

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Návrh, syntéza a hodnocení derivátů pyrazinamidu jako  
potenciálních antimikrobních sloučenin II**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Lucie Kučerová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Juhás

Hradec Králové, 2020



Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

.....

Lucie Kučerová

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za vedení mé práce, za vstřícnost a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat mému odbornému konzultantovi PharmDr. Martinu Juhásovi za pomoc a rady při řešení dané problematiky.

Děkuji rovněž všem, kteří se podíleli na testování biologické aktivity nově připravených sloučenin. Jmenovitě se jedná o PharmDr. Ondřeje Jandourka, Ph.D., RNDr. Kláru Konečnou, Ph.D. a Idu Dufkovou.

Dále děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za konzultace při interpretaci spekter NMR, doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za provedení hmotnostní spektrometrie, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. a Mgr. Ondřeji Horáčkoví za provedení měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), Ivě Vencovské za změření infračervených spekter a Mgr. Pavlovi Bártovi, Ph.D. za stanovení cytotoxicity připravených sloučenin.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala veškerým institucím a projektům, které náš výzkum finančně podpořily. Konkrétně jsou to: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy (SVV 260 547), Grantová agentura ČR (20-19638Y) a projekt CELSA – název projektu: *Structure-based design of new antitubercular medicines* – podporovaný KU Leuven a Karlovou Univerzitou.

Lucie Kučerová

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Řešitel: Lucie Kučerová

Školitel: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Juhás

Název diplomové práce: Návrh, syntéza a hodnocení derivátů pyrazinamidu jako potenciálních antimikrobních sloučenin II

Tuberkulóza je infekční onemocnění způsobené *Mycobacterium tuberculosis* komplex a v současné době patří k nejčastější příčině úmrtí na infekční chorobu. Léčba tuberkulózy je dlouhodobá, kombinovaná a kontrolovaná, aby se zabránilo vzniku rezistence. Právě rezistence je u tuberkulózy velmi závažná, a proto se léčba provádí vždy s více antituberkulotiky zároveň. Hledání nových léčiv a vylepšování těch stávajících je tak stálou součástí výzkumu.

V teoretické části jsem se snažila shrnout informace o tuberkulóze, jejím původci, diagnostice, možné prevenci a strategii léčby. Popsala jsem nejčastěji používaná antituberkulotika, především pak antituberkulotikum 1. linie – pyrazinamid, ze kterého dále vycházejí deriváty syntetizované v mojí práci.

V experimentální části jsem popsala postupy a reakce při syntéze nových látek, které vznikly spojením pyrazinamidu s různými aminokyselinami. V této práci se zabývám 23 připravenými deriváty. U těchto látek bylo provedeno měření teploty tání,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ a MS spektrometrie. Všechny látky byly testovány na antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitu. Žádná z těchto látek nevykazovala významnou antifungální a antibakteriální aktivitu. Antimykobakteriální aktivitu (*M. tuberculosis* H37Ra) vykazovalo šest látek – PC-L-Ala-Et (MIC = 3,91  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-L-Glu-diEt (MIC = 31,25  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-L-Met-Me (MIC <3,91  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-D/L-Pgl-Me (MIC <1,95  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-L-OBn-Ser-Me (MIC = 7,81  $\mu\text{g/ml}$ ) a PC-L-Tyr-Et (MIC = 7,81  $\mu\text{g/ml}$ ). Většina látek

prokazovala vyšší antimykobakteriální aktivitu v mírně kyselém prostředí – pH 6. Aktivita byla vázaná na sloučeniny s vyšší lipofilitou a převážně na sloučeniny s aminokyselinovým fragmentem v konfiguraci L. U aktivních látek byly zjišťovány i cytotoxické účinky, nejlepší cytotoxický profil vykazovaly látky PC-L-Ala-Et, PC-D/L-Pgl-Me a PC-L-OBn-Ser-Me.

## Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Lucie Kučerová

Supervisor: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Martin Juhás

Title of diploma thesis: Design, synthesis and evaluation of pyrazinamide derivatives as potential antimicrobial compounds II

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex and is currently one of the most common causes of death from an infectious disease. Treatment of tuberculosis is long-term, combined and controlled to prevent resistance. Resistance is very serious and therefore treatment is always performed with more antituberculars at the same time. Finding new drugs and improving existing ones is a constant part of research.

In the theoretical part I tried to summarize information about tuberculosis, its causative agent, diagnostics, possible prevention and treatment strategy. I have described the most commonly used antituberculars, especially the first-line antituberculars – pyrazinamide, from which the derivatives synthesized in my work are based.

In the experimental part I described the procedures and reactions used for synthesis of the new compounds, which were formed by combining pyrazinamide with various amino acids. In this thesis I dealt with 23 prepared derivatives. These compounds were measured for melting point,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR and MS spectrometry. All derivatives were tested for antimycobacterial, antibacterial and antifungal activity. None of these compounds showed significant antifungal or antibacterial activity. Six substances showed antimycobacterial activity (*M. tuberculosis* H37Ra) – PC-L-Ala-Et (MIC = 3,91  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-L-Glu-diEt (MIC = 31,25  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-L-Met-Me (MIC <3,91  $\mu\text{g/ml}$ ), PC-D/L-Pgl-Me

(MIC <1,95 µg/ml), PC-L-OBn-Ser-Me (MIC = 7,81 µg/ml) and PC-L-Tyr-Et (MIC = 7,81 µg/ml). Most derivatives showed higher antimycobacterial activity in a mildly acidic environment – pH 6. The activity was bound to compounds with higher lipophilicity and mostly to compounds with the amino acid fragment in L-configuration. Cytotoxic effects were also found for the active substances, the best cytotoxic profile was shown by PC-L-Ala-Et, PC-D/L-Pgl-Me and PC-L-OBn-Ser-Me.



## Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. Cíl práce	12
2. Teoretická část	13
2.1 Charakteristika tuberkulózy	13
2.2 Původce tuberkulózy	13
2.2.1 Základní informace	13
2.2.2 Rezistence	14
2.3 Epidemiologie	14
2.4 Etiopatogeneze a symptomy	15
2.5 Diagnostika	15
2.6 Prevence	17
2.7 Strategie léčby	17
2.7.1 Antituberkulotika 1. linie	20
2.7.2 Antituberkulotika 2. linie	21
2.7.3 Nová léčiva	24
2.7.4 Pyrazinamid	26
3. Experimentální část	29
3.1 Chemikálie, přístroje a metody	29
3.2 Postup přípravy nových látek	31
3.3 Nově připravené deriváty	33
3.4 Biologické hodnocení látek	56
3.4.1 Antimykobakteriální aktivita	56
3.4.2 Antibakteriální aktivita	59
3.4.3 Antifungální aktivita	60
3.4.4 Cytotoxická aktivita	60
4. Diskuze	62

5. Závěr.....	65
6. Použitá literatura .....	66

## **Seznam použitých zkratk**

**AMK** – aminokyselina

**ATB** – antibiotikum/antibiotika

**BCG** – bacil Calmettův-Guérinův

**CDI** – karbonyldiimidazol

**CoA** – koenzym A

**CPX** – ciprofloxacin

**CT** – výpočetní tomografie

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**EMB** – ethambutol

**EPTB** – mimoplicní tuberkulóza

**ETH** – ethionamid

**FAS** – syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)

**FQ** – fluorochinolonová antibiotika

**GS-MS** – plynová hmotnostní spektrometrie

**IC<sub>50</sub>** – střední inhibiční koncentrace

**IČ** – infračervené

**INF** – interferon

**INH** – isoniazid

**LC-MS** – kapalinová hmotnostní spektrometrie

**Log *P*** – rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda

**MDR-TB** – multirezistentní tuberkulóza

**Me** – methyl

**MeAcr** – methylakrylát

**MIC** – minimální inhibiční koncentrace

**MRSA** – *Staphylococcus aureus subsp. aureus methicillin-resistant*

**MS** – hmotnostní spektrometrie

**NAD<sup>+</sup>** – nikotinamidadenindinukleotid

**NADPH** – nikotinamidadenindinukleotid fosfát

**NMR** – nukleární magnetická rezonance

**PanD** – aspartát dekarboxyláza

**PAS** – kyselina *para*-aminosalicylová

**PC** – pyrazinkarbonyl

**Pgl** – fenylglycin

**POA** – pyrazinkarboxylová kyselina

**PTB** – plicní tuberkulóza

**PTH** – prothionamid

**PZA** – pyrazinamid

**PZáza** – pyrazinamidáza

**QAPRTáza** – fosforibosyltransferáza chinolinové kyseliny (Quinolinic acid phosphoribosyl transferase)

**RIF** – rifampicin

**RNA** – ribonukleová kyselina

**RpsA** – ribozomální protein S1

**RR-TB** – tuberkulóza rezistentní na rifampicin

**SA** – *Staphylococcus aureus subsp. aureus*

**SI** – index selektivity

**TBC** – tuberkulóza

**TEA** – triethylamin

**THF** – tetrahydrofuran

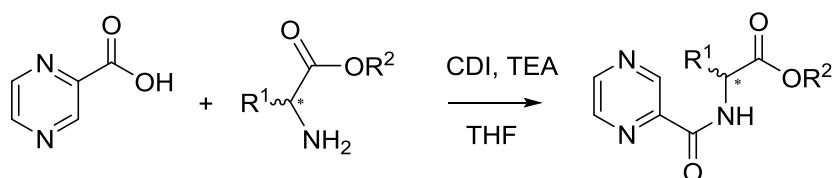
**TLC** – tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)

**WHO** – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

**XDR-TB** – extenzivně rezistentní tuberkulóza

## 1. Cíl práce

Cílem mé práce je připravit a otestovat syntetizované sloučeniny, které by mohly mít potenciální antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální účinky. Tyto sloučeniny jsou deriváty pyrazinamidu (PZA) a volných aminokyselin (AMK), nebo jejich methyl- a ethylesterů. Během této práce bych měla zjistit, jaký vliv na aktivitu má lipofilita, optická konfigurace a další fyzikálně-chemické vlastnosti. Tato práce je součástí výzkumu, který se zabývá syntézou nových potenciálně aktivních antituberkulotik a který vede prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D., doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D. a podílí se na něm mnoho dalších z výzkumné skupiny. V rámci výzkumu bylo připraveno 39 derivátů, ale jelikož jsem se podílela na přípravě pouze některých, uvádím jich v této diplomové práci pouze 23. Většina těchto derivátů ještě nebyla nikde popsána, především D-enantiomery a enantiomerické směsi. Obecné schéma přípravy našich derivátů je zobrazeno na **obr. 1**.



**Obr. 1** Obecné schéma přípravy cílového produktu. R<sup>1</sup> – postranní aminokyselinový řetězec, R<sup>2</sup> – H, malý alkyl (Me, Et), \* - centrum chirality

## 2. Teoretická část

### 2.1 Charakteristika tuberkulózy

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění způsobené *Mycobacterium tuberculosis* a je v současné době nejčastější smrtelnou infekční chorobou na světě. Podle světové zdravotnické organizace (WHO) na TBC v roce 2018 zemřelo cca 1,2 miliónů lidí a dalších 251 000 pacientů, kteří byli zároveň HIV-pozitivní (počítáno zvlášť, protože pokud HIV-pozitivní pacient zemře na tuberkulózu, zapisuje se do Mezinárodní klasifikace nemocí jako úmrtí způsobené HIV) <sup>1</sup>. Tuberkulóza je povinně hlášené onemocnění a v České republice se nemocní tuberkulózou nebo jinou mykobakteriózou zaznamenávají v registru tuberkulózy.

TBC může postihnout kterýkoliv orgán, nejčastější jsou plíce. Dle výskytu tak rozlišujeme plicní (PTB) a mimoplicní (EPTB) tuberkulózu, přičemž stanovení lokalizace je důležité především kvůli evidenci a léčbě komplikací. Strategie léčby se u PTB i EPTB velmi podobá <sup>2</sup>. U většiny infikovaných osob se onemocnění nemusí nikdy projevit, jedná se tak o latentní formu onemocnění, pokud ale imunitní systém zeslábně, může se TBC stát aktivní. Rozvinutí aktivní tuberkulózy nastává během života u přibližně 10 % infikovaných, často se to stává v případech podvyživených, HIV-pozitivních nebo starších osob <sup>3</sup>.

### 2.2 Původce tuberkulózy

#### 2.2.1 Základní informace

Tuberkulóza je vyvolána *Mycobacterium tuberculosis* komplex, což je skupina patogenů zahrnující několik blízce příbuzných druhů *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii* a *Mycobacterium pinnipedii*. Nejčastěji je onemocnění způsobené *M. tuberculosis*, výjimečně *M. bovis* a ostatní druhy jsou zcela raritní <sup>4</sup>.

*Mycobacterium tuberculosis* je aerobní, gram pozitivní tyčinka, která roste v optimální teplotě 37–38 °C. V buněčné stěně má vysoký obsah lipidů a vosků a můžeme ji charakterizovat jako acido-, alkali- a alkoholrezistentní. Za běžných okolností může mykobakterie v kapénkách přežívat 1–2 hodiny.

Ke snížení její životaschopnosti přispívají vysoké teploty nad 60 °C, sluneční svit, sucho a UV záření <sup>2,5</sup>.

### 2.2.2 Rezistence

Velkým problémem při léčbě tuberkulózy je rezistence mykobakterií na léčiva. Mykobakteriální populace obsahuje vždy určitý podíl primárně rezistentních bakterií, které nejsou terapií ovlivněny. Získaná rezistence vzniká selekčním tlakem jako důsledek nesprávné léčby <sup>6</sup>. V roce 2018 se celosvětově vyskytla multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB), nebo tuberkulóza rezistentní na rifampicin (RR-TB) zhruba u 3,4 % nových případů a u 18 % již léčených případů <sup>1</sup>.

Polyrezistentní formy tuberkulózy jsou vyvolány kmeny rezistentními na dvě a více antituberkulotika, nejzávažnější formou je multirezistence, u které je necitlivost kmene na dvě základní antituberkulotika – rifampicin a isoniazid. Objevují se i tzv. extenzivně rezistentní kmeny mykobakterií (XDR-TB), což je kombinace multirezistence a rezistence na jeden injekčně aplikovaný lék (amikacin, kanamycin, capreomycin) a na jeden fluorochinolon <sup>6</sup>.

### 2.3 Epidemiologie

Podle WHO, která každoročně od roku 1997 vydává zprávu Global Tuberculosis Report, v roce 2018 onemocnělo tuberkulózou odhadem asi 10 milionů obyvatel planety, přičemž zhruba čtvrtina populace je latentně infikována *M. tuberculosis*. Častěji tuberkulózou onemocní muži <sup>1</sup>.

TBC je tzv. sociální chorobou, kdy se většina případů vyskytuje ve státech s nízkým hrubým domácím produktem <sup>2</sup>. Geograficky nejvíce případů se vyskytuje v jihovýchodní Asii (44 %), Africe (24 %) a v západním Pacifiku (18 %), s nižším výskytem je to pak východní Středomoří (8 %), Amerika (3 %) a Evropa (3 %). Počet nakažených v osmi státech světa tvoří 2/3 z celkového počtu nakažených, mezi tyto země patří Indie (27 %), Čína (9 %), Indonesie (8 %), Filipíny (6 %), Pakistán (6 %), Nigérie (4 %), Bangladéš (4 %) a Jižní Afrika (3 %) <sup>1</sup>.

Nejčastějším způsobem přenosu onemocnění je inhalační cesta – kapénky. Možný je i přenos přímým kontaktem s infekčními sekrety



a infikovanými předměty. Inkubační doba se pohybuje od čtyř týdnů do dvou let od skončení expozice <sup>5</sup>.

Podle publikace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, která vychází z dat Registru tuberkulózy, bylo v roce 2018 hlášeno 444 případů, z čehož se u 398 osob jednalo o PTB a u zbytku o EPTB. Oproti roku 2017 se v České republice objevilo o 61 případů méně, což potvrzuje dlouhodobý klesající trend výskytu TBC u nás. Nejčastěji se nemoc objevuje u věkové skupiny 40-64 let. Dle zprávy v roce 2018 v České republice zemřelo na TBC 26 osob <sup>7</sup>.

#### **2.4 Etiopatogeneze a symptomy**

TBC můžeme rozdělit na latentní a manifestní formu. U většiny infikovaných se nemoc nikdy neprojeví, onemocnění se manifestuje u přibližně 10 % pacientů, u nich pak hovoříme o manifestní formě, u které rozlišujeme primární a postprimární TBC <sup>2</sup>.

Primární TBC se vyskytuje především v dětském věku, kdy jde o první kontakt hostitele s mykobakteriální infekcí. *M. tuberculosis* se dostává do plic, kde se množí a vyvolává zde zánět <sup>5</sup>. Během několika hodin se mykobakterie šíří lymfatickými cévami do regionálních uzlin, které se zvětšují a spolu se zánětem v plicích tvoří primární tuberkulózní komplex <sup>6</sup>.

Postprimární TBC vzniká u již infikovaných osob, kdy dochází buď k exogenní infekci (tj. inhalace nových mykobakterií při kontaktu s nemocným), nebo k endogenní reaktivaci primární TBC (tento způsob je častější). Tato forma TBC může probíhat chronicky či akutně <sup>2</sup>.

U většiny nemocných se TBC projevuje únavou, nočním pocením, nechutenstvím, snížením fyzické výkonnosti, zvýšenou teplotou a suchým, později produktivním kašlem, který může být provázen různě závažnou hemoptýzou. Podle závažnosti procesu bývá přítomna různá intenzita dušnosti, vzácněji pak i pleurální bolest <sup>2</sup>.

#### **2.5 Diagnostika**

TBC je diagnostikována na základě symptomů, nálezů na rentgenu plic, CT skenech a průkazů mykobakterií v kultivacích. Pokud je opakovaně

mikroskopické vyšetření sputa negativní a pacient má patologický nález na rentgenových snímcích nebo CT skenech, provádí se bronchoskopické vyšetření, které umožňuje získat bronchiální sekret na mykobakteriální vyšetření<sup>8</sup>.

U mikroskopického vyšetření se vyšetřuje sputum nebo bronchiální sekret pomocí speciálního barvení (Ziehl-Neelsen) nebo za použití fluorescence. Jedná se o levnou a rychlou orientační metodu. Prokazují se acidorezistentní tyčky, u kterých ale nejde s jistotou říct, že se jedná o *M. tuberculosis*. K prokázání pozitivita musí být v 1 ml sputa 50 000–100 000 mykobakterií<sup>6</sup>.

Kultivace sputa je časově náročná metoda, ale přibližně 1000krát citlivější než mikroskopické vyšetření. Hodnocení se provádí po 3, 6 a 9 týdnech. Pokud je zjištěna pozitivita, provádí se z kolonií nátěr pro stanovení druhu mykobakterie a citlivosti na antibiotika (ATB)<sup>6</sup>. K urychlenému kultivačnímu vyšetření se používá radiometrický systém BACTEC. Metoda je založena na radiometrickém nebo kolorimetrickém měření metabolismu kyseliny palmitové, kdy v průběhu testu v pozitivním vzorku dochází k uvolňování CO<sub>2</sub><sup>2</sup>.

Molekulárně genetické techniky jsou rychlé metody, ale mají jen podpůrný význam. Jsou založeny na použití genetických sond a amplifikačních systémů, které využívají polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo ligázové řetězové reakce (LCR). Pozitivní nález může značit infekci, ale může jít i o kontaminaci, mrtvé mykobakterie nebo jejich části<sup>2</sup>.

IGRA metody (interferon gama release assay) jsou založeny na detekci indukce tvorby interferonu (INF  $\gamma$ ) z krve nemocných. Zjišťuje se schopnost T-lymfocytů produkovat INF  $\gamma$  po styku se specifickými antigeny mykobakterií. Nejčastěji se provádí test QuantiFERON-TB Gold, který se používá ke zjištění latentní infekce<sup>2</sup>.

Skiagram hrudníku je základním vyšetřením u PTB i EPTB. Rentgenový nález bývá charakteristický, ale nikoliv specifický<sup>2</sup>, jelikož může u PTB představovat řadu jiných plicních onemocnění. Na TBC je třeba pomýšlet v případě nálezu infiltrátů v horním laloku, nebo v případě zánětu pleury<sup>6</sup>.

Tuberkulinový kožní test je průkazem opožděné hyperaktivity vůči antigenům mykobakterií. Spočívá v podkožní aplikaci tuberkulinu (směs purifikovaných proteinů mykobakterií) a sledování indurace (zatvrdnutí tkáně zmnožením vaziva) v místě vpichu za 72 hodin. Za pozitivní se považuje indurace větší než 5 mm. Negativní výsledek však nevylučuje přítomnost TBC, protože pozitivitou reaguje jen část populace a reaktivita je ovlivněna řadou nemocí a klesá ve stáří a při imunodeficienci. V našich podmínkách očkované populace a promoženosti starší populace tento test pro stanovení diagnózy nemá zásadní přínos <sup>2</sup>.

## **2.6 Prevence**

V prevenci TBC se používají dva způsoby – BCG vakcinace a chemoprophylaxe.

Vakcinace oslabeným kmenem *M. bovis* (BCG – bacil Calmettův-Guerinův) navozuje určitý stupeň odolnosti vůči TBC, který trvá asi 10–15 let. V ČR je od 1. 11. 2010 nepovinná a indikována pouze u rizikových skupin. Zrušení povinnosti očkování bylo provedeno na základě příznivé situace kontroly TBC v ČR. Při očkování se aplikuje 0,1 ml BCG vakcíny intradermálně <sup>5</sup>. Podle WHO v roce 2018 153 zemí poskytovalo očkování BCG vakcínou jako součást dětského imunizačního programu, z toho 113 zemí hlásilo proočkovanost  $\geq 90\%$  <sup>1</sup>.

Cílem chemoprophylaxe je zabránit manifestaci TBC u jedince infikovaného či pravděpodobně infikovaného. V ČR se podává především dětem, které přišly do kontaktu s nemocným s prokázanou aktivní TBC a u některých dospělých po provedení IGRA testu nebo tuberkulinové reakce. Obvykle se podává 300 mg isoniazidu denně po dobu šesti měsíců <sup>5</sup>.

## **2.7 Strategie léčby**

PTB i EPTB se léčí antituberkulotiky, které se podávají v kombinacích vzhledem k rozdílným vlastnostem v populacích mykobakterií. Léčba TBC je kombinovaná, dlouhodobá a kontrolovaná kvůli vzniku rezistence. Minimální účinná doba podávání je šest měsíců <sup>2</sup>.

Cíle léčby se dají shrnout do několika bodů:

- a) Vyléčit nemocného a zachovat kvalitu života
- b) Zabránit úmrtí na aktivní TBC a předejít pozdním následkům
- c) Zabránit recidivě onemocnění
- d) Minimalizovat riziko přenosu TBC na ostatní
- e) Zabránit vzniku získané rezistence na antituberkulotika

Antituberkulotika mají tři hlavní účinky:

- 1) Baktericidní účinek – schopnost rychle usmrtit aktivně rostoucí mykobakterie (např. INH)
- 2) Sterilizační účinek – schopnost usmrtit i dormantní mykobakterie (např. RIF, PZA)
- 3) Zabránění vzniku rezistence (např. INH, RIF) <sup>4</sup>.

Isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB) patří mezi antituberkulotika 1. linie. Kombinace INH a RIF podávaná 9 měsíců vyléčí 95–98 % případů způsobených citlivými kmeny. Přidání PZA umožňuje zkrátit dobu trvání léčby na šest měsíců. V praxi se obvykle terapie zahajuje ve čtyřkombinaci základních antituberkulotik (INH, RIF, PZA, EMB) <sup>9</sup>.

Při podávání antituberkulotik se používají především dva základní režimy – každodenní aplikace léčiv a intermitentní (3× týdně), podrobnější dávkování je uvedené v **tab. 1**.

**Tab. 1** Dávkování základních antituberkulotických léků. Tabulka byla převzata a upravena dle Kolek, V., et al. Doporučené postupy v pneumologii. 3. aktualizované vydání <sup>4</sup>

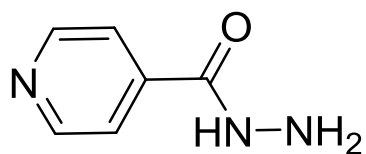
Léčivo (zkratka)	Doporučené dávkování (rozmezí) v mg/kg			
	Denní aplikace		3× týdně	
	Dávka (rozmezí)	Maximum (mg)	Dávka (rozmezí)	Maximum (mg)
Isoniazid (INH)	5 (4–6)	300	10 (8–12)	900
Rifampicin (RIF)	10 (8–12)	600	10 (8–12)	600
Pyrazinamid (PZA)	25 (20–30)	–	35 (30–40)	–
Ethambutol (EMB)	15 (15–20)	–	30 (25–35)	–

V České republice je hlavní epidemiologickou zásadou léčby TBC izolace pacienta s cílem zabránit dalšímu šíření onemocnění a kontrolované podávání kombinace antituberkulotik v denním režimu. Léčba se zahajuje hospitalizací <sup>5</sup>.

### 2.7.1 Antituberkulotika 1. linie

#### Isoniazid (INH)

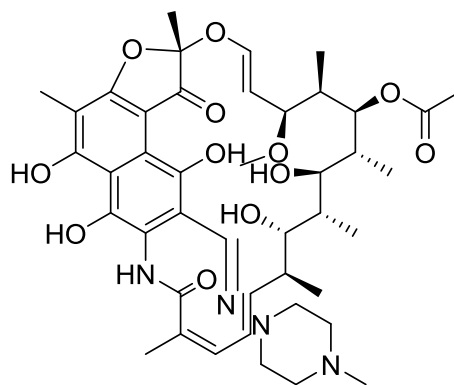
INH je derivát kyseliny isonikotinové a má baktericidní účinek <sup>10</sup>. INH je nejvíce aktivním antituberkulotikem. Inhibuje syntézu mykolových kyselin, které jsou důležitou složkou mykobakteriální buněčné stěny. Je to proléčivo, které je aktivováno bakteriálním enzymem kataláza-peroxidáza (KatG) <sup>9</sup>.



Incidence a vážnost nežádoucích účinků se odvíjí od dávky a doby podávání. Nejčastější závažnou reakcí je INH-navozená hepatitida. Dále je pozorována periferní neuropatie, ale vyskytuje se spíše u vyšších dávek <sup>9</sup>.

#### Rifampicin (RIF)

RIF patří mezi ansamycinová ATB. Má baktericidní účinky a široké antimikrobiální spektrum účinku, v kombinaci s INH patří k nejúčinnějším antituberkulotikům. Vzniká na něj velmi snadno rezistence, a proto je podáván vždy s ostatními antituberkulotiky <sup>11</sup>.

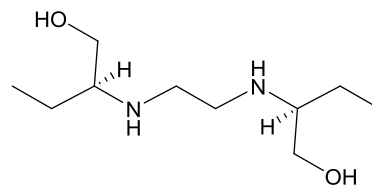


Mechanismem účinku RIF je inhibice bakteriálního enzymu DNA-dependentní RNA-polymerázy, který provádí transkripci. Inhibicí transkripce tak RIF působí baktericidně <sup>12</sup>.

Závažné nežádoucí účinky jsou vzácné. Vyskytují se běžné trávicí poruchy, které se projevují jako anorexie, nauzea, zvracení, průjemy a bolesti v abdominální krajině, závažný je výskyt hepatitidy, která je pravděpodobně vyvolána toxickým účinkem RIF. Rifampicin je silný induktor cytochromu P-450, tudíž může docházet ke snižování sérové i tkáňové koncentrace jiných látek <sup>13</sup>.

### Ethambutol (EMB)

EMB je opticky aktivní aminoalkohol. Účinný je pouze pravotočivý S,S-(+)-izomer. Mechanismem účinku EMB je inhibice polymerizace arabinózy v buněčné stěně mykobakterie.



Cílem jeho účinku je arabinofuranosyltransferáza, která katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu, který je nezbytný pro zachování celistvosti mykobakteriální stěny <sup>14</sup>.

EMB je většinou velmi dobře snášen, může vyvolávat trávicí obtíže, či vzácněji alergické reakce. K závažnějším a relativně častým nežádoucím účinkům se řadí neurologické poruchy, jako je retrobulbární neuritida, která se projevuje poruchou zrakové ostrosti a barevného vnímání (převážně zelené barvy), výpadky v zorném poli a výjimečně dochází k atrofii zrakového nervu. Většinou jsou tyto poruchy reverzibilní a po vysazení mizí, ale výjimečně mohou přetrvávat <sup>13</sup>.

### Pyrazinamid (PZA)

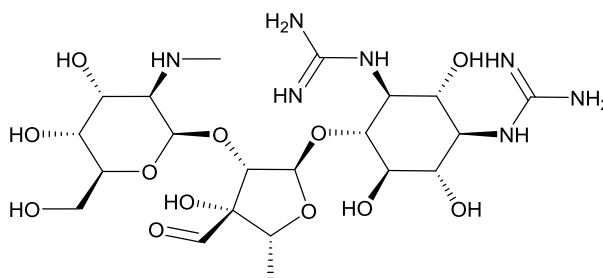
Jelikož se na derivátech pyrazinamidu zakládá moje diplomová práce, budu se PZA věnovat podrobněji dále.

#### *2.7.2 Antituberkulotika 2. linie*

Do skupiny antituberkulotik 2. linie se řadí léčiva, která jsou buď méně účinná než antituberkulotika 1. linie, více toxická a nebo hůře dostupná <sup>15</sup>. Používají se zejména tehdy, když jsou mykobakterie rezistentní na léčiva 1. linie, nebo pokud došlo k selhání klinické odpovědi na konvenční léčbu a také v případech závažných nežádoucích účinků zabraňujících užití jiných léčiv <sup>9</sup>.

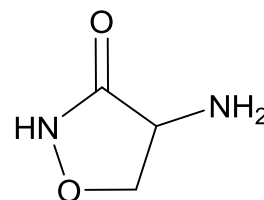
## Streptomycin

Streptomycin byl první účinným antibiotikem proti TBC. Je to aminoglykosidové ATB a jeho mechanismus účinku je inhibice proteosyntézy a narušení bakteriální stěny. Mezi jeho nežádoucí účinky patří ototoxicita, nefrotoxicita a neurotoxicita <sup>10</sup>.



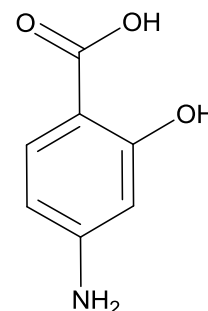
## Cykloserin

Cykloserin je oxazolidinonový derivát a cyklický analog D-Ala, který inhibuje syntézu buněčné stěny. V závislosti na dávce působí bakteriostaticky nebo bakteriocidně. Mezi jeho nežádoucí účinky patří neurotoxicita – působí akutní psychózy, halucinace a zmatenost, dále bylo pozorováno i náhlé srdeční selhání a alergické kožní reakce <sup>10</sup>.



## Para-aminosalicylová kyselina (PAS)

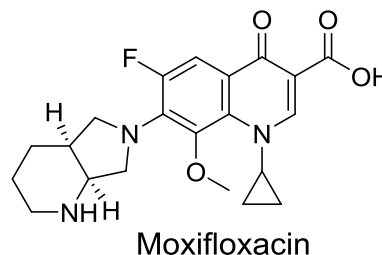
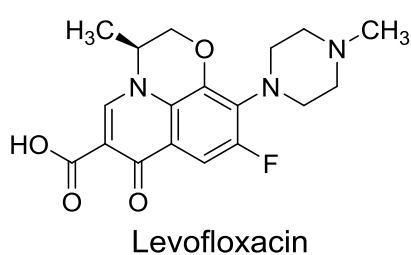
PAS je strukturální analog kyseliny *para*-aminobenzoové, vzhledem k této podobnosti se předpokládalo, že PAS inhibuje dihydropteroátsyntházu (DHPS) v biosyntetické dráze folátu, to se ale nepotvrdilo. Bylo prokázáno, že PAS působí jako alternativní substrát pro metabolismus folátu u *M. tuberculosis*. PAS je proléčivo, které po začlenění do folátové cesty tvoří toxické analogy dihydrofolátu, který poté inhibuje aktivitu dihydrofolátreduktázy (DHFR) <sup>16</sup>. Mezi nežádoucí účinky patří gastrointestinální dysfunkce vedoucí k peptickému vředu a krvácení, dále je častá hypersenzitivita projevující se vyrážkami, horečkou, bolestmi kloubů, hepatitidou či agranulocytopenií <sup>17</sup>.





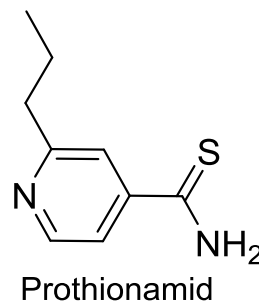
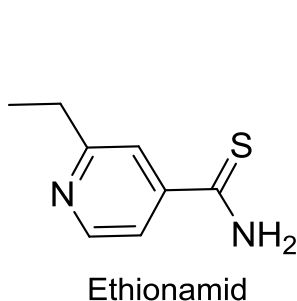
### Fluorochinolonová antibiotika (FQ)

FQ jsou širokospektrá ATB inhibující aktivitu DNA gyrázy. DNA gyráza je topoisomeráza typu II, která hraje esenciální roli v replikaci DNA. K léčbě TBC se používají například levofloxacin a moxifloxacin<sup>18</sup>. Mezi jejich závažné nežádoucí účinky patří zánět či ruptura šlach (zejména Achillovy šlachy), bolesti svalů, otoky kloubů, problémy s chůzí, poškození zraku a sluchu a další<sup>19</sup>.



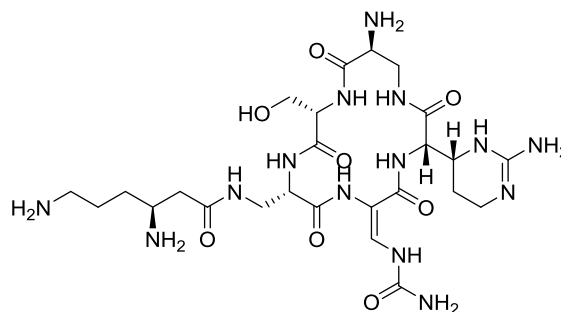
### Ethionamid (ETH) a Prothionamid (PTH)

ETH a PTH jsou strukturním analogem INH. Jsou to proléčiva, která potřebují pro jejich přeměnu bakteriální enzym. Cílem jejich účinku je biosyntéza mykolové kyseliny<sup>20</sup>. Vysoké dávky ETH mohou dráždit žaludek, vyvolat neurologické příznaky či hepatotoxicitu. Rezistence může být zkřížená s INH<sup>17</sup>.



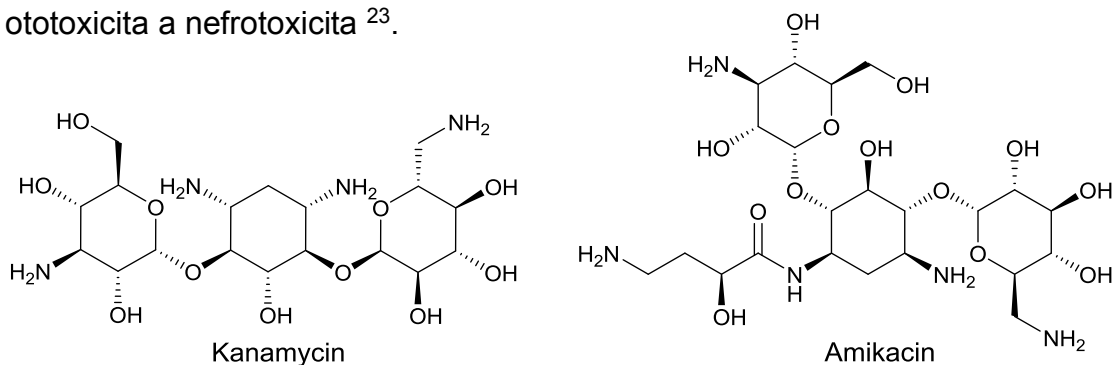
### Kapreomycin

Kapreomycin je polypeptidové ATB, které interaguje s ribozomem a tím inhibuje proteosyntézu. Jelikož nemůže být užíván orálně, podává se parenterálně. Jeho podávání je omezeno kvůli renální a sluchové toxicitě. Mezi další nežádoucí účinky patří vyrážka, poruchy hladin elektrolytů a změny v krevním obraze<sup>21</sup>.



## Kanamycin a Amikacin

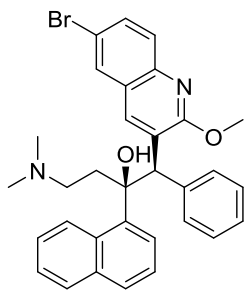
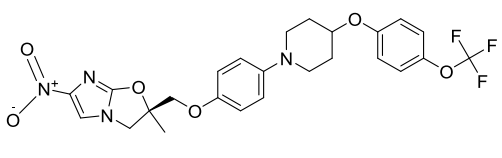
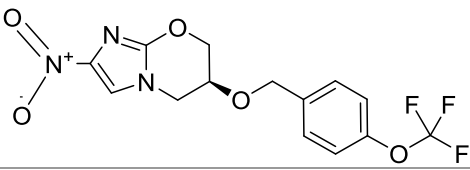
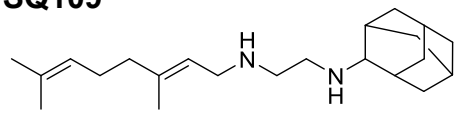
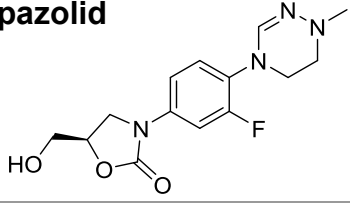
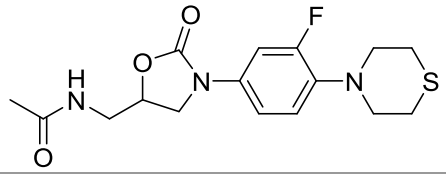
Kanamycin a amikacin jsou aminoglykosidová ATB a používají se především k léčbě pacientů s MDR-TB. Obě léčiva ovlivňují ribozomální podjednotku 30S, tím zabraňují translaci RNA a inhibují proteosyntézu <sup>22</sup>. Jelikož se kanamycin a amikacin nevstřebávají z gastrointestinálního traktu, musí se podávat parenterálně. Mezi jejich nežádoucí účinky patří vertigo, ototoxicita a nefrotoxicita <sup>23</sup>.



### 2.7.3 Nová léčiva

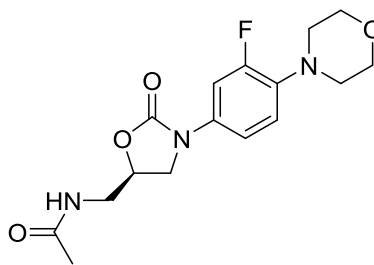
Jelikož je TBC stále jedna z nejčastějších příčin smrti a zároveň se zvyšuje i množství rezistentních případů na běžná antituberkulotika roste tak potřeba nových léčiv. Dalším důvodem vývoje nových léčiv je snaha o zkrácení doby léčby, čímž by se zvýšila adherence pacientů. Naštěstí, téměř po 40 letech léčení stejnými metodami, došlo ve vývoji nových léčiv k pokroku <sup>24</sup>. Nová nadějná léčiva a jejich mechanismus účinku jsou uvedeny v **tab. 2**.

Tab. 2 Nová léčiva a jejich mechanismus účinku <sup>25</sup>

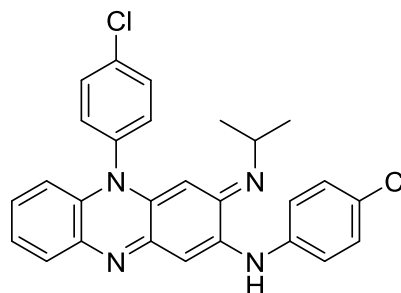
Název léčiva a vzorec	Zařazení	Mechanismus účinku	Fáze klinické studie
<b>Bedachilin</b> 	Diarylchinolin	Inhibice ATP-syntházy a bakteriálního dýchání	III
<b>Delamanid</b> 	Nitroimidazol	Inhibice syntézy buněčné stěny a bakteriálního dýchání	IV
<b>Pretomanid</b> 	Nitroimidazol	Inhibice syntézy buněčné stěny a bakteriálního dýchání	III
<b>SQ109</b> 	1,2-ethyldiamin	Inhibice syntézy buněčné stěny	II
<b>Delpazolid</b> 	Oxazolidinon	Inhibice syntézy proteinů (23S ribozom)	II
<b>Sutezolid</b> 	Oxazolidinon	Inhibice syntézy proteinů (23S ribozom)	II

Protože je vývoj nových léčiv zdlouhavý, využívají se k léčbě již známá léčiva, ale s novou indikací. Mezi tyto léčiva patří například ATB linezolid a antileprotikum klofazimin <sup>24</sup>.

Linezolid je antibiotikum, jehož mechanismem účinku je inhibice proteosyntézy. Je to léčivo ze skupiny oxazolidinonů. Ačkoliv se používá v léčbě rezistentní TBC, objevují se u něj vážné nežádoucí účinky (myelosuprese, periferní neuropatie, optická neuropatie), kvůli kterým musí být často léčba ukončena <sup>25</sup>.

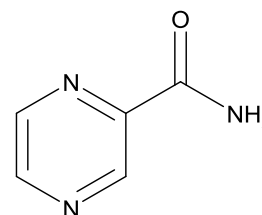


Klofazamin se používá jako antileprotikum a patří do skupiny riminofenazinů. Jeho cíle účinku jsou transport iontů a bakteriální dýchání <sup>25</sup>. Jako nežádoucí účinky se vyskytují zbarvení kůže a prodloužení QT intervalu. Může se objevovat zkřížená rezistence s bedachilinem <sup>24</sup>.



#### 2.7.4 Pyrazinamid

Antituberkulotický účinek pyrazinamidu (PZA) byl objeven roku 1952 <sup>26</sup>. Je to důležité antituberkulotikum, které hraje zásadní roli ve zkrácení doby léčby z 9 až 12 měsíců na 6. PZA je účinný pouze v kyselém prostředí, při ustoupení zánětu a stoupajícím pH PZA ztrácí svůj účinek <sup>27</sup>, proto je používán pouze v průběhu prvních dvou měsíců intenzivní fáze 6-měsíčního režimu léčby a jeho delší podávání nepřináší další výhody <sup>28</sup>. PZA patří do antituberkulotik 1. linie především díky jeho sterilizační schopnosti proti perzistentním bakteriím <sup>29</sup>.



Navzdory důležitosti PZA v léčbě TBC zůstává jeho přesný mechanismus účinku neznámý. PZA působí zcela odlišně od běžných antibiotik, působí na více cílů najednou například na tvorbu energie, trans-translaci a také ovlivňuje syntézu koenzymu A (CoA) <sup>30</sup>.

PZA je proléčivo, které je přeměněno na jeho aktivní metabolit pyrazinkarboxylovou kyselinu (POA) pomocí bakteriálního enzymu pyrazinamidázy (PZáza), který je kódován genem *pncA* <sup>31</sup>. Tato přeměna probíhá v cytoplazmě bakterie, do které se PZA dostává pasivní difúzí. POA<sup>-</sup> je poté

z mykobakterie vypuzována pomocí efluxního mechanismu. Pokud je pH extracelulárního prostředí kyselé (pH 5,5), malá část  $\text{POA}^-$  se stává elektricky neutrální protonizovanou  $\text{HPOA}$  a snadno proniká zpět do buňky. Pokud přítok  $\text{HPOA}$  převáží nad efluxem  $\text{POA}^-$ , dochází k akumulaci  $\text{POA}$  v mykobakterii<sup>32</sup>. Akumulace  $\text{POA}$  může způsobit acidifikaci cytoplazmy a narušit tak membránový potenciál a s tím spojené transportní systémy a inhibovat syntézu proteinů a RNA<sup>33</sup>. Při zásaditém nebo neutrálním pH extracelulárního prostředí se v mykobakterii nachází pouze malé množství  $\text{POA}$ , protože se nachází v podobě aniontu ( $\text{POA}^-$ ), který špatně proniká do buňky a zůstává tak v extracelulárním prostoru<sup>32</sup>.

Bylo zjištěno, že efluxní systém *M. tuberculosis*, kterým je z buňky odstraňován  $\text{POA}^-$ , je méně aktivní než u *M. smegmatis*, která je přirozeně rezistentní na pyrazinamid. U *M. tuberculosis* je odstraňování  $\text{POA}^-$  pomalejší a dochází tak k akumulaci  $\text{POA}$  uvnitř bakterie, což vysvětluje unikátní citlivost *M. tuberculosis* k PZA<sup>34</sup>.

Jedním z cílů, na které PZA působí, je syntéza mastných kyselin I (FAS I – fatty acid synthasa I), která je společně s FAS II zodpovědná za syntézu mykolových kyselin<sup>35</sup>. Bylo zjištěno, že FAS I je především cíl pro chlorovaný derivát pyrazinamidu 5-chlor-PZA (5-Cl-PZA) a že  $\text{POA}$  a PZA jsou účinné pouze při vysokých koncentracích<sup>36</sup>. Inhibice FAS I probíhá tak, že PZA soutěží o vazebné místo s NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát), který zaručuje, že enzym bude fungovat správně.  $\text{POA}$  sice také inhibuje FAS I, ale váže se na jiné místo, než PZA a NADPH<sup>37</sup>.

Dalším mechanismem účinku PZA je inhibice trans-translace pomocí vazby  $\text{POA}$  na protein RpsA (ribosomální protein S1)<sup>38</sup>. Trans-translace je ochranný proces, který v průběhu translace odstraňuje z ribozomu defektní protein. Děje se tak pomocí RpsA, který se společně s tmRNA (krátká sekvence s vlastnostmi tRNA i mRNA) váže na defektní protein a uvolňuje ho z ribozomu. Tento protein je pak následně degradován proteázami. Trans-translace je velice důležitý děj pro životaschopnost, virulenci a přežití ve stresových podmínkách v mnoha bakteriálních systémech<sup>39</sup>. Bylo zjištěno, že se  $\text{POA}$  váže na RpsA, čímž zabraňuje tvorbě komplexu RpsA-tmRNA a tím inhibuje trans-translaci<sup>38</sup>.

Bylo zjištěno, že jedním z dalších cílů PZA, nebo spíše jeho metabolitu POA, je enzym aspartát dekarboxyláza (PanD) kódovaná genem *panD* <sup>40</sup>. Aspartát dekarboxyláza přetváří aspartát na  $\beta$ -alanin, který je potřebný pro syntézu pantothenátu a CoA. CoA je pak důležitý při energetickém metabolismu a syntéze mastných kyselin <sup>41</sup>. PanD je zároveň i faktorem virulence a mohl by se podílet na perzistenci bakterií. Mechanismus účinku POA je zřejmě takový, že POA blokuje enzymatickou aktivitu PanD a tím inhibuje syntézu pantothenátu a následně CoA <sup>40</sup>.

Dalším možným cílem PZA/POA je enzym fosforibosyl transferáza chinolinové kyseliny (QAPRTáza – Quinolinate phosphoribosyl transferase), který je důležitý v syntéze nikotinamidadeninukleotidu (NAD<sup>+</sup>). NAD<sup>+</sup> za normálních podmínek vzniká z chinolinové kyseliny, 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu a za přítomnosti Mg<sup>2+</sup>. Předpokládá se, že POA se na základě strukturální podobnosti s chinolinovou kyselinou může vázat na vazebné místo QAPRTázy a tím ji inhibovat <sup>42</sup>.

Rezistence na PZA může být důsledkem složité souhry několika enzymů a transportních mechanismů zapojených do metabolismu PZA. Většinou je rezistence *M. tuberculosis* způsobená mutací genu *pncA*, díky čemuž je inaktivována PZáza a nedochází tak přeměně PZA na POA. Ačkoliv některé studie ukazují, že ne všechny rezistence jsou způsobené mutacemi v *pncA*. Další mutace způsobující rezistenci se mohou nacházet v genu kódujícím protein RpsA, který hraje důležitou roli v trans-translaci <sup>29</sup>.

Mezi nežádoucí účinky PZA patří nauzea, zvracení, hepatotoxicita (u 1–5 % pacientů) a léková horečka. Někdy se objevuje hyperurikemie vedoucí až k akutní dnové artritidě <sup>17</sup>.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Chemikálie, přístroje a metody

Všechny L- a D-aminokyseliny byly zakoupeny od společnosti Fluorochem (Derbyshire, UK), TCI (Tokyo, Japonsko), Alfa Aesar (Kendal, Německo) a Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI) byl také od firmy Sigma-Aldrich, rozpouštědla pocházela buď od společnosti Penta (Praha, Česká republika) nebo společnosti Sigma-Aldrich. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla provedena na desce Silica 60 F<sub>254</sub> od společnosti Merck (Darmstadt, Německo).

#### Flash chromatografie

Sloučeniny byly adsorbovány na silikagel a přečištěny na chromatografickém systému PuriFlash XS420+ (Interchim, Montlucon, Francie) za použití gradientové eluce. K lepší separaci byla použita kombinace silikagelu a kolony DIOL-silikagelu (Interchim). Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a ethyl-acetátu. Detekce byla prováděna při vlnových délkách 270 nm a 317 nm (absorpční maxima POA).

#### NMR spektrometrie

<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektra byla zaznamenána na přístroj Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, USA) při frekvenci 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 126 MHz pro <sup>13</sup>C. Chemické posuny byly uvedeny v ppm (δ) a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu dle signálu rozpouštědel (2.49 pro <sup>1</sup>H a 39.7 pro <sup>13</sup>C v DMSO-*d*<sub>6</sub>).

#### IČ spektrometrie

IČ spektra byla zaznamenána spektrometrem FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, USA) s použitím metody zeslabeného úplného odrazu na krystalu germania.

#### Teplota tání

Teploty tání byly měřeny kapilární metodou pomocí přístroje Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). U sloučenin získaných v malém množství byla teplota tání měřena bodotávkem Kofler s mikroskopem.

### Měření optické otáčivosti

Měření optické otáčivosti bylo použito pro zkoumání derivátů PC-D/L-Pgl-Me a pro další zkoumání sloučenin bez přesných antipodů (různé estery D- a L-AMK). Byl použit Polarimeter Krüss P3000 (A. Krüss Optronic GmbH, Hamburk, Německo). Sloučeniny PC-D/L-Pgl-Me a PC-L-Met-Me byly rozpuštěny v chloroformu (pro srovnání získaných specifických otáčivostí s literaturou) a další sloučeniny byly rozpuštěny v methanolu do konečné koncentrace  $c = 5$  až 20 mg/ml (na základě pozorované rotace  $\alpha$ /nebo dostupného množství vzorku). Optická otáčivost byla měřena v 5 cm dlouhé kyvetě s použitím vlnové délky 589 nm při laboratorní teplotě ( $25 \pm 1$  °C). Všechna měření byla provedena třikrát a v této práci jsou uvedeny průměrné hodnoty.

### HPLC

Chemická a enantiomerní čistota sloučenin byla testována na chromatografu Shimadzu. Chirální separace byla provedena na koloně Lux Amylose-1 (amylóza tris(3,5-dimethylfenyl)karbamát) (250 x 4,6 mm), velikost částic 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Německo). Mobilní fáze se skládala z methanolu nebo acetonitrilu – 50 mM vodného roztoku  $\text{NaClO}_4$  nebo methanolu – 0,2% (v/v) kyseliny octové ve specifických objemových poměrech. Průtoková rychlost byla 1 ml/min a vstřikovaný objem byl 1  $\mu\text{l}$ . Pro detekci byl použit detektor s fotodiodovým polem a zvolena vlnová délka 270 nm.

Chromatogramy dokazující optickou čistotu jednotlivých derivátů či poměr enantiomerů v případě směsí nejsou v této práci prezentovány. Jsou však (v podobě doplňujících informací – [Supplementary material](#)) publikovány v našem článku.

### LC-MS a GC-MS analýza

K provedení LC-MS u sloučenin obsahující volnou karboxylovou skupinou byl použit hmotnostní spektrometr Advantage Max ion-trap LCQ (Thermo Finnigan, San Jose, USA) s ionizační technikou ESI. Všechna spektra byla zpracována pomocí softwaru Thermo Finnigan Xcalibur (Thermo Finnigan, San Jose, USA).



Analýza GC-MS byla provedena pomocí systému GCMS-QP2010 Plus s ionizační technikou při 70 eV (Shimadzu, Tokio, Japonsko). Chromatografická separace byla provedena na koloně Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, Restek, USA). Teplota kolony byla zvýšena o 20 °C/min, ze 130 na 320 °C a tato teplota byla udržována po dobu 2 minut. Teplota vstřikovače byla 240 °C a průtok nosného plynu (helium) byl nastaven na 1 ml/min. Detekční rozsah byl m/z 110–700 a teplota zdroje iontů byla udržována na 220 °C. Data byla zaznamenána a analyzována pomocí softwaru GCMS Solution Software ver. 4.45 (Shimadzu, Tokio, Japonsko).

#### Esterifikace aminokyselin

Methylester *O*-benzyl-Ser byl připraven s použitím 2 mmol *O*-benzyl-Ser, 0,5 ml trimethylsilylchloridu (TMSCl) a 10 ml methanolu. Reakční směs poté byla odpařena do sucha a vložena do exsikátoru.

#### Odchránění hydroxy AMK chráněných *O*-*tert*-butylem

Odchránění se řídilo běžným postupem. 0,5 mmol příslušného *O*-*tert*-butyl derivátu bylo přidáno k 1 ml deprotektivní směsi (0,95 ml kyseliny trifluoroctové, 0,025 ml triisopropylsilanu, 0,025 ml destilované vody) a mícháno po dobu 1 hod za laboratorní teploty. Následně se směs odpařila do sucha a byla čištěna za použití Flash chromatografie.

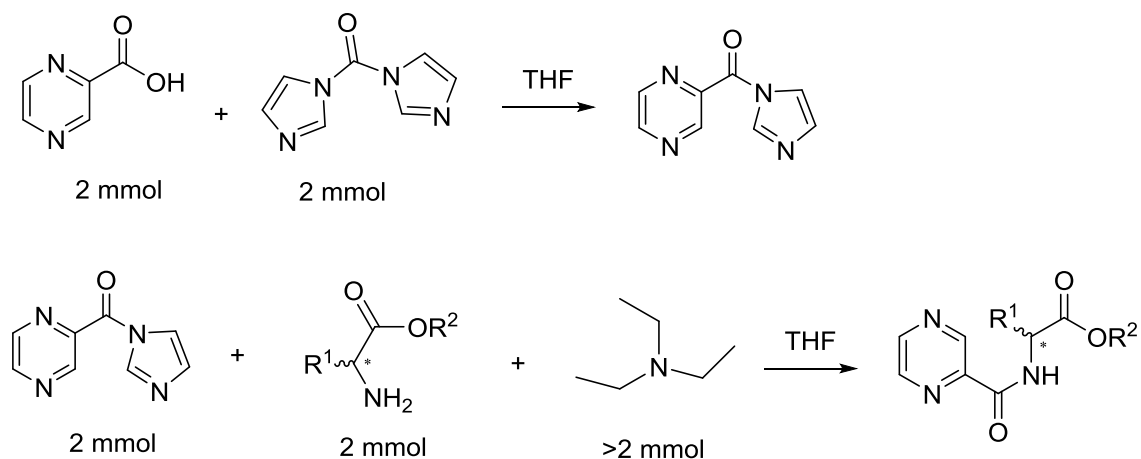
### **3.2 Postup přípravy nových látek**

Výchozími látkami pro naši syntézu bylo 248 mg (2 mmol) kyseliny pyrazinkarboxylové (POA) a 324 mg (2 mmol) CDI. Obě látky jsme navázili do baňky s kulatým dnem a přidali jsme 2 ml tetrahydrofuranu (THF). Do baňky jsme vložili magnetické míchadlo, zavřeli ji a ponořili do vodní lázně vyhřáté na 70 °C. V takovémto stavu jsme baňku nechali 1 hodinu, během níž došlo k aktivaci POA a docházelo k vyvíjení plynu CO<sub>2</sub>.

Po této době jsme baňku přestali zahřívat a za stálého míchání ji nechali zchladnout na laboratorní teplotu. V dalším kroku jsme přidali ke směsi 2 mmol příslušné AMK, nebo jejího esteru (obojí obvykle ve formě hydrochloridu) a 300  $\mu$ l (2,14 mmol) triethylaminu (TEA), což je báze, která vychytává uvolněný chlorovodík. Reakční směs jsme nechali reagovat v uzavřené baňce 2 hodiny.

Po ukončení reakce jsme za použití rotační vakuové odparky (300 mbar, 50 °C) odpařili ze směsi rozpouštědlo. Zbytek jsme převedli s přiměřeným množstvím ethyl-acetátu a vody do dělicí nálevky. Přidali jsme 15 ml ethyl-acetátu a 10 ml vody a vytřepávali jsme. Postup jsme vždy alespoň jednou zopakovali, u některých sloučenin, které hůře přestupovaly do organické fáze, jsme vytřepávali vícekrát. Po oddělení vodné a organické fáze jsme provedli TLC, abychom si ověřili čistotu ethyl-acetátové fáze a zjistili, zda ve vodné fázi zůstal ještě nějaký zbytek produktu. Ethyl-acetátové fáze jsme spojili a vytřepali s 0,01M HCl, abychom se zbavili případných nečistot – imidazol, či nezreagovaná AMK. Znovu jsme provedli kontrolní TLC.

Po vytřepávání jsme organickou fází zbavili zbytkové vody pomocí nasyceného roztoku NaCl, přidali přibližně 50 mg aktivního uhlí, míchali asi 10 minut a poté ji přefiltrovali. Přefiltrovanou ethyl-acetátovou fází jsme dali odpařit na vakuovou odparku. Konečný produkt jsme dali přes noc do exsikátoru a několik miligramů jsme odebrali pro  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrii. Pokud to bylo nutné, tak jsme některé produkty dále čistili pomocí Flash chromatografie. Obecné schéma přípravy produktů je zobrazeno na **obr. 2**.



**Obr. 2** Obecné schéma přípravy produktů

### 3.3 Nově připravené deriváty

**Název:** (pyrazin-2-karboxyl)-D-alanin

**Označení:** PC-D-Ala

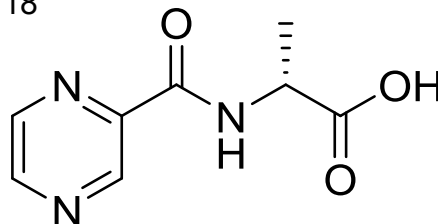
**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 195,18

**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Log P:** -1,0155

**Teplota tání:** 175–178 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 390,4 mg
- Praktický: 26 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.80 (bs, 1H), 9.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.94 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 8.89 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.76 – 8.74 (m, 1H), 4.54 – 4.44 (m, 1H), 1.43 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.74, 162.70, 147.95, 144.52, 143.70, 143.61, 47.97, 17.31

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3370 CONH N-H, 1641 CONH C=O, 2923 COOH O-H, 1736 COOH C=O

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 194

**Název:** (pyrazin-2-karboxyl)-L-alanin

**Označení:** PC-L-Ala

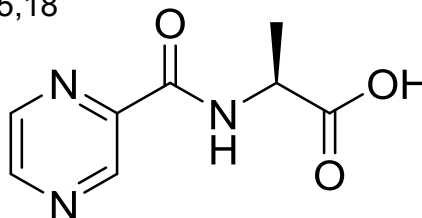
**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 195,18

**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Log P:** -1,0155

**Teplota tání:** 170–174 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 390,4 mg
- Praktický: 95 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.89 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.75 (dd, *J* = 2.5, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.54 – 4.44 (m, 1H), 1.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 173.72, 162.69, 147.95, 144.52, 143.69, 143.62, 47.98, 17.32

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3370 CONH N-H, 1641 CONH C=O, 2872 COOH O-H, 1736 COOH C=O

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 194

**Název:** methyl-(pyrazin-2-karbonyl)-DL-alaninát

**Označení:** PC-DL -Ala-Me

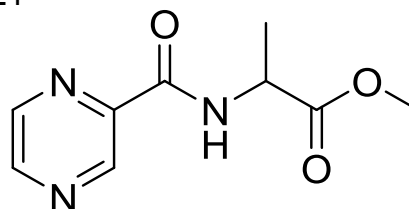
**Sumární vzorec:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 209,21

**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Log P:** -0,8725

**Teplota tání:** 53–56 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 418,4 mg
- Praktický: 17 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 9.16 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.77 – 8.74 (m, 1H), 4.62 – 4.54 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 1.43 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.63, 162.94, 147.97, 144.48, 143.78, 143.62, 52.24, 48.00, 17.00

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3258 CONH N-H, 1671 CONH C=O, 1747 COOR C=O, 2993, 2951 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 209

**Název:** ethyl-(pyrazin-2-karboxyl)-D-alaninát

**Označení:** PC-D-Ala-Et

**Sumární vzorec:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

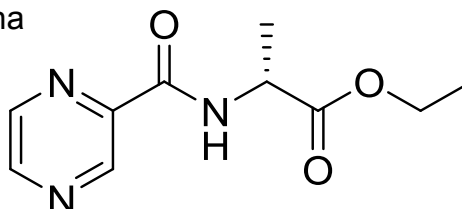
**Relativní molekulová hmotnost:** 223,23

**Vzhled:** Nažloutlá olejovitá kapalina

**Log P:** -0,5315

**Výtěžek:**

- Teoretický: 446,5 mg
- Praktický: 45 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 9.11 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.77 – 8.75 (m, 1H), 4.58 – 4.50 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 2H), 1.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.13, 162.94, 147.95, 144.50, 143.74, 143.61, 60.85, 48.12, 16.99, 14.20

**IČ:** IR (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3392 CONH N-H, 1675 CONH C=O, 1736 COOR C=O, 2984 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 223

**Název:** ethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-alaninát

**Označení:** PC-L-Ala-Et

**Sumární vzorec:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

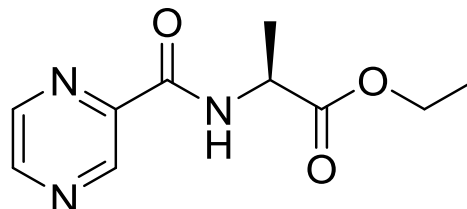
**Relativní molekulová hmotnost:** 223,23

**Vzhled:** Nažloutlá olejovitá kapalina

**Log P:** -0.5315

**Výtěžek:**

- Teoretický: 446,5 mg
- Praktický: 32 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.19 – 9.17 (m, 1H), 9.12 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.77 – 8.75 (m, 1H), 4.58 – 4.50 (m, 1H), 4.15 – 4.08 (m, 2H), 1.44 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 172.14, 162.94, 147.96, 144.50, 143.75, 143.62, 60.86, 48.13, 16.99, 14.22

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3389 CONH N-H, 1674 CONH C=O, 1738 COOR C=O, 2984 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 223

**Název:** dimethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-D-aspartát

**Označení:** PC-D-Asp-diMe

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

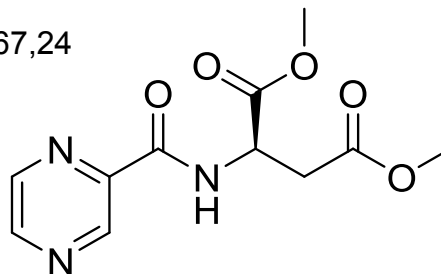
**Relativní molekulová hmotnost:** 267,24

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** -1,3565

**Výtěžek:**

- Teoretický: 534,5 mg
- Praktický: 66 %



**<sup>1</sup>H NMR:** 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 9.20 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.91 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.78 – 8.69 (m, 1H), 5.10 – 4.86 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.01 (dd, *J* = 16.6 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.94 (dd, *J* = 16.6 Hz, *J* = 6.4 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.03, 170.96, 162.94, 148.20, 144.10, 143.82, 143.71, 52.64, 51.91, 48.75, 35.46

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3382 CONH N-H, 1679 CONH C=O, 1737 COOR C=O, 2954 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -4.0° (methanol)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 267



**Název:** diethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-aspartát

**Označení:** PC-L-Asp-diEt

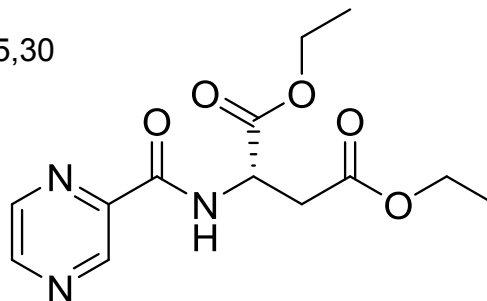
**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 295,30

**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Log P:** -0,6745

**Teplota tání:** 54–57 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 590,6 mg
- Praktický: 25 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 9.20 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.79 – 8.74 (m, 1H), 5.01 – 4.90 (m, 1H), 4.16 – 4.00 (m, 4H), 3.03 – 2.86 (m, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.47, 170.35, 162.88, 148.18, 144.12, 143.78, 143.69, 61.30, 60.51, 48.87, 35.72, 14.15, 14.11

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3311 CONH N-H, 1660 CONH C=O, 1732 COOR C=O, 2978 C-H.

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = 12,0° (methanol)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 295

**Název:** S-benzyl-N-(pyrazin-2-karbonyl)-L-cystein

**Označení:** PC-L-SBn-Cys

**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S

**Relativní molekulová hmotnost:** 317,36

**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Log P:** 0,9855

**Teplota tání:** 84–87 °C (v kapiláře)

**Výtěžek:**

- Teoretický: 634,7 mg
- Praktický: 84 %

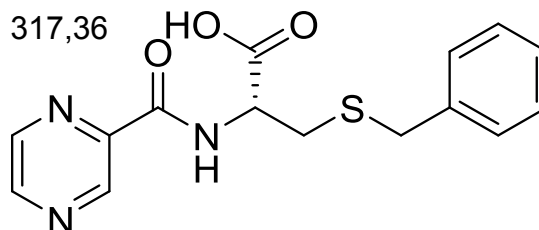
**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.80 – 8.76 (m, 1H), 7.31 – 7.24 (m, 4H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 4.75 – 4.67 (m, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.03 – 2.97 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.77, 162.88, 148.12, 144.20, 143.72, 143.68, 138.36, 129.00, 128.54, 127.03, 51.77, 35.41, 32.31

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3357 CONH N-H, 1660 CONH C=O, 1732 COOH C=O, 2916 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -49,3° (methanol)

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 316



**Název:** diethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-glutamát

**Označení:** PC-L-Glu-diEt

**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

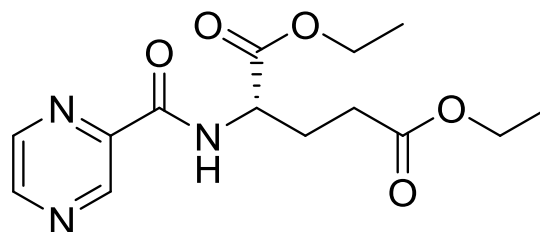
**Relativní molekulová hmotnost:** 309,32

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** -0,2325

**Výtěžek:**

- Teoretický: 618,6 mg
- Praktický: 72 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.18 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 9.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.79 – 8.74 (m, 1H), 4.59 – 4.51 (m, 1H), 4.17 – 4.07 (m, 2H), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.43 – 2.36 (m, 2H), 2.23 – 2.04 (m, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.38, 171.25, 163.41, 147.99, 144.43, 143.79, 143.62, 61.00, 60.08, 51.74, 30.24, 25.82, 14.20

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3359 CONH N-H, 1677 CONH C=O, 1732 COOR C=O, 2982 C-H.

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -12,0° (methanol)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 309

**Název:** methyl-2-(pyrazin-2-karboxamid)akrylát

**Označení:** PC-MeAcr

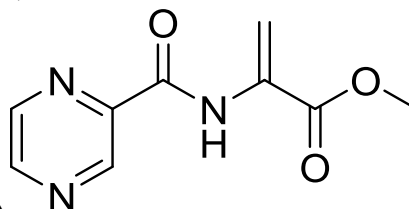
**Sumární vzorec:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 207,19

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** -0,5555

**Teplota tání:** 102–104 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 414,4 mg
- Praktický: 11 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.10 (bs, 1H), 9.27 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.82 – 8.77 (m, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 3.83 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.80, 161.52, 148.64, 143.79, 143.65, 143.48, 131.57, 109.67, 53.31

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3349 CONH N-H, 1689 CONH C=O, 1712 COOR C=O, 3158, 2957 C-H

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 206

**Název:** methyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-methioninát

**Označení:** PC-L-Met-Me

**Sumární vzorec:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S

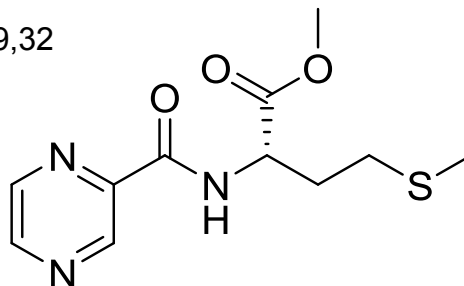
**Relativní molekulová hmotnost:** 269,32

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** -0,2175

**Výtěžek:**

- Teoretický: 538,6 mg
- Praktický: 66 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 9.19 – 9.17 (m, 1H), 8.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.78 – 8.75 (m, 1H), 4.74 – 4.66 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.60 – 2.42 (m, 2H), 2.23 – 2.06 (m, 2H), 2.04 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.95, 163.48, 147.97, 144.47, 143.84, 143.61, 52.32, 51.34, 30.10, 29.97, 14.69

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3376 CONH N-H, 1675 CONH C=O, 1741 COOR C=O, 2952 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -22,7° (methanol), 33,0° (chloroform)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 269

**Název:** methyl-2-fenyl-2-(pyrazin-2-karboxamid)acetát

**Označení:** PC-D/L-Pgl-Me

**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 271,10

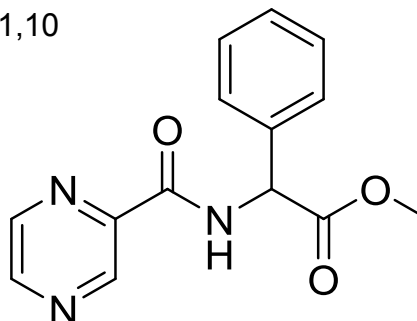
**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 0,5745

**Teplota tání:** 92–97 °C (v kapiláře)

**Výtěžek:**

- Teoretický: 482,2
- Praktický: 55 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 9.18 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.91 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.79 – 8.75 (m, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 2H), 7.43 – 7.29 (m, 3H), 5.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.66, 162.68, 148.20, 144.17, 143.75, 143.73, 136.62, 128.85, 128.48, 128.04, 56.35, 52.82

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3376 CONH N-H, 1665 CONH C=O, 1747 COOR C=O, 3090, 2953 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -47,3° (chloroform)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 271

**Název:** (pyrazin-2-karbonyl)-D-serin

**Označení:** PC-D-Ser

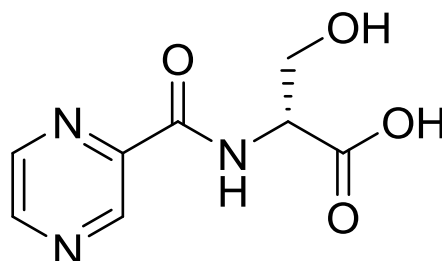
**Sumární vzorec:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 211,18

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** -2,0505

**Teplota tání:** 185–189 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 422,4 mg
- Praktický: 20 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.23 – 9.19 (m, 1H), 8.91 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.80 – 8.75 (m, 1H), 8.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.52 – 4.45 (m, 1H), 3.89 (dd, *J* = 11.1, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 11.1, *J* = 3.4 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.69, 162.54, 148.11, 144.21, 143.66, 143.56, 61.29, 54.93

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3365 CONH N-H, 1651 CONH C=O, 1708 COOH C=O, 3335 CH<sub>2</sub>OH O-H, 2935 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> – nezměřeno kvůli nerozpustnosti

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 210 (LC-MS)

**Název:** methyl-(pyrazin-2-karbonyl)-D-serinát

**Označení:** PC-D-Ser-Me

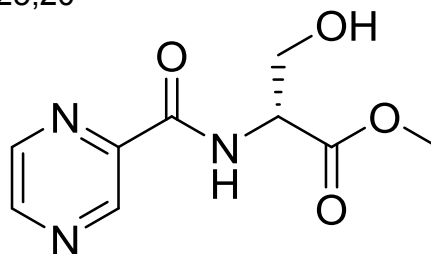
**Sumární vzorec:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 225,20

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** -1,9075

**Teplota tání:** 54–56 °C (Kofler)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 450,4 mg
- Praktický: 45 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.93 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.79 (dd, *J* = 2.5, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.27 (bs, 1H), 4.70 – 4.56 (m, 1H), 3.93 – 3.85 (m, 1H), 3.83 – 3.75 (m, 1H), 3.67 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.95, 163.15, 148.52, 144.33, 143.98, 143.95, 61.49, 55.19, 52.64

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 1656 CONH C=O, 1737 COOR C=O, 3343 CH<sub>2</sub>OH O-H, 2956 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 225



**Název:** methyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-serinát

**Označení:** PC-L-Ser-Me

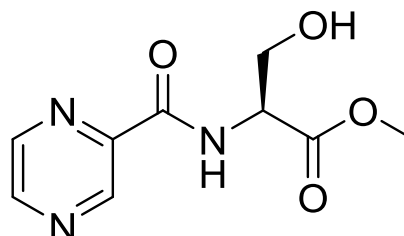
**Sumární vzorec:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 225,20

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** -1,9075

**Teplota tání:** 56–58 °C (Kofler)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 450,4 mg
- Praktický: 59 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.93 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.79 – 8.77 (m, 1H), 5.27 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 4.66 – 4.59 (m, 1H), 3.93 – 3.86 (m, 1H), 3.84 – 3.76 (m, 1H), 3.68 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.66, 162.85, 148.23, 144.04, 143.68, 143.66, 61.20, 54.91, 52.35

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 1657 CONH C=O, 1737 COOR C=O, 3340 CH<sub>2</sub>OH O-H, 2956 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 225

**Název:** O-benzyl-N-(pyrazin-2-karbonyl)-L-serinát

**Označení:** PC-L-OBn-Ser

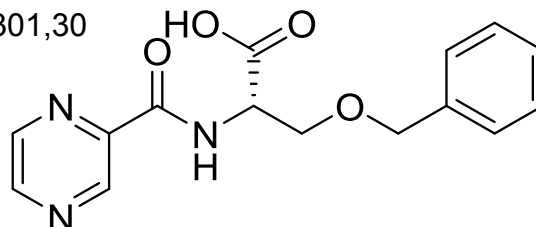
**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 301,30

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 0,3495

**Teplota tání:** 139–142 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 602,6 mg
- Praktický: 50 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.14 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.37 – 7.22 (m, 5H), 4.80 – 4.70 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.05 – 3.91 (m, 1H), 3.88 – 3.79 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.20, 162.58, 148.21, 144.00, 143.71, 143.60, 138.12, 128.41, 127.70, 127.66, 72.30, 69.20, 52.61

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3400 CONH N-H, 1650 CONH C=O, 1743 COOH C=O, 2943 COOH O-H, 2935 C-H.

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = 45,3° (methanol)

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 300

**Název:** methyl-O-benzyl-N-(pyrazin-2-karbonyl)-L-serinát

**Označení:** PC-L-OBn-Ser-Me

**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

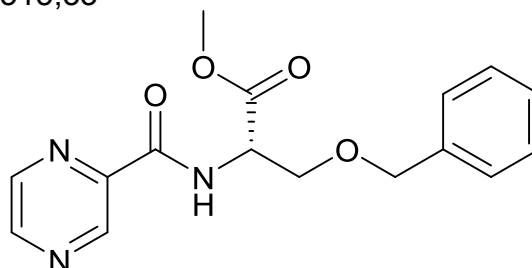
**Relativní molekulová hmotnost:** 315,33

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** 0,4925

**Výtěžek:**

- Teoretický: 630,66 mg
- Praktický: 95 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.20 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.81 – 8.75 (m, 1H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 3H), 4.88 – 4.81 (m, 1H), 4.55 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 9.9, 5.5 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.53, 163.14, 148.56, 144.23, 144.02, 143.97, 138.32, 128.74, 128.04, 127.99, 72.51, 69.12, 52.83, 52.79

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3398 CONH N-H, 1679 CONH C=O, 1746 COOR C=O, 2921 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = 10,7° (methanol)

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 315

**Název:** methyl-O-(*terc*-butyl)-*N*-(pyrazin-2-karbonyl)-*L*-serinát

**Označení:** PC-L-*O*tBu-Ser-Me

**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

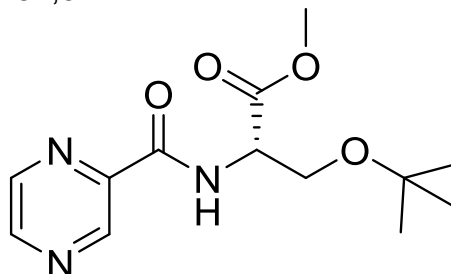
**Relativní molekulová hmotnost:** 281,31

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** -0,0855

**Výtěžek:**

- Teoretický: 562,6 mg
- Praktický: 61 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.80 – 8.76 (m, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.76 – 4.69 (m, 1H), 3.83 (dd, *J* = 9.6, 4.3 Hz, 1H), 3.70 (dd, *J* = 9.6, 3.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.10 (s, 9H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 170.43, 162.62, 148.32, 143.84, 143.78, 143.64, 73.33, 61.55, 53.01, 52.39, 27.28

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3404 CONH N-H, 1681 CONH C=O, 1747 COOR C=O, 2973 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 281

**Název:** methyl-*O*-(*tert*-butyl)-*N*-(pyrazin-2-karboxyl)-*D*-threoninát

**Označení:** PC-*D*-*O*tBu-Thr-Me

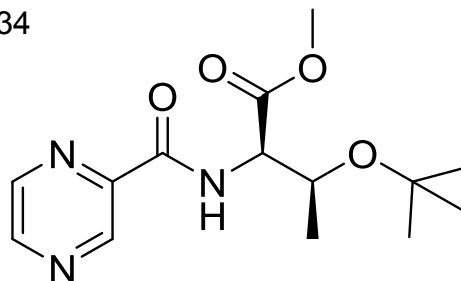
**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 295,34

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 0,3765

**Teplota tání:** 81–84 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 590,7 mg
- Praktický: 89 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.81 – 8.80 (m, 1H), 8.29 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.58 (dd, *J* = 9.2, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.32 (qd, *J* = 6.2, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.11 (s, 9H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.61, 162.90, 148.48, 143.84, 143.61, 143.52, 74.02, 67.22, 57.70, 52.37, 28.22, 21.01

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3411 CONH N-H, 1685 CONH C=O, 1743 COOR C=O, 2977 C-H

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 294

**Název:** methyl-O-(*terc*-butyl)-N-(pyrazinu-2-karbonyl)-L-threoninát

**Označení:** PC-L-*Of*Bu-Thr-Me

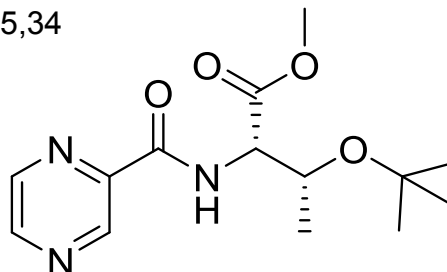
**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 295,34

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 0,3765

**Teplota tání:** 83–86 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 590,7 mg
- Praktický: 99 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.23 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.83 – 8.78 (m, 1H), 8.29 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.58 (dd, *J* = 9.2, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.32 (qd, *J* = 6.2, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.11 (s, 9H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 170.60, 162.90, 148.47, 143.83, 143.60, 143.51, 74.01, 67.22, 57.69, 52.36, 28.21, 21.00

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3410 CONH N-H, 1685 CONH C=O, 1743 COOR C=O, 2977 C-H

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 294

**Název:** ethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-D-tryptofanát

**Označení:** PC-D-Trp-Et

**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 338,37

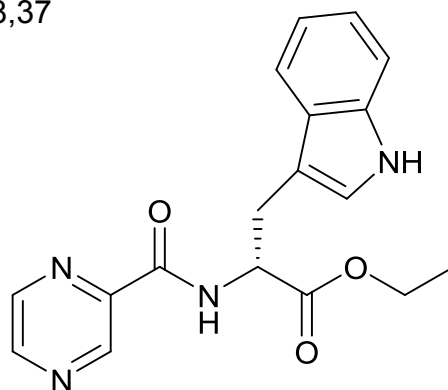
**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 1,3695

**Teplota tání:** 90–93 °C (v kapiláře)

**Výtěžek:**

- Teoretický: 676,7 mg
- Praktický: 99 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.85 (s, 1H), 9.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.91 – 8.85 (m, 2H), 8.73 – 8.69 (m, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.08 – 7.01 (m, 1H), 6.98 – 6.90 (m, 1H), 4.85 – 4.77 (m, 1H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.41 – 3.29 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.42, 162.90, 148.05, 144.20, 143.67, 143.60, 136.30, 127.31, 123.97, 121.20, 118.57, 118.25, 111.62, 109.41, 61.03, 53.36, 26.84, 14.14

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3366 CONH N-H, 1673 CONH C=O, 1732 COOR C=O, 2980 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 338

**Název:** ethyl-(pyrazin-2-karboxyl)-L-tryptofanát

**Označení:** PC-L-Trp-Et

**Sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

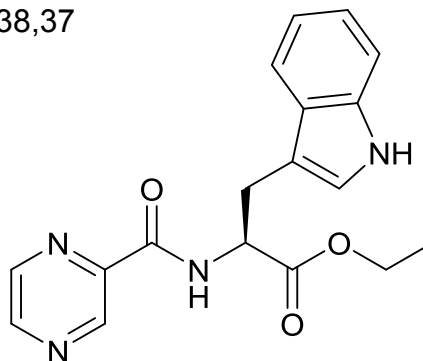
**Relativní molekulová hmotnost:** 338,37

**Vzhled:** Žlutá olejovitá kapalina

**Log P:** 1,3695

**Výtěžek:**

- Teoretický: 676,7 mg
- Praktický: 96 %



**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.86 (s, 1H), 9.16 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.89 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 8.73 – 8.69 (m, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.10 – 6.97 (m, 1H), 6.97 – 6.91 (m, 1H), 4.85 – 4.78 (m, 1H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.40 – 3.30 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.42, 162.90, 148.05, 144.20, 143.67, 143.60, 136.30, 127.31, 123.97, 121.19, 118.57, 118.25, 111.62, 109.40, 61.03, 53.36, 26.84, 14.13

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3368 CONH N-H, 1672 CONH C=O, 1732 COOR C=O, 2981 C-H

**MS:** (EI): M<sup>+</sup> = 338



**Název:** ethyl-(pyrazin-2-karbonyl)-L-tyrosinát

**Označení:** PC-L-Tyr-Et

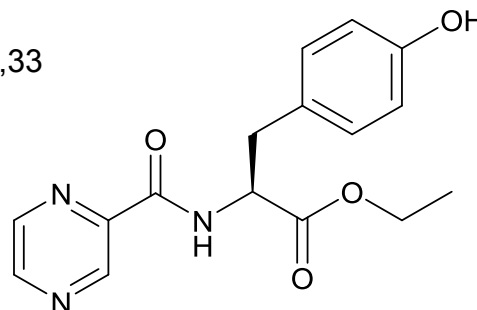
**Sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Relativní molekulová hmotnost:** 315,33

**Vzhled:** Bílá pevná látka

**Log P:** 0,6955

**Teplota tání:** 119–123 °C (v kapiláře)



**Výtěžek:**

- Teoretický: 630,7 mg
- Praktický: 65 %

**<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.21 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 8.92–8.86 (m, 2H), 8.76 – 8.73 (m, 1H), 7.03 – 6.98 (m, AA', BB', 2H), 6.66 – 6.60 (m, AA', BB', 2H), 4.73 – 4.65 (m, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.09 (dd, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.21, 162.92, 156.20, 148.07, 144.21, 143.68, 143.67, 130.23, 127.19, 115.27, 60.99, 54.09, 35.66, 14.19

**IČ:** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>) 3367 CONH N-H, 1663 CONH C=O, 1720 COOR C=O, 3440 Ar-OH O-H, 2986 C-H

**Optická otáčivost:** [α]<sub>D</sub> = -5,0° (methanol)

**MS:** (ESI-): [M-H]<sup>-</sup> = 314

### 3.4 Biologické hodnocení látek

Všechny výše uvedené látky byly testovány na antimikrobiální, antifungální a cytotoxické účinky. Antimikrobiální aktivita byla testována na bakteriální kmenech zahrnujících *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra – avirulentní kmen), *M. smegmatis*, *M. aurum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (další kmeny uvedeny níže), antifungální aktivita byla zjišťována u kmenů *Candida albicans* a *Aspergillus flavus* (další kmeny uvedeny níže). Cytotoxicita sloučenin s prokázanou aktivitou pak byla testována na lidské buněčné linii jaterního karcinomu HepG2. Antibakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace dané látky, která zastaví růst mikroba<sup>43</sup>. Za aktivní se v této diplomové práci považují látky s MIC pod 31,25 µl/ml. Jelikož PZA vykazuje významnou aktivitu *in vitro* pouze v prostředí kyselého pH, probíhalo antibakteriální testování při mírně kyselém pH 6 a pro srovnání při běžně používaném pH 6,6.

#### 3.4.1 Antimykobakteriální aktivita

Stanovení antimykobakteriální aktivity připravených sloučenin bylo provedeno s avirulentním kmenem *M. tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) a s rychle rostoucími kmeny *M. smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366).

K testování na antimykobakteriální aktivitu byla použita mikrodiluční bujonová metoda, při které se používá 96-jamková mikrotitrační destička. Každá jamka se naplní bujonem, který obsahuje různé koncentrace testované látky. Pro každé stanovení MIC by mělo být použito alespoň 8 různých koncentrací látky. Naočkované destičky se poté překryjí plastovým víčkem a inkubují se při 36 °C ± 1 °C<sup>44</sup>.

Jako kultivační médium byl použit bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) s deklarovaným pH 6,6 a obohacený o 0,4% glycerol (Sigma-Aldrich) a o 10% růstový doplněk Middlebrook OADC (olejová kyselina, albumin, dextróza, kataláza). U testování při pH 6 bylo požadovaného pH dosaženo přidáním 1M HCl (Penta). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich) a naředěny dvojkovým ředěním tak, aby finální koncentrace sloučenin v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,625 – 7,81 –

3,91 µl/ml. Jako pozitivní kontrola pro stanovení aktivity byly použity INH, RIF a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich) a jako negativní kontrola bujon s DMSO. Vzorky byly zakryty a inkubovány ve tmě při 37 °C.

Po 48 hodinách inkubace *M. smegmatis*, po 72 hodinách inkubace *M. aurum* a po 120 hodinách inkubace *M. tuberculosis* H37Ra byl přidán 0,01% roztok sodné soli resazurinu. Tento indikátor byl získán rozpuštěním sodné soli resazurinu (Sigma-Aldrich) v deionizované vodě za vzniku 0,02% roztoku a byl smíchán ve stejném objemu s 10% vodným roztokem polysorbátu 80 (Tween 80). Mikrotitrační destičky poté byly inkubovány dalších 2,5 hodiny pro stanovení aktivity *M. smegmatis*, 4 hodiny pro *M. aurum* a 18 hodin pro *M. tuberculosis* H37Ra. MIC byla stanovena na základě změny barvy skvrny (modrá barva – aktivní, růžová – neaktivní). Hodnoty MIC pro pH 6 i pro pH 6,6 jsou uvedeny v **tab. 3** a **tab. 4** (červeně jsou označeny aktivní látky).

**Tab. 3** Antimykobakteriální aktivity připravených sloučenin a standardů při pH 6,6, prezentované jako MIC (µg/ml).

Kód látky	<i>M. tbc</i> H37Ra	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
PC-D-Ala	≥500	≥500	≥500
PC-L-Ala	≥250	≥250	≥250
PC-DL-Ala-Me	≥500	≥500	≥500
PC-D-Ala-Et	≥500	≥500	≥500
PC-L-Ala-Et	≥500	≥500	≥500
PC-D-Asp-diMe	≥125	≥125	≥125
PC-L-Asp-diEt	≥500	≥500	≥500
PC-L-SBn-Cys	≥250	≥250	≥250
PC-L-Glu-diEt	≥500	≥500	≥500
<b>PC-MeAcr</b>	<b>15,625</b>	<b>31,25</b>	62,5
PC-L-Met-Me	≥500	≥500	≥500
PC-D/L-Pgl-Me	≥500	≥500	≥500
PC-D-Ser	≥500	≥500	≥500
PC-D-Ser-Me	≥500	≥500	≥500
PC-L-Ser-Me	≥500	≥500	≥500
PC-L-OBn-Ser	≥500	≥500	≥500
PC-L-OBn-Ser-Me	250	≥500	≥500

PC-L-OfBu-Ser-Me	≥500	≥500	≥500
PC-D-OfBu-Thr-Me	≥500	≥500	≥500
PC-L-OfBu-Thr-Me	≥500	≥500	≥500
PC-D-Trp-Et	125	250	250
PC-L-Trp-Et	125	250	125
PC-L-Tyr-Et	500	≥500	≥500
PZA	≥500	≥500	≥500
INH	0,125–0,25	7,81–15,625	1,95–3,91
RIF	0,0039–0,0078	12,5–25	0,39–0,78
CPX	0,125–0,25	0,0625–0,125	0,0078–0,0156

Tab. 4 Antimykobakteriální aktivity připravených sloučenin a standardů při pH 6, prezentované jako MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Kód látky	<i>M. tbc</i> H37Ra	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	logP
PC-D-Ala	≥125	≥125	62,5	-1,0155
PC-L-Ala	≥250	125	62,5	-1,0155
PC-DL-Ala-Me	≥125	≥125	≥125	-0,8725
PC-D-Ala-Et	≥125	≥125	≥125	-0,5315
<b>PC-L-Ala-Et</b>	<b>3,91</b>	≥125	≥125	-0,5315
PC-D-Asp-diMe	≥125	≥125	≥125	-1,3565
PC-L-Asp-diEt	≥125	≥125	≥125	-0,6745
PC-L-SBn-Cys	62,5	125	125	0,9855
<b>PC-L-Glu-diEt</b>	<b>31,25</b>	≥500	≥500	-0,2325
PC-MeAcr	62,5	≥125	62,5	-0,5555
<b>PC-L-Met-Me</b>	<b>&lt;3,91</b>	≥500	62,5	-0,2175
<b>PC-D/L-Pgl-Me</b>	<b>&lt;1,95</b>	≥250	<b>31,25</b>	0,5745
PC-D-Ser	≥250	125	62,5	-2,0505
PC-D-Ser-Me	250	≥500	250	-1,9075
PC-L-Ser-Me	≥500	≥500	≥500	-1,9075
PC-L-OBn-Ser	≥500	250	62,5	0,3495
<b>PC-L-OBn-Ser-Me</b>	<b>7,81</b>	≥500	62,5	0,4925
PC-L-OfBu-Ser-Me	≥500	250	62,5	-0,0855
PC-D-OfBu-Thr-Me	62,5	≥500	≥500	0,3765

<b>PC-L-OtBu-Thr-Me</b>	≥500	≥500	≥500	0,3765
<b>PC-D-Trp-Et</b>	62,5	250	62,5	1,3695
<b>PC-L-Trp-Et</b>	125	250	62,5	1,3695
<b>PC-L-Tyr-Et</b>	<b>7,81</b>	≥250	≥250	0,6955
<b>PZA</b>	<3,91	≥500	250	-1,4595
<b>INH</b>	0,125–0,25	7,81–15,625	3,91–7,81	-0,7970
<b>RIF</b>	0,0016–0,0062	6,25–12,5	0,39–1,56	4,5560
<b>CPX</b>	0,25	0,0625–0,25	0,0625	1,0370

### 3.4.2 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita byla testována mikrodiluční bujonovou metodou u *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (SA) CCM 4223 (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* methicillin-resistant (MRSA) CCM 4750 (ATCC 43300), *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (ATCC 29212), *Escherichia coli* CCM 3954 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* DSM 30007 (ATCC 19606) a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853). Kultivace probíhala v kationtově upraveném Mueller-Hintonově bujónu (CAMHB, M-H 2 Broth, Sigma-Aldrich), testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich) za vzniku zásobních roztoků. Pozitivní kontrolou byly testovací mikroby a negativní kontrolou kultivační médium a DMSO. Antibakteriální aktivita byla vyjádřena jako MIC (v  $\mu\text{M}$ ) po 24 a 48 hodinách inkubování v temné a zvlhčené atmosféře při teplotě  $35 \pm 2$  °C. Jako indikátor byl použit Alamar Blue (resazurin) a jako standardy gentamicin a CPX (oba ze Sigma-Aldrich).

Většina našich sloučenin nevykazovala žádnou aktivitu. Látka PC-L-Ala-Et vykazovala nízkou aktivitu proti SA, MIC byla 125  $\mu\text{M}$ . Dalším aktivním derivátem byl PC-L-OtBu-Thr-Me, který byl účinný proti SA i MRSA, jeho MIC byla 31,25  $\mu\text{M}$ , také vykazoval i určitou aktivitu proti *Staphylococcus epidermidis*, s hodnotou MIC 62,5  $\mu\text{M}$ .

### 3.4.3 Antifungální aktivita

Při testování antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujonová metoda a 4 kmeny kvasinek a 4 kmeny plísní, konkrétně to byly *Candida albicans* CCM 8320 (ATCC 24433), *Candida krusei* CCM 8271 (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* CCM 8260 (ATCC 22019), *Candida tropicalis* CCM 8264 (ATCC 750), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspegillus flavus* CCM 8363, *Lichtheimia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* CCM 8377 (ATCC 9533). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny s kultivačním médiem RPMI 1640 s glutaminem a 2% glukózou, pufované na pH 7,0 pomocí kyseliny 3-morfolinpropan-1-sulfonové. Kultivace byla prováděná ve tmavé a vlhké atmosféře při teplotě  $35 \pm 2$  °C. Pozitivní kontrolou byly testovací mikroby a negativní kontrolou kultivační médium a DMSO. Jako indikátor byl použit Alamar Blue (resazurin) a jako standardy amfotericin B (Sigma-Aldrich) a vorikonazol (Toronto Research Chemicals, Kanada).

Žádná testovaná látka nevykazovala významnou aktivitu. Nejvyšší aktivita byla zaznamenaná u PC-L-OBn-Ser-Me, kdy MIC byla 125 µM.

### 3.4.4 Cytotoxická aktivita

Cytotoxicita byla zjišťována na lidské buněčné linii jaterního karcinomu HepG2 (ECACC, Salisbury, UK), která byla kultivována v MEM (minimální esenciální médium) (Sigma-Aldrich) doplněném o 10% fetální bovinní sérum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), 1% roztok L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a roztok neesenciálních kyselin (Sigma-Aldrich) ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub> při 37 °C. Pro vyhodnocení cytotoxicity byly buňky ošetřené testovanými látkami použity jako experimentální skupina, zatímco neošetřené buňky HepG2 sloužily jako kontrolní. Buňky byly naočkovány v hustotě 10 000 buněk na jamku v 96-jamkové destičce. Další den byly buňky ošetřeny testovanými látkami rozpuštěnými v DMSO.

Při vyhodnocení byl využit test Cell Titer 96, který je založen na redukování MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, vnitřní sůl) živými buňkami v prostředí fenazin methosulfátu (PMS) <sup>45</sup> na rozpustný formazan, který je poté stanoven kolorimetricky při vlnové délce 490 nm <sup>46</sup>.

Jako měřítko cytotoxicity byla použita hodnota IC<sub>50</sub>, neboli střední inhibiční koncentrace. Čím je hodnota IC<sub>50</sub> nižší, tím je cytotoxicita vyšší. Celkově toxicita našich látek byla nízká, nejvyšší cytotoxicitu prokazoval PC-L-Trp-Et. Pro neaktivnější sloučeniny byl stanoven index selektivity (SI), který ukazuje, do jaké míry jsou látky aktivnější proti *M. tuberculosis*, než je jejich cytotoxicita vůči lidským buňkám. SI byl stanoven pomocí rovnice: SI = IC<sub>50</sub> (μM) / MIC (μM)<sup>47</sup>. Dvě významně aktivní sloučeniny PC-L-Ala-Et a PC-D/L-Pgl-Me měly SI >40, což naznačuje dobrý cytotoxický profil. (Tab. 5)

Tab. 5 Vypočítaný index selektivity (SI) u neaktivnějších sloučenin proti *M. tuberculosis*. Sloučeniny s dobrým cytotoxickým profilem jsou vyznačeny červeně.

Kód látky	HepG2 IC <sub>50</sub> (μM)	MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (μg/ml)	MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (μM)	SI (pH 6)
<b>PC-L-Ala-Et</b>	>1000	3,91	18	<b>&gt;57,1</b>
PC-L-Met-Me	>100	<3,91	15	6,9
<b>PC-D/L-Pgl-Me</b>	>1000	<1,95	<7	<b>&gt;68,5</b>
PC-OBn-Ser-Me	742,3	7,81	25	30,0
PC-L-Tyr-Et	177,1	7,81	25	7,2
PZA	9619,1*	<3,91	<31,8	302,9

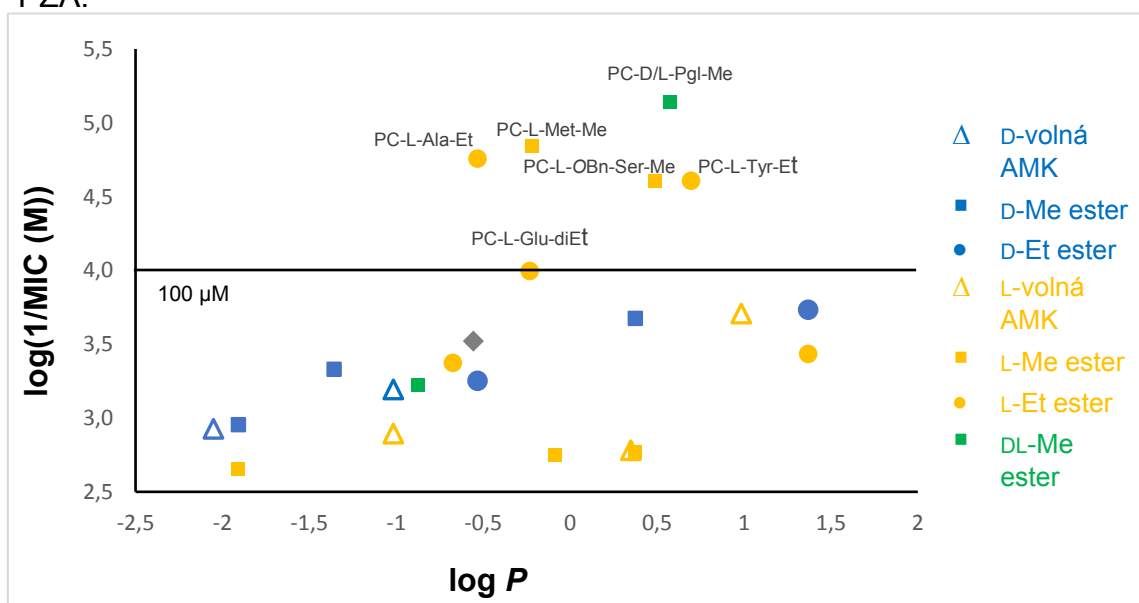
\* převedeno na μM na základě literární hodnoty 1184,3 ± 120,2 μg/ml<sup>48</sup>.

## 4. Diskuze

Cílem mé práce bylo zjistit možnou antimikrobní aktivitu a její závislost na vlastnostech sloučenin.

Jak již jsem psala na začátku, tato diplomová práce je součástí výzkumu, který se zabývá syntézou nových potenciálně aktivních antituberkulotik. Na základě výsledků výzkumu byl publikován článek: *N-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents – The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers*,<sup>47</sup> (<https://doi.org/10.3390/molecules25071518>) ve kterém jsou uvedeny nejen sloučeniny, popsané v této diplomové práci, ale i další, které byly v rámci výzkumu připraveny

Naše připravené sloučeniny by mohly účinkovat jako proléčiva uvolňujících POA, proto bylo k testování antimykobakteriální aktivity použito mírně kyselé pH (konkrétně pH 6,0), které je vyžadované pro účinek PZA/POA. Výsledky byly porovnány s aktivitou v běžně používaném pH 6,6. Podle zjištěných hodnot, které jsou uvedeny v **tab. 3** a v **tab. 4** je vliv pH na aktivitu podstatný. U všech sloučenin, které byly aktivní při pH 6, bylo pozorováno významné snížení hodnoty MIC (oproti měření při pH 6,6). Jelikož účinek pH na aktivitu u ostatních kmenů byl mnohem méně výrazný, podobně jako u PZA, mohlo by to naznačovat stejný mechanismus účinku jako PZA.



Graf 1 Závislost antimykobakteriální aktivity na lipofilitě.



Důležitou vlastností, která má vliv na aktivitu našich sloučenin je lipofilita. Mykobakteriální membrána obsahuje vysoké množství lipidů <sup>2</sup>, tudíž se očekávala vyšší aktivita u lipofilních sloučenin, díky lepšímu pronikání skrz membránu. Tato domněnka se nám potvrdila. Závislost aktivity na lipofilitě ukazuje **graf 1**.

Celkově z derivátů stejných AMK byly nejméně aktivní deriváty s volnou karboxylovou skupinou, dále methylestery a jako neúčinnější se ukázaly ethylestery, což lze připsat jejich vyšší lipofilitě oproti volným AMK a methylesterům. Jako konkrétní příklad jsou v **tab. 6** uvedeny deriváty alaninu. Rozdíl lze pozorovat u volné kyseliny PC-L-Ala a ethylesteru PC-L-Ala-Et, hodnota MIC je u esteru asi 64× nižší, než u volné AMK a hodnota log P se liší přibližně o 0,5.

**Tab. 6** Hodnoty MIC a log P derivátů Alaninu

Kód látky	MIC <i>M. tbc</i> H37Ra (µg/ml)	Log P
<b>PC-D-Ala</b>	≥125	-1,0155
<b>PC-L-Ala</b>	≥250	-1,0155
<b>PC-DL-Ala-Me</b>	≥125	-0,8725
<b>PC-D-Ala-Et</b>	≥125	-0,5315
<b>PC-L-Ala-Et</b>	3,91	-0,5315

Z našich výsledků tedy vyplývá, že deriváty s volnými AMK nejsou příliš účinné. U methylesterů můžeme pozorovat významnější aktivitu pouze u více lipofilních sloučenin (PC-L-Met-Me, PC-D/L-Pgl-Me, PC-L-OBn-Ser-Me. Vyšší aktivita byla zaznamenána také u většiny derivátů aromatických AMK. Celkově nejvyšší aktivitu vykazovala sloučenina PC-D/L-Pgl-Me.

Mimo lipofilitu může hrát významnou roli také enzymová substrátová specifita, která byla již u některých mikroorganismů zjištěna. Většina přirozeně se vyskytujících proteinů a peptidů je syntetizována výhradně z L-AMK, ale objevují se i biologické systémy, ve kterých D-AMK hrají důležitou roli <sup>49</sup>. Ve studii publikované roku 1995 byla zkoumána a prokázána substrátová specifita u dipeptidázy produkované *Acinetobacter calcoaceticus* <sup>50</sup>. Na téma allosterické regulace L- a D-aminokyselin u *M. tuberculosis* byla provedena studie

z roku 2016, ve které byly porovnávány L- a D-enantiomery (konkrétně L-Phe, D-Phe, L-Tyr, D-Tyr, L-Trp a D-Trp). V této studii vyšší odpovědi dosahovaly L-enantiomery <sup>49</sup>.

Na **graf 1** lze pozorovat, že i u našich připravených sloučenin jsou více aktivní L-deriváty. To by mohlo znamenat přítomnost specifického cíle uvnitř buňky, nebo vyšší afinitu mykobakteriální amidázy a tím rychlejší hydrolýzu amidové vazby L-izomeru. V **tab. 6** je vidět velký rozdíl v hodnotách MIC u PC-D-Ala-Et a PC-L-Ala-Et. U směsi enantiomerů PC-D/L-Pgl-Me není možné připsat aktivitu konkrétnímu enantiomeru, jelikož ale fenylglycin není přírodní AMK, tak je možné, že je aktivita vázána na oba enantiomery.

Naše výsledky však ukazují, že jsou i případy, kdy je D-enantiomer aktivnější než L-enantiomer. U derivátů PC-D-Trp-Et a PC-L-Trp-Et má nižší hodnotu MIC D-derivát, ačkoliv aktivita není ani u jednoho příliš významná. Dalším případem, kdy má D-derivát vyšší aktivitu je PC-D-OtBu-Thr-Me a PC-L-OtBu-Thr-Me. Zde má D-enantiomer výrazněji nižší hodnoty MIC (62,5 µg/ml oproti ≥500 µg/ml) ačkoliv ani zde to není příliš významná aktivita. Důvody těchto preferencí jsou neznámé.

Výše uvedené výsledky naznačují, že při mírně kyselém pH jsou aktivní spíše lipofilní L-deriváty. Aby se dal tento vztah struktury a účinku potvrdit, je nutné připravit více derivátů se zaměřením na rozdílnost aktivity mezi různými enantiomery stejných esterů a mezi různými estery stejné AMK.

Na závěr lze konstatovat, že nejaktivnějšími sloučeninami (PC-L-Ala-Et, PC-L-Met-Me, PC-D/L-Pgl-Me, PC-L-OBn-Ser-Me, PC-L-Glu-diEt a PC-L-Tyr-Et) jsou lipofilní látky a až na PC-D/L-Pgl-Me jsou to všechno L-enantiomery. Kromě významné aktivity mají sloučeniny PC-L-Ala-Et, PC-D/L-Pgl-Me a PC-L-OBn-Ser-Me také dobrý cytotoxický profil.

## 5. Závěr

V této diplomové práci bylo uvedeno 23 derivátů, které obsahují pyrazinamid a AMK a jejich methyl- nebo ethylestery. Tyto sloučeniny vznikly po přidání AMK k pyrazin-2-karboxylové kyselině a CDI (postup popsán výše). U všech sloučenin bylo provedeno  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ a MS spektrometrie. U pevných látek byly změřeny i teploty tání. Veličina popisující lipofilitu –  $\log P$  byla vypočítána v programu MOE 2019.0101. Všechny tyto připravené látky byly otestovány na antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitu.

Žádná z látek nevykazovala významnou antifungální aktivitu. Antibakteriální aktivita proti *Staphylococcus aureus* byla zaznamenána u derivátu PC-L-O $\beta$ Bu-Thr-Me s hodnotou MIC 31,25  $\mu\text{g/ml}$ . Ostatní látky žádnou další aktivitu nevykazovaly. Hlavní testování bylo zaměřeno na antimykobakteriální aktivitu, kdy byla zaznamenána vysoká aktivita zejména proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. V běžně užívaném pH 6,6 byly sloučeniny inaktivní, významnější hodnoty MIC měl pouze PC-MeAcr. Při mírně kyselém pH 6 vykazovalo vyšší aktivitu šest sloučenin – PC-L-Ala-Et, PC-L-Met-Me, PC-D/L-Pgl-Me, PC-L-OBn-Ser-Me, PC-L-Glu-diEt a PC-L-Tyr-Et.

Celkově lze říci, že všechny deriváty volných AMK byly neaktivní. Dle našich výsledků aktivita byla vázaná na sloučeniny s vyšší lipofilitou a enantiomerní uspořádání – vyšší aktivitu vykazovaly L-deriváty. U aktivních látek byly zjišťovány i cytotoxické účinky, nejlepší cytotoxický profil vykazovaly látky PC-L-Ala-Et, PC-D/L-Pgl-Me a PC-L-OBn-Ser-Me. Tyto látky by se tak mohly stát předmětem dalšího výzkumu.

## 6. Použitá literatura

1. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2019. Executive summary. 2019* [online]. Dostupné z: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/tb19\\_Exec\\_Sum\\_12Nov2019.pdf?ua=1](https://www.who.int/tb/publications/global_report/tb19_Exec_Sum_12Nov2019.pdf?ua=1) [09-03-2020].
2. Kolek, V.; Kašák, V., et al. *Pneumologie: vybrané kapitoly pro praxi*. Maxdorf, Praha 2010. p.423, ISBN: 978-80-7345-220-9.
3. .Lékaři bez hranic. *Tuberkulóza. 2017* [online]. Dostupné z: <https://www.lekari-bez-hranic.cz/tuberkuloza> [10-03-2020].
4. Kolek, V., et al. *Doporučené postupy v pneumologii. 3. aktualizované vydání*. Maxdorf, Praha 2019. p. 627, ISBN: 978-80-7345-624.
5. Vašáková, M., *Moderní farmakoterapie v pneumologii*. Maxdorf, Praha 2013. p.470, ISBN: 978-80-7345-351-0.
6. Klener, P., et al. *Vnitřní lékařství. Čtvrté, přepracované a doplněné vydání*. Galén, Praha 2011. p.1174, ISBN: 978-80-7262-705-9.
7. ÚZIS ČR. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2018. ÚZIS 2019* [online]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008271/tbc2018-cz-a2b.pdf> [03-03-2020].
8. Homolka, J., *Tuberkulóza*. Karolinum, 2016. p. 74, ISBN: 978-80-246-3476-0.
9. Katzung, B. G., *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th Edition. McGraw-Hill Education, New York 2018. p.1250, ISBN: 978-1-260-28817-9.
10. Švihovec, J., *Farmakologie*. Grada, Praha 2018. p. 1008, ISBN: 978-80-247-5558-8.
11. Hynie, S., *Farmakologie v kostce*. Triton, Praha 2001, p. 520, ISBN: 80-7254-181-1.

12. Lüllmann, H.; Mohr, K., Hein, L., *Barevný atlas farmakologie*. Překlad 4. anglického, zcela přepracovaného a rozšířeného vydání. Grada, Praha 2012. p.384, ISBN: 978-80-247-3908-3.
13. Lochmann, O., *Nežádoucí účinky antiinfekčních léčiv*. Triton, Praha, 2008. p. 243, ISBN: 978-80-7387-073-7.
14. Hartl, J., et al. *Farmaceutická chemie IV*. Karolinum, Praha 2012. p.166, ISBN: 978-80-246-2129-6.
15. Souček, M., et al. *Vnitřní lékařství*. Grada, Praha 2011. p. 1788, ISBN: 978-80-247-2110-1.
16. Zheng, J.; Rubin, E.J.; Bifani, P.; et al. *para*-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288(32), 23447-23456, doi: 10.1074/jbc.M113.475798.
17. Martínková, J., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2.*, zcela přepracované a doplnění vydání. Grada, Praha 2018. p. 520, ISBN: 978-80-247-4157-4.
18. Ouchi, Y.; Mukai, T.; Koide, K.; Yamaguchi, T.; et al. WQ-3810: A new fluoroquinolone with a high potential against fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2020**, 120, doi: 10.1016/j.tube.2019.101891.
19. SÚKL, *Fluorochinolonová antibiotika - omezení používání potvrzeno*. 2018 [online]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/fluorochinolonova-antibiotika-omezeni-pouzivani-potvrzeno> [08-04-2020].
20. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J. Exp. Med.* **2007**, 204(1), 73–78, doi:10.1084/jem.20062100.
21. Capreomycin. *Tuberculosis* **2008**, 88(2), 89-91, doi: 10.1016/S1472-9792(08)70004-0.
22. Kumar, B.; Sharma, D.; Sharma, P.; Katoch, V. M.; Venkatesan, K.; Bisht, D. Proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to

- kanamycin and amikacin. *J. Proteomics* **2013**, 94, 68-77, doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.025.
23. Cohen, J.; Opal, S. M.; Powderly, W. G. *Infectious Diseases*. 4th Edition. Elsevier 2017. p. 2016, ISBN: 978-0-7020-6285-8.
24. Tiberi, S.; Munoz-Torrico, M.; Duarte, R.; et al. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonology* **2018**, 24(2), 86-98, doi: 10.1016/j.rppnen.2017.10.009.
25. McKenna, L., *The Tuberculosis Treatment Pipeline*. Treatment Action Group 2019 [online]. Dostupné z: [https://www.treatmentactiongroup.org/wp-content/uploads/2019/12/pipeline\\_tb\\_treatment\\_lm\\_final.pdf](https://www.treatmentactiongroup.org/wp-content/uploads/2019/12/pipeline_tb_treatment_lm_final.pdf) [11-04-2020].
26. Yeager, R.; Munroe, W.; Dessau, F. Pyrazinamide (Aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* **1952**, 65, 511-518.
27. Vašáková, M.; Hricíková, I.; Kopecká, E. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. *Remédia* **2016**, 26(3), 236-241.
28. Fox, W.; Ellard, G. A.; Mitchison, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **1999**, 3 (10), 231-279.
29. Stehr, M.; Elamin, A. A.; Singh, M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2015**, 13(5), 593-603, doi: 10.1586/14787210.2015.1021784.
30. Zhang, Y.; Shi, W.; Zhang, W.; Mitchison, D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol Spectr.* **2014**, 2(4): MGM2-0023-2013, doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.
31. Scorpio, A.; Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/ nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **1996**, 2(6), 662-667, doi: 10.1038/nm0696-662.

32. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol* **1999**, 181(7), 2044-2049.
33. Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, 52(5), 790–795, doi: 10.1093/jac/dkg446.
34. Zimic, M.; Fuentes, P.; Gilman, R. H.; Gutiérrez, A. H.; Kirwan, D.; Sheen, P. Pyrazinoic acid efflux rate in *Mycobacterium tuberculosis* is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*, **2012**, 92(1), 84–91, doi:10.1016/j.tube.2011.09.002.
35. Elad, N.; Baron, S.; Peleg, Y. et al. Structure of Type-I *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase at 3.3 Å resolution. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 3886, doi: 10.1038/s41467-018-06440-6.
36. Ngo, S. C.; Zimhony, O.; Chung, W. J.; Sayahi, H.; Jacobs, W. R. Jr; Welch, J. T. Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 2430–2435, doi: 10.1128/AAC.01458-06.
37. Sayahi, H.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R., Jr.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21(16), 4804-4807, doi:10.1016/j.bmcl.2011.06.055.
38. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Ruan, H.; Barry, C. E. 3rd; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2011**, 333, 1630–1632, doi: 10.1126/science.1208813.
39. Keiler, K. C., Biology of trans-translation. *Annu. Rev. Microbiol.* **2008**, 62, 133–151, doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162948.
40. Shi, W.; Chen, J.; Feng, J.; Cui, P.; Zhang, S.; Weng, X.; Zhang, W.; Zhang, Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, 3, 58, doi: 10.1038/emi.2014.61.

41. Zhang, S.; Chen, J.; Shi, W.; Liu, W.; Zhang, W.; Zhang, Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect.* **2013**, *2*, 34, doi: 10.1038/emi.2013.38.
42. Kim, H.; Shibayama, K.; Rimbara, E.; Mori, S. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLoS ONE* **2014**, *9*(6), e100062, doi: 10.1371/journal.pone.0100062.
43. Votava, M., et al., *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Neptun, Brno 2010. p. 495, ISBN: 978-80-86850-04-8.
44. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Reference protocol for MIC determination of anti-tuberculous agents against isolates of the Mycobacterium tuberculosis complex in Middlebrook 7H9 broth*. 2019 [online]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Mycobacteria/Methods\\_in\\_AMST/Technical\\_protocol\\_AMST\\_MIC\\_reference\\_method\\_190719.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Mycobacteria/Methods_in_AMST/Technical_protocol_AMST_MIC_reference_method_190719.pdf) [20.03.2020].
45. Buttke, T. M.; McCubrey, J. A.; Owen, T. C. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J. Immunol. Methods* **1993**, *157*, 233-240.
46. Celis, J. E., *Cell biology: a laboratory handbook. 3th edition*. Elsevier Academic, Oxford 2006. p. 2338, ISBN: 978-0-12-164730-8.
47. Juhás, M.; Kučerová, L.; Horáček, O.; Jandourek, O.; Kubíček, V.; Konečná, K.; Kučera, R.; Bárta, P.; Janoušek, J.; Paterová, P.; Kuneš, J.; Doležal, M.; Zitko, J. N-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents — The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules* **2020**, *25*, 1518, doi: 10.3390/molecules25071518.
48. Shih, T. Y.; Pai, C. Y.; Yang, P.; Chang, W. L.; Wang, N. C.; Hu, O. Y. A Novel Mechanism Underlies the Hepatotoxicity of Pyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 1685-1690, doi: 10.1128/AAC.01866-12.
49. Reichau, S.; Blackmore, N. J.; Jiao, W.; Parker, E. J. Probing the Sophisticated Synergistic Allosteric Regulation of Aromatic Amino Acid



Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* Using D-Amino Acids. *PLoS One* **2016**, 11, e0152723, doi: 10.1371/journal.pone.0152723.

50. Adachi, H.; Tsujimoto, M. Cloning and Expression of Dipeptidase from *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 23055, *J. Biochem.* **1995**, 118, 555–561, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124945.