

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



**Návrh, příprava a hodnocení derivátů pyrazinamidu jako
potenciálních antimykobakteriálních sloučenin**

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D., školiteli mé doktorské disertační práce, který mě přivedl k tématu derivátů pyrazinu jako potenciálních antimikrobních léčiv. Děkuji mu tímto za dlouholeté vedení a podporu.

Děkuji rovněž všem spolupracovníkům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za spolupráci a vytvoření tvůrčí atmosféry na pracovišti. Děkuji všem spolupracovníkům z jiných kateder Farmaceutické fakulty UK, kteří se podíleli na našich projektech a byli často spoluautory našich publikací. Jedná se zejména o doc. Františka Trejtnara a jeho doktorandy (PharmDr. Janu Mandíkovou, Ph.D., PharmDr. Jiřího Janouška), kteří pro nás měřili cytotoxicitu našich sloučenin *in vitro*. PharmDr. Petru Jílkovi, CSc., RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. a paní Idě Dufkové děkuji za měření antibakteriální a antifungální aktivity našich sloučenin.

Za zavedení a rozvoj testování antimykobakteriální aktivity děkuji doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., MUDr. Pavle Paterové a spolupracujícím laborantkám z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Můj největší dík patří všem (dosud nejmenovaným) současným i bývalým členům naší laboratoře a pracovní skupiny ([Design and Development of New Antimicrobial Agents](#)). Jmenovitě se jedná o PharmDr. Barbora Vaňáskovou, Ph.D., PharmDr. Ondřeje Jand'ourka, Ph.D., PharmDr. Lucii Semelkovou, Ph.D. a doktorandku MSc. Ghada Bouz.

Děkuji vědeckým spolupracovníkům, od kterých jsem směl čerpat jejich znalosti, zkušenosti a dovednosti během svých odborných stáží.

V neposlední řadě děkuji i veškerým institucím, které náš výzkum finančně podpořily (úplné dedikace lze nalézt v příslušných publikacích). Ze současných podporovatelů si dovolím zmínit Grantovou agenturu Univerzity Karlovy (C-C3/1572317), Grantovou agenturu ČR (GAČR 17-27514Y) a projekt CELSA (Structure-based design of new antitubercular medicines, supported by KU Leuven and Charles University).

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

Obsah

Seznam zkratk	7
1. ÚVOD	9
1.1. Tuberkulóza	9
1.1.1. Tuberkulóza – obecné informace	9
1.1.2. Epidemiologická situace tuberkulózy ve světě a v ČR	9
1.1.3. Resistence	11
1.2. Léčba tuberkulózy a vývoj nových antituberkulotik	13
1.3. Mechanismus účinku PZA	14
1.3.1. Strukturně nespecifický účinek	14
1.3.2. Inhibice synthasy mastných kyselin I (Fatty Acid Synthase I)	16
1.3.3. Inhibice trans-translace	18
1.3.4. Inhibice aspartát dekarboxylasy (PanD)	19
1.3.5. Inhibice QAPRTasy	20
1.3.6. Další možné cíle PZA/POA	21
1.3.7. Mechanismus účinku PZA – shrnutí	22
2. KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM	23
2.1. Metody syntéz cílových sloučenin	23
2.1.1. Halogenace pyrazinového jádra	23
2.1.2. Příprava substituovaných amidů karboxylových kyselin	24
2.1.3. Příprava esterů karboxylových kyselin	26
2.1.4. Substituce chloru na pyrazinovém jádře	26
2.2. Metodika hodnocení biologické aktivity připravených derivátů	29
2.2.1. Antimykobakteriální aktivita	29
2.2.2. Doplnkové testy	33
2.2.3. Vyjadřování minimální inhibiční koncentrace v hmotnostních a molárních koncentracích – diskuse	34
2.3. Vztahy mezi strukturou a účinkem	35
2.3.1. Vliv postranních alkylových řetězců na antimykobakteriální aktivitu	35
2.3.2. <i>N</i> -fenylpyrazin-2-karboxamid jako ústřední struktura našeho výzkumu	41

2.3.3.	Vzájemná poloha substituentů na pyrazinovém jádře	45
2.4.	Využití metod počítačem podporovaného návrhu léčiv (CADD)	49
2.4.1.	Pyrazinamidasa (PncA) jako aktivující enzym.....	50
2.4.2.	Enoyl-ACP-reduktasa jako potenciální cílový protein.....	52
2.4.3.	β -ketoacyl-ACP-synthasa jako potenciální cílový protein.....	55
2.4.4.	MycPermCheck	55
2.5.	Hybridní sloučeniny kombinující fragment PZA a PAS	56
3.	SOUHRN, ZÁVĚRY A MOŽNÉ SMĚRY DALŠÍHO VÝZKUMU	59
3.1.	Vybrané perspektivní sloučeniny.....	59
3.2.	Mechanismu účinku	59
3.3.	Nové směry výzkumu	60
3.3.1.	OIDD – Od náhody po <i>in vivo</i> testování	60
3.3.2.	Deriváty pyrazinamidu jako analoga adeninu či adenosinu	62
4.	LITERATURA	65
4.1.	Seznam vlastních prací s uvedením podílu předkladatele	65
4.1.1.	Původní experimentální práce	65
4.1.2.	Přehledové práce	68
4.1.3.	Kapitoly v monografiích.....	69
4.1.4.	Práce nezahrnuté v tomto komentáři	69
4.2.	Kvalifikační práce	71
4.3.	Seznam ostatní použité literatury.....	71
5.	SOUBOR PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ	76

Seznam zkratek

AMR	antimikrobiální rezistence
ATP	adenosintrifosfát
CADD	Computer Aided Drug Design, počítačem podporovaný návrh léčiv
DMSO	dimethylsulfoxid
EMB	ethambutol
FAS	Fatty Acid Synthase – syntasa mastných kyselin, enzymatický komplex mykobaktérií podílející se na syntéze vyšších mastných kyselin s dlouhým řetězcem
HT(V)S	vysokokapacitní (virtuální) skřínink
IHB	intramolekulární vodíková vazba
INH	isoniazid
ITC	isotermální titrační kalorimetrie
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
MD	molekulární dynamika
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis, multilékově rezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MW	mikrovlny
NCE	New Chemical Entity
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotid fosfát (redukovaná forma)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PanD	aspartát dekarboxylasa
PAS	<i>para</i> -aminosalicylová kyselina
PncA	pyrazinamidas

POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
QAPRTasa	chinolinát fosforibosyl transferasa
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RR-TB	Rifampicin-resistant tuberculosis, tuberkulóza rezistentní na rifampicin
SAR	Structure-Activity Relationships – vztahy mezi strukturou a účinkem
TB	tuberkulóza
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
XDR-TB	Extensively drug-resistant tuberculosis

1. ÚVOD

1.1. Tuberkulóza

Tato habilitační práce je souborem publikovaných prací opatřeným komentářem. V naší vědecké práci jsme se zabývali především návrhem, syntézou a biologickým hodnocením derivátů pyrazinamidu (PZA) s potenciálním antimykobakteriálním účinkem. Úvodní části této práce jsou tedy věnovány tuberkulóze a pyrazinamidu, který patří mezi nejdůležitější antituberkulotika 1. linie.

1.1.1. Tuberkulóza – obecné informace

Tuberkulóza (TB) je závažné infekční onemocnění způsobené různými kmeny *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). TB napadá nejčastěji plicní tkáň, ale sekundárním rozsevem může být přenesena do mnohých částí těla, často střev, kostí či mozku. TB provází lidstvo pravděpodobně již od pravěku [1]. Společný předek dnešních moderních kmenů *Mtb* pochází z období před 15.000 lety [2]. Nejstarší archeologický nález biologického původu dokumentující TB u člověka je představován kosterními pozůstatky s typickým tuberkulózním poškozením – tento nález je datován do období přibližně 7.000 let před naším letopočtem [3]. Mykobakteriální DNA z *Mtb* byla prokázána ve staroegyptských mumiích z období 3000–2400 let př. n. l. [4]. Bez nadsázky lze tedy tvrdit, že patogen *Mtb* provází lidstvo od jeho prvopočátků. Dlouhé období koexistence rodů *Homo* a *Mycobacterium* umožnilo mykobakteriím stát se vysoce adaptovanými a tím i úspěšnými patogeny člověka. Je obecně odhadováno, že v současné době je latentní (neaktivní) formou TB infikována asi 1/3 světové populace. Studie z roku 2016 založená na matematických modelech odhadla tuto hodnotu na 23 % [5].

1.1.2. Epidemiologická situace tuberkulózy ve světě a v ČR

Světová zdravotnická organizace (WHO) vydává každoročně zprávu Global Tuberculosis Report, ve které jsou uváděny epidemiologické ukazatele, diagnostické a terapeutické aspekty TB a farmakoekonomický management tohoto onemocnění. Není-li uvedeno jinak, pochází epidemiologická data v následujících částech ze zprávy WHO Global Tuberculosis Report 2018 [6], a vztahují se k roku 2017. Je třeba dodat, že většina dat WHO nejsou přesné počty hlášených případů, ale kvalifikované odhady na základě hlášených případů. To je nutné proto, že velká část případů TB se vyskytuje v oblastech a státech, které nemají dostatečně rozvinutou infrastrukturu a zdravotní péči tak, aby většina případů TB mohla být hlášena.

Obr. 1 zobrazuje relativní incidenci (na 100.000 obyvatel) v jednotlivých státech. Celosvětově se v roce 2017 vyskytlo asi 10 milionů nových případů aktivní TB. Dvě třetiny z absolutního počtu těchto případů se vyskytly v pouhých šesti zemích - Indie (27 %), Čína (9 %), Indonésie (8 %), Filipíny (6 %), Pákistán (5 %), Nigérie (4 %), Bangladéš (4 %) a Jihoafrická

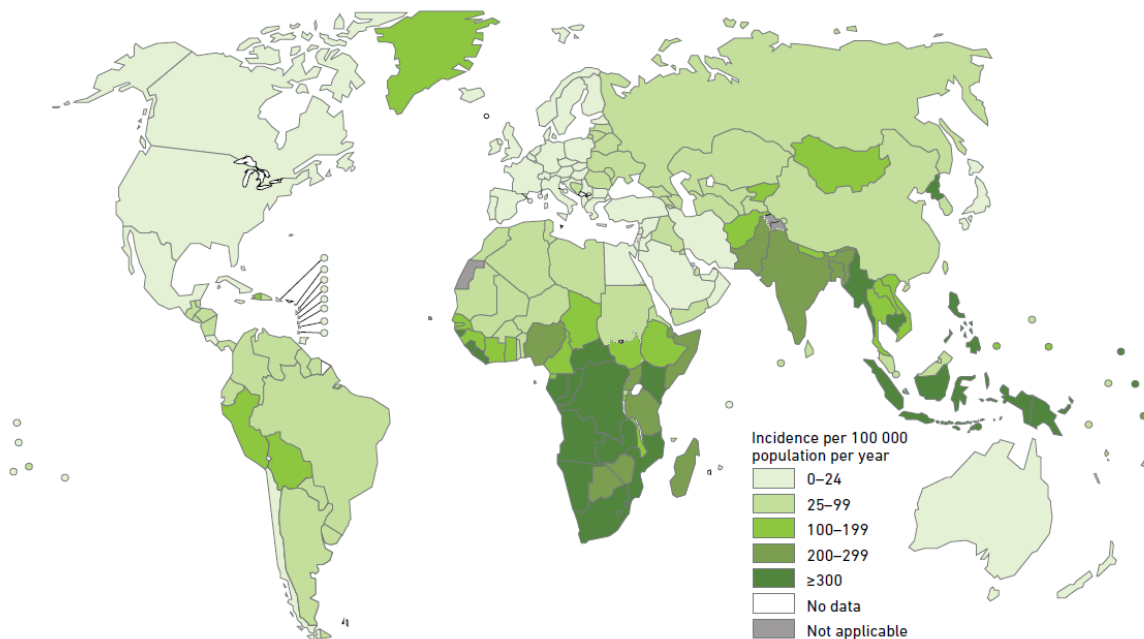
republika (3 %). Naproti tomu Evropa jako celek se na celkovém počtu případů TB v roce 2017 podílela pouze třemi procenty, stejně tak jako WHO oblast Severní a Jižní Ameriky.

Česká republika patří (stejně tak jako ostatní země střední a západní Evropy) mezi země s nízkým výskytem TB s relativní incidencí 0–24 případů na 100 tisíc obyvatel. V roce 2017 bylo v ČR do Registru tuberkulózy při ÚZIS (Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR) hlášeno celkem 505 případů TB (tj. 4,77 případů na 100 tisíc obyvatel), z toho 31,5 % tvořili cizinci s pobytem na území ČR [7]. Mohlo by se tedy zdát, že TB není v ČR závažným problémem. Je pravdou, že onemocnění aktivní TB se zde vyskytuje téměř výhradně v sociálně vyloučených skupinách. Významným rizikem je ovšem imigrace, především ze zemí s vysokou prevalencí TB. Od roku 2011 se v ČR neprovádí plošné očkování proti TB (v současnosti je aplikováno pouze u osob se zvýšenou možností expozice). Důsledek tohoto opatření se může negativně projevit až s časovým odstupem.

TB je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí ze všech infekčních chorob (následována HIV). Celosvětově v roce 2017 zemřelo v důsledku onemocnění TB 1,3 milionu HIV negativních lidí a 0,3 milionu HIV-pozitivních. V roce 2016 byla TB desátou nejčastější příčinou úmrtí a počet úmrtí v důsledku TB byl podobný jako počet úmrtí v souvislosti s diabetem melitus či v důsledku dopravních nehod [6].

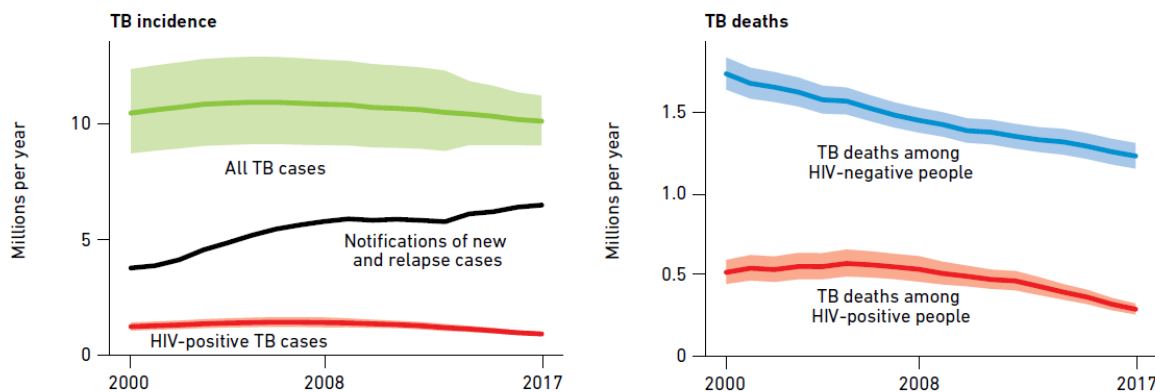
I přes stále vysoké počty nových případů aktivní TB a úmrtí s TB spojených je možno konstatovat příznivý epidemiologický vývoj v tom smyslu, že přibližně od roku 2000 dochází ke kontinuálnímu poklesu incidence a úmrtnosti jak v relativních, tak v absolutních číslech [6]. Obr. 2 zobrazuje tyto trendy pro v absolutních hodnotách. Pozn.: Ukazatel v absolutních hodnotách vykazuje mírnější pokles než ukazatelé relativní, neboť u absolutních počtů je pokles částečně kompenzován narůstající světovou populací.

Estimated TB incidence rates, 2017



Obr. 1. Odhadovaná incidence (počet nových případů) TB za rok 2017. Převzato pod licencí CC BY-NC-SA 3.0 IGO z [6].

Global trends in the estimated number of incident TB cases and the number of TB deaths (in millions), 2000–2017. Shaded areas represent uncertainty intervals.



Obr. 2. Vývoj epidemiologických ukazatelů TB (absolutní incidence a mortalita) v letech 2000–2017. Převzato pod licencí CC BY-NC-SA 3.0 IGO z [6].

1.1.3. Resistance

Výše uvedené epidemiologické trendy (incidence, mortalita) jsou jistě poměrně povzbudivé, neboť vykazují celosvětově a posledních několik let také regionálně (WHO rozděluje svět do celkem šesti oblastí) klesající charakter. Významným problémem spojeným s kontrolou pandemie TB

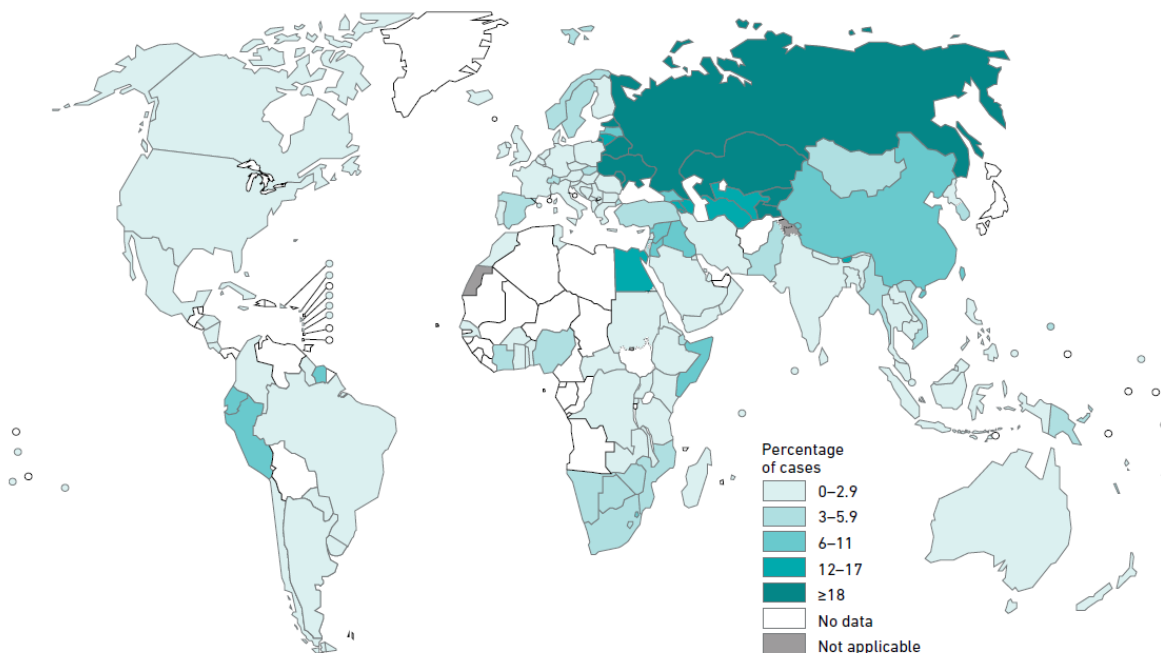
je ovšem léková rezistence, tj. necitlivost kmenů *Mtb* na klinicky užívaná antituberkulózní léčiva 1. a 2. linie. WHO v současnosti definuje několik úrovní rezistence TB:

- RR-TB – rifampicin-resistant TB, tj. tuberkulóza rezistentní vůči rifampicinu (RIF)
- MDR-TB – multidrug-resistant TB, tj. tuberkulóza rezistentní vůči isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF)
- XDR-TB - extensively drug-resistant TB, tj. tuberkulóza rezistentní na INH a RIF, navíc rezistentní vůči kterémukoliv z fluorochinolonů a nejméně vůči jednomu injekčně podávanému antituberkulóznímu léčivu 2. linie (amikacin, kapreomycin, kanamycin)

Rezistence TB na léčiva užívaná k její terapii zapadá do obecného problému antimikrobní rezistence (AMR), což je v současné době velmi často skloňovaný pojem představující významné riziko pro společnost jak z hlediska zdravotního tak socioekonomického [8, 9]. Vznik a šíření rezistentních kmenů TB má stejné příčiny jako rezistence u ostatních mikroorganismů – tedy velmi často nedostupnost či nedodržení správné terapie.

V roce 2017 se vyskytlo 558 tisíc případů RR-TB, z toho 82 % bylo zároveň MDR-TB. Mezi novými případy TB v roce 2017 bylo průměrně 3,5% MDR/RR-TB, u osob s opakovanou (tj. dříve léčenou) TB byl tento poměr 18 % [6]. Čísla týkající se rezistence TB jsou v některých zemích světa alarmující. Obr. 3 uvádí, jaká část nově vzniklých případů TB za poslední období v daném státu vykazovala multilékovou rezistenci (MDR-TB) nebo rezistenci k rifampicinu (RR-TB). Srovnáním Obr. 3 s Obr. 1 zjišťujeme, že míra rezistence v jednotlivých státech neodpovídá incidenci TB. Jinými slovy, i země, které mají relativně nízkou incidenci TB, mohou být významným zdrojem MDR kmenů TB. Při uvážení geografické polohy ČR je takovým příkladem vhodným zdůraznění Ruska a země bývalého Sovětského bloku, které spadají do skupiny s druhou nejnižší incidencí TB (25–99 případů na rok a 100 tisíc obyvatel), ale z hlediska výskytu MDR/RR-TB u nových případů patří do kategorie s nejvyšším zastoupením (≥ 18 %). V Rusku za poslední sledované období bylo 33 % všech nových (dříve neléčených) případů tuberkulózy MDR/RR. U dříve léčených případů TB bylo dokonce 67 % případů na území Ruska MDR/RR.

Percentage of new TB cases with MDR/RR-TB^a



^a Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries. Data cover the period 2002–2018.

Obr. 3. Podíl případů MDR/RR-TB na celkovém počtu případů (v %) za poslední sledované období. Převzato pod licencí CC BY-NC-SA 3.0 IGO z [6].

1.2. Léčba tuberkulózy a vývoj nových antituberkulotik

Léčba nekomplikované (na léky citlivé) TB trvá obvykle 6 měsíců. Základní léčebný režim primoinfekce TB se skládá z **intenzivní fáze** (2 měsíce, čtyřkombinace isoniazid – INH, rifampicin - RIF, pyrazinamid - PZA, ethambutol - EMB) a **pokračovací fáze** (min. 4 měsíce, dvojkombinace INH a RIF). V případě rezistentních forem TB (MDR-TB) se léčiva do intenzivní fáze vybírají na základě průkazu citlivosti z antituberkulotik první volby (INH, RIF, PZA, EMB) a doplní se antituberkulotiky druhé volby tak, aby byla nasazena alespoň čtyři účinná léčiva, která vzájemně nevykazují zkříženou rezistenci. Intenzivní fáze u terapie MDR trvá minimálně 6 měsíců a často obsahuje injekčně podávaná léčiva (ze skupiny aminoglykosidových antibiotik). Nejkratší doporučené léčebné režimy (WHO) pro MDR/RR-TB trvají 6–9 měsíců [10]. Je zřejmé, že takto dlouhá léčba, navíc často spojená s pravidelnou parenterální aplikací léčiv, je náročná pro pacientovu compliance. Struktury antituberkulotik 1. volby a výčet antituberkulotik 2. volby lze najít v našem přehledovém článku [68P24].

Vývoj nových antituberkulotik (a antimikrobních léčiv obecně) je komplikovaný a pro farmaceutické společnosti ne vždy dostatečně rentabilní. Ve druhé polovině 20. století vývoj nových antituberkulotik ustrnul, což lze demonstrovat faktem, že mezi klinickým uvedením rifampicinu (1967) a časově následujícího antituberkulotika bedachilinu (2012) je časová mezera

45 let. S rozvojem antimikrobní rezistence (AMR) se však vývoj nových antimikrobních léčiv stal opět prioritou.

Mezi nová antituberkulotika v preklinickém a klinickém vývoji patří především bedachilin (diarylchinolin), ortho-kondenzované bicykly obsahující nitroimidazol (delamanid, pretomanid, TBA-354), oxazolidinony (sutezolid, AZD5847). Velmi perspektivní skupinou jsou i inhibitory dekaprenylfosforyl- β -D-ribose oxidasy (DprE1), zejména benzothiazinonového typu (PBTZ169). Podrobnosti jsou uvedeny v našem přehledovém článku [P24].

Vývoj nového léčiva (NCE, New Chemical Entity) je náročným a nákladným procesem s nejistým výsledkem. Alternativním přístupem je tzv. **drug repurposing (repositioning)**, což je využití již známého léčiva v nové indikaci. Jedná se o moderní trend, který minimalizuje náklady na vývoj léčivého přípravku. V přehledovém článku [P24] jsme shrnuli nejvýznamnější skupiny léčiv, jejichž novou indikací by mohla být terapie TB. Mechanismem účinku je často nikoliv přímé ovlivnění patogenu (*Mtb*), ale ovlivnění hostitele, například změnami (normalizací) jeho imunitního systému.

1.3. Mechanismus účinku PZA

Pyrazinamid (PZA) je antituberkulotikum první linie a je součástí iniciační (intenzivní) fáze všech základních terapeutických režimů TB. Přestože je klinicky užíván již od 50. let 20. století, jeho mechanismus účinku není dosud plně objasněn.

Mechanismům účinku PZA, POA a jejich derivátům jsem věnoval svou přednášku, která byla postupně doplňována a aktualizována o nové poznatky. Nejvýznamněji byla tato přednáška přednesena jako vyžádaný příspěvek (plenární přednáška) na konferenci 46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis, Bratislava, Slovensko v září 2017. Rozšířený abstrakt přednášky byl publikován [P32]. Protože se jedná o stěžejní východiska pro moji práci a nové informace v posledních letech přibývají poměrně rychle, rekapituluji a aktualizuji toto téma v nadcházejících kapitolách 1.3.1 až 1.3.7.

1.3.1. Strukturně nespecifický účinek

Účinek PZA byl dlouhou dobu považován za strukturně nespecifický, založený na fyzikálně-chemických, především acidobazických, vlastnostech jeho metabolitu – kyseliny pyrazin-2-karboxylové (POA). Tyto účinky byly popsány v teorii Zhanga a kol. [11-13]. PZA prostupuje pasivní difuzí přes mykobakteriální stěnu, v cytoplasmě mykobaktéria je hydrolyzován pyrazinamidásou (nikotinamidasa, PncA, EC 3.5.1.19) na POA. Ta je ve formě karboxylátu (POA⁻) vypuzována aktivním **efluxním systémem** do extracelulárního prostoru. Je-li pH extracelulárního prostředí dostatečně nízké, nezanedbatelná část POA⁻ (ale stále se jedná dle

Handerson-Hasselbalchovy rovnice o desetiny procent, viz Tab. 1) je protonizována (HPOA) a v elektricky neutrální formě prochází zpět do mykobakteriální buňky (pravděpodobně pasivním transportem či prostou difuzí). Pokud influx HPOA převáží nad efluxem POA⁻, dochází k akumulaci POA⁻ v cytoplazmě mykobaktéria.

Tab. 1. Poměr HPOA/POA⁻ v závislosti na pH

pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
HPOA /POA ⁻ (%)	0,788	0,251	0,079	0,025	0,008	0,003

Je známo, že u kmenů *M. tuberculosis* je efluxní mechanismus pro POA⁻ málo účinný (defektní) v porovnání s jinými druhy mykobaktérií [11]. Sníženým vypuzováním POA⁻ je tak vysvětlována unikátní (ve vztahu k ostatním druhům mykobaktérií) citlivost *M. tbc* k PZA. Je znepokojující, že efluxní systém, který významně ovlivňuje citlivost mykobakteriálních kmenů k PZA, nebyl dosud identifikován. Neúplné informace přinesla studie Zhanga a kol. z roku 2017 [14], kde autoři pomocí proteomických metod identifikovali čtyři různé proteiny, které se do určité míry podílejí na efluxu POA⁻. Zvýšená exprese těchto kandidátních proteinů mírně snižovala citlivost *M. tbc* *iH37Rv* vůči PZA, naopak použití známých nespecifických inhibitorů efluxních pump (reserpin, verapamil) vedlo k mírnému zvýšení citlivosti. Nadále je třeba provést studie, které by určily, které z kandidátních efluxních proteinů (nebo zda jiný, dosud nepopsaný protein) jsou klinicky významné pro určení citlivosti k PZA. Je ovšem nesporné, že podpoření účinku PZA i jiných antimykobakteriálních léčiv pomocí inhibitoru efluxu je lákavou strategií – viz přehledový článek [15]. V literatuře nejčastěji zmiňovanými inhibitory efluxních systémů mykobaktéria jsou verapamil (blokátor vápníkového kanálu) [16-21] a tricyklická antipsychotika fenothiazinového typu (thioridazin, chlorpromazin) [22-25].

Teorie strukturně nespecifického účinku PZA a jeho metabolitu POA předpokládá, že baktericidní efekt je způsoben akumulací POA v intracelulárním prostoru mykobaktéria, následnou **acidifikací** cytoplazmy, **narušením** protonového gradientu (**membránového potenciálu**) na membráně organel a narušení transportních procesů, které jsou na tomto gradientu závislé [11, 12]. Teorie strukturně nespecifického mechanismu účinku je podporována skutečností, že PZA je účinnější v kyselém prostředí (vyšší podíl neionizované POA pro prostup membránou) [26], a že PZA je účinný na dormantní subpopulace mykobaktérií s nízkou energetickou úrovní metabolismu (je k dispozici méně energie pro aktivní eflux). Tyto argumenty ovšem stejně tak podporující teorie o specifických MÚ, kde aktivním sloučeninou je POA (viz dále).

Dlouho uznávaná teorie nespecifického účinku PZA/POA byla podporována též skutečností, že se nedařilo izolovat životaschopné mutanty *Mtb* s rezistencí vůči POA. To bylo vysvětlováno (mimo jiné) tím, že pro POA neexistuje specifický cíl, jinými slovy tím, že POA je strukturně nespecifické léčivo. Teorie strukturně nespecifického účinku PZA/POA byla zpochybněna v roce

2015 ve studii Petersona et kol. [27], kteří přímým měřením intracelulárního pH pomocí pH-senzitivního fluorescenčního proteinu prokázali, že při inkubaci (2 hod.) mykobaktérií s PZA nedochází k acidifikaci cytoplazmy vůbec a při inkubaci s POA byla mírná acidifikace pozorovatelná pouze při užití koncentrace 10x převyšující MIC. Po několikadenní inkubaci s PZA/POA byla acidifikace pouze mírná a pravděpodobně biologicky irrelevantní.

První informace o specifických cílech, které by mohly být místem účinku PZA/POA, se počaly objevovat přibližně od roku 2000 – jednalo se o syntasu mastných kyselin I (FAS I). Po roce 2010 poté rychlým tempem přibývaly další návrhy potenciálních cílů s různou mírou prokázanosti a také s různou mírou využitelnosti pro racionální návrh nových derivátů PZA/POA.

1.3.2. Inhibice syntasy mastných kyselin I (Fatty Acid Synthase I)

Cíl pro: PZA, 5-Cl-PZA, *n*-alkylpyrazinoáty, pravděpodobně **ne pro** POA.

Mykobakteriální syntasa mastných kyselin typu I (Fatty Acid Synthase I) byla pravděpodobně prvním konkrétním subcelulárním cílem, který byl navržen pro strukturně specifický mechanismus účinku PZA či POA. FAS I je typicky eukaryotický systém syntézy mastných kyselin. Jedná se o protein skládající se ze šesti různých katalytických domén, které uskutečňují syntézu mastných kyselin. Oproti tomu prokaryotický systém FAS II je soubor šesti oddělených enzymů, které spolu souvisí pouze funkčně a prostorově, kdy každý z těchto enzymů katalyzuje jednu reakci elongačního cyklu syntézy mastných kyselin. Některé organismy, mezi nimi i rod *Mycobacterium*, obsahují oba systémy FAS I i FAS II. V mykobaktériích produkuje FAS I C₁₂ až C₁₆ mastné kyseliny, které jsou ve formě acyl-CoA předávány do systému FAS II, který je dále prodlužuje a syntetizuje tak mykolové kyseliny [28].

FAS I byla navržena jako cílový protein pro PZA, POA, a jejich jednoduché strukturní deriváty jako 5-Cl-PZA nebo *n*-alkyl estery POA. V roce 2000 Zimhony a kol. publikoval, že rezistence na 5-Cl-PZA je vázána na mutaci v plazmidovém genu *fas1* a že 5-Cl-PZA inhibuje izolovanou FAS I [29]. Inhibice FAS I byla v této studii pozorována i pro PZA a POA, ale pouze ve vysokých koncentracích (1000, resp. 1500 µg/ml). Boshoff a kol. inhibiční aktivitu na izolované FAS I potvrdili pouze pro 5-Cl-PZA, nikoliv pro PZA [30]. Další studie z roku 2007 ukázaly na FAS I inhibiční aktivitu POA a jejich esterů, především *n*-propylesteru [31, 32].

Inhibice FAS I tedy byla navržena jako mechanismus účinku PZA poprvé v roce 2000 [29]. První poznatky o možném mechanismu této inhibice na molekulární úrovni přišly až po roce 2011 ve studiích Sayahi a kol., kteří interakce PZA a jeho derivátů s FAS I studovali pomocí diferenční NMR spektroskopie (STD-NMR, Saturation-Transfer Difference). Bylo zjištěno, že PZA soutěží o vazebné místo s kofaktorem NADPH (na rozdíl od POA, která se váže na jiné vazebné místo) [33]. Kompetice s NADPH byla později potvrzena i pro 5-Cl-PZA a alkylestery POA [34]. Potvrzení kompetice PZA s NADPH nám upřesňuje vazebné místo PZA a jeho derivátů na FAS I

v tom smyslu, že ze šesti katalytických domén FAS I pouze dvě, enoyl reduktasová doména (ER) a ketoacyl reduktasová doména (KR) mají vazebná místa pro NADPH. Místem zásahu PZA a jeho derivátů by tedy měla být jedna z těchto domén (nebo obě domény).

Praktické využití těchto informací pro racionální návrh léčiv je omezené nedostupností dostatečně kvalitní 3D struktury proteinu FAS I. FAS I je velmi velký protein (biologicky relevantní formou je homohexamer o celkové hmotnosti 6 MDa) a jako takový je velmi obtížně krystalizovatelný pro potřeby rentgenové krystalografie. Prozatím je tedy nutné spolehnout se na 3D modely FAS I založené na kryo-elektronové mikroskopii. V roce 2013 byl publikován 3D model FAS I *M. smegmatis* s průměrným rozlišením 7.5 Å [35] a 3D model FAS I *Mtb* s průměrným rozlišením 17–27 Å [36] Jedná se tedy o modely s nedostatečným rozlišením pro metody návrhu léčiva založeného na struktuře receptoru (SBDD, Structure-based Drug Design) – zde je obecně doporučováno, aby rozlišení bylo menší nebo rovno 2,5 Å. Naděje lze vkládat do progresivně se zlepšujících metod pro studování struktury proteinů pomocí kryo-elektronové mikroskopie, které v posledních letech začínají poskytovat struktury s rozlišením blízcím se struktur řešených rentgenovou krystalografií. V roce 2018 byl publikován 3D model FAS I *Mtb* získaný pomocí kryo-elektronové mikroskopie s rozlišením 3,3 Å (pdb: [6GJC](#)) [37]. Tento model je dostatečně kvalitní na to, aby po příslušných úpravách (energetické minimalizace, relaxace pomocí molekulární dynamiky) mohl sloužit pro *in silico* studium interakcí mezi deriváty PZA a mykobakteriální FAS I.

Inhibice FAS I byla prvním specifickým mechanismem účinku navrženým pro PZA a jeho deriváty. I přesto, že později byly navrženy nejméně tři jiné specifické MÚ, zůstává FAS I stále v popředí vědeckého zájmu vybraných vědeckých skupin. V roce 2018 byla publikována úspěšná exprese rekombinantní *Mtb* FAS I v *E. coli*. Izolovaná FAS I byla plně biologicky aktivní [38]. Oproti dřívějším postupům, které jsou odkazovány v citované práci, je výhodou snadná purifikace proteinu a získání jeho plně aktivní formy, včetně fosfopantothénátu vázaného na serin ACP domény. V publikaci je opět připomínána inhibice FAS jako mechanismu účinku PZA, POA a jejich derivátů.

Poznatky využitelné pro návrh derivátů PZA jako potenciálních inhibitorů FAS I, založeno na STD-NMR experimentech:

- Vodík H3 pyrazinamidu interaguje s FAS I (tj. směřuje ke stěně vazebného místa) [33, 34]. Substituce vodíku H3 větším substituentem by tedy pravděpodobně vedla ke změně polohy a orientace takového derivátu (změna vazebného módu) a tím znemožnila inhibici FAS I.
- Substituce PZA v poloze 5 je výhodná. 5-Cl-PZA interaguje s FAS I stejně jako PZA [34] a je účinnějším inhibitorem FAS I než PZA [34].

- *n*-alkylpyrazinoáty byly schopny interagovat se stejným vazebným místem FAS I jako PZA, i když docházelo k vychýlení pozice pyrazinového jádra. To znamená, že i deriváty PZA/POA s objemnou substitucí karboxylové či karboxamidové funkční skupiny mohou teoreticky být inhibitory FAS I [34].

1.3.3. Inhibice trans-translace

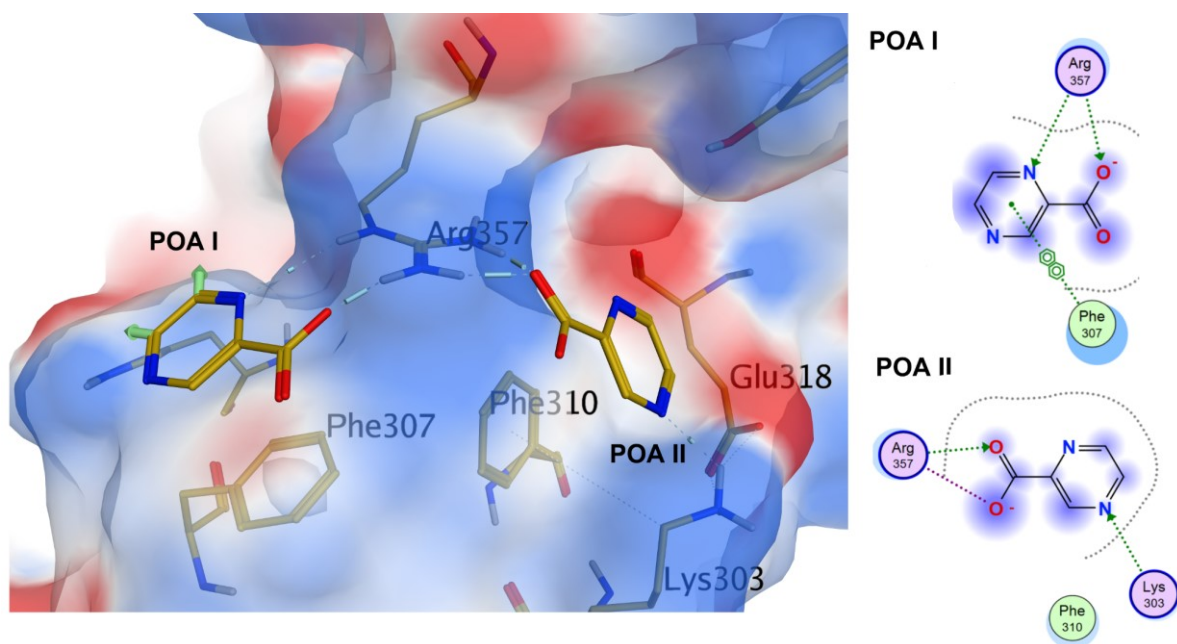
Cíl pro: POA, **ne pro** PZA.

Trans-translace je proces, který umožňuje v průběhu translace uvolnit z ribosomu defektní mRNA [39]. Trans-translace je důležitá pro životaschopnost a virulenci mikroorganismů a jejich schopnost přežít ve stresových podmínkách (při kterých vzniká více chyb v průběhu transkripce a translace DNA). V roce 2011 publikoval Shi a kol. studii [40], ve které prováděl afinitní chromatografii mykobakteriálního lyzátu (*Mtb*) na pevné fázi obsahující etherovou vazbou vázaný zbytek kys. 5-hydrohypyrazin-2-karboxylové. Sledovali tak, které proteiny mají výraznou afinitu k POA a mohly by tak být místem účinku POA, potažmo PZA. Jako hlavní kandidát byl identifikován protein RpsA (ribosomální protein S1), jehož funkcí během trans-translace je zprostředkovat vazbu mezi 30S podjednotkou defektního ribosomu a tmRNA (tmRNA je krátká sekvence RNA, která v sobě zahrnuje funkci tRNA i mRNA a jejíž translací dochází k uvolnění defektního proteinu). Shi a kol. ukázali, že POA se váže na RpsA, čímž zabráňuje vzniku komplexů tmRNA-RpsA a inhibuje trans-translaci [40]. Inhibiční efekt POA byl závislý na koncentraci a byl výrazný při koncentracích 100 a 200 µg/ml. PZA neinhiboval vznik komplexu tmRNA-RpsA ani při nejvyšší testované koncentraci 200 µg/ml.

V roce 2015 byla vyřešena a publikována krystalografická struktura komplexu POA-RpsA (pdb: [4NNI](#)) [41]. Bylo prokázáno, že dvě molekuly POA se vážou na C-koncovou doménu RpsA v oblasti, která je důležitá pro interakci s tmRNA – viz Obr. 4.

Poznatky využitelné pro návrh derivátů POA jako inhibitorů trans-translace (interakce s RpsA):

- POA lze substituovat v poloze 5 či 6 pyrazinového jádra (viz exit-vektory u POA I na Obr. 4)

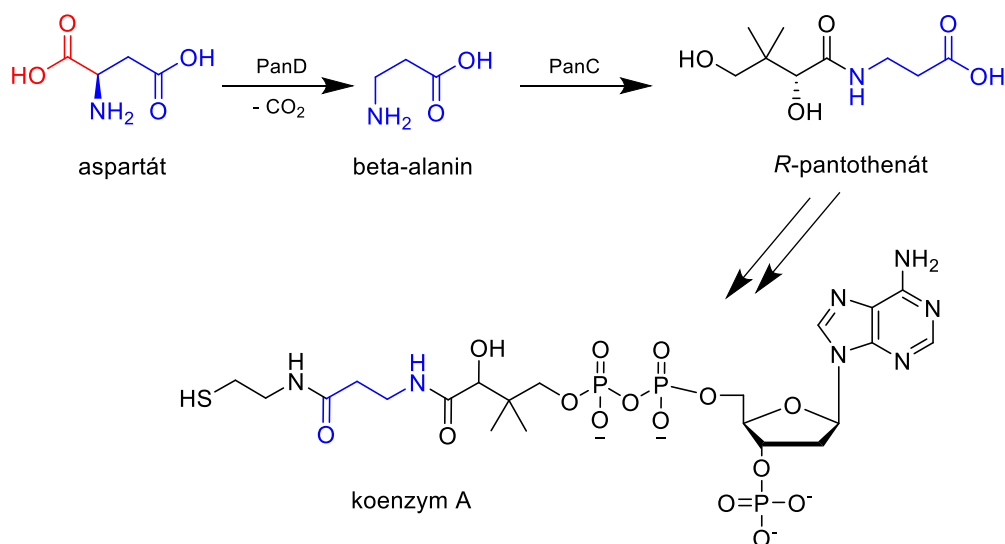


Obr. 4. Molekulární interakce POA s C-koncovou doménou ribosomálního proteinu RpsA (pdb: [4NNI](#)), včetně interakčních diagramů ligand-receptor. Zelené šipky jsou exit-vektory, místa možné substituce.

1.3.4. Inhibice aspartát dekarboxylasy (PanD)

Cíl pro: POA, **nikoliv PZA**

Aspartát dekarboxyláza (PanD) je klíčovým enzymem v biosyntetické dráze koenzymu A [42]. Dekarboxylací aspartátu vzniká β -alanin, který je v dalších stupních biosyntetické dráhy přeměněn na *R*-pantothenát, který je součástí koenzymu A (Obr. 5). Biochemické dráhy zahrnující aspartát jsou pro mykobakterie velmi důležité a samotná PanD je považována za virulentní faktor *Mtb* [42]. V roce 2013 byla PanD navržena jako možný cíl PZA/POA na základě sekvenování PZA-rezistentních mutantů *Mtb*, které obsahovaly mutace v genu *panD* [43]. Shi a kol. publikovali v roce 2014 studii [44], ve které prokázali, že POA inhibuje enzymatickou aktivitu PanD již v koncentracích 25 $\mu\text{g/ml}$. PZA nebyl v tomto smyslu aktivní ani při koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Inhibiční efekt POA na růst mykobakterií (*Mtb*) byl antagonizován přidávkem β -alaninu nebo pantothenátu do živného média (agaru). To naznačuje, že pozorovaná inhibice PanD vykazuje biologický efekt v podobě inhibice růstu mykobaktérií a že místem zásahu je biosyntetická dráha koenzymu A. PanD tedy byla navržena jako cíl POA. Dalším nepřímým důkazem pro PanD jako cíl POA byla izolace POA-rezistentních mutantů, které obsahovaly mutace v genu *panD*. Zvýšená exprese *panD* poté vedla k rezistenci *Mtb* vůči POA [44]. Afinita POA k PanD byla potvrzena i metodou isothermické titrační kalorimetrie (ITC) [45]. Inhibice aspartát dekarboxylázy byla tedy etablována jako možný mechanismus účinku POA a jejího proléčiva PZA.



Obr. 5. Zapojení aspartát dekarboxylasy (PanD) do biosyntetické dráhy koenzymu A

Uvědomme si, že koenzym A je nepostradatelným kofaktorem pro (mimo jiné) syntézu mastných a mykolových kyselin. Inhibice PanD (tedy inhibice syntézy koenzymu A) by se v konečném důsledku mohla projevit jako narušení syntézy mastných a mykolových kyselin [45] - tedy stejným důsledkem jako inhibice FAS I.

Molekulární mechanismus interakce POA s PanD není znám. Ve výše zmíněné studii byly určeny aminokyselinové zbytky, které jsou mutovány u POA-rezistentních kmenů. Tyto zbytky se dle autorů nacházejí v oblasti důležité pro vázání POA, ale nikoliv pro enzymatickou aktivitu samotnou – izolované mutanty tedy neváží POA, ale mají zachovanou enzymatickou aktivitu [44].

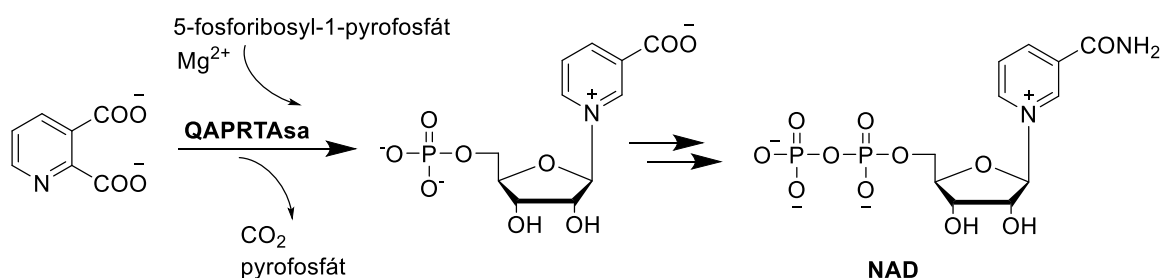
Krystalografická struktura komplexu POA-PanD není známa. V PDB databázi je k dispozici apo-struktura PanD z *Mtb* o rozlišení 2,99 Å (pdb: [2C45](#)). Oblast, ve které se dle analýzy mutantů nachází aminokyselinové zbytky nutné pro vázání POA, není v krystalografické struktuře viditelná [44]. *In silico* studie z roku 2016 [46] se pokoušela určit vazebné místo pro POA pomocí molekulárního dockingu, následovaného MD simulací. Dle mého názoru však byly tyto výsledky nejednoznačné a s dostatečnou mírou jistoty neurčily vazebné místo pro POA. Pro racionální modifikace POA za účelem zvýšení afinity k PanD bude tedy pravděpodobně třeba vyčkat na to, až bude krystalograficky vyřešena struktura komplexu POA-PanD.

1.3.5. Inhibice QAPRTasy

Chinolinát fosforibosyl transferasa (Quinolate Phosphoribosyl Transferase; EC 2.4.2.19, QAPRTasa) je enzym biosyntetické dráhy nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺). QAPRTasa katalyzuje na Mg²⁺ závislý přenos fosforibosylu na dusíkový atom chinolinové kyseliny za

současné dekarboxylace za vzniku mononukleotidu kyseliny nikotinové. Ten je pak následnými reakcemi přeměňován na NAD⁺ (Obr. 6).

V roce 2014 popsal Kim a kol. inhibiční aktivitu PZA a POA na QAPRTasu. Při neutrálním pH snižoval PZA aktivitu s hodnotou IC₅₀ = 0,38 mM, POA vykazala IC₅₀ řádově desetkrát vyšší (jednotky mM). Vzhledem k hodnotám IC₅₀ se tedy jedná o spíše nevýraznou aktivitu. Od roku 1998 je známa krystalografická struktura mykobakteriální (*Mtb*) QAPRTasy v komplexu s jejími substráty a tedy i kys. chinolinovou (pdb: [1QPR](#), 2,45 Å) [47]. Kim a kol. provedli molekulární docking PZA do aktivního místa QAPRTasy. Vazebné místo PZA předpovězené molekulárně dokovací studií se překrývalo s experimentálně zjištěným vazebným místem chinolinové kyseliny.



Obr. 6. Zapojení chinolát fosforibosyl transferasy (QAPRTasy) do biosyntetické dráhy NAD⁺

1.3.6. Další možné cíle PZA/POA

Další možné cíle PZA či POA byly často předpovězeny na základě sekvenování genomu mutantů *Mtb* s rezistencí k PZA/POA. Nejčastějším zdrojem PZA/POA rezistence na úrovni genů jsou mutace v genech *pncA* (kódující pyrazinamidasu PncA, enzym aktivující PZA na POA), *rpsA* a *panD*. Stále častěji se však u PZA/POA rezistentních kmenů daří identifikovat nové mutace v dalších genech. Zde je nutné podotknout, že se převážně jedná o mutanty s nízkou úrovní rezistence (MIC_{*Mtb*} = 200–300 µg/ml, pH 6) [48]. Není jasné, zda jsou tyto mutace významné v tom smyslu, že by příslušné proteiny měly být považovány za další (doplňkové) cíle PZA/POA.

GpsI (Rv2783) je protein, u něhož je předpokládána polymerizační a fosforylační aktivita na DNA i RNA. Rv2783 byl zachycen jako možný cíl POA již při afinitní chromatografii provedené Shi a kol. v roce 2011 [40] – viz kapitola 1.3.3. Tuto teorii dále rozpracoval Njire a kol. [49], který publikoval zjištění, že záměna jedné aminokyseliny v sekvenci tohoto enzymu (Asp67Asn) vede k rezistenci vůči POA. Asp67 má být důležitý k vázání POA, ale nikoliv pro katalytickou aktivitu. ITC experimentem bylo potvrzeno, že POA (a nikoliv PZA) se váže (ač slabě) do tohoto enzymu *Mtb*. POA nevykazovala afinitu ani k mutantní variantě (Asp67Asn) tohoto enzymu, ani k homolognímu enzymu z *M. smegmatis* [49]. To je v souladu s faktem, že *M. smegmatis* je přirozeně rezistentní vůči PZA.

ClpC1 (Rv3596) je ATP-dependentní ATPasa, která je součástí kaseinolýtického proteasového komplexu. Mutace v genu *clpC1* byly nalezeny u některých *Mtb* kmenů s nízkou rezistencí vůči PZA [48, 50, 51]. Afinita PZA/POA k ClpC1 zatím nebyla zjišťována a nic není známo o možné interakci na molekulární úrovni.

1.3.7. Mechanismus účinku PZA – shrnutí

Z výše uvedeného vyplývá, že pohled na MÚ PZA se během posledních 20 let velmi proměnil. Bylo popsáno mnoho potenciálních subcelulárních cílů (většina z nich v roce 2011 či později). Z původně strukturně nespecifického léčiva se tak stává „multitarget“ inhibitor několika klíčových systémů *Mtb*. Debata o MÚ PZA je stále živá, některé mechanismy jsou vyzdvihovány (PanD [52]) a jiné rozporovány (trans-translace [53]). Je však nesporné, že nové poznatky mohou výrazně přispět k racionálnímu návrhu derivátů PZA/POA se zlepšenými účinky.

2. KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM

2.1. Metody syntéz cílových sloučenin

V naprosté většině případů byly využívány reakce dříve popsané v odborné literatuře. Některé typové reakce, které jsme rutinně využívali při syntéze derivátů pyrazinamidu, budou shrnuty a popsány níže se zaměřením na praktické aspekty těchto syntéz.

2.1.1. Halogenace pyrazinového jádra

Chlor na pyrazinovém jádře může být poměrně snadno nahrazen mechanismem nukleofilní aromatické substituce vhodným nukleofilem – dusíkatým (snáze) či kyslíkatým (obtížněji). V našich syntézách byla často využívána substituce chloru za amino, alkylamino, či arylalkylamino substituent. Pyrazinové jádro je elektron-deficientní díky přítomnosti dvou atomů dusíku a snadněji tedy podléhá substitucím nukleofilním než elektrofilním. Přítomnost halogenu vede ke vzniku významného parciálního kladného náboje na příslušném atomu uhlíku. Takovýto uhlík je místem ataku nukleofilu. Halogenderiváty (z hlediska dostupnosti nejčastěji chlorderiváty) pyrazinu jsou tedy důležitými stavebními bloky pro syntézu derivátů pyrazinu.

Chlorace pyrazinu se provádí nejčastěji působením vhodného chloračního činidla (POCl_3) na *N*-oxid pyrazinového derivátu [54-56]. Regioselektivita chlorace pyrazinového jádra závisí na stupni *N*-oxidace výchozího pyrazinu (monooxid či 1,4-dioxid) a na charakteru dalších substituentů na pyrazinovém jádře.

V našem případě se vzhledem k zaměření našeho výzkumu jednalo o chlorace *N*-oxidů pyrazin-2-karbonitrilu, pyrazin-2-karboxamidu, či pyrazin-2-karboxylové kyseliny, tedy výchozích sloučenin s elektron-odtahujícími substituenty. Takové substituenty směřují chloraci převážně do polohy *meta* vůči sobě samým [56]. Většinou však vzniká směr polohových isomerů. Jako příklad uvádím chloraci pyrazin-2-karboxamidu (PZA), kterou jsme využili pro získání výchozích chlorderivátů (Schéma 1) [P6]. PZA byl oxidován peroxidem vodíku v kyselině octové. Vzniklé *N*-oxidy PZA nebyly charakterizovány. V druhém kroku dochází působením POCl_3 k halogenaci pyrazinového jádra a zároveň k dehydrataci karboxamidu na karbonitril. Směs produktů byla dělena chromatograficky. Převažoval 6-chlor isomer (přibližně 50 %), následovaný 3-chlor isomerem (35 %) a 5-chlor isomerem (15 %). Nízké zastoupení 5-Cl isomeru v této směsi bylo důvodem, proč jsme se syntéze 5-Cl derivátů PZA a POA začali věnovat později než 6-Cl isomerům, i když jsme byli přesvědčeni, že právě 5-Cl isomery by mohly být zajímavé vzhledem k tomu, že 5-Cl-PZA je silnějším inhibítozem FAS I než nesubstituovaný PZA [34]. K syntéze 5-Cl derivátů PZA a POA jsme přistoupili až poté, kdy byla za přijatelnou cenu dostupná (Sigma-Aldrich) kys. 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová (5-OH-POA), u které jsme prováděli substituci 5-OH za 5-Cl (působením chloridu thionylu či oxalylchloridu).

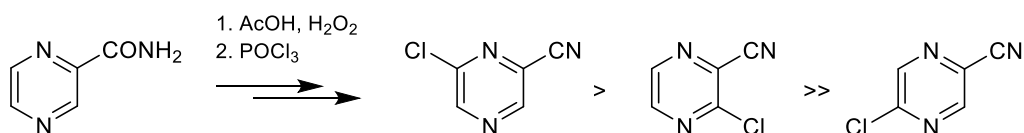


Schéma 1. Chlorace pyrazin-2-karboxamidu

Selektivní *N*-oxidací pyrazinového jádra lze zvýšit regioselektivitu chlorace. Tento postup jsme využili při přípravě 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny [P9]. Selektivní *N*-oxidace POA peroxidem vodíku za katalýzy wolframanem sodným (NaWO_4) v kyselém prostředí následovaná chlorací *N*-oxidu pomocí POCl_3 dala vzniknout preferenčně 6-Cl-POA [57].

2.1.2. Příprava substituovaných amidů karboxylových kyselin

Při přípravě substituovaných amidů POA jsme většinou vycházeli z karboxylové kyseliny, která byla některým z běžně používaných aktivačních činidel (chlorid thionylu, oxalyl chlorid, 1,1'-karbonyldiimidazol) převedena na reaktivní meziprodukt (chlorid kyseliny, resp. imidazolyl). Tento meziprodukt následně reagoval s vhodným aminoderivátem (amoniakem, *n*-alkylaminem, anilinem, benzylaminem).

Ve většině případů jsme volili převedení příslušné pyrazin-2-karboxylové kyseliny na její chlorid působením nadbytku chloridu thionylu (SOCl_2). Příslušná POA se dispergovala v bezvodém toluenu (PhMe), byl přidán SOCl_2 a za intenzivního míchání (které brání usazování pevné výchozí látky a následnému uhelnatění) se směs zahřívala pod zpětným chladičem při teplotě 95–110 °C po dobu asi jedné hodiny. Probíhající reakce je indikována postupným „rozpuštěním“ výchozí kyseliny (kyselina je v PhMe nerozpustná, její chlorid ano) a tmavnutím reakční směsi, která přechází do žlutého, hnědo-červeného až fialového zbarvení (dle výchozí kyseliny). Ve většině případů jsme pro urychlení převodu karboxylové kyseliny na její chlorid užívali katalytické množství *N,N*-dimethylformamidu. Po odstranění přebytku SOCl_2 a rozpouštědla (PhMe) byl surový chlorid kyseliny rozpuštěn v bezvodém rozpouštědle (obvykle acetonu či dichlormethanu) a smísen s roztokem příslušného aminoderivátu ve stejném rozpouštědle. Experimentální popisy převodu různě substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin na jejich chloridy lze nalézt v příslušných publikacích [P1, P2, P5, P7, P9, P10, P11, P12, P13, P18].

V případech, kdy byla jako výchozí látka zvolena hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina, docházelo výhodně při převodu karboxylové kyseliny na chlorid zároveň k substituci hydroxyly chlorem. Komerčně dostupná 5-OH-POA (Sigma-Aldrich, Německo) se tak pro nás stala prekurzorem pro syntézy derivátů odvozených od 5-Cl-POA a 5-Cl-PZA (Schéma 2) [P5, P7, P9, P14].

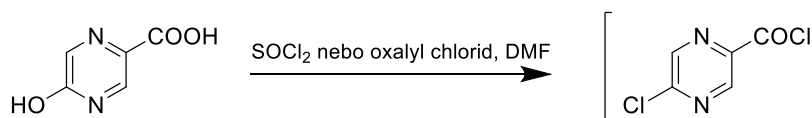


Schéma 2. Příprava chloridu kyseliny za současné substituce hydroxyly chlorem

V laboratoři, kde pracují pregraduální studenti v rámci svých diplomových prací, je třeba kromě efektivity syntéz brát ohled i na snadnost jejich provedení. V některých sériích jsme proto aktivaci karboxylových kyselin prováděli působením ekvivalentního množství (nebo mírného nadbytku, 1,1–1,2 molárního ekvivalentu) oxalyl chloridu za katalýzy DMF při laboratorní teplotě. Ukončení reakce bylo v tomto případě pedagogicky názorně indikováno ukončením uvolňování bublinek plynného CO₂ a CO (šumění). Dále nebylo nutno po ukončení aktivace odpařovat rozpouštědla a odstraňovat nadbytek činidla. K přípravě anilidů 5-alkylpyrazin-2-karboxylových kyselin jsme využili aktivaci karboxylové kyseliny pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu (CDI) v malém množství DMSO. Výhodou byla snazší a bezpečnější manipulace s aktivačním činidlem (CDI je pevná látka) a opět zřetelná indikace probíhající aktivace (uvolňování CO₂). Aktivace pomocí CDI byla využita v diplomové práci M. Halířové [DP1].

V publikaci P19 jsme pro vytvoření amidové vazby využili komerčně dostupný anhydrid 2,3-pyrazindikarboxylové kyseliny, který jsme rovněž připravovali dehydratací pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny působením acetanhydridu (Schéma 3).

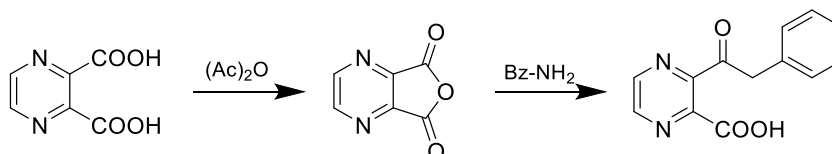


Schéma 3. Příprava amidů přes anhydrid pyrazin-2,3-dikarboxylové kys.

Vlastní aminolýza chloridů kyselin probíhala smísením roztoku (DCM nebo aceton) surového chloridu kyseliny s roztokem příslušného aminu. Aminokomponenta byla přidávána obvykle v množství 0,85–0,9 molárního ekvivalentu vůči navážce výchozí kyseliny, neboť jsme pozorovali, že konverze výchozí karboxylové kyseliny na chlorid nebyla nikdy úplná – předpokládáme, že ztráty byly způsobeny částečným uhelnatěním výchozí látky a/nebo ztrátami těkavého karbonylchloridu při odpařování rozpouštědla (PhMe) po reakci. K vyvazování HCl vnikající při aminolýze chloridu byla ve většině případů užita indiferentní báze (K₂CO₃, triethylamin, pyridin) obvykle v množství 2,5–5 molárního ekvivalentu vůči výchozí kyselině. V P11 jsme pro aminolýzu chlorpyrazinoylchloridu benzylaminem použili dvoufázové podmínky (DCM/voda) dle Shottena-Baumanna s nadbytkem benzylaminu a přísadkou TEA jako báze.

Aminolýza chloridů karboxylových kyselin byla obvykle prováděna při laboratorní teplotě. V případech, kdy byl aminokomponentou aminofenol či hydroxybenzylamin, jsme pro snížení

pravděpodobnosti vzniku esterového vedlejšího produktu reakční směs při mísení roztoků acylchloridu a aminokomponenty a následujících 30 minut chladili na ledu.

Při benzoylaci aminopyrazinů [P21] jsme pozorovali vznik diacylovaných vedlejších produktů (Schéma 4, b). V souladu s literaturou [58] množství diacylovaného vedlejšího produktu rostlo se silou užití báze. Při užití TEA jsme tak pozorovali výhradně vznik diacylovaného produktu, při užití pyridinu převážně monoacylovaný (žádaný) produkt.

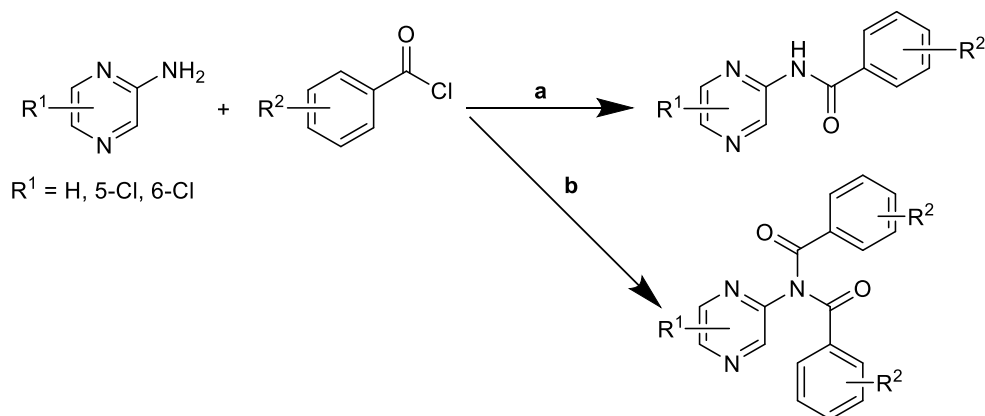


Schéma 4. Vznik diacylovaného vedlejšího produktu

2.1.3. Příprava esterů karboxylových kyselin

Estery pyrazin-2-karboxylových kyselin s krátkými alifatickými alkoholy (MeOH, EtOH, PrOH) jsme v malém měřítku připravovali pomocí mikrovlnami (MW) asistované chemie. Reakce byla prováděna v mikrovlnném reaktoru CEM Discover (CEM Corporation, Matthews, NC, USA; reaktor s fokusovaným polem) v tlakově uzavřené zkumavce. Výhodou je tedy možnost provádět esterifikace v daném alkoholu při výrazně vyšší teplotě, než je teplota varu tohoto alkoholu za atmosférického tlaku. Výchozí karboxylová kyselina byla smísena s nadbytkem příslušného alkoholu a bylo přidáno katalytické množství koncentrované H₂SO₄. Reakce probíhala při teplotě 100–120 °C (tj. za přetlaku) po dobu 30–60 minut. Ve srovnání s klasickou esterifikací dle Fischera bylo dosaženo nižších výtěžků, ale s výraznou časovou úsporou a za snadného provedení. Mikrovlnami asistovaná esterifikace byla využita v [P16, P19] a [DP2].

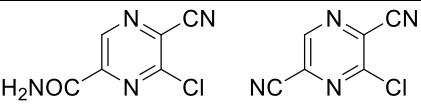
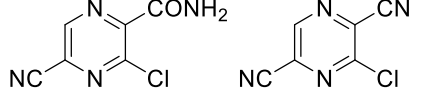
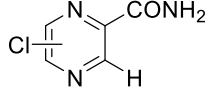
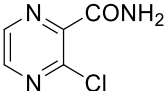
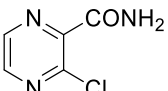
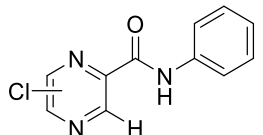
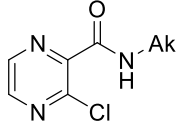
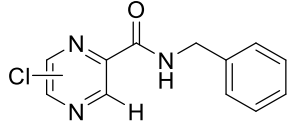
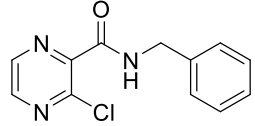
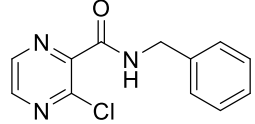
2.1.4. Substituce chloru na pyrazinovém jádře

Nukleofilní substituce halogenu (chloru) na pyrazinovém jádře za aminosubstituent byla jednou z nejčastěji využívaných reakcí v rámci našich syntéz. Reakce byly prováděny s nadbytkem příslušného aminu a/nebo s přidavkem indiferentní báze (k vyvazování vznikajících protonů) – K₂CO₃, triethylaminu či pyridinu. Snadnost provedení nukleofilní substituce je obecně závislá na síle dusíkatého nukleofilu – v našich komentovaných publikacích byly užívány nejčastěji alifatické aminy, alicyklické aminy, benzylaminy, fenylalkylaminy a amoniak (vodný

roztok). Rozdíl mezi těmito skupinami nukleofilů není natolik velký, aby síla užitého nukleofilu byla v našich reakcích určující pro volbu podmínek reakce. Druhým parametrem, na kterém je obecně závislá snadnost nukleofilní substituce, je velikost parciálního kladného náboje na atomu uhlíku, který se má stát místem nukleofilního ataku. Jinými slovy, nukleofilní substituce je tím snazší, čím větší je relativní nedostatek elektronové hustoty na pyrazinovém jádře. Tento efekt jsme v našich reakcích pozorovali velmi intenzivně. Výchozí chlorpyraziny, které byly kromě chlorsubstituentu substituovány dalšími dvěma elektron-akceptorovými substituenty (kombinace $-\text{CONH}_2$, $-\text{CN}$), podléhaly velmi snadno substituci dusíkatými nukleofily již při laboratorní teplotě – významná konverze byla pozorována již po 30 min (viz P3, P4, P6 a řádky 1–2 Tab. 2). Výchozí chlorpyraziny, které kromě chlorsubstituentu obsahovaly již jen jeden další elektron-akceptorový substituent (nejčastěji karboxamid nebo *N*-substituovaný karboxamid), podléhaly substituci méně ochotně a reakce s nimi byly (pro dosažení dobrých výtěžků v přiměřeném čase) prováděny za zvýšené teploty – řádky 3–10 Tab. 2. Dále jsme pozorovali rozdíl v reaktivitě polohových isomerů. 5-Chlor a 6-chlor isomery (řádky 3, 6 a 8 Tab. 2) byly pro nukleofilní substituci vždy reaktivnější než 3-chlor isomery (řádky 4, 5, 7, 9 a 10 Tab. 2). V praxi jsme jako podmínky pro nukleofilní substituce tohoto typu volili (v pořadí dle klesající předpokládané reaktivity výchozího chlorpyrazinu) jako: míchání za laboratorní teploty (THF), refluxování v EtOH (t.v. 78 °C), refluxování v PhMe (t.v. 111 °C), či zahřívání v mikrovlnném reaktoru v MeOH v tlakově uzavřeném systému za přetlaku a teplotě 140–150 °C.

Reakce, ve kterých jako nukleofil vystupoval amoniak, jsme kvůli praktické proveditelnosti (těkavost NH_3 z jeho roztoků za zvýšené teploty) prováděli vždy v tlakově uzavřené zkumavce v mikrovlnném reaktoru. Výchozí chlorpyrazin byl rozpuštěn v MeOH a v nadbytku byl přidán vodný roztok NH_3 (25% m/m). Reakce probíhaly při teplotě 95–160 °C (nejčastěji 140 °C) po dobu 30–60 minut [P9, P13, P14, P16].

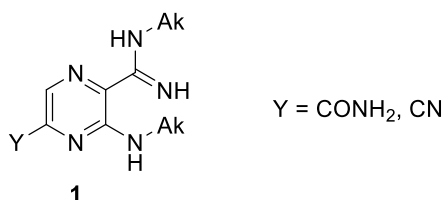
Tab. 2. Reprezentativní podmínky substituce aminoderiváty

Řádek	Výchozí chlorpyrazin	Amin	Podmínky	Báze	Ref
1		alifatické a alicyklické aminy (1 eq)	lab. teplota*, THF, 30 min	TEA (1,2 eq)	P3, P4
2		benzylaminy (1,2 eq)	lab. teplota, THF, 30 min	K ₂ CO ₃ (1,5 eq)	P6
3		alkylaminy, fenyalkylamin; (3 eq)	78 °C, EtOH, 6 hod	TEA (1 eq)	P9
4		alifatické aminy (2 eq)	140 °C, MeOH, 30 min nebo 110 °C, PhMe, 60 min	pyridin (1 eq)	P8
5		benzylaminy (2 eq)	140 °C, MeOH, 30 min nebo 66 °C, THF, 15 h	pyridin (1 eq)	P17
6		alifatické aminy (5 eq, resp. 1,5 eq)	78 °C, EtOH, až 8 hod	TEA (1 eq, resp. 3 eq)	P12, P14
7		alkylaminy (3 eq)	150 °C, MeOH, přetlak, 1 hod	pyridin (1 eq)	P10
8		alkylaminy (5 eq)	78 °C, EtOH, až 8 hod	TEA	P11
9		alifatické aminy (2 eq)	140 °C, MeOH, 30 min	pyridin	P11
10		benzylaminy (3 eq)	150 °C, MeOH, přetlak, 1 hod	pyridin (1 eq)	P18

* reflux pro benzylaminy s elektronegativními substituenty (-NO₂, -CF₃)

eq – molární ekvivalent

Při reakci chlorpyrazinkarbonitrilů s nadbytkem alifatického aminu jsme kromě nukleofilní substituce chloru pozorovali i adici na trojnou vazbu karbonitrilové funkční skupiny za vzniku iminového vedlejšího produktu obecné struktury (**1**) [P3, P4]. Vznik tohoto vedlejšího produktu jsme omezovali užitím pouze molárního ekvivalentu aminu (a přidavkem indierentní báze pro vyvazování H⁺).



Při mikrovlnami asistované syntéze se nám neosvědčilo užití TEA jako báze. V reakční směsi jsme detekovali vedlejší produkty, které odpovídaly substituci chloru *N,N*-diethylaminem či ethylaminem. Je tedy pravděpodobné, že TEA se při zahřívání v mikrovlnném poli částečně dealkyloval a tyto rozkladné produkty reagovaly s příslušným chlorpyrazinem namísto žádaného aminu.

2.2. Metodika hodnocení biologické aktivity připravených derivátů

2.2.1. Antimykobakteriální aktivita

Testování *in vitro* antimykobakteriální aktivity ve Fakultní nemocnici Hradec Králové

Testované kmeny: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. kansasii* Hauduroy (ATCC 12478), *M. avium* ssp. *avium* Chester (ATCC 15769).

Testování antimykobakteriální aktivity jako inhibice růstu mykobakterií *in vitro* je stěžejním testem pro náš výzkum. Základem je mikrodiluční bujónová metoda prováděná v mikrotitrační destičce. V době zahájení mého doktorského studia na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové měla naše pracovní skupina pouze omezený přístup k tomuto testování (Nemocnici Pardubice, Oddělení klinické mikrobiologie). Hlavním problémem byla nedostatečná kapacita tohoto testování. Od roku 2009 jsme testování přemístili na Ústav klinické mikrobiologie (ÚKM) Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK). Hlavní zásluhu na tomto měl prof. Martin Doležal (Farmaceutická fakulta UK) a doc. Vladimír Buchta, tehdejší vedoucí ÚKM. Praktickými aspekty testování byla pověřena MUDr. Pavla Paterová, se kterou jsme zavedli prvotní verzi testování, v podstatě prostým přebráním metodiky z Nemocnice Pardubice. Ve spolupráci s MUDr. Paterovou a doc. Buchtou jsme poté postupně v několika krocích navrhovali metodické změny, které byly zaměřeny na zvýšení kapacity testování, zlepšení opakovatelnosti, omezení

mikrobiologické kontaminace a standardizaci (i ve srovnání s metodikou publikovanou v zahraničních časopisech). Níže uvádím vybrané metodické změny.

Změna kultivačního média – hodnota pH. V prvotní převzaté metodě byla kultivačním médiem **Šulova půda o mírně kyselém pH (5,6)**. Kyselé pH bylo zvoleno, protože je známo, že PZA je *in vitro* významně aktivní pouze v kyselém prostředí. V našem testování při pH 5,6 vykazoval PZA MIC v rozmezí 6,25 až 25 µg/ml, v neutrálním médiu byla však aktivita PZA velmi nízká (MIC > 100 µg/ml). Zvýšená účinnost PZA na úrovni *in vitro* v mírně kyselém prostředí může být vysvětlena větším podílem neionizované HPOA (Tab. 1 na str. 15), která je dostupná pro pasivní vstup do mykobaktéria (farmakokinetický aspekt). Teoreticky tento efekt může nastat u všech léčiv, která obsahují dostatečně kyselou funkční skupinu. Jelikož jsme se v počátcích mého projektu zaměřovali i na deriváty POA s volnou karboxylovou skupinou či na deriváty PZA s volnou karboxamidovou skupinou (kde lze očekávat hydrolyzu na karboxylát), předpokládali jsme, že růstové médium o mírně kyselém pH by mohlo mít na účinek těchto derivátů pozitivní vliv. Dalším vysvětlením zvýšené účinnosti PZA v kyselém prostředí je zvýšená citlivost mykobaktérií v důsledku změněného metabolismu (fenotypu) v důsledku nepříznivých vnějších podmínek - nízké pH (ale i oxidativní stres či nedostatek živin) [52].

V souvislosti s testováním antimykobakteriální účinnosti v médiu se sníženým pH je nutno si položit i otázku, zda jsou získané hodnoty MIC biologicky relevantní – jinými slovy, zda se v prostředí infikovaného organismu v okolí mykobakteriálního infektu snížené pH vyskytuje. Je třeba si uvědomit, že *Mtb* je schopno přežívat intracelulárně v kyselých organelách makrofágů imunitního systému. Pokud bychom chtěli vyvíjeným léčivem zasáhnout právě tuto subpopulaci mykobaktérií, je možno se sníženým pH prostředí počítat. Je nutno ovšem mít na paměti, že léčivo se zamýšleným antimykobakteriálním účinkem uvnitř makrofágů (přesněji řečeno v jejich endosomech či lysosomech), musí překonat zvýšené množství biologických bariér (buněčná membrána makrofágu, membrána endosomu či lysozomu a konečně komplexní obaly mykobaktéria). Návrh a vývoj antimikrobních léčiv s působením na intracelulární mikroorganismy je kvůli tomuto náročný.

Vzhledem k problémům s nastavením hodnoty pH dodávané Šulovy půdy (problémy s opakovatelností) a vzhledem k tomu, že kyselé pH nelze v okolí mykobakteriálního infektu vždy předpokládat, jsme se rozhodli přejít k tekuté půdě o (téměř) neutrálním pH 6,6. Tato změna souvisela i se snahou o sladění podmínek testování s metodikou užívanou nejčastěji v zahraničních odborných publikacích.

Změna kultivačního média – druh tekuté půdy. V původní převzaté metodice byla užívána Šulova půda. Toto médium je (bylo) do určité míry regionálním specifikem. Pro sjednocení podmínek našeho testování s nejčastější metodikou publikovanou v zahraničních odborných

časopisech jsme přešli k tekuté půdě Middlebrook 7H9 o deklarované hodnotě pH 6,6, s přidavkem OADC růstového doplňku (olejová kyselina, albumin, dextrosa, katalasa).

Změna užívaných standardů – pozitivní kontroly inhibice růstu. Při testování v Šulově půdě o kyselém pH jsme jako standard užívali PZA (pro hodnoty MIC viz Tab. 3). PZA je ovšem v neutrálním pH *in vitro* jen velmi málo účinný (v našem testování $MIC_{Mtb} > 100 \mu\text{g/ml}$), proto jsme se změnou pH přešli na standard isoniazid (INH). Jeho výhodou kromě dobré účinnosti v neutrálním pH je i (na rozdíl od PZA) zřetelná inhibice netuberkulózních mykobakteriálních kmenů, které jsou v tomto testu zahrnuty (*M. avium*, *M. kansasii*).

Změna způsobu odečtu. Hodnocení zákalu prostým okem (případně turbidimetricky) bylo nahrazeno nebo doplněno užitím indikátorového barviva resazurinu (Alamar Blue). Jedná se o tzv. MABA – Microplate Alamar Blue Assay, růst bakterií je indikován na základě redukce barviva resazurinu (oxidovaná forma modrá, redukováná růžová). Změnu zbarvení lze hodnotit spektrofotometricky. S vhodným přístrojovým vybavením lze přesnost měření zvýšit měřením změny fluorescence [59]. V našem uspořádání umožnilo nasazení resazurinového barviva hodnotit růst *Mtb* již po pěti až sedmi dnech kultivace, při odečtu na základě zákalu bylo nutno kultivovat 10–14 dní.

Tab. 3. MIC pro standardy ($\mu\text{g/ml}$)

Standard / médium	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. smegmatis</i>
PZA Šula pH 5,6	6,25–12,5	>100	>100	>100
PZA Middlebrook 7H9 pH 6,6, OADC	100	>100	>100	>100
INH Middlebrook 7H9 pH 6,6, OADC	0,2–0,38	6,25–12,5	6,25–25	15,625

PZA – pyrazinamid, INH - isoniazid

Testování *in vitro* antimykobakteriální aktivity na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové

Jedná se opět o mikrodiluční bujónovou metodu prováděnou na mikrotitrační destičce (96 jamek). Vzhledem k vybavenosti a stavebnímu řešení laboratoře mohou být testovány pouze kmeny vyžadující BSL (Biosafety Level) 1 nebo 2. Metodiku ze své zahraniční stáže (Cork Institute of Technology, Cork, Ireland, prof. Aidan Coffey) přivezl, zavedl a rozšířil kolega PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D. Testovanými kmeny jsou *M. smegmatis* (ATCC 607), *M. aurum* (ATCC 23366) a v roce 2018 nově zavedené *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177).

Toto doplňkové testování bylo zaváděno postupně od roku 2014. Na zavedení tohoto testování jsem se osobně prakticky nepodílel, omezím se tedy proto v tomto komentáři na zhodnocení významu testování antimykobakteriální aktivity na těchto modelových kmenech.

Mtb H37Rv (tedy virulentní kmen nejčastěji způsobující lidskou TB), je vysoce patogenní, způsobuje závažné infekční onemocnění, a proto vyžaduje práci ve standardu BSL3. *Mtb* je navíc velmi pomalu rostoucí druh s generační dobou 24–48 h. Na nárůst viditelných kolonií *Mtb* je nutno čekat 3–4 týdny, což je pro výzkum neprakticky dlouhá doba. Proto jsou ve výzkumu TB často užívané různé modelové organismy.

M. smegmatis mc² 155 je rychle rostoucí (s generační dobou 3–4 h), saprofytický (nepatogenní) kmen, který je hojně používán jako modelový organismus ve výzkumu tuberkulózy [60]. S *Mtb* sdílí velký počet genů, včetně genů důležitých virulentních faktorů [60], a obsahuje chemicky a strukturně podobnou stěnu (obaly) s vysokým obsahem lipidové složky. *M. smegmatis* je tak díky rychlému růstu a absenci patogenity velmi vhodným modelovým organismem, i když dle některých názorů ne zcela vhodným pro studium interakcí typu hostitel-patogen [61].

Kompletní genomová sekvence *M. aurum* byla publikována teprve v roce 2017 [62]. Autoři této studie ukázali, že studovaný kmen obsahuje většinu genů, které jsou spojeny s rezistencí *Mtb* vůči užívaným antituberkulotikům. *M. aurum* by tedy mohlo být vhodným modelovým organismem pro výzkum a vývoj nových antituberkulotik. Nízký počet záznamů o aktivitách na *M. aurum* v databázi ChEMBL je možno vysvětlit teprve nedávným popsáním genomu tohoto organismu. Lze předpokládat, že význam *M. aurum* jako modelového organismu bude v blízké budoucnosti narůstat.

M. tuberculosis H37Ra je avirulentní, atenuovaný kmen běžné tuberkulózy. Byl odvozen již v roce 1935 kultivací standardního kmene H37 na chudé vaječné půdě po dobu 3 měsíců [63]. Morfologicky odlišné kolonie poskytly atenuovaný kmen, který nebyl schopen infikovat pokusná zvířata [64]. Tento kmen byl označen jako H37Ra. Kmen, který si po kultivaci zachoval virulenci, byl označen jako H37Rv. Avirulentní kmen oproti virulentnímu není schopen (mimo jiné) dlouhodobě přežít v anaerobních podmínkách a není schopen úniku z fagolysosomů poškozením jejich membrány [65]. Avirulence je podmíněná geneticky a to mnohonásobně [65], spontánní zvrát atenuovaného kmene k zpět na virulentní je tedy velmi nepravděpodobný. *Mtb* H37Ra je tedy geneticky i fenotypově nejbližší model pro studium TB na úrovni *in vitro*.

Tab. 4 ukazuje srovnání četnosti využití různých modelových organismů v porovnání s referenčním kmenem *Mtb* H37Rv. Data byla extrahována z databáze ChEMBL a byla aktuální k 14. 1. 2019.

Tab. 4. Srovnání četnosti využití různých modelových organismů v porovnání s referenčním kmenem *Mtb* H37Rv – dle databáze ChEMBL

Druh a kmen	ChEMBL identifikátor	Počet sloučenin ^a	Počet záznamů o aktivitě ^b
<i>M. smegmatis</i>	CHEMBL613088	2658	4543
<i>M. smegmatis</i> str. mc ² 155	CHEMBL2366793	541	723
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	CHEMBL2366634	1151	2021
<i>M. aurum</i>	CHEMBL612952	137	229
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CHEMBL2111188	13325	23440

^a Počet sloučenin testovaných na daném organismu.

^b Počet záznamů o aktivitě na daném organismus (neodstraněny multiplicitně testované sloučeniny)

Význam testování aktivity vůči shora uvedeným modelovým organismům je pro naši skupinu zatím doplňkový. Nejvíce dat máme k dispozici pro *M. smegmatis*, které v tomto panelu testujeme nejdéle. Dle dosavadních výsledků koreluje aktivita vůči *M. smegmatis* častěji s obecnou antibakteriální aktivitou na Gram-pozitivní bakterie než s aktivitou vůči *Mtb*. I přesto pro nás *M. smegmatis* zůstává důležitým organismem pro svou bezpečnost a snadnost kultivace, která nám umožní provádět pokročilé funkční testy ke zjištění mechanismu antimykobakteriálního účinku našich sloučenin (viz kapitola 3.2).

U nedávno (2018) zavedeného avirulentního kmene *Mtb* H37Ra s potěšením sledujeme, že aktivita koreluje s aktivitou dříve otestovanou na standardním virulentním kmenu *Mtb* H37Rv. To by nám mělo v budoucnu umožnit zvýšit kapacitu skríninku antimykobakteriální aktivity za použití 96-jamkového formátu a instrumentální detekce růstu.

2.2.2. Doplnkové testy

Všechny námi připravené sloučeniny jsou doplňkově testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu *in vitro* vůči vybraným kmenům důležitým pro klinickou praxi (včetně některých rezistentních kmenů jako methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)). Testování je prováděno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Výrazný antibakteriální či antifungální účinek pozorujeme u našich sloučenin pouze ojediněle, na Gram-negativní bakterie pouze zcela výjimečně. Izolované aktivity neumožňují definici vztahů struktura-účinek. Informace o antibakteriální a antifungální aktivitě našich antimykobakteriálně účinných derivátů užíváme k orientačnímu posouzení selektivity jejich účinku.

2.2.3. Vyjadřování minimální inhibiční koncentrace v hmotnostních a molárních koncentracích – diskuse

Pro určování antimykobakteriální aktivity jsme používali mikrodiluční bujónovou metodu s dvojkovým (binárním) ředěním. Výchozí koncentrace testované sloučeniny (pokud to rozpustnost v DMSO umožnila) byla 100 µg/ml pro *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* a *M. avium* a 500 µg/ml pro *M. smegmatis* a *M. aurum*. Výsledná aktivita byla vyjadřována jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) s jednotou µg/ml. U účinných derivátů bylo naším zvykem přepočítat tyto hmotnostní koncentrace na koncentrace molární (µmol/l, µM) tak, abychom zohlednili rozdílnou molární hmotnost jednotlivých sloučenin.

Stávalo se poměrně často, že v procesu oponentních řízení nám bylo primární užití hmotnostních koncentrací vyčítáno s argumentem, že pro porovnání účinnosti sloučenin s rozdílnou molární hmotností je správnější či dokonce nutné užívat molární koncentrace. Chtěl bych zde tento (jistě fakticky správný) argument položit do praktické roviny.

1. Užívání hmotnostních koncentrací k vyjadřování MIC je v mikrobiologii velmi časté.
2. Příprava vzorku je jednodušší, neboť se vždy navažuje přibližně přesně stejné množství sloučeniny.
3. Určování MIC ve dvojkovém ředění je z vlastního principu nepřesná metoda a tato vnitřní nepřesnost je v praxi obvykle mnohem větší, než nepřesnost vnesená porovnáváním účinnosti dvou sloučenin s rozdílnou molární hmotností.

Ad 1 – Vyhledal jsem v databázi ChEMBL cílový organismus *M. tuberculosis* H37Rv (ChEMBL2111188). Ke dni 7. 1. 2019 bylo v databázi 13 369 záznamů o aktivitě ve formě MIC, z toho 6 377 bylo vyjádřeno v jednotkách hmotnostní koncentrace (mg/ml, µg/ml, ng/ml) a 6 543 záznamů v jednotkách molární koncentrace (mmol/l, µmol/l, nmol/l). Je tedy vidět, že hmotnostní koncentrace jsou k vyjádření MIC užívány v této oblasti velmi často.

Ad 3 – Doloženo na konkrétním případě. V publikaci P12 jsme prezentovali antimykobakteriální aktivitu v homologické řadě 5-(alkylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů. Propylaminoderivát měl $M_r = 256,31$, heptylaminoderivát poté $M_r = 326,44$. Zanedbáme-li při srovnávání jejich účinnosti jejich rozdílné M_r , vnášíme chybu, která se dá vyjádřit poměrem jejich molárních hmotností, tedy přibližně faktorem 1,27. Co nám však skutečně udává hodnota MIC? MIC je definována jako nejnižší koncentrace testované sloučeniny, která zabrání viditelnému růstu mikroorganismů (detekováno pouhým okem, turbidimetricky či pomocí změny zabarvení – např. Alamar blue). Je-li tedy například v jamce s koncentrací 6,25 µg/ml patrný růst a v sousední jamce o koncentraci 12,5 µg/ml nikoli, určíme MIC = 12,5 µg/ml. Co to však znamená? Jednoznačně víme, že koncentrace 6,25 µg/ml není pro inhibici dostatečná, ale teoreticky je možné, že již koncentrace 6,30 µg/ml (tu jsme netestovali) by růst inhibovala - MIC tedy leží v intervalu (6,25;

12,5>. Tím, že jsme MIC určili hodnotu 12,5 $\mu\text{g/ml}$, můžeme tedy do měření teoreticky vnést chybu limitně se blížíci faktoru 2,0 (používáme-li dvojkové ředění). Z toho se tedy dá dovodit, že v případě určování MIC pomocí dvojkového ředění je nutno požadovat ředění v molárních koncentracích jen tehdy, má-li v dané sérii derivát s nejvyšší M_r dvojnásobnou M_r oproti derivátu s nejnižší M_r . Takto velké rozdíly se však často u příbuzných derivátů v rámci jedné strukturální série nevyskytují.

Užití molárních koncentrací nabývá na významu při srovnávání MIC mezi strukturálně odlišnými sériemi, kde jsou rozdíly v M_r větší.

N. B.: Předcházející odstavce se týkají využití hmotnostních koncentrací při určování MIC pomocí dvojkového ředění. Je-li však účinnost určována jako koncentrace působící konkrétní míru inhibice vůči kontrole (např. IC_{50} , EC_{50}) za pomoci instrumentálního měření nějaké fyzikální veličiny, je zcela namístě (při srovnávání aktivit odlišných sloučenin) užívat vždy koncentrace molární.

2.3. Vztahy mezi strukturou a účinkem

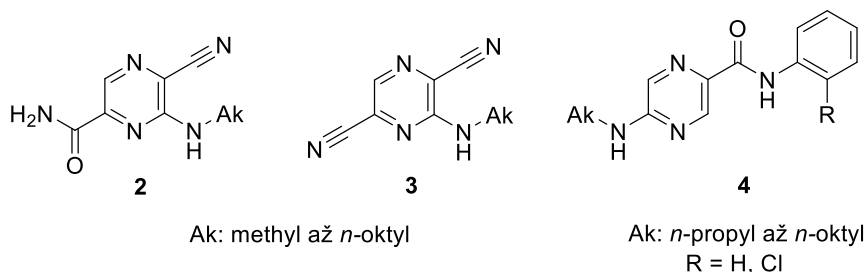
V následujících částech nastiňuji nejdůležitější trendy ve vztazích mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou *in vitro* pro námi navržené, připravené a (z větší části) publikované deriváty PZA. U každého zobecnění musí nutně docházet k určitým zjednodušením – proto trendy popisované v následujících částech neplatí absolutně a čtenáři je doporučováno se v případě zájmu seznámit s plným textem komentovaných publikací.

V této práci se zaměřuji na komentář antimykobakteriální aktivity vůči *Mtb* H37Rv *in vitro* (tedy inhibice růstu celých buněk). Pokud není blíže specifikováno jinak, je výrazem „aktivita“ nebo „účinek“ zamýšlen právě tento biologický efekt.

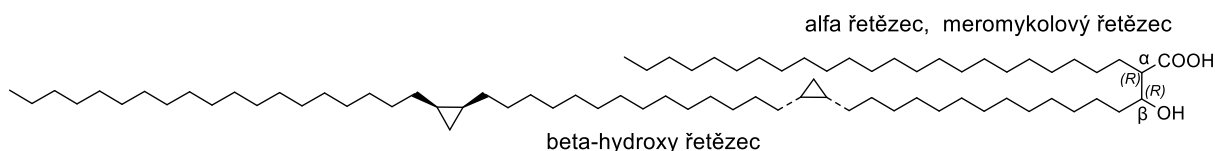
2.3.1. Vliv postranních alkylových řetězců na antimykobakteriální aktivitu

V rámci námi připravovaných sérií jsme často pozorovali výhodnost zavedení postranního alkylového řetězce na pyrazinové jádro. Tento později často opakovaný strukturální motiv jsme poprvé použili v publikacích P3 a P4, kde jsme publikovali různé kyanopyrazinkarboxamidy a pyrazindikarbonitrily s postranním **alkylamino substituentem** (**2**, **3**). Tyto sloučeniny byly původně navrženy jako obměna dříve publikovaných 3-arylamino-pyrazin-2,5-dikarbonistrilů [66]. Jako začínající doktorand jsem měl radost, že nukleofilní substituce výchozích chlorpyrazinů alifatickými aminy probíhala výrazně lépe a za mírnějších podmínek než substituce aromatickými aminy (aniliny). V obou sériích (**2**) a (**3**) jsme pozorovali nárůst *in vitro* antimykobakteriální aktivity s prodlužujícím se alkylovým řetězcem. Aktivita kulminovala u heptylamino- (či oktylamino-) derivátů, které vykazaly účinnost s MIC_{Mtb} 12,5–25 $\mu\text{g/ml}$ v Šulově půdě (pH 5,6),

což byla aktivita srovnatelná se standardem PZA, v molárních koncentracích byly tyto deriváty až dvakrát účinnější než PZA. Výsledky naznačovaly, že se nejedná o prostý efekt zvýšení lipofility, protože cykloalkylaminoderiváty s podobnou lipofilitou (počítaný $\log P$) byly zcela neaktivní ($MIC_{Mtb} > 100 \mu\text{g/ml}$). Neaktivní byly rovněž deriváty s terciární aminoskupinou získané substitucí příslušného chlorpyrazinu morfolinem, *N*-methylpiperazinem, či *N,N*-diethylaminem.



Nárůst antimykobakteriálního účinku u alkylaminoderivátů s delším alkylem jsme navrhli vysvětlit jako důsledek zvýšení lipofility, které by mělo vést ke zvýšení prostupu mykobakteriální stěnou, jež je výrazně lipofilní (lipidy tvoří až 60 % hmotnosti sušiny [67], což je výrazně více než u většiny ostatních bakterií). Tento jev jsme ale nechápali jako nespécifický nárůst lipofility, ale jako projev strukturní podobnosti (tj. afinity ve smyslu *similia similibus*) studovaných derivátů s mykolovými kyselinami, které jsou typickou součástí mykobakteriální stěny a tvoří její hlavní lipidovou složku [67]. Ze struktury mykolových kyselin (Obr. 7) je patrný společný strukturní prvek – dlouhý alkylový řetězec. Představujeme si tedy, že dlouhý postranní alkylový řetězec našich sloučenin může vést k vmezeření do vnější vrstvy mykobakteriálních obalů a následnému usnadnění penetrace do mykobaktéria.



Obr. 7. Struktura mykolových kyselin. Je uveden příklad α -mykolové kyseliny. Dalšími zástupci jsou methoxymykolové a ketomykolové kyseliny, které mají tyto funkční skupiny obsažené v postranním beta řetězci a mohou mít i *trans* uspořádání na cyklopropanovém kruhu.

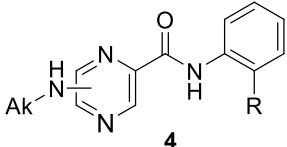
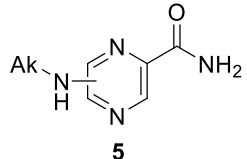
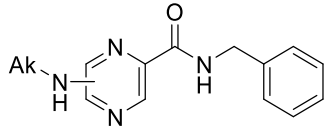
Historicky dalším (nikoliv ovšem dle data publikování) strukturním typem, kde jsme uplatnili alkylamino substituci, byly *N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidy, tedy anilidy substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin. Reakcí 5-chlor-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidu s příslušnými aminy byly připraveny sloučeniny strukturního typu (4) [P14]. Aktivita kulminovala u hexylamino- a heptylamino-derivátů ($MIC_{Mtb} = 0,78 \mu\text{g/ml}$, tj. přibližně $2,5 \mu\text{M}$). Zajímavým zjištěním bylo, že záměnou chloru v poloze 5 pyrazinového jádra za alkylamino substituent došlo (kromě nárůstu aktivity) k podstatnému snížení *in vitro* cytotoxicity (měřeno na HepG2 buněčné linii) - IC_{50} se zvýšila z jednotek μM na stovky μM . Ve zmíněné publikaci [P14] byly alkylaminoderiváty (4) připraveny z výchozí látky z nesubstituovaným benzenovým jádrem a od

výchozí látky s 2'-Cl substituovaným benzenovým jádrem. Série odvozená od 2'-Cl substituované výchozí sloučeniny byla neaktivní (s výjimkou střední aktivity heptylaminoderivátu, $MIC_{Mtb} = 12,5 \mu\text{g/ml}$, nicméně i tato hodnota znamenala výrazný pokles aktivity ve srovnání s výchozím 5-chlorderivátem). To potvrzuje naši domněnku, že aktivita prezentovaných alkylaminoderivátů nemůže být dána pouze nespecifickým zvýšením lipofility těchto sloučenin. Záměna *N*-alkylu za *N*-fenylalkyl (fenylethyl, fenylpropyl) vedla k méně účinným ($R = H$: $MIC_{Mtb} = 12,5\text{--}25 \mu\text{g/ml}$) nebo neúčinným ($R = Cl$: $MIC_{Mtb} > 100 \mu\text{g/ml}$) derivátům. Alkylaminoderiváty ($R = H$) byly tedy často účinnější než fenylalkylaminy s podobnou lipofilitou ($\log P$), což je dalším náznakem toho, že aktivita diskutovaných derivátů nevyhází pouze z nespecifického zvýšení lipofility. Je tedy možné, že kromě zvýšení lipofility a specifické substituce *R* na benzenovém jádře je pro účinek důležitá i flexibilita substituentu. Narušení lipofilního charakteru alkylamino substituentu formálním zavedením terminálního hydroxyly či methoxy skupiny vedlo k derivátům se sníženým účinkem [P12, P14].

Závěr: Lze shrnout, že v sérii strukturního typu (4) se záměna chloru na pyrazinovém jádře za alkylamino substituent osvědčila, neboť (často) vedla k zachování nebo zvýšení antimykobakteriální aktivity *in vitro* za současného snížení cytotoxicity *in vitro*. Proto jsme se tento typ strukturní záměny (Cl \rightarrow alkylamino) snažili uplatnit v mnoha následujících sériích a publikacích.

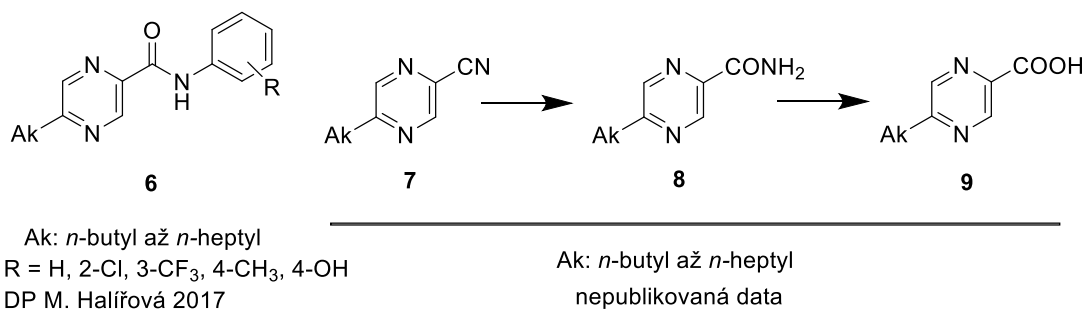
Výsledky byly vždy obdobné, s kulminací *in vitro* antimykobakteriální aktivity u hexylamino- až oktylaminoderivátů. Tab. 5 obsahuje přehled těchto derivátů a jejich aktivit. Všimněme si, že 5- a 6-isomery byly vždy výrazně aktivnější než 3-isomery. Nejprůkaznější je toto srovnání pro *N*-benzylaminopyrazin-2-karboxamidy (poslední struktura v Tab. 5), kde všechny tři řady polohových isomerů byly testovány za identických podmínek.

Tab. 5. Příklady alkylaminoderivátů s význačnou in vitro antimykobakteriální aktivitou (MABA Mtb H37Rv) a jejich in vitro cytotoxicita – srovnání polohových isomerů

Obecný vzorec	P	SAR MIC _{Mtb}	In vitro cytotoxicita nejúčinnějších sloučenin	Odkaz/ podmínky ^a
 <p>4 Ak: <i>n</i>-propyl až <i>n</i>-oktyl R = H, Cl</p>	5	R = H: kulminace C ₆ až C ₇ ; 0,78 µg/ml (2,5 µM); R = Cl: C ₇ ; 12,5 µg/ml (36 µM), ostatní neúčinné	HepG2 IC ₅₀ > 250 µM	[P14] Šulova půda, pH 5,6
	6	R = H kulminace C ₆ až C ₇ ; 1,56 µg/ml (5 µM); R = Cl kulminace C ₇ ; 3,13 µg/ml (9 µM)	různé buněčné linie, obvykle MCC ^b > 100 µM	[P12] Šulova půda, pH 5,6
 <p>5 Ak: methyl až <i>n</i>-oktyl</p>	5	kulminace C ₇ až C ₈ ; 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml (53–25 µM)	HepG2 IC ₅₀ > 250 µM	[P9] Šulova půda, pH 5,6
	6	kulminace C ₇ až C ₈ ; 25 µg/ml, 1,56 µg/ml (6 µM)	HepG2 IC ₅₀ = 161 µM	
	3	C ₁ až C ₅ neaktivní (>100 µg/ml); C ₆ až C ₈ 50 µg/ml	n.d.	[P8] Middlebrook 7H9, OADC, pH 6,6
 <p>6 Ak: <i>n</i>-butyl až <i>n</i>-oktyl</p>	5	kulminace C ₆ až C ₈ ; 6,25 µg/ml, 3,13 µg/ml; 20–10 µM	různé buněčné linie, obvykle MCC ^b > 100 µM	[P11] Šulova půda, pH 5,6
	6	kulminace C ₆ až C ₈ ; 3,13 µg/ml, 1,56 µg/ml; 10–5 µM	různé buněčné linie, obvykle MCC ^b > 100 µM	
	3	neaktivní (> 100 µg/ml)	n.d.	

^a Vše MABA - Microplate Alamar Blue Assay [59]. ^b MCC – minimální koncentrace působící cytotoxický efekt, hodnoceno mikroskopicky – podrobnosti viz původní publikace. P – poloha druhého substituentu na pyrazinovém jádře.

Přítomnost alkylamino substituentu (s delším alkylovým řetězcem) na pyrazinovém jádře se tedy osvědčila z hlediska antimykobakteriální aktivity *in vitro*. Jestliže jsme tedy předpokládali, že nárůst aktivity mohl být způsobený zlepšenou penetrací vnějších obalů mykobaktéria (na základě strukturní podobnosti s mykologickými kyselinami), bylo jasné, že není nutno vázat alkyl přes dusíkový atom. Abychom tuto hypotézu ověřili, připravili jsme několik sérií pyrazinových derivátů s ***n*-alkyly** v poloze 5 vůči prioritní funkční skupině (substituovaný karboxamid - anilid, karboxamid, karboxyl, karbonitril) – viz Obr. 8.



Obr. 8. Obecné vzorce připravených 5-alkylderivátů pyrazinamidu

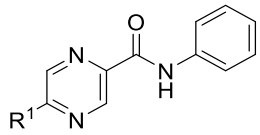
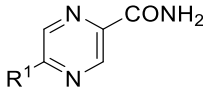
5-Alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy (**6**) byly připraveny a publikovány v rámci diplomové práce Martiny Halířové [DP1]. Aktivita nejúčinnějších látek dosahovala MIC_{Mtb} 3,13–6,25 µg/ml (přibližně 9–22 µM) a jejich *in vitro* cytotoxicita (IC₅₀) na HepG2 byla v řádu stovek µM. Aktivita obvykle v homologické řadě butyl až heptyl vrůstala, ale u derivátů s R = 3-CF₃ a R = 4-OH byl nejvíce účinným 5-pentyl homolog. V diplomové práci [DP1] jsme se pokusili i o přímé srovnání aktivity 5-alkyl derivátů s odpovídajícími (dříve publikovanými) 5-alkylaminoderiváty [P14]. Mezi zmíněnými sériemi nastala shoda v substituentu R pouze u R = H a R = 2-Cl. U těchto sérií tedy bylo možno učinit přímé srovnání, které by určilo efekt odstranění –NH– skupiny. Ve skupině alkylaminoderivátů ovšem sloučeniny s R = 2-Cl byly převážně neaktivní (viz také Tab. 5, první řádek).

Srovnání (Tab. 6) na první pohled vypadá nepříznivě pro alkylderiváty, nicméně zde je nutno upozornit, že aktivita pro alkylaminoderiváty byla zjišťována dle starší metodiky v jiném růstovém bujónu (Šulova půda, pH 5,6), kdežto alkylderiváty byly testovány novou metodikou (standardní bujón Middlebrook 7H9, OADC, pH 6,6). Výsledky tedy nejsou vzájemně plně srovnatelné. Dlouhodobým pozorováním jsme zjistili, že některé naše deriváty vykazují v kyselé Šulově půdě vyšší aktivitu než v neutrálním Middlebrook bujónu (rozdíl MIC obvykle 1–2 kroky dvojkového ředění). Je tedy správnější uzavřít, že v případě anilidů POA 5-alkylderiváty (**6**) vykazovaly podobnou nebo mírně nižší aktivitu ve srovnání s 5-alkylaminoderiváty (**4**).

Jako další *n*-alkyl deriváty pyrazinu byly připraveny sloučeniny ze série 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů (7), 5-alkylpyrazin-2-karboxamidů (8), 5-alkylpyrazin-2-karboxylových kyselin (9). Tyto série nebyly dosud publikovány. Látky byly připraveny radikálovou alkylací pyrazin-2-karbonitrilu a jeho následnou parciální, respektive úplnou hydrolýzou. V sérii karbonitrilů (7) a karboxylových kyselin (9) byly aktivní pouze 5-heptyl deriváty, deriváty s kratšími alkyly byly neúčinné ($MIC_{Mtb} > 100 \mu\text{g/ml}$). V sérii karboxamidů (8) byl patrný pozitivní efekt prodlužujícího se alkylového řetězce – v řadě butyl až heptyl rostla aktivita (MIC_{Mtb}) následujícím způsobem: 50; 12,5; 6,25 resp. 3,13 $\mu\text{g/ml}$.

Přímé srovnání aktivit alkylaminoderivátů s alkylderiváty se stejným počtem uhlíků v postranním řetězci je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6. Porovnání antimykobakteriální aktivity MIC_{Mtb} ($\mu\text{g/ml}$) alkylaminoderivátů a alkylderivátů pyrazinamidu

				
Ref	[P14]	[DP1]	[P9]	nepublikováno
Alkyl	R ¹ = Ak-NH-alkylaminoderiváty	R ¹ = Ak alkylderiváty	R ¹ = Ak-NH-alkylaminoderiváty	R ¹ = Ak alkylderiváty
propyl	3,13	n.d.	> 100	n.d.
butyl	1,56	25	> 100	50
pentyl	3,13	25	> 100	12,5
hexyl	0,78	6,25	50	6,25
heptyl	0,78	6,25	12,5	3,13
oktyl	3,13	n.d.	6,25	n.d.
PZA	6,25	>100	12,5–25	>100
INH	0,2-0,39	0,39	0,39–1,56	0,39–0,78
podmínky	Šulova půda, pH 5,6	Middlebrook 7H9, pH 6,6	Šulova půda, pH 5,6	Middlebrook 7H9, pH 6,6

n.d. – nedostupné

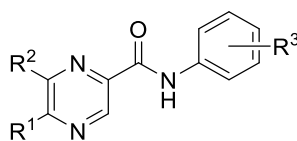
Závěr: Zavedení 5-alkyl substituentu se osvědčilo podobně jako zavedení 5-alkylamino substituentu. Připravené deriváty byly antimykobakteriálně účinné

Zavedení delšího alkylového řetězce (ať již v podobě alkyly či alkylamino substituentu) do polohy 5 či 6 dvoujaderných derivátů pyrazin-2-karboxamidu vede ke sloučeninám, které svou strukturou evokují PT70, inhibitor mykobakteriální enoyl-ACP reduktasy (InhA). Proto některé naše série tohoto strukturního typu byly podrobeny molekulovému dockingu do InhA – pro podrobnosti viz kapitola 2.4.2.

Racionálním důvodem pro návrh a přípravu alkylderivátů POA (**9**) je snaha o zvýšení lipofility POA, která sama o sobě je *in vitro* účinnou antimykobakteriální látkou, ale *in vivo* je neúčinná, pravděpodobně kvůli nevhodné farmakokinetice [68]. Substituce POA v poloze 5 či 6 pyrazinového jádra by měla být kompatibilní s mechanismem účinku zprostředkovaným vazbou POA na ribosomální protein RpsA - blíže viz kapitola 1.3.3. Alkylaminoderiváty PZA (**5**) či alkylderiváty PZA (**8**) by mohly být proléčivý příslušných pyrazinkarboxylových kyselin se zvýšeno lipofilitou. V části 2.4.1 popisují *in silico* studie za účelem ověření, zda 5- či 6-substituované deriváty PZA mohou být substrátem mykobakteriální pyrazinamidasy PncA.

2.3.2. N-fenylpyrazin-2-karboxamid jako ústřední struktura našeho výzkumu

N-fenylpyrazin-2-karboxamidy (tedy anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny) byly jedním z ústředních témat již mého školitele prof. Martina Doležala, který v této oblasti publikoval pravidelně od roku 2000. Byly připraveny deriváty s jednoduchými substituenty na benzenovém jádře (R^3 je H, OH, krátký alkyl, halogen, CF_3 a jejich kombinace) a v poloze 5 či 6 pyrazinového jádra (H, Cl, methyl, *tert*-butyl a jejich kombinace) – obecná struktura na Obr. 9.



R^1 : H, *tert*-Bu

R^2 : H, Cl

R^3 : H, OH, OCH_3 , krátký alkyl, OH, CF_3 , halogen

Obr. 9. Obecná struktura anilidů POA připravených v letech 2000–2011

Anilidy POA byly testovány *in vitro* na antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitu a vybrané sloučeniny rovněž na schopnost inhibovat fotosyntézu. V oblasti anilidů POA jako potenciálních antimikrobních léčiv jsem tedy přistoupil k již probíhajícímu projektu. V rámci mého doktorského studia jsem se podílel na rozšíření palety těchto derivátů. Spolu se školitelem (a dalšími spoluautory) jsme připravili a publikovali souhrnné publikace rekapitulující nejvýznačnější deriváty a jejich SAR pro antimykobakteriální aktivitu. Souhrnné práce byly publikovány jako kapitola v monografii [P25] a jako přehledový článek [P22]. Zjednodušený (ale zároveň nejvíce aktuální) souhrn je poté obsažen v úvodu našeho experimentálního článku publikovaného v roce 2016 [P15]. V sériích anilidů pyrazin-2-karboxylových kyselin jsme SAR analýzy stavěli na charakteru substituce benzenového jádra (zde byla nejvyšší variabilita) a hodnotili tyto substituenty z hlediska jejich **elektronových parametrů** (elektron-donorové, elektron-akceptorové) a **parametrů lipofility**. Elektronové parametry jsme vyjadřovali pomocí tabulkových Hammettových konstant σ [69], lipofilní příspěvek poté jako substituční konstantu π

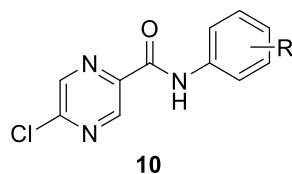
(tabulková hodnota nebo rozdíl experimentálně změřené lipofility substituovaného a nesubstituovaného derivátu).

Ze sérií anilidů POA, které byly publikovány v letech 2000–2011 vyplynulo, že pozitivní vliv na antimykobakteriální aktivitu má substituce benzenového jádra elektron-donorovými substituenty v poloze 4 (*para*) a naopak elektron-akceptorovými substituenty v poloze 3 (*meta*) - v obou případech se jednalo o lipofilní substituenty [P25]. Hydrofilní substituenty ($R^3 = 2\text{-OH}, 4\text{-OH}$) byly prospěšné pouze u derivátů odvozených od kys. 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové - tedy od nejvíce lipofilní výchozí kyseliny – kde mohlo být výhodné kompenzovat příliš vysokou lipofilitu substituentů pyrazinové části hydrofilitou substituentů benzenové části. Celkově antimykobakteriální aktivita nebyla závislá pouze na lipofilitě daného derivátu, ale i na konkrétních substituentech pyrazinového i benzenového jádra. Je třeba mít na paměti, že výše uvedené SAR jsou popsáním trendů v rozsáhlé skupině *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů (celkově přes 100 sloučenin) a některé deriváty se svou aktivitou vymykaly těmto pravidlům. Nejúčinnější anilidy POA vykazaly inhibici růstu *Mtb in vitro* > 90% (při koncentraci 6,25 $\mu\text{g/ml}$) a jejich MIC_{Mtb} se pohybovala v rozmezí 3,13–12,5 $\mu\text{g/ml}$. Pro nejúčinnější deriváty viz *tabulka 1* v příloze P22 či *tabulka 2* v příloze [P25].

Ve výše zmíněných sériích jsme pozorovali pozitivní vliv zavedení chloru do polohy 6 pyrazinového jádra – obvykle docházelo ke zvýšení antimykobakteriální aktivity. Při rekapitulaci SAR v těchto sériích jsme si uvědomili, že by bylo velmi potřebné otestovat anilidy POA s 5-chlor substitucí pyrazinového jádra. K tomu nás vedly i studie, které ukazovaly, že 5-Cl-PZA je účinnějším inhibítozem mykobakteriální syntasy mastných kyselin I (FAS I) než nehalogenovaný PZA [34]. Klíčovou výchozí látkou pro nás byla tehdy nově komerčně dostupná (Sigma-Aldrich) 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina (5-OH-POA), u níž během aktivace karboxylu působením chloridu thionylu docházelo zároveň k záměně hydroxyly za chlor.

Sérii ***N*-feryl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidů (10)** (30 sloučenin) jsme publikovali v roce 2013 [P7]. Z hlediska antimykobakteriální aktivity vůči *Mtb* se jednalo o velmi úspěšnou sérii – z třiceti sloučenin lišících se pouze různou substitucí na benzenovém jádře vykazala většina MIC_{Mtb} v rozmezí 1,56–6,25 $\mu\text{g/ml}$ a pouze tři deriváty byly neúčinné ($\text{MIC} > 50 \mu\text{g/ml}$ nebo $\text{MIC} > 100 \mu\text{g/ml}$). Nejúčinnější deriváty měly $\text{MIC}_{Mtb} < 1,56 \mu\text{g/ml}$ (tedy jednotky μM). Vztahy SAR pro antimykobakteriální aktivitu byly nevýrazné – jinými slovy, substituent R na benzenovém jádře výrazně neovlivňoval aktivitu (téměř vše bylo aktivní, tolerovány elektron-donorové i elektron-akceptorové, hydrofilní i hydrofobní substituenty). Srovnáním s dříve publikovanými anilidy POA s odlišnou substitucí na pyrazinové části bylo patrné, že substituce 5-Cl je nejvýhodnější substitucí (dle poměru aktivní/neaktivní deriváty v dané sérii i dle hodnot MIC nejúčinnějších sloučenin). Toto srovnání bylo provedeno v původní publikaci [P7] ve výsledkové části. Negativem série ***N*-feryl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidů (10)** byla význačná *in vitro*

cytotoxicita (HepG2), která se u většiny derivátů pohybovala v rozmezí jednotek až desítek μM . Cytotoxicita vzrůstala se zvyšující se lipofilitou – přítomnost hydroxylové skupiny naopak cytotoxicitu snižovala (možné místo konjugačních reakcí metabolismu). V Tab. 7 jsou uvedeny perspektivní deriváty s dobrým aktivně-toxickým poměrem (vyjádřen jako SI, index selektivity, definován jako $\text{IC}_{50}/\text{MIC}$ v molárních koncentracích).



Tab. 7. Srovnání antimykobakteriální aktivity a cytotoxicity vybraných *N*-fenyl-5-chloropyrazin-2-karboxamidů. Převzato a upraveno dle [P7].

R	Kód a	<i>M. tbc</i> H37Rv	HepG2		CHO-K1		ACHN	
		MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	SI	IC ₅₀ [μM]	SI	IC ₅₀ [μM]	SI
4-OH	4	12.5	69	5.5	48 ± 4	3.8	100 ± 39	8.0
5-Cl-2-OH	21	5.5	41	7.4	39 ± 2	7.1	51 ± 14	9.3
4-COOH-3-OH	30	10.7	160 b	15,0	502 ± 122	47.1	371 ± 96	34.8

Cytotoxicita je vyjádřena parametrem IC_{50} , v případě linií CHO-K1 a ACHN jako průměr ± SEM (N=3). SI je index selektivity, definován jako $\text{IC}_{50}/\text{MIC}$. ^a Kód sloučeniny v původní publikaci. ^b Hodnota určena pozdějším měřením, v původní publikaci není uvedena.

Perspektivním derivátem byl anilid s R = 5-Cl-2-OH, který vykázal třetí nejnižší cytotoxicitu a zároveň nejširší spektru účinku, kdy inhiboval (na rozdíl od většiny testovaných sloučenin) i růst kmenů *M. avium* a *M. kansasii*. Další důležitou sloučeninou byl anilid s R = 4-COOH-3-OH, který vykázal nejnižší toxicitu a to s hodnotami IC_{50} v řádech stovek μM na všech testovaných buněčných liniích. Povšimněme si, že tento anilid obsahuje ve své struktuře fragment kyseliny 4-aminosalicylové (*p*-aminosalicylové, PAS), která je antituberkulotikem 2. linie. Tento anilid je tedy hybridní molekulou dvou antituberkulotik - PZA a PAS. O této struktuře bude pojednáno dále v kapitole 2.5.

N-fenyl-5-chloropyrazin-2-karboxamid se tedy stal na určitou dobu centrální sloučeninou, ze které jsme vycházeli při návrhu strukturně obměněných derivátů. Motivací těchto obměn bylo blíže prozkoumat vztahy SAR a pokusit se o snížení cytotoxicity (vůči savcím buňkám), která byla hlavním a význačným negativem série *N*-fenyl-5-chloropyrazin-2-karboxamidů. Níže stručně popisují tyto změny a jejich vliv na aktivitu (*Mtb*) a *in vitro* cytotoxicitu. Graficky jsou tyto obměny zachyceny na Obr. 10.

Změna spojovacího řetězce (linkeru) mezi jádry

- Vložení methylenového můstku $-CH_2-$ za vzniku *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů. Prodloužení spojovacího řetězce obvykle vedlo ke snížení účinku, typicky o 2–3 stupně dvojkového ředění. Přímé srovnání je uvedeno v *Tabulce 1* publikace [P5].
- Inverze karboxamidového můstku (-CONH-) za vzniku *N*-pyrazinylbenzamidů (označeny jako retro-amidy, -NHCO-). Tato záměna vedla ve většině případů ke snížení nebo vymizení účinku. Ovšem ty deriváty, které si účinek zachovaly, vykazovaly nízkou cytotoxicitu (obvykle HepG2 IC₅₀ > 250 μM) a dobrou selektivitu (SI > 10). Přímé vyhodnocení inverze spojovacího můstku je uvedeno v *Tabulce 6* publikace [P21]. *N*-pyrazinylbenzamid s 2-OH substituentem na benzenovém jádře vykázal široké spektrum účinku, které zahrnovalo všechny testované mykobakteriální kmeny a také některé bakteriální a houbové organismy. Široké spektrum jsme vysvětlili strukturální podobností se salicylanilidy, které jsou dlouhodobě studovány jako všeobecně antimikrobní látky [70, 71].

Substituce chloru na pyrazinovém jádře

- Substituce alkylaminem (C₃-C₇) vedla obvykle k zachování nebo zvýšení účinku a současně k výraznému snížení cytotoxicity HepG2. Aspekty této substituce byly blíže diskutovány v části 2.3.1 a Tab. 5 na str. 38.
- Náhrada chloru za aminoskupinu vedla ke zcela neúčinným derivátům [P13].

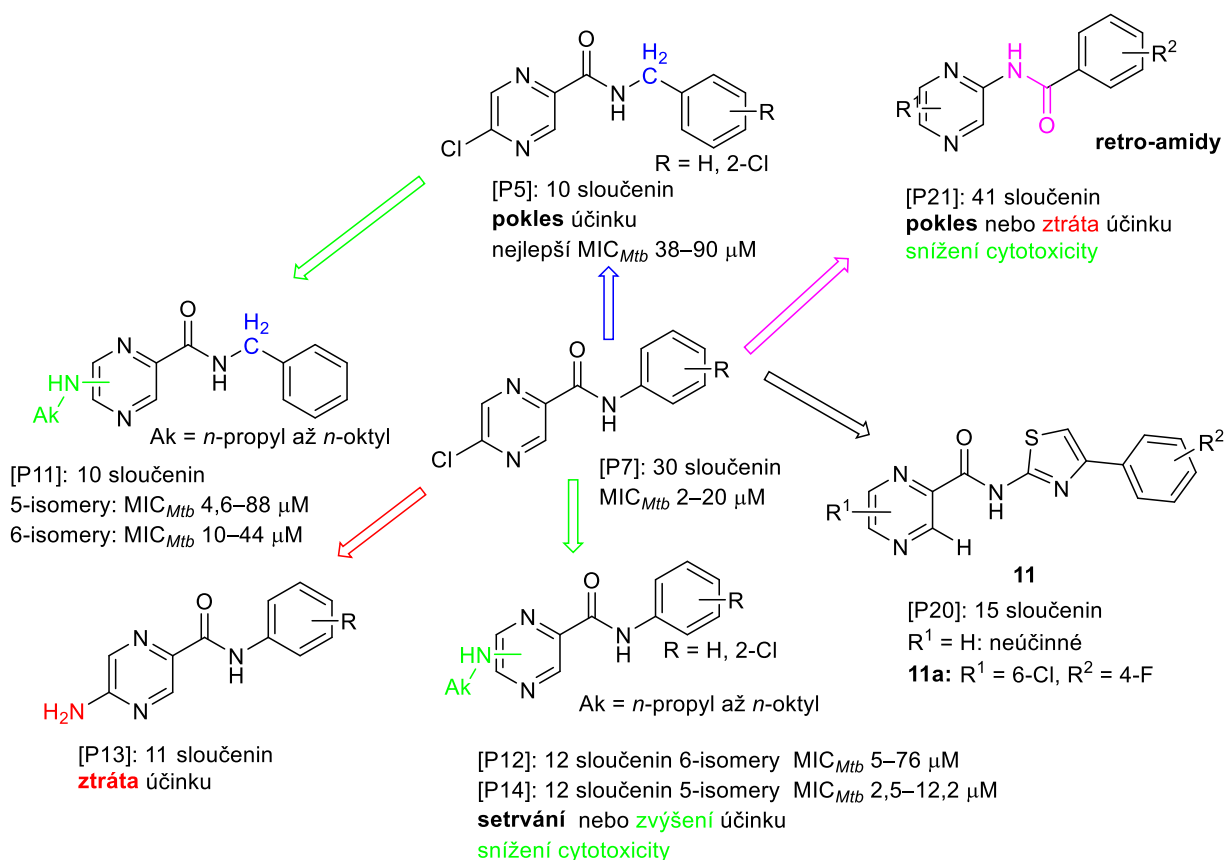
Polohová isomerie na pyrazinovém jádře

- 5- a 6-chlor polohové isomery byly výrazně účinnější než 3-chlor isomery. Blíže viz kapitola 2.3.3.

Náhrada benzenového jádra

- Formální náhrada benzenového jádra za 4-fenyl-1,3-thiazol-2-yl vedla k derivátům, které ve své struktuře kombinují PZA a **4-fenyl-1,3-thiazol-2-amin**, což je fragment vyskytující se ve sloučeninách s antibakteriálním a antimykobakteriálním účinkem – pro odkazy na původní literaturu viz [P20]. Tímto způsobem byly získány sloučeniny obecné struktury (**11**, Obr. 10). Zajímavou aktivitu vykázal zejména derivát **11a** (Obr. 10), který inhiboval *Mtb* H37Rv, *M. kansasii* a *M. avium* s MIC = 2,2 μM. Zároveň neprojevil cytotoxické účinky *in vitro* (HepG2 IC₅₀ > 50 μM, SI > 21) a to ani při prodloužené expozici 48 hodin. Vzhledem ke strukturální podobnosti se známými inhibitory enzymu FabH III byly deriváty obecné struktury (**11**) dokovány do tohoto enzymu – viz kapitola 2.4.3.

Nově navržené a připravené deriváty s odkazem na příslušnou publikaci (přílohu) jsou znázorněny na Obr. 10.



Obr. 10. Strukturální obměny *N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidů. **Zelená** barva označuje žádoucí změnu (zvýšení účinku, snížení toxicity), **modrá** mírné snížení účinku, **červená** ztrátu účinku, **fialová** nevyhraněný efekt (závislost na substituentech).

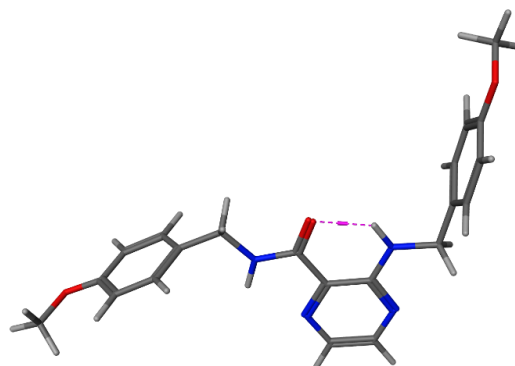
2.3.3. Vzájemná poloha substituentů na pyrazinovém jádře

Strukturu většiny námi připravených a v této práci komentovaných sloučenin lze zobecnit následujícím způsobem - jednalo o deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny (včetně funkčních derivátů karboxylových kyselin, tedy karboxamidů, karbonitrilů, esterů). Zároveň ve většině případů bylo pyrazinové jádro substituováno alespoň jedním dalším substituentem (nejčastěji chlor, alkylamino, benzylamino). Postupem času jsme si ověřili, že 5- nebo 6- substituované deriváty POA a PZA byly velmi často antimykobakteriálně výrazně účinnější než jejich 3-substituované polohové isomery. Příkladem jsou alkylaminoderiváty, jejichž polohové isomerní řady byly již srovnávány v Tab. 5. na str. 38.

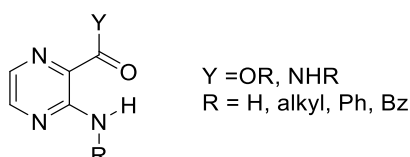
Nižší účinnost 3-substituovaných derivátů PZA/POA lze hypoteticky vysvětlit několika způsoby:

1. Sterickou náročností vicinální disubstituce. Zde je třeba si uvědomit, že se jedná o 2,3-disubstituované deriváty. Jsou-li oba substituenty objemné, je molekula nucena zaujímat konformaci, která je stericky náročná. To lze dobře demonstrovat na sloučeninách typu 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů (mající objemný benzyl v polohách 2 a 3 pyrazinového jádra), jejichž energeticky výhodné konformace (predikované na základě molekulární dynamiky a energetické minimalizace pod silovým polem AMBER10:EHT) jsme popsali v publikaci [P18]. Příklad energeticky výhodné konformace uvádím níže na Obr. 11. Na obrázku je rovněž patrná přítomnost intramolekulárního vodíkového můstku (o jeho významu dále). Předpokládali jsme, že stericky náročná 2,3-disubstituce objemnými substituenty může být nevýhodná pro interakci s receptory (molekula je tvarově náročná a vyžaduje specifický typ či tvar vazebného místa). Tento předpoklad nám byl ovšem v posledních dvou letech částečně vyvrácen – potvrdili jsme, že právě sloučeniny strukturního typu uvedeného na Obr. 11. se vážou do lidské prolyl-tRNA synthetasy. Blíže viz kapitola 3.3.2.
2. Sterickým bráněním karboxamidové či karboxylové funkční skupiny. Toto vysvětlení je relevantní pro sloučeniny s nesubstituovanou karboxamidovou či karboxylovou funkční skupinou. U některých specifických mechanismů účinku, které byly navrženy pro PZA či POA, je důležitá interakce karboxamidové, resp. karboxylové funkční skupiny s vazebným místem proteinu. Bylo prokázáno, že PZA je schopen inhibovat mykobakteriální syntasu mastných kyselin I (FAS I). Pomocí diferenční NMR spektroskopie (STD-NMR, Saturation-Transfer Difference) bylo určeno, že vodík H-3 pyrazinamidu interaguje s proteinem (tj. směřuje ke stěně vazebného místa) [33, 34]. Substituce vodíku H-3 větším substituentem by tedy pravděpodobně vedla ke změně polohy a orientace takového derivátu (změna vazebného módu) a tím znemožnila inhibici FAS I. Podobná situace je u POA, u které jeden z předpokládaných mechanismů účinku - inhibice trans-translace - je závislý na vázání se POA na ribosomální protein RpsA. Z experimentálně určené krystalografické struktury komplexu POA-RpsA (pdb: [4NNI](#), Obr. 4 na str. 19) vyplývá, že POA s RpsA interaguje prostřednictvím karboxylu a substituce vodíku H-3 by tuto interakci ztížila či znemožnila [72]. Substituce H-5 či H-6 pyrazinového jádra by však měla být možná [40, 72]. Podrobnosti a nejnovější poznatky k výše popsaným mechanismům účinku PZA/POA byly popsány v kapitole 1.3.2, resp. 1.3.3.
3. Tvorbou intramolekulárního vodíkového můstku. Týká se derivátů PZA/POA, které mají na C-3 pyrazinového jádra vázaný substituent, který může vystupovat jako donor vodíkové vazby. Jeho vodík tvoří vodíkovou vazbu s karbonylovým kyslíkem karboxamidové či karboxylové funkční skupiny (příklad viz Obr. 11). Obecná struktura předmětných

derivátů je zachycena na Obr. 12. Možnost tvorby intramolekulárního H-můstku (intramolecular H-bond, IHB) má důsledky pro fyzikálně-chemické vlastnosti dané sloučeniny i pro její potenciál vytvářet nevazebné interakce s receptory. Atom vodíku a volný elektronový pár vytvářející IHB nejsou k dispozici pro vytváření vodíkových můstků s molekulami polárního rozpouštědla (např. vody). Můžeme také říci, že vytvořením IHB dochází k částečnému maskování hydrofilního charakteru funkčních skupin, které IHB tvoří, a deriváty schopné tvořit IHB tak mohou mít vyšší lipofilitu než polohové isomery, které IHB tvořit nemohou. Zvýšenou lipofilitu 3-substituovaných derivátů ve srovnání s 5- či 6-substituovanými deriváty PZA/POA jsme v několika sériích potvrdili experimentálním měřením (pomocí HPLC v reverzním uspořádání, lipofilita vyjádřena jako funkce retenčního času) [P18]. Přítomnost IHB taktéž snižuje interakční potenciál dané molekuly, neboť donory a akceptory zapojené do IHB nejsou k dispozici pro tvorbu H-můstků s receptorem. Teoreticky je samozřejmě možný zánik IHB a tvorba interakcí s receptorem, ale toto by bylo spojeno s vytočením (např. karboxamidové či karboxylové) funkční skupiny mimo rovinu heteroaromatického cyklu, což je energeticky nevýhodné. Výsledná energetická bilance by byla dána rozdílem energie potřebné k přechodu do konformace bez IHB (konformace s IHB je energeticky nejvýhodnější) a energií, která se uvolní vytvořením nových vodíkových vazeb ligand-receptor.



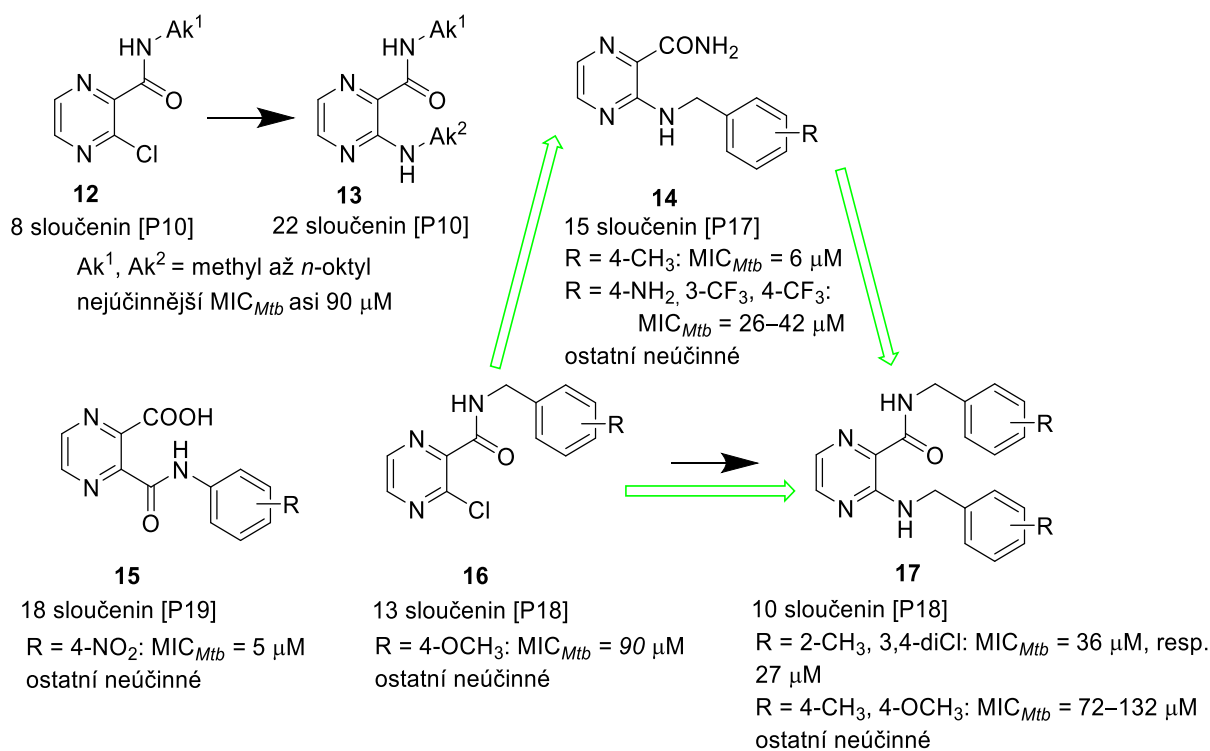
Obr. 11. Energeticky minimalizovaná konformace derivátu 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů se znázorněním intramolekulární vodíkové vazby (převzato z [P18])



Obr. 12. Obecná struktura pyrazinových derivátů tvořících intramolekulární H-můstek

Níže na Obr. 13 jsou uvedeny obecné strukturální vzorce připravených 3-substituovaných derivátů PZA/POA s odkazem na příslušnou přílohu. Série **12**, **13**, **15** a **16** vykazovaly obecně

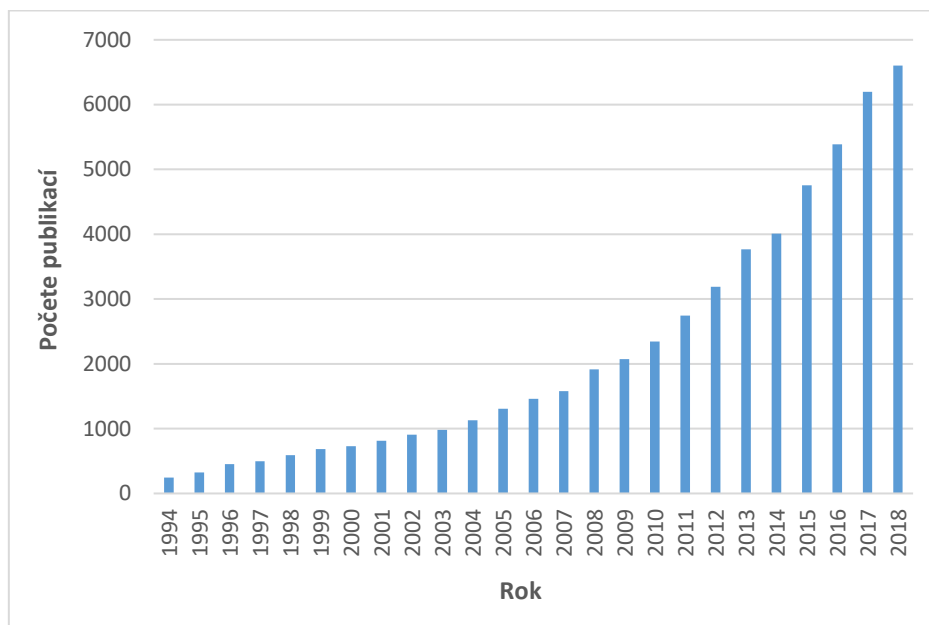
nízký účinek ($MIC_{Mtb} \geq 25 \mu\text{g/ml}$). Některé 3-benzylaminoderiváty (**14**, **17**) vykazovaly střední aktivitu (MIC_{Mtb} typicky 6,25 až 25 $\mu\text{g/ml}$) v závislosti na substituentu R. V sériích **12** a **13** [P10] aktivita mírně rostla s prodlužujícím se alkylovým řetězcem Ak¹ nebo Ak², přítomnost dvou delších alkylů v molekule však byla nevýhodná. Po porovnání typických aktivit mezi sériemi **14**, **16** a **17** je možno konstatovat, že přítomnost benzylového zbytku je nejvýhodnější v poloze 3 pyrazinového jádra (ve formě benzylamino substituentu), méně výhodná pak v pozici 2 jako *N*-substituent karboxamidu. Je nutno zdůraznit, že v diskutovaných sériích vždy počet neúčinných sloučenin výrazně převyšoval počet účinných. I z tohoto důvodu jsme 3-substituované deriváty PZA/POA obecně považovali za méně účinné a syntetizovali je jako doplnění k účinnějším 5- a 6-polohovým isomerům.



Obr. 13. Příklady 3-substituovaných derivátů PZA/POA s uvedením antimykobakteriální aktivity (MIC_{Mtb}). Šipka označuje přímý syntetický vztah. Zelená šipka naznačuje (mírný) nárůst účinku.

2.4. Využití metod počítačem podporovaného návrhu léčiv (CADD)

Metody počítačem podporovaného návrhu léčiv (CADD; Computer-Aided Drug Design) se během posledních dvaceti let staly nedílnou součástí procesu návrhu a vývoje léčiv ve farmaceutickém průmyslu i v akademické sféře [73, 74]. Tuto skutečnost lze doložit grafem (Graf 1), který zobrazuje analýzu počtu experimentálních publikací obsahujících pojem „docking“ v jednotlivých letech za posledních 25 let – analýza databáze Web of Science dne 22. 1. 2019. Molekulární docking je jednou z nejvíce užívaných metod CADD. Analýza si neklade za cíl být úplná a přesná, ale její výsledky jasně demonstrují rostoucí trend.



Graf 1. Analýza počtu experimentálních publikací, které obsahují termín „docking“, dle roku publikování. Zdrojem dat je databáze Web of Science ke dni 22. 1. 2019.

Je obecně uznáváno, že metody počítačového modelování léčiv nemohou samy o sobě vést k vývoji nových léčiv, *in silico* výsledky je třeba vždy potvrdit experimentálním měřením. Největší přínos metod CADD spočívá v identifikaci sloučenin, které by bylo vhodné otestovat v reálném experimentu (tzv. wet assay). V dnešní době veřejně dostupné knihovny obsahují řádově miliony sloučenin, které lze komerčně získat. Takto velké množství není ale možno ani při použití vysokokapacitních skrínigových metod (HTS; High-Throughput Screening) reálně otestovat. V případě virtuálního *in silico* skríninku však toto omezení neplatí. V závislosti na zvolené metodě CADD lze dnes i na low-endovém stroji (např. 8 jader) testovat tisíce (molekulární docking) až miliony (vyhledávání dle podobnosti, vyhledávání pomocí farmakoforu) sloučenin. Metody CADD jsou tedy velmi často využívány v iniciačních fázích projektů k selekci molekul, které mají vhodné fyzikálně chemické vlastnosti a které by na základě své struktury mohly interagovat se studovaným cílem (receptorem). Tyto postupy se souhrnně označují jako

vysokokapacitní virtuální skřínink (HTVS, High-Throughput Virtual Screening). *In silico* metody jsou v porovnání se skutečným experimentem časově méně náročné a jsou rovněž levné.

Další fází vývoje léčiv, kde se CADD metody široce uplatňují, je hit-to-lead optimalizace, kdy se pomocí počítačových simulací snažíme optimalizovat strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti původní molekuly (hitu) tak, abychom zvýšili účinnost a selektivitu. V této fázi se z metod CADD uplatňuje velmi často molekulární docking či molekulární dynamika.

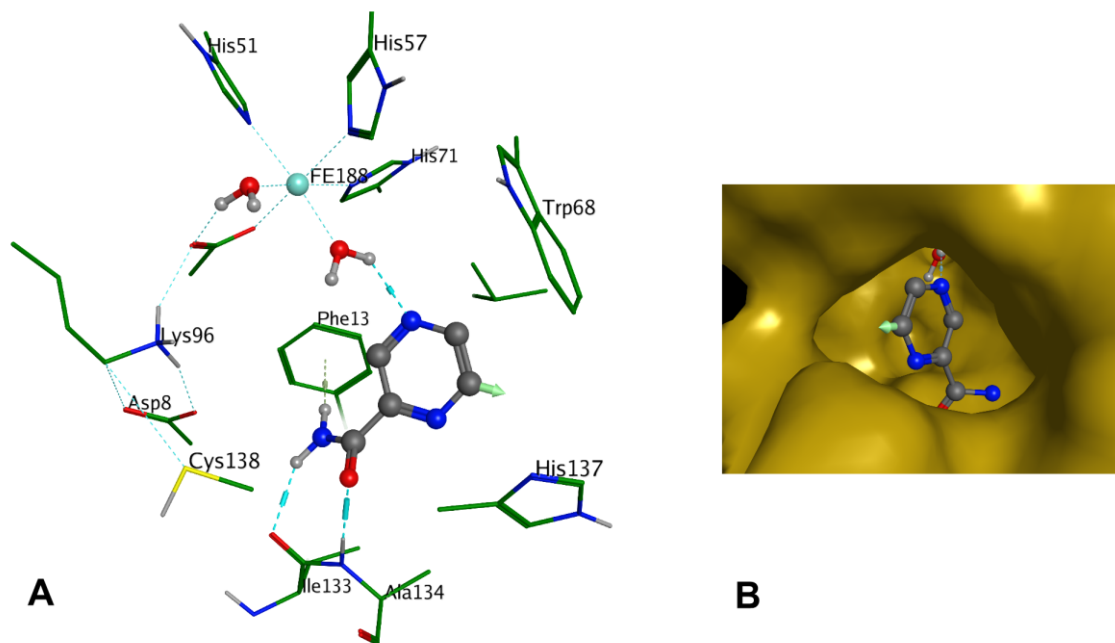
V naší laboratoři jsme CADD metody užívali doposud především k ověřování potenciálních mechanismů účinku antimykobakteriálně aktivních sloučenin.

2.4.1. Pyrazinamidasa (PncA) jako aktivující enzym

V publikaci P9 jsme pomocí molekulárního dockingu jsme zjišťovali, zda námi připravené 5- a 6-alkylaminopyrazin-2-karboxamidy mohou být hydrolyzovány mykobakteriální pyrazinamidásou (PncA). Jak bylo uvedeno v části 1.3, některé specifické mechanismy účinku PZA jsou vázány na pyrazinamid jako takový, jiné na POA vznikající z PZA hydrolyzou působením PncA. Úplné výsledky molekulového dokování včetně zobrazení póz jednotlivých ligandů v aktivním místě PncA byly publikovány v doplňujících informacích k P9. V této studii jsme nejprve nadokovali PZA do aktivního místa pyrazinamidasy PncA (pdb: [3PL1](#)) a ověřili, že použitý dokovací algoritmus (Autodock Vina) je schopen pro PZA predikovat pózu, která odpovídá dříve publikovanému modelu komplexu PZA-PncA [75]. Již z této modelové pózy bylo patrné, že vodíky H-6 a H-5 pyrazinového jádra směřují ke stěně kavity vazebného místa a substituce objemnějším substituentem do těchto poloh by nutně vedla k výrazné změně pozice (translace a rotace) ligandu odměněného PZA, v důsledku čehož by karboxamidová funkční skupina nebyla nadále v pozici nutné k uskutečnění hydrolyzy katalytickou triádou. (Pozn.: Tuto tezi o nemožnosti substituovat vodík H-6 jsme později přehodnotili na základě zobrazení totožného komplexu PZA-PncA v software MOE – viz Obr. 14. Zelená šipka zde je tzv. exit vektor, který označuje vodík, který by ze sterického hlediska mohl být nahrazen alespoň methylem. Přehodnocujeme tedy naše stanovisko v tom smyslu, že substituce H-6 by mohla poskytnout deriváty PZA, které budou moci být hydrolyzovány mykobakteriální PncA. To zejména v tom případě, budeme-li uvažovat i určitou flexibilitu proteinu. V blízké budoucnosti budeme toto studovat metodami molekulární dynamiky.)

Dokování vybraných 5- a 6-alkylaminopyrazin-2-karboxamidů do aktivního místa PncA předpovídalo pro tyto ligandy pózy, ve kterých karboxamidová funkční skupina směřovala opačným směrem v porovnání s přirozeným substrátem PZA. Prostor poblíž katalytické triády Lys96, Asp8 a Cys138 (kde se má nacházet karbonylový uhlík karboxamidu) byl u póz předpovídaných pro alkylaminoderiváty PZA obsazen alkylovým zbytkem [P9].

Závěr: 5-alkylaminoderiváty PZA dle molekulového dokování pravděpodobně nebudou hydrolyzovány pyrazinamidásou (PncA) na odpovídající karboxylové kyseliny. Antimykobakteriálně účinné deriváty tohoto strukturního typu tedy pravděpodobně účinkují ve formě nehydrolyzovaného karboxamidu (pokud není hydrolyzován jiným způsobem).



Obr. 14. Model pyrazinamidu v aktivním místě mykobakteriální pyrazinamidasy (PncA). A – Nevazebné interakce. Lys96, Asp8 a Cys138 tvoří katalytickou triádu. B – Celkový pohled do aktivního místa PncA. Zelená šipka označuje místo možné substituce.

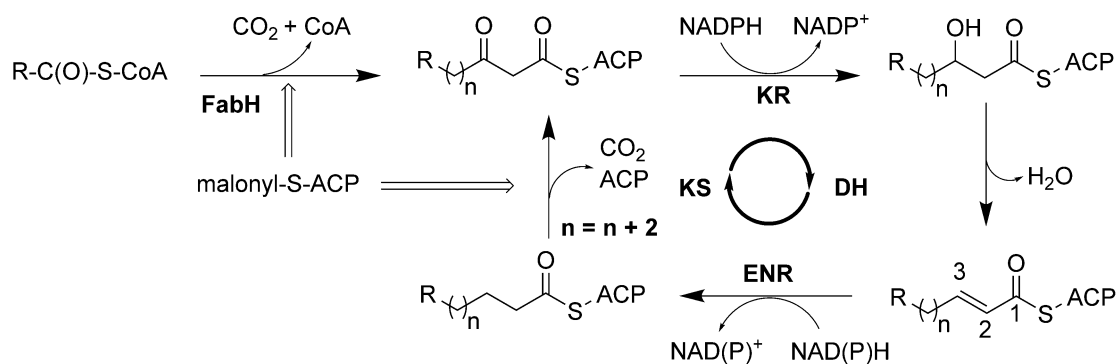
Publikace **P12** - 6-Alkylamino-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidy – může být karboxamidová skupina substituovaná objemným substituentem (*N*-fenylem) hydrolyzována PncA? Jednoduchý docking s obdobným uspořádáním jako v případě 5- a 6-alkylaminoderivátů PZA [P9] neumožnil vyvodit jednoznačný závěr. Některé ze studovaných 6-alkylamino-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů zaujímaly (i kvůli přítomnosti dvou objemných substituentů a prostě nemožnosti se v kavitě orientovat jinak) pózy, ve kterých byla karboxamidová skupina blízko katalytické triády a vykazovala i vhodnou orientaci. Rozhodli jsme se tudíž provést detailnější studii, při jejímž návrhu jsme vycházeli ze známého mechanismu hydrolýzy nikotinamidu příbuznou nikotinamidásou z *Acinetobacter baumannii* [76]. Klíčovým krokem hydrolýzy je vznik tetrahedrálního intermediátu, který vzniká nukleofilním atakem –SH skupiny Cys138 na elektrondeficientní karbonylový uhlík karboxamidu. Takto vzniklý intermediát musí být navíc stabilizován – třemi H-můstky vycházejícími z karboxamidové skupiny, a jedním H-můstkem mezi heterocyklickým dusíkovým atomem a molekulou vody, která je koordinována k Fe^{2+} . Jedná se o totožné interakce jako na Obr. 14, který zobrazuje PZA před vznikem intermediátu.

V publikaci **P12** jsme tedy pro *in silico* studium vzniku tetrahedrálních intermediátů použili metodu **kovalentního dockingu** (Schrödinger Suite, v rámci mé stáže na Farmaceutické fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě). Jedná se o molekulární docking, ve kterém je prvním krokem vznik kovalentní vazby (dle definovaného reakčního mechanismu) mezi vybranou funkční skupinou ligandu a vybraným aminokyselinovým zbytkem proteinu. Vzniklá kovalentní vazba funguje jako zábrana (délka vazby, úhel vazby), pro zbytek ligandu je pak optimální póza vyhledávána běžnými vyhledávacími funkcemi dokovacího algoritmu. Naše metodika předpověděla vznik správných a nekovalentními vazbami stabilizovaných intermediátů pro PZA i nikotinamid (obrázky 2 a 3 v P12). Pro studované 6-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy byly předpovězeny intermediáty, které nebyly stabilizovány (obrázek 4 v P12).

Závěr: 6-Alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy nebudou dle *in silico* modelování substrátem PZA.

2.4.2. Enoyl-ACP-reduktasa jako potenciální cílový protein

Enoyl-(acyl-carrier-protein) reduktasa (enoyl-ACP reduktasa; ENR; EC 1.3.1.9) patří do rodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (short-chain dehydrogenase/reductase; SDR). Funkčně ENR patří do systému synthasy mastných kyselin typu II (FAS II). ENR katalyzuje poslední krok cyklu prodlužování postranního řetězce mastných kyselin, tj. redukci dvojně vazby enoylového intermediátu (viz Obr. 15).

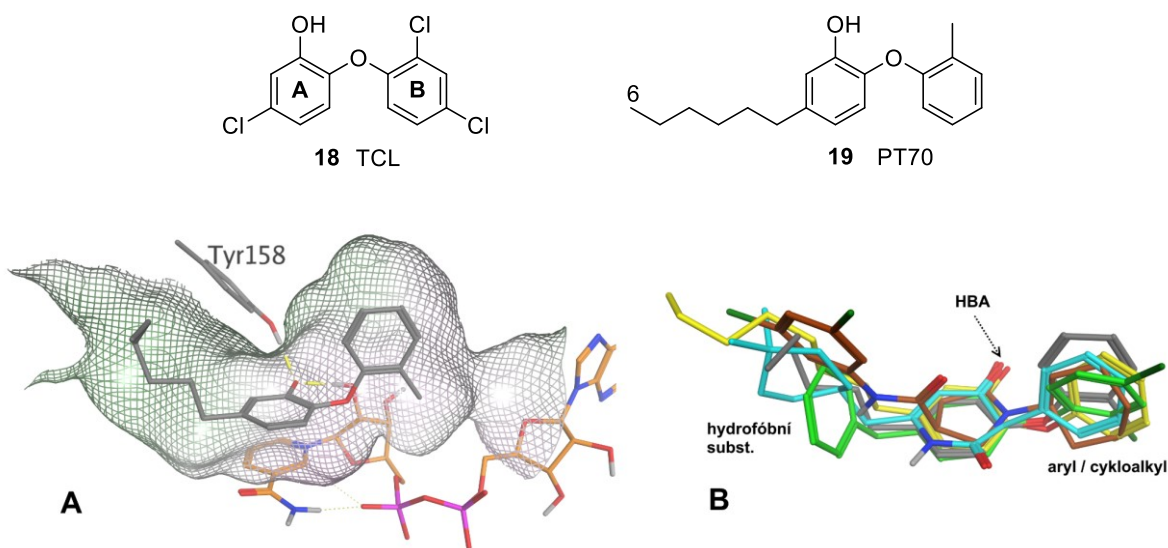


Obr. 15. Systém synthasy mastných kyselin II (FAS II). Převzato z [P23].

Kofaktorem ENR je NADH či NADPH, který slouží jako zdroj hydridu pro redukci dvojně vazby. Systém FAS II je typicky prokaryontní a je tvořen šesti jednotlivými enzymy, které spolu pouze místně a funkčně souvisí. Oproti tomu systém FAS I (typicky eukaryotní) je tvořen jediným enzymem, který má šest katalytických domén (viz také kapitola 1.3.2). Odlišnost prokaryontní FAS II od eukaryotní FAS I činí z FAS II atraktivní cíl pro vývoj antimikrobiálních léčiv. Inhibitory ENR jsou vyvíjeny především jako sloučeniny účinné vůči stafylokokům, plazmodiím

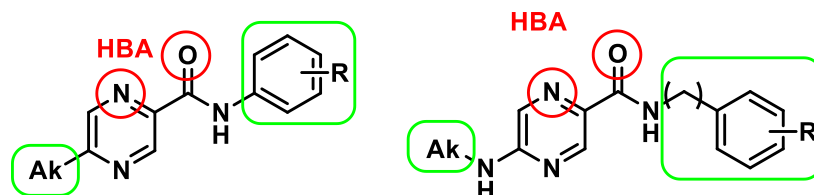
a *Mtb*. V přehledovém článku [P23] jsme podrobně zmapovali vývoj nových inhibitorů ENR v letech 2011–2015 v patentové i časopisecké literatuře.

Mykobakteriální ENR je primárním cílem isoniazidu (INH, antituberkulotikum 1. linie) a je proto označována také jako InhA. Díky intenzivnímu vývoji ve skupině inhibitorů ENR je známo několik strukturních tříd těchto inhibitorů [P23], jejichž společný farmakofor je dobře prostudován. PT70 (**19**) je derivát odvozený od antimikrobního triklosanu (TCL, **18**), jehož mechanismem účinku (nikoliv jediným) je inhibice bakteriální ENR. TCL i PT70 patří do strukturní skupiny difenyletherů. TCL je nescifickým inhibitorem ENR různých organismů, u PT70 došlo k vystupňování aktivity vůči mykobakteriální InhA, především díky zavedení hydrofobního alkyly [77]. Na Obr. 16A je znázorněna interakce inhibitoru PT70 s mykobakteriální InhA (pdb: [2X23](#)). Farmakofor je tvořen akceptorem vodíkové vazby, který vytváří H-vazby s hydroxylem Tyr158 a s 2'-hydroxylem glukosy z kofaktoru NADH. Fenolické jádro TCL vytváří π - π (sendvič) interakce s pyridinovým jádrem NADH. Hexylový zbytek vyplňuje hydrofobní tunel, ve kterém se běžně nachází alkyl masné kyseliny (přírodního substrátu). Na Obr. 16B je překryv inhibitorů InhA z různých strukturních tříd (vytvořeno superpozicí krystalografických struktur – pdb: 2B37, 2X23, 3FNF, 4R9S, 4TZK) a z něj vyvozený společný farmakofor.



Obr. 16. A – Interakce PT70 s komplexem InhA-NAD⁺. B – Překryv inhibitorů InhA z různých strukturních tříd ve vazebném místě InhA v porovnání s TCL (šedé uhlíky).

Je patrné, že mnohé z našich připravených derivátů pyrazin-2-karboxamidu mohou takto obecně definovaný farmakofor pro inhibici InhA uspokojit. Příklady takových derivátů jsou uvedeny na Obr. 17. Pyrazinové jádro nahrazuje fenolické jádro PT70. Vhodným HBA může být N-1 pyrazinového jádra či kyslíkový atom karboxamidu. Deriváty obsahují i dva hydrofobní substituenty v polohách odpovídajících PT70. Některé naše série derivátů pyrazin-2-karboxamidu jsme proto podrobili dokování do PncA.



Ak= *n*-butyl až *n*-heptyl

Obr. 17. Příklady derivátů PZA, které teoreticky splňují obecný farmakofor inhibitorů InhA. **Červeně** – akceptor vodíkové vazby. **Zeleně** – hydrofobní substituenty.

P11: 5- a 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy byly dokovány do InhA (pdb: [2X23](#)). Předpovídané pózy vybraných antimykobakteriálně účinných derivátů vykazují všechny důležité interakce známých inhibitorů. Karbonylový kyslík amidové vazby plní úlohu HBA a vytváří vodíkovou vazbu s Tyr158, případně s 2'-OH hydroxylem ribosy NADH. Postranní alkylový řetězec obsazuje vstupní hydrofobní tunel, ve kterém se za běžné situace nachází alkylový řetězec mastné kyseliny (přirozeného substrátu).

Závěr: Mechanismem účinku antimykobakteriálně účinných 5- a 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů by mohla být inhibice InhA. Tato hypotéza byla ověřována pomocí funkčního testu, kdy byla sledována změna spektra mykolových kyselin po kultivaci mykobaktérií s testovanou sloučeninou. Při kultivaci s vybranými 5- a 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy nebylo v porovnání s negativní kontrolou pozorována změna ve spektru mykolových kyselin. Tento mechanismus účinku tedy nebyl potvrzen [P11].

V publikacích P17 a P18 jsme popsali molekulární docking 3-substituovaných derivátů pyrazin-2-karboxamidu do InhA. U těchto derivátů nebyla shoda s diskutovaným farmakoforem zřejmá, nicméně i tyto deriváty byly nadokovány tak, že vykazovaly interakci s Tyr158 a případně s 2'-OH kofaktoru.

V publikaci P18 (doplněk) jsme předpověděli vazebný mód 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů (17, Obr. 13 na str. 48), tedy derivátů s velmi objemnými substituenty ve vzájemně vicinálních polohách. Překvapivě jsme zjistili, že i takto stericky náročné deriváty jsou dle *in silico* predikce schopny se vázat do aktivního místa InhA a že vykazují interakce shodné se známými inhibitory. Stericky objemné 2,3-disubstituované deriváty pyrazinu se však tímto způsobem vázaly pouze do otevřených nebo polootevřených konformací InhA, nikoliv do uzavřených konformací tohoto enzymu. Dokování do různých konformačních stavů jednoho proteinu je běžnou metodou využívanou k simulaci částečné flexibility proteinu. (Kavita InhA je spoluvytvářena pohyblivou smyčkou (tzv. substrate-binding loop), která uzavírá a otevírá aktivní místo InhA a organizuje se až během procesu navazování ligandu. Podílí se na

koordinování substrátu i vlastní katalýze - obsahuje i katalyticky důležitý Tyr158. InhA se tedy výrazně přizpůsobuje velikosti navazované molekuly substrátu či inhibitoru). *Obrázek S1* v doplňku k P18 zobrazuje reprezentativní vazebný mód 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů v InhA. Konformace ligandu je taková, že umožňuje zachování intramolekulární H-vazby (která je částečně oslabena ve prospěch vzniku dvou nových H-vazeb na Tyr158 a 2'-OH ribosy).

Závěr: Dle *in silico* predikce jsou i 2,3-disubstituované deriváty pyrazinu, včetně objemně substituovaných, schopny se vázat do aktivního místa InhA v podobném módu jako známé inhibitory InhA. Při dokování objemných derivátů je třeba užívat otevřené či polootevřené konformace InhA. Není jasné, zda předpovídaná afinita má biologický význam.

2.4.3. β -ketoacyl-ACP-synthasa jako potenciální cílový protein

β -Ketoacyl-ACP-synthasa III (FabH) je dalším enzymem patřícím do systému FAS II. V mykobakteriích tento enzym zprostředkovává nezbytné propojení (předávání substrátu) mezi systémy FAS I a FAS II [78]. Mastná kyselina ve formě thioesteru-koenzymu A je působením FabH rozšířena o 2 uhlíky a navázána jako beta-ketothioester na nosič ACP (Obr. 15 na str. 52).

Mykobakteriální FabH (pdb: [1U6S](#)) byla vybrána jako potenciální cíl námi připravených (4-fenylthiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamidů a to na základě vysoké strukturní podobnosti s dříve připravenými inhibitory homologní FabH z *E. coli*. Tento výběr se všemi souvislostmi je zdůvodněn v P20 a jejím doplňku.

Závěr: Na základě výsledků dockingové studie bylo potvrzeno, že studované deriváty se vážou poblíž katalytické triády FabH a mohou tak tento enzym inhibovat.

2.4.4. MycPermCheck

MycPermCheck [79] (University of Würzburg) je *in silico* model pro předpověď pravděpodobnosti průniku dané sloučeniny přes mykobakteriální stěnu. Model byl vytvořen analýzou hodnot molekulárních deskriptorů ve skupinách sloučenin pronikajících a nepronikajících přes mykobakteriální stěnu. Sloučeniny pronikající byly definovány jako látky mající inhibiční účinek na růst *Mtb in vitro*. Sloučeniny nepronikající byly zjednodušeně definovány jako látky účinkující jako inhibitory izolovaných mykobakteriálních subcelulárních cílů, které zároveň neinhibují růst *Mtb* jako celých buněk. MycPermCheck je zdarma dostupný jako webový nástroj [80], jako vstup jsou využívány deskriptory vypočtené modulem QikProp (Schrödinger Suite). MycPermCheck jsme využili v několika našich publikacích [P12, P14, P20]

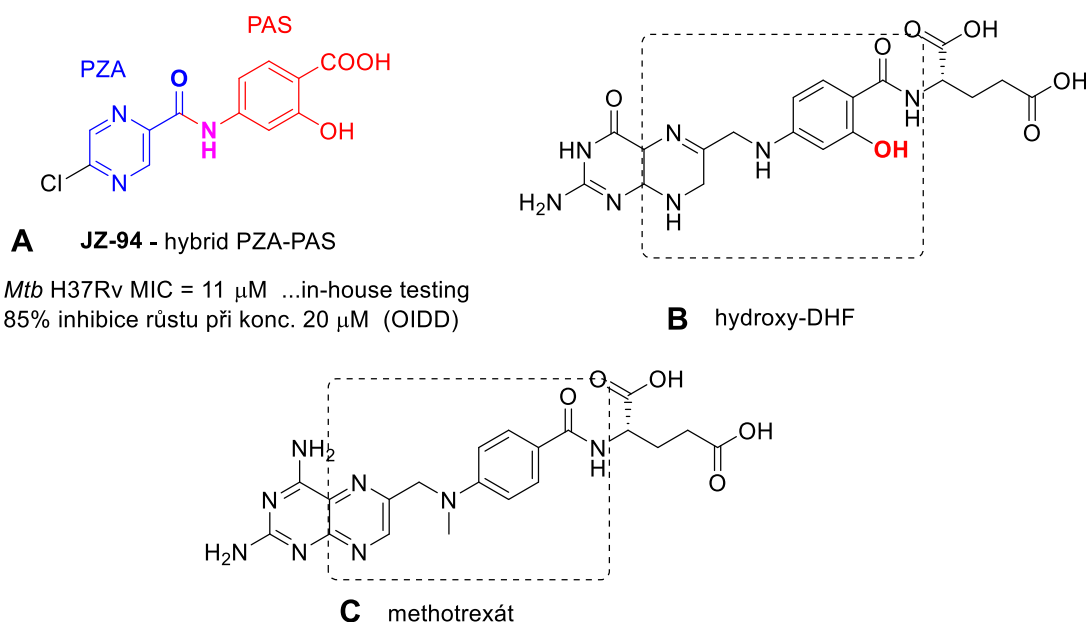
k zdůvodnění neúčinnosti některých sloučenin. Z celkových pěti deskriptorů, které MycPermCheck pro výpočet pravděpodobnosti průniku využívá, jsou k návrhu nových antituberkulotik intuitivně využitelné zejména $\log P$ (doporučené rozmezí 2,779–4,479) a počet akceptorů vodíkových vazeb (HBA, doporučené rozmezí 3,75–6,00 – pozn.: dle QikPrep výpočtu HBA mohou skutečně nabývat necelých čísel). Vzhledem k tomu, že centrální struktura našeho výzkumu PZA obsahuje ve své struktuře již 4 HBA (N-1 a N-4 pyrazinu, O a N karboxamidu), je poměrně snadné nevhodnou substitucí překročit horní limit pro počet HBA.

2.5. Hybridní sloučeniny kombinující fragment PZA a PAS

Anilid na Obr. 18 (označení JZ-94) byl původně publikován v sérii ostatních *N*-fenyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidů, které se lišily pouze charakterem substituce na benzenovém jádře [P7]. I když tento hybrid PZA-PAS nebyl v rámci publikované série zdaleka nejúčinnější (jeho MIC_{Mtb} byla přibližně 11 μM , nejúčinnější deriváty dosahovaly úrovně 3 μM), výhodou byla nízká cytotoxicita *in vitro* na několika různých buněčných liniích (viz Tab. 7 na straně 43). Dalším podnětem pro podrobnější studium této sloučeniny byl fakt, že ze sloučenin, které byly testovány na antimykobakteriální aktivitu v rámci programu OIDD (Eli Lilly), byl tento derivát absolutně nejúčinnější. Při koncentraci 20 μM inhiboval růst *Mtb* H37Rv z 85 % ve srovnání s kontrolou.

PAS je antituberkulotikum druhé linie. Do klinické praxe byla zavedena v roce 1947 a stala se tak historicky druhým antituberkulotickým léčivem (po streptomycinu). Postupným zaváděním účinnějších antituberkulotik však klinický význam PAS od 70. let 20. století postupně upadal. PAS vyžadovala vysoké dávkování (až 20 g za den) a nebyla dobře snášena [81]. V poslední době byl zájem o PAS obnoven díky zjištění, že baktericidní dávky PAS (10–12 g denně) mají schopnost oddálit vznik rezistence na antituberkulotika, které jsou s PAS podávány v kombinaci [81]. Přesný a úplný mechanismus antimykobakteriálního účinku není dosud znám. PAS zasahuje do metabolismu železa mykobaktérií [82]. Dle nových poznatků je však hlavním MÚ PAS pravděpodobně zásah do folátové dráhy mykobaktéria [83-85]. PAS vystupuje jako falešný substrát (antimetabolit *p*-aminobenzoové kys.) dihydropteroátsynthasy (DHPS) a je inkorporována do folátové dráhy za vzniku falešného metabolitu hydroxy-dihydrofolátu (hydroxy-DHF, Obr. 18B), který je inhibitorem mykobakteriální dihydrofolátreduktasy (DHFR) [85, 86]. Na základě strukturní podobnosti (vyznačeno rámečkem na Obr. 18B a C) mezi hybridní molekulou PZA-PAS, hydroxy-DHF (Obr. 18B) a klinicky užívaným inhibitorem eukaryotní DHFR methotrexátem (Obr. 18C) pracujeme s hypotézou, že hybridní sloučeniny PZA-PAS by mohly inhibovat některý z enzymů folátové cesty mykobaktéria. V tomto smyslu jsme již provedli prvotní molekulárně dokovací studie do mykobakteriální DHPS, dihydrofolátsynthasy (DHFS) a DHFR. Prvotní výsledky naznačily, že překážkou tohoto uvažovaného MÚ by mohla být snížená

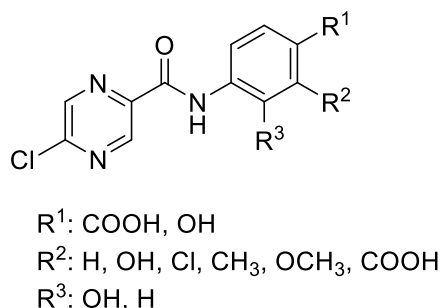
flexibilita karboxamidového linkeru v našich derivátech oproti aminomethylenovému linkeru v hydroxy-DHF a methotrexátu. Nevýhodou našich derivátů pro tento MÚ je také absence přikondenzovaného jádra s dusíkovými atomy, které, soudě na základě molekulárních interakcí mezi methotrexátem a mykobakteriální DHFR (pdb: [1DF7](#)), vytváří důležité stabilizující interakce.



Obr. 18. A - Sloučeniny kombinující ve své struktuře fragment PZA a 4-aminosalicylové kys. (PAS). B – struktura aktivního metabolitu PAS, který je inhibitorem DHFR. C – Methotrexát, klinicky užívaný inhibitor DHFR.

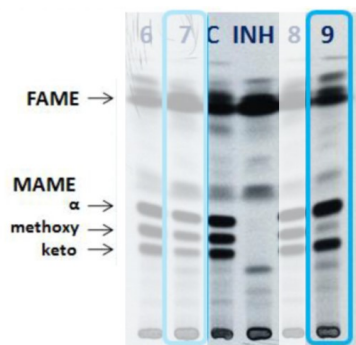
V rámci studia SAR ve skupině hybridních sloučenin PZA-PAS jsme nejprve chtěli ověřit, zda je přítomnost fragmentu PAS nezbytná pro dobrý antimykobakteriální účinek. V rámci diplomové práce Jany Žecové [DP2] jsme připravili deriváty s obměněnou substitucí benzenového jádra (Obr. 19), ve kterých se fenolická skupina přesunula do polohy 3 benzenového jádra či byla nahrazena jiným substituentem (CH_3 , OCH_3 , Cl). Byl připraven i derivát, ve kterém došlo k formální vzájemné výměně pozic karboxylu a hydroxylu. U většiny obměněných derivátů došlo k úplnému vymizení aktivity ($\text{MIC}_{Mtb} > 100 \mu\text{g/ml}$), u derivátu $\text{R}^1 = \text{COOH}$ $\text{R}^2 = \text{Cl}$ byla zaznamenána nízká aktivita $\text{MIC}_{Mtb} = 50 \mu\text{g/ml}$. Vzájemnou výměnou poloh karboxylové a fenolické skupiny (za vzniku $\text{R}^1 = \text{OH}$, $\text{R}^2 = \text{COOH}$) došlo ke snížení účinku o jeden stupeň dvojkového ředění z $6,25 \mu\text{g/ml}$ na $12,5 \mu\text{g/ml}$. Bylo tedy prokázáno, že substituční vzor PAS je důležitý pro antimykobakteriální účinek. Esterifikace karboxylové skupiny (za účelem vytvoření potenciálního proléčiva se zvýšenou lipofilitou a lepším průnikem do mykobaktéria) nevedla ke zvýšení *in vitro* účinku [DP2].

Předběžné výsledky uveřejněné v diplomové práci Ondřeje Žáka [DP3] dále ukazují, že záměnou chloru na pyrazinovém jádře za *n*-alkylamino substituent lze dosáhnout zvýšení aktivity až na úroveň $MIC_{Mtb} = 1,56 \mu\text{g/ml}$.



Obr. 19. Strukturální obměny hybridní molekuly PZA-PAS [DP2]

Na další možný mechanismus účinku hybridní struktury PZA-PAS ukázala biochemická studie provedená PharmDr. Barborou Vaňáskovou, Ph.D. (moje role: školitel specialista) v rámci její stáže na Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě (pod vedením doc. RNDr. Kataríny Mikušové). *M. tuberculosis* H37Ra bylo kultivováno v přítomnosti JZ-94 (5 $\mu\text{g/ml}$) v médiu obohaceném radioaktivně značeným acetátem. Po ukončení kultivace byl získán mykobakteriální lyzát, v němž byly radioizotopově značené mastné a mykolové kyseliny (vzniklé z radioaktivního acetátu) převedeny na methylestery a chromatograficky analyzovány. Výsledek byl porovnán s kontrolou INH, který je inhibítorem enoyl reduktasy (InhA) systému FAS II a navozuje tak hromadění mastných kyselin (ty jsou produkty FAS I) a depleci mykolových kyselin (produkty FAS II). Porovnáním normálního spektra mastných a mykolových kyselin (dráha C) se spektrem po kultivaci s hybridní sloučeninou JZ-94 (dráha 9) na Obr. 20 je patrné, že sloučenina JZ-94 způsobila selektivní depleci methoxymykolových kyselin. Methoxymykolové kyseliny patří mezi virulentní faktory *Mtb* [87].



Obr. 20. Vliv testovaných sloučenin na spektrum mastných a mykolových kyselin u *Mtb* H37Rv. FAME – methylestery mykolových kyselin, MAME – methylestery mykolových kyselin. INH – isoniazid (inhibitor FAS II), C – negativní kontrola. Převzato a upraveno z [DP4].

3. SOUHRN, ZÁVĚRY A MOŽNÉ SMĚRY DALŠÍHO VÝZKUMU

3.1. Vybrané perspektivní sloučeniny

V komentáři na předcházejících stranách jsem zhruba představil naše výsledky z projektu zaměřeného na nové deriváty PZA s potenciální antimykobakteriální aktivitou. V rámci projektu jsme dokončili vyhodnocení SAR ve skupině anilidů pyrazin-2-karboxylových kyselin (*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů). Dále jsme navrhli strukturní obměny této základní sloučeniny, vybrané deriváty připravili a otestovali (Obr. 10 na str. 45). Tímto způsobem byly získány některé deriváty se zvýšeným či zachovaným antimykobakteriálním účinkem (*Mtb*) a výrazně sníženou *in vitro* cytotoxicitou (HepG2 a další buněčné linie). Velmi úspěšnou obměnou v tomto smyslu byla náhrada atomu chloru na pyrazinovém jádře za *n*-alkylamino substituent s delším řetězcem (optimum C₆ až C₈) (kapitola 2.3.1.). Mezi obměny, které antimykobakteriální aktivitu mírně snižovaly, ale vedly ke sloučeninám s nižší cytotoxicitou, patřily obměny spojovacího řetězce mezi pyrazinovým a benzenovým jádrem výchozího anilidu POA – prodloužení spojovacího řetězce o jednu methylenovou skupinu, inverze spojovacího řetězce za vzniku *N*-(pyrazin-2-yl)benzamidů.

Úspěšnou strategií se ukázalo být spojování dvou antimykobakteriálně účinných fragmentů do jedné hybridní molekuly. Obdrželi jsme tak sloučeniny vykazující antimykobakteriální aktivitu s MIC v nízkých jednotkách μM a nízkou cytotoxicitou. Velmi perspektivní se jeví hybridní sloučeniny kombinující fragment PZA a *p*-aminosalicylové kyseliny (kapitola 2.5) nebo hybridní sloučeniny kombinující PZA a substituovaný 2-aminothiazol (**11a** na Obr. 10 na str. 45). Tyto z našeho pohledu perspektivní deriváty hodláme strukturně rozpracovat (tj. navrhnout a připravit jejich strukturní deriváty a prozkoumat SAR) a pokusit se experimentálně zjistit jejich možný mechanismus účinku.

3.2. Mechanismu účinku

Největší slabinou našeho dosavadního výzkumu je skutečnost, že nemáme žádným způsobem experimentálně určen či potvrzen mechanismus antimykobakteriálního účinku našich sloučenin. Na základě molekulárně dokovacích studií jsme pro mnohé deriváty PZA navrhli jako MÚ zásah do syntézy mastných/mykolových kyselin prostřednictvím inhibice mykobakteriální enoyl-ACP reduktasy (InhA). Funkční test založený na sledování spektra těchto kyselin po inkubaci mykobaktérií s testovanými sloučeninami tento MÚ však neprokázal [P11, DP4].

Ve spolupráci s PharmDr. Ondřejem Jand'ourkem, Ph.D. (Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové) máme připraven funkční test, který na základě biochemické inkorporace radioaktivně značených prekurzorů makromolekulárních látek

je schopen určit, zda testovaná sloučenina inhibuje syntézu peptidoglykanu, DNA, RNA, či proteosyntézu. V současnosti nám tento test již funguje na vybraných bakteriálních kmenech. V současné době probíhá validace tohoto testu pro modelový organismus *M. smegmatis* s výhledem možného rozšíření na avirulentní kmen *Mtb* H37Rv. Oproti standardnímu protokolu pro bakterie bude do testu na mykobakteriích přidána kultivace s radioaktivně značeným acetátem, která by nám měla umožnit sledovat biosyntézu mastných a mykolových kyselin.

Výsledky výše uvedeného testu ovlivnění syntézy makromolekul by nám mohly napovědět, na jaké konkrétní metabolické dráhy a konkrétní enzymy či cíle se máme zaměřit, ať již v dalších *in silico* modelovacích studiích či v reálném experimentálním hodnocení interakcí derivátů PZA s proteiny (enzymové eseje, izotermální titrační kalorimetrie, kokrytalizační experimenty). V práci s proteiny nám bude velmi nápomocna biokrytalografická laboratoř (Laboratory for Biocrystallography, KU Leuven, Belgie), se kterou jsme nedávno navázali vědeckou spolupráci a kde jsem v roce 2018 působil v rámci tříměsíční stáže. Jedná se o špičkové pracoviště rutinně provádějící klonování, expresi, purifikaci a krytalografickou analýzu proteinů.

3.3. Nové směry výzkumu

3.3.1. OIDD – Od náhody po *in vivo* testování

V letech 2012–2018 byla naše pracovní skupina zapojena do programu Open Innovation Drug Discovery (OIDD). Jednalo se o program farmaceutické společnosti Eli Lilly (dále jako společnost) postavený na základě principu „Open Innovation“, tedy inovace založené na sdílení informací a spolupráci.

V rámci OIDD byly naše látky testovány v mnohých panelech, které pokrývaly oblast onemocnění metabolických (diabetes mellitus), kardiovaskulárních, imunitních, onkologických, neurodegenerativních a oblast bolesti. Pro naši skupinu bylo příhodné testování v panelu tropických a jiných opomíjených nemocí, kam byla zařazena i TB. V jednotlivých panelech se nacházejí testy fenotypové (netestujeme na konkrétní receptor ale na biologickou aktivitu) i testy cílené na konkrétní receptor či enzym. Z hlediska provedení se jedná o určení aktivity (změna aktivity v % vůči kontrole) při dané koncentraci testované sloučeniny (SP; single point), nebo se jedná o určení EC_{50} (či obdobného parametru) na základě průběhu křivky závislosti aktivity na koncentraci (CRC; concentration response curve).

OIDD – kampaň z pohledu syntetické laboratoře:

- Dostupnost mnoha testů pro širokou paletu cílů a onemocnění. Je jisté, že osamocená laboratoř ani při spolupráci s jinými laboratořemi nemůže mít přístup k podobnému množství testů. Je zde tedy šance najít nové potenciální cíle a uplatnění pro sloučeniny, které již byly tzv. v „šuplíku“.
- Velká kapacita a automatizace testování.
- Vlastnická práva k testovaným látkám zůstávají u původce látky, potažmo jeho zaměstnavatele.
- Výsledky testování lze publikovat.
- Uživatel nemá možnost ovlivnit, které látky budou testovány a ve kterých panelech. Složení testovacích panelů je v čase proměnné v závislosti na prioritách společnosti.

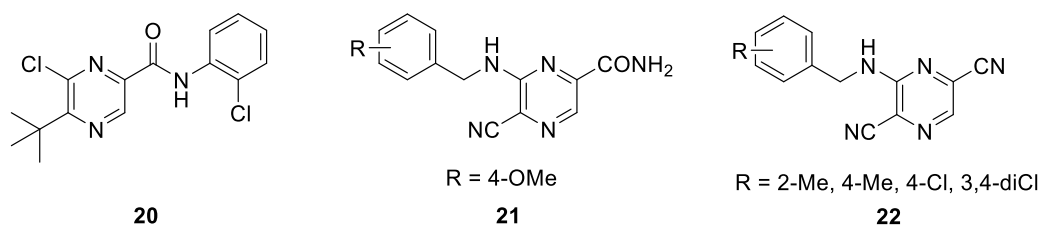
Níže jako příklad uvádím esej, ve které naše sloučeniny dosáhly (samozřejmě kromě antimykobakteriálních testů v rámci OIDD) výrazných výsledků.

GLP-1 Secretion Assay

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) je peptidový hormon vylučovaný enteroendokrinními buňkami typu L, které se nachází především v ileu a tlustém střevu, ale v menší míře také v duodenu a jejunu [88]. Vylučování GLP-1 je závislé na obsahu glukosy ve střevě. GLP-1 se váže na příslušné receptory (GLP-1R) na povrchu β buněk Langerhansových ostrůvků slinivky a vyvolává zvýšení sekrece insulinu. GLP-1 proto řadíme mezi tzv. inkretiny, tj. hormony působící snižování hladiny glukosy v krvi. Ovlivnění systému GLP-1 – insulin je dnes využíváno k terapii diabetes mellitus 2. typu (DM 2). Na trhu jsou dostupná peptidová analoga GLP-1 se zvýšenou stabilitou (exenatid, liraglutid, lixisenatid, albiglutid, dulaglutid, semaglutid). Alternativní strategií je nasazení inhibitorů dipeptidyl peptidasy 4 (DPP-4), což je hlavní enzym odbourávající GLP-1. Inhibitory DPP-4 jsou označovány příponovým morfémem –gliptin. Celosvětově je registrováno více než deset různých gliptinů, v ČR v současnosti (2019) mají registrovaný přípravek látky sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin a alogliptin. Strukturně se (na rozdíl od analog GLP-1) jedná o nepeptidové malé molekuly.

Je zřejmé, že ovlivnění systému GLP-1 – insulin k léčbě DM 2 je oblastí, ve které se v současné době angažuje většina velkých farmaceutických společností. Další strategií (kromě analog GLP-1 a inhibitorů DPP-4) je využití malých molekul, které by stimulovaly sekreci GLP-1 působením na L enteroendokrinní buňky.

Na vyhledávání těchto sloučenin byl zaměřen jeden z testů v rámci OIDD. V primárním testu byly sloučeniny testovány na schopnost zvyšovat sekreci GLP-1 u modifikovaných myšiček a lidských enterocytů. Stimulující aktivita byla v různé míře zjištěna u dvou strukturních typů našich sloučenin – anilidů POA s lipofilními substituenty na pyrazinovém jádře (Obr. 21, **20**) a u kyanopyrazinkarboxamidů (**21**), případně pyrazindikarbonitrilů (**22**) s benzylamino substituentem.



Obr. 21. Pyrazinové deriváty stimující sekreci GLP-1

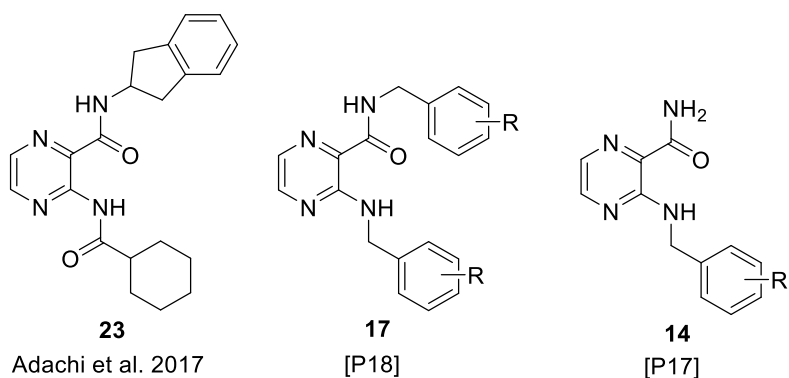
Tyto sloučeniny v primárním testu při koncentraci 20 μM zvyšovaly sekreci GLP-1 o 50–137 % oproti kontrole, při koncentraci 2 μM byla sekrece GLP-1 zvýšena o 10–78 %. V testech závislosti aktivity na koncentraci byly pro tyto látky určeny hodnoty EC_{50} v řádech jednotek μM . Bylo zajímavé, že sloučeniny zvyšovaly sekreci GLP-1 u myších buněk, ale nikoliv u lidských. Dvě vybrané sloučeniny byly testovány na stimulaci sekrece GLP-1 *in vivo* na myším modelu. Látky byly adjustovány do tekuté perorální formy a podány myším, které byly předtím 16 hodin bez potravy. Třicet minut po podání byly myši dekapitovány a ve vzorku plazmy byly stanoveny plazmatické koncentrace parentní testované látky a koncentrace GLP-1. Látka **20** dosáhla plazmatické koncentrace pouhých 58 nM a zvýšila koncentraci GLP-1 1,59krát v porovnání s negativní kontrolou. Látka **21** dosáhla plazmatické koncentrace 16 μM a koncentraci GLP-1 oproti kontrole nezvýšila. Dle ústního sdělení pracovníků OIDD je zájem o látky zvyšující sekreci alespoň 5krát vůči negativní kontrole, což přibližně odpovídá účinku pozitivní kontroly používané v testu.

Vzhledem k nedostatečné aktivitě látek **20** a **21** tedy nebylo v jejich výzkumu v rámci OIDD pokračováno. I přes to byly tyto *in vivo* studie pro nás velmi prospěšné. Byla nalezena vhodná formulace pro perorální podání značně lipofilních derivátů. Prospěšná pro nás byla i informace o značných rozdílech v biodostupnosti pyrazinových derivátů (o 3 řády se lišící plazmatické koncentrace látky **20** a **21**). Nejdůležitějším je však ujištění, že velkokapacitní skrínigové kampaně mohou u *in-house* sloučenin objevit zcela jiné účinky, než na které byly sloučeniny původně navrhovány.

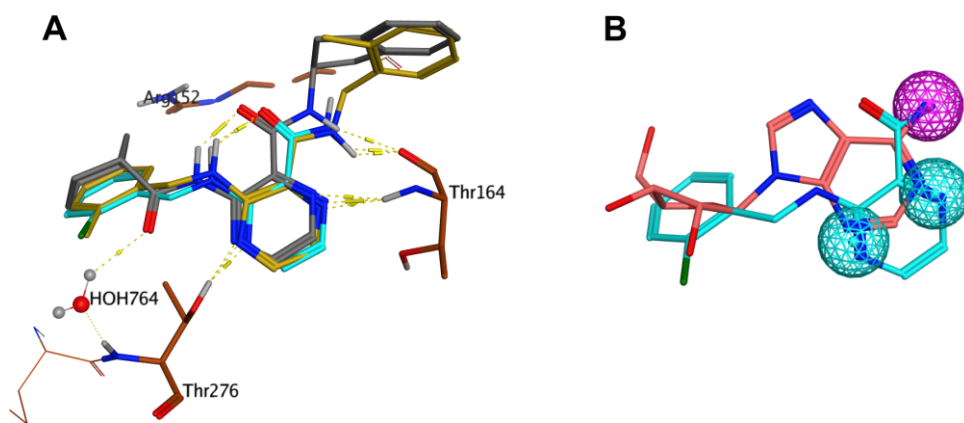
3.3.2. Deriváty pyrazinamidu jako analoga adeninu či adenosinu

V roce 2017 jsme rešerší literatury zjistili, že sloučenina **23** (Obr. 22) byla popsána jako inhibitor lidské prolyl-tRNA synthetasy (hProRS). To nás velmi zaujalo, neboť jsme ze zcela jiných pohnutek připravili strukturně velmi podobné 2,3-disubstituované deriváty pyrazinu (**17**, Obr. 13 na str. 48). V rámci mé zahraniční stáže v Laboratory for Biocrystallography (KU Leuven, Belgie) jsem pod vedením Dr. Stephena Weekse biosynteticky připravil hProRS a optimalizoval podmínky pro její krystalizaci. Posléze byly provedeny kokrystalizační experimenty s vybranými sloučeninami strukturního typu **17** a **14** (Obr. 22). Doposud se podařilo krystalograficky vyřešit

strukturu dvou terciárních komplexů hProRS-prolin-pyrazinový derivát a to pro sloučeninu LS51 strukturního typu **17** ($R = 2\text{-CH}_3$) a sloučeninu OJ49 strukturního typu **14** ($R = 2\text{-Cl}$). Obě naše sloučeniny se vázaly stejným způsobem jako potvrzený inhibitor **23** – viz Obr. 23A. Pozice jednotlivých aromátů a cyklů byly totožné a ve všech ligandech vystupovaly oba dusíkové atomy pyrazinového jádra jako akceptory H-vazeb a karboxamidový vodík jako donor H-vazby. Původní inhibitor vykazuje navíc jednu H-vazbu karbonylového kyslíku druhého karboxamidu přes molekulu vody. Našimi výsledky jsme dokázali, že indanové jádro původního inhibitoru **23** není nutné pro vazbu ligandu do aktivního místa hProRS. Toto jádro vykazuje pouze nespecifické interakce s receptorem a může být nahrazeno podobným jádrem (**17**) nebo zcela odstraněno (**14**).



Obr. 22. Srovnání struktury potvrzeného inhibitoru lidské prolyl-tRNA synthetasy (**23**) se strukturou 2,3-disubstituovaných derivátů pyrazinu z naší laboratoře.



Obr. 23. A – Překryv potvrzeného inhibitoru (šedé uhlíky) s deriváty LS51 (žluté uhlíky) a OJ49 (tyrkysové uhlíky). B - Překryv OJ49 (tyrkysové uhlíky) s fragmentem ATP (lososové uhlíky). Tyrkysové sféry – akceptory H-vazeb, fialová sféra – donor H-vazeb.

ProRS patří mezi aminoacyl-tRNA synthetasy, jejichž úkolem je vázat příslušnou aminokyselinu (po aktivaci reakcí s ATP) na odpovídající tRNA. Je tedy jasné, že se jedná o velmi konzervované a esenciální proteiny s výskytem ve všech živých organismech [89]. Inhibitory různých aminoacyl-tRNA synthetas je teoreticky možno využít jako antimikrobní léčiva [90] nebo kancerostatika. Důležitější je však dle mého názoru obecný princip vyplývající z Obr. 23B a sice

ten, že vhodně 3-substituované deriváty PZA mohou napodobovat interakce adenosinu (adeninového jádra). Domyšleno do důsledku to znamená, že takovéto deriváty PZA by mohly teoreticky interagovat s jakýmkoliv enzymem či receptorem, který má vazebné místo pro ATP a příbuzné ligandy.

Projekt derivátů PZA jako potenciálních ligandů aminoacyl-tRNA synthetas hodláme v následujících letech dále rozvíjet ve spolupráci se skupinami prof. Aerschota (farmaceutická chemie, Rega Institut) a prof. Strelkova (biokrystalografie, Laboratory for Biocrystallography), obojí v rámci KU Leuven, Lovan, Belgie.

4. LITERATURA

4.1. Seznam vlastních prací s uvedením podílu předkladatele

4.1.1. Původní experimentální práce

(S) značí, že k dané publikaci existují doplňky (Supplementary Material)

- P1. Doležal, M.; **Zitko, J.**; Kešetovičová, D.; Kuneš, J.; Svobodová, M. Substituted *N*-Phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. *Molecules* **2009**, *14*, 4180-4189.
Podíl: *Syntéza vybraných derivátů. Podíl na sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.*
- P2. Doležal, M.; **Zitko, J.**; Osička, Z.; Kuneš, J.; Vejsová, M.; Buchta, V.; Dohnal, J.; Jampílek, J.; Kralova, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2010**, *15*, 8567-81.
Podíl: *Syntéza vybraných derivátů. Podíl na sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.*
- P3. **Zitko, J.**; Doležal, M.; Svobodová, M.; Vejsová, M.; Kuneš, J.; Kučera, R.; Jílek, P. Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1471-1476.
Podíl: *První a korespondující autor. Návrh studie. Syntéza všech derivátů. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepání manuskriptu, korektura manuskriptu.*
- P4. **Zitko, J.**; Jampílek, J.; Dobrovolný, L.; Svobodová, M.; Kuneš, J.; Doležal, M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1598-1601. (S)
Podíl: *První a korespondující autor. Návrh studie. Vedení syntetizujícího studenta. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepání manuskriptu, korektura manuskriptu.*
- P5. Servusová, B.; Vobicková, J.; Paterová, P.; Kubíček, V.; Kuneš, J.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3589-3591. (S)
Podíl: *Školitel specialista první autorky. Návrh studie. Podíl na vyhodnocení biologických výsledků. Konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.*
- P6. **Zitko, J.**; Paterová, P.; Kubíček, V.; Mandiková, J.; Trejtnar, F.; Kuneš, J.; Doležal, M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinamide derivatives with benzylamino substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 476-479. (S)
Podíl: *První a korespondující autor. Návrh studie. Syntéza všech sloučenin. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepání manuskriptu, korektura manuskriptu.*

- P7. **Zitko, J.**; Servusová, B.; Paterová, P.; Mandiková, J.; Kubíček, V.; Kučera, R.; Hrabcova, V.; Kuneš, J.; Soukup, O.; Doležal, M. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2013**, *18*, 14807-25. (S)
Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Syntéza všech sloučenin. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepisání manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P8. Jand'ourek, O.; Doležal, M.; Kuneš, J.; Kubíček, V.; Paterová, P.; Peško, M.; Buchta, V.; Králova, K.; **Zitko, J.** New Potentially Active Pyrazinamide Derivatives Synthesized Under Microwave Conditions. *Molecules* **2014**, *19*, 9318-9338.
Podíl: Školitel specialista prvního autora a korespondující autor. Podíl na vyhodnocení biologických výsledků. Korelace měřených a vypočtených parametrů lipofility. Konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P9. Servusová, B.; Paterová, P.; Mandiková, J.; Kubíček, V.; Kučera, R.; Kuneš, J.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 450-453. (S)
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Podíl na návrhu studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Molekulární docking. Podíl na sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P10. Semelková, L.; Konečná, K.; Paterová, P.; Kubíček, V.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Marek, J.; Naesens, L.; Peško, M.; Králová, K.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Alkyl-3-(alkylamino)-pyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2015**, *20*, 8687-8711.
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Podíl na návrhu studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P11. Servusová-Vaňásková, B.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Kordulakova, J.; Plevakova, M.; Kubíček, V.; Kučera, R.; Garaj, V.; Naesens, L.; Kuneš, J.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *MedChemComm* **2015**, *6*, 1311-1317. (S)
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Návrh studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Molekulární docking. Podíl na sepisování manuskriptu, konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P12. Servusová-Vaňásková, B.; Paterová, P.; Garaj, V.; Mandiková, J.; Kuneš, J.; Naesens, L.; Jílek, P.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 6-Alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 674-681. (S)
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Podíl na návrhu studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Molekulární docking. Podíl na sepisování manuskriptu, konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.

- P13. **Zitko, J.**; Franco, F.; Paterová, P. Synthesis and anti-infective evaluation of 5-amino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Ceska Slov. Farm.* **2015**, *64*, 19-24.
Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Vedení syntetizujícího studenta. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepsání manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P14. **Zitko, J.**; Servusová, B.; Janoutová, A.; Paterová, P.; Mandíková, J.; Garaj, V.; Vejsová, M.; Marek, J.; Doležal, M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 174-183. (S)
Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Podíl na syntéze a vedení syntetizujícího studenta. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepsání manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P15. **Zitko, J.**; Servusová-Vaňásková, B.; Paterová, P.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Kuneš, J.; Doležal, M. Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Papers* **2016**, *70*, 649-657. (S)
Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Vedení syntetizujícího studenta. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepsání manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P16. Bouz, G.; Juhás, M.; Niklová, P.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Janoušek, J.; Tůmová, L.; Kovalíková, Z.; Kastner, P.; Doležal, M.; **Zitko, J.** Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules* **2017**, *22*, 1797. (S)
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Podíl na vyhodnocení výsledků. Konzultace při sepsování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P17. Jand'ourek, O.; Tauchman, M.; Paterová, P.; Konečná, K.; Navrátilová, L.; Kubíček, V.; Holas, O.; **Zitko, J.**; Doležal, M. Synthesis of Novel Pyrazinamide Derivatives Based on 3-Chloropyrazine-2-carboxamide and Their Antimicrobial Evaluation. *Molecules* **2017**, *22*, 223.
Podíl: Školitel specialista prvního autora. Podíl na návrhu studie. Podíl na vyhodnocení biologických výsledků. Konzultace při sepsování manuskriptu, korektura manuskriptu.
- P18. Semelková, L.; Jand'ourek, 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. (S)
Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Návrh studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Molekulární docking, energetické minimalizace studovaných sloučenin. Podíl na sepsování manuskriptu. Konzultace při sepsování manuskriptu, korektura manuskriptu.

P19. Semelková, L.; Janošcová, P.; Fernandes, C.; Bouz, G.; Jand'ourek, 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. *Molecules* **2017**, *22*, 1491. (S)

Podíl: Školitel specialista první autorky a korespondující autor. Návrh studie. Podíl na vyhodnocení výsledků. Molekulární docking. Podíl na sepisování manuskriptu. Konzultace při sepisování manuskriptu, korektura manuskriptu.

P20. **Zitko, J.**; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Navrátilová, L.; Kuneš, J.; Vinšová, J.; Doležal, M. Design, synthesis and antimycobacterial activity of hybrid molecules combining pyrazinamide with 4-phenylthiazol-2-amine scaffold. *MedChemComm* **2018**, *9*, 685-696.

Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Syntéza sloučenin. Vyhodnocení biologických výsledků. Molekulární docking. Sepsání manuskriptu, korektura manuskriptu.

P21. **Zitko, J.**; Mindlová, A.; Valášek, O.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Janoušek, J.; Konečná, K.; Doležal, M. Design, Synthesis and Evaluation of *N*-pyrazinylbenzamides as Potential Antimycobacterial Agents. *Molecules* **2018**, *23*, 2390.

Podíl: První a korespondující autor. Návrh studie. Podíl na syntéze a vedení syntetizujících studentů. Kvantově-chemické výpočty. Vyhodnocení biologických výsledků. Sepsání manuskriptu, korektura manuskriptu.

4.1.2. Přehledové práce

P22. Doležal, M.; Kesetovic, D.; **Zitko, J.** Antimycobacterial evaluation of pyrazinoic acid reversible derivatives. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3506-3514.

Podíl: Spoluautor. Podíl na rešerši. Podíl na sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.

P23. **Zitko, J.**; Doležal, M. Enoyl acyl carrier protein reductase inhibitors: an updated patent review (2011 - 2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 1079-1094.

Podíl: První autor a korespondující autor. Většinový podíl na rešerši a sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.

P24. **Zitko, J.**; Doležal, M. Old Drugs and New Targets as an Outlook for the Treatment of Tuberculosis. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 5142-5167.

Podíl: První autor a korespondující autor. Podíl na rešerši a většinový podíl na sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.

4.1.3. Kapitoly v monografiích

- P25. Doležal, M.; **Zitko, J.**; Jampílek, J. Pyrazinecarboxylic Acid Derivatives with Antimycobacterial Activity. Cardona, P.-J., ed. Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance [online]. InTech, 2012.[cit. 2019-02-04]. DOI: [10.5772/29598](https://doi.org/10.5772/29598). ISBN 978-953-307-948-6. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drug-resistance/pyrazinecarboxylic-acid-derivatives-with-antimycobacterial-activity>

4.1.4. Práce nezahrnuté v tomto komentáři

Pro přístup k nepřiloženým pracím je možno využít aktivní odkazy uvedené v Tab. 8 na str. 70.

Patentové přihlášky

- P26. Doležal, M.; **Zitko, J.**; Jand'ourek, O.; Servusová-Vaňásková, B. Preparation of 2-(2-phenylhydrazinyl)pyrazine derivatives as antitubercular agents. WO2016095877A1, 2016.
Podíl: *Spoluautor přihlášky. Korektury textu.*

Původní experimentální práce

- P27. Sebastian, S. H. R.; Al-Alshaikh, M. A.; El-Emam, A. A.; Panicker, C. Y.; **Zitko, J.**; Doležal, M.; VanAlsenoy, C. Spectroscopic, quantum chemical studies, Fukui functions, in vitro antiviral activity and molecular docking of 5-chloro-*N*-(3-nitrophenyl) pyrazine-2-carboxamide. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1119*, 188-199.
Podíl: *Spoluautor. Syntéza. Vyhodnocení biologických výsledků. Korektura manuskriptu.*
- P28. Beegum, S.; Mary, Y. S.; Varghese, H. T.; Panicker, C. Y.; Armaković, S.; Armaković, S. J.; **Zitko, J.**; Doležal, M.; Van Alsenoy, C. Vibrational spectroscopic analysis of cyanopyrazine-2-carboxamide derivatives and investigation of their reactive properties by DFT calculations and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1131*, 1-15.
Podíl: *Spoluautor. Syntéza. Vyhodnocení biologických výsledků. Molekulární docking. Podíl na sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.*
- P29. Ranjith, P. K.; Al-Abdullah, E. S.; Al-Omary, F. A. M.; El-Emam, A. A.; Anto, P. L.; Sheena, M. Y.; Armaković, S.; Armaković, S. J.; **Zitko, J.**; Doležal, M.; Van Alsenoy, C. FT-IR and FT-Raman characterization and investigation of reactive properties of *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide by molecular dynamics simulations and DFT calculations. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1136*, 14-24.
Podíl: *Spoluautor. Syntéza. Vyhodnocení biologických výsledků. Korektura manuskriptu.*

Přehledové práce

P30. Doležal, M.; **Zitko, J.** Pyrazine derivatives: a patent review (June 2012-present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 33-47.

Podíl: Spoluautor a korespondující autor. Podíl na rešerši. Podíl na sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.

P31. **Zitko, J.**; Doležal, M. Indole-2-carboxamide derivatives: a patent evaluation of WO2015036412A1. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 1487-1494.

(přehledový článek-hodnocení patentové přihlášky v kontextu literatury)

Podíl: První autor a korespondující autor. Většinový podíl na rešerši a sepisování manuskriptu. Korektura manuskriptu.

P32. Mucaji, P.; Atanasov, A. G.; Bak, A.; Kozik, V.; Sieron, K.; Olsen, M.; Pan, W. D.; Liu, Y. Z.; Hu, S. C.; Lan, J. J.; Haider, N.; Musiol, R.; Vanco, J.; Diederich, M.; Ji, S.; **Zitko, J.**; Wang, D. D.; Agbaba, D.; Nikolic, K.; Oljacic, S.; Vucicevic, J.; Jezova, D.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Tsopelas, F.; Giaginis, C.; Kowalska, T.; Sajewicz, M.; Silberring, J.; Mielczarek, P.; Smoluch, M.; Jendrzewska, I.; Polanski, J.; Jampilek, J. The Forty-Sixth Euro Congress on Drug Synthesis and Analysis: Snapshot. *Molecules* **2017**, *22*, 1848.

(rozšířený abstrakt – conference paper mé přenášky)

Podíl: Autor příslušné části.

Tab. 8. Tabulka s aktivními odkazy – nepřiložené publikace

Označení	Zdroj	Rok	DOI či jiný odkaz	IF
P26	Patent	2016	WO2015036412A1	-
P27	J. Mol. Struct.	2016	10.1016/j.molstruc.2016.04.088	IF ₂₀₁₆ = 1.753
P28	J. Mol. Struct.	2017	10.1016/j.molstruc.2016.11.044	IF ₂₀₁₇ = 2.011
P29	J. Mol. Struct.	2017	10.1016/j.molstruc.2017.01.079	IF ₂₀₁₇ = 2.011
P30	EOTP	2015	10.1517/13543776.2014.982533	IF ₂₀₁₅ = 4.626
P31	EOTP	2015	10.1517/13543776.2015.1101066	IF ₂₀₁₅ = 4.626
P32	Molecules	2017	10.3390/molecules22111848	IF ₂₀₁₇ = 3.098

EOTP – Expert Opinion on Therapeutic Patents

4.2. Kvalifikační práce

Některá data diskutovaná v tomto komentáři nebyla dosud publikována časopisecky a jsou dostupná ve formě diplomových, rigorózních či disertačních prací, jejichž jsem byl školitelem, resp. školitelem specialistou.

- DP1. Martina Halířová. Deriváty 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny jako potenciální antiinfektiva. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2017. Dostupné online: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/85325>
- DP2. Jana Žecová. Zlúčeniny kombinujúce fragment pyrazinamidu a 4-aminobenzoovej kyseliny ako potencionálne antituberkulotiká. Diplomová / rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2018. Dostupné online: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/104630>
- DP3. Ondřej Žák. Sloučeniny kombinující fragment pyrazinamidu a p-aminosalicylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika II. Diplomová / rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2018. Dostupné online: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/104044>
- DP4. Barbora Vaňásková. Deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika. (příprava a studium biologických vlastností). Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Hradec Králové, 2016. Dostupné online: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/81619>

4.3. Seznam ostatní použité literatury

1. Barberis, I.; Bragazzi, N. L.; Galluzzo, L.; Martini, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J. Prev. Med. Hyg.* **2017**, *58*, e9-e12.
2. Kapur, V.; Whittam, T. S.; Musser, J. M. Is Mycobacterium tuberculosis 15,000 Years Old? *The Journal of Infectious Diseases* **1994**, *170*, 1348-1349.
3. 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*, e3426.
4. Zink, A. R.; Sola, C.; Reischl, U.; Grabner, W.; Rastogi, N.; Wolf, H.; Nerlich, A. G. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 359-367.
5. Houben, R. M.; Dodd, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002152.
6. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. WHO/CDS/TB/2018.20 [online]. Geneva: World Health Organization, 2018. Dostupné z: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [01-02-2019].
7. ÚZIS ČR. Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017. ÚZIS ČZ, 2018. [online] Dostupné z: https://www.uzis.cz/system/files/tbc2017_cz.pdf [01-02-2019].

8. Prestinaci, F.; Pezzotti, P.; Pantosti, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health* **2015**, *109*, 309-318.
9. Singer, A. C.; Shaw, H.; Rhodes, V.; Hart, A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1728.
10. World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. WHO/HTM/TB/2016.04 [online]. Geneva: World Health Organization, 2016. Dsoťupné z: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/treatment/resources/en/> [01-02-2019].
11. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z. H. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2044-2049.
12. Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. H. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 790-795.
13. Zhang, Y.; Zhang, H.; Sun, Z. Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to weak acids. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 56-60.
14. Zhang, Y. M.; Zhang, J.; Cui, P.; Zhang, Y.; Zhang, W. H. Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00940-17.
15. Kapp, E.; Malan, S. F.; Joubert, J.; Sampson, S. L. Small Molecule Efflux Pump Inhibitors in Mycobacterium tuberculosis: A Rational Drug Design Perspective. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2018**, *18*, 72-86.
16. Gupta, S.; Tyagi, S.; Almeida, D. V.; Maiga, M. C.; Ammerman, N. C.; Bishai, W. R. Acceleration of Tuberculosis Treatment by Adjunctive Therapy with Verapamil as an Efflux Inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 600-607.
17. Adams, K. N.; Szumowski, J. D.; Ramakrishnan, L. Verapamil, and Its Metabolite Norverapamil, Inhibit Macrophage-induced, Bacterial Efflux Pump-mediated Tolerance to Multiple Anti-tubercular Drugs. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 456-466.
18. Gupta, S.; Cohen, K. A.; Winglee, K.; Maiga, M.; Diarra, B.; Bishai, W. R. Efflux Inhibition with Verapamil Potentiates Bedaquiline in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 574-576.
19. Chen, C.; Gardete, S.; Jansen, R. S.; Shetty, A.; Dick, T.; Rhee, K. Y.; Dartois, V. Verapamil Targets Membrane Energetics in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02107-17.
20. Pieterman, E. D.; te Brake, L. H. M.; de Knecht, G. J.; van der Meijden, A.; Alffenaar, J. W. C.; Bax, H. I.; Aarnoutse, R. E.; de Steenwinkel, J. E. M. Assessment of the Additional Value of Verapamil to a Moxifloxacin and Linezolid Combination Regimen in a Murine Tuberculosis Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01354-18.
21. Xu, J.; Tasneen, R.; Peloquin, C. A.; Almeida, D. V.; Li, S. Y.; Barnes-Boyle, K.; Lu, Y.; Nuermberger, E. Verapamil Increases the Bioavailability and Efficacy of Bedaquiline but Not Clofazimine in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01692-17.
22. Rodrigues, L.; Wagner, D.; Viveiros, M.; Sampaio, D.; Couto, I.; Vavra, M.; Kern, W. V.; Amaral, L. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in Mycobacterium avium and Mycobacterium smegmatis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 1076-1082.
23. Warman, A. J.; Rito, T. S.; Fisher, N. E.; Moss, D. M.; Berry, N. G.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A.; Biagini, G. A. Antitubercular pharmacodynamics of phenothiazines. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 869-880.
24. Kristiansen, J. E.; Dastidar, S. G.; Palchoudhuri, S.; Roy, D. S.; Das, S.; Hendricks, O.; Christensen, J. B. Phenothiazines as a solution for multidrug resistant tuberculosis: From the origin to present. *Int. Microbiol.* **2015**, *18*, 1-12.
25. Vesenbeckh, S.; Krieger, D.; Bettermann, G.; Schonfeld, N.; Bauer, T. T.; Russmann, H.; Mauch, H. Neuroleptic drugs in the treatment of tuberculosis: Minimal inhibitory concentrations of different phenothiazines against Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* **2016**, *98*, 27-29.
26. Wade, M. M.; Zhang, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 936-941.
27. Peterson, N. D.; Rosen, B. C.; Dillon, N. A.; Baughn, A. D. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 7320-7326.
28. Jenke-Kodama, H.; Sandmann, A.; Müller, R.; Dittmann, E. Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2027-2039.

29. Zimhony, O.; Cox, J. S.; Welch, J. T.; Vilcheze, C.; Jacobs, W. R., Jr. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043-1047.
30. Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Barry, C. E., 3rd. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2167-2172.
31. Ngo, S. C.; Zimhony, O.; Chung, W. J.; Sayahi, H.; Jacobs, W. R., Jr.; Welch, J. T. Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2430-2435.
32. 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*, 752-754.
33. Sayahi, H.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R., Jr.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4804-4807.
34. Sayahi, H.; Pugliese, K. M.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. Analogs of the Antituberculous Agent Pyrazinamide Are Competitive Inhibitors of NADPH Binding to *M. tuberculosis* Fatty Acid Synthase I. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2582-2596.
35. Boehringer, D.; Ban, N.; Leibundgut, M. 7.5-angstrom Cryo-EM Structure of the Mycobacterial Fatty Acid Synthase. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 841-849.
36. 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.
37. Elad, N.; Baron, S.; Peleg, Y.; Albeck, S.; Grunwald, J.; Raviv, G.; Shakked, Z.; Zimhony, O.; Diskin, R. Structure of Type-I *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase at 3.3 Å resolution. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3886.
38. Baron, S.; Peleg, Y.; Grunwald, J.; Morgenstern, D.; Elad, N.; Peretz, M.; Albeck, S.; Levin, Y.; Welch, J. T.; DeWeerd, K. A.; Schwarz, A.; Burstein, Y.; Diskin, R.; Shakked, Z.; Zimhony, O. Expression of a recombinant, 4'-Phosphopantetheinylated, active *M. tuberculosis* fatty acid synthase I in *E. coli*. *PLoS One* **2018**, *13*, e0204457.
39. Himeno, H.; Kurita, D.; Muto, A. tmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell. *Frontiers in genetics* **2014**, *5*, 66.
40. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J. S.; Barry, C. E., 3rd; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2011**, *333*, 1630-1632.
41. 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.
42. Gouzy, A.; Poquet, Y.; Neyrolles, O. A central role for aspartate in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 1-3.
43. Zhang, S.; Chen, J.; Shi, W.; Liu, W.; Zhang, W.; Zhang, Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* **2013**, *2*, e34.
44. Shi, W.; Chen, J.; Feng, J.; Cui, P.; Zhang, S.; Weng, X.; Zhang, W.; Zhang, Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* **2014**, *3*, e58.
45. Gopal, P.; Nartey, W.; Ragunathan, P.; Sarathy, J.; Kaya, F.; Yee, M.; Setzer, C.; Manimekalai, M. S. S.; Dartois, V.; Grüber, G.; Dick, T. Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 807-819.
46. 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.
47. Sharma, V.; Grubmeyer, C.; Sacchettini, J. C. Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure Fold. Des.* **1998**, *6*, 1587-1599.
48. Zhang, S.; Chen, J. Z.; Shi, W. L.; Cui, P.; Zhang, J.; Cho, S.; Zhang, W. H.; Zhang, Y. Mutation in clpC1 encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e8.

49. Njire, M.; Wang, N.; Wang, B.; Tan, Y.; Cai, X.; Liu, Y.; Mugweru, J.; Guo, J.; Hameed, H. M. A.; Tan, S.; Liu, J.; Yew, W. W.; Nuermberger, E.; Lamichhane, G.; Liu, J.; Zhang, T. Pyrazinoic Acid Inhibits a Bifunctional Enzyme in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00070-17.
50. Yee, M.; Gopal, P.; Dick, T. Missense Mutations in the Unfoldase ClpC1 of the Caseinolytic Protease Complex Are Associated with Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02342-16.
51. Gopal, P.; Tasneen, R.; Yee, M.; Lanoix, J. P.; Sarathy, J.; Rasic, G.; Li, L. P.; Dartois, V.; Nuermberger, E.; Dick, T. In Vivo-Selected Pyrazinoic Acid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Harbor Missense Mutations in the Aspartate Decarboxylase PanD and the Unfoldase ClpC1. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 492-501.
52. Anthony, R. M.; den Hertog, A. L.; van Soolingen, D. 'Happy the man, who, studying nature's laws, Thro' known effects can trace the secret cause.' plus Do we have enough pieces to solve the pyrazinamide puzzle? *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1750-1754.
53. Dillon, N. A.; Peterson, N. D.; Feaga, H. A.; Keiler, K. C.; Baughn, A. D. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6135.
54. Klein, B.; Odonnell, M. E.; Hetman, N. E. Pyrazines .3. Action of Phosphoroyl Chloride on Pyrazine N-Oxides. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1682-1686.
55. Foks, H. Pyrazine-2-Carboxylic Acid N-Oxides .4. Reaction of Pyrazine-2-Carboxamide 4-N-Oxide with Phosphorus Oxychloride. *Acta Pol. Pharm.* **1976**, *33*, 153-161.
56. Sato, N. Studies on Pyrazines .10. Substitution Effect on Reaction of Pyrazine N-Oxides with Phosphoryl Chloride. *Journal of Chemical Research-S* **1984**, 318-319.
57. Venturello, C.; D'Aloisio, R. Preparation of 2-carboxypyrazine 4-oxides. EP201934A2, 1986.
58. Theodorou, V.; Gogou, M.; Giannoussi, A.; Skobridis, K. Insights into the N,N-diacylation reaction of 2-aminopyrimidines and deactivated anilines: an alternative N-monoacylation reaction. *ARKIVOC* **2014**, 11-23.
59. Franzblau, S. G.; Witzig, R. S.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M. T.; Cook, M. B.; Quenzer, V. K.; Ferguson, R. M.; Gilman, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362-366.
60. Reytrat, J. M.; Kahn, D. Mycobacterium smegmatis: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 472-473.
61. Barry, C. E. Mycobacterium smegmatis: an absurd model for tuberculosis? Response. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 473-474.
62. Namouchi, A.; Cimino, M.; Favre-Rochex, S.; Charles, P.; Gicquel, B. Phenotypic and genomic comparison of Mycobacterium aurum and surrogate model species to Mycobacterium tuberculosis: implications for drug discovery. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 530-530.
63. Steenken, W. Lysis of Tubercle Bacilli in Vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1935**, *33*, 253-255.
64. Steenken, W. Spontaneous lysis of tubercle bacilli on artificial culture media. *American review of tuberculosis* **1938**, *38*, 777-790.
65. Zheng, H.; Lu, L.; Wang, B.; Pu, S.; Zhang, X.; Zhu, G.; Shi, W.; Zhang, L.; Wang, H.; Wang, S.; Zhao, G.; Zhang, Y. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of Mycobacterium tuberculosis Strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One* **2008**, *3*, e2375.
66. Palek, L.; Dvorak, J.; Svobodova, M.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Dolezal, M. Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of 3-arylaminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 61-65.
67. Barry, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 143-179.
68. Cynamon, M. H.; Gimi, R.; Gyenes, F.; Sharpe, C. A.; Bergmann, K. E.; Han, H. J.; Gregor, L. B.; Rapolu, R.; Luciano, G.; Welch, J. T. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3902-3907.
69. Norrington, F. E.; Hyde, R. M.; Williams, S. G.; Wootton, R. Physicochemical-Activity Relations in Practice .1. Rational and Self-Consistent Data Bank. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 604-607.
70. Kratky, M.; Vinsova, J. Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents - a Review. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3494-3505.
71. Kratky, M.; Vinsova, J. Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid. *Molecules* **2012**, *17*, 9426-9442.

72. 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.
73. Srivastava, P.; Tiwari, A. Critical Role of Computer Simulations in Drug Discovery and Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 2422-2432.
74. Usha, T.; Shanmugarajan, D.; Goyal, A. K.; Kumar, C. S.; Middha, S. K. Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 3296-3307.
75. Petrella, S.; Gelus-Ziental, N.; Maudry, A.; Laurans, C.; Boudjelloul, R.; Sougakoff, W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLoS One* **2011**, *6*, e15785.
76. Fyfe, P. K.; Rao, V. A.; Zemla, A.; Cameron, S.; Hunter, W. N. Specificity and Mechanism of *Acinetobacter baumannii* Nicotinamidase: Implications for Activation of the Front-Line Tuberculosis Drug Pyrazinamide. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 9176-9179.
77. Luckner, S. R.; Liu, N. N.; Ende, C. W. A.; Tonge, P. J.; Kisker, C. A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14330-14337.
78. Bhatt, A.; Molle, V.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R.; Kremer, L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 1442-1454.
79. Merget, B.; Zilian, D.; Muller, T.; Sotriffer, C. A. MycPermCheck: the *Mycobacterium tuberculosis* permeability prediction tool for small molecules. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 62-68.
80. MycPermCheck. [online] Dostupné z: <http://www.mycpermcheck.aksotriffer.pharmazie.uni-wuerzburg.de> [02-02-2019].
81. Donald, P. R.; Diacon, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 1091-1099.
82. Ratledge, C.; Brown, K. A. Inhibition of mycobactin formation in *Mycobacterium smegmatis* by p-aminosalicylate. A new proposal for the mode of action of p-aminosalicylate. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1972**, *106*, 774-776.
83. Rengarajan, J.; Sasseti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 275-282.
84. Chakraborty, S.; Gruber, T.; Barry, C. E., III; Boshoff, H. I.; Rhee, K. Y. Para-Aminosalicylic Acid Acts as an Alternative Substrate of Folate Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2013**, *339*, 88-91.
85. Minato, Y.; Thiede, J. M.; Kordus, S. L.; McKlveen, E. J.; Turman, B. J.; Baughn, A. D. *Mycobacterium tuberculosis* Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for para-Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5097-5106.
86. Zheng, J.; Rubin, E. J.; Bifani, P.; Mathys, V.; Lim, V.; Au, M.; Jang, J.; Nam, J.; Dick, T.; Walker, J. R.; Pethe, K.; Camacho, L. R. para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 23447-23456.
87. Marrakchi, H.; Laneelle, M. A.; Daffe, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 67-85.
88. Drucker, D. J.; Nauck, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* **2006**, *368*, 1696-1705.
89. Rajendran, V.; Kalita, P.; Shukla, H.; Kumar, A.; Tripathi, T. Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 400-414.
90. Vondenhoff, G. H. M.; Van Aerschot, A. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potential antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5227-5236.

5. SOUBOR PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ

Publikace jsou řazeny chronologicky a dle typu publikace (původní práce, přehledové práce). Součástí některých publikací jsou doplňující informace, které (až na výjimky) nejsou k této habilitační práci přiloženy. V tabulce níže lze pro každou přílohu určit číslo strany, na které se nachází. V elektronické verzi této habilitační práce nejsou přílohy obsaženy. Pro přístup k nim lze využít aktivní odkazy v tabulce níže.

Označení	Strana	Zdroj	Rok	DOI či jiný odkaz	IF
Příloha P1	3	Molecules	2009	10.3390/molecules14104180	IF ₂₀₀₉ = 1.738
Příloha P2	13	Molecules	2010	10.3390/molecules15128567	IF ₂₀₁₀ = 1.988
Příloha P3	29	Bioorg. Med. Chem.	2011	10.1016/j.bmc.2010.12.054	IF ₂₀₁₁ = 2.921
Příloha P4	35	Bioorg. Med. Chem. Lett.	2012	10.1016/j.bmcl.2011.12.129	IF ₂₀₁₂ = 2.338
Příloha P5	39	Bioorg. Med. Chem. Lett.	2013	10.1016/j.bmcl.2013.04.021	IF ₂₀₁₃ = 2.331
Příloha P6	43	Bioorg. Med. Chem. Lett.	2013	10.1016/j.bmcl.2012.11.052	IF ₂₀₁₃ = 2.331
Příloha P7	47	Molecules	2013	10.3390/molecules181214807	IF ₂₀₁₃ = 2.095
Příloha P8	67	Molecules	2014	10.3390/molecules19079318	IF ₂₀₁₄ = 2.416
Příloha P9	89	Bioorg. Med. Chem. Lett.	2014	10.1016/j.bmcl.2013.12.054	IF ₂₀₁₄ = 2.420
Příloha P10	93	Molecules	2015	10.3390/molecules20058687	IF ₂₀₁₅ = 2.465
Příloha P11	119	MedChemComm	2015	10.1039/C5MD00178A	IF ₂₀₁₅ = 2.319
Příloha P12	127	Chem. Biol. Drug Des.	2015	10.1111/cbdd.12536	IF ₂₀₁₅ = 2.802
Příloha P13	135	Česká a slov. farmacie	2015	www	bez IF
Příloha P14	141	Bioorg. Med. Chem.	2015	10.1016/j.bmc.2014.11.014	IF ₂₀₁₅ = 2.923
Příloha P15	151	Chemical Papers	2016	10.1515/chempap-2015-0246	IF ₂₀₁₆ = 1.258
Příloha P16	161	Molecules	2017	10.3390/molecules22101797	IF ₂₀₁₇ = 3.098
Příloha P17	177	Molecules	2017	10.3390/molecules22020223	IF ₂₀₁₇ = 3.098
Příloha P18	197	Molecules	2017	10.3390/molecules22030495	IF ₂₀₁₇ = 3.098
doplněk	213				
Příloha P19	219	Molecules	2017	10.3390/molecules22091491	IF ₂₀₁₇ = 3.098
doplněk	237				
Příloha P20	241	MedChemComm	2018	10.1039/C8MD00056E	IF ₂₀₁₇ = 2.342
doplněk 1	253				
doplněk 2	255				
Příloha P21	263	Molecules	2018	10.3390/molecules23092390	IF ₂₀₁₇ = 3.098
Příloha P22	281	Curr. Pharm. Des.	2011	10.2174/138161211798194477	IF ₂₀₁₁ = 3.870
Příloha P23	291	Expert Opin. Ther. Pat.	2016	10.1080/13543776.2016.1211112	IF ₂₀₁₆ = 3.041
Příloha P24	307	Curr. Med. Chem.	2018	10.2174/0929867324666170920154325	IF ₂₀₁₇ = 3.469
Příloha P25	333	Intech Open	2012	10.5772/2477	bez IF