

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



Syntéza a hodnocení potenciálních antimikrobních léčiv

Disertační práce

Mgr. Václav Pflégr

Školitel: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Václav Pflégr, v.r.

Poděkování

Děkuji svému školiteli **doc. Martinovi Krátkému** a předešlé školitelce **prof. Jarmile Vinšové** za rady a vedení během celého studia. Děkuji **prof. Szilvii Bősze** z ELKH Research Group of Peptide Chemistry v Budapešti za možnost absolvovat odbornou stáž pod jejím vedením. Děkuji **Dr. Michaele Málkové** za přímé nasměrování. Děkuji **Dr. Markétě Švarcové** a **Ing. Ivaně Kadlečkové** za mnohem víc než jen oporu při studiu.

Děkuji Květě S., Rašovi A., Evě P., Ivě V., Pavlovi M., Ivaně A., Polonyce O., Юлии М. В., Markovi M., Enikő Š., Stefánii P. M., Jardovi K., Petře B. a Aleně H. za to všechno ostatní.

Děkuji i těm, co se mě přes můj odpor pokoušeli vzdělávat.

A děkuji všem, co mi nepomohli a tím mě posunuli až sem.

Práce byla financována Grantovou agenturou ČR (17-27514Y a 20-19638Y), Univerzitou Karlovou (SVV 260547 a SVV 260661) a Grantovými schémata na UK (CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Školící pracoviště Katedra organické chemie a bioorganické chemie

Doktorský studijní program Bioorganická chemie

Kandidát: Mgr. Václav Pflégr

Školitel: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Název disertační práce: Syntéza a hodnocení potenciálních antimikrobních léčiv

Předložená disertační práce referuje některé výsledky dosažené v rámci doktorandského projektu zabývajícího se syntézou a hodnocením potenciálních antimikrobních léčiv. Hlavním cílem bylo získání nových derivátů isoniazidu a jeho analog působících proti *Mycobacterium tuberculosis* a atypickým mykobakteriím, a to optimálně včetně rezistentních kmenů. Dílčím cílem byla příprava peptidových nosičů pro antituberkulotika, což je kromě vývoje nových molekul další perspektivní směr vývoje nových terapeutických strategií vůči tuberkulóze.

Disertační práce v teoretické části přehledně zpracovává problematiku tuberkulózy. Je zde rozebrána etiologie onemocnění, morfologie buněčné stěny mykobakterií a vybrané epidemiologické ukazatele. Podrobně je popsána léčba a charakteristika klinicky používaných léčiv, na tuto kapitolu navazuje stručný rešeršní přehled slibných klinicky hodnocených potenciálních antituberkulotik, zejména nových inhibitorů InhA a DprE1, které cílí na syntézu buněčné stěny.

Experimentální část komentuje výstupy výzkumu nových antituberkulotik. Syntéza sloučenin vycházela z isoniazidu, který byl přes pyruvátový linker konjugován s různými aminy, alkoholy (resp. fenoly a jejich sirnými analogy) za vzniku odpovídajících amidů nebo (thio)esterů. Cílové produkty byly získány zpravidla C-N karbodiimidovým couplingem za katalýzy 1-hydroxybenzotriazolem nebo 4-(dimethylamino)pyridinem.

Naše, v naprosté většině originální, syntetizované sloučeniny vykazaly v několika případech vysoký antimykobakteriální potenciál. Pravděpodobně se jedná o inhibitory

InhA, u některých sloučenin byla tato inhibice potvrzena experimentálně, někdy s velmi nízkými hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) vůči *Mtb.* (již od $\leq 0,03 \mu\text{M}$), ačkoliv u některých sloučenin (zejm. esterů) je možné diskutovat také doplňkový mechanismus účinku. Některé sloučeniny jeví rovněž výbornou aktivitu vůči kmenům netuberkulózních mykobakterií (MIC, vůči *M. kansasii* již od $\leq 0,25 \mu\text{M}$). V práci jsou podrobně diskutována všechna základní experimentální data tří vybraných publikací týkající se designu, přípravy a hodnocení biologické aktivity předmětných derivátů, které byly designovány mj. jakožto možná proléčiva (s potencionovanou účinností, lepší absorpcí a průchodem přes biologické bariéry či redukovanou toxicitou).

Práce se dále věnuje přípravě a hodnocení peptidových nosičů na bázi tuftsinu pro antituberkulotika, které byly designovány zejména s cílem zvýšit intracelulární aktivitu a snížit toxicitu malých molekul.

V rámci práce se podařilo celkově identifikovat řadu nadějných sloučenin.

Klíčová slova: Amidy, antituberkulotika, estery, InhA, isoniazid, tuberkulóza, tuftsin

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Training Workplace Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Doctoral Degree Program Bioorganic Chemistry

Candidate: Mgr. Václav Pflégr

Supervisor: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Synthesis and evaluation of potential antimicrobial drugs

The dissertation thesis reports some results achieved within the framework of a doctoral project dealing with the synthesis and evaluation of potential antimicrobial drugs. The main goal was to obtain new derivatives of isoniazid and its analogues acting against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria, optimally including resistant strains. A partial aim was the preparation of peptide carriers for antituberculosis drugs, which, in addition to the development of new molecules, is another promising direction for the development of new therapeutic strategies against tuberculosis.

The theoretical part of the dissertation overviews the issue of tuberculosis. The aetiology of the disease, the morphology of the cell wall of mycobacteria and selected epidemiological data are presented there. The treatment and characteristics of clinically used drugs are described in detail, this chapter is followed by a brief research review of promising clinically evaluated potential antituberculotics, especially new InhA and DprE1 inhibitors that target cell wall synthesis.

The experimental part comments on the results of research on new antituberculosis drugs. The synthesis of the compounds was based on isoniazid, which was conjugated *via* a pyruvate linker with various amines, alcohols (or phenols and their thio analogues) to form corresponding amides or (thio)esters. The target products were usually obtained by C-N carbodiimide mediated coupling catalysed by 1-hydroxybenzotriazole or 4-(dimethylamino)pyridine.

Our, mostly originally synthesized compounds showed high antimycobacterial potential in several cases. These are probably InhA inhibitors, for some of them this mechanism of action was confirmed experimentally, for a number of them with very low minimum inhibitory concentrations (MICs) against *Mtb.* (from $\leq 0.03 \mu\text{M}$), although for some compounds (especially esters) it is also possible to consider an additional mechanism of action. Some compounds also showed excellent activity against non-tuberculous mycobacteria (MIC against *M. kansasii* from $\leq 0.25 \mu\text{M}$). The thesis discusses in detail all the basic experimental data of three selected publications regarding the design, preparation, and evaluation of the biological activity of the derivatives, which were designed also as possible prodrugs (with improved efficacy, absorption and penetrability through biological barriers or reduced toxicity).

The work is also devoted to the preparation and evaluation of tuftsin-based peptide carriers for antituberculosis drugs, which were designed mainly with the aim of increasing intracellular activity and reducing the toxicity of small molecules.

As part of the work, it was possible to identify several promising compounds.

Key words: Amides, antituberculosics, esters, InhA, isoniazid, tuberculosis, tuftsin

Seznam použitých zkratek

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
AMK	Amikacin
ATP	Adenosin-trifosfát
BCG	<i>Bacillus</i> Calmette–Guérin
CFZ	Klofazimin
CNS	Centrální nervový systém
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOTS	Directly observed treatment short-course (Přímo kontrolovaný krátkodobý terapeutický režim)
DPA	Dekaprenylfosfo- β -D-arabinóza
DPX	Dekaprenylfosfo- β -2'-keto-D-ribóza
EL	Extrahovatelné lipidy
EMB	Ethambutol
ENR	Enoyl-acyl-carrier protein reduktáza
FC	Fluorochinolony
GEN	Gentamicin
GIT	Gastrointestinální trakt
HEB	Hematoencefalická bariéra
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
INH	Isoniazid
InhA	NADH-dependentní enoyl-acyl-carrier protein reduktáza
INHA	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová kyselina
KatG	Kataláza-peroxidáza
KO	Krevní obraz
covid-19	Pandemie SARS-CoV-2
MA	Mykolové kyseliny
MDR-TBC	Multirezistentní tuberkulóza
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

NADH	Nikotinamidadeninukleotid
NK	Nukleová kyselina (nukleové kyseliny)
NÚ	Nežádoucí účinek (nežádoucí účinky)
OFX	Ofloxacin
panD	Aspartát dekarboxyláza
PAS	<i>p</i> -Aminosalicylová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
p. o.	<i>per os</i> (perorální podání)
PZA	Pyrazinamid
RIF	Rifampicin
RR-TBC	Rifampicin rezistentní tuberkulóza
SI	Index selektivity
STM	Streptomycin
TBC	Tuberkulóza
TRN	Oddělení tuberkulózy a respiračních nemocí
VRE	Vankomycin-rezistentní enterokoky
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TBC	Extenzivně rezistentní tuberkulóza

Obsah

1	Úvod	15
2	Tuberkulóza	16
2.1	Základní informace	16
2.2	Atypické mykobakteriózy	17
2.3	Incidence tuberkulózy, aktuální přehled	18
2.4	Patogeneze.....	21
2.5	Buňka mykobakterie	21
3	Antituberkulotika.....	24
3.1	Antituberkulotika cílící na buněčnou stěnu mykobakterie.....	24
3.2	Léčiva cílící na jaderné struktury	30
3.2.1	Inhibitory syntézy nukleových kyselin	30
3.2.2	Inhibitor syntézy ATP.....	33
3.3	Inhibitory proteosyntézy	34
3.4	Ostatní léčiva.....	36
3.5	Léčba	37
3.6	Léčba rezistentní TBC.....	37
4	Přímé inhibitory InhA.....	39
5	Inhibitory DprE1	43
5.1	Benzothiazinony.....	43
5.2	Dinitrobenzamidy.....	44
5.3	Azaindoly	45
5.4	Thiadiazoly.....	45
5.5	Benzothiazoly a triazolopyridiny	46
6	Cíle práce.....	48
7	Komentáře	50
7.1	Návrh a syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanamidů jako inhibitorů InhA s vysokou antituberkulotickou aktivitou	51

7.2	Syntéza a hodnocení antimykobakteriální aktivity derivátů isoniazidu s alifatickými aminy	56
7.3	Návrh a syntéza vysoce aktivních antimykobakteriálních „mutual“ esterů kyseliny 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanové	59
7.4	<i>In silico</i> predikce	64
7.5	Nové antimykobakteriální deriváty kyseliny 4-aminosalicylové s tuftsinovými peptidovými nosiči cílící na hostitelské buňky.....	66
8	Závěr	73
9	Seznam publikací a prezentací.....	75
9.1	Publikace komentované	75
9.2	Publikace ostatní.....	76
9.3	Konferenční příspěvky	78
9.4	Zvané přednášky	81
10	Seznam použité literatury	82

1 Úvod

Tuberkulóza (TBC) je závažné infekční onemocnění vyvolané mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex, nejběžněji druhem *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*). [1-3] Při nedodržování standardních hygienických opatření se může infekce snadno šířit, nejčastěji inhalací infikovaných kapének vykašlovaných nakaženým jedincem. [3, 4] Nemoc, nejčastěji ve své plicní formě, postihuje zejména oslabené, podvyživené, imunokompromitované a nemocné jedince [5], častěji muže než ženy, méně děti než dospělé. [1] Odhaduje se, že až jedna čtvrtina světové populace může být infikována *Mtb.*, ačkoliv u těchto jedinců nemusí vždy dojít k rozvoji vlastního onemocnění. Incidence tuberkulózy ve vyspělých zemích sice dlouhodobě meziročně klesá, nicméně v globálním kontextu je TBC jednou z hlavních příčin úmrtí na jedno samostatné infekční agens (řadí se dokonce nad HIV/AIDS), teprve až v letech těsně minulých byla úmrtnost na TBC v absolutní hodnotě překonána virem SARS-CoV-2 (pandemie covid-19 v letech 2019-2022). [1] Tuberkulóza je léčitelná, nicméně léčba je dlouhodobá a může pacientovi způsobovat značné obtíže, často tedy dochází k předčasnému ukončení léčby. [6] Statistická data udávají, že až 50 % nakažených bez vhodné léčby umírá. [1]

Celosvětová situace je s ohledem na rychlý rozvoj rezistence na antituberkulotika alarmující. [1, 5, 7]. Tlak na vývoj nových sloučenin s potenciální antituberkulotickou aktivitou stále vzrůstá. [8]

Celkový terapeutický přístup kromě složky kurativní zahrnuje také stejně důležitou složku preventivní (zodpovědnost, vývoj nové vakcíny, depistážní činnost, kvalitní hygienické standardy, zdravý životní styl a další). [3, 8, 9] Vidina totální eradikace onemocnění prozatím zůstává daleko v budoucnosti.

2 Tuberkulóza

2.1 Základní informace

Mtb. jako takové poprvé představil Robert Koch v březnu roku 1882 a tím se mu právě podařilo definovat etiologické agens tuberkulózy; Kochův bacil. [3, 10] V tom čase se ujala až do současnosti používaná definice tuberkulózy:

„Tuberkulóza představuje všechny chorobné stavy, jejichž příčinou je Kochův bacil.“

Robert Koch, 1882 [3]

Mtb. je imobilní tyčinka o délce asi 2-5 μm , může a nemusí být prohnutá. Je acidorezistentní, tzn. špatně barvitelná organickými barvivy, a to díky vysokému podílu lipidů v buněčné stěně, navíc je odolná vůči odbarvování chemickými činidly (kyselinami, zásadami nebo alkoholem). Je striktně aerobním mikrobem s optimální teplotou růstu kolem 37 °C. Je to obligátní patogen pro člověka i hospodářský dobytek. Často, vzhledem ke své potřebě kyslíku, napadá právě respirační systém (asi 75-85 % případů), ale běžně jsou popisovány také viscerální, pleurální, kožní, meningeální nebo kostní formy (Pottova nemoc) TBC. [11] Osoba může být *Mtb.* infikována, ačkoliv se u ní onemocnění nemusí rozvinout, probíhá tedy latentně. V okamžiku, kde je tělo hostitele oslabeno vlivem např. malnutrice, dalšího onemocnění (zejména pacienti s AIDS a rakovinou, iatrogenní imunosupresí, diabetem apod.) nebo jinými nepříznivými exogenními vlivy, propuká manifestní onemocnění se všemi jeho příznaky. Typickými příznaky pro pulmonální formu tuberkulózy jsou kašel, hemoptýza, dušnost, bolest na hrudi a další systémové příznaky, jako úbytek na hmotnosti, pyrexie, únava, astenie, anemie a mnoho dalších. [1, 3, 12, 13]

Pacient s těmito příznaky je v úvodu izolován na vhodném oddělení (v ČR je to oddělení tuberkulózy a respiračních nemocí; TRN) a jeho sputum (nebo punktát, výpotek či hnis) je kultivačně a mikroskopicky hodnoceno na přímý průkaz mykobakterií [3], zároveň je prokazována bakteriální DNA pomocí PCR. [14] Ke kultivaci se používají speciální půdy typu Löwenstein–Jensen, k mikroskopickému průkazu se využívá Ziehlovo–Neelsenovo barvení mykobakterií karbolfuchsinem. [15] Diagnózu je možné podepřít ještě nálezem granulomu na skiagramu hrudníku nebo pozitivní reakcí na tuberkulínový test (Mantoux). Na základě výsledků vyšetření se pacientovi předepíše terapeutické schéma, které se řídí doporučenými postupy pro léčbu TBC. Pokud je to

možné a vhodné, provede se v okolí pacienta cílená depistáž, která může odhalit komunitní šíření např. v sociálně vyloučených oblastech. Klíčovou roli ve zvládnání TBC hraje rovněž prevence, např. očkování bacilem Calmettovým-Guérinovým (BCG), zdravotnická osvěta a také řádná edukace nemocných [3], což evidentně bývá opomíjeno. Nové vakcíny jsou ve vývoji. [16, 17]

2.2 Atypické mykobakteriózy

Dlužno zmínit, že problematika mykobakterióz není ohraničena pouze na infekce vyvolané obligátně patogenními, pravými mykobakteriemi *M. tuberculosis* komplex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. orygis*, *M. canetti* atd.). Druhou kategorií jsou mykobakterie netuberkulózní (také zvaná atypické), sem je zařazena celá řada neobvyklých agens, která mohou být potenciálně patogenní pro člověka (nejčastěji *M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*, *M. abscessus*, *M. xenopi* a mnoho dalších). Onemocnění způsobená těmito kmeny se nazývají mykobakteriózy a jejich klinický obraz v případě plicních forem bývá připodobňován právě k TBC. Nejrizikovější skupinu tvoří pacienti s cystickou fibrózou, chronickou obstrukční plicní nemocí, HIV a dalšími syndromy imunodeficience. Studie konzistentně naznačují, že prevalence atypických mykobakterióz se zvyšuje [18], možná také kvůli nárůstu počtu HIV-pozitivních pacientů. [19] V poslední dekádě byl zaznamenán nárůst selekce rezistentních kmenů i u těchto bakterií (např. *M. abscessus*, které je některými autory odborných publikací nazývána doslova „antibiotickou noční můrou“). [20, 21]

Atypické (netuberkulózní) mykobakterie tedy stejně jako *Mtb.* napadají respirační trakt, nicméně běžné jsou rovněž infekce měkkých tkání, kůže, lymfatického systému apod. Vzhledem k jejich různorodé morfologii a také různé rychlosti růstu napříč jednotlivými kmeny je stanovení správné diagnózy velmi komplikované. Stejně komplikovaná je rovněž léčba, která vyžaduje (stejně jako TBC) dlouhodobou a kombinovanou terapii, nezřídka bývá nutná i chirurgická intervence. [22] Častými původci atypických mykobakterióz jsou zejména:

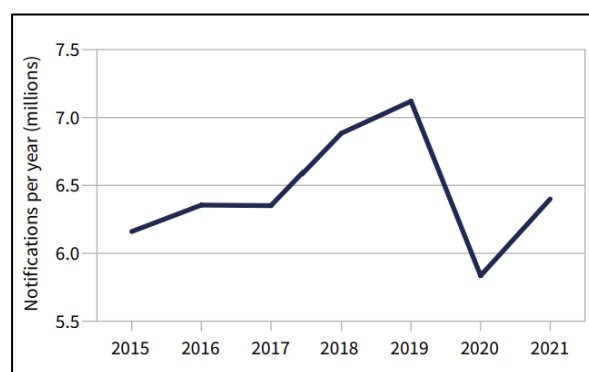
- *Mycobacterium avium* komplex (*M. avium*, *M. intracellulare*)
- *Mycobacterium kansasii*
- *Mycobacterium abscessus* komplex (*M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii*)
- *Mycobacterium ulcerans*
- *Mycobacterium marinum*

Léčba infekcí vyvolaných jednotlivými kmeny je přísně individuální, neboť některé z nich disponují primární rezistencí vůči běžným léčivům užívaným k terapii TBC (např. *M. avium* je přirozeně rezistentní vůči isoniazidu). [23]

2.3 Incidence tuberkulózy, aktuální přehled

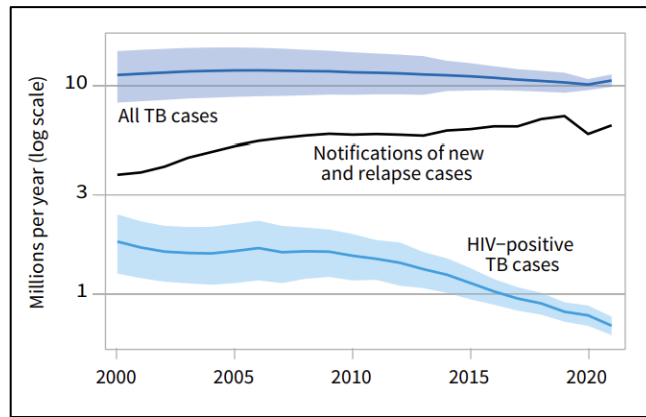
Incidence TBC je celosvětově monitorována a většině civilizovaných zemí také povinně ohlašována (více než 100 zemí, zaznamenáno přibližně 90 % všech případů) a data jsou rovněž referována Světové zdravotnické organizaci (WHO). Hlavní důraz je kladen na monitorování zemí s vysokou TBC zátěží (Afrika, Indie, Indonésie). [1]

Nashromážděná epidemiologická data jsou v posledních třech letech značně zkreslena pandemií covid-19. Ta se projevila jak pozitivně, ve smyslu striktního dodržování zavedených protiepidemických pravidel, což nejspíš pomohlo snížit počty náhodných přenosů infekce (zejm. kvůli povinnému nošení respirátorů, nucenému mytí rukou atd.), tak i negativně s ohledem na lokální přetížení zdravotnických zařízení a tím nedostupnosti lékařské péče. [1]



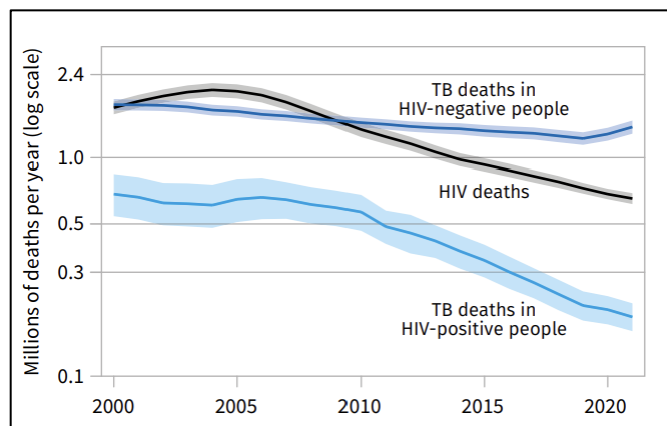
Obrázek 1 – Nově diagnostikované případy TBC (celosvětově) mezi lety 2015-2021 [1]

Vyčísleno; v roce 2019 bylo WHO hlášeno 7,1 milionu případů TBC, v roce 2020 už jen 5,8 milionu případů (pokles o 18 %) a konečně v roce 2021 bylo reportováno 6,4 milionu nově diagnostikovaných případů (**Obr. 1**). Součtem bylo reportováno v roce 2020 10,1 milionu a v roce 2021 10,6 milionu všech případů TBC celosvětově (nárůst 4,5 %) (**Obr. 2**). Otázkou zůstává, zda tato příznivě vyhlížející čísla způsobila skutečná neexistence případů, nebo pouze jejich nediodagnostikování. To se podle WHO úplně projeví patrně až v dalších letech. [1]



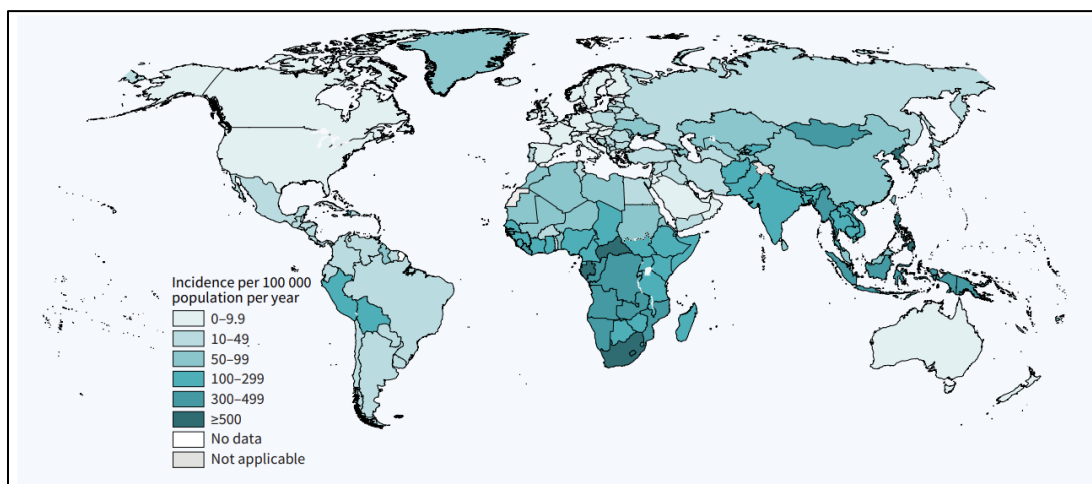
Obrázek 2 – Odhadované počty případů TBC (celosvětově) mezi lety 2000-2021 [1]

Jinou otázkou je mortalita v tomto období, kdy podle odhadu WHO zemřelo v roce 2021 1,6 milionu, v roce 2020 1,5 milionu a v roce 2019 1,4 milionu nemocných, přičemž v letech před pandemií covid-19 byl trend spíše sestupný (**Obr. 3**). Pacienti se tak patrně infikovali komunitně a na pozadí „aktuálnější“ a rychle probíhající pandemie covidu-19. WHO dokonce uvádí, že ve zmíněném období se léčby rifampicin rezistentní tuberkulózy (RR-TBC) a multirezistentní tuberkulózy (MDR-TBC) dočkala pouze jedna třetina nemocných. [1]



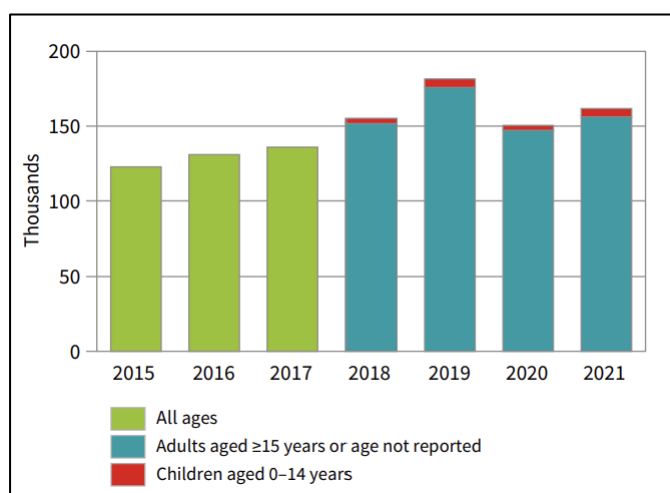
Obrázek 3 – Odhadované počty úmrtí na TBC mezi lety 2000-2021 [1]

Výskyt TBC se zvýšil mezi roky 2020 až 2021 v pěti ze šesti monitorovaných územních celků. Výjimku překvapivě tvořil africký region, až později se zjistilo, že odchylka je způsobena narušením tamější, už tak místy provizorní, lékařské péče vlivem covid-19. Podrobný přehled o distribuci nemocných v jednotlivých světadílech podává **Obr. 4**. Z obrázku je patrné, že mezi oblasti s největší roční incidencí TBC na 100 000 obyvatel patří jižní a střední Afrika, Indie a jihovýchodní Asie. [1]



Obrázek 4 – Odhadovaná distribuce případů v regionech (2021) [1]

Stanovení počtu případů nemocných s TBC rezistentní vůči léčbě je složitější. Ke stanovení správné diagnózy je třeba přesné bakteriologické vyšetření profilu rezistence, k tomu se dnes mimo klasické kultivace používají rychlé molekulární testy nebo sekvenační technologie. Dobrou zprávou je, že tato vyšetření jsou dnes prováděna skoro ve třech čtvrtinách potvrzených případů pulmonální TBC. V roce 2019 bylo tímto způsobem na rifampicinovou rezistenci vyšetřeno 61 % a v roce 2020 a 2021 dokonce asi 71 % nemocných. Celosvětově bylo v roce 2021 diagnostikováno 161 746 lidí s MDR/RR-TBC delegovaných k léčbě, to je nárůst asi o 7,5 % ze 150 469 stejných případů za rok 2020, ale stále výrazně nižší (asi o 11 %) v porovnání s počtem případů 181 533 z roku 2019 (**Obr. 5**). Počty nemocných se závažnějšími profily rezistence (např. extenzivně rezistentní tuberkulóza; XDR-TBC) se za poslední tři roky pohybují okolo cca. 20-30 tisíc osob za rok. Většina nakažených je dospělá. [1]



Obrázek 5 – Počty nemocných léčených pro MDR/RR-TBC (celosvětově) [1]

2.4 Patogeneze

Základním zdrojem infekce je nemocný¹, případně infikované hospodářské nebo jiné domácí zvíře. Pokud pacient s otevřenou (aktivní) TBC kašle nebo i jen mluví, emituje do okolního prostředí kapénky aerosolu o velikosti jen několika jednotek mikrometrů, které nesou živé buňky *Mtb*. Další osoba v jeho blízkosti je nákaze vystavena prostřednictvím aspirace těchto infekčních působků, riziko nákazy se zvyšuje s opakovanou expozicí (např. v uzavřených komunitách). [3, 4, 24, 25]

Po expozici a zasažení hostitele vniká *Mtb*. hluboko do dýchacích cest, nakonec až do alveolů. Zde jsou buňky *Mtb*. pohlceny alveolárními makrofágy, podstatná část mykobakteriální nálože je buňkami imunitního systému skutečně zničena, avšak některé buňky mohou přežít, v makrofágu se množit a vyvolávat primární granulomatózní zánět. Výsledkem procesu je vznik typického granulomu – jinak také *tubercula*, uzlíku – odtud název onemocnění. Granulom je v podstatě vytvořen reakcí organismu hostitele, aby zabránil dalšímu šíření mykobakterií, a zároveň se stává místem, kde se pokouší imunitní systém hostitele cizí buňky eliminovat. V případě insuficience imunitního systému jsou pomnožené mykobakterie emitovány z rozpadajícího se granulomu ven a dochází k jejich dalšímu šíření, např. krevním řečištěm nebo lymfatickým systémem po celém těle. Pokud se začnou mykobakterie množit v těchto diseminovaných ložiscích, hovoříme o život ohrožujícím stavu: miliární tuberkulóze. Pokud není adekvátně přeléčena, pacient zpravidla brzy umírá. [24-27]

Při nedodržení přísného terapeutického režimu, tzn. nedoléčení, se mohou střídát období bezpříznaková s exacerbacemi (a to dokonce ve více ložiscích, tj. patologie v jednom místě relabuje a v druhém ustupuje). Rozpadající se granulomy působí kaseózní nekrózu, která se postupně hojí jizvou, a jak známo, tyto buňky již nerespektují architekturu normální plicní tkáně a ta se stává z hlediska látkové výměny nejen nefunkční, ale dokonce potenciálně nebezpečná z hlediska tvorby malignit. [25, 27]

2.5 Buňka mykobakterie

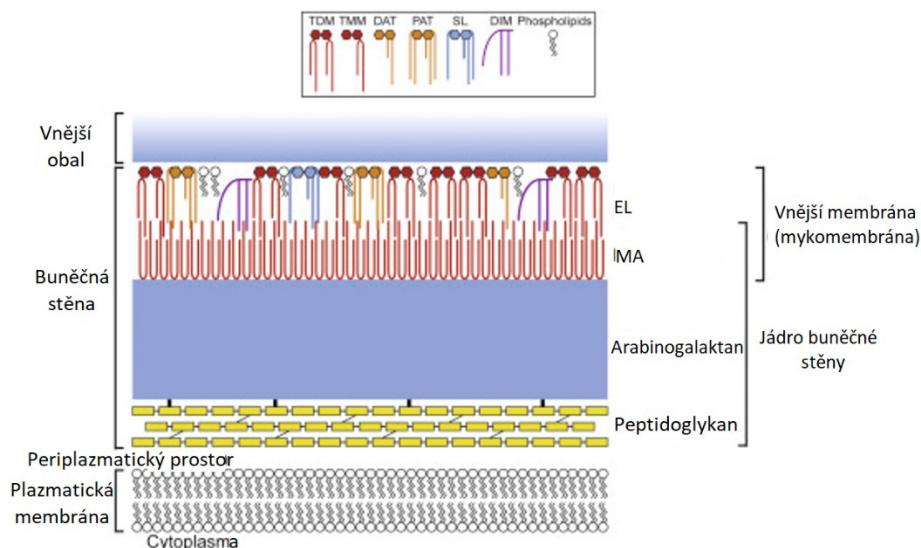
Pro správné pochopení mechanismu účinku léčiv používaných k terapii TBC a posléze důvodů vzniku rezistence na ně, je klíčové rozpoznat pozoruhodnou molekulární složitost buněk mykobakterií. V širším kontextu se jedná o znak společný pro všechny pravé i atypické mykobakterie. Hlavní doménou mykobakteriální buňky je

¹ Méně běžně se objevuje nákaza inokulační (dotykem) nebo alimentární.

ve srovnání s jinými bakteriemi její vrstevnatý voskový, hydrofobní obal (podíl lipidů v buněčném obalu je až 40 %), který určuje mykobakteriální buňce její typické vlastnosti, jako jsou odolnost vůči řadě chemických a fyzikálních faktorů, horší penetrabilita pro léčiva, odolnost vůči biologickým agens (lysozymu makrofágů), imunitnímu systému hostitele celkově nebo relativně delší generační doba². [28-30] Jak již bylo zmíněno v úvodu, je tedy nutné zavádět do terapie léčiva speciální, tj. antituberkulotika (Kapitola 3).

Buněčný obal mykobakterií lze orientačně podle (**Obr. 6**) partikulovat do čtyř celků [31]:

- **Buněčná membrána**
- **Periplazmatický prostor**
- **Buněčná stěna**
 - Peptidoglykan
 - Arabinogalaktan
 - Mykomembrána (mykolové kyseliny, MA; mastné kyseliny s 60-90 atomy uhlíku, a extrahovatelné lipidy, EL)
- **Vnější obal**



Obrázek 6 – Buněčný obal mykobakterie [31]

² Generační doba některých mykobakterií se pohybuje v rozmezí cca 20-30 hodin. U bakterií běžně v řádu minut.

První vrstvou dělící vnitřní prostředí buňky od okolí je buněčná membrána (cytoplazmatická membrána). To je konvenčně chápána fosfolipidová dvojvrstva o síle asi 7–8 nm. Je protkána proteinovými komplexy, které plní různé funkce např. přenos iontů a dalších důležitých látek, buněčná signalizace (přenos signálu do a z buňky) apod. [30, 31]

Na cytoplazmatickou membránu naléhá periplazmatický prostor, který někdy bývá schematicky přiřazován k cytoplazmatické membráně a odděluje cytoplazmatickou membránu od buněčné stěny. [30]

Ačkoliv jsou mykobakterie taxonomicky zaříděny do skupiny Gram-pozitivních bakterií³, *ergo* je pro ně typická buněčná stěna sestávající ze silné lamelární vrstvy mureinu, má ale na rozdíl od ostatních G+ (a také G- bakterií) vnější membránu. Murein (přesněji peptidoglykan) je polysacharidový řetězec tvořený střídajícími se *O*-glykosidicky vázanými jednotkami *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylmuramové kyseliny, přičemž jsou zbytky *N*-acetylmuramové kyseliny v jednotlivých řetězcích mureinu propojeny tetrapeptidovou vazbou. V porovnání s buněčnou stěnou typických G+ bakterií je vrstva peptidoglykanu u mykobakterií poněkud oslabena na úkor dalších dvou klíčových komponent mykobakteriální buněčné stěny, těmi jsou arabinogalaktan a mykolové kyseliny. Mykobakteriální buněčná stěna je tedy tripartitní útvar sestávající z peptidoglykanu, jako je tomu u G+ bakterií, arabinogalaktanu a mykomembrány. Superficiální mykomembrána je zbudována ze zbytků velmi dlouhých mastných kyselin, jinak zvaných též mykolové kyseliny. Tyto acyly jsou esterovou vazbou připojeny k arabinogalaktanu. Nejvnitřnější, a tedy podkladovou vrstvou buněčné stěny, je peptidoglykan, na který jsou kovalentně vázány polysacharidové řetězce arabinogalaktanu. Poslední vrstvou, která je v přímém kontaktu s okolím mykobakterie, je vnější obal, který je primárně tvořen bílkoviny, jen s malým množstvím sacharidů a lipidů. Tyto bílkoviny navozují humorální i buněčnou imunitní odezvu. [30]

Podstatná část antituberkulotik právě určitým způsobem ovlivňuje buněčnou stěnu, respektive biosyntetické dráhy, které utvářejí buněčnou stěnu. Existují i další antituberkulotika, která přímo s buněčnými obaly neinteragují v terapeutickém smyslu slova, ale všechna musí být schopna jimi alespoň prostoupit.

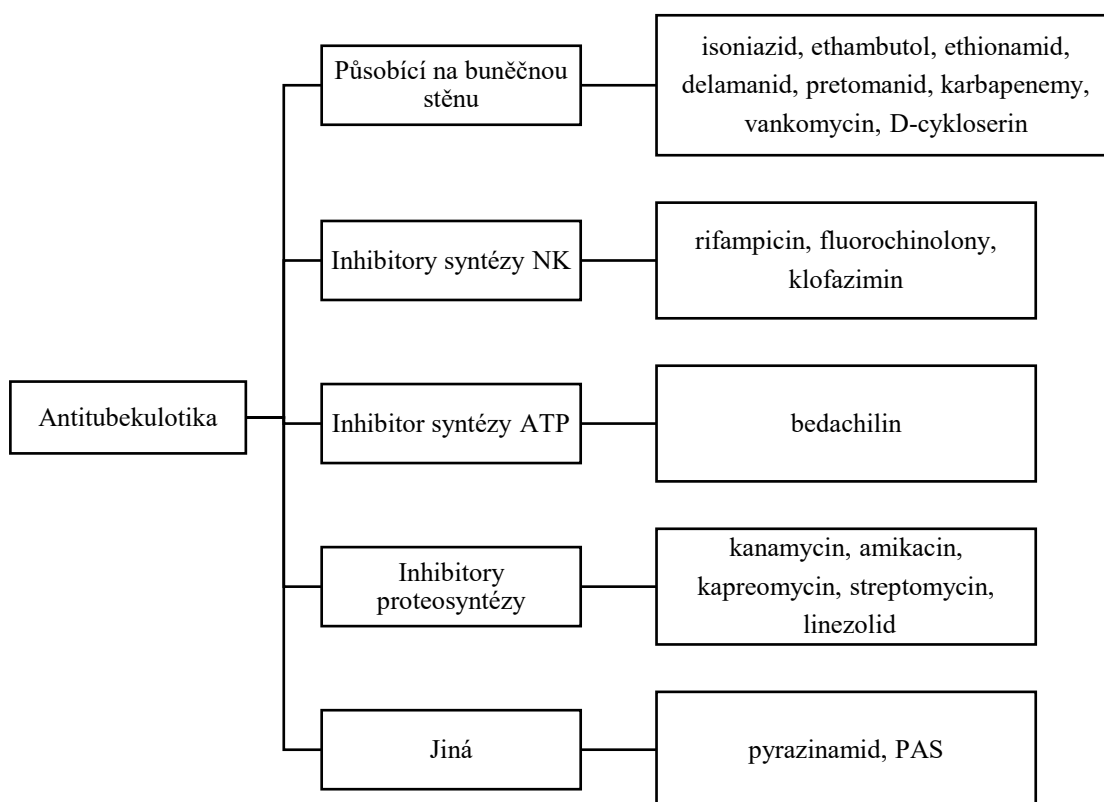
³ Někdy jsou mykobakterie vyčleněny do skupiny Gram-neutrálních bakterií.

3 Antituberkulotika

3.1 Antituberkulotika cílící na buněčnou stěnu mykobakterie

Jak již bylo zmíněno, povaha mykobakteriální buněčné stěny nese zásadní podíl na vlastní patogenitě mykobakterií, tedy se podstatná část léčiv zaměřuje různými způsoby právě na buněčnou stěnu mykobakterie. [32]

Následující schéma (**Obr. 7**) orientačně rozděluje některá antituberkulotika do skupin podle místa jejich účinku.



Obrázek 7 – Rozdělení vybraných antituberkulotik dle mechanismu účinku (MÚ)

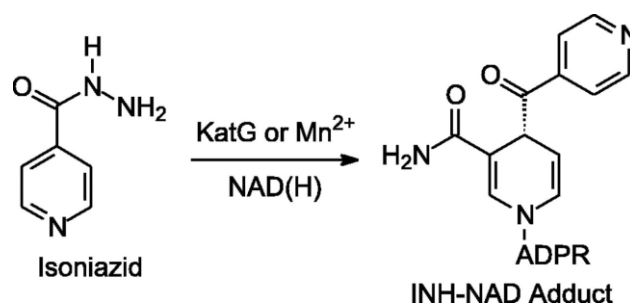
Isoniazid

Isoniazid (INH) je základním léčivem proti TBC s širokospektrým mechanismem účinku, používá se od 50. let minulého století a díky jeho snadné výrobě, nízké ceně a vysoké účinnosti je celosvětově nejvíce používaným lékem proti TBC. [33] Nicméně jeho terapeutický potenciál je limitován rozvíjející se rezistencí [34], stejně jako paletou

možných nežádoucích účinků spojených s terapií (např. hepatotoxicita a neurotoxicita periferní nervové soustavy. [35]

Nejčastěji se podává v jedné denní dávce ve formě tablet o síle 100 mg nebo injekčně, dobře proniká do tělesných tkání i tekutin, maximální sérové koncentrace dosahuje už 1 hodinu po podání *per os* (p. o.). [36] Pakliže není terapie vedena správně, rychle se rozvíjí rezistence.

Mechanismus účinku tkví především ve schopnosti inhibovat NADH-dependentní enoyl-acyl-carrier protein reduktázu (InhA), která je zodpovědná za syntézu mykolových kyselin pro budování buněčné stěny (konkrétně mykomembrány). INH je proléčivo, které je aktivováno mykobakteriálním enzymem katalázou-peroxidázou (KatG), předpokládá se, že KatG radikálově štěpí vazbu mezi karbonylovým atomem uhlíku a sekundárním dusíkem INH. Vzniklý isonikotinoylový radikál poté interferuje s nikotinamidadeninukleotidem (NADH) za tvorby nikotinoyl-NAD aduktu, který právě inhibuje InhA, a tímto se zablokuje syntéza mykolových kyselin (MA). Kromě KatG dokážou INH aktivovat také další chemická činidla, jak je patrné z (**Obr. 8**) (např. manganaté, nebo železnaté ionty). Při radikálovém rozkladu INH vzniká ovšem celá řada vysoce reaktivních částic, které ovlivňují mnoho dalších biochemických dějů probíhajících v mykobakteriální buňce a přispívají tak k její eliminaci. INH je považován za baktericidní antituberkulotikum pro rostoucí mykobakterie. [37]

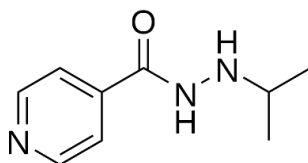


Obrázek 8 – Tvorba nikotinoyl-NAD aduktu [37]

Metabolizuje se v játrech acetylací, metabolity jsou neaktivní a jsou vylučovány močí. [36]

Existuje velké množství více či méně úspěšných derivátů INH připravených za účelem vylepšení jeho celkového farmakochemického profilu (např. zlepšení vstřebávání, eliminace nežádoucích účinků atd.). [38-41] Do širšího užívání zatím žádný derivát, až na glykoniazid, postoupen nebyl. [42] Za zmínku snad stojí ještě iproniazid

(má isopropylový zbytek navázaný na původně primární aminoskupinu INH, **Obr. 9**), který nakonec našel na nějaký čas uplatnění jako antidepresivum a později upadl v zapomnění. [43]



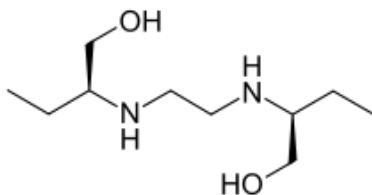
Obrázek 9 – Iproniazid

Jak bylo zmíněno výše, stinnou stránkou INH jsou jeho možné nežádoucí účinky (NÚ), ze skupiny méně závažných např. nauzea, zvracení, dyspepsie, bolesti hlavy a závratě. Jako závažnější NÚ spojené s užíváním INH se u pacientů poměrně často vyskytují periferní polyneuropatie s paresteziemi z důvodu snížené hladiny pyridoxinu v krvi, elevované sérové hodnoty jaterních enzymů (konkrétně transamináz), změny v krevním obrazu, ojediněle ale také psychické poruchy (např. psychózy a deprese). [36]

Isoniazid má být dávkován pacientům trpícím epilepsií, jaterní cirhózou nebo ikterikům všeobecně jen s maximální obezřetností. [36]

Ethambutol

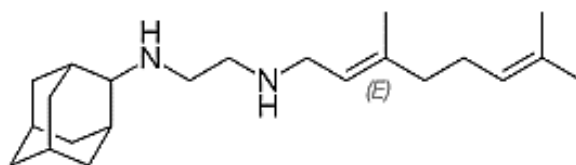
Dalším léčivem běžně používaným v terapii TBC je ethambutol (EMB, **Obr. 10**). Jedná se o syntetický derivát ethylendiaminu s mykobakteriostatickým účinkem a relativně nízkou frekvencí nežádoucích účinků. [44] Užíván je v kombinaci s dalšími antituberkulotiky, je schopen potencovat baktericidní účinky INH. Je užíván zpravidla p. o. ve formě tablet, vstřebává se dobře a maximálních sérových koncentrací je dosahováno po 3 hodinách od podání. Jak je patrné z obrázku, molekula ethambutolu nese dvě centra chiralit, sloučenina tedy tvoří tři stereoizomery (*S,S*; *R,R* a *meso*). Nositelem žádané antituberkulotické aktivity je (*S,S*)-ethambutol a jedině tento je dnes v praxi využíván. [45] Zkřížená rezistence na EMB nebyla zatím pozorována.



Obrázek 10 – Struktura ethambutolu

Mechanismus účinku ethambutolu spočívá v inhibici arabinosyltransferázy, enzymu, který polymerizuje arabinózu na arabinan a poté na arabinogalaktan, složku mykobakteriální buněčné stěny. Ethambutol je považován za účinné bakteriostatikum vůči dělicím se mykobakteriím. [46] V některých případech je možné EMB předepsat i pro terapii atypických mykobakterióz (např. infekce způsobené *M. kansasii*). Při terapii účinnou dávkou 15 mg na kg tělesné hmotnosti se nežádoucí účinky objevují jen zřídka, avšak v kombinaci s dalšími antituberkulotiky se NÚ mohou podstatně zvýraznit. Nejzávažnější NÚ (zejm. v kombinaci s vyššími dávkami INH) je retrobulbární neuritida se snížením zrakové ostrosti nebo poruchami barvocitu. [44] EMB je vhodný i pro pacienty s jaterní nedostatečností. [45]

Existují další terapeuticky velmi slibné sloučeniny odvozené od ethylendiaminu, např. SQ 109 (**Obr. 11**).

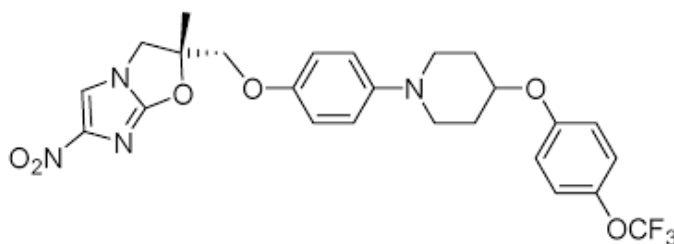


Obrázek 11 – SQ 109

SQ 109 je rovněž považován za inhibitor výstavby buněčné stěny. Další vlastnosti SQ 109 jsou stále předmětem výzkumu. [47, 48]

Delamanid

Delamanid (**Obr. 12**) je velmi důležitý, relativně nový (rok registrace v ČR je 2014) nitroimidazolový derivát používaný k léčbě aktivních MDR nebo XDR tuberkulóz. Také se nepoužívá v monoterapii, navíc je vysoce žádoucí podávání pouze v přímo kontrolovaných krátkodobých terapeutických režimech (directly observed treatment short-course, DOTS). Doporučená dávka pro dospělého je 100 mg dvakrát denně po dobu 24 týdnů. [49, 50]



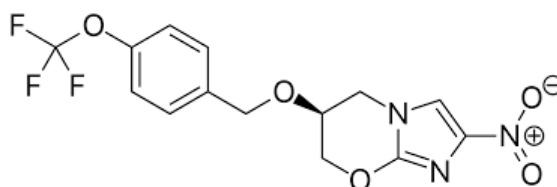
Obrázek 12 – Delamanid

Mechanismus účinku byl pečlivě studován a bylo konstatováno, že delamanid je proléčivo, které je aktivováno prostřednictvím mykobakteriálního enzymatického systému F420. Během aktivace se mimo jiné generuje oxid dusnatý. Aktivní radikálový intermediát inhibuje syntézu methoxymykolových a ketomykolových kyselin, které jsou esenciální pro výstavbu buněčné stěny. [49]

Léčivo je dobře tolerované a jeho užívání je spojeno jen s mírnými nežádoucími účinky, jako jsou bolest hlavy, ztrátu chuti k jídlu nebo lehčí psychické obtíže. [50]

Pretomanid

Mladším, ale strukturně velmi podobným léčivem delamanidu je nitroimidazolový derivát pretomanid⁴ (**Obr. 13**).



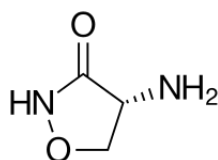
Obrázek 13 – Pretomanid

Možná také díky výrazné strukturní podobnosti je pretomanid, stejně jako delamanid, inhibitorem výstavby buněčné stěny, nicméně mechanismus účinku není totožný. Pretomanid inhibuje biosyntézu buněčné stěny blokadou oxidace hydroxymykolátu na ketomykolát. Za anaerobních podmínek pretomanid způsobuje respirační otravu bakteriální buňky uvolňováním reaktivních forem dusíku. [51] Pretomanid je indikován k terapii MDR/XDR tuberkulózy, obvykle v kombinaci s bedachilinem a/nebo linezolidem. Nežádoucí účinky jsou podobné jako i jiných nitroimidazolů; neuropatie, obtíže gastrointestinálního traktu GIT, elevované jaterní transaminázy, kožní obtíže atd. Nemocný užívá 200 mg denně v jedné dávce po dobu 26 týdnů v režimu DOTS. [52]

D-Cykloserin

Je léčivo 2. volby v terapii TBC (**Obr. 14**). Jedná se o cyklický analog D-alaninu, který je velmi efektivní inhibitor syntézy peptidoglykanů. [53] Jedná se o širokospektré antibiotikum produkované *Streptomyces orchidaceus*. [54] Je předepisován až v případě, že není vhodné podávat léčiva 1. volby z důvodu rezistence nebo nesnášenlivosti.

⁴ Pretomanid; Předpona „preto-“ podle Pretorie v Jižní Africe.



Obrázek 14 – D-Cykloserin

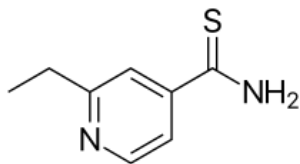
Mechanismus účinku D-cykloserinu spočívá v inhibici hned dvou důležitých (myko)bakteriálních enzymů; alanin racemázy a D-alanin-D-alanin-ligázy. První ze dvou enzymů převádí L-alanin na D-alanin a druhý enzym spojuje D-alanin peptidovou vazbou za vzniku D-alanyl-alaninu. Jsou-li tyto dva enzymy inhibovány, nedochází k syntéze D-alanyl-alaninu, který je esenciální pro biosyntézu peptidoglykanu. [55, 56]

Doporučuje se podávat 250 mg každých 12 hodin po dobu 14 dnů, poté se dávka titruje individuálně podle hladiny sérové koncentrace. Je třeba ho předepisovat s jistou opatrností, neboť je schopný pronikat do centrální nervové soustavy (CNS), a s tím je spojena celá řada i poměrně závažných neuropsychiatrických NÚ (psychózy, křeče, těžké deprese, při předávkování i parézy a koma). [57]

Léčivo je absolutně kontraindikováno depresivním pacientům, psychotikům, epileptikům a pacientům trpícím ethylismem – u takto nemocných spolehlivě dochází k vystupňování původních obtíží a může dojít k ohrožení života. Léčivo je v ČR dostupné. [58]

Ethionamid

Dalším antituberkulotikem 2. volby je ethionamid (**Obr. 15**). Jedná se o proléčivo, inhibitor InhA (podobně jako isoniazid, ethionamid je jeho strukturní analog), je aktivován enzymem ethionamid monooxygenázou – EthA. [59]



Obrázek 15 – Ethionamid

Ačkoliv se může zdát, že se jedná o léčivo zaměnitelné za INH, není tomu tak. INH vyžaduje aktivaci KatG a mutace v *katG* jsou hlavním mechanismem rezistence INH. V případě takové rezistence nemusí být EthA vůbec dotčena a neuplatní se zkřížená rezistence. [59]

Míra nežádoucích účinků je značná (také protože léčivo prostupuje hematoencefalickou bariéru, HEB) od poruch GIT jako např. nevolnost a zvracení, které jsou velmi časté, až po poškození jater, dále neurologické postižení (neuropatie), psychiatrické obtíže (deprese). Popsáno bylo i poškození funkce štítné žlázy. Při souběžném užívání s D-cykloserinem se objevují delirantní stavy a záchvaty. [60]

Léčivo je vyhrazeno pouze pro terapii MDR/XDR tuberkulózy. Doporučená dávka je 15 až 20 mg na kg tělesné hmotnosti denně. [60] Přípravek s touto účinnou látkou není v ČR dostupný.

Ostatní inhibitory buněčné stěny

Mimo výše zmíněných léčiv se používají i další inhibitory výstavby buněčné stěny např. vankomycin [61, 62], amoxicilin/klavulanát [63], thioacetazon [64], karbapenemy [65] apod., jedná se však o léčiva 3. volby, a tedy spíše doplňková.

3.2 Léčiva cílící na jaderné struktury

3.2.1 Inhibitory syntézy nukleových kyselin

Rifampicin

Je polosyntetické širokospektré antibiotikum (**Obr. 16**), derivát rifamycinu, dnes využívaný především k terapii mykobakterií, pouze v řádně zdůvodněných případech se smí použít např. ke kombinační terapii těžkých stafylokokových infekcí nebo legionelózy. [66] Jedná se o léčivo 1. volby, je předepisováno zásadně do kombinace s dalšími antituberkulotiky.

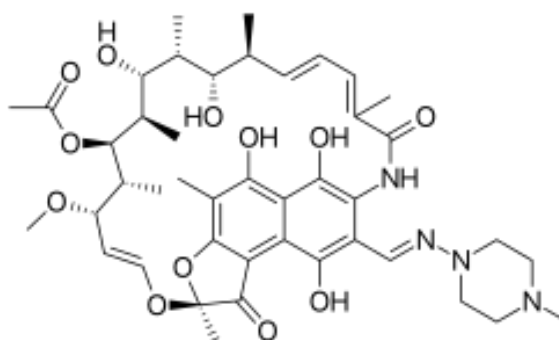
S ohledem na rychle se vyvíjející rezistenci mykobakterií na rifampicin (RIF) je nezbytné stanovit citlivost pacientova kmene. Zjištěná rezistence může být důvod ke generální revizi pacientova léčebného schématu, je třeba držet se oficiálních doporučení WHO. Primární rezistence *Mtb.* na RIF je méně běžná. [67, 68]

V nízké dávce působí bakteriostaticky, ve vyšší potom baktericidně. Hodí se rovněž k terapii atypických mykobakterií, a dokonce i lepry. Dospělí užívají 400-600 mg jednou denně. Tyto dávky platí i v intermitentním léčebném režimu. Podává se p. o. ve formě tobolek, rychle a dobře se resorbuje z GIT, maximálních sérových koncentrací se dosahuje 2-3 hodiny od podání. Dobře prostupuje do tkání, tekutin a také do cerebrospinálního likvoru. [69]

Předpokládá se, že rifampicin způsobuje inhibici bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy, k níž zřejmě dochází v důsledku vazby léčiva v podjednotce polymerázy hluboko v kanálu DNA/RNA, což usnadňuje přímé blokování prodlužující se RNA. [70]

Nežádoucí účinky jsou spíše mírné a RIF bývá pacienty dobře tolerován. Mezi typické NÚ patří elevace aminotransferáz, lehčí obtíže GIT (nauzea, vomitus, průjem) nebo změny v krevním obrazu (KO; např. trombocytopenii). Rifampicin je silným induktorem CYP3A4 (cytochrom P450), z toho vyplývá, že u polymorbidních pacientů musí být upraveno dávkování léčiv, která odbourává právě výše zmíněný enzym (amlodipin, simvastatin a mnoho dalších). Dalším nepříjemným vedlejším účinkem je zbarvení tělesných tekutin do oranžova (vč. slz). [69]

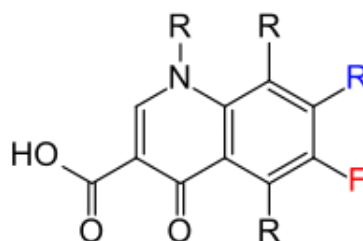
Rifampicin je v ČR dostupný.



Obrázek 16 – Rifampicin

Fluorované chinolony

Fluorované chinolony (FC, **Obr. 17**) jsou primárně baktericidní širokospektrá chemoterapeutika používaná v terapii různých infekcí. V terapii TBC se využívají fluorované chinolony napříč všemi vývojovými generacemi [71] (mimo první, které se dnes již nepoužívají vůbec).



Obrázek 17 – Základní struktura fluorovaných chinolonů

FC mají poměrně široké spektrum účinku (při terapii TBC spíše nevýhoda) a rovnoměrnou systémovou distribuci. Mají silný a rychlý baktericidní účinek proti G- bakteriím, některým mykobakteriím, stafylokokům aj. [71]

Fluorované chinolony uplatňují svůj baktericidní účinek prostřednictvím inhibice enzymu DNA gyrázy (enzym zodpovědný za rozplétání vláken nukleových kyselin při replikaci), následkem toho replikace neproběhne správně, DNA je poškozena a bakterie umírá. V terapii TBC se nejvíce uplatní levofloxacin a moxifloxacin⁵. Do terapie se zavádí vždy pouze jeden, neboť mají všechny totožný mechanismus účinku. [71] [72] Dávkování se řídí zvláště podle předepsané účinné látky. Např. ciprofloxacin se podává po 500 mg dvakrát denně. [73]

Nežádoucí účinky bývají podobné pro všechny FC, patří sem mykotické infekce, změny v krevním obraze, lehké poruchy CNS (nespavost, tinnitus), obtíže GIT (nauzea, zvracení, podráždění žaludku), zvýšení alkalické fosfatázy v krvi atd. [73]

Jich účinnost obecně stejná nebo vyšší než účinnost aminoglykosidů.

V ČR jsou FC až na výjimky dostupné.

Klofazimin

Je léčivo strukturně odvozené od fenazinu, používané především v kombinované terapii lepry (etiologicky *Mycobacterium leprae*), nicméně své uplatnění nachází i v terapii MDR/XDR TBC. [74]

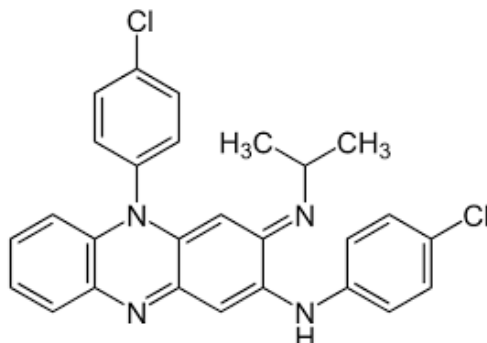
Mechanismus účinku tohoto léčiva je poměrně problematicky uchopitelný, není přesně objasněn, a navíc se zdá, že klofazimin (**Obr. 18**) působí vůči mykobakteriím hned několika mechanismy. Nicméně, je známo, že se kromě dalšího, váže na mykobakteriální DNA, čímž inhibuje replikaci DNA a buněčný růst. Dále jsou popsány jeho účinky proti membránám včetně bakteriálního dýchacího řetězce a iontovým transportérům. Klofazimin vykazuje zároveň protizánětlivé a imunosupresivní účinky. [74, 75]

Klofazimin může zbarvovat kůži a tělesné sekrety pacientů, podobně jako rifampicin, ovšem tentokrát narůžovo, jinak jsou NÚ spíše lehčí, většinou postihující GIT. Vzácně může, vzhledem k dlouhému vylučovacímu poločasů krystalizovat

⁵ každý z jiné generace

v orgánech. Dávkování se upravuje přísně individuálně i s ohledem na další užívaná léčiva. [76]

Klofazimin je v ČR dostupný v rámci specifického léčebného programu.



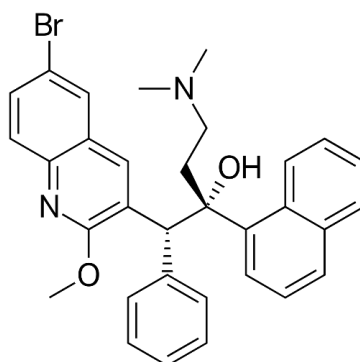
Obrázek 18 – Klofazimin

3.2.2 Inhibitor syntézy ATP

Bedachilin

Bedachilin (**Obr. 19**) je relativně nové (poprvé registrován 2012) a jediné antituberkulotikum ze skupiny diarylchinolinů. Léčivo je schváleno pro použití jako součást kombinované terapie plicní MDR-TBC u dospělých, pokud nelze poskytnout jiný účinný léčebný režim. Je účinný proti aktivní i latentní TBC. [77, 78]

Mechanismus účinku bedachilinu spočívá ve schopnosti inhibovat protonové pumpy mykobakteriální ATP syntázy (konkrétně vazbou na podjednotku c ATP syntázy), mykobakteriální buňka tedy nemůže efektivně hospodařit s ATP a zaniká. Gen kódující podjednotku c ATP syntázy se označuje jako *atpE* a jeho aminokyselinová sekvence je vysoce konzervována i v nepříbuzných izolátech *M. tuberculosis*. [77, 78]



Obrázek 19 – Bedachilin

Jak již bylo uvedeno, bedachilin je předepisován až v případě, že ostatní způsoby léčby nepřinesly uspokojivé výsledky. To je kromě dalších důvodů dáno především

poměrně pestrou paletou, někdy i velmi závažných, nežádoucích účinků (včetně smrti). Přibližně 11,4 % pacientů užívajících přípravek Sirturo (bedachilin-fumarát) zemřelo v průběhu klinických studií ve srovnání s 2,5 % pacientů užívajících placebo. Existuje předpoklad, že přípravek může ve zvýšení míře negativně ovlivňovat činnost srdce. Ovšem běžněji se ve dvou hodnocených klinických studiích objevovaly pouze nauzea, bolest kloubů a bolest hlavy. [78-81] Standardní kúra trvá 24 týdnů a dávkování je upravováno individuálně. [78]

Léčivo je v ČR registrováno.

3.3 Inhibitory proteosyntézy

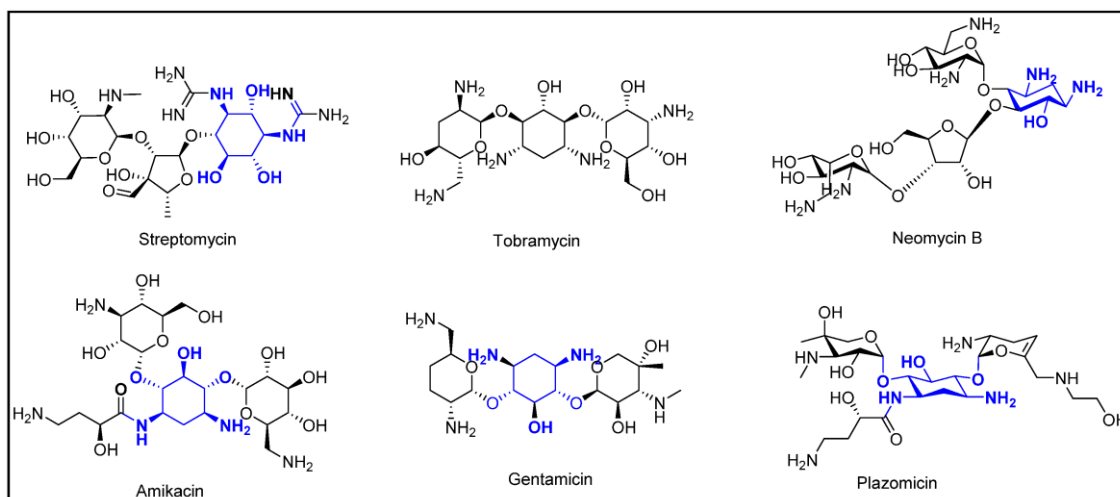
Aminoglykosidy

K terapii TBC se již od 40. let minulého století využívají také aminoglykosidová antibiotika (**Obr. 20**). Prvním léčivem z této kategorie, u kterého byly jasně prokázány antituberkulotické účinky, byl streptomycin (STM). [82] Streptomycin je považován dokonce za úplně první antituberkulotikum, Selman Waksman byl za jeho objev honorován Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu (1952). [83]

Postupem času se antimykobakteriální aktivita prokázala i u dalších léčiv z této skupiny, jmenovitě u kanamycinu nebo amikacinu. Podobný mechanismus účinku má i polypeptid kapreomycin. Bohužel mezi aminoglykosidy zcela prokazatelně existuje zkřížená rezistence (stejně jako v případě vzájemné rezistence mezi fluorovanými chinolony). [84, 85] Také kvůli poměrně rozšířené rezistenci se dnes aminoglykosidy indikují k terapii TBC méně než např. v poválečných letech, kdy byl streptomycin hojně předepisován. Dnes se podávají injekčně jako podpůrná léčba u komplikovanějších případů TBC.

Mezi antituberkulotiky mají však aminoglykosidy nezaměnitelné postavení z hlediska jejich mechanismu účinku, který spočívá v inhibici proteosyntézy. Např. STM se po průniku mykobakteriálními buněčnými obaly ireverzibilně se váže na 30S podjednotku ribozomu, což způsobí nesprávné přečtení kodonu, tím blokuje syntézu proteinů a nakonec vede ke smrti mykobakterie. Zásadní nevýhodou této skupiny léčiv je fakt, že cílová struktura léčiva se nenachází pouze v patogenu, ale i v hostiteli (člověku), od toho se odvíjí i závažné nežádoucí účinky při poměrně úzkém terapeutickém okně. [86]

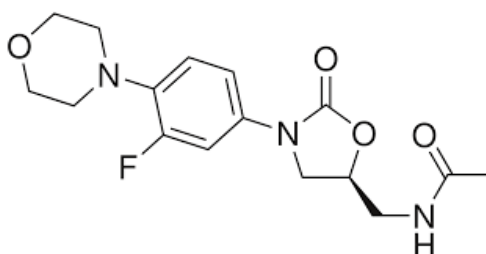
Mezi často vzpomínané nežádoucí jevy patří např. závažné alergické reakce. [87]



Obrázek 20 – Struktury vybraných aminoglykosidových antibiotik [87]

Linezolid

Další plně syntetický antimykobakteriálně účinný inhibitor proteosyntézy ze třídy oxazolidinonů je linezolid (**Obr. 21**). Jedná se o velice účinné antibiotikum původně určené k terapii různých infekcí (např. methicilin-rezistentním zlatým stafylokokem, nebo vankomycin-rezistentními enterokoky), nejedná se totiž primárně o antituberkulotikum jako takové. Pro terapii TBC se používá právě tehdy, když standardní léčebný protokol není dostačující či není pacientem dobře tolerován. [88]



Obrázek 21 – Struktura linezolidu

Užívání linezolidu je relativně bezpečné, zejména je-li užíván krátkodobě. Nežádoucí účinky jsou spíše mírné, typicky se objevují bolesti hlavy nebo nevolnost. Při dlouhodobém užívání může docházet k poškození nervové soustavy, např. zrakového nervu. Určitá opatrnost je na místě, pokud má být linezolid užíván pacienty léčených psychofarmaky, neboť je slabým inhibitorem monoaminoxidázy, může tak vyvolávat serotoninový syndrom. [89]

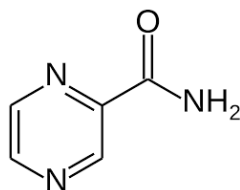
Mechanismus účinku MÚ linezolidu není shodný s MÚ aminoglykosidů nebo jiných inhibitorů proteosyntézy. Linezolid totiž inhibuje proteosyntézu v jejím samotném

začátku, narušením translace mediátorové RNA do proteinů v bakteriálních ribozomech. [89, 90] Vzhledem k tomu, že MÚ linezolidu je unikátní, tak není pozorována zkřížena rezistence linezolidu s dalšími léčivy.

3.4 Ostatní léčiva

Pyrazinamid

Pyrazinamid (PZA; **Obr. 22**), strukturální analog odvozený nikotinamidu, byl poprvé chemicky syntetizován roku 1936, nicméně jeho antituberkulotické vlastnosti byly poprvé popsány až v roce 1952. [91, 92]



Obrázek 22 – Pyrazinamid

Pyrazinamid zaujímá mezi antituberkulotiky unikátní místo vzhledem ke svému mechanismu účinku, je totiž schopen velmi účinně likvidovat především nereplikující se mykobakterie (persistory) a je tak obvykle přidáván do každého terapeutického režimu (vždy v kombinaci s INH, RIF a EMB). Jeho aktivita je závislá na pH prostředí, které se mění v závislosti na metabolické aktivitě mykobakteriální buňky (např. v prostředí zánětu v okolí makrofágů se nachází kyselé pH, stejně tak uvnitř těchto buněk). Při ústupu zánětu, kdy se hodnota pH zvyšuje, snižuje se zároveň baktericidní aktivita pyrazinamidu. Pacienti mají tedy z PZA nejvyšší přínos v raných fázích onemocnění. [92]

Pyrazinamid je proléčivo, které je konvertováno pyrazinamidázou/nikotinamidázou na kyselinu pyrazinovou, která podle současných poznatků efektivně inhibuje enzym panD (aspartát dekarboxylázu), což narušuje schopnost mykobakterií syntetizovat koenzym A. [93] Dávkování je voleno individuálně, doporučená denní dávka pyrazinamidu je 25 mg/kg tělesné hmotnosti (maximálně 2,5 g denně). V intermitentním schématu je doporučená dávka pyrazinamidu 35 mg/kg tělesné hmotnosti a podává se třikrát týdně. Mezi běžné nežádoucí účinky patří hyperurikémie, zažívací obtíže, zvýšené hladiny jaterních enzymů a fotosenzitivita. [94]

PZA nemá aktivitu vůči atypickým mykobakteriím.

V ČR je PZA registrovaný v rámci specifického léčebného programu.

3.5 Léčba

Přes svou závažnost je TBC relativně úspěšně léčitelná. Základní léčba v DOTS se opírá o souběžné podávání několika odlišných antituberkulotik v přesně definovaných časových úsecích a dávkách. Lékař nebo jiná pověřená osoba podává pacientovi léčiva a tato osoba je zároveň povinna se vhodným způsobem přesvědčit, zda pacient léky skutečně požil (resp. že mu byla léčiva aplikována). Pacient má být lékařem řádně informován o svém zdravotním stavu a poučen. [95, 96]

Schéma dva měsíce trvající iniciální fáze léčby nerezistentní TBC se optimálně na základě výsledků vyšetření citlivosti a za hospitalizace sestává z čtyř- až pětikombinace:

- Isoniazidu (INH, H)
- Pyrazinamidu (PZA, Z)
- Ethambutolu (EMB, E)
- Rifampicinu (RIF, R)
- Možno doplnit ještě o streptomycin (STM, S), případně zaměnit EMB za STM.

Po zvládnutí akutní fáze se pacient obvykle převede na režim pokračovací terapie, která je vedena ambulantně a sestává z denního (příp. intermitentního) podávání kombinace INH a RIF po dobu 4 měsíců nebo denního podávání INH a EMB po dobu alespoň 6 měsíců. Léčebný režim se pro pacienty volí vždy individuálně s přihlédnutím k celkovému zdravotnímu stavu (komorbidity, imunokompetence, lokalizace primárního ložiska apod.) a celková doba léčby se tímto může prodlužovat i na 24 měsíců a více. [97]. Léčba celkově působí pacientovi diskomfort ve smyslu nutnosti dodržování přísných režimových opatření, jako je na počátku pobyt na izolaci, užívání velkého množství léčiv a s tím spojený výskyt nežádoucích účinků, pracovní neschopnost aj. V zemích s nedostatečně rozvinutou zdravotnickou infrastrukturou a sociální politikou tato pacientova tíže často vyústí v non-adherenci k léčbě a jejímu přerušování/ukončení a v tomto okamžiku nastává kritický bod.

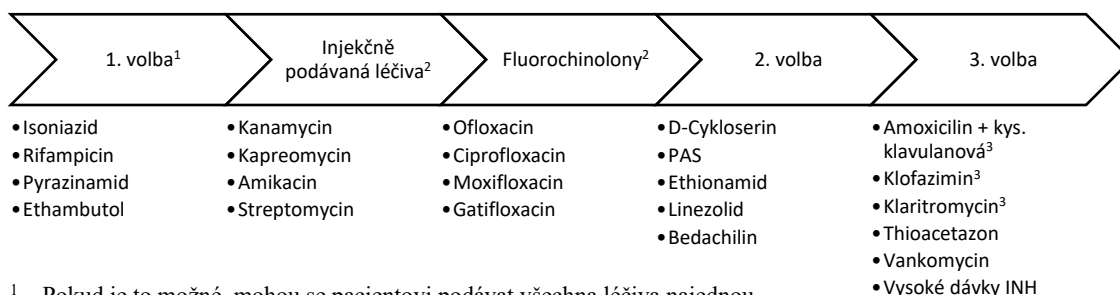
3.6 Léčba rezistentní TBC

Statistická data referují, že při úplném dodržení nastaveného komplexního léčebného režimu asi 85 % nemocných zcela vyzdraví. Nicméně situace je bohužel komplikována evolučně řízenou selekcí tuberkulózních kmenů s různými profily

sekundární rezistence vůči používaným léčivům, která je právě důsledkem nezvládnutí léčebného režimu v celém jeho předepsaném rozsahu. [1]

Mimo různých dílčích podtypů sekundární rezistence se zajímáme především o:

- TBC rezistentní vůči isoniazidu,
- RR-TBC
- MDR-TBC, manifestuje se získanou necitlivostí na INH a RIF,
- pre-extenzívně rezistentní tuberkulózu (pre-XDR-TBC), rezistentní vůči RIF a FC, a
- extenzívně rezistentní tuberkulózu (XDR-TBC), která je *ditto* necitlivá na INH a RIF, ale navíc ještě vůči minimálně jednomu FC (např. levofloxacin) a alespoň jednomu dalšímu léčivu skupiny A (léky skupiny A jsou nejsilnější skupinou léčiv v žebříčku léků druhé volby pro léčbu lékově rezistentních forem TBC za použití delších léčebných režimů a zahrnují kromě FC bedachilin a linezolid). [98, 99]



¹ – Pokud je to možné, mohou se pacientovi podávat všechna léčiva najednou

² – Z každé kategorie pouze jedno léčivo

³ – Pouze jako podpůrná léčba

Obrázek 23 - Terapeutický algoritmus podávání antituberkulotik [1]

Léčba rezistentních TBC infekcí je skutečnou klinickou výzvou. Prognóza pacientů nakažených těmito kmeny je podstatně méně příznivá ve srovnání s pacienty, kteří byli nakaženi citlivým kmenem, zvládnutí této infekce je přitom podmíněno roky léčby. Lékař volí další léčiva podle stanovené citlivosti. Terapeutický algoritmus podávání některých konvenčně používaných léčiv a jejich zařazení do kategorií předkládá **Obr. 23**. [98-100] Schéma volně sestaveno dle WHO. [1]

Kromě léčiv uvedených v ilustraci se v případě nutnosti používají i další antibiotika (chemoterapeutika), jako např. vankomycin, karbapenemy (zejm. kombinace

imipenemu a cilastatinu) aj. Relativní průlom v léčbě tuberkulózy způsobil objev bedachilinu, delamanidu a pretomanidu. [61, 101]

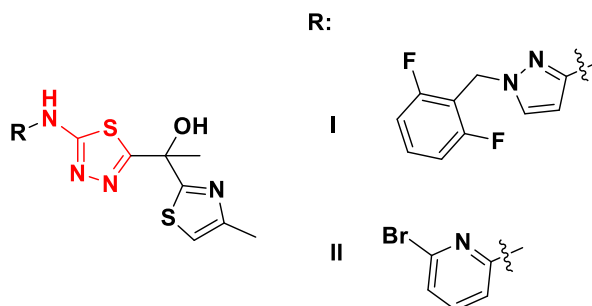
4 Přímé inhibitory InhA

Enoyl-acyl-carrier protein reduktáza (ENR) je posledním enzymem cyklu prodlužování řetězců mastných kyselin. Biosyntéza mastných kyselin je nezbytná pro přežití savců, rostlin, hub a bakterií a na rozdíl od většiny klíčových enzymů v této základní dráze, vykazuje ENR pozoruhodnou rozmanitost mezi organismy. [102] Rostoucí zájem o ENR je určován především skutečností, že řada syntetických i přírodních antimykobakteriálně účinných sloučenin specificky cílí právě na jejich aktivitu. [103] Antituberkulotikum první volby INH nebo antibakteriálně účinný triklosan inhibují mykobakteriální enoyl-acyl carrier protein reduktázu (InhA) a jsou velmi účinnými prostředky používanými k eliminaci *Mtb*. [104]

Bohužel, MDR- a XDR-TB izoláty jsou vůči INH rezistentní, důvodem mohou být např. mutace genu *katG* kódujícího katalázu-peroxidázu KatG (způsobí deaktivaci neesenciálního enzymu), zodpovědnou za aktivaci INH. [105]

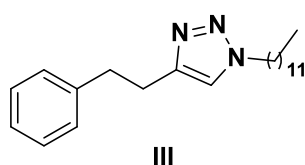
Z hlediska vývoje léčiv proti TBC jsou tedy nesmírně atraktivní sloučeniny schopné inhibovat InhA bez nutnosti předchozí aktivace pomocí KatG (tzv. přímých inhibitorů). To vedlo k rozsáhlému úsilí o identifikaci těchto přímých inhibitorů. [106-108] Během posledních dvou desetiletí přineslo toto úsilí množství vysoce aktivních strukturálně rozmanitých přímých inhibitorů InhA, ale zatím s omezeným úspěchem při dosahování perorálně aktivní kandidátní molekuly s účinností *in vivo*.

Velkou sérii zajímavých tetracyklických struktur s thiaziazolovým jádrem patenty společnosti GSK a AstraZeneca. [109] Sloučenina I vykazovala výbornou inhibiční aktivitu vůči rostoucím buňkám *Mtb*. (MIC 0,2 μM), byla stanovena i střední inhibiční koncentrace (IC_{50}) vůči InhA, rovněž s velmi povzbudivou hodnotou 4 nM.

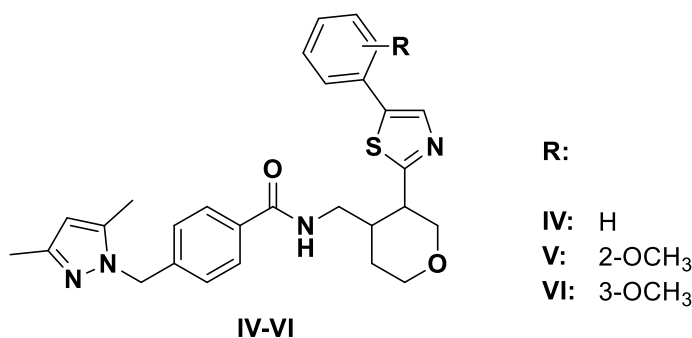


Tuto strukturu při zachování thiadiazolaminového fragmentu dále modifikovali Šink *et al.* ve spolupráci s GSK, rovněž s velmi dobrými výsledky. [110] Minimální inhibiční koncentrace nejlepší sloučeniny **II** vůči celým buňkám *Mtb.* byla 2 μM a IC_{50} vůči InhA = 13 nM.

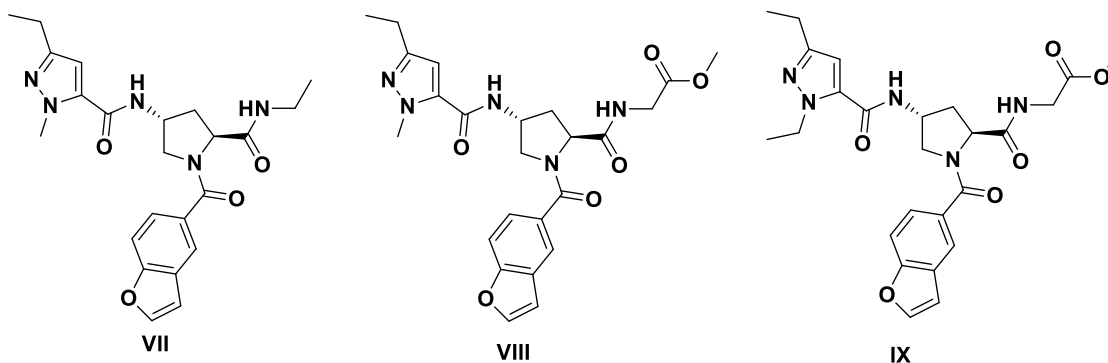
Syntézou a hodnocením biologické aktivity triazolových derivátů jako inhibitorů InhA se zabývali Menendez *et al.* [111] Některé z připravených sloučenin byly shledány inhibitory InhA. Nejlepší inhibiční aktivitu (40% inhibice při koncentraci 50 μM) stejně jako nejnižší hodnotu $\text{MIC} \leq 5.9 \mu\text{M}$ vykazala sloučenina **III** nesoucí dvanáctiuhlíkatý alkylový řetězec.



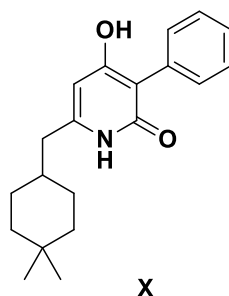
Přímé inhibitory InhA s antimykobakteriální aktivitou na bázi tetrahydropyranu navrhli a připravili ve spolupráci s GSK Pajk *et al.* [112] Předlohová struktura **IV** vykazovala IC_{50} 0,02 μM a MIC 11,7 μM , její dvě modifikace potom IC_{50} 0,036 μM a MIC 5 μM pro sloučeninu **V** a IC_{50} 0,323 μM a MIC 20 μM (sloučenina **VI**).



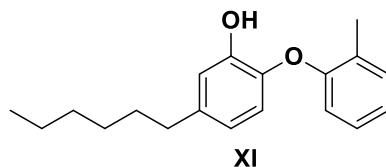
Encias *et al.* [106] provedli podrobnou studii kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR) nových inhibitorů. Modelová sloučenina **VII** navržená pomocí výpočetní techniky vynikala dobrou inhibiční aktivitou vůči InhA (IC_{50} = 0,034 μM), avšak antituberkulotická aktivita vyjádřena MIC byla poměrně nízká (8 μM). Strukturálními obměnami byly připraveny další sloučeniny **VIII** a **IX** s výrazně lepšími farmakochemickými parametry. Sloučenina **VIII** vykazovala inhibiční aktivitu vůči InhA s IC_{50} 0,005 μM a MIC = 0,5 μM , kdežto **IX** měla IC_{50} 0,003 μM a MIC 0,05 μM . Došlo tedy k podstatnému vylepšení žádaných vlastností předlohové struktury **VII**.



Manjunatha *et al.* ve spolupráci s firmou Novartis vytvořili sérii 4-hydroxy-2-pyridonů se zajímavými antituberkulotickými vlastnostmi. [103] Nejúspěšnější sloučenina **X** (NITD-916) vykazovala silné baktericidní účinky. Byla zkoumána aktivita proti mnoha INH-rezistentním kmenům *Mtb.* a *in vivo* účinnost v modelech akutní a chronické infekce. Sloučenina **X** je s MIC 0,05 μM účinnější než INH (MIC = 0,33 μM) a srovnatelně účinná s bedachilinem (MIC = 0,04 μM). 4-Hydroxy-2-pyridonová analoga všeobecně vykazovala jak koncentračně, tak časově závislou baktericidní aktivitu proti *in vitro* replikujícím se *Mtb.* a byly také aktivní proti *Mtb.* v makrofázích.

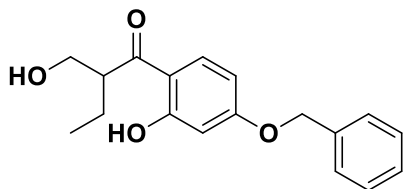


Velmi úspěšným derivátem ze skupiny diaryletherů (derivát triklosanu) je sloučenina PT70 (**XI**), která vykazovala InhA $\text{IC}_{50} \leq 50$ nM a MIC = 3,125 $\mu\text{g/ml}$. [113]

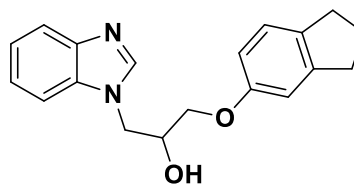


Kamsri *et al.* hledali nové inhibitory InhA pomocí virtuálního screeningu. [114] V rámci tohoto experimentu bylo identifikováno a vybráno šestnáct sloučenin pro biologické testy *in vitro*, z nichž dvě (**XII** a **XIII**) vykazovaly MIC 12,5 a 25 $\mu\text{g/ml}$ proti *M. tuberculosis* H₃₇Rv a vykazovaly proti purifikované rekombinantní InhA hodnoty IC_{50} 0,38 a 0,22 μM . Krystalová struktura nejúčinnější sloučeniny **XIII** navázané na InhA

odhalila, že inhibitor obsazuje hydrofobní kapsu, která se podílí na vazbě alifatických částí substrátů InhA, ale je vzdálená od kofaktoru NADH, tj. v místě odlišném od míst obsazených velkou většinou známých inhibitorů InhA.



XII



XIII

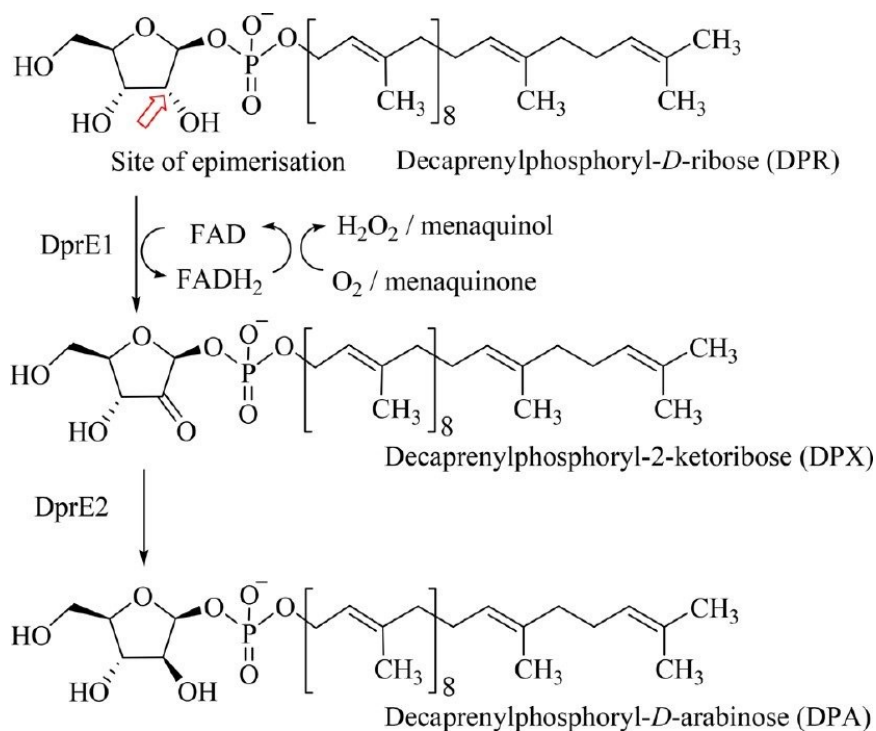
Příklady dalších přímých inhibitorů InhA ze třídy formazanů kyseliny gallové, pyrrolidinonů a pyrrolidinových derivátů nebo benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-onů uvádí review Al Matar *et al.* [115]

InhA je nesporně jedním z mála klinicky ověřených cílů při vývoji léčiv proti TBC. Bylo rozpracováno a identifikováno mnoho nových tříd přímých inhibitorů InhA, avšak bohužel existují i mykobakteriální kmeny rezistentní vůči těmto sloučeninám. Např. McNeil *et al.* [116] popsali rezistenci dvou TBC kmenů na recentně zkoumaný přímý inhibitor NITD-916. Všechny mutanty rezistentní na NITD-916 ale nebyly zkříženě rezistentní vůči INH. Tuto rezistenci nejspíš způsobily mutace blízko aktivní místa InhA nebo v oblasti promotoru *fabG* *inhA*.

5 Inhibitory DprE1

Dekaprenylfosforyl- β -D-riboza 2'-epimeráza (DprE1) je životně důležitý mykobakteriální enzym, který hraje klíčovou roli v biosyntetické dráze určitých složek mykobakteriální buněčné stěny (lipoarabinomannanu a arabinogalaktanu). DprE1 katalyzuje přeměnu dekaprenylfosfo- β -D-ribozy na dekaprenylfosfo- β -2'-keto-D-ribozu (DPX). Následně enzym dekaprenylfosforyl-D-2-keto-*erythro*-pentóza reduktáza (DprE2) katalyzuje přeměnu DPX na dekaprenylfosfo- β -D-arabinózu (DPA). Vytvořená DPA je považována za klíčový prekurzor, který slouží jako donor arabinózy potřebný pro syntézu biopolymerů mykobakteriální buněčné stěny. [117-119] Shrnutí v **Obr. 24**.

Bylo rovněž zjištěno, že mykobakterie nemají k dispozici žádnou alternativní cestu syntézy DPX, jak dokazují studie na *Mtb.* s inaktivovanou DprE1 (vyřazení DprE1 indukuje smrt buňky). [118]



Obrázek 24 – Činnost DprE1-DprE2 komplexu [119]

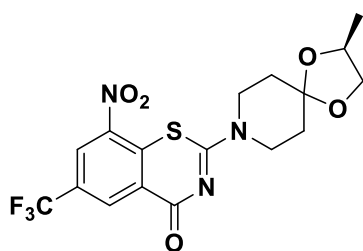
Byla vyvinuta celá řada sloučenin s různými strukturálními motivy, které cílí na tento enzymový komplex. Mezi atraktivní strukturální motivy patří např. triazoly, benzothiazoly, chinoxazoliny, dinitrobenzamidy, benzothiazinony a mnoho dalších. [119]

5.1 Benzothiazinony

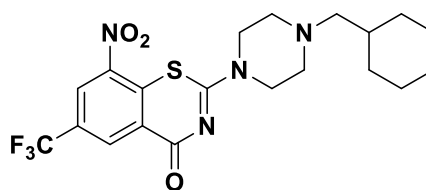
Velmi významnou sloučeninou ze třídy benzothiazinonů je BTZ043 **XIV** s MIC vůči *Mtb.* pouze 1 ng/ml. BTZ043 je silný inhibitor DprE1 s IC₅₀ = 0,00425 μ M.

Sloučenina se ukázala být aktivní také při intracelulární infekci *Mtb.* v makrofázích a na myším modelu chronické tuberkulózy a nevykazovala žádné známky toxicity nebo mutagenity v koncentracích značně převyšujících koncentrace použité pro experimenty. Nicméně takto nízká MIC se ve studiích na zvířatech nepromítla do alespoň srovnatelně vysoké účinnosti. Byly proto provedeny další strukturální modifikace, nejvýznamnější **XV**, která byla později nazvána makozinon. [120]

Makozinon (**XV**, PBTZ-169) je jedním z řady připravených piperazin-benzothiazinonových derivátů předlohy BTZ-043. [121] Ukázalo se, že (cyklo)alkylové deriváty byly v rámci této série neaktivnější a některé z nich dosáhly MIC mezi 0,19–0,75 ng/ml vůči *Mtb.* Makozinon byl vybrán jako nejvhodnější kandidát pro další testy. Později bylo zjištěno, že po *in vivo* redukci inhibuje esenciální flavoprotein DprE1 vytvořením kovalentní vazby s aktivním zbytkem Cys387. [122] Tato sloučenina je nyní ve fázi klinického hodnocení.



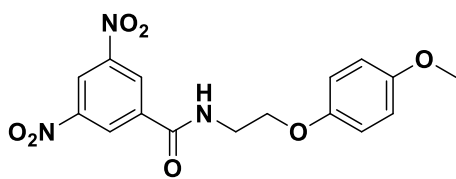
XIV (BTZ-043)



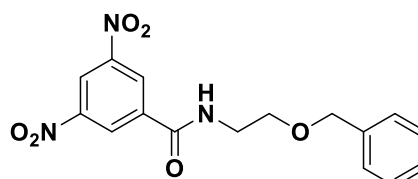
XV (PBTZ-169)

5.2 Dinitrobenzamididy

Christophe *et al.* [123] publikovali výsledky screening knihovny čítající 57 000 malých molekul, v rámci, něhož identifikovali 135 aktivních sloučenin se silnou intracelulární antimykobakteriální aktivitou, navíc bez toxicity pro hostitelské buňky. Mezi nimi byly dva dinitrobenzamidové deriváty **XVI** a **XVII** (DNB1 a 2), které vykazovaly vysokou aktivitu proti *Mtb.*, a to včetně XDR kmenů. Prokázána byla i inhibice tvorby lipoarabinomannanu i arabinogalaktanu, což lze přičíst blokádě syntézy DPA katalyzované komplexem DprE1/DprE2 ($IC_{50} = 0,2 \mu M$). I zde se jedná o kovalentní inhibitory.



XVI (DNB1)



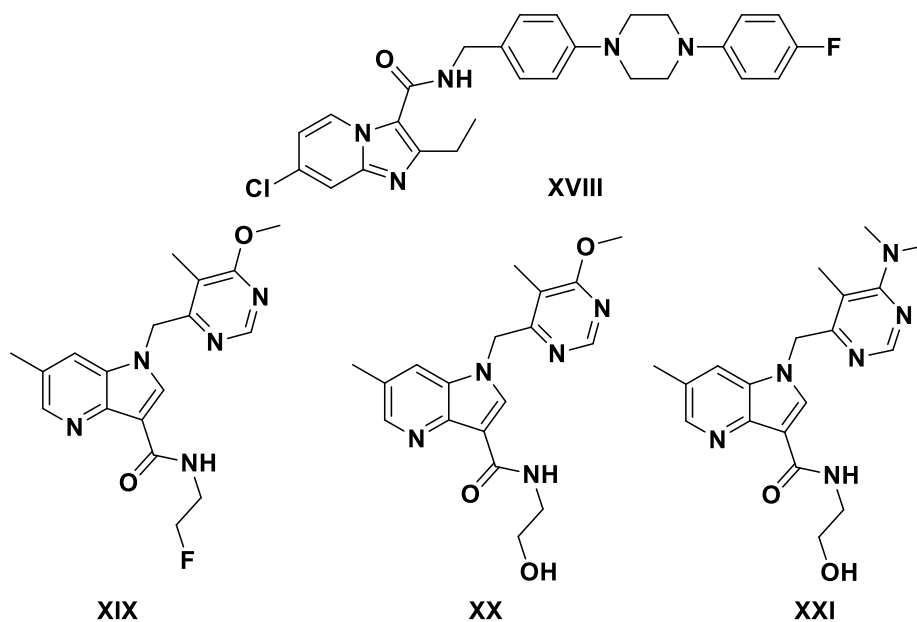
XVII (DNB2)

5.3 Azaindoly

Shirude *et al.* [124] představili sérii 23 azaindolových derivátů jako novou třídu potenciálních antituberkulotik. Bylo prokázáno, že sloučeniny tohoto strukturního motivu spolehlivě hubí *Mtb.* *in vitro* a navíc prokazují účinnost na myších modelech. Nová série vzešla z modifikace sloučeniny **XVIII**, která sice vykazovala velmi dobré hodnoty MIC vůči *Mtb.* (0,017 μM), avšak její schopnost inhibovat DprE1 byla slabší ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). Nově připravené sloučeniny **XIX**, **XX** a **XXI** vynikají nejen dobrými hodnotami MIC vůči *Mtb.* (<0,39 μM pro **XIX**, 1,56-3,12 μM pro **XX** a 0,5-1,56 μM pro **XXI**), ale bylo rovněž prokázáno, že nekovalentně inhibují DprE1 (IC_{50} pro **XIX** = 0,003-0,015 μM , pro **XX** 0,010-0,03 μM a 0,032 μM pro **XXI**). Data shrnuje tabulka (**Tab. 1**).

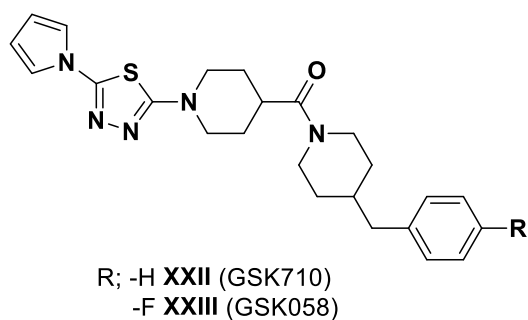
Tabulka 1 – Inhibiční aktivita vybraných azaindolů

Sloučenina	IC_{50} [μM]	MIC [μM]
XVIII	>10	0,017
XIX	0,003-0,015	<0,39
XX	0,010-0,03	1,56-3,12
XXI	0,032	0,5-1,56

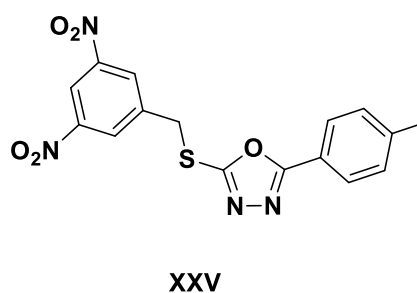
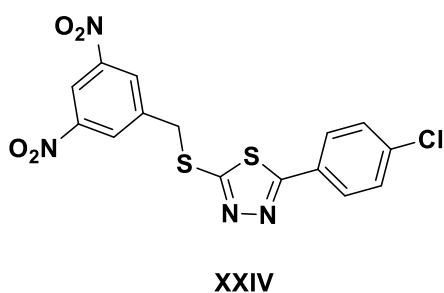


5.4 Thiadiazoly

Batt *et al.* [125] testovali inhibiční aktivitu vůči DprE1 u série 177 sloučenin s předpokládanou antituberkulotickou aktivitou. Nejlépe hodnoceny byly sloučeniny **XXII** (GSK710) a **XXIII** (GSK058). Pro obě sloučeniny byly zjištěny hodnoty $\text{IC}_{50} = 0,054 \mu\text{M}$ a MIC (*Mtb.* pMV261) 4 μM .

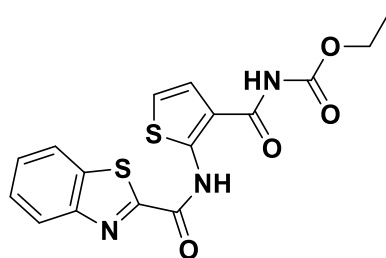


Karabanovich *et al.* [126] reportovali podrobnou studii antimykobakteriálních 5-substituovaných 2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-thiadiazolů (a izosterních 1,3,4-oxadiazolů). Většina těchto sloučenin vykazovala vynikající *in vitro* aktivitu proti *Mtb.* H₃₇Rv a šesti multirezistentním klinickým izolátům *Mtb.* s hodnotami MIC 0,03-0,06 μM. Zkoumané sloučeniny měly vysoce selektivní antimykobakteriální účinek, protože nevykazovaly žádnou aktivitu proti jiným bakteriím nebo plísním. Oxadiazolové a thiadiazolové deriváty **XXIV** a **XXV** s nejvyšší aktivitou a nejpříznivějšími profily toxicity také ukázaly účinnost srovnatelnou s RIF proti nereplikujícímu *Mtb.* kmenu Lux18b. Sloučeniny byly identifikovány jako inhibitory DprE1.



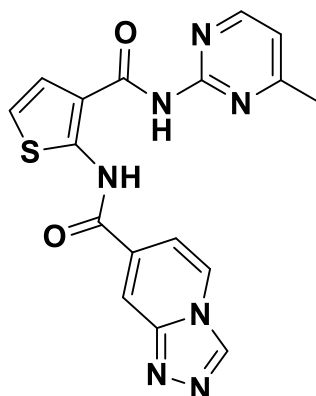
5.5 Benzothiazoly a triazolopyridiny

Buněčný fenotypový screening inhibitorů tvorby mykobakteriálního biofilmu provedený Wangem *et al.* [127] identifikoval malou molekulu **XXVI** (TCA1), která má baktericidní aktivitu proti *Mtb.* kmenům citlivým i lékově rezistentním. Navíc má tato sloučenina baktericidní aktivitu i vůči nereplikujícímu se *Mtb.* *in vitro* a je účinná v myších modelech akutní a chronické infekce. Sloučenina inhibuje výstavbu mykobakteriální buněčné stěny, kromě jiného také interakcí s DprE1.



XXVI (TCA1)

Sloučenina **XXVI** (TCA1) posloužila jako předlohová struktura pro výzkum nekovalentních inhibitorů DprE1. Liu *et al.* [128] prováděli strukturální modifikace **XXVI** na thiofenovém cyklu, benzothiazolovém scaffoldu a karbamátové uskupení nahradili různými heterocykly. Přestože tyto modifikace vedly k zvýšení inhibice DprE1, způsobovaly také zvýšení inhibice CYP2C9 (což vede k lékovým interakcím). Z jejich výzkumu nakonec vzešla sloučenina **XXVII** (TCA711), ačkoliv připomíná předlohovou strukturu jen vzdáleně, je velmi selektivním inhibitorem DprE1 s $IC_{50} = 0,03 \mu M$ (IC_{50} pro CYP2C9 $>50 \mu M$).



XXVII (TCA711)

Inhibitory DprE1/DprE2 komplexu jsou klinicky maximálně zajímavé, neboť žádné léčivo cílící na tento enzym dosud nebylo impementováno do klinické praxe, a tak sloučeniny spolehlivě inhibující tyto enzymy mohou představovat naději pro zvládnání terapie vysoce rezistentních mykobakterií. Bohužel už dnes, ještě dříve, než bylo vůbec registrováno jediné léčivo cílící na tyto enzymy, byly hlášeny případy mírnější zkřížené rezistence BTZ043 a PBTZ169 s bedachilinem (mutace genu *rv0678*). I když zatím není jasné, zda by mutace *rv0678* učinily benzothiazinony neúčinnými při léčbě TBC, tyto výsledky zdůrazňují důležitost monitorování klinicky převládajících mutací *rv0678* během probíhajících klinických studií BTZ043 a PBTZ169. [129]

6 Cíle práce

Cílem práce je příprava a hodnocení potenciálních antituberkulotik, především nových inhibitorů InhA odvozených od isoniazidu. Toto bude realizováno prostřednictvím logicky aplikovaných strukturních obměn předlokové struktury, kterou je kyselina (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová.

Předlohová struktura byla partikulována do segmentů, které budou postupně obměňovány a na základně získaných experimentálních dat (především hodnot MIC), budou studovány strukturně-aktivitní vztahy vůči referenční sloučenině (isoniazid).

Hlavní zvolenou strukturní obměnou kyseliny bude její převedení na funkční deriváty (amidy a estery) ve snaze získat sloučeniny s vyšší selektivitou, lepším průnikem přes biologické bariéry (zejména schopností pronikat lipofilní buněčnou stěnou mykobakterií) a tím vyšší aktivitou. Pro tvorbu amidů budou vybrány aminy alifatické i aromatické (aniliny, které jsou ještě navíc substituovány funkčními skupinami s různými elektronovými efekty v různých polohách). Estery budou designovány s alifatickými alkoholy a různými deriváty fenolu, jejich sirnými isostery a se sloučeninami s popsanou anti(myko)bakteriální aktivitou s cílem získat sloučeniny s duálním a/nebo potencionálním původním mechanismem účinku.

V rámci dalších strukturních obměn budou studovány vlivy pyruvátového linkeru, redukce dvojně vazby hydrazonu a nutnost přítomnosti pyridin-4-ylového jádra (výměnou za polohové izomery, dodatečná halogenace jádra apod.).

Připravené sloučeniny budou charakterizovány souborem běžných analytických metod (NMR spektroskopie ^1H a ^{13}C jader, IČ spektroskopie, elementární analýza, retenční faktor při TLC a teplota tání).

Všechny připravené sloučeniny budou formou plošného screeningu testovány na jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivitu proti jednomu citlivému kmenu *Mtb.* H₃₇Rv a dvěma kmenům netuberkulózních (atypických) mykobakterií (*M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 6509/96). Sloučeniny se zjištěnými nízkými hodnotami MIC v rámci základního screeningu budou hodnoceny na antimykobakteriální aktivitu vůči panelu osmi MDR- a XDR-TBC kmenů s různými profily rezistence.

U nejslibnějších sloučenin budou hodnoceny cytostatické a cytotoxické vlastnosti na buněčné linii lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2. Míra toxicity bude

vyjádřena hodnotou IC_{50} . U vhodných kandidátů bude experimentálně stanoven mechanismus účinku (bude určováno, zda sloučeniny skutečně inhibují InhA). Finálně budou hodnoceny vztahy mezi strukturou a vykázanou aktivitou. Hodnocení antimykobakteriální aktivity, cytotoxicity a mechanismu účinku bude provedeno externě.

V rámci zahraniční pracovní stáže budou připravovány a studovány peptidové nosiče pro antituberkulotika na bázi tuftsinu.

7 Komentáře

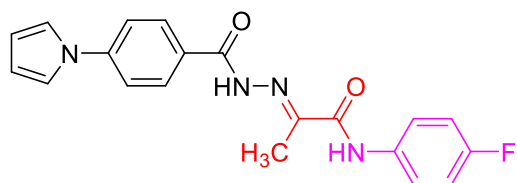
Jednou z možných taktik identifikace a výzkumu nových potenciálních antituberkulotik může být logicky aplikovaná modifikace struktur již dříve zavedených a dobře známých léčiv. [130] Cílem takového snažení je ideálně zvýšení žádané antituberkulotické aktivity, rozšíření spektra účinnosti i vůči rezistentním kmenům při současné možnosti zkrácení celkové doby trvání léčby, redukce nežádoucích a vedlejších účinků, snížení toxicity a zlepšení selektivity nebo vylepšení profilu fyzikálně-chemických vlastností (např. rozpustnost). Isoniazid, jak již bylo zmíněno, je základním léčivem proti TBC, s unikátním „multitarget“ mechanismem účinku, kde dominuje inhibice InhA (po vlastní aktivaci KatG). Bohužel je INH známý také pro svou poměrně značnou hepatotoxicitu a stále častěji se setkáváme s případy rezistence vůči němu (např. vlivem nadprodukce InhA nebo knock-out genu *katG*). Existují rovněž mykobakteriální kmeny, kterou jsou vůči INH rezistentní primárně, neboť nejsou schopny jej enzymaticky aktivovat (např. *M. avium*). [41, 131, 132]

Na základě našich předchozích zkušeností [133-136] jsme pro vylepšení farmakotoxikologického profilu INH navrhli tři série nových sloučenin (resp. derivátů INH), primárně ve snaze získat struktury s potencovanou antituberkulotickou aktivitou vůči citlivému kmenu *Mtb*. H₃₇Rv a některým dalším tuberkulózním kmenům odolným vůči standardně používaným léčivům (včetně MDR-TBC a XDR-TBC), stejně jako atypickým mykobakteriím. Očekávali jsme, že funkčnost těchto nově navržených derivátů by nemusela být podmíněna právě enzymatickou aktivací katalázou-peroxidázou KatG. [135]

Společnou výchozí sloučeninou pro tyto tři série je (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová kyselina (INHA). Jedná se o sloučeninu, která byla prvotně připravena pracovní skupinou Kryukova *et al.* v SSSR, byl rovněž proveden orientační antimykobakteriální screening, a bylo zjištěno, že se INHA svou účinností nijak zvlášť nelišila od parentního INH. [137]

Tuto synteticky velmi snadno získatelnou sloučeninu jsme vybrali hned z několika důvodů. Prvním z nich je, že kyselina pyrohroznová tvořící linker je člověku netoxická, je to molekula tělu vlastní a nepředpokládali jsme tedy v důsledku jejího zakomponování do finální molekuly zásadní zvýšení toxicity.

Druhým důvodem je, že zanesením volné karboxylové skupiny do struktury výchozího INH získáme reaktivní centrum, které otevírá mnoho možností přípravy dalších funkčních derivátů. Třetím důvodem je, že již dříve byla kyselina pyrohroznová s úspěchem použita jako linker při syntéze potenciálních antituberkulotik (**Obr. 25**). [138]



Obrázek 25 – Pyrrolyl hydrazony popsané skupinou Joshi et al. [138]

7.1 Návrh a syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanamidů jako inhibitorů InhA s vysokou antituberkulotickou aktivitou

Základní strukturální motiv celé této série představuje molekulární hybrid InhA a různě substituovaných anilinů, přičemž jsou tyto fragmenty spojeny pyruvátovým linkerem.

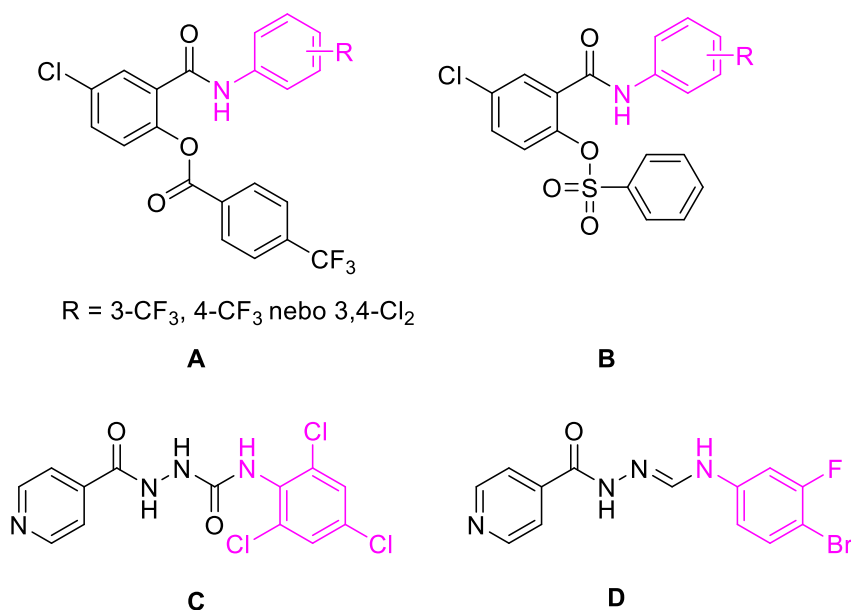
Všechny použité aniliny byly substituovány nejméně jedním atomem halogenu (nebo jinou halogen obsahující skupinou, např. trifluormethyl) z důvodu zvýšení lipofility, která hraje významnou úlohu při pronikání potenciálního léčiva mykobakteriální buněčnou stěnou pomocí pasivní difúze. Navíc je obecně známo, že aniliny bývají často přítomny v antimykobakteriálních sloučeninách (**Obr. 26**), a to navázány na zbytek molekuly různými typy vazeb, často amidovou či iminovou. Možný je ale i podíl na specifickém mechanismu účinku. [135, 136, 139]

Například Krátký *et al.* [133] hodnotili antimykobakteriální vlastnosti u série salicylanilidových 4-(trifluormethyl)benzoátů s popsanou antifungální aktivitou. Sloučeniny s 3,4-dichlor- a trifluormethylovou substitucí na anilinovém kruhu (**Obr. 26, A**) vykazovaly vynikající antimykobakteriální účinky včetně MDR kmenů bez zkřížené rezistence vůči běžně užívaným léčivům. V některých případech byly jejich antimykobakteriální vlastnosti srovnatelné nebo dokonce lepší než INH, a to nejen na INH-rezistentní kmeny.

Další studie reportovala antimykobakteriální aktivitu salicylanilidových benzensulfonátů (**Obr. 26, B**). [134] 4-Chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylbenzensulfonát vykázal jako sloučenina s nejsilnější antituberkulotickou aktivitou

(MIC vůči *Mtb.* 1 μM), podobnou aktivitu měl i 4-chlor-2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)fenyl-benzensulfonát (MIC 1-2 μM). Rychtarčíková *et al.* [135] prezentovali sérii *N*-substituovaných 2-isonikotinoylhydrazinkarboxamidů jako možnost nové modifikace isoniazidu. INH scaffold byl spojen s různými aniliny skrze karbonylovou skupinu. Mezi halogenovanými deriváty vykázal nejlepší aktivitu proti *Mtb.* derivát odvozený od 2,4,6-trichloranilinu (MIC 4 μM ; **Obr. 26, C**).

Řadu hydrazonů odvozených od INH obsahující elektronakceptorní substituenty představili Vavříková *et al.* [136] INH byl v tomto případě spojen s aniliny obsahujícími elektronakceptorní substituenty pomocí CH fragmentu (methinového můstku). Většina z připravených derivátů vykazovala stejnou aktivitu proti *Mtb.* (MIC 1 μM) jako INH a lepší účinnost proti *M. kansasii* 235/80 a *M. avium* 330/88. Navíc mají získané sloučeniny nízkou toxicitu s IC_{50} pro savčí buňky (HepG2) mezi 21,8 a 326 μM (**Obr. 26, D**).

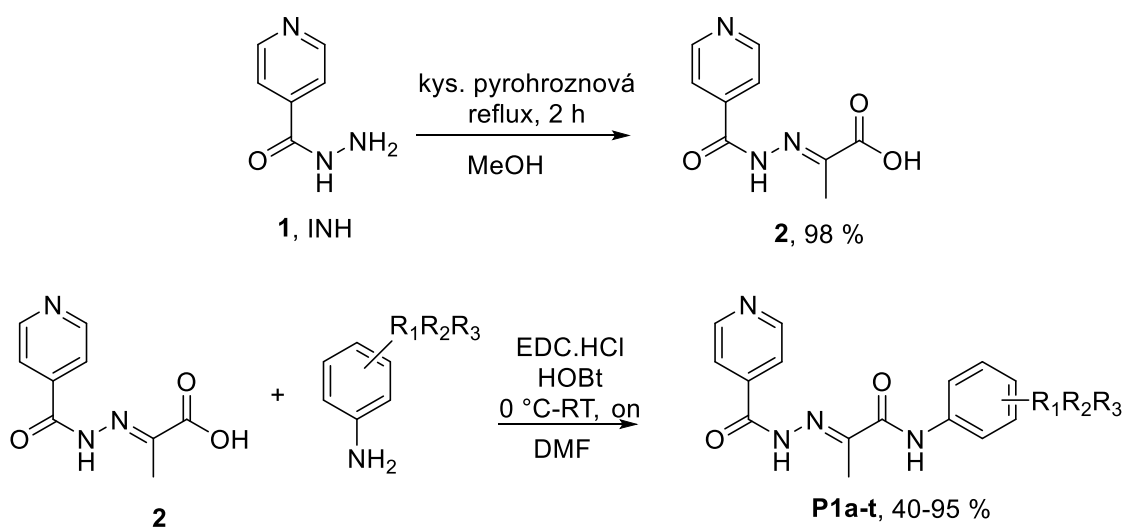


Obrázek 26 – Antimykobakteriální deriváty anilinu [140]

Kyselina (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová **2** byla připravená reakcí komerčně dostupného INH **1** a kyseliny pyrohroznové ve vroucím methanolu s téměř kvantitativním výtěžkem (98 %) podle dříve popsané metody. Izolován byl pouze termodynamicky stabilnější (*E*)-izomer. [137]

Poté kyselina (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová **2** reagovala s různě substituovanými aniliny prostřednictvím karbodiimidového C-N couplingu. Jako coupling činidlo byl použit 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid hydrochlorid

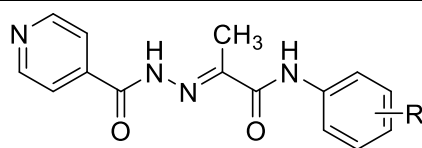
(EDC.HCl) a 1-hydroxybenzotriazol (HOBt) jako katalyzátor. Reakce byly prováděny v *N,N*-dimethylformamidu (DMF) v teplotním gradientu od -20 °C do laboratorní teploty (RT) přes noc (on). Tato nenáročná metoda spolehlivě poskytovala uspokojivé výtěžky. Výsledná močovina a další nezreagovaný materiál byly odstraněny extrakcí a surové produkty **3** byly purifikovány za použití sloupcové chromatografie. Výtěžky se pohybovaly od 40 do 95 %, poměrně široký rozptyl souvisí zejména s potřebou několikastupňové purifikace u některých sloučenin.



Obrázek 27 – Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanamidů [140]

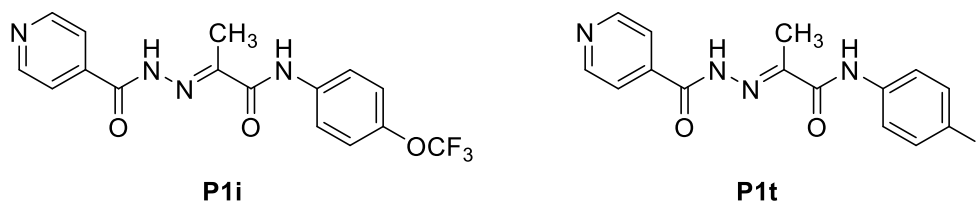
Připravili jsme celkem dvacet nových 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-propanamidů, u kterých byla hodnocena aktivita proti citlivému kmenu *Mtb*. H₃₇R_v, třem kmenům netuberkulózních mykobakterií (*M. avium* 330/88, *M. kansasii* 6509/96 a *M. kansasii* 235/80) a také vůči multirezistentním tuberkulózní kmenům (MDR- a XDR-TBC). Aktivita vůči kmenu *M. kansasii* 235/80 byla hodnocena jen u některých sloučenin, neboť v průběhu procesu hodnocení přestal být tento kmen dostupný.

Tabulka 2 - Antimykobakteriální aktivita anilidů [140]



Kód	R	MIC [μM]									
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			<i>M. kansasii</i> 235/80		
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
P1a	3-F	0.25	0.25	500*	500*	2	4	8	-	-	-
P1b	4-F	0.25	0.25	>250	>250	2	4	8	62.5	125	250
P1c	3,4-F ₂	0.25	0.5	500*	500*	2	4	8	-	-	-
P1d	3-CF ₃	0.125	0.25	>10 ³	>10 ³	2	4	8	-	-	-
P1e	4-CF ₃	≤0.03	≤0.03	125*	125*	2	4	4	8	16	32
P1f	3,5-(CF ₃) ₂	1	1	>10 ³	>10 ³	32	32	32	-	-	-
P1g	4-SCF ₃	0.5	0.5	250*	250*	4	4	4	-	-	-
P1h	3-OCF ₃	0.125	0.5	500*	500*	4	8	8	-	-	-
P1i	4-OCF ₃	≤0.03	≤0.03	125*	125*	2	2	4	8	8	16
P1j	4-OCF ₂ H	0.25	0.5	>10 ³	>10 ³	2	4	8	-	-	-
P1k	4- <i>n</i> -C ₈ F ₁₇	0.25	0.5	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	-	-	-
P1l	3-Cl	0.125	0.125	125*	125*	2	2	4	32	62.5*	62.5*
P1m	4-Cl	0.25	0.25	250	250	4	8	16	16	16	16
P1n	3,4-Cl ₂	0.06	0.06	>250	>250	4	8	16	>250	>250	>250
P1o	3,5-Cl ₂	≤0.25	0.25	>250	>250	16	16	32	>250	>250	>250
P1p	3,4,5-Cl ₃	0.5	1	>250	>250	16	16	32	62.5	125	250
P1q	3-Br	0.125	0.125	>10 ³	>10 ³	4	8	8	-	-	-
P1r	4-Br	0.06	0.125	250	250	4	8	16	16	16	16
P1s	3-I	0.125	0.5	>10 ³	>10 ³	4	8	8	-	-	-
P1t	4-I	0.25	0.25	250	250	2	4	4	8	8	8
1	INH	0.5	1	>250	>250	4	8	8	>250	>250	>250
2	INHA	1	1	500	>10 ³	8	16	16	8	16	16

Přehled zjištěných MIC udává tabulka č. 2. Všechny sloučeniny vykazovaly vynikající aktivitu nejen proti *Mtb.* H₃₇Rv (MIC již od $\leq 0,03 \mu\text{M}$), ale také proti *M. kansasii* 6509/96 (MIC od $2 \mu\text{M}$). Aktivita vůči *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 235/80 byla u nejlepších sloučenin jen nepatrně lepší než u INH (nebo shodná). Neaktivnější molekuly mají substituenty OCF₃ nebo CF₃ (**P1i**, **P1e**) a I **P1t** v poloze 4 na anilinovém jádře (**Obr. 27**). Nejlepší hodnoty MIC proti MDR-TB byly od $8 \mu\text{M}$.



Obrázek 28 - Nejaktivnější anilidy

Všechny zkoumané deriváty **P1a-t** vykazovaly konzistentní inhibici lékově rezistentních kmenů *Mtb.* bez ohledu na jejich profil rezistence. Vzájemně však sdílejí vyšší hodnoty MIC než MIC pozorované u *Mtb.* H₃₇Rv. Tyto údaje naznačují možnost zkřížené rezistence vůči INH. Nicméně začleněním INH do struktury komplexnější sloučeniny mohou být získány i sloučeniny s prokazatelnou aktivitou vůči INH-rezistentním i MDR-TBC kmenům, i když toto není příliš obvyklý jev. [41, 141]

Nejúčinnější deriváty byly navíc podrobeny stanovení mechanismu účinku. Inkubace *Mtb.* H₃₇Ra s testovanými sloučeninami vedla ke snížení produkce mykolových kyselin a kmeny nadprodukcující InhA byly vůči působení těchto sloučenin odolnější. Naproti tomu kmen nadprodukcující KatG byl k působení testovaných sloučenin citlivější. Tyto výsledky potvrzují, že studované sloučeniny inhibují mykobakteriální InhA analogicky jako mateřský INH jako jejich primární cíl a jsou významnou měrou aktivovány pomocí KatG.

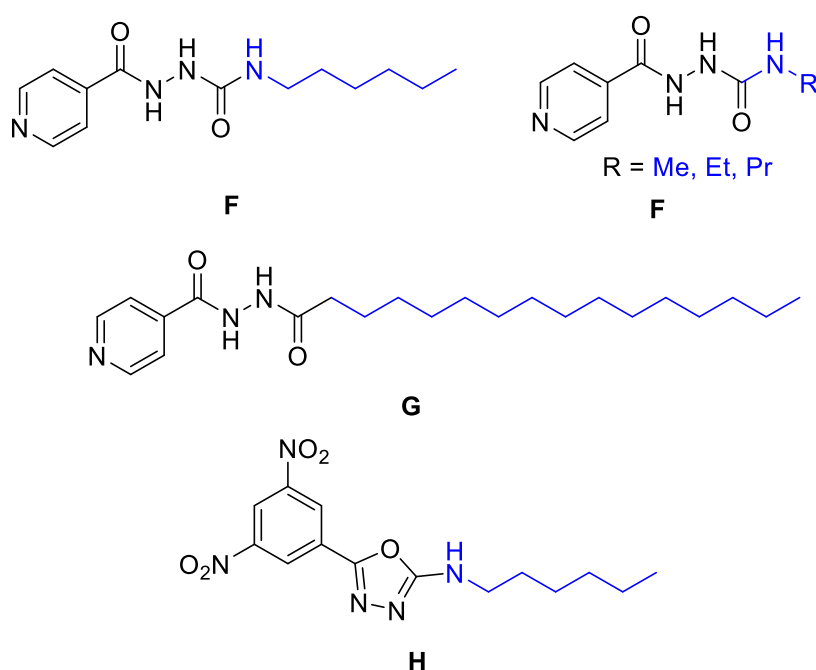
Předmětné sloučeniny nevykazovaly žádnou cytotoxickou a cytostatickou aktivitu pro buňky HepG2. Index selektivity (SI) pro derivát **P1i** je >1667 pro *Mtb.* H₃₇Rv a >12,5 pro *M. kansasii* 6509/96, kdežto pro sloučeninu **P1t** je SI >200 pro *Mtb.* H₃₇Rv a >12,5 pro *M. kansasii* 6509/96.

Amidy lze považovat za slibný scaffold pro budoucí objevování antituberkulotik, které mají lepší antimikrobiální vlastnosti než původní isoniazid spolu s výrazně vylepšeným farmako-toxikologickým profilem.

7.2 Syntéza a hodnocení antimykobakteriální aktivity derivátů isoniazidu s alifatickými aminy

V rámci další práce byla kyselina (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-propanová **2** modifikována obdobným způsobem jako v předchozí kapitole, avšak s tím rozdílem, že tentokrát byly místo různě substituovaných anilinů použity alifatické aminy.

Volba těchto reaktantů souvisí s faktem, že celá řada úspěšných isoniazidových derivátů i jiných antimykobakteriálních sloučenin v sobě nese *n*-alkylaminový (či delší alkylový) fragment.



Obrázek 29 – Antimykobakteriální deriváty obsahující alkylaminový fragment [142]

Mezi *N*-substituovanými 2-isonikotinoylhydrazinkarboxamidy sloučenina (**Obr. 29, E**) vykazala signifikantně vyšší aktivitu vůči INH-rezistentnímu kmenu *M. avium* v porovnání s isoniazidem (MIC = 32 μ M v porovnání s MIC INH >250 μ M), přičemž aktivita vůči citlivému kmenu *Mtb.* zůstala zachována. [135] V návaznosti na tuto práci byla publikována ucelená série *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidů (*n*-alkyly od C₁ po C₁₈), které sloužily jako prekurzory pro syntézu odpovídajících 1,3,4-oxadiazolů. [41] Při porovnání s výchozím isoniazidem tři deriváty (**Obr. 29, F**) vykazaly shodnou *in vitro* inhibiční aktivitu vůči *Mtb.* Navíc *N*-ethyl derivát vykázal výbornou aktivitu (MIC = 4-16 μ M) vůči dvěma kmenům *M. kansasii* (jeden kmen byl citlivý, druhý kmen byl vůči INH rezistentní).

Rodrigues *et al.* [143] zkoumali antituberkulotickou aktivitu série derivátů isoniazidu acylovaného zbytky mastných kyselin. Tyto deriváty vykázaly značnou antituberkulotickou aktivitu v závislosti na zvyšující se lipofilitě (**Obr. 29, G**; MIC pro *Mtb.* 0,015 µg/ml).

Karabanovich *et al.* [144] popsali antimykobakteriální aktivitu sloučeniny **H** nesoucí 1,3,4-oxadiazolový fragment. *Mtb.* H₃₇Rv byla inhibována při koncentraci ≤0,03 µM, *M. avium* 330/88 při koncentraci ≤1 µM a *M. kansasii* 6509/96 již od 0,25 µM.

Na podkladě těchto zjištění jsme navrhli, připravili a hodnotili antimykobakteriální aktivitu série třiadvaceti *N*-(cyklo)alkyl-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanamidů.

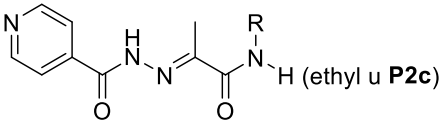
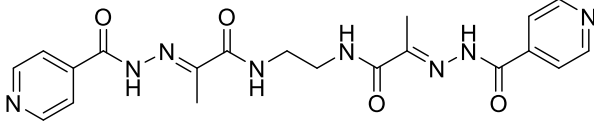
K přípravě předmětných amidů byla použita stejná syntetická metoda jako v případě derivátů z kapitoly 7.1. Metoda opět poskytovala vesměs uspokojivé výtěžky. Reakce aminů s delším alifatickým řetězcem (C₈-C₁₆) poskytovala všeobecně vyšší výtěžky (91-98 %). Nižší výtěžnost (45-64 %) byla pozorovaná u reakcí aminů s kratšími řetězci (C₁-C₄). Reakce sekundárního aminu (diethylaminu) poskytla nejnižší výtěžnost (pouze 35 %) v důsledku sterického bránění reagující aminoskupiny. Amidy s kratším alkylem (C₁-C₄, vč. izomerů) byly dodatečně purifikovány pomocí sloupcové chromatografie, neboť rekrytalizace způsobovala přílišné ztráty díky zvýšené rozpustnosti ve vodě. Ostatní deriváty mohly být díky své nižší rozpustnosti purifikovány rekrytalizací z vhodného rozpouštědla.

Všechny připravené sloučeniny byly hodnoceny na jejich antimykobakteriální aktivitu vůči citlivému kmenu *Mtb.* H₃₇Rv a třem kmenům netuberkulózních mykobakterií (*M. avium* 330/88, *M. kansasii* 6509/96 a *M. kansasii* 235/80). Vůči kmenu *M. kansasii* 235/80 bylo hodnoceno jen sedm z připravených sloučenin (**Tab. 3**).

Všechny připravené deriváty vykazovaly určitou aktivitu vůči *Mtb.* H₃₇Rv (MIC ≤0,125-8 µM). Dále byla zaznamenána účinnost vůči *M. kansasii* 6509/96 (MIC 2-500 µM) a *M. avium* 330/88 (MIC ≥32 µM). Mezi sedmi sloučeninami testovanými vůči *M. kansasii* 235/80 vykázal dobrou aktivitu hlavně derivát s *n*-hexylovým řetězcem (MIC = 16 µM).

Ze všech testovaných derivátů vykázal povšechně nejslabší aktivitu jediný připravený *N,N*-disubstituovaný amid (diethylamid).

Tabulka 3 – Antimykobakteriální aktivita amidů s alkylovými řetězci [142]

		 H (ethyl u P2c)									
Kód	R	MIC [μM]									
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			<i>M. kansasii</i> 235/80		
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
P2a	Methyl	0.5	0.5	500	10 ³	16	16	32	-	-	-
P2b	Ethyl	0.5	0.5	>10 ³	>10 ³	32	32	64	-	-	-
P2c	(Ethyl) ₂	8	8	>10 ³	>10 ³	250	500	500	-	-	-
P2d	<i>n</i> -Propyl	0.5	1	>250	>250	32	32	32	>250	>250	>250
P2e	Cyklopropyl	0.5	1	>250	>250	32	32	62.5	>250	>250	>250
P2f	Propargyl	0.5	1	10 ³	>10 ³	16	16	16	-	-	-
P2g	<i>n</i> -Butyl	0.5	0.5	>250	>250	16	32	32	>250	>250	>250
P2h	<i>i</i> -Butyl	0.5	1	>250	>250	32	32	32	>250	>250	>250
P2i	<i>tert</i> -Butyl	0.5	1	>250	>250	16	16	16	>250	>250	>250
P2j	<i>n</i> -Pentyl	0.5	0.5	10 ³	>10 ³	8	8	16	-	-	-
P2k	<i>n</i> -Hexyl	0.5	1	>250	>250	16	16	16	16	16	16
P2l	Cyklohexyl	0.5	1	>250	>250	16	16	32	>250	>250	>250
P2m	<i>n</i> -Heptyl	0.5	0.5	125	250	4	8	16	-	-	-
P2n	<i>n</i> -Oktyl	≤0.125	0.25	250	500	4	8	16	-	-	-
P2o	<i>n</i> -Nonyl	≤0.125	≤0.125	250	250	2	4	4	-	-	-
P2p	<i>n</i> -Decyl	≤0.125	0.5	250	250	4	8	16	-	-	-
P2q	<i>n</i> -Undecyl	≤0.125	0.25	125	250	4	8	16	-	-	-
P2r	<i>n</i> -Dodecyl	≤0.125	0.25	64	125	4	8	16	-	-	-
P2s	<i>n</i> -Tridecyl	0.25	0.25	64	125	8	16	32	-	-	-
P2t	<i>n</i> -Tetradecyl	≤0.125	≤0.125	32	32	4	8	8	-	-	-
P2u	<i>n</i> -Pentadecyl	0.5	0.5	250	250	8	16	32	-	-	-
P2v	<i>n</i> -Hexadecyl	0.25	0.25	250	250	8	8	8	-	-	-
											
P2w	---	0.25	0.25	500	500	8	16	16	-	-	-
INH	---	1	1	>250	>250	4	8	8	≥250	≥250	≥250
2	---	1	1	500	>10 ³	8	16	16	8	16	16

Sloučeniny lze z hlediska aktivity vůči *Mtb.* orientačně rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří amidy s kratším řetězcem C₁-C₇ (včetně cyklických a nenasycených analog; **P2a-P2m**), které vykazovaly MIC v hodnotách 0,5-1 μM (z trendu krátkých alkylů vybočuje pouze derivát s *n*-pentadecylovým řetězcem **P2u**, který by se na základě

hodnoty MIC 0,5 μM dal také přiřadit do této kategorie). V druhé skupině se objevují zejména sloučeniny s delším alifatickým řetězcem ($\text{C}_8\text{-C}_{14}$, C_{16} ; **P2n-P2t** a **P2v**) a hodnotami MIC $\leq 0,125\text{-}0,5$ μM . Významnější inhibiční aktivitu vůči *M. avium* vykazaly pouze sloučeniny s $\text{C}_{12}\text{-C}_{14}$ alkylovým řetězcem (**P2r-P2t**; (MIC 32-64 μM , což je asi sedmkrát vyšší aktivita v porovnání s INH **1**). Svou inhibiční aktivitou vůči *M. kansasii* 6509/96 vynikají dvě sloučeniny: *n*-nonyl **P2o** (MIC = 2-4 μM) a *n*-tetradecyl **P2t** deriváty (MIC = 4-8 μM). Další sloučeniny (C_5 , C_7 , C_8 , C_{10-12} , C_{16} a ethylendiaminový derivát **P2w**) vykazaly vůči tomuto kmenu MIC 4-18 μM . Od dvanáctiuhlíkatého řetězce výše lze pozorovat „even-odd effect“, preferenční je sudý počet uhlíků. Nižší aktivitu vykazaly deriváty ethyl-, diethyl-, propyl-, cyklopropyl-, butyl- a isobutylaminu.

Obecně deriváty více lipofilnější lze považovat za účinnější. [143] To může být vysvětleno možností snadnějšího uvolňování isonikotinoylového radikálu díky některým mutacím a/nebo rychlejšímu transportu do mykobakteriální buňky, což vede k vyšší intracelulární koncentraci.

7.3 Návrh a syntéza vysoce aktivních antimykobakteriálních „mutual“ esterů kyseliny 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanové

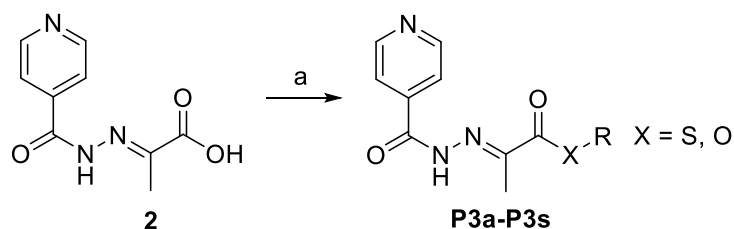
Tato publikace referuje výsledky pokračování našeho výzkumu v oblasti syntézy a hodnocení duálně aktivních derivátů klinicky významných antituberkulotik.

Zabývali jsme v ní přípravou nových „me-too“ derivátů INH s využitím přístupu molekulární hybridizace, nyní ve formě esterů INHA **2**. Navrhli a připravili jsme (thio)estery **3** kyseliny **2** s různými alkoholy, fenoly a thioly, a to včetně zavedených léčiv, které mají převážně vlastní antimykrobiální aktivitu. Kromě vyšší lipofily tedy navrhované „mutual“ antimykobakteriální estery nabízejí potenciální výhody duální antimykobakteriální aktivity, aditivitu/syngii a také možnost inhibice rezistentních patogenů, a to právě díky jejich odlišným mechanismům účinku.

Syntéza esterů je jednou z nejběžnějších strategií přípravy proléčiva za účelem zvýšení lipofily. [145, 146] Takovéto estery kyseliny pyrazin-2-karboxylové se substituovanými salicylanilidy prokázaly *in vitro* účinnost proti patogenním houbám a bakteriím (zejména proti grampozitivním kmenům, tuberkulózním a atypickým mykobakteriím včetně INH-rezistentních kmenů), které jsou rezistentní vůči jednomu

nebo více klinicky používaným lékům. [146] Jako vysoce účinné látky proti TBC byly také popsány amidy hydrazonových kyselin na bázi INH (viz kapitola [7.1](#) a [7.2](#)).

Kyselina (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanová **2** byla esterifikována různými (thio)alkoholy nebo (thio)fenoly dle protokolu Steglichovy esterifikace za použití EDC.HCl jako coupling činidla a za katalýzy 4-(dimethylamino)pyridinem. [147] Jako rozpouštědlo byl použit dichlormethan (**Obr. 30**. Tato metoda je účinná a vyznačuje se mírnými podmínkami. Výsledný močovinový vedlejší produkt byl odstraněn extrakcí do vody a organická vrstva byla postupně extrahována hydrogenuhličitanem sodným a nasycenou solankou a odpařena za sníženého tlaku. Všechny surové produkty byly čištěny krystalizací nebo sloupcovou chromatografií.



R = alkyl, 4-pyridylmethyl, fenyl, 4-substituovaný fenyl, naftalen-1/2-yl, chinolin-8-yl, další látky s biologickou aktivitou připojené prostřednictvím esterové vazby (thymol, karvakrol, triklosan, metronidazol)

(a) R-OH or R-SH, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid, 4-(dimethylamino)pyridin, CH₂Cl₂, 12 h, 0 °C-rt)

Obrázek 30 - Syntéza esterů [148]

Výtěžky sloučenin **P3** se pohybovaly od 36 do 92 %, závisely především na procesu purifikace. V některých případech musel být proces krystalizace několikrát opakován, což vedlo ke snížení výtěžků. Relativně nízký výtěžek (36 %) byl získán u sloučeniny **P3o** na bázi triklosanu, s největší pravděpodobností v důsledku sterické zábrany reagujícího hydroxyly. Lepší reakční konverze poskytly reakce s alifatickými substráty vedoucí k (thio)esterům **P3a** a **P3r**. Nesubstituovaný fenol, naftoly (**P3b** a **P3i**, **P3j**) nebo některé fenoly substituované elektrondonorovými substituenty (**P3c**, **P3k**, **P31**) také poskytly dobré výtěžky (52-81 %). Sloučeniny **P3k** a **P31** jsou polohové izomery, přičemž **P31** byla připravena v nižším výtěžku (52 %), s největší pravděpodobností v důsledku sterické zábrany. Výtěžky sloučenin **P3i**, **P3j**, **P3k** a **P31** však byly sníženy jejich opakovaným chromatografickým čištěním surového produktu. Pozorovali jsme také částečný rozklad sloučenin **P3i**, **P3j**, **P3k** a **P31** při kontaktu se silikagelem, a to i po jeho alkalizaci triethylaminem. Tento jev byl částečně eliminován aprotickým složením mobilní fáze. Syntéza derivátu **P3s** vykazovala lepší reakční konverzi díky vyšší

nukleofilite thiofenolu ve srovnání se syntézou analogického fenylesteru **P3b**, podobný výsledek byl pozorován v případě sloučenin **P3r** a **P3a**.

Všechny připravené sloučeniny byly hodnoceny vůči citlivému kmenu *Mtb.* H₃₇Rv a dvěma kmenům netuberkulózních mykobakterií (*M. avium* 330/88, *M. kansasii* 6509/96). Hodnoty MIC shrnuje **Tab. 4**.

Tabulka 4 – Antimykobakteriální aktivita esterů [148]

Kód	R	MIC [μ M]						
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96		
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
P3a	Me	0.25	0.25	500	1000	2	4	8
P3b	H	0.125	0.25	>250	>250	8	8	8
P3c	4-Me	\leq 0.25	0.5	>250	>250	8	8	8
P3d	4-MeO	0.25	0.25	500	1000	4	8	8
P3e	4-PhO	\leq 0.125	0.5	250	500	2	4	4
P3f	4-F	0.25	0.5	500	500	2	4	4
P3g	4-Cl	\leq 0.125	\leq 0.125	500	1000	4	8	16
P3h	4-Br	\leq 0.125	0.25	250	500	8	8	16
P3i	1-naftyl	0.25	0.25	125	250	0.25	0.25	0.25
P3j	2-naftyl	0.25	0.25	125	250	0.25	0.25	0.5
P3k	2- <i>i</i> Pr-5-Me	0.25	0.25	500	1000	8	16	16
P3l	2-Me-5- <i>i</i> Pr	0.25	0.25	125	250	0.25	0.25	0.25
P3m	chinolin-8-yl	0.25	0.5	32	64	2	4	4
P3n	pyridin-4-ylmethyl	0.5	1	\geq 1000	\geq 1000	8	16	16
P3o	5-Cl-2-(2,4-diCl-PhO)	\leq 0.125	\leq 0.125	64	64	4	4	8
P3p	4-Ac-NH	0.25	0.5	1000	1000	8	16	16
P3q	-	0.25	0.5	500	1000	2	4	4
P3r	Et	0.25	0.25	250	500	1	2	4
P3s	Ph	0.25	0.25	250	250	1	2	4
2	INHA	1	1	500	>1000	8	16	16
INH	-	1	1	>250	>250	8	8	16

Všechny estery **P3** vykazovaly slibný antimykobakteriální účinek, zejména vůči *Mtb.* s MIC od $\leq 0,125$ do $1 \mu\text{M}$. Nejúčinnější byly estery 4-chlorfenolu (**P3g**) a triklosanu (**P3o**), následované fenyl (**P3c**) a 4-bromfenyl (**P3h**) estery. Naopak ester **P3n** vykazoval nejvyšší (ale stále nízkou) MIC ($0,5\text{-}1 \mu\text{M}$). Mezi jednotlivými (thio)estery, aromatickými a alifatickými deriváty nebo odpovídajícími izomery (**P3i** a **P3j**, **P3k** a **P3l**) nebyl žádný výrazný rozdíl v aktivitě.

Naprostá většina (thio)esterů **P3** vykazovala lepší antituberkulární aktivitu než původní kyselina **2**, s výjimkou sloučeniny **P3n**. Přeměna volného karboxylu na jeho lipofilnější analoga je tedy výhodná z hlediska zlepšení antimykobakteriálních vlastností (až $\geq 8 \times$). Důležité je, že totožné závěry lze učinit i pro mateřský INH.

M. kansasii 6509/96 byl druhým nejcitlivějším kmenem (MIC $0,25\text{-}16 \mu\text{M}$). Nejlepší *in vitro* inhibice byla zjištěna u naftylesterů (**P3i**, **P3j**) a derivátu thymolu **P3l** (MIC $\leq 0,5 \mu\text{M}$). Je zajímavé, že jeho izomer na bázi karvakrolu **P3k** má $64 \times$ nižší aktivitu. Také thioestery **P3r** a **P3s** vykazovaly srovnatelně nižší MIC. U monosubstituovaných fenylesterů byly nejúčinnější 4-PhO a 4-F deriváty **P3e** a **P3f**, naopak estery 4-bromfenolu, pyridin-4-ylmethanolu a paracetamolů (**P3h**, **P3n** a **P3p**) vedly k nejvyšší MIC ($8\text{-}16 \mu\text{M}$). Také u tohoto kmene byla řada derivátů lepší než INH a INHA; zbývající měly stejné MIC.

Polyrezistentní kmen *M. avium* obecně vykazoval nižší citlivost (MIC od $64 \mu\text{M}$). Některé deriváty však byly významně aktivnější než INH a kyselina **2**: zejména estery chinolin-8-olu **P3m** a triklosanu **P3o** ($32\text{-}64 \mu\text{M}$), následované thymolovým derivátem **P3k**, naftylestery (**P3i**, **P3j**) a thioestery (**P3r**, **P3s**).

Na podkladě těchto výsledků byla hodnocena aktivita nejslibnějších sloučenin vůči šesti MDR-TB a jednomu XDR-TB kmeni s různým profilem rezistence. Vybrány byly nejaktivnější estery zahrnující různé reprezentativní typy (thio)fenolových derivátů včetně zavedených léčiv (**P3b**, **P3d**, **P3g**, **P3i-P3l**, **P3o** a **P3r**).

Některé estery byly schopny inhibovat růst rezistentních kmenů, i když s vyššími hodnotami MIC ($8\text{-}125 \mu\text{M}$). Výsledky však naznačují zkříženou rezistenci vůči mateřskému INH. Hodnoty MIC udává **Tab. 5**. Nejúčinnější byl derivát odvozený od chinolinu (**P3m**), patrně díky chinolinové složce molekuly.

Tabulka 5 - MIC esterů vůči rezistentním kmenům.

Kód	MIC [μ M]													
	<i>Mtb.</i> Praha 1		<i>Mtb.</i> Praha 4		<i>Mtb.</i> Praha 131		<i>Mtb.</i> 234/2005		<i>Mtb.</i> 9449/2007		<i>Mtb.</i> 7357/1998		<i>Mtb.</i> 8666/2010	
	14	21	14	21	14	21	14	21	14	21	14	21	14	21
	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
P3b	16	16	16	16	16	16	32	32	32	32	16	16	16	16
P3d	8	16	16	32	8	16	16	32	16	16	16	16	8	16
P3g	8	8	16	16	8	8	16	32	16	16	16	16	8	16
P3i	64	125	16	32	32	32	16	32	32	32	16	32	16	16
P3j	125	125	32	32	32	32	16	32	32	32	32	32	16	32
P3k	125	125	16	32	32	64	32	32	32	32	32	32	16	32
P3l	32	64	8	16	32	64	16	32	16	32	16	32	16	16
P3m	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
P3o	125	125	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
P3p	125	125	32	32	32	64	32	64	32	64	16	32	32	32
P3q	125	125	32	32	16	32	32	32	32	32	16	32	16	16
P3s	64	125	32	64	32	64	32	64	64	64	32	64	32	32

Mtb. Praha 1; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF, CFZ. *Mtb.* Praha 4; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF, OFX, CFZ. *Mtb.* Praha 131; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF, OFX, GEN, AMK (XDR-TB). *Mtb.* 9449/2007; rezistentní k STM, INH, RIF. *Mtb.* 234/2005; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF. *Mtb.* 7357/1998; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF, OFX. *Mtb.* 8666/2010; rezistentní k STM, INH, EMB, RIF, OFX, CFZ.

STM: streptomycin, INH: isoniazid, EMB: ethambutol, RIF: rifampicin, OFX: ofloxacin, GEN: gentamicin, CFZ: klofazimin, AMK: amikacin.

U třech vysoce aktivních esterů (získané z thymolu, chinolin-8-olu a triklosanu, **P3l**, **P3m** a **P3o**) byl experimentálně hodnocen mechanismus účinku, předpokládaným cílem byla InhA. Inkubace *Mtb.* H₃₇Ra s testovanými sloučeninami vedla ke snížení produkce mykolových kyselin, nadproducenti InhA byli vůči působení těchto sloučenin odolnější. Naproti tomu kmen nadprodukující KatG byl k působení testovaných sloučenin citlivější. Tyto výsledky potvrzují, že studované sloučeniny inhibují InhA analogicky mateřskému INH jako jejich primární cíl.

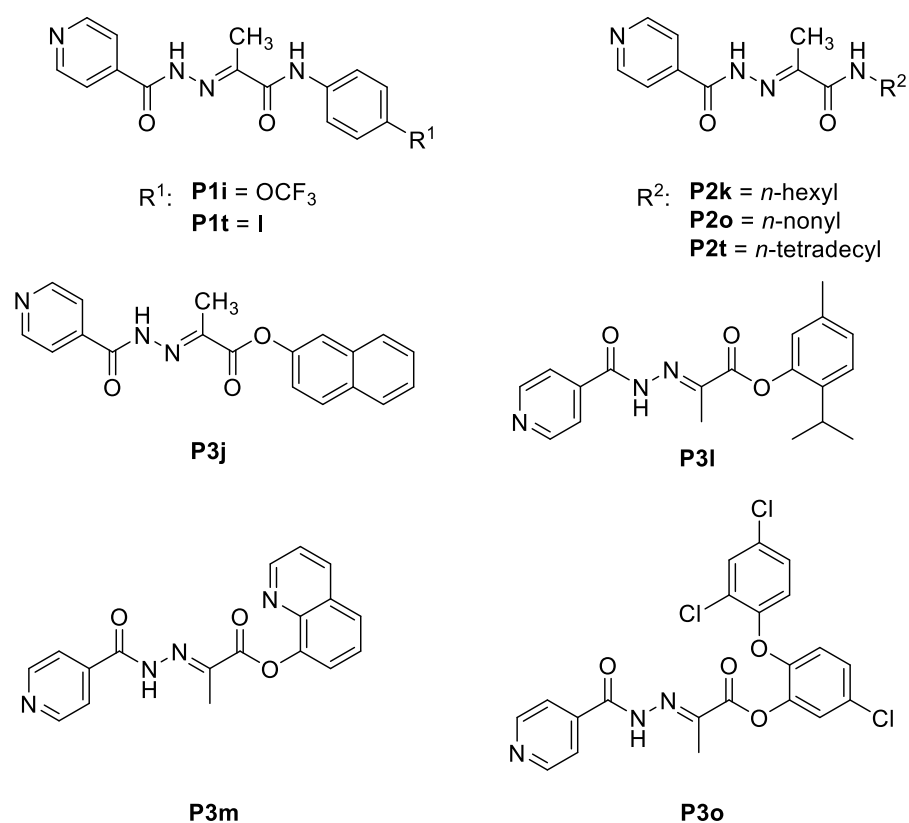
Pro potvrzení inhibice syntézy mykolových kyselin byly buňky *Mtb.* H₃₇Ra inkubovány s různými koncentracemi těchto esterů a metabolicky značeny ¹⁴C acetátem pro monitorování syntézy mykolových kyselin a lipidů. Analýza lipidového profilu odhalila, že přítomnost zkoumaných esterů vedla ke specificky snížené produkci trehalóza-monomykolátů (TMM) a dimykolátů (TDM). Analýza mastných kyselin izolovaných z celých buněk potvrdila sníženou syntézu všech forem mykolových kyselin, a to na rozdíl od syntézy běžných mastných kyselin, které nebyly ovlivněny. Tato zjištění potvrzují enzym InhA jako jejich primární molekulární cíl. Nicméně některé

ze zkoumaných sloučenin, jako například **P3m**, která byla vůči rezistentním kmenům neaktivnějším derivátem s jednotnou MIC 8 μM , minimálně naznačuje doplňkový mechanismus (mechanismy) účinku. Například samostatný chinolin-8-ol byl identifikován jako chelátor kovů [149] (MIC 8 μM pro *Mtb.* H₃₇Rv).

Všechny zkoumané estery **P3a-P3s** nevykazovaly významnou cytotoxickou aktivitu pro buňky HepG2. Index selektivity (SI) je od ≥ 493 do ≥ 4000 pro *Mtb.* H₃₇Rv a 39,1 až >4000 pro *M. kansasii* 6509/96. Pouze tři sloučeniny (**P3m**, **P3o** a **P3s**) byly mírně toxičtější (IC₅₀ 182,1-246,7 μM), fenylthioester **P3s** byl identifikován jako sloučenina s nejvyšší toxicitou, zatímco jeho *S*-ethyl analog toxicitu nejevil.

7.4 *In silico* predikce

V rámci těchto tří sérií byly identifikovány antimykobakteriálně nejslibnější sloučeniny (**Obr. 31**) a *in silico* byly predikovány klíčové fyzikálně-chemické a strukturní parametry, které se uplatňují v preklinickém vývoji nových léčiv, zejména s ohledem na drug-likeness a vyvarování se jiných nežádoucích vlastností.



Obrázek 31 – Nejslibnější sloučeniny odvozené od INH

Pro tyto sloučeniny byly programem SwissADME [150] *in silico* modelovány vybrané fyzikálně-chemické, strukturní a farmakokinetické parametry ($\text{Log}P$, rozpustnost ve vodě, vstřebatelnost z GIT, „drug-likeness“ dle Lipinského a Ghose a index PAINS (pain assay interference compounds)) [151, 152]. *In silico* nebyly u předmětných sloučenin zjištěny žádné závažné překážky pro jejich ev. dalším vývoji jako potenciálních léčiv, data referuje **Tab. 6**.

Tabulka 6 – *In silico* predikce

<i>In silico</i> predikce							
Kód	$\text{Log}P^*$	Rozpustnost ve vodě	GI absorpce	Lipinski	Ghose	PAINS	BOILED-Egg
P1i	2,35	Rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P1t	2,23	Rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P2k	2,08	Rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P2o	3,17	Rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P2t	5,00	Mírně rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P3j	2,85	Mírně rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P3l	3,19	Mírně rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P3m	2,23	Rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB
P3o	4,63	Špatně rozpustné	Ano	Ano	Ano	Ne	Neprostupují HEB

*Metodou consensus $\text{Log}P$ – počítáno jako průměr pěti různých metod predikce.

Rozpustnost ve vodě byla predikována pomocí metody ESOL [153] (ESTimated SOLubility) na základě devíti molekulárních parametrů ($\text{Log}P$, molekulová hmotnost atd.). Sloučeniny **P1i**, **P1t**, **P2k**, **P2o** a **P3m** byly určeny jako rozpustné. Ostatní deriváty (**P2t**, **P2j**, **P2l** a **P3o**) byly určeny jako středně anebo špatně rozpustné.

Predikce vstřebatelnosti z GIT po podání ústy byla prováděna metodou BOILED-Egg (Brain Or IntestinaL EstimateD permeation) [154], jedná se o metodu vycházející ze vztahu mezi lipofilitou ($\text{log}P$) a polaritou molekul (polar surface area). Všechny sloučeniny byly určeny jako dobře vstřebatelné a zároveň žádná z připravených sloučenin by neměla prostupovat přes HEB.

Drug-likeness byla hodnocena dvěma přístupy. Základní metodou bylo zkoumání splnění Lipinského pravidla pěti [155] a závěry této analýzy byly podpořeny metodou dle Ghose [156]. Ideální kandidát na léčivo by měl dle Lipinského splňovat následující podmínky:

- Relativní molekulová hmotnost nepřesahuje 500
- $\text{Log}P$ nepřekračuje hodnotu 5
- Obsahuje maximálně 5 donorů vodíkových vazeb
- Obsahuje maximálně 10 akceptorů vodíkových vazeb (obvyčejně se udává jako součet N a O atomů)

Všechny vybrané sloučeniny tato kritéria splňují. Poněkud odlišná metoda podle Ghose je založená na částečně odlišných vyčíslitelných fyzikálně-chemických vlastnostech a chemickém konstituci. Hodnocena jsou kritéria (v závorce intervaly):

- $\text{Log}P$ (od -0,4 do 5,6)
- Molární refraktivita (40–30)
- Relativní molekulová hmotnost (160–500)
- Počet atomů (20–70)

Žádná z předkládaných sloučenin nebyla identifikována jako tzv. pain assay interference compound (tj. sloučenina, která nespecificky interaguje s různými biologickými strukturami, a obecně se má za to, že takovou sloučeninu nelze automaticky považovat za potenciální léčivo). To také nasvědčuje selektivitě a specifické aktivitě připravených sloučenin.

7.5 Nové antimykobakteriální deriváty kyseliny 4-aminosalicylové s tuftsinovými peptidovými nosiči cílící na hostitelské buňky

Mtb. je intracelulární patogen a vstup antituberkulotik do hostitelských buněk bývá omezený, mykobakterie tak zůstává ukryta před imunitním systémem a může perzistovat (nejčastěji ve fagocytech). Je tedy velmi užitečné identifikovat a mít k dispozici taková léčiva, která mají nejen vlastní antimykobakteriální aktivitu, ale zároveň i schopnost proniknout do hostitelské buňky. [157, 158]

Již dříve bylo mnohokrát prokázáno, že deriváty kyseliny salicylové (např. salicylanilidy) mají rozmanité biologické účinky (antimikrobiální [159, 160], antimykotické [161], antihelmintické [162], antiprotozoální [163] či protinádorové

[164]). Předpokládá se, že salicylanilidové deriváty inhibují, mezi jinými mechanismy účinku, také dvousložkový regulační systém bakterií, enzym isocitrát lyázu [146, 165] a jsou selektivními inhibitory interleukinu 12p40. [166] Zároveň mohou tyto sloučeniny ovlivňovat buněčný protonový gradient. Kyselina 4-aminosalicylová (kyselina *para*-aminosalicylová, ASA) je také používána jako antituberkulotikum druhé linie (proléčivo ovlivňující esenciální metabolismus folátu v *Mtb.*). [157, 167]

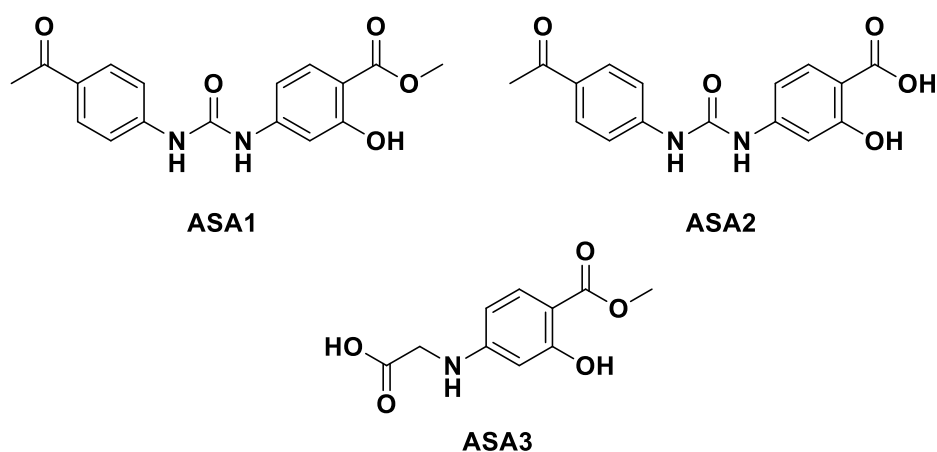
Interakce mezi léčivem a biologickými bariérami v lidském organismu, resp. buněčnou stěnou mykobakterie, hraje naprosto klíčovou roli ve farmakodynamice i farmakokinetice sloučeniny. Je obecně známo, že lipofilnější sloučeniny mívají častokrát značnou inhibiční aktivitu na mykobakteriím (bohužel na úkor jejich rozpustnosti ve vodě a selektivity). Zvýšení rozpustnosti, selektivity a biologické dostupnosti těchto sloučenin je tedy zásadní otázkou.

K řešení této situace mohou přispět peptidové drug delivery systémy, které mohou zlepšit buněčný uptake aktivních látek prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy a zvýšit tak vlastní intracelulární koncentraci, a tudíž i účinnost antimykobakteriálních sloučenin. Jako hlavní cíle pro tyto konjugáty jsou uvažovány receptory s peptidovými ligandy, které jsou exprimovány hlavně na hostitelských buňkách *Mtb.* (hlavně na makrofázích). Jedním z těchto potenciálních cílů je tuftsinový receptor. Právě peptidové deriváty na bázi tuftsínu jsou slibnými a již ověřenými nosiči pro antituberkulotika. Tyto peptidy jsou ligandy neuropilinových receptorů a mají samy o sobě imunostimulační (např. stimulují fagocytózu) aktivitu, protinádorové účinky a zároveň nejsou toxické ani imunogenní pro savce. Tuftsin je přírodní tetrapeptid uvolňovaný z IgG enzymatickým štěpením, sestává u člověka ze sekvence Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR), u psa potom ze sekvence Thr-Lys-Pro-Lys (TKPK), a je vychytáván makrofágy a polymorfonukleárními fagocyty prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy. [168-171]

V rámci přechodného výzkumu byla vyvinuta řada sekvenčních oligopeptidů na bázi psího tuftsínu. Tyto peptidy se sekvencí [TKPKG]_n (kde n = 1, 2, 3, 4) mají vlastnosti podobné tuftsínu a mohou být použity jako transportní systémy pro cílení hlavních hostitelských buněk *Mtb.* Na základě předchozích studií jsou konjugáty obsahující monotuftsinové transportní peptidy (Thr-Lys-Pro-Lys-Gly, TKPKG; Thr-Lys-Pro-Arg, TKPR; Thr-Lys-Pro-Pro-Arg, TKPPR) účinnější proti extracelulárním

a intracelulárním *Mtb.*, avšak s nižší cytotoxicitou pro model hostitelských buněk (monocytární linie MonoMac6). Deriváty obsahující acyl mastné kyseliny mají zvýšený lipofilní charakter, buněčný uptake, ale často také toxicitu. [172-174]

Aby došlo ke snadnějšímu uvolnění neseného léčiva z peptidového nosiče, vmezeří se mezi nosný peptid a léčivo enzymaticky labilní tetrapeptidové sekvence (např. Gly-Phe-Leu-Gly, GFLG; Gly-Phe-Tyr-Ala, GFYA). Tyto sekvence poté mohou být štěpeny katepsinem B, což je jedna z lysozomálních cysteinových proteáz. [157, 175]



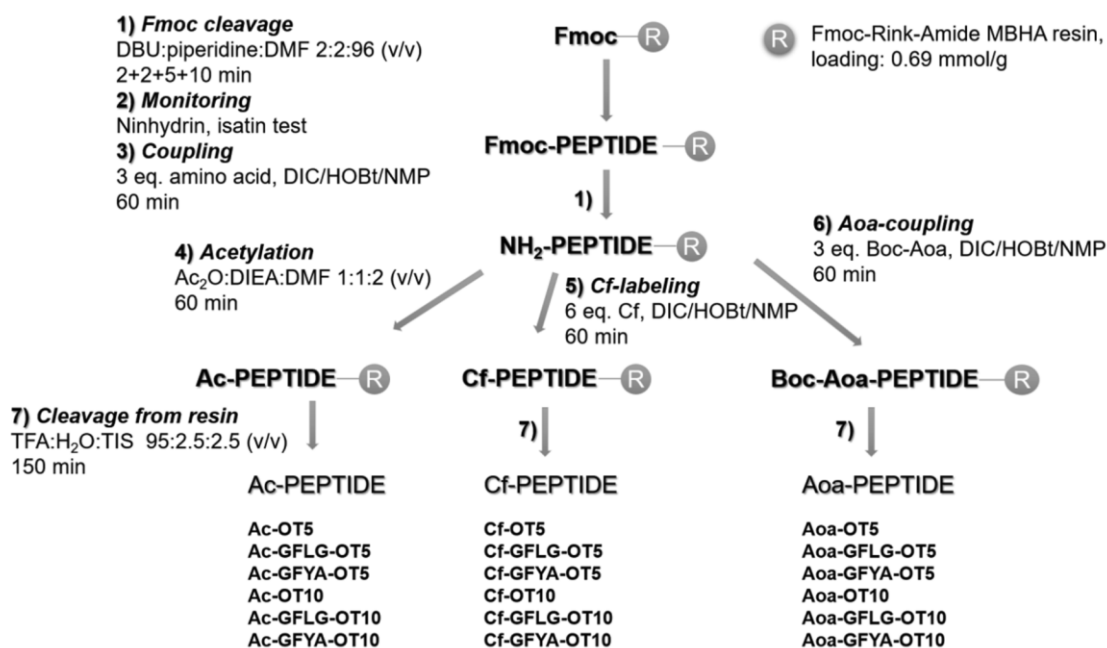
Obrázek 32 – Deriváty ASA použité ke konjugaci s peptidovými nosiči

V kontextu těchto informací byly tři nové *N*-substituované deriváty kyseliny 4-aminosalicylové (**Obr. 32**) s dobrou antimykobakteriální aktivitou konjugovány s oligotuftsinovými nosiči [TKPKG]_n (kde n = 1 a 2), a to prostřednictvím oximových nebo amidových vazeb ve snaze dosáhnout zejména vyšší intracelulární účinnosti a tím vyšší selektivitu. Mezi deriváty ASA a nosič byly navíc vmezeřeny enzymaticky labilní linkerové sekvence (GFLG, GFYA). Byla hodnocena *in vitro* antimykobakteriální účinnost na intracelulární populaci mykobakterií, dále např. buněčný uptake, intracelulární lokalizace či rychlost a průběh lysozomální degradace. Schopnost *in vitro* penetrace nosného peptidu TKPKG byla stanovena pomocí sféroidů jako buněčného prostředí napodobujícího tkáň a také modelu tkáňové bariéry.

Připraveno a testováno bylo tedy dohromady šest různých peptidových sekvencí a tyto byly vzájemně porovnány s ohledem na počet tuftsinových jednotek a přítomnost a konkrétní sekvenci linkeru.

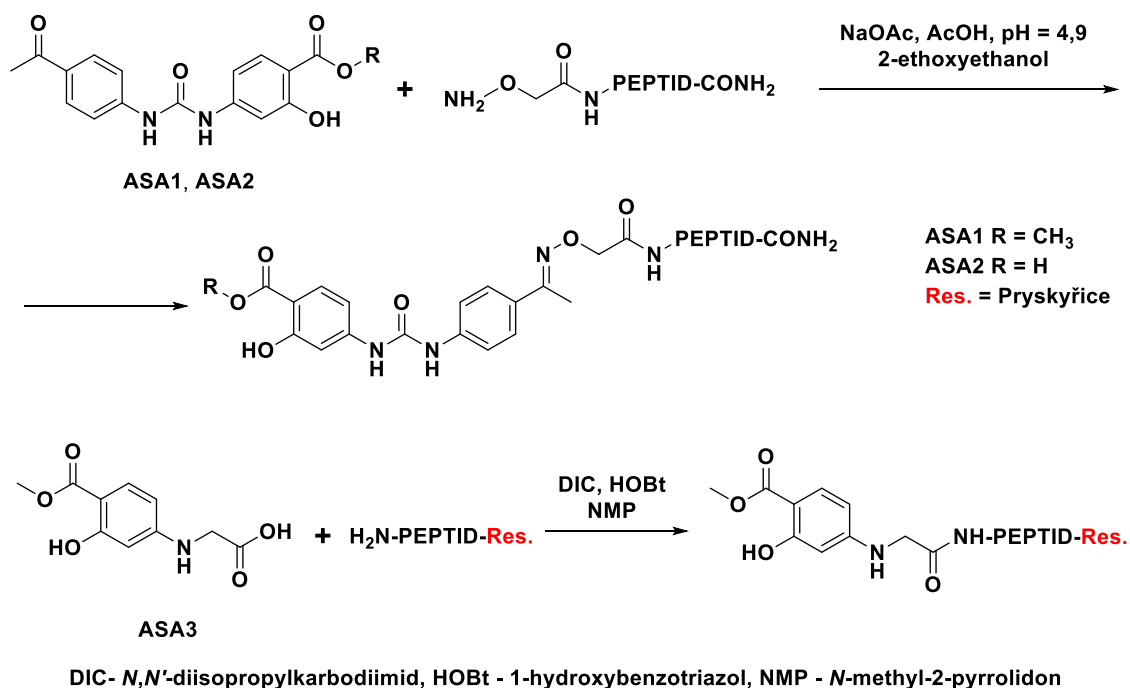
Peptidy byly syntetizovány manuálně na pevné fázi za použití standardní Fmoc/*t*-Bu strategie a pryskyřice typu Rink Amide. Všechny připravené peptidy mají

proto po odštěpení z pryskyřice (pevné fáze) C-konec ve formě amidu. Ve všech případech byly syntetizovány kromě konjugátů s účinnými molekulami také kontrolní peptidy s acetylovaným N-koncem (Ac-; pro studie selektivity na lidských buněčných kulturách modelujících hostitelské buňky *Mtb.*), s navázaným 5(6)-karboxyfluoresceinem (Cf-; pro studium *in vitro* buněčné absorpce a intracelulární lokalizace) a (aminooxy)acetylované (Aoa-; pro navazující syntézu oximů z ASA 1 a 2 v roztoku). Celý proces přípravy peptidových řetězců dobře objasňuje schéma (Obr. 33) převzaté z originální publikace Horváth *et al.* [157]



Obrázek 33 – Schéma přípravy peptidových nosičů (Horváth *et al.*) [157]

V rámci studie bylo připraveno osmnáct nových ASA-konjugátů. Sloučeniny ASA 1 a 2 byly k peptidům připojeny prostřednictvím oximové vazby (Obr. 34). Tato reakce již probíhala v kapalně fázi po uvolnění peptidu z pevné fáze (Obr. 33, krok 7) v mírně kyselém prostředí. Sloučenina ASA 3 byla připojena k peptidovému řetězci ještě na pevné fázi (Obr. 34) způsobem obdobným jako při připojování aminokyselin (Obr. 33, krok 3).



Obrázek 34 - Syntéza konjugátů [157]

Prokázali jsme, že *in vitro* extracelulární antimykobakteriální aktivita ASA derivátů proti *Mtb.* H₃₇Rv byla v peptidových konjugátech zachována. Samostatné deriváty ASA nebyly účinné na intracelulární infekci, ale konjugáty ASA-peptid byly aktivní proti intracelulárním bakteriím. Byla rovněž hodnocena intracelulární distribuce peptidových nosičů a bylo zjištěno, že peptidy se internalizují hlavně v cytosolu, a to v závislosti na koncentraci. Selektivita sloučenin ASA i výsledných konjugátů byla hodnocena na buňkách MonoMac6 pomocí MTT (kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity). Bylo zjištěno, že IC₅₀ pro buněčnou linii MonoMac6 jsou průřezově podstatně vyšší (někdy až 33×) než MIC pro *Mtb.* H₃₇Rv. Jedinou výjimku tvoří nekonjugovaná sloučenina ASA1, která měla vyšší inhibiční aktivitu vůči MonoMac6, tato toxicita byla ovšem podstatně redukována konjugací s peptidy, což svědčí ve prospěch cílenější distribuce konjugátů a tím zvýšení selektivity. Nejvýraznějším příkladem je konjugát ASA2-Aoa-OT5, který je vysoce selektivní při zachování velmi dobré inhibiční aktivity v porovnání s parentní sloučeninou ASA2. Ucelený pohled na antimykobakteriální aktivitu ASA derivátů a jejich peptidových konjugátů zprostředkovává **Tab. 7.** [157]

Tabulka 7 – Extracelulární antimykobakteriální aktivita ASA a jejich konjugátů [157]

Kód sloučeniny	MIC <i>Mtb.</i> H ₃₇ Rv [μM]
ASA2-Aoa-OT5	5,6
ASA1-Aoa-OT5	22,0
ASA3-OT5	27,2
ASA2-Aoa-GFLG-OT5	15,7
ASA1-Aoa-GFLG-OT5	31,1
ASA3-GFLG-OT5	18,0
ASA2-Aoa-GFYA-OT5	11,2
ASA1-Aoa-GFYA-OT5	44,5
ASA3-GFYA-OT5	34,1
ASA2-Aoa-OT10	14,2
ASA1-Aoa-OT10	84,3
ASA3-OT10	16,0
ASA2-Aoa-GFLG-OT10	11,2
ASA1-Aoa-GFLG-OT10	59,3
ASA3-GFLG-OT10	37,0
ASA2-Aoa-GFYA-OT10	8,1
ASA1-Aoa-GFYA-OT10	62,2
ASA3-GFYA-OT10	47,5
ASA1	121,8
ASA2	1,6
ASA3	4,4

Jak již bylo zmíněno v úvodu, *Mtb.* je intracelulární patogen a pro naše účely je nezbytné stanovit intracelulární aktivitu připravených peptidových konjugátů. Jako model *Mtb.* infikovaného makrofágu pro stanovení *in vitro* aktivity předmětných sloučenin byla zvolena buněčná linie MonoMac6 infikovaná *Mtb* H₃₇Rv (protože má pravděpodobně stejné fenotypové a funkční charakteristiky jako zralé monocyty, buňky jsou fagocytární a exprimují receptor CR3, který je důležitý pro vstup *Mtb.* do buňky). [157, 176]

Výsledky potvrzují, že samotné sloučeniny ASA mají jen zanedbatelnou nebo žádnou intracelulární aktivitu, tzn. nebyl pozorován žádný rozdíl oproti kontrole (avšak vůči samotným *Mtb.* kulturám *in vitro* vykazují ASA velmi dobrou inhibiční aktivitu, **Tab. 7**). Bylo prokázáno, že peptidové konjugáty ASA inhibují růst intracelulárních bakterií způsobem závislým na koncentraci (patrně díky zvýšené míře buněčného vychytávání ve srovnání s volnými sloučeninami). Pro spolehlivý intracelulárně baktericidní účinek ovšem není důležité pouze buněčné vychytávání celého peptidu, ale zejména rychlost uvolňování samotného potenciálního léčiva (ASA) z peptidu. Byla pozorována jasná souvislost mezi aktivitou ASA-konjugátů a jejich intracelulární

degradací (a tím uvolnění léčiva z nosiče). Profil degradace konjugátů v lysozomálním homogenátu jater potkana byl analyzován pomocí HPLC-MS. Nebyla pozorována degradace amidové nebo oximové vazby, kterou byly malé molekuly připojeny, a nejmenší fragmenty obsahující účinnou látku ASA byly sloučeniny tvořené ASA a první *N*-terminální aminokyselinou (ASA1-Aoa-Gly-OH, ASA1-Aoa-Thr-OH, ASA2-Aoa-Gly-OH, ASA2-Aoa-Thr-OH, ASA3-Gly-OH a ASA3-Thr-OH). Byl také potvrzen předpoklad, že konjugáty obsahující štěpitelný linker (GFLG, GFYA) jsou štěpeny rychleji a ve větší míře ve srovnání s konjugáty OT5 a OT10 bez linkeru (konjugáty s linkerem a bez linkeru mají podobné vzorce degradace, avšak liší se právě v její rychlosti).

8 Závěr

Hlavním cílem práce byla příprava a hodnocení nových antimykobakteriálně účinných molekul. Na základě známého isoniazidového scaffoldu byly navrženy rozsáhlé série “me-too“ analog, zejména funkčních derivátů kyseliny (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanové **2**. Byla získána a hodnocena řada sloučenin s výrazně lepšími farmakochemickými vlastnostmi, např. se zvýšenou lipofilitou, která je důležitá pro pasivní difúzi obtížně překonatelnou mykobakteriální buněčnou stěnou.

Byla připravena řada funkčních derivátů předlokové kyseliny (především amidy a estery). Tyto sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Mtb.* H₃₇Rv, netuberkulózním mykobakteriím a také MDR-TBC. Některé sloučeniny vykazovaly vynikající aktivitu nejen proti *Mtb.* (MIC od $\leq 0,03$ μM), ale také proti *M. kansasii* (MIC od 0,25 μM) a *M. avium* (MIC od 32 μM). Nejlepší hodnoty MIC proti MDR-TBC byly od 8 μM . Bylo experimentálně potvrzeno, že zkoumané sloučeniny inhibují mykobakteriální InhA a zároveň nevykazují žádnou cytotoxickou a cytostatickou aktivitu vůči HepG2. U některých sloučenin je možné diskutovat doplňkový mechanismus účinku, toto bude ovšem předmětem budoucího zkoumání.

Spojením INH s lipofilními fragmenty přes pyruvátový můstek se podařilo připravit sloučeniny, které jsou účinnější vůči všem testovaným mykobakteriálním kmenům, což je pravděpodobně způsobeno schopností lépe pronikat přes buněčné membrány mykobakterií, ve srovnání s INH. Obecně platí, že připravené sloučeniny průřezově napříč zmíněnými publikacemi disponují zlepšenými antimikrobiálními vlastnostmi v porovnání s původním isoniazidem, rovněž mají významně zlepšený farmakologicko-toxikologický profil.

Pro nejslibnější sloučeniny odvozené od INH byl rovněž proveden *in silico* drug-likeness screening u sloučenin s nejslibnější aktivitou s velmi dobrými výsledky (Ghose a Lipinski) a žádná z předkládaných sloučenin nebyla identifikována jako tzv. pan-assay interference compound.

Čtvrtá publikace se tematicky poněkud odchyluje od syntézy inhibitorů InhA. V rámci této studie byly navrženy a připraveny peptidové nosiče pro potenciální antituberkulotika odvozená od kyseliny *p*-aminosalicylové, jejichž peptidové konjugáty dokážou cílit také na intracelulární formy mykobakterií. Bylo kromě jiného prokázáno, že tyto konjugáty mohou zásadním způsobem řešit toxicitu původních derivátů ASA,

avšak při zachování původní antimikrobní aktivity. Konjugáty jsou tedy rovněž velmi selektivní a konečně i velmi efektivní v eliminaci intracelulárních mykobakterií, aniž by poškodily buňku samotnou. Tento terapeutický přístup, do praxe dosud neaplikovaný, může v budoucnosti představovat milník v terapii TBC, už jen z hlediska jisté šetrnosti a respektu vůči oslabenému organismu pacienta (nižší toxicita a specifitější cílení), nemluvě o jeho prokázané *in vitro* efektivitě. Takový komplexní přístup kombinující poznatky biologické, biochemické a farmakologické může otevřít cestu mnoha potenciálním antituberkulotikům s vynikající aktivitou, která se nyní nacházejí mimo střed zájmu, např. kvůli špatné rozpustnosti, vyšší toxicitě, nespecifické distribuci a dalším jiným obtížnostem.

V rámci práce se tak podařilo celkově identifikovat řadu nadějných sloučenin.

9 Seznam publikací a prezentací

9.1 Publikace komentované

P1: PFLÉGR, V.; HORVÁTH, L.; STOLAŘÍKOVÁ, J.; PÁL, A.; KORDULÁKOVÁ, J.; BŐSZE, S.; VINŠOVÁ, J.; KRÁTKÝ, M. Design and Synthesis of 2-(2-Isonicotinoylhydrazineylidene)Propanamides as InhA Inhibitors with High Antitubercular Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2021**, 223, 113668. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113668>.

IF₂₀₂₁ = 7.088 (Q1), AIS Q1.

Příspěvek: Syntéza a purifikace všech sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat, sepsání experimentální části publikace

P2: PFLÉGR, V.; STOLAŘÍKOVÁ, J.; VINŠOVÁ, J.; KRÁTKÝ, M. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Isoniazid Derivatives Tethered with Aliphatic Amines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2022**, 22, 2695–2706. <https://doi.org/10.2174/1568026622666220805152811>.

IF₂₀₂₁ = 3.570 (Q3), AIS Q2.

Příspěvek: Syntéza a purifikace všech sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat, sepsání experimentální části publikace

P3: PFLÉGR, V.; MAIXNEROVÁ, J.; STOLAŘÍKOVÁ, J.; PÁL, A.; KORDULÁKOVÁ, J.; TREJTNAR, F.; VINŠOVÁ, J.; KRÁTKÝ, M. Design and Synthesis of Highly Active Antimycobacterial Mutual Esters of 2-(2-Isonicotinoylhydrazineylidene)Propanoic Acid. *Pharmaceuticals*, **2021**, 14, 1302. <https://doi.org/10.3390/ph14121302>.

IF₂₀₂₁ = 5.215 (Q1Q2), AIS Q1Q2.

Příspěvek: Syntéza a purifikace všech sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat, sepsání publikace

P4: BORBÁLA HORVÁTH, L.; KRÁTKÝ, M.; **PFLÉGR, V.;** MÉHES, E.; GYULAI, G.; KOHUT, G.; BABICZKY, Á.; BIRI-KOVÁCS, B.; BARANYAI, Z.; VINŠOVÁ, J.; BŐSZE, S. Host Cell Targeting of Novel Antimycobacterial 4-Aminosalicylic Acid

Derivatives with Tuftsin Carrier Peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2022**, 174, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.03.009>.

IF₂₀₂₁ = 5.589 (Q1), AIS Q2.

Příspěvek: Syntéza části peptidových nosičů, konjugace jedné ASA sloučeniny s čtyřmi peptidy

9.2 Publikace ostatní

KRÁTKÝ, M.; JAKLOVÁ, K.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; SVRČKOVÁ, K.; **PFLÉGR, V.**; VINŠOVÁ, J. *N*-[3,5-Bis(Trifluoromethyl)Phenyl]-5-Bromo-2-Hydroxybenzamide Analogues: Novel Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2020**, 20, 2094–2105. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200819154722>.

IF₂₀₂₀ = 3.295 (Q3), AIS Q2.

Příspěvek: Syntéza a purifikace části sloučenin

KRÁTKÝ, M.; KONEČNÁ, K.; BRABLÍKOVÁ, M.; JANOUŠEK, J.; **PFLÉGR, V.**; MAIXNEROVÁ, J.; TREJTAR, F.; VINŠOVÁ, J. Iodinated 1,2-Diacylhydrazines, Benzohydrazide-Hydrazones and Their Analogues as Dual Antimicrobial and Cytotoxic Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2021**, 41, 116209. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116209>.

IF₂₀₂₁ = 3.461 (Q3Q3Q2), AIS Q3Q3Q2.

Příspěvek: Syntéza a purifikace části sloučenin

KRÁTKÝ, M.; VU, Q. A.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; MARUCA, A.; SILVA, T. B.; AMBROŽ, M.; **PFLÉGR, V.**; ROCCA, R.; SVRČKOVÁ, K.; ALCARO, S.; BORGES, F.; VINŠOVÁ, J. Novel Propargylamine-Based Inhibitors of Cholinesterases and Monoamine Oxidases: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Study. *Bioorganic Chemistry*, **2021**, 116, 105301. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105301>.

IF₂₀₂₁ = 5.307 (Q1Q2), AIS Q2Q3.

Příspěvek: Syntéza a purifikace části sloučenin

PFLÉGR, V.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; SVRČKOVÁ, K.; ŠVARCOVÁ, M.; VINŠOVÁ, J.; KRÁTKÝ, M. 5-Aryl-1,3,4-Oxadiazol-2-Amines Decorated with Long Alkyl and Their Analogues: Synthesis, Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition and Docking Study. *Pharmaceuticals*, **2022**, 15, 400. <https://doi.org/10.3390/ph15040400>.

IF₂₀₂₁ = 5.215 (Q1Q2), AIS Q1Q2.

Příspěvek: Syntéza a purifikace všech sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat, sepsání publikace

HOUNGBEDJI, N.-H.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; **PFLÉGR, V.**; SVRČKOVÁ, K.; ŠVARCOVÁ, M.; VINŠOVÁ, J.; KRÁTKÝ, M. Novel Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase Derived from Benzohydrazides: Synthesis, Evaluation and Docking Study. *Pharmaceuticals*, **2023**, 16, 172. <https://doi.org/10.3390/ph16020172>.

Příspěvek: Syntéza a purifikace poloviny sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat

IF₂₀₂₁ = 5.215 (Q1Q2), AIS Q1Q2.

9.3 Konferenční příspěvky

Martin KRÁTKÝ, **Václav PFLÉGR**, Jarmila VINŠOVÁ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ. Novel 2-(2-Aryloylhydrazono)propanoic Acid Derivatives: Synthesis and Biological Activity. **In:** *51st Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2016. Lázně Bělohrad: Czech Chemical Society, 2016, p. 102. (*Posterové sdělení*)

Martin KRÁTKÝ, **Václav PFLÉGR**, Jarmila VINŠOVÁ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ. Conjugable Derivatives and Antitubercular Drugs for Coupling with Tuftsin Carriers: Synthesis and Evaluation. **In:** *52nd Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2017. Lázně Bělohrad: Czech Chemical Society, 2017, p. 88. (*Posterové sdělení*)

Václav PFLÉGR, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of novel antimycobacterial isoniazid analogues. **In:** *XXVI. Studentská vědecká konference*. Hradec Králové: SČSF, 2018, p. 30. (*Přednáška*)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. Synthesis and Evaluation of Novel Antimycobacterial Isoniazid Analogues. **In:** *53rd Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2018. Lázně Bělohrad: Czech Chemical Society, 2018, p. 121. (*Posterové sdělení*)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Sara BRUNO, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Szilvia BŐSZE, Jarmila VINŠOVÁ. Synthesis and Evaluation of Novel Antimycobacterial Isoniazid Analogues. **In:** Paul Ehrlich Euro-PhD Network & MuTaLig COST Action meeting 2019. Catanzaro (Italy): MedChem, 2019, p. 86. (*Přednáška*)

Lilla HORVÁTH, Martin KRÁTKÝ, Zsuzsa BARANYAI, **Václav PFLÉGR**, Jarmila VINŠOVÁ, Szilvia BŐSZE. *In vitro* profiling of new antimycobacterial compounds and their peptide conjugates. **In:** *11th Joint Meeting on Medicinal Chemistry 2019*. Praha: Czech Pharmaceutical Society, 2019, p. 70. (*Posterové sdělení*)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Sara BRUNO, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Lilla HORVÁTH, Szilvia BŐSZE, Jarmila VINŠOVÁ. Synthesis and evaluation of novel isoniazid-based compounds as potential antimycobacterial agents. **In:** *11th Joint Meeting*

on *Medicinal Chemistry 2019*. Praha: Czech Pharmaceutical Society, 2019, p. 110. (Posterové sdělení)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. Study of potential antimycobacterials based on amides and esters of 2-(2-isonicotinoyl)hydrazonopropanoic acid. **In:** *54th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2019. Špindlerův Mlýn: Czech Chemical Society, 2019, p. 127. (Posterové sdělení)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. (E)-2-(2-Isonicotinoylhydrazineylidene)propanoic acid derivatives as promising antimycobacterial substances. **In:** *10th Postgraduate and Postdoc Conference*. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2020, BPC16 (Session 1 – Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry). (Přednáška)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. Studium antimykobakteriální aktivity halogenovaných derivátů (E)-2-(2-isonicotinoylhydrazinyliden)-N-fenylpropanamidu. **In:** *Czech. Chem. Soc. Symp. Ser. 18*, Praha: Czech Chemical Society, 2020, p. 169. (Posterové sdělení)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jarmila VINŠOVÁ. Study of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as potential antituberculotics. **In:** *11th Postgraduate and Postdoc Conference*. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2021, BPC12 (Session 1 – Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry). (Přednáška)

Quynh Anh VU, **Václav PFLÉGR**, Martin KRÁTKÝ. Synthesis of potential mycobacterial InhA and cholinesterases inhibitors based on triclosan. **In:** *XXVIII. Studentská vědecká konference*. Hradec Králové: SČSF, 2021. (Přednáška)

Kateřina, KUČEROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of potential antitubercular drugs based on isoniazid. **In:** *XXVIII. Studentská vědecká konference*. Hradec Králové: SČSF, 2021. (Přednáška)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jarmila VINŠOVÁ. 2,5-Disubstituované 1,3,4-oxadiazoly jako vysoce účinná potenciální antituberkulotika. **In:** *ChemZi 17*, Horný Smokovec: Slovak Chemical Society, 2021, p. 226. (*Posterové sdělení*)

Václav PFLÉGR, Martin KRÁTKÝ, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ. Study of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as potential antitubercutotics. **In:** *55th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2021. Špindlerův Mlýn: Czech Chemical Society, 2021, p. 166. (*Posterové sdělení*)

Enikő ŠIKOROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. 2-Alkyl-5-(pyridine-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as potential antitubercutotics. **In:** *55th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2021. Špindlerův Mlýn: Czech Chemical Society, 2021, p. 186. (*Posterové sdělení*)

Václav PFLÉGR, Jarmila VINŠOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as potential antitubercutotics. **In:** *12th Postgraduate and Postdoc Conference*. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2022, BPC5 (Session 1 – Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry). (*Přednáška*)

Apolena KOKLAROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of potential antimycobacterial agents based on hydrazine derivatives. **In:** *XXIX. Studentská vědecká konference*. Hradec Králové: SČSF, 2022. (*Přednáška*)

Enikő ŠIKOROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of antimycobacterial active 1,3,4-oxadiazole derivatives and their precursors. **In:** *XXIX. Studentská vědecká konference*. Hradec Králové: SČSF, 2022. (*Přednáška*)

Matuš KYSELICA, **Václav PFLÉGR**, Martin KRÁTKÝ. 3-Amino-*N*-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-5-bromobenzamide analogues: novel acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. **In:** *f*. Hradec Králové: SČSF, 2022. (*Přednáška*)

Václav PFLÉGR, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Jana MAIXNEROVÁ, Galina KARABANOVICH, Adrian PÁL, Jana KODRDULÁKOVÁ, Zuzana NEJEDLÁ, Michaela LIEGERTO VÁ, Jarmila VINŠOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Long alkylamine decorated 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles as potential antituberculotics. **In:** *EMBO Workshop on Tuberculosis*. Paris: EMBO, Pausteur Institut, 2022, ID 73P, p.158. (Posterové sdělení)

Apolena KOKLAROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. Synthesis and evaluation of hydrazine-based potential antimycobacterial agents. **In:** *56th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2022. Špindlerův Mlýn: Czech Chemical Society, 2022, p. 162. (Posterové sdělení)

Enikő ŠIKOROVÁ, **Václav PFLÉGR**, Jiřina STOLAŘÍKOVÁ, Martin KRÁTKÝ. 2-Alkyl-5-(heteroaryl-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as potential antituberculotics. **In:** *56th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2022. Špindlerův Mlýn: Czech Chemical Society, 2022, p. 175. (Posterové sdělení)

9.4 Zvané přednášky

Václav PFLÉGR. Nové směry ve vývoji antituberkulotik. Odborný seminář pro posluchače oboru chemie a toxikologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí and Labem, CPTO 2023.

10 Seznam použité literatury

1. WHO, *Global tuberculosis report*. 2022, Geneva.
2. Natarajan, A., et al., *A systemic review on tuberculosis*. Indian J Tuberc, 2020. **67**(3): p. 295-311.
3. Votava, V., Homolka J. *Tuberkulóza*. 1991: Karolinum, Praha.
4. Escombe, A.R., et al., *The Infectiousness of Tuberculosis Patients Coinfected with HIV*. PLOS Medicine, 2008. **5**(9): p. e188.
5. Lange, C., et al., *Management of drug-resistant tuberculosis*. Lancet, 2019. **394**(10202): p. 953-966.
6. Nahid, P., et al., *Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline*. Am J Respir Crit Care Med, 2019. **200**(10): p. E93-E142.
7. Walker, T.M., et al., *The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: a genotypic analysis*. Lancet Microbe, 2022. **3**(4): p. E265-E273.
8. Dartois, V.A. and E.J. Rubin, *Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities*. Nat Rev Microbiol, 2022. **20**(11): p. 685-701.
9. Nemes, E., et al., *Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination*. N Engl J Med, 2018. **379**(2): p. 138-149.
10. Sakula, A., *Robert koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882*. Can Vet J, 1983. **24**(4): p. 127-131.
11. Ansari, S., et al., *Pott's Spine: Diagnostic Imaging Modalities and Technology Advancements*. N Am J Med Sci, 2013. **5**(7): p. 404-411.
12. Alva, A., et al., *Morphological characterization of Mycobacterium tuberculosis in a MODS culture for an automatic diagnostics through pattern recognition*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82809.
13. Percival, S.L., *Preface*, in *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, S.L. Percival, et al., Editors. 2014, Academic Press: London. p. xvii.
14. Kivihya-Ndugga, L., et al., *Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1012-1015.
15. Chen, P., et al., *A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of*

- extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid.* J Clin Microbiol, 2012. **50**(4): p. 1166-1170.
16. Tait, D.R., et al., *Final Analysis of a Trial of M72/AS01(E) Vaccine to Prevent Tuberculosis.* N Engl J Med, 2019. **381**(25): p. 2429-2439.
 17. Van der Meeren, O., et al., *Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01(E) Vaccine to Prevent Tuberculosis.* N Engl J Med, 2018. **379**(17): p. 1621-1634.
 18. Adjemian, J., et al., *Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteriosis.* Semin Respir Crit Care Med, 2018. **39**(03): p. 325-335.
 19. Feysia, S.G., et al., *Incidence, Clinical Manifestation, Treatment Outcome, and Drug Susceptibility Pattern of Nontuberculous Mycobacteria in HIV Patients in Tehran, Iran.* Ethiop J Health Sci, 2020. **30**(1): p. 75-84.
 20. Ratnatunga, C.N., et al., *The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease.* Front Immunol, 2020. **303**(11): 32194556
 21. Nessar, R., et al., *Mycobacterium abscessus: a new antibiotic nightmare.* J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(4): p. 810-818.
 22. Griffith, D.E., et al., *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(4): p. 367-416.
 23. Wallace, R.J., et al., *Macrolide/Azalide Therapy for Nodular/Bronchiectatic Mycobacterium avium Complex Lung Disease.* Chest, 2014. **146**(2): p. 276-282.
 24. Singh, M., et al., *Prevalence and risk factors for transmission of infection among children in household contact with adults having pulmonary tuberculosis.* Arch Dis Child, 2005. **90**(6): p. 624-628.
 25. Homolka, J., et al., *Vnitřní lékařství: Pneumologie. Svazek III.* 2001: Galén.
 26. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence.* Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 463-496.
 27. Wallenfels, J., *Epidemiologie tuberkulózy.* Kardiol Rev Int Med 2019. **21**(3): p. 125-128.
 28. Alderwick, L.J., et al., *The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(8): p. a021113.
 29. Abrahams, K.A. and G.S. Besra, *Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target.* Parasitology, 2018. **145**(2): p. 116-133.
 30. Chiaradia, L., et al., *Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane.* Sci Rep, 2017. **7**(1): 12807.

31. Chalut, C., *MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria*. Tuberculosis, 2016. **100**: p. 32-45.
32. Favrot, L. and D.R. Ronning, *Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(9): p. 1023-1036.
33. Murray, J.F., D.E. Schraufnagel, and P.C. Hopewell, *Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(12): p. 1749-1759.
34. Barry, C.E., 3rd, R.A. Slayden, and K. Mdluli, *Mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Drug Resist Updat, 1998. **1**(2): p. 128-134.
35. Dutt, A.K., D. Moers, and W.W. Stead, *Undesirable side effects of isoniazid and rifampin in largely twice-weekly short-course chemotherapy for tuberculosis*. Am Rev Respir Dis, 1983. **128**(3): p. 419-424.
36. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravdu (Nidrazid)*. 2019; Available from: <https://prehledy.sukl.cz/prehledy/v1/dokumenty/11059>.
37. Rawat, R., A. Whitty, and P.J. Tonge, *The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance*. Proc Natl Acad Sci, 2003. **100**(24): p. 13881-13886.
38. Hu, Y.Q., et al., *Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity*. Eur J Med Chem, 2017. **133**: p. 255-267.
39. Ridahunlang, N., R. Bisht, and N. Rishanlang, *Isoniazid Derivatives as Anti-Tubercular Agents: From Structural Design to Clinical Investigations*. Infect Disord Drug Targets, 2023. **23**(3): p. 44-68.
40. de Faria, C.F., et al., *Designing new antitubercular isoniazid derivatives with improved reactivity and membrane trafficking abilities*. Biomed Pharmacother, 2021. **144**: 112362.
41. Vosátka, R., et al., *New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action*. Eur J Med Chem, 2018. **151**: p. 824-835.
42. Colwell, C.A., et al., *Laboratory and clinical studies of d-glucuronolactone isonicotinyl hydrazone in pulmonary tuberculosis*. J Lab Clin Med, 1955. **46**(4): p. 597-607.

43. Pare, C.M. and M. Sandler, *A clinical and biochemical study of a trial of iproniazid in the treatment of depression*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1959. **22**(3): p. 247-251.
44. Lim, S.A., *Ethambutol-associated optic neuropathy*. Ann Acad Med Singap, 2006. **35**(4): p. 274-278.
45. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravdu (Sural)*. 2022; Available from: <https://prehledy.sukl.cz/prehledy/v1/dokumenty/12757>.
46. Zhang, L., et al., *Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol*. Science, 2020. **368**(6496): p. 1211-1219.
47. Sacksteder, K.A., et al., *Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action*. Future Microbiol, 2012. **7**(7): p. 823-837.
48. Singh, M., et al., *The 1,2-ethylenediamine SQ109 protects against tuberculosis by promoting M1 macrophage polarization through the p38 MAPK pathway*. Commun Biol, 2022. **5**(1): 759.
49. Khoshnood, S., et al., *Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis*. Front Microbiol, 2021. **12**: 717045.
50. SÚKL. *Souhr údajů o přípravdu (Delyba)*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/delyba-epar-product-information_cs.pdf.
51. Manjunatha, U., H.I. Boshoff, and C.E. Barry, *The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling*. Commun Integr Biol, 2009. **2**(3): p. 215-218.
52. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravku (Dovprela)*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/dovprela-previously-pretomanid-fgk-epar-product-information_cs.pdf.
53. Deshpande, D., et al., *d-Cycloserine Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Susceptibility, and Dosing Implications in Multidrug-resistant Tuberculosis: A Faustian Deal*. Clin Infect Dis, 2018. **67**(suppl_3): p. 308-316.
54. Ma, Z., A.M. Ginsberg, and M. Spigelman, *7.24 - Antimycobacterium Agents*, in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, J.B. Taylor and D.J. Triggle. 2007, Elsevier: Oxford. p. 699-730.

55. Alghamdi, W.A., et al., *Cycloserine Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Patients with Tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019. **63**(5): e00055-19.
56. Barreteau, H., et al., *Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2008. **32**(2): p. 168-207.
57. Aronson, J.K., *Cycloserine*, in *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*, J.K. Aronson, Editor. 2016, Elsevier: Oxford. p. 796.
58. WHO. *Summary of Product Characteristics (Cycloserine cps. 250)*. 2015; Available from: <https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/TB154part4v1.pdf>.
59. Morlock, G.P., et al., *ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(12): p. 3799-3805.
60. WHO. *Summary of Product Characteristics (Ethionamide 250 mg)*. 2008; Available from: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/TB133part4v1_0.pdf.
61. Srivastava, S., et al., *Potency of vancomycin against Mycobacterium tuberculosis in the hollow fiber system model*. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021. **24**: p. 403-410.
62. Soetaert, K., et al., *Increased Vancomycin Susceptibility in Mycobacteria: a New Approach To Identify Synergistic Activity against Multidrug-Resistant Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. **59**(8): p. 5057-5060.
63. Chambers, H.F., et al., *Activity of amoxicillin/clavulanate in patients with tuberculosis*. *Clin Infect Dis*, 1998. **26**(4): p. 874-877.
64. Banerjee, D. and R. Bhattacharyya, *Isoniazid and thioacetazone may exhibit antitubercular activity by binding directly with the active site of mycolic acid cyclopropane synthase: Hypothesis based on computational analysis*. *Bioinformatics*, 2012. **8**(16): p. 787-789.
65. Jaganath, D., G. Lamichhane, and M. Shah, *Carbapenems against Mycobacterium tuberculosis: a review of the evidence*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016. **20**(11): p. 1436-1447.
66. Furesz, S., *Chemical and biological properties of rifampicin*. *Antibiot Chemother*, 1970. **16**: p. 316-51.

67. Prasad, R., N. Gupta, and A. Banka, *Multidrug-resistant tuberculosis/rifampicin-resistant tuberculosis: Principles of management*. Lung India, 2018. **35**(1): p. 78-81.
68. Van Deun, A., et al., *Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(8): p. 2633-2640.
69. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravku (Benemycin)*. 2023; Available from: <https://prehledy.sukl.cz/prehledy/v1/dokumenty/53960>.
70. Campbell, E.A., et al., *Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase*. Cell, 2001. **104**(6): p. 901-912.
71. Pranger, A.D., et al., *The Role of Fluoroquinolones in the Treatment of Tuberculosis in 2019*. Drugs, 2019. **79**(2): p. 161-171.
72. Sarathy, J., et al., *Fluoroquinolone Efficacy against Tuberculosis Is Driven by Penetration into Lesions and Activity against Resident Bacterial Populations*. Antimicrob Agents Chemother, 2019. **63**(5): e02516-18.
73. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravku (Ciplox)*. 2020; Available from: <https://prehledy.sukl.cz/prehledy/v1/dokumenty/14155>.
74. Gopal, M., et al., *Systematic review of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2013. **17**(8): p. 1001-1007.
75. Lechartier, B. and S.T. Cole, *Mode of Action of Clofazimine and Combination Therapy with Benzothiazinones against Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(8): p. 4457-4463.
76. Co., N.P. *Highlights of Prescribing Information (Lamprene tbl.)*. 1986; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/019500s013lbl.pdf.
77. Mahajan, R., *Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years*. Int J Appl Basic Med Res, 2013. **3**(1): p. 1-2.
78. WHO. *Summary of Product Characteristic (Annex 1, Sirturo)*. 2021; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sirturo-epar-product-information_en.pdf.
79. Mbuagbaw, L., et al., *Outcomes of Bedaquiline Treatment in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis*. Emerg Infect Dis, 2019. **25**(5): p. 936-943.
80. Pai, H., et al., *Bedaquiline safety, efficacy, utilization and emergence of resistance following treatment of multidrug-resistant tuberculosis patients in South Africa: a retrospective cohort analysis*. BMC Infect Dis, 2022. **22**(1): 870.

81. Borisov, S.E., et al., *Effectiveness and safety of bedaquiline-containing regimens in the treatment of MDR- and XDR-TB: a multicentre study*. Eur Respir J, 2017. **49**(5).
82. Grosset, J.H. and T. Singer, *Streptomycin*, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy and K. Hughes. 2013, Academic Press: San Diego. p. 568-569.
83. Woodruff, H.B., *Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine*. Appl Environ Microbiol, 2014. **80**(1): p. 2-8.
84. Reeves, A.Z., et al., *Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5' untranslated region of whiB7*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(4): p. 1857-1865.
85. Cegielski, J.P., et al., *Aminoglycosides and Capreomycin in the Treatment of Multidrug-resistant Tuberculosis: Individual Patient Data Meta-analysis of 12 030 Patients From 25 Countries, 2009–2016*. Clin Infect Dis, 2020. **73**(11): p. e3929-e3936.
86. Krause, K.M., et al., *Aminoglycosides: An Overview*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(6).
87. Childs-Kean, L.M., et al., *Aminoglycoside Allergic Reactions*. Pharmacy, 2019. **7**(3): 124.
88. Singh, B., et al., *Linezolid for drug-resistant pulmonary tuberculosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2019. **3**(3): Cd012836.
89. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravku (Dilizolen 2 mg)*. 2022; Available from: <https://prehledy.sukl.cz/prehledy/v1/dokumenty/13119>.
90. Hashemian, S.M.R., T. Farhadi, and M. Ganjparvar, *Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care*. Drug Des Devel Ther, 2018. **12**: p. 1759-1767.
91. Chakraborty, S. and K.Y. Rhee, *Tuberculosis Drug Development: History and Evolution of the Mechanism-Based Paradigm*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(8): a021147.
92. Zhang, Y., et al., *Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance*. Microbiol Spectr, 2013. **2**(4): p. 1-12.
93. Shi, W., et al., *Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Microbes Infect, 2014. **3**(1): p. 1-8.

94. WHO. *Summary of Product Characteristics*. 2018; Available from: <https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/TB159part4.pdf>.
95. WHO. *What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-Recommended TB-Control strategy Known as DOTS*. 1999; Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65979/WHO_CDS_CPC_TB_99.270.pdf;jsessionid=
96. Davies, P.D., *The role of DOTS in tuberculosis treatment and control*. Am J Respir Med, 2003. **2**(3): p. 203-209.
97. WHO, *Treatment: drug-susceptible tuberculosis treatment (Mod. 4)*, in *WHO consolidated guidelines on tuberculosis*, WHO. 2022: Geneva.
98. Jang, J.G. and J.H. Chung, *Diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis*. Yeungnam Univ J Med, 2020. **37**(4): p. 277-285.
99. WHO, *Consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*, WHO. 2019: Geneva.
100. Seung, K.J., S. Keshavjee, and M.L. Rich, *Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(9): p. a017863.
101. Angula, K.T., L.J. Legoabe, and R.M. Beteck, *Chemical Classes Presenting Novel Antituberculosis Agents Currently in Different Phases of Drug Development: A 2010-2020 Review*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(5).
102. Massengo-Tiassé, R.P. and J.E. Cronan, *Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(9): p. 1507-1517.
103. Manjunatha, U.H., et al., *Direct inhibitors of InhA are active against Mycobacterium tuberculosis*. Sci Transl Med, 2015. **7**(269): 269ra3.
104. Parikh, S.L., G. Xiao, and P.J. Tonge, *Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid*. Biochemistry, 2000. **39**(26): p. 7645-50.
105. Torres, J.N., et al., *Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical M. tuberculosis isolates*. Emerg Microbes Infect, 2015. **4**(7): e42.
106. Encinas, L., et al., *Encoded library technology as a source of hits for the discovery and lead optimization of a potent and selective class of bactericidal direct inhibitors of Mycobacterium tuberculosis InhA*. J Med Chem, 2014. **57**(4): p. 1276-1288.

107. Hartkoorn, R.C., et al., *Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(2): p. 96-8.
108. Shirude, P.S., et al., *Methyl-thiazoles: a novel mode of inhibition with the potential to develop novel inhibitors targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2013. **56**(21): p. 8533-8542.
109. Pages, L. P. et al., *(Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-amine and (Pyrazol-3-yl)-1,3,4-thiazol-2-amine Compounds*, Astra Zeneza, WO2010118852A1. 2010.
110. Šink, R., et al., *Design, synthesis, and evaluation of new thiadiazole-based direct inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase (InhA) for the treatment of tuberculosis*. J Med Chem, 2015. **58**(2): p. 613-624.
111. Menendez, C., et al., *Synthesis and biological activities of triazole derivatives as inhibitors of InhA and antituberculosis agents*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(11): p. 5524-5531.
112. Pajk, S., et al., *New direct inhibitors of InhA with antimycobacterial activity based on a tetrahydropyran scaffold*. Eur J Med Chem, 2016. **112**: p. 252-257.
113. Pan, P. and P. J. Tonge, *Targeting InhA, the FASII Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies on Novel Inhibitor Scaffolds*. Curr Top Med Chem, 2012. **12**(7): p. 672-693.
114. Kamsri, P., et al., *Discovery of New and Potent InhA Inhibitors as Antituberculosis Agents: Structure-Based Virtual Screening Validated by Biological Assays and X-ray Crystallography*. J Chem Inf Model, 2020. **60**(1): p. 226-234.
115. AlMatar, M., et al., *Novel compounds targeting InhA for TB therapy*. Pharmacol Rep, 2018. **70**(2): p. 217-226.
116. McNeil, M.B., et al., *Mechanisms of resistance against NITD-916, a direct inhibitor of Mycobacterium tuberculosis InhA*. Tuberculosis, 2017. **107**: p. 133-136.
117. Chhabra, S., S. Kumar, and R. Parkesh, *Chemical Space Exploration of DprE1 Inhibitors Using Chemoinformatics and Artificial Intelligence*. ACS Omega, 2021. **6**(22): p. 14430-14441.
118. Kolly, G.S., et al., *Assessing the essentiality of the decaprenyl-phospho-d-arabinofuranose pathway in Mycobacterium tuberculosis using conditional mutants*. Mol Microbiol, 2014. **92**(1): p. 194-211.

119. Chikhale, R.V., et al., *Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis*. J Med Chem, 2018. **61**(19): p. 8563-8593.
120. Makarov, V., et al., *Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis*. Science, 2009. **324**(5928): p. 801-804.
121. Makarov, V. and K. Mikušová, *Development of Macozinone for TB treatment: An Update*. App Sci, 2020. **10**(7): 2269.
122. Makarov, V., et al., *Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(3): p. 372-383.
123. Christophe, T., et al., *High Content Screening Identifies Decaprenyl-Phosphoribose 2' Epimerase as a Target for Intracellular Antimycobacterial Inhibitors*. PLOS Pathogens, 2009. **5**(10): e1000645.
124. Shirude, P.S., et al., *Azaindoles: Noncovalent DprE1 Inhibitors from Scaffold Morphing Efforts, Kill Mycobacterium tuberculosis and Are Efficacious in Vivo*. J Med Chem, 2013. **56**(23): p. 9701-9708.
125. Batt, S.M., et al., *Whole Cell Target Engagement Identifies Novel Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Decaprenylphosphoryl- β -d-ribose Oxidase*. ACS Infect Dis, 2015. **1**(12): p. 615-626.
126. Karabanovich, G., et al., *Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2016. **59**(6): p. 2362-2380.
127. Wang, F., et al., *Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci, 2013. **110**(27): p. E2510-E2517.
128. Liu, R., et al., *Determinants of the Inhibition of DprE1 and CYP2C9 by Antitubercular Thiophenes*. Angew Chem, Int Ed, 2017. **56**(42): p. 13011-13015.
129. Poulton, N.C., et al., *Mutations in rv0678 Confer Low-Level Resistance to Benzothiazinone DprE1 Inhibitors in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2022. **66**(9): e0090422.
130. Alsayed, S.S.R., et al., *Facile synthesis and antimycobacterial activity of isoniazid, pyrazinamide and ciprofloxacin derivatives*. Chem Biol Drug Des, 2021. **97**(6): p. 1137-1150.

131. Castelo-Branco, F.S., et al., *New hydrazides derivatives of isoniazid against Mycobacterium tuberculosis: Higher potency and lower hepatocytotoxicity*. Eur J Med Chem, 2018. **146**: p. 529-540.
132. Dragostin, I., et al., *New isoniazid derivatives with improved pharmacotoxicological profile: Obtaining, characterization and biological evaluation*. Eur J Pharm Sci, 2019. **137**: 104974.
133. Krátký, M., et al., *Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)benzoates*. Molecules, 2013. **18**(4): p. 3674-3688.
134. Krátký, M., J. Vinšová, and J. Stolaříková, *Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains*. Molecules, 2012. **17**(11): p. 12812-12820.
135. Rychtarčíková, Z., et al., *N-Substituted 2-Isonicotinoylhydrazinecarboxamides — New Antimycobacterial Active Molecules*. Molecules, 2014. **19**(4): p. 3851-3868.
136. Vavříková, E., et al., *New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing substituents*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(12): p. 5902-5909.
137. Kryukova, L.M., et al., *Synthesis and bacteriostatic activity of thiosemicarbazones and isonicotinoylhydrazones of pyruvic acid*. Pharm Chem J, 1977. **11**(12): p. 1609-1611.
138. Joshi, S.D., et al., *Synthesis, characterization and antitubercular activities of novel pyrrolyl hydrazones and their Cu-complexes*. Eur J Med Chem, 2016. **121**: p. 21-39.
139. Fullam, E. and R.J. Young, *Physicochemical properties and Mycobacterium tuberculosis transporters: keys to efficacious antitubercular drugs?* RSC Med Chem, 2021. **12**(1): p. 43-56.
140. Pflégr, V., et al., *Design and synthesis of 2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene)propanamides as InhA inhibitors with high antitubercular activity*. Eur J Med Chem, 2021. **223**: 113668.
141. Vinšová, J. and M. Krátký, *Tuberculosis—The development of new MDR-TB drugs*. Drug-Resistant Tuberculosis, Causes, Diagnosis and Treatments, 2010: p. 59-141.
142. Pflégr, V., et al., *Synthesis and Antimycobacterial Activity of Isoniazid Derivatives Tethered with Aliphatic Amines*. Curr Top Med Chem, 2022. **22**(32): p. 2695-2706.

143. Rodrigues, M.O., et al., *Synthesis and antimycobacterial activity of isoniazid derivatives from renewable fatty acids*. *Bioorg Med Chem*, 2013. **21**(22): p. 6910-6914.
144. Karabanovich, G.R., Jaroslav; Hrabálek, Alexandr; Klimešová Věra; Pávek Petr, *Dinitrofenyloxadiazol nebo triazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující* FaF.v.H.K. Univerzita Karlova v Praze, CZ2014891A3. 2014: CZ.
145. Krátký, M. and J. Vinsová, *Salicylanilide ester prodrugs as potential antimicrobial agents--a review*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(32): p. 3494-3505.
146. Krátký, M., et al., *Salicylanilide pyrazinoates inhibit in vitro multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase*. *Eur J Pharm Sci*, 2014. **53**: p. 1-9.
147. Neises, B. and W. Steglich, *Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids*. *Angewandte Chemie International Edition*, 1978. **17**(7): p. 522-524.
148. Pflégr, V., et al., *Design and Synthesis of Highly Active Antimycobacterial Mutual Esters of 2-(2-Isonicotinoylhydrazineylidene)propanoic Acid*. *Pharm*, 2021. **14**(12): 1302.
149. Darby, C.M. and C.F. Nathan, *Killing of non-replicating Mycobacterium tuberculosis by 8-hydroxyquinoline*. *J Antimicrob Chemother*, 2010. **65**(7): p. 1424-1427.
150. Daina, A., O. Michielin, and V. Zoete, *SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): 42717.
151. Baell, J.B. and G.A. Holloway, *New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays*. *J Med Chem*, 2010. **53**(7): p. 2719-2740.
152. Baell, J.B. and J.W.M. Nissink, *Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations*. *ACS Chem Biol*, 2018. **13**(1): p. 36-44.
153. Delaney, J.S., *ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure*. *J Chem Inf Comput*, 2004. **44**(3): p. 1000-1005.
154. Daina, A. and V. Zoete, *A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules*. *Chem Med Chem*, 2016. **11**(11): p. 1117-1121.

155. Ventura, C., D.A. Latino, and F. Martins, *Comparison of multiple linear regressions and neural networks based QSAR models for the design of new antitubercular compounds*. Eur J Med Chem, 2013. **70**: p. 831-845.
156. Ghose, A.K., V.N. Viswanadhan, and J.J. Wendoloski, *A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases*. J Comb Chem, 1999. **1**(1): p. 55-68.
157. Borbála Horváth, L., et al., *Host cell targeting of novel antimycobacterial 4-aminosalicylic acid derivatives with tuftsin carrier peptides*. Eur J Pharm Biopharm, 2022. **174**: p. 111-130.
158. Kamaruzzaman, N.F., S. Kendall, and L. Good, *Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(14): p. 2225-2236.
159. Pauk, K., et al., *New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(21): p. 6574-6581.
160. Macielag, M.J., et al., *Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria*. J Med Chem, 1998. **41**(16): p. 2939-2945.
161. Kolochi, T., A. Victoria, and N. Elangovan, *Antibacterial and antifungal activities of derivatives of 4-amino salicylic acid*. J Chem Pharm Res, 2016. **8**(7): p. 782-785.
162. Zhang, J.L., et al., *New life for an old drug: In vitro and in vivo effects of the anthelmintic drug niclosamide against Toxoplasma gondii RH strain*. Int J Parasitol: Drugs Drug Resist, 2019. **9**: p. 27-34.
163. Serrano, D.R., et al., *Modelling and shadowgraph imaging of cocrystal dissolution and assessment of in vitro antimicrobial activity for sulfadimidine/4-aminosalicylic acid cocrystals*. Eur J Pharm Sci, 2016. **89**: p. 125-136.
164. Zhou, J., et al., *The antihelminthic drug niclosamide effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma in vitro and in vivo*. Theranostics, 2017. **7**(6): p. 1447-1462.
165. Krátký, M. and J. Vinšová, *Advances in mycobacterial isocitrate lyase targeting and inhibitors*. Curr Med Chem, 2012. **19**(36): p. 6126-6137.

166. Boyce, J.P., et al., *Identification of 14-3-3 ζ by Chemical Affinity with Salicylanilide Inhibitors of Interleukin-12p40 Production*. Biocon Chem, 2008. **19**(9): p. 1775-1784.
167. Terada, H., et al., *Structural requirements of salicylanilides for uncoupling activity in mitochondria: Quantitative analysis of structure-uncoupling relationships*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 1988. **936**(3): p. 504-512.
168. Horváti, K., et al., *Antimycobacterial activity of peptide conjugate of pyridopyrimidine derivative against Mycobacterium tuberculosis in a series of in vitro and in vivo models*. Tuberculosis, 2015. **95**: p. S207-S211.
169. Horváti, K., et al., *Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid—design, synthesis and antimycobacterial effect*. J Pept Sci, 2009. **15**(5): p. 385-391.
170. Kiss, É., et al., *Nanoencapsulation of Antitubercular Drug Isoniazid and Its Lipopeptide Conjugate*. J Dispers Sci Technol, 2011. **32**(12): p. 1728-1734.
171. Sutar, Y.B., et al., *Transferrin conjugates of antitubercular drug isoniazid: Synthesis and in vitro efficacy*. Eur J Med Chem, 2019. **183**: 111713.
172. Mezö, G., et al., *Synthesis, Conformation, and Immunoreactivity of New Carrier Molecules Based on Repeated Tuftsin-Like Sequence*. Biopolymers, 2004. **73**(6): p. 645-656.
173. Bai, K.B., et al., *Design, Synthesis, and In Vitro Activity of Novel Drug Delivery Systems Containing Tuftsin Derivatives and Methotrexate*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(11): p. 2260-2269.
174. Baranyai, Z., et al., *In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsin conjugates*. Eur J Med Chem, 2017. **133**: p. 152-173.
175. Kopeček, J., et al., *HPMA copolymer–anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 61-81.
176. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. Int J Cancer, 1988. **41**(3): p. 456-61.

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Nově diagnostikované případy TBC (celosvětově) mezi lety 2015-2021 [1]	18
Obrázek 2 – Odhadované počty případů TBC (celosvětově) mezi lety 2000-2021 [1]	19
Obrázek 3 – Odhadované počty úmrtí na TBC mezi lety 2000-2021 [1]	19
Obrázek 4 – Odhadovaná distribuce případů v regionech (2021) [1]	20
Obrázek 5 – Počty nemocných léčených pro MDR/RR-TBC (celosvětově) [1]	20
Obrázek 6 – Buněčný obal mykobakterie [31]	22
Obrázek 7 – Rozdělení vybraných antituberkulotik dle mechanismu účinku (MÚ)	24
Obrázek 8 – Tvorba nikotinoyl-NAD aduktu [37]	25
Obrázek 9 – Iproniazid	26
Obrázek 10 – Struktura ethambutolu	26
Obrázek 11 – SQ 109	27
Obrázek 12 – Delamanid	27
Obrázek 13 – Pretomanid	28
Obrázek 14 – D-Cykloserin	29
Obrázek 15 – Ethionamid	29
Obrázek 16 – Rifampicin	31
Obrázek 17 – Základní struktura fluorovaných chinolonů	31
Obrázek 18 – Klofazimin	33
Obrázek 19 – Bedachilin	33
Obrázek 20 – Struktury vybraných aminoglykosidových antibiotik [87]	35
Obrázek 21 – Struktura linezolidu	35
Obrázek 22 – Pyrazinamid	36
Obrázek 23 - Terapeutický algoritmus podávání antituberkulotik [1]	38
Obrázek 24 – Činnost DprE1-DprE2 komplexu [119]	43
Obrázek 25 – Pyrrolyl hydrazony popsané skupinou Joshi et al. [138]	51
Obrázek 26 – Antimykobakteriální deriváty anilinu [140]	52
Obrázek 27 – Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanamidů [140]	53
Obrázek 28 - Nejaktivnější anilidy	55
Obrázek 29 – Antimykobakteriální deriváty obsahující alkylaminový fragment [142]	56
Obrázek 30 - Syntéza esterů [148]	60
Obrázek 31 – Nejslibnější sloučeniny odvozené od INH	64

Obrázek 32 – Deriváty ASA použité ke konjugaci s peptidovými nosiči	68
Obrázek 33 – Schéma přípravy peptidových nosičů (Horváth et al.) [157]	69
Obrázek 34 - Syntéza konjugátů [157]	70

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Inhibiční aktivita vybraných azaindolů	45
Tabulka 2 - Antimykobakteriální aktivita anilidů [140]	54
Tabulka 3 – Antimykobakteriální aktivita amidů s alkylovými řetězci [142]	58
Tabulka 4 – Antimykobakteriální aktivita esterů [148]	61
Tabulka 5 - MIC esterů vůči rezistentním kmenům.	63
Tabulka 6 – In silico predikce	65
Tabulka 7 – Extracelulární antimykobakteriální aktivita ASA a jejich konjugátů [157]	71