

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra organické a bioorganické chemie**



**Peptidové a aminokyselinové deriváty antimikrobiálně aktivních  
sloučenin**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.**

**Hradec Králové 2021**

**Kateřina Šulcová**

## **Prohlášení**

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.*

V Hradci Králové dne 9. 9. 2021

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za odborné a trpělivé vedení mé práce, pomoc při psaní a poskytování podkladů k vypracování této práce, za cenné rady a návrhy.

Práce byla podpořena grantem Grantové agentury ČR č. 20-19638Y (Design a studium nových antimikrobních látek účinných na rezistentní a biofilm-produkující gram-pozitivní bakterie).

## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zabývá nově syntetizovanými látkami, které mají potenciál sloužit v budoucnu k léčbě mikrobiálních infekcí či přispět k syntéze látek dalších, výhodnějších. Nejprve se zabývá tématem bakteriální rezistence a souvisejícími pojmy, dále se věnuje možnostem modifikace léčiv pro získání dalších aktivních látek nebo s cílem zlepšení vlastností již známých molekul.

Práce shrnuje některé aminokyselinové deriváty antimikrobně působících látek. Nejprve se věnuje analogům primachinu, kde se pro antimalarickou aktivitu jeví slibně acylace primární aminoskupiny, dále jsou shrnuty některé slibné antibakteriální látky např. deriváty fluorochinolonů či kurkuminu s fyziologickými i přirozeně se nevyskytujícími aminokyselinami. Nakonec se práce věnuje antimykobakteriálním látkám – salicylanilidovým derivátům pro léčbu tuberkulózy a derivátům antileprotika dapsonu k zvýšení jeho rozpustnosti.

Peptidové a aminokyselinové deriváty tak mohou být efektivně využity ke zvýšení aktivity či k modifikaci nevýhodných vlastností malých molekul (toxicita, rozpustnost aj.).

### Klíčová slova

Aminokyselinové deriváty, bakteriální rezistence, modifikace léčiv, peptidy, proléčiva

## ***Abstract***

This bachelor thesis is concerned with newly synthesized compounds which have potential to be used in treatment of microbial infections or contribute to synthesis of novel, more convenient compounds. At first, it deals with bacterial resistance and related facts. Then, it summarizes possible modifications of drugs to obtain novel bioactive substances or to improve properties of already known drugs.

The thesis summarizes some new amino acid derivatives of antimicrobial active agents. First, it describes primaquine analogues where acylation of primary amino group seems to be promising for the antimalarial activity, then it summarizes promising compounds with antibacterial activity, e.g., derivatives of fluoroquinolones or curcumin with physiological and unnatural amino acids. Finally, it deals with antimycobacterial agents – salicylanilide derivatives for treatment of tuberculosis and antileprotic dapsone derivatives to increase its solubility.

In conclusion, peptide and amino acid derivatives can be effectively used to increase activity or to modify disadvantageous properties of small molecules (e.g., toxicity or solubility issues).

## **Keywords**

Amino acid derivatives, drug modification, microbial resistance, peptides, prodrugs

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	8
1. Úvod .....	10
2. Teoretická část .....	12
2.1. Bakteriální rezistence .....	12
2.1.1. Mechanismy vzniku rezistence .....	12
2.1.1.1. Enzymatická inaktivace léčiva .....	12
2.1.1.2. Znemožnění přístupu k cílové struktuře .....	13
2.1.1.3. Bakteriální eflux .....	13
2.1.1.4. Zabránění aktivace antibiotika .....	13
2.1.1.5. Změny místa působení .....	14
2.1.1.6. Nahrazení zablokované metabolické dráhy .....	14
2.1.1.7. Syntéza nadbytečného množství cílových struktur .....	14
2.1.2. Šíření rezistence .....	15
2.1.2.1. Konjugace .....	15
2.1.2.2. Transdukce .....	16
2.1.2.3. Transformace .....	16
2.1.2.4. Transpozice .....	16
2.1.3. Příčiny vzestupu a šíření mikrobiální rezistence .....	16
2.1.4. Epidemiologie a výskyt .....	17
2.1.5. Problémové druhy bakterií .....	18
2.1.6. Rezistence, tolerance a perzistence .....	18
2.1.7. Zkřížená rezistence a multirezistence .....	19
2.2. Modifikace známých antimikrobních látek jako zdroj nových léčiv .....	20
2.2.1. Izomerie .....	21
2.2.1.1. Konstituční izomerie .....	21
2.2.1.2. Stereoizomerie .....	22
2.2.1.2.1. Optická izomerie .....	22
2.2.1.2.2. Geometrická izomerie .....	23
2.2.1.2.3. Konformační izomerie .....	24
2.2.2. Homologie .....	25
2.2.3. Analogie .....	26
2.2.3.1. Hydrogenace a dehydrogenace .....	26
2.2.3.2. Alkylová analogie .....	26
2.2.3.3. Radikálová analogie .....	27

2.2.3.4.	Izosterie .....	27
2.2.3.5.	Analogie funkčních skupin .....	28
2.2.3.6.	Analogie kruhů .....	28
2.2.3.7.	Modely .....	29
2.2.3.8.	Zdvojení molekul .....	29
2.2.4.	Prekurzory léčiv .....	29
2.2.4.1.	Prekurzory se zvýšenou rozpustností ve vodě .....	30
2.2.4.2.	Prekurzory se zlepšeným vstřebáváním .....	31
2.2.4.3.	Prekurzory se specifitější distribucí .....	31
2.2.4.4.	Prekurzory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky .....	32
2.2.4.5.	Prekurzory s protahovaným účinkem .....	33
2.2.4.6.	Prekurzory se zvýšenou stabilitou .....	33
2.2.4.7.	Mutual prodrug .....	33
3.	Cíl práce .....	35
4.	Rešeršní část .....	36
4.1.	Léčiva proti parazitickým onemocněním .....	36
4.1.1.	Trypanosomóza .....	36
4.1.2.	Malárie .....	38
4.2.	Léčiva proti bakteriálním onemocněním .....	46
4.2.1.	Grampozitivní a gramnegativní bakterie .....	47
4.2.2.	Tuberkulóza a mykobakteriální infekce .....	56
5.	Závěr .....	62
6.	Literatura .....	64

## Seznam použitých zkratek

AA	aminokyselina
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
ATB	antibiotikum
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Cbz	benzyloxykarbonyl
CPX	ciprofloxacin
CYP450	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EARS-net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
Gly	glycin
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnost
IC <sub>50</sub>	koncentrace léčiva, při které je dosaženo inhibice růstu 50% pozorovaných buněk (např. bakteriálních)
INH	isoniazid
Leu	leucin
Lys	lysin
MAO	monoaminoxidáza
MDK	nejkratší čas nutný k usmrcení 99% bakteriální populace
MDR	multidrug resistance, tj. bakteriální kmen je rezistentní alespoň k jednomu ze tří relevantních skupin antibiotik
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza, rezistentní alespoň k isoniazidu a rifampicinu
Me	methyl
Met	methionin
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Orn	ornitin



PABA	kyselina 4-aminobenzoová
PDR	pan-drug resistance, tj. rezistence kmene ke všem relevantním skupinám antibiotik
Phe	fenylalanin
PNC	penicilin
PZA	pyrazinamid
TBC	tuberkulóza
Trp	tryptofan
Val	valin
VRE	enterokoky rezistentní k vankomycinu
XDR	extensively drug resistance, tj. bakteriální kmen je rezistentní k alespoň jednomu přípravku z většiny relevantních skupin antibiotik, zbývá pouze jedna či dvě účinné skupiny antibiotik
8-AQ	8-aminochinoliny

## 1. Úvod

S objevem antibiotik se naskytla možnost léčit do té doby smrtelná infekční onemocnění. Je tedy jasné, že používání antibiotik patří mezi nejvýznamnější léčebné postupy, které byly objeveny. Do počátku 20. století byla nejčastější příčinou morbidit a mortality právě infekční onemocnění. Po zavedení penicilinu do terapeutické praxe rychle následovaly i další antimikrobní přípravky. Se zavedením antibiotik se ale začal šířit mylný názor, že je lepší podávat antibiotika „pro jistotu“ i v nejasných případech. V dnešní době antibiotika k moderní léčbě neodmyslitelně patří a bez nich by nebyly možné například chirurgické zákroky nebo transplantace.

Současně s prvním použitím moderních antimikrobních látek se pak objevil i pojem bakteriální rezistence, která je v současné době už globálním problémem. Avšak samotná rezistence je stejně stará jako bakterie samy. Geny pro rezistenci vznikly vlivem selekčního tlaku a odedávna pomáhaly bakteriím přežít nepříznivé vlivy prostředí zahrnující i působení přirozených antibiotik tvořených jinými bakteriemi. Zvýšená spotřeba antibiotik, především širokospektrých, zvýšila selekční tlak, s jehož vzestupem stoupá i bakteriální rezistence.

Zvyšování odolnosti bakterií k antimikrobním přípravkům je jedním z největších problémů současné medicíny hlavně kvůli možnosti selhání léčby a s tím souvisejícím zvýšením morbidit a mortality. Kromě toho ohrožuje i další užívání antibiotik pro léčbu infekcí, protože se objevuje i rezistence na antibiotika rezervní, která se používají jako náhrada za antibiotika, ke kterým jsou kmeny rezistentní. Největší problém je to pak, když se taková rezistence vůči více antibiotikům projeví u tzv. multirezistentních kmenů, které jsou už samy o sobě závažným problémem a nějakou dobu už se neobjevují pouze v nemocnicích, šíří se i v komunitě.

Z toho vyplývá, že by rezistence měla být důkladně monitorována, a to nejen v jednotlivých zdravotnických zařízeních, ale i ve větších epidemiologických jednotkách, aby se zabránilo dalšímu šíření. Například projekt EARS-net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) shromažďuje a analyzuje informace o současném stavu bakteriální rezistence a jejích trendech u klinicky významných, invazivních bakterií [1].

Mezi bakterie působící závažné problémy patří *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a druhy

rodu *Enterobacter*, pro které se používá souhrnné označení „ESKAPE“. Velmi nebezpečné a zároveň časté jsou methicilin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Kvůli šířící se rezistenci je stále větší nutnost vývoje nových antibiotik, která by mohla nahradit ta, na která jsou kmeny rezistentní. Jedná se především o potřebu antibiotik účinných na multirezistentní a panrezistentní kmeny. Ztráta účinnosti antibiotik je natolik závažná, že se stává součástí politických rozhodnutí nejen v rámci Evropy, ale celosvětově, a jsou zaváděny globální i vnitrostátní antibiotické programy.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Bakteriální rezistence

Bakteriální rezistence je podle Světové zdravotnické organizace schopnost bakterií přežít působení minimální inhibiční koncentrace (MIC) daného antibiotika. Minimální inhibiční koncentrace je nejnižší koncentrace antimikrobní látky, která za normálních okolností ještě zastaví růst daného mikroba. Tyto hodnoty jsou kategorizované a slouží k porovnávání při vyšetřování citlivosti mikroba na dané antibiotikum [2, 3, 4].

Rezistentní mikroorganismy často způsobují infekce v nemocnicích, což může být velmi nebezpečné hlavně pro pacienty na jednotkách intenzivní péče. Tyto bakterie ale mohou způsobovat infekce i mimo nemocnice a některé mohou být součástí přirozené mikroflóry [5].

Podle vzniku lze rozlišit dva druhy rezistence: přirozená (primární) a získaná (sekundární) rezistence. V případě přirozené rezistence jde o vlastnost, která vyplývá ze stavby buňky nebo z jejího metabolismu. Může jít např. o absenci transportního systému či cílového místa pro antibiotikum. Přirozenou rezistenci vykazují všichni zástupci daného kmene a je tedy možné tuto vlastnost využít k selektivní izolaci nebo identifikaci kmene. Příkladem takové rezistence je třeba odolnost mykoplazmat k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům [6, 7].

Získaná rezistence je závažnějším druhem odolnosti bakterií k antibiotikům. Vyskytuje se u bakterií, které byly původně k danému antibiotiku citlivé, ale po setkání s ním si vytvořily rezistenci. K získání rezistence se však bakterie nemusí nutně s antibiotikem setkat, rezistentní se může stát i po přijetí příslušného genu od jiné bakterie. Mechanismů vzniku získané rezistence je sedm a týkají se zneškodnění molekuly antibiotika, nebo cílové struktury, na kterou antibiotikum působí [6].

#### 2.1.1. Mechanismy vzniku rezistence

Mikroorganismy si mohou vytvořit rezistenci následujícími způsoby: enzymatická inaktivace léčiva, znemožnění přístupu k cílové struktuře, bakteriální eflux, zabránění aktivace antibiotika, změny místa působení, nahrazení zablokované metabolické dráhy a syntéza nadbytečného množství cílových struktur [6].

##### 2.1.1.1. Enzymatická inaktivace léčiva

V tomto případě bakterie vytváří enzymy, které mají schopnost pozměnit strukturu antibiotika nebo jej rozštěpit. Jako typický příklad lze uvést  $\beta$ -laktamázy, které štěpí široké spektrum penicilinových a cefalosporinových antibiotik. Nadměrné používání  $\beta$ -laktamů vedlo

ke vzniku velkého množství typů již zmíněných  $\beta$ -laktamáz, a tedy k rozšíření spektra rezistence na tato antibiotika [6, 7].

Tento mechanismus rezistence je u bakterií velmi častý. Jedná se o snadný a účinný způsob vzniku odolnosti na antibiotika, kdy už malé množství enzymu dokáže antibiotikum inaktivovat. Tento druh rezistence se navíc v populaci bakterií dokáže jednoduše rozšířit [6, 7].

#### **2.1.1.2. Znemožnění přístupu k cílové struktuře**

Aby bylo antibiotikum účinné, musí se dostat do buňky. Tomu mohou bakterie zabránit třemi způsoby. Přítomnost pouzdra, nebo vrstva hlenu může znemožnit průchod skrz buněčnou stěnu. U gramnegativních bakterií je účinnou bariérou zevní membrána, která obsahuje poriny. Každá bakterie vytváří různé druhy porinů, kterými se může molekula hydrofilního antibiotika dostat dovnitř. Snižit průnik antibiotik do buňky je pak možné změnou propustnosti daného porinu, snížením jejich počtu, nebo dočasným zamezením jejich tvorby [6, 8].

Poslední bariérou může být cytoplazmatická membrána. Některá antibiotika totiž pro vstup do buňky potřebují transportní systém, často na úkor energie buňky (aktivní transport). Bakterie pak mohou omezit aktivitu daného systému, nebo jej úplně vyřadit, to však pouze v případě, není-li nezbytný pro buněčný metabolismus [6].

#### **2.1.1.3. Bakteriální eflux**

Bakteriální buňky tímto způsobem odčerpávají nežádoucí látky, včetně antibiotik, z intracelulárního prostoru. Používají k tomu transmembránové pumpy, efluxní systémy. Tento děj je velmi energeticky náročný, protože dochází často k transportu proti koncentračnímu gradientu. Efluxní systémy poskytují pouze částečnou ochranu, protože odstraňují molekuly, které již pronikly do buňky, tudíž měly možnost navázat se na cílovou strukturu. Bakteriální eflux tedy spíše snižuje účinnost antibiotika, než že by ho zneškodnil [6, 8].

Existuje několik druhů efluxních systémů a každý může odčerpávat několik látek najednou, takže mohou zajišťovat rezistenci na několik antibiotik zároveň. Tímto způsobem se bakteriální buňka zbavuje například makrolidů, sulfonamidů nebo fluorochinolonů [6].

#### **2.1.1.4. Zabránění aktivace antibiotika**

Tento mechanismus platí pouze pro antibiotika, která do buňky vstupují v inaktivní formě a uvnitř buňky jsou teprve aktivována. Příkladem jsou nitroimidazoly. Bakterie může snížit množství aktivujícího enzymu nebo důsledkem mutace produkovat neúčinný enzym. Antibiotikum tak zůstane v neúčinné formě a bakterii neublíží [6].

### **2.1.1.5. Změny místa působení**

Různá antibiotika mají různá cílová místa například enzymy, některé stavební prvky buněčné stěny, cytoplazmatické membrány nebo ribozomy. Pozměněním této struktury k ní antibiotiku ztratí afinitu [6].

Ke změně může dojít mutací genu pro daný enzym, kdy dochází v nejlepším případě k drobné změně v aktivním centru enzymu, a tedy k ztrátě afinity antimikrobní látky, ale fyziologická funkce enzymu je zachována [6, 9].

Dalším, komplexnějším, typem modifikace je změna metabolické dráhy, na kterou antibiotikum působí. Je tomu tak například u rezistence k vankomycinu, kdy dochází k záměně D-alaninu za D-laktát při syntéze peptidoglykanu. Viabilita buňky není ovlivněna, ale antibiotikum ztrácí cílové místo zásahu [6, 9].

Bakterie mohou také poupravit cílové molekuly dodatečně. Příkladem pozdější modifikace je methylace ribozomu nebo peptidy rodiny Qnr chránící bakteriální gyrázu před fluorochinolony [6].

### **2.1.1.6. Nahrazení zablokované metabolické dráhy**

V případě, že je některá důležitá metabolická dráha již zablokovaná, mohou bakterie využít alternativní dráhu. Tato dráha sice může být méně výkonná, ale dostačuje k přežití. Příkladem užití alternativní dráhy je kompenzace působení sulfonamidů u enterokoků. Sulfonamidy blokuji syntézu kyseliny tetrahydrofolové, enterokoky však poté začnou využívat kyselinu listovou z okolního prostředí, kde je jí dostatek [6].

### **2.1.1.7. Syntéza nadbytečného množství cílových struktur**

Pokud je cílovou strukturou antibiotika enzym, může buňka po jeho zablokování zvýšit jeho syntézu. Tento mechanismus je sice kvůli energetické náročnosti syntézy proteinů méně výhodný, ale může se jednat o jednu z cest k přežití [6].

Zvýšená tvorba může být ale i u jiných cílových struktur. Například u intermediární rezistence k vankomycinu u stafylokoků dochází k zvýšení syntézy peptidoglykanu a k zesílení této vrstvy. Díky tomu se molekuly antibiotika nedostanou v dostatečném množství k cílové struktuře. Podobný mechanismus využívají i mykobakterie, které tvoří molekulární mimikry. Syntetizují peptidy, které strukturou imitují molekulu DNA, molekuly fluorochinolonových antibiotik se potom navážou na tyto „imitace“ a skutečná DNA je chráněna [6, 9].

## 2.1.2. Šíření rezistence

Protože je rezistence geneticky podmíněná, předává se stejným způsobem jako všechna genetická informace. Pokud poskytuje selekční výhodu, bakterie s tímto genem se začnou v populaci prosazovat více a více na úkor citlivých bakterií. Tato genetická informace se poté přenáší z mateřské buňky na dceřiné. Tato cesta přenosu rezistence se nazývá klonální šíření [6, 10].

Oproti tomu horizontální šíření je založeno na přenosu rezistence mezi buňkami z různých klonů, různých druhů nebo rodů. Horizontální přenos genetické informace je zdrojem genetické rozmanitosti mezi klony a má tedy význam jako pohlavní rozmnožování u vyšších organismů. Mechanismy rezistence schopné horizontálního šíření jsou navíc nebezpečnější než ty, jež se šíří pouze vertikálně [6, 10].

Horizontálně se mohou šířit mechanismy kódované pouze jedním genem, které se šíří nejnáze a tím pádem i nejvíce, naopak složitější změny se tak snadno nepřenesou. Přenos rezistence jedním genem s sebou však nese jisté nevýhody. A to především to, že činnost tohoto genu není řízená a buňka může být nucena tvořit produkt v nadbytku. Tím se snižuje její konkurenceschopnost a vitalita. Po dobu trvání selekčního tlaku je gen pro bakterii nezbytný, poté se ale stává nežádoucí přítěží. Tento problém má dvě různá řešení. Spolu s daným genem může být předáván i regulační gen, který spustí expresi v době potřeby (inducibilní exprese), nebo může bakterie informaci o rezistenci ponechat na plazmidu, nevčleňovat ji do chromozomu, geny budou aktivní neustále (kontinuální rezistence), buňka se však může plazmidu kdykoli zbavit [6].

Samotné mechanismy horizontálního šíření jsou následující:

### 2.1.2.1. Konjugace

Konjugace je přenos genetické informace zprostředkovaný plazmidy. Při konjugaci se k sobě buňky přiblíží a spojí se pomocí speciálního výběžku cytoplazmy, tzv. sex pilu. Tímto kanálkem poté projde kopie plazmidu do buňky, která danou informací neobsahuje [6].

Plazmid je malý extrachromozomální kruhový úsek DNA, který se nachází volně v cytoplazmě buňky. Mohou obsahovat jeden, ale i více genů, které pak buňka může využívat stejně jako vlastní DNA. Pokud plazmid obsahuje nepotřebnou informaci, buňka se ho může snadno zbavit. Přenos rezistence zprostředkovávají R-plazmidy, ale plazmidů samotných je několik různých druhů [6, 7].

### **2.1.2.2. Transdukce**

Při transdukci je genetická informace přenesena bakteriálním virem – bakteriofágem, který se přichytí na buňku a svou genetickou informaci vpraví do buňky. Uvnitř se DNA může včlenit do genetické informace bakterie, nebo buňku usmrtí [6, 11].

### **2.1.2.3. Transformace**

V prostředí se volně nacházejí vlákna DNA, která nejčastěji pocházejí z uhynulých bakterií. Bakterie tato vlákna mohou přijmout a získat novou genetickou informaci. Nejspíše se tak ale děje za účelem zisku nukleotidů než nových genů. Okolnosti využití získaného vlákna DNA jako zdroj genetické informace ještě nejsou spolehlivě prozkoumány [6].

### **2.1.2.4. Transpozice**

Tento způsob šíření rezistence je zprostředkovaný transpozony. To jsou malé úseky DNA schopné přemístit se, přeskakovat mohou v rámci chromozomu, ale i z plazmidu na chromozom a opačně. Je možný i přesun z chromozomu jedné bakterie na chromozom bakterie jiné. Po zabudování do vlákna DNA se transpozony stávají trvalou součástí genetické informace [6].

## **2.1.3. Příčiny vzestupu a šíření mikrobiální rezistence**

Antibiotická rezistence se vyskytuje přirozeně díky genetickým změnám a rezistentní organismy se nacházejí v lidském organismu, zvířatech, rostlinách, jídle i v životním prostředí. Rezistence se pak může šířit mezi lidmi, ale i mezi různými druhy [12].

Příčin šíření rezistence po světě je několik. Vzestup rezistence je způsoben zvýšenou spotřebou antibiotik, jejich zbytečným, nevhodným a neoprávněným užíváním, v některých zemích kvůli nedostatku čisté vody a hygieny jak u lidí, tak u zvířat. Šíření také podporuje chabé povědomí a informovanost o tomto problému, špatná dostupnost kvalitních a cenově dostupných léčiv, vakcín a diagnostických postupů. Mimo jiné ale i nedostatečná legislativa v oblasti výdeje antibiotik [12, 13].

Podle studií zaměřených na praxi v předepisování antibiotik představuje nevhodná preskripce 50-80 %. V posledních letech bylo také prokázáno, že používání antibiotik na banální, samoúdržavné infekce má na jejich klinický průběh pouze malý nebo žádný účinek [13].



Intervence pro omezení nárůstu rezistence snížením spotřeby antimikrobních látek musí být komplexního charakteru a dotýkat se zdravotnických profesionálů i laické veřejnosti, protože používání a spotřeba antibiotik je ovlivněna řadou socioekonomických a kulturních faktorů. Dobrou účinnost mohou mít především preventivní opatření, ta eliminují potenciální rizika rozpoznaná systémem surveillance. Nekontrolované šíření rezistence se pak opatřeními ovlivní hůře [13].

#### 2.1.4. Epidemiologie a výskyt

Rezistence na antimikrobní látky narůstá a představuje celosvětovou hrozbu pro zdravotní stav populace. Výskyt rezistence se dlouhou dobu omezoval na specializovaná oddělení s vysokou spotřebou antibiotik (např. jednotky intenzivní péče). Během osmdesátých let se rezistence rychle rozšířila i mezi běžné bakterie v komunitě. V devadesátých letech se situace ještě zhoršila a rezistence se stala hrozbou globálně [13].

Po celém světě stoupá incidence rezistentních původců běžných bakteriálních infekcí vylučovacího systému, dýchacích cest, sepsí, sexuálně přenosných onemocnění a střevních infekcí. Hrozbou jsou globálně rozšířené pneumokoky rezistentní k penicilinu. Nebezpečná je také multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB), v roce 2018 bylo zaznamenáno asi půl milionu nových případů rifampicin-rezistentní tuberkulózy, kdy drtivá většina byla multirezistentní. Vzrůstá rezistence u gramnegativních bakterií, jde především o kmeny enterobakterií rezistentních k cefalosporinům 3. generace nebo enterobakterie produkující enzymy inaktivující betalaktamy [13, 14].

Míra rezistence *Escherichia coli* k ciprofloxacinu často užívaném při léčbě infekcí vylučovacího systému stoupla z 8,4 % na 92,9 %. Po celém světě je rozšířena rezistence *Klebsiella pneumoniae* ke karbapenemům. *K. pneumoniae* je častým původcem nozokomiálních nákaz, v některých zemích se tato rezistence vyskytuje i u více než 50 % pacientů. Jako náhrada se pak používá kolistin, ke kterému už byla rovněž v některých zemích zaznamenána rezistence. *S. aureus* je častým původcem infekcí jak v komunitě, tak v nemocnicích. U pacientů s MRSA je o 64 % vyšší riziko úmrtí než u pacientů s citlivými kmeny [12, 14].

V rámci Evropy se rezistentní kmeny vyskytují častěji v jižní a jihovýchodní Evropě než v severní Evropě. Pravidelně je zaznamenáván výskyt kmenů MRSA a v důsledku používání vankomycinu pro léčbu MRSA infekcí se objevují i enterokoky rezistentní k vankomycinu (VRE) a kmeny *Staphylococcus aureus* se sníženou citlivostí k vankomycinu

(VISA). U více než třetiny evropských států je výskyt MRSA u invazivních izolátů z krve více než 25 %. V České republice zůstává v posledních letech výskyt MRSA pod 15 %, naopak dochází k vzestupu přítomnosti VRE [14].

Mimo celosvětové šíření rezistence dochází i k smývání rozdílů mezi infekcemi v nemocnicích a komunitě. Multirezistentní kmeny se začínají více a více vyskytovat v komunitě a naopak. Problém antibiotické rezistence vyžaduje spojení mnoha sektorů týkajících se nejen člověka, ale i zvířat a rostlin. Pro řešení tohoto problému existují jak státní, tak mezinárodní programy, které mají zajistit vysokou kvalitu používaných antibiotik tedy účinnou, bezpečnou a nákladově efektivní léčbu při omezení rizika vzestupu rezistence [12, 14].

### 2.1.5. Problémové druhy bakterií

V příložené tabulce jsou uvedeny nejvýznamnější druhy bakterií s rostoucí rezistencí. Tyto druhy způsobují největší potíže.

Tabulka 1: Problematické rezistentní druhy bakterií [15]

Bakterie	Rezistence na antibiotika
<i>Staphylococcus aureus</i>	oxacilin i jiná ATB
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PNC, makrolidy
<i>Enterococcus spp.</i>	glykopeptidy (vankomycin)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> a další enterobakterie	cefalosporiny II. – IV. generace, fluorochinolony
<i>Helicobacter pylori</i>	metronidazol, makrolidy
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	isoniazid, rifampicin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> a další nefermentující tyčinky	všechny beta-laktamy, aminoglykosidy, fluorochinolony

### 2.1.6. Rezistence, tolerance a perzistence

Tyto tři pojmy se často užívají v podobných situacích a bývají zaměňovány, ale každý označuje trochu jinou situaci [6].

Rezistence je skutečnost, kdy jsou bakterie odolné vůči terapeutickým koncentracím antibiotika. Tedy rostou a množí se v přítomnosti antibiotika stejně, jako kdyby v půdě obsaženo nebylo. Rezistence je vždy geneticky podmíněna a přenáší se z mateřské buňky na dceřiné [6].

V případě tolerance jsou bakterie antibiotikem zabíjeny, ale dochází k tomu výrazně pomaleji, než tomu tak je u daného druhu běžně. Tolerance je projevem adaptace. Vzniká genetickou změnou, ale i hladověním a působením stresu. Za těchto okolností může dojít ke změně metabolismu, a tedy snížení syntézy některých látek, na které dané antibiotikum působí. Efekt dané antimikrobní látky se v tom případě projeví až s odstupem. Pokud je bakteriální kmen k antibiotiku tolerantní, hodnota MIC je shodná s MIC citlivého kmene. Toleranci tedy lze zjistit analýzou růstových křivek bakteriální populace. Ke kvantitativnímu hodnocení se používá parametr MDK (*minimum duration for killing*). MDK stanovuje nejkratší čas nutný k usmrcení 99 % bakteriální populace [6, 16].

Perzistence se na rozdíl od rezistence a tolerance netýká populace jako celku, ale označuje stav, kdy několik bakterií z populace přejde do dormantního (spícího) stavu snížením své metabolické aktivity. V dormantním stavu jsou bakterie odolné vůči antibiotikům. Těchto buněk obvykle nebývá více než 1 % celé populace. U rezistence a tolerance se jedná o genetickou odlišnost, zatímco zde mají spící bakterie shodný genom jako zbytek populace. Bakterie v dormantním stavu můžeme považovat za životní strategii, za jakousi pojistku přežití. Pokud nastanou nepříznivé podmínky, které populace bakterií nepřežije, dormantní bakterie se po jejich přečkání začnou množit a vytvoří novou populaci se stejnými vlastnostmi jako populace původní. Kvantifikace tohoto stavu je obtížná právě kvůli tomu, že v dormantním stavu se nachází pouze několik buněk z celé populace. Přítomnost perzistence se určuje pomocí růstových křivek populace, kde se stanovuje MDK<sub>99,99</sub>, tedy čas nutný k usmrcení 99,99 % populace [6].

### **2.1.7. Zkřížená rezistence a multirezistence**

Bakterie rezistentní k jedné látce mohou vykazovat rezistenci i k jiným chemicky podobným antimikrobním látkám. Jako příklad lze uvést sulfonamidy. Pokud vznikne rezistence na jeden přípravek, buňka bude rezistentní i na ostatní sulfonamidové přípravky. Dalšími příklady jsou tetracykliny, nitrofurany a makrolidy. U všech čtyř skupin jde o vysoký stupeň zkřížené rezistence: stupně rezistence se k jednotlivým přípravkům téměř rovnají. Mimo to se může vyskytovat i částečně zkřížená rezistence, ta byla objevena u neomycinu, streptomycinu a kanamycinu. V tomto případě může být různého stupně podle odolnosti dané molekuly k inaktivujícím enzymům [8].

Vyskytovat se však může i rezistence k několika chemicky nepodobným antimikrobním látkám, jedná se o sdruženou rezistenci. Pokud je bakterie rezistentní na 3-6 antibiotik, mluvíme

o multirezistenci, a označení polyrezistence se používá v případě rezistence na více než šest antibiotik [8].

V rámci multirezistence byl v roce 2012 přijat systém hodnocení, který zahrnuje tři kategorie. MDR se používá, je-li bakteriální kmen rezistentní alespoň k jednomu ze tří různých relevantních skupin antibiotik. XDR znamená rezistenci kmene na alespoň k jednomu přípravku z většiny relevantních skupin antibiotik, tím pádem zbývá pouze jedna, nebo dvě skupiny antibiotik, které jsou účinné. Třetí kategorie je „pandrug“ rezistence PDR, která označuje rezistenci kmene ke všem relevantním antibiotikům [6].

## **2.2.Modifikace známých antimikrobních látek jako zdroj nových léčiv**

V současné době jsou nová léčiva vyvíjena na základě pěti přístupů. Nahodilý screening zahrnuje testování velkého množství látek připravených ve farmaceutickém výzkumu na možné antimikrobní účinky. Objevování ztraceného se zaměřuje na studium starších prací, kdy se hledají látky, které nemohly být v době publikování dostatečně doceněny. Dalším přístupem je kombinatoriální chemie, která bere pro syntézy příklady z přírody. Vznikne tzv. knihovna, kde je směs látek s nekompletními informacemi o struktuře. Ta se zjišťuje až po prokázání potřebných vlastností. Předposledním přístupem je využívání poznatků z oborů příbuzných farmaceutické chemii, především biochemie a klinických medicínských oborů. Poslední je obměňování struktury již existujících léčiv vycházející z poznatků o vztahu mezi chemickou strukturou a účinkem [17, 18].

U jednotlivých skupin léčiv lze metodou logických aplikací vymezit „konstituční oblast účinku“. Připravit tedy účinnější látky, sloučeniny s odlišnou délkou aktivity, se specifickou distribucí do určité tkáně, s méně výraznými vedlejšími účinky nebo výhodnějšími organoleptickými vlastnostmi. Podávaná látka může být účinná až jako metabolit, těmto látkám se pak říká proléčiva [17].

Široké možnosti modifikací jsou především u jednodušších molekul. Při modifikacích složitějších molekul, většinou přírodních látek, je množství obměn omezeno přítomností reaktivních míst a zaměnitelných skupin v molekule. Příkladem obměny struktury přírodních látek jsou silná analgetika vycházející z morfinu, spasmolytika odvozená od atropinu nebo chinolinová antimalarika. Modifikovány mohou být ale i syntetické látky, příkladem jsou hypnotika piperidinového typu, jejichž základem jsou barbituráty [17].

Účinná látka také musí mít potřebné fyzikálně-chemické vlastnosti, které ovlivňují účinek a chování látky v organismu. Sledován je vliv rozpustnosti, ionizace (bazicity a kyselosti), průchod buněčnými membránami, adsorpce na rozhraní fází apod. [17].

Při modifikaci struktury se pohlíží na poznatky o izomerii, homologii, analogii a proléčivech.

### **2.2.1. Izomerie**

Izomerie je charakterizována různým strukturním uspořádáním látek se stejným sumárním vzorcem. Tyto látky se nazývají izomery. Izomerie podmiňuje rozdílné fyzikální i chemické vlastnosti a je jednou z příčin rozmanitosti a početnosti hlavně u organických sloučenin. To platí i pro léčiva, izomerie je významným faktorem, jenž ovlivňuje účinek a vlastnosti léčiva [17, 19, 20].

Rozlišujeme izomerii konstituční (strukturní), která je dána různou povahou a uspořádáním atomů i vazeb v molekule, a izomerii prostorovou (stereoizomerie), u níž mají molekuly rozdílné uspořádání atomů v prostoru [17, 20].

#### **2.2.1.1. Konstituční izomerie**

U alifatických látek a sloučenin substituovaných aspoň tříuhlíkovým alkylem se setkáváme s izomerií řetězcovou. U této izomerie jde o rozdílné větvení uhlíkového řetězce a podle sdružení atomů v řetězci rozeznáváme uhlík primární, sekundární, terciární a kvartérní [17, 21].

Řetězcové izomery se liší chemickými vlastnostmi, které ovlivňují různé možnosti biotransformace, i fyzikálními vlastnostmi, jež ovlivňují rychlost transportu molekul. Nejvýrazněji se tato izomerie projevuje u rozvětvení v blízkosti reaktivní funkční skupiny. Vlivem sterického stínění dochází ke snížení pravděpodobnosti reakce mezi prostředím a funkční skupinou [17].

Polohová izomerie se vyskytuje u derivátů uhlovodíků, kde se mohou substituenty vázat na různé atomy základní uhlovodíkové kostry. U léčiv je to nejčastěji benzenový kruh, ale i heterocyklický, alifatický a alicyklický skelet. U polohových izomerů je pak časté, že jejich účinek je více méně stejný, ale u některých izomerů se objevuje rozdíl v účinku nebo je účinek vázán na specifické polohové seskupení [17, 20, 21].

Příčinou různého účinku strukturálních izomerů mohou být různé fyzikálně-chemické vlastnosti, jež mají vliv na vstřebávání a distribuci látky v organismu, nebo rozdílná odolnost izomerů k metabolickým změnám [17].

### **2.2.1.2. Stereoizomerie**

Některé stavební jednotky makromolekul biopolymerů se vyskytují ve formě jednoho z enantiomerů, například L-aminokyselina v bílkovinách. Tyto látky jsou opticky aktivní a díky nim je organismus komplexním soustavou chirálních látek a životní děje v něm probíhají s vysokou stereoselektivitou. Je tomu tak například u enzymatických reakcí. Prostorové uspořádání je důležité i u celé řady léčiv, protože většinou interagují s makromolekulárními systémy se specifickým prostorovým uspořádáním, jako jsou např. receptory [17].

Stereoizomery se mohou lišit v účinku jak kvantitativně, tak kvalitativně. Prostorové uspořádání může mít vliv v jakékoli fázi farmakokinetiky od podání látky do těla. Stereoizomery mohou také vykazovat rozdílný výskyt vedlejších a toxických účinků [17].

V rámci stereoizomerů rozlišujeme optickou, geometrickou izomerii a izomerii založenou na různé konformaci [17].

#### **2.2.1.2.1. Optická izomerie**

Příčinou optické izomerie je asymetrie molekulové stavby, tato molekula se nazývá chirální. U organických látek má chiralitu „na svědomí“ nejčastěji uhlík se čtyřmi různými substituenty (asymetrický uhlík). I jiné prvky však mohou tvořit asymetrické centrum, např. jsou to křemík, dusík, síra, fosfor a kovy v komplexních sloučeninách. Přítomnost asymetrického prvku nemusí být jedinou příčinou optické izomerie, rozhoduje i chiralita celé molekuly. Tyto látky se projevují optickou aktivitou, tj. schopností stáčet rovinu lineárně polarizovaného světla [17, 22].

Látka s jedním chirálním atomem se vyskytuje ve dvou optických izomerech, enantiomerech. Enantiomery jsou vzájemně svými zrcadlovými obrazy, jež se žádným natočením nedají ztotožnit. Vedle toho se liší smyslem optické otáčivosti. Pravotočivý izomer značený (+)- a levotočivý (-)- mají stejnou absolutní velikost optické otáčivosti, proto je směs stejných množství obou izomerů opticky inaktivní. Tato směs se nazývá racemát [17, 19, 22].

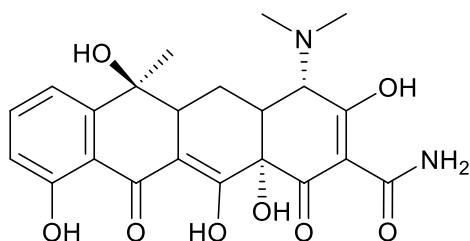
Enantiomery mají stejné fyzikální vlastnosti a v nechirálním prostředí i chemické vlastnosti. Rozdílná je u nich schopnost reagovat s jinými chirálními látkami, toho se využívá u stereospecifických reakcí v živých organismech a jednotlivé izomery se liší v biologické

aktivitě. Mezi enantiomerem a receptorem se při stereoselektivních reakcích předpokládá tříbodový kontakt, tedy soulad či nesoulad mezi látkou a vazebnými místy receptoru [17, 21].

S přibývajícím centry chiraloty přibývá i počet pravděpodobných izomerů, u látky s  $n$  asymetrickými centry bude  $2^n$  izomerů. Současně každé jejich dvojici odpovídá racemát, proto je počet racemátů poloviční než počet izomerů. Dvojice izomerů v racemátu je vůči jinému racemátu diastereoizomerní. Diastereoizomery se od enantiomerů liší optickou otáčivostí, chemickými i fyzikálními vlastnostmi [17, 19].

Pokud molekula obsahuje různá asymetrická centra, platí vztah uvedený v předchozím odstavci. Jestliže jsou centra stejná, počet stereoizomerů bude menší.

Stereoizomery nejsou konfiguračně stálé, přeměně, chirální interkonverzi, podléhají působením především pH, teploty a přítomností enzymů. U látek s jedním chirálním centrem může dojít k racemizaci, přeměně opticky aktivního enantiomeru na inaktivní racemát. U molekul s větším množstvím chirálních center může dojít k epimeraci, kdy dojde ke změně konfigurace na jednom a více centrech, ne však na všech najednou. Tím vznikne stále opticky aktivní diastereoizomer. K těmto změnám může dojít ve farmaceutické fázi, ale i ve farmakologické fázi, tj. po podání do organismu. K epimeraci snadno dochází např. u tetracyklinu (Obrázek 1) [17, 21].



Obrázek 1 Tetracyklin

Rozdílné biologické chování je a bude důvodem k častějšímu nahrazování racemátů aktivními enantiomery. K jejich syntéze se mohou využít buď opticky aktivních přírodních surovin, kdy je zachována optická čistota produktu, nebo se použije racemát, který je rozštěpen. Štěpení se provádí převedením na diastereoizomerní látky (soli, estery, molekulární komplexy...) nebo užitím mikroorganismů či enzymů. Rozdělení je možné i chromatograficky na chirálních sorbentech. V posledních letech bylo dosaženo velkých pokroků u enantioselektivních syntéz [17].

#### 2.2.1.2.2. Geometrická izomerie

U geometrických izomerů nedovoluje rigidita vazby mezi atomy volné otáčení na ně vázaných atomů a skupin. Často je tato izomerie důsledkem rigidity dvojně vazby [17, 21, 22].

Substituenty napojené na dvojně vázané atomy můžeme rozdělit na *cis*-substituenty ležící na stejné straně referenční roviny dvojně vazby (prochází oběma dvojně vázanými atomy a je kolmá na rovinu substituentů na atomy navázaných) a *trans*-izomery, kde substituenty leží každý na jiné straně roviny. V současné době je však spíše preferována terminologie *E/Z*, kde konfigurace *Z* odpovídá *cis*- (pomůcka z němčiny *zusammen* = spolu) a konfigurace *E* je pro *trans*- (*entgegen* = proti) [17, 21].

Druhý typ geometrické izomerie najdeme u nasycených cyklických systémů. Schematicky lze říct, že atomy tvořící kruh jsou v jedné rovině a atomy na ně navázané se nacházejí buď v téže rovině, nebo na opačných stranách [17].

Geometrická izomerie nezávisí na typu atomu, který tvoří kruh, může to být uhlík, ale i jiné atomy. Tato izomerie se vyskytuje také u *ortho*-kondenzovaných cyklů. Zde může být spojení cyklů rovněž *cis*- nebo *trans*- [17].

U sloučenin se čtyřmi rozdílnými substituenty je používání *cis*- a *trans*- afixů nejednoznačné. V tomto případě se používá rovněž systém *E/Z*. Určuje se vzájemná poloha dvou preferovaných substituentů, jejichž priorita se určuje podle protonových čísel a podle jejich vzájemné polohy se určí *E/Z* konfigurace [17, 19].

I u geometrické izomerie představují izomery různá individua a vykazují rozdílné fyzikální i chemické vlastnosti. Vyskytují se jako poměrně stálé sloučeniny a pro jejich přeměnu je nutno dodat energii. Rozdílné vlastnosti se projevují i v účinku léčiv. Díky různému prostorovému uspořádání a vzdálenosti substituentů nezaujmu izomery na receptoru stejné místo a jejich biologická aktivita se bude lišit [17].

### 2.2.1.2.3. Konformační izomerie

Konformační izomerie vychází z volné rotace atomů nebo atomových skupin kolem jednoduché vazby. V alifatických sloučeninách je za normálních podmínek otáčivost volná, ale z energetických důvodů existují zvýhodněné polohy – konformace. Energetické rozdíly jednotlivých konformací nejsou tolik rozdílné a snadno tedy přecházejí jedna v druhou. Izomery necyklických sloučenin proto nelze izolovat a vzhledem k účinku léčiva se jejich vliv neprojeví [17, 19, 22].



Z pohledu léčiv je významnější konformační izomerie cyklických sloučenin, u nich je možné otáčení kolem vazeb C-C omezit až téměř vyloučit. Alicyklické sloučeniny nemají rovinné uspořádání (až na cyklopropan), cyklobutan má např. konformaci čtverce ohnutého kolem úhlopříčky. Nejstabilnější konformace cyklopentanu je „obálková“ konformace. U cyklohexanového kruhu existují dvě formy bez úhlového pnutí: konformace židličková a vaničková. Vaničková konformace je méně častá, většinou vzniká kvůli strukturním důvodům. Substituenty jsou k cyklu připojeny buď ekvatoriálními (e), nebo axiálními (a) vazbami [17, 19].

Axiální vazby jsou kolmé k rovinám určeným sousedícími atomy, ekvatoriální vazby se od těchto rovin mírně odchyľují. Na ekvatoriálních vazbách jsou vazebné interakce menší než na axiálních, a proto budou termodynamicky stabilnější ty izomery s největším počtem substituentů na ekvatoriálních vazbách. Vazba na těchto vazbách má vliv i na reaktivitu. Substituent v ekvatoriální poloze je přístupnější reakcím. Axiálně navázaný substituent je stíněn cyklem, vodíkovými vazbami a jinými vazbami u ostatních axiálních poloh [17].

Rozdílná stavba izomerů má vliv na fyzikální, chemické i biologické vlastnosti. Jako u předchozích typů stereoizomerie může být rozdíl ve vstřebávání, transportu, metabolismu, eliminaci nebo vazbě na receptor [17].

### **2.2.2. Homologie**

Při homologii dochází ke změně délky uhlovodíkového řetězce o  $-CH_2-$ , je to nejjednodušší změna předlohové struktury. Z farmaceutického hlediska jsou rozlišovány dva druhy homologie. Pokud dochází ke změně délky postranního alkylového řetězce, jedná se o alkylovou homologii. O alkylenovou homologii jde, pokud dochází ke změně délky spojovacího řetězce [17, 23].

Homologie má praktický význam pro studium vlivu velikosti molekuly měněné látky na fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti. Při alkylové homologii jsou kvantitativní změny v biologické aktivitě podmíněny změnou fyzikálně-chemických vlastností. Změny fyzikálně-chemických a biologických vlastností nejsou během homologických řad vždy pravidelné. Rozlišuje se několik typů závislosti. Nejčastější je případ, kdy v řadě účinek narůstá, v určitém bodě dosáhne maxima a následně klesá. V dalším případě je účinek nejvyšší u prvního členu a postupně klesá, může tomu být i naopak, kdy účinek postupně narůstá. Méně častá je inverze účinku [17, 21].

U alkylenové homologie dochází k podstatnému snížení nebo k úplnému vymizení aktivity. Je tomu tak, protože účinek látek na receptor vyžaduje zachování vzdálenosti mezi atomy a změna délky spojovacího řetězce tuto vzdálenost poruší. Prodlužování uhlíkatého řetězce může dojít ke kvalitativnímu zvratu účinku, vyšší členové řady pak inhibují účinek nižších. Změna biologického účinku může být také závislá na lichém nebo sudém počtu uhlíků ve spojovacím řetězci. Homology s lichým počtem uhlíku mají vyšší aktivitu, což souvisí s neschopností metabolizace  $\beta$ -oxidací. Prodlužování spojovacího řetězce způsobuje i změny v transportu po organismu a způsobu exkrece [17].

### **2.2.3. Analogie**

Analogie nabízí široké množství možností pro obměny látek. Podle chemické změny jsou rozeznávány tyto typy analogie: hydrogenace a dehydrogenace, analogie alkylová, analogie radikálová, izosterie, analogie funkčních skupin, analogie kruhů, modely a zdvojení molekul [17].

#### **2.2.3.1. Hydrogenace a dehydrogenace**

Jedná se o nejjednodušší typ analogie. Analog se od původní látky liší přítomností či nepřítomností násobné vazby, tedy počtem na sousedních atomech navázaných vodíků. Tato zdánlivě malá změna struktury má za následek změnu fyzikálně-chemických nebo chemických vlastností. Hydrogenace a dehydrogenace tedy může účinek ovlivnit jak kvantitativně, tak kvalitativně. Kvalitativní změny nastávají, když dojde ke změně stereochemického uspořádání molekuly [17, 24].

Hydrogenace je často využíváno k přípravě parciálně-syntetických derivátů přírodních látek s izolovanou dvojnou vazbou v molekule nebo se používá při modifikaci námelových alkaloidů. Dehydrogenace se používá při změně struktury steroidních hormonů [17].

#### **2.2.3.2. Alkylová analogie**

Alkylová analogie je založena na obměně vodíku nebo alkyly vázaného na atomu původní látky, nejčastěji na uhlíku, ale i dusíku nebo kyslíku, nějakým jiným alkylem, cykloalkylem nebo alkoxy skupinou. Často se provádí náhrada vodíku navázaného na uhlík methylovou skupinou, toho se využívá ke sterickému stínění lehce štěpitelných vazeb. Dále se používá náhrada vodíku nebo alkyly za nenasycený uhlíkatý zbytek. Provádí se i modifikace vzájemnou výměnou alkylů [17, 23].

Záměnou alkylů může dojít i ke kvalitativní změně účinku. Kromě zvýšení, či snížení biologické aktivity, se může účinek posunout, ale může dojít až k jeho inverzi [17].

### **2.2.3.3. Radikálová analogie**

Radikálová analogie je široce využívána a provádí se záměnou vodíku nebo alkylu předlokové látky za aryl či naopak. I u této analogie se uplatňuje vzájemná výměna, tentokrát aromatických zbytků. Případně se provádí jejich výměna za heterocyklus či cykloalkyl. V některých případech se radikálová analogie překrývá s izosterií v kruzích, je tomu tak především při záměně arylu a heterocyklu [17, 23].

Účinek při radikálové analogii zůstává často stejný, může být zvýšen nebo snížen a v některých případech může dojít ke kvalitativnímu zvratu. To může nastat např. při záměně nestejně velkých arylů [17].

### **2.2.3.4. Izosterie**

Izosterie je postavena na poznatku, že různé atomy či atomová seskupení mohou plnit podobnou nebo stejnou funkci. Podmínkou je zachování stejného množství valenčních elektronů, přibližně stejného prostorového uspořádání a velikosti. Tyto skupiny jsou nazývány izosterní a látky, které je obsahují, se označují izostery. Izostery často vykazují podobné fyzikálně-chemické, chemické a tím pádem i biologické vlastnosti [25, 26].

Rozlišují se izostery prvního a druhého řádu. Součástí izosterů prvního řádu jsou atomová seskupení, která se utvořila na základě Grimmova zákona vodíkového posunu. Jedná se o postupné připojování atomů vodíku k prvkům IV. až VII. skupiny periodické soustavy prvků. V případě čtyřvazného uhlíku dostaneme nejprve trojvaznou methinovou skupinu, jež je izosterní s trojvazným dusíkem. Následně dvojvaznou methylenovou skupinu izosterní s dvojvazným kyslíkem a nakonec jednovaznou methylovou skupinu izosterní s jednovazným fluorem. Izosterie prvního řádu se tedy týká prvků patřících do různých skupin, ale do stejné řady periodické soustavy prvků. Obdobně lze odvodit izostery prvního řádu i u dalších prvků, tedy dusíku a kyslíku. Tyto analogy mají více méně stejnou velikost a fyzikální vlastnosti a jsou velmi podobné. Naopak z chemického hlediska se mohou lišit. Izosterní jsou např. benzen a pyridin, látky lišící se dvojvaznou skupinou a z látek s jednovaznými skupinami jsou to např. n-alkoholy, alkylaminy, alkylhalogenidy a alkany [17, 26, 27].

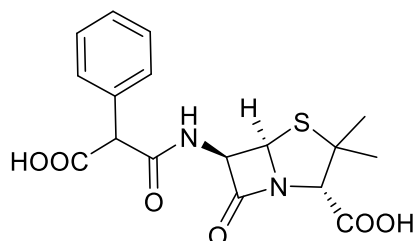
V případě izosterů druhého řádu se jedná o prvky patřící do stejné skupiny, ale do jiné periody periodického systému. Díky tomu se liší velikostí i hmotností. U těchto izosterů jsou

podobné fyzikální i chemické vlastnosti. Příkladem izosterů druhého řádu jsou třeba izosterní alkyhalogenidy ethylfluorid, ethylchlorid, ethylbromid a ethyljodid [17].

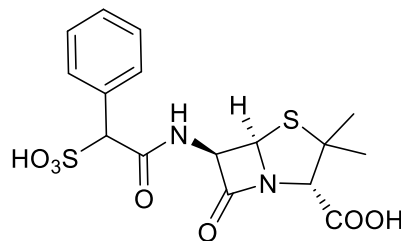
Mezi léčivy se objevuje celá řada izosterních látek. Mohou být synergisty, kteří mají stejný účinek, nebo antagonisty s opačným účinkem. Izosterie se užívá při změnách řetězce, kruhu či funkčních skupin u předlohových látek [26].

### 2.2.3.5. Analogie funkčních skupin

Při analogii funkčních skupin se látky liší pouze charakterem funkční skupiny, tyto skupiny zároveň nejsou izosterní. Tato modifikace se často používá při obměně esterové skupiny za ketonickou, etherovou nebo další. U toho nedochází zpravidla ke snížení ani zrušení účinku. Další záměnou může být nahrazení karbonylové skupiny za alkoholovou. V některých případech lze nahradit karboxylovou skupinu skupinou sulfonovou, např. sulfoanalog karbenicilinu (*Obrázek 2*), sulbenicilin (*Obrázek 3*), má širokospektrý antibakteriální účinek. Z bazických skupin je v léčivech nejčastější terciární aminoskupina, kterou je možné v některých případech převést na sekundární a naopak. Pro hledání vhodné struktury je využívána příprava tzv. převrácených analogů, především jde o převrácené amidy R-CONH-, R-NHCO- a převrácené estery R-COO-R<sup>1</sup> a R-OCO-R<sup>1</sup> [17, 23].



Obrázek 2 Karbenicilin



Obrázek 3 Sulbenicilin

### 2.2.3.6. Analogie kruhů

Analogie kruhů je založena na tom, zda je v odvozené látce kruh bohatší, analogie cyklická, nebo chudší, analogie otevřená. U cyklické analogie vzniká nový kruh propojením nesousedních atomů nebo za pomoci vhodného můstku. Tím může být atom uhlíku, či jiný atom nebo atomové seskupení [17, 23].

Cyklizací může dojít ke změně prostorového uspořádání, především u kondenzovaných systémů vznikne rigidnější struktura. Díky prostorové změně pak nemusí mít odvozená látka kvalitativně stejný účinek. Např. od látek obsahujících v molekule bifenylnmethylenové seskupení bylo odvozeno velké množství analog. Na tvorbě cyklických analog se může podílet

i postranní alkylový řetězec. Cyklická analogie se také často využívá u látek obsahujících dialkylaminové seskupení [17].

Naopak analogie otevřená vzniká otevřením jednoho či více kruhů předlohy látky. To představuje poměrně velký zásah do struktury látky, odvozená molekula má oproti molekule původní mnohem více flexibilní molekulu. Otevřená analogie se užívá při modifikaci struktury polycyklických látek, např. steroidních hormonů [17].

### **2.2.3.7. Modely**

Jednodušší syntetická analoga odvozená od složitějších látek mají v molekule zachované základní strukturní rysy původní molekuly. Modely jsou důležitým posunem u skupin léčiv, která vycházejí ze struktur přírodních látek. Následuje pak tvorba jednodušších otevřených analog, které se od předlohy už podstatně liší. Modely se tedy často využívají u alkaloidů, hormonů atd. [17, 23].

### **2.2.3.8. Zdvojení molekul**

Poslední z analogií je zdvojení molekul, kdy může nová látka vzniknout kombinací dvou stejných molekul či dvou látek se stejným farmakodynamickým působením. Známé jsou však i kombinace látek s různým mechanismem působení [17].

Zdvojení molekuly může být uskutečněno esterovou vazbou, ale i vazbami pevnějšími jako např. vazba amidová. Molekuly může spojovat i pevná kovalentní (di)sulfidová vazba, etherová vazba či vazba C-C, proto vždy nelze přepokládat, že dojde *in vivo* k rozštěpení zdvojené molekuly [17, 28].

## **2.2.4. Prekurzory léčiv**

Prekurzory léčiv, proléčiva, zaujímají mezi modifikacemi zvláštní místo. Jedná se o obměněné struktury biologicky aktivních látek. Tato modifikovaná molekula je většinou *in vitro* neúčinná, může však vykazovat i částečnou či plnou aktivitu. Biologickou aktivitu a terapeutický účinek získá biotransformací v organismu, nejčastěji enzymatickým štěpením [17, 28].

Příprava proléčiv má za účel potlačení nevhodných vlastností nebo vystupňování účinku. Změnou na prekurzor může dojít k pozitivnímu ovlivnění vstřebávání, zlepšení rozpustnosti ve vodě, prodloužení účinku, také může být ovlivněna distribuce v organismu, tedy putování látky do určitého orgánu či tkáně. Prekurzorů se také užívá pro zvýšení stálosti méně stabilních látek a snížení toxicity a nežádoucích účinků [17].

Tvorbu proléčiv lze srovnat s používáním protektivních skupin během syntéz. Prekurzory obsahují protektivní skupiny, které jsou zároveň netoxické, často výrazně lipofilní a přechodně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti látky. Proléčiva můžeme nazývat transportními formami léčiv, protože se před vyvoláním biologického efektu modifikující skupina odštěpí. Prekurzory léčiv jsou tedy reverzibilní deriváty. Existují i prekurzory s kombinací dvou účinných složek [17, 28].

Mezi složkou použitou k pozměnění struktury a léčivem vzniká nejčastěji kovalentní vazba, především snadno hydrolyzovatelné esterové a amidové skupiny. Dále se užívá i sloučenin typu Schiffových bází, acetalů, Mannichových bází aj., které se v organismu snadno hydrolyzují. Je možné použít i spojení funkční skupinou, jež je štěpena metabolickou redukcí. U některých proléčiv se nacházejí i komplexní vazby či iontové vztahy [17].

Pro vyvolání potřebného efektu je nutné, aby se prekurzor měnil na aktivní látku rychleji, než probíhá metabolizace mateřského léčiva a vznikla tak dostatečná koncentrace účinné látky [17, 28].

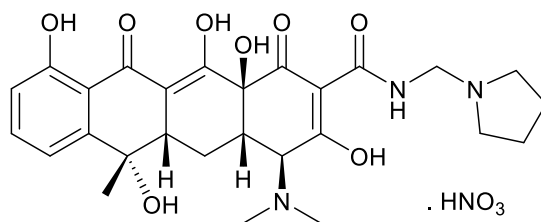
Proléčiva lze podle účelu rozdělit do následujících skupin: prekurzory se zvýšenou rozpustností ve vodě, prekurzory se zlepšeným vstřebáváním, prekurzory se specifitější distribucí, prekurzory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky, prekurzory s protahovaným účinkem a prekurzory se zvýšenou stálostí [17].

#### **2.2.4.1. Prekurzory se zvýšenou rozpustností ve vodě**

U léčiv určených k parenterální aplikaci nebo u očních kapek je zvýšená rozpustnost ve vodě důležitým požadavkem. Dosažení rozpustnosti ve vodě se řeší převedením na jednoduchou sůl, to ale není vždy možné, v tom případě se látka převede na prekurzor. Proléčiv se využívá u některých antibiotik, steroidních hormonů, ve vodě nerozpustných hormonů aj. [17].

Pro zvýšení rozpustnosti mohou být látky kondenzovány s ionizovatelnými skupinami (fosfáty, sukcináty, sulfáty atd.) nebo neionizovatelnými skupinami (sacharidy, glykoly atd.). Využití má např. tvorba esterů s aminokyselinami, kde lze podle zvolené aminokyseliny vložit další kyselou nebo zásaditou skupinu. Aminoskupinu je pak možné využít k tvorbě soli. U steroidů jsou vhodnou formou soli poloesterů dikarboxylových kyselin. V steroidů a vitaminů nerozpustných ve vodě se využívá vzniku kyselých solí s kyselinou fosforečnou. Kondenzáty se sacharidy jsou dalším způsobem zvýšení rozpustnosti. V případě

tetracyklinových antibiotik se dosahuje rozpustnosti ve vodě modifikací na soli Mannichových bázi, např. rolitetrazyklinium-nitrát (*Obrázek 4*) je prekurzor tetracyklinu vytvořený kondenzací s formaldehydem a pyrrolidinem [17, 28].

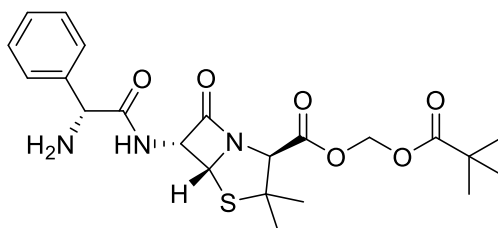


*Obrázek 4 Rolitetrazyklinium-nitrát*

#### 2.2.4.2. Prekurzory se zlepšeným vstřebáváním

Nejčastěji se průchod léčiv skrz biologické membrány uskutečňuje pasivním transportem. Pro látky polárního charakteru a nízké lipofility je tento děj ovšem ztížen a jejich zlepšeného vstřebávání se dosáhne modifikací na lipofilnější prekurzory. Toho se docílí maskováním polárních funkčních skupin, tedy skupin schopných tvorby vodíkových můstků [17, 28].

Pro zlepšení vstřebávání se používá např. esterifikace či acetyly. Obě modifikace se využívají pro zlepšené vstřebávání kůží, samotná esterifikace se pak užívá např. i u perorálního podání. Pivampicilin (*Obrázek 5*) je příkladem těchto prolečiv, jedná se o pivaloyloxymethylester ampicilinu s lepším vstřebáváním po perorálním podání [17].

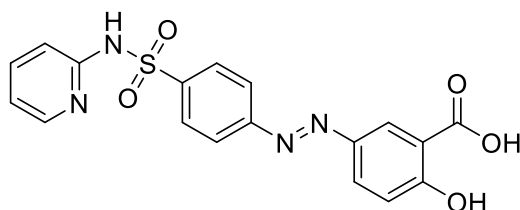


*Obrázek 5 Pivampicilin*

#### 2.2.4.3. Prekurzory se specifitější distribucí

Pro účinek látky je samozřejmě důležité to, aby se dostala do tkáně, kde má působit. Proto je snaha docílit nahromadění dostatečného množství látky v konkrétním orgánu nebo tkáni hlavní motivací pro přípravu prolečiv se specifitější distribucí. Toho lze docílit úpravou fyzikálně-chemických vlastností nebo využitím rozdílů mezi zdravou a patologickou tkání, kdy je léčivo distribuováno do celého organismu, avšak bioaktivace proběhne pouze v určité tkáni [17, 28].

Dlouhodobě se specifitější distribuci věnuje pozornost u chemoterapeutik. Například díky zjištění vyšší aktivity fosfoamidů v určitých nádorech byly připraveny fosforesteramidové deriváty dusíkatých yperitů, k jejichž bioaktivaci by mělo dojít v nádorové tkáni. Prakticky se používají i prekurzory antimetabolitů. Za pomoci lipofilních prekurzorů se též podařilo ovlivnit průchod léčiv hematoencefalickou bariérou. Známé jsou  $N^4$ -substituované sulfonamidy, které se používají k léčbě střevních bakteriálních infekcí, např. sulfasalazin (Obrázek 6) [17].



Obrázek 6 Sulfasalazin

#### 2.2.4.4. Prekurzory se sníženou toxicitou a redukovanými vedlejšími účinky

Vedle samotného účinku léčiva je toxicita druhým nejdůležitějším projevem působení na organismus a snahy o její snížení se objevily záhy. U látek, které jsou vysoce aktivní a jsou v organismu rychle inaktivovány, se hovoří o tzv. soft drugs. Zde je modifikace cílena na snížení nežádoucích účinků, především toxicity. Tyto látky jsou velmi krátce *i. v.* podávaná systémová léčiva nebo místně působící léčiva [28].

Ke snížení toxicity dojde u případů, kde se dosáhlo místně specifického účinku. U látek, kde je toxicita projevem molekuly jako celku, je možné toxicitu snížit převedením na *N*-oxidy. Jsou to např. alkaloidy nebo látky se sekundárními či terciárními aminoskupinami v molekule. Molekuly s primární aminoskupinou vykazují nižší toxicitu jako proléčiva typu Schiffových bází vznikající kondenzací s aldosi. Prekurzory glykosidické povahy vznikají modifikací látek obsahujících hydroxylové skupiny [17].

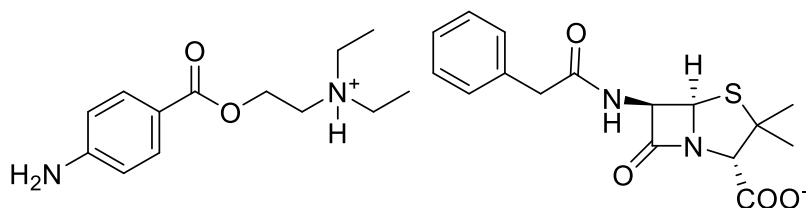
Mimo toxicitu je dalším nežádoucím účinkem špatná místní snášenlivost, ta je často vázána na určité funkční seskupení, především jde o aldehydickou skupinu. Místní nesnášenlivost způsobují i fenolické skupiny. U některých látek jsou však tyto skupiny nezbytné pro biologickou aktivitu nezbytné a jejich dráždivost se dočasně blokuje esterovou vazbou. Stejně tak je proléčiv využíváno pro odstranění hořké chuti některých antibiotik. Mimo hořké chuti může být nevhodnou vlastností i nepříjemný zápach. K jeho odstranění je rovněž možné využít modifikaci na prekurzory [17].



#### 2.2.4.5. Prekurzory s protahovaným účinkem

Pokud je nutné dlouhodobě udržet konstantní hladinu léčiva, využívá se přípravy proléčiv s protahovaným účinkem. Prodloužení účinku se dosáhne převodem na lipofilnější ve vodě hůře rozpustné látky, z nich se poté v těle postupně uvolňuje původní léčivo. To se provádí opět maskováním hydrofilních skupin. Zpravidla se aplikují intramuskulárně jako roztoky v rostlinných olejích či vodné mikrokrystalické suspenze [17, 28].

K prodloužení účinku se u látek s hydroxylovými skupinami využívá esterifikace, jako kyselá složka se nejčastěji využívá delších alifatických kyselin, aromatických kyselin a cykloalkylalkanových kyselin. Kromě esterifikace se používají i proléčiva typu acetalů, špatně rozpustných solí a komplexních solí, u antimikrobních látek jsou to třeba tzv. depotní peniciliny např. sůl benzylpenicilinu s prokainem prokain-benzylpenicilin (Obrázek 7) [17].



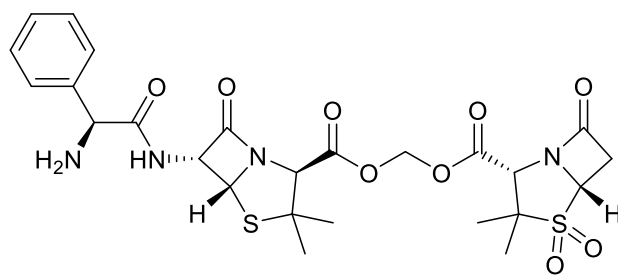
Obrázek 7 Prokain-benzylpenicilin

#### 2.2.4.6. Prekurzory se zvýšenou stabilitou

Při přípravě proléčiv se přihlíží i ke snaze získat dostatečně stabilní látky pro přípravu dané lékové formy. Například u prostaglandinů se zvýšení stálosti in *substantia* a v roztocích docílilo modifikací na krystalické estery s některými fenoly. Dalším příkladem může být maskování primární alkoholické skupiny u retinolu esterifikací [17].

#### 2.2.4.7. Mutual prodrug

Tzv. mutual prodrugs jsou proléčiva složená ze dvou biologicky aktivních látek, které slouží jedna druhé jako ochranný prvek před degradací, nosič či k tlumení nežádoucích účinků. Spárované látky mohou mít stejný biologický účinek, společně pak mohou působit synergicky. Případně může mít párovaná látka nějaký doplňující účinek, který původnímu léčivu chybí, či vylepšit místní specifitu léčiva. Příkladem je sultamicilin (Obrázek 8), kde byl spojen synergicky působící sulbaktam a ampicilin [29].



Obrázek 8 Sultamicilin

### 3. Cíl práce

Cílem práce je nejprve přiblížit problematiku bakteriální rezistence, která je v současné době globálním problémem, a důležitých pojmů, které se této problematice týkají. Další část je věnována možnostem vývoje nových léčiv, především získávání nových léčiv modifikací již existujících molekul za účelem zlepšení vlastností původní látky či odstranění nežádoucích vlastností (tvorba prolečiv).

Účelem rešeršní části je poté shrnout v posledních několika letech syntetizované a testované sloučeniny založené na aminokyselinových a peptidových derivátech antimikrobních molekul, které se ukázaly být účinné proti mikroorganismům, vykázaly zajímavé výsledky a mohly by mít potenciál v boji s šířící se rezistencí, případně by mohly vést k syntéze dalších účinných látek.

## 4. Rešeršní část

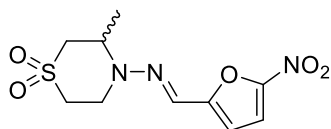
### 4.1. Léčiva proti parazitickým onemocněním

Parazitická onemocnění způsobená širokým spektrem eukaryotických organismů představují významný celosvětový zdravotní problém. Ať už se jedná o malárii, leishmaniózu, Chagasovu chorobu nebo africkou spavou nemoc, tato onemocnění postihují stamiliony lidí po celém světě a představují ohromnou sociální a ekonomickou zátěž [30].

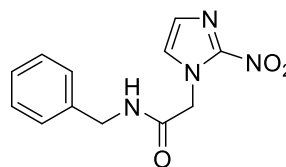
Většina současně používaných léků je stará a má mnoho omezení, včetně vzniku rezistence. Je tedy nutné vyvinout nové kontrolní nástroje (vakcíny, nová léčiva), které by vykazovaly různé způsoby účinku. Dosažení toho je možné skrz zkoumání a kombinování široké škály chemických struktur či zlepšováním farmakologických vlastností již užívaných léčiv [30].

#### 4.1.1. Trypanosomóza

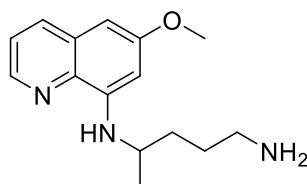
Americká trypanosomóza (Chagasova nemoc) je vážným problémem veřejného zdraví na americkém kontinentu. Riziku infekce je vystaveno velké množství lidí, terapie je neuspokojivá a je uskutečňována pouze dvěma dostupnými léky: nifurtimox (*Obrázek 9*) a benznidazol (*Obrázek 10*). Jedním z hlavních problémů při terapii trypanosomózy je související účinnost léků, které jsou účinné pouze v akutní fázi infekce. Časná stádia infekce se navíc obtížně diagnostikují a obě léčiva mají závažné nežádoucí účinky. Antimalarikum primachin (*Obrázek 11*) už bylo též použito v akutních vrozených případech Chagasovy choroby [30, 31].



Obrázek 9 Nifurtimox [30]



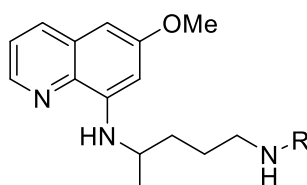
Obrázek 10 Benznidazol [30]



Obrázek 11 Primachin [30]

Chung a kol. [30, 31] připravili dipeptidová proléčiva tohoto antimalarika a *in vitro* hodnotili jeho trypanocidní aktivitu. Dipeptidová proléčiva primachinu **1a-c** (*Obrázek 12*) byla

účinná proti trypomastigotním formám *Trypanosoma cruzi*. Bylo prokázáno, že **1a** působí na vývoj *T. cruzi* v hostitelských buňkách. Tyto prekurzory byly aktivnější než **1b** a **1c**, to naznačuje, že při uvolňování léčiva hraje důležitou roli specifické enzymatické štěpení. Navíc se jednalo o dobrý nosič primachinu a má potenciál být využit jako spacer při vývoji dalších preparátů primachinu proti trypanosomóze. Pro získání dalších informací ohledně biologické dostupnosti a farmakologických parametrech **1a** je nutné provést testy *in vivo*.



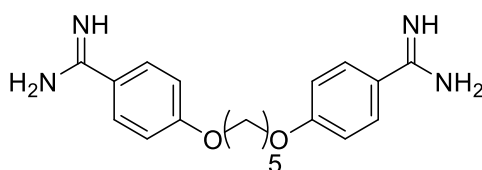
Obrázek 12 Deriváty primachinu [30]

**1a** R = Lys-Arg

**1b** R = Phe-Ala

**1c** R = Phe-Arg

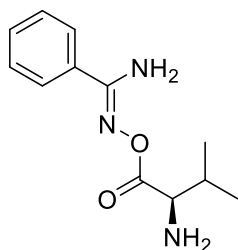
Pentamidin (Obrázek 13) je účinný v léčbě hemolymfatického stádia trypanosomózy a leishmaniózy rezistentní k derivátům antimonu. Jelikož se jedná o aromatický diamidin, je nutné intravenózní či inhalační podání. Většina parazitárních onemocnění se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech, kde je obvykle systém lékařské péče špatný. Kvůli tomu tento způsob aplikace omezuje léčebné použití pentamidinu ve většině regionů. Z tohoto důvodu je nutné připravit deriváty umožňující perorální podání. Intravenózní podání je navíc spojeno s toxickými účinky. Obecně mají léčiva obsahující amidiny při perorálním podání špatnou biologickou dostupnost, a proto jsou často přeměňovány na amidoximová proléčiva, aby se překonalo nízké vstřebávání ze zažívacího traktu [30, 32].



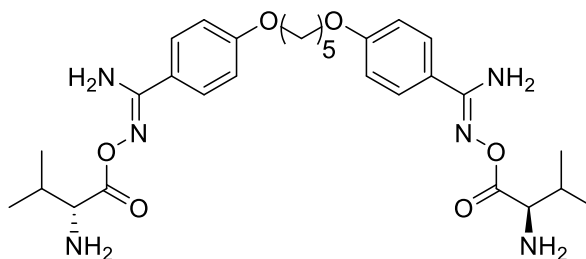
Obrázek 13 Pentamidin [30]

Esterifikace amidoximu a aminokyselinami je novým principem dvojitých proléčiv. Pro překonání toxicity navrhli Kotthaus a kol. [30, 32] sloučeninu *N*-valyloxybenzamidin (**2**, Obrázek 14) Následně zkoumali biologickou transformaci *in vitro* a *in vivo*. Zaměřili se na biologickou dostupnost po perorálním podání a na následnou biodistribuci v tkáních. Následně převedli proléčivo na *N,N'*-bis(valyloxy)pentamidin (**3**, Obrázek 15) a byla

zkoumána rozpustnost ve vodě, stabilita, bioaktivace *in vitro* a orgánová distribuce včetně post-absorpční konverze na aktivní metabolit pentamidin.



Obrázek 14 N-valyloxybenzamidin **2** [30]



Obrázek 15 N,N'-bis(valyloxy)pentamidin **3** [30]

Obě sloučeniny, **2** a **3**, byly *in vitro* enzymaticky aktivovány. Aktivace je založena na mitochondriálních amidoxin reduktázách, proto je nezávislá na enzymech cytochromu P450 (CYP450). Tím se minimalizuje riziko lékových interakcí a nežádoucích účinků. Ve srovnání s amidoximovými proléčivými měly **2** a **3** zvýšenou rozpustnost ve vodě, což vedlo k výborné biologické dostupnosti po perorálním podání. V gastrointestinálním traktu je kromě absorpce difuzí možný i transport aminokyselinovými a peptidovými transportéry. Vysoká biologická dostupnost též snižuje pravděpodobnost hydrolyzy esteru před absorpcí [30, 32].

Pentamidin vstoupil do buněk všech zkoumaných tkání. To je zásadní pro antiprotozoální účinek léčiva vzhledem k rozšíření parazita po celém těle. Důležité je, že proléčivo **2** bylo zcela přeměněno na původní léčivo a jeho rozpustnost se v porovnání s pentamidinem, diamidoxinem a N,N'-bis(acetoxi)pentamidinem zlepšila více než stonásobně [30, 32].

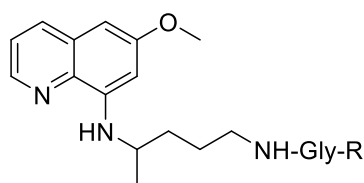
Popsaný přístup by mohl být rovněž cenný pro léčbu druhé fáze africké spavé nemoci. Při testech bylo zjištěno, že se pentamidin dostal v malém množství do mozku. Vývoj proléčiv pentamidinu na bázi jiných aminokyselin by pak mohl vést k proléčivům, která účinněji překročí hematoencefalickou bariéru [30, 32].

#### 4.1.2. Malárie

V tropických oblastech je malárie jedním z hlavních problémů veřejného zdraví. Hlavní překážkou v úsilí o kontrolu této choroby je rychlý vznik a následně šíření plazmodií (hlavně *Plasmodium falciparum*) rezistentních k chlorochinu po celém africkém kontinentu. Kmeny *P. falciparum* jsou rezistentní i k novějším lékům, např. meflochinu. To může být důsledkem ztráty aktivity vůči nepohlavním krevním formám parazita, které způsobují klinické příznaky onemocnění [30].

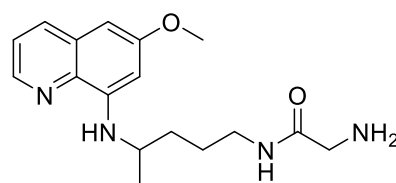
V současné době je léčivem první volby primachin, protože je účinný proti oběma latentním jaterním formám recidivujících forem malárie způsobené *P. vivax* a *P. ovale* i gametocytům všech druhů způsobujících malárii u člověka, a používá se především pro zamezení přenosu. Primachin má krátký poločas v plazmě, což může souviset s jeho rychlou oxidativní deaminací na karboxyprimachin, který je proti malárii neaktivní. Primachin rovněž způsobuje oxidaci oxyhemoglobinu na methemoglobin, tento děj pak vede ke ztrátě schopnosti přenášet kyslík [30].

Portela a kol. [30, 33] vyvinuli dipeptidové deriváty primachinu **4-6** (Obrázky 16-18) za třemi účely: aby vyhodnotili gametocytocidní účinky nových dipeptidových derivátů a jejich potenciál pro využití jako antimalarika blokující přenos prvoků, dále pro porovnání vedlejších účinků na gametocidní aktivitu u řetězců s přírodními aminokyselinami i s těmi přirozeně se nevyskytujícími. Posledním cílem bylo posoudit účinek acylace alifatického vedlejšího řetězce na tvorbu karboxyprimachinu v homogenátech jater potkanů.

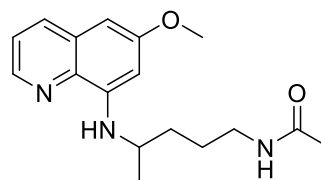


Obrázek 16 Deriváty **4** [30]

- 4a** R = Gly
- 4b** R = L-Phe
- 4c** R = L-Ala
- 4d** R = D-Phe
- 4e** R = Sar



Obrázek 17 Derivát **5** [30]



Obrázek 18 Derivát **6** [30]

Ke studiu metabolismu derivátů **4** byly vybrány homogenáty potkaních jater, kde hrají při přeměně primachinu na karboxyprimachin roli cytochrom CYP450, monoaminoxidáza (MAO) a aldehyddehydrogenáza stejnou roli. U derivátů **4a-c** byla pozorována současná tvorba primachinu a derivátu **5**. Naopak u derivátů **4d-e**, které byly v inkubačních směsích stabilní, zůstala jejich koncentrace se po dobu nejméně 3 hodin neměnná. Za stejných podmínek se u derivátu **5** nepodařilo regenerovat původní látku. Proto se předpokládalo, že acylace alifatického postranního řetězce chrání koncovou aminoskupinu před oxidativní deaminací a tím se brání vzniku karboxyprimachinu [30, 33].

Při testech sporogonického vývoje byl použit kmen *P. berghei* ANKA 25R/10 odolný vůči meflochinu, myši Balb/c a komár rodu *Anopheles stephensi*. Při hodnocení antimalarické aktivity se přihlíželo k několika kritériím: minimální účinná dávka zabraňující výskytu oocyst ve střevech komárů, procentní podíl komárů s oocystami, průměrný počet oocyst na nakaženého komára a procento komárů se sporozoity ve slinných žlázách. Všechny deriváty **4** byly schopny zabránit vzniku sporogonických cyklů *P. berghei* v dávkách 15 a 7,5 mg/kg [30, 33].

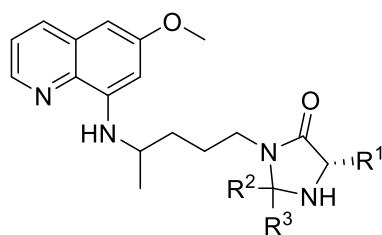
Gametocytocidní aktivita derivátů **4** s největší pravděpodobností nesouvisí s rychlostí hydrolýzy katalyzované peptidázami na primachin. Deriváty **4d-e**, které nejsou hydrolyzovány, vykazovaly vnitřní aktivitu. Naopak derivát **5** postrádající terminální fyziologickou aminokyselinu gametocytocidní aktivitu nevykazoval [30, 33].

Jelikož i karboxyprimachin postrádá terminální aminoskupinu a je rovněž inaktivní, vede to k závěru, že přítomnost této skupiny je hlavním strukturním požadavkem pro cidní účinek na gametocyty. Novým přístupem pro prevenci oxidativní deaminace primachinu je tedy acylace primární aminoskupiny na C'-4 dipeptidy, které obsahují přirozené a nefyziologické aminokyseliny, což autoři považují obecně za potenciálně užitečné pro navrhování sloučenin na bázi antimalarik, jež jsou rychle metabolizovány [30, 33].

Za účelem zredukování metabolické oxidativní deaminační dráhy a snížení toxicity původní látky byly syntetizovány některé další aminokyselinové a peptidové deriváty primachinu a dalších 8-aminochinolinových antimalarik. I přes povzbuzující výsledky bylo prokázáno, že aminokyselinové a peptidové deriváty primachinu rychle podléhají hydrolýze aminopeptidázami a endopeptidázami za uvolnění původního léčiva. To naznačuje, že po perorálním podání by mohly v gastrointestinálním traktu podlehnout rozsáhlé hydrolýze na původní látky [30, 33].

S cílem zvýšit stabilitu a snížit toxicitu Araújo a kol. [34] syntetizovali několik peptidových a aminokyselinových derivátů primachinu a imidazolidin-4-onu **7a-I** (Obrázek 19). Imidazolidin-4-on slouží k ochraně *N*-terminálního zbytku aminokyseliny před peptidázami. Tyto deriváty jsou neenzymaticky štěpeny na mateřský peptid primachinu, který by pak mohl být enzymaticky hydrolyzován na původní léčivo.





Obrázek 19 Deriváty **7a-l** [30]

<b>7a</b> $R^1 = H, R^2 = (CH_2)_5, R^3 = (CH_2)_5$	<b>7g</b> $R^1 = CHPh, R^2 = Me, R^3 = Me$
<b>7b</b> $R^1 = H, R^2 = Me, R^3 = Me$	<b>7h</b> $R^1 = CHMe_2, R^2 = (CH_2)_6, R^3 = (CH_2)_6$
<b>7c</b> $R^1 = Me, R^2 = (CH_2)_5, R^3 = (CH_2)_5$	<b>7i</b> $R^1 = CHMe_2, R^2 = (CH_2)_5, R^3 = (CH_2)_5$
<b>7d</b> $R^1 = CH_2Ph, R^2 = (CH_2)_6, R^3 = (CH_2)_6$	<b>7j</b> $R^1 = CHMe_2, R^2 = (CH_2)_4, R^3 = (CH_2)_4$
<b>7e</b> $R^1 = CH_2Ph, R^2 = (CH_2)_5, R^3 = (CH_2)_5$	<b>7k</b> $R^1 = CHMe_2, R^2 = Me, R^3 = Me$
<b>7f</b> $R^1 = CH_2Ph, R^2 = (CH_2)_4, R^3 = (CH_2)_4$	<b>7l</b> $R^1 = CH_2CHMe_2, R^2 = Me, R^3 = Me$

Kromě **7b** vykazovaly všechny sloučeniny neobvykle vysokou stabilitu při inkubaci v lidské plazmě bez toho, aby po dobu 3 dnů inkubace významně vymizely výchozí deriváty. Výsledky ukázaly, že stabilita **7** není významně ovlivněna substituenty  $R^2$  a  $R^3$ . Naopak necyklizované prekurzory derivátů **7** jsou kvantitativně hydrolyzovány na primachin v množství závislém na povaze aminokyselinového řetězce [30, 34].

Zatímco jednoduché aminokyselinové deriváty se chovají jako proléčiva primachinu, odpovídající imidazolidin-4-ony **7** jsou příliš stabilní na to, aby se daly považovat za jednoduchá proléčiva. V pufru o pH 7,4 deriváty **7** hydrolyzují na odpovídající aminokyselinové deriváty (s dlouhým poločasem 9-30 dní). Sloučeniny **7** se navíc hydrolyzují 50krát až 100krát pomaleji než jejich acyklická analoga na bázi dipeptidů a peptidů. Autoři se domnívali, že by vysvětlení mohlo souviset s mechanismem hydrolyzy [30, 34].

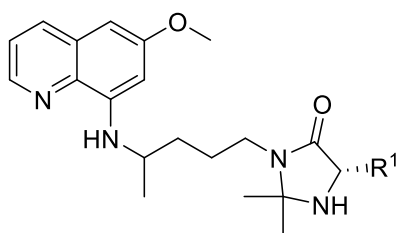
Byl testován potenciál sloučenin zabránit přenosu malárie za použití myších buněk BalbC infikovaných *P. berghei*. Výchozí léčivo a deriváty imidazolidin-4-ony **7a-g**, tedy ty obsahující glycín (Gly), alanin (Ala) a fenylalanin (Phe), inhibovaly tvorbu oocyst v dávce 50  $\mu\text{mol/kg}$  úplně. Ačkoli imidazolidin-4-ony obsahující valin (Val) a leucin (Leu), **7i-l**, významně ovlivňují sporogonický vývoj *P. berghei*, při již zmíněné dávce však neinhibovaly produkci oocyst zcela. Při dávce 10  $\mu\text{mol/kg}$  ovlivnily deriváty **7a-c** a **7j-l** významně počet oocyst. Tato aktivita byla podobná primachinu [30, 34].

Deriváty **7d-g**, odvozené od Phe, a deriváty **7h** a **7i**, odvozené od Val, produkci oocyst v porovnání s kontrolou výrazně nesnížily. Imidazolidin-4-ony odvozené od Gly **7a** a **7b** a Ala **7c** jsou nejúčinnějšími gametocytocidními látkami. To naznačuje, že zabudování imidazolidin-4-onového scaffoldu výrazně nemění antimalarickou aktivitu. Naopak deriváty imidazolidin-4-

onu odvozené od lipofilních aminokyselin Phe, Val a Leu byly ve srovnání s primachinem méně aktivní [30, 34].

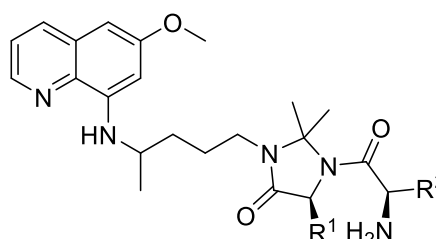
Vangapandu a kol. [30] zjistili, že připojení hydrofobní aminokyseliny na terminální aminoskupinu primachinu vedlo ke snížení antimalarické aktivity proti schizontům v krvi. To tedy naznačuje negativní vliv postranních hydrofobních řetězců aminokyselin na aktivitu derivátů 8-aminochinolinu jak u krevních schizontů, tak u gametocytů. Syntetizované imidazolidin-4-ony jsou velmi stabilní vůči chemické i enzymatické degradaci, což značí, že samy o sobě jsou aktivní a nejedná se o klasická proléčiva.

Vale a kol. [35] syntetizovali imidazolidin-4-onové deriváty primachinu **8-10** (Obrázky 20-22). *N*<sup>1</sup>-acylací imidazolidin-4-onu aminokyselinou připravili deriváty **9** za účelem úplného potlačení hydrolyzy imidazolidin-4-onového kruhu. Za použití několika aminokyselinových řetězců ( $R^1$  a  $R^2$ ) byl připraven soubor zmíněných sloučenin s cílem ověřit vliv těchto substituentů na vlastnosti sloučenin.



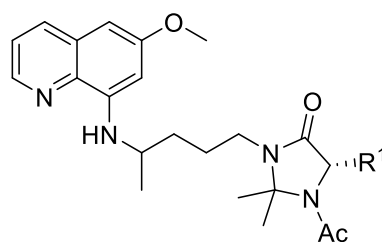
Obrázek 20 Derivát **8** [30]

**8a**  $R^1 = H$   
**8b**  $R^1 = Me$



Obrázek 21 Derivát **9** [35]

**9a**  $R^1 = H, R^2 = H$     **9e**  $R^1 = H, R^2 = Bz$   
**9b**  $R^1 = H, R^2 = Me$     **9f**  $R^1 = H, R^2 = (CH_2)SMe$   
**9c**  $R^1 = H, R^2 = iPr$     **9g**  $R^1 = Me, R^2 = H$   
**9d**  $R^1 = H, R^2 = iBu$     **9h**  $R^1 = (CH_2)_2SMe, R^2 = H$



Obrázek 22 Derivát **10** [30]

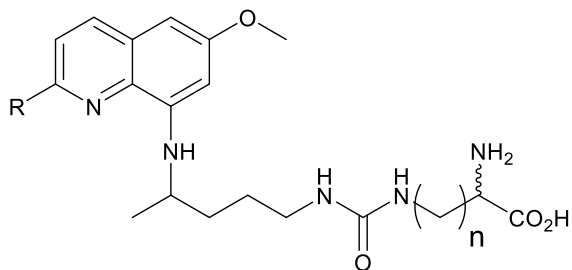
Sloučeniny **9** byly hodnoceny na *in vitro* aktivitu proti kmeni *P. falciparum* W2, který je rezistentní k chlorochinu. Aktivita sloučenin byla v rozmezí  $IC_{50}$  5,5-12  $\mu M$ , při čemž aktivita sloučeniny **9g** byla blízká primachinu ( $IC_{50}$  **9g** 5,5  $\mu M$ , primachin 3,3  $\mu M$ ). Výsledky testování také ukázaly, že aktivita sloučeniny proti plazmodiím není významně ovlivněna povahou aminokyselinového zbytku na *N*<sup>1</sup> atomu imidazolidin-4-onu a aktivita sloučenin **9** též

není významně ovlivněna povahou substituentu R<sup>1</sup> na pozici C5 imidazolidin-4-onu. Obecně byly sloučeniny **9** proti *P. falciparum* aktivnější než jejich prekurzory **8** (**8** IC<sub>50</sub> 9-50 μM, **9** IC<sub>50</sub> 5,5-12 μM) [35].

Byl testován potenciál sloučenin **9a,b,e** zastavit přenos malárie, použity byly myši BalbC buňky infikované *P. berghei* a komáři *A. stephensi*. Sloučeniny **9a,e** inhibovaly přenos infekce na komáry stejně účinně jako primachin při obou testovaných dávkách 10 a 50 μmol/kg, sloučenina **9b** byla při dávce 10 μmol/kg inaktivní [35].

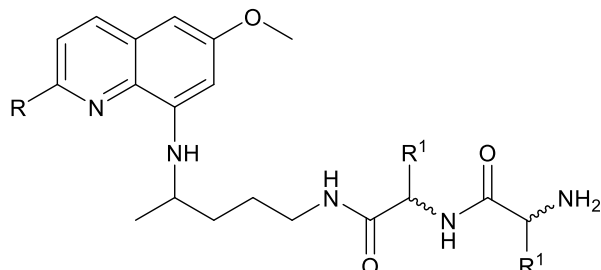
Sloučeniny **9** vykazovaly v porovnání s primachinem vyšší cytotoxicitu proti buňkám A549. Výjimkou jsou **9a** a **9h**, které žádnou toxicitu nevykazovaly. Autoři se domnívali, že aktivitu sloučenin pozitivně moduluje N<sup>1</sup>-acylace imidazolidin-4-onového kruhu aminokyselinou, což může být částečně i díky přítomnosti primární aminokyseliny [30].

Kaur a kol. [36] syntetizovali tři série nových konjugátů aminokyselin, dipeptidů a pseudodipeptidů s 8-aminochinoliny (8-AQ) (Obrázky 23-25). Konjugáty vznikly kovalentním spojením postranního řetězce (série 1 a 3) či karboxylu (série 2) aminokyseliny s terminální aminoskupinou 8-AQ, kdy bylo už dříve zjištěno, že připojením kationtové aminokyseliny jako lysin (Lys) a ornithin (Orn) dojde ke zvýšení antimalarické aktivity – na rozdíl od aniontových a lipofilních aminokyselin. Vyšší aktivita těchto konjugátů by mohla být vysvětlena tím, že zvýšením bazicity sloučeniny se zvýší i její akumulace ve vakuolách parazitů a dojde ke zvýšení jejich schopnosti inhibice β-hematinu, a tím antimalarické aktivity. Následně byly syntetizovány i dipeptidové konjugáty 8-AQ.



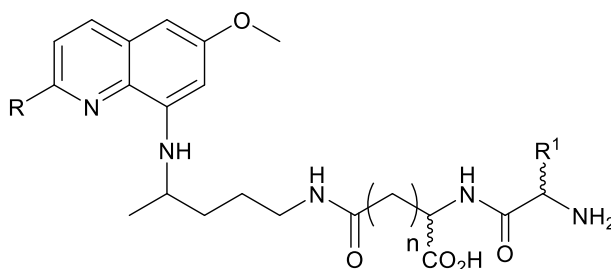
Obrázek 23 Deriváty 1. série **11–14** [36]

- 11**  $R = H$ ,  $n = 4$   
**12**  $R = H$ ,  $n = 3$   
**13**  $R = C(CH_3)_3$ ,  $n = 4$   
**14**  $R = C(CH_3)_3$ ,  $n = 3$



Obrázek 24 Deriváty 2. série **15–18** [36]

- 15**  $R = C(CH_3)_3$ ,  $R^1 = L\text{-Lys}$   
**16**  $R = C(CH_3)_3$ ,  $R^1 = L\text{-Arg}$   
**17**  $R = H$ ,  $R^1 = L\text{-Lys}$   
**18**  $R = C(CH_3)_3$ ,  $R^1 = D\text{-Arg}$

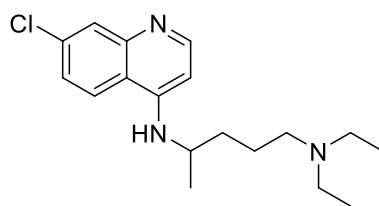


Obrázek 25 Derivát 3. série **19** [36]

$R = H$   $R^1 = L\text{-Lys}$

Pseudodipeptidy jsou skupina sloučenin, u nichž je amidová vazba modifikována chemickými změnami, např. redukcí karbonylové skupiny v amidové vazbě či thionací. V pseudopeptidech mohou být zbytky aminokyselin spojené přes  $\alpha/\beta/\gamma\text{-CO}_2\text{H}$  nebo  $\text{NH}_2$  skupiny, což zvýší jejich odolnost vůči enzymatickému štěpení [36].

U syntetizovaných konjugátů byla *in vitro* testována antimalarická aktivita ke kmenům *P. falciparum* citlivých i rezistentních k chlorochinu (Obrázek 26). Sloučeniny **11–14** (Obrázek 23) měly slabou nebo žádnou antimalarickou aktivitu, sloučenina **14** ale vykazovala nízkou, rovněž testovanou, inhibici  $\beta$ -hematinu. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost volné  $\text{CO}_2\text{H}$  skupiny spolu s žádanou volnou terminální  $\text{NH}_2$  skupinou je pro antimalarickou aktivitu nevýhodná. Z dipeptidových derivátů byly neaktivnější amidy **15** a **16** (Obrázek 24) obsahující L-Lys-L-Lys a L-Arg-L-Arg. Z pseudopeptidových derivátů byla jako nejúčinnější vyhodnocena sloučenina **18** (Obrázek 24) a proti oběma kmenům měla vysoký index selektivity, nebyla tedy přítomna zkřížená rezistence s chlorochinem [36].

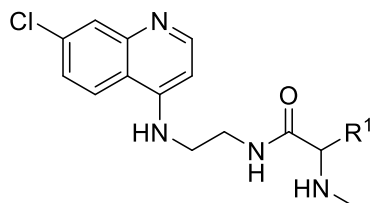


Obrázek 26 Chlorochin [30]

Dále byla testována i cytotoxicita proti savčím buňkám ledvin Vero (nejvyšší koncentrace  $IC_{50}$  23,8 mg/ml) a u žádné z látek nebyly cytotoxické účinky zjištěny, což naznačuje selektivitu antimalarického účinku. *In vivo* testy schizontocidního působení u kmene *P. berghei* ukázaly, že nejlepší aktivitu mají deriváty **17** a **19** (Obrázky 24 a 25) [36].

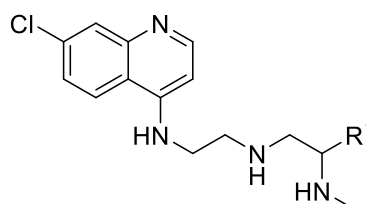
Deriváty byly testovány i na antibakteriální aktivitu proti *S. aureus*, MRSA, *Mycobacterium intracellulare*, *E. coli* a *P. aeruginosa*. Z testovaných konjugátů vykazovaly slibnou aktivitu látky **16** a **18** proti MRSA ( $IC_{50}$  7  $\mu$ g/ml a 5,9  $\mu$ g/ml, MIC 10  $\mu$ g/ml) [36].

Rovněž byla vyvinuta nová série 4-aminochinolinů s postranními řetězci modifikovaných amidovou vazbou a její redukovanou formou, jejíž antimalarická aktivita byla hodnocena na kmenech *P. falciparum* citlivých na chlorochin (3D7) i rezistentních na chlorochin (K1). Přestože je chlorochin stále důležitým antimalarikem, během let se v endemických oblastech objevily kmeny *P. falciparum* k tomuto léčivu rezistentní. Je tedy nutné vyvinout či modifikovat chemoterapeutika, aby se předešlo rezistenci [30, 37].



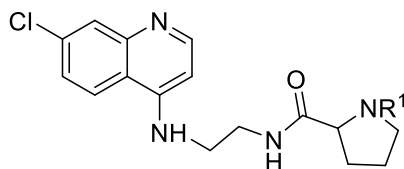
Obrázek 27 Deriváty **20** [30]

**20a**  $R^1 = CH(CH_3)_2$   
**20b**  $R^1 = CH(CH_3)CH_2(CH_3)$



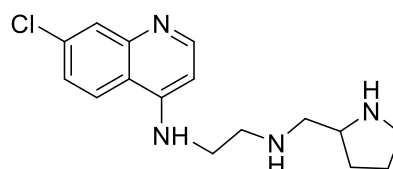
Obrázek 28 Derivát **21** [30]

$R^1 = CH_2CH(CH_3)_2$



Obrázek 29 Deriváty **22** [30]

**22a**  $R^1 = Me$   
**22b**  $R^1 = H$



Obrázek 30 Derivát **23** [30]

Za účelem zlepšení lipofility a antimalarické aktivity byly navrženy nové deriváty na bázi chlorochinu. Vzhledem k tomu, že amidová vazba je v biologickém prostředí nestabilní, existovala hypotéza, že její redukcí dojde ke zvýšení lipofility a mohla by tedy zvýšit jejich aktivitu *in vivo*. Zatím však nebyla antimalarická aktivita derivátů **20-23** *in vivo* hodnocena [30, 37].

Deriváty s atomem dusíku v postranním řetězci chlorochinové kostry vykazovaly *in vitro* výraznou antimalarickou aktivitu. Nejslibnější testované sloučeniny **20a** a **20b** významně inhibovaly růst kmene K1 *P. falciparum* a také sloučeniny **21**, **22b** a **23** vykazovaly vyšší aktivitu proti tomuto kmeni ve srovnání s chlorochinem. Zavedení methylové skupiny do postranního řetězce (např. **22a**) zřejmě vede ke zvýšené aktivitě proti kmeni 3D7, navíc tento derivát vykazoval lepší aktivitu i proti *P. falciparum* K1 než chlorochin [30, 37].

Nové deriváty pak prokázaly nižší cytotoxicitu během inkubace ve VERO buňkách a vyšší index selektivity. Rovněž bylo prokázáno, že všechny deriváty vytvářejí pevný komplex s hematinem a *in vitro* inhibují tvorbu  $\beta$ -hematinu. Tyto výsledky ukazují na to, že tyto deriváty by mohly být slibné pro optimalizaci s cílem získat nové látky účinné proti rezistentním kmenům *P. falciparum* [30, 37].

## 4.2. Léčiva proti bakteriálním onemocněním

Výzkum nových antibakteriálních látek byl především podnícen zvyšujícím se výskytem infekcí v důsledku bakteriální rezistence na dostupná antibiotika a šířením multirezistentních kmenů [30].

Mezi problematické druhy patří MRSA, jehož výskyt je v léčbě infekcí vyvolaných stafylokoky důležitým omezujícím faktorem. V České republice se výskyt MRSA v letech 2014 – 2017 pohyboval mezi 13 – 14%. Výskyt MRSA sice v různých oblastech kolísá, jeho přítomnost však komplikuje léčbu, která pak často vyžaduje použití glykopeptidových antibiotik (např. vankomycin). Ta mohou následně přispět k šíření VRE. Enterokoky jsou významnými původci infekcí v komunitách, ale i nozokomiálních infekcí. V roce 2018 byl výskyt VRE 20,7 % (o 7 % vyšší než v roce 2017). Problém představují i enterobakterie schopné produkce širokospektrých beta-laktamáz, jelikož k léčbě infekcí vyvolaných enterobakteriemi se často používají právě beta-laktamová antibiotika. Ta bývají nahrazována karbapenemy, což je doprovázeno šířením rezistence i k této skupině antibiotik. V České republice patří *P. aeruginosa* společně s *K. pneumoniae* k nejčastějším původcům nozokomiálních infekcí. Vážným problémem je pak vznik rezistence *P. aeruginosa* k beta-

laktamovým antibiotikům včetně karbapenemů a *K. pneumoniae* k cefalosporinům II-IV. generace. V roce 2013 přesáhl výskyt *K. pneumoniae* rezistentní k cefalosporinům III. generace 50% [38, 39, 40].

#### 4.2.1. Grampozitivní a gramnegativní bakterie

Antimikrobní látky prostupující i do nitra buňky mohou hrát potenciálně důležitou roli v eliminaci infekcí způsobenými intracelulárními patogeny. Mnoho tříd antibiotik bohužel plazmatickou membránou účinně neproniká [30, 41].

Ibrahimi a kol. [30, 41] syntetizovali aminokyselinové konjugáty fluorochinolonů – ciprofloxacinu (CPX), norfloxacinu a dalších. Následně vyšetřovali jejich aktivitu proti kmenům *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *Bacillus subtilis*. Zvolená antibiotika jsou považována za širokospektrá s účinkem proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Mají ovšem i jistá omezení, např. mohou způsobit nežádoucí účinky mj. v centrální nervové soustavě, gastrointestinálním traktu či na kůži.

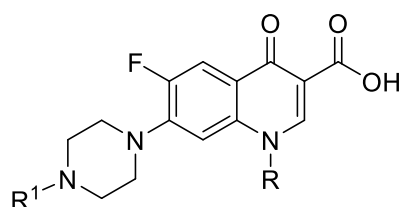
Několik těchto syntetizovaných léčiv mělo v porovnání s původní látkou vyšší inhibiční aktivitu. Pravděpodobně může konjugát zvýšit koncentraci sloučeniny v buňce či předcházet inaktivaci léčiva, dále je v porovnání s původním léčivem lipofilita konjugátů vyšší, což usnadňuje nespécifickou permeaci skrze biologické bariéry [30, 41].

Ciprofloxacin (*Obrázek 31*) a jeho konjugáty **24a-c** byly testovány na inhibici růstu zmíněných kmenů. Při nižších koncentracích bylo prokázáno, že je CPX vysoce aktivní a může být považován za mnohem účinnější antibiotikum než ostatní testované látky. Navzdory dobrým aktivitám byl však u této skupiny konjugátů mezi kmeny proměnlivý výsledek, **24a** a **24b** inhiboval při MIC 0,4 µg/ml růst *B. subtilis* z více než 90 % (94,19 % a 91,86 %), ciprofloxacin inhiboval při stejné koncentraci růst z 94,32 %. Konjugát **24a** inhiboval při MIC 4 µg/ml růst *S. aureus* pouze z 56,26 %, zatímco CPX inhiboval při stejné koncentraci růst z 63,93 %. Derivát alaninu **24b** byl zcela inaktivní [30, 41].

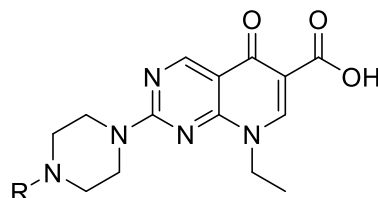
Norfloxacin (*Obrázek 31*) vykazoval inhibici růstu všech kmenů, účinnost jeho konjugátů však byla variabilní. Při koncentraci 60 µg/ml konjugáty **25a-d** inhibovaly *S. aureus* efektivněji než původní látka, zatímco v případě *P. aeruginosa* vykazoval aktivitu pouze konjugát **25a** [30, 41].

Deriváty **25** kyseliny pipemidové (*Obrázek 31*) byly aktivní pouze proti grampozitivním bakteriím. *B. subtilis* vykazoval vysokou senzitivitu vůči všem konjugátům při koncentraci

40 µg/ml. Proléčiva **26a** a **26e** vykazovala v porovnání s původním antibiotikem vyšší inhibici růstu. Při vysoké koncentraci 200 µg/ml byl *S. aureus* nejcitlivější ke konjugátům **26c** a **26d** [30, 41].

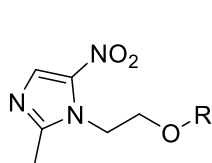


Obrázek 31 Deriváty **24** a **25** [30]  
 Ciprofloxacin  $R = (CH_2)_3$ ,  $R^1 = H$   
**24a**  $R = (CH_2)_3$ ,  $R^1 = Gly-Cbz$   
**24b**  $R = (CH_2)_3$ ,  $R^1 = L-Ala-Cbz$   
**24c**  $R = (CH_2)_3$ ,  $R^1 = L-Lys-Cbz$   
 Norfloxacin  $R = CH_2CH_3$ ,  $R^1 = H$   
**25a**  $R = CH_2CH_3$ ,  $R^1 = Gly-Cbz$   
**25b**  $R = CH_2CH_3$ ,  $R^1 = L-Ala-Cbz$   
**25c**  $R = CH_2CH_3$ ,  $R^1 = DL-Ala-Cbz$   
**25d**  $R = CH_2CH_3$ ,  $R^1 = L-Phe-Cbz$   
 Cbz = benzyloxykarbonyl

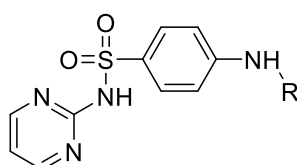


Obrázek 32 Deriváty **26** [30]  
**26a**  $R = Gly-Cbz$   
**26b**  $R = L-Ala-Cbz$   
**26c**  $R = L-Val-Cbz$   
**26d**  $R = L-Phe-Cbz$   
**26e**  $R = L-Lys-Cbz$

Nitroimidazolový derivát metronidazol (Obrázek 33), sulfonamid sulfadiazin (Obrázek 34) a jejich konjugáty **27** a **28** neinhibovaly v této studii růst žádného z kmenů. Vzhledem k výsledkům fluorochinolonových derivátů autoři konstatovali, že inkorporace aminokyselin do antibiotik může poskytnout alternativní možnosti léčby v případě rezistentních kmenů, a to s výhodou zvýšení absorpce a/nebo zmírnění či eliminace nežádoucích vedlejších účinků, ačkoli tyto parametry v této práci nestudovali [30, 41].



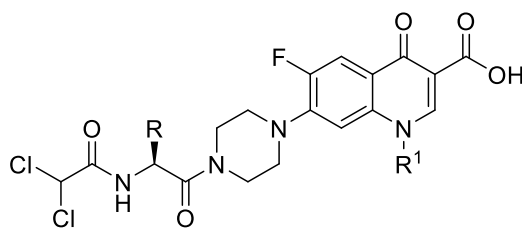
Obrázek 33 deriváty **27** [30]  
 Metronidazol  $R = H$   
**27a**  $R = Gly-Cbz$   
**27b**  $R = L-Ala-Cbz$



Obrázek 34 Deriváty **28** [30]  
 Sulfadiazin  $R = H$   
**28a**  $R = Gly-Cbz$   
**28b**  $R = L-Ala-Cbz$

Na syntézu fluorochinolonových konjugátů se zaměřili i Seliem a kol. [42] a připravili hybridy s aminokyselinami (Gly, Ala, Ile, Val, Phe) chráněnými na dusíku dichloracetylem odvozeným ze struktury chloramfenikolu – deriváty **29a-g** a **30a-f** (Obrázek 35). Pro testování antimikrobní aktivity těchto látek byly vybrány kmeny *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* a *Enterococcus faecalis*.





Obrázek 35 Deriváty **29** a **30** [42]

**29**  $R^1$  = cyklopropyl

**29a**  $R$  = Gly-Cip

**29b**  $R$  = L-Ala-Cip

**29c**  $R$  = DL-Ala-Cip

**29d**  $R$  = D-Ala-Cip

**30**  $R^1$  =  $CH_2CH_3$

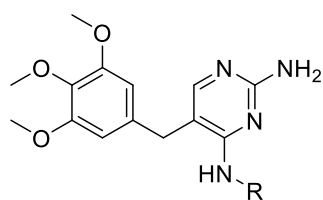
Konjugáty **29c** a **29d** ukázaly v porovnání s původním léčivem (ciprofloxacin MIC 0,125  $\mu\text{g/ml}$  pro *E. coli*, 4  $\mu\text{g/ml}$  pro *S. aureus* a 8  $\mu\text{g/ml}$  pro *E. faecalis*) vyšší antimikrobiální aktivitu proti třem z testovaných kmenů (**29c** *E. coli* MIC 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus* MIC 0,1  $\mu\text{g/ml}$  a *E. faecalis* 0,6  $\mu\text{g/ml}$ , **29d** *E. coli* MIC 0,082  $\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus* MIC 0,167  $\mu\text{g/ml}$  a *E. faecalis* 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Z testování bylo zjištěno, že konjugáty s D-aminokyselinami měly vyšší antimikrobiální vlastnosti než ty s L-aminokyselinami, a také, že konjugáty obsahující Phe byly ve srovnání s ostatními méně účinné. Byly provedeny i studie inhibice enzymatické aktivity DNA gyrázy, cílové molekuly fluorochinolonů, které zjištěné údaje podporují, ale zároveň se zdá, že na antibakteriální aktivitě konjugátů se podílí více mechanismů [42].

Ullah a kol. [43] zvolili pro tvorbu konjugátů diaminopyrimidin trimethoprim (Obrázek 36), metronidazol a antituberkulotikum isoniazid (Obrázek 37). Pro modifikaci pak byly vzhledem k jejich strukturní diverzitě vybrány lipofilní aminokyseliny Val, tryptofan (Trp) a Phe. Cílem jejich studie bylo připravit látky schopné snadněji proniknout na místo působení a interagovat s cílovými molekulami uvnitř bakterií. Kromě přímého spojení aminokyseliny a léčiva bylo využito ještě napojení přes triazinové jádro.

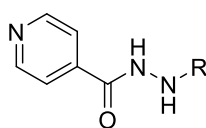
Výsledných 21 sloučenin (**31-37**, **a-c**) bylo následně podrobena *in vitro* testování antibakteriální aktivity (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhi* a *P. aeruginosa*), hodnocení vztahu mezi lipofilitou a aktivitou a konečně inhibiční aktivity vůči ureáze [43].

Výsledky testů u přímých konjugátů trimethoprimu **31a-c**, **34a-c** a **37a-c** ukázaly, že antibakteriální aktivita derivátů **31** s přímým napojením aminokyseliny střední až špatná (MIC 82-243,8  $\mu\text{M}$  pro *S. aureus*, 68,3-243,8  $\mu\text{M}$  pro *B. subtilis*, 67,1-164,4  $\mu\text{M}$  pro *E. coli*, 55,8-218,9  $\mu\text{M}$  pro *S. typhi* a 67,1-136,9  $\mu\text{M}$  pro *P. aeruginosa*), podobné výsledky vykázaly i triazinové deriváty **34** (MIC 165,7-303,2  $\mu\text{M}$  pro *S. aureus*, 124,4-227,5  $\mu\text{M}$  pro *B. subtilis*,

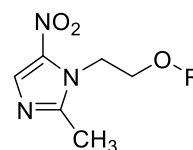
47,3-62,2  $\mu\text{M}$  pro *E. coli*, 53,2-82,8  $\mu\text{M}$  pro *S. typhi* a 28,4-53,2  $\mu\text{M}$  pro *P. aeruginosa*). Určitá aktivita proti grampozitivním bakteriím byla prokázána u **31a** (MIC pro *S. aureus* 82  $\mu\text{M}$  a pro *B. subtilis* 68.3  $\mu\text{M}$ ). Konjugací trimethoprimu s Phe a Trp došlo k zvýšení účinnosti proti gramnegativním bakteriím, ale snížila se aktivita proti grampozitivním. Triazinové deriváty **34a-c** prokázaly dominantní aktivitu proti gramnegativním kmenům. Výsledky ukázaly, že sloučeniny dobře pronikají do buňky. Vyšší aktivitu pak prokázala sloučenina **37b**, a to nejen vůči gramnegativním, ale i grampozitivním bakteriím (MIC 3,4  $\mu\text{M}$  pro *S. aureus*, 6,8  $\mu\text{M}$  pro *B. subtilis*, 1,1  $\mu\text{M}$  pro *E. coli*, 2,3  $\mu\text{M}$  pro *S. typhi* a 1,4  $\mu\text{M}$  pro *P. aeruginosa*) [43].



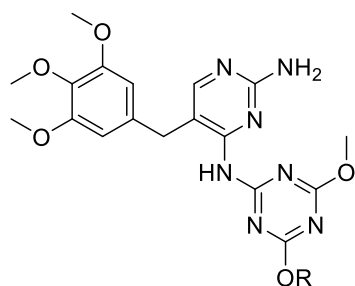
Obrázek 36 Deriváty 31 [43]  
Trimethoprim  $R = H$   
**31a**  $R = \text{Val}$   
**31b**  $R = \text{Trp}$   
**31c**  $R = \text{Phe}$



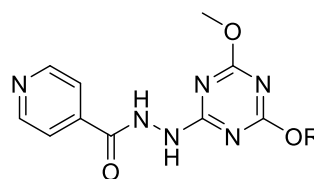
Obrázek 37 Deriváty 32 [43]  
Isoniazid  $R = H$   
**32a**  $R = \text{Val}$   
**32b**  $R = \text{Trp}$   
**32c**  $R = \text{Phe}$



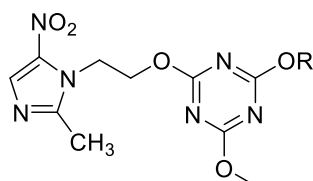
Obrázek 38 Deriváty 33 [43]  
**33a**  $R = \text{Val}$   
**33b**  $R = \text{Trp}$   
**33c**  $R = \text{Phe}$



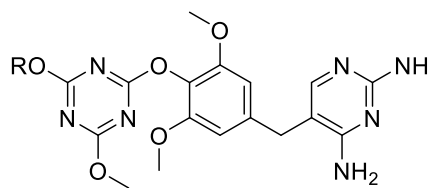
Obrázek 39 Deriváty 34 [43]  
**34a**  $R = \text{Val}$   
**34b**  $R = \text{Trp}$   
**34c**  $R = \text{Phe}$



Obrázek 40 Deriváty 35 [43]  
**35a**  $R = \text{Val}$   
**35b**  $R = \text{Trp}$   
**35c**  $R = \text{Phe}$



Obrázek 41 Deriváty 36 [43]  
**36a**  $R = \text{Val}$   
**36b**  $R = \text{Trp}$   
**36c**  $R = \text{Phe}$



Obrázek 42 Deriváty 37 [43]  
**37a**  $R = \text{Val}$   
**37b**  $R = \text{Trp}$   
**37c**  $R = \text{Phe}$

U derivátů isoniazidu **32a-c** nebyla u žádné sloučeniny s výjimkou **32b** identifikována účinnost, to bylo pravděpodobně způsobeno neprostupností skrz buněčnou stěnu nebo neúčinností isoniazidu samotného proti uvedeným kmenům, spojením prostřednictvím triazinové kostry (**35a-c**) však vedlo ke zlepšení aktivity [43].

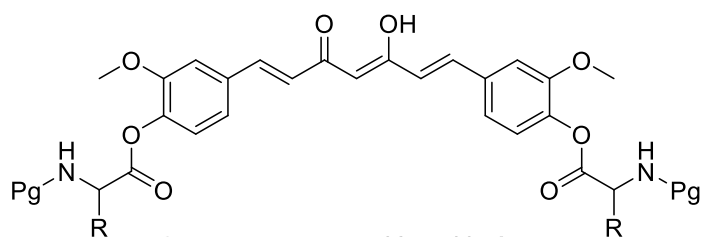
V případě derivátů metronidazolu **33a-c** byly výsledky variabilní a i zde se ukázalo přidání triazinové kostry jako prospěšné a účinnost látek se zvýšila. Sloučeniny **36a-c** pak vykazovaly slabý až vynikající inhibiční potenciál. **36b** a **36c** měly nízkou MIC jak proti grampozitivním, tak gramnegativním testovaným kmenům (MIC **36b** 16,5  $\mu\text{M}$  pro *S. aureus*, 13  $\mu\text{M}$  pro *B. subtilis*, 2  $\mu\text{M}$  pro *E. coli*, 6,8  $\mu\text{M}$  pro *S. typhi* a 4  $\mu\text{M}$  pro *P. aeruginosa*) [43].

Ze studia vztahu lipofility a aktivity lze říci, že antibakteriální aktivita se zvyšuje se zvýšením hydrofobicity. Sloučeniny **37a-c** vykazovaly vysokou inhibici u obou testovaných grampozitivních kmenů (*S. aureus*, *B. subtilis*). Naopak isoniazidové deriváty **32a-c** měly nejnižší hodnoty  $\log P$ , jsou silně hydrofilní. Tato hydrofilita je pravděpodobně důvodem jejich neúčinnosti v důsledku nedostatečného průniku do buněk [43].

Konjugáty byly také testovány na inhibici ureázy, kterou produkují některé bakterie, např. *Helicobacter pylori*, které umožňuje přežít v kyselém prostředí žaludku. Jednotlivé deriváty vykazovaly různý stupeň inhibice, avšak nejúčinnější byla sloučenina **37a** ( $\text{IC}_{50}$  6,23  $\mu\text{M}$ ), celkově vykazovaly deriváty trimethoprimu **37a-c** výbornou inhibici ureázy,  $\text{IC}_{50}$  se pohybovala mezi 6,23 a 11,51  $\mu\text{M}$  [43].

Sloučeniny **35a-c** a **36b** prokázaly dobrou aktivitu proti všem testovaným kmenům. Ze všech zjištění pak vyplývá, že tyto sloučeniny jsou dobrým výchozím bodem pro vývoj nových antibakteriálních látek [43].

Panda a kol. [44] se zaměřili na přípravu derivátů kurkuminu. Kurkumin je látka rostlinného původu a sama o sobě vykazuje mnoho biologických vlastností včetně protizánětlivých. Už dříve byly u sloučenin obsahující ve své struktuře kurkumin hlášeny antioxidační, antimikrobní a protinádorové vlastnosti. Kurkumin má však i řadu nevýhod, které omezují jeho použití: nízká rozpustnost ve vodě, stabilita i biologická dostupnost. Za účelem zlepšení těchto vlastností a zvýšení specifčnosti cíle autoři syntetizovali sérii kurkuminových bis-konjugátů **38a-q**, **39a-k** a **40a-k** (Obrázky 43, 44; sloučeniny se stejnými substituenty se liší stereochemií aminokyselin).



Obrázek 43 Deriváty **38a-q** **39a-k** [44]

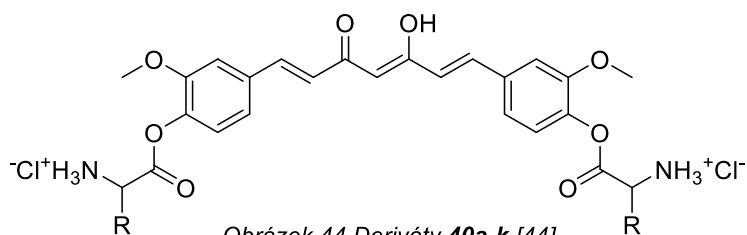
**38c a 38d** R = CH<sub>3</sub>, Pg = Cbz

**38g a 38h** R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, Pg = Cbz

**38l** R = H, Pg = Fmoc

**38p** R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, Pg = Fmoc

**39h a 39i** R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, Pg = Boc



Obrázek 44 Deriváty **40a-k** [44]

**40a** R = H

**40c** R = CH<sub>3</sub>

**40h a 40i** R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>

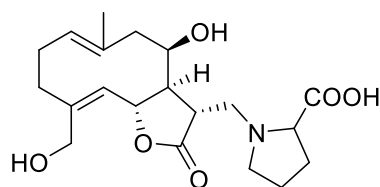
Vzniklé konjugáty pak byly testovány na jejich antimikrobiální vlastnosti, ale i protizánětlivé a analgetické účinky. Mimo to autoři sledovali vliv různých použitých aminokyselin a ochranných skupin na biologické vlastnosti konjugátů. Jako chránící skupiny byly použity benzyloxykarbonyl (Cbz-), fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc-) a *tert*-butyloxycarbonyl (Boc-). Slibné protizánětlivé účinky prokázaly látky **38c**, **38d**, **38g**, **38h**, **38p**, **39h**, **39i**, **40a**, **40c**, **40e**, **40h** a **40i**, rovněž bylo u sloučenin **38d**, **38g** a **38h** zaznamenáno, že vykazují protizánětlivé účinky trvající 24 hodin, což směřuje pozornost vedle akutní i na chronickou bolest. U těchto nejúčinnějších látek pak byla testována ulcerogenní aktivita, která byla u sloučenin **38c**, **38h**, **38l**, **38p**, **39h**, **39i**, **40a**, **40c**, **40e**, **40h** a **40i** nulová, což ukazuje na jejich bezpečnost při perorálním podání. Stejně výsledky byly i při testech toxicity těchto konjugátů [44].

Z testování analgetických vlastností vyplynulo, že některé z nejslibnějších protizánětlivých konjugátů jsou vysoce účinné jako periferní analgetika (**38c**, **38p**, **39h**, **40a** a **40c**) a ostatní (**38h**, **38l**, **39h**, **39i**, **40c** a **40h**) jako centrální analgetika. Konjugace kurkuminu s aminokyselinami tedy může zvýšit centrální nebo periferní analgetické vlastnosti [44].

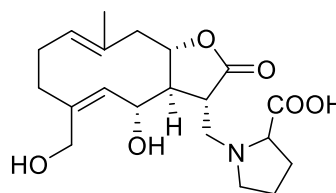
Antimikrobiální aktivita konjugátů byla testována na grampozitivních (*S. aureus* a *Streptococcus pyogenes*) a gramnegativních (*Salmonella typhi* a *P. aeruginosa*) kmenech a na kvasince *Candida albicans*. Kurkumin a všechny syntetizované konjugáty odhalily slibné

antibakteriální vlastnosti jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím. Kurkumin má sám o sobě vysokou aktivitu proti bakteriím (MIC 0,339  $\mu\text{g/mL}$ ), avšak některé konjugáty odhalily asi dvojnásobný účinek (MIC **38a, e, f, g-j, 39g, k** 0,124-0,166  $\mu\text{g/ml}$  proti *S. aureus*, **38a-d, f-i, k, p, q, 39i, j** 0,113-0,166  $\mu\text{g/ml}$  proti *S. pyogenes*, **38e, g, i, j, 39k** 0,124-0,145  $\mu\text{g/ml}$  proti *S. typhi* a **38f, g** 0,139-0,145  $\mu\text{g/ml}$  proti *P. aeruginosa*). Pro antimikrobní aktivitu se ukázalo vhodnější použít chránění raději než ponechání volného amino skupiny, konkrétně Cbz- skupinou. Z aminokyselin se nejvhodnější jeví Phe a methionin (Met). Zvýšení antimikrobních vlastností lze připsat přítomnosti lipofilnější chráněné aminokyseliny, která ovlivňuje s tím související fyzikálněchemické vlastnosti. To podporují i výpočetní studie ADME. Je však potřeba podrobnějšího zkoumání pro vyvinutí farmakokinetického profilu a lepší pochopení molekulárního mechanismu účinku [44].

Labeled a kol. [45] izolovali řadu sloučenin z nadzemních částí *Centaurea pungens* (*Asteraceae*), jmenovitě dva laktonové aminokyselinové konjugáty seskviterpenu: centaureolid A (**41**, *Obrázek 45*) a centaureolid B (**42**, *Obrázek 46*). Rod *Centaurea* (chrpa) je po světě široce rozšířený a je v mnoha zemích používán v lidové medicíně k léčbě rakoviny, mikrobiálních infekcí i jako stimulant, tonikum a antirevmatikum. Sloučeniny **41** a **42** dosud nebyly popsány a jsou charakteristické neobvyklým výskytem prolinových zbytků vázaných methylenovým můstkem.



Obrázek 45 Derivát **41** [45]

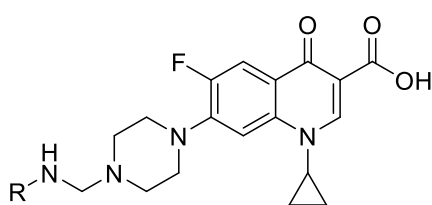


Obrázek 46 Derivát **42** [45]

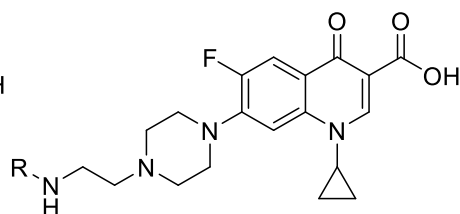
Byla hodnocena antimikrobiální aktivita u kmenů *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Listeria innocua*, *P. aeruginosa* a *Pseudomonas fragi*. Nejcitlivější byl proti oběma testovaným látkám kmen *P. aeruginosa* (s poměrně vysokou MIC 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Naopak *P. fragi* vykazovala větší rezistenci, slabou inhibiční aktivitu měla pouze sloučenina **41** (MIC 400  $\mu\text{g/ml}$ ), shodnou MIC měla sloučenina **41** u kmene *L. innocua*. Inhibiční aktivita proti dvěma kmenům *B. cereus* (DSM 4313 a DSM 4384) byla u obou sloučenin shodná (MIC 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Celkově byla antimikrobní účinnost těchto derivátů poměrně nízká [45].

Tahir a kol. [46] syntetizovali deriváty CPX s kyselinou *p*-aminobenzoovou (PABA) a gabapentinem s cílem vytvořit hybridy obsahující dvě různá léčiva za účelem zlepšení účinnosti či nového mechanismu účinku.

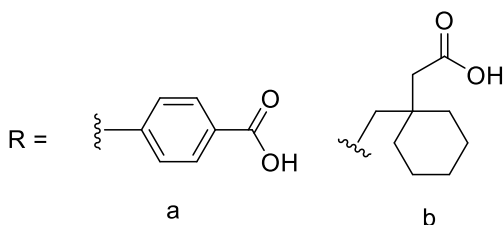
Syntetizované sloučeniny **43a, b** a **44a, b** (Obrázky 47, 48) byly *in vitro* testovány na antibakteriální aktivitu proti *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* a *S. aureus*, dále pak proti klinicky izolovaným rezistentním kmenům *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (MRSA) a *Streptococcus haemolyticus*. Sloučenina **44a** vykazovala vynikající inhibici růstu standardních kmenů (MIC **44a** 1 µg/ml pro gram pozitivní kmeny a *K. pneumoniae*, 0,5 µg/ml pro *E. coli* a *P. aeruginosa*, CPX 8 µg/ml pro všechny kmeny), z testování aktivity proti rezistentním kmenům vyšla jako slibná sloučenina **44a** (MIC **44a** 8 µg/ml pro MRSA a 0,5 µg/ml pro *E. coli*, *P. aeruginosa*, CPX 32 µg/ml pro MRSA a 4 µg/ml pro *S. haemolyticus*, *E. coli* a *P. aeruginosa*) [46].



Obrázek 47 Deriváty **43a,b** [46]



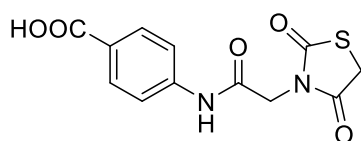
Obrázek 48 Deriváty **44a,b** [46]



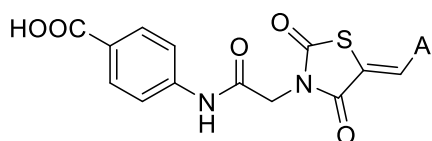
Marc a kol. [47] připravili deset nových derivátů thiazolidin-2,4-dionu konjugovaných s PABA, což je fyziologická, ale nekódovaná aminokyselina. Za účelem získání nových předloh, které by obsahovaly různé strukturální prvky, bylo analyzováno několik už dříve připravených látek s antimikrobní aktivitou. Společným prvkem zvažovaných sloučenin byla přítomnost jedné či dvou C=O skupin na thiazolidinovém jádře.

Syntetizované látky byly testovány na antimikrobní aktivitu u některých referenčních kmenů: *Salmonella enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* a houby *C. albicans*. Citlivost testovaných mikroorganismů byla k **45** a **46a-i** (Obrázky 49, 50) střední až dobrá (průměr inhibiční zóny pro *S. enteritidis* 12-15 mm, pro *L. monocytogenes* 6-16 mm, pro *E. coli* 10-14 mm, pro *S. aureus* 8-20 mm a pro *C. albicans* 14-24 mm). Proti *E. coli* byly nejúčinnější

**46f** a **46g** (inhibiční zóna 14 mm), nejvyšší aktivitu proti *S. aureus* měly **46d** a **46h** (inhibiční zóna 20 mm), proti *C. albicans* byly neúčinnější **46a**, **46b**, **46e-h** (16-18 mm). Všechny sloučeniny měly nízkou účinnost proti *S. enteritidis* a *Listeria monocytogenes* a také byly méně aktivní než referenční léčiva amoxicilin/kyselina klavulanová 5:1 (inhibiční zóny pro *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 26 mm a pro *E. coli* 20 mm) a flukonazol (inhibiční zóna pro *C. albicans* 24 mm). Obecně pak substituce aromatickým zbytkem v pozici 5 thiazolidin-2,4-dionového kruhu zvyšuje antimikrobiální aktivitu, což bylo potvrzeno skutečností, že sloučeniny **46a-i** měly tendenci být aktivnější než sloučenina **45** [47].



Obrázek 49 Derivát **45** [47]



Obrázek 50 Deriváty **46** [47]

- |   |   |
|---|---|
| <b>46a</b> Ar = 4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                | <b>46f</b> Ar = 3-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - |
| <b>46b</b> Ar = 3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                | <b>46g</b> Ar = 2-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - |
| <b>46c</b> Ar = 2,6-diCl-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -            | <b>46h</b> Ar = 3-Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -                |
| <b>46d</b> Ar = 4-NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -  | <b>46i</b> Ar = 3-Py-   |
| <b>46e</b> Ar = 4-OCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> - |   |

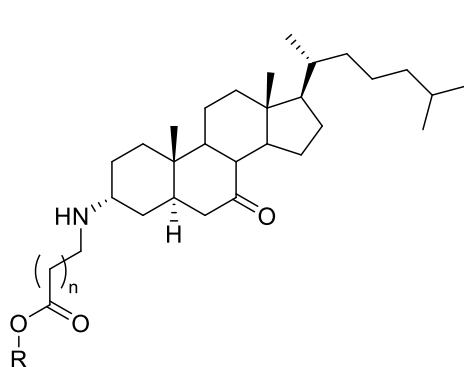
Z molekulárního dokování vyplynuly důležité interakce, ke kterým dochází s katalytickým místem dihydropteroátsyntázy, stejně tak význam flexibilního atomu uhlíku ve středu molekuly. Ze studia ADME se zdá, že všechny sloučeniny mají dobrý farmakokinetický profil, což by z nich dělalo vynikající kandidáty pro další vývoj [47].

Díky své rigiditě a potenciálu pro různou úroveň funkcionalizace, širokému profilu biologické aktivity a schopnosti pronikat buněčnou membránou se staly steroidy vhodnými kandidáty pro syntézu konjugátů. Pro biologickou antimikrobní aktivitu steroidu je nutná objemná a rigidní hydrofobní jednotka napojená na flexibilní hydrofilní řetězec. Zavedení aminokyseliny nebo peptidu do struktury základního steroidu nabízí kombinaci hydrofilní funkční části a hydrofobního nosiče ve stejné molekule, a proto představuje důležitou třídu molekul pro navrhování a vývoj léčiv. Jadhav a kol. [48] syntetizovali řadu *N*-cholesterylaminokyselinových konjugátů, konkrétněji *N*-[3a-cholesteryl]aminokyseliny a *N*-[3a,7a-cholesteryl]-bis(aminokyseliny).

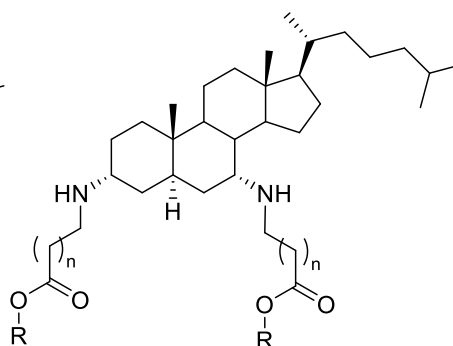
Jedenáct konjugátů bylo *in vitro* testováno na antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus lichemiformis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* a *K.*

*aerogenes*. Vynikající aktivitu vykazovaly konjugáty s výjimkou konjugátu **51** proti většině grampozitivních kmenů [48].

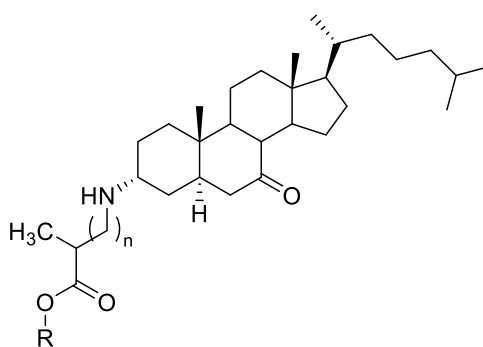
Byly hledány vztahy mezi strukturou a aktivitou těchto sloučenin. Ukázalo se, že optimální délka postranního řetězce ovlivňuje antimikrobiální aktivitu. Sloučeniny **47**, **48**, **49** a **50** spojené dvěma a třemi methyleny mezi aminovou a karboxylovou skupinou vykazovaly zlepšenou účinnost (MIC **47** 2-8 µg/ml, **48** 2-16 µg/ml, **49** 2-4 µg/ml a **50** 2-4 µg/ml), naopak sloučeniny **51** a **52** s rozvětveným spojovacím řetězcem vykazovaly nižší aktivitu (MIC **51** pro všechny testované kmeny více než 32 µg/ml a **52** 8 µg/ml proti *B. subtilis*, pro ostatní kmeny 16 µg/ml a více). Konjugát obsahující kyselinu gama-aminomáselnou na pozicích 3 a 7 cholestanu byl nejúčinnější u testovaných grampozitivních bakterií (MIC 2 µg/ml) [48].



Obrázek 51 Deriváty **47** a **48** [48]  
**47** n = 1, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
**48** n = 2, R = CH<sub>3</sub>



Obrázek 52 Deriváty **49** a **50** [48]  
**49** n = 1, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
**50** n = 2, R = CH<sub>3</sub>



Obrázek 53 Deriváty **51** a **52** [48]  
**51** n = 0, R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
**52** n = 1, R = CH<sub>3</sub>

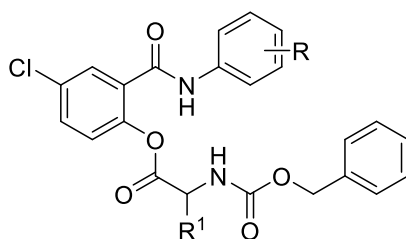
#### 4.2.2. Tuberkulóza a mykobakteriální infekce

Vývoj tuberkulózy rezistentní vůči léčivům po celém světě je alarmující. Odhaduje se, že je v současné době asi čtvrtina světové populace nakažená *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*) a každý rok přibude dalších 8-9 milionů nových případů aktivní tuberkulózy. V roce 2019 se u téměř půl milionu lidí vyvinula rifampicin-rezistentní tuberkulóza, z čehož bylo



téměř 80 % multirezistentní (MDR-TB), tedy rezistentní alespoň k isoniazidu a rifampicinu, a odhadováno bylo asi 1,4 milionů úmrtí. Závažnou výzvou je mimo to i koinfekce HIV a MDR-TB, je proto naléhavě nutné vyvinout nové léky či proléčiva s novým mechanismem účinku [30, 49].

Byla syntetizována řada nových salicylanilidivých esterů *N*-Cbz-chráněných aminokyselin **53a-j** (Obrázek 54). Sloučeniny byly následně testovány na antifungální aktivitu proti osmi kmenům a aktivitu proti *M. tuberculosis* [50].



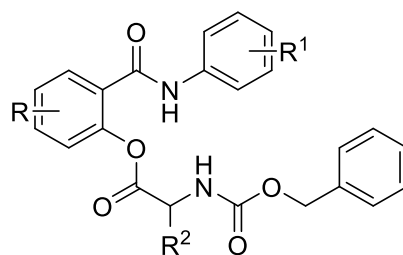
Obrázek 54 Deriváty **53** [50]

<b>53a</b> $R = 3\text{-Cl}, R^1 = H$	<b>53f</b> $R = 4\text{-Cl}, R^1 = (R)\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$
<b>53b</b> $R = 3\text{-Cl}, R^1 = (S)\text{-CH}_3$	<b>53g</b> $R = 4\text{-Cl}, R^1 = (S)\text{-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
<b>53c</b> $R = 3\text{-Cl}, R^1 = (R)\text{-CH}_3$	<b>53h</b> $R = 4\text{-CF}_3, R^1 = H$
<b>53d</b> $R = 4\text{-Cl}, R^1 = H$	<b>53i</b> $R = 4\text{-CF}_3, R^1 = (S)\text{-CH}_3$
<b>53e</b> $R = 4\text{-Cl}, R^1 = (S)\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	<b>53j</b> $R = 3,4\text{-Cl}, R^1 = H$

Všechny sloučeniny vykazovaly nejvyšší aktivitu proti plísni *Trichophyton mentagrophytes* (MIC **53a,j** 31,25  $\mu\text{M}$ , **53b,c,g** 7,81  $\mu\text{M}$ , **53d,e,f,h** 15,63  $\mu\text{M}$ , **53i** 1,95  $\mu\text{M}$ , flukonazol 1,95  $\mu\text{M}$ ), U kmenů *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* měla většina sloučenin vyšší aktivitu než flukonazol (IC<sub>50</sub> flukonazol >125  $\mu\text{M}$  pro oba patogeny) [50].

Antimykobakteriální aktivita byla nejvyšší u sloučenin **53b**, **53h** a **53i** (MIC **53b** 3,13  $\mu\text{g/ml}$ , **53h** 6,25  $\mu\text{g/ml}$  a **53i** 3,13  $\mu\text{g/ml}$ ; stupeň inhibice 89-99%). U obou aktivit se ze závislosti aktivity na lipofilitě ukázalo, že se jedná až o sekundární parametr. Velmi důležitý je typ a pozice substituce. Nejvhodnější se ukázala substituce CF<sub>3</sub> na pozici C4 anilinu [50].

Během hledání nových antituberkuloticky aktivních salicylanilidů byla připravena série 30 *N*-chráněných esterů aminokyselin **54a-dd** (Obrázek 55). Připravené deriváty byly testovány na antimykobakteriální aktivitu proti kmenům *M. tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii* (235/80 a klinický izolát 6509/96) [51].



Obrázek 55 Deriváty **54a-dd** [51]

$R = 4\text{-Cl}, 5\text{-Cl}$

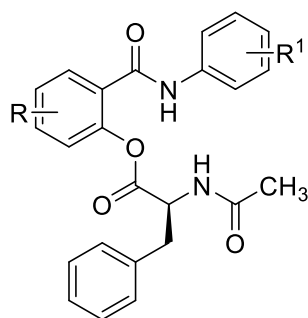
$R^1 = 3\text{-Cl}, 4\text{-Cl}, 4,3\text{-diCl}, 4\text{-Br}$

$R^2 = \text{H}, \text{Me}, i\text{-Pro}, \text{-CH}_2\text{-Ph}$

Všechny sloučeniny vykazovaly aktivitu srovnatelnou u nejučinnějších esterů s isoniazidem vůči *M. tuberculosis* a lepší u netuberkulózních kmenů (MIC **54** 1-16  $\mu\text{M}$  pro *M. tuberculosis*, 8-32  $\mu\text{M}$  pro *M. avium*, 4-32  $\mu\text{M}$  pro *M. kansasii* 235/80 a 8-32  $\mu\text{M}$  pro *M. kansasii* 6509/96; INH 0,5  $\mu\text{M}$  pro *M. tuberculosis*, >250  $\mu\text{M}$  pro *M. avium* a *M. kansasii* 235/80 a 8  $\mu\text{M}$  pro *M. kansasii* 6509/96), který byl použit jako standard. Sloučeniny **54r** a **54m, o, q, s-x** ( $R = 4\text{-Cl}$ ;  $R^1 = \mathbf{54r,s-x}$  4,3-diCl, **54m,o,q** 4-Br;  $R^2 = \mathbf{54r}$  H, **54m** (*R*)-CH<sub>3</sub>, **54o** (*R*)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **54q** (*R*)-CH<sub>2</sub>-phenyl, **54s** (*S*)-CH<sub>3</sub>, **54t** (*R*)-CH<sub>3</sub>, **54u** (*S*)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **54v** (*R*)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **54w** (*S*)-CH<sub>2</sub>-phenyl, **54x** (*R*)-CH<sub>2</sub>-phenyl) (MIC **54r** 1  $\mu\text{M}$  **54m, o, q, s-x** 2  $\mu\text{M}$ ) měly nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis*, což ukazuje důležitost substitucí  $R = 4\text{-Cl}$ ,  $R^1 = 3,4\text{-Cl}$  nebo 4-Br pro vysokou aktivitu proti tuberkulóze. Proti *M. avium* byly neaktivnější sloučeniny **54n, q, bb, cc** a **54dd** ( $R = \mathbf{54n}$  4-Cl, **54bb,cc,dd** 5-Cl;  $R^1 = \mathbf{54m}$  4-Br, **54bb,cc,dd** 4-Cl; **54n** (*S*)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **54bb** (*R*)-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **54cc** (*S*)-CH<sub>2</sub>-phenyl, **54dd** (*R*)-CH<sub>2</sub>-phenyl) (jednotná MIC 8  $\mu\text{M}$ ) [51].

Látky byly rovněž testovány na cytotoxicitu, použita byla linie lidských střevních buněk HCT-8. Všechny měřené sloučeniny prokázaly v porovnání s isoniazidem střední toxicitu. Index selektivity je u všech vybraných nejučinnějších sloučenin vyšší než 10, proto mohou být považovány za vhodné pro další screening. Studována byla i jejich stabilita. [51].

Na základě těchto výsledků byla syntetizována nová série esterů halogenovaných salicylanilidů a *N*-acetyl-L-fenylalaninu (**55**, Obrázek 56). Jejich antibakteriální aktivita pak byla hodnocena na *M. tuberculosis* včetně MDR-TB kmenů a atypických mykobakterií *M. avium* a *M. kansasii* [30, 52].



Obrázek 61 Deriváty **55** [30].

<b>55a</b> R = 4-Cl R <sup>1</sup> = 3-Cl	<b>55g</b> R = 4-Cl R <sup>1</sup> = 3,4-diCl
<b>55b</b> R = 5-Cl R <sup>1</sup> = 3-Cl	<b>55h</b> R = 5-Cl R <sup>1</sup> = 3,4-diCl
<b>55c</b> R = 4-Cl R <sup>1</sup> = 4-Cl	<b>55i</b> R = 4-Cl R <sup>1</sup> = 4-CF <sub>3</sub>
<b>55d</b> R = 5-Cl R <sup>1</sup> = 4-Cl	<b>55j</b> R = 5-Cl R <sup>1</sup> = 4-CF <sub>3</sub>
<b>55e</b> R = 4-Cl R <sup>1</sup> = 4-Br	<b>55k</b> R = 4-Br R <sup>1</sup> = 4-CF <sub>3</sub>
<b>55f</b> R = 5-Cl R <sup>1</sup> = 5-Br	

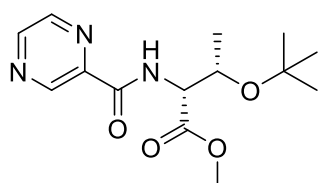
Nové estery vykazovaly vysokou antituberkulózní aktivitu (MIC od 0,25 µM). S výjimkou **55j** byly syntetizované sloučeniny aktivnější než původní salicylanilidy. Deriváty **55c** a **55d** vykazující podobné hodnoty MIC měly vyšší aktivitu na *M. tuberculosis* než salicylanilidy. Lipofilita má vliv na aktivitu, vztah ovšem není přímý. Obecně platí, že nejvyšší aktivitu proti mykobakteriím měly nejvíce lipofilní látky **55g**, **55i**, **55k** a částečně i **55e** [30, 52].

Výsledky na MDR-TB kmeny naznačují, že **55g**, **55k** a **55i** by mohly být slibnými kandidáty pro léčbu multirezistentní tuberkulózy. Při porovnávání **55k** a **55i** měly látky téměř stejnou účinnost, z hlediska toxicity se jevil ester **55k** vhodnou kandidátní molekulou pro další zkoumání jako potenciální antimykobakteriální látka [30, 52].

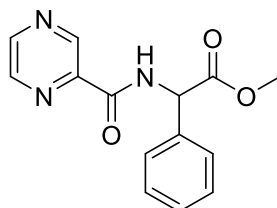
Estery byly dále testovány vůči bakteriím a houbám. Obecně platí, že pro zvýšení aktivity proti bakteriím se zdají nejvhodnější substituenty 4-CF<sub>3</sub> (např. **55i** a **55k**) a 4-Br (např. **55f**) na anilinovém jádře. Při porovnání substituentů na salicylovém kruhu jsou proti bakteriím aktivnější ty, které mají 5-Cl spíše než 4-Cl, s výjimkou **55i**. Tyto estery také vykazovaly aktivitu proti Gram-pozitivním patogenům včetně MRSA. S ohledem na výsledky by mohly být *N*-acetylphenylalaninové estery salicylanilidů novou vysoce aktivní skupinou se slibnou širokospektrální antibakteriální aktivitou [30, 52].

Juhás a kol. [53] připravili sloučeniny obsahující fragment pyrazinamidu (PZA), resp. jeho metabolit pyrazinovou kyselinu, ve spojení s methyl nebo ethylestery vybraných aminokyselin. Pyrazinamid je jedním z pilířů moderní léčby TBC. Největší výhodou je jeho *in vivo* účinnost při průniku do plicních granulomů, a tedy schopnost působit na dormantní mykobakterie, navíc v kyselém prostředí.

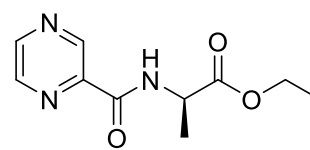
Třicet devět připravených derivátů bylo testováno na antimikrobiální aktivitu na kmenech *Mtb.* H<sub>37</sub>Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum*, bakteriím *S. aureus*, *P. aeruginosa* a houbám *C. albicans* a *Aspergillus flavus*. Nebyla zjištěna žádná aktivita proti mykotickým kmenům. U derivátu **56** byla zjištěna nízká aktivita proti *S. aureus*. Primárním cílem ale byla antimykobakteriální aktivita. Vysoká účinnost u některých sloučenin byla pozorována především proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Ra. Významná aktivita byla pozorována v mírně kyselém prostředí (pH 6), zatímco v běžně používaném pH 6,6 byly látky obecně neaktivní [53].



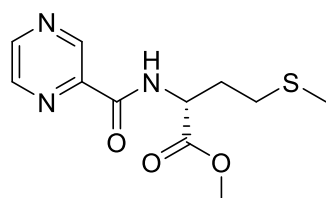
Obrázek 57 Derivát **56** [53]



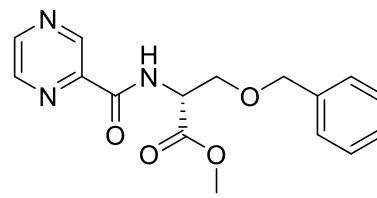
Obrázek 58 Derivát **57** [53]



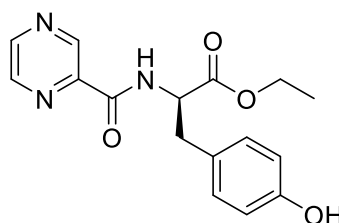
Obrázek 59 Derivát **58** [53]



Obrázek 60 Derivát **59** [53]



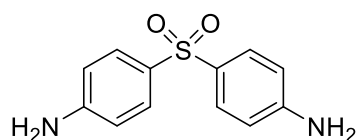
Obrázek 61 Derivát **60** [53]



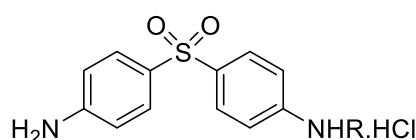
Obrázek 62 Derivát **61** [53]

Nejlepší aktivitu měla směs enantiomerů sloučeniny **57**, byla čtyřikrát aktivnější než PZA. Estery **58**, **59**, **60** a **61** byly ve srovnání s PZA až dvakrát aktivnější. Sloučeniny s volnou karboxylovou skupinou byly obecně neaktivní. Byl sledován vztah mezi aktivitou a strukturou, ze kterého vyplývá, že aktivita je úzce spojena s vyšší lipofilitou sloučenin a také se stereochemií (preferovány jsou fyziologické L-izomery). Aktivita derivátů obsahujících D-aminokyseliny byla ve srovnání s L-enantiomery výrazně nižší. Pro přesvědčivý popis vztahů mezi strukturou a aktivitou je však nutné syntetizovat více derivátů se zaměřením se na rozdíly mezi aktivitou různých enantiomerů [53].

Dapson (4,4'-sulfonyldianilin, *Obrázek 63*) má bakteriostatickou aktivitu vůči *Mycobacterium leprae*, jeho nevýhodou je však nízká rozpustnost ve vodě. Za účelem překonání tohoto omezení syntetizovali Pochopin a kol. [30, 54] nové aminokyselinové amidové deriváty dapsonu **62a-k** jako potenciální léčiva lepry.



*Obrázek 63 Dapson [30]*



*Obrázek 64 Deriváty 62 [30]*

<b>62a</b> R = L-Ala	<b>62g</b> R = D-Leu
<b>62b</b> R = L-Leu	<b>62h</b> R = D-Phe
<b>62c</b> R = L-Phe	<b>62i</b> R = DL-Ala
<b>62d</b> R = Gly	<b>62j</b> R = DL-Leu
<b>62e</b> R = L-Lys	<b>62k</b> R = DL-Phe
<b>62f</b> R = D-Ala	

Během studií chemické stability proléčiv bylo jediným sledovaným produktem rozkladu původní léčivo (při jakékoli hodnotě pH), což naznačuje, že kromě hydrolyzy amidové vazby neprobíhá degradace žádnou jinou cestou. Připojení aminokyselinových zbytků na dapson vedlo u jejich hydrochloridů ke zlepšení rozpustnosti ve vodě o 2-3 řády. Výjimkou jsou L-Phe-dapson **62c**, u něž k zlepšení rozpustnosti došlo v menším rozsahu, a L-Lys-dapson **62e**, který je naopak extrémně rozpustný. Jeho nejvyšší rozpustnost v nejširším rozsahu pH může být způsobena ionizovatelnou ε-amino skupinou, která je za fyziologického pH protonizovaná [30, 54].

Všechny deriváty **62a-e** byly substráty pro leucin aminopeptidázu. Odpovídající deriváty D-aminokyselin byly po dobu 8 hodin v přítomnosti této aminopeptidázy zcela stabilní, což je v souladu se specifíčností enzymu pro L-aminokyseliny. Výjimkou je glycin, který nemá chirální centrum [30, 54].

V lidské plazmě a lidské, potkaní a králičí krvi došlo k hydrolyze **62a-e** na dapson. Derivát **62e** po intravenózním podání byl v systémové cirkulaci rychle a kvantitativně hydrolyzován. Proto by mohl být derivát **62e** vhodným příkladem proléčiva pro modifikaci dalších špatně rozpustných aminů [30, 54].

## 5. Závěr

V teoretické části práce je rozebrána problematika bakteriální rezistence k antibiotikům. Jsou popsány mechanismy rezistence, způsoby vzniku a šíření rezistence mezi bakteriemi, vysvětleny jsou i pojmy týkající se této problematiky jako je např. multirezistence, zkřížená rezistence nebo tolerance. Dále se práce věnuje možnostem modifikace léčiv ať už za účelem získání nových antimikrobně působících látek, či zlepšení některých vlastností stávajících léčiv. Prostor je věnován izomerii, homologii, analogii a především tématu proléčiv.

Byla syntetizována řada slibných sloučenin na bázi peptidových a aminokyselinových derivátů sloučenin se známou biologickou aktivitou, které by se daly v budoucnu využít. *N*-Valyloxybenzamidin a *N,N'*-bis(valyloxy)pentamidin prokázaly vyšší rozpustnost ve vodě a díky tomu měly sloučeniny vyšší biologickou dostupnost po perorálním podání a při testování pak pentamidin vstoupil do všech testovaných buněk. Tento přístup by mohl vést k zpřístupnění léčby v tropických oblastech.

Dále bylo připraveno několik různých derivátů primachinu pro jejich potenciální využití jako antimalarika a porovnání aktivit a vedlejších účinků jednotlivých derivátů. Slibným přístupem pro zabránění oxidativní deaminaci a tím zachování antimalarické aktivity promachinu se ukázala acylace primární aminoskupiny na C<sup>α</sup>-4 dipeptidy. Také byla zjištěna nevhodnost volné CO<sub>2</sub>H skupiny bez přítomnosti volné terminální NH<sub>2</sub> skupiny pro antimalarickou aktivitu.

Lipofilnější aminokyselinové deriváty fluorochinolonů vykazovaly vyšší inhibiční aktivitu v porovnání s původními léčivy, a to pravděpodobně díky snadnější nespecifické permeaci skrze biologické bariery. Další fluorochinolonové deriváty s *N*-chráněnou aminokyselinou rovněž vykazovaly vyšší antimikrobní aktivitu. Z dalších studií (deriváty trimethoprimu, isoniazidu a metronidazolu) opět vyplývá, že zvýšení lipofility derivátů vede k snadnější permeaci do buněk a ke zvýšení aktivity, tyto látky mohou být vhodným výchozím bodem pro další vývoj. Připraveny byly i deriváty kurkuminu s *N*-chráněnými aminokyselinami, slibně vypadají deriváty lipofilnějších aminokyselin chráněných Cbz. Potenciál mají i aromatickým zbytkem (např. PABA) substituované deriváty thiazolidin-2,4-dionu.

Syntetizovány byly estery salicylanilidových esterů s *N*-chráněnými aminokyselinami. Pro antituberkulotickou aktivitu se ukázala důležitou substituce chlorem v pozici 4 na benzenovém jádře a současně 3,4-Cl nebo 4-Br. V navazující studii byly připraveny deriváty

halogenovaných salicylanilidů a *N*-acetyl-L-fenylalaninu, kdy se jako nejvhodnější opět jevíly substituce chlorem a bromem v pozici 4 a současně substituce 4-CF<sub>3</sub> na benzenových jádrech.

Modifikace aminokyselinami je vhodnou cestou pro přípravu antimikrobní působících látek a do budoucna může přinést další pokroky ve vývoji nových léčiv či v úpravě vlastností stávajících látek.

## 6. Literatura

1. EARS-Net – European Centre for Disease Prevention and Control (online) 2021 [cit. 2021-02-29]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/networks/disease-networks-and-laboratory-networks/ears-net-about>
2. URBÁŠKOVÁ P., HRABÁK J., ŽEMLIČKOVÁ H. Antibiotická rezistence bakterií – hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. (online) 2012 [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>
3. URBÁŠKOVÁ P., HRABÁK J., ŽEMLIČKOVÁ H. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? (online) 2010 [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene\\_postupy/266\\_breakpointy.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/doporucene_postupy/266_breakpointy.pdf)
4. About AMR (online) [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/about-amr>
5. Fakta pro odborníky – Evropský antibiotický den (online) [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/cs/informujte-se/informacni-listy/fakta-pro-odborniky>
6. BENEŠ J. Antibiotika. systematika, vlastnosti, použití. 1. vyd. Praha: Grada, 2018. 600 s. ISBN 978-80-271-0636-3
7. SCHINDLER J. Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2. doplněné a přepracované vyd. Praha: Grada, 2014. 224 s. ISBN 978-80-247-4771-2
8. LOCHMANN O. Antimikrobní terapie v praxi. 1. vyd. Praha: Triton, 2006. 204 s. ISBN 80-7254-826-3
9. LAMBERT P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites, Adv. Drug Deliv. Rev. 2005, 57, 10:1472-1479.
10. HUSNÍK F. Symbiózy a horizontální přenos genů aneb Když si organismy „kradou“ geny. Nakladatelství Academia, SsČ AV ČR, v. v. i., 2018. (online) [cit. 2021-03-15] Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/symbiozy-a-horizontalni-prenos-genu-aneb-kdyz-si-o.pdf>
11. LEVY S. B. Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc. 1. vyd. Praha: Academia, 2007. 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6



12. Antimicrobial resistance (online) 2020. [cit. 2021-02-13]. Dostupné z [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance?fbclid=IwAR1dbnsaQLWGCslNeod13vhfwtWvkoXLNsoPg\\_t8pcwjFGvHw09C5ul21kg](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance?fbclid=IwAR1dbnsaQLWGCslNeod13vhfwtWvkoXLNsoPg_t8pcwjFGvHw09C5ul21kg)
13. Národní program antibiotické politiky (online) [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: [https://www.nemocnicepribram.cz/pdf/mikrobio/NAPAP\\_VR.pdf](https://www.nemocnicepribram.cz/pdf/mikrobio/NAPAP_VR.pdf)
14. KREJČÍ E. Vyrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. (online) Med. praxi 2020, 17(1), 8-12. [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: [https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-202001-0001\\_vzrustajici\\_rezistence\\_k\\_antibiotikum\\_a\\_racionalni\\_antibioticka\\_terapie.php](https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-202001-0001_vzrustajici_rezistence_k_antibiotikum_a_racionalni_antibioticka_terapie.php)
15. BENEŠ J. Infekční lékařství. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1, str. 71.
16. WINDELS E. M., MICHIELIS J. E., Van den BERGH B., FAUVART M., MICHIELS J., Antibiotics: Combating Tolerance To Stop Resistance, mBio. 2019, 10(5):e02095-19
17. HARTL J., PALÁT K. Farmaceutická chemie I., 3. vyd. Praha: Karolinum, 2016, ISBN 978-80-246-2033-6
18. SOUČKOVÁ L., RUZSÍKOVÁ A. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu, Klin. Farmakol. Farm. 2016, 30(3): 23-28
19. BŘÍŽDALA J. E-Chembook – Izomerie organických sloučenin (online) [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <http://www.e-chembook.eu/organicka-chemie>
20. MUSILOVÁ E., CÍDLOVÁ H. Izomerie koordinačních sloučenin (online), 2009 [cit. 2021-03-16] Dostupné z: <https://is.muni.cz/elportal/estud/pedf/ps09/slouceniny/web/pages/426.html>
21. CLARK J. Chemistry LibreTexts – Organic Chemistry (online) 2020 [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Fundamentals](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Fundamentals)
22. Struktura organických sloučenin a izomerie (online) [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2373>

23. KVÍTKOVÁ L. *Základy chemie léčivých látek 1*, Olomouc, 2012 (online) [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: [http://aplchem.upol.cz/predmety/ZCLL/Skripta\\_ZCLL1.pdf](http://aplchem.upol.cz/predmety/ZCLL/Skripta_ZCLL1.pdf)
24. Difference Between Hydrogenation and Hydrogenolysis (online) [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://pediaa.com/difference-between-hydrogenation-and-hydrogenolysis/>
25. Merriam-Webster – isostere (online) [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.merriam-webster.com/medical/isostere>
26. LIMA L. M., BARREIRO E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design, *Curr. Med. Chem.* 2005, 12(1):23-49
27. Bioisosteric Replacements (online) 2021 [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/bioisoteres/>
28. ČERNÍKOVÁ A., JAMPÍLEK J. Strukturní modifikace léčiv ovlivňující biodostupnost a terapeutický účinek, *Chem. Listy* 2014, 108:7-16
29. BHOSLE D., BHARAMBE S., GAIROLA N., DHANESHWAR S. Mutual prodrug concept: Fundamentals and applications, *Indian J. Pharm. Sci.* 2006, 68(3):286-294
30. VALE N., FERRIERA A., MATOS J., FRESCO P., GOUVEIA M. J. Amino Acids in the Development of Prodrugs, *Molecules* 2018, 11, 23(9):2318
31. CHUNG M. C.; GONCALVES M. F.; COLLI N.; FERREIRA E. I.; MIRANDA M. T. M. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine, *J. Pharm. Sci.* 1997, 86:1127-1131
32. KOTTHAUS J.; HUNGELING H.; REEH C.; KOTTHAUS J.; SCHADE D.; WEIN S.; WOLFFRAM S.; CLEMENT B. Synthesis and biological evaluation of L-valine-amidoxiesters as double prodrugs of amidines, *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19:1907-1914
33. PORTELA M. J.; MOREIRA R.; VALENTE E.; CONSTANTINO L.; ILEY J.; PINTO J.; ROSA R.; CRAVO P.; ROSÁRIO V. E. Dipeptide derivatives of primaquine as transmission-blocking antimalarials: Effect of aliphatic side-chain acylation on the gametocytocidal activity and on the formation of carboxyprimaquine in rat liver homogenates, *Pharm. Res.* 1999, 16:942-954

34. ARAÚJO M. J.; BOM J.; CAPELA R.; CASIMIRO C.; CHAMBEL P.; GOMES P.; ILEY J.; LOPES F.; MORAIS J.; MOREIRA R.; et al. Imidazolidin-4-one derivatives of primaquine as novel transmission-blocking antimalarials, *J. Med. Chem.* 2005, 48:888-892
35. VALE N.; MATOS J.; GUT J.; NOGUEIRA F.; DO ROSÁRIO V.; ROSENTHAL P. J.; MOREIRA R.; GOMES P. Imidazolidin-4-one peptidomimetic derivatives of primaquine: Synthesis and antimalarial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 18:4150-4153
36. KAUR K., JAIN M., KHAN S. I., JACOB M. R., TEKWANI B. L., SINGH S., SINGH P. P., JAIN R. Amino acid, dipeptide and pseudodipeptide conjugates of ring-substituted 8-aminoquinolines: synthesis and evaluation of anti-infective,  $\beta$ -haematin inhibition and cytotoxic activities, *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 52:230-241
37. SRINIVASARAO K.; ARGAWAL P.; SRIVASTAVA K.; HAQ W.; PURI S.K.; KATTI, S.B. Design, synthesis and in vitro antiplasmodial activity of 4-aminoquinolines containing modified amino acid conjugates, *Med. Chem. Res.* 2016, 25:1148-1162
38. KOLÁŘ M. Nebezpečné multirezistentní bakterie „superbugs“ v současné medicíně. *Interní Med.* 2019, 21(3):142-148
39. KOLÁŘ M., ŠTRBOVÁ P. Vývoj rezistence invazivních bakterií v souvislosti se spotřebou antibiotik, *Klin. Farmakol. Farm.* 2015, 29(2):49-52
40. KUBELE J., HEDLOVÁ D., BAREKOVÁ L., NĚMCOVÁ D., JINDRÁK V. Zpráva o vzestupu výskytu enterokoků rezistentních k vankomycinu v nemocnicích, SZÚ, Praha, 2019, 28(9):364-369
41. IBRAHIM M. A.; PANDA S. S.; BIRDS A. S.; SERRANO J. C.; GONZALES C. F.; ALAMRY K. A.; KATRIZKY A. R. Synthesis and antibacterial evaluation of amino-acid antibiotic conjugates, *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 24:1856-1861
42. SELIEM I.; PANDA S.; GIRGIS A.; NAGY Y.; GEORGE R.; FAYAD W.; FAWZY N.; IBRAHIM T.; AL-MAHMOUDY A.; SAKHUJA R.; ABDEL-SAMII Z. Design, synthesis, antimicrobial and DNA gyrase inhibitory properties of fluoroquinolone-dichloroacetic acid hybrids, *Chem. Biol. Drug Des.* 2020, 95(2):248-259
43. ULLAH A.; IFTIKHAR F.; ARFAN M.; BATOOL K. S. T.; ANJUM M. N.; HAQ I. U.; AYAZ M.; FAROOQ S.; RASHID U. Amino acid conjugated antimicrobial drugs: Synthesis,

lipophilicity-activity relationship, antibacterial and urease inhibition activity, Eur. J. Med. Chem. 2018, 10, 145:140-153

44. PANDA S. S.; GIRGIS A. S.; THOMAS S. J.; CAPITO J. E.; GEORGE R. F.; SALMAN A.; EL-MANAWATY M. A.; SAMIR A. Synthesis, pharmacological profile and 2D-QSAR studies of curcumin-amino acid conjugates as potential drug candidates, Eur. J. Med. Chem. 2020, 15, 196:112293

45. LABED F.; MASULLO M.; MIRRA V.; NAZZARO F.; BENAYACHE F.; BENAYACHE S.; PIACENTE S. Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity, Fitoterapia. 2019, 133:51-55

46. TAHIR S.; MAHMOOD T.; DASTGIR F.; HAQ I. U.; WASEEM A.; RASHID U. Design, synthesis and anti-bacterial studies of piperazine derivatives against drug resistant bacteria, Eur. J. Med. Chem. 2019, 15, 166:224-231

47. MARC G.; ONIGA S.; PIRNAU A.; DUMA M.; VLASE L.; ONIGA O. Rational Synthesis of Some New *para*-Aminobenzoic Acid Hybrids with Thiazolidin-2,4-diones with Antimicrobial Properties. ADMET and molecular docking evaluation, Rev. Chim. 2019, 70:769-775

48. JADHAV J. R.; KIM H. S.; KWAK J. H. N-cholesteryl amino acid conjugates and their antimicrobial activities, Eur. J. Pharm. Sci. 2013 Oct 9, 50(2):208-14

49. World Health Organization (WHO), Global Tuberculosis Report, Ženeva 2020, ISBN 978-92-4-001313-1

50. IMRAMOVSKÝ A.; VINŠOVÁ J.; FÉRRIZ J. M.; BUCHTA V.; JAMPÍLEK J. Salicylanilide esters of N-protected amino acids as novel antimicrobial agents, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19:348-351

51. IMRAMOVSKÝ A.; VINŠOVÁ J.; FÉRRIZ J. M.; DOLEŽAL R.; JAMPÍLEK J.; KAUSTOVÁ J.; KUNC F. New antituberculotics originated from salicylanilides with promising in vitro activity against atypical mycobacterial strains, Bioorg. Med. Chem. 2009, 17:3572-3579

52. KRÁTKÝ M.; VINŠOVÁ J.; BUTCHA V.; HORVATI K.; BÖSZE S.; STOLAŘÍKOVÁ J. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes, Eur. J. Med. Chem. 2008, 45:6106-6113

53. JUHÁS M.; KUČEROVÁ L.; HORÁČEK O.; JANĎOUREK O.; KUBÍČEK V.; KONEČNÁ K.; KUČERA R.; BÁRTA P.; JANOUŠEK J.; PATEROVÁ P.; KUNEŠ J.; DOLEŽAL M.; ZITKO J. N-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents-The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers, *Molecules*. 2020, 25(7):1518
54. POCHOPIN N. L.; CHARMAN W. N.; STELLA V. J. Aminoacid derivatives of dapsone as water-soluble prodrugs, *Int. J. Pharm.* 1995, 121:157-167