

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ PYRAZINU JAKO
POTENCIÁLNÍCH ANTITUBERKULOTIK**

(studium vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou)

Disertační práce

Mgr. Lucia SEMELKOVÁ

Studijní obor: Farmaceutická chemie
Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Konzultant: PharmDr. Jan Zítko, Ph.D.

Hradec Králové

Červen 2017

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. 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, červen 2017

.....

Mgr. Lucia Semelková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému školiteli prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi PharmDr. Jan Zitkovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady v průběhu celého mého doktorského studia, za pomoc při praktické části a rady při přípravě publikací a této disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za spolupráci při řešení dílčích výzkumných úkolů a pomoc při tvorbě publikací. Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření a pomoc při interpretaci NMR spekter, Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za měření lipofility a pK_a látek. Dále pak paní Věnceslavě Hronové za měření elementární analýzy a paní Ivě Vencovské za změření IČ spekter.

Chtěla bych také poděkovat osobám podílejících se na biologickém testování. Za provedení testování antimykobakteriální aktivity doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., MUDr. Pavle Paterové a paní Silvě Čermákové z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Na testování antibakteriální a antifungální aktivity se podíleli paní Ida Dufková, RNDr. Klára Konečná, Ph.D. a PharmDr. Petr Jílek, CSc. z Katedry biologických a lékařských věd. Dále bych chtěla poděkovat svému kolegovi PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za spolupráci při testování antimykobakteriální aktivity vůči rychle rostoucím mykobakteriálním kmenům. Mé díky také patří Mgr. Lucii Navrátilové a doc. PharmDr. Františku Trejtnarovi, CSc. z Katedry farmakologie a toxikologie za stanovení cytotoxicity připravených aktivních látek.

Na závěr bych ráda poděkovala mé rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory následujících grantů a projektů:
Grant GAUK 1594214 B-CH/FaF,
Grant GAUK 710312 B-CH/FaF,
Grant SVV 260 401,
Grant IGA NZ 13346,
Projekt FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194,
Projekt TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	Acyl Carrier Protein
AK	aminokyseliny
AQs	deriváty 4-aminochinolon piperidinu
Arg	arginin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
Bac	bacitracin
BTO	benzothiazhol- <i>N</i> -oxid
BTZ	deriváty benzothiazinu
cBT	6-methyl-7-nitro-5-(trifluormethyl)-1,3-benzothiazoly
CCM	Czech Collection of Microorganisms; Česká sbírka mikroorganismů
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CNCTC	Czech National Collection of Type Cultures; Česká národní sbírka typových kultur
CoA	koenzym A
Cys	cystein
DCMU	3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-demethylurea
Ddn	deazaflavin dependentní nitro-reduktasa
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNBs	dinitrobenzamidy
DPA	dekaprenyl-fosfo-arabiosa
DPR	dekaprenyl-fosfo-ribosa
DprE1	dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa oxidasa
DprE2	dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa-2-epimerasa
DPX	dekaprenyl-fosfo-2'-keto-D-arabiosa
EMA	European Medicines Agency; Evropská léková agentura
EMB	ethambutol
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH ₂	flavinadenindinukleotid (redukována forma)

FAS I	Fatty Acid Synthase I; synthasa mastných kyselin I
FAS II	Fatty Acid Synthase II; synthasa mastných kyselin II
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro potraviny a léky (USA)
G+	Gram pozitivní bakterie
G-	Gram negativní bakterie
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
HeLA	buněčná linie izolovaná z epitelálních buněk maligního karcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie izolovaná z lidského hepatocelulárního karcinomu
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% pokles aktivity vůči kontrole
INH	isoniazid
InhA	enoyl-ACP-reduktasa
KasA	beta-ketoacyl ACP synthasa
KatG	katalasa-peroxidasa
LE	Ligand Efficiency; efektivnost ligandu
Lys	lysin
MA	Mycolic acids; mykolové kyseliny
MABA	Microplate Almar Blue Assay; metodika testování antimykobakteriální aktivity
mAGP	mykolyt-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex
MDR-TB	Multi-drug resistant tuberculosis; multirezistentní tuberkulóza
Met	methionin
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MW	mikrovlnné záření
NAD+	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NAT	<i>N</i> -arylaminoacetyltransferasa
Neom	neomycin

PanD	aspartát dekarboxylasa
PDB	Protein data bank
Pen	penicilin V
PET	Photosynthetic Electron Transport; fotosyntetický elektronový transport
Phe	fenylalanin
PncA	pyrazinamidasa/nikotinamidasa
POA	pyrazinkarboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RpsA	ribosomální protein S1
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RR-TB	Rifampicin resistant tuberculosis; rifampicin rezistentní tuberkulóza
SAR	Structure-Activity Relationships; vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou
SI	index selektivity; parametr používaný pro určení bezpečnosti léčiva
STD-NMR	Saturation-Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance; rozdíl v přenosu saturace nukleární magnetická rezonance
TBC	tuberkulóza
TCA	triklosan
TDM	trehalose-6,6'-dimykolát
TEA	triethylamin
TLC	Thin Layer Chromatography; tenkovrstvá chromatografie
tmRNA	transferová-mediátorová ribonukleová kyselina
Tyr	tyrosin
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací České republiky
Val	valin
Vero	buněčná linie izolovaná z opičích ledvin
WHO	World Health Organization; Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	Extensively drug resistant tuberculosis; extenzivně rezistentní tuberkulóza

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Kandidát: Mgr. Lucia Semelková
Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Konzultant: PharmDr. Jan Zítka, Ph.D.
Název dizertační práce: Příprava derivátů pyrazinu jako potenciálních antituberkulotik (studium vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou)

Disertační práce se zabývá hledáním nových derivátů pyrazinamidu s potenciální antituberkulotickou aktivitou. Teoretická část práce shrnuje problematiku tuberkulózy a její epidemiologickou situaci spolu s faktory (rezistence a HIV koinfekce), které komplikují terapii tuberkulózy. Dále je uveden stručný přehled používaných antituberkulotik, které se používají v současných terapeutických režimech. Samostatná kapitola je věnována antituberkulotiku první linie – pyrazinamidu, který je ústřední sloučeninou celé práce, a jeho možným mechanismům účinků.

V praktické části je popisována příprava a vyhodnocení biologické aktivity 112 derivátů pyrazinamidu, které jsou modifikovány v amidové části molekuly a v poloze 3 pyrazinového jádra. První dvě série byly odvozeny od *N*-substituovaných 3-chlorpyrazin-2-karboxamidů, třetí série zahrnuje 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny a odvozené estery a čtvrtá série sestává z *N*-substituovaných 3-aminopyrazin-2-karboxamidů. Připravené sloučeniny byly *in vitro* testovány na antimykobakteriální aktivitu vůči čtyřem mykobakteriálním kmenům, jmenovitě *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*, *M. avium* a rychle rostoucímu *M. smegmatis*. Jedna látka, 3-((4-nitrofenyl)karbamoyl)pyrazin-2-karboxylová kyselina (série 3), vykázala vysokou antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* (MIC = 1,25 µg/ml; 5 µM). Obvyklá aktivita se pohybovala v rozmezí od 12,5 do 25 µg/ml. V neposlední řadě byly diskutovány vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou.

Všechny látky byly doplňkově otestovány na antibakteriální a antifungální aktivitu. Několik látek, zvláště ze sérií *N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazin-2-karboxamidů a 3-amino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů, prokázalo vysokou antibakteriální aktivitu vůči stafylokokovým kmenům včetně methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus*

(MIC = 1,95–15,62 μ M). 3-Amino-*N*-(4-ethylfenyl) pyrazin-2-karboxamid prokázal vysokou antifungální aktivitu (MIC = 7,81 μ M) vůči *Candida albicans*. Část látek byla také testována na antivirovou a herbicidní aktivitu, ovšem s žádným pozorovaným efektem.

Vybrané látky byly podrobeny *in silico* dockingovým studiím se záměrem navrhnout možný enzymatický cíl působení těchto derivátů. K tomuto studiu byla využita enoyl-ACP reductasa, která je zapojená do biosyntézy mykolových kyselin, a dekaprenylfosforyl- β -D-ribose oxidasa, která je esenciálním enzymem v biosyntéze arabinogalaktanu.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and
Pharmaceutical Analysis
Candidate: Mgr. Lucia Semelková
Supervisor: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Consultant: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.
Title of Doctoral Thesis: Preparation of Pyrazinamide Derivatives as Potential
Antituberculotics (Study of Structure Activity
Relationships)

This doctoral thesis is focused on search for novel pyrazinamide derivatives with potential antitubercular activity. The theoretical part summarizes issues connected with tuberculosis and its epidemiological situation along with factors (resistance and HIV co-infection) that complicate treatment of tuberculosis. A brief overview of antitubercular drugs used in current therapeutic regimens of tuberculosis is outlined. A single chapter is dedicated to pyrazinamide, which belongs to the first-line antitubercular drugs, and its possible mechanisms of action. The last part is focused on potential enzymatic targets of pyrazinamide derivatives.

The practical part describes synthesis and biological evaluation of 112 pyrazinamide derivatives with modifications in amide moiety and position 3 on the pyrazine ring. First two series were derived from *N*-substituted 3-chloropyrazine-2-carboxamides, the third series contains 3-(phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic acids and their esters, and the fourth series consists of *N*-substituted 3-aminopyrazine-2-carboxamides. Prepared compounds were *in vitro* screened for activity against four mycobacterial strains, namely *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*, *M. avium* and fast growing *M. smegmatis*. One compound, 3-((4-nitrophenyl)carbamoyl)pyrazine-2-carboxylic acid (series 3), exerted an excellent antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* (MIC = 1.25 µg/mL; 5 µM). Frequent activity was ranged between 12.5 and 25 µg/mL. The structure-activity relationships were discussed.

All compounds were additionally tested for their antibacterial and antifungal activity. Several compounds, especially from series *N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazine-

2-carboxamides and 3-amino-*N*-phenylpyrazin-2-carboxamides, exerted high antibacterial activity against staphylococcal strains including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MIC = 1.95–15.62 μ M). 3-Amino-*N*-(4-ethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide showed high antifungal activity (MIC = 7.81 μ M) against *Candida albicans*. Some compounds were also tested for their antiviral and herbicidal activity with no observed effect.

Selected compounds were studied using *in silico* docking methods to propose a possible enzymatic target. Used enzymes were enoyl-ACP reductase, which is involved in biosynthesis of mycolic acids, and decaprenylphosphoryl- β -D-ribose oxidase, which is an essential enzyme in arabinogalactan biosynthesis.

OBSAH

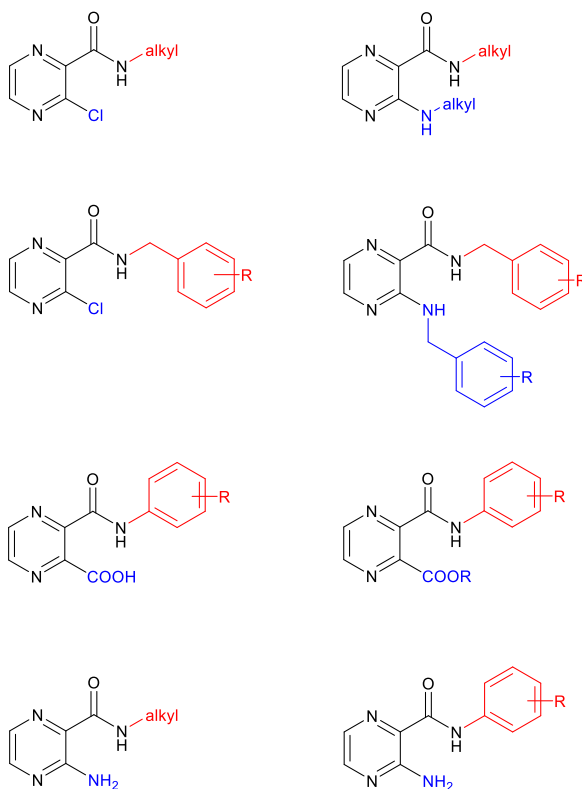
1.	Cíl práce	133
2.	Současný stav poznání	135
2.1.	Tuberkulóza.....	135
2.1.1.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	138
2.2.	Terapie.....	139
2.2.1.	Léčiva první linie.....	140
2.2.2.	Léčiva druhé linie	142
2.2.3.	Nově zavedené látky	143
2.3.	Pyrazinamid.....	145
2.3.1.	Nespecifický mechanismus účinku	145
2.3.2.	Specifický mechanismus účinku	146
2.4.	Potencionální enzymatické cíle derivátů PZA	148
2.4.1.	FAS I	148
2.4.2.	InhA.....	148
2.4.3.	RpsA.....	151
2.4.4.	PanD	152
2.4.5.	DprE1	152
3.	Komentář dosažených výsledků	155
3.1.	Přehled připravených sloučenin	155
3.2.	Syntéza	158
3.3.	Hodnocení biologické aktivity	161
3.3.1.	Antimykobakteriální aktivita.....	161
3.3.2.	SAR	166
3.3.3.	Antibakteriální aktivita.....	167
3.3.4.	Antifungální aktivita.....	169
3.3.5.	Cytotoxicita	170

3.3.6. Antivirová aktivita	170
3.3.7. Herbicidní aktivita	171
3.4. Docking	172
3.4.1. Enoyl-ACP reductasa	172
3.4.2. DprE1	173
4. Závěr.....	175
5. Seznam publikovaných prací	178
6. Seznam použité literatury	181
7. Seznam příloh.....	195

1. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce byla příprava nových derivátů pyrazinu a navázání na dlouholetý výzkum a vývoj potenciálních antituberkulotik odvozených od pyrazinamidu probíhající pod vedením prof. Doležala na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Vedle syntézy látek dosud nepopsaných v literatuře se práce zabývá studiem jejich fyzikálně-chemických vlastností, testováním a vyhodnocováním biologické aktivity.

Disertační práce byla zaměřena na modifikaci struktury pyrazinamidu v poloze 2 (obměna amidové skupiny) a poloze 3 (chlor, amino, alkylamino, benzylamino, karboxy, ester). U připravených látek byla zkoumána antimykobakteriální aktivita a doplňkově také antibakteriální a antifungální aktivita. Část látek byla testována na antivirovou a herbicidní aktivitu. Některé látky byly podrobeny *in silico* dockingovým studiím pro navrzení možného místa působení. Na základě výsledků biologických aktivit byly vyvozeny vztahy mezi strukturou a aktivitou a navrženy další modifikace struktury. Dalším cílem bylo shrnout současný stav problematiky tuberkulózy, terapie a potenciální cílové struktury vhodné pro design dalších pyrazinových derivátů.



2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

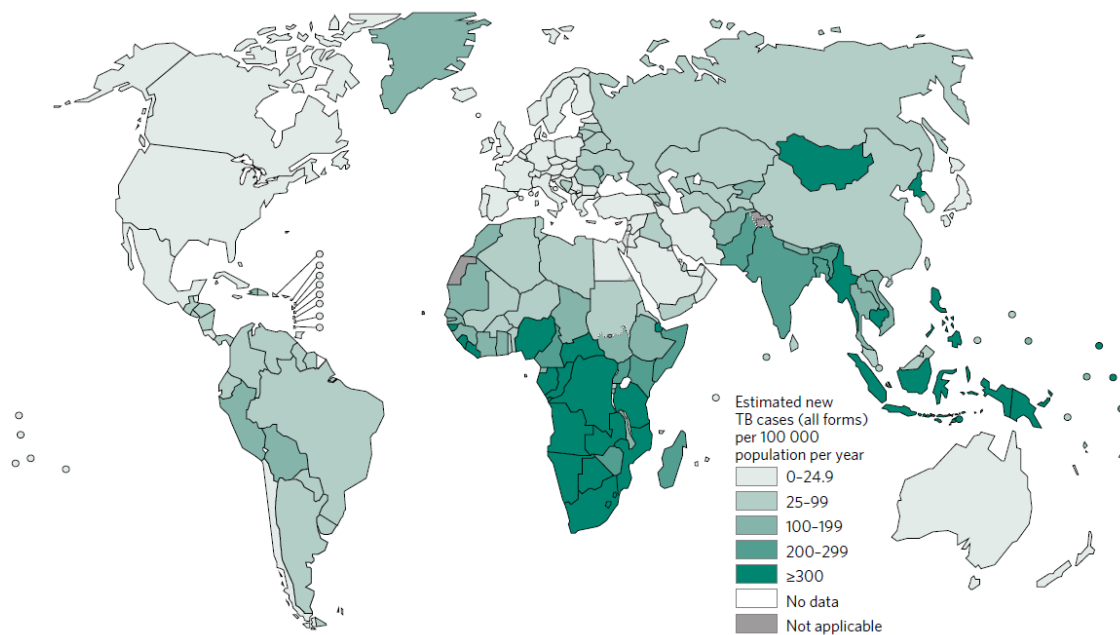
2.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) patří mezi infekční onemocnění způsobené patogeny rodu *Mycobacterium*, tzv. *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Hlavním původcem je především *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), přičemž TBC může způsobovat i *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti* nebo *M. bovis*.¹

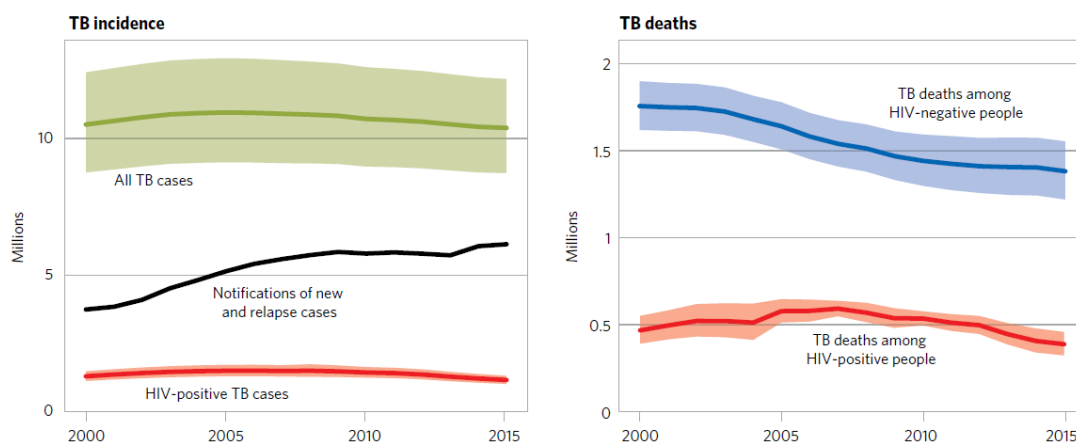
TBC sužuje lidstvo již po celá tisíciletí. Nеспецифické morfolоgické změny odpovídající TBC byly nalezeny v pozůstatcích *Homo erectus* starých přes 500 000 let.² Přesný anatomický a patologický popis nemoci se objevil v 17. století a roku 1882 byl Robertem Kochem označen *Mtb* za původce onemocnění.³

V současnosti je TBC považována za jednu z hlavních globálních hrozeb. Každoročně onemocní kolem 9 milionů obyvatel. V roce 2015 TBC incidence překročila 10 milionovou hranici, kdy bylo odhadováno 10,4 milionů případů, a v důsledku onemocnění zemřelo 1,4 milionů obyvatel. Odhadované zastoupení incidence je znázorněno na **Obrázku 1** a vývoj incidence a mortality představuje **Obrázek 2**. Celkově se TBC řadí na druhé místo v úmrtnosti způsobené infekčním onemocněním (za HIV). Dle údajů shromažďovaných Světovou zdravotnickou organizací (WHO), incidence i mortalita TBC postupně klesá. V roce 2006 byl ustanoven The Global Plan to Stop TB 2006–2015 s jedním z cílů snížit úmrtnost o 50 % oproti roku 1990. Tohoto cíle bylo téměř dosaženo, úmrtnost dle shromážděných dat klesla globálně o 47 %. V roce 2015 byla WHO vytvořena nová strategie The End TB Strategy pro období 2016–2035 s cíli redukovat úmrtnost o 95 % a incidenci o 90 % v porovnání s rokem 2015. Požadovaný vývoj poklesu incidence v porovnání s aktuálním trendem je znázorněn na **Obrázku 3**.⁴

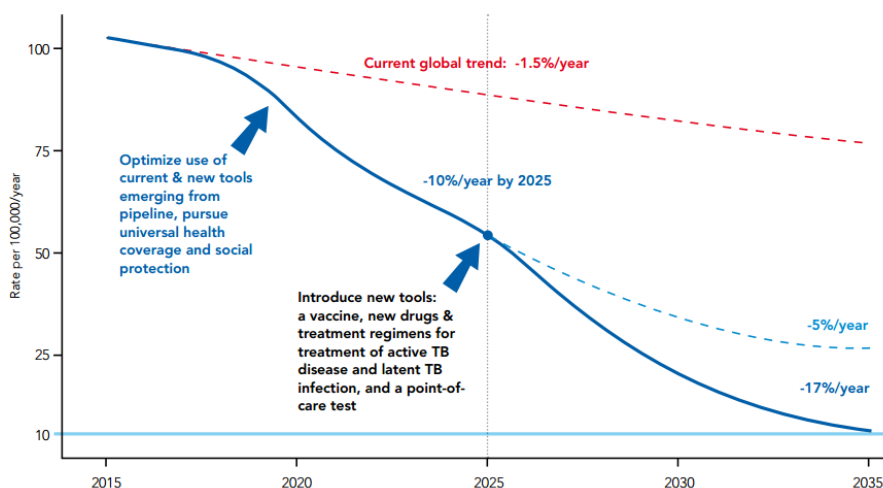
5



Obrázek 1. Odhadovaná incidence onemocnění v roce 2015. Převzato z Global Tuberculosis Report 2016.⁴



Obrázek 2. Odhad celosvětového vývoje případů incidence a mortality v období 2000–2015. Zelenou křivkou je znázorněn odhad celkové incidence, modrou křivkou odhad mortality TBC u HIV-negativních pacientů, černou křivkou oznámení nových případů a relapsů a červenou křivkou incidence či mortality TBC u HIV-pozitivních pacientů. Vystínované oblasti kolem křivek představují intervaly nejistoty. Převzato z Global Tuberculosis Report 2016.⁴



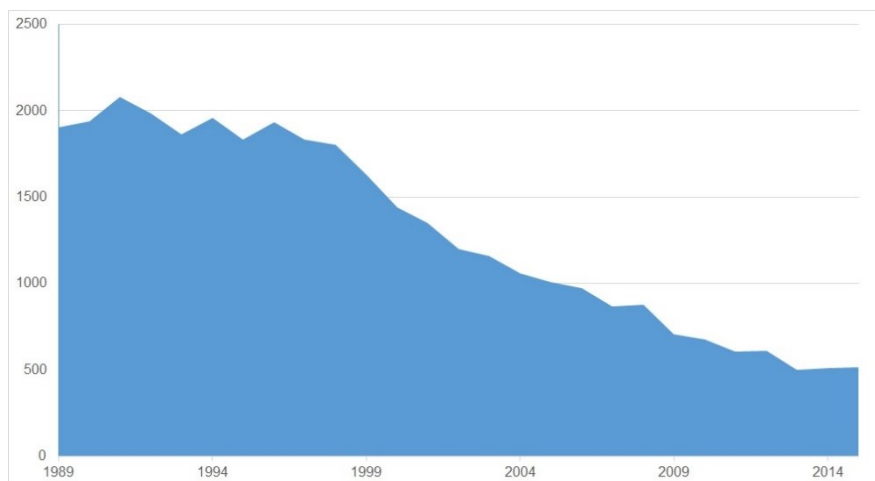
Obrázek 3. Požadovaný pokles incidence k dosažení cíle do roku 2035. Modrá křivka znázorňuje požadovaný pokles, červená aktuální tendenci poklesu. Převzato z The End TB Strategy.⁵

Na zhoršení vývoje výskytu TBC se značně podílí koinfekce s HIV. Oslabená imunita HIV-pozitivních pacientů je důvodem zvýšení pravděpodobnosti rozvoje TBC. V roce 2015 bylo 1,2 milionu případů lidí koinfikovaných HIV, což je 11 % z celkového počtu 10,4 milionů. Nemoci podlehl 0,4 mil HIV koinfikovaných pacientů.⁴

Dalším zásadním problémem je výskyt rezistence vůči používaným léčivům. Největší ohrožení v poslední době představují multirezistentní forma (Multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) a extenzivní léková rezistence (Extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB). O MDR-TB hovoříme v případě, kdy je mykobakteriální kmen rezistentní nejméně vůči isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF). Od roku 2013, kdy došlo k zavedení molekulárního testování detekce rezistence na RIF, se dostává do popředí sledování TBC rezistentní na RIF, označované jako RR-TB, ať už se jedná o monorezistenci, nebo je součástí MDR-TB.⁶ V posledním reportu se tak objevují i data společná pro obě formy rezistence, označováno jako MRD-TB/RR-TB. Odhadovaný počet nových případů MDR-TB v roce 2015 dosahoval výše 480 tisíc pacientů a dalších 100 tisíc případů RR-TB. V tomto roce bylo odhadováno 250 tisíc úmrtí spojených s výskytem MDR-TB/RR-TB. Mezi země s nejčtenějším výskytem MDR-TB/RR-TB řadíme Čínu, Indii a Rusko. XDR-TB kmeny jsou oproti MDR-TB navíc rezistentní vůči přinejmenším jednomu fluorochinolonu a injekčně podávanému antituberkulotiku druhé linie.⁴

V evropském regionu je situace příznivější, výskyt TBC zde tvoří 3 % z celkového odhadovaného počtu. V České republice (ČR) je v posledních třech letech

hlášeno ročně kolem 500 případů. V roce 2015 bylo, dle dat shromážděných Registrem tuberkulózy (publikuje Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR; ÚZIS ČR), nahlášeno celkem 518 onemocnění TBC a 33 úmrtí. MDR-TB byla zjištěna u 10 případů. Dlouhodobě dochází k poklesu hlášených výskytů (**Obrázek 4**) a ČR se mezinárodně řadí k zemím s nízkým výskytem tohoto infekčního onemocnění.⁷



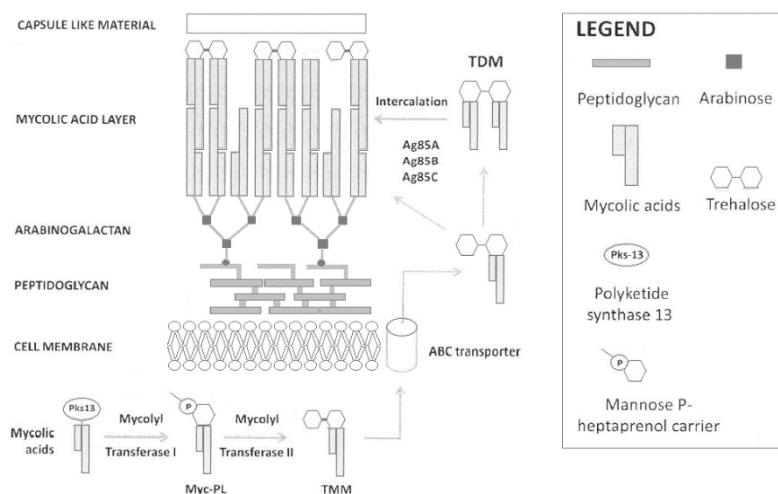
Obrázek 4. Vývojový trend výskytu TBC v ČR v rozmezí let 1989–2015. Zpracováno dle dat publikovaných ÚZIS ČR.⁷

TBC se přenáší kapénkovou infekcí, a proto i nejčastěji postihuje plíce (85–90 %). Může však zasáhnout i jiné orgány, např. urogenitální ústrojí či kosti. Nemoc se nemusí projevit ihned po nákaze, ale mykobakterie může přejít do dormantní formy a přežívat v těle v tomto spícím stavu několik let, než dojde k propuknutí onemocnění. Ke vzplanutí pak nejčastěji dochází za nepříznivých životních podmínek, jako jsou oslabení imunity, vysoký věk, špatné životní a sociální podmínky, alkoholismus nebo přidružené nemoci. Diagnostika zahrnuje anamnestické příznaky, rentgenový nález, bakteriologický či histologický průkaz a nepřímé diagnostické metody. Důležitý krok představuje přesná identifikace kmene a stanovení citlivosti na používaná antituberkulotika.⁸ Příznaky aktivního onemocnění jsou horečka, noční pocení, únava, nechutenství, ztráta váhy a při plicní formě kašel s případným vykašláváním krve.⁹

2.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb je obligátně aerobní, Gram pozitivní (G+), acidorezistentní patogen, který se vyznačuje pomalým růstem (generační doba přibližně 24 h), dormancí a komplexním buněčným obalem.^{10, 11} Tento obal je tvořen cytoplazmatickou membránou, buněčnou stěnou a na ní navazující vrstvou složenou z proteinů a polysacharidů¹², viz **Obrázek 5**.

Nejvýznamnější část celého komplexu tvoří buněčná stěna, která je unikátní svým složením, velice bohatá na lipidy a je jedním z faktorů, které mají zásadní význam při přežívání, odolnosti a virulenci mykobakteria. Buněčná stěna se skládá z mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu (mAGP). Peptidoglykan tvoří propojenou síť, ve které jsou zbytky muramové kyseliny esterifikovány komplexním polysacharidem arabinogalaktanem, který je spojen s mykolovými kyselinami (MA). MA představují důležitou součást buněčné stěny, jsou to α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny s extrémně dlouhým řetězcem, které jsou s délkou alkylového řetězce C₆₀–C₉₀ nejrozsáhlejší v přírodě. Tyto MA jsou syntetizovány dvěma enzymy. ACP-dependentní syntéza mastných kyselin typu I (Fatty Acid Synthase I, FAS I) produkuje MA délky od C₁₆ do C₂₆ a multienzymový komplex CoA-dependentní syntéza mastných kyselin typu II (Fatty Acid Synthase II, FAS II) tyto MA prodlužuje. MA se vyskytují i mimo mAGP komplex, ať už ve volné formě, nebo kovalentně vázané na trehalosu.^{10, 11, 13, 14} Spojením s trehalosou vzniká trehalosa-6,6'-dimykolát (TDM), označovaný jako cord faktor, který se podílí na virulenci mykobakteria.¹⁵



Obrázek 5. Složení mykobakteriální stěny. Převzato z Sgaragli et al.¹¹

2.2. Terapie

K léčbě TBC se využívá látek působících na mykobakteria různými mechanismy. V této kapitole je uveden přehled léčebných režimů TBC, nejčastěji používaných antituberkulotik a látek, které byly pro léčbu schváleny v posledních letech.

Antituberkulotika se nejčastěji rozdělují do dvou tříd. Léčiva první linie jsou součástí základních standardních léčebných postupů pro léčbu nových případů TBC

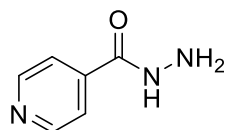
a forem na ně citlivých. Řadíme mezi ně isoniazid (INH), pyrazinamid (PZA), rifampicin (RIF) a ethambutol (EMB). Antituberkulotika druhé linie jsou léčiva, která se využívají při rezistenci na látky z první linie, či při nedostatečné odpovědi pacientů na léčbu. Do této skupiny patří aminoglykosidová antibiotika (streptomycin, amikacin, kanamycin), fluorochinolony (ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin), kyselina *p*-aminosalicylová, ethionamid, cykloserin a kapreomycin.^{16, 17}

Standardním léčivým režimem, doporučeným WHO pro nově nakažené pacienty, je dvouměsíční léčba čtyřkombinací léčiv INH, RIF, PZA, EMB a následně navazující čtyři měsíce užívání INH a RIF. U HIV-pozitivních pacientů je po začátku léčby TBC doporučené zahájení i antiretrovirální léčby v následujících 2–8 týdnech od nasazení antituberkulotik. I u HIV-pozitivních pacientů je doporučovaná délka léčby šest měsíců na základě provedených studií, kdy bylo zjištěno, že prodloužení na osm či více měsíců zvyšuje výskyt nežádoucích účinků a interakcí léčiv.¹⁸

Při léčbě MDR-TB je důležité zjistit citlivost izolátu na používaná antituberkulotika, posoudit celkový zdravotní stav pacienta a sestavit tak odpovídající léčbu. Kombinace by měla obsahovat minimálně čtyři léčiva s pravděpodobnou účinností - fluorochinolon, injekčně podávané léčivo (amikacin, kanamicin nebo kapreomycin) a alespoň další dvě léčiva druhé linie. Může být přidáno léčivo první linie k posílení režimu. V případě, že se objeví toxicita nebo rezistence, přidávají se další léčiva, včetně bedachilinu a delamanidu. Do roku 2016 trvala léčba MDR-TB 20 měsíců. Na základě nových důkazů se doporučená doba léčby zkrátila na 9–12 měsíců pro pacienty s plicní formou, u které nebyla prokázána rezistence na léčiva druhé linie.^{4, 9}

2.2.1. Léčiva první linie

Isoniazid

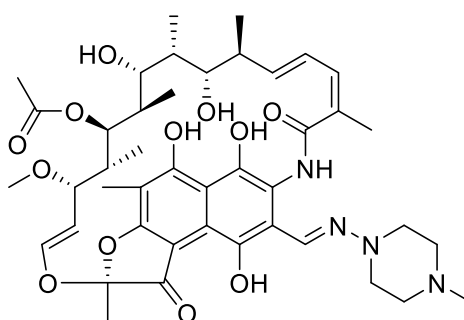


MIC = 0,01-0,2 µg/ml

INH, hydrazid kyseliny isonikotinové, byl do léčby TBC zaveden roku 1952. Je proléčivo, které je aktivováno enzymem katalasou-peroxidasou (KatG). Poté se váže na NADH, s kterým vytvoří komplex INH-NADH.¹⁹ Takto aktivovaný INH inhibuje

syntézu mykolových kyselin prostřednictvím enzymů enoyl acyl carrier protein (ACP) reductasy (InhA) a beta-ketoacyl ACP synthasy (KasA). InhA je součástí multienzymového komplexu FAS II. Antimykobakteriální aktivita, vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), se pohybuje v rozmezí 0,01– 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ¹⁷. Rezistence je způsobena mutací genů kódujících enzymy, které INH ovlivňuje (inhA, kasA), mutací genu katG, kódujícího enzym důležitý pro aktivaci INH, či zvýšenou expresí *N*-arylaminoacetyl transferasy (NAT), která INH biodegraduje.^{19, 20}

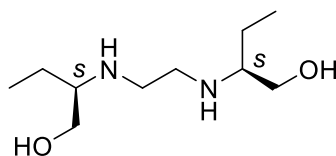
Rifampicin



MIC = 0,05-0,5 $\mu\text{g/ml}$

Antibiotikum ansamycinového původu, používané od roku 1966, vysoce účinné na G⁺ bakterie. Inhibuje prodlužování mRNA vazbou na β -podjednotku RNA polymerasy. MIC v rozmezí 0,05–0,5 $\mu\text{g/ml}$. Rezistenci způsobuje mutace genu rpoB, který kóduje výše zmíněnou polymerasu.^{17, 20, 21}

Ethambutol



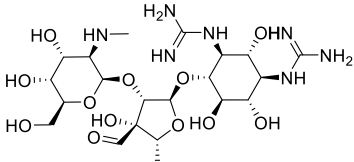
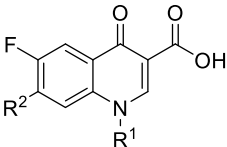
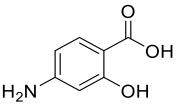
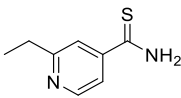
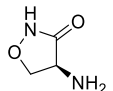
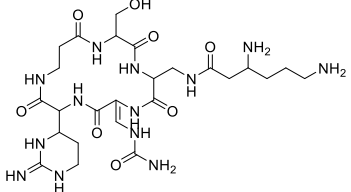
MIC = 1-5 $\mu\text{g/ml}$

Chirální aminoalkohol, aktivní pouze *S,S*-(+)-izomer, používán od roku 1961. Zasahuje do biosyntézy arabinogalaktanu a lipoarabinomannanu v buněčné stěně inhibicí arabinosyl transferasy, což vede ke zvýšené propustnosti buněčné stěny. Hodnoty MIC jsou v rozmezí 1–5 $\mu\text{g/ml}$. Příčinou rezistence je mutace genu embB, který kóduje arabinosyl transferasu.^{17, 22, 23}

2.2.2. Léčiva druhé linie

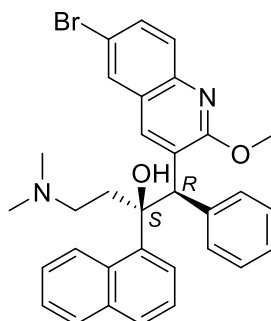
Jak již bylo zmíněno výše, tato skupina je tvořena látkami různých chemických struktur lišících se i místem působení. Přehled léčiv druhé linie je uveden v **Tabulce 1**, spolu s hodnotami MIC a místem účinku.

Tabulka 1. Základní přehled léčiv druhé linie.^{17, 23}

Léčivo	Struktura	MIC [µg/ml]	Mechanismus účinku	Cílová struktura
aminoglykosidová antibiotika	 streptomycin	1–8	Inhibice syntézy proteinů	30S ribosomální podjednotka
fluorochinolony		0,2–4	Inhibice replikace a transkripce DNA	DNA gyrasa
kyselina <i>p</i>- aminosalicylová		1–8	Inhibice syntézy kyseliny listové a metabolismu železa	pravděpodobně dihydropteroát synthasa
ethionamid		0,6–2,5	Inhibice syntézy mykologických kyselin	InhA po převedení na aktivní formu ²⁴
D-cykloserin		5–20	Inhibice biosyntézy peptidoglykanu	D-alanin racemasa
kapreomycin		1,25– 2,5	Inhibice syntézy proteinů	16S ribosomální podjednotka a 23S rRNA

2.2.3. Nově zavedené látky

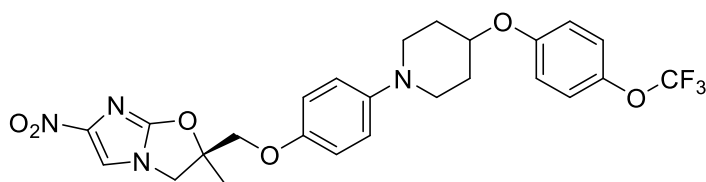
Bedachilin



MIC = 2-60 ng/ml

Diarylchinolin²⁵, koncem roku 2012 prošel zrychleným procesem schválení FDA k léčbě MDR-TB u dospělých pacientů.²⁶ Stal se prvním antituberkulotikem s novým mechanismem účinku za posledních 40 let.²⁷ Díky odlišnému místu působení si zachovává aktivitu vůči izolátům *Mtb*, které jsou rezistentní vůči běžné léčbě a poskytuje tak možnost léčby pacientům s MDR-TB či XDR-TB²⁸, u kterých není možnost efektivní kombinace standardně používaných léčebných režimů. Bedachilin inhibuje protonovou pumpu ATP syntasů, vazbou na její podjednotku c, a vyčerpává tak zásoby energie v buňce.^{16, 26, 29} Hodnoty MIC bedachilinu se pohybují v rozmezí 2–60 ng/ml.^{17, 30} Již před dokončením klinických studií se na bedachilin objevila rezistence, vycházející z mutace *atpE* genu. Nedávné studie poukazují na další mechanismus rezistence způsobený zvýšenou expresí efluxní pumpy.²⁸

Delamanid

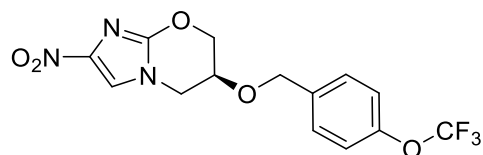


MIC = 6-24 ng/ml

Derivát nitrodihydroimidazooxazolu, který byl v roce 2014 schválen EMA pro léčbu MDR-TB.³¹ Pro samotný účinek je nutná aktivace deazaflavin dependentní nitro-reduktasou (Ddn).³² Ta ho transformuje na primární metabolity, především *des*-nitro

derivát. Při redukci delamanidu dochází k uvolnění oxidu dusnatého, který inhibuje buněčné dýchání působením na cytochrom c oxidasu. Dalším mechanismem účinku je inhibice syntézy mykolových kyselin s dosud neznámým mechanismem.^{28, 33, 34} Antimykobakteriální aktivita se pohybuje v rozmezí MIC = 6–24 ng/ml.^{35, 36}

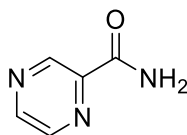
Pretomanid



MIC = 0,015-0,25 µg/ml

Bicycklý nitro-imidazooxazin, který je stejně jako delamanid aktivován Ddn na *des*-nitro metabolity, přičemž dochází k uvolnění oxidu dusnatého. Poté dochází k inhibici buněčného dýchání a syntézy mykolových kyselin.^{28, 37} Aktivita vůči senzitivním i rezistentním kmenům se pohybuje v rozmezí 0,015–0,25 µg/ml.³⁸

2.3. Pyrazinamid



PZA, analog nikotinamidu, patří mezi léčiva první linie a je používán k léčbě TBC od roku 1952. Tvoří důležitou roli v terapii TBC, především z důvodu sterilizačního efektu na semidormantní mykobakterie. V kombinační terapii s INH a RIF pomáhá zkracovat trvání léčby TBC na šest měsíců.^{3, 39}

PZA je proléčivo, které prochází pasivní difúzí do buňky, kde je aktivováno enzymem pyrazinamidasou/nikotinamidasou (PncA) převedením na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA; **Schéma 1**). Mutací genu *pncA* dochází k zablokování konverze PZA/POA a je tak jedním z mechanismů rezistence.^{3, 39}

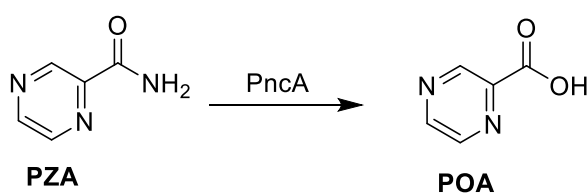


Schéma 1. Aktivace PZA převedením na POA

2.3.1. Nespecifický mechanismus účinku

Po převedení PZA na POA je POA ve formě aniontu z neutrálního prostředí cytoplasmy vyloučena do extracelulárního prostoru. Pokud je vně buňky kyselé prostředí, dochází k protonizaci a vytvoření nenabité molekuly, která může procházet pasivní difúzí opět dovnitř buňky. Zde dochází k opětovnému odloučení protonu a znovu k vyloučení z buňky. Tímto cyklickým opakováním dochází k akumulaci protonů uvnitř mykobakteria. Acidifikace cytoplasmy může vést k energetickému rozvratu buňky a zasažení membránového transportu (**Obrázek 6**).³⁹⁻⁴³ Podmínkou tohoto mechanismu je právě přítomnost kyselého prostředí. V neutrálním a alkalickém prostředí POA zůstává ve formě nabitého aniontu, který nemůže procházet membránou a nedochází tak k akumulaci.^{41, 42}

Nedávno publikovaný výzkum Petersona et. al.⁴⁴ diskutuje vliv pH na tento nespecifický mechanismus účinku PZA/POA. Při tomto experimentu porovnávali POA s prokázanými protonofory (látky přenášející protony přes membránu), ale v porovnání s těmito látkami se POA v kyselém prostředí neprokázala jako dostatečně účinný protonofor pro rozvrat membránového potenciálu.

2.3.2. Specifický mechanismus účinku

Inhibice syntézy mykolových kyselin

Jedním ze dvou enzymů zapojených do syntézy mykolových kyselin je FAS I, jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.1.

Nejprve byl jako inhibitor navržen PZA a jeho derivát 5-chlorpyrazinamid.⁴⁵ Boshof et al.⁴⁶ provedli studii, kde byly látky testovány na izolovaném enzymu, avšak PZA se nepotvrdil jako inhibitor. Následující experimenty prokázaly jako inhibitory i samotnou POA a její *n*-propyl ester.⁴⁷ Konečné potvrzení účinku a objasnění interakcí enzymu s PZA a POA bylo prokázáno až pomocí STD-NMR spektroskopie, která charakterizuje interakce ligand-protein.^{48, 49} Mechanismus účinku PZA spočívá v kompetici s NADPH o vazbu do aktivního místa FAS I. Bylo zjištěno, že POA se váže do jiného místa.⁴⁹

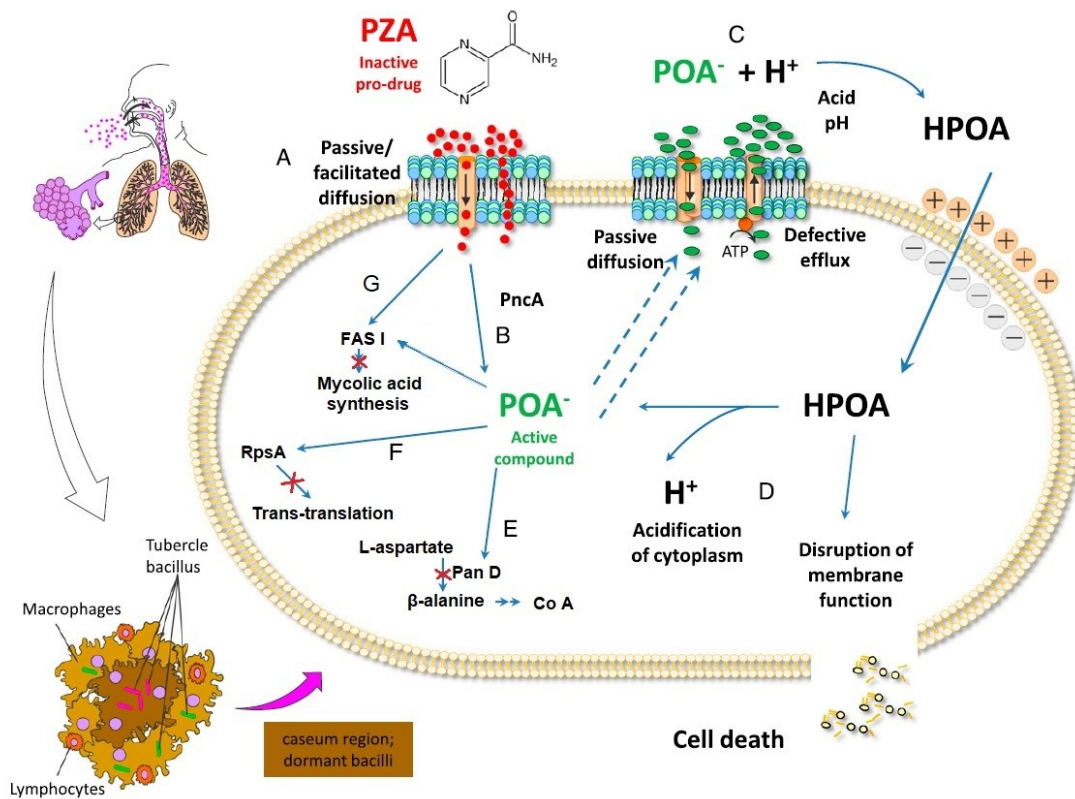
Inhibice trans-translace

Trans-translace je kontrolní proces, který eliminuje chybně vznikající proteiny při translaci. Pokud v procesu translace vznikne defektní protein, celý translační komplex se zastaví a dojde k zablokování ribosomu. Zabránění tvorby, rozklad defektních proteinů a obnovení funkce ribosomu je pro buňku životně důležité při stresových podmínkách, či zotavení z nutričního nedostatku.^{50, 51} Hlavní roli při trans-translaci hraje komplex složený z transfer-messenger RNA (tmRNA), proteinu SmpB, elongačního faktoru Tu a ribosomálního proteinu S1 (RpsA).⁵² Tento komplex dokáže rozpoznat zablokované ribosomy a rozložit je. Po navázání na zablokovaný ribozom, prostřednictvím RpsA, dochází k odpojení a následné degradaci deviantní mRNA. Po uvolnění mRNA se na její místo přesune tmRNA, která na vznikající chybný protein připojí degradační kodon. Po odpojení označeného proteinu dochází k uvolnění ribosomu.^{50, 53} Místem účinku PZA, prostřednictvím POA, byl určen ribosomální protein RpsA.⁵² Bylo zjištěno, že POA

se váže v oblasti C-konce a zabraňuje navázání tmRNA.⁵⁴ Za rezistenci zodpovídá gen rpsA.

Inhibice aspartát dekarboxylasy

Při hledání nových mechanismů rezistence na PZA byla u rezistentních kmenů bez mutací pncA a rpsA detekována mutace genu panD kódujícího aspartát dekarboxylasu (PanD).^{55, 56} PanD je enzym zapojený do syntézy β -alaninu, který je prekurzorem panthotenátu a koenzymu A (CoA). Zásahem do biosyntézy CoA, jakožto centrální molekuly energetického metabolismu buňky, může dojít k odumření buňky z nedostatku energetických zásob.^{55, 57} Předpokládaným vazebným místem pro POA je flexibilní C-konec enzymu.⁵⁷



Obrázek 6. Mechanismy účinku PZA/POA. A) Membránový transport PZA; B) Konverze PZA na POA⁻; C) Převedení POA⁻ na HPOA v kyselém prostředí; D) Přestup HPOA do mykobakteria, acidifikace cytoplasmu a rozvrat membránového potenciálu a transportu; E) Inhibice biosyntézy koenzymu A; F) Inhibice trans-translace; G) Inhibice syntézy mykolových kyselin. Upraveno dle Miotto et al.⁵⁸

2.4. Potencionální enzymatické cíle derivátů PZA

Ačkoliv je PZA používán v léčbě TBC více jak šedesát let, stále není znám přesný mechanismus účinku. Postupem času bylo navrženo několik možných míst působení PZA, jak bylo uvedeno výše. Nalezené enzymatické či proteinové cílové struktury jsou v dnešní době velice perspektivní pro přístup racionálního navrhování a modifikace struktur, které přímo cílí na daný enzym/protein.

2.4.1. FAS I

FAS I je enzym zapojený do syntézy MA s krátkým řetězcem (C_{16} – C_{26}), který je inhibovaný PZA prostřednictvím kompetice s NADH o navázání do aktivního místa. Na rozdíl od FAS II, která je tvořena komplexem jednotlivých enzymů, FAS I jako multi-doménový enzym zastává všechny kroky vedoucí k syntéze MA a obsahuje tak několik aktivních míst.⁵⁹ Konečné potvrzení vlivu PZA a POA na tento enzym bylo provedeno pomocí STD-NMR spektroskopie. Od té doby probíhaly experimenty, které by určily přesnou strukturu mykobakteriální FAS I, aby mohl probíhat vývoj potencionálních inhibitorů tohoto enzymu. Cicarelli et. al.⁶⁰ provedli kryo-elektronovou mikroskopii (cryo-EM), která odhalila porézní barelovou strukturu s výraznou konformační variabilitou, avšak s nízkým rozlišením. I přes další pokusy o detailnější objasnění struktury, doposud není k dispozici krystalografická struktura dostatečné kvality, která by mohla být použita k *in silico* dockingovým studiím.

2.4.2. InhA

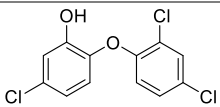
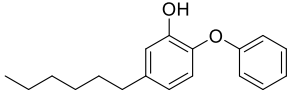
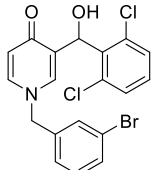
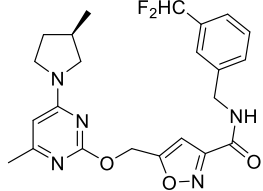
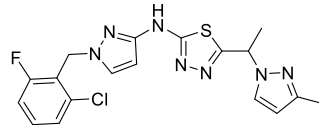
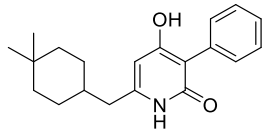
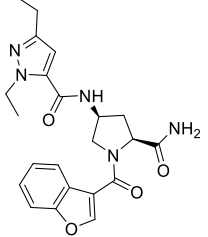
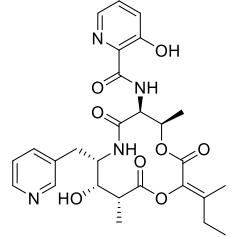
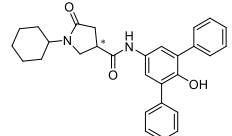
InhA, enoyl-ACP reduktasa, je součástí multienzymového komplexu FAS II, který se podílí na syntéze MA prodlužováním řetězce do délky C_{60} – C_{90} . InhA katalyzuje poslední krok cyklu prodlužování mastných kyselin, kterým je redukce dvojně vazby enoyl meziprojektu. V každém tomto cyklu dochází k prodlužování o dvou uhlíkový fragment, jehož zdrojem je malonyl-ACP. Klíčovými aminokyselinovými zbytky pro katalytickou aktivitu jsou Tyr158 a Lys165.⁶¹ Lys165 stabilizuje NADH prostřednictvím *H*-můstku k 2'-OH skupině ribosy v nikotinamidové části NADH. Hydrid z NADH je přenesen na C-3 uhlík dvojně vazby C2–C3 enoyl substrátu, přičemž se vytvoří enolát na C-1. C-1 následně přijme vodík z Tyr158 a dojde k vytvoření enolu, který tautomerizuje na konečný produkt.^{59,62} Zablokování aktivity InhA vede ke ztrátě integrity

buněčné stěny a v důsledku k buněčné smrti. Protože InhA zastává stěžejní roli v cyklu prodlužování MA, je považován za slibnou cílovou strukturu nových antituberkulotik.⁶²

Na rozdíl od bakteriálních enoyl-ACP reduktas má InhA prostornější a hlubší vazebnou kavitu, což je dáno schopností syntetizovat MA s extrémně dlouhým řetězcem. Vazebná smyčka, která formuje vazebné místo, se uspořádává po navázání substrátu. Z toho důvodu jsou v Protein Data Bank (PDB) databázi k dispozici uzavřená, polo-otevřená a otevřená forma InhA.^{59, 62} Většina inhibitorů InhA obsahuje ve své struktuře elektronegativní skupinu, která vytváří stěžejní *H*-můstek s hydroxylem Tyr158 a 2'-hydroxylovou skupinou ribosy NADH. Tyto interakce byly považovány za typické pro InhA inhibitory. Tato skupina inhibitorů je označována jako „Tyr158-in“ inhibitory, kdy je hydroxylová skupina Tyr158 orientována směrem k inhibitoru (tzv. „Tyr158-in“ konformace). Mezi tyto inhibitory patří triklosan (TCA), jeho deriváty, pyrrolidin karboxamidy a 4-hydroxy-2-pyridony.^{59, 63} Později došlo k objevu látek, které se váží odlišně. Mezi tyto tzv. „Tyr158-out“ inhibitory⁶⁴ řadíme deriváty thiadiazolu a prolinu. Při „Tyr158-out“ konformaci je Tyr158 orientován směrem od inhibitoru a nedochází tak k tvorbě *H*-můstku, ale inhibitory tvoří van der Waalsovy interakce. Thiadiazolový kruh interaguje s postranním řetězcem Met103, zatímco navázaný sekundární amin tvoří *H*-můstek s Met98. Inhibitor přírodního původu, pyridomycin, působí jako přímý kompetitivní inhibitor NADH.⁶⁵ Z krystalové struktury bylo potvrzeno, že se váže do vazebného místa pro NADH, a zároveň interaguje s AK zbytky ve vazebném místě substrátu.^{62, 66} V **Tabulce 2** jsou uvedeny strukturní typy inhibitorů InhA a dostupné hodnoty aktivit vůči izolovanému enzymu (IC₅₀) či *Mtb* (MIC).

Dříve připravené 5- a 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy⁶⁷ a 3-benzylaminopyrazin-2-karboxamidy⁶⁸ byly na základě jistých strukturních podobností s potvrzenými inhibitory InhA podrobeny *in silico* dockingu na InhA. Studované látky vykazaly interakce typické pro „Tyr158-in“ inhibitory a InhA byla tak navržena jako potenciální místo účinku těchto derivátů.

Tabulka 2. Přehled strukturních typů inhibitorů InhA a aktivity vybraných zástupců. Aktivita vyjádřena IC₅₀ na izolovaném enzymu a MIC vůči *Mtb.*^{59, 63, 66}

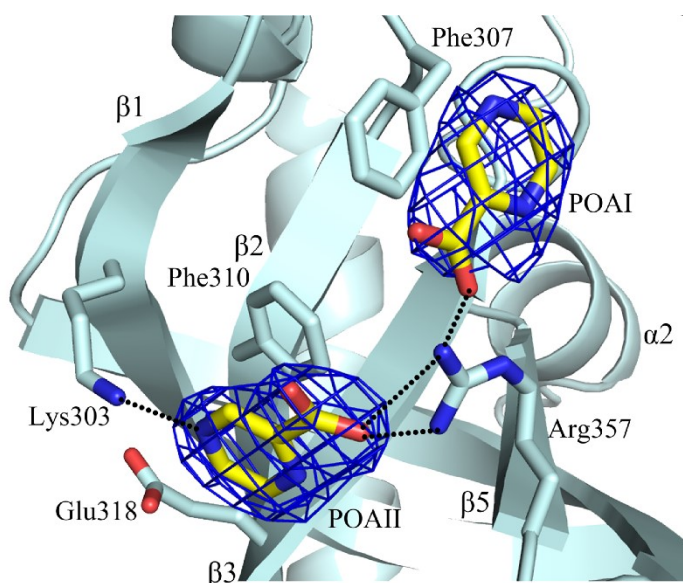
Látka	Struktura	IC ₅₀	MIC
TCA		1000 ± 100 nM	12,5 µg/ml (43 µM)
deriváty TCA 6PP		11 ± 1 nM	2,1 µg/ml
deriváty pyridonu		-	2 µg/ml
isoxazol-3- karboxamidy		0,3 nM	0,2 µM
thiadiazoly		2 nM	0,4 µM
4-hydroxy-2- pyridony		570 ± 40 nM	0,02 µg/ml (0,05 µM)
deriváty prolinu		4 nM	0,5 µM
pyridomycin		-	0,31–0,63 µg/ml
pyrrolidin karboxamidy p64b		62 nM	-

2.4.3. RpsA

Poté, co byl RpsA identifikován jako cíl PZA/POA, byla na základě biochemických studií provedených Shi et. al.⁵² navržena oblast jeho C-konce jako vazebné místo. Přesto byly detaily interakce POA s RpsA neznámé. K odhalení vazebných interakcí a přesné pozice vazebného místa došlo pár let poté, co se Yang et. al.⁶⁹ podařilo vytvořit krystalografickou strukturu RpsA proteinu s navázanou POA.

Protein RpsA je tvořen čtyřmi S1 doménami a dalšími přibližně 100 AK ve flexibilním C-konci, který je charakteristický pro kmen aktinomycet, jehož součástí je i rod *Mycobacterium*. Na základě krystalické struktury bylo odhaleno, že do RpsA se váží dvě molekuly POA (**Obrázek 7**). POA tvoří s S1 doménou hydrofobní interakce a *H*-můstky, které jsou zprostředkovány především Phe307, Phe310 a Arg357 ve vazebném místě RNA. V případě POA 1 pyrazinové jádro vytváří π - π interakci s Phe307, přičemž karboxylový kyslík se váže *H*-můstkem k guanidinové skupině Arg357. Podobně vytváří pyrazinové jádro POA 2 π - π interakci s Phe310 a karboxylový kyslík se opět váže k Arg357 stejným způsobem jako POA 1. POA 2 navíc vytváří *H*-můstek mezi N-4 a Lys303 a C-5 a C-6 pyrazinového jádra interagují s methylenovými skupinami Glu318 prostřednictvím hydrofobního kontaktu.⁶⁹

Na základě této krystalografické struktury Yang et. al.⁶⁹ navrhuji možné strukturální modifikace POA. Jelikož samotná POA je vůči *Mtb* neúčinná kvůli nízké schopnosti procházet mykobakteriální buněčnou stěnou bohatou na lipidy, nabízí se zde zavedení lipofilního substituentu, který by průnik do mykobakteria usnadnil. Po prostudování vazebných míst POA se nejvhodnějším místem pro takovouto modifikaci jeví pozice C-5 a C-6 pyrazinového jádra. Takto modifikovaná POA by se vyhnula kroku aktivace pomocí PncA (enzym konvertující PZA na POA) a mohla tak působit i na kmeny, které mají mutaci v *pncA* genu.



Obrázek 7. Vazebná místa a interakce POA s RpsA. *H*-můstky jsou znázorněny tečkovaně. Převzato z Yang et. al.⁵⁹

2.4.4. PanD

PanD neboli aspartát dekarboxylasa je enzym zapojený do biosyntézy CoA. Konkrétním místem jeho působení je krok přeměny L-aspartátu na β -alanin.⁵⁵⁻⁵⁷ Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.2., tento enzym byl navržen jako místo zásahu POA. Přestože se podařilo objasnit krystalickou strukturu enzymu (PDB: 2C45)⁷⁰, komplex s navázanou POA není k dispozici a doposud není známé vazebné místo či interakce POA-enzym. Pandey et. al.⁷¹ Se zabývali simulací navázání PZA/POA do PanD pomocí dockingu s následnými simulacemi molekulární dynamiky získaných komplexů, které poskytly nejisté výsledky.

2.4.5. DprE1

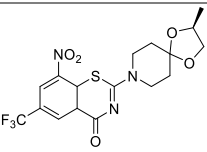
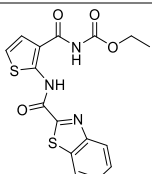
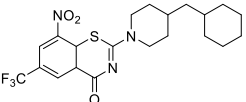
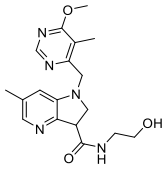
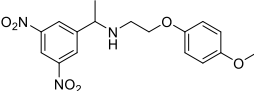
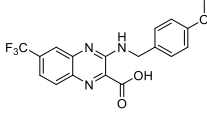
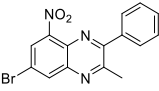
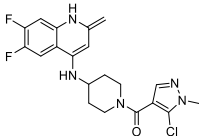
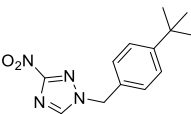
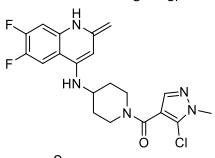
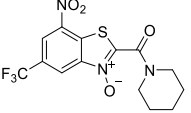
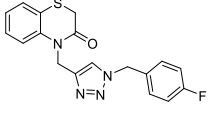
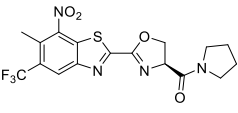
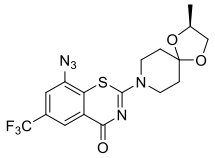
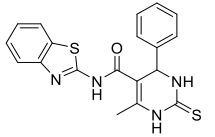
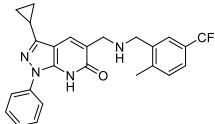
V nedávné době byl navržen další potenciální enzymatický cíl pro design nových antimykobakteriálních látek. Tímto enzymem je dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa oxidasa (DprE1), která je esenciálním flavoenzymem (s kofaktorem FAD) v biosyntéze arabinogalaktanu^{12, 72, 73}, základní součásti mykobakteriální buněčné stěny, jak bylo popsáno v kapitole 2.1.1. DprE1 společně s DprE2 (dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa-2-epimerasa) katalyzují dvou krokovou epimerizaci dekaprenyl-fosfo-ribosy (DPR) na dekaprenyl-fosfo-arabinosu (DPA), která je prekurzorem pro syntézu arabinogalaktanu a lipoarabinomannanu. DprE1 katalyzuje první krok epimerizace, oxidaci DPR na meziproduct dekaprenyl-fosfo-2'-keto-D-arabinosu (DPX) redukcí FAD

kofaktoru na FADH₂. Dále je DPX redukována NADH-dependentní DprE2 na DPA. Oba tyto enzymy jsou esenciální pro růst buňky a přežití *Mtb*.^{12, 72}

DprE1 se skládá ze 461 aminokyselin (AK) a tvoří dvě hlavní domény: 1) vazebná doména FAD (AK 7–196 a 413–461) a 2) vazebná doména substrátu (AK 197–412).⁷⁴ V PDB můžeme nalézt 19 záznamů vykrytalizovaných DprE1, ať už samotných, či s ligandem. Blízko vazebné domény substrátu se nachází dvě povrchové smyčky, které by mohly být zahrnuté do interakcí s cytoplazmatickou membránou, dalšími proteiny účastnícími se v biosyntéze DPA nebo se substrátem DPR. U struktur bez ligandu se tyto smyčky nachází přímo nad vazebným místem ligandu, nechávají aktivní místo doširoka otevřené a mohou se tak chovat jako brána pro ligand. Tyto smyčky se chovají v závislosti na přítomném inhibitoru, kdy může dojít ke stabilizaci jedné, či obou smyček.¹²

Prvními potvrzenými inhibitory mykobakteriální DprE1 byly látky s benzothiazinonovým (BTZ) skeletem.⁷⁵ Bylo zjištěno, že tyto látky jsou aktivovány redukcí na nitroso deriváty⁷⁶, které se kovalentně váží na Cys387 a způsobují kvantitativní a ireverzibilní inaktivaci.^{77, 78} Od té doby bylo popsáno 15 nových strukturních typů inhibitorů, viz **Tabulka 3**. DprE1 inhibitory můžeme rozdělit do dvou kategorií podle mechanismu účinku na ireverzibilní inhibitory, které tvoří s Cys387 kovalentní vazbu jako výše uvedené BTZ, a kompetitivní nekovalentní inhibitory.

Tabulka 3. Přehled inhibitorů DprE1 a jejich hodnoty MIC vůči *Mtb*. Převzato z Piton et. al.¹²

Kovalentní inhibitory			Nekovalentní inhibitory		
Označení	Struktura	MIC [μM]	Označení	Struktura	MIC [μM]
BTZ043 ⁷⁵		0,002	TCAI ⁷⁹		0,51
PBTZ169 ⁸⁰		0,0006	TBA-7371 ⁸¹ (1–4 azaindoly)		0,39
DNB1 ⁸²		0,69	Ty38c ⁸³ (2-karboxychinoxaliny)		3,1
VI-9376 ⁸⁴		3,1	4-AQs ⁸⁵ (látka-3)		0,8
377790 ⁸⁶		*	PyrBTZ02 ⁸⁷ (8-pyrrol-BTZ)		0,34
BTO ⁸⁸		0,07	1,2,4-Triazol obsahující 1,4-BTZ deriváty ⁸⁹ (látka-6c)		30
cBT ⁹⁰		4,2	1,3-BTZ azid ⁹¹		0,47
			Benzothiazolylpyrimidin-5-karboxamidy ⁹² (látka-7a)		0,08
			Pyrazolopyridony ⁹³ (látka-19)		0,1

*IC₉₀ = 0,48 μM

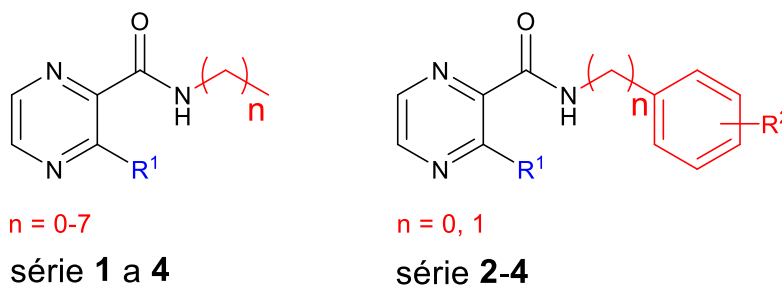
3. KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ

Výsledky uvedené v této disertační práci byly publikovány formou dvou článků v recenzovaných zahraničních časopisech (**P1**, **P2**), jednoho článku odeslaného do redakce (v oponentském řízení, **P3**) a prezentovány na odborných konferencích formou plakátových sdělení či přednášek.

Komentář bude prvotně zaměřen na hodnocení antimykobakteriální aktivity a hledání vztahů struktury a antimykobakteriální aktivity. Podrobné syntetické postupy, popis použitých metodik a analytická data připravených sloučenin jsou uvedeny v příslušných článcích tvořící přílohy **P1–P3**. Příloha **P4** obsahuje výsledky, které v době odevzdání disertační práce nebyly publikovány.

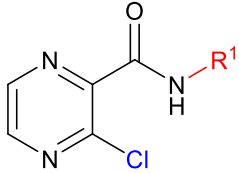
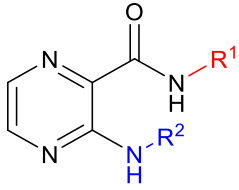
3.1. Přehled připravených sloučenin

Celkem bylo připraveno 112 derivátů PZA, z toho 102 dosud nepublikovaných a deset dříve připravených jako meziprodukty, či jako finální produkty s jinou zkoumanou aktivitou než antimykobakteriální. Sloučeniny jsou rozděleny do čtyř sérií, dle strukturních typů (**Obrázek 7**). Série 1 a 2 byly připraveny za účelem porovnání pyrazin-2-karboxamidů substituovaných v poloze 3 pyrazinového jádra s dříve připravenými polohovými izomery se substituenty v polohách 5 a 6. Série 3 byla navržena a připravena za účelem přípravy lipofilních derivátů POA, které kombinují možné ovlivnění proteinu RpsA a strukturní obměnu potvrzených inhibitorů nově navrženého enzymatického mykobakteriálního cíle DprE1. Látky ze série 4 byly připraveny ke studiu další obměny substituentu v poloze 3 a doplnění série látek připravených v diplomové práci⁹⁴ autorky.

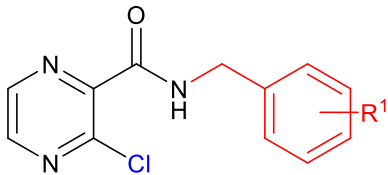
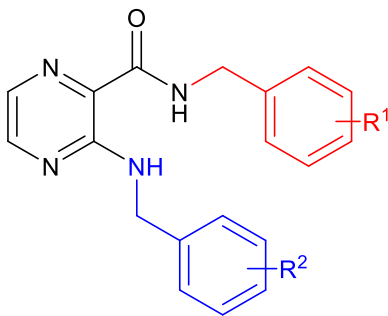


Obrázek 7. Obecné struktury připravených látek

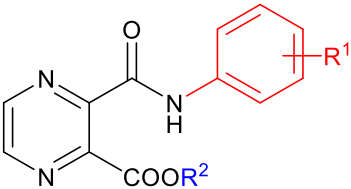
Série 1 (P1)

Struktury	R ¹	R ²
 <p>8 látek N-alkyl-3-chloropyrazin-2-karboxamidy</p>	CH ₃ -C ₈ H ₁₇	–
 <p>22 látek N-alkyl-3-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidy</p>	CH ₃ -C ₈ H ₁₇	CH ₃ -C ₈ H ₁₇
celkem 30 látek		

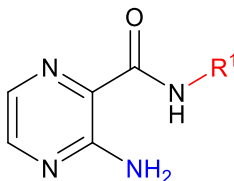
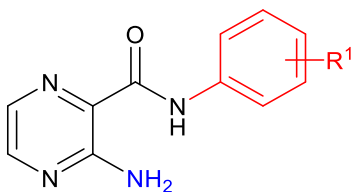
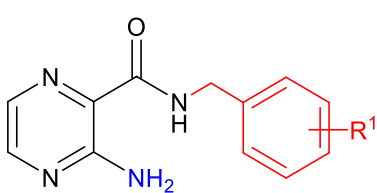
Série 2 (P2)

Struktury	R ¹	R ²
 <p>13 látek N-benzyl-3-chloropyrazin-2-karboxamidy</p>	2-CH ₃ 4-CH ₃ 4-OCH ₃ 2,4-diOCH ₃ 2-Cl 3-Cl 4-Cl 2,4-diCl 3,4-diCl 2-F 4-F 3-CF ₃ 4-CF ₃	–
 <p>10 látek N-benzyl-3-(benzylamino)pyrazin-2-karboxamidy</p>	2-CH ₃ 4-CH ₃ 4-OCH ₃ 2-Cl 3-Cl 4-Cl 3,4-diCl 2-F 4-F 4-CF ₃	2-CH ₃ 4-CH ₃ 4-OCH ₃ 2-Cl 3-Cl 4-Cl 3,4-diCl 2-F 4-F 4-CF ₃
celkem 23 látek		

Série 3 (P3)

Struktury	R ²	R ¹
 <p>3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny</p>	H	H
	18 látek	2-OH
	CH ₃	4-OCH ₃
	12 látek	2,4-diOCH ₃
	C ₃ H ₇	2,5-diCH ₃
	17 látek	4-C ₂ H ₅
		4-F
		2,4-diF
		4-Cl
		3,4-diCl
		4-Br
		5-F-2-CH ₃
		2-Cl-5-CH ₃
		5-Cl-2-OH
		2-OH-5-NO ₂
		4-NO ₂
		3-CF ₃
	4-CF ₃	
	celkem 47 látek	

Série 4 (P4)

Struktury	R ¹
 <p>4 látky</p> <p><i>N</i>-alkyl-3-aminopyrazin-2-karboxamidy</p>	C ₅ H ₁₁ –C ₈ H ₁₇
 <p>8 látek</p> <p>3-amino-<i>N</i>-fenylpyrazin-2-karboxamidy</p>	H 2-OH 2,4-diOCH ₃ 2,5-diCH ₃ 4-CH ₂ CH ₃ 2,4-diF 3,4-diCl 4-CF ₃
 <p>8 látek</p> <p>3-amino-<i>N</i>-benzylpyrazin-2-karboxamidy</p>	H 3-CF ₃ 4-CH ₃ 4-OCH ₃ 2,4-diOCH ₃ 3,4-diCl 2-CH ₃ 4-CF ₃
celkem 20 látek	

3.2. Syntéza

Výchozí látkou pro přípravu derivátů *N*-alkyl- a substituovaných *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů (série 1 a 2) byl 3-chlorpyrazin-2-karbonitril, viz **Schéma 2**. Tento nitril byl podroben alkalické hydrolyze za vzniku kyseliny 3-chlorpyrazin-2-karboxylové. Kyselina byla dále převedena na chlorid působením SOCl₂ za přítomnosti katalytického množství *N,N*-dimethylformamidu (DMF) v bezvodém toluenu. Aminolýza chloridu kyseliny 3-chlorpyrazin-2-karboxylové probíhala v bezvodém acetonu s příslušným alkylaminem či substituovaným benzylaminem a triethylaminem (TEA) jako bází. U tří látek typu *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu (série 2; R: 2-CH₃, 4-CH₃, 4-OCH₃) vznikaly v tomto kroku zároveň finální benzylamino sloučeniny v dostatečném množství pro izolaci. Aminodehalogenace *N*-alkyl- či *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů probíhala s využitím mikrovlnného záření

(MW) dle předešlých experimentů. Do speciální silnostěnné zkumavky uzavřené septem byl k *N*-substituovanému 3-chlorpyrazin-2-karboxamidu přidán příslušný alkylamin či substituovaný benzylamin. Do směsi byl přidán pyridin, jako baze. Při porovnávání vhodnosti bazí TEA a pyridinu bylo zjištěno, že TEA je v přítomnosti mikrovlnného záření nestabilní.⁹⁵ Rozkladné produkty TEA (především diethylamin) pak mohou reagovat s výchozími látkami a vytvářet tak nechtěné vedlejší produkty. Jako rozpouštědlo byl použit methanol, který je svým dipólovým momentem vhodný pro mikrovlnou syntézu a i při jeho teplotě varu 64,7 °C může reakce v mikrovlnném reaktoru díky přetlaku a uzavřenému systému probíhat za vysokých teplot, např. 150 °C. Podmínky pro mikrovlnou syntézu byly zvoleny na základě dříve provedených experimentů. Reakce probíhala za následujících podmínek: 150 °C, 30 min (benzylaminy) nebo 1 h (alkylaminy), 100 W. Výtěžky reakcí *N*-alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů byly v rozmezí 40–64 % a pro *N*-alkyl-3-alkylpyrazin-2-karboxamidy 41–98 %. V případě *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů se výtěžky pohybovaly v rozmezí 11–67 % a u *N*-benzyl-3-benzylpyrazin-2-karboxamidů v rozmezí 39–86 %. U *N*-benzyl-3-benzylaminopyrazin-2-karboxamidů vzniklých jako vedlejší produkty při kroku tvorby 3-chlor benzylamidů byly výtěžky 14–26 % (počítáno z výchozí 3-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny).

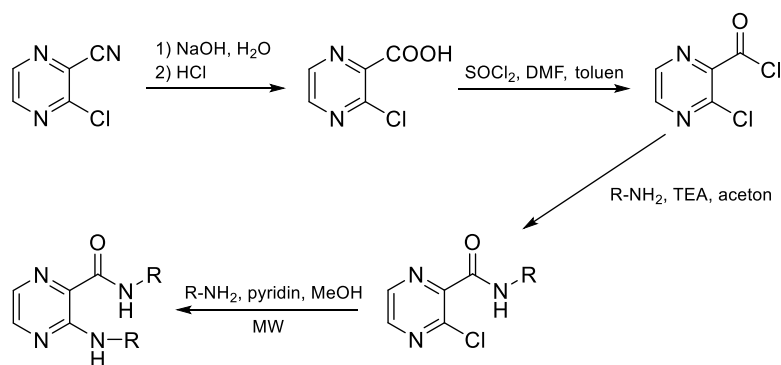


Schéma 2. Příprava derivátů odvozených od *N*-alkyl a *N*-benzyl 3-chlorpyrazin-2-karboxamidů.

Pro přípravu 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin (série 3) byl použit jako výchozí látka zakoupený anhydrid pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny, pro syntézu několika látek byl pak tento anhydrid připraven zahříváním pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny s anhydridem kyseliny octové, viz **Schéma 3**. Výchozí anhydrid reagoval s příslušným substituovaným anilinem v tetrahydrofuranu. Pro ukončení reakce byla přidána voda a směs byla zneutralizována nasyceným roztokem NaHCO₃. Methyl a propyl estery byly připraveny s využitím mikrovln v přítomnosti methanolu či

propanolu s katalytickým množstvím H_2SO_4 za následujících podmínek: 120 °C, 20 min, 50 W. Výtěžky kyseliny se pohybovaly v rozmezí 58–98 %, methyl esterů v rozmezí 52–76 % a propyl esterů v rozmezí 33–85 %.

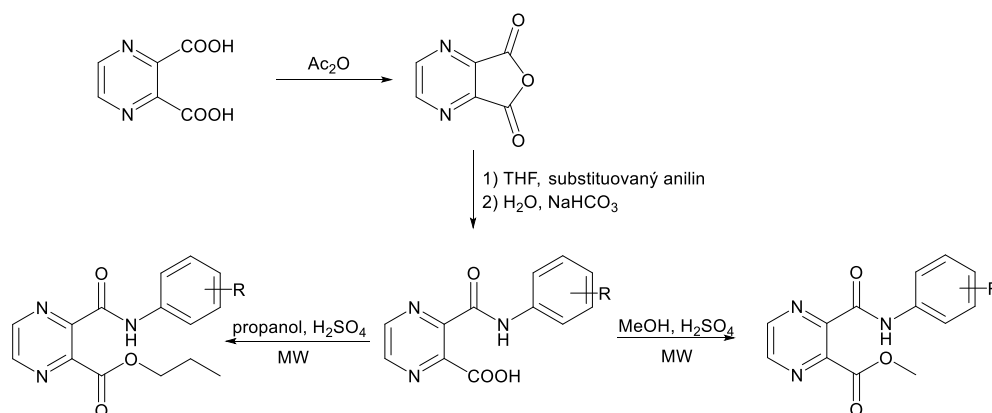


Schéma 3. Příprava 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin a jejich methyl a propyl esterů.

Série *N*-alkyl-3-aminopyrazin-2-karboxamidů a 3-amino-*N*-fenyلكarboxamidů (série 4) vycházela z 3-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny, která byla převedena na příslušný amid pomocí kaplingového činidla 1,1'-karbonyldiimidazolu (CDI) v dimethylsulfoxidu, viz **Schéma 4**. Toto činidlo bylo použito z důvodu lepšího zacházení, zkrácení a zjednodušení kroku převodu kyseliny na amid. Využitím CDI se vyhneme případné degradaci reakční směsi, ke které může docházet v průběhu vzniku chloridu, časově náročnému čištění směsi od přebytečného SOCl_2 a použití těkavého toluenu. Při reakci s CDI dochází k aktivaci kyseliny (**Obrázek 8**), která je pak snadněji převedena na amid reakcí s příslušným alkylaminem či substituovaným anilinem v přítomnosti mikrovln. Podmínky použité při mikrovlnné syntéze: 120 °C, 30 min, 100 W. Výtěžky alkylamidů byly v rozmezí 42–67 % a anilidů v rozmezí 21–55 %.

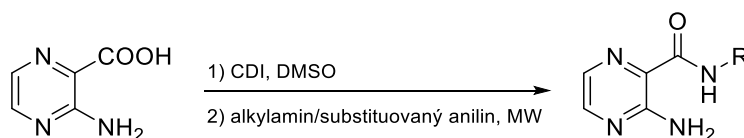
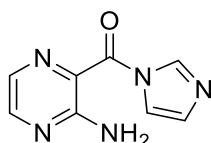


Schéma 4. Příprava *N*-fenyl a *N*-alkyl-3-aminopyrazin-2-karboxamidů.



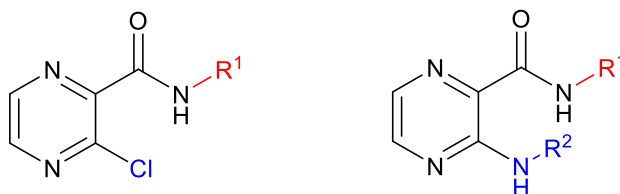
Obrázek 8. Struktura aktivované kyseliny

3.3. Hodnocení biologické aktivity

3.3.1. Antimykobakteriální aktivita

Připravené sloučeniny byly podrobeny antimykobakteriálnímu testování *in vitro* vůči čtyřem mykobakteriálním kmenům (pokud není uvedeno jinak), jmenovitě *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (*Mtb*), *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 80/72 a rychle rostoucímu *M. smegmatis* CCM 4622. Testování probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody popsané v přílohách **P1–P3**. Výsledky mykobakteriální aktivity byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace MIC. Pro přehlednost je antimykobakteriální aktivita v této práci označena slovně jako: nízká aktivita, MIC = 50–100 µg/ml; střední aktivita, MIC = 12,5–25 µg/ml; a vysoká aktivita, MIC = 1,56–3,13 µg/ml. Přehled neaktivnějších látek vůči *Mtb* shrnuje **Tabulka 4**.

3-Chlor a 3-alkylamino alkylamidy - série 1

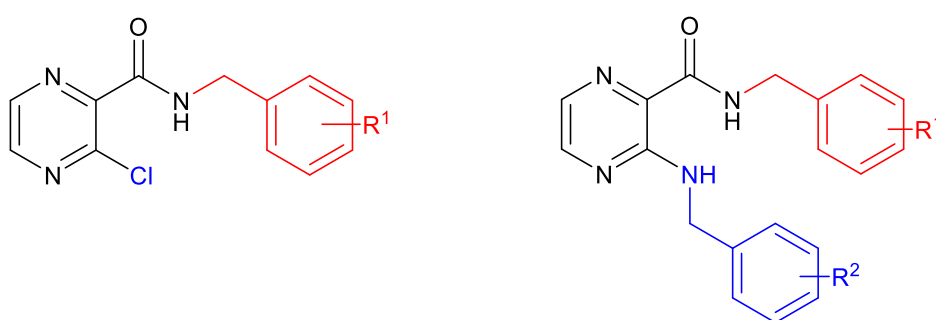


Nejvyšší aktivitu vůči *Mtb* prokázaly tři látky z podskupiny methylamidů s dlouhým alkylaminovým řetězcem, konkrétně hexyl-, heptyl- a oktylamino. Tyto sloučeniny vykazaly střední aktivitu, tj. MIC = 25 µg/ml.

Dalších sedm látek vykazalo nízkou aktivitu (MIC = 50 µg/ml). Z těchto látek byla jedna látka v poloze 3 pyrazinového jádra substituována chlorem, zbylé byly alkylamino deriváty. Ke zvyšování aktivity docházelo zpravidla při prodlužování alkylaminového řetězce. V amidové části byla optimální substituce methylem, při záměně za ethyl či vyšší alkyl aktivita klesala. Nižší aktivitu můžeme pozorovat i v případě nesubstituované amidové skupiny, kdy i látky s dlouhým alkylaminovým řetězcem, připravené dříve dr. Jand'ourkem⁹⁶, dosahovaly nízké aktivity MIC = 50 µg/ml. Pro studium vlivu polohy alkylaminového řetězce na pyrazinovém jádře můžeme látky porovnat s polohovými izomery připravenými dr. Servusovou-Vaňáskovou⁹⁷. Pokud se oktylamino-2-pyrazinylcarboxamid nacházel v poloze 5 pyrazin-2-karboxamidu, antimykobakteriální aktivita byla MIC = 6,25 µg/ml, v případě přesunu do polohy 6 se aktivita zvýšila na MIC

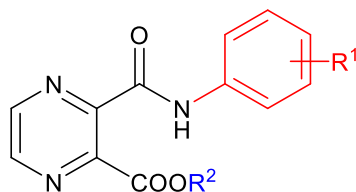
= 1,56 µg/ml. Tyto izomery byly však testovány při pH 5,6, při kterém deriváty PZA vykazují zpravidla vyšší aktivity (porovnání výsledků testování při rozdílných pH bude diskutováno u série 4). Tento fenomén byl studován Huang et. al.⁹⁸, kdy při nutričním hladovění a nižších hodnotách pH docházelo ke zvyšování aktivity PZA. *N*-Alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidy byly testovány pouze vůči *Mtb*. Čtyři látky z podskupiny ehtylamidů s alkylaminovým řetězcem C₅–C₈ vykázaly nízkou aktivitu, MIC = 50 µg/ml, vůči kmeni *M. avium*. Aktivita vůči *M. kansasii* nebyla prokázána. Tato série nebyla testována vůči rychle rostoucímu *M. smegmatis*.

3-Chlor a 3-benzylamino benzylamidy – série 2



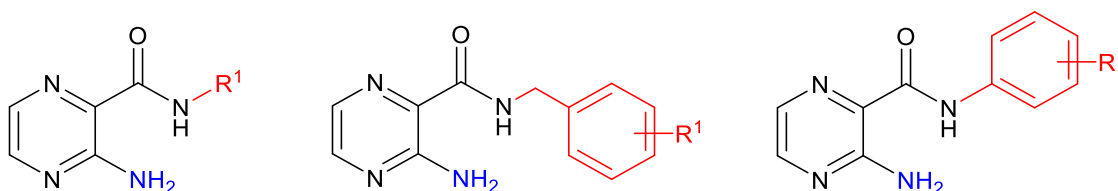
V rámci substituovaných *N*-benzylamin-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů projevila mírnou antimykobakteriální aktivitu vůči *Mtb* pouze jedna látka s 4-OCH₃ substitucí na fenylovém jádře, jejíž hodnota MIC byla 25 µg/ml. V porovnání s polohovými izomery, 6-Cl či 5-Cl substituce pyrazinového jádra^{99, 100}, v přítomnosti chloru v poloze 3 docházelo k poklesu či vytracení aktivity. Například u výše uvedené sloučeniny s 4-OCH₃ substituentem na fenylovém jádře, 5-Cl polohový izomer vykázal aktivitu MIC = 25 µg/ml a 6-Cl polohový izomer MIC = 6,25 µg/ml.⁹⁹ 6-Cl a 5-Cl deriváty byly testovány při pH 6,0. Nahrazením chloru za benzylamino skupinu, kdy obě fenylová jádra obsahovala stejné substituenty, docházelo zpravidla ke zvýšení aktivity. Nejúčinnější benzylamino sloučeniny byly látky s 2-CH₃ a 3,4-diCl substitucí na fenylovém jádře s MIC = 12,5 µg/ml. Mírnou aktivitu, MIC = 25 µg/ml, vykázala sloučenina s 4-CH₃ substituentem. Látky neprokázaly aktivitu vůči *M. kansasii* či *M. avium*. Při testování vůči *M. smegmatis* projevilo nízkou aktivitu pět látek, jejich MIC dosahovala hodnot 125 µg/ml.

3-Fenylkarbamoyl kyseliny a jejich estery – série 3



Ze série derivátů POA se zvýšenou lipofilitou vykazovalo antimykobakteriální aktivitu vůči *Mtb* pouze několik sloučenin. Látky se substitucí fenylu 2-OH a 4-Br prokázaly nízkou aktivitu s MIC = 50 $\mu\text{g/ml}$. Nejúčinnější látka byla substituována 4-NO₂ skupinou na fenylovém jádře. Tato látka vykazovala vysokou aktivitu MIC = 1,56 $\mu\text{g/ml}$. Další zvýšení lipofility převedením příslušné kyseliny na methyl či propyl ester nepřineslo očekávané zvýšení aktivity. Výjimku tvořil propyl ester s 4-CF₃ substitucí fenylového jádra, který vykazoval vysokou aktivitu MIC = 3,13 $\mu\text{g/ml}$ oproti původní kyselině, která aktivní nebyla (testováno do výše 100 $\mu\text{g/ml}$). V případě sloučeniny s 2-OH substitucí fenylu zůstala antimykobakteriální aktivita stejná jak u kyseliny, tak i u propyl esteru (MIC = 50 $\mu\text{g/ml}$). Sloučeniny z této série nebyly v testovaných koncentracích (do výše 100 $\mu\text{g/ml}$) aktivní vůči *M. avium*, *M. kansasii*, ani vůči *M. smegmatis*.

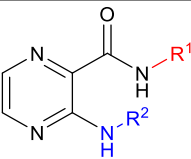
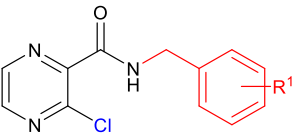
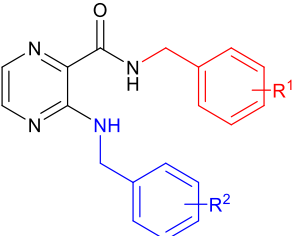
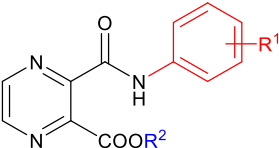
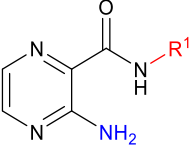
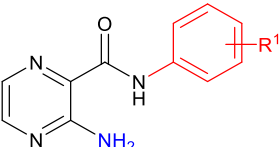
3-Amino alkylamidy, anilidy a benzylamidy – série 4



Součástí této série jsou alkylamidy, anilidy a dříve připravené benzylamidy kyseliny 3-aminopyrazin-2-karboxylové. Z předešlých zkušeností s účinností sloučenin s delším alkylovým řetězcem byly připraveny látky o délce C₅–C₈. *N*-Heptyl a *N*-oktyl amidy vykazovaly nízkou antibakteriální vůči *Mtb* s MIC = 50 $\mu\text{g/ml}$. Jako nejúčinnější látka se projevil 3-amino-*N*-hexylpyrazin-2-karboxamid, jehož hodnota MIC byla 12,5 $\mu\text{g/ml}$. I ze skupiny anilidů vykazovaly dvě látky mírnou aktivitu s MIC 50 $\mu\text{g/ml}$, a to látky s 3,4-diCl a 3-CF₃ substitucí fenylového jádra. Z důvodu ucelení série 3-amino derivátů je do diskuze zahrnuta i série benzylamidů, které byly připraveny v rámci diplomové práce. Tyto látky byly původně testovány za použití Šulova média s pH 5,6, kdy nejaktivnější látka se substitucí fenylu 3,4-diCl skupinou vykazovala

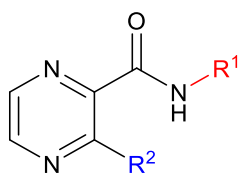
antimykobakteriální aktivitu vůči *Mtb* MIC = 6,25 µg/ml. Dále pak látky s 2-CH₃ a 4-CF₃ substitucí prokázaly mírnou aktivitu, MIC = 25 µg/ml a látky s 4-CH₃ a 3-CF₃ nízkou aktivitu, MIC = 50 µg/ml. Pro náležité porovnání vlivu substituce amidové části byly znovu otestovány v Middlebrookově médiu při pH 6,8. Při vyšším pH vykázaly aktivitu pouze dvě látky, a to látky s 3-CF₃ a 4-CF₃ substitucí, obě s MIC = 50 µg/ml. Nízkou aktivitu vůči *M. avium* vykázala pouze jedna látka, a to 3-amino-*N*-oktylpyrazin-2-pyrazinkarboxamid s MIC = 50 µg/ml. Tato látka prokázala i mírnou aktivitu vůči kmeni *M. kansasii*, MIC = 25 µg/ml. Vůči *M. kansasii* vykázala nízkou aktivitu (MIC = 50 µg/ml) i látka s heptylamidem. Ostatní byly v testovaných koncentracích neúčinné. Při testování aktivity vůči *M. smegmatis* se jevila nejvíc aktivní látka s 4-CF₃ substitucí anilidu s hodnotou MIC = 31,25 µg/ml. *N*-Heptyl a *N*-oktylamid vykázaly vůči *M. smegmatis* nízkou aktivitu s MIC = 62,5 µg/ml.

Tabulka 4. Přehled neúčinnějších látek vůči *Mtb* a zjištěná cytotoxicita na HepG2 buněčné linii (pokud není uvedeno jinak).

Struktura	R ¹	R ²	MIC [μg/ml]	IC ₅₀ [μM]
	CH ₃	C ₆ H ₁₃	25 (106 μM)	>100*
	CH ₃	C ₇ H ₁₅	25 (100 μM)	>100*
	CH ₃	C ₈ H ₁₇	25 (95 μM)	>100*
	4-OCH ₃	-	25 (90 μM)	n.t.
	2-CH ₃	2-CH ₃	12,5 (36 μM)	>250
	4-CH ₃	4-CH ₃	25 (72 μM)	n.t.
	3,4-diCl	3,4-diCl	12,5 (27 μM)	>100
	4-NO ₂	H	1,56 (5 μM)	>750
	4-CF ₃	C ₃ H ₇	3,13 (10 μM)	252,4
	C ₆ H ₁₃	-	12,5 (56 μM)	388,8
	2,4-diOCH ₃	-	12,5 (46 μM)	>50
INH	-	-	0,1–0,2 (0,7–1,5 μM)	n.t.
PZA	-	-	100 (812 μM)	n.t.
POA	-	-	100 (806 μM)	n.t.

* látky byly testovány na HeLa a Vero buněčných liniích
n.t. - netestováno

3.3.2. SAR



- pro R^2 všeobecně platí:
 - záměna chloru za amin či substituovanou aminoskupinu vede ke zvýšení aktivity
 - substituce karboxylem vede téměř k vymizení účinku, tvorbou esteru nedochází ke zvýšení aktivity
- pro R^1 nebyl pozorován výrazný rozdíl v aktivitách při substituci alkylem, benzylem či fenylem
- chlor v poloze 3 pyrazinového jádra
 - alkylamidy stejně aktivní jako benzylamidy
- záměna chloru za amino
 - u alkylamidů dochází ke zvýšení aktivity
 - u benzylamidů se aktivita neliší
 - aktivita vzrůstá v pořadí benzylamid > alkylamid > anilid
- substituce amino skupiny
 - vede převážně ke zvýšení aktivity
 - benzylamino účinnější než alkylamino
 - u alkylamino preference methylamidové skupiny, při prodlužování aktivita klesá
 - u alkylamidů se aktivita neliší v porovnání s 3-NH₂ substitucí
 - u benzylamidů aktivita vzrůstá v porovnání s 3-NH₂ substitucí
- u alkyl substituce obecně platí, že látky s delším alkylovým řetězcem vykazují vyšší aktivitu (C₆–C₈)
- u substituce benzylu a fenylu projevovaly aktivitu převážně sloučeniny s elektron odtahující skupinou – nejčastěji 3,4-diCl a CF₃ v poloze 3 nebo 4
- vztahy jednotlivých struktur jsou graficky znázorněny ve Schématu 5

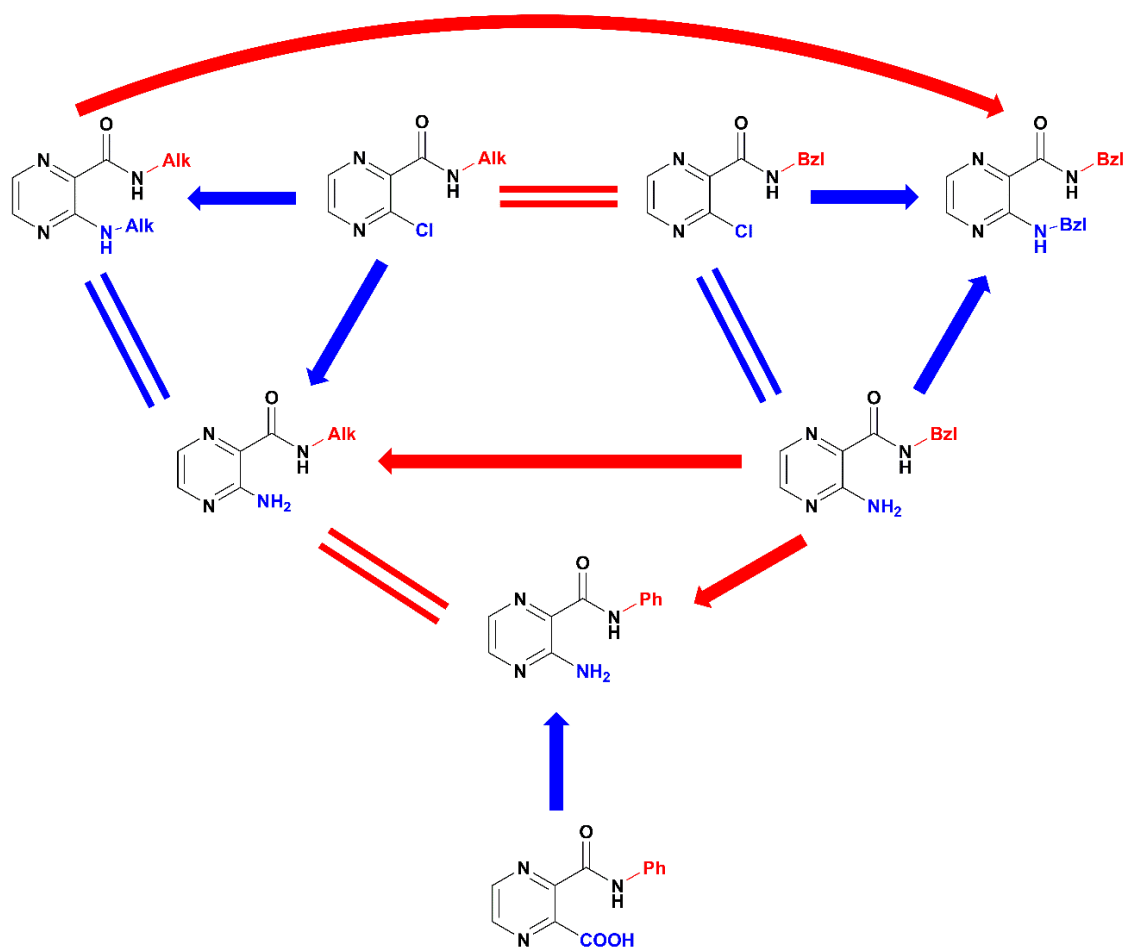


Schéma 5. Grafické znázornění vztahů antimykobakteriální aktivity vůči *Mtb* jednotlivých struktur. Červenou barvou jsou označeny substituce v amidové části, modrou pak v poloze 3 pyrazinu. Barva šipek určuje obměněnou část molekuly a šipky jsou orientovány ve směru zvyšování aktivity vlivem příslušné substituce.

3.3.3. Antibakteriální aktivita

Připravené sloučeniny byly testovány vůči osmi klinicky významným bakteriálním kmenům. Do testování byly zahrnuty čtyři G+ a čtyři G- kmeny. Použitá metodika a testované kmeny jsou popsány v přílohách **P1–P3**.

Mezi testovanými sloučeninami byly nalezeny látky účinné především vůči G+ kmenům. Výjimku představují dvě látky, které vykazovaly nízkou aktivitu vůči G- *Pseudomonas aeruginosa* - propyl 3-((4-bromfenyl)karbamoyl)pyrazin-2-karboxylát ze série 3 s MIC = 250 $\mu\text{mol/l}$ a 3-amino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid ze série 4 s MIC = 125 $\mu\text{mol/l}$. Sloučeniny vykazovaly aktivitu převážně vůči třem G+ kmenům – *Staphylococcus aureus*, methicilin rezistentnímu *S. aureus* (MRSA) a *S. epidermidis*. Vůči čtvrtému testovanému G+ kmeni, *Enterococcus* spp., projevila aktivitu látka ze série 4, konkrétně 3-amino-*N*-(2,5-dimethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid, který vykazoval

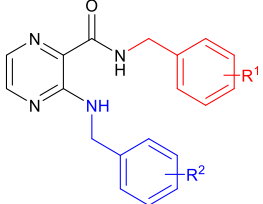
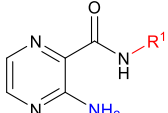
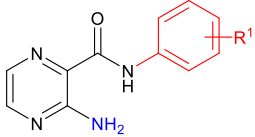
aktivitu MIC = 31,25 $\mu\text{mol/l}$. Přehled hodnot nejaktivnějších látek vůči kmenům *S. aureus*, MRSA a *S. epidermidis* je uveden v **Tabulce 5**.

Pro antibakteriální aktivitu vůči *S. aureus* v rámci připravených látek platí následující. *N*-alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidy neprojevily aktivitu. Záměnou 3-Cl za 3-NH₂ dochází ke zvýšení aktivity na mírnou (MIC = 62,5–250 $\mu\text{mol/l}$), prodloužením na alkylamino se aktivita nemění. Záměnou alkylu za benzyl v amidové části (3-Cl deriváty) dochází ke zvýšení aktivity, kdy látka se 2-Cl substitucí na fenylu vykazala vysokou aktivitu MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$. U benzylamidů se změnou z 3-Cl na 3-benzylamino substitucí aktivita zůstává zachována, v případě 3-NH₂ derivátů se aktivita vytrácí. Záměnou benzylamidu za anilid u 3-aminopyrazin-2-karboxamidů dochází ke zvýšení aktivity, nejúčinnější látka s vysokou MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$. V případě výměny 3-NH₂ za COOH skupinu u anilidů dochází ke snížení aktivity.

3-substituované *N*-alkylpyrazin-2-karboxamidy nevykázaly aktivitu vůči MRSA. Změnou alkylu za benzyl dochází ke zvýšení aktivity na nízké hodnoty MIC = 62,5–250 $\mu\text{mol/l}$. *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy substituované v poloze 3 NH₂ skupinou byly neaktivní. U *N*-alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů změnou Cl za NH₂ skupinu dochází ke zvýšení aktivity na nízké hodnoty MIC. Záměnou alkylamidu za anilid aktivita vzrůstá. 3-Amino-*N*-((4-trifluormethyl)fenyl)pyrazin-2-karboxamid vykázal vysokou aktivitu s MIC = 1,95 $\mu\text{mol/l}$. Tato látka byla následně přetestována na nově zakoupeném kmeni (ATCC 29213, CCM 4223), kdy se tato vysoká aktivita nepotvrdila a klesla na MIC = 125 $\mu\text{mol/l}$ (platí i pro aktivity vůči *S. aureus* a *S. epidermidis*). Deriváty 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin nebyly aktivní.

Vůči *S. epidermidis* vykazalo aktivitu pouze několik látek. Alkylamidy s 3-Cl substitucí byly neaktivní, záměnou za NH₂ skupinu se objevila nízká vrůstající aktivita s prodlužujícím se řetězcem alkylamidu a dalším prodloužením na alkylamino zůstává aktivita nízká. Převedením *N*-alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidů na benzylamidy dochází ke zvýšení na střední hodnoty MIC. Záměnou Cl v poloze 3 za NH₂ či benzylamino skupinu se aktivita benzylamidů vytrácí. V rámci *N*-substituovaných 3-aminopyrazin-2-karboxamidů nejvyšší aktivitu vykazaly anilidy, kdy nejúčinnější látka vykazala vysokou aktivitu MIC = 7,81 $\mu\text{mol/l}$. Deriváty 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin nevykázaly vůči *S. epidermidis* žádnou aktivitu.

Tabulka 5. Přehled neaktivnějších látek vůči kmenům *S. aureus* (SA), MRSA a *S. epidermidis* (SE) s výsledky cytotoxicity na HepG2 buněčné linii.

Struktura	R ¹	R ²	MIC [μmol/l]			IC ₅₀ [μmol/l]
			SA	MRSA	SE	
	4-CH ₃	-	125	>500	500	n.t.
	4-OCH ₃	-	31,25	125	250	n.t.
	2,4-diOCH ₃	-	125	> 500	> 500	n.t.
	2-Cl	-	7,81	500	15,62	847,2
	2,4-diCl	-	125	250	125	n.t.
	3,4-diCl	-	62,5	250	31,25	n.t.
	4-CF ₃	-	31,25	500	62,5	n.t.
	4-OCH ₃	4-OCH ₃	15,62	62,5	> 500	>100
	4-CF ₃	4-CF ₃	62,5	> 500	> 500	n.t.
		C ₈ H ₁₇	-	62,5	62,5	62,5
		C ₂ H ₅	-	125	> 500	> 500
	2,5-diCH ₃	-	>125	125	>125	n.t.
	3,4-diCl	-	15,62	15,62	7,81	n.t.
	4-CF ₃	-	7,81/62,5	1,95/125	15,32/62,5	41,4
Pen			0,2	62,5	3,9	n.t.
Neom			1,95	0,98	7,81	n.t.
Bac			7,81	7,81	15,62	n.t.

n.t. - netestováno

3.3.4. Antifungální aktivita

Pro testování antifungální aktivity bylo využito osm klinicky významných kmenů hub. Použitá metodika a testované kmeny jsou uvedeny v přílohách **P1–P3**.

Nejvíce látek, které vykazaly antifungální aktivitu, bylo aktivních vůči *Trichophyton mentagrophytes*. Účinné látky prokázaly nízkou aktivitu MIC = 62,5–250 μmol/l. Všeobecně u alkyl derivátů aktivita vzrůstala s prodlužujícím se řetězcem od C₅ do C₈. Ze skupiny 3-amino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů (série 4) vykazaly nízkou aktivitu látky s CH₃ a CF₃ substituenty na fenylovém jádře. Při vypuštění methylenového můstku za vzniku anilidů dochází téměř k vymizení aktivity, kdy nízkou aktivitu vůči *T. mentagrophytes* vykazala pouze jedna látka s nesubstituovaným fenylem.

V sérii *N*-substituovaných 3-aminopyrazin-2-karboxamidů byla nalezena aktivita vůči rodu *Candida*. Čtyři deriváty typu 3-amino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu (R: H; 4-CH₃; 3-CF₃; 4-CF₃) vykazaly nízkou aktivitu MIC = 250 μmol/l, která vynecháním

methylenového můstku v případě těchto anilidů vymizela. Naopak u látek s elektron donorovými substituenty 4-OH a 4-C₂H₅ došlo ke zvýšení aktivity vůči *Candida albicans*, u 4-OH skupiny se MIC zvýšila na 125 μmol/l a v případě 4-C₂H₅ substituentu látka vykazala vysokou aktivitu s MIC = 7,81 μmol/l.

Dále se u výše zmíněných sérií objevovaly i ojedinělé aktivity vůči ostatním kmenům, které jsou popsány v jednotlivých přílohách. U derivátů 3-substituovaných *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů a 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin (série 3) nebyla v testovaných koncentracích (obvykle do 500 μmol/l) nalezena žádná antifungální aktivita.

3.3.5. Cytotoxicita

Nejúčinnější látky byly podrobeny zkoumání *in vitro* cytotoxicity. Cytotoxicita látek ze série 1 byla zkoumána na HeLa a Vero buněčných liniích. Výsledky byly vyjádřeny jako minimální koncentrace, která způsobovala mikroskopicky detekovatelné změny v buněčné morfologii (MCC). U látek nebyla prokázána cytotoxicita do výše testovaných koncentrací 100 μmol/l, pouze u jedné látky byla nejvyšší testovaná koncentrace 4 μmol/l z důvodu špatné rozpustnosti. Cytotoxicita u ostatních testovaných látek byla zjišťována na HepG2 buněčné linii. Pouze jedna látka ze série 4, 3-amino-*N*-(4-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid, vykazala vysokou cytotoxicitu IC₅₀ = 41,4 μmol/l, ostatní látky neprokázaly významnou cytotoxicitu. Přehled výsledků testovaných látek s vypočítaným indexem selektivity (SI) zobrazuje **Tabulka 6**. SI byl vypočítán dle vztahu $SI = IC_{50}/MIC$, kdy hodnota MIC reprezentuje biologickou aktivitu vůči *Mtb*, *S. aureus*, MRSA či *C. albicans* (konkrétně uvedeno v tabulce u jednotlivých látek).

3.3.6. Antivirová aktivita

Látky ze série 1 byly testovány vůči různým DNA a RNA virům ve spolupráci s Laboratoří virologie a chemoterapie Rega Institutu KU v Lovani. Skupina testovaných virů obsahovala klinicky významné patogeny, např. HIV, či virus chřipky. Podrobný seznam kmenů a popis metodiky je uveden v příloze **P1**. Žádná látka neprokázala antivirovou aktivitu v testovaných koncentracích do výše 100 μmol/l.

Tabulka 6. Přehled testovaných látek na cytotoxicitu na HepG2 buněčné linii spolu s hodnotami IC₅₀ a SI.

Struktura	R ¹	R ²	IC ₅₀ [μmol/l]	SI
Série 2	2-Cl	-	847,2	108 ^a
	2-CH ₃	2-CH ₃	>250	>10 ^b
	4-OCH ₃	4-OCH ₃	>100	>6 ^a
	3,4-diCl	3,4-diCl	>100	>4 ^b
Série 3	4-NO ₂	H	>750	>150 ^b
	4-CF ₃	C ₃ H ₇	252,4	24 ^b
Série 4	C ₆ H ₁₃	-	388,8	7 ^b
	4-C ₂ H ₅	-	>250	32 ^c
	2,4-diOCH ₃	-	>50	>1 ^b
	4-CF ₃	-	41,4	80/0,32 ^d

^a vypočítáno z antibakteriální aktivity vůči *S. aureus*; ^b vypočítáno z antimykobakteriální aktivity [μmol/l] vůči *Mtb*; ^c vypočítáno z antifungální aktivity vůči *C. albicans*; ^d vypočítáno z antibakteriální aktivity vůči MRSA/vypočítáno z aktivity po přetestování

3.3.7. Herbicidní aktivita

U sloučenin ze série 1, *N*-alkyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidy a *N*-alkyl-3-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidy, byla doplňkově zkoumána herbicidní aktivita na základě výsledků strukturně podobných dříve publikovaných sloučenin.^{96, 101, 102} Toto testování probíhalo ve spolupráci s Chemickým ústavem a Katedrou environmentální ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. U látek byla zjišťována inhibiční aktivita fotosyntetického elektronového transportu (PET) v chloroplastech špenátu. Výsledky byly vyjádřeny jako koncentrace látky způsobující 50% inhibici PET – IC₅₀. Použitá metodika je podrobně popsána v příloze P1.

Aktivita vzrůstala s narůstající délkou řetězce, zpravidla C₃–C₈. V případě symetrických *N*-alkyl-*N*-(alkylamino)pyrazin-2-karboxamidů aktivita vzrůstala do délky řetězce C₅, s dalším prodlužováním řetězce docházelo k poklesu aktivity. U methyl a ethylamidů aktivita vzrůstala do délky alkylaminového řetězce C₇, v případě *N*-methyl-3-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamidu se aktivita nezměnila a u *N*-ethyl-3-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamidu došlo ke snížení aktivity. Jako neaktivnější látka se projevil *N*-ethyl-3-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid s hodnotou IC₅₀ = 48 μmol/l, který ovšem nepředčil použitý standard 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylureu (DCMU; IC₅₀ = 2 μmol/l).

3.4. Docking

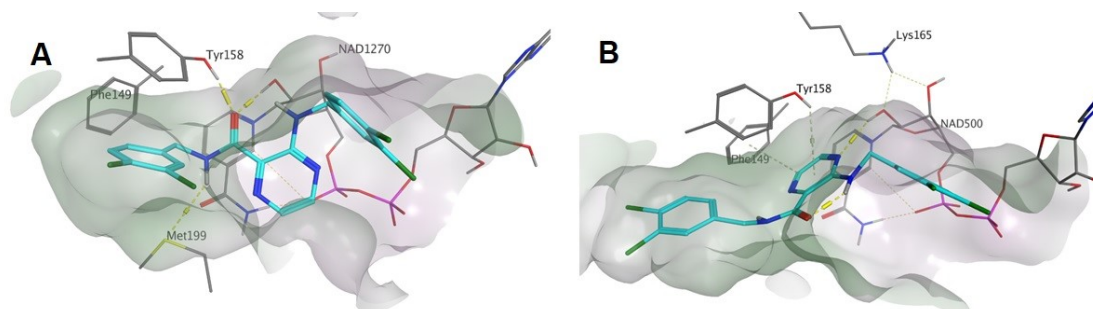
V posledních letech se docking stal součástí základních metodik používaných při designu, vývoji a hledání struktur s potenciální biologickou aktivitou. S rozšiřujícím se množstvím vykrytalizovaných enzymů v komplexu s účinnými inhibitory, které jsou přístupné z PDB databáze, můžeme docking využít i při hledání možného mechanismu účinku aktivních látek.

3.4.1. Enoyl-ACP reduktasa

Na základě dříve provedeného molekulárního dockingu, byly jako možné InhA inhibitory navrženy i látky struktury *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu.⁶⁷ U těchto PZA derivátů byla předpovídána tvorba *H*-můstku mezi karbonylovým O karboxylové skupiny, Tyr158 a 2'-OH ribosy kofaktoru NAD⁺, což je typická interakce pro většinu InhA inhibitorů odvozených od TCA.⁵⁹

Sloučeniny zahrnuté do této dockingové studie byly látky ze série 2, *N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazin-2-karboxamidy. Tyto látky byly vybrány z důvodu studia vlivu pozice sousedících dvou objemných substituentů na pyrazinovém jádře a jejich možnosti umístění do aktivního místa InhA obdobným způsobem jako menší PZA deriváty s jedním aryllovým substituentem. Dockingová studie byla provedena na látce, která prokázala nejvyšší antimykobakteriální aktivitu, a to na látce s 3,4-diCl substitucí fenylového jádra. Ke studiu byly použity různé konformace InhA, lišící se ve velikosti kavity aktivního místa, která je tvořena vysoce flexibilní substrát-vázající smyčkou. Nebylo překvapením, že studovaná látka nezapadala do uzavřené konformace InhA (PDB: 2X23 a 3FNF) a neprokázala očekávané interakce ligandu s receptorem. Naopak při použití otevřené konformace InhA (PDB: 4R9S, 4TZK a 5G0S) se látka vážala dvěma různými vazebnými módy (**Obrázek 9**) s dokovacím skóre podobným vykrytalizovaného ligandu a vykazala interakce typické pro InhA inhibitory. V prvním vazebném módu (**Obrázek 9A**) byla látka orientována podobně jako dříve studované *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy, kdy amidový vodík (donor) tvořil *H*-můstek se sírou Met199 (akceptor). V druhém vazebném módu (**Obrázek 9B**) byl akceptorem *H*-můstek N-1 pyrazinového jádra, přičemž karboxylový kyslík byl k dispozici pro tvorbu intramolekulárního *H*-můstku s NH skupinou benzylaminové části molekuly. Tento intramolekulární můstek byl přítomen ve všech nízkenergetických konformacích studované látky.

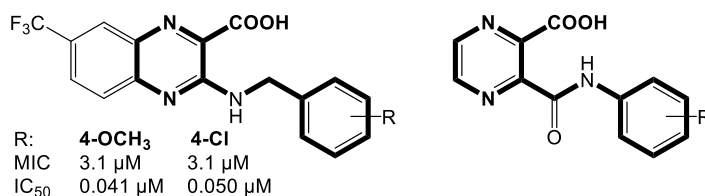
Ačkoliv na základě těchto in silico dockingových výsledků nemůžeme potvrdit inhibici InhA jako mechanismus účinku této látky, prokázali jsme, že i takto stericky objemné deriváty jsou schopné napodobit pózu a interakce známých InhA inhibitorů.



Obrázek 9. Předpovídané vazebné módy pro látku **9a** z **P2**. A) Předpovídaný první vazebný mód, PDB: 5G0S; B) Předpovídaný druhý vazebný mód, PDB: 4TZK

3.4.2. DprE1

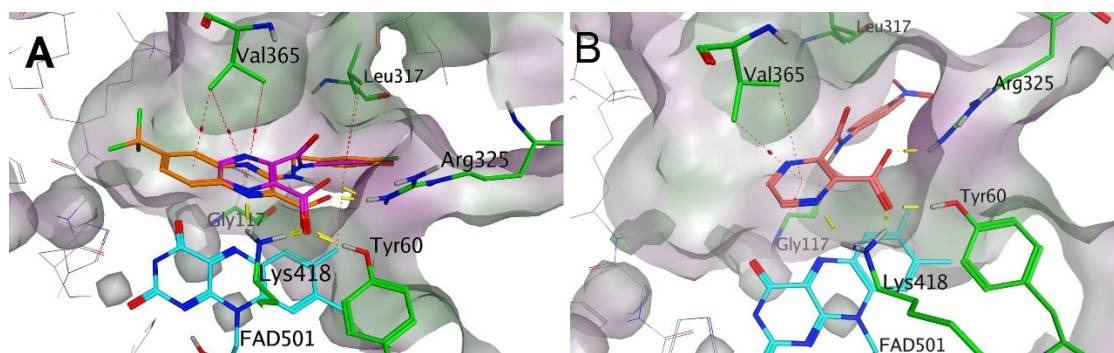
Substituované 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxamidy ze série 3 byly připraveny jako strukturní obměna DprE1 inhibitorů s 2-karboxychinoxalinovým skeletem.¹⁰³ Na rozdíl od předlohových sloučenin se připravené deriváty liší absencí druhého aromatického jádra s trifluormethylovou skupinou a záměnou methylenaminového můstku za karboxamidový, viz **Obrázek 10**.



Obrázek 10. Porovnání struktury dříve připravených 2-karboxychinoxalinů se strukturou 3-fenyلكarbamoyl kyselin.

Látky byly dokovány do PDB struktury 4P8N, popis metodiky je uveden v **P3**. Předpovídané pózy studovaných látek byly vyhodnocovány s ohledem k pozici a interakcím původního vykrytalizovaného ligandu s receptorem. Za úspěšné byly považovány látky na základě kombinace nejlepšího dokovacího skóre, podobnosti interakcí vzhledem k původnímu ligandu a překryvu s původním ligandem. Tyto podmínky splňovalo osm látek. Pyrazinové jádro je v překryvu s pyrazinovou částí chinoxalinu, kdy pyrazinový N-1 vytváří interakci s Lys418 a pyrazinové jádro je stabilizováno C–H/ π interakcemi s Val365 a Gly117, jako u původního ligandu.

Karboxylová skupina se váže karbonylovým kyslíkem k postranním řetězcům Lys418 a Tyr60 a hydroxylová část interaguje s postranním řetězcem Arg325. Anilidová část molekuly je orientována také jako původní ligand, kdy dochází k drobné odchylce v místě -CONH- skupiny, přičemž fenylové jádro je opět v překryvu s fenylem původního ligandu. Dokovací skóre původního ligandu bylo -8.73 kcal/mol, zatímco nejvyšší skóre ze studovaných látek v hodnotě -7.28 kcal/mol měla látka s 2,4-diOCH₃ substitucí. Pokud porovnáme hodnoty efektivnosti ligandu (LE), vypočítané dle dokovací skóre/počet těžkých atomů, měla tato látka lepší LE = -0,33 než byla hodnota LE původního ligandu (LE = -0,31). Nejlepší látka podle hodnot LE byla látka s 4-Br substitucí s LE = -0,36. U této látky byla také viditelná C-H/π interakce s FAD kofaktorem, jako u původního ligandu, viz **Obrázek 11A**. Látka s 4-NO₂ substitucí, která projevila nejlepší antimykobakteriální aktivitu, měla dokovací skóre -6.96 kcal/mol a LE = -0.33, **Obrázek 11B**. Jak již bylo zmíněno výše, v porovnání s původní strukturou 2-karboxychinoxalinů, nahrazením -NH-CH₂- spojovacího můstku za -CONH- skupinu nedošlo k radikální změně vazebného módu. Na druhé straně, ztráta přikondenzovaného aromatického jádra, spolu s objemným lipofilním CF₃ substituentem, se jeví jako možné vysvětlení ztráty antimykobakteriální aktivity. Pravděpodobně je potřeba objemného lipofilního substituentu, který vyplní lipofilní kavitu.



Obrázek 11. A) Předpovídaný vazebný mód pro látku s 4-Br substitucí (látka **11** z **P3**, tmavě růžová) v porovnání s původním ligandem (oranžová); B) Předpovídaný vazebný mód látky s 4-NO₂ substitucí (látka **16** z **P3**, růžová), která byla nejaktivnější látkou vůči *Mtb*.

4. ZÁVĚR

V rámci teoretické části této disertační práce byl popsán současný stav a vývoj epidemiologie tuberkulózy. Dále byly zmíněny rezistentní formy onemocnění, které spolu s koinfekcí HIV léčbu tuberkulózy značně komplikují. Následně byl uveden přehled používaných antituberkulotik první linie, stručný souhrn antituberkulotik druhé linie a látek schválených ke kombinační léčbě v nedávné době. Ústřední molekulou této disertační práce bylo antituberkulotikum první linie, pyrazinamid, proto jeho působení na mykobakterie byla věnována samostatná kapitola. Poslední kapitolu tvořil přehled potenciálních enzymatických/proteinových cílů pro design a vývoj nových derivátů pyrazinamidu.

Náplní experimentální části práce byla syntéza derivátů pyrazinamidu modifikovaných v polohách 2 a 3. Obměna amidové části byla zaměřena na alkyl, benzyl a fenyl substituci. V poloze 3 se nacházel chlor, aminoskupina či sekundární amin substituovaný alkylem, nebo benzylem. Připravené látky byly rozděleny do čtyř sérií dle strukturních typů: 3-chlor a 3-alkylamino-*N*-alkylpyrazin-2-karboxamidy (série 1, 30 látek), 3-chlor a 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy (série 2, 23 látek), 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny a estery (série 3, 47 látek) a *N*-substituované 3-aminopyrazin-2-karboxamidy (série 4, 12 látek).

Série 1 a 2 byly připraveny jako polohové izomery dříve připravených látek s dobrou antimykobakteriální aktivitou a ke studiu prostorového uspořádání sousedících objemných substituentů. Série 3 byla navržena ke zvýšení lipofility pyrazinkarboxylové kyseliny a jako modifikace potvrzených inhibitorů enzymu DprE1 (zapojeného do syntézy arabinogalaktanu mykobakteriální buněčné stěny). Série 4 navazovala na předchozí diplomovou práci autorky. Tyto látky tak byly připraveny k ucelení série derivátů 3-aminopyrazin-2-karboxamidu.

Připravené sloučeniny byly studovány především na antimykobakteriální aktivitu vůči čtyřem mykobakteriálním kmenům, jmenovitě *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*, *M. avium* a *M. smegmatis*. Nejaktivnější látka byla nalezena v sérii 3, a to 3-((4-nitrofenyl)karbamoyl)pyrazin-2-karboxylová kyselina, která vykazala vysokou aktivitu MIC = 1,56 µg/ml vůči *Mtb*. Ačkoliv tato látka obsahuje potenciálně toxickou aromatickou NO₂ skupinu, při testování cytotoxicity na HepG2 buněčné linii neprokázala cytotoxický efekt. Nejúspěšnějším strukturním typem, z pohledu počtu aktivních látek,

byla však série substituovaných *N*-benzyl-3-(benzylamino)pyrazin-2-karboxamidů (část série 2), kdy z 23 látek vykázaly střední aktivitu (12,5–25 µg/ml) vůči *Mtb* tři látky. Pokud porovnáme sérii 1 a 2 (substituent v poloze 3) s dříve připravenými 5 a 6 polohovými izomery, při přesunu substituentu z polohy 6 nebo 5 do polohy 3 pyrazinového jádra, dochází ke snížení antimykobakteriální aktivit. Naopak na rozdíl od 5 a 6 polohových izomerů, které nevykázaly zpravidla žádnou antibakteriální a antifungální aktivitu, u derivátů substituovaných v poloze 3 se tyto aktivity objevují. V případě některých látek byly antibakteriální aktivity dokonce srovnatelné s použitými standardy. Na základě dostupných dat z antimykobakteriálního testování byly vyvozeny a diskutovány vztahy mezi strukturou a účinkem v rámci sloučenin prezentovaných v této práci.

Dále byly připravené látky testovány vůči osmi bakteriálním a osmi fungálním kmenům. Ač bylo toto testování prováděno doplňkově pro vytvoření uceleného obrazu antimikrobní aktivity, mezi připravenými sériemi bylo nalezeno několik velice slibných látek pro podrobnější studium či následnou modifikaci struktury za účelem zvýšení aktivity. Nejslibnější látkou byl 3-amino-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid ze série 4, který vůči MRSA vykázal vysokou aktivitu MIC = 1,95 µmol/l, což předčilo i standardy penicilin V a bacitracin. Ovšem po dalším přetestování na nově zakoupených kmenech se tato aktivita nepotvrdila. V sérii 4 byla nalezena i látka 3-amino-*N*-(4-ethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid se vysokou aktivitou vůči *Candida albicans* MIC = 7,81 µmol/l. Na základě výsledků dříve připravených derivátů pyrazinamidu byla u části látek zkoumána i antivirová a herbicidní aktivita. Žádná z testovaných látek nevykázala významnou aktivitu.

Vybrané látky byly dále studovány pomocí *in silico* dockingu pro možný návrh místa jejich působení. 3-(Benzylamino)benzylamidy (série 2), které projevíly antimykobakteriální aktivitu, byly dokovány do enzymu InhA. Přestože se jedná o stericky objemné deriváty, studované látky byly schopné napodobit pózu a interakce známých inhibitorů tohoto enzymu. 3-Fenylkarbamoyl substituované kyseliny (série 3) byly dokovány do enzymu DprE1 na základě strukturní podobnosti s potvrzenými inhibitory DprE1. I přes skutečnost, že z celé série měla antimykobakteriální aktivitu pouze jedna látka, v porovnání s původním ligandem studované sloučeniny vykazovaly podobné interakce a pozice ve vazebném místě. Na základě porovnání připravených látek s původním ligandem můžeme vyvodit vhodné modifikace pro následný vývoj aktivnějších látek. Touto úpravou je navázání dalšího lipofilního substituentu na

pyrazinové jádro v polohách 5 nebo 6, přičemž by tento substituent vyplnil hydrofobní kavitu aktivního místa enzymu. U těchto látek, jakožto lipofilních derivátů POA, bylo původně zamýšleno i cílení na protein RpsA. Ovšem z krystalografické struktury tohoto proteinu je patrné, že pro substituent v poloze 3 pyrazinového jádra není ve vazebných místech pro POA prostor. Proto se zde nabízí modifikace této struktury přesunutím lipofilního substituentu do polohy 5 nebo 6.

5. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Přehled publikací v impaktovaných časopisech

SEMELKOVÁ, L.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; KUBÍČEK, V.; KUNEŠ, J.; NOVÁKOVÁ, L.; MAREK, J.; NAESSENS, L.; PEŠKO, M.; KRÁL'OVA, K.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Alkyl-3-(alkylamino)-pyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2015**, 20, 8687–8711. IF₂₀₁₅ = 2.465.

SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L.; TREJTNAR, F.; KUBÍČEK, V.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. 3-Substituted *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamide Derivatives: Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2017**, 22, 495. IF₂₀₁₆ = 2.861.

KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M.; VYŠKOVSKÁ-TYLLOVÁ, V.; RICHTEROVÁ-FINKOVÁ, L.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; VEJSOVÁ, M.; PATEROVÁ, P.; SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; OPLETALOVÁ, V. Novel halogenated pyrazine-based chalcones as potential antimicrobial drugs. *Molecules* **2016**, 21, 1421. IF₂₀₁₆ = 2.861.

Podíl autorky: Testování a vyhodnocení antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium smegmatis*.

SEMELKOVÁ, L.; JANOŠCOVÁ, P.; FERNANDES, C.; BOUZ, G.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Design, Synthesis, Antimycobacterial Evaluation, and *in silico* Studies of 3-(Phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic Acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2017**. Zasláno do redakce, probíhá oponentským řízením.

Přednášky

SEMELKOVÁ, L.; ZITKO, J.; PATEROVÁ, P.; DOLEŽAL, M. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Alkyl-3-(alkylamino)pyrazine-2-carboxamides and Their Precursors. 5. Postgraduální a 3. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, 3. – 4. 2. 2015.

SEMELKOVÁ, L.; ZITKO, J.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; DOLEŽAL, M. Synthesis and Biological Evaluation of 3-Chloropyrazine-2-carboxamide Derivatives and Their Precursors. 5th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Kraków, Poland, July 3–5, 2015, Book of Abstracts, O-6.

SEMELKOVÁ, L.; ZITKO, J.; JANĎOUREK, O.; PATEROVÁ, P.; KONEČNÁ, K.; DOLEŽAL, M. Benzylderivatives of 3-Aminopyrazine-2-carboxamide: Synthesis and Anti-infective Evaluation. 6. Postgraduální a 4. postdoktorandská vědecká konference FaF UK, Hradec Králové, 9. – 10. 2. 2016.

Plakátová sdělení

SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; PATEROVÁ, P.; BUCHTA, V.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis of *N*-Alkyl-(3-alkylamino)pyrazine-2-carboxamides as Potential Antituberculous Drugs. 4th Paul Ehrlich MedChem Euro PhD Network, Hradec Králové, June 20–22, 2014, Book of Abstracts P-21.

SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; PATEROVÁ, P.; BUCHTA, V.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Alkyl-(3-alkylamino)-pyrazine-2-carboxamides. 23th International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMC 2014, Lisbon, Portugal, September 7–11 2014, in: ChemMedChem, Book of Abstracts S014.

SEMELKOVÁ, L.; PATEROVÁ, P.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis and Antimycobacterial Activity of *N*-Benzyl-3-benzylaminopyrazine-2-carboxamides. IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry, Athens, Greece, June 7–10, 2015, Book of Abstracts P37.

SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; PATEROVÁ, P.; KONEČNÁ, K.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-benzyl-3-benzylaminopyrazine-2-carboxamides. 44. Konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, September 2–4, 2015. Sborník P55.

SEMELKOVÁ, L.; FERNANDES, C.; KONEČNÁ, K.; DOLEŽAL, M. 3-Aminopyrazine-2-carboxamides: Microwave Assisted Synthesis and Biological Evaluation. 45. Konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, June 22–24, 2016. Sborník P-45.

SEMELKOVÁ, L.; JANOŠCOVÁ, P.; ZITKO, J.; PATEROVÁ, P.; KONEČNÁ, K.; DOLEŽAL, M. Synthesis and Anti-infective Evaluation of Substituted 3-(Phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic Acids and Their Methyl Esters. 24th International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMC 2016, Manchester, UK, August 28 – September 1, 2016, in: ChemMedChem, Book of Abstracts P613.

SEMELKOVÁ, L.; JANOŠCOVÁ, P.; PATEROVÁ, P.; KONEČNÁ, K.; ZITKO, J.; DOLEŽAL, M. Synthesis and Anti-infective Evaluation of 3-(Phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic Acid Derivatives. 8th Conference Chemistry towards Biology, Brno, August 28 – September 1, 2016, Book of Abstracts P-66.

SEMELKOVÁ, L.; FERNANDES, C.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; DOLEŽAL, M. Microwave Assisted Synthesis and Antibacterial Evaluation of 3-Aminopyrazine-2-carboxamide Derivatives. 6th Paul Ehrlich MedChem Euro PhD Network, Budapest, Hungary, November 18–20, 2016, Book of Abstracts P-21.

Granty

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: B-CH 1594214/FaF 2014–2016

Řešitel: Mgr. Lucia Semelková

Název projektu: Počítačem podporované projektování léčiv, syntéza, *in vitro* antimykobakteriální hodnocení nových derivátů pyrazinu.

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: B-CH 710312/FaF 2012–2014

Řešitel: Mgr. Barbora Servusová

Spoluřešitel: Mgr. Lucia Semelková

Název projektu: Studium nových potenciálních antituberkulotik odvozených od pyrazinkarboxylové kyseliny.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BROSCHE, R.; GORDON, S. V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L. M.; PYM, A. S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S. T., A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 3684-3689.
2. HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H. D.; MINNIKIN, D. E.; BESRA, G. S.; LEE, O. Y. C.; GERNAEY, A. M.; GALILI, E.; ESHED, V.; GREENBLATT, C. L.; LEMMA, E.; BAR-GAL, G. K.; SPIGELMAN, M., Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *Plos One* **2008**, 3.
3. TRIPATHI, R. P.; TEWARI, N.; DWIVEDI, N.; TIWARI, V. K., Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. *Med Res Rev* **2005**, 25, 93-131.
4. *Global Tuberculosis Report 2016*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2016**. WHO/HTM/TB/2016.13
5. *The End TB Strategy*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2015**. WHO/HTM/TB/2015.19
6. *Global Tuberculosis Report 2015*; World Health Organisation: **2015**. WHO/HTM/TB/2015.22
7. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2015*; Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Praha, **2017**.
8. BÁRTŮ, V., Tuberkulóza - současný stav. *Postgraduální medicína* **2011**, 6, 650.
9. PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C. C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H.; MENZIES, D.; RAVIGLIONE, M., Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, 2, 16076.
10. COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH,

- T.; CONNER, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G., Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence (vol 393, pg 537, 1998). *Nature* **1998**, 396, 190-198.
11. SGARAGLI, G.; FROSINI, M., Human Tuberculosis I. Epidemiology, Diagnosis and Pathogenetic Mechanisms. *Current Medicinal Chemistry* **2016**, 23, 2836-2873.
 12. PITON, J.; FOO, C. S.; COLE, S. T., Structural studies of Mycobacterium tuberculosis DprE1 interacting with its inhibitors. *Drug Discov Today* **2017**, 22, 526-533.
 13. VERSCHOOR, J. A.; BAIRD, M. S.; GROOTEN, J., Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis. *Progress in Lipid Research* **2012**, 51, 325-339.
 14. CHATTERJEE, D., The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* **1997**, 1, 579-588.
 15. HUNTER, R. L.; OLSEN, M. R.; JAGANNATH, C.; ACTOR, J. K., Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **2006**, 36, 371-386.
 16. BEENA; RAWAT, D. S., Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview. *Medicinal Research Reviews* **2013**, 33, 693-764.
 17. SHAKYA, N.; GARG, G.; AGRAWAL, B.; KUMAR, R., Chemotherapeutic interventions against tuberculosis. *Pharmaceuticals (Basel)* **2012**, 5, 690-718.
 18. *Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care (2017 update)*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, **2017**.
 19. JUDGE, V.; NARASIMHAN, B.; AHUJA, M., Isoniazid: the magic molecule. *Medicinal Chemistry Research* **2012**, 21, 3940-3957.

20. RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N., Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular perspectives. *Emerging Infectious Diseases* **1998**, 4, 195-209.
21. DA SILVA, P. E. A.; PALOMINO, J. C., Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, 66, 1417-1430.
22. GOUDE, R.; AMIN, A. G.; CHATTERJEE, D.; PARISH, T., The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, 53, 4138-4146.
23. SIDDIQI, M. I.; KUMAR, A., Review of knowledge for rational design and identification of anti-tubercular compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2009**, 4, 1005-1015.
24. VANNELLI, T. A.; DYKMAN, A.; DE MONTELLANO, P. R. O., The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 12824-12829.
25. YADAV, P., DEOLEKAR, P. , KANASE, V. AND MISHRA, S., Overview of New Anti TB Drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2012**, 3, 2472-2481
26. COX, E.; LAESSIG, K., FDA Approval of Bedaquiline - The Benefit-Risk Balance for Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* **2014**, 371, 689-691.
27. DIACON, A. H.; PYM, A.; GROBUSCH, M. P.; DE LOS RIOS, J. M.; GOTUZZO, E.; VASILYEVA, I.; LEIMANE, V.; ANDRIES, K.; BAKARE, N.; DE MAREZ, T.; HAXAIRE-THEEUWES, M.; LOUNIS, N.; MEYVISCH, P.; DE PAEPE, E.; VAN HEESWIJK, R. P. G.; DANNEMANN, B.; GRP, T. C. S., Multidrug-Resistant Tuberculosis and Culture Conversion with Bedaquiline. *New England Journal of Medicine* **2014**, 371, 723-732.
28. SGARAGLI, G.; FROSINI, M.; SAPONARA, S.; CORELLI, F., Human Tuberculosis. III. Current and Prospective Approaches in Anti-Tubercular Therapy. *Current Medicinal Chemistry* **2016**, 23, 2245-2274.

29. FIORILLO, M.; LAMB, R.; TANOWITZ, H. B.; CAPPELLO, A. R.; MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. P., Bedaquiline, an FDA-approved antibiotic, inhibits mitochondrial function and potently blocks the proliferative expansion of stem-like cancer cells (CSCs). *Aging-Us* **2016**, *8*, 1593-1607.
30. MATTEELLI, A.; CARVALHO, A. C.; DOOLEY, K. E.; KRITSKI, A., TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiol* **2010**, *5*, 849-58.
31. RYAN, N. J.; LO, J. H., Delamanid: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1041-1045.
32. GURUMURTHY, M.; MUKHERJEE, T.; DOWD, C. S.; SINGH, R.; NIYOMRATTANAKIT, P.; TAY, J. A.; NAYYAR, A.; LEE, Y. S.; CHERIAN, J.; BOSHOFF, H. I.; DICK, T.; BARRY, C. E., 3rd; Manjunatha, U. H., Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *FEBS J* **2012**, *279*, 113-25.
33. GUPTA, R.; GEITER, L. J.; WELLS, C. D., Delamanid for Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* **2015**, *373*, 291-292.
34. SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H. I. M.; HA, Y. H.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LEDWIDGE, R.; DOWD, C. S.; LEE, I. Y.; KIM, P.; ZHANG, L.; KANG, S. H.; KELLER, T. H.; JIRICEK, J.; BARRY, C. E., PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science* **2008**, *322*, 1392-1395.
35. RIVERS, E. C.; MANCERA, R. L., New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 1090-1098.
36. MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T.; KAWASAKI, M.; TSUBOUCHI, H.; SASAKI, H.; SHIMOKAWA, Y.; KOMATSU, M., OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Med* **2006**, *3*, e466.

37. OLARU, I. D.; VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F.; HEYCKENDORF, J.; YEW, W. W.; LANGE, C.; CHANG, K. C., Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *European Respiratory Journal* **2015**, *45*, 1119-1131.
38. STOVER, C. K.; WARRENER, P.; VANDEVANTER, D. R.; SHERMAN, D. R.; ARAIN, T. M.; LANGHORNE, M. H.; ANDERSON, S. W.; TOWELL, J. A.; YUAN, Y.; MCMURRAY, D. N.; KREISWIRTH, B. N.; BARRY, C. E.; BAKER, W. R., A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, *405*, 962-966.
39. SINGH, P.; MISHRA, A. K.; MALONIA, S. K.; CHAUHAN, D. S.; SHARMA, V. D.; VENKATESAN, K.; KATOCH, V. M., The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in Mycobacteria. *Journal of Communicable Diseases* **2006**, *38*, 288.
40. KALINDA, A. S.; ALDRICH, C. C., Pyrazinamide: A Frontline Drug Used for Tuberculosis. Molecular Mechanism of Action Resolved after 50 Years? *Chemmedchem* **2012**, *7*, 558-560.
41. 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*, 790-5.
42. ZHANG, Y.; MITCHISON, D., The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, *7*, 6-21.
43. 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*, 2044-9.
44. PETERSON, N. D.; ROSEN, B. C.; DILLON, N. A.; BAUGHN, A. D., Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 7320-7326.
45. ZIMHONY, O.; COX, J. S.; WELCH, J. T.; VILCHEZE, C.; JACOBS, W. R., Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Medicine* **2000**, *6*, 1043-1047.

46. BOSHOFF, H. I.; MIZRAHI, V.; BARRY, C. E., Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of Bacteriology* **2002**, 184, 2167-2172.
47. ZIMHONY, O.; VILCHEZE, C.; ARAI, M.; WELCH, J. T.; JACOBS, W. R., Jr., Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 752-4.
48. NGO, S. C.; ZIMHONY, O.; CHUNG, W. J.; SAYAHI, H.; JACOBS, W. R.; WELCH, J. T., Inhibition of isolated mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, 51, 2430-2435.
49. SAYAHI, H.; ZIMHONY, O.; JACOBS, W. R.; SHEKHTMAN, A.; WELCH, J. T., Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 4804-4807.
50. KEILER, K. C., Biology of trans-translation. *Annu Rev Microbiol* **2008**, 62, 133-51.
51. WITHEY, J. H.; FRIEDMAN, D. I., A salvage pathway for protein synthesis: tmRNA and trans-translation. *Annual Review of Microbiology* **2003**, 57, 101-123.
52. SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X.; YUAN, H.; LEE, J. S.; BARRY, C. E., III; WANG, H.; ZHANG, W.; ZHANG, Y., Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science* **2011**, 333, 1630-1632.
53. DULEBOHN, D.; CHOY, J.; SUNDERMEIER, T.; OKAN, N.; KARZAI, A. W., Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry* **2007**, 46, 4681-93.
54. YANG, J.; LIU, Y.; BI, J.; CAI, Q.; LIAO, X.; LI, W.; GUO, C.; ZHANG, Q.; LIN, T.; ZHAO, Y.; WANG, H.; LIU, J.; ZHANG, X.; LIN, D., Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Mol Microbiol* **2015**, 95, 791-803.
55. 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*. *Emerging Microbes & Infections* **2013**, 2.
56. DILLON, N. A.; PETERSON, N. D.; ROSEN, B. C.; BAUGHN, A. D., Pantothenate and Pantetheine Antagonize the Antitubercular Activity of Pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, 58, 7258-7263.
 57. 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*. *Emerging Microbes & Infections* **2014**, 3.
 58. MIOTTO, P.; CIRILLO, D. M.; MIGLIORI, G. B., Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. *Chest* **2015**, 147, 1135-1143.
 59. ZITKO, J.; DOLEZAL, M., Enoyl acyl carrier protein reductase inhibitors: an updated patent review (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2016**, 26, 1079-1094.
 60. CICCARELLI, L.; CONNELL, S. R.; ENDERLE, M.; MILLS, D. J.; VONCK, J.; GRININGER, M., Structure and Conformational Variability of the *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase Multienzyme Complex. *Structure* **2013**, 21, 1251-1257.
 61. PARIKH, S.; MOYNIHAN, D. P.; XIAO, G. P.; TONGE, P. J., Roles of tyrosine 158 and lysine 165 in the catalytic mechanism of InhA, the enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **1999**, 38, 13623-13634.
 62. HOLAS, O.; ONDREJCEK, P.; DOLEZAL, M., *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as potential antitubercotics: development in the past decade. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2015**, 30, 629-648.
 63. HE, X.; ALIAN, A.; STROUD, R.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R., Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem* **2006**, 49, 6308-23.
 64. SHIRUDE, P. S.; MADHAVAPEDDI, P.; NAIK, M.; MURUGAN, K.; SHINDE, V.; NANDISHAIAH, R.; BHAT, J.; KUMAR, A.; HAMEED, S.; HOLDGATE, G.; DAVIES, G.; MCMIKEN, H.; HEGDE, N.; AMBADY, A.;

- VENKATRAMAN, J.; PANDA, M.; BANDODKAR, B.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; READ, J. A., Methyl-Thiazoles: A Novel Mode of Inhibition with the Potential to Develop Novel Inhibitors Targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 8533-8542.
65. HARTKOORN, R. C.; SALA, C.; NERES, J.; POJER, F.; MAGNET, S.; MUKHERJEE, R.; UPLEKAR, S.; BOY-ROTTGER, S.; ALTMANN, K. H.; COLE, S. T., Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin - nature's isoniazid. *EMBO Mol Med* **2012**, 4, 1032-42.
66. ROZMAN, K.; SOSIC, I.; FERNANDEZ, R.; YOUNG, R. J.; MENDOZA, A.; GOBEC, S.; ENCINAS, L., A new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Discov Today* **2017**, 22, 492-502.
67. SERVUSOVA-VANASKOVA, B.; JANDOUREK, O.; PATEROVA, P.; KORDULAKOVA, J.; PLEVAKOVA, M.; KUBICEK, V.; KUCERA, R.; GARAJ, V.; NAESENS, L.; KUNES, J.; DOLEZAL, M.; ZITKO, J., Alkylamino derivatives of N-benzylpyrazine-2-carboxamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Medchemcomm* **2015**, 6, 1311-1317.
68. JANDOUREK, O.; TAUCHMAN, M.; PATEROVA, P.; KONECNA, K.; NAVRATILOVA, L.; KUBICEK, V.; HOLAS, O.; ZITKO, J.; DOLEZAL, M., Synthesis of Novel Pyrazinamide Derivatives Based on 3-Chloropyrazine-2-carboxamide and Their Antimicrobial Evaluation. *Molecules* **2017**, 22, 223.
69. YANG, J.; LIU, Y.; BI, J.; CAI, Q.; LIAO, X.; LI, W.; GUO, C.; ZHANG, Q.; LIN, T.; ZHAO, Y.; WANG, H.; LIU, J.; ZHANG, X.; LIN, D., Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Molecular Microbiology* **2015**, 95, 791-803.
70. GOPALAN, G.; CHOPRA, S.; RANGANATHAN, A.; SWAMINATHAN, K., Crystal structure of uncleaved L-aspartate-alpha-decarboxylase from Mycobacterium tuberculosis. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2006**, 65, 796-802.
71. PANDEY, B.; GROVER, S.; TYAGI, C.; GOYAL, S.; JAMAL, S.; SINGH, A.; KAUR, J.; GROVER, A., Molecular principles behind pyrazinamide resistance due to mutations in panD gene in Mycobacterium tuberculosis. *Gene* **2016**, 581, 31-42.

72. RICCARDI, G.; PASCA, M. R.; CHIARELLI, L. R.; MANINA, G.; MATTEVI, A.; BINDA, C., The DprE1 enzyme, one of the most vulnerable targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, *97*, 8841-8.
73. WOLUCKA, B. A., Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria - a novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy. *FEBS J* **2008**, *275*, 2691-711.
74. BHUTANI, I.; LOHARCH, S.; GUPTA, P.; MADATHIL, R.; PARKESH, R., Structure, dynamics, and interaction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DprE1 and DprE2 examined by molecular modeling, simulation, and electrostatic studies. *PLoS One* **2015**, *10*, e0119771.
75. MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUSOVA, K.; MOLLMANN, U.; RYABOVA, O.; SAINT-JOANIS, B.; DHAR, N.; PASCA, M. R.; BURONI, S.; LUCARELLI, A. P.; MILANO, A.; DE ROSSI, E.; BELANOVA, M.; BOBOVSKA, A.; DIANISKOVA, P.; KORDULAKOVA, J.; SALA, C.; FULLAM, E.; SCHNEIDER, P.; MCKINNEY, J. D.; BRODIN, P.; CHRISTOPHE, T.; WADDELL, S.; BUTCHER, P.; ALBRETHSEN, J.; ROSENKRANDS, I.; BROSCHE, R.; NANDI, V.; BHARATH, S.; GAONKAR, S.; SHANDIL, R. K.; BALASUBRAMANIAN, V.; BALGANESH, T.; TYAGI, S.; GROSSET, J.; RICCARDI, G.; COLE, S. T., Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science* **2009**, *324*, 801-4.
76. TREFZER, C.; SKOVIEROVA, H.; BURONI, S.; BOBOVSKA, A.; NENCI, S.; MOLTENI, E.; POJER, F.; PASCA, M. R.; MAKAROV, V.; COLE, S. T.; RICCARDI, G.; MIKUSOVA, K.; JOHNSON, K., Benzothiazinones are suicide inhibitors of mycobacterial decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-oxidase DprE1. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 912-5.
77. BATT, S. M.; JABEEN, T.; BHOWRUTH, V.; QUILL, L.; LUND, P. A.; EGGELING, L.; ALDERWICK, L. J.; FUTTERER, K.; BESRA, G. S., Structural basis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 by benzothiazinone inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 11354-9.
78. BRECIK, M.; CENTAROVA, I.; MUKHERJEE, R.; KOLLY, G. S.; HUSZAR, S.; BOBOVSKA, A.; KILACSKOVA, E.; MOKOSOVA, V.; SVETLIKOVA, Z.;

- SARKAN, M.; NERES, J.; KORDULAKOVA, J.; COLE, S. T.; MIKUSOVA, K., DprE1 Is a Vulnerable Tuberculosis Drug Target Due to Its Cell Wall Localization. *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 1631-6.
79. WANG, F.; SAMBANDAN, D.; HALDER, R.; WANG, J. N.; BATT, S. M.; WEINRICK, B.; AHMAD, I.; YANG, P. Y.; ZHANG, Y.; KIM, J.; HASSANI, M.; HUSZAR, S.; TREFZER, C.; MA, Z. K.; KANEKO, T.; MDLULI, K. E.; FRANZBLAU, S.; CHATTERJEE, A. K.; JOHNSON, K.; MIKUSOVA, K.; BESRA, G. S.; FUTTERER, K.; JACOBS, W. R.; SCHULTZ, P. G., Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, E2510-E2517.
80. MAKAROV, V.; LECHARTIER, B.; ZHANG, M.; NERES, J.; VAN DER SAR, A. M.; RAADSEN, S. A.; HARTKOORN, R. C.; RYABOVA, O. B.; VOCAT, A.; DECOSTERD, L. A.; WIDMER, N.; BUCLIN, T.; BITTER, W.; ANDRIES, K.; POJER, F.; DYSON, P. J.; COLE, S. T., Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *Embo Molecular Medicine* **2014**, *6*, 372-383.
81. SHIRUDE, P. S.; SHANDIL, R.; SADLER, C.; NAIK, M.; HOSAGRAHARA, V.; HAMEED, S.; SHINDE, V.; BATHULA, C.; HUMNABADKAR, V.; KUMAR, N.; REDDY, J.; PANDUGA, V.; SHARMA, S.; AMBADY, A.; HEGDE, N.; WHITEAKER, J.; MCLAUGHLIN, R. E.; GARDNER, H.; MADHAVAPEDDI, P.; RAMACHANDRAN, V.; KAUR, P.; NARAYAN, A.; GUPTHA, S.; AWASTHY, D.; NARAYAN, C.; MAHADEVASWAMY, J.; VISHWAS, K. G.; AHUJA, V.; SRIVASTAVA, A.; PRABHAKAR, K. R.; BHARATH, S.; KALE, R.; RAMAIAH, M.; CHOUDHURY, N. R.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; SOLAPURE, S.; IYER, P. S.; NARAYANAN, S.; CHATTERJI, M., Azaindoles: noncovalent DprE1 inhibitors from scaffold morphing efforts, kill Mycobacterium tuberculosis and are efficacious in vivo. *J Med Chem* **2013**, *56*, 9701-8.
82. CHRISTOPHE, T.; JACKSON, M.; JEON, H. K.; FENISTEIN, D.; CONTRERAS-DOMINGUEZ, M.; KIM, J.; GENOVESIO, A.; CARRALOT, J. P.; EWANN, F.; KIM, E. H.; LEE, S. Y.; KANG, S.; SEO, M. J.; PARK, E. J.; SKOVIEROVA, H.; PHAM, H.; RICCARDI, G.; NAM, J. Y.; MARSOLLIER, L.;

- KEMPF, M.; JOLY-GUILLOU, M. L.; OH, T.; SHIN, W. K.; NO, Z.; NEHRBASS, U.; BROSCHE, R.; COLE, S. T.; BRODIN, P., High Content Screening Identifies Decaprenyl-Phosphoribose 2' Epimerase as a Target for Intracellular Antimycobacterial Inhibitors. *Plos Pathogens* **2009**, *5*.
83. NERES, J.; HARTKOORN, R. C.; CHIARELLI, L. R.; GADUPUDI, R.; PASCA, M. R.; MORI, G.; VENTURELLI, A.; SAVINA, S.; MAKAROV, V.; KOLLY, G. S.; MOLteni, E.; BINDA, C.; DHAR, N.; FERRARI, S.; BRODIN, P.; DELORME, V.; LANDRY, V.; DE JESUS LOPES RIBEIRO, A. L.; FARINA, D.; SAXENA, P.; POJER, F.; CARTA, A.; LUCIANI, R.; PORTA, A.; ZANONI, G.; DE ROSSI, E.; COSTI, M. P.; RICCARDI, G.; COLE, S. T., 2-Carboxyquinoxalines kill mycobacterium tuberculosis through noncovalent inhibition of DprE1. *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 705-14.
84. MAGNET, S.; HARTKOORN, R. C.; SZEKELY, R.; PATO, J.; TRICCAS, J. A.; SCHNEIDER, P.; SZANTAI-KIS, C.; ORFI, L.; CHAMBON, M.; BANFI, D.; BUENO, M.; TURCATTI, G.; KERI, G.; COLE, S. T., Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 354-360.
85. NAIK, M.; HUMNABADKAR, V.; TANTRY, S. J.; PANDA, M.; NARAYAN, A.; GUPTHA, S.; PANDUGA, V.; MANJREKAR, P.; JENA, L. K.; KOUSHIK, K.; SHANBHAG, G.; JATHEENDRANATH, S.; MANJUNATHA, M. R.; GORAI, G.; BATHULA, C.; RUDRAPATNA, S.; ACHAR, V.; SHARMA, S.; AMBADY, A.; HEGDE, N.; MAHADEVASWAMY, J.; KAUR, P.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; AWASTHY, D.; NARAYAN, C.; RAVISHANKAR, S.; MADHAVAPEDDI, P.; REDDY, J.; PRABHAKAR, K.; SARALAYA, R.; CHATTERJI, M.; WHITEAKER, J.; MCLAUGHLIN, B.; CHIARELLI, L. R.; RICCARDI, G.; PASCA, M. R.; BINDA, C.; NERES, J.; DHAR, N.; SIGNORINO-GELO, F.; MCKINNEY, J. D.; RAMACHANDRAN, V.; SHANDIL, R.; TOMMASI, R.; IYER, P. S.; NARAYANAN, S.; HOSAGRAHARA, V.; KAVANAGH, S.; DINESH, N.; GHORPADE, S. R., 4-aminoquinolone piperidine amides: noncovalent inhibitors of DprE1 with long residence time and potent antimycobacterial activity. *J Med Chem* **2014**, *57*, 5419-34.

86. STANLEY, S. A.; GRANT, S. S.; KAWATE, T.; IWASE, N.; SHIMIZU, M.; WIVAGG, C.; SILVIS, M.; KAZYANSKAYA, E.; AQUADRO, J.; GOLAS, A.; FITZGERALD, M.; DAI, H. Q.; ZHANG, L. X.; HUNG, D. T., Identification of Novel Inhibitors of *M. tuberculosis* Growth Using Whole Cell Based High-Throughput Screening. *Acs Chemical Biology* **2012**, *7*, 1377-1384.
87. MAKAROV, V.; NERES, J.; HARTKOORN, R. C.; RYABOVA, O. B.; KAZAKOVA, E.; SARKAN, M.; HUSZAR, S.; PITON, J.; KOLLY, G. S.; VOCAT, A.; CONROY, T. M.; MIKUSOVA, K.; COLE, S. T., The 8-Pyrrole-Benzothiazinones Are Noncovalent Inhibitors of DprE1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59*, 4446-52.
88. LANDGE, S.; MULLICK, A. B.; NAGALAPUR, K.; NERES, J.; SUBBULAKSHMI, V.; MURUGAN, K.; GHOSH, A.; SADLER, C.; FELLOWS, M. D.; HUMNABADKAR, V.; MAHADEVASWAMY, J.; VACHASPATI, P.; SHARMA, S.; KAUR, P.; MALLYA, M.; RUDRAPATNA, S.; AWASTHY, D.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; POJER, F.; COLE, S. T.; BALGANESH, T. S.; UGARKAR, B. G.; BALASUBRAMANIAN, V.; BANDODKAR, B. S.; PANDA, M.; RAMACHANDRAN, V., Discovery of benzothiazoles as antimycobacterial agents: Synthesis, structure-activity relationships and binding studies with *Mycobacterium tuberculosis* decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose 2'-oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 7694-7710.
89. SHAIKH, M. H.; SUBHEDAR, D. D.; ARKILE, M.; KHEDKAR, V. M.; JADHAV, N.; SARKAR, D.; SHINGATE, B. B., Synthesis and bioactivity of novel triazole incorporated benzothiazinone derivatives as antitubercular and antioxidant agent. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26*, 561-9.
90. LANDGE, S.; RAMACHANDRAN, V.; KUMAR, A.; NERES, J.; MURUGAN, K.; SADLER, C.; FELLOWS, M. D.; HUMNABADKAR, V.; VACHASPATI, P.; RAICHURKAR, A.; SHARMA, S.; RAVISHANKAR, S.; GUPTHA, S.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; BALGANESH, T. S.; UGARKAR, B. G.; BALASUBRAMANIAN, V.; BANDODKAR, B. S.; PANDA, M., Nitroarenes as Antitubercular Agents: Stereoelectronic Modulation to Mitigate Mutagenicity. *Chemmedchem* **2016**, *11*, 331-339.

91. TIWARI, R.; MILLER, P. A.; CHIARELLI, L. R.; MORI, G.; SARKAN, M.; CENTAROVA, I.; CHO, S. H.; MIKUSOVA, K.; FRANZBLAU, S. G.; OLIVER, A. G.; MILLER, M. J., Design, Syntheses, and Anti-TB Activity of 1,3-Benzothiazinone Azide and Click Chemistry Products Inspired by BTZ043. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 7, 266-270.
92. CHIKHALE, R.; MENGHANI, S.; BABU, R.; BANSODE, R.; BHARGAVI, G.; KARODIA, N.; RAJASEKHARAN, M. V.; PARADKAR, A.; KHEDEKAR, P., Development of selective DprE1 inhibitors: Design, synthesis, crystal structure and antitubercular activity of benzothiazolylpyrimidine-5-carboxamides. *Eur J Med Chem* **2015**, 96, 30-46.
93. PANDA, M.; RAMACHANDRAN, S.; RAMACHANDRAN, V.; SHIRUDE, P. S.; HUMNABADKAR, V.; NAGALAPUR, K.; SHARMA, S.; KAUR, P.; GUPTHA, S.; NARAYAN, A.; MAHADEVASWAMY, J.; AMBADY, A.; HEGDE, N.; RUDRAPATNA, S. S.; HOSAGRAHARA, V. P.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; RAICHURKAR, A., Discovery of pyrazolopyridones as a novel class of noncovalent DprE1 inhibitor with potent anti-mycobacterial activity. *J Med Chem* **2014**, 57, 4761-71.
94. SEMELKOVÁ, L. Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika I. Diplomová práce, Karlova Univerzita, **2013**.
95. JANDOUREK, O.; DOLEZAL, M.; PATEROVA, P.; KUBICEK, V.; PESKO, M.; KUNES, J.; COFFEY, A.; GUO, J.; KRALOVA, K., N-Substituted 5-Amino-6-methylpyrazine-2,3-dicarbonitriles: Microwave-Assisted Synthesis and Biological Properties. *Molecules* **2014**, 19, 651-671.
96. JANDOUREK, O.; DOLEZAL, M.; KUNES, J.; KUBICEK, V.; PATEROVA, P.; PESKO, M.; BUCHTA, V.; KRALOVA, K.; ZITKO, J., New Potentially Active Pyrazinamide Derivatives Synthesized Under Microwave Conditions. *Molecules* **2014**, 19, 9318-9338.
97. SERVUSOVA, B.; PATEROVA, P.; MANDIKOVA, J.; KUBICEK, V.; KUCERA, R.; KUNES, J.; DOLEZAL, M.; ZITKO, J., Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24, 450-453.

98. HUANG, Q.; CHEN, Z. F.; LI, Y. Y.; ZHANG, Y.; REN, Y.; FU, Z.; XU, S. Q., Nutrient-starved incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemotherapy* **2007**, 53, 338-343.
99. SERVUSOVA, B.; EIBINOVA, D.; DOLEZAL, M.; KUBICEK, V.; PATEROVA, P.; PESKO, M.; KRAL'OVA, K., Substituted N-Benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2012**, 17, 13183-13198.
100. SERVUSOVA, B.; VOBICKOVA, J.; PATEROVA, P.; KUBICEK, V.; KUNES, J.; DOLEZAL, M.; ZITKO, J., Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23, 3589-3591.
101. DOLEZAL, M.; MILETIN, M.; KUNES, J.; KRALOVA, K., Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: Synthesis and biological activity. *Molecules* **2002**, 7, 363-373.
102. DOLEŽAL, M.; Kráupví, K., Synthesis and Evaluation of Pyrazine Derivatives with Herbicidal Activity. In *Herbicides, Theory and Applications*, Prof. Marcelo Larramendy (Ed.). InTech: **2011**. DOI: 10.5772/13482. Available from: <https://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/synthesis-and-evaluation-of-pyrazine-derivatives-with-herbicidal-activity>.
103. NERES, J.; HARTKOORN, R. C.; CHIARELLI, L. R.; GADUPUDI, R.; PASCA, M. R.; MORI, G.; VENTURELLI, A.; SAVINA, S.; MAKAROV, V.; KOLLY, G. S.; MOLTENI, E.; BINDA, C.; DHAR, N.; FERRARI, S.; BRODIN, P.; DELORME, V.; LANDRY, V.; RIBEIRO, A.; FARINA, D.; SAXENA, P.; POJER, F.; CARTA, A.; LUCIANI, R.; PORTA, A.; ZANONI, G.; DE ROSSI, E.; COSTI, M. P.; RICCARDI, G.; COLE, S. T., 2-Carboxyquinoxalines Kill *Mycobacterium tuberculosis* through Noncovalent Inhibition of DprE1. *Acs Chemical Biology* **2015**, 10, 705-714.

7. SEZNAM PŘÍLOH

- P1** SEMELKOVÁ, L.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; KUBÍČEK, V.; KUNEŠ, J.; NOVÁKOVÁ, L.; MAREK, J.; NAESESENS, L.; PEŠKO, M.; KRÁL'OVA, K.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Alkyl-3-(alkylamino)-pyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2015**, *20*, 8687–8711. IF₂₀₁₅ = 2.465.
- P2** SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L.; TREJTAR, F.; KUBÍČEK, V.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. 3-Substituted *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamide Derivatives: Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2017**, *22*, 495. IF₂₀₁₆ = 2.861.
- P3** SEMELKOVÁ, L.; JANOŠCOVÁ, P.; FERNANDES, C.; BOUZ, G.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Design, Synthesis, Antimycobacterial Evaluation, and *in silico* Studies of 3-(Phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic Acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2017**. Zasláno do redakce, probíhá oponentským řízením.
- P4** SEMELKOVÁ, L. Syntéza a biologické vyhodnocení *N*-substituovaných 3-aminopyrazin-2-karboxamidů. Nepublikovaná data. **2017**.