

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**



**Deriváty pyrazinamidu jako potenciální antimikrobní látky**

Diplomová práce

Martina Čečetková

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

Hradec Králové, 2018



„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Martina Čečetková

#### Poděkování:

Chtěla bych upřímně poděkovat především svému školiteli PharmDr. Janu Zítkovi, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, trpělivost, cenné rady a neocenitelnou pomoc po celou dobu vypracování této práce. Rovněž děkuji učitelům a vědeckým pracovníkům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Katedry organické a bioorganické chemie a Katedry biologických a lékařských věd za pomoc během vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala zaměstnancům Fakultní nemocnice Hradec Králové za hodnocení antimikrobních aktivit daných sloučenin. Nakonec bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mě po celou dobu studia plně podporovala.

Tato diplomová práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 17-27514Y) a dále grantem SVV 260 401.

## Obsah

1. Seznam použitých zkratek.....	7
2. Cíl diplomové práce.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1 Tuberkulóza.....	13
3.2 Etiologie tuberkulózy .....	16
3.3 Epidemiologie tuberkulózy .....	17
3.3.1 Situace v České republice .....	17
3.3.2 Situace ve světě .....	18
3.3.3 Epidemiologie ostatních pravých mykobakterií.....	19
3.4 Diagnostika tuberkulózy .....	19
3.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
3.5.1 Základní informace .....	22
3.5.2 Buněčná stěna.....	22
3.5.3 Rezistence <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
3.6 Terapie tuberkulózy .....	28
3.6.1 DOTS ( <i>Directly Observed Treatment Short-course</i> ).....	28
3.7 Antituberkulotika .....	30
3.7.1 Léčiva 1. linie.....	31
3.7.2 Léčiva 2. linie.....	38
3.7.3 Nová léčiva .....	39
3.8 Vakcinace .....	41
3.8.1 Povinnost očkování v ČR .....	41
3.8.2 Důvody zrušení očkování proti TB v ČR.....	42
3.8.3 Způsob vakcinace.....	42
3.9 Design syntetizovaných sloučenin .....	42
4. Metodická část .....	44

4.1	Chemikálie, metody, pomůcky, přístroje a software..	44
4.2	<i>In silico</i> doking série JZ-MC .....	45
4.3	Syntéza série JZ-MC .....	49
4.3.1	Syntéza meziproduktů a výchozích látek .....	49
4.3.2	Syntéza alkylaminoderivátů výchozí látky 1 a 2 .....	52
4.4	Nově připravené látky .....	56
5.	Výsledky .....	63
5.1	<i>In silico</i> dokování .....	63
5.2	Antimykobakteriální aktivita .....	70
6.	Diskuse .....	72
7.	Závěr .....	78
8.	Abstrakt .....	79
9.	Abstract .....	80
10.	Seznam použité literatury .....	81

## 1. Seznam použitých zkratek

6-CI-POA	6-chlorpyrazin-2-karboxylová kyselina
ACP	<i>Acyl-carrier-protein</i>
AG	Aabinogalaktan
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrom</i> , Syndrom získaného deficitu imunity
AT	Antituberkulotika
ATP	Adenosintrifosfát
Bactec	<i>Instrumented blood culture systems</i> , automatický systém pro detekci a kultivaci mikroorganismů využívající fluorescenční metodu pro velmi přesnou detekci spotřeby kyslíku
BacT/ALERT	Automatická mikrobiální detekce na základě produkce specifických metabolitů daných mikrobů
BCG	<i>Bacillus Calmette–Guérin</i> vakcína
BS	Buněčná stěna
CoA	Koenzym A
D-glu	D-glukosa
CD4+	Povrchový protein pomocných T-lymfocytů
CNCTC	<i>Czech National Collection of Type Cultures</i>
ČLS-JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
ČR	Česká republika
DO	<i>Directly observed</i>
DOTS	<i>Directly observed short-course treatment</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Etambutol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , bičíkovitá bakterie
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , imunologická metoda využívaná k detekci protilátek
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Evropská léková agentura
EtOAc	Ethyl-acetát
FabD	Malonyl-CoA ACP transacylasa. Enzym účastnící se syntézy mykolových kyselin
FabH	$\beta$ -ketoacyl-ACP-synthasa III, enzym katalyzující iniciální reakci FAS II při syntéze mykolových kyselin
FAS I	<i>Fatty acid synthase I</i>
FAS II	<i>Fatty acid synthase II</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i> (USA), Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G+ tyčinka	Pojmenování dle Gramova barvení buněčné stěny bakterií, gram pozitivní bakterie se obarví tmavě fialovou barvou
GIT	Gastrointestinální trakt
H	Isoniazid
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , obalený RNA virus působící nemoc AIDS
HPOA	Protonizovaná forma pyrazinové kyseliny
IČ	Infračervené spektrum
IGRA test	<i>Interferon gama release assay</i>
IL-1,12,18	Interleukin 1,12,18, cytokin regulující imunitní děje



INF- $\gamma$	Interferon gama, glykoproteiny produkované buňkami lidské imunity a podílející se na imunitní odpovědi
INH	Isoniazid
InhA	2- <i>trans</i> -enoyl-ACP reductasa, enzym katalyzující reakci při syntéze mykolových kyselin, součást enzymatického komplexu FAS I a cíl mechanismu účinku INH
KatG	Katalasa-peroxidasa, enzym aktivující isoniazid
KL	Klinické studie
LE	<i>Ligand efficiency</i>
LP	Léčivý přípravek
MDR-MT	<i>Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis</i> , multirezistentní <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MeOH	Methanol
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MK	Mastné kyseliny
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
mm	Milimetr
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MZd	Ministerstvo zdravotnictví
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH+H <sup>+</sup>	Nikotinadenindinukleotidfosfát, redukční činidlo
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NO	Oxid dusnatý
NÚ	Nežádoucí účinky
<i>panD</i>	Gen kódující aspartát dekarboxylasu
PCR	Polymerázová řetězová reakce

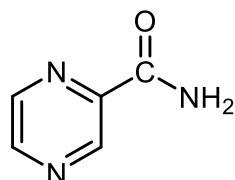
PDB	<i>Protein data bank</i>
PG	Peptidoglykan
PIMs	<i>Phosphatidyl-myo-inositol mannoside</i>
<i>pncA</i>	Gen kódující pyrazinamidasu
POA	Pyrazin-2-karboxylová kyselina
PPD	Purifikovaný proteinový derivát tuberkulinu
ppm	<i>Parts per million</i>
PSI	Libra na čtverečný metr - anglosaská jednotka tlaku
PRPP	5-fosforybisil-1-pyrofosfát
PZA	Pyrazinamid
QAPRTasa	<i>Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase</i>
R	Rifampicin
RNA	Ribonukleová kyselina
RpsA	Ribosomální protein S1
RTBC	Registr tuberkulózy
RTG	Rentgenové vyšetření, radiologický snímek
S	Streptomycin
SZO	Světová zdravotní organizace
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TB	Tuberkulóza
TEA	Triethylamin
TLC	Tenkovrstvá chromatografie, <i>Thin layer chromatography</i>
TLR	Receptor <i>Toll-like</i> , bílkovinné receptory na povrchu buněk, jsou schopny rozpoznat cizí molekuly, součást imunitního systému

TMS	Tetramethylsilan
TRN	Tuberkulóza a respirační onemocnění, speciální lékařský obor
TNF $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
VL	Výchozí látka
WHO	<i>World health organization</i>
XDR-MT	Extenzivně rezistentní <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Z	Pyrazinamid
ZOO	Zoologická zahrada

## 2. Cíl diplomové práce

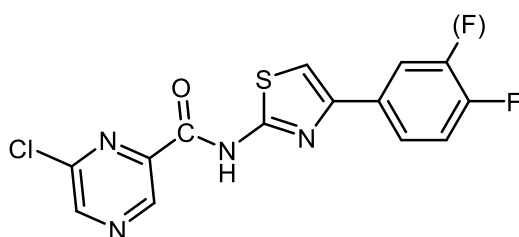
Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění vyvolané bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis complex*. TB patří mezi top deset onemocnění způsobující každoročně nejvíce úmrtí. Společnost WHO udává, že za rok 2016 zemřelo na toto onemocnění 1,8 miliónů lidí. Největším úskalím léčby této nemoci je léková rezistence bakterií, které nemoc vyvolávají, a vedlejší účinky této léčby. [1]

Na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy se již od roku 1996 zabývají vývojem nových sloučenin jakožto potenciálních antituberkulotik. Hlavní pozornost je věnována modifikacím molekuly pyrazinamidu (Obr. 1).

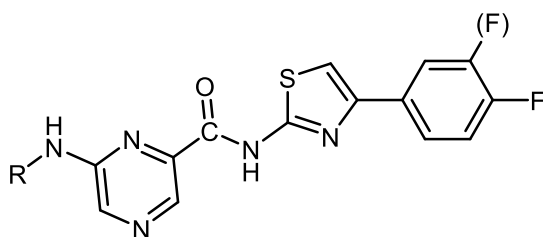


**Obrázek 1:** Pyrazinamid

Cílem diplomové práce je provést návrh a *in silico* testování vybraných sloučenin v programu MOE (*Molecular Operating Environment*), jejich následná syntéza, charakteristika, test účinnosti na mykobakterie a vyhodnocení výsledků celé této operace. Série sloučenin je zaměřena na *N*-alkylamino obměnu v poloze 6 pyrazinového jádra výchozí látky (Obr. 2, Obr. 3).



**Obrázek 2:** Výchozí látka



**Obrázek 3:** Modifikace struktury výchozí látky

### 3. Teoretická část

#### 3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza je celosvětově se vyskytující infekční onemocnění vyvolané bakteriemi z kmene *Mycobacterium tuberculosis complex*, nejčastěji však právě *Mycobacterium tuberculosis*. Mezi ostatní patogeny tohoto kmene patří *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* (bacil *Calmette-Guérinův*), *Mycobacterium pinipedii* a další. [2] Toto onemocnění patří mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí lidí po celém světě. Může napadnout člověka ale i zvířata (*Mycobacterium bovis*). Tuberkulóza je léčitelná a lze jí předcházet. [1] Patogen *Mycobacterium tuberculosis* byl objeven roku 1882 Robertem Kochem, který za tento objev dostal roku 1905 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. [3]

„Název tuberkulóza je odvozen od latinského slova *tuberculum* = uzlíček, který je charakteristickým patologickoanatomickým projevem tohoto zánětu. Hippokrates nazval TB původně phthisis, což znamená hubnutí a vysychání organismu, název vystihoval příznak úbytku tělesné hmotnosti. Do češtiny se phthisis překládala jako součotiny. Od původního řeckého názvu je odvozen i název lékařského oboru zabývajícího se tuberkulózou – ftizeologie“. [2]

Zdrojem nákazy je nejčastěji nemocný člověk, který vylučuje mykobakterie do svého okolí. Dnes již vzácně je zdrojem infekce nemocné domácí nebo hospodářské zvíře, tudíž je prakticky vyloučena možnost alimentárního přenosu nákazy. Imunodeficientní pacienti se mohou infikovat podmíněně patogenními mykobakteriemi ze životního prostředí. Přenos tuberkulózní nákazy se nejčastěji uskutečňuje inhalační cestou nebo přímým kontaktem. Přenos TB inhalačně se vysvětluje vdechováním kapiček infikovaného bronchiálního sekretu při osobním kontaktu s nemocným nebo přímým vdechováním mykobakterií, které se volně vznášejí ve vzduchu i bez přítomnosti nemocného pacienta. Přenos přímým kontaktem lze pozorovat například u veterinářů a označuje se jako profesní infekce. [4]

Primární tuberkulóza představuje první kontakt patogenu a hostitele a vyskytuje se převážně u dětí. MT se dostává aerosolem do plic hostitele. Mykobakterie se zde množí do rozvoje buněčné imunity. [5] Nespecifická alveolitida se pak mění v tuberkulózní specifický infekt (Ghonův fokus). Zánět je

charakteristický centrální kaseózní nekrózou, kolem níž vzniká granulační tkáň tvořená lymfocyty, epiteloidními buňkami (přeměněné makrofágy s pohlcenými MT) a obrovskými Langhansovými buňkami (mnohojaderný útvar, který vznikne splynutím fagocytujících makrofágů). Během několika hodin se MT šíří lymfatickými cévami do regionálních uzlin. Tyto uzliny se zvětšují a spolu s plicním zánětem tvoří primární tuberkulózní komplex. V 90 % se primární tuberkulóza spontánně zhojí a jediným pozůstatkem je vznik přecitlivělosti na tuberkulin. [4]

Osud primárního tuberkulózního komplexu je různý a záleží na zdravotním stavu infikovaného jedince. V 90 % případech se zhojí s rozvojem buněčné imunity. Ve výjimečných případech dojde k progresivní primární TB, kdy dochází ke kaseifikaci a kavernizaci zánětlivých ložisek v plicích a šíření nemoci do okolí. Třetí možností je šíření MT hematogenní cestou a vznik miliární TB nebo meningitidy. [4]

Postprimární tuberkulóza vzniká u osob již infikovaných. Jde o sekundární formu TB. Může vzniknout vdechnutím nových mykobakterií, v tomto případě se jedná o exogenní reinfekci, onemocnění vyvolané dalším MT. Nebo může vzniknout reaktivací primární TB. Tento stav nastává i po několika letech nebo desítkách let latence primární infekce. Nejčastěji tato situace nastane, pokud u pacienta vznikla změna týkající se jeho zdravotního stavu (onemocnění HIV, imunosuprese, imunodeficience, alkoholismus...). Tento jev souvisí se schopností MT nepozorovaně perzistovat v organismu hostitele. Nejčastěji MT přežívají intracelulárně v makrofázích v kalcifikovaných nekrózních uzlících. [4]

Interakce mezi MT a hostitelem se odehrává jak na úrovni vrozené tak i adaptivní imunity. Po vstupu mykobakterie do plic se setkává nejdříve s místními monocyty/makrofágy. Díky specifickým receptorům (scavenger receptor, manosový receptor a opsonizace MT) dojde k fagocytóze MT. Některá MT mají schopnost uniknout intracelulární záhubě a množí se uvnitř makrofága, kterého posléze rozruší a tím se uvolní chemokiny, které atrahují další monocyty a prozánětlivé buňky. Nové makrofágy MT pohltní, ale nejsou schopné MT zneškodnit. Po dvou až třech týdnech adaptivní imunita začne produkovat antigen specifické T-lymfocyty, které produkují prozánětlivé cytokiny hlavně

INF  $\gamma$ , který aktivuje makrofágy k intracelulárnímu zneškodnění MT. [6] Imunitní systém produkuje i další důležité působky jako například TNF $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-18 a mnoho dalších. TNF $\alpha$  je velmi důležitý pro formulaci granulomu a omezuje významně schopnost replikace bacilů, také ovlivňuje jejich ohraničení během zánětlivé reakce. [4, 6] Z tohoto důvodu musí být všichni pacienti, u kterých má být nasazena biologická terapie (preparáty blokující účinky TNF $\alpha$ ) vyšetřeni pneumoftizeologem, aby vyloučil latentní TB. [4,7]

Klinický obraz je u pacientů velmi variabilní. Téměř 20 % nemocných je asymptomatických a TB je u nich odhalena náhodou při RTG vyšetření konaném z jiných důvodů, než diagnostika TB. [8] U pacienta lze pozorovat příznaky nemoci jen tehdy, trpí-li aktivní formou TB, v této fázi onemocnění je nakažlivý pro své okolí. [5] Mezi nejcharakterističtější příznaky patří kašel, ze začátku může být suchý, poté se přidává expektorace sputa hnisavého či hlenohnisavého. Hemoptýza dnes již tak často nehrozí, protože je nemoc většinou zachycena dříve než k vykašlávání krve dojde. Dalším typickým příznakem je úbytek váhy (kachektizace), subfebrilie v odpoledních a nočních hodinách, noční pocení, nadměrná únava a malátnost, nechutenství, někdy zhoršení dechových funkcí. [4,5,8]

Prevence tuberkulózy spočívá hlavně ve vakcinaci, která v ČR, již není povinná. Další možností prevence je zvyšování hygienické úrovně a hlavně zvyšování celkové životní úrovně obyvatelstva. Jako prevence slouží i ucelený systém povinnosti ohlašování TB. Ohlašování probíhá na krajskou hygienickou stanici. Ohlásit se musí všechny nové případy, recidivy, smrt z TB, ale i podezření na smrt z TB. Krajská hygienická stanice poskytuje informace o výskytu tuberkulózy Národnímu registru tuberkulózy a ten ve spolupráci s ÚZIS vyhodnocuje epidemiologickou situaci TB v České republice. Celý tento systém povinnosti ohlašování případů TB a epidemiologické vyhodnocování je součástí dohledu nad TB a jeho cílem je vypořádat se s touto nemocí jako s hromadným infekčním onemocněním. [4]

### 3.2 Etiologie tuberkulózy

Mykobakterie lze dělit dle jejich patogenity na obligátně patogenní a podmíněně patogenní bakterie. [9]

Mezi obligátní patogeny patří *Mycobacterium tuberculosis complex*, který zahrnuje geneticky příbuzné patogeny. Tento komplex zahrnuje různé druhy mykobakterií jako například *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canetti* a *M. pinipedii*, někdy též označované pravé mykobakterie. Nejčastějším původcem tuberkulózy je *M. tuberculosis*. Jedná se o humánní typ mykobakterie, proto je někdy v literatuře označováno jako *Mycobacterium tuberculosis hominis*. Nejčastější bránou vstupu do organismu jsou dýchací cesty, potažmo plíce. Z tohoto důvodu bývá nejčastější infekce plic, ale prakticky může být napaden jakýkoliv orgán v těle. [4] *M. bovis* je původcem tuberkulózy skotu nebo jiných divokých zvířat, výjimečně též člověka. Jedná se o bovinní typ mykobakterie, které napadá plíce pouze výjimečně, častěji je příčinou tuberkulózy kostí nebo lymfatických uzlin. [8] Tyto dva patogeny lze od sebe odlišit diferenciální diagnostikou pomocí PCR nebo kultivací. Příkladem může být rozdíl v rychlosti růstu kolonií, kdy *M. bovis* roste pomaleji než *M. tuberculosis*, odlišnost vzhledu kolonií, nebo neschopnost *M. bovis* biosyntézy niacinu a nitratasy. [9]

Podmíněně patogenní bakterie neboli environmentální patogeny jsou mykobakterie vyskytující se v životním prostředí, které jsou přenosné na člověka. Pro člověka jsou pouze potenciálně patogenní, někdy mohou být pouhými lidskými saprofyty. [9] Nemoci vyvolané těmito netuberkulózními mykobakteriemi jsou označovány jako mykobakteriózy. [4] Mezi agens této skupiny lze zařadit *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* a další. *M. avium* se řadí do společného komplexu s *M. intracellulare*. [4] Vyvolávají nejčastěji tuberkulózu drůbeže přenosnou na další domestikovaná zvířata i na člověka (nejčastěji infikovaným AIDS). *M. marinum* se vyskytuje ve vodních rezervoárech, je přenosné na člověka a vyvolává u něj kožní granulomy. *M. kansasii* a *M. xenopi* jsou mykobakterie vyskytující se také ve vodních rezervoárech, jsou přenosné na člověka. Jejich diferenciální diagnostika se provádí hodnocením rychlosti růstu, optimální teplotou růstu, citlivosti na světlo,



tvorby pigmentu a vzhledu kolonií. *M. smegmatis* patří mezi nepatogenní mykobakterie. [9]

### 3.3 Epidemiologie tuberkulózy

#### 3.3.1 Situace v České republice

V České republice je na základě zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a prováděcích předpisů povinné ohlašovat některá infekční onemocnění, mezi něž patří i tuberkulóza. [10]

Kvalifikovanou analýzu epidemiologické situace TB v České republice provádí Národní jednotka dohledu nad TB, která dále provádí i vyhodnocení účinnosti antituberkulotické léčby. Statisticky epidemiologickou situaci v ČR zpracovává ÚZIS ČR (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR) ve spolupráci s Registrem tuberkulózy v ČR (RTBC). [11]

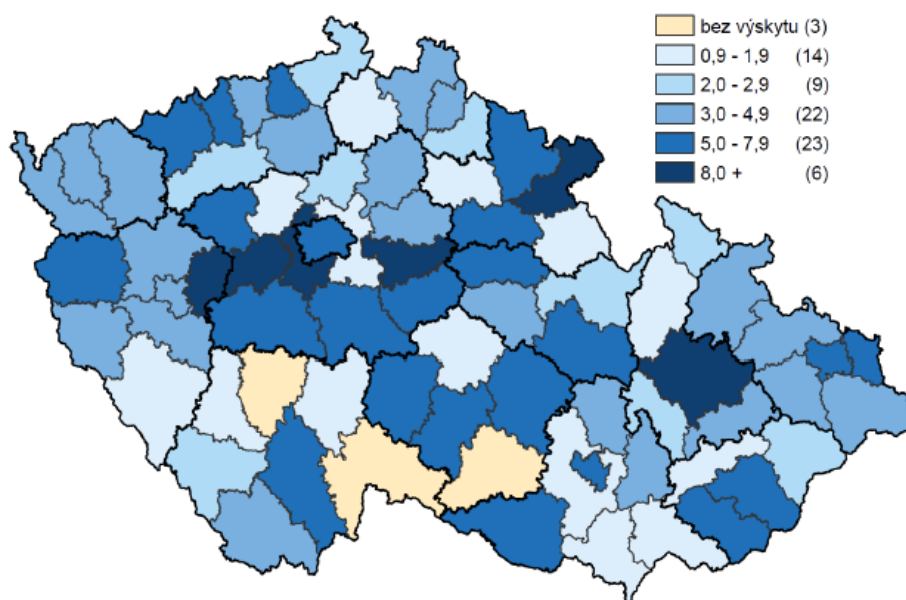
**Tabulka 1:** Tabulka znázorňující počet nemocných za jednotlivé uvedené roky v absolutní hodnotě a v přepočtu na 100 000 obyvatel. Převzato: Registr tuberkulózy ČR [11].

Rok	Celkem případů	Případů na 100 000 obyvatel
2005	1007	9,9
2006	973	9,5
2007	871	8,4
2008	879	8,4
2009	710	6,8
2010	680	6,5
2011	609	5,8
2012	611	5,8
2013	502	4,8
2014	514	4,9
2015	518	4,9
2016	517	4,9

Z tabulky (Tab.1) lze vyčíst, že za rok 2016 bylo hlášeno celkem 517 nových případů TB, což je jen o jeden případ méně, než bylo hlášeno v roce 2015. Při celkovém pohledu na tabulku (Tab. 1) je jasné, že celkový trend výskytu nových případů TB v ČR dlouhodobě klesá. V mezinárodním srovnání patříme

k zemím s nízkým výskytem této nemoci, země s vysokým výskytem mají incidenci 40 a více nemocných na 100 tisíc obyvatel. [12,13]

448 případů se týkalo onemocnění plic a pouze 69 případů bylo mimoplicní TB. Více infikovaných bylo mužů nežli žen. Nejčastěji onemocní lidé ve středním až vyšším věku (40–59) a poté samozřejmě lidé 80 let a více. Oproti roku 2015 narostla incidence infekce v dětském věku a ve věku 25–29 let. Nejčastěji je infekce evidována v hlavním městě Praha ve vztahu k počtu obyvatel (Obr. 4). Téměř 30 % nových případů TB v ČR bylo evidováno u cizinců, nejčastěji nemocní cizinci jsou Ukrajinci a Slováci. Za rok 2016 zemřelo na TB v ČR 26 pacientů. [12]



**Obrázek 4:** Počet hlášených onemocnění TB na 100 000 obyvatel na území ČR. Převzato: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Tuberkulóza a respirační nemoci 2014. Čerpáno 15. 1. 2018 [14]

### 3.3.2 Situace ve světě

Za rok 2016 dle WHO celkově onemocnělo tuberkulózou 10,4 miliónů lidí. 1,7 miliónu lidí na tuto nemoc zemřelo, z toho 400 000 lidí trpělo HIV. [1] Více jak 95 % obětí pocházelo z rozvojových zemí, kde jsou špatné hygienické návyky, nedostatek financí na zdravotní péči a lidé trpí hladem a nemocemi. Země s nejvyšším výskytem této nemoci je Indie, následují ji například Indonésie, Filipíny, Nigérie a Jihoafrická republika. Téměř jeden milión nakažených představovaly děti, z toho jich zemřelo přibližně 250 000. TB je nejčastější příčina úmrtí pacientů nakažených HIV. [15]

Během téhož roku se zjistilo, že přibližně v 600 000 případech TB se jednalo o kmeny mykobakterií rezistentních na rifampicin, bohužel 490 000 z toho bylo navíc multirezistentních. MDR-TB jsou největší hrozbou pro veřejné zdraví dnes i do budoucna. Celosvětově klesá výskyt TB přibližně o 2 % ročně. [1] Je potřeba, aby se tento pokles vyšplhal nejméně na 4–5 % snížení za rok, aby mohlo být dosaženo mírových cílů WHO koncem roku 2020. Ukončení epidemie TB do roku 2035 patří k cílům v oblasti udržitelného rozvoje v oblasti zdraví. Cílem WHO v boji proti tuberkulóze je konec globální epidemie tuberkulózy, který je nazván *A world free of tuberculosis*. WHO chce docílit do roku 2035: snížení úmrtí způsobených TB o 95 % vzhledem k roku 2015, snížení nových případů TB o 90 % v porovnání s rokem 2015 a nakonec chce docílit, aby žádná rodina nebyla postihnuta ekonomicky likvidačními výdaji spojenými s onemocněním TB. [16]

### 3.3.3 Epidemiologie ostatních pravých mykobakterií

Tyto případy se u nás vyskytují výjimečně. Ze všech známých členů *Mycobacterium tuberculosis complex* se u nás vyskytlo pouze pět jeho zástupců. V tomto odstavci opomineme *Mycobacterium tuberculosis*, které je příčinou drtivé většiny TB onemocnění u nás. [17]

V roce 2011 byla v nemocnici Na Bulovce hospitalizována žena, 29 let HIV pozitivní, pocházející z Nigérie, u které se prokázalo *Mycobacterium africanum*. Je to doposud první a poslední případ v ČR. Taktéž v roce 2011 byly hlášeny dva případy infekce *Mycobacterium bovis* v Chomutově. Oba pacienti se nakazili od skotu. Další případ *M. bovis* se vyskytl na podzim roku 2012 u 69 let staré ženy. *Mycobacterium pinnipedii* a *Mycobacterium caprae* se na našem území taktéž vyskytly, ale již jen u zvířecí populace lachtanů a velbloudů v ZOO. [17]

## 3.4 Diagnostika tuberkulózy

Diagnostikovat MT lze u jedince s latentní i aktivní tuberkulózou. Mnohem přínosnější je diagnostika latentního pacienta, protože nemůže nakazit jedince ve svém okolí a je možné jeho nemoc zachytit včas a zabránit šíření i poškození pacienta. [18] Diagnóza takto závažného onemocnění není vůbec jednoduchá, je komplexní a mnohdy zdlouhavá. Rozhodující vyšetřovací metoda je bezpochyby mikrobiologický průkaz infekčního agens, lze se však opřít i o jiné metody

vyšetření jako je rentgenové vyšetření plic, biochemické vyšetření krve, histologické vyšetření, anamnéza, tuberkulínový test a IGRA test. [4] Některé metody jsou označovány jako pomocné metody diagnostiky TB. To jsou ty, které samy nejsou průkazné, ale při podezření na TB mohou pomoci při stanovení diagnózy. [4]

Základním nástrojem je **anamnéza pacienta**. Důležité je sledovat příznaky nemoci jako je hubnutí, kašláním, zpočátku bez sputa poté se sputem, noční pocení... [19] Další skutečnost, která by měla lékaře zajímat je, prostředí v jakém se pacient pohybuje, zda je alkoholik, závislý na drogách, HIV pozitivní nebo jinak imunodeficientní, ale hlavně, zda v jeho okolí není jedinec s aktivní formou TB. [18,20]

Téměř ve všech případech se doporučuje **radiologické vyšetření** hrudníku. [18,19] Získávají se snímky přehledové, tedy celých plic a dále snímky zaměřené na hilovou část plic. Hilová část se snímkuje hlavně z důvodu výskytu hilových lymfatických uzlin, které jsou jako první napadené při primární TB a tudíž jsou zvětšené. [19]

**Laboratorní diagnostika** je rozhodující pro průkaz patogenů. Prvním krokem vyšetření je správný odběr testovaného materiálu. Nejčastější a nejlepší materiál je sputum, lze ale odebrat téměř jakoukoliv tělní tekutinu (moč, krev, ejakulát, likvor, menstruační krev, hnis...). Mnohdy je potřeba odebírat větší množství tekutiny a několik dní po sobě pro dostatečnou detekci mykobakterií. [18] Poté lze provést mikroskopické vyšetření, které umožňuje prokázat přítomnost acidorezistentních tyček v přímo odebraném materiálu. Používá se barvení karbofuchsinem dle Zeih-Neelsenona (růžově obarvené bakterie v zeleném prostředí), nebo častěji fluorescenční mikroskopie (barvení fluorochromy, MT se jeví jako zářící žlutozelené až stříbřité tyčinky). Pro mikroskopické vyšetření je průkazné nejméně 50 000–100 000 MT v 1 mililitru sputa. [4] Mikroskopické vyšetření je velmi rychlé, levné, ale není dostatečně průkazné, protože touto metodou se nedá zjistit, zda mykobakterie ve vyšetřovaném materiálu jsou živé nebo uhynulé. Z tohoto důvodu se mikroskopické vyšetření vždy doplňuje kultivací, která je sice mnohonásobně delší, ale průkaznější. Kultivační vyšetření lze provést na tuhých (vaječná

Lowestein-Jensenova půda) nebo tekutých půdách (Šulova půda s nativní bílkovinou) a umožňuje průkaz pouze živých mykobakterií. Jelikož je generační doba MT dlouhá, trvá toto stanovení v závislosti na typu mykobakterie 6 až 9 týdnů. [4,18] Modernější metody umožňují detekci metabolických produktů v uzavřeném systému BacT/ALERT, nebo detekci spotřeby kyslíku během jejich růstu Bactec, ale i tato vyšetření sdělí negativní výsledek až po šesti týdnech. [4,18] Nejmodernější je stanovení pomocí molekulárně biologických metod, nejčastěji PCR. Tyto metody umožňují velmi rychlou a specifickou detekci mykobakterií podle jejich specifických úseků DNA. Nevýhodou této metody je možnost detekovat DNA i uhynulých bakterií, proto je nutné doplnit výsledky o kulturační vyšetření. [18] Před nasazením AT se laboratorně zjišťuje citlivost MT na tato léčiva. [4,18,20]

**Histologické vyšetření** prokazuje přítomnost buněk mykobakterií a změny ve tkáni způsobené přítomností těchto patogenů (kaseózní nekróza). [4]

Ke zjištění stavu buněčné imunity se používají **pomocné testy**. [19] Patří mezi ně Tuberkulínová zkouška (Mantoux test) a IGRA test.

### **Tuberkulinová zkouška**

Tuberkulin (PPD) je čištěná bílkovina získaná z mykobakterií, aplikuje se tenkou jehličkou do kůže v předloktí. Tato bílkovina v kůži pacienta vyvolá zánětlivou reakci, kdy daná oblast zčervená a tvoří se ztvrdlé léze. [18] Výsledky testu odečítá lékař po 48–72 hodinách. Odečítá se velikost ztvrdnutí v milimetrech. Hraniční hodnotou je 5 mm. Pokud je ztvrdnutí menší než 5 mm považujeme reakci za negativní, pacient se nejspíš s MT nesešel a měl by být přeočkován. Pokud je ztvrdnutí 5–10 mm považujeme reakci za pozitivní, pacient byl úspěšně očkovan a vytvořila se u něj buněčná imunita. Pokud je větší, než 15 mm, reakce je opět pozitivní, ale je pravděpodobné, že pacient trpí aktivní nákazou TB. [4]

### **IGRA test**

IGRA test (*Interferon gamma release assay*) je krevní test, kterým se zjišťuje schopnost specifických lymfocytů (T-lymfocytů s povrchovými antigeny CD4+) produkovat interferon gamma (INF  $\gamma$ ) při kontaktu s antigeny MT. [18] Pro

provedení testu postačí jedna návštěva pacienta u lékaře. Nejznámější je test QuantiFERON-TB Gold test, který se skládá ze tří zkumavek, odlišených barevně (šedá zkumavka-kontrolní NULOVA, červená zkumavka-obsahuje TB antigen, fialová zkumavka-MITOGEN, pro zjištění schopnosti produkce INF  $\gamma$ ). Odebírá se venózní krev, do každé zkumavky 1 mililitr. Po odebrání se zkumavky musí 10× pomalu otočit nahoru a dolů. Při teplotě 37°C se doručí do laboratoře, kde jsou vyhodnoceny pomocí ELISA technologie. Výsledky je možné získat do 24 hodin. Tento test dokáže odhalit latentní i aktivní TB. Bohužel negativní výsledek nutně neznamená, že pacient není TB infikovaný. [21]

### 3.5 *Mycobacterium tuberculosis*

#### 3.5.1 Základní informace

MT patří do skupiny mykobakterií zvaných *Mycobacterium tuberculosis complex*, což je soubor mykobakterií s genetickou příbuzností, označující se jako pravé mykobakterie. MT vyvolává u lidí nemoc zvanou tuberkulóza. [4]

Jedná se o aerobní acidorezistentní obligátně patogenní tyčinku. MT je imobilní krátká tyčinka, většinou rovná nebo lehce zahnutá. Velikost patogenu se pohybuje řádově 1–1,5 mikrometrů. Optimální teplota růstu je 37–38°C. Někdy je označováno jako G+ tyčinka, a to díky tomu, že nemá vnější membránu jako G- bakterie, i když ho není možné gramovým barvením obarvit. Jeho vizualizace se provádí Zeihl-Neelsenovým barvením, nebo fluorescenčně. Má velmi dlouhou generační dobu (20–30 hodin) v porovnání s ostatními bakteriemi, které se dělí řádově během minut (*E. coli*). Je odolné vůči desinficiencím a je schopné přežít i několik týdnů v suchém stavu. [9] Jedná se o intracelulárního parazita. Za jeho odolnost vůči barvení i vnějším vlivům a zároveň za jeho vysokou virulenci je zodpovědná jeho specifická buněčná stěna. Je schopné přežívat intracelulárně v makrofázích, nebo extracelulárně v kaseózním materiálu. [4]

#### 3.5.2 Buněčná stěna

##### A. Stavba buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis*

Buněčná stěna navazuje na cytoplazmatickou membránu což je semipermeabilní dvojvrstva fosfolipidů obsahující integrální proteiny. Buněčná stěna (BS) se dělí na dvě části. První část je nerozpustné jádro tvořené peptidoglykany-arabinogalaktany-mykolovými kyselinami. Tato část BS je díky

její nerozpustnosti považována za kostru mikroba a určuje jeho vlastnosti. Druhá vrstva se skládá z volných rozpustných komponent. Tato část BS je považována za zdroj virulence mikrobů. Dále lze dělit BS na vnitřní a vnější, do vnitřní vrstvy zařazujeme peptidoglykan (PG), arabinogalaktan a fosfatidyl-*myo*-inositol s navázanými manózami. Vnější vrstva je tvořena mykolovými kyselinami a volnými komponentami BS. [22]

## **B. Stavba jádra buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis***

Peptidoglykan (PG) se nachází hned nad cytoplasmatickou membránou a je dále kovalentně vázán na arabinogalaktan. Základem jeho struktury jsou dva aminocukry *N*-acetylglukosamin a kyselina *N*-acetylmurámová, spojené  $\beta$ -1,4 glykosidickými vazbami. Na karboxylovou skupinu *N*-acetylmurámové kyseliny je připojen tetrapeptid skládající se z L-alanyl-D-isoglutaminy-meso-diaminopimelyl-D-alanin, kde D-Glu je dále amidován. Tyto polymerní útvary jsou mezi sebou navzájem spojeny a tvoří síť. [22] Arabinogalaktan (AG) je tvořen sacharidy, které se vyskytují jen ve formě furanóz, jak název napovídá sacharidy tvořící tuto strukturu jsou  $\alpha$ -D-arabinóza (*Araf*) a  $\beta$ -D-galaktóza (*Galf*). Základ této struktury tvoří lineární řetězec *Galf* vázaný vazbou  $\beta$ -1,5 nebo  $\beta$ -1,6. Na tento lineární řetězec galaktóz se váží různě uskupené řetězce arabinóz. *Araf* se vyskytuje ve třech základních uskupeních, tyto *Araf* řetězce se váží na galaktofuranózový lineární řetězec v poloze 8, 10 a 12. Arabinogalaktan má dva konce, redukující konec je vázán kovalentně speciální diglykosyl-P mostem v poloze 6 kyseliny *N*-acetylmurámové a neredukující konec, na který jsou kovalentně vázány mykolové kyseliny. [6,23] Mykolové kyseliny jsou připojeny ve čtyřjednotkových klustrech, pouze 2/3 hexaarabinofuranózových konců jsou obsazeny mykolovými kyselinami, neobsazené arabinózy se nejspíše účastní imunitní reakce. [22] Mykolové kyseliny jsou připojeny fosfodiesterovou vazbou na arabinogalaktan a jsou součástí vnější BS. Jsou nejmasitější částí BS a udávají MT charakteristické rysy, hlavně acidorezistenci. Jedná se o  $\beta$ -hydroxymastné kyseliny s velmi dlouhým hydrofobním řetězcem C<sub>54</sub>-C<sub>63</sub> a s C<sub>22</sub>-C<sub>24</sub> dlouhým  $\alpha$ -bočním řetězcem. Existují tři odlišné strukturní třídy mykolových kyselin,  $\alpha$ -mykolové kyseliny (nejzastoupenější- 70 % mykolových kyselin), methoxy- a keto-mykolové kyseliny. Odlišujeme *cis* a *trans* mastné kyseliny podle

postavení řetězců na cyklopropanových cyklech. Jednotlivé MK se liší podle zdroje, lze tedy podle struktury MK odlišit jednotlivá MT. [22, 23]

### **C. Stavba a funkce volných, rozpustných komponent BS**

*Phosphatidyl-myo-inositol mannoside* (PIMs) jsou unikátní glykolipidy vyskytující se ve vnitřní i vnější BS mykobakterií. Tvoří základní strukturu i pro lipoglykany (lipomanany a lipoarabinomanany), vyskytující se ve vnější membráně MT. Jsou nekovalentně vázány k ostatním komponentám BS a hrají velkou roli ve virulenci bacilů. Jejich strukturu tvoří fosfolipid *fosfatidyl-myo-inositol*, který na sebe dále váže 1–6 molekul manózy v polohách dva a šest inositolu a tato struktura je acylována. PIMs obsahují maximálně šest molekul manózy, pokud jich je ve struktuře více, jedná se o lipoglykany. [23]

*Cord factor* je složen z disacharidu trehalosy, která je esterifikována dvěma molekulami mykolových kyselin. Jeden zbytek mykolové kyseliny je napojen na C6 jednoho z cukrů a druhý zbytek je napojen na C6 druhého cukru v molekule disacharidu. Mykolové zbytky jsou různě dlouhé, od 20 až k 80 uhlíkům, záleží dle původu MT. Kord faktor tvoří ochrannou vrstvu bacilů, protože brání splnutí fagosomu s MT a lysosomu. Další úlohu hraje ve virulenci a toxicitě MT. Jeho toxicita spočívá ve snižování hladin  $\text{NAD}^+$ , tím snižuje aktivitu enzymů na  $\text{NAD}^+$  závislých, dále působí fyzikálně na membránu mitochondrií, a tím je schopen rozvrátit dýchací řetězec. Je imunogenní a podporuje tvorbu granulomů. [22]

Sulfolipidy jsou další důležitou součástí BS mykobakterií. Chemicky to jsou sulfatované acylované molekuly trehalosy. Hrají určitou roli ve virulenci MT a dále v interakci fagosom-lysosom. Prakticky stejně jako kord faktor zabraňují fúzi fagosomu obsahujícího MT a lysosomu a inhibují oxidativní fosforylaci mitochondrií savčích buněk. [22]

Lipomanany a lipoarabinomanany jsou lipoglykany BS mykobakterií. Chemicky jsou odvozeny od PIMs, lipomanany vznikají z PIMs prodloužením manosového řetězce, lipoarabinomanany vznikají také z PIMs prodloužením manosového řetězce a navíc do sloučeniny je zakomponována arabinóza. [22] Tyto molekuly hrají důležitou roli ve virulenci bacilů, LAM jsou navíc zkoumány



pro jejich schopnost vázat se na manosový receptor makrofágů a schopnost interakce s *Toll* receptorem. [6]

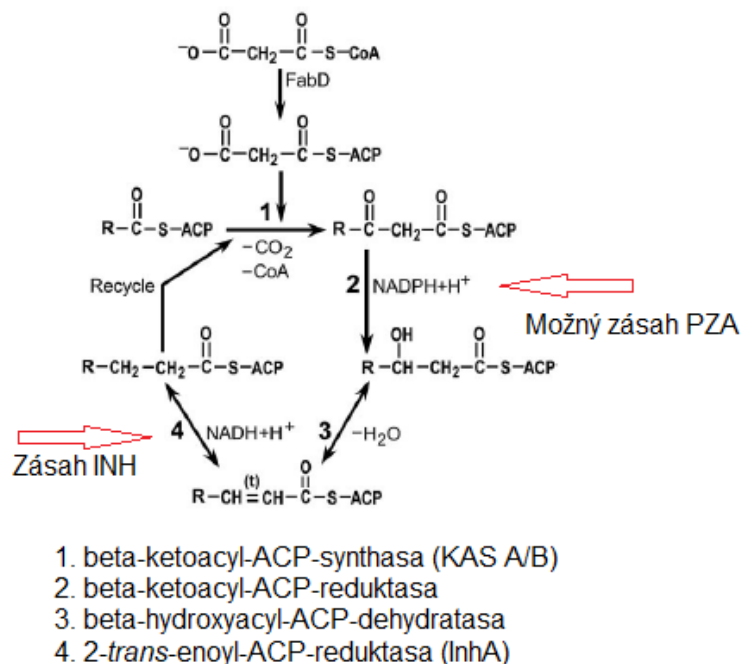
*Phthiocerol dimycocerosate* je specifický lipid, někdy nazýván voskem buněčné stěny MT. Jeho molekula je nepolární, jediné dvě hydroxylové skupiny phthiocerolu jsou esterifikované mykocerózovými kyselinami (mycocerosic acids). Hrají důležitou roli ve virulenci, MT bez těchto molekul se označují jako atenuované a jsou snadno zničitelné imunitním systémem pacienta. [22]

#### **D. Biosyntéza mykolových kyselin**

Syntéza mykolových kyselin se skládá ze čtyř hlavních kroků: syntéza malonyl-CoA, produkce FAS I, produkce FAS II a nakonec kondenzace produktů FAS I a FAS II produkce. [24]

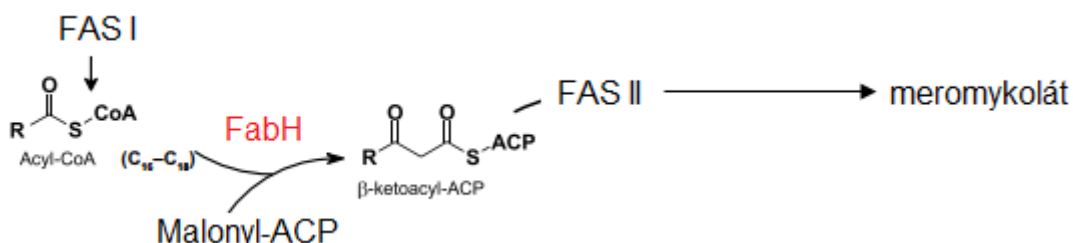
Za syntézu mykolových kyselin jsou odpovědné hlavní dva enzymy nazývané FAS I a FAS II. V obou případech se jedná o multienzymové systémy, jejichž funkcí je elongace řetězce mykolových kyselin, v případě FAS I elongace  $\alpha$ -řetězce MK a FAS II prodloužení meromykolátu. Oba enzymy prodlužují stávající řetězec o dva uhlíky pocházející z malonyl-CoA (ten je syntetizován z acetyl-CoA enzymem acetyl-CoA-karboxylasa). [25] FAS I (*eukaryotic-like*) produkuje  $C_{16}$ - $C_{18}$  a  $C_{24}$ - $C_{26}$  dlouhé řetězce.  $C_{16}$ - $C_{18}$  jsou považovány za substrát pro FAS II a  $C_{24}$ - $C_{26}$  jsou přímo prekursory  $\alpha$ -mykolového řetězce. [22,25]

Prvním krokem stavby BS mykobakterií je syntéza malonyl-CoA, který je enzymem FabD konvertován na malonyl-ACP (Obr. 5). Takto upravená molekula vstupuje do FAS I multienzymového systému a podléhá prodloužení řetězce v každém cyklu o dva uhlíky. FAS I uvolňuje své produkty jako acyl-CoA deriváty. Součástí tohoto enzymového systému je enzym InhA, který je cílem působení isoniazidu. [24]



**Obrázek 5:** FAS I mechanismus syntézy mykolových kyselin s vyznačenými mechanismy účinku léčiv. Převzato a upraveno z *Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis* [24].

Důležitým spojovníkem mezi FAS I a FAS II enzymovým systémem je enzym FabH (Obr. 6), který odebírá C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>-CoA deriváty produkované FAS I a kondenzací s malonyl-ACP dává vzniknout β-ketoacyl-ACP. β-ketoacyl-ACP je považován za iniciální biomolekulu účastnící se FAS II enzymové reakce. Systematika reakcí je téměř totožná jako v enzymovém systému FAS I, odlišuje se tím, že v posledním kroku není dvojná vazba zredukována, ale je enzymem isomerasou převedena na *cis*-izomer. Tato dvojná vazba je během dalších úprav přeměněna cyklopropan synthasou na cyklopropanový kruh. Po náležitě úpravě produktů FAS I a FAS II probíhá kondenzace za účasti enzymu Pks13 a vzniká molekula mykolových kyselin. [22,25]



**Obrázek 6:** Znárodnění FabH enzymu, důležitého spojovníku mezi FAS I a FAS II. Převzato a upraveno z [25].

### 3.5.3 Rezistence *Mycobacterium tuberculosis*

Rezistence je schopnost mykobakterií odolávat účinku antituberkulotik. [4] Je to geneticky daná vlastnost, která určuje citlivost bacilů k AT (antituberkulotikům). Rozlišujeme rezistenci primární a sekundární, monorezistenci a polyrezistenci, a nakonec multirezistenci (MDR-MT) a extenzivní multirezistenci (XDR-MT). Z důvodů předcházení rezistence se snaží SZO prosadit mezi základní vyšetření také průkaz citlivost MT na AT. [26]

Primární rezistence je stav, kdy daný kmen mykobakterií nereaguje na léčbu AT u pacienta, který je poprvé léčen. [26] Jsou to tedy bakterie s jistou genetickou výhodou, pacient se touto zmutovanou bakterií nakazil již od počátku onemocnění. Nejčastěji se jedná o rezistenci na INH, u nás není závažná, vyskytuje se u 1–2 % pacientů. [4]

Sekundární rezistence je naopak stav, kdy je pacient infikován zpočátku citlivým bacilem, ale v průběhu léčby vznikne mutant, bacil, který získá jistou výhodu oproti bacilům nemutantním. [4] Tento mutant má schopnost odolávat terapii AT. Rezistence je navozena nesprávnou terapií, špatnou spoluprací pacienta a lékaře, nedostatečným dohledem nad léčbou, nebo předčasným ukončením terapie. Někdy je tento stav nazýván jako lidský fenomén, jediným zdrojem této mutace je totiž člověk. [26]

Jako monorezistentní MT je označován takový bacil, který je při průkazu citlivosti rezistentní pouze na jedno antituberkulotikum z 1. linie léčiv. Naopak polyrezistencí se rozumí rezistence kmene na více, než jedno AT první linie léčiv. Polyrezistence na isoniazid a rifampicin se označuje multirezistence. Ještě závažnější forma necitlivosti je extenzivní multirezistence, kdy daný kmen není citlivý na rifampicin a isoniazid a navíc ještě je rezistentní k jednomu z injekčně podávaných AT 2. linie léčiv a k jednomu fluorochinolonovému antibiotiku. [26]

Dle WHO za rok 2016 přibylo 600 000 nových případů MDR-MT, z toho 6,2 % XDR-MT, a 240 000 lidí zemřelo na onemocnění TB způsobené multirezistentním kmenem MT. Šíření MDR-MT je potřeba zabránit, protože tyto kmeny lze těžko léčit také proto, že škála AT je úzká a nerozrůstá se tak rychle jako rezistentní kmeny tuberkulózy. Z tohoto důvodu vydala WHO pět hlavních priorit týkajících se krize rezistentních kmenů AT. První prioritou je zabránění

vzniku MDR-MT, druhou je vyhledávání MDR-MT, další je okamžité poskytnutí efektivní terapie pacientům nakaženým MDR-MT, čtvrtá spočívá v prevenci šíření a poslední je politický zájem o situaci a zlepšení financování zdravotní péče. [27]

Rezistence na PZA je způsobena nejčastěji mutací genu *pncA*, který kóduje pyrazinamidázu, tedy enzym konvertující pyrazinamid na aktivní molekulu pyrazinové kyseliny. Druhá nejčastější příčina rezistence je mutace *rpsA* genu, který kóduje ribozomální protein S1, ten je považován za jeden z cílů PZA. Nejnovější poznatek o rezistenci k PZA se týká *panD* genu, který kóduje aspartát dekarboxylasu. Tento enzym se podílí na syntéze  $\beta$ -alaninu, prekurzoru CoA a pantothenátu, důležité součásti energetického metabolismu buňky MT a také cíle PZA u mykobakterií. [28]

### 3.6 Terapie tuberkulózy

Léčba tohoto infekčního onemocnění je svěřována výhradně do rukou specialisty z oboru TRN. Je povinné každý nový případ, úmrtí nebo recidivu ohlásit na krajskou hygienickou stanici, toto hlášení je nástrojem kontroly TB. Pro tento účel byl také založen roku 1981 Centrální registr pro TB. Pro terapii TB se používají standardizované léčebné režimy, které jsou dány WHO, respektive doporučenými postupy vydávanými Českou pneumologickou a ftizeologickou společností pod záštitou ČLS JEP. [2]

#### 3.6.1 DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*)

Taktika léčby je dána DOTS (*Directly Observed Treatment Short-course*), je považována za nejefektivnější metodu kontroly TB. Jedná se o nákladově efektivní léčebnou metodu, která je kombinací technických a manažerských poznatků a jejímž úkolem je přeměnit infekční případy TB na neinfekční a prolomit nekonečný kruh šíření tuberkulózy. DOTS je charakterizována pěti znaky, které je pro funkčnost systému nutné dodržovat: [29]

1. Vládní závazek k trvalým aktivitám tlumící šíření TB.
2. Mikroskopický průkaz mykobakterií ve sputu u symptomatických pacientů a hlášení případů autoritám.
3. Standardizovaný léčebný režim na 6–8 měsíců, z čehož minimálně dva měsíce jsou pod dohledem lékaře na lůžku.

4. Pravidelná a nepřerušovaná dodávka základních léků proti TB.
5. Standardizovaný systém hlášení a zadávání údajů pro spolehlivé vyhodnocování výsledků pro jednotlivé pacienty i systém jako takový. [29]

DOTS do sebe musí být schopná zakomponovat potřeby daných zemí, například v Africe implementovat skutečnost časté nákazy HIV a TB v kombinaci u jednoho pacienta, pro východní Evropu skutečnost, že se zde nachází více rezistentních kmenů MT. Tato metoda musí být použitelná pro země chudé i bohaté, velké i malé. [29] Základní myšlenka DOTS je, že nejlepší prevencí je vyhledávání nových případů TB a jejich následná léčba. Správná léčba rychle zamezí šíření nemoci. Nevhodná léčba, například nevhodná kombinace léčiv, nebo krátký interval užívání léčiv, vede ke vzniku rezistentních kmenů MT, čehož je nutné se vyvarovat. [29,30]

*Short course treatment with DO*, neboli krátký cyklus léčby, trvá 6–8 měsíců léčby antituberkulotiky. V minulosti existoval *Long-course treatment*, který trval 12–18 měsíců a probíhal v sanatoriích, která se snažila u pacienta posílit odolnost vůči TB, a nebyla užívána žádná atituberkulotika, jelikož v té době ještě nebyla objevena. [29] *Short course treatment with DO* je rozdělen do dvou fází: iniciační a pokračovací. Léčebné režimy jsou standardizované, což znamená, že všichni pacienti, zařazení do definované skupiny, dostanou stejnou terapii. Léčba je odlišná pro nového pacienta s TB nebo relapsujícího pacienta. Léčba TB u HIV pozitivního pacienta je prakticky stejná jako u HIV negativního až na výjimku thiacetazonu, který může u HIV pozitivního pacienta vyvolat fatální kožní reakci. Pro léčbu TB se používá kombinace léčiv, aby se zamezilo vzniku rezistentních kmenů MT. [29]

**Iniciační (intenzivní) fáze** probíhá v nemocnici, pacient je izolován. Má za úkol rychlou redukci bakteriální populace, dosáhnout ústupu klinických známek aktivity tuberkulózy a počínající ústup rentgenového nálezu u plicní formy onemocnění. [20] Většinou trvá dva měsíce, jinak minimálně po dobu pozitivního mikroskopického nálezu ve sputu. Pacient je léčen kombinací čtyř nebo pěti antituberkulotik, v dávkovacím schématu dle jeho hmotnosti (mg/kg). Léčiva jsou podávána dle dávky buď jedenkrát denně nebo 3× týdně. [20]

Kombinační terapie zahrnuje léčbu isoniazidem, rifampicinem, pyrazinamidem a etambutolem. Tzv. „pětiterapie“ zahrnuje léčbu isoniazidem, rifampicinem, pyrazinamidem, etambutolem a navíc streptomycinem. Streptomycin se používá častěji u TB *meningitis*. V této fázi léčby je pacient přímo sledován, zda lék opravdu užívá (*Directly Observed Treatment*). [20,29]

**Pokračovací fáze** většinou probíhá v domácím prostředí, bez izolace, pacient už není infekční. Cílem této fáze je zabránit množení patogenů, které zbyly v tuberkulózních lézích a tím pádem má zabránit recidivě onemocnění. [20] Trvá minimálně čtyři měsíce, nebo déle, v přímé návaznosti na iniciační fázi. Pacient je léčen kombinací dvou léčiv, pokud je ve skupině rizikových pacientů, volí se spíše kombinace tří léčiv. Před stanovením kombinace léčiv se vždy stanovuje mikrobiologická citlivost vůči AT. Nejčastěji se používá isoniazid a rifampicin, popřípadě do trojkombinace etambutol. I tato fáze je pod dohledem lékaře specialisty. Vhodná je také podpůrná rehabilitace v sanatoriích. [20,29]

### **Chemoprolaxe TB**

„Chemoprolaxe znamená podávání antituberkulotik u jedinců, kteří jsou ve zvýšeném riziku vzniku TB.“ [31] Profylaxe primární se aplikuje nejčastěji u dětí, které mají negativní tuberkulinovou reakci, ale jsou vystaveny nakažlivé TB. Sekundární profylaxe se využívá, když je jedinec již nakažen MT, slouží k zabránění přechodu v manifestní onemocnění. [31] K ochraně se používá nejčastěji isoniazid v monoterapii zpravidla po dobu šesti měsíců. [4] Dávka je opět vztažena na hmotnost jedince (mg/kg), podává se 1× denně. Pokud je při sekundární profylaxi prokázána rezistence na isoniazid podává se rifampicin po dobu šesti měsíců. HIV pozitivní děti dostávají šest měsíců isoniazid. Délka profylaxe se odvíjí od věku dítěte a od rizikovosti situace. [31]

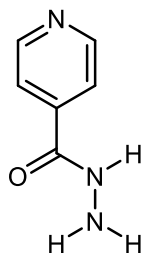
### **3.7 Antituberkulotika**

Antituberkulotika, neboli antimykobakteriální látky, jsou léčiva využívaná k léčbě tuberkulózy. Jsou to sloučeniny rozličné struktury. Častěji se setkáme se synteticky získanými chemoterapeutiky (pyrazinamid, isoniazid...) méně často pak s látkami přírodního původu, izolovanými z bakterií (rifampicin). [32] Základní vlastností AT je sterilizační nebo baktericidní účinek. Baktericidní účinek je schopnost usmrcovat rychle se dělící MT a sterilizační účinek se vyznačuje

usmrcováním perzistentních MT. Léčiva se vždy nasazují v kombinaci, aby se zamezilo vzniku rezistentních forem MT, z toho důvodu se volí léčiva s různými mechanismy účinku. [2]

### 3.7.1 Léčiva 1. linie

#### Isoniazid (H, Obr. 7)



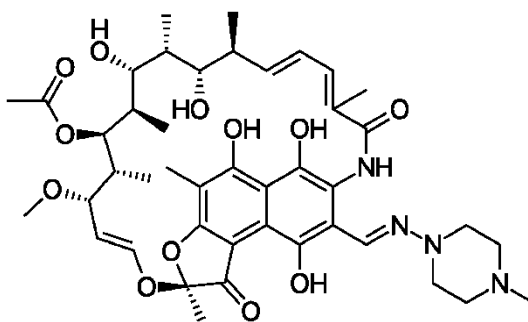
Obrázek 7: Vzorec isoniazidu

Jedná se o hydrazid kyseliny isonikotinové. Působí baktericidně na extracelulární i intracelulární aktivní MT, ale bakteriostaticky u neaktivních forem patogenu. [32] Relativně rychle vzniká rezistence. Isoniazid (INH) je proléčivo, které je aktivováno uvnitř buňky MT pomocí KatG (katalasa-peroxidasa). Aktivní produkt (isonikotinový acyl-radikál) se spontánně váže na NADH za vzniku nikotinoyl-NADH produktu. Tento adukt se váže pevně na *enoyl*-ACP-reduktasu (InhA), součást multienzymového systému FAS I. Tímto způsobem blokuje isoniazid syntézu mykolových kyselin, potřebných pro stavbu buněčné stěny. [33]

Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, dyspepsie, průjem. Pacient může trpět bolestí hlavy a závratěmi nebo periferními neuropatiemi s parestéziemi. Parestézii lze předcházet podáváním pyridoxinu, u kterého dochází k deficitu při podávání isoniazidu. Méně často jsou postižené jaterní funkce projevující se hepatitidou. Inhibuje metabolismus léčiv v játrech, čímž může zvýšit i jejich toxicitu, proto se doporučuje upravit dávky těchto léčiv. [34]

Isoniazid je u nás registrovaný jako léčivý přípravek Nidrazid 100 mg. [34] Dávkuje se u dospělých 5 mg/kg tělesné hmotnosti/den, maximálně 300 mg denně perorálně. [35] Podává se 1× denně na lačno, alespoň 30 minut před jídlem. Proti parestéziím se profylakticky podává 10 mg pyridoxinu denně. [34,35]

## Rifampicin (R, Obr. 8)



Obrázek 8: Vzorec rifampicinu

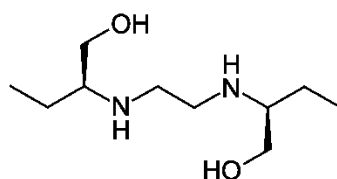
Rifampicin patří do skupiny ansamycinových antibiotik. V jejich struktuře je dominantní makrocyclický laktam a naftalenové jádro. Byl izolován z bakterie *Amycolatopsis rifamycinica* jako směs označovaná rifamycin. Z této směsi je nejdůležitější ryfamycin B, který byl dále chemicky modifikován na strukturu rifampicinu. Je to baktericidní antibiotikum. [32] Mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA-dependentní RNA-polymerázy, tedy v inhibici tvorby mykobakteriální RNA. Léčivo je silně lipofilní, proto snadno proniká do buňky mykobakterie. Je indikován na léčbu TB, lepry ale i infekce způsobené G+ i G-bakteriemi. [36]

Je to silný induktor cytochromu P450, tudíž má hodně lékových interakcí a nízký terapeutický index a jeho aplikaci je doporučováno monitorovat. Během užívání rifampicinu dochází ke zbarvení slin, potu, slz a moči do oranžova. Podávání se nedoporučuje pacientům s onemocněním jater. Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, průjem, porucha krvetvorby, výskyt chřipkového syndromu a porucha jaterních funkcí. Velmi rychle se vyvíjí rezistence MT k rifampicinu, proto se stanovuje před nasazením léčby citlivost MT vůči tomuto léčivu a test citlivosti se opakuje několikrát během léčby. [37]

U nás je registrovaný jako Benemicin 300 a 600 mg, dává se u dospělých 10 mg/kg/den perorálně. Maximálně 600 mg za den. Podává se současně s ostatními AT na lačno, alespoň hodinu před jídlem. [35,37]



### Ethambutol (E, Obr. 9)



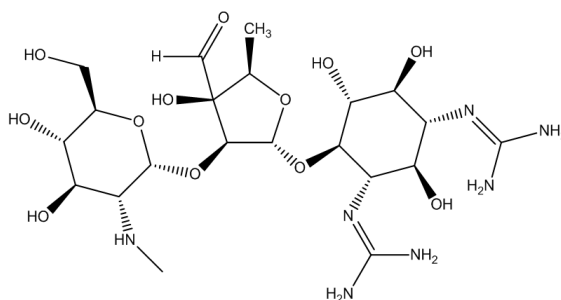
Obrázek 9: Vzorec etambutolu

Sloučenina typu aminoalkoholu. Opticky aktivní sloučenina se dvěma chirálními uhlíky. Je to syntetické chemoterapeutikum. Účinný je pouze pravotočivý S,S-(+) izomer, zatímco ostatní izomery jsou neúčinné nebo toxické. Ethambutol je bakteriostatický pro aktivní MT, ale v kombinacích zvyšuje baktericidní potenciál. Mechanismus účinku spočívá v blokádě syntézy sacharidové složky buněčné stěny. Inhibice syntézy arabinogalaktanu z D-arabinozy, a tudíž zamezení vazby mykolových kyselin na 5-hydroxylovou skupinu arabinogalaktanu a tvorbě komplexů v BS. [32]

Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, průjem, zvýšená urikémie, poruchy vizu, respektive červená a zelená barvoslepost a reverzibilní retrobulbární neuritida. Na rozdíl od ostatních není hepatotoxický. [35,38]

U nás registrovaný jako Sural 400 mg. Dávkuje se 15 mg/kg podaných v jedné denní dávce perorálně. Maximální denní dávka je 2,5 g. Potrava neovlivní jeho vstřebávání, nemusí se podávat na lačno. [35,38]

### Streptomycin (S, Obr. 10)



Obrázek 10: Vzorec streptomycinu

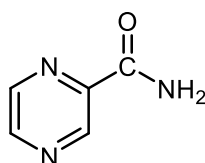
Látka přírodního původu izolovaná z bakterií *Streptomyces griseus*. Patří mezi aminoglykosidová antibiotika, obsahuje ve své struktuře trisacharid, respektive aminosacharid. Jeho molekula je příliš polární pro perorální aplikaci

a je nutné ho podat intramuskulárně nebo intravenózně pro systémový účinek. Mechanismu účinku je založen na inhibici proteosyntézy bakteriální buňky nevratnou vazbou na podjednotku 30S bakteriálního ribozomu. Má široké spektrum účinku, používá se v terapii infekcí způsobených G- bakteriemi, TB a *Pseudomonas aeruginosa*. Díky vysokému výskytu nežádoucích účinků by se neměl podávat déle než 7–10 dní u jiných infekcí než TB. [32]

Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky patří neurotoxicita, především poškození sluchu, nefrotoxicita a porucha přenosu nervosvalového signálu. Při poškození ledvin je nutné sledovat jeho hladiny v krvi a případně upravovat dávky. Je teratogenní a nesmí se užívat během těhotenství. Do bakterií se dostává transportním mechanismem. [4]

U nás nyní není registrovaný LP s touto obsahovou látkou. Dávkuje se 10–15 mg/kg/den, maximální tolerovaná dávka je většinou 750 mg. V prášku pro injekce ve formě sulfátu. [35]

#### **Pyrazinamid (Z, Obr. 11)**



**Obrázek 11:** Vzorec pyrazinamidu

#### Fyzikální vlastnosti

Pyrazinamid neboli amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové je bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v 96% lihu a dichlormethanu. Jeho sumární vzorec je  $C_5H_5N_3O$  a jeho teplota tání se pohybuje v rozmezí 188 až 191°C. Jedná se o separandum, tedy silně účinnou látku. [39]

#### Chemické vlastnosti

Základní skelet tvoří pyrazin, což je aromatický heterocyklus obsahující dva dusíky v cyklu, které mají volné elektronové páry. Tyto volné elektronové páry ale nejsou zapojeny do konjugace, jak je tomu například u pyrrolu, protože je zde už splněna podmínka aromaticity, což je přítomnost 6  $\pi$  elektronů v konjugaci. Vliv dusíků na reaktivitu sloučeniny je spíše deaktivující, způsobují

zvýšení elektronové hustoty v *m*-polohách vůči jejich poloze. Vhodné reakce jsou tedy hlavně nukleofilní aromatické substituce v *o*-poloze vzhledem k dusíku. Chemicky se jedná o slabou dvojsytnou bázi s hodnotou disociačních konstant  $pK_a=0,65$  a  $pK_a=-5,78$ . [40]

#### Farmakodynamika pyrazinamidu

Mechanismus účinku PZA není dodnes plně objasněn. Existuje několik hypotéz, jakým mechanismem tato sloučenina působí. PZA je jedinečný v tom ohledu, že je schopný působit na bacily, které se nereplikují a mají minimální aktivitu metabolismu, neboli jen perzistují v těle hostitele. Z tohoto důvodu má nezastupitelnou roli v terapii TB, protože ostatní AT působí především na aktivní bacily. [28]

#### **A. Enzymatická konverze PZA na POA enzymem pyrazinamidásou a následný zásah POA do metabolismu buňky MT**

V této teorii se předpokládá, že PZA vstupuje do buněk bacilů pasivní difúzí. V buňce je enzymaticky konvertován na kyselinu pyrazinovou enzymem pyrazinamidásou (kódováno *pncA* genem). POA je relativně silná kyselina ( $pK_a$  2,9), která se uvnitř bacilů vyskytuje deprotonizovaná a opouští intracelulární prostředí aktivním i pasivním transportem do extracelulárního kyselého prostoru. Toto extracelulární prostředí je kyselé díky probíhajícímu TB zánětu a působením tohoto kyselého prostředí se stává deprotonizovaná POA opět nenabitou sloučeninou (HPOA) a znovu vstupuje pasivní difúzí do buňky MT. Zde uvolňuje kyselý vodík a celý cyklus se opakuje. POA tedy celkově okyseluje vnitřní prostředí MT, a tím inhibuje funkci enzymů, zároveň rozvrací funkci membrán a zasahuje i do energetického metabolismu patogenů. Tento mechanismus účinku je tedy závislý na kyselém pH prostředí, a jelikož kyselé prostředí zánětu vymizí během iniciační fáze terapie TB, PZA se v pokračovací fázi nepodává. [28,41]

#### **B. Inhibice *trans*-translace**

*Trans*-translace je vitální funkce buněk, která umožňuje uvolnění defektního proteinu z ribosomu, jeho následnou degradaci a obnovení funkce ribosomu. Pro tuto funkci existuje v buňce speciální *tm*-RNA, která se spolu

s RpsA proteinem váže na defektní *m*-RNA a uvolňuje tak defektní protein z ribozomu, zabezpečí jeho degradaci a obnoví funkci ribosomu. Pro působení PZA tímto mechanismem je důležitá jeho konverze na POA. POA se naváže na ribosomální protein S1 (RpsA), a tím zamezuje následné *trans*-tanslaci v případě syntézy defektního proteinu. [42,43]

### **C. Aspartát dekarboxylasa jako cíl POA**

Nejnovější poznatky naznačují nový mechanismus účinku, který byl prokázán u PZA-rezistentních mykobakterií bez mutací pro gen *pncA* a *rpsA*. Diskutovaný mechanismus účinku je založený na interferenci POA s C-koncem enzymu aspartát dekarboxylasa, který je kódovaný *panD* genem. Aspartát dekarboxylasa je enzym zodpovědný za konverzi L-aspartátu na  $\beta$ -alanin, který je součástí molekuly pantothenátu. Vitamín B<sub>5</sub> je nezbytnou součástí koenzymu A, a ten je velmi důležitou částí energetického metabolismu a biosyntézy mykolových kyselin. Narušením energetického metabolismu dojde k nedostatku energie v buňce MT a následně takto poškozená buňka uhynie. [44]

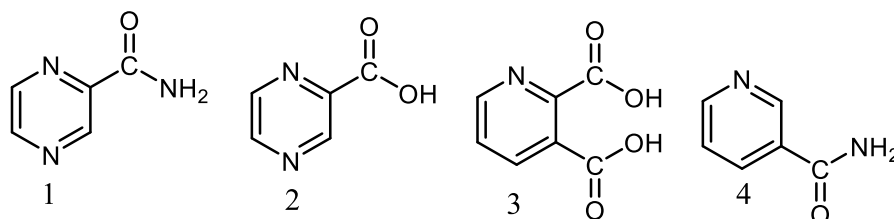
### **D. Inhibice *Fatty acid synthase I***

FAS I je enzym syntetizující mykolové kyseliny buněčné stěny MT. Syntetizuje krátké  $\alpha$ -řetězce a dále prekursory mykolových kyselin, které dále prodlužuje FAS II. [28] Pokud dojde k zablokování funkce FAS I, dojde k defektu mykolových kyselin a tedy i rozrušení buňky MT a jejímu úhynu. Interference s FAS I enzymem je předpokládána přes intermediát NADPH+H<sup>+</sup>, který působí jako redukční činidlo při syntéze mykolových kyselin. Je možné, že PZA a NADPH+H<sup>+</sup> kompetují o vazebné místo v enzymu FAS I. Jelikož inhibice nastává až při vysokých koncentracích PZA, nepředpokládá se, že by PZA tímto mechanismem účinku v organismu působil. [45]

### **E. Mechanismus účinku spojený se syntézou NAD<sup>+</sup>**

Tato teorie je založena na myšlence, že PZA, potažmo POA, dokáže zastavit biosyntézu životně důležitého koenzymu NAD<sup>+</sup> na základě jeho strukturní podobnosti s chinolinovou kyselinou a nikotinamidem (Obr. 12). NAD<sup>+</sup> je nezbytně důležité redoxní činidlo a také koenzym hrající zásadní roli v energetickém metabolismu buňky MT. Za normálních okolností vzniká NAD<sup>+</sup>

z chinolinové kyseliny, PRPP (5-fosforybisil-1-pyrofosfát) a dalších komponent včetně  $Mg^{2+}$  za katalýzy enzymem QAPRTasa (*Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase*). Na základě strukturní podobnosti POA a chinolinové kyseliny (Obr. 12) lze předpokládat, že POA dokáže tímto mechanismem interferovat s QAPRTasou a jako falešný substrát ji inhibovat. MT ale dokáže *de novo* syntézu  $NAD^+$  obejít přijetím hotového nikotinamidu, zda je strukturní podobnost využita i během této cesty biosyntézy  $NAD^+$  zůstává otázkou. [46,47]



**Obrázek 12:** Porovnání podobnosti: 1-Pyrazinamid, 2-kyselina pyrazinová, 3-chinolinová kyselina, 4-nikotinamid

### Farmakokinetika

PZA je kompletně absorbován z gastrointestinálního traktu. Je široce distribuován do všech orgánů a tělesných tekutin (i mozkomíšního moku). Pouze 5 % PZA se váže na plazmatické bílkoviny. Jeho metabolismus probíhá v játrech a jeho hlavním metabolitem je kyselina pyrazinová. Jeho metabolity jsou vylučovány ledvinami. Je vylučován do mateřského mléka. [48]

### Pyrazinamid jako léčivý přípravek

V České republice je známý pod obchodním názvem Pyrazinamid Krka 500 mg, zařazený do specifického léčebného programu. Jedná se o tablety s perorálním podáním. [48] Dávkuje se dle tělesné hmotnosti dospělého pacienta 15–30 mg/kg, při každodenním podávání by dávka neměla přesáhnout 2 g za den. Lze dávkovat i 2× nebo 3× týdně. Tablety se užívají celé v jedné denní dávce, nejčastěji po snídani. [35,48]

Před nasazením léčivého přípravku se doporučuje změřit hladiny kyseliny močové v séru a funkce jater. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky patří poškození jaterních funkcí, nejčastěji žloutenka. Mezi další NÚ lze zařadit nauzeu, zvýšení kyseliny močové v séru (inhibicí vylučování urátů ledvinami)

a myalgie. Přípravek lze používat v těhotenství, po porodu se doporučuje nekojit, protože se léčivo vylučuje do mateřského mléka. [48]

### 3.7.2 Léčiva 2. linie

Do této skupiny léčiv lze zahrnout celou škálu léčiv různé struktury i různého mechanismu účinku. Pro terapii TB se používají výhradně v případě rezistence na některé z léčiv 1. linie, proto se jim přezdívá rezervní antituberkulotika. Patří sem léky podávané perorálně i aplikované intravenózně. [49]

#### Injekční léčiva (Tab. 2)

Obě skupiny látek, které lze podat pouze injekčně, působí stejným mechanismem účinku a to inhibicí buněčné proteosyntézy. [36] Pokud pacientovi nelze podat léky perorálně, lze aplikovat injekčně i některé z dalších léčiv dostupných i v tabletách (fluorochinolony, Tab. 3).

**Tabulka 2:** Přehled injekčně podávaných léčiv 2. linie antituberkulotik [50]

Skupina	Účinné látky	Účinek	Nežádoucí účinky
Aminoglykosidy	Amikacin, Kanamycin	baktericidní	Ototoxicita, nefrotoxicita, porucha přenosu nervosvalového impulzu
Polypeptidy	Kapreomycin	baktericidní	Nefrotoxicita, Neurotoxicita, hypokalémie

#### Perorální léčiva (Tab. 3)

Fluorochinolony působí inhibicí DNA gyráz bakterií, respektive topoizomerázy II u G- bakterií, tím inhibují replikaci buněčné DNA. Thioamidy interferují se syntézou mykolových kyselin, tím znemožňují správnou stavbu BS mykobakterií, ale jsou to významně toxické látky. Cycloserin působí inhibicí syntézy peptidoglykanu a kyselina *p*-aminosalicylová působí nejspíše přes

metabolismus železa patogenů. Nevýhodou *p*-aminosalicylové kyseliny je její obsolentnost a potřeba vysokých terapeutických dávek, řádově v gramech. [50]

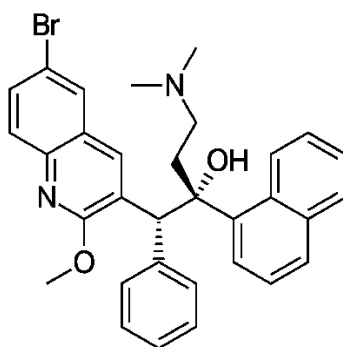
**Tabulka 3:** Přehled léčiv 2. linie antituberkulotik podávaných perorálně [50]

Skupina	Účinné látky	Účinek	Nežádoucí účinky
Fluorochinolony	Ofloxacin, Ciprofloxacin	baktericidní	Hepatopatie, ruptura Achilovy paty, artropatie, fotosenzibilizace...
Thioamidy	Ethionamid, Propionamid	bakteriostatické	Nauzea, zvracení, možnost thyreopatií.
	Cycloserin	bakteriostatické	Bolesti hlavy, psychózy...
	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina	bakteriostatické	Nauzea, zvracení, eroze GIT, thyreopatie v kombinaci s thioamidy.

### 3.7.3 Nová léčiva

Vzhledem k tomu, že lidstvo stále nepřekonal TB a toto infekční onemocnění neustále způsobuje škody na životech lidí a navíc se stále rozmáhají i rezistentní formy MT, je třeba intenzivně pracovat na vývoji nových AT. Pro vývoj nových antituberkulotik existují jasně definovaná pravidla. Kromě ověřeného bezpečnostního profilu by mělo léčivo mít větší antimykobakteriální aktivitu než stávající léčiva, zasahovat nové cíle, být kompatibilní s terapií HIV, nesmí jevit antagonismus s ostatními AT a mělo by napomáhat zkrácení doby terapie. [51] Jelikož vývoj nových léčiv trvá několik desítek let a situace ohledně TB je alarmující, tak se přistoupilo ke zrychleným klinickým testům některých nadějných sloučenin (delamanid-fáze III klinických studií, bedachilin- fáze II klinických studií). [50,51]

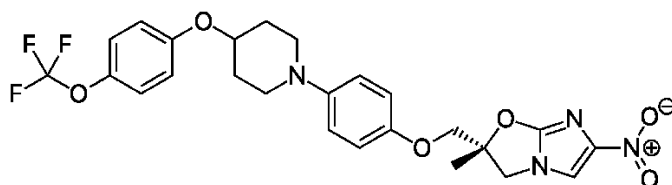
### Bedachilin (Obr. 13)



**Obrázek 13:** Vzorec bedachilinu

Tato látka byla označována během vývoje jako TMC207 a chemicky patří mezi diarylchinoliny. [51] TMC207 byla FDA a posléze i EMA schválena pro užívání v kombinační terapii v případě onemocnění MDR-TB u dospělých jedinců. [50] Mechanismus účinku spočívá v inhibici ATP-synthasy, což je klíčový enzym pro energetický metabolismus buňky. Výhodou je, že je selektivní pro mykobakteriální buňky, čímž je méně toxický pro člověka. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří nevolnost, bolest svalů a prodloužení QT intervalu. Jeho MIC je velmi nízká, udávána v desítkách až stovkách nanogramů na mililitr. [50,51]

### Delamanid (Obr. 14) a pretomanid



**Obrázek 14:** Vzorec delamanidu

Obě léčiva patří mezi nitroimidazolová antibiotika. Během vývoje byly označovány: Delamanid (OPC 67683) a pretomanid (PA-824). Delamanid byl již FDA schválen pro užívání k terapii TB u dospělých a je dále testován v pediatrické skupině. Mechanismus jejich účinku spočívá v inhibici syntézy mykolových kyselin, důležitých komponent buněčné stěny MT. Navíc mají schopnost uvolňovat oxid dusnatý (NO), který způsobí respirační otravu. Pretomanid uvolňuje NO především v anaerobních podmínkách, a tím působí i na dormantní formy MT. Jejich výhodou je nízká hepatotoxicita, díky které je lze lépe kombinovat s antivirotyky u HIV pozitivních pacientů. [50,51] Dle databáze



SÚKL jsou u nás registrovány: bedachilin (SIRTURO 100 mg tablety) a delamanid (Delyba 50 mg tablety).

#### Další nadějná léčiva

Mezi tato léčiva se řadí nová i znovuobnovená léčiva. Mezi znovuobnovená patří antibiotika linezolid a meropenem/klavulánová kyselina. A k novým léčivům lze zařadit sutezolid, který patří do stejné skupiny antibiotik jako linezolid (oxazolidinony). Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy. Dalším novým léčivem je SQ109 (1,2-ethylendiamin), analog ethambutolu, který působí též inhibici proteosyntézy. U těchto látek probíhají intenzivní studie nacházející se v různých stádiích klinického hodnocení léčiv. [50,51]

### 3.8 Vakcinace

#### 3.8.1 Povinnost očkování v ČR

Zásadním rokem pro tuto problematiku se stal rok 2010, resp. 1. 11. 2010, kdy vyšla v platnost vyhláška [52] č.299/2010 jako provádějící předpis zákona č. 258/2000 o ochraně veřejného zdraví [10], která zrušila plošné povinné očkování proti TB. Povinné toto očkování zůstalo pouze pro osoby z rizikových skupin, hlavně pro novorozence, a pro tyto jedince je plně hrazeno z veřejného zdravotního pojištění. [10] Vyhláška MZd č. 355/2017 o očkování proti infekčním nemocem, příloha č. 2 [53], jako provádějící předpis zákona č. 258/2000 o ochraně veřejného zdraví stanovuje podmínky povinného očkování novorozenců proti TB. Do rizikové skupiny patří například novorozenec, jehož rodiče trpí aktivní formou TB, nebo se narodilo či pobývá ve státě s vyšším výskytem TB než 40 případů na 100 000 obyvatel. [53]

Do roku 2009 probíhalo očkování proti TB od 4. dne do 6. týdne života dítěte a poté v 11–12ti letech života dítěte probíhalo přeočkování u tuberkulin negativních dětí, které bylo plně hrazeno z veřejného zdravotního pojištění. Od března roku 2009 vyšla v platnost vyhláška č. 65/2009 podle které byla povinná pouze primovakcinace ve věku od 4. dne do 6. týdne života dítěte. Poté roku 2010 následovalo zrušení plošného očkování proti TB. [54]

### 3.8.2 Důvody zrušení očkování proti TB v ČR

Kalmetizace neboli očkování proti TB neboli vakcinace proti TB byla zrušena z důvodu usnesení WHO o její účinnosti. Proběhlo mnoho metaanalýz, které pomohly odkrýt účinnost a bezpečnost vakcinace proti TB. Na základě výsledků těchto metaanalýz vydala WHO všeobecná doporučení, ve kterých doporučuje kalmetizaci pouze v zemích s vysokým výskytem TB, a to co nejdříve po narození. V zemích s nízkým výskytem tohoto onemocnění doporučuje očkovat pouze novorozence zahrnuté do rizikových skupin. BCG vakcína má prokázané protektivní účinky proti meningitidě a šíření tuberkulózy mezi dětmi, nedokáže však zabránit primární infekci a hlavně reaktivaci latentní plicní tuberkulózy, což její efekt značně omezuje. Délka ochranného působení BCG vakcíny se udává 10–20 let, proto se dříve v 11ti letech přeočkovávaly tuberkulin negativní děti. Zjistilo se však, že toto přeočkování je bez efektu. Jediný efekt má pouze očkování čerstvě narozených dětí, které se ještě s MT nesetkaly. [55,56,57]

### 3.8.3 Způsob vakcinace

Očkuje se BCG vakcínou neboli *Bacillus Calmette–Guérin*. Jedná se o živou atenuovanou vakcínu získanou z *Mycobacterium bovis*. Navozuje buněčný typ imunity a chrání před generalizovanými formami TB. Vakcína se aplikuje intradermálně do horní části levé paže, kde také zanechává typickou jizvu. Očkování se nesmí provádět u imunosuprimovaných pacientů, u pacientů HIV pozitivních, při horečnatých stavech a u pacientů s pozitivní tuberkulinovou zkouškou. [55]

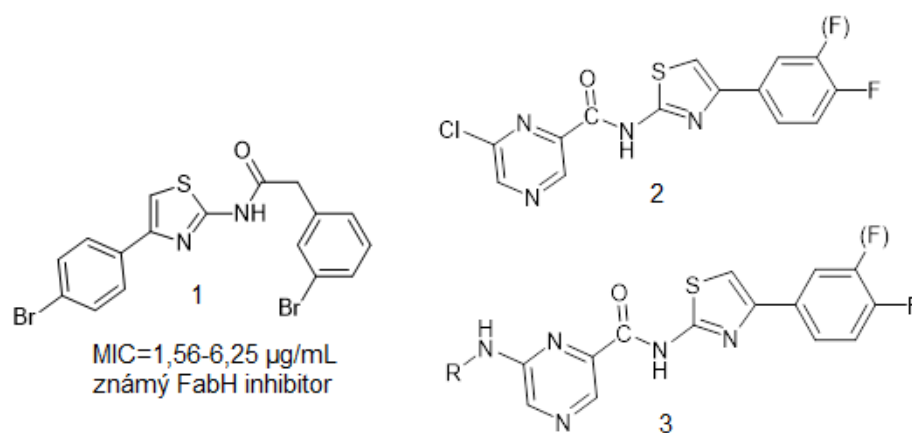
## 3.9 Design syntetizovaných sloučenin

Struktura výchozí látky je složena z pyrazinamidu (Obr. 1 na straně 11), antituberkulotika 1. linie, který je detailně popsán v kapitole 3.7.1, i když v širším úhlu pohledu se jedná vlastně o 6-chlorpyrazinamid. Dalším fragmentem struktury je substituovaný 4-fenylthiazol-2-amin (Obr. 2,3 na str. 11), jehož deriváty již dříve prokázaly antimykobakteriální aktivitu. [58,59]

Myšlená obměna v poloze šest pyrazinového jádra vychází z poznatků, že alkylamino substituce pyrazinamidu a jeho dalších derivátů zvyšuje antimykobakteriální aktivitu takto obměněných molekul. Tato modifikace se

provádí v poloze pět a šest pyrazinového kruhu, antimykobakteriální aktivita roste s rostoucí lipofilitou, tedy s rostoucí délkou alkylového řetězce do délky sedmi až osmi uhlíků. Tato modifikace přinesla dále sloučeninám nižší cytotoxicitu na HepG2 hepatální buňky. [60,61]

Vzhledem k této struktuře byl navržen jako potenciální cíl účinku těchto sloučenin enzym FabH (kapitola 3.5.2). K tomuto návrhu došlo na základě strukturní podobnosti s již známými inhibitory tohoto enzymu (Obr. 15) a na základě výsledků molekulového modelování. Struktura 1 (Obr. 15) zobrazuje známý inhibitor enzymu FabH, nejedná se ovšem o enzym z MT. Jde o enzym z jiné bakterie, avšak tyto enzymy jsou si velmi podobné. [58,62]



**Obrázek 15:** Porovnání struktury známého inhibitoru FabH enzymu (1), výchozí látky 1 (2) a všeobecné struktury nově připravených látek (3), upraveno a převzato z [58].

## 4. Metodická část

### 4.1 Chemikálie, metody, pomůcky, přístroje a software

Experimentální část této práce probíhala na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Chemikálie použité pro syntézu pocházely od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Byly použity v dodané kvalitě, která odpovídala kvalitě pro syntézu.

Pro TLC chromatografii a ověření průběhu reakcí, nebo ověření čistoty separovaného produktu byly použity desky Silica 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Německo). Detekce byla provedena v UV boxu pod UV lampou s vlnovou délkou 254 a 366 nm.

K pokusu syntézy látky JZ-MC-10 a JZ-MC-3 byl použit mikrovlnný reaktor CEM Discover vybavený podavačem Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, Severní Karolína, USA).

Separace produktu od nečistot byla provedena na automatizovaném flash chromatografu CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, Nebraska, USA). Kolony byly plněny ručně silikagelem s velikostí zrn 40-63 µm (Silica gel 60, 0,040 až 0,063 mm, Merck). Eluce byla gradientová a detekce probíhala měřením absorbance při vlnových délkách 254 nm a 280 nm.

<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektra byla měřena na Katedře organické a bioorganické chemie doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. na přístrojích Varian VNMR S500 (<sup>1</sup>H-HMR při 500 MHz, <sup>13</sup>C-NMR při 125 MHz) nebo Varian Mercury VX- BB 300 (<sup>1</sup>H-HMR při 300 MHz, <sup>13</sup>C-NMR při 75 MHz), oba od firmy Varian (Palo Alto, Kalifornie, USA). Měření bylo provedeno v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) nebo deuterovaném chloroformu (CDCl<sub>3</sub>) za laboratorní teploty. Chemické posuny δ (ppm) jsou vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) a to nepřímo pomocí signálů rozpouštědla (pro DMSO-*d*<sub>6</sub> 2,49 ppm (<sup>1</sup>H) a 39,70 ppm (<sup>13</sup>C), pro CDCl<sub>3</sub> 7,27 ppm (<sup>1</sup>H) a 77,00 ppm (<sup>13</sup>C)).

Infračervená spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie přístrojem Nicolet Impact 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Massachusetts, USA) s využitím metody ATR (zeslabený úplný odraz) na krystalu germania.

Hmotnostní spektra byla změřena doc. Radimem Kučerou, Ph.D. na hmotnostním spektrometru LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Vzorky byly rozpuštěny ve směsi MeOH, H<sub>2</sub>O, kyselina mravenčí v poměru 80:20:0,1 (v/v). Ionizace byla prováděna elektrosprejem v pozitivním módu.

Teploty tání čistých produktů byly naměřeny kapilární metodou v bodotávku Stuart SMP 30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Velká Británie). Získané hodnoty jsou nekorigované.

Chemické strukturní vzorce sloučenin a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti byly získány z programu ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, Massachusetts, USA).

Pro 3D *in silico* simulaci interakce sloučeniny a receptoru byl využit software MOE (Molecular Operating Environment) od společnosti Chemical Computing Group (CCP, Montreal, Kanada).

Uvedené výtěžky v procentech patří chromatograficky čisté látky po posledním kroku čištění.

Pomůcky pro syntézy zahrnovaly standardní laboratorní vybavení. Kádinky, baňky s plochým i kulatým dnem, skleněná tyčinka, míchátko a magnetická míchačka, olejová lázeň, vařič, filtrační papír, nálevky, frity, vodní vývěva, vakuová odparka, kapiláry, TLC komory, zpětné chladiče a teploměry.

## 4.2 *In silico* doking série JZ-MC

*In silico* doking je technika molekulového modelování, jehož účelem je predikce vzájemné interakce molekul. V rámci této práce budeme hovořit o makromolekule, tedy enzymu a malé molekule, tedy ligandu. Jedná se o metodu racionálního, počítačem podporovaného vývoje léčiv. Molekulární dokování do proteinu, všechny *in silico* kalkulace a generování pól proběhlo v MOE (*Molecular Operating Environment*) v.2016.0802 (Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Canada) s použitím MMFF94x silového pole.

Prvním krokem molekulového modelování této práce byl výběr a posléze úprava proteinu, v tomto případě enzymu, vhodného pro dokování dané série sloučenin. 3D struktura proteinu  $\beta$ -ketoacyl-ACP-synthasy III (FabH) byla stažena z PDB databáze (Tab. 4), která je volně dostupná na internetu. Kód použitého proteinu je 1U6S a jedná se o komplex lauroyl-CoA a  $\beta$ -ketoacyl-ACP-synthasy III. Je to enzym pocházející z *Mycobacteria tuberculosis*, jehož 3D struktura byla získána metodou rentgenové krystalografie. Tento protein byl stažen jako PDB formát a vložen do programu MOE. 3D struktury v databázi PDB často obsahují mnoho chyb, které je nutno před molekulovým modelováním opravit.

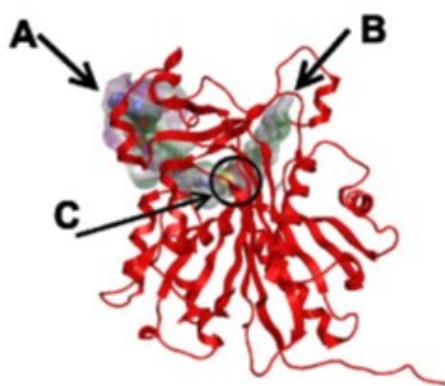
**Tabulka 4:** Souhrnné vlastnosti proteinu 1U6S

PDB ID	1U6S
Zdrojový organismus	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Rok publikace	2004
X-ray rozlišení	2,3 Å
R-value Work	0,206
R-value Free	0,247
Ramachandran outliers	0,5 %
Počet podjednotek	2 (A, B)
Počet AMK na jeden řetězec	335

Jelikož se jedná o homodimerní strukturu enzymu, byla jedna z podjednotek (A) smazána pomocí funkce *Sequence editor*. Zbylá ponechaná jednotka byla následně opravena funkcí *Structure preparation*, která opravila hlavně strukturální chyby. Přes aplikaci *Protonate 3D* byly přidány vodíkové atomy, dále byly vypočítány parciální náboje a taktéž byla provedena omezená energetická minimalizace komplexu ligand-receptor. Molekuly vody vzdálenější více než 4,5 Å od receptoru nebo ligandu byly odstraněny, voda nebyla tedy brána v potaz v následných kalkulacích a interakcích ligandu a proteinu. Protein 1U6S byl pro zjednodušení krystalizace zmutován v katalytické triádě (Cys112 byl nahrazen Ala112), z tohoto důvodu byl Ala112 opraven na Cys112. Pro následný doking byl vybrán rotamer Cys112 s nejnižší energií. Správná

konformace Cys112 byla potvrzena porovnáním s jinou strukturou FabH (pdb: 2QO0).

Podjednotka je tvořena dvěma kanály, které jsou na sebe skoro kolmé a tvoří písmeno L (Obr. 16). Na spojnici těchto větví se nachází katalytická triáda (Cys112, His244, Asn274). Na toto katalytické místo z jedné strany navazuje hydrofobní a z druhé strany hydrofilní kanál enzymu. [58] Pro tento projekt je důležité vyhodnotit, zda se molekula finálních sloučenin je schopna vázat na aminokyseliny z katalytické triády a zda je velikost hydrofobní kapsy enzymu dostatečná pro hydrofobní část sloučeniny potenciálního léčiva.



**Obrázek 16:** L-tvar tunelu mykobakteriální FabH. A-hydrofilní část, B-lipofilní část, C-katalytická triáda. Obrázek čerpán z [58].

Druhým krokem byla příprava a úprava databáze sloučenin, které budou dokovány. Tato databáze byla připravena ručním skládáním. V tomto případě se jednalo o čtrnáct sloučenin, sedm z nich bylo poté připraveno a otestováno, zbylých sedm sloučenin bylo využito jen pro molekulové modelování *in silico*. Jednotlivé sloučeniny byly postaveny z jednotlivých atomů v programu MOE ve 3D formátu, zkontrolovány ve 2D formátu, byl jim přidán parciální náboj, vybrán převažující tautomer a provedena energetická minimalizace.

Následovala nejdůležitější část a to doking připravené databáze molekul do opraveného enzymu. Podrobnosti o nastavení dokovacího protokolu: **Docking stage - Placement method:** *Triangle Matcher, generate 10.000 poses; Score: London dG; retain 30 poses.* **Refinement stage – Rigid receptor;** *Score: GBVI/WSA dG; retain 5 poses.* Doking byl zaměřen na vazebné místo originálního ko-krystalizovaného ligandu (lauroyl-CoA). Jako zdroj ligandů byla vybrána databáze dříve upravených molekul. Výsledkem dokingu je tabulka

s pěti nejlepšími pózami pro každou molekulu, které ohodnotil program číselnou hodnotou (SCORE).

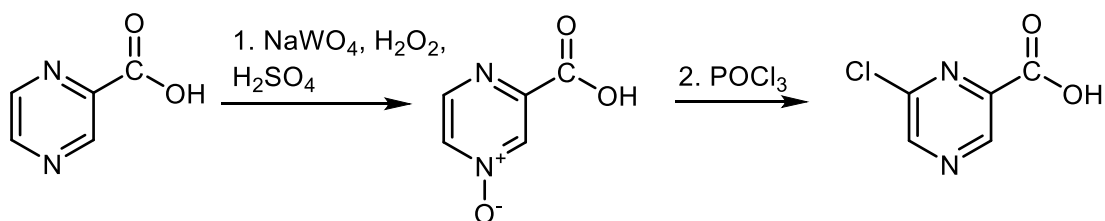


## 4.3 Syntéza série JZ-MC

### 4.3.1 Syntéza meziproductů a výchozích látek

#### Příprava kyseliny 6-chlorpyrazin-2-karboxylové (6-Cl-POA)

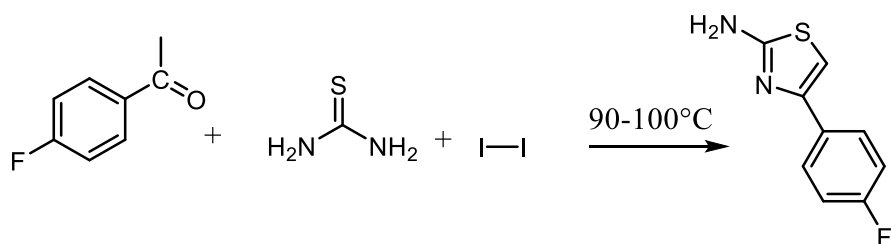
Výchozí sloučeninou byla kyselina pyrazin-2-karboxylová, která byla zoxidována  $\text{NaWO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na *N*-oxid v poloze 4 kyseliny pyrazin-2-karboxylové (Obr. 17). Karboxylová skupina i *N*-oxid jsou silně deaktivující funkční skupiny s negativním mesomerním efektem a směřují další substituci aromatického jádra do *meta* polohy [63]. Působením dalšího činidla  $\text{POCl}_3$  nastala chlorace jádra v poloze 6 (Obr. 17). Sloučenina 6-Cl-POA nebyla v rámci této diplomové práce syntetizována, protože zde byla zásoba z předešlých syntéz. [63,64]



Obrázek 17: Příprava sloučeniny 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny

#### Příprava 4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-aminu

Do třetí misky bylo naváženo 5,5 g (72,2 mmol) thiomčoviny a 9,2 g (36,2 mmol) jodu a rozetřeno na jemný prášek. Po rozetření se směs kvantitativně přenesla do varné baňky a přidalo se 5 g (36,2 mmol) 4-fluoracetofenonu a čtyři hodiny se tato směs (Obr. 18) zahřívala pod zpětným chladičem při 90–100 °C (během zahřívání směs zkapalní). Po vychladnutí směs ztuhla, byla promyta vodným roztokem thiosíranu sodného, díky kterému se směs odbarvila, protože došlo k redukci jodu na rozpustný jodid. Po odstranění jodu pomocí vodného roztoku thiosíranu sodného byla směs propláchnuta etherem pro odstranění zbytku 4-fluoracetofenonu. [65] Nakonec byla provedena rekrystalizace z horké vody a TLC pro kontrolu čistoty. Výtěžek 4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-aminu byl 7,75 g (55,3 % teoretického výtěžku). Obdobným způsobem by se připravil i 4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-amin, který ale byl dostupný z jiných zdrojů a nebyl během této diplomové práce syntetizován.

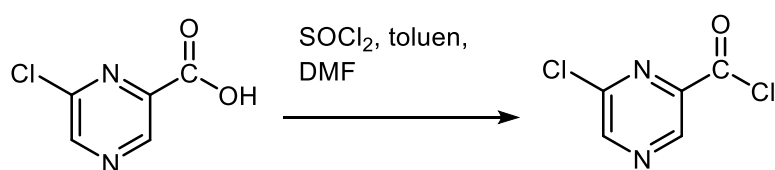


**Obrázek 18:** Příprava substituovaného aminothiazolu

### Výchozí látka 1

Název: 6-chlor-*N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid

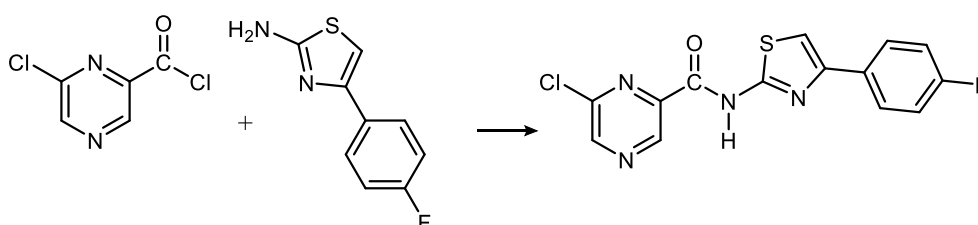
Celá příprava začala syntézou chloridu kyseliny 6-Cl-POA. Syntéza chloridu probíhala po celou dobu za bezvodých podmínek. Kyselina 6-chlorpyrazin-2-karboxylová (6-Cl-POA) byla dispergována v 30 ml bezvodého toluenu, byl přidán chlorid thionylu a dvě kapky DMF (katalyzátor), celá směs se zahřívala pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny při 100–110°C (Obr. 19, navážky viz Tab. 5). Během reakce dochází k postupnému rozpouštění dispergované kyseliny, což je důkaz vzniku chloridu kyseliny, který je v toluenu rozpustný. Směs během reakce zčervenala. Tato reakční směs byla třikrát odpařena (toluen jako rozpouštědlo) za sníženého tlaku do odpaření rozpouštědla. Po odpaření zbyla hnědá viskózní kapalina, která byla bez zbytečného odkladu a bez dalšího čištění rozpuštěna v bezvodém acetonu a použita pro následnou kondenzaci.



**Obrázek 19:** Příprava chloridu kyseliny 6-Cl-POA

Do kondenzační reakce – přípravy výchozí látky 1 (Obr. 20) bylo naváženo 1,39 g (6,75 mmol) 4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-aminu a rozpuštěno ve 20 ml bezvodého acetonu. K roztoku se přidalo 1,8 g (22,5 mmol) pyridinu a tato směs se nechala vychladit v lednici. Po vytažení z lednice se směs přenesla na magnetickou míchačku, kde se opět chladila v ledové tříšti. K takto připravené směsi substituovaného aminothiazolu byl přidáván po kapkách chlorid kyseliny 6-Cl-POA z předešlé reakce (podrobnosti reakce Tab. 5, první řádek) rozpuštěný v bezvodém acetonu. Reakční směs zhnědla a po pár minutách začal

„vypadávat“ produkt. Za stálého míchání probíhala reakce ještě několik hodin. Produkt byl odfiltrován na fritě a propláchnut vodou. K filtrátu byla přidána voda a vzniklý produkt (precipitát) se opět přefiltroval. Byla provedena TLC chromatografie (porovnání s výchozím 4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-aminem). Další purifikace neproběhla, sloučenina byla v této čistotě použita pro další syntézy. Identita byla potvrzena pomocí TLC. teplotou tání, a <sup>1</sup>H NMR (porovnání se standardem [58]). Bylo získáno 901,3 mg (38,6 % teoretického výtěžku) žlutého pevného produktu, který byl použit již jen pro pokus syntézy vzorku JZ-MC-10(RP), pro zbylé syntézy byla použita výchozí látka 1 připravena v předešlých syntézách na katedře.



**Obrázek 20:** Kondenzační reakce k přípravě výchozí látky 1

**Tabulka 5:** Detailní informace reakcí, respektive navážky pro přípravu VL 1 a VL 2

Produkt	6-Cl-POA	SOCI <sub>2</sub>	DMF	subst. aminothiazol	pyridin
VL 1	1,244 g (7,5 mmol)	2,5 ml	2 kapky	1,39 g 6,75 mmol 0,9 mol. ekv. 6-Cl POA	1,8 g 22,5 mmol 3 mol. ekv
VL2 JZ-MC-7	0,342 g (2,16 mmol)	0,75 ml	2 kapky	0,342 g 2,16 mmol 1 ml. ekv 6-Cl-POA	0,474 g 6 mmol 2,8 mol. ekv

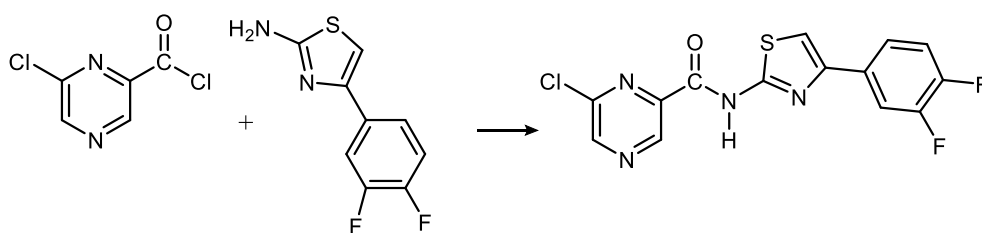
### Výchozí látka 2 (JZ-MC-7)

Název: 6-chlor-*N*-[4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-yl]pyrazin-2-karboxamid

Tuto sloučeninu lze také považovat za výchozí látku, i když z ní byl posléze syntetizován jen jeden finální produkt. Stala se ale nedílnou součástí molekulového modelování.

Celá příprava začala syntézou chloridu kyseliny 6-Cl-POA, která byla syntetizována obdobným způsobem jako u VL 1 (podrobnosti Tab. 5, druhý řádek).

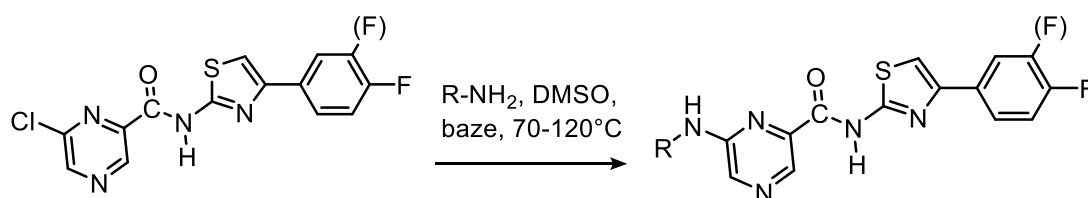
Pro kondenzační reakci k přípravě VL 2 (Obr. 21) bylo naváženo 342 mg (2,16 mmol) 4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-aminu, který byl rozpuštěn v bezvodém acetonu. K roztoku byl přidán pyridin 474 mg (6 mmol) a celá směs byla chlazená v lednici. Po ochlazení se směs přemístila na magnetickou míchačku, kde probíhalo nadále chlazení ledem za stálého míchání. K takto připravené směsi byl po kapkách přidáván chlorid kyseliny 6-chlorpyrazin-2-karboxylové rozpuštěný v bezvodém acetonu. Zde produkt vypadl až po několika hodinách míchání reakční směsi. Postup byl dále stejný jako u výchozí látky 1. Proběhla filtrace přes fritu, propláchnutí vodou a provedení TLC se standardem výchozí látky 1. Po vysušení byl zvážen výtěžek 332 mg výchozí látky 2 (47,06 % teoretického výtěžku). Bezvodé prostředí je důležité kvůli citlivosti reakčních komponent. Jelikož je reakce silně exotermní, je důležité směs chladit. Vznikl žlutý pevný produkt.



**Obrázek 21:** Kondenzační reakce k přípravě výchozí látky 2

#### 4.3.2 Syntéza alkylaminoderivátů výchozí látky 1 a 2

Všechny nově připravené látky jsou alkylaminoderiváty výše popsaných výchozích látek. Během reakcí docházelo k substituci chloru v poloze 6 pyrazinového kruhu za alifatický amin s různě dlouhým uhlíkatým řetězcem (Obr. 22), za různých podmínek. U všech nově připravených sloučenin byla změřena teplota tání, proběhlo ověření struktury a čistoty pomocí NMR a IČ spektra a v neposlední řadě byla stanovena i antimykobakteriální aktivita.



**Obrázek 22:** Obecné schéma reakce přípravy alkylaminoderivátů výchozích látek

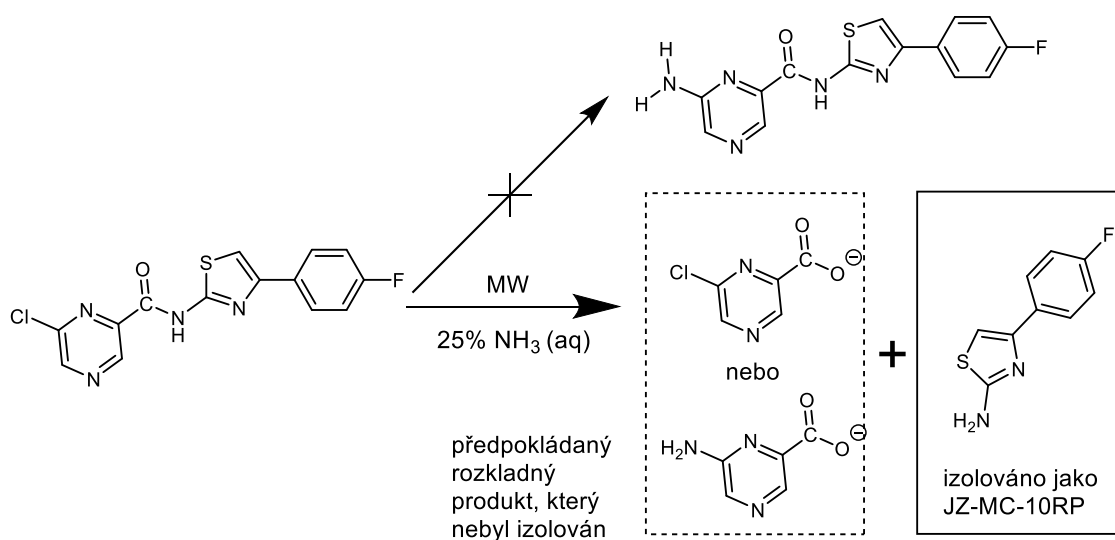
Výchozí látka (VL 1 nebo VL 2) byla rozpuštěna v 10 ml DMSO. Jako báze pro vychytávání protonů byl použit pyridin, TEA nebo uhličitán draselný a to téměř

vždy v odlišném molárním ekvivalentu. Tato směs byla posléze zahřívána na 70–120°C po dobu několika hodin pod zpětným chladičem. Po proběhnuté reakci prokázanou TLC chromatografií byla směs naředěna vodou přibližně v pětinásobném množství v porovnání s DMSO. Pokud se vzorek vysrážel, byl přefiltrován přes fritu a poté byla sraženina rozpuštěna v ethyl-acetátu (EtOAc). Pokud se ale vzorek nevysrážel, byl vytřepán do EtOAc. Roztok vzorku rozpuštěný v EtOAc byl naadsorbován na silikagel během odpařování rozpouštědla za sníženého tlaku a následně byla provedena flash chromatografie s gradientovou elucí hexan: EtOAc, tedy separace a vyčištění látky.

Během syntézy vzorků v mikrovlnném reaktoru došlo k nečekanému zvratu a rozštěpení molekuly v místě amidové vazby. Takto se stalo u vzorku JZ-MC-3, který touto cestou byl syntetizován jako první. Kde hned po vyjmutí reakce ve zkumavce z reaktoru bylo evidentní, že reakce neproběhla dle očekávání, směs zčernala a silně zapáchala. Při pokusu o přípravu touto cestou u vzorku JZ-MC-10 tyto markantní změny reakční směsi vidět nebyly, ale bohužel žádaná reakce neproběhla a opět došlo k rozštěpení vazby a uvolnění volného 4-(4-fluorfenylthiazol)-2-aminu a došlo tedy k mylné izolaci rozkladného produktu (izolován jako JZ-MC-10RP, struktura byla potvrzena srovnáním teploty tání,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter s údaji z literatury [58]). Pro následnou přípravu sloučeniny JZ-MC-3 byl použit stejný postup jako při ostatních alkylaminoderivátech (tj. konvekční zahřívání na olejové lázni pod zpětným chladičem). JZ-MC-10 nebyla z důvodu nedostatku času syntetizována náhradním způsobem.

Sloučenina **JZ-MC-10** byla původně zamýšlena jako jediná k syntéze v mikrovlnném reaktoru (vzhledem k těkavosti amoniaku). Do speciální zkumavky komplementární k danému reaktoru se vložilo magnetické míchátko, navázila se spočítaná navážka výchozí látky (VL 1) 253,0 mg (0,76 mmol) a jako rozpouštědlo a zároveň reagentie se použil 25% (m/m) vodný roztok amoniaku v množství odpovídajícím z poloviny plné zkumavky, přibližně 5 ml (reakce Obr. 23). Byl nastaven čas reakce 45 minut + 10 minut chlazení, teplota 120°C, tlakový limit 150 PSI a výkon 150W. Po 45 minutách byla v reakční zkumavce stále pevná rezidua výchozí látky, ale i tak bylo provedeno TLC, které tuto informaci potvrdilo. Z reakční zkumavky byl slit a uschován roztok. Ke krystalkům výchozí látky se přidal opět 25% (m/m) vodný roztok amoniaku tentokrát

v poměru 1:1 s methanolem (kosolvent), celkový objem přibližně 5 ml. V reaktoru se změnila podmínka pro tlakový limit 120 PSI a výkon 60W, ostatní podmínky jako čas a teplota se nezměnily. Byla provedena TLC chromatografie pro potvrzení proběhnutí reakce (vymizení skvrny odpovídající VL 1). Poté se reakční směs odpařila do sucha, rozpustila se v EtOAc a naadsorbovala na silikagel. Byla provedena flash chromatografie v gradientové eluci EtOAc: methanol.



**Obrázek 23:** Pokus o přípravu sloučeniny JZ-MC-10 a vznik rozkladného produktu JZ-MC-10RP

Podmínky u jednotlivých reakcí se měnily z důvodu stále neuspokojivých výtěžků reakcí a tedy i malého množství produktu jako takového. Snaha o zjištění vhodných podmínek reakce, kdy by bylo dosaženo optimálních výsledků (výtěžek alespoň 50 %), provázela celý tento projekt. Některé sloučeniny byly syntetizovány několika způsoby, často neúspěšně. V této práci je vždy uveden pouze úspěšný pokus přípravy dané sloučeniny potenciálního léčiva (Tab. 6).

*Pozn.:* Pracovní kód JZ-MC-6 zde není uveden, protože tento kód byl přidělen látce syntetizované během tohoto projektu, ale posléze zařazené do jiné série látek, a JZ-MC-8 byl použit pro látku odlišné struktury.

**Tabulka 6: Přehled detailů reakcí derivátů výchozích látek**

Vzorek	Navážka VL	Molární množství VL	Rozp.	Báze	Mol. ekv. alkylaminu	Zisk pevné látky
JZ-MC-1	257,0 mg	0,77 mmol	DMSO	pyridin 3 mol. ekv.	3	vytřepáním do ethyl-acetátu a odpařením
JZ-MC-2	231,9 mg	0,70 mmol	DMSO	TEA 3 mol. ekv.	3	vytřepáním do ethyl-acetátu a odpařením
JZ-MC-3	250,2 mg	0,75 mmol	DMSO	uhličitan draselný 2 mol. ekv.	5	vysrážením vodou
JZ-MC-4	251,7 mg	0,75 mmol	DMSO	uhličitan draselný 2 mol. ekv.	5	okyselením a vysrážením vodou
JZ-MC-5	136,6 mg	0,41 mmol	DMSO	TEA 2 mol. ekv.	3	vytřepáním do ethyl-acetátu a odpařením
JZ-MC-9	202,3 mg	0,57 mmol	DMSO	uhličitan draselný 2 mol. ekv.	5	vysrážením vodou

#### 4.4 Nově připravené látky

Název: *N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(hexylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-1

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>5</sub>OS

Molekulová hmotnost: 399,49

Log *P*: 4,85

Clog *P*: 5,78751

Teplota tání: 116–121°C

Vzhled: pevná, krystalická, hnědo-žlutá látka

Výtěžek:

-teoretický:	306,7 mg	100 %
-praktický:	67,9 mg	22,13 %

R<sub>f</sub>: 0,67 (hexan: ethyl-acetát 3:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 60,13; H, 5,55; F, 4,76; N, 17,53; O, 4,00; S, 8,03.

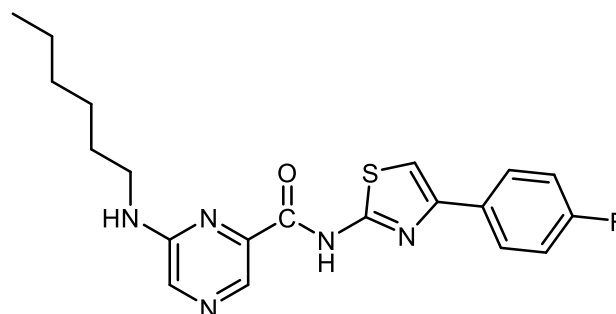
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.88 (bs, 1H, CONH), 8.69 (s, 1H, H3), 8.12 (s, 1H, H5), 7.88–7.78 (m, 2H, H2'', H6''), 7.14 (s, 1H, H5'), 7.14–7.08 (m, 2H, H3'', H5''), 4.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.48 (td, *J* = 7.1, NCH<sub>2</sub>, 5.5 Hz, 2H), 1.76–1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.52–1.31 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.93 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.7 (d, *J* = 247.3 Hz), 161.9, 157.4, 153.0, 149.4, 139.4, 136.5, 131.9, 130.6 (d, *J* = 3.3 Hz), 127.9 (d, *J* = 8.1 Hz), 115.6 (d, *J* = 21.6 Hz), 107.9, 41.6, 31.5, 29.2, 26.7, 22.6, 14.0.

**IČ** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3340 ν(N-H) sek. amin; 3228; 2954, 2930, 2857 ν(C-H) alkyl; 1694 ν(C=O) amid; 1592; 1550; 1533; 1217; 995; 844; 748; 657.

**MS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 400,16 [M+H]<sup>+</sup>; 820,87 [2M+Na]<sup>+</sup>

Exact mass: 399,15





Název: *N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(butylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-2

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>5</sub>OS

Molekulová hmotnost: 371,43

Log *P*: 4,02

Clog *P*: 4,72951

Teplota tání: 166,1–166,2°C

Vzhled: pevná, krystalická světle žlutá látka

Výtěžek:

-teoretický: 257,3 mg                      100 %

-praktický: 44,8 mg                        17,41 %

Rf: 0,7 (hexan: ethyl-acetát 3:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 58,21; H, 4,88; F, 5,11; N, 18,86; O, 4,31; S, 8,63.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.75 (s, 1H, CONH), 8.69 (s, 1H, H3), 8.12 (s, 1H, H5), 7.90–7.79 (m, 2H, H2'', H6''), 7.17–7.07 (m, 3H, H3'', H5'', H5'), 4.93 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 3.48 (td, J = 7.1, 5.5 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.76–1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.57–1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

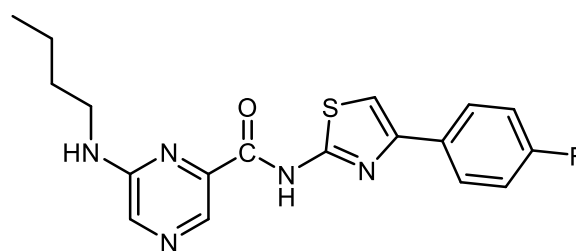
**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.6 (d, J = 247.5 Hz), 161.8, 157.2, 152.9, 149.4, 139.3, 136.6, 132.0, 130.6 (d, J = 3.3 Hz), 127.8 (d, J = 8.1 Hz), 115.6 (d, J = 21.6 Hz), 107.8, 41.3, 31.3, 20.1, 13.8.

**IČ** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3346 ν(N-H) sek. amin; 3281; 2957, 2933, 2870 ν(C-H) alkyl; 1679 ν(C=O) amid; 1606; 1545; 1527; 1218; 991; 836; 744; 661.

**MS** (ESI+) m/z: 372,15 [M+H]<sup>+</sup>; 764,85 [2M+Na]<sup>+</sup>

Exact mass: 371,12

Vzorec:



Název: *N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(propylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-3

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>5</sub>OS

Molekulová hmotnost: 357,41

Log *P*: 3,6

Clog *P*: 4,20051

Teplota tání: 150,8–153,1°C

Vzhled: velmi světle žlutá pevná látka

Výtěžek:

-teoretický:	268,1 mg	100 %
-praktický:	57,7 mg	21,53 %

Rf: 0,37 (hexan:ethyl-acetát 1:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 57,13; H, 4,51; F, 5,32; N, 19,60; O, 4,48; S, 8,97.

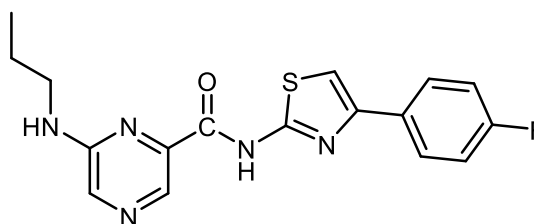
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.90 (s, 1H, CONH), 8.31 (s, 1H, H3), 8.16 (s, 1H, H5), 8.01–7.93 (m, 2H, H2'', H6''), 7.70 (s, 1H, H5'), 7.51 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.30–7.20 (m, 2H, H3'', H5''), 3.44 (td, *J* = 7.0, 5.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.66–1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.2, 162.0 (d, *J* = 244.7 Hz), 157.6, 154.0, 148.4, 140.1, 138.0, 130.9 (d, *J* = 3.0 Hz), 129.8, 128.1 (d, *J* = 8.2 Hz), 115.7 (d, *J* = 21.5 Hz), 109.0, 42.0, 22.1, 11.8.

**IČ** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3354 ν(N-H) sek. amin; 3296; 2968, 2938 ν(C-H) alkyl; 1687 ν(C=O) amid; 1594; 1546; 1525; 1222; 996; 842; 739; 654.

**MS** (ESI+) *m/z*: 358,13 [M+H]<sup>+</sup>; 736,84 [2M+Na]<sup>+</sup>

Exact mass: 357,11



Název: *N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(heptylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-4

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>5</sub>OS

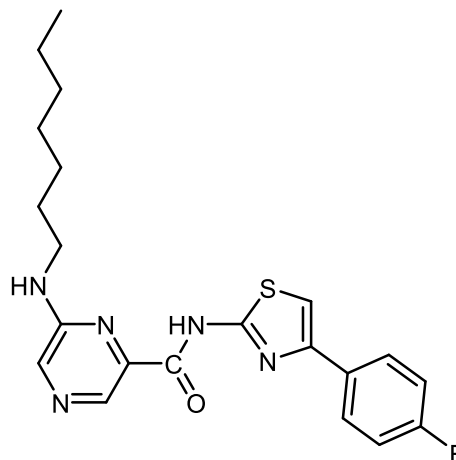
Molekulová hmotnost: 413,52

Log *P*: 5,27

Clog *P*: 6,31651

Teplota tání: 115,0–116,1°C

Vzhled: sytě žlutá pevná mastná látka



Výtěžek:

-teoretický: 310,1 mg                      100 %

-praktický: 86,2 mg                        27,79 %

Rf: 0,36 (hexan:ethyl-acetát 1:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 61,00; H, 5,85; F, 4,59; N, 16,94; O, 3,87; S, 7,75.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.85 (s, 1H, CONH), 8.30 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.15 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 8.02–7.91 (m, 2H, H<sub>2</sub>'', H<sub>6</sub>''), 7.71 (s, 1H, H<sub>5</sub>'), 7.51 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.34–7.15 (m, 2H, H<sub>3</sub>'', H<sub>5</sub>''), 3.45 (td, *J* = 7.0, 5.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.62–1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.44–1.11 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 0.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.1, 162.0 (d, *J* = 244.6 Hz), 157.5, 154.0, 148.4, 140.0, 138.0, 130.9 (d, *J* = 3.0 Hz), 129.7, 128.0 (d, *J* = 8.1 Hz), 115.7 (d, *J* = 21.5 Hz), 109.0, 31.5, 30.2, 28.7, 26.8, 26.5, 22.2, 14.1.

**IČ** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3350 ν(N-H) sek. amin; 2956, 2929, 2855 ν(C-H) alkyl; 1679 ν(C=O) amid; 1591; 1544; 1519; 1219; 988; 838; 750; 632.

**MS** (ESI<sup>+</sup>) *m/z*: 414,19 [M+H]<sup>+</sup>; 848,84 [2M+Na]<sup>+</sup>

Exact mass: 413,17

Název: *N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(pentylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-5

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>5</sub>OS

Molekulová hmotnost: 385,46

Log *P*: 4,44

Clog *P*: 5,25851

Teplota tání: 154,5–154,6°C

Vzhled: pevná, krystalická světle žlutá látka

Výtěžek:

-teoretický:	157,3 mg	100 %
-praktický:	81,4 mg	51,75 %

Rf: 0,53 (hexan: ethyl-acetát 1:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 59,20; H, 5,23; F, 4,93; N, 18,17; O, 4,15; S, 8,32.

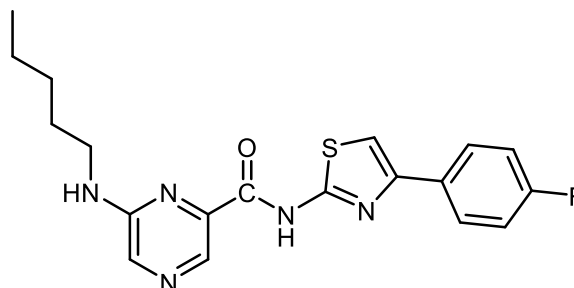
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.75 (s, 1H, CONH), 8.70 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.12 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 7.92–7.77 (m, 2H, H<sub>2</sub>'', H<sub>6</sub>''), 7.15 (s, 1H, H<sub>5</sub>'), 7.14–7.08 (m, 2H, H<sub>3</sub>'', H<sub>5</sub>''), 4.93 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.47 (td, *J* = 7.1, 5.5 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.76–1.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.51–1.37 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 0.97 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.6 (d, *J* = 247.3 Hz), 161.8, 157.2, 152.9, 149.4, 139.3, 136.6, 132.0, 130.6 (d, *J* = 2.9 Hz), 127.8 (d, *J* = 8.1 Hz), 115.6 (d, *J* = 21.5 Hz), 107.8, 41.6, 29.1, 28.9, 22.4, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3354 ν(N-H) sek. amin; 3276; 2964, 2931, 2858 ν(C-H) alkyl; 1684 ν(C=O) amid; 1599; 1544; 1524; 1232; 988; 838; 748; 645.

MS (ESI+) *m/z*: 386,13 [M+H]<sup>+</sup>; 792,85 [2M+Na]<sup>+</sup>

Exact mass: 385,14



Název: 6-chlor-*N*-(4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-7 (VL 2)

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS

Molekulová hmotnost: 352,74

Log *P*: 3,62

Clog *P*: 3,11338

Teplota tání: 245,4–246,7°C

Vzhled: pevná sytě žlutá látka

Výtěžek:

-teoretický: 705,5 mg 100 %

-praktický: 332,0 mg 47,06 %

Rf: 0,58 (hexan: ethyl-acetát 2:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 47,67; H, 2,00; Cl, 10,05; F, 10,77; N, 15,88; O, 4,54; S, 9,09.

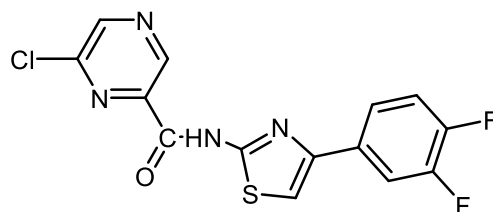
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.76 (s, 1H, CONH), 9.26 (s, 1H, H3), 9.08 (s, 1H, H5), 8.07–7.71 (m, 3H, H2'', H6'', H5'), 7.58–7.42 (m, 1H, H5').

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 161.5, 157.7, 148.3, 147.4, 143.7, 142.8, 122.7, 118.1 (d, J = 17.5 Hz), 114.8 (d, J = 18.1 Hz), 110.5.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3132; 3059; 1681 ν(C=O) amid; 1609; 1541; 1488; 1276; 1011; 965; 930; 880; 772; 742; 633.

MS (ESI+) m/z: 353,09 [M+H]<sup>+</sup>

Exact mass: 352,00



Název: *N*-(4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-yl)-6-(butylamino)-pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-MC-9

Vzorec:

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>OS

Molekulová hmotnost: 389,42

Log *P*: 4,18

Clog *P*: 4,80349

Teplota tání: 203,7–204,8°C

Vzhled: pevná, světle-žlutá látka

Výtěžek:

-teoretický:	222,0 mg	100 %
-praktický:	102,3 mg	46,08 %

R<sub>f</sub>: 0,36 (hexan: ethyl-acetát1:1)

Elementární analýza:

-vypočítaná: C, 55,52; H, 4,40; F, 9,76; N, 17,98; O, 4,11; S, 8,23.

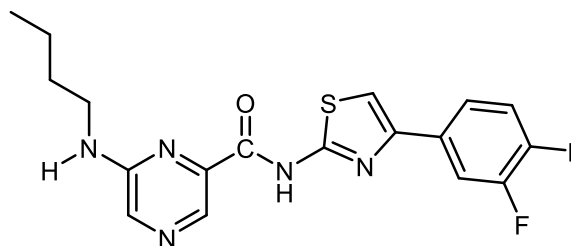
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.84 (s, 1H, CONH), 8.29 (s, 1H, H3), 8.14 (s, 1H, H5), 7.97–7.90 (m, 1H, H6'), 7.81 (s, 1H, H5'), 7.80–7.75 (m, 1H, H2'), 7.55–7.41 (m, 2H, H5'', NH), 3.45 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.63–1.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47–1.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.1, 157.6, 154.0, 150.5 (dd, *J* = 75.3, 12.7 Hz), 148.6 (dd, *J* = 77.1, 12.7 Hz), 147.2, 139.9, 138.1, 132.0 (dd, *J* = 6.5, 3.4 Hz), 129.7, 122.7 (dd, *J* = 6.6, 3.1 Hz), 118.0 (d, *J* = 17.4 Hz), 114.8 (d, *J* = 18.5 Hz), 110.2, 39.9, 30.9, 19.9, 14.0.

**IČ** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3359 ν(N-H) sek. amin; 3260; 2961, 2932, 2875 ν(C-H) alkyl; 1675 ν(C=O) amid; 1604; 1525; 1501; 1271; 1118; 992; 770; 739; 631.

**MS** (ESI+) *m/z*: 390,16 [M+H]<sup>+</sup>; 412,06 [M+Na]<sup>+</sup>, 800,81 [2M+Na]<sup>+</sup>

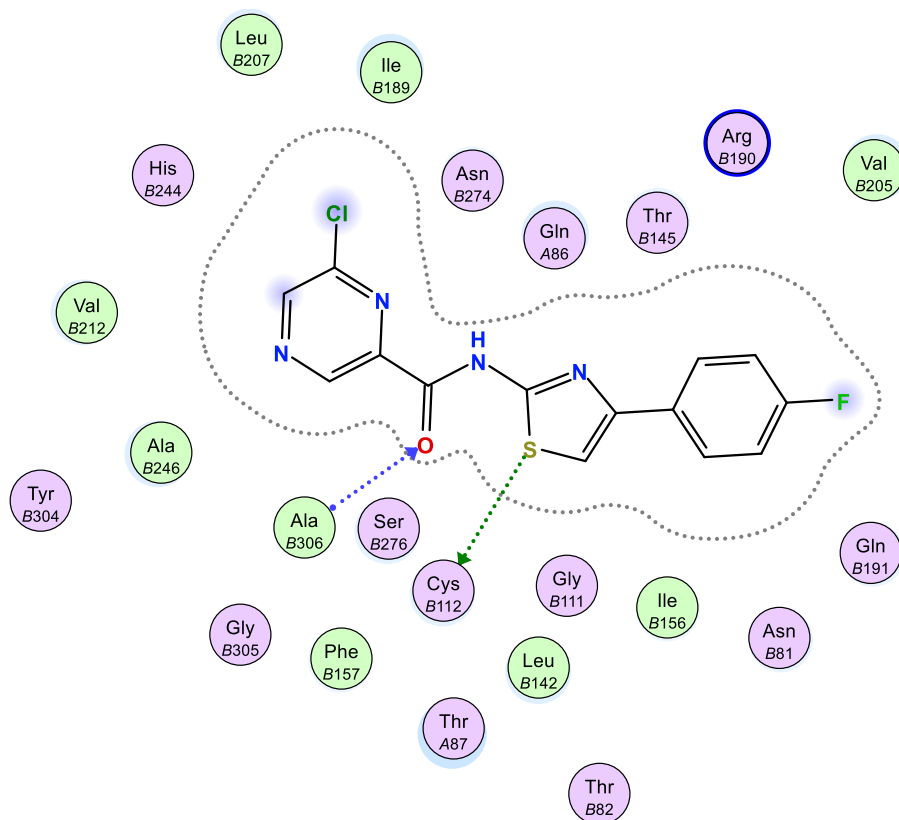
Exact mass: 389,11



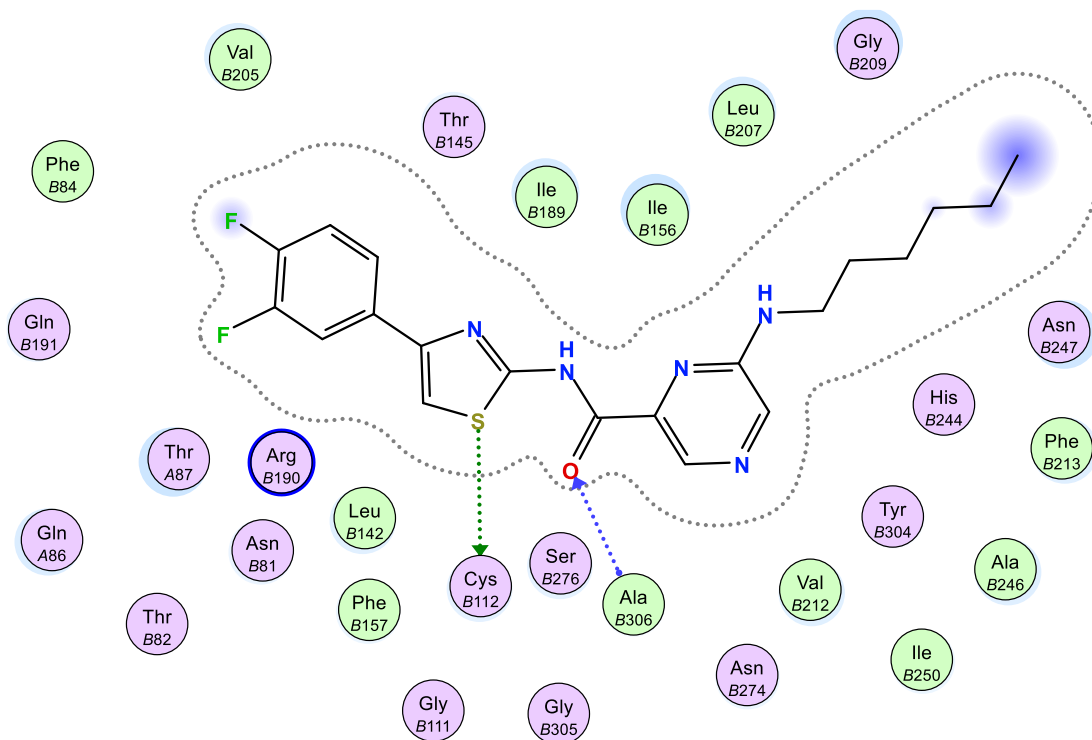
## 5. Výsledky

### 5.1 *In silico* dokování

Po proběhnutém dokování se vytvořila tabulka, kde bylo pro každou ze čtrnácti sloučenin pět nejlepších póz a tyto pózy byly ohodnoceny číselnou hodnotou SCORE. Dohromady tedy existovalo 70 výsledků. Vzhledem k tomu, že je to velké množství číselných výsledků, byla tabulka zúžena pouze na nejlepší SKORE hodnotu pro každou sloučeninu. Zbylé výsledky sloužily k porovnání rozdílů mezi jednotlivými SCORE hodnotami a k nim přiřazených obrázkových 3D póz. Pro každou sloučeninu existovaly dva vazebné režimy, kdy první režim měl situovanou alkylaminopyrazinovou část molekuly vlevo a druhý režim měl tuto část molekuly na pravé straně (Obr. 24, 25, 26, 27).



**Obrázek 24:** Znárodnění interakcí výchozí látky 1 s proteinem po nadokování v programu MOE, 2D interakční diagram. Vazebný režim 1, kdy je pyrazinamid vlevo.



**Obrázek 25:** Znárodnění interakcí sloučeniny z databáze pro dokování, na interakčním diagramu můžeme vidět, že má stejné interakce s proteinem jako VL 1, vazebný režim 1.

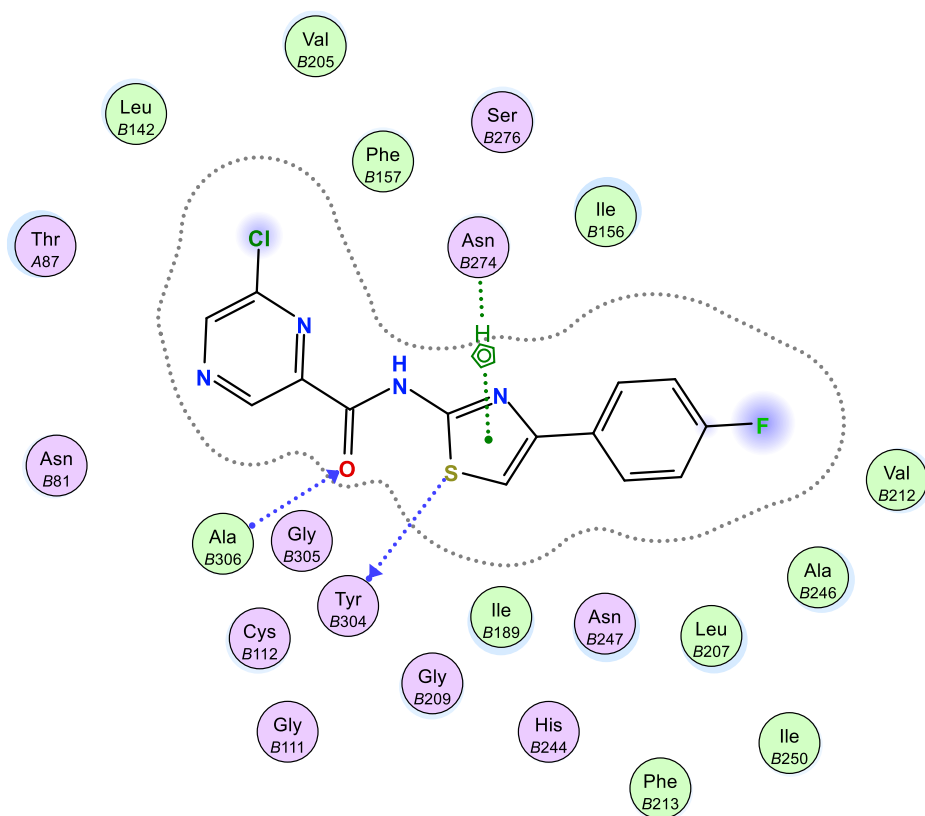
Na tomto interakčním diagramu (Obr. 24, 25) je vidět, že VL 1 a sloučenina z databáze interagují s proteinem v blízkosti katalytické triády a jsou zde přítomny stabilizační vazby. Vazba mezi karboxamidovým kyslíkem a Ala306, kde kyslík je akceptor H-vazby od Ala306, a dále vazba mezi sírou z aminothiazolového kruhu a postranním řetězcem Cys112.

Druhý vazebný režim se liší od prvního minimálně. Rozdíl ve SCORE hodnotách je nepatrný (Tab. 7), ve 2D interakčním diagramu je druhý vazebný režim obohacen o jednu stabilizační vazbu mezi vodíkem postranního řetězce Asn274 a cyklem aminothiazolu v molekule výchozí látky (tzv. aren-H interakce). Síra aminothiazolového kruhu zde interaguje s aminokyselinou Tyr304 (Obr. 26, 27).

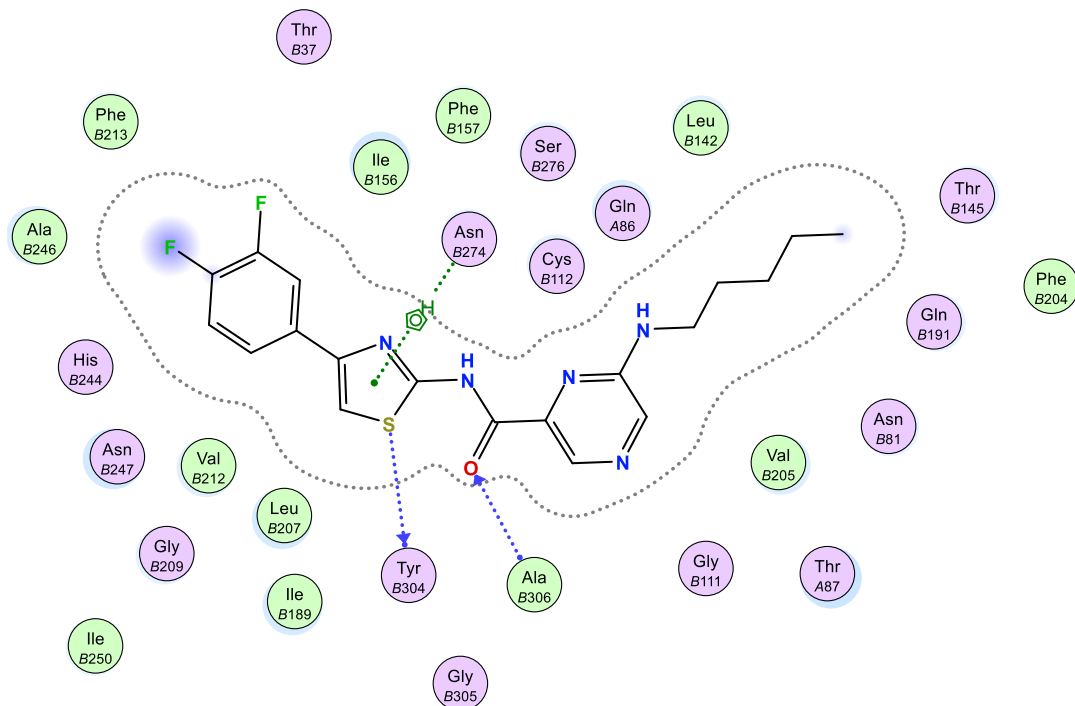
**Tabulka 7:** Rozdíl SCORE hodnot mezi jednotlivými vazebnými režimy vztažený na výchozí látku

	Vazebný režim 1	-6,748
	Vazebný režim 2	-6,506



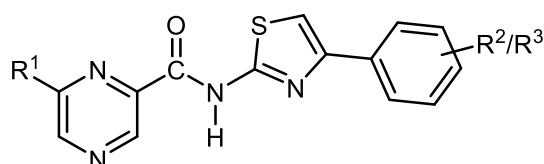


**Obrázek 26:** Známostření interakcí výchozí látky 1 s proteinem po nadokování v programu MOE, 2D interakční diagram. Vazebný režim 2, i v tomto režimu lze vidět interakci kyslíku transamidové vazby s Ala306, interakci síry aminothiazolového kruhu na rozdíl od 1 režimu zde s Tyr304 a navíc je zde i H-aren interakce.



**Obrázek 27:** Interakce vazebného režimu 2 sloučeniny z databáze pro dokování.

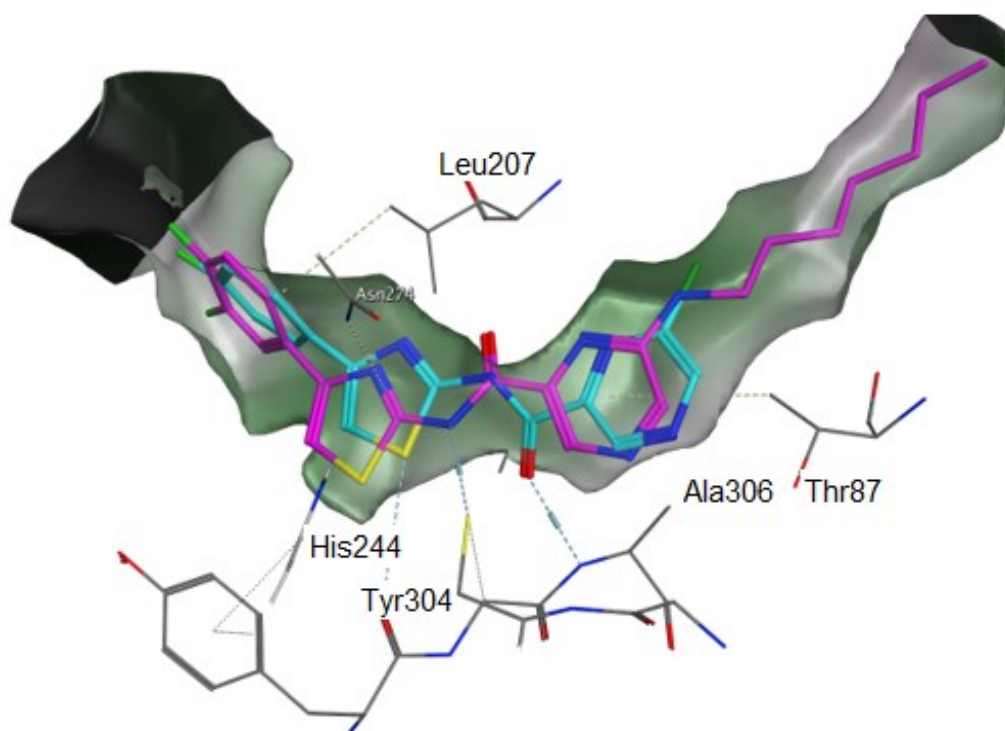
Celkem bylo podrobena *in silico* dokování 14 sloučenin. Tato databáze se skládala ze sedmi sloučenin obsahující pouze jeden atom fluoru na fenylovém kruhu a sedmi sloučenin, které obsahovaly dva atomy fluoru na fenylovém kruhu. Dále se sloučeniny lišily už jen délkou alkylaminového řetězce v poloze šest pyrazinového kruhu, dvě sloučeniny měly v poloze šest aminoskupinu a dvě měly v této poloze chlor, jakožto výchozí látky. Vyhodnoceny a seřazeny v tabulce (Tab. 8) jsou dle jejich nejlepších SCORE hodnot. SCORE hodnota je výsledkem hodnotící funkce dokování, má za úkol ohodnotit afinitu molekul a jejich vazebnou energii. Čím nižší je hodnota SCORE pro danou pózu, tím větší je afinita těchto molekul k aktivnímu místu receptoru FabH.



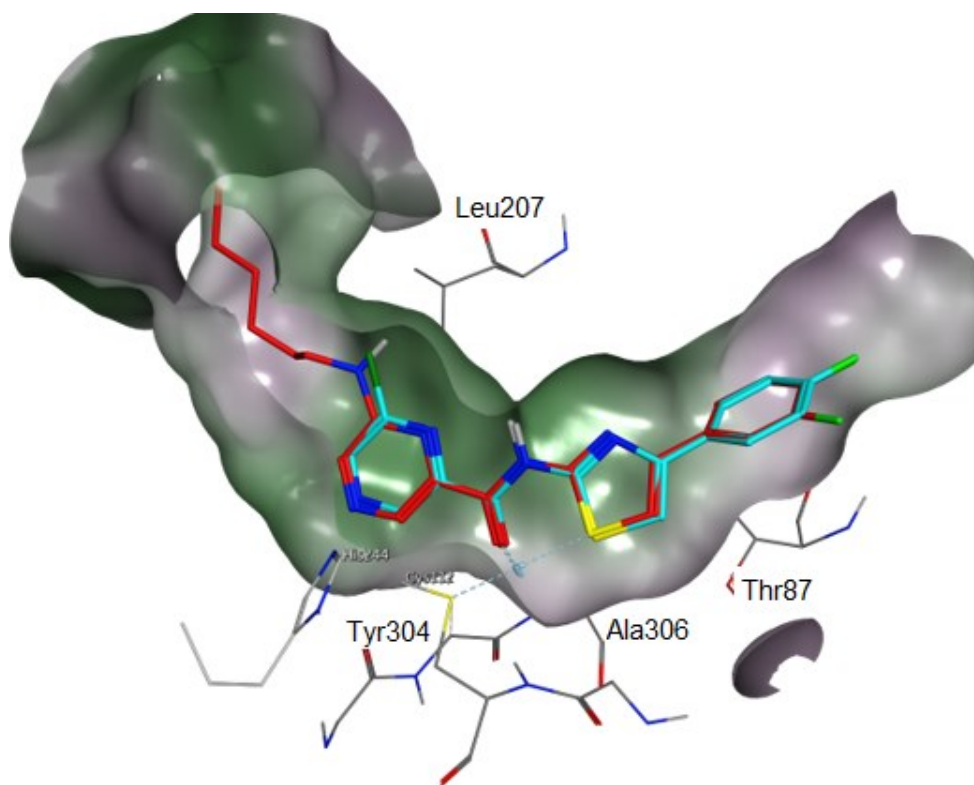
**Obrázek 28:** Obecná struktura pro představu substituentů k tabulce 8

**Tabulka 8:** Výsledky dokování (Obr. 28)

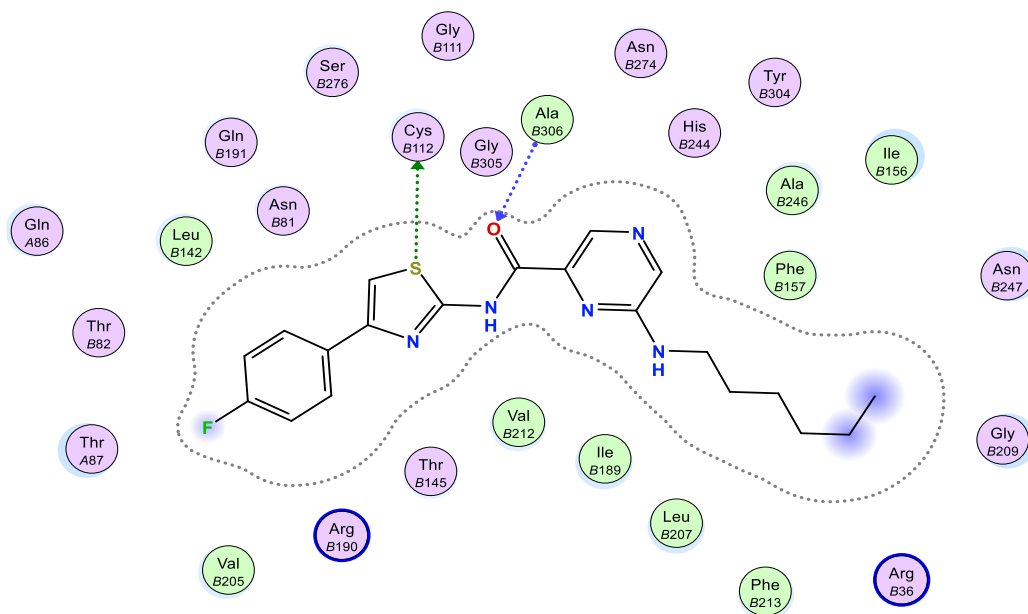
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> /R <sub>3</sub>	Kód	SCORE	Vazebný režim
heptylamino	3'-F, 4'-F	-	-9,081	2
Hexylamino	3'-F, 4'-F	-	-8,755	1
heptylamino	4'-F	JZ-MC-4	-8,690	2
pentylamino	3'-F, 4'-F	-	-8,179	2
Hexylamino	4'-F	JZ-MC-1	-8,134	1
Butylamino	3'-F, 4'-F	JZ-MC-9	-8,121	2
pentylamino	4'-F	JZ-MC-5	-7,730	2
propylamino	3'-F, 4'-F	-	-7,442	2
Butylamino	4'-F	JZ-MC-2	-7,177	1
propylamino	4'-F	JZ-MC-3	-7,012	1
Cl	3'-F, 4'-F	JZ-MC-7 (VL 2)	-6,905	1
Cl	4'-F	VL 1	-6,748	1
NH <sub>2</sub>	3'-F, 4'-F	-	-6,359	1
NH <sub>2</sub>	4'-F		-6,330	1



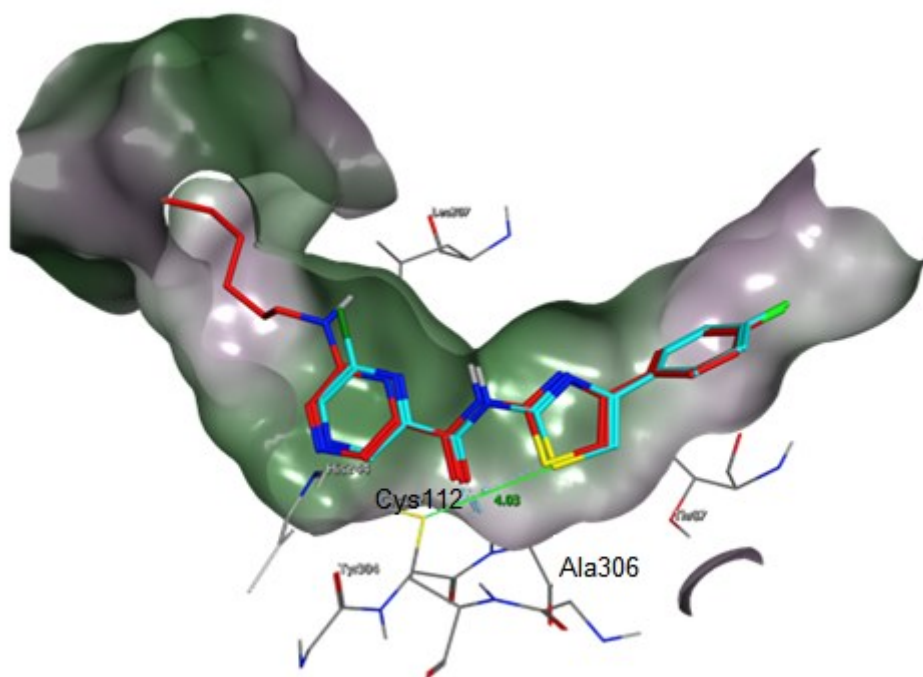
**Obrázek 29:** Znáornění interakcí molekuly s nejlepší SCORE hodnotou a enzymem ve vazebném režimu 2 (modrý skelet patří výchozí látce 1, fialový náleží látce s nejnižší SCORE hodnotou z tabulky 8)



**Obrázek 30:** Znáornění interakcí molekuly s druhou nejlepší SCORE hodnotou a enzymem ve vazebném režimu 1 (modrý skelet patří výchozí látce 1, červený náleží jejímu derivátu s druhou nejlepší SCORE hodnotou).



**Obrázek 31:** Interakční diagram sloučeniny posléze syntetizované JZ-MC-1 se SCORE hodnotou -8,134, vazebný režim 1. I zde jsou naznačené interakce mezi katalytickou triádou a strukturou sloučeniny totožné jako u výchozí látky 1 ve vazebném režimu 1.



**Obrázek 32:** 3D interakce sloučeniny JZ-MC-1

Alkylaminoderiváty tedy zauímají stejně jako VL 1 dva vazebné režimy a navíc mají stejné nebo velmi podobné interakce s proteinem. Dále molekulový doking dokázal, že i sloučeniny s dlouhým alkylaminovým řetězcem mají v aktivním místě dostatek prostoru (Obr. 29, 30, 32) a mohou se na enzym teoreticky navázat. Molekulární doking těmito sloučeninám předpovídá interakce

v místě katalytické triády (Obr. 31, 32) mykobakteriálního enzymu FabH. Až na aminoderiváty výchozí látky mají všechny sloučeniny lepší hodnotu SCORE než výchozí látka, měly by tedy dle předpovědí MOE mít větší afinitu k tomuto enzymu (Obr. 29, 30, 32) než výchozí látka a potenciálně i vyšší antimykobakteriální aktivitu. Tento pokus potvrdil, že v enzymu je pro nově syntetizované látky této série dostatek místa a že teoreticky k interakci dojít může.

## 5.2 Antimykobakteriální aktivita

Všechny nasyntetizované látky byly zkoušeny *in vitro* na kmenech mykobakterií získaných z České národní sbírky typových kultur v Praze (CNCTC). Mezi tyto kmeny patří *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 a (ATCC 12478), *Mycobacterium avium* ssp. *avium* Chester CNCTC My 80/72 (ATCC 15769). *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) byly získány z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo). Testování aktivity vůči *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium* probíhalo ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, kmeny *M. smegmatis* a *M. aurum* byly testovány Mgr. Ondřejem Jandourkem na Katedře biologických a lékařských věd.

Jako kultivační médium byl využit bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Německo) obohacený 0,4% (v/v) glycerolem (Sigma Aldrich) a 10% (v/v) růstovým doplňkem OADC (kyselina olejová, albumin, dextróza, katalasa, Himedia, Indie) o deklarovaném pH 6,6. Zkoušené látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním tak, aby finální koncentrace testovaných látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 µg/mL. Testované mykobakterie byly suspendovány v isotonickém roztoku chloridu sodného s upravenou hustotou. Po smíchání roztoku zkoušených látek a suspenze mykobakterií v mikrotitračních jamkách se tato směs inkubovala ve tmě v humidních podmínkách 37°C po dobu pěti dní. Jako negativní kontrola, kontrola růstu mykobakterií, byl použit DMSO s bujónem. Jako pozitivní kontrola, inhibice růstu, byl použit isoniazid. Po pěti dnech se přidala látka Alamar Blue (1:1 směs 0,01% resazurinu sodné soli (vodný roztok) a 10% Tween 80) a po 24 hodinách se odečetly výsledky. Výsledky byly odečteny pouhým okem jako MIC (Tab. 9). Minimální inhibiční koncentrace (MIC µg/mL) představuje nejnižší koncentraci látky, která zabrání změně barvy z modré na růžovou. Tento postup platí pro *M. avium*, *M. tuberculosis* a *M. kansasii*.

*M. smegmatis* a *M. aurum* byly testovány analogicky. Ve stejném živném médiu a za stejných inkubačních podmínek. Zkoušené látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním tak, aby finální koncentrace

testovaných látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,625 – 7,81 a 3,91 µg/mL. Jako standard byl použit rifampicin a ciprofloxacin. Po 48 hodinách kultivace se přidal Alamar Blue. Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC µg/mL, Tab. 9) představující nejnižší koncentraci látky, která zabránila změně barvy z modré na růžovou.

**Tabulka 9:** Výsledky testování antimykobakteriální aktivity zkoušených látek. Sloučeniny jsou seřazeny dle prodlužujícího se alkylamino substituentu, JZ-MC-7 je VL 2 a JZ-MC-9 od ní odvozen difluorovaný alkylaminoderivát.

Kód	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
VL 1	0,78 [58]	0,78 [58]	0,78 [58]	>250 [58]	-
JZ-MC-3	>100	>100	>100	≥ 500	≥ 500
JZ-MC-2	>100	>100	>100	250	≥ 500
JZ-MC-5	>100	>100	>100	>500	≥ 500
JZ-MC-1	>100	>100	>100	125	≥ 500
JZ-MC-4	100	100	>100	125	250
JZ-MC-7	>50	>50	>50	≥ 125	≥ 125
JZ-MC-9	>100	>100	>100	>500	≥ 500
INH	0,2-0,39	6,25-12,5	12,5	7,81-15,625	1,95-3,91
RFM	-	-	-	6,25-12,5	0,78-156
CPX	-	-	-	0,0625-0,125	0,00781

Z tabulky (Tab. 9) je zřejmé, že žádná z nově připravených látek neprojevila lepší antimykobakteriální aktivitu oproti MT, než výchozí látka 1. Některé sloučeniny ale naopak vykazují lepší aktivitu proti *M. smegmatis*, než VL 1, a to hlavně sloučeniny s dlouhým alkylaminovým řetězcem (JZ-MC-1, JZ-MC-4 a potažmo i JZ-MC-7). Nejnižší MIC= 100 µg/mL proti MT vykazuje sloučenina pod kódem JZ-MC-4, její aktivita je ovšem vzhledem k VL 1 nevýznamná.

## 6. Diskuse

V rámci této diplomové práce bylo připraveno sedm nových sloučenin. Jejich příprava proběhla nukleofilní substitucí chloru v poloze šest sloučeniny 6-chlor-*N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamidu (VL 1) nebo 6-chlor-*N*-[4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-yl]pyrazin-2-karboxamid (VL 2) komerčně dostupnými alkylaminy. Výchozí látky vykazovaly před použitím pro syntézu dostatečnou čistotu na TLC desce.

Podmínky reakce se vzhledem k nízkým výtěžkům u jednotlivých reakcí lišily (Tab. 6). U sloučeniny JZ-MC-10 a JZ-MC-3 byl pokus o přípravu v mikrovlnném reaktoru, u ostatních byla využita jako zdroj tepla olejová lázeň. Během reakcí v mikrovlnném reaktoru docházelo k rozštěpení amidové vazby a rozpadu výchozí látky na fragmenty, což znamená, že se tyto podmínky bohužel neosvědčily.

Výtěžky při přípravě alkylaminoderivátů VL byly v rozmezí 17,41–51,75 %, průměrně 31,12 %. Výtěžek z přípravy VL 2 je 47,06%. Nízké výtěžky byly způsobeny nízkou výtěžností reakcí a navíc docházelo ke ztrátám i během čistících procesů. Po konečném odpařování rozpouštědla zůstaly látky s dlouhým alkylovým řetězcem v kapalném skupenství. Tyto kapaliny se po několika hodinách za laboratorní teploty spontánně přeměnily na skupenství pevné. Všechny získané sloučeniny jsou pevné jemně krystalické látky mající odstín žluté barvy a jsou bez zápachu.

Po dokončení syntéz a čistících procesů byly sloučeniny charakterizovány  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektry a IČ spektry s pomocí Katedry organické a bioorganické chemie, což potvrdilo strukturu a čistotu látek. Měření teploty tání proběhlo na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Všechny naměřené intervaly teplot tání jsou v rozmezí 5°C.

Elementární analýza u této série sloučenin nebyla neprováděna, protože přístroj pro její měření je citlivý na fluor, který se vyskytuje ve všech strukturách nově připravených látek. Všechny sloučeniny byly dále charakterizovány MS spektry. Pomocí chemického softwaru *ChemDraw* byly vypočítány hodnoty molekulové hmotnosti, sumární vzorce,  $\log P$  a  $\text{Clog}P$ . Poslední dvě jmenované hodnoty jsou důležité pro charakteristiku lipofility daných sloučenin. Lipofilita



přímo souvisí se schopností sloučenin penetrovat přes lipofilní buněčnou stěnu MT, která je jeho typickou charakteristikou. Hodnoty  $\log P$  se pohybovaly v rozmezí 2,48–5,27 (nárůst v homologické řadě o 0,41–0,42). Hodnota 5,27 pro JZ-MC-4 neodpovídá Lipinskému pravidlu pěti. Hodnota  $\log P$  roste úměrně s délkou alkyloaminového řetězce, sloučenina JZ-MC-4 je heptylaminoderivát výchozí látky 1, byl by tedy potenciálně nevhodný pro perorální aplikaci. Hodnota  $\text{Clog}P$  se pohybovala v rozmezí 2,32–6,32. Nejvyšší hodnoty  $\log P$  i  $\text{Clog}P$  patří vzorku JZ-MC-4, je tedy nejlipofilnější. Nejnižší hodnoty přísluší vzorku JZ-MC-3, je tedy nejhydrofilnější (Tab. 10).

Pokud se zaměříme na teploty tání vzhledem ke struktuře, lze si všimnout, že čím delší je alkylaminový řetězec, tím je nižší teplota tání. Toto pravidlo ovšem ruší sloučenina JZ-MC-3 (Graf 1). Dále je patrné, že druhý atom fluoru ve struktuře syntetizovaných sloučenin navyšuje teplotu tání. Rozdíl ve vzorku JZ-MC-2 a JZ-MC-9 je jen jeden atom fluoru, který rapidně zvýšil teplotu tání (Tab. 10). Další charakteristikou této série sloučenin je lepší rozpustnost v DMSO oproti výchozí látce 1.

**Tabulka 10:** Shrnutí diskutovaných hodnot, sloučeniny jsou seřazeny dle vzestupné teploty tání, doplněny grafickým znázorněním

Vzorek	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> /R <sub>3</sub>	Teplota tání	Log <i>P</i>	Clog <i>P</i>
JZ-MC-4	heptylamino	4'-F	115,0-116,1	5,27	6,32
JZ-MC-1	hexylamino	4'-F	116,0-121,0	4,85	5,79
JZ-MC-3	propylamino	4'-F	150,8-153,1	3,60	4,20
JZ-MC-5	pentylamino	4'-F	154,5-154,6	4,44	5,26
JZ-MC-2	Butylamino	4'-F	166,1-166,2	4,02	4,73
JZ-MC-9	Butylamino	3'-F, 4'-F	203,7-204,8	4,18	4,80
JZ-MC-7	Cl	3'-F, 4'-F	245,4-246,7	3,62	3,11



**Graf 1:** Graf k tabulce 10.

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout *in silico* dokování do enzymu FabH, který je navrženým cílem v buňce mykobakterie, na základě strukturní podobnosti s již známými inhibitory tohoto enzymu. Dále nasyntetizovat sérii sloučenin a provést *in vitro* testování na buňkách mykobakterií. Nakonec zjistit, jaký vliv na aktivitu proti mykobakteriím má substituce chloru výchozích látek za alkylaminový řetězec, a porovnat tuto aktivitu s výsledky z molekulového modelování.

Při hodnocení molekulového dokování je důležité znát význam hodnoty SCORE, která vyjadřuje afinitu ligandu k enzymu podobně jako vazebná energie. Tudíž čím nižší hodnota SCORE, tím větší afinita ligandu k enzymu. Při pohledu do tabulky (Tab. 11) vidíme, že hodnota SCORE klesá s velikostí molekuly. Pokud se zaměříme na páry obdobných sloučenin, tedy sloučenin, které se liší pouze fluorem v poloze tři fenylového kruhu, ale mají stejně dlouhý alkylaminový řetězec, má vždy nižší hodnotu SCORE difluorovaný derivát. Až na obě sloučeniny s volnou aminoskupinou v poloze šest mají všechny ostatní sloučeniny lepší hodnotu SCORE, než VL 1. Dalo by se tedy říci, že by měly mít lepší afinitu k enzymu FabH a potenciálně i lepší antimykobakteriální aktivitu než výchozí látka 1. Ze sloučenin následně syntetizovaných přísluší nejnižší hodnota SCORE sloučenině JZ-MC-4, která ale porušuje svým  $\log P$  (5,27) Lipinského pravidlo pěti a byla by tudíž nevhodná pro perorální podání, jak bylo řečeno výše.

**Tabulka 11:** Výsledky molekulového modelování porovnané s molekulovou hmotností

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> /R <sub>3</sub>	Kód	SCORE	Mol. hmotnost
heptylamino	3'-F, 4'-F	-	-9,081	431,16
hexylamino	3'-F, 4'-F	-	-8,755	417,48
heptylamino	4'-F	JZ-MC-4	-8,690	413,52
pentylamino	3'-F, 4'-F	-	-8,179	403,45
hexylamino	4'-F	JZ-MC-1	-8,134	399,49
butylamino	3'-F, 4'-F	JZ-MC-9	-8,121	389,42
pentylamino	4'-F	JZ-MC-5	-7,730	385,46
propylamino	3'-F, 4'-F	-	-7,442	375,40
butylamino	4'-F	JZ-MC-2	-7,177	371,43
propylamino	4'-F	JZ-MC-3	-7,012	357,41
Cl	3'-F, 4'-F	JZ-MC-7	-6,905	352,74
Cl	4'-F	VL	-6,748	334,75
NH <sub>2</sub>	3'-F, 4'-F	-	-6,359	333,32
NH <sub>2</sub>	4'-F		-6,330	315,33

Po přípravě série sloučenin JZ-MC a jejich purifikaci přes flash chromatografii byly poslány všechny vzorky na testování aktivity na buňkách MT a dalších mykobakterií. Bohužel žádná z připravených molekul neprokázala vyšší aktivitu oproti MT, tedy nižší MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), než výchozí látka 1. Nejnižší hodnota MIC= 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  patří sloučenině JZ-MC-4 (sloučenina s nejlepší SCORE hodnotou), tato hodnota je však prakticky 100× horší než u VL 1. Při testování aktivity vůči *M. smegmatis* (nepatogenní mykobakterium) prokazovaly sloučeniny velký rozptyl aktivit od MIC>500 do 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nejnižší hodnota MIC= 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tab. 9) patří sloučeninám s nejdelším alkylaminovým substituentem JZ-MC-4 a JZ-MC-1. Substituce chloru v poloze šest VL 1 a 2 za alkylaminový řetězec má za následek ztrátu antimykobakteriální aktivity těchto sloučenin. Jednotlivé vzorky této série nebyly testovány na cytotoxicitu vůči HepG2.

**Tabulka 12:** Porovnání výsledků antimykobakteriální aktivity vůči MT a výsledků z molekulového modelování.

Kód	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	M. tuberculosis MIC (µg/mL)	SCORE	LE
VL	6-Cl	4'-F	0,78 [58]	-6,748	-0,2890
JZ-MC-7	6-chlor	4',3'-F, F	>50	-6,905	-0,2752
JZ-MC-3	6-propylamino	4'-F	>100	-7,012	-0,2977
JZ-MC-2	6-butylamino	4'-F	>100	-7,177	-0,2973
JZ-MC-5	6-pentylamino	4'-F	>100	-7,730	-0,3008
JZ-MC-9	6-butylamino	4',3'-F, F	>100	-8,121	-0,2658
JZ-MC-1	6-hexylamino	4'-F	>100	-8,134	-0,3104
JZ-MC-4	6-heptylamino	4'-F	100	-8,690	-0,3019

Pro doplnění (Tab. 12) je uveden parametr LIGAND EFFICIENCY (LE), který lze vypočítat jako: SCORE/ počet těžkých atomů ve sloučenině (všechny kromě vodíků), který nám pomůže vyhodnotit kvalitu ligandu. Fakt, že s rostoucí velikostí sloučeniny roste i hodnota SCORE je díky tomu, že zde existuje větší pravděpodobnost nescifických interakcí. Hodnotu LE lze tedy zjednodušeně chápat jako afinitu (vazebnou energii) vztaženou na jeden těžký atom. Opět platí vztah, čím nižší LE, tím větší afinita k enzymu. Nejlepší LE patří vzorku JZ-MC-1, kdežto nejlepší SCORE hodnota přísluší vzorku JZ-MC-4.

Jelikož vyhlídky díky pozitivním výsledkům molekulového modelování byly velmi optimistické, ale reálné hodnoty aktivit (MIC µg/mL) neodpovídají hodnotám SCORE, je nutné se zamyslet proč tomu tak je. Molekulové modelování, neboli doking, je počítačová simulace, která má předpovědět pouze teoretickou interakci ligandu a enzymu. Hodnota SCORE a 3D póza je tedy pouhá predikce a nelze ji brát jako jistotu. Na druhou stranu, ale ani nelze říci, že sloučeniny s enzymem FabH ve skutečnosti neinteragují, protože testování aktivity probíhalo na celých buňkách MT. Je teoreticky možné, že se změnila díky substituci v poloze šest farmakokinetika a obměněné molekuly se nedostaly pasivním transportem, nebo jiným transportem, přes BS mykobakterie. Na druhou stranu je možné, že jsou látky extensivně metabolizovány nebo vylučovány z buněk efluxním systémem. Další možnou teorií je, že provedená substituce v poloze šest zvrátila antimykobakteriální účinek těchto sloučenin a nemají žádný cíl v mykobakteriální buňce. Cílový enzym FabH byl navržen pouze podle strukturní podobnosti již známých inhibitorů tohoto enzymu [58], ale je možné, že se

nejedná ani o cílový enzym VL 1. Ostatní sloučeniny z původní databáze pro dokování nebyly syntetizovány z důvodu nedostatku času.

## 7. Závěr

V teoretické části je probrána problematika tuberkulózy formou rešerše. Tento text je zaměřen na všeobecný popis nemoci, její epidemiologii a etiologii, způsob diagnózy, léčby a v neposlední řadě jsou probrána jednotlivá antituberkulotika, problematika rezistentních forem MT a očkování. Je zde velmi krátce zmíněn design nově syntetizovaných sloučenin

Praktická část je zaměřena v první řadě na molekulové dokování. Najdeme zde popis přípravy proteinu i ligandu před spuštěním funkce *Dock*. Další část experimentální části je věnována přípravě sloučenin série JZ-MC. Celkem bylo připraveno sedm novým sloučenin dříve nepopsaných v literatuře. Podstatou reakcí byla nukleofilní substituce chloru v poloze šest výchozí látky 6-chlor-*N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamidu nebo 6-chlor-*N*-(4-(3,4-difluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamidu za alkylaminový řetězec s délkou alkylového řetězce v rozpětí 3-7 uhlíků.

Připravené sloučeniny byly charakterizovány teplotou tání,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektry, IČ spektry a teplotou tání. Elementární analýza nebyla provedena kvůli citlivosti přístroje na fluor, který poškozují katalytické trubice přístroje. Sloučeniny byly charakterizovány MS spektry. Pomocí programu *ChemDraw* byly vypočítány hodnoty molekulové hmotnosti,  $\log P$  a  $\text{Clog}P$ .

Cílem této práce byl provést návrh *in silico* dokování a výsledky této operace následně porovnat s reálnými hodnotami MIC příslušných sloučenin. Pro molekulové modelování byla vytvořena databáze 14 sloučenin, kterým byla přidělena hodnota SCORE skórovací funkcí programu MOE. Nasyntetizované sloučeniny byly poslány na testování biologické aktivity vůči mykobakteriím do Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde jim byla přidělena hodnota MIC. Hodnoty SCORE předpověděly sloučeninám vysokou afinitu k receptoru FabH, která se ovšem nepotvrdila. Bohužel obměna VL 1 a 2 v poloze 6 se neosvědčila a vedla k vymizení antimykobakteriální aktivity, což je v rozporu s dosud známými informacemi o alkylaminoderivátech pyrazinamidu [60,61,66].

## 8. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Pracoviště: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Diplomant: **Martina Čečetková**

Vedoucí práce: **PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.**

Název diplomové práce: **Deriváty pyrazinamidu jako potenciální antimikrobní látky**

Dokonce i ve 21. století představuje tuberkulóza stále vážné globální ohrožení. Patří mezi jednu z deseti nejčastějších příčin úmrtí. Nejvíce zatěžuje rozvojové země, ale celosvětově je touto nemocí nakažena až 1/3 obyvatelstva. Díky neefektivní terapii tuberkulózy v rozvojových zemích narůstá prevalence tuberkulózy, která již nereaguje na zavedenou léčbu. Je potřeba vyvíjet nová léčiva, která budou účinná proti multirezistentní tuberkulóze a tak zabrání dalšímu šíření nemoci.

Předlohou pro sérii sloučenin připravených v rámci této diplomové práce je 6-chlor-*N*-(4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid, jehož struktura vychází z antituberkulotika 1. linie pyrazinamidu a fragmentu 4-arylthiazol-2-aminu, u kterého byla dříve popsána antimykobakteriální aktivita. Předlohová sloučenina vykazuje vysokou účinnost proti *M. tuberculosis* popsanou MIC = 0,78 µg/mL a nízkou cytotoxicitu. Cílem této práce bylo zjistit vliv substituce chloru v poloze 6 pyrazinového kruhu za alkylaminový zbytek. Jako potenciální cíl těchto sloučenin byl navržen mykobakteriální enzym  $\beta$ -ketoacyl-ACP-synthasa III na základě strukturní podobnosti se známými inhibitory tohoto enzymu a taktéž dle výsledků molekulového dokingu.

Experimentální část této práce je zaměřena na doking daných molekul do příslušného enzymu (pdb: 1U6S) a na následnou syntézu těchto sloučenin. Sloučeniny byly připraveny jedнокrokovou nukleofilní substitucí. Jednotlivé sloučeniny této série byly popsány teplotou tání,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR a IČ spektry. Dále byly testovány na antituberkulotickou aktivitu. Obecně obměna předlohové sloučeniny vedla k vymizení antituberkulotické aktivity připravených sloučenin, i přes velice slibné výsledky molekulárního dokingu.

## 9. Abstract

Charles University, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical analysis

Candidate: **Martina Čečetková**

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

Title of Diploma Thesis: **Pyrazinamide derivatives as potential antimicrobial compounds**

Even in 21<sup>st</sup> century, tuberculosis still remains a serious and global health threat. Tuberculosis is one of the 10 most common causes of death, the most burdened are developing countries, but this disease infects up to 1/3 of population worldwide. Due to ineffective treatment of tuberculosis in developing countries, the prevalence of tuberculosis which does not respond to standard treatment is increasing. It is necessary to develop new drugs effective against multidrug-resistant tuberculosis and prevent further spread of the disease.

The design of final structures is based on previously synthesized molecule 6-chloro-*N*-(4-(4-fluorophenyl)thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamide, which structure comes from first line antitubercular pyrazinamide (PZA) and 4-arylthiazol-2-amine scaffold with formerly identified antimycobacterial activity. This starting compound exhibits high activity against *M. tuberculosis* described by MIC = 0,78 µg/mL and low cytotoxicity. The object of study was to determine effect of substitution of chlorine at position 6 of pyrazine ring by different alkylamine chains. We suggest mycobacterial β-ketoacyl-ACP-synthase III as a potential target, in response to results of molecular docking study and structural similarity to known inhibitors of this enzyme.

The experimental part of this study is focused on molecular docking of the molecules into specific enzyme (pdb: 1U6S) and their subsequent synthesis. The compounds were prepared by single-step nucleophilic substitution. Individual compounds were described by melting point, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C spectra and IR spectra. The compounds were *in vitro* tested for their antitubercular activity. Generally, the substitution of chlorine by alkylamino chains decreased the antimycobacterial activity, despite promising results of molecular docking.



## 10. Seznam použité literatury

- [1] World health organization, *Tuberculosis Key facts*. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> citováno: 10. 1. 2018.
- [2] Potrepčiaková, S., Skříčková, J., *Tuberkulóza*, Practicus, **2008**, 7, 25–29.
- [3] *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901–1921*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York 1967. ISBN: 978-981-02-3409-6
- [4] Homolka, J. *Tuberkulóza*. 5. vydání, Karolinum, Praha 2016. ISBN: 978–80–246–3476–0
- [5] Bureš, J., Horáček, J., et al. *Vnitřní lékařství 1. díl*. 2. vydání, Galén, Praha 2014. ISBN: 978-80-7492-145-2
- [6] Crevel, J., Oosting, M., et al. Innate Immune Recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Dev. Immunol.*, **2011**, 5, 1–12.
- [7] Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2003**, 16, 463–496.
- [8] Pacovský, V., *Vnitřní lékařství, učebnice pro lékařské fakulty*, 1. vydání, Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha 1986.
- [9] Bednář M., Fraňková V., et al. *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie a parazitologie*, 1. vydání, Marvil, Praha 1996. ISBN: 978-80-2380-297-9
- [10] Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, *Ministerstvo vnitra*, Sbírka zákonů 30. 6. **2013**, částka 89, 2090–2012, ISSN 1211–1244.
- [11] Registr tuberkulózy (RTBC). *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy> citováno 11. 1. 2018.

- [12] ÚZIS ČR, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy na území České republiky v roce 2016, *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*, Praha **2017**, 1–13.
- [13] ÚZIS ČR, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy na území České republiky v roce 2015, *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR*, Praha **2017**, 1–11.
- [14] ÚZIS ČR. *Tuberkulóza a respirační nemoci 2014*, 1. vydání, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha 2015, 1–83. ISBN 978–80–7472–144–1
- [15] World Health Organisation, *Global tuberculosis report 2017*, 1. vydání, WHO, Geneva 2017. ISBN 978–92–4–156551–6
- [16] World health organisation, Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015, WHO, Geneva **2013**.
- [17] Svobodová, J., Případy tuberkulózy v ČR v letech 2009–2012 vyvolané neobvyklými druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. *Zprávy Centra Epidemiologie A Mikrobiologie, Státní zdravotní ústav*, **2013**, 22, 12–14.
- [18] Ptáková, M., Současné diagnostické laboratorní možnosti diagnózy tuberkulózy a mykobakterióz, *Med. praxi*, Olomouc **2011**, 8, 466–468.
- [19] Bártů, V., Tuberkulóza-infekční onemocnění ve 21. století, *Med. praxi*, Olomouc **2008**, 5, 245–248.
- [20] Křepela, K., Diagnostika a léčba tuberkulózy dětí a mladistvých v ČR, *Pediatric pro praxi*, Olomouc **2007**, 8, 208–210.
- [21] Qiagen, QuantiFERON-TB Gold, Quiagen 2016. Dostupné z: <http://www.quantiferon.com/products/quantiferon-tb-gold/> citováno: 11. 2. 2018.
- [22] Brennan, P.J., Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, **2003**, 83, 91–97.

- [23] Guerin, M.E., Korduláková J., et al. Molecular Basis of Phosphatidyl-myo-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 33577–33583.
- [24] Takayama, K., Wang, C., et al. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol., Rev.* **2005**, 18, 81-101.
- [25] Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., et al. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond, *Chem. Biol.*, **2014**, 21, 67–85.
- [26] Bártů, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy, *Interní med.*, Olomouc **2007**, 9, 372–373.
- [27] World Health Organisation, Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), update 2017. Dostupné z: <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/en/> citováno 28.3.2018.
- [28] Zhang, Y., Mitchison, D., et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance, *Microbiol. Spectr.*, **2014**, 2, 1–12.
- [29] World Health Organization, What is DOTS ? A Guide to Understanding the WHO recommended TB Control Strategy Known as DOTS, Geneva **1999**, 1–39.
- [30] Bastian, I., Rigouts, L., et al. Directly observed treatment, short-course strategy and multidrug-resistant tuberculosis: Are any modifications required? *Bulletin of the World Health Organisation*, **2000**, 78, 238–251.
- [31] Kolek, V., Křepela, K. Chemoprolaxe onemocnění tuberkulózou u dětí, Česká pneumologická a ftizeologická společnost, kapitola 4.3.
- [32] Hartl, J., Doležal, M., et al. *Farmaceutická Chemie IV*. 2. vydání, Karolinum, Praha 2012. ISBN: 978-80-246-2129-6
- [33] Timmins, G. S., Master, S., et al. Requirements for Nitric Oxide Generation from Isoniazid Activation *In Vitro* and Inhibition of Mycobacterial

- Respiration *In Vivo*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, 48, 3006–3009.
- [34] SÚKL, Souhrn informací o přípravku Nidrazid 100 mg, Praha 2017, sp. zn. sukls251334/2016. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/> citováno 25. 3. 2018.
- [35] Zatloukal, P., Kos, S., et al. Tuberkulóza dospělých (Standard léčebného plánu), Česká pneumologická a ftizeologická společnost, Kapitola 4.1.
- [36] Lincová, D., Farghali, H., et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání, Galen, Praha 2007. ISBN: 978-80-7262-373-0
- [37] SÚKL, Souhrn informací o přípravku Benemicin 150 mg/300 mg, Praha 2016, sp. zn.sukls76420/2016. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/> citováno 26. 3. 2018.
- [38] SÚKL, Souhrn údajů o přípravku Sural 400 mg, Praha 2016, sp. zn.sukls252207/2016. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/> citováno 26. 3. 2018.
- [39] Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2009, Doplněk 2012*, Grada Publishing a.s., Praha 2012, 3513–3514. ISBN: 978-80-247-2994-7
- [40] Barlin, G. B. *Chemistry of heterocyclic compounds*. John Wiley and Sons, New York, 1982.
- [41] Zhang, Y., Scorpio, A., et al. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.*, **1999**, 181, 2044–2049.
- [42] Kenneth, C. K. Biology of *trans* – Translation, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2008**, 62, 133–151.
- [43] Shi, W., Zhang, X., et al. Pyrazinamide inhibits *trans*-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of chemotherapy, *Science*, **2011**, 333, 1630–1632.

- [44] Shi, W., Chen, J., et al. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*, *Emerging Microbes Infect.*, **2014**, 3, 1–8.
- [45] Sayahia, H., Zimhony, O., et al. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 4804–4807.
- [46] Kim, H., Shibayama, K., et al. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLoS One*, **2014**, 9, e100062.
- [47] Stehr, M., Elamin, A., et al. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria, *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, **2015**, 13, 593–603.
- [48] SÚKL, Souhr informací o přípravku Pyrazinamid Krka 500 mg, Praha. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/> citováno 26. 3. 2018.
- [49] Caminero, J. A., Sotgiu, G., et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, 10, 621–629.
- [50] Zumla, A., Nahid, P., et al. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, 12, 388–404.
- [51] D'Ambrosio, L., Centis, R., et al. New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Research*, **2015**, 1, 1–15.
- [52] Vyhláška č. 299/2010 Sb. kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů, Ministerstvo vnitra, Sběrka zákonů 1. 11. **2010**, částka 110.
- [53] Vyhláška č. 355/2017 Sb. kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů, Ministerstvo vnitra, Sběrka zákonů 1. 1. **2018**, částka 123.

- [54] Vyhláška č. 65/2009 Sb. kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, Ministerstvo vnitra, Sbírka zákonů 12. 3. **2009**, částka 21.
- [55] Fine, E. M., Carneiro, A. M., et al. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes - A discussion document, WHO, Geneva, **1999**.
- [56] World Health Organisation, Weecly epidemiological report, WHO, Geneva, **2004**, 79, 25–40.
- [57] Mangtani, P., Abubakar, I., et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials, *Clin. Infect. Dis.*, **2014**, 58, 470–480.
- [58] Zitko, J., Jand'ourek, O., et al. Design, synthesis and antimycobacterial activity of hybrid molecules combining pyrazinamide with 4-phenylthiazol-2-amine scaffold, *Med. Chem. Commun.*, **2018**, 9, 685–696.
- [59] Kesicki ,E. A., Bailey, M. A., et al. Synthesis and evaluation of the 2-aminothiazoles as anti-tubercular agents. *PLoS One.*, **2016**, 11, 1–25.
- [60] Servusová, B., Paterová, P., et al. Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 450–453.
- [61] Zitko, J., Servusová, B., et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23, 174–183.
- [62] Li, J. R., Li, D. D., et al. Design and synthesis of thiazole derivatives as potent FabH inhibitors with antibacterial activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 75, 438-447.
- [63] Montedison S.p.a., Process for the preparation of 2-carboxypyrazines-4-ooxide, European patent office, 0201934 (A2), 1986.

- [64] Abe, H., Shigeta, Y., et al. Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. JP Patent 44012898, **1969**, *Chem. Abstr.*, **1969**, 71, 112979y.
- [65] Kidwai, M., Bhatnagar, D., et al. Molecular iodine as a versatile reagent for Hantzsch synthesis of 2-aminothiazole derivatives. *J. Sulfur Chem.*, **2009**, 30, 29–36.
- [66] Zitko, J., Paterová, P., et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinamide derivatives with benzylamino substitution. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 476–479.