

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva III.**

**Diplomová práce**

**Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martin Doležal, PhD.**

**Hradec Králové, 2006**

**Jaroslav Dvořák**

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, PhD. a Mgr. Lukáši Palkovi za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky při zpracování této diplomové práce.

## OBSAH

<b>1. ÚVODNÍ ČÁST .....</b>	<b>5</b>
1.1. TUBERKULÓZA .....	6
1.1.1. Etiologie TBC .....	7
1.1.2. Zdroj a přenos infekce .....	9
1.1.3. Diagnostika tuberkulózy .....	9
1.1.4. Prevence onemocnění .....	10
1.2. TERAPIE TUBERKULÓZY .....	11
1.2.1. Současné možnosti léčby TBC .....	11
1.2.2. Struktura a charakteristika základních antituberkulotik .....	12
1.2.3. Léková rezistence .....	21
1.2.4. Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik .....	21
<b>2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>26</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
3.1. VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA .....	29
3.2. METODY PŘÍPRAVY VÝCHOZÍCH LÁTEK .....	31
3.2.1. Příprava N-oxidu .....	31
3.2.2. Příprava halogenderivátu .....	32
3.2.3. Příprava amidů .....	32
3.2.4. Příprava nitrilů .....	33
3.2.5. Nukleofilní substituce na pyrazinovém jádře .....	33
3.2.6. Souhrnné schéma přípravy .....	34
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
4.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	37
4.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PROVÁDĚNÉ REAKCE .....	38
4.2.1. Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny	
4.2.2. Příprava 6-chlor-pyrazin-2-karbonitrilu .....	38
4.2.3. Příprava amidu 3-chlor-5-kyan-pyrazin-2-karboxylové kyseliny	
4.2.3.1. Optimalizace homolytické amidace .....	39
4.2.4. Příprava 3-chlor-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	40
4.2.5. Obecný postup přípravy N-substituovaných derivátů 3-chlor-pyrazin- 2,5-dikarbonitrilu .....	40

4.2.5.1. Příprava 3-(3-trifluoromethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	41
4.2.5.2. Příprava 3-(3,5-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	42
4.2.5.3. Příprava 3-(2,4-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	43
4.2.5.4. Příprava 3-(2-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	44
4.2.5.5. Příprava 3-(3-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	45
4.2.5.6. Příprava 3-(3-N,N-dimethylaminofenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	46
4.2.5.7. Příprava 3-(4-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	47
4.2.5.8. Příprava 3-(4-chlorfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	48
4.2.5.9. Příprava 3-(4-chlor-3-methylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu .....	49
<b>5. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ .....</b>	<b>50</b>
5.1. ANTITUBERKULOTICKÁ AKTIVITA .....	51
5.2. ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA .....	51
5.3. VÝPOČET A ZMĚŘENÍ LIPOFILITY PŘIPRAVENÝCH LÁTEK ..	53
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>54</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>57</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>59</b>

# **1.ÚVODNÍ ČÁST**

## 1.1. TUBERKULÓZA

Tuberkulóza (TBC) patří v celosvětovém měřítku k velmi často se vyskytujícím infekčním chorobám. Podle výzkumu Světové zdravotnické organizace (WHO) je původcem *Mycobacterium tuberculosis* nakažena téměř jedna třetina světové populace, a na následky choroby zemře ročně přibližně tři miliony lidí<sup>1</sup>.

Z historického pohledu lze říci, že se jedná o nejstarší onemocnění lidstva. Nálezy na kosterních pozůstatcích z doby kamenné, ale i na egyptských mumiích svědčí o výskytu kostní tuberkulózy. V době středověku patřila tuberkulóza k nejčastějším příčinám smrti, což pak platilo i v novověku. V 18. a 19. století byla tato nemoc velmi rozšířena a takovéto rozšíření je patrné i dnes v rozvojových zemích<sup>2</sup>. V současné době je tedy tuberkulóza pandemicky rozšířena a tuberkulózními bakteriemi je infikována asi jedna třetina lidstva, tj. 1,7 miliardy jedinců. Každoročně je hlášeno celosvětově asi 8 miliónů nových onemocnění, z toho připadá na rozvojové země asi 95% výskytu onemocnění a 5% na vyspělé státy. Ročně umírá na TBC asi 2 milióny osob, v ČR asi 100 nemocných, tj. 1 na 100 000 obyvatel<sup>3</sup>.

Tuberkulóza je celkové chronické infekční onemocnění, které je řazeno mezi specifické zánětlivé procesy. Název onemocnění je odvozen od latinského slova tuberculum (uzlíček). Tuberkulózní infekce má dva základní morfologické projevy: tuberkulózní uzlík (tuberkl) nebo exsudativní typ tuberkulózního zánětu, tyto projevy se mohou kombinovat. Při nepříznivém vývoji onemocnění může vzniknout chorobná dutina, tzv. kaverna. TBC postihuje v 85% případů dýchací ústrojí, v 15% jiné orgány, např. mízní uzliny, klouby a kosti, urogenitální trakt, kůži, pleny mozkové, perikard, peritoneum a gastrointestinální trakt<sup>4</sup>.

Největším objevem v dějinách tuberkulózy byl v roce 1882 průkaz původce onemocnění Robertem Kochem (odtud Kochův bacil). V roce 1891 objevil Koch také tuberkulin. V roce 1921 byla připravena francouzskými bakteriology Calmettem a Guérinem první vakcína, obsahující oslabený kmen *M. bovis*. Tento kmen byl nazván jako bacil Calmettův-Guérinův (BCG) a očkování proti TBC kalmetizací. Po objevení původce onemocnění bylo cílem objevit účinné léčebné prostředky. Do té doby se používaly pouze vitamíny, klid na lůžku a klimatická léčba. To sice zpomalovalo průběh onemocnění, ale přesto nemoci podlehl mnoho lidí. Obratem

se stalo na konci 2. světové války objevení tří antituberkulotik v krátkém časovém sledu (1944 streptomycin, 1946 kyselina para-aminosalicylová, 1952 využití antimikrobiální účinku kyseliny isonikotinové). Počátek účinné antituberkulotické léčby se datuje od padesátých let<sup>5</sup>.

Po zavedení chemoterapeutik do praxe došlo k trvalému poklesu výskytu onemocnění TBC. Bohužel však již koncem osmdesátých a začátkem devadesátých let minulého století došlo ke stagnaci nemoci TBC a poté následoval v některých zemích významný vzestup počtu nových onemocnění tuberkulózou, současně i s rozvíjející se pandemií HIV/AIDS<sup>6</sup>. Nejsložitější situace je zřejmě v oblastech subsaharské Afriky a jihovýchodní Asie, v Jižní Americe pak v Peru či v Bolívii.

Vlivy podmiňující rozvoj infekce jsou migrace infikovaných, špatná výživa, nízká životní úroveň, oslabený imunitní systém, nedostatečná osvěta, nízký hygienický standard, nedostatek financí a kvalitních léčiv a také vznik vysoké multilékové resistance (více než 30% i v rozvinutých částech světa)<sup>7</sup>.

Tudíž tuberkulóza zůstává i tak globálním problémem, který postihuje všechny kontinenty světa.

### 1.1.1. Etiologie TBC

Tuberkulóza je vyvolávána patogenními mykobakteriemi: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*. Tato mykobakteria jsou označována jako klasická. V České republice se jako vyvolávající agens uplatňuje prakticky pouze *M. tuberculosis*. Atypická mykobakteria jsou označována anglickou zkratkou MOTT (mycobacteria other than tuberculosis), např. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* (TBC ptáků), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium ulceralis*, *Mycobacterium xenopi*. Onemocnění způsobená atypickými mykobakteriemi se nazývají mykobakteriózy. Postihují plíce a jsou podobné tuberkulóze. Objevují se často v souvislosti s poklesem odolnosti (imunity) a nepřenášejí se mezi lidmi<sup>8</sup>.

*M. tuberculosis* jako obligatorní aerob je imobilní krátká tyčinka, rovná nebo lehce zahnutá o velikosti 1,5-5  $\mu\text{m}$ . Obecně se mykobakteria odlišují od ostatních mikroorganismů především skladbou buněčné stěny, dlouhou generační dobou (24-

48 hodin), fakultativním intracelulárním parazitizmem, acidorezistencí (díky kys. mykolové v buněčné stěně) a schopností perzistence<sup>2</sup>.

Buněčná stěna je silná a má komplikovanou strukturu, která obsahuje čtyři typy polymerů: peptidoglykan, arabinogalaktan, kyseliny mykolové a lipoarabinomannan. Peptidoglykan je tvořen řetězci lineárních polysacharidů, které jsou spojeny krátkými peptidy.

Na peptidoglykan navazuje arabinogalaktan přes diglukosylfosforylový můstek tvořený rhamnózou a *N*-acetylglukosaminem. Stavební jednotku arabinogalaktanu představuje arabinofuranóza a galaktofuranóza. Furanózové seskupení poukazuje na jedinečnost buněčné stěny, protože se oproti běžné pyranóze vyskytuje vyjíměčně. K terminální arabinóze arabinogalaktanu jsou esterovou vazbou vázány mykolové kyseliny. Obsahují 60-90 uhlíkových atomů a 3-hydroxy-2-alkylové substituenty. Buněčnou stěnu zakončuje lipoarabinomannan.

Dnešní antituberkuloticky účinné látky působí zásahem do syntézy buněčné stěny a na enzymy, účastníci se její syntézy. FAS I (fatty acid synthetasa I) je zodpovědná za biosyntézu mastných kyselin z dvouuhlíkatých prekursorů (acetylCoA), FAS II přeměňuje tyto mastné kyseliny na kyseliny mykolové, které jsou vysoce zastoupeny v mykobakteriální buněčné stěně<sup>9,10</sup>.

Populace mykobakterií se podle Mitchinsova dělí na několik typů:

- Aktivní populace - tvoří největší část, aktivně se dělí, je uložena extracelulárně, roste nejlépe v prostředí kaverny (zásadité pH a dobrý přístup kyslíku).
- Polospící populace v neutrálním pH – lokalizována v menších kaseózních ložiscích, střídá se období růstového klidu a období dělení.
- Polospící populace v kyselém pH – uložena převážně intracelulárně na okrajích kaseifikované tkáně, kde kyselé prostředí a nedostatek kyslíku omezily schopnost dělení.
- Spící populace – bakterie se nedělí a nerostou.

Druhá a třetí skupina, tzv. perzistoři, mohou po rozpadu makrofágů a neutralizaci tkáňového prostředí znovu získat růstovou aktivitu a stát se původci nového vzplanutí onemocnění<sup>11,12</sup>.



### 1.1.2. Zdroj a přenos infekce

K přenosu TBC dochází inhalací kapének menších než 10 mikronů vzniklých při kašli infikované osoby a pohlcených makrofágy v alveolech. K vyvolání infekce stačí jen jediný mikroorganismus! TBC je chronická nemoc a infikovaná osoba šíří mikroorganismus *M. tuberculosis* dlouho před tím, než je onemocnění diagnostikováno. Obvykle je infikováno 50 % nechráněných osob, což je měřeno kožní tuberkulinovou zkouškou (PPD test - protein purified derivative of tuberculin). Po vystavení infekci onemocní asi 10 % - 15 % osob. Někteří odborníci soudí, že pro rozvoj nemoci u konkrétního pacienta je rozhodující jeho genetická výbava. Určitý vliv totiž mohou mít geny sdružené s následujícími molekulami - NO, alfa interferon<sup>13</sup>.

### 1.1.3. Diagnostika tuberkulózy

Diagnostiku TBC stanovuje odborný lékař - pneumolog. Využívá se hlavně dvou metod. Dnes se diagnostika opírá hlavně o bakteriologický průkaz vyvolávajícího mykobakteria (nutné opakované a kvalitní mikrobiologické vyšetření sputa). Buď orientačně mikroskopicky pomocí Ziehllova - Neelsonova barvení, specifického pro acidorezistentní mikroorganismy, nebo kultivací sputa na pevném či tekutém médiu. Mykobakteria musí být kultivována na speciálních pro ně selektivních půdách. Na pevném médiu lze očekávat dobu kultivace měsíc i déle. Nepostradatelné je také rentgenové vyšetření hrudníku, popřípadě dalších postižených orgánů<sup>12,14</sup>. Mezi pomocné diagnostické metody patří tuberkulinový test (PPD test). Tuberkulin se vstříkne do kůže a následné posouzení reakce (zkouška dle Mantoux) umožní zjistit, zda se nemocný setkal s TBC (včetně očkování). Nevýhodou tohoto testu je hlavně v Evropě zkrácené stanovení případné diagnózy vysokým procentem lidí očkovaných. Ve světě očkuje 64 zemí, z těch vyspělých se neočkuje jen v USA a Holandsku. Další pomocné metody jsou případné histologické vyšetření u aktivní TBC dýchacího ústrojí i dalších orgánů, epidemiologické souvislosti a jiné (bronchoskopie, počítačová tomografie, krevní a imunologické vyšetření)<sup>13</sup>.

#### 1.1.4. Prevence onemocnění

Současná prevence vzniku tuberkulózy je:

1. očkování BCG vakcínou (podrobněji bude uvedeno později)
2. vyšetřování infikovaných osob, jejich následná izolace, léčba a sledování po léčbě
3. chemoprophylaxe isoniazidem. Cílem profylaxe je zabránit vzniku onemocnění za určitých rizikových situací:
  - kontakt s prokázanou plicní tuberkulózou
  - nemocní pozitivně reagující na tuberkulin v průběhu dlouhodobé glukokortikoterapie nebo terapie imunosupresivy, nemocní s dekompenzovaným diabetem a nemocní s AIDS

Speciální součástí terapie TBC je očkování. Provádí se pomocí BCG vakcíny (bílkovinná kultivace *M. bovis*). Je to živá oslabená vakcína, a proto je méně bezpečná u imunosuprimovaných pacientů. Celkem 64 zemí světa má povinné očkování proti TBC.

Potenciální populace pro očkování tvoří neinfikované osoby, aktivně nemocní (u nich se jedná o imunoterapii) a také osoby s pozitivním kožním testem, a to nedávno infikované nebo latentně nemocné, jako prevence nemoci. Očkují se také infikované těhotné ženy s negativním kožním testem kvůli prevenci neonatální meningitidy.

Chemoprophylaxe je buď primární (osoby neinfikované, ale exponované nákaze) nebo sekundární (osoby infikované, zábrana přechodu infekce v manifestní onemocnění, případně zábrana recidiv u zhojené ale dosud neléčené TBC).

Chemoprophylaxe se provádí většinou ve formě monoterapie isoniazidem 300 mg denně po dobu 6 - 12 měsíců. K prevenci periferní neuritidy se podává 10 mg pyridoxinu denně<sup>8,13</sup>.

## 1.2. TERAPIE TUBERKULÓZY

### 1.2.1. Současné možnosti léčby TBC

Zásady léčby antituberkulotiky jsou následující:

- léčiva se podávají v kombinaci (důvodem není zvýšení efektu léčby, ale zábrana vzniku lékové rezistence)
- léčiva se podávají v jedné denní dávce (ukázalo se, že nejúčinnější je vliv na mykobakterie ve stádiu množení. Musí se dát možnost bakteriím, aby se pomnožily a pak zasáhnout jednorázovou dávkou, která dosáhne vysoké hladiny.)
- léčiva se podávají dlouhodobě

Moderní strategie TBC léčby byla vypracována WHO v devadesátých letech a je celosvětově zaváděna do praxe. Spočívá ve standardizovaných krátkodobých chemoterapeutických režimech aplikovaných za individuální péče o každého nemocného. Účinný TBC program, kterým by byla snížena nemocnost, má vyléčit alespoň 85 % nemocných. Základem léčby zůstávají po léta používaná léčiva s baktericidními a sterilizačními vlastnostmi (zabíjejí perzistory), se schopností zabránit vzniku rezistence mykobakterií.

Léky se podávají celkem šest až osm měsíců pro pojištění sterility tuberkulózní léze. Aby bylo dosaženo léčebného účinku, je nutno, aby nemocný vybral alespoň 80% doporučených dávek. Monitorování výsledků léčby se děje pravidelně opakovaným bakteriologickým vyšetřením sputa. I po vyléčení jsou pacienti sledováni. Obvykle se v léčbě vystačí s pěti léčivy (isoniazidem (INH), streptomycinem (STM), rifampicinem (RMP), ethambutolem (EMB) a pyrazinamidem (PZA)). Do **první linie** terapie jsou řazeny **INH, RMP, PZA**, popřípadě **EMB** při terapii čtyřmi léky. V České republice je v terapii čtyřmi léky též místo EMB používán **STM**.

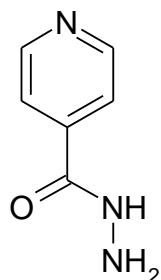
Léčba plicní TBC probíhá ve dvou fázích. V iniciální (intenzivní) fázi nemocní dostávají dva měsíce čtyři léky denně (INH, RMP, PZA, EMB/STM). V pokračující fázi se podává čtyři měsíce kombinace INH a RMP denně nebo čtyři měsíce intermitentně tato kombinace 3x týdně. Další možností je šestiměsíční denní podávání kombinace INH a EMB.

Mezi další léčiva patří: deriváty rifamycinu (rifapentin, rifabutin, rifalazil), aminoglykosidy (amikacin, kanamycin), polypeptidová ATB (kapreomycin, viomycin), makrolidy (erytromycin, klaritromycin), cefalosporiny (cefoxitin), fluorované chinolony (ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, difloxacin) a popřípadě i antileprotika (klofazimin, dapson). Jejich používání má opodstatnění u onemocnění, která jsou vyvolána multirezistentními kmeny *M. tuberculosis*, u infekcí atypickými mykobakterií a u některých mykobakterióz. Spíše okrajový význam mají tetracykliny (doxycyklin), beta-laktamy (amoxicilin/kyselina klavulánová) a sulfonamidy (sulfametoxazol/trimetoprim)<sup>15</sup>.

## 1.2.2. Struktura a charakteristika základních antituberkulotik

### Antituberkulotika první volby

#### *Isoniazid (INH)*



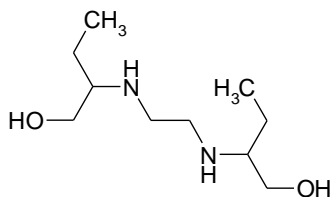
INH, hydrazid kys. isonikotinové, byl poprvé syntetizován v roce 1952. Pro jeho snadnou výrobu, levnost a vysokou účinnost je INH celosvětově nejvíce používaným lékem proti TBC.

Působí bakteriostaticky na bakterie, jejichž látková výměna je méně aktivní, baktericidně proti bakteriím ve stavu rychlého množení (aktivní látková výměna). Mechanismem účinku je inhibice syntézy kyseliny mykolové (součást buněčné stěny), vlastně enzymu FAS II<sup>10</sup>.

Má dobrou absorpci z GIT, neváže se na plazmatické bílkoviny, terapeutických hladin dosahuje v pleurální, cerebrospinální tekutině, kůži, svalů a penetruje i přes pouzdro tuberkulotické nekrotické léze. Mezi nežádoucí účinky patří hepatotoxicita,



### ***Ethambutol (EMB)***

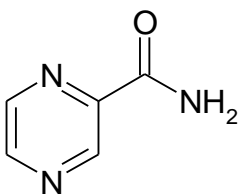


Je syntetický derivát ethylendiaminu. Je vhodný ke kombinované terapii. Jedná se o opticky aktivní sloučeninu typu aminoalkoholu se dvěma izolovanými chirálními atomy uhlíku. Účinný je pouze pravotočivý *S,S*(+)-izomer, zatímco levotočivý izomer je inaktivní a jeho další stereoizomery jsou toxické (*R,R*-izomer může způsobit slepotu).

Mechanismus účinku spočívá v polymerizaci arabinózy v buněčné stěně mykobakteria, místem jeho účinku je arabinosyltransferáza, která katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu nezbytného pro zachování integrity mykobakteriální stěny.

EMB se dobře absorbuje z GIT, částečně se metabolizuje v játrech, je vylučován močí i stolicí. Mezi nežádoucí účinky patří optická neuritida, reverzibilní daltonismus (poruchy barvocitu v oblasti červené a zelené barvy), hyperurikémie, bolest hlavy a závratě<sup>16,17,18</sup>.

### ***Pyrazinamid (PZA)***



PZA je syntetickým analogem nikotinamidu. Používá se v kombinaci s INH a RMP. Je efektivní ve zkrácení požadovaného času terapie, což podporuje dobrou compliance pacientů<sup>16</sup>.

PZA je proléčivo, vlastní účinnou látkou je pyrazin-2-karboxylová kyselina, na kterou se přeměňuje enzymem pyrazinamidázou. Mechanismem účinku je inhibice FAS I, pyrazinová kyselina se zabudovává do nikotinamidových nukleotidů FAS I místo kyseliny nikotinové. PZA je účinný pouze v kyselém prostředí, to zlepšuje

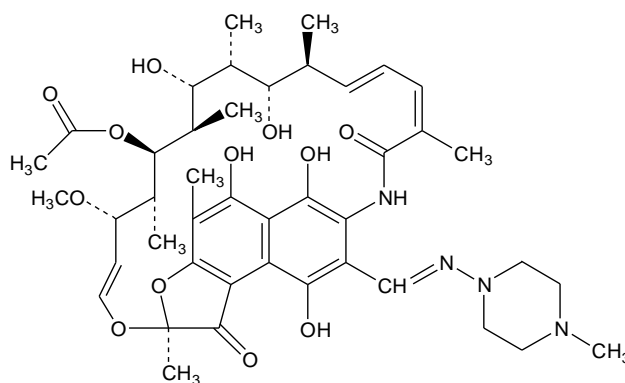
intracelulární akumulaci pyrazin-2-karboxylové kyseliny. PZA působí pouze na *M. tuberculosis* (ostatní mykobakterie nemají pyrazinamidázu). Analog pyrazinamidu 5-chlor-pyrazinamid vykazuje širší spektrum účinku, je aktivní proti pomalu rostoucím mykobakteriím (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*) i proti rychle rostoucí *M. smegmatis*<sup>9</sup>.

PZA se dobře absorbuje z GIT, je vylučován močí, nežádoucími účinky jsou hepatotoxicita a hyperurikémie<sup>17</sup>.

### ***Ansamycinová antibiotika***

Ansamycinová antibiotika jsou z chemického hlediska makrocyclické laktamy, mají planární aromatickou část molekuly přemostěnou dlouhým alifatickým řetězcem obsahující laktamovou vazbu. V současnosti ansamyciny patří mezi nejvýznamnější terapeutika tuberkulózy. Mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy prostřednictvím inaktivace bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy. Mají velmi široké antibakteriální spektrum zahrnující vedle řady grampozitivních a gramnegativních koků i chlamydie, mykoplazmata a rickettsie, významný je účinek na mykobakterie.

- ***Rifampicin (RMP)***



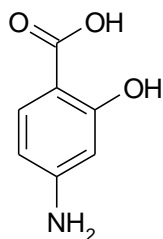
Je to polosyntetická látka, produkována *Streptomyces mediterranei*, účinná na *M. tuberculosis*, atypická mykobakteria, ale i na jiné bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*). Použití je však rezervováno hlavně pro terapii tuberkulózy, a to v kombinaci s jinými antituberkulotiky k léčbě všech forem a stadií

TBC. Je-li podáván samostatně vývoj rezistence je velmi rychlý. Je účinný proti extra- i intracelulárním mikroorganismům, má sterilizační účinky i na spící bakterie. Inhibuje syntézu RNA tvorbou stabilních komplexů s RNA polymerázou.

Velmi dobře se absorbuje z GIT, je vylučován žlučí, a je induktorem jaterních enzymů. Mezi nežádoucí účinky patří hepatotoxicita, bolesti hlavy, anemie, horečky, oranžové zbarvení moči a stolice<sup>16,17</sup>.

### **Antituberkulotika druhé volby**

#### ***Kyselina p-aminosalicylová (PAS)***

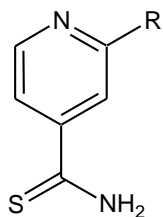


Jedno z nejstarších antituberkulotik je látka velmi jednoduché struktury. Mechanismus účinku je vysvětlován inhibicí syntézy kyseliny listové, působí bakteriostaticky.

Dobře se absorbuje z GIT, vylučuje se močí, distribuuje se i do tuberkuloidních lézí, zvyšuje plazmatickou hladinu isoniazidu. Nežádoucí účinky jsou GIT intolerance a časté alergické reakce. Výhodou PAS je její nízká cena, nevýhodou nutnost vysokých terapeutických dávek (denně 12-16 g) a vysoké riziko vzniku rezistence. Ve vyspělých státech se prakticky nepoužívá již ani v kombinacích<sup>16</sup>.



### ***Ethionamid, Prothionamid***



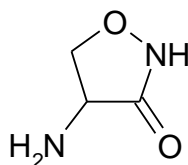
ethionamid (R= ethyl)

prothionamid (R= propyl)

Jsou to relativně toxická bakteriostatická antituberkulotika, od jejichž používání se ustoupilo v 70. a 80. letech dvacátého století. Jejich použití v monoterapii je nevhodné vzhledem k rychlému vzniku rezistence a významné toxicitě. Mají omezený význam při léčbě plicní a mimoplicní tuberkulózy, u níž se podávají vždy v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Ethionamid se používá v případě rezistence na antituberkulotika první řady, a rovněž v terapii *Mycobacterium avium* komplexu u pacientů se syndromem získané imunodeficiencie v případě rezistence na léčiva první volby. Prothionamid je účinný i proti *M. leprae*. Mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny, dochází k hydrolyze thioamidové skupiny a vzniká isonikotinová kyselina.

Nežádoucí účinky jsou gynekomastie, impotence, hepatitis<sup>16,17,18</sup>.

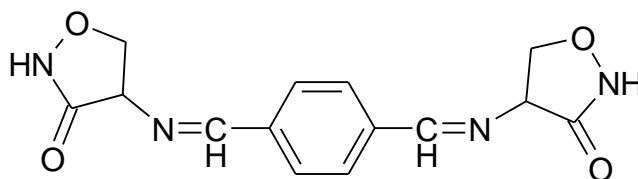
### ***Cykloserin***



Cykloserin je antibiotikum produkované *Streptomyces orchidaceus*. Inhibuje inkorporaci D-alaninu do pentapeptidu peptidoglykanu buněčné stěny tím, že inhibuje enzym alaninracemázu. Narušuje tedy syntézu buněčné stěny.

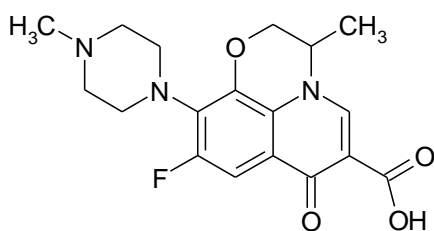
Dobře se absorbuje z GIT, je vylučován močí jako parentní látka, proto je vhodný pro léčbu renální tuberkulózy. Cykloserin způsobuje poruchy CNS (bolesti hlavy, třes, křeče, zmatenost, psychózy, halucinace), příležitostně se může vyskytnout hepatotoxicita<sup>16,17,18</sup>.

## ***Terizidon***

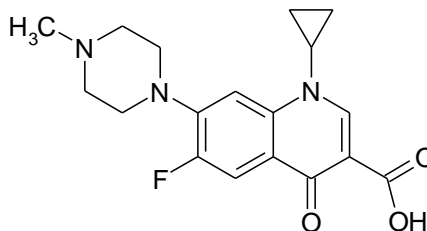


Terizidon je derivát cykloserinu (kondenzační produkt s tereftaldialdehydem). Po resorpci z něj vzniká cykloserin, je tedy jeho proléčivem. Uplatňuje se pouze ve výjimečných případech proti vysoce rezistentním atypickým mykobakteriím. Jeho podávání může vést k poškození CNS<sup>16,17,18</sup>.

## ***Fluorované chinolony***



ofloxacin

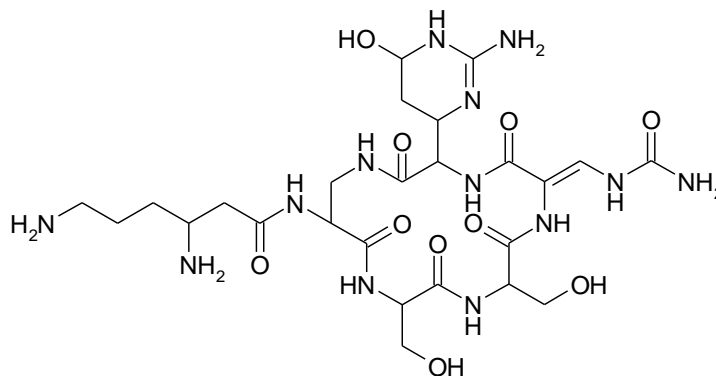


ciprofloxacin

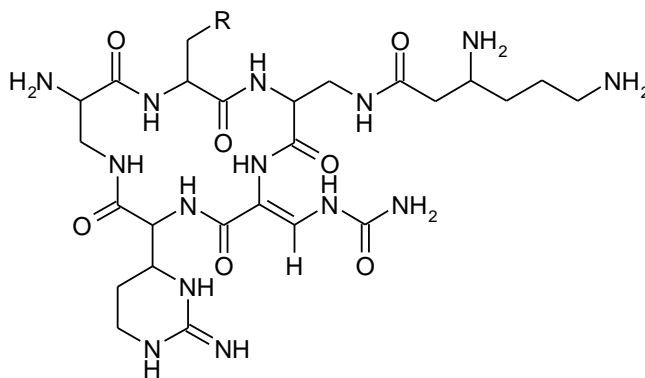
V terapii mykobakteriálních infekcí se klinicky využívají především ciprofloxacin a ofloxacin (dále také enoxacin, lomefloxacin, tosufloxacin, fleroxacin atd.). Mechanismem účinku je inhibice bakteriální gyrazy a bakteriální topoisomerasy IV, působí baktericidně.

Dobře se absorbují z GIT, mají velmi dobrý průnik do tkání a sekretů, vylučují se močí. Jsou celkově dobře snášeny, ale může se vyskytnout nevolnost, zvracení, bolesti hlavy, fotosenzitivita, poruchy nervové a psychické, záněty šlach<sup>16,17,18</sup>.

### *Kapreomycin, viomycin*



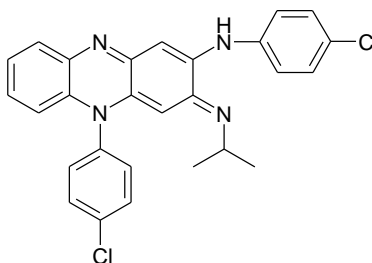
viomycin



kapreomycin IA R=OH  
kapreomycin IB R=H

Patří mezi cyklická peptidová antibiotika, k léčbě tuberkulózy nejsou používána příliš často. Inhibují proteosyntézu vazbou na 30 S podjednotku ribozómu. Obě látky mohou působit nefrotoxicky a ototoxicky<sup>16,17,18</sup>.

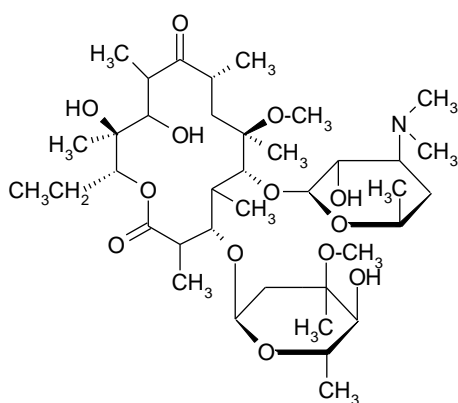
### *Iminofenaziny*



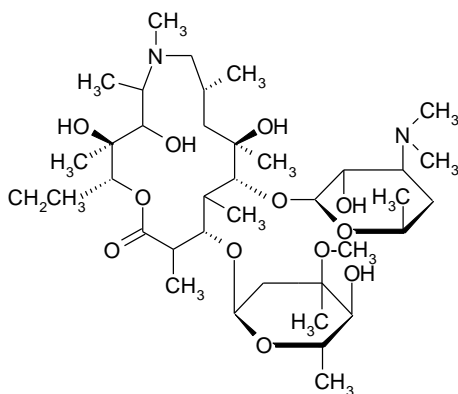
klofazimin

Jsou to sloučeniny používané především proti lepra, ale uplatnění dosáhly i v terapii některých mykobakterií způsobených *M. intracellulare*. Nejdůležitější je klofazimin. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na DNA mykobakterií (guanin). Toto baktericidní chemoterapeutikum je velmi dobře rozpustné v tucích, a má proto velmi dlouhý biologický poločas (70 dnů). Spektrum účinku (*M. leprae*, *M. avium*) ho předurčuje k léčbě lepry rezistentní na dapson, a využití má dále u pacientů se syndromem získané imunodeficiencie<sup>16,17</sup>.

### **Makrolidy**



klarithromycin



azithromycin

Ze skupiny antibiotik typu makrocyclických laktonů se v terapii mykobakteriálních infekcí využívají hlavně **klarithromycin** a **azithromycin**<sup>16,17</sup>.

### 1.2.3. Léková rezistence

Bohužel již několik let po objevení a zavedení prvních antituberkulotik do praxe se díky léčbě jedním lékem objevila a rychle rozšiřovala rezistence jednotlivých kmenů *Mycobacterium tuberculosis*. Klasickým případem vzniku rezistence je mutace enzymů potřebných k aktivaci léčiv. Ve světě je nejrozšířenější rezistence zejména na INH a PZA. V praxi se tento problém řeší používáním kombinací různých léčiv.

Dnes se ve světě objevuje nový fenomén. Je jím MDR (multi drug resistance), definovaná jako současná rezistence na INH, RMP a další struktury. U léků první volby vzniká rezistence mutací na těchto cílových proteinech:

- INH: mutace v následujících genech - katG, inhA a inhB
- RMP: mutace v beta podjednotce DNA dependentní RNA polymerase, rpoB
- PZA: mutace v pyrazinamidáze
- STM: ribozomální mutace (s12 protein a 16S rRNA)

Základním pravidlem je nepřidávat žádné léčivo jednotlivě k terapii, která již selhala, protože je to nejjistější cesta k selekci rezistentních tlaků.

Zajímavostí může být například objevení se “W kmene TBC” v USA (New York City), který byl rezistentní hned na několik léčiv najednou (INH, RMP, STM, EMB a také kanamycin) <sup>19</sup>.

### 1.2.4. Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik

Terapie TBC zůstává i nadále celosvětovým problémem. Hledání nových léčiv je výzvou pro farmaceutický výzkum a vývoj. Stávajícími problémy léčby tuberkulózy jsou:

- rezistence mykobakterií
- dlouhá doba léčby a s ní související non-compliance pacientů
- toxicita antituberkulotik
- vedlejší a nežádoucí účinky léčiv

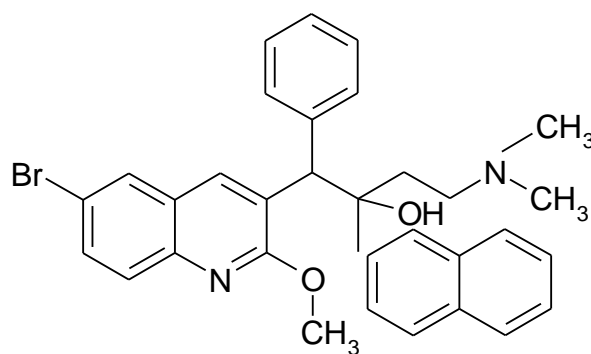
Hlavním cílem výzkumu je proto zkrátit dobu léčby a tak zvýšit compliance pacientů, najít léčiva, která budou účinná i proti “multidrug resistant”

mykobacteriím, budou méně toxická a budou mít méně nežádoucích a vedlejších účinků. Také je důležité najít nové cíle, kde v mykobakteriu zapůsobit léčivý. Proto je nutné mít důkladně zmapovaný genom *M. tuberculosis*, dále definovat způsoby biosyntézy v mykobakteriální buněčné stěně a nakonec detekovat geny ovlivňující latenci a virulenci.

Mezi nová perspektivní léčiva lze zahrnout:

### ***Diarylchinolin ("J compound")***

Toto nové léčivo účinkuje na aktivní populace *M. tuberculosis* a *M. smegmatis*, avšak je velmi málo účinné zejména proti např. *E.coli* nebo *Staphylococcus aureus*. Rezistence na diarylchinolin vzniká mnohem pomaleji než na dosavadní léčiva TBC. Mechanismem účinku je inhibice mykobakteriální ATP syntázy, která je esenciálním enzymem ve všech mykobakteriích, ale není přítomna v hostitelských buňkách, proto má toto léčivo mnohem vyšší selektivitu k mykobacteriím a je tedy méně toxické. Velmi dobře působí synergicky s PZA a to na mykobakterie nacházející se v plicích a ve slezině. Léčivo má dlouhý biologický poločas, dobrou farmakokinetiku a farmakodynamiku a také zkracuje dobu léčby na 2 měsíce.

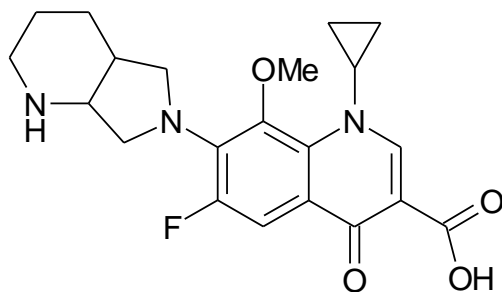


diarylchinolin

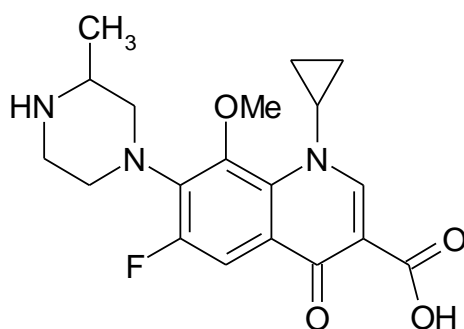
### ***Flurochinolony***

Nynější flurochinolony jako je ofloxacin a ciprofloxacin patří mezi léčiva druhé volby. Jejich nové analogy jsou **moxifloxacin** a **gatifloxacin**, které mají delší

poločasy účinku, jsou více účinná proti *M. tuberculosis* a mají lepší výsledky v kombinaci s RMP a PZA, než dosud používaná linie: INH, RMP a PZA.



moxifloxacin

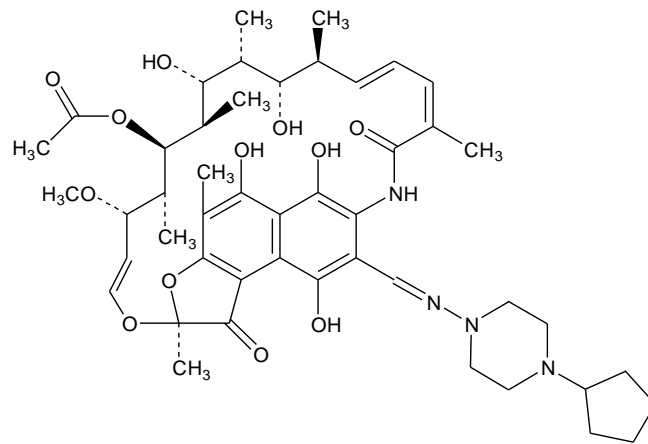


gatifloxacin

### *Rifamycinové deriváty*

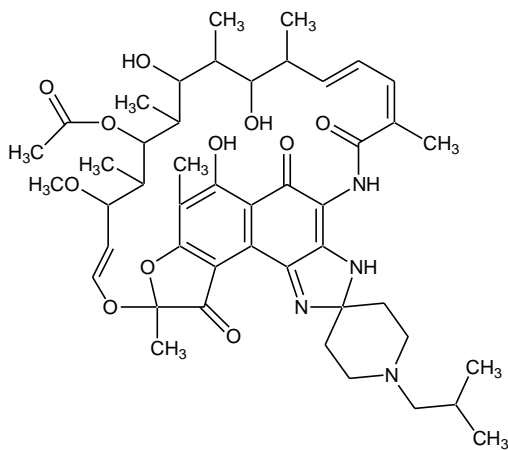
Do této skupiny léčiv patří **rifapentin, rifabutin a rifalazil.**

- **Rifapentin**



Rifapentin je cyklopentylový analog RMP, má však delší biologický poločas. Je vyhrazen pro multirezistentní kmeny a atypická mykobakteria. Je velmi dobře snášen pacienty a zvyšuje compliance tím, že je podáván jen jedenkrát týdně.

- **Rifabutin**

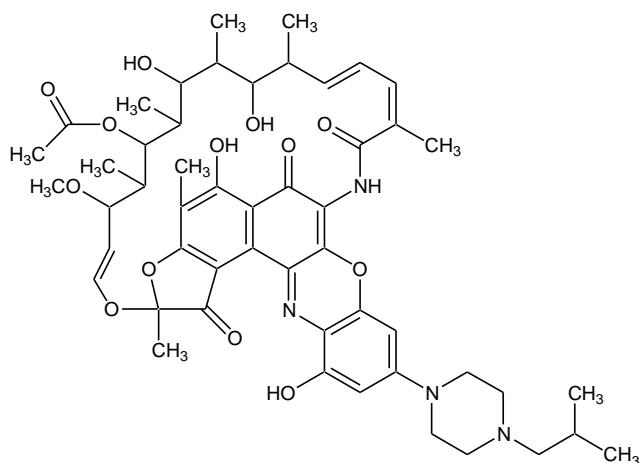


Rifabutin je spiropiperidylový analog RMP. Je rovněž vyhrazen pro multirezistentní kmeny a atypická mykobakteria.

- **Rifalazil**

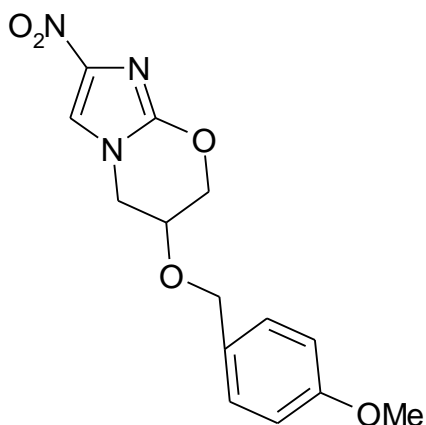
Rifalazil má srovnatelnou účinnost s rifabutinem. Může se kombinovat s INH nebo s RMP. Působí mimojiné i na chlamydie a *Helicobacter pylori*.





### *Nitroimidazopyran*

Léčivo je hlavně účinné vůči multirezistentním mykobakteriím. Jedná se o prodrug. Hlavní účinná látka (amin) inhibuje syntézu kys. mykolové a tvorbu proteinů inhibicí glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy a nitroreduktázy. Účinkem je tato látka srovnatelná s moxifloxacinem.



nitroimidazopyran

Výše uvedené látky představují perspektivní léčiva tuberkulózy<sup>20</sup>.

## **2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

V současné době hledání nových antituberkulotických léčiv nabývá na významu kvůli znovuvyvstání epidemie tuberkulózy ve světě, dále kvůli lékové rezistenci a také toxicitě současných antituberkulotik.

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Faf UK v Hradci Králové se dlouhodobě zabývá syntézou potenciálních antituberkulotik<sup>21</sup>. Tato diplomová práce je příspěvkem k řešení tohoto výzkumného úkolu katedry.

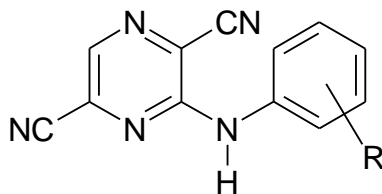
V roce 1996 byla navázána spolupráce s americkou institucí Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), jež je součástí National Institute of Health (NIH), která umožňuje zapojení fakulty do mezinárodního programu screeningu nově připravených antituberkulotik Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF)<sup>22</sup>.

V rámci své diplomové práce jsem se zaměřil na syntézu substituovaných 3-aryl-amino-pyrazin-2,5-dikarbonitrilů. Výchozí látkou byly: 3-chlor-pyrazin-2,5-dikarbonitril a různě substituované aniliny - při jejich výběru jsem navázal na práce svého školitele a konzultanta<sup>23,24</sup>.

Cíle mé práce byly následující:

- rešerše zaměřená na současný význam tuberkulózy ve světě, její léčbu a potenciální antituberkulotika
- v dostupné chemické literatuře zjistit metody přípravy výchozí látky chemických reakcí
- syntéza série sloučenin
- předání látek na biologické hodnocení - antimykobakteriální a antimykotické aktivity
- studium vztahu mezi lipofilitou a biologickou aktivitou

Obecný vzorec připravovaných sloučenin (substituované 3-aryl-amino-pyrazin-2,5-dikarbonitrily):

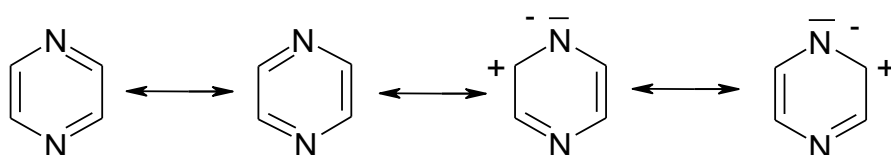


### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1. VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA

Pyrazin představuje vysoce symetrickou molekulu. Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid několika základních struktur (Obr. 1). Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciálních alifatických aminů. Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base, a v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je nejslabší bází<sup>25</sup>.

Obr. 1: Rezonanční struktury pyrazinového jádra



Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly<sup>26</sup>

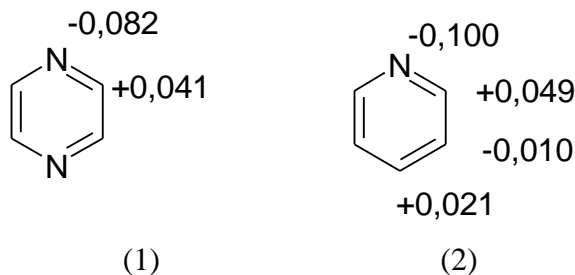
Sloučenina	% aromaticity
benzen	100
pyridin	82
pyridazin	65
pyrimidin	67
pyrazin	75

Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů<sup>25</sup>

Sloučenina	pKa (1. stupeň)
pyridin	5.20
pyridazin	2.33
pyrimidin	1.30
pyrazin	0.65

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

Je patrné, že hustoty  $\pi$ -elektronů na  $\alpha$ -uhlících pyrazinu (1) a pyridinu (2) jsou velmi podobné a lze očekávat i podobnou chemickou reaktivitu  $\alpha$ -substituovaných pyrazinů a pyridinu<sup>27,28,29,30</sup>.



Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivní geometrii molekuly<sup>26</sup>.

V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární, vzdálenost C-H je 13,48 nm, C-C potom 13,83 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového jádra, takže úhel sevřený N1,  $\alpha$ - a  $\beta$ - uhlíkem je o  $5^\circ$  ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu<sup>31</sup>.

Pyrazin, stejně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím. Příímý elektrofilní atak je ztížen indukčním 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<sup>32</sup>.

Infračervená spektra pyrazinu a pyrazin *N*-oxidů vykazují 4 roztažené  $\nu$ -vibrace v oblasti 1600-1370  $\text{cm}^{-1}$ . Vibrace v rozmezí 1600-1575  $\text{cm}^{-1}$  má různou (většinou slabou) intenzitu, v oblasti 1500-1520  $\text{cm}^{-1}$  slabou až střední intenzitu, v oblasti 1500-1465 a 1420-1370  $\text{cm}^{-1}$  se nacházejí vibrace středně silné intenzity. Valenční vibrace *N*-oxidů se objevují v oblasti 1350-1260  $\text{cm}^{-1}$  a mají silnou intenzitu. U monosubstituovaných pyrazinů se vyskytuje ještě silný pás v oblasti 1060-1040 a 1030-1010  $\text{cm}^{-1}$ . Navíc mají pyrazinové deriváty ještě mimorovinné  $\sigma(\text{CH})$  vibrace kruhu v oblasti 860-800  $\text{cm}^{-1}$ . U nesubstituovaných pyrazinů tato vibrace klesá pod 800  $\text{cm}^{-1}$ . Substituenty se  $-M$  efektem posunují hodnoty vlnočtu vibrací k vyšším mezím, substituenty s  $+M$  efektem tyto hodnoty snižují<sup>33</sup>.

Příklady hodnot vlnočtů a vibrací pyrazinu jsou uvedeny v následující tabulce<sup>33</sup>.

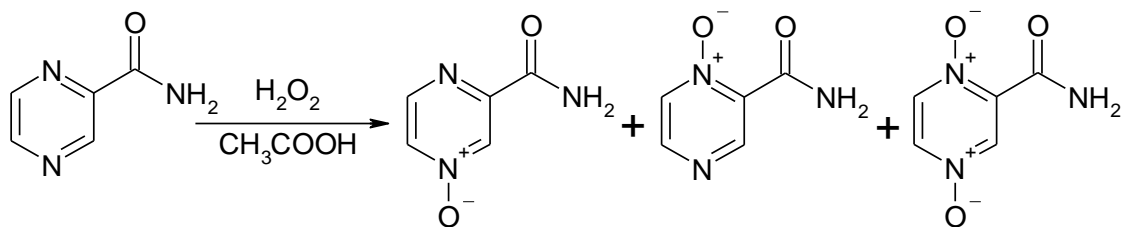
Sloučenina	v aromatického kruhu								$\sigma$ (C-H)
	1590	1535	1488	1430	1175	-	1059	1005	
2-aminopyrazin	1590	1535	1488	1430	1175	-	1059	1005	814
2-metylpyrazin	-	-	-	-	-	-	-	-	824
2-chlorpyrazin	1560	1522	1462	1387	1175	1133	1048	1009	839
2-pyrazinkarbonitril	-	-	1464	1401	1176	1148	1147	1013	851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

## 3.2. METODY PŘÍPRAVY VÝCHOZÍCH LÁTEK

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

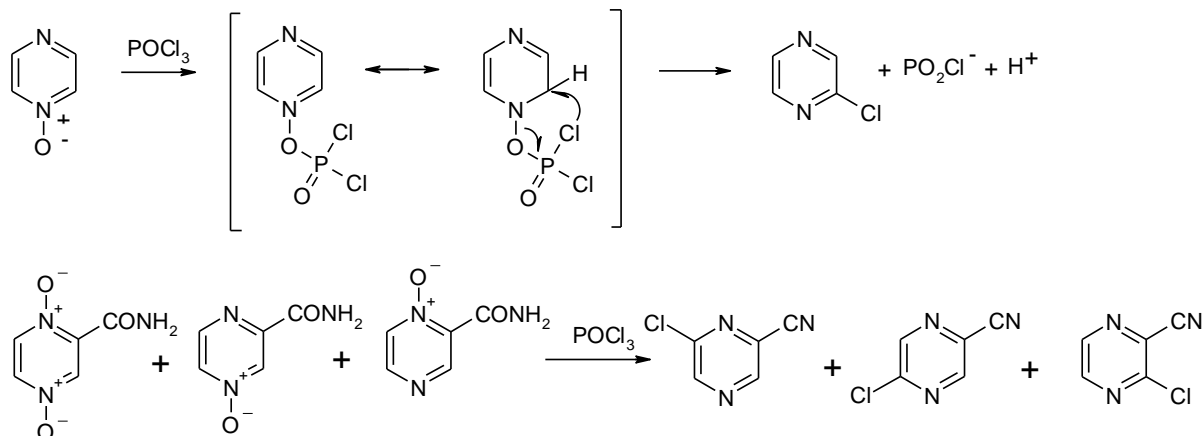
### 3.2.1. Příprava *N*-oxidu

Působením peroxidu vodíku v prostředí ledové kyseliny octové na pyrazin-2-karboxamid vzniká po šesti hodinovém zahřívání při teplotě v rozmezí 70-80 °C převážně 4-*N*-oxid pyrazin-2-karboxamid, v malé míře vznikají i 1-*N*-oxid pyrazin-2-karboxamid a 1,4-*N,N*-dioxid pyrazin-2-karboxamid. Po ochlazení reakční směsi se vyloučené krystaly odfiltrují a promyjí vodou a ethanolem<sup>34,35</sup>.



### 3.2.2. Příprava halogenderivátu

Chlorace směsi *N*-oxidů pyrazin-2-karboxamidu se provádí metodou nukleofilní halogenace a zároveň deoxygenace pomocí chloridu thionylu nebo chloridu fosforylu za vzniku tří polohových izomerů 6-, 5- a 3-chlorpyrazin-2-karbonitrilu. (Chlorid fosforylu, resp. thionylu působí zároveň jako dehydratační činidlo.)<sup>34,35,36</sup>



Jednotlivé polohové izomery lze oddělit pomocí sloupcové chromatografie. Pro jejich dělení není vhodná destilace, z důvodu jejich blízkých teplot varu.

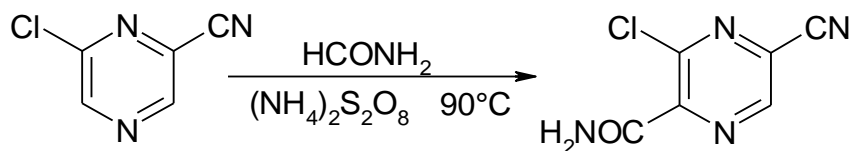
### 3.2.3. Příprava amidů

K metodám přípravy amidů patří homolytická amidace<sup>37</sup>. Zdrojem amidového radikálu je formamid s redoxním systémem tvořeným peroxidem vodíku a Fe<sup>2+</sup>, diterc. butylperoxidem a Fe<sup>2+</sup>, dibenzoylperoxidem, diterc. butylperoxidem, peroxodisíranem amonným či draselným a Fe<sup>2+</sup> nebo Ag<sup>+</sup>, nebo peroxodisíranem amonným či draselným za zvýšené teploty<sup>38</sup>.

Vlastnosti již přítomného substituentu na pyrazinovém kruhu podmiňují místo, které bude radikálem atakováno. U monosubstituovaného pyrazinového derivátu substituent s -M efektem (-COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CONH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -CN) usměřňuje vstup radikálu přednostně do polohy 5 a vzniká 2,5-disubstituovaný pyrazin. Substituent s +M efektem (-Cl, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>) řídí atak radikálu do polohy 3 a vzniká 2,3-disubstituovaný pyrazin. Při amidaci 5-chlorpyrazin-2-karbonitrilu, který obsahuje oba typy substituentů (tj. s +M i s -M) se získá amid 6-kyan-3-chlorpyrazin-2-

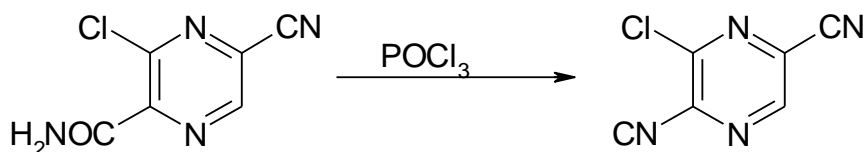


karboxylové kyseliny. Při amidaci 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu vznikne amid 5-kyan-3-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny<sup>39,40</sup>.



### 3.2.4. Příprava nitrilů

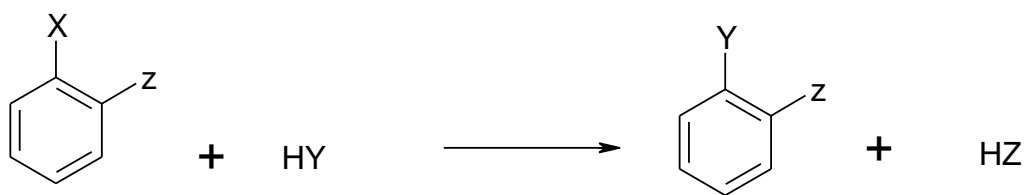
Příprava nitrilů má většinou povahu nukleofilní substituce. Aromatické nitrily se však připravují nejčastěji z diazoniových solí, Sandmeyerovou reakcí. Dále je lze připravit dehydratací primárních amidů, např. za použití činidla oxidu fosforečného, oxidu hlinitého nebo chloridu fosforylu<sup>41</sup>.



### 3.2.5. Nukleofilní substituce na pyrazinovém jádře

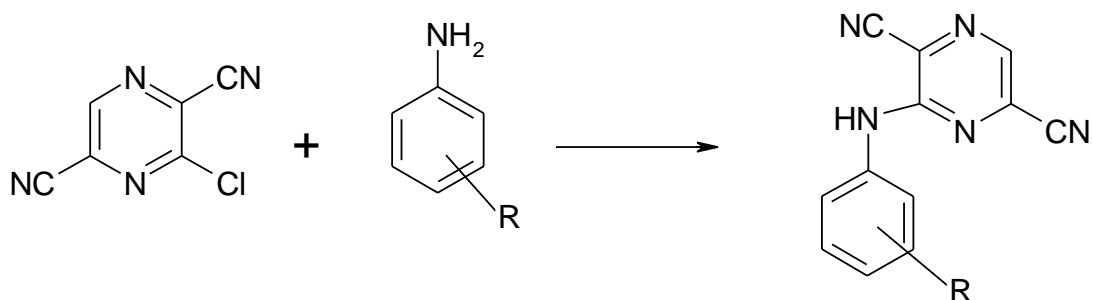
Substituované deriváty 3-aryl-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu byly připraveny nukleofilní substitucí typu aminodehalogenace.

Výměna halogenu za aminoskupinu na arylhalogenidu vyžaduje obecně tvrdší reakční podmínky. Reakci usnadňuje přítomnost elektronegativních skupin (např. -NO<sub>2</sub>, -CN, -CONH<sub>2</sub>, -COOH), hlavně jsou-li v polohách *ortho* a *para*. Snadnost substituce halogenu vzrůstá dále s počtem aktivizujících skupin<sup>41</sup>.



X = halogen

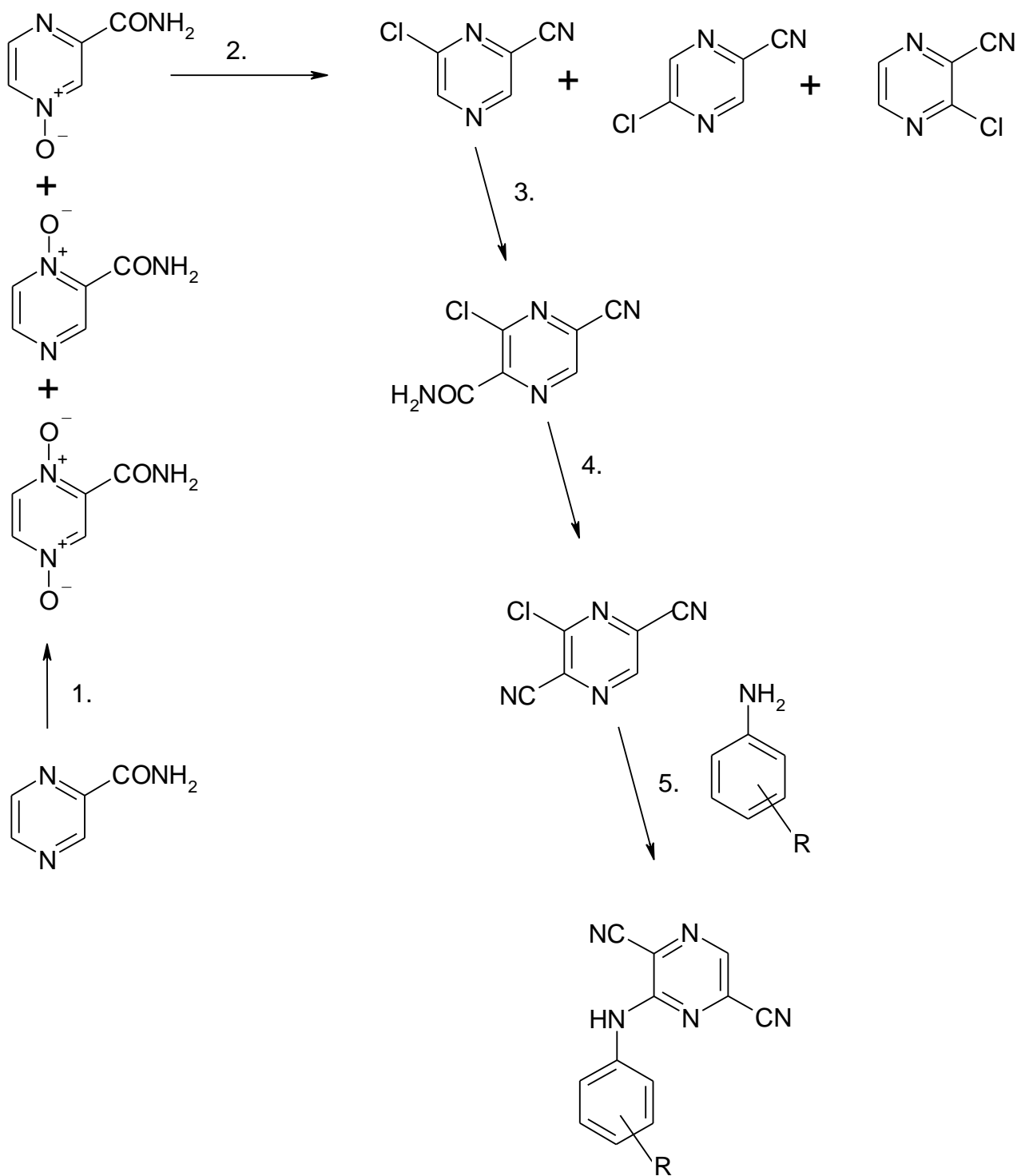
Z = elektronegativní skupina



Tyto obecné závěry lze uplatnit i v případě nukleofilní substituce na pyrazinovém jádře. V rámci mé diplomové práce jsem postupoval následovně: reakce byla prováděna po dobu 12 hodin v nevodném prostředí toluenu pod ochrannou atmosférou argonu s přidavkem triethylaminu, reakční teplota byla 135-140 °C<sup>23</sup>.

### 3.2.6. Souhrnné schéma přípravy

1. N-oxidace
2. halogenace (chlorace) a deoxygenace
3. homolytická amidace
4. redukce amidu
5. nukleofilní substituce typu aminodehalogenace



## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1. POUŽITÉ PŘÍSTROJE

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

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstevné chromatografie na deskách SILUFOL UV 254 (Kavalier, Votice) za použití vyvíjecí soustavy ethylacetát-hexan (1:4). Detekovalo se UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Preparativní chromatografie byla provedena pomocí FlashMaster Personal (Flash Chromatography System, Argonaut, USA). Použitá průtoková rychlost byla 30 ml/min., mobilní fáze ethylacetát-hexan (0-20%), jako sorbent byl použit silikagel (Kieselgel 60, Merck, Germany).

Teploty tání byly stanoveny pomocí Koflerova bloku (Nagema Rapido K8, NDR) a jsou nekorigované.

Spektra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR byla získána pomocí Varian Mercury-Vx BB 300 spektrometru při 300 MHz na Katedře anorganické a organické chemie. Vzorky byly měřeny v dimethylsulfoxidu,  $^1\text{H}$  chemické posuny ( $\delta$ , ppm) jsou vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako vnitřnímu standardu.

Elementární analýzy byly provedeny na CHN analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

Infračervená spektra byla změřena na Katedře anorganické a organické chemie na spektrometru Nicolet Impact 400. Krystalické látky byly měřeny v tabletách bromidu draselného. Vlnočty jsou uváděny v  $\text{cm}^{-1}$ .

UV spektra byla měřena na přístroji Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters corp., Milford, MA, USA).

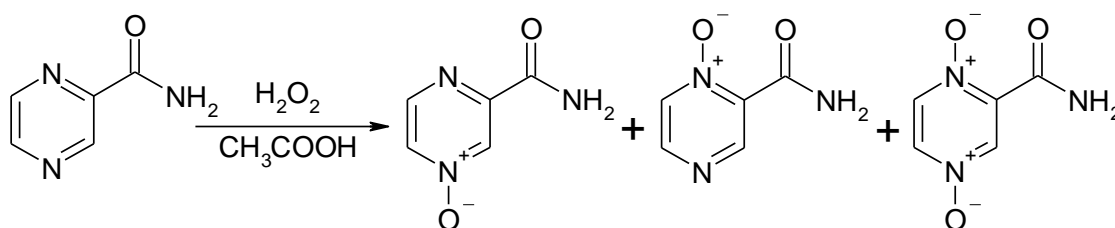
Log  $P$  sloučenin byl vypočten pomocí programu ACD/log  $P$  ver.1.0. (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto).

Log  $K$  byl změřen pomocí HPLC chromatografie - Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Proces byl monitorován pomocí Millennium 32<sup>®</sup> Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp., Milford, MA, USA).

## 4.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PROVÁDĚNÉ REAKCE

Na všechny reakce byl použita reagentia o čistotě 99% a vyšší. Kde bylo potřeba, byly reakce prováděny v bezvodém prostředí pod ochrannou atmosférou argonu.

### 4.2.1. Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



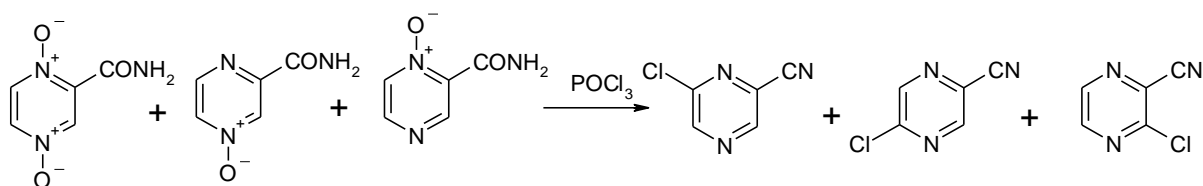
K roztoku 340 ml (11,0 mol) 30-ti procentního peroxidu vodíku v 520 ml (9,0 mol) ledové kyseliny octové bylo po částech přidáno 128 g (1,04 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Směs byla zahřata na 70 °C a dále byla teplota udržována na 70-80 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byla reakční směs ponechána přes noc v lednici. Vypadlé krystaly byly odsáty a promyty vodou<sup>23</sup>.

Výtěžek: 52,7 g, tj. 36,4 % teoretického výtěžku

Sumární vzorec: C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Mol. hmotnost: 139,11

### 4.2.2. Příprava 6-chlor-pyrazin-2-karbonitrilu



K 200 ml (2,24 mol) chloridu fosforýlu bylo po částech přidáno 52,7 g (0,38 mol) směsi oxidů amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny (hlavní podíl má 4-N-oxid amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny). Směs byla zahřívána na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl obsah v baňce ochlazen na teplotu 10-15 °C a reakční směs byla pomalu vylita na led. Teplota při hydrolyze nesmí přestoupit 50 °C. Potom byl

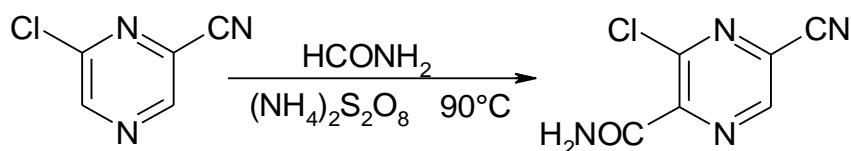
produkt extrahován chloroformem po dobu 48 hodin. Byla získána reakční směs, která byla separována chromatograficky za použití FlashMaster Personal Chromatografy, mobilní fází byl ethylacetát-hexan (0-20%). Dále byly jednotlivé polohové izomery detekovány pomocí TLC chromatografie. K následující reakci byl použit pouze čistý 6-chlorpyrazin-2-karbonitril<sup>23</sup>.

Výtěžek: 32,2 g, tj. 61 % teoretického výtěžku

Sumární vzorec: C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Cl

Mol. hmotnost: 139,54

#### 4.2.3. Příprava amidu 3-chlor-5-kyan-pyrazin-2-karboxylové kyseliny



V trojhrdlé litrové baňce opatřené teploměrem a míchadlem bylo ve 201,5 ml (227,8 g) formamidu rozpuštěno 32,2 g (0,23 mol) 6-chlor-pyrazin-2-karbonitrilu. Roztok byl zahřát na teplotu 90 °C a za míchání byl po částech při této teplotě během 1,5 hodiny přidáván pevný peroxodisíran amonný (0,26 mol). Po přidání veškerého množství byla tmavohnědá směs míchána ještě 1 hodinu při 90 °C. Poté byla reakční směs zředěna 200 ml vody, byla odsáta nerozpuštěná sraženina a filtrát byl kontinuálně extrahován chloroformem po dobu 48 hodin. Po oddestilování rozpouštědla byl olejovitý zbytek dán do lednice přes noc. Vypadlé krystaly byly odsáty a překrystalizovány z ethanolu<sup>23</sup>.

Výtěžek: 4,2 g, tj. 10 % teoretického výtěžku

Sumární vzorec: C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>4</sub>OCl

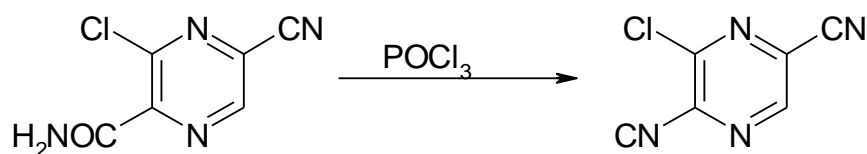
Mol. hmotnost: 182,57

##### 4.2.3.1. Optimalizace homolytické amidace

Jelikož předchozí reakce je velmi ztrátová (výtěžek byl 10,0%), snažil jsem se optimalizovat reakční podmínky tak abych dosáhl co nejvyššího výtěžku produktu, kterým je 3-chlor-5-kyan-pyrazin-2-karboxamid. S použitím následujících katalyzátorů jsem dosáhl takovýchto výsledků:

Katalyzátor	% výtěžek produktu reakce
Cu	11,3
Cu <sub>2</sub> O	11,7
AgNO <sub>3</sub>	9,4
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,3

#### 4.2.4. Příprava 3-chlor-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu



4,2 g (0,023 mol) 3-chlor-5-kyan-2-pyrazinkarboxamidu bylo zahříváno s 7,8 ml (0,087 mol) chloridu fosforly při teplotě 105 °C po dobu jedné hodiny.

Reakční směs byla ochlazená na 10-15°C a opatrně nalita na led. Vypadlé krystaly byly odsáty a filtrát byl extrahován chloroformem. Poté byl chloroform oddestilován a látka přečištěna krystalizací ze zředěného ethanolu<sup>23</sup>.

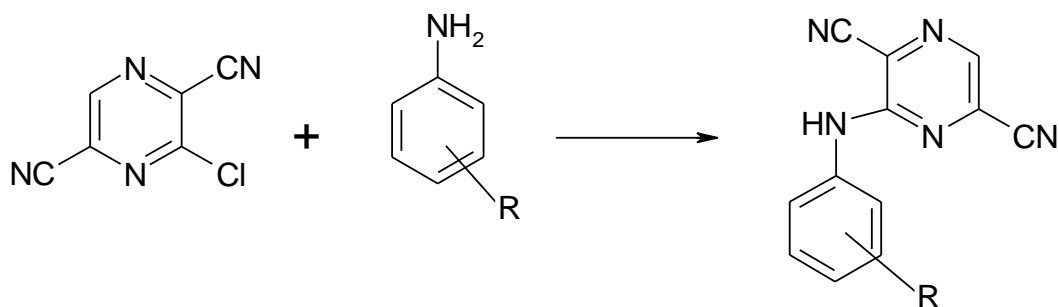
Výtěžek: 1,9 g, tj. 51 % teoretického výtěžku

Sumární vzorec: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>Cl

Mol. hmotnost: 164,55

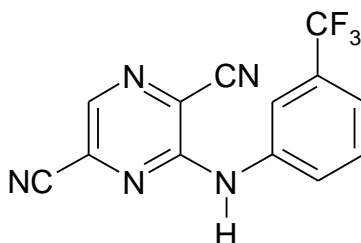
#### 4.2.5. Obecný postup přípravy *N*-substituovaných derivátů 3-chlor-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu





V 30 ml bezvodého toluenu bylo rozpuštěno 50 mg (0,304 mmol) 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitrilu. K tomuto roztoku bylo přidáno 31 mg triethylaminu a ekvimolární množství substituovaného anilinu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem, reakční teplota byla 135-140°C, směs byla zahřívána po dobu 12 hodin v ochranné atmosféře argonu. Po ochlazení bylo za sníženého tlaku oddestilováno rozpouštědlo. Produkt byl vyčištěn pomocí flash chromatografie, za použití soustavy ethylacetát-hexan (0-20%)<sup>23</sup>.

#### 4.2.5.1. Příprava 3-(3-trifluoromethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu (CN1)



Výtěžek: 33 mg , 9,4% teoretického výtěžku

Sumární vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>6</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>

Molekulová hmotnost: 289,22

Teplota tání: 184-188°C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Elementární analýza	C	H	F	N
Vypočteno %	53.99	2.09	19.71	24.21
Nalezeno %	54.06	2.11	19.80	24.22

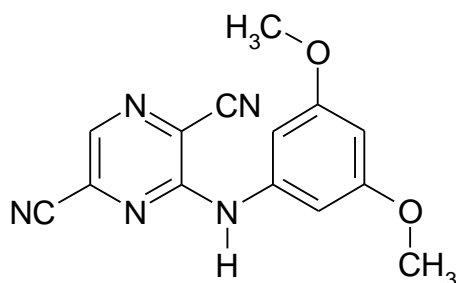
IČ spektra:

UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 284,3/3,20

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 9,67 (bs, 1 H, NH), 9,38 (d, 1 H,  $J=1,37\text{Hz}$ , H3), 8,62 (d, 1 H,  $J=1,37\text{Hz}$ , H6), 7,89 (t, 1 H,  $J=2,07\text{Hz}$ , H2'), 7,59 (ddd, 1 H,  $J=7,96\text{Hz}$ ,  $J=2,07\text{Hz}$ ,  $J=1,10\text{Hz}$ , H4'), 7,30 (t, 1 H,  $J=7,96\text{Hz}$ , H5'), 7,13 (ddd, 1 H,  $J=7,96\text{Hz}$ ,  $J=2,07\text{Hz}$ ,  $J=1,10\text{Hz}$ , H6'), 1,45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 168.0, 161.1, 143.0, 141.0, 139.0, 138.5, 134.8, 130.1, 124.6, 119.8, 117.6, 37.1, 29.7

#### 4.2.5.2. Příprava 3-(3,5-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu (D1)



Výtěžek: 37 mg , 43,3% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 281,28

Teplota tání: 225-226°C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N	O
---------------------	---	---	---	---

Vypočteno %	59,78	3,94	24,90	11,38
Nalezeno %	59,70	3,99	24,91	11,40

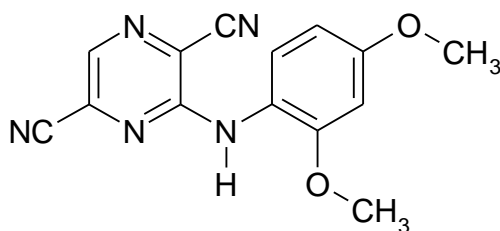
IČ spektra:

UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 290,3/3,76

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.85 (s, 1 H, H6), 8.65 (s, 1 H, H4'), 6.8 (s, 2 H, H2', H6'), 6.3 (s, 1 H, NH), 3.75 (s, 6 H, H3', H5')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 160.6, 152.5, 139.6, 137.9, 129.2, 119.4, 115.7, 114.8, 100.6, 96.6, 55.4

#### 4.2.5.3. Příprava 3-(2,4-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu (D2)



Výtěžek: 63 mg , 73,71% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 281,28

Teplota tání: 188-191°C

Vzhled: červená krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N	O
---------------------	---	---	---	---

Vypočteno %	59.78	3.94	24.90	11.38
Nalezeno %	59.81	3.96	24.90	11.42

IČ spektra:

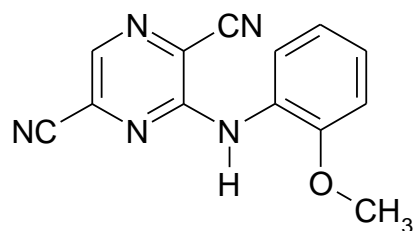
UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 289,1/3,47

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.5 (s, 1 H, H6), 8.5 (s, 1 H, H3'), 7.25 (d, 1 H, J=9.03 Hz, H5'), 6.7 (s, 1 H, NH), 6.55 (d, 1 H, J=9.48 Hz, H6'), 3.8 (s, 6 H, H2', H4')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 159.3, 155.1, 153.6, 136.7, 129.9, 127.7, 118.5, 117.3, 115.7, 114.8, 104.9, 99.4, 55.9, 55.6

#### 4.2.5.4. Příprava 3-(2-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

(D3)



Výtěžek: 48 mg , 62,8% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$

Molekulová hmotnost: 251,25

Teplota tání: 167-172°C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N	O
---------------------	---	---	---	---

Vypočteno %	62.15	3.61	27.87	6.37
Nalezeno %	62.23	3.62	27.74	6.47

IČ spektra:

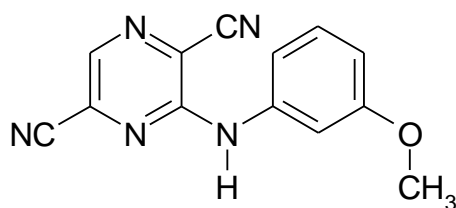
UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 279,6/3,35

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.5 (s, 1 H, H6), 8.6 (s, 1 H, NH), 7.5 (d, 1 H, J=12.00 Hz, H3'), 7.25 (t, 1 H, J=12.12 Hz, H4'), 7.15 (d, 1 H, J=11.27 Hz, H6'), 7.0 (t, 1 H, J=10.81 Hz, H5'), 3.8 (s, 3 H, H2')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 153.1, 153.0, 137.2, 129.6, 127.3, 125.8, 125.5, 120.7, 118.3, 115.7, 114.7, 112.2, 55.9

#### 4.2.5.5. Příprava 3-(3-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

(D4)



Výtěžek: 36 mg , 47,15% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$

Molekulová hmotnost: 251,25

Teplota tání: 191-193°C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N	O
Vypočteno %	62.15	3.61	27.87	6.37
Nalezeno %	62.16	3.62	27.79	6.41

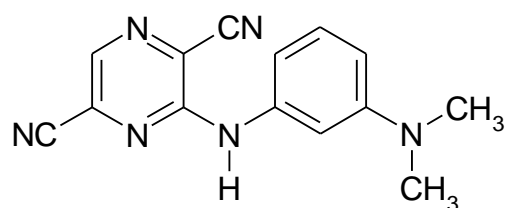
IČ spektra:

UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 284,3/3,18

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.95 (s, 1 H, H6), 8.65 (s, 1 H, H2'), 7.3 (t, 1 H,  $J=13.88$  Hz, H5'), 7.15 (s, 1 H, NH), 7.1 (d, 1 H,  $J=19.94$  Hz, H4'), 6.65 (d, 1 H,  $J=13.57$  Hz, H6'), 3.9 (s, 3 H, H3')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 159.6, 152.6, 139.1, 137.9, 129.7, 129.3, 119.3, 115.7, 114.9, 114.7, 110.4, 108.4, 55.3

#### 4.2.5.6. Příprava 3-(3-N,N-dimethylaminofenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu (D6)



Výtěžek: 38 mg , 47,32% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_6$

Molekulová hmotnost: 264,29

Teplota tání: 228-232°C

Vzhled: červená krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N
Vypočteno %	63.63	4.58	31.80
Nalezeno %	63.59	4.49	31.84

IČ spektra:

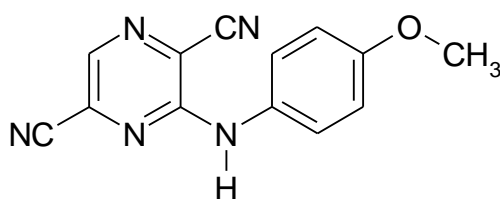
UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 270,1/3,14

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.6 (s, 1 H, H6), 8.55 (s, 1 H, H2'), 7.15 (t, 1 H, J=9.52 Hz, H5'), 6.9 (s, 1 H, NH), 6.85 (d, 1 H, J=17.00 Hz, H6'), 6.5 (d, 1 H, J=7.99 Hz, H4'), 2.9 (s, 6 H, H3')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 152.8, 151.0, 138.5, 137.4, 129.4, 129.2, 119.0, 115.8, 115.0, 110.6, 109.4, 106.9, 39.7

#### 4.2.5.7. Příprava 3-(4-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

(D7)



Výtěžek: 68 mg , 89,07% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$

Molekulová hmotnost: 251,25

Teplota tání: 179-182°C

Vzhled: oranžová krystalická látka

Elementární analýza	C	H	N	O
Vypočteno %	62.15	3.61	27.87	6.37
Nalezeno %	32.07	3.60	27.80	6.45

IČ spektra:

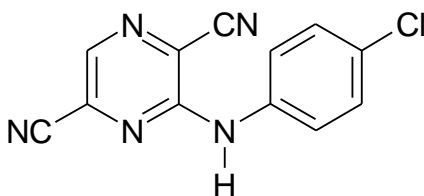
UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 290,3/3,26

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ : 9.85 (s, 1 H, H6), 8.5 (s, 1 H, NH), 7.4 (d, 2 H, J=22.97 Hz, H3', H5'), 6.95 (d, 2 H, J=22.95 Hz, H2', H6'), 3.85 (s, 3 H, H4')

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ : 156.9, 153.1, 137.1, 130.4, 129.5, 125.2, 118.6, 115.8, 114.9, 114.1, 55.4

#### 4.2.5.8. Příprava 3-(4-chlorofenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu

(D8)



Výtěžek: 43 mg , 27,67% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{ClN}_5$

Molekulová hmotnost: 255,67

Teplota tání: 196-199°C

Vzhled: žlutá krystalická látka



Elementární analýza	C	H	Cl	N
Vypočteno %	56.38	2.37	13.87	27.39
Nalezeno %	56.46	2.36	13.87	27.47

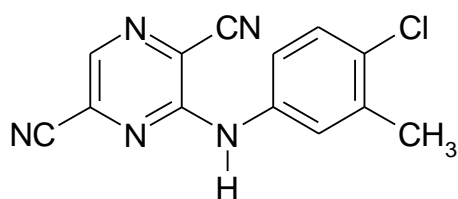
IČ spektra:

UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ):285,5/3,48

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ :

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ :

#### 4.2.5.9. Příprava 3-(4-chloro-3-methylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu (D9)



Výtěžek: 80 mg , 48,81% teoretického výtěžku

Sumární vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{ClN}_5$

Molekulová hmotnost: 269,70

Teplota tání: 135-138°C

Vzhled: žlutá krystalická látka

<b>Elementární analýza</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>Cl</b>	<b>N</b>
<b>Vypočteno %</b>	57.90	2.99	13.15	25.97
<b>Nalezeno %</b>	57.85	3.01	13.22	25.99

IČ spektra:

UV spektra ( $\lambda_{\max}/\log \epsilon$ ): 287,9/3,37

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO),  $\delta$ :

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO),  $\delta$ :

## **5. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ**

### **5.1. ANTITUBERKULOTICKÁ AKTIVITA**

Nově syntetizované deriváty pyrazinu budou (některé už byly) testovány na antituberkulotickou aktivitu americkou institucí Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), jež je součástí National Institute of Health (NIH). Tím jsou pracoviště Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové zapojena do mezinárodního programu vyhledávání antituberkulotické aktivity u nově připravených sloučenin - TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility).

Program TAACF se skládá ze tří propojených součástí:

- příjem a uchovávání sloučenin (Southern Research Institute, Frederick)
- in vitro screening (Hansen's Diseases Center)
- in vivo screening (Colorado State University)<sup>22</sup>

## 5.2. ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA

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

Připravené sloučeniny byly zkoušeny pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640 s glutaminem, který byl pufován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (Sigma). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975  $\mu\text{M}$ . Součástí testování byly slepé pokusy (bez účinné látky) a určení aktivity standardu (ketokonazol, KET) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35°C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC odečítány po 72 a 120 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon beigelii* 1188, *Trychophyton mentagrophytes* 445, *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272.

Testované kmeny-kód:

1. **CA** - *Candida albicans* ATCC 44849
2. **CT** - *Candida tropicalis* 156
3. **CK** - *Candida krusei* E28
4. **CG** - *Candida glabrata* 20/I
5. **TB** - *Trichosporon beigelii* 1188
6. **TM** - *Trychophyton mentagrophytes* 445
7. **AF** - *Aspergillus fumigatus* 231
8. **AC** - *Absidia corymbifera* 272

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) -MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )									
(kód)		KET	CN1	D1	D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9
<b>TM</b>	72h	<b>0,98</b>	<b>125</b>	>125	>250	<b>125</b>	<b>125</b>	>125	<b>62,5</b>		
	120h	<b>1,95</b>	<b>125</b>	>125	>250	>125	>125	>125	<b>62,5</b>		
<b>CA</b>	24h	< <b>0,24</b>	<b>62,5</b>	>125	>250	<b>125</b>	>125	>125	>500		
	48h	< <b>0,24</b>	<b>125</b>	>125	>250	>125	>125	>125	>500		

<b>CT</b>	24h	<b>1,95</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
	48h	<b>3,91</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
<b>CK</b>	24h	<b>0,98</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
	48h	<b>1,95</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
<b>CG</b>	24h	<b>0,49</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
	48h	<b>1,95</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
<b>TB</b>	24h	<b>&lt;0,24</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
	48h	<b>&lt;0,24</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
<b>AF</b>	24h	<b>7,81</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	<b>125</b>		
	48h	<b>7,81</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	>500		
<b>AC</b>	24h	<b>31,25</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	<b>125</b>		
	48h	<b>31,25</b>	>125	>125	>250	>125	>125	>125	<b>500</b>		

Pozn.: MIC je minimální inhibiční koncentrace, která je definována jako nejnižší koncentrace látky vykazující mikrobistatický účinek<sup>42</sup>.

Tučně je vyznačena hodnota MIC, která se nachází v rámci testovaného rozmezí.

### 5.3.VÝPOČET A ZMĚŘENÍ LIPOFILITY PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

Lipofilita ( $\log P$ ) *N*-substituovaných derivátů 3-aryl-amino-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu byla vypočtena pomocí počítačového programu ACD/  $\log P$  ver. 1.0.

Lipofilitu také charakterizuje hodnota  $\log K$ , jež byla změřena pomocí HPLC chromatografie - Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, USA) na koloně Symetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m, 4,6\*250 mm, Part No.WAT054275 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Proces byl monitorován pomocí Millennium 32<sup>®</sup> Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp., Milford, MA, USA).

Hodnoty  $\log P$  a  $\log K$  jednotlivých látek jsou uvedeny v následující tabulce.

Testovaná látka	$\log P$	$\log K$
CN1	3,50 $\pm$ 0,56	0,7831
D1	2,70 $\pm$ 0,54	0,6953

D2	2,03±0,53	0,6940
D3	2,20±0,52	0,7202
D4	2,56±0,52	0,6799
D6	2,75±0,52	0,7334
D7	2,25±0,51	0,6607
D8	3,29±0,52	0,7730
D9	3,75±0,52	0,8783

## 6.DISKUSE

Cílem této diplomové práce byla syntéza série *N*-substituovaných derivátů 3-aryl-amino-pyrazin-2,5-dikarbonitrilů, které mají v poloze 3 pyrazinového kruhu zavedený různě substituovaný primární aromatický amin. Při výběru vhodných substituentů do bočního aromatického jádra jsem navázal na práci svého školitele a konzultanta.

Výchozí látkou pro dané reakce byl 3-chlor-pyrazin-2,5-dikarbonitril. Finální produkty byly připraveny metodou nukleofilní substituce aromatických aminů na aromatickém jádře. Reakce probíhala v prostředí bezvodého toluenu pod ochrannou atmosférou argonu za přídavku triethylaminu a poskytovala dobré výtěžky. Totožnost a čistota jednotlivých získaných látek byly kontrolovány TLC chromatografií, teplotou tání na Koflerově bloku, elementární analýzou, IČ a UV spektry a  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektry.

Připravené sloučeniny byly určeny pro hodnocení antimykobakteriální a antifungální aktivity v podmínkách *in vitro*. Pro hodnocení antimykobakteriální aktivity byl použit klasický kmen *Mycobacterium tuberculosis*. Pro hodnocení antimykotické aktivity bylo použito 8 druhů hub, které jsou uvedeny v kapitole 5.2.

Výsledky z testování antimykobakteriální aktivity známe zatím jen u první látky CN1, ostatní látky zatím nebyly potvrzeny. Z předchozích získaných výsledků biologického hodnocení obecně vyplývá, že antimykobakteriálně nejúčinnější jsou látky s jediným substituentem na arylu v poloze 3. Látka CN 1: 3-(3-trifluoromethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril má velmi vysokou aktivitu (94% inhibice). Podobně vysokou míru inhibice by proto mohly vykazovat i sloučeniny D4 a D6, jelikož mají také jediný substituent na arylu v poloze 3. U látky D4, je to skupina -methoxy-, a u látky D6 se jedná o -N,N-dimethylamino- skupinu. Lze tedy říci, že právě poloha 3 na aromatickém jádře substituentu má pro vlastní účinek látky nezanedbatelný význam.

Testovány na antifungální aktivitu byly všechny připravené látky. Bohužel ani u jedné z připravených látek nebyla antimykotická aktivita nijak výrazná. Nejvyšší aktivitu ze všech syntetizovaných látek vykazovala in vitro výše zmiňovaná látka CN1: 3-(3-trifluoromethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril, a to proti *Trychophyton mentagrophytes*, MIC=125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a proti *Candida albicans*, MIC=62,5-125  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Látka D7: 3-(4-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril vykazovala dobrou účinnost proti *Trychophyton mentagrophytes*, MIC=62,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ostatní látky neprokázaly žádnou výraznou antimykotickou aktivitu. Jako standard při testování byl použit ketokonazol.

U látek byla také hodnocena lipofilita, pomocí log *P* a log *K*. Nejvyšší lipofilitu měla látka D9: 3-(4-chloro-3-methylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril, a tomu odpovídají obě nejvyšší hodnoty obou logaritmů. Nejnížší lipofilitu měla látka D2: 3-(2,4-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril podle log *P* a podle log *K* byla však nejnížší lipofilita naměřena u látky D7: 3-(4-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril.





## 7.ZÁVĚR

V rámci diplomové práce bylo připraveno 9 dosud nepopsaných sloučenin:

- **3-(3-trifluoromethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (CN1)**
- **3-(3,5-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D1)**
- **3-(2,4-dimethoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D2)**
- **3-(2-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D3)**
- **3-(3-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D4)**
- **3-(3-N,N-dimethylaminofenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D6)**
- **3-(4-methoxyfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D7)**
- **3-(4-chlorofenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D8)**
- **3-(4-chloro-3-methylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitril (D9)**

Produkty jsou charakterizovány teplotou tání, elementární analýzou, IČ, UV a NMR spektry. Připravené sloučeniny byly určeny pro hodnocení jejich antimykobakteriální a antifungální aktivity v podmínkách *in vitro*.

Všechny látky byly poslány do USA na testování antimykobakteriální aktivity a zatím známe výsledky jen u jedné z nich, CN1. Pro hodnocení antimykobakteriální aktivity byl použit klasický kmen *Mycobacterium tuberculosis*. Látka CN1 měla silný antimykobakteriální účinek, 94% inhibice. Antimykobakteriální účinek lze předpokládat u látek D4 a D6, které mají jediný substituent na arylu v poloze 3, což se zdá být nejdůležitější předpoklad pro tento účinek. Ve vztahu lipofilita: antimykobakteriální aktivita nelze zatím dojít k žádnému závěru, jelikož zbývajících 8 látek je stále v procesu testování v USA.

Všechny látky byly testovány na antimykotickou aktivitu. Nejsilnější účinek měly látky CN1 a D7, ostatní látky neměly žádnou výraznou antifungální aktivitu, tudíž nebyl nalezen žádný významný vztah mezi lipofilitou látek a antimykotickou aktivitou. Nejcitlivějším kmenem na hodnocené látky byl *Trichophyton mentagrophytes*.

## **8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. <http://www.who.int/gtb/publications/factsheet/index.htm>
2. Votava, V., Homolka, J.: Tuberkulóza, Praha, Karolinum 1996, s.7
3. <http://www.zdravcentra.cz/?act=m-1&infekce id=72>
4. Kos, S.: Remedia, 9,1999, s.81-83
5. [http://www.vakciny.net/pravidelne\\_ockovani/TBC.htm](http://www.vakciny.net/pravidelne_ockovani/TBC.htm)
6. Trnka, L., Krejbich, F., Daňková, D.: Remedia, 9, 1999, s.73-75
7. Příkazský, V., Havelková, M.: Výsledky informačního systému bacilární tuberkulózy v roce 2002. Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie 10, 12, 2003.
8. Kordač, V. a kol.: Vnitřní lékařství, Praha, Avicenum 1991, s.667
9. Zimhony, O., Cox, J.S., Welch, J.T., Vilcheze, C., Jacobs Jr., W.R.: Pyrazineamide inhibits fatty acid synthetase 1 (FAS1) of Mycobacterium tuberculosis. Nature Medicine, 6, 2000, s. 1043
10. Draper, P.: Lipid Biochemistry takes a stand against tuberculosis. Nature Medicine, 6, 2000, s.977

11. Mitchison, D.A.: Drug-Resistance in Mycobacteria. Brit. Med. Bull. ,40, 1984, s.84-90
12. Bednář, M., Fraňková, V., Šindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie, Praha, Marwill 1999, s. 526.
13. <http://www.zdrav.cz/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=2255>
14. Albert, R., Spiro, S., Jett, J.: Comprehensive Respiratory Medicine, London, Mosby 1999, 29.1-29.4
15. Peřinová, J.: Solutio, 2000, s.65-70
16. Katzung, B.G.: Základní a klinická farmakologie, Praha, H&H 1994, s. 685-693.
17. Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: Farmakologie a toxikologie, Praha, Grada – Avicenum 2002, s. 503-508.
18. Hartl, J., Palát, K.: Farmaceutická chemie IV., Praha, Karolinum 1992, s. 143-151
19. <http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0402/tbc.htm>
20. Zhang, Y., Post-Martens, K., Denkin, S.: New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. DDT, 11, 2006, s.22-27
21. a) Hartl, J.: Study of potential drugs derivatived from pyrazine. Grant agency: Internal Grant Agency of the Charles University Regist. No 40/93; b) Hartl, J.: Study of potential drugs derivatived from pyrazine. Grant agency: Internal Grant Agency of the Charles University Regist. No 622/95; c) Hartl, J.: Study of potential drugs derivatived from pyrazine. Grant agency: Internal Grant Agency of the Charles University Regist. No 26/1998 BCH
22. [www.taacf.org](http://www.taacf.org)
23. Doležal, M.: Doktorská disertační práce, Faf UK, Hradec Králové (1996)
24. Palek, L.: Diplomová práce, Faf UK, Hradec Králové (2003)
25. Pratt, Y.T.: Pyrazines and Pyperazines. In: ELDERFIELD R.C.: Heterocyclic Compounds, 6, J. Willey and Sons 1957, s. 377
26. Požarskij, A.F.: Theoretical principles of the chemistry of heterocycles. Chim. Geterocicl. Sojedin., 7, 1985, s. 867-905

27. Katritzki, A.R., Boulton, A.J.: *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Academic Press, 14, New York and London 1972, s.956-963
28. Black, P.J., McDowell, C.A.: Spin densities of polyasine anions. *Mol. Phys.*, 12, 1967, s.233, In: *Chem. Abstr.* 67, 1967, 77716f
29. Kwiatowski, S., Zurawski, B.: Indexes of the chemical reactivity of nitrogen heterobenzenes. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Math. Astron. Phys.*, 13, 1965, s.489, In: *Chem. Abstr.* 64, 1966, 15719
30. Black, P.J., Brown, R.D., Hefferman, M.Z.: Proton chemical shifts and electro densities in aromatic and heteroaromatic molecules. I. Procedures and chemical shifts corrections applications to azines. *Aust. J. Chem.* 20, 1967, s.1305, In: *Chem. Abstr.* 67, 1967, 48883
31. Takaki, Y., Ysata, Y., Watanabe, T.: *Acta Cryst.*, 13, 1960, s.693. In: *Chem. Abstr.*, 54, 1960, 23591e
32. Klein, B., Hetman, N.E., O'Donnel, M.E.: Structures of 3-methoxy-pyrazine-1-oxide and 3-methoxy-5-methyl-pyrazine-1-oxide. *J. Org. Chem.*, 28, 1963, s.1682
33. Shindo, H.: Infrared spectra of heterocyclic compounds. VII. Infrared spectra of substituted pyrazines and their *N*-oxides. *Chem. Pharm. Bull.*, 8, 1960, s.34
34. Bernadi, L., Palamidessi, G., Leone, A., Larrini, G.: Pyrazine derivatives. III. Pyrazine *N*-oxides and their reactions with phosphorus oxychloride. *Gaz. Chim. Ital.* 91, 1961, s.1431-1437
35. Foks, H.: Pyrazine-2-carboxylic acid *N*-oxides. IV. Reaction of 2-carbamoylpyrazine 4-oxide with phosphorus oxide chloride. *Acta Pol. Pharm.*, 33, 1976, s.153-161
36. Asai, M.: Chemotherapeutics. VII. Synthesis of pyrazinamide derivatives. *Yakugaku Zasshi*, 81, 1961, s.1475-1478, In: *Chem. Abstr.* 56, 1962, 8711c
37. Minisci, F., Galli, R., Qulico, A.: Verfahren zu Herstellung von Amidinen Stickstoffhaltigen aromatischer heterocyclischen Basen. *SRN pat.*, 1979, 2056433 C3
38. Gardini, G.P., Minisci, F., Palla, G., Arnon, A., Galli, P.: Homolytic amidation of heteroatomic bases, a new selective process. *Tetrahedron*, 1971, Lett. 59
39. Vontor, T., Palát, K., Lyčka, A.: Homolytic carbamoylation and alkoxy-carbamoylation of 2-aminopyrazine. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 54, 1989, s.1306, In: *Chem. Abstr.* 112, 1990, 55775t

40. Dlabal, K., Palát, K., Lyčka, A., Odlerová, Ž.: Synthesis and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of sulphur derivatives of pyrazine derived from amidation product of 2-chloropyrazine and 6-chloropyrazin-2-carbonitrile. Tuberculosis activity. Collect. Czech. Chem. Commun., 55, 1990, s. 2493
41. Červinka, O. a kol.. Organická chemie, Praha, Informatorium 1991, 791s.
42. Buchta, V., Jílek, P., Horáček, J., Horák, V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1998, s.33