

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

DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ
ANTITUBERKULOTIKA

HRADEC KRÁLOVÉ, 2006

RUDOLF BRUNER

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

OBSAH

1	ÚVODNÍ ČÁST	4
1.1	TUBERKULÓZA.....	4
1.1.1	<i>Epidemiologie tuberkulózy</i>	4
1.1.2	<i>Etiologie tuberkulózy</i>	6
1.1.3	<i>Přenos a rozvoj infekce</i>	7
1.1.4	<i>Prevence tuberkulózy</i>	8
1.1.5	<i>Diagnostika tuberkulózy</i>	9
1.2	TERAPIE TUBERKULÓZY	10
1.2.1	<i>Současné trendy v terapii</i>	10
1.2.2	<i>Zásady terapie</i>	10
1.2.3	<i>Rezistence na terapii</i>	11
1.2.4	<i>Monitorování terapie</i>	11
1.3	CHEMICKÉ STRUKTURY A FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI ANTITUBERKULOTIK	12
1.3.1	<i>Antituberkulotika první volby</i>	12
1.3.2	<i>Antituberkulotika druhé volby</i>	15
1.3.3	<i>Potenciální antituberkulotika</i>	21
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	24
3	TEORETICKÁ ČÁST	25
3.1	VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA	25
3.2	PŘÍPRAVA N-OXIDŮ PYRAZINU	27
3.3	HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA.....	28
3.4	PŘÍPRAVA ACYLHALOGENIDŮ	28
3.5	PŘÍPRAVA ANILIDŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	POUŽITÉ METODY, PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	32
4.2	SCHEMA PROVÁDĚNÝCH REAKCÍ.....	33
4.2.1	<i>Syntéza výchozích substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin</i>	33
4.2.2	<i>Syntéza chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin</i>	34
4.2.3	<i>Syntéza anilidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin</i>	34
4.3	OBECNÝ POSTUP PŘÍPRAVY	35
4.3.1	<i>Příprava chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin</i>	35
4.3.2	<i>Příprava anilidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin</i>	35
4.4	PRINCIPY BIOLOGICKÉHO HODNOCENÍ	36
4.4.1	<i>Antituberkulotická aktivita</i>	36
4.4.2	<i>Antimykotická aktivita</i>	37
4.4.3	<i>Herbicidní aktivita</i>	38
5	VÝSLEDKY DIPLOMOVÉ PRÁCE	39
5.1	NOVĚ PŘIPRAVENÉ LÁTKY A JEJICH ANALYTICKÁ DATA.....	39
5.2	LIPOFILITA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK	45
5.3	VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTITUBERKULOTICKÉ AKTIVITY.....	47
5.4	VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTIMYKOTICKÉ AKTIVITY	48
5.5	VÝSLEDKY HODNOCENÍ HERBICIDNÍ AKTIVITY	49
6	DISKUSE	50
7	ZÁVĚR	52
8	LITERATURA	53

1 Úvodní část

1.1 Tuberkulóza

1.1.1 Epidemiologie tuberkulózy

Tuberkulóza (TBC), způsobená *Mycobacterium tuberculosis*, která se vyvinula z půdní bakterie před více než 10 000 lety, se stává ve 21. století jednou z hlavních příčin úmrtnosti po celém světě. V padesátých létech minulého století se podařilo užíváním běžných chemoterapeutik proti tuberkulóze snížit počet případů nakažených o 75%, což vedlo k závěru, že by tuberkulóza mohla být úplně eradikována do roku 2010. Avšak od roku 1985 naopak došlo k nárůstu počtu infikovaných až k epidemickým rozměrům. V současnosti se toto infekční onemocnění, postihující především dýchací systém, vyskytuje přibližně u 32% lidské populace. V této skupině se asi u 8 milionů jedinců projeví onemocnění v aktivní formě a pro téměř 2 miliony lidí je smrtelné.^{1,2}

Tuberkulóza je problémem hlavně v rozvojových zemích, na které připadá 95% všech případů. To je způsobeno zejména vysokou hustotou populace, špatnými hygienickými podmínkami a nedostatečnou zdravotnickou péčí. Největší výskyt případů tuberkulózy, asi 33% z celkově nakažené populace, připadá na oblast jihovýchodní Asie. Největší počet nakažených v porovnání s počtem obyvatelstva je ale ve střední Africe, a to 350 případů na 100 000 obyvatel, což je více než dvojnásobek v porovnání s jihovýchodní Asií.^{1,3}

Velkým problémem se stává kombinace tuberkulózy s onemocněním AIDS, jehož původce (HIV) oslabuje imunitní systém. U pacientů nakažených tuberkulózou a zároveň HIV pozitivních je několikanásobně větší pravděpodobnost vývinu aktivní tuberkulózy než u pacientů HIV negativních. Hlavní příčinou úmrtí pacientů s AIDS je právě tuberkulóza, jedná se přibližně o 13% ze všech úmrtí.³

Za posledních 40 let se stal velice významným faktorem pro šíření tuberkulózy také vzrůstající pohyb lidí, a to zejména uprchlíků. Tuberkulóza se nejvíce objevuje v uprchlických táborech a odhaduje se, že přes 50% všech uprchlíků je nakaženo tuberkulózou. Tato skupina lidí je neustále v pohybu, což komplikuje terapii, jejíž délka je minimálně 6 měsíců.²

Předpokládá se, že do roku 2020 dosáhne počet nově infikovaných jedinců 1 miliardy, aktivní forma tuberkulózy se projeví u 200 milionů jedinců a 35 milionů lidí zemře na následky tuberkulózy.²

Obr. č. 1: Počet případů onemocnění tuberkulózou na konci 20.stol. v jednotlivých světadílech²



Obr. č. 2: Počet případů úmrtí na tuberkulózu na konci 20. stol. v jednotlivých světadílech²



V roce 1991 byl pod Světovou zdravotnickou organizací (WHO) vytvořen projekt pro přímou kontrolu nad průběhem terapie, tzv. DOTS (Directly Observed Treatment Short-course). Jeho úkolem je kontrola epidemie tuberkulózy a zamezení rozšíření rezistentních kmenů. Hlavním cílem je diagnostikovat tuberkulózu co nejdříve a ihned začít s léčbou. Spočívá ve standardizovaných krátkodobých chemoterapeutických režimech aplikovaných za individuální péče o každého nemocného. Po 6 měsících terapie se provádí kontrola, zda byla

nemoc úspěšně vyléčena. DOTS se podílí na více než 95% terapií tuberkulózy, a to především v rozvojových zemích. Velkou úlohu hraje také v boji proti rozvoji multirezistence tuberkulózy tím, že dohlíží na dodržování terapeutických režimů.²

1.1.2 Etiologie tuberkulózy

Pro člověka je nejvýznamnější *Mycobacterium bovis* a především *Mycobacterium tuberculosis*, která je příčinou většiny infekcí. Vzácnější je *Mycobacterium africanum*, která se vyskytuje jen ve střední Africe. U HIV pozitivních jedinců se objevily další atypické kmeny mycobacterium, vyvolávající oportunní infekce.

Všechny mykobakterie jsou grampozitivní, aerobní, acidorezistentní, velmi pomalu rostoucí, nepohyblivé tyčky o velikosti 0,3-1,5 μ m s vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně. Tyto mikroorganismy jsou extrémně citlivé na teplo a světlo, ale velice odolné vůči chladu a suchu a jsou schopny přežít i několik dní mimo hostitele, například v hlenu.^{2, 4}

Obr. č. 3: Fotografie *Mycobacterium tuberculosis*⁴



Mycobacterium tuberculosis objevil německý vědec Robert Koch v roce 1882. Mezi její obranné mechanismy patří vysoce hydrofobní stěna neprostupná pro mnohá léčiva, velice účinný efluxní systém, produkce enzymů (β -laktamasy, aminoglykosidacyltransferasy), inaktivujících léčiva nebo schopnost mutace bakteriálního chromozomu, která vede ke vzniku rezistentních kmenů.¹

Asi největší problém představuje právě její hydrofobní obal, ten tvoří celkem tři struktury: plasmová membrána, buněčná stěna a pouzdro. Klíčem k jeho odolnosti je buněčná stěna, která je dvojvrstvá a vyznačuje se velmi nízkou permeabilitou. Tvoří ji tzv. mykolol arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex. Skládá se z vrstvy peptidoglykanu, který je pomocí diglykosylfosforylového můstku spojený s arabinogalaktanem vázajícím rozlehlé mykolové kyseliny, to jsou α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny obsahující 60 až 90 atomů uhlíku.¹

Problém, který v současnosti nabývá velkého významu je rovněž vzrůstající rezistence na terapii. Ta vzniká v těch případech, kdy rezistentní kmeny mykobakterií přerostou kmeny citlivé. Rezistence může být na jedno nebo i na více antituberkulotik současně, tzv. multirezistence, ta vzniká obvykle po neúspěšné terapii. Rezistentní kmeny vznikají náhodnou genetickou mutací bakteriálního chromozomu ještě před kontaktem mykobakterie s léčivem. Teoreticky může vzniknout rezistence na jakémkoliv antituberkulotikum, ale v praxi je rezistence na některá antituberkulotika častější než na jiná. Například rezistence *Mycobacterium tuberculosis* na isoniazid se objevuje v průměru $2,56 \times 10^{-8}$ mutací na bakterii na generaci. Očekávaný poměr rezistentních mykobakterií a citlivých bakterií u neléčené populace je 1:10⁶ pro isoniazid a streptomycin, 1:10⁸ pro rifampicin a 1:10¹⁴ pro rezistenci na isoniazid i rifampicin. Důvody vzniku rezistence jsou zejména chybná terapie, obvykle jen jedním antituberkulotikem, chybně zvolený léčebný režim a také nedodržení léčby pacientem. Tímto způsobem se postupně usmrtí citlivé kmeny, ale zároveň se pomnoží kmeny odolné. Ty mohou dále mutovat a vznikají tak dvojitě rezistentní kmeny, jejichž přítomnost byla dříve velmi nepravděpodobná.⁵

V poslední době byly nově objeveny další zbraně *Mycobacterium tuberculosis*. Jedna z nich například způsobuje vysokou virulenci. Imunitní systém pomocí T-lymfocytů značí mykobakterie proteiny C2a, které navedou makrofágy. Poté, co jsou mykobakterie pohlceny, C2a odpadá a ztrácí pro tělo význam. Tento C2a protein však dokáže využít ve svůj prospěch i sama mykobakterie, která díky němu získá schopnost přilnout k makrofágu a tím tak narůstá její virulence. Putující makrofágy tak mykobakterie v lidském těle více rozšíří.

Také schopnost perzistovat v těle člověka po dlouhou dobu v tzv. latentní formě je pro tyto mikroorganismy typická. Vysvětlením by mohl být enzym isocitrátlyasa, který mykobakterie produkují a který jim umožňuje využívat mastné kyseliny jako zdroj energie. Tato skutečnost má také spojitost s odpovědí imunitního systému na infekci. Mykobakterie totiž dokáží přeprogramovat metabolismus makrofágů na metabolismus mastných kyselin. Makrofágové však neumí vytvořit isocitrátlyasu, takže nakonec mastné kyseliny nezpracují a hynou.²

1.1.3 Přenos a rozvoj infekce

Zdrojem tuberkulózy je nemocný. Základní cesta přenosu infekce je inhalací kontaminovaných kapének (*Mycobacterium bovis* může být také přenesena kontaminovaným mlékem). Kýchním, kašláním nebo jen mluvením rozšiřují lidé s plicní či laryngeální

tuberkulózou do prostoru kapénky s mykobakteriemi, které se ve vzduchu udrží i několik hodin. Po vdechnutí druhou osobou mykobakterie dosáhnou plicních alveol a vzniká nová infekce.

Přenos závisí především na čtyřech faktorech:

1. infekčnost nakažené osoby, tj. do jaké míry je schopna kontaminovat okolní vzduch
2. prostředí, ve kterém se kapénky šíří
3. délka expozice druhé osoby
4. virulence toho konkrétního kmenu mykobakterie

Multirezistentní tuberkulóza se šíří stejným způsobem. Doba infekčnosti první osoby je však díky neúspěšné terapii mnohem delší. Nejlepší způsob, jak omezit přenos infekce, je izolace nakaženého pacienta a ihned začít terapii.^{2, 6}

Poté, co jsou životaschopné mykobakterie inhalovány, jsou označeny antigeny, které tvoří T-lymfocyty, a pohlceny plicními makrofágy. Ty je však nejsou schopny všechny zničit, některé mykobakterie přežívají a po smrti makrofága jsou opět uvolněny. Takto se mykobakterie velice rychle pomnoží a lymfou nebo krevní cestou napadají další orgány. Tuberkulóza postihuje hlavně plíce, ledviny, mozek a kosti.²

Kumulace mykobakterií v makrofázích způsobí vznik tuberkulózních uzlíků (primárního komplexu). Tato fáze je také někdy označována jako primární infekce a často probíhá asymptomaticky. Druhou fází je postprimární infekce, která se může objevit hned nebo i po několika letech při oslabení imunitního systému jinou příčinou. Tato fáze je již výrazně symptomatická. K příznakům patří dlouhotrvající kašel, febrilie, únavnost, hubnutí a chrlení krve. Onemocnění má zpravidla chronický ráz, u mladších dospělých může probíhat rychle s infaustní prognózou.^{2, 6}

Infikovaný jedinec, u něhož se neprojevila aktivní forma tuberkulózy, nemůže nakazit ostatní.²

1.1.4 Prevence tuberkulózy

Pro prevenci vzniku tuberkulózy má největší význam očkování BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) vakcínou, kterou tvoří oslabený kmen *Mycobacterium bovis*. Vakcinace snižuje riziko vzniku onemocnění, ale zabraňuje hlavně vzniku generalizovaných forem. V České republice je vakcinace povinná a provádí se 3.-5. den po narození s revakcinací v 11 letech.⁷

V oblasti vakcinace probíhá v současnosti vývoj čtyř nových skupin vakcín. Mezi ně patří atenuované kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, vakcinace proteinovými subjednotkami, vakcíny na bázi nukleových kyselin a také se pracuje na vylepšení dnes jediné užívané vakcíny BCG.¹

V prevenci je rovněž důležitá izolace léčených pacientů a bakteriologické vyšetření po skončení terapie. Také se užívá chemoprophylaxe isoniazidem. Cílem chemoprophylaxe je zabránit onemocnění za určitých rizikových situací, zejména při terapii imunosupresivy, onemocnění silikozou, chronická renální insuficience, dekompenzovaný diabetes, nemocní s AIDS.⁷

1.1.5 Diagnostika tuberkulózy

V diagnostice TBC se využívají metody:

1. bakteriologické vyšetření sputa
2. rentgenové vyšetření hrudníku případně dalších postižených orgánů
3. tuberkulinový test, tuberkulin je očištěná bílkovina *Mycobacterium tuberculosis*, ta se vstříkuje pod kůži, reakce se odečítá za 72 hodin (vzhledem k očkování celé populace je tento test v České republice pouze orientační)
4. histologické vyšetření
5. v úvahu nutno brát epidemiologické souvislosti a predisponující faktory (diabetes mellitus, imunodeficience, imunosuprese)
6. mezi pomocné metody dále patří: bronchoskopie, bronchografie, vyšetření krve, moči a imunologická vyšetření⁷

1.2 Terapie tuberkulózy

1.2.1 Současné trendy v terapii

Terapie se zahajuje útočnou (iniciální) fází, která zpravidla trvá dva měsíce a spočívá v kombinaci 3 - 4 léků. Dochází k podstatné eliminaci mykobakterii a k zahájení reparačních procesů. Mezi základní antituberkulotika zařazujeme isoniazid (INH), rifampicin (RMP), pyrazinamid (PZA), streptomycin (STM) a etambutol (EMP). Nemocní jsou obvykle hospitalizováni a léky dostávají denně.

Pokračující léčba (zajišťující) zahrnuje podávání 2 přípravků po dobu čtyř až šesti měsíců s cílem postihnout maximální množství patogenů méně metabolicky aktivních a inaktivních po jejich návratu do růstové fáze. Léky jsou aplikovány podle závažnosti onemocnění denně nebo intermitentně, a to ambulantně.^{7, 8}

Standardní terapeutický režim aktivní formy tuberkulózy je léčba INH, RIF, PZA po dva měsíce a poté čtyři měsíce léčba INH a RIF. U pacientů s latentním stádiem TBC, tj. pozitivní tuberkulinový test, ale žádné klinické příznaky, se doporučuje chemoterapie, spočívající v každodenním užíváním isoniazidu po dobu šesti měsíců.²

Nové přístupy k terapii tuberkulózy slibují zkrácení doby léčby. 16. listopadu 2005 byly na konferenci 45 th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy in Washington, D.C. prezentovány výsledky nových farmakoterapeutických postupů v léčbě tuberkulózy, zejména nové využití gatifloxacinu. Tyto studie jsou v rámci WHO součástí programu: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Současná kombinace základními antituberkulotiky vyžaduje délku terapie minimálně šest měsíců. Nové výzkumy však dokazují, že po nahrazení etambutolu gatifloxacinem se tato doba zkrátí na čtyři měsíce. Pokud budou výsledky i nadále pozitivní, uvedený postup bude zaveden již v roce 2009.⁹

1.2.2 Zásady terapie

Při léčbě tuberkulózy je nutné dodržet tyto základní pravidla:

1. podávání léčiv v kombinaci (z důvodu zabránění rezistence)
2. podávání léčiv v jedné denní dávce (musí se dát čas mykobakteriím na pomnožení, v této fázi je léčba nejefektivnější)
3. léčiva nutno podávat dlouhodobě (nevysazovat léčivo po odeznění symptomů)⁷

1.2.3 Rezistence na terapii

Z hlediska terapie lze rezistenci dělit na dva typy: primární a sekundární. Primární rezistence se objevuje u pacientů, kteří ještě nebyli léčeni a byli tedy infikováni již rezistentními kmeny. Sekundární rezistence, někdy také nazývaná získaná rezistence, se objevuje u pacientů, kteří jsou léčeni chybným terapeutickým režimem nebo terapii správně nedodrží.

Řešení pro vzniklou rezistenci může být použití kombinace antituberkulotik nebo užití atypických antituberkulotik, ty jsou však dražší a obvykle způsobují vážnější nežádoucí účinky než běžná antituberkulotika. Také délka terapie se v těchto případech prodlužuje až na 18-24 měsíců. Lépe je rezistenci předcházet, což lze například tím, že se účinnost daného léčiva ověří *in vitro* ještě před začátkem terapie.²

1.2.4 Monitorování terapie

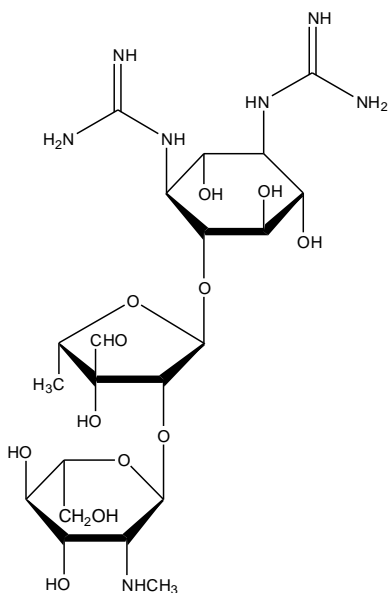
V případě plicní tuberkulózy je nejvýhodnějším ukazatelem úspěšnosti terapie mikrobiologické vyšetření sputa kultivací. U pacientů léčených režimem zahrnujícím terapii rifampicinem a současně isoniazidem by se měla infekčnost úplně potlačit během dvou týdnů. Pokud však mikrobiologický test prokáže opak, je infekce způsobená rezistentními mykobakteriemi nebo se tyto mykobakterie rezistentními staly. Avšak ve většině těchto případů bývá příčina jiná, a to noncompliance pacienta. Pokud tedy zvolený terapeutický režim vede k úspěšné léčbě, největší hrozbou se pro něj stává sám pacient nedodržením terapie. Jednou z možností jak kontrolovat compliance pacienta je sledování jeho moče, kterou rifampicin zbarví do červena za čtyři hodiny po jeho podání. Velice rozšířen je také rentgen plic, ale tato metoda z hlediska sledování průběhu terapie již poskytuje informaci daleko méně.¹⁰

Podávání isoniazidu, rifampicinu i pyrazinamidu je také spojeno s rizikem hepatotoxicity, proto je nutné před zahájením i během terapie provádět vyšetření jaterních funkcí. S ohledem na kinetiku antituberkulotik je rovněž nutné sledovat i funkci ledvin. Při porušené funkci ledvin je nutné upravit dávkování, zejména u streptomycinu a etambutolu. Při terapii etambutolem se také provádí oční vyšetření.⁸

1.3 Chemické struktury a farmakologické vlastnosti antituberkulotik

1.3.1 Antituberkulotika první volby

Streptomycin

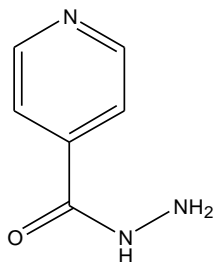


Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované ze *Streptomyces griseus*. Jeho molekulu tvoří tři hlavní struktury: streptidin, streptáza a N-methyl-L-glukosamin. Pro svou nízkou absorpci z gastrointestinálního traktu je podáván intramuskulární nebo velice zřídka intratekální cestou. Působí baktericidně. Jde o antituberkulotikum první řady a pro rychlý rozvoj rezistence se používá v kombinaci. Kromě *Mycobacterium tuberculosis* je účinný i proti jiným patogenům, např. *Brucella spp.*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas mallei*, *Listeria monocytogenes*, *Streptobacillus moniliformis*, *Spirillum minus*.^{1, 11, 12}

Mechanismus jeho účinku spočívá v penetraci do vnitřní membrány *Mycobacterium tuberculosis* a následné vazbě na 30s podjednotku ribozomů.¹

Jeho velkou nevýhodou je častá manifestace nežádoucích účinků z důvodů vysokých dávek. Jsou to hlavně různé alergické reakce a toxické působení na periferní a centrální nervový systém, zejména na osmý kraniální nerv.¹

Isoniazid

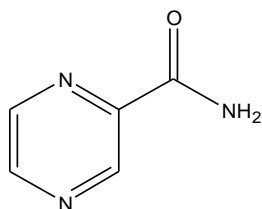


Isoniazid je hydrazid kyseliny isonikotinové. Působí baktericidně na extra- i intracelulární aktivně rostoucí *Mycobacterium tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky. Vzhledem k poměrně rychlému vzniku rezistence mykobakterii se používá v kombinaci s ostatními antituberkulotiky.^{11, 12}

V mykobakterii je oxidován na kyselinu isonikotinovou za účasti enzymů katalasy a peroxidasy, obsažených v cytoplazmě. Kyselina isonikotinová pro svůj silný negativní náboj obtížně opouští buňku, proto se v ní kumuluje a zasahuje do metabolismu kyseliny nikotinové. Také inhibuje biosyntézu buněčné stěny, resp. mykolických kyselin, ovlivněním enzymu mykolátsyntetasy.¹³

Je výrazně hepatotoxický (hlavně v kombinaci s rifampicinem) a neurotoxický. Popisovány jsou také gastrointestinální potíže jako anorexie, nauzea, zvracení a také různé kožní projevy jako ekzémy nebo prurigo. Výjimečně se může objevit i anémie nebo leukémie. Podávání isoniazidu vede k deficitu pyridoxinu, proto se doporučuje současně podávat pyridoxin pro snížení neurotoxicity isoniazidu.¹¹

Pyrazinamid

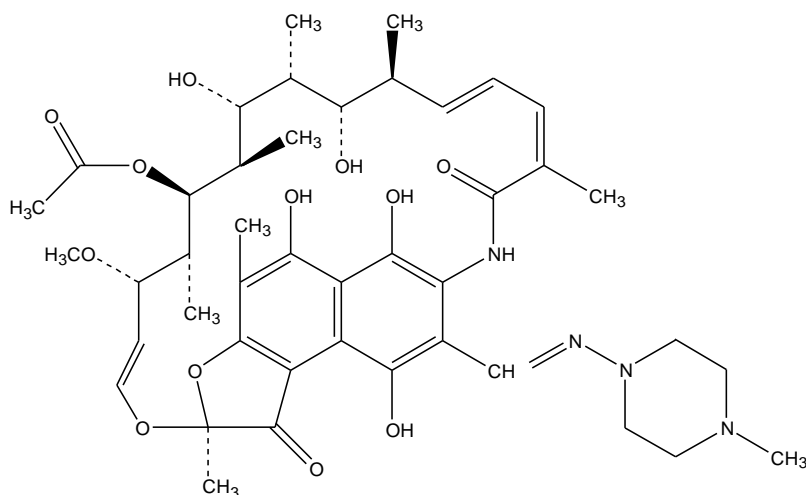


Pyrazinamid je strukturálním analogem nikotinamidu. Působí baktericidně na *Mycobacterium tuberculosis*, zatímco *Mycobacterium bovis* a jiní atypičtí původci jsou rezistentní. Jeho význam spočívá zejména v nasazení v iniciálních fázích terapie, jelikož zkracuje potřebnou délku léčení. Vykazuje synergismus s INH a RMP a zkracuje tak terapii na šest měsíců.^{1,13, 12}

Je aktivní při slabě kyselém pH. Po proniknutí do mykobakterie je enzymem amidasou transformován na účinnou formu pyrazinkarboxylovou kyselinu, která je vysoce specifická k *Mycobacterium tuberculosis*.¹

Nežádoucí účinky zahrnují především hepatotoxicitu v závislosti na dávce. Jsou popisovány i výskyty dny, porfýře, horečky, myalgie, kožních alergických reakcí a zažívací obtíže.¹¹

Rifampicin

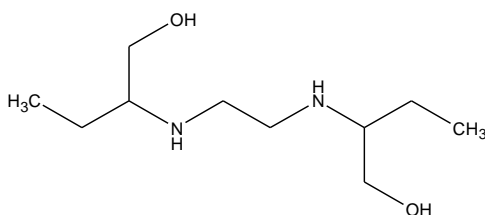


Antibiotikum s úzkým antimikrobiálním spektrem působící bakteriostaticky, ve vyšších dávkách baktericidně. Patří do skupiny polysyntetických antibiotik odvozených od rifamycinu B izolovaného z *Streptomyces mediterrani*. Jeho charakteristickou strukturou je chromoforické naftochinonové seskupení s dlouhým alifatickým přemostěním. Je indikován nejen v léčbě tuberkulózy, ale i v dalších především stafylokokových infekcích.^{1,11,12}

Mechanismem účinku je inhibice prokaryotické DNA dependentní RNA polymerasy vazbou na její β -podjednotku. Výsledkem je inhibice syntézy RNA. Lidské enzymy tato látka neinhibuje. Rifampicin je velice lipofilní, díky čemuž dobře prochází přes mykobakteriální stěnu.¹

Nevýhodou je rychlý vznik rezistence, proto je nutná kombinace s isoniazidem nebo etambutolem. Kombinace rifamycinu s isoniazidem ale na druhé straně zvyšuje riziko hepatotoxicity.¹

Etambutol



Etambutol je syntetický aminoalkohol (ethylen-diamino-di-1-butanol) působící bakteriostaticky na většinu kmenů *Mycobacterium*. Ve své struktuře má dva chirální uhlíky, přičemž S,S uspořádání je asi 600x účinnější než R,R. Indikací je kombinační léčba plicní tuberkulózy, zejména s isoniazidem a streptomycinem. Působí pouze na aktivně rostoucí kmeny.^{1,11,12}

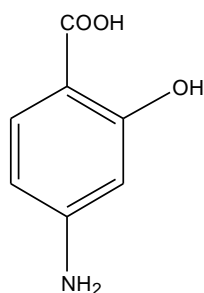
Mechanismem účinku je inhibice syntézy proteinů a nukleových kyselin. Narušuje také biosyntézu arabinogalaktanu, který je součástí buněčné stěny mykobakterii, a tím přispívá ke zvýšení její permeability pro ostatní léčiva.¹

Z nežádoucích účinků je nejzávažnější retrobulbární neuritida s poruchou vnímání zelené barvy, proto se doporučují oftalmologické kontroly během léčby. Také může dojít k zhoršení zrakové ostrosti.¹¹

1.3.2 Antituberkulotika druhé volby

Užívají se méně často a terapie těmito látkami je obvykle provázena větším výskytem nežádoucích účinků.

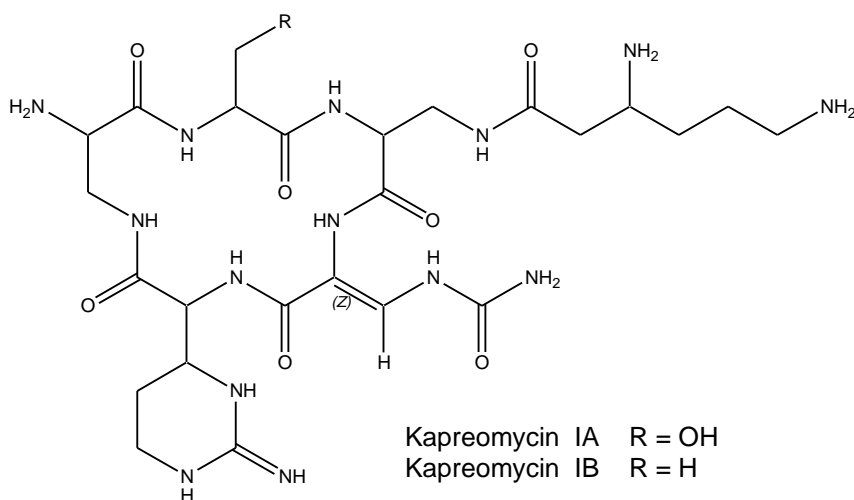
Kyselina p-aminosalicylová



Struktura kyseliny p-aminosalicylové vykazuje významnou podobnost s kyselinou p-aminobenzoovou (PABA). Mechanismus účinku spočívá právě v kompetici s PABA, to má za následek inhibici syntézy kyseliny listové, podobně jako je tomu u sulfonamidů. Receptory

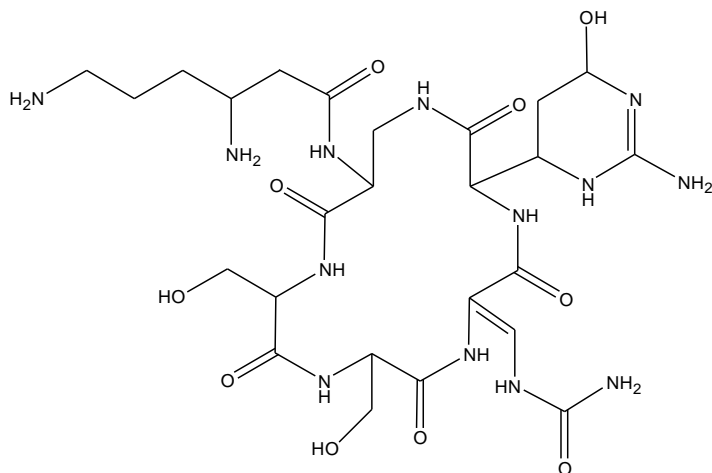
pro PABA musí být značně specifické, protože kyselina p-aminosalicylová je proti většině bakterií neúčinná, a naopak sulfonamidy nepůsobí na mykobakterie. Kyselina p-aminosalicylová byla dříve používána při dlouhodobé léčbě tuberkulózy společně s isoniazidem a streptomycinem. Nyní je její použití v terapii velmi omezené vzhledem k vysokému výskytu nežádoucích účinků. Jsou to zejména gastrointestinální obtíže, poruchy ledvin a jater, bolest kloubů a neurologické poruchy.^{14, 12}

Kapreomycin



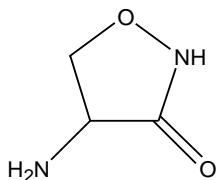
Kapreomycin je polypeptidové antibiotikum, získávané ze *Streptomyces capreolus*. Jeho použití je méně časté a pouze v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Ve vyšších dávkách se u něj vyskytují projevy toxicity: poškození ledvin, vedoucí k retenci dusíku, poškození osmého nervu, vedoucí k hluchotě a vestibulárním poruchám. Podává se intramuskulárně.^{14, 12}

Viomycin



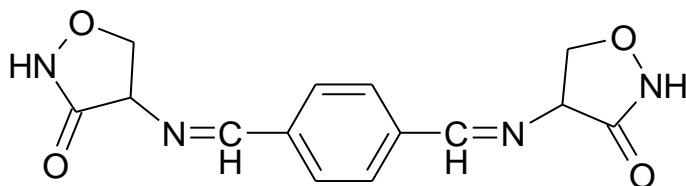
Viomycin je antibiotikum produkované určitými kmeny *Streptomyces*. Je to komplexní bazický polypeptid. Jeho nevýhodou je rezistence mykobakterií na viomycin, která se rozvíjí velice rychle. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky spojené s terapií viomycinem patří: poškození ledvin a osmého nervu, které vede ke ztrátě rovnováhy a hluchotě. Tyto účinky jsou u viomycinu výraznější než u streptomycinu.^{14, 12}

Cykloserin



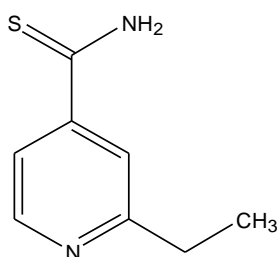
Cykloserin je antibiotický analog D-alaninu, který inhibuje alaninracemasu, brání tak využití alaninu při stavbě buněčné stěny. Dříve se užíval při infekcích močového ústrojí. Nejzávažnější nežádoucí reakce jsou různé dysfunkce centrálního nervového systému a psychotické reakce, některé z nich mohou být zvládnuty fenytoinem. Z těchto důvodů je dnes jeho význam v terapii tuberkulózy velmi malý.^{13,14, 12}

Terizidon



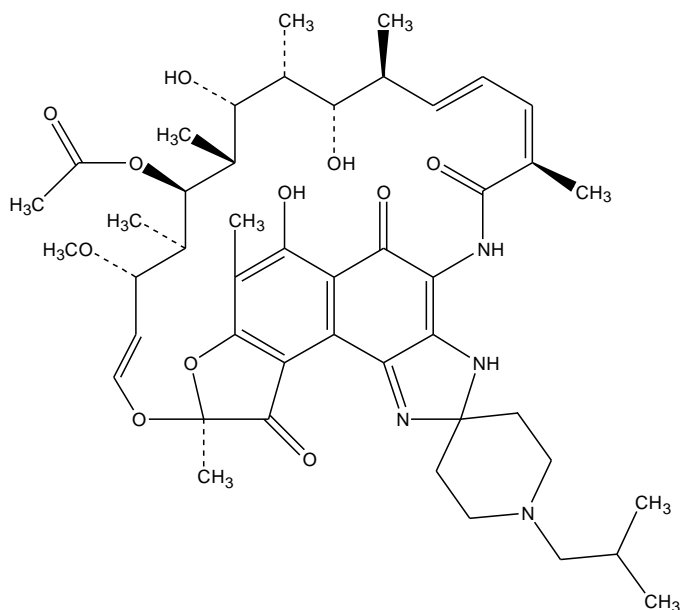
Terizidon obsahuje v molekule dva cykloserinové podíly. Tato látka je proléčivem cykloserinu a má tedy ve výsledném efektu stejné projevy. Opět se zde objevují nežádoucí účinky na centrální nervový systém, proto je rovněž v terapii tuberkulózy řazena mezi rezervní léčiva.¹³

Ethionamid



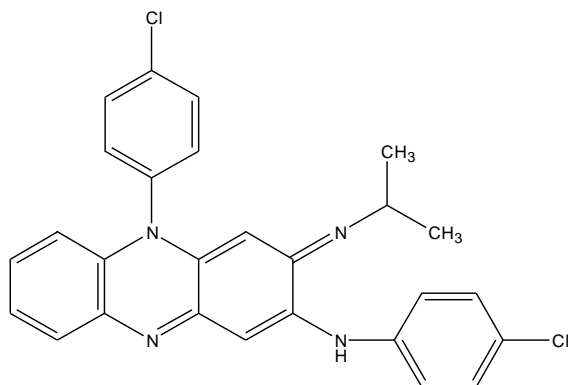
Ethionamid je chemicky příbuzný isoniazidu. Je zajímavé, že i přes tuto podobnost není rezistence vůči isoniazidu zkřížená. Bohužel rezistence mykobakterii na ethionamid vzniká velice rychle. Ve vyšších dávkách se projeví výrazné nežádoucí účinky, zejména silné dráždění žaludku a neurologické poruchy.^{14, 12}

Rifabutin



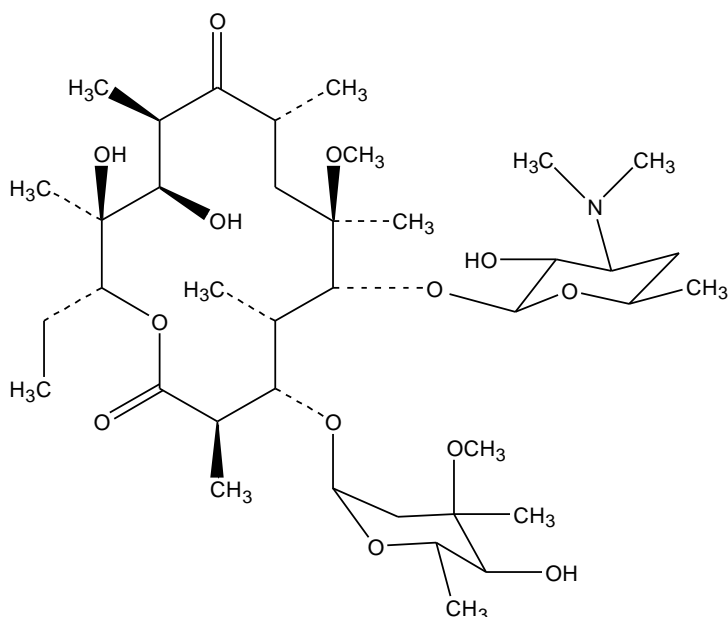
Rifabutin je bakteriostatické antibiotikum odvozené od rifamycinu a je příbuzné rifampicinu. Užívá se u infekcí multirezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis*, dále u HIV pozitivních nemocných s infekcí *Mycobacterium avium*.^{8, 12}

Klofazimin



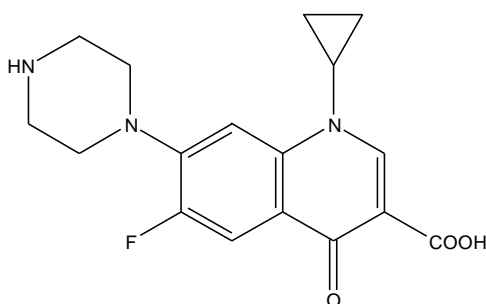
Klofazimin je fenazinové barvivo. Jeho mechanismus účinku zřejmě souvisí s vazbou na DNA. Klofazimin je podáván zejména v terapii lepry, ale také se používá v kombinované terapii mykobakteriálních infekcí u pacientů s AIDS, vyvolaných zejména *Mycobacterium avium-intracellulare*.^{14, 12}

Klarithromycin



Klarithromycin patří do skupiny makrolidových antibiotik, která se také v některých případech používají v terapii tuberkulózy. Do této skupiny patří i roxithromycin, azithromycin nebo rokitamycin. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici proteosyntézy, vazbou na 50s podjednotku ribozomů, tím zastavuje růst mykobakterii. Používají se pouze v kombinované terapii.^{1, 12}

Ciprofloxacin

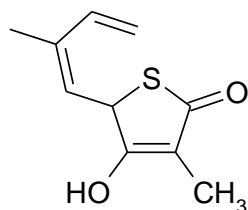


V terapii tuberkulózy se také uplatňují některé fluorochinolony, vycházející z kyseliny nalidixové. Vedle ciprofloxacinu zde mají význam i ofloxacin, levofloxacin nebo moxifloxacin. Mechanismem účinku je inhibice DNA-gyrasy a DNA-topoizomerasy IV. Ve výsledném efektu působí baktericidně. Jsou používány opět pouze v kombinacích.^{1, 12}

1.3.3 Potenciální antituberkulotika

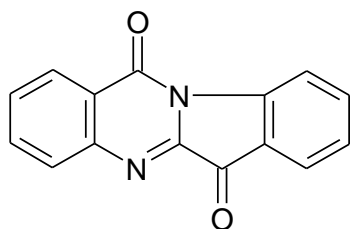
V současné době jsou v různých stádiích vývoje další látky, které vykazují antituberkulotickou aktivitu a které by mohly v budoucnu významně přispět v terapii tuberkulózy. Mezi ně patří například:

Thiolaktomycin



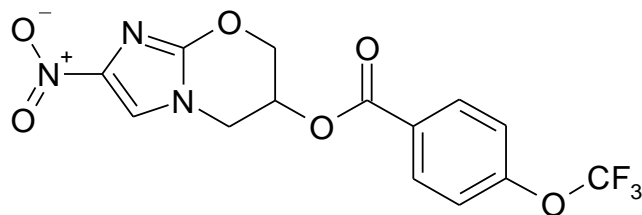
Tato látka patří do skupiny thiolaktonů. Její antituberkulotická aktivita spočívá v inhibici biosyntézy mykolových kyselin, které jsou součástí buněčné stěny mykobakterií. Avšak, vzhledem k nedostatku informací o její *in vivo* toxicitě či *in vitro* cytotoxicitě, nelze říci, jestli její minimální inhibiční koncentrace (MIC) 5 μg/ml nepřesáhne toxickou hladinu.¹

Tryptanthrin



Strukturálně se jedná o indolylchinazolinový alkaloid. Vykazuje účinek proti multirezistentním kmenům mykobakterií, avšak i zde nejsou ještě známy výsledky testů na toxicitu. MIC se v tomto případě pohybuje v rozmezí 0,5 – 1,0 μg/ml.¹

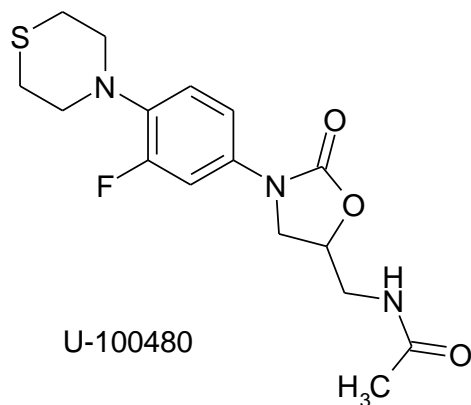
Nitroimidazofurany, nitroimidazopyrany



PA-824

V průběhu užívání nitroimidazofuranů v oblasti chemoterapie rakoviny byla zjištěna i antituberkulotická aktivita, avšak vzhledem k jejich mutagenním vedlejším účinkům se jako antituberkulotika neprosadily. Jinak je tomu u příbuzné skupiny látek, u bicyklických nitroimidazopyranů. Patří sem například látka označovaná PA-824, která vykazuje účinek jak na rostoucí, tak na latentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis*. Mechanismy účinku jsou inhibice proteosyntézy a inhibice syntézy lipidů buněčné stěny. Její MIC se pohybuje v rozmezí 0,015 – 0,25 µg/ml.¹

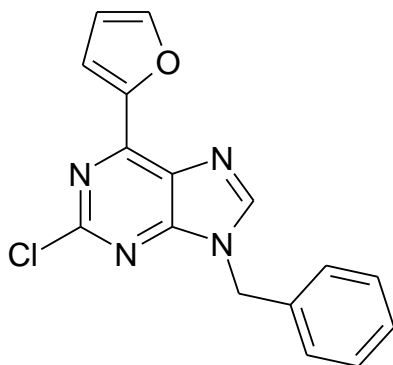
Oxazolidinony



U-100480

Oxazolidinony vykazují antibiotickou aktivitu, vycházející z jejich schopnosti inhibice proteosyntézy. Patří sem i látka označovaná jako U-100480, která je účinná i proti *Mycobacterium tuberculosis*. Při testech na laboratorních potkanech však byla prokázána toxicita, která vedla k dalším obměnám struktury. Ve fázi klinických zkoušek není zatím žádná z těchto látek.¹

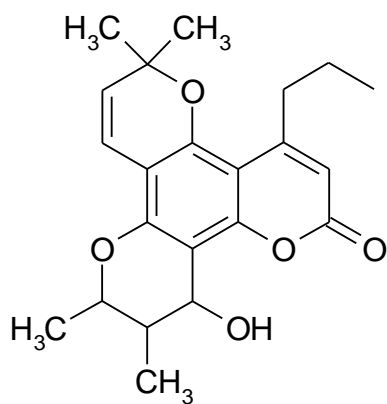
Puriny



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

Zajímavými látkami s antituberkulotickými účinky jsou i 9-benzylpuriny substituované v polohách 2, 6 a 8. Mezi látky s největší aktivitou patří 9-benzylpurin substituovaný chlorem v poloze 2 a furan-2-ylem v poloze 6.¹

Benzopyran-2-ony



Calanolid A

Benzopyran-2-ony byly původně testovány na aktivitu proti viru HIV. U některých však byla zjištěna i antituberkulotická aktivita. Jednou z těchto látek je calanolid A.¹

2 Cíl diplomové práce

Vzhledem k celosvětově zvyšujícímu se počtu případů onemocnění tuberkulózou a nárůstu výskytu rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* vzniká v současnosti potřeba vývoje nových antituberkulotik. Požadavky na tato léčiva jsou zejména: nové mechanismy účinku, které by zajistily odolnost vůči rezistentním kmenům, nízký výskyt nežádoucích účinků, který by zvýšil compliance pacientů a snížil rizika terapie, a také vyšší účinnost, která by vedla ke zkrácení terapie. Nová léčiva musí být schopna nahradit ta stávající.¹⁵

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciální antimykobakteriální a antifungální aktivitou nebo inhibiční aktivitou na fotosyntézu.¹⁶

V rámci své diplomové práce jsem se zaměřil na přípravu biologicky (antimykobakteriálně, doplňkově i antifungálně a herbicidně) aktivní deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Tato práce navazuje na výsledky, prezentované na fakultním kole Studentské vědecké konference v roce 2005. Některé z mých výsledků byly také zveřejněny formou plakátových sdělení na odborných konferencích.^{15, 17, 18}

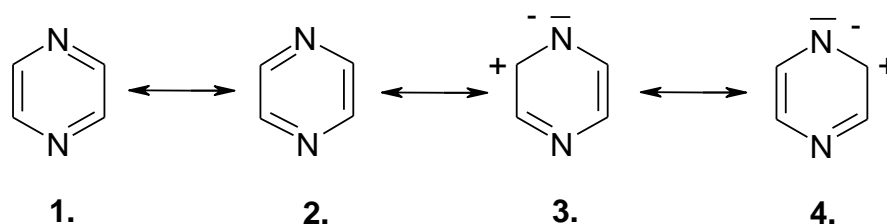
Mé úkoly byly následující:

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

3 Teoretická část

3.1 Vlastnosti pyrazinového jádra

Pyrazin, 1,4-diazin, je vysoce symetrickou molekulou. Pyrazinové jádro je planární útvar, který může být znázorněn jako rezonanční hybrid několika základních struktur (1.-4.).



Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů. Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base, která je v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem bází nejslabší.¹⁹

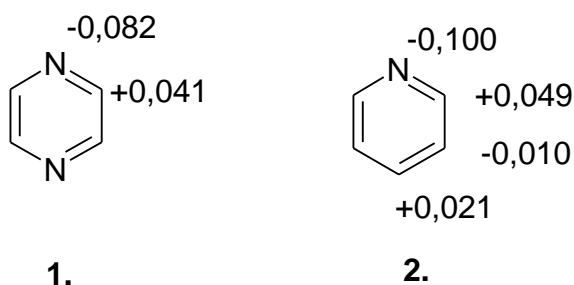
Tabulka č.1: Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly²⁰

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

Tabulka č.2: Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů¹⁹

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.^{21, 22, 23}



Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivňuje geometrii molekuly.²⁰

Pyrazin, stejně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním 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. Mnohem lépe však probíhají substituce nukleofilní, zvláště v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na N-oxid.²⁴

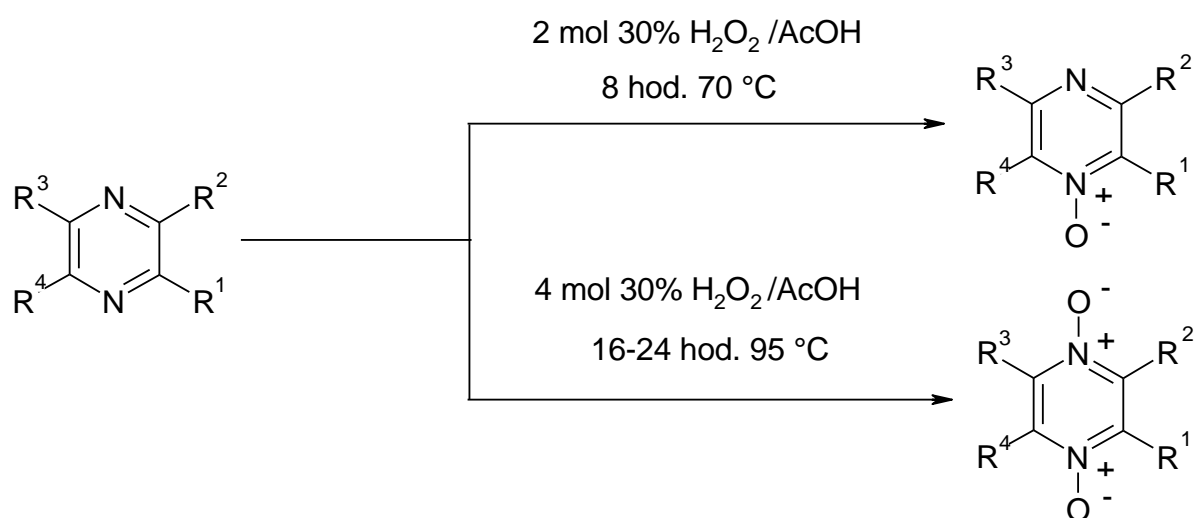
IČ spektra pyrazinů a N-oxidů pyrazinu vykazují čtyři roztažené ν -vibrace v oblasti 1600-1370 cm^{-1} . Vibrace v rozmezí 1600-1575 cm^{-1} má různou (většinou slabou) intenzitu, v oblasti 1500-1520 cm^{-1} slabou až střední intenzitu, v oblasti 1500-1465 a 1420-1370 cm^{-1} se nacházejí vibrace středně silné intenzity. Valenční vibrace N-oxidů se nachází v oblasti 1350-1260 cm^{-1} a mají silnou intenzitu. U monosubstituovaných pyrazinů se vyskytuje ještě silný pás v oblasti 1060-1040 a 1030-1010 cm^{-1} . Navíc mají pyrazinové deriváty ještě mimorovinné σ (C-H) vibrace kruhu v oblasti 860-800 cm^{-1} . U nesubstituovaného pyrazinu tato vibrace klesá pod 800 cm^{-1} . Substituenty se $-M$ efektem posouvají hodnoty vlnočtu vibrací k vyšším mezím, substituenty s $+M$ efektem tyto hodnoty snižují.²⁵

Tabulka č. 3: Příklady hodnot vlnočtů a vibrační pyrazinových derivátů²⁵

Sloučenina	v pyrazinového kruhu								$\sigma(\text{C-H})$
2-aminopyrazin	1590	1535	1488	1430	1175	-	1059	1005	814
2-metylpyrazin	-	-	-	-	-	-	-	-	824
2-chlorpyrazin	1560	1522	1462	1387	1175	1133	1048	1009	839
2-pyrazinkarbonitril	-	-	1464	1401	1176	1148	1147	1013	851
2-pyrazinkarboxamid	1585	1530	1485	1379	1181	1164	1054	1025	869
pyrazin	-	-	1488	1414	1150	1130	1063	1018	784

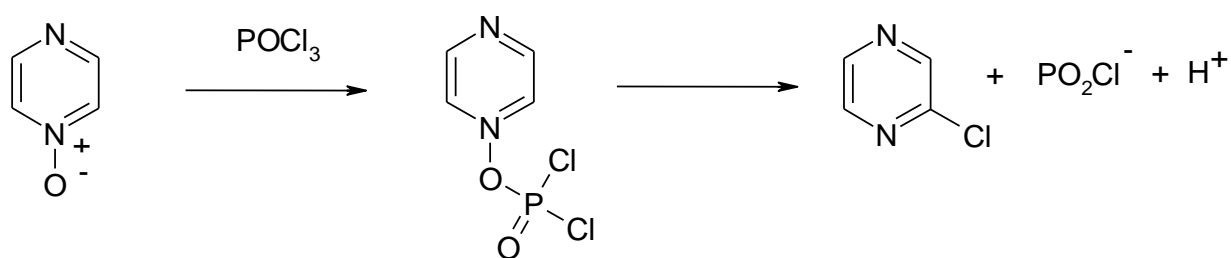
3.2 Příprava N-oxidů pyrazinu

Pyrazin, stejně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím. Důvodem toho je induktivní efekt dusíkatých atomů pyrazinu, který je příčinou kladného náboje na atom uhlíku heterocyklu, tím se ztěžuje přímý elektrofilní atak. Výhodnější jsou proto substituce nukleofilní, zejména pokud je pyrazinový kruh aktivován převedením na N-oxid. Aktivace na N-oxid se provádí nejčastěji pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, reakční teplotě a molární koncentraci oxidačního činidla probíhá do stadia pyrazin-1-oxidu či pyrazin-1,4-dioxidu.^{26, 27}



3.3 Halogenace pyrazinového jádra

Halogenpyraziny hrají v chemii derivátů pyrazinu velkou roli, jelikož mohou poskytovat díky snadné výměně atomu halogenu za nukleofil řadu derivátů pyrazinu jinak nedostupných. Existují tři klasické metody, jak lze halogenderiváty pyrazinu připravit. První způsob je založen na přímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi, druhý na záměně hydroxyly či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem pomocí chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejčastěji se halogenderiváty pyrazinu získávají nukleofilní halogenací N-oxidu pyrazinu. Tato halogenace probíhá nejvíce do polohy 2, méně do polohy 3. Z halogenačních činidel se nejčastěji užívá chlorid fosforylu.²⁸

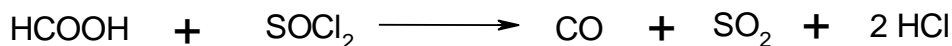


3.4 Příprava acylhalogenidů

Acyhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Ze všech acylhalogenidů mají největší význam acylchloridy. Acylhalogenidy se získávají reakcí kyselin s halogenidy fosforu a síry: chloridem fosforečným a fosforitým a chloridem thionylu (thionylchloridem). V některých případech je výhodné činidlo pro převádění kyselin na acylchloridy fosgen, popř. chlorid oxalové kyseliny a pro citlivé kyseliny benzoylchlorid.²⁹

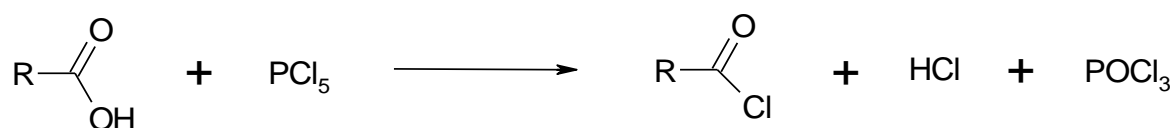
Výběr činidla se řídí tím, jak snadno lze izolovat produkt ze vzniklé směsi. Z tohoto pohledu je zřejmě nejvýhodnějším chlorid thionylu, který dává plynné vedlejší produkty, jež z reakční směsi unikají. Často se ale musí při přípravě acylchloridů používat chlorid thionylu v přebytku. Po skončení reakce se reakční směs zpravidla zpracovává destilací. Chlorid thionylu však vře již při teplotě 76°C, proto se hodí tento, jinak velice snadný, způsob je pro přípravu chloridů s vyšším bodem varu.²⁹

Pokud není možné přebytek chloridu thionylu oddestilovat vzhledem k blízkým teplotám varu chloridu thionylu a vzniklého acylhalogenidu, odstraní se jeho přebytek přidávkem kyseliny mravenčí.²⁹

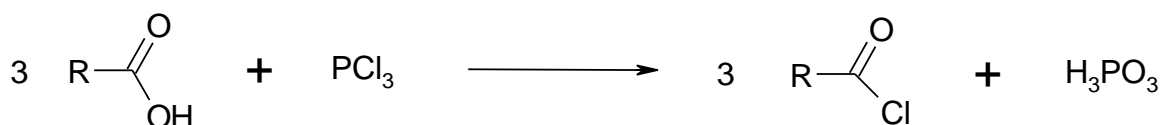


Acylchloridy se připravují z karboxylových kyselin působením:²⁹

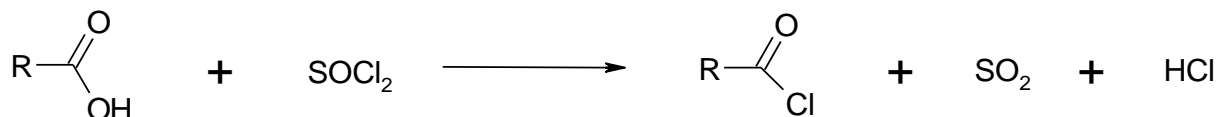
1. chloridu fosforečného



2. chloridu fosforitého



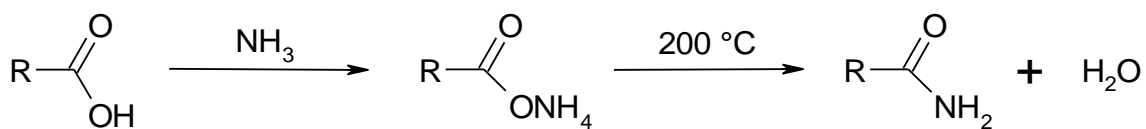
3. chloridu thionylu



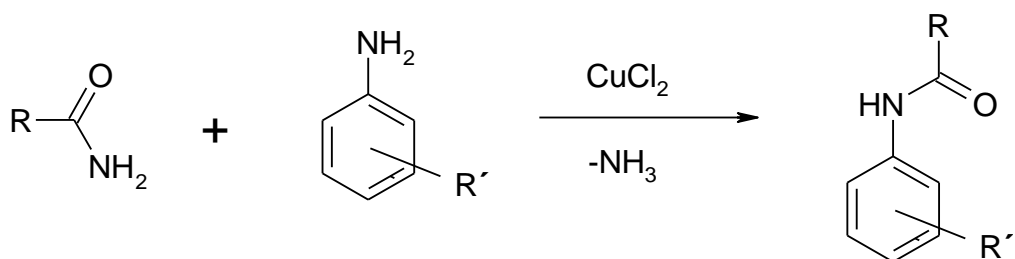
3.5 Příprava anilidů karboxylových kyselin

Anilidy či amidy karboxylových kyselin lze připravit z kyselin nebo i z většiny jejich funkčních derivátů.²⁹

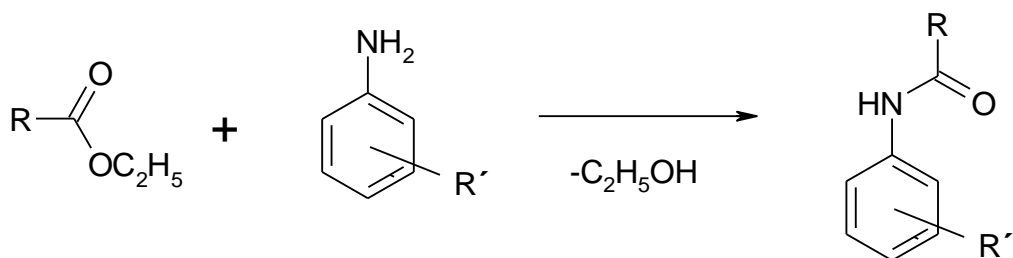
Z kyselin se amidy získávají aminolýzou karboxylových kyselin. Po převedení kyseliny na sůl s amoniakem nebo primárním či sekundárním aminem, ji podrobíme tepelnému rozkladu. Takto získáme primární, sekundární nebo terciární amidy. Pro přípravu anilidů má tato metoda menší význam.²⁹



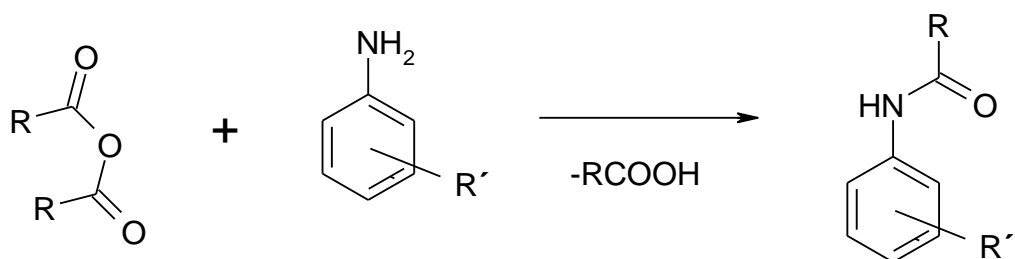
Další možností, jak získat amidy resp. anilidy karboxylových kyselin je aminolýza amidů karboxylových kyselin.



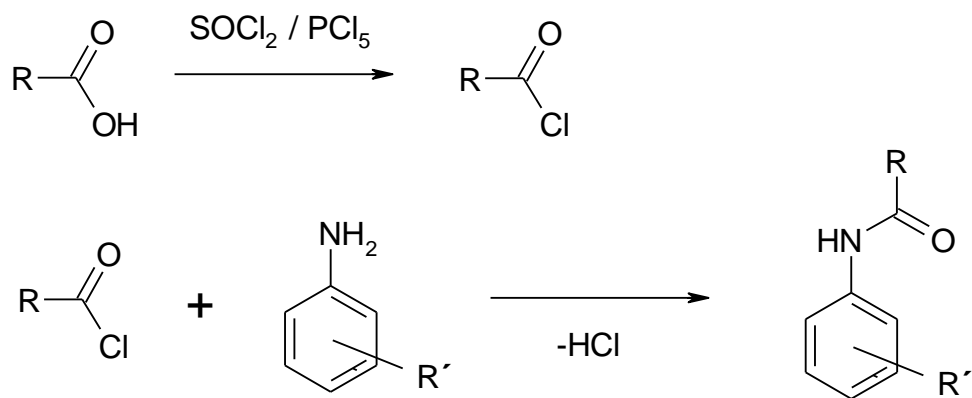
Můžeme také využít aminolýzu esterů karboxylových kyselin.



Další možností je i aminolýza anhydridů karboxylových kyselin.



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



Reakce acylchloridů a anhydridů s amoniakem a amíny probíhá se většinou provádějí za laboratorní teploty, ale estery reagují za této teploty pouze s amoniakem. Při použití acylchloridů k přípravě amidů vzniká chlorovodík, resp. karboxylová kyselina při použití anhydridů, který vyžaduje molekulu base ke své neutralizaci.²⁹

4 Experimentální část

4.1 Použité metody, přístroje a chemikálie

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

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány tenkovrstvou chromatografií na deskách SILUFOL UV 254 (Kavalier, Votice, ČR) za použití vyvíjecí soustavy toluen - aceton (1:1). Deriváty pyrazinu obsahující volnou karboxylovou skupinu byly vyvíjeny v soustavě propanol - amoniak (2:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

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

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

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

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

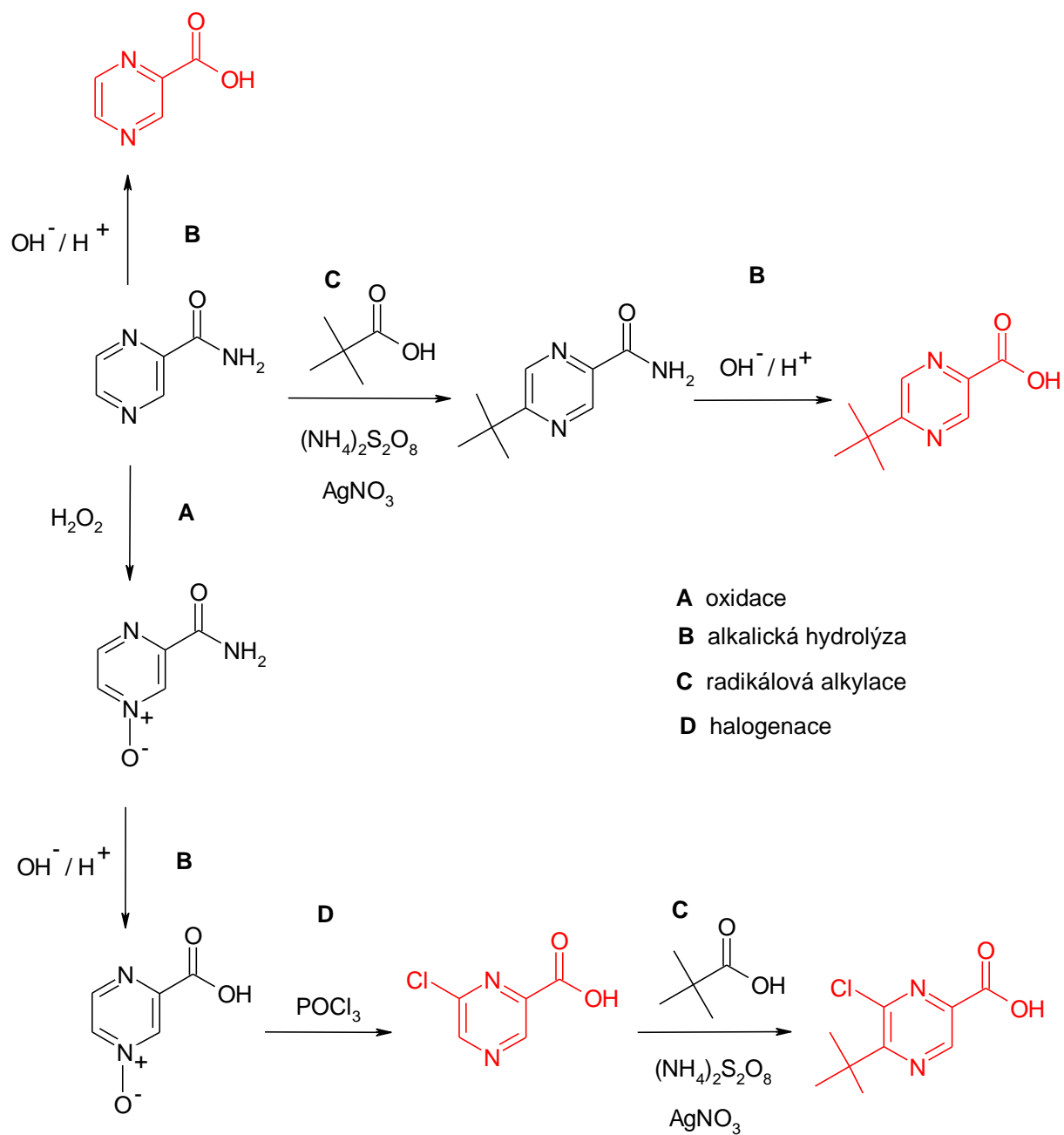
Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano) byla provedena na KFCHKL FaF UK HK paní Hronovou.

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

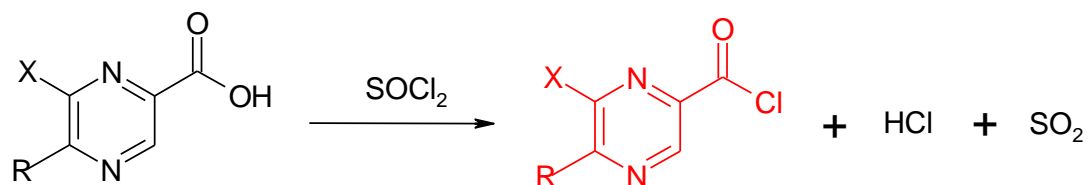
^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkury – Vx BB 300 (299,95 MHz – ^1H and 75,43 MHz – ^{13}C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc.PharmDr. J. Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$.

4.2 Schema prováděných reakcí

4.2.1 Syntéza výchozích substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin



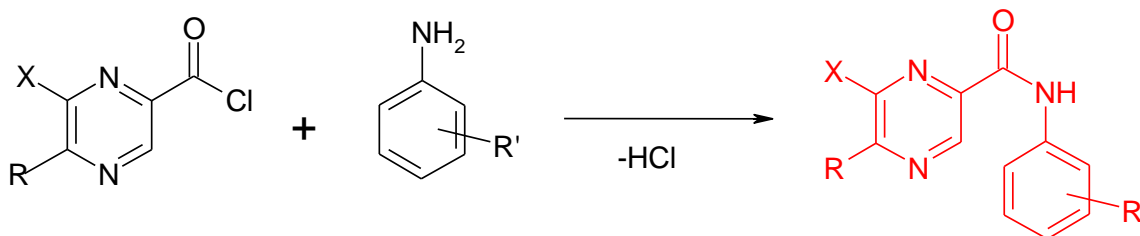
4.2.2 Syntéza chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin



R = H, terc-butyl

X = H, Cl

4.2.3 Syntéza anlidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin



R = H, terc-butyl

R' = 2-SH, 2-Cl-5-CH₃, 4-Cl-3-CH₃

X = H, Cl

4.3 Obecný postup přípravy

4.3.1 Příprava chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin

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

4.3.2 Příprava anilidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin

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

4.4 Principy biologického hodnocení

4.4.1 Antituberkulotická aktivita

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

Program TAACF se skládá ze tří úzce propojených částí:

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

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

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

Látky, u kterých je v primárním screeningu nalezena vyšší než 90% inhibice, jsou zařazeny do další fáze testování při nižších koncentracích proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv za účelem určení skutečné MIC v mikrodilučním Almar Blue testu (MABA). Zároveň jsou látky zkoušeny proti *Mycobacterium avium*. V případě zjištění dostatečné aktivity následuje testování cytotoxicity a dále experimenty na laboratorních zvířatech.³⁰

4.4.2 Antimykotická aktivita

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

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufovaný na pH 7 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (3-(morfolino)-propansulfonová kyselina). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975 μM . Součástí testování byly jednak slepé pokusy (bez účinné látky), jednak určení aktivity standardu (ketokonazol) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *C. tropicalis* 156 (CT), *C. krusei* E28 (CK), *C. glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigelii* 1188 (TB), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM) , *Aspergillus fumigatus* 231 (AF) a *Absidia corymbifera* 272 (AC).³⁰

4.4.3 Herbicidní aktivita

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

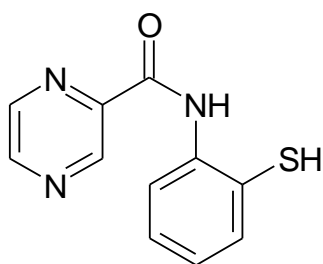
Chlorella vulgaris algae byla stacionárně kultivována (7 dní, a to 16 hodin světlo/ 8 hodin tma) podle popsané metodiky. Chlorofyl obsažený v suspenzi z řas byl stanoven spektrofotometricky (Specord UV VIS, Zeiss Jena, Germany) po extrakci N,N-dimethylformamidem. Antialgální aktivita (inhibice tvorby chlorofylu) byla u zkoumaných látek měřena v dimethylsulfoxidu v koncentraci $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l v přítomnosti DCPIP (2,6-dichlorfenolindofenolu) jako akceptoru elektronů. Součástí testování bylo určení aktivity standardu DCMU (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea).³⁰

Inhibice rychlosti vývoje kyslíku byla rovněž studována na chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea*). Rychlost tvorby kyslíku v chloroplastech špenátu byla měřena spektrofotometricky (Specord UV VIS, Zeiss Jena, Germany) v přítomnosti 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCPIP) jako elektronového akceptoru. Vzhledem ke špatné rozpustnosti látek ve vodě byl jako rozpouštědlo zvolen dimethylsulfoxid (DMSO). Použitá koncentrace DMSO (max. 4%) neovlivňovala vývoj kyslíku. Schopnost inhibice studovaných látek byla vyjádřena hodnotou IC_{50} , která je definována jako molární koncentrace sloučeniny způsobující 50% pokles vývoje kyslíku vztažený ke kontrolnímu vzorku bez studované látky. Jako standard byl opět použit DCMU.^{31, 32}

5 Výsledky diplomové práce

5.1 Nově připravené látky a jejich analytická data

1. 2-thioanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: hnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₁H₉N₃OS

Mh: 231,27

Množství: 151,5 mg

Výtěžek: 38,53%

Tt: 171°C

Rf: 0,80

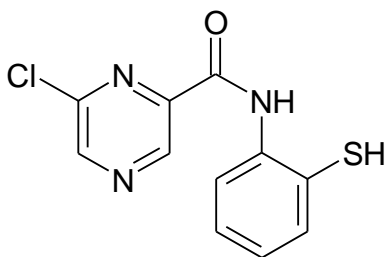
Elementární analýza: vypočteno: C 57,13%, H 3,92%, N 18,17%, S 13,86%
naměřeno: C 60,98%, H 3,30%, N 18,96%, S 13,91%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3433 (NH), 1704 (CO), 1522 (fenyl), 1457 (NH), 1317, 1293, 1058 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.49 (1H, t, *J*=1.4 Hz, H3), 8.85-8.79 (2H, m, H5, H6), 8.24-8.11 (2H, m, H3', H6'), 7.64-7.48 (2H, m, H4', H5')

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.7, 153.9, 147.0, 146.0, 145.0, 141.7, 135.5, 127.2, 126.6, 123.8, 122.9

2. 2-thioanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: žlutohnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃OS

Mh: 265,72

Množství: 50mg

Výtěžek: 11,07%

Tt: 173-175°C

Rf: 0,88

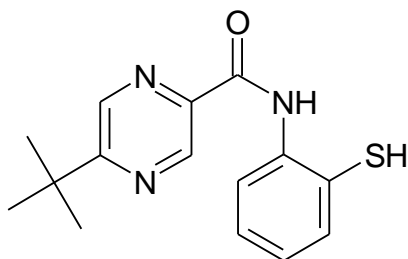
Elementární analýza: vypočteno: C 49,72%, H 3,03%, Cl 13,34%, N 15,81%, S 12,07%
naměřeno: C 53,03%, H 2,89%, N 15,04%, S 13,35%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3446 (NH), 1700 (CO), 1584 (fenyl), 1517 (NH), 1315, 1143, 1000 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.44 (1H, s, H3), 8.97 (1H, s, H5), 8.27-8.12 (2H, m, H3', H6'), 7.67-7.51 (2H, m, H4', H5')

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.8, 153.8, 148.0, 146.5, 145.8, 139.9, 135.6, 127.4, 127.0, 124.0, 123.

3. 2-thioanilid 5-*tert*.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle hnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₅H₁₇N₃OS

Mh: 287,38

Množství: 167mg

Výtěžek: 34,18%

Tt: 150,5°C

Rf: 0,95

Elementární analýza: vypočteno: C 62,69%, H 5,96%, N 14,62%, S 11,16%

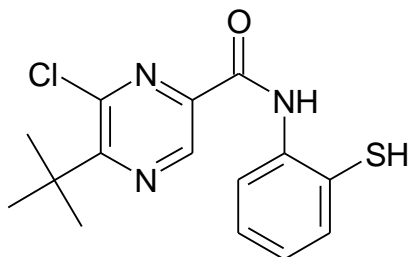
naměřeno: C 64,73%, H 5,70%, N 14,79%, S 10,72%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3432 (NH), 2970, 2953, 2930 (*tert*-butyl), 1691 (CO), 1577 (fenyl), 1522 (NH), 1313, 1162, 1138 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.39 (1H, s, H3), 8.91 (1H, s, H6), 8.23-8.11 (2H, m, H3', H6'), 7.63-7.46 (2H, m, H4', H5'), 1.40 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.9, 166.1, 154.0, 143.4, 141.6, 139.9, 135.4, 127.0, 126.4, 123.7, 122.8, 36.9, 29.6

4. 2-thioanilid 5-*tert*.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: bílá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₅H₁₆ClN₃OS

Mh: 321,83

Množství: 144mg

Výtěžek: 26,32%

Tt: 163,5°C

Rf: 0,95

Elementární analýza: vypočteno: C 55,98%, H 5,01%, Cl 11,02%, N 13,06%, S 9,96%

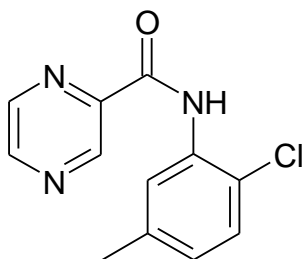
naměřeno: C 58,46%, H 6,01%, N 13,67%, S 10,23%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3443 (NH), 2967, 2959, 2928 (*tert*-butyl), 1705 (CO), 1558 (fenyl), 1517 (NH), 1331, 1148, 1056 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.32 (1H, s, H3), 8.25-8.08 (2H, m, H3', H6'), 7.67-7.47 (2H, m, H4', H5'), 1.51 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.1, 153.9, 146.4, 145.1, 143.3, 137.8, 135.5, 127.3, 126.8, 123.9, 123.0, 38.6, 28.3

5. 2-chlor-5-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: šedá krystalická látka
Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O
Mh: 247,68
Množství: 175mg
Výtěžek: 41,56%
Tt: 102°C
Rf: 0,86

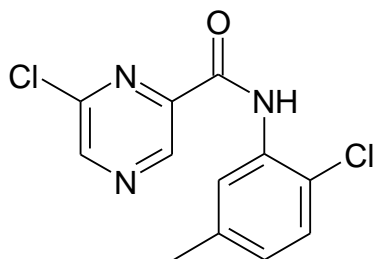
Elementární analýza: *vypočteno:* C 58,19%, H 4,07%, Cl 14,31%, N 16,97%
naměřeno: C 58,36%, H 4,27%, N 16,78%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3428 (NH), 2924 (methyl), 1700 (CO), 1590 (fenylyl), 1537 (NH), 1458, 1299, 1118 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.35 (1H, bs, NH), 9.31 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.97 (1H, d, *J*=2.6 Hz, H6), 8.83 (1H, dd, *J*=2.6 Hz, *J*=1.4 Hz, H5), 8.07 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H6'), 7.44 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H3'), 7.05 (1H, ddd, *J*=8.2 Hz, *J*=1.9 Hz, *J*=0.8 Hz, H4'), 2.32 (3H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.1, 148.6, 144.0, 143.9, 143.7, 137.8, 133.8, 129.3, 127.0, 123.6, 121.9, 21.0

6. 2-chlor-5-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: oranžovohnědá krystalická látka
Sumární vzorec: C₁₂H₉Cl₂N₃O
Mh: 282,12
Množství: 275mg
Výtěžek: 57,34%
Tt: 132°C
Rf: 0,86

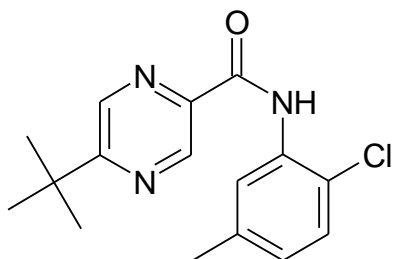
Elementární analýza: *vypočteno:* C 51,09%, H 3,22%, Cl 25,13%, N 14,89%
naměřeno: C 51,21%, H 3,44%, N 14,80%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3447 (NH), 2925 (methyl), 1696 (CO), 1590 (fenylyl), 1538 (NH), 1300, 1170, 1144 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.24 (1H, bs, NH), 9.25 (1H, s, H3), 9.11 (1H, s, H5), 7.89 (1H, d, *J*=1.7 Hz, H6'), 7.44 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H3'), 7.08 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, *J*=1.7 Hz, H4'), 2.32 (3H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.2, 148.3, 147.1, 144.0, 142.2, 137.8, 133.7, 129.3, 127.6, 124.9, 123.1, 20.9

7. 2-chlor-5-methylanilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle hnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₃O

Mh: 303,79

Množství: 161mg

Výtěžek: 31,17%

Tt: 98°C

Rf: 0,93

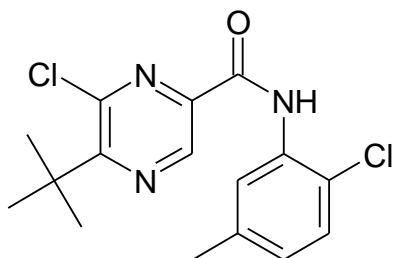
Elementární analýza: vypočteno: C 63,26%, H 5,97%, Cl 11,67%, N 13,83%
naměřeno: C 62,84%, H 6,70%, N 12,44%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3440 (NH), 2986, 2960, 2928, 2865 (*terc*-butyl, methyl), 1697 (CO), 1585 (fenyl), 1532 (NH), 1413, 1257, 1132 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.30 (1H, bs, NH), 9.24-9.20 (1H, m, H3), 8.94-8.90 (1H, m, H6), 8.13 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H6'), 7.43 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H3'), 7.03 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, *J*=1.9 Hz, H4'), 2.33 (3H, s, CH₃), 1.39 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.8, 161.1, 142.3, 141.3, 140.5, 137.8, 133.9, 129.2, 126.8, 123.2, 121.5, 37.1, 29.6, 21.0

8. 2-chlor-5-methylanilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: bílá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇Cl₂N₃O

Mh: 338,23

Množství: 171mg

Výtěžek: 29,74%

Tt: 147°C

Rf: 0,97

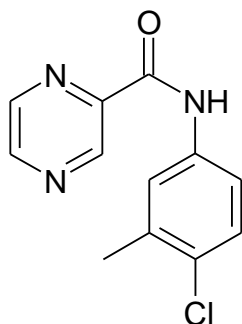
Elementární analýza: vypočteno: C 56,82%, H 5,07%, Cl 20,96%, N 12,42%
naměřeno: C 56,12%, H 6,03%, N 12,44%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3442 (NH), 2997, 2988, 2968, 2927, 2872 (*terc*-butyl, methyl), 1697 (CO), 1587 (fenyl), 1527 (NH), 1367, 1294, 1147, 1061 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

9. 4-chlor-3-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: hnědá krystalická látka
Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O
Mh: 247,68
Množství: 68mg
Výtěžek: 16,15%
Tt: 144°C
Rf: 0,73

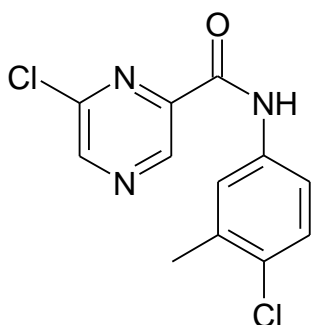
Elementární analýza: *vypočteno:* C 58,19%, H 4,07%, Cl 14,31%, N 16,97%
naměřeno: C 57,35%, H 5,44%, N 16,64%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3427 (NH), 2945 (methyl), 1679 (CO), 1589 (fenyl), 1537 (NH), 1399, 1288, 1169, 1022 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

10. 4-chlor-3-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: oranžovohnědá krystalická látka
Sumární vzorec: C₁₂H₉Cl₂N₃O
Mh: 282,12
Množství: 278mg
Výtěžek: 57,96%
Tt: 137°C
Rf: 0,82

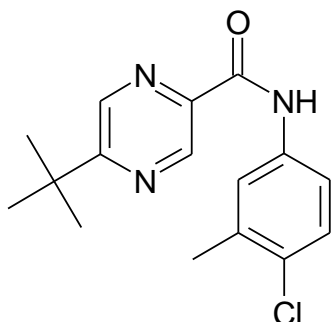
Elementární analýza: *vypočteno:* C 51,09%, H 3,22%, Cl 25,13%, N 14,89%
naměřeno: C 50,81%, H 5,11%, N 14,44%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3443 (NH), 2926 (methyl), 1690 (CO), 1589 (fenyl), 1541 (NH), 1377, 1172, 1144, 1009 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

11. 4-chlor-3-methylanilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle hnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₃O

Mh: 303,79

Množství: 230mg

Výtěžek: 44,54%

Tt: 122°C

Rf: 0,94

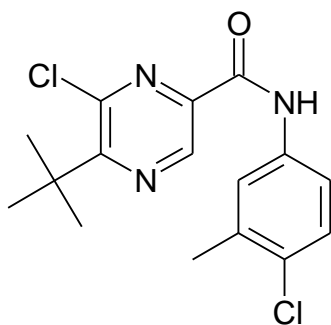
Elementární analýza: *vypočteno:* C 63,26%, H 5,97%, Cl 11,67%, N 13,83%
naměřeno: C 62,44%, H 8,11%, N 13,54%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3425 (NH), 2965, 2933, 2921, 2869 (*terc*-butyl, methyl), 1688 (CO), 1587 (fenyl), 1519 (NH), 1407, 1278, 1143 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) výsledky nejsou zatím k dispozici

12. 4-chlor-3-methylanilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle šedá krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₆H₁₇Cl₂N₃O

Mh: 338,23

Množství: 213mg

Výtěžek: 37,04%

Tt: 108,5°C

Rf: 0,97

Elementární analýza: *vypočteno:* C 56,82%, H 5,07%, Cl 20,96%, N 12,42%
naměřeno: C 56,42%, H 6,35%, N 12,20%

IČ spektrum (KBr), cm⁻¹: 3442 (NH), 2970, 2957, 2931, 2909, 2871 (*terc*-butyl, methyl), 1698 (CO), 1589 (fenyl), 1530 (NH), 1366, 1261, 1147, 1060 (pyrazin)

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.58 (1H, bs, NH), 9.12 (1H, s, H3), 7.85 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H2'), 7.72 (1H, dd, *J*=8.4 Hz, *J*=2.3 Hz, H6'), 7.39 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5'), 2.32 (3H, s, CH₃), 1.50 (9H, s, CH₃)

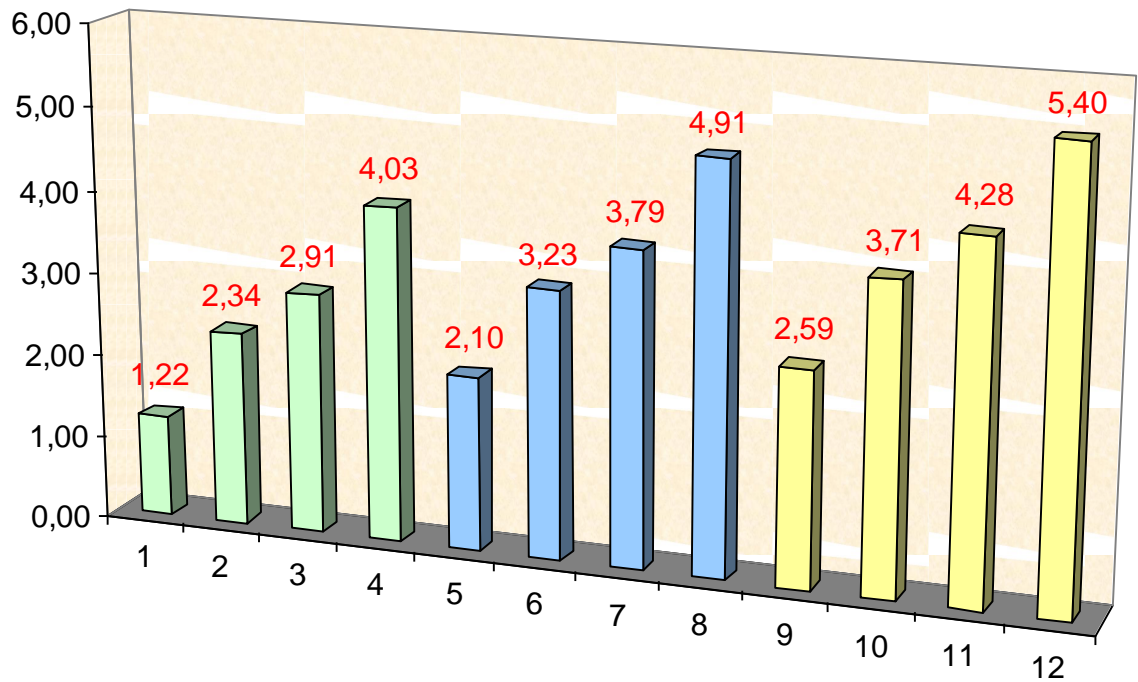
¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 1163.1, 161.0, 145.4, 142.7, 140.6, 137.1, 135.8 129.1, 128.6, 123.4, 120.1, 38.7, 28.2, 20.1

5.2 Lipofilita připravených látek

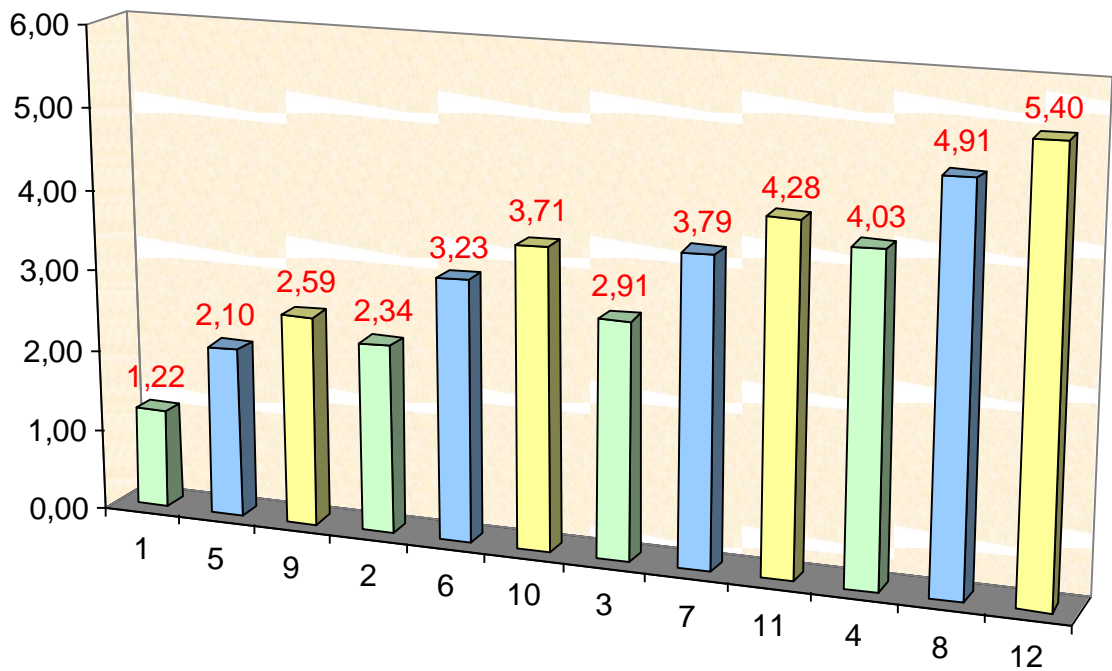
Tabulka č.4: Chromatograficky stanovená hodnota Log K (K-kapacitní faktor) a vypočítaná hodnota Log P (ACD/logP ver. 1.0).

Látka Č.	Log K	Log P
1.	0,8142	1,22
2.	1,1105	2,34
3.	1,4225	2,91
4.	1,8256	4,03
5.	0,8264	2,10
6.	1,1600	3,23
7.	1,5864	3,79
8.	1,9841	4,91
9.	0,6403	2,59
10.	0,9804	3,71
11.	1,2979	4,28
12.	1,7291	5,40

Graf č. 1: Lipofilita (Log P) připravených látek seřazených podle jejich výchozích anilinů.

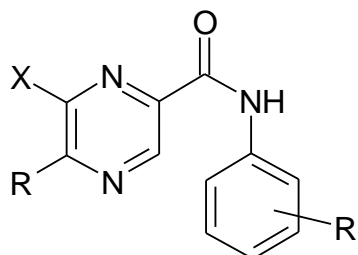


Graf č.2: Lipofilita (Log P) připravených látek seřazených podle jejich výchozích kyselin.



5.3 Výsledky hodnocení antituberkulotické aktivity

Tabulka č.5: Hodnoty antituberkulotické aktivity (% inhibice) při MIC > 6,25 µg/ml pro připravené látky.



Látka Č.	Struktura			Inhibice (%)
	-X	-R	-R'	
1.	H	H	2-SH	18
2.	Cl	H	2-SH	16
3.	H	(CH ₃) ₃ C	2-SH	24
4.	Cl	(CH ₃) ₃ C	2-SH	8
5.	H	H	2-Cl-5-CH ₃	5
6.	Cl	H	2-Cl-5-CH ₃	15
7.	H	(CH ₃) ₃ C	2-Cl-5-CH ₃	0
8.	Cl	(CH ₃) ₃ C	2-Cl-5-CH ₃	1
9.	H	H	4-Cl-3-CH ₃	53
10.	Cl	H	4-Cl-3-CH ₃	0
11.	H	(CH ₃) ₃ C	4-Cl-3-CH ₃	0
12.	Cl	(CH ₃) ₃ C	4-Cl-3-CH ₃	0

5.4 Výsledky hodnocení antimykotické aktivity

Tabulka č. 6: Hodnoty antimykotické aktivity připravených látek ve srovnání s účinností ketokonazolu (KET). Tučně je vyznačena MIC, která se nachází v rámci testovaného rozmezí.

Látka Č.	Kmen (kód) – MIC ($\mu\text{mol/l}$)																
	CA		CT		CK		CG		TB		AF		AC		TM		
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	72h	120h	
1.	125	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	125	>500	>500	>500	500	500	
2.	125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62,5	>125	
3.	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
4.	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	
5.	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125	>125	
6.	62,5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	62,5	>125
7.	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	>500	
8.	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	
9.	62,5	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500	
10.	15,6	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
11.	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
12.	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
KET	<0,24	<0,24	1,95	3,91	0,98	1,95	0,49	1,95	<0,24	<0,24	7,81	7,81	31,25	31,25	0,98	1,95	

5.5 Výsledky hodnocení herbicidní aktivity

Tabulka č.7: Hodnoty herbicidní aktivity pro sérii připravených látek ve srovnání s účinností DCMU.

Látka Č.	Inhibice fotosyntézy (<i>Spinacia oleracea</i>)		Redukce obsahu chlorofylu (<i>Chlorella vulgaris</i>)	
	log (1/ IC ₅₀) (mol /dm ³)	IC ₅₀ (mmol/dm ³)	log (1/ IC ₅₀) (mol /dm ³)	IC ₅₀ (mmol/dm ³)
1.	3,2340	0,583	3,9545	0,111
2.	x	x	x	x
3.	4,1083	0,078	3,8182	0,152
4.	x	x	x	x
5.	x	x	3,6795	0,209
6.	x	x	3,8875	0,130
7.	x	x	x	x
8.	x	x	x	x
9.	3,7124	0,194	4,8754	0,013
10.	3,2255	0,595	4,0953	0,080
11.	3,7200	0,190	4,3562	0,044
12.	3,6274	0,235	3,4769	0,333
DCMU		0,0019		0,0073

Poznámka: x – u těchto látek nebylo možné provést hodnocení z důvodu nízké rozpustnosti v DMSO nebo z důvodu vysrážení látky v průběhu testování.

6 Diskuse

Úvodní kapitoly jsou věnovány problematice onemocnění tuberkulózou v současnosti. Jsou zde informace postihující zejména epidemiologii a etiologii tohoto onemocnění, ale také současnost a vývojové trendy v oblasti terapie tuberkulózy.

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

Ve své diplomové práci jsem se zaměřil na syntézu látek ze skupiny anilidů různě substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Na katedře bylo již v minulosti připraveno několik sérií látek tohoto typu.

Série 12 látek byla připravena reakcí chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny s příslušnými anilíny. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

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

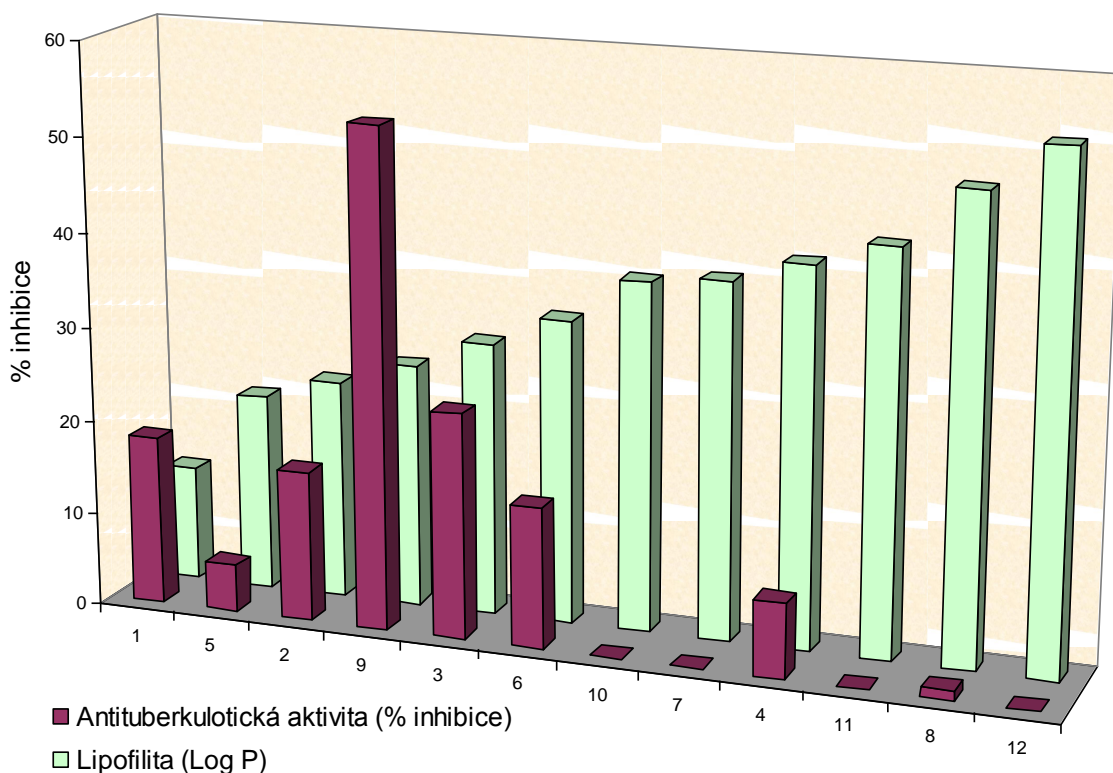
Výtěžky reakcí se pohybovaly 11 – 58 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu. Totožnost a čistota jednotlivých látek byly kontrolovány TLC chromatografií, teplotou tání, elementární analýzou, IČ spektry, ^1H a ^{13}C NMR. Čištění látek jsem prováděl rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

Lipofilita (Log P) připravených sloučenin se pohybovala v rozmezí 1,22 – 5,40, přičemž nejnižší lipofilitu vykazala látka č. **1** a nejvyšší lipofilitu látka č. **12**. Zjištěná lipofilita stoupá se vzrůstající molekulovou hmotností jak v seřazení připravených látek podle jejich výchozích anilidů, tak v seřazení látek podle jejich výchozích kyselin (viz graf č. 1, 2). V případě sloučenin obsahujících ve struktuře anilin substituovaný chlorem a methylem byla prokázána větší lipofilita při substituci 4-chlor-3-methyl než u sloučenin se substitucí 2-chlor-5-methyl.

Všechny látky byly podrobeny testování antituberkulotické aktivity. Nejvyšší aktivitu, 53% inhibice, prokázala látka č. **9** (4-chlor-3-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny),

s lipofilitou 2,59. U látek č.7, 10, 11, 12 nebyla prokázána žádná aktivita. Následující graf ukazuje, že, po seřazení látek ve směru stoupající lipofility, se antituberkulotická aktivita projevila spíše u látek s nižší lipofilitou, tj. látky č. 1, 5, 2, 9, 3, 6 s lipofilitou 1,22-3,23.

Graf č. 3: Antituberkulotická aktivita látek, seřazených podle jejich lipofility



Látky byly podrobeny rovněž testům na antimykotickou aktivitu. Nejvyšší antimykotickou aktivitu *in vitro* vykazovala látka č. 10, a to proti kmenu *Candida albicans*. Zajímavé aktivity měly i látky č. 2, 6 a 9 zejména proti kmenům *Candida albicans* a *Trichophyton mentagrophytes*. Aktivitu vykazaly i látky č. 1, 5, a 7. Avšak v porovnání se standardem (ketokonazol) jsou všechny tyto aktivity velmi slabé.

Při hodnocení herbicidní aktivity se v testech inhibice fotosyntézy u *Spinacia oleracea* ukázala jako nejúčinnější látka č. 3. Ještě zajímavějších výsledků bylo dosaženo v testech na redukci obsahu chlorofylu u *Chlorella vulgaris*, a to u látky č. 11 a především u látky č. 9, která se svou účinností přiblížila standardu DCMU.

7 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem připravil 12 dosud v chemické literatuře nepopsaných sloučenin:

1. 2-thioanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
2. 2-thioanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
3. 2-thioanilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
4. 2-thioanilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
5. 2-chlor-5-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
6. 2-chlor-5-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
7. 2-chlor-5-methylanilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
8. 2-chlor-5-methylanilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
9. 4-chlor-3-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
10. 4-chlor-3-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
11. 4-chlor-3-methylanilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
12. 4-chlor-3-methylanilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny

Všechny uvedené látky jsou charakterizovány elementární analýzou, teplotou tání, IČ spektrem a lipofilitou. Také jsou zde uvedena ^1H a ^{13}C NMR spektra těchto látek, mimo látky č. 8, 9, 10, 11, u kterých nejsou zatím výsledky k dispozici.

Připravené látky byly podrobeny *in vitro* biologickému hodnocení. Jednalo se o testy antituberkulotické, antimykotické a herbicidní aktivity.

8 Literatura

-
- ¹ Tripathi R.P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V.K.: Med. Res. Rev. **25**, s.93-131 (2005)
- ² <http://ist-socrates.berkeley.edu/~jmp/TB1.htm> (24.1.2006)
- ³ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (17.2.2006)
- ⁴ <http://www.tuberculosis-vaccine.com> (17.2.2006)
- ⁵ <http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/mdrtb/mdrtb.htm> (17.2.2006)
- ⁶ Buchta V., Jílek P., Horáček J., Horák V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1998, s. 113
- ⁷ Peřinová J.: Tuberkulóza, Solutio 2000/2001, Medon, Praha 2000, s. 65-70
- ⁸ Mičuda S., Grim J., Cermanová J., Martínková J.: Antibiotika, Solutio 2002/2003, Medon, Praha 2002, s. 183-185
- ⁹ <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr71/en/index.html> (17.2.2006)
- ¹⁰ Walker R., Edwards C.: Clinical Pharmacy and Therapeutics, Third Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh 2003, s. 590-591
- ¹¹ Lincová D., Farghali H., at al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén, Karolinum 2002, s. 461-463
- ¹² The Merck Index (an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals), 13th Edition, Merck Co., Inc., 2001
- ¹³ Lullmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie, Grada – Avicenum, Praha 2002, s. 503-508
- ¹⁴ Katzung B.G.: Základní a klinická farmakologie, nakladatelství H&H, Praha 1994, s. 685-693
- ¹⁵ Bruner R.: Syntéza substituovaných karboxamidů pomocí radikálové amidace. Studentská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 15. duben 2005.
- ¹⁶ Doležal M., Miletín M., Kuneš J., Kráľová K.: Molecules , **7** , s.363-373 (2002)
- ¹⁷ Doležal M., Bruner R., Buchta V., Kráľová K.: Carboxamide bridging ligand in series of pyrazinamide analogues, their synthesis and biological evaluation. 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, 28.sprna-1.září 200, Brno, Česká republika
- ¹⁸ Doležal M., Bruner R., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Amidy pyrazinkarboxylové kyseliny: syntéza antifungální hodnocení a jejich inhibiční vliv na fotosyntézu. 57. Sjezd chemických společností, 4.-8. září 2005, Tatranské Matliare, Slovenská republika

-
- ¹⁹ Pratt Y.T.: Pyrazines and Ppyperazines, In: ELDERFIELD R.C.: Heterocyclic Compounds, **6**, J Willey and Sons, Inc. (1957)
- ²⁰ Požarskij A.F.: Theoretical principles of the chemistry of heterocycles, Chim. Geterociel. Sojedin. **7**, s. 867-905 (1985)
- ²¹ Katritzki A.R., Boulton A.J.: Advances in Heterocyclic Chemistry, **14**, Academic Press, New York and London (1972)
- ²² Black P.J., McDowell C.A.: Spin densities of polyasine anions, Mol. Phys. **12**, 233 (1967), In: Chem. Abstr. **67**, 77716f (1967)
- ²³ Kwiatowski S., Zurawski B.: Indexes of the chemical reactivity of nitrogen heterobenzenes. Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Math. Astron. Phys. **13**, 489 (1965), In: Chem. Abstr. 64, 15719 (1966)
- ²⁴ Klein B., Hetman N.E., O'Donnell M.E.: Pyrazines III. The action of phosphoryl chloride on pyrazine N- oxides, J. Org. Chem. **28**, 1682 (1960)
- ²⁵ Shindo H.: Infrared spectra of heterocyclic compounds.VII. Infrared spectra of substituted pyrazines and their N-oxid. Chem. Pharm. Bull. **8**, 34 (1960)
- ²⁶ Klein B., Hetman N. E., O'Donnell M. E.: J. Org. Chem. **28**, s. 1682 (1963)
- ²⁷ Klein B., Berkowitz J.:J. Am. Chem. Soc.,**81**, s. 5160 (1959)
- ²⁸ Sato N., Fuji M.: J.Heterocycl.Chem.,**31**, 1994, s. 1177
- ²⁹ Červinka O. a kol.: Chemie organických sloučenin, 1. vydání, 2. díl, SNTL, Praha, 1987, s. 49-50, 73-76
- ³⁰ Doležal M., Vičík R., Miletín M., Král'ová K.: Chem. Pap., **54**, s. 254 (2000)
- ³¹ Král'ová K., Šeršeň F., Sidoová E.: Chem. Pap.,**46**, s.348 (1992)
- ³² Carpentier R., Fuerst E. P., Nakatani H. Y., Artzen C. J.: Biochim. Biophys. Acta, **808**, s. 293 (1985)