

POKROKY VE VÝVOJI ANTITUBERKULOTIK PŮSOBÍCÍCH NA MULTILÉKOVĚ REZISTENTNÍ KMENY

MARTIN KRÁTKÝ a JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové
jarmila.vinsova@faf.cuni.cz

Došlo 24.6.09, přepracováno 15.3.10, přijato 1.4.10.

Klíčová slova: tuberkulóza, antituberkulotika, nové směry ve vývoji léčiv, cílení

Obsah

1. Úvod
2. Výzkum nových léčiv působících vůči MDR-TB kmenům
 - 2.1. Modifikace struktur používaných léčiv
 - 2.2. Sloučeniny v preklinickém a klinickém stádiu vývoje, tzv. „leads“
 - 2.3. Výzkum v oblasti nových cílových struktur pro aktivní molekuly
 - 2.3.1. Biosyntéza buněčné stěny
 - 2.3.2. Isocitrát lyasové cílení
 - 2.3.3. Cílení na FtsZ protein
 - 2.3.4. Další možné cíle zásahu mykobakterií
3. Závěr

1. Úvod

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění vyvolané kmeny komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, které se šíří kapěnkovou nákazou. V poslední době se dramaticky rozšířila epidemiologicky velmi závažná multilékově rezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TB), odolná vůči dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům první linie isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF)¹. Od roku 2006 je nově užíván termín extenzivně rezistentní tuberkulóza XDR-TB (extremely/extensively drug-resistant tuberculosis) rezistentní navíc vůči jakémukoli fluorochinolonu a nejméně jednomu z injekčních léčiv druhé volby – amikacinu, kapreomycinu a kanamycinu². XDR-TB je bohužel často neléčitelná, problematická je i koincidence tuberkulózy s HIV infekcí. Rezistentní formy tuberkulózy byly zaznamenány ve více než 45 zemích světa, její rozšíření je kritické především ve východní Evropě, střední Asii a v Africe.

Obecný mechanismus vzniku rezistence spočívá např. v modifikaci cílových míst, jejich nadprodukci, změněné farmakokinetice či metabolizaci léčiv. U mykobakterií představuje vysoce lipofilní buněčná stěna významnou bariéru pro transport aktivních molekul a může tak přispí-

vat ke snížené citlivosti. Rezistence na léky proti TB vychází ze selekce přirozeně se vyskytujících mutantů s vrozenou odolností. Částečné potlačení bakteriálního bujení a vznik rezistentních organismů může vyplynout z nedbalého dodržování terapeutického režimu, nevhodné preskripce, interakcí či nedostatečného vstřebávání léčiv. Hrozbou pro budoucnost se stávají latentní neboli spící kmeny, které jsou rezervoárem pro propuknutí onemocnění v případě snížení imunity organismu³.

Léčba MDR-TB je stálou výzvou a zahrnuje tři hlavní oblasti zkoumání:

- a) Nové látky přinášející zkrácení doby léčby TB ze současných 6–9 měsíců na dva nebo méně; zejména jsou žádány sloučeniny se sterilizujícími účinky vůči mykobakteriím.
- b) Vývoj molekul s novým mechanismem účinku bez zkřížené rezistence s užívanými léčivy.
- c) Vývoj nových léčiv zlepšujících léčbu latentní infekce.

2. Výzkum nových léčiv působících vůči MDR-TB kmenům

Směry současného výzkumu zahrnují přípravu a testování zcela nových struktur, modifikace známých molekul, zkoumání přírodních látek, kombinace léčiv za účelem zkrácení doby léčby, vývoj nových lékových forem s postupným uvolňováním aktivní látky, což umožní snížení frekvence podávání nebo i velikosti dávek³. Velmi aktuální je výzkum v oblasti tzv. cílení (angl. targeting), tj. hledání potenciálních molekulárních cílů, zejména enzymů. Vedle chemoterapie nabízí také nové možnosti imunoterapie, např. DNA vakcíny nebo využití cytokinů⁴.

Současné trendy směřují především k syntéze malých molekul s nízkou minimální inhibiční koncentrací (MIC), fyzikálně-chemickými parametry v požadovaném rozmezí (např. podle Lipinského pravidla pěti) a optimálním toxikologickým profilem vyjádřeným indexem selektivity (SI)⁵.

2.1. Modifikace struktur používaných léčiv

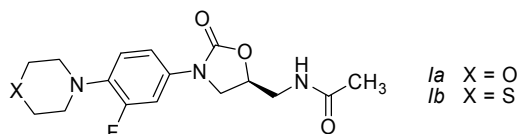
Nejstarším přístupem jsou modifikace struktur kliniky užívaných léčiv, především isoniazidu, thioamidů, rifampicinu, pyrazinamidu (PZA), ethambutolu (EMB) a skupiny chinolonů. Zejména nové chinolony jsou velmi perspektivní³. Tato kapitola je pro svůj rozsah přesunuta do suplementu přístupného na webové stránce Chemických listů.

2.2. Struktury v preklinickém a klinickém stádiu vývoje, tzv. „leads“

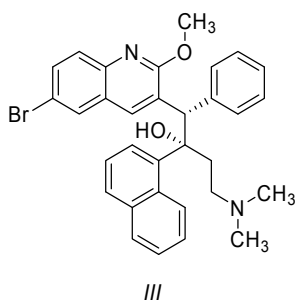
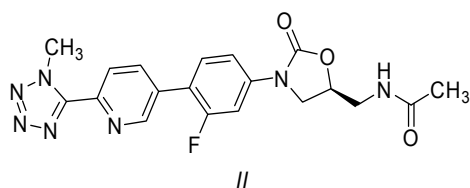
Do této skupiny jsme zařadili sloučeniny nacházející se v literatuře pod různými názvy a zkratkami – linezolid,

TMC207, PA-824, OPC-67683, SQ109, FAS20013, LL-3858 a BM212.

Linezolid (*Ia*), jenž patří do skupiny oxazolidinonů⁶, se používá pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi včetně streptokoků a methicillin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). Firma Pfizer ho uvedla na trh i do ČR pod názvem Zyvoxid. Linezolid byl použit pro léčbu tuberkulózy v dávce 600 mg jednou až dvakrát denně s dobrým účinkem. Zasahuje do syntézy mikrobiálních proteinů, cíleně inaktivuje 30S nebo 70S ribosomální komplex³. Jeho thiomorfolinový analog PNU-100480 (*Ib*) vykázal vysokou aktivitu vůči rezistentním kmenům *M. tbc.* (MIC $\leq 0,5$ –4 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Je dobře absorbován a tolerován u zvířecích modelů⁷.



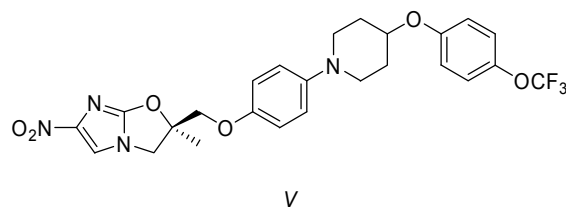
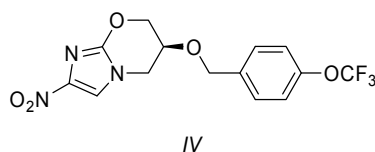
Novým oxazolidinonem obohaceným o tetrazol je DA-7867 (*II*). *In vitro* je účinnější než linezolid, MIC se pohybuje v rozmezí 0,03–0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁸). Přestože si jsou obě sloučeniny strukturálně velmi podobné, liší se ve farmakokinetice. Plazmatická hladina linezolidu je u myši po 4 hodinách oproti DA-7867 velmi nízká, čímž může být vysvětlována jeho nižší aktivita.



TMC207 (dříve R207910; *III*) je diarylchinolin firmy Johnson & Johnson. Má výhodné vlastnosti, zejména vysokou aktivitu vůči senzitivním i rezistentním TB kmenům v koncentraci od 0,03 $\mu\text{g ml}^{-1}$, dlouhý biologický poločas dovolující podávání jednou týdně, neinteraguje s ostatními antituberkulotiky⁹ a nemá zkříženou rezistenci s léky první linie. Použití samotného TMC207 je stejně účinné jako kombinace RIF, INH a PZA. Byla pozorována synergická aktivita s dalšími antituberkulotiky. Unikátní mechanismus působení – inhibice mykobakteriální membránově vázané ATP-synthasy – nabízí velký potenciál, protože se tyto enzymy u člověka značně liší od mykobakteriálních. Vykazuje zcela jedinečnou duální aktivitu jak vůči spícím, tak

vůči replikujícím se subpopulacím, čímž se liší od běžných antituberkulotik. Jedná se o jednoho z nejslibnějších kandidátů za posledních 30 let (cit.³).

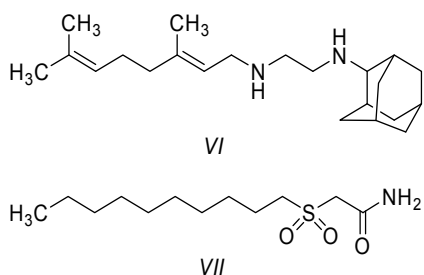
Další sloučeninou, která se nachází ve II. fázi preklinického zkoušení, je bicycklý nitroimidazopyranový derivát, nitroimidazo[2,1-*b*]oxazin (PA-824; *IV*), působící na replikující se i nereplikující se mykobakterie¹⁰. PA-824 způsobuje hromadění hydroxymykolových kyselin inhibicí enzymů, které je oxidují na ketomykoláty. Je stejně aktivní na mono- i multirezistentní kmeny *M. tbc.* v koncentracích 0,015–0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, nevykazuje zkříženou rezistenci s běžnými antituberkulotiky¹¹. Působí synergicky s RIF a chinolony, v kombinaci oddaluje vznik rezistentních mutantů. Oproti běžným antituberkulotikům ukázal vysokou baktericidní aktivitu proti všem MDR i latentním kmenům.



V druhé fázi klinického zkoušení je také látka OPC-67683 (*V*). Má 6–7 krát vyšší aktivitu než běžně užívaná antituberkulotika, její MIC proti *M. tbc.* je 0,006–0,024 $\mu\text{g ml}^{-1}$, vykazuje vynikající *in vitro* aktivitu vůči rezistentním a senzitivním TB kmenům a nemá zkříženou rezistenci s antituberkulotiky první linie¹². Díky dlouhému biologickému poločas, chybějící metabolizaci enzymy CYP a účinnosti i u imunokompromitovaných myši by mohl být používán při léčbě HIV pozitivních pacientů infikovaných současně tuberkulózou. Již při nízkých koncentracích působí inhibicí syntézy methoxymykolových a ketomykolových kyselin. Stejně jako PA-824 patří OPC-67683 mezi proléčiva, je metabolizován na denitroderivát. Obě uvedené sloučeniny mají hydrofobní charakter, což může vést k problémům biodostupnosti³.

Syntéza a screening knihovny analogů ethambutolu obsahujících ethylendiaminový farmakofor přinesly objev *N*-geranyl-*N'*-(adamantan-2-yl)ethan-1,2-diaminu (SQ109; *VI*) vykazujícího vynikající *in vitro* aktivitu proti *M. tbc.* (MIC 0,16–0,64 $\mu\text{g ml}^{-1}$) včetně EMB, INH a RIF rezistentních kmenů. SQ109 je jako proléčivo rychle metabolizován v játrech¹³. Přesný mechanismus účinku není znám, ale předpokládá se, že zasahuje do biosyntézy buněčné stěny, a to jiným způsobem než ethambutol. V kombinaci s RIF a INH vykazuje *in vitro* synergickou aktivitu, kombinace se STM a hraničně i s EMB má aditivní účinky. V porovnání s EMB má 14–35 krát vyšší aktivitu.

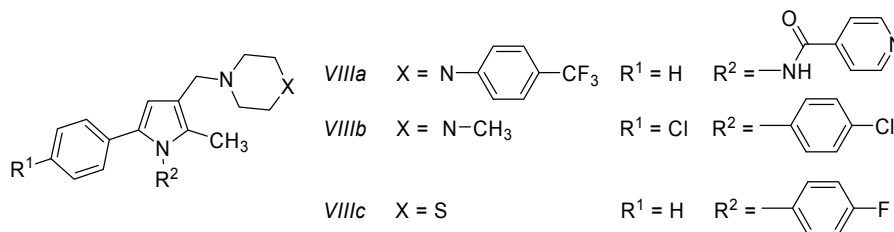
Sulfonylacetamidový analog β -ketoacyl synthasy FAS20013 (*VII*) vykazuje aktivitu v koncentracích 0,75 až



1,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Pravděpodobně interferuje se syntézou ATP a důležitými kroky energetických metabolických drah, navíc inhibuje biosyntézu mykolových kyselin. Je charakterizován jako ideální antituberkulotikum, působí baktericidně na pomalu rostoucí mykobakterie, nikoli na nepatogenní organismy. U klinických izolátů nebyla nalezena rezistence ani po několikanásobných pokusech ji indukovat. Působí velmi rychle, za 4 hodiny expozice usmrtí více organismů než INH či RIF za 12 až 14 dní. V krátkodobém horizontu je velmi účinný vůči kmenům rezistentním na většinu používaných antituberkulotik. Laboratorní pokusy naznačují vynikající schopnost sterilizovat TB léze a vymýtit latentní infekci vyskytující se u jedné třetiny světové populace. Terapeutické hodnocení na modelu TB infekce u myši opakovaně ukázalo jeho účinnost bez nežádoucích vedlejších účinků. Sloučenina je téměř ze 100 % orálně biodostupná a doposud nebyla zaznamenána její toxicita, i když byly podávány až desetinásobky účinné dávky^{14,15}.

Pyrol LL-3858 (Sudoterb; *VIIIa*)¹⁶ je nyní ve fázi II. klinických zkoušek v Lupin Ltd. Sloučenina patří do skupiny rostlinných alkaloidů a obsahuje isoniazidovou část. Stejně jako INH má baktericidní *in vitro* aktivitu v rozmezí MIC 0,025–0,12 $\mu\text{g ml}^{-1}$, působí synergicky s RIF. Kombinace s INH, RIF a PZA vedla u myši ke kompletní sterilizaci senzitivních i MDR kmenů během dvou měsíců, spolu s RIF a PZA vyléčil TB u všech druhů zvířat za tři měsíce. Sloučenina vykazuje dobrou biodostupnost a dávkování postačuje jednou denně.

Italští autoři objevili skupinu pyrrolových derivátů, z nichž nejvyšší aktivitu proti rezistentním i latentním kmenům mykobakterií vykazala sloučenina označená BM212 (*VIIIb*). Její MIC se pohybuje v rozmezí 0,7–1,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.¹⁷). Strukturální obměny vedly k thiomorfolinovému analogu *VIIIc* s nižší toxicitou a vyšší aktivitou (MIC 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$)¹⁸.



2.3. Výzkum v oblasti nových cílových struktur pro aktivní molekuly

V posledních letech je ve výzkumu nových léčiv kladen největší důraz na zásah do působení enzymů esenciálních pro životaschopnost mykobakterií. Cílová místa nových antituberkulotik zahrnují syntézu DNA, RNA, buněčné stěny či dráhy energetického metabolismu.

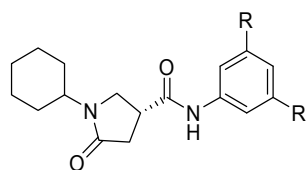
2.3.1. Biosyntéza buněčné stěny

Vysoce lipofilní mykobakteriální buněčná stěna má zcela specifické složení, proto je atraktivním místem působení nových molekul. Tvoří ji tři hlavní složky – peptidoglykan, arabinogalaktan a mykolové kyseliny.

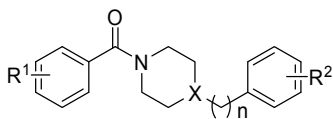
Inhibitory syntézy mykolových kyselin

Oproti většině organismů mají mykobakterie dva enzymatické systémy syntetizující mastné kyseliny, syntasy mastných kyselin I a II (FAS I a II). FAS I bimodálně produkuje nasycené mastné kyseliny – palmitovou a tetrakosanovou, kdežto FAS II, složený z řady nezávislých enzymů (včetně *InhA*) a vyžadující pro svou činnost acyl carrier protein (ACP), je zodpovědný za syntézu mykolových kyselin¹⁹.

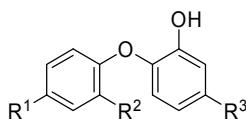
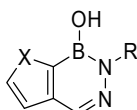
InhA, enoyl-ACP reductasa, je klíčovým enzymem biosyntézy mykolových kyselin a je jednou ze složek FAS II. Na *InhA* působí isoniazid, vývoj však směřuje k hledání takových molekul, které inhibují *InhA* přímo, bez nutné předchozí aktivace enzymem *KatG*, čímž dojde k překonání mechanismu rezistence vůči INH. Jednou z takovýchto skupin jsou substituované pyrrolidin-3-karboxamidy (*IX*), z nichž se vysoce aktivními jevíly sloučeniny s elektronegativní substitucí v *meta*-poloze benzenového jádra²⁰. Dalšími přímými inhibitory jsou piperazinové a piperidinové amidy (*X*), z nichž je nejúčinnější [4-(3-chlorfenyl)piperazin-1-yl](2,4-dimethylfenyl)methanon²¹. Ukázalo se také, že antiseptikum triklosan (*XIa*) působí inhibičně na FAS II systém. MIC₉₉ triklosanu je 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*M. tbc.* H₃₇Rv), u analogických difenyletherů substituovaných v poloze 5 ethylem či pentylem (*XIb*) tato hodnota klesá na 3,8, resp. 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, zatímco výrazné prodloužení tohoto řetězce se projeví značným poklesem aktivity. Triklosan a jeho deriváty 6PP a 8PP účinkují obdobně dobře na INH-senzitivní i rezistentní kmeny²². Bylo zjištěno, že také heterocyklické *ortho*-kondenzované diazaboriny (*XII*) blokují funkci *InhA* tvorbou kovalentní vazby boru s 2'-hydroxyem ribosy v NAD⁺ (cit.²³).



IX



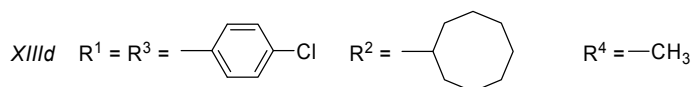
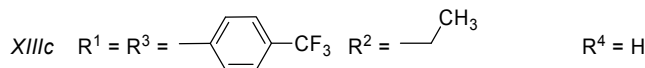
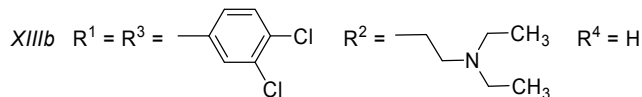
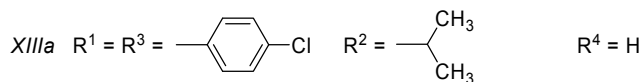
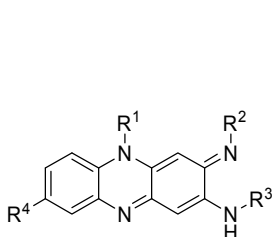
X

XIa R¹ = R² = R³ = ClXIb R¹ = R² = H; R³ = -(CH₂)_nCH₃

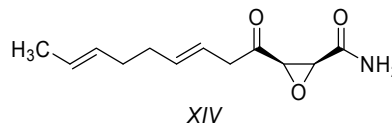
XII

Fenazinaminové deriváty odvozené od antileprotika klofaziminu vykazují aktivitu vůči řadě klinicky izolovaných tuberkulózních kmenů, včetně MDR. Mechanismus jejich účinku je komplexní, blokují dělení buněk vazbou na guanin v DNA a nedávno byla zjištěna na dávce závislá inhibice biosyntézy mykolových kyselin. Některé deriváty mají i další farmakologické účinky, např. zvrácení inhibičního efektu mykobakteriálních proteinů na fagocytózu napadených buněk^{24,25}.

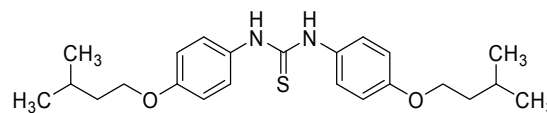
Kromě klofaziminu (XIIIa) se jedná např. o jeho vysoce účinné deriváty B4154 (XIIIb) a B4157 (XIIIc). MIC₉₀ B4154 byla 0,25, B4157 0,12 a klofaziminu ≤ 1,0 μg ml⁻¹, přičemž *in vivo* (u myši) se jevil nejefektivnější v dávce 20 mg kg⁻¹ den⁻¹ klofazimin²⁶. Vysoce aktivním dihydrofenazinem je sloučenina nazvaná OPC-37306 (XIII d). Její MIC je 0,1-0,2 mg ml⁻¹ vůči rezistentním kmenům *M. tbc.* (INH, RIF, EMB, STM) a *M. bovis* BCG, nejeví však žádnou aktivitu proti grampozitivním ani negativním bakteriím²⁵.



Dalším inhibitorem syntézy mastných kyselin je cerulenin (XIV), produkt plísně *Cephalosporium caerulens*, blokující FAS I i FAS II a mající synergický efekt s dalšími antituberkulotiky. Jeho MIC vůči MDR kmenům se pohybuje od 1,5 do 12,5 μg ml⁻¹, působí i na netuberkulózní mykobakteria, bohužel je však v lidském organismu nestabilní²⁷.



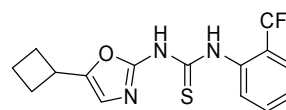
XIV



XV

DesA3 je stearyl-CoA Δ⁹-desaturasa vytvářející kyselinu olejovou. Působením DesA3 vzniká dvojná vazba na uhlíku 9, čímž se podílí na syntéze mastných kyselin včetně mykolových²⁸. Thiokarlid (též isoxyl, 1,3-bis[4-(isopentyloxy)fenyl]thiomočovina; XVI) je dlouho známé a užívané antituberkulotikum, které účinkuje i proti široké škále MDR tuberkulózních kmenů, a to právě inhibicí DesA3. Thiokarlid je pro léčivem, v organismu dochází k jeho aktivaci prostřednictvím flavinové monooxygenasy EthA, podobně jako u thioamidových tuberkulostatik²⁹.

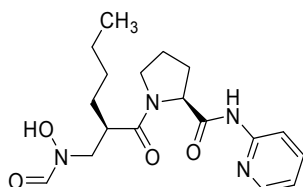
Od thiokarlidu jsou odvozeny další deriváty thiočoviny. Díky podobné struktuře je možné, že účinkují stejným mechanismem. Série 1-(5-cyklobutyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-(substituovaných fenyl/pyridyl)thiomočoviny byla hodnocena *in vitro* a *in vivo* proti *M. tbc.* H₃₇Rv a klinicky izolovanému MDR-TB kmeni. Sedm sloučenin zastavilo růst jak senzitivního, tak MDR kmene *in vitro* v koncentraci nižší než < 1 μM, kdy nejaktivnější byla sledována thiočovina XVI (MIC 0,14 μM), která zároveň vykazovala vysoký index selektivity (> 1307)³⁰.



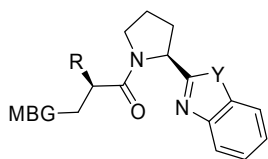
XVI

Inhibitory proteínové syntézy

Peptidová deformylasa (PDF) katalyzuje hydrolytické odstranění *N*-koncové formylové skupiny v základním kroku syntézy proteinů, a proto se stala jedním z cílů vývoje antibakteriálních látek. Na tomto enzymu byla testována skupina PDF-I inhibitorů odvozených od *N*-alkylmočovinyových hydroxamových kyselin³¹. Několik z nich vykazovalo antimykobakteriální aktivitu včetně MDR kmenů *M. tbc.* s MIC₉₀ < 1 μM. Farmakokinetické studie potvrdily jejich perorální použitelnost. Tyto výsledky potvrzují roli PDF jako „targetu“ a podporují další výzkum těchto sloučenin jako potenciálních antimykobakteriálních sloučenin³². Analoga nejúčinnějšího LBK-611 (XVII) mají pyridin nahrazen benzimidazolem (XVIII, kde Y = NH) nebo benzoxazolem (XVIII, kde Y = O); MBG znamená skupinu vázající kov, R = alkyl. Pro aktivitu jsou důležité chelatační vlastnosti molekuly. Karboxylové kyseliny jsou daleko méně účinné než jim odpovídající hydroxamové kyseliny a obrácené analogy hydroxamové kyseliny³³.



XVII



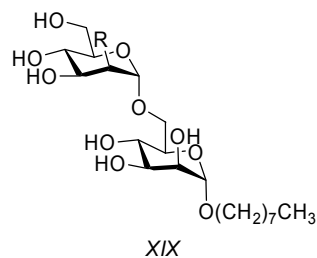
XVIII

Inhibitory biosyntézy polysacharidů

Arabinofuranosidy jsou velmi důležitou komponentou buněčné stěny. Proto byly připraveny alkylglykosidy se třemi mono- nebo bivalentně vázanými arabinofuranosidními jednotkami. Bylo zjištěno, že alkylglykosidy inhibují růst *M. smegmatis*, kdežto samotný arabinofuranosidový trisacharid či alkylglykosid s maltosovou cukernou komponentou jsou neaktivní³⁴.

Látky ze série α-(1→6)-vázaných mannosových disacharidů, u nichž byla 2'-OH skupina nahrazena za deoxy, fluor, amino nebo methoxy skupinu (XIX; R = H, F, NH₂, OCH₃), byly hodnoceny jako substráty nebo inhibitory polyrenolmonofosfomannosy-dependentní α-(1→6)-mannosyltransferasy zapojené do biosyntézy mykobakteriálního lipoarabinomannanu, jenž je hlavní antigenní komponentou buněčné stěny a je zapojen do značného počtu důležitých imunologických procesů. Tento enzym rozpozná disacharidy se skupinami podobnými nebo menšími, než je přirozená OH skupina, ale ne disacharidy se stericky náročnějšími skupinami³⁵.

Mykobakteriální 2*C*-methyl-D-erythritol-4-fosfát (MEP) je slibný specifický cíl pro nová léčiva. Všechny isopreno-



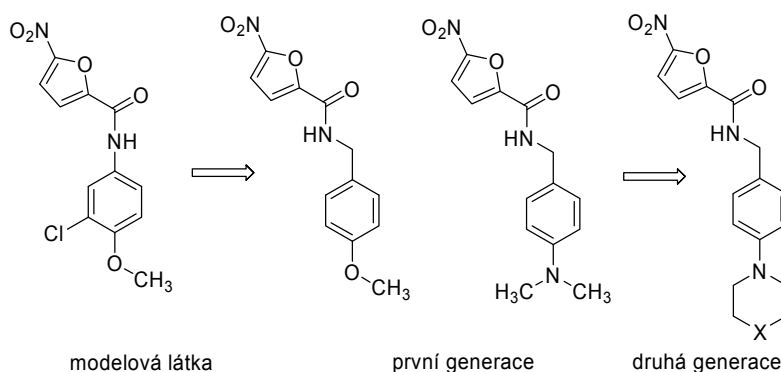
XIX

dy jsou syntetizovány opakující se kondenzací dvou důležitých prekurzorů, isopentenyl difosfátu (IPP) a dimethylallyl difosfátu (DMAPP). U *M. tbc.* jsou IPP a DMAPP biosyntetizovány pouze 2*C*-methyl-D-erythrol-4-fosfátovou cestou³⁶. V *M. tbc.* byly nalezeny a charakterizovány isoprenoidy zahrnující polyprenylfosfát (Pol-P), prenylový postranní řetězec menachinonu a různých forem karotenoidů. Pol-P je zodpovědný nebo je zahrnut do biosyntézy arabinogalaktanu, arabinomannanu, lipoarabinomannanu a dalších lipidů peptidoglykanové biosyntézy. Hraje důležitou roli v biosyntéze buněčné stěny jako lipidní nosič aktivních cukrů. Proto může být MEP cesta považována za potenciální zdroj nových cílových míst³⁷.

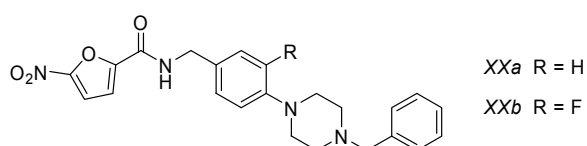
Vzhledem k tomu, že je peptidoglykan základním polymerem bakteriální stěny, nabízí se jako jedinečný a selektivní „target“. Fosfo-*N*-acetylmuramyl-pentapeptidová translokasa je integrální membránový protein katalyzující první krok reakcí uvnitř membrán. Při screeningu nových antibiotik vůči tomuto enzymu byla nalezena série kapuramycinových analogů, které vykazují selektivní antibakteriální aktivitu vůči mykobakteriím. Nejvyšší aktivitu vykázal kapuramycinový analog RS-118641 s MIC_{50/90} vůči *M. tbc.* 1/2; vůči MDR *M. tbc.* 0,5/2; *M. avium* 4/8 a *M. intracellulare* 0,06/0,5 μg ml⁻¹ (cit.³⁸). Z těchto výsledků vyplývá, že kapuramycinová analoga jsou vynikajícími kandidáty pro další vývoj léčiv vůči MDR-TB infekcím.

Arabinogalaktan, základní komponenta mykobakteriální buněčné stěny, obsahuje galaktofuranosové stavební bloky. UDP-galaktosa mutasa katalyzuje přeměnu UDP-galaktopyranosy na UDP-galaktofuranosu. Jako modelový inhibitor tohoto enzymu a antituberkulotikum s novým mechanismem působení, které je účinné vůči rostoucím i latentním formám, byl vybrán *N*-(3-chlor-4-methoxyfenyl)-5-nitrofurán-2-karboxamid (obr. 1 – modelová látka). MIC tohoto nitrofurankarboxamidu je 1,6 μg ml⁻¹ (cit.³⁹). Optimalizace molekuly vedla k přípravě knihovny první a druhé generace (obr. 1; X = O, NH, *N*-methyl, *N*-benzyl, CH-benzyl, S, SO, SO₂, *N*-pyridin-2-yl).

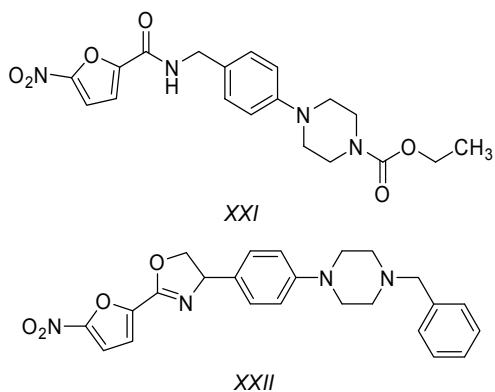
Nejúčinnější z druhé generace byl *N*-[4-(4-*N*-benzylpiperazin-1-yl)benzyl]-5-nitrofurán-2-karboxamid (XXa) s MIC₉₀ 0,0125 μg ml⁻¹ a jeho fluorovaný derivát XXb, jehož MIC₉₀ je 0,025 μg ml⁻¹. Řada nitrofurankarboxamidů s cyklickými sekundárními aminy byla vybrána pro *in vivo* testy. Sloučeniny však vykazovaly oproti *in vitro* testům daleko nižší aktivitu⁴⁰. Studium jejich biodostupnosti ukázalo, že mají krátký biologický poločas a jsou rychle eliminovány nebo degradovány. Benzylamidová a benzylpiperazinová vazba je pravděpodobným místem metabolického štěpení.



Obr. 1. Vývoj struktury nitrofurancarboxamidů



Vývoj třetí generace vedl k přípravě karbamátů. V biologickém hodnocení prokázaly vynikající antituberkulózní aktivitu a lepší rozpustnost. Nejúčinnější byl ethylkarbamát *XXI* ($MIC_{90} = 0,0062 \mu\text{g ml}^{-1}$)⁴¹ a cyklický 4,5-dihydrooxazolový analog *XXII*, který měl hodnotu MIC_{90} dokonce jen $0,00005 \mu\text{g ml}^{-1}$. Protože se amidické vazbě přiřítala metabolická nestabilita, byla zabudována do oxazolinového cyklu jako stabilního bioisosteru. U série těchto sloučenin se prodloužil biologický poločas za současného zvýšení antituberkulózní aktivity *in vitro*⁴².



2.3.2. Isocitrát lyasové cílení

Isocitrát lyasa (ICL) je cílový enzym pro boj s latentní infekcí *Mycobacterium tuberculosis*, která přežívá v makrofágu po dlouhou dobu nepoznána lidským imunitním systémem. Během této fáze latence rostou mykobakterie jen velmi pomalu, jsou rezistentní k běžně používaným lékům a pro přizpůsobení se nehostinnému prostředí makrofágů využívají glyoxylátový cyklus. ICL přeměňuje isocitrát na glyoxylát a hraje klíčovou roli v udržování vnitrobuněčné infekce *M. tuberculosis* v makrofázích

u myši⁴³. Enzym dovoluje, aby se uhlík získaný z acetylkoenzymu A při β -oxidaci mastných kyselin dostal do glyoxylátové cesty, kde je využit jako klíčový prekurzor biosyntézy základních buněčných komponent. Modelovým inhibitorem ICL je 3-nitropropanová kyselina, dalšími sloučeninami blokujícími tento enzym jsou 3-brom-2-oxopropanová kyselina či akonitát⁴⁴.

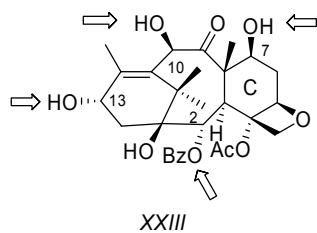
2.3.3. Cílení na FtsZ protein

Pro buněčné dělení u bakterií je důležitý termosenzitivní filamentární protein Z (FtsZ). Jedná se o homolog savčího cytoskeletálního proteinu tubulinu⁴⁵. Polymerace FtsZ je zahájena na více místech vnější membrány a objeví se jako dvourozměrně rostoucí vysoce dynamická helikální struktura obkružující buňku označovaná jako Z-kruh. Uspořádání FtsZ je regulováno vzájemně se ovlivňujícími stabilizačními a destabilizačními faktory. Jejich rovnováha, tedy stabilita FtsZ, je přesně regulována. Z-kruh je extrémně dynamický, zastavení jeho tvorby vede k úhynu buňky. Z toho vyplývá, že je FtsZ slibným místem zásahu pro vývoj nových antimikrobiálních léčiv díky jeho centrální roli v buněčném dělení. Sloučeninami působícími na mykobakteriální FtsZ jsou anthelmintika thiabendazol a albendazol. Zpomalují buněčné dělení u *M. tbc.* při MIC $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁴⁶).

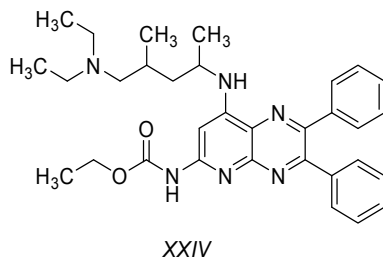
Taxany reprezentují skupinu sloučenin rovněž působících na FtsZ. Tvoří dvě rozdílné skupiny – vysoce toxické taxoidy a necytotoxické taxany, které vykazují významnou anti-TB aktivitu i vůči multilékově rezistentním kmenům. Modifikací substituce v různých pozicích molekuly 10-deacetyl-baccatinu (*XXIII*) byla připravena obsáhlá knihovna taxanů. Sloučenina mající (*E*)-3-(naftalen-2-yl)akryloylovou skupinu na uhlíku C-13 (cit.⁴⁷), je účinná s MIC_{99} $2,5\text{--}5 \mu\text{M}$ a byla vybrána jako modelová látka pro další optimalizaci.

Čtyři slibné necytotoxické taxany odvozené od *C-seco*-baccatinu vykazaly aktivitu v koncentracích $1,15$ až $2,5 \mu\text{M}$ proti lékově senzitivním a rezistentním kmenům *M. tbc.* bez ztlačné cytotoxicity⁴⁸.

Bylo zjištěno, že některé sloučeniny, které byly vyvi-



nuty jako inhibitory tubulinové polymerizace, inhibují růst *M. tbc.* Např. SRI-3072 (XXIV) vykazuje MIC 0,15 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Redukuje růst *M. tbc.* v myších makrofázích, je specifická pro FtsZ a nepůsobí na polymerizaci tubulinu⁴⁹.



2.3.4. Další možné cíle zásahu mykobakterií

Jedním z přístupů k získávání nových antituberkulotik je testování známých antibiotických i neantibiotických léčiv, kde byla aktivita vůči MDR kmenům zjištěna u co-amoxicilinu, imipenemu, nových makrolidů, nesteroidního antiflogistika diklofenaku či fenothiazinových neuroleptik a jejich recentně připravených derivátů³.

Přehled dalších možných cílových míst zásahů je prezentován v literárním zdroji³ a je sumarizován v tabulce, která je rovněž uvedena v suplementu přístupného na webových stránkách Chemických listů.

3. Závěr

Zatímco běžné případy tuberkulózy jsou doposud léčitelné, MDR-TB a XDR-TB způsobují problémy a v některých případech jsou smrtelné. Vzhledem k rostoucímu počtu rezistentních kmenů mykobakterií a jejich spicím formám, které mohou způsobit pozdější pandemii, je třeba věnovat maximální pozornost hledání nových mechanismů působení a cílových molekul pro účinnou a rychlou léčbu, která by eliminovala vznik rezistence a rezervoár latentních kmenů *M. tbc.* Cílem tohoto článku je podat přehled progresivně rostoucích poznatků z oblasti vývoje antituberkulotik působících vůči multilékově rezistentním kmenům za posledních několika let. Byly nalezeny nové cíle působení, dekodovány virulentní geny a připraveny nadějně struktury, např. PA-824, OPC-67683 a TMC207, které po zvládnutí ADME, mutagenity, biodostupnosti a lékových interakcí pravděpodobně rozšíří skupinu antituberkulotik působících proti multilékově rezistentní TB.

Tato práce byla financována z MSM 0021620822 a IGA NS 10367-3.

LITERATURA

1. Wright A., Zignol M.: *Anti-tuberculosis drug resistance in the world (fourth global report)*. World Health Organization, Geneva 2008.
2. WHO Stop TB Department: *Frequently asked questions – XDR-TB (Oct. 2006)*. World Health Organization, Geneva 2006. <http://www.who.int/tb/challenges/xdr/faqs/en/index.html>, staženo 29.4.2009.
3. Vinšová J., Krátký M., v knize: *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments* (Nguy S., K'ung Z., ed.), kap. 2. Nova Publishers, New York 2009.
4. Flynn J. L.: *Tuberculosis* 84, 93 (2004).
5. Balcells L., Field R. A., Duncan K., Young R. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2153 (2005).
6. Nam H. S., Koh W. J., Kwon O. J., Cho S. N., Shim T. S.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 92 (2009).
7. Cynamon M. H., Klemens S. P., Sharpe C. A., Chase S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1189 (1999).
8. Vera-Cabrera L., Castro-Garza J., Rendon A., Ocampo-Candiani J., Welsh O., Choi SH., Blackwood K., Molina-Torres K.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4351 (2005).
9. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Gohlmann H. W. H., Neefs J. M., Winkler H., Von Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis N., Jarlier V.: *Science* 307, 223 (2005).
10. Lenaerts A. J., Gruppo V., Marietta K. S., Johnson C. M., Driscoll D. K., Tompkins N. M., Rose J. D., Reynolds R. C., Orme I. M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2294 (2005).
11. Stover C. K., Warrenner P., VanDevanter D. R., Sherman D. R., Arain T. M., Langhorne M. H., Anderson S. W., Towell J. A., Yuan Y., McMurray D. N., Kreiswirth B. N., Barry C. E., Baker W. R.: *Nature* 405, 962 (2000).
12. Matsumoto M., Hashizume H., Tomishige T., Kawasaka M., Tsubouchi H., Sasaki H., Shimokawa Y., Komatsu M.: *PLoS Med.* 3, 2131 (2006).
13. Chen P., Gearhart J., Protopopova M., Einck L., Nacy C. A.: *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 332 (2006).
14. Jones P. B., Parrish N. M., Houston T. A., Stapon A., Bansal N. P., Dick J. D., Townsend C. A.: *J. Med. Chem.* 43, 3304 (2000).
15. Fasgen Inc.: *FASgen Announces Research Breakthrough in Treatment of TB and MDR-TB (Jan. 2005)*. FASgen, Baltimore 2005. <http://www.fasgen.com/pr-january122005.html>, staženo 29.4.2009.
16. *Tuberculosis* 88, 126 (2008).
17. Deidda, D., Lampis, G., Fioravanti, R., Biava, M., Porretta, G. C., Zanetti, S., Pompei, R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3035 (1998).
18. Biava, M., Porretta, G. C., Poce, G., Supino, S., Deidda, D., Pompei, R., Mollicotti, P., Manetti, F., Botta, M.: *J. Med. Chem.* 49, 4946 (2006).

19. Vilcheze C., Morbidoni H. R., Weisbrod T. R., Iwamoto H., Kuo M., Sacchetti J. C., Jacobs W. R.: *J. Bacteriol.* **182**, 4059 (2000).
20. He X., Alian A., Stroud R., de Montellano P. R. O.: *J. Med. Chem.* **49**, 6308 (2006).
21. He X., Alian A., de Montellano P. R. O.: *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 6649 (2007).
22. Sullivan T. J., Truglio J. J., Boyne M. E., Novichenok P., Zhang X., Stratton C. F., Li H. J., Kaur T., Amin S. A., Johnson F., Slayden R. A., Kisker C., Tonge P. J.: *ACS Chem. Biol.* **1**, 43 (2006).
23. Lu H., Tonge P. J.: *Acc. Chem. Res.* **41**, 11 (2008).
24. Reddy V. M., O'Sullivan J. F., Gangadharam P. R. J.: *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 615 (1999).
25. Matsumoto M., Hashizume H., Tsubouchi H., Sasaki H., Itotani M., Kuroda H., Tomishige T., Kawasaki M., Komatsu M.: *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 499 (2007).
26. Reddy V. M., Nadadur G., Daneluzzi D., O'Sullivan J. F., Gangadharam P. R. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 633 (1996).
27. Barry P. J., O'Connor T. M.: *Curr. Med. Chem.* **14**, 2000 (2007).
28. Chang Y., Fox B. G.: *Biochemistry* **45**, 13476 (2006).
29. Kordulakova J., Janin Y. L., Liav A., Barilone N., Dos Vultos T., Rauzier J., Brennan P. J., Gicquel B., Jackson M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3824 (2007).
30. Sriram D., Yogeewari P., Dinakaran M., Thirumuran R.: *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1194 (2007).
31. Hackbarth C. J., Chen D. Z., Lewis J. G., Clark K., Mangold J. B., Cramer J. A., Margolis P. S., Wang W., Koehn J., Wu C., Lopez S., Withers G., Gu H., Dunn E., Kulathila R., Pan S. H., Porter W. L., Jacobs J., Trias J., Patel D. V., Weidmann B., White R. J., Yuan Z.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2752 (2002).
32. Teo J. W. P., Thayalan P., Beer D., Yap A. S. L., Nanjundappa M., Ngew X., Duraiswamy J., Liung S., Dartois V., Schreiber M., Hasan S., Cynamon M., Ryder N. S., Yang X., Weidmann B., Bracken K., Dick T., Mukherjee K.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3665 (2006).
33. Pichota A., Duraiswamy J., Yin Z., Keller T. H., Alam J., Liung S., Lee G., Ding M., Wang G., Chan W. L., Schreiber M., Maa I., Beer D., Ngew X., Mukherjee K., Nanjundappa M., Teo J. W. P., Thayalan P., Yap A., Dick T., Meng W., Xu M., Koehn J., Pan S. H., Clark K., Xie X., Shoen C., Cynamon M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6568 (2008).
34. Naresh K., Bharati B. K., Jayaraman N., Chatterji D.: *Org. Biomol. Chem.* **6**, 2388 (2008).
35. Subramaniam V., Gurucha S. S., Besra G. S., Lotary T. L.: *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1083 (2005).
36. Eoh H., Brennan P. J., Crick D. C.: *Tuberculosis* **89**, 1 (2009).
37. Parrish N. M., Ko C. G., Hughes M. A., Townsed C. A., Dick J. D.: *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 722 (2004).
38. Koga T., Fukuoka T., Doi N., Harasaki T., Inoue H., Hotoda H., Kakuta M., Muramatsu Y., Yamamura N., Hoshi M., Hirota T.: *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 755 (2004).
39. Tangallapally R. P., Yendapally R., Daniels A. J., Lee R. E. B., Lee R. E.: *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 509 (2007).
40. Tangallapally R. P., Yendapally R., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Lee R. E.: *J. Med. Chem.* **48**, 8261 (2005).
41. Tangallapally R. P., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Lee R. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2584 (2006).
42. Tangallapally R. P., Sun D., Rakesh B., N., Lee R. E. B., Lenaerts A. J. M., Meibohm B., Lee R. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6638 (2007).
43. Munoz-Elias E. J., Upton A. M., Cherian J., McKinney J. D.: *Mol. Microbiol.* **60**, 1109 (2006).
44. Tripathi R. P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V. K.: *Med. Res. Rev.* **25**, 93 (2005).
45. Bi E., Lutkenhaus J.: *Nature* **354**, 161 (1991).
46. Huang Q., Tonge P. J., Slayden R. A., Kirikae T., Ojima I.: *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 527 (2007).
47. Ojima I., Borella C. P., Wu X. Y., Bounaud P. Y., Oderca C. F., Sturm M., Miller M. L., Chakravarty S., Chen J., Huang Q., Pera P., Brooks T. A., Baer M. R., Bernacki R. J.: *J. Med. Chem.* **48**, 2218 (2005).
48. Huang Q., Kirikae T., Pepe A., Amin A., Respcio L., Slayden R. A., Tonge P. J., Ojima I.: *J. Med. Chem.* **49**, 463 (2006).
49. White E. L., Suling W. J., Ross L. J., Seitz L. E., Reynolds R. C.: *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 111 (2002).

M. Krátký and J. Vinšová (*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Advances in the Development of Antituberculotics Acting on Multidrug-Resistant Strains**

The aim of this review is to outline the recent advances in the development of new drugs against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). The occurrence of resistance to anti-tuberculosis drugs, particularly of MDR-TB, has become a major public health problem. The emergence of MDR-TB has made many currently available anti-TB drugs ineffective. Due to a many reasons, there is an urgent need to identify new drug targets and to find novel chemical structures. The research of novel anti-MDR-TB potential drugs follows structure modification of known antituberculotics, new lead structures with novel mechanism of the action (linezolid, TMC207, PA-824, OPC-67683, SQ109, FAS20013, LL-3858, BM212) and novel drug targets, *i.e.* cell wall biosynthesis (mycolic acid synthesis, protein synthesis, arabinogalactan and peptidoglycan biosynthesis inhibitors) or other novel targets.

POKROKY VE VÝVOJI ANTITUBERKULOTIK PŮSOBÍCÍCH NA MULTILÉKOVĚ REZISTENTNÍ KMENY – SUPLEMENT

MARTIN KRÁTKÝ a JARMILA VINŠOVÁ

Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05
Hradec Králové
jarmila.vinsova@faf.cuni.cz

Klíčová slova: tuberkulóza, antituberkulotika, nové směry ve vývoji léčiv, cílení

Obsah

1. Poznámky ke klinicky užívaným antituberkulózním léčivům
2. Modifikace struktur používaných léčiv
 - 2.1. Isoniazid a thioamidy
 - 2.2. Skupina rifampicinu
 - 2.3. Pyrazinamid a ethambutol
 - 2.4. Chinolonové deriváty
3. Další možné cíle a přístupy k zásahu rezistentních mykobakterií
 - 3.1. Potenciální cílová místa
 - 3.2. Výzkum přírodních látek
4. Závěr

1. Poznámky ke klinicky užívaným antituberkulózním léčivům

Antituberkulotika se aktuálně dělí do následujících pěti skupin, viz tabulka I (cit.¹).

Tabulka II sumarizuje významné vlastnosti (minimální inhibiční koncentrace, mechanismus účinku a účinky na mykobakterie) vybraných antituberkulotik. Jedná se o ta antituberkulotika, od nichž jsou odvozeny níže uvedené látky působící proti MDR-TB kmenům.

Tabulka I
Rozdělení klinicky užívaných antituberkulotik

| | |
|--|--|
| Perorální antituberkulotika první řady | isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a rifabutin, pyrazinamid (PZA), ethambutol (EMB) |
| Injekční antituberkulotika druhé volby | amikacin, kapreomycin, kanamycin, streptomycin (STM), (viomycin) |
| Fluorochinolony | ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, (gatifloxacin) |
| Perorální antituberkulotika druhé řady | cykloserin, terizidon, ethionamid (ETH), prothionamid, kys. <i>p</i> -aminosalicylová |
| Léčiva s nejasnou rolí v léčbě MDR-TB | amoxicilin/klavulanát, imipenem, klarithromycin, klofazimin, thioacetazon, linezolid, vysoké dávky INH |

První multilékově rezistentní tuberkulózní kmen byl popsán na počátku 90. let. MDR byla sice definována jako rezistence nejméně vůči rifampicinu a isoniazidu, ovšem takřka 50 % případů je rezistentních vůči všem antituberkulotikům první linie, tj. INH, RIF, PZA a EMB². Tento fenotyp nevyplývá z jedné pleiotropní mutace, ale je způsoben postupným hromaděním mutací různých genů. Standardní protokol léčby tuberkulózy (directly observed therapy short-course, DOTS) spočívá právě v každodenním podávání těchto čtyř léčiv po dobu dvou měsíců a denního podávání INH a RIF po další čtyři měsíce³, ovšem léčba MDR-TB trvá zpravidla 18–24 měsíců.

2. Modifikace struktur používaných léčiv

Nejstarším, relativně jednoduchým a hojně praktikovaným přístupem jsou modifikace struktur klinicky užívaných léčiv, především isoniazidu, thioamidů, rifampicinu, pyrazinamidu, ethambutolu a skupiny chinolonů. Nevýhodou takového přístupu je však to, že nově připravené sloučeniny zpravidla nepřinášejí originální mechanismus účinku a také hrozí, že kmeny necitlivé na mateřskou látku nebudou citlivé ani na nový derivát (zkřížená rezistence). Přesto je tento přístup perspektivní a přináší nové účinné molekuly⁴.

2.1. Isoniazid a thioamidy

Snad nejvíce modifikací bylo provedeno na molekule isoniazidu⁵. Přestože jich byla připravena celá řada (např.^{6,7}), nepodařilo se zatím původní sloučeninu zcela překonat⁸. Problematické je, že většina INH derivátů nezastavuje v nízkých koncentracích růst INH-rezistentních kmenů.

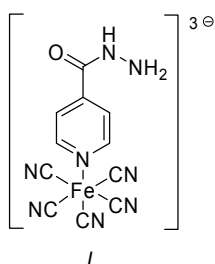
Jednou z úspěšných modifikací INH, která nevyžaduje k aktivaci KatG, je jeho komplex s pentakyanohydroxylatnanem, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ (*I*), který pravděpodob-

Tabulka II
Přehled vybraných antituberkulotik a některých jejich vlastností

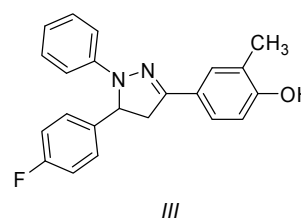
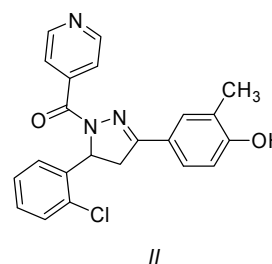
| Léčivo | MIC [$\mu\text{g ml}^{-1}$] | Mechanismus účinku |
|-------------------------|----------------------------------|--|
| INH | 0,02–0,2 | aktivace INH jako proléčiva katalasou-peroxidasou KatG, blokáda enoyl-ACP reduktasy (InhA) → inhibice syntézy mykolových kyselin, řada dalších účinků na metabolismus DNA, NAD, lipidů a sacharidů |
| ETH, resp. prothionamid | 2,5–10 | aktivace proléčiva ETH flavinovými monooxygenasami EtaA/EthA, blokáda enoyl-ACP reduktasy (InhA) → inhibice syntézy mykolových kyselin |
| RIF | 0,5–2 | blokáda DNA dependentní RNA polymerasy → inhibice biosyntézy RNA |
| PZA | 16–50 (pH 5,5) | aktivace PZA jako proléčiva nikotinamidasou/pyrazinamidasou; deplece energetických zásob, inhibice FAS I |
| EMB | 1–5 | inhibice arabinosyl transferasy → zástava biosyntézy arabinogalaktanu |
| Chinolony | 0,5–2,5 | inhibice topoisomerasy II (DNA gyrasy) a IV vazbou na podjednotku A → změna prostorového uspořádání a blokáda řady funkcí DNA |

ně interaguje přímo s NADH vazebným místem 2-*trans*-enoyl-ACP reduktasy. Tento přístup k překonání rezistence spočívá v syntéze molekul schopných sebeaktivace vlastními elektrony. Po oxidaci komplexu kyslíkem či jiným oxidačním činidlem nestabilní Fe^{III} komplex podléhá rychlému intramolekulárnímu elektronovému přenosu za vzniku $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{isonikotinyl})]^{3-}$ intermediátu přeměňujícího se na komplex $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{L})]^{3-}$ (L = isonikotinová kyselina, isonikotinamid či isonikotinaldehyd), který se váže na enoyl-ACP a vede k inhibici biosyntézy mykolových kyselin. Podobně může být INH oxidován za vzniku isonikotinoyl-NAD aduktu v přítomnosti Mn^{3+} . Zajímavé je, že je tento komplex účinnější na INH-rezistentní kmeny než na kmeny bez mutace InhA. MIC této sloučeniny je $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.⁹).

Zcela odlišnou modifikací je zabudování hydrazidové části molekuly INH do heterocyklu. Vzhledem k tomu, že některé pyrazolové deriváty mají antituberkulózní aktivitu, byl INH začleněn do pyrazolinu za vzniku [3-(4-hydroxy-3-methylfenyl)-5-(substituovaný fenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl](pyridin-4-yl)methanonů. 5-Chlorderivát *II* vykázal nejvyšší aktivitu s MIC $0,26 \mu\text{M}$ vůči INH-rezistentním i senzitivním kmenům, zároveň byl v koncentraci $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ stále netoxický vůči savčím buňkám¹⁰. Zajímavé je, že obdobná antimykobakteriální aktivita byla zjištěna i u 4-[5-(substituovaný fenyl)-1-fenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-3-yl]-2-methylfenolů, které jsou sice předešlé skupině strukturálně podobné, avšak



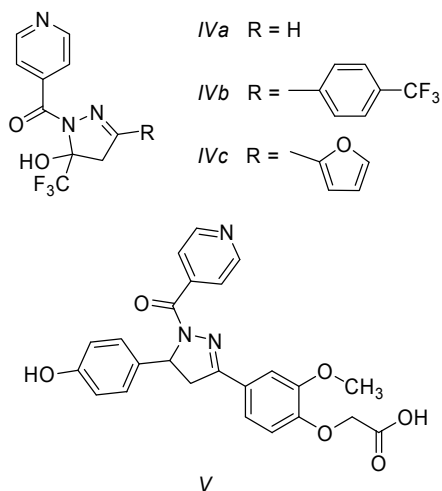
v jejich struktuře je nahrazen isonikotinoyl za fenyl. De facto se tedy nejedná o isoniazidové deriváty. Nejúčinnější sloučenina *III* vykazuje MIC $0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.¹¹).



Další skupinou látek s inkorporovaným isoniazidem do pyrazolinového cyklu jsou [3-substituované-5-hydroxy-5-(trifluor/trichlormethyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl](pyridin-1-yl)methanony. Deriváty *IVa* a *IVb* se ukázaly aktivnější než INH vůči INH-senzitivním i některým rezistentním kmenům *M. tbc.* a *IVc* zastavil růst všech INH-rezistentních kmenů v dvakrát až čtyřikrát vyšší koncentraci než u *M. tuberculosis* H₃₇Rv. I tyto sloučeniny působí inhibicí biosyntézy mykolových kyselin¹².

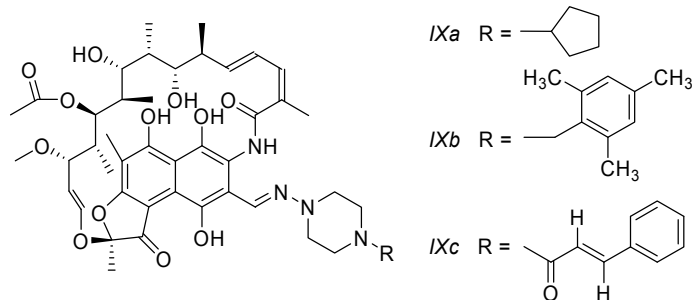
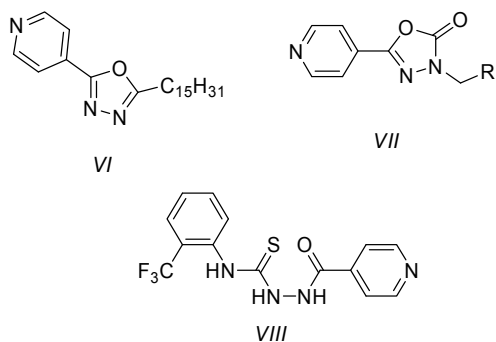
Pyrazolin najdeme i u 2-{4-[5-(substituovaných fenyl)-1-isonikotinoyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-3-yl]-2-methoxyfenoxy}octových kyselin, u nichž byla zjištěna aktivita vůči INH-rezistentním i senzitivním kmenům – nejnižší MIC ($0,12 \mu\text{M}$) dosáhla kyselina *V* (cit.¹³).

Začlenění INH do oxadiazolového cyklu je jeho další efektivní heterocyklickou obměnou. 2-Substituované-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazoly se ukázaly být vysoce aktivními vůči *M. tbc.* H₃₇Rv i proti klinickým isolátům



včetně rezistentních kmenů. Zvláště výhodnou je substituce v poloze 2 výrazně lipofilním pentadecylovým a heptadecylovým řetězcem. Zdá se, že lipofilita usnadňuje vstup molekuly buněčnou stěnou bohatou na lipidy. MIC pro 2-pentadecylový derivát VI vůči senzitivním *M. tbc.* kmenům (0,35 μM) byla podobná jako u isoniazidu (0,44 μM) a vůči rezistentním a MDR kmenům protituberkulózní aktivita výrazně převyšovala INH, EMB a STM¹⁴.

3-Substituované 5-(pyridin-4-yl)-3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-ony (VII; R = substituovaný heterocykl) mohou být také považovány za cyklická analoga INH, navíc však mohou interagovat v aktivním místě mykobakteriálního cytochromu P450, čímž blokují cytochrom P450-dependentní sterol 4 α -demethylasu v procesu biosyntézy sterolů. 2-Thionové deriváty byly méně aktivní¹⁵.



Typickým farmakoforem perorálních antituberkulotik druhé linie ethionamidu a prothionamidu je thioamidová skupina. Proto byla připravena skupina isonikotinoylhydrazinokarbothioamidů kombinující tuto skupinu s isoniazidem. Zavedení trifluormethylové skupiny na fenyl zvyšuje oproti elektrondorovým substituentům (methyl, methoxyskupina) aktivitu. Nejnižší MIC vůči INH-senzitivním i rezistentním kmenům (0,58 μM) ukázala molekula VIII, která je současně velmi málo toxická (index selektivity > 218). Dobrá účinnost byla potvrzena i *in vivo* u myši v dávce 25 mg $\text{kg}^{-1} \text{den}^{-1}$ (cit.¹⁶).

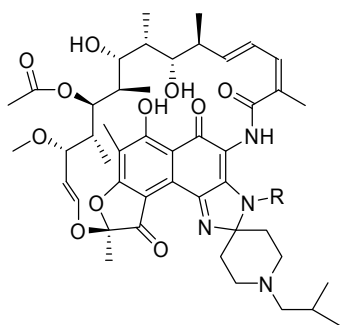
2.2. Skupina rifampicinu

Od ansamycinového antibiotika rifampicinu jsou odvozeny užívané deriváty rifapentin (IXa), rifabutin (Xa) a rifalazil s delším biologickým poločasem umožňujícím intermitentní aplikaci. Všechny působí stejně jako rifampicin na *M. tuberculosis* i atypická mykobakteria, včetně latentních forem. Rifapentin je v dávkování jednou týdně ve třetí fázi klinického testování léčby latentní formy TB¹⁷. Další derivát, CGP7040 (IXb), je antimykobakteriálně účinnější a stabilnější než rifampicin¹⁸. Obecně problematický je fakt, že všechny ansamyciny mají společný mechanismus účinku a RIF-rezistentní kmeny bývají rezistentní i na tyto novější molekuly.

K derivátům aktivním i vůči RIF-rezistentním kmenům patří 3-(4-cinnamylpiperazin-1-yliminomethyl) rifamycin (IXc) s MIC 2–8 krát nižší než RIF¹⁹ a novější rifabutinové deriváty, zejména *N*⁷-acetylrifabutin (Xb) s MIC vůči *M. tbc.* H₃₇Rv < 0,013 $\mu\text{g ml}^{-1}$, *N*⁷-acetylrifabutinol a *N*⁷-(undec-10'-enyl)rifabutin (Xc). V myším modelu infekce běžným TB kmenem se ukázaly být efektivními *N*⁷-acetylrifabutin a rifabutin, kdežto u MDR-TB myši byl navíc obdobně efektivní i *N*⁷-(undec-10'-enyl)rifabutin²⁰.

2.3. Pyrazinamid a ethambutol

Také pyrazinamid patří k molekulám se značným počtem modifikací. Byla připravena řada jeho derivátů, např. 5-chlorpyrazinamid, propyl-pyrazin-2-karboxylát či substituované pyrazinkarboxamidy^{21–23}, z nichž některé jsou aktivnější vůči typickým i atypickým mykobakteriím než parentní sloučenina, a to i vůči PZA-rezistentním kmenům; některé z nich jsou současně antifungální. U většiny

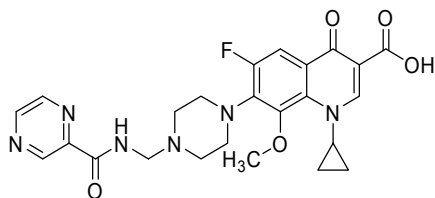


Xa R = H

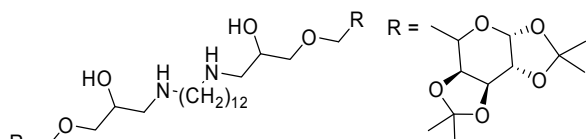
Xb R =

Xc R =

z těchto derivátů však chybí hodnocení vůči MDR kmenům. Výjimkou je např. série Mannichových báží PZA, kdy neúčinnější látka, karboxylová kyselina *XI*, byla účinná *in vitro* v koncentraci 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ vůči *M. tbc.* rezistentnímu na INH, PZA, RIF a ofloxacin, inhibuje FAS I a DNA-gyrasu a byla aktivní i *in vivo*²⁴. Z chemického hlediska se jedná o kondenzát pyrazinamidu s fluorochinolonem.



XI



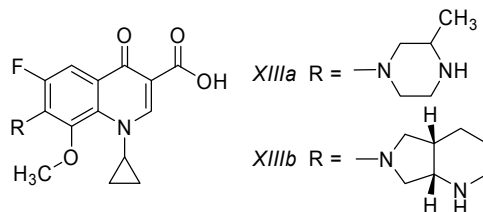
XII

Aminoalkohol ethambutol účinkuje inhibicí arabinosyl transferasy, přičemž právě glykosyl transferasy se podílejí na biosyntéze arabino-D-galaktanu a lipoarabinomannanu, nezbytných pro buněčnou stěnu mykobakterií. Za jeho deriváty může být považována skupina galaktopyranosylovaných aminoalkoholů. Účinnějšími než EMB byly shledány ty látky, kde jsou tyto galaktopyranosylové jednotky spojeny dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Nejaktivnější vůči senzitivním i MDR kmenům byla sloučenina *XII* s můstkem tvořeným 1-[12-(2-hydroxypropylamino)-dodecylamino]-propan-2-olem (MIC = 1,56 $\mu\text{g ml}^{-1}$)²⁵.

2.4. Chinolonové deriváty

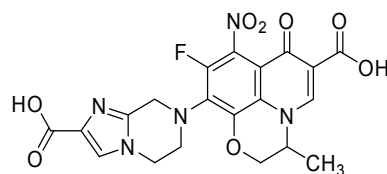
Chinolony jsou moderní a perspektivní skupinou antibakteriálních látek s významnou antimykobakteriální aktivitou spočívající v inhibici topoisomerasy IV a DNA gyraasy. Zejména fluorované chinolony 4. generace gatifloxacin (*XIIIa*) a moxifloxacin (*XIIIb*) se jeví nadějnými pro léčbu infekcí způsobených citlivými i rezistentními kmeny – mají dlouhý biologický poločas, MIC₉₀ se pohybuje v rozmezí 0,031–0,125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.^{26,27}), jsou účinnější než ofloxacin a levofloxacin, sterilizují mykobakterie a významné je i to, že umožňují zkrátit dobu léčení.

Moderním širokospektrým fluorochinolonem je sitafloxacin (*XIVa*), jenž zastavuje růst i těch mykobakterií, které jsou vůči dalším chinolonům odolné²⁸. K novým derivátům aktivním vůči MDR-TB patří gemifloxacin (*XIVb*)²⁹ a oxazinový derivát *XV*, jehož aktivita byla úspěšně testována *in vitro* (MIC₉₉ 0,09 μM) a *in vivo*³⁰.



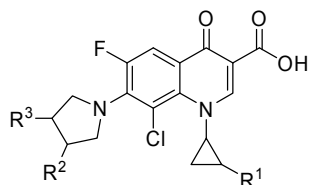
XIIIa R =

XIIIb R =



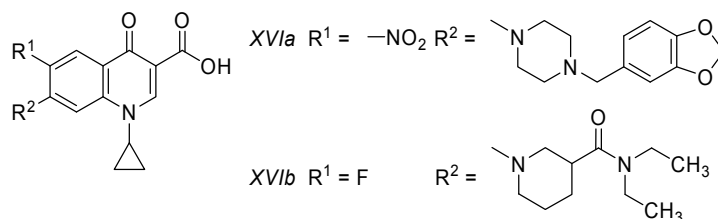
XV

Z dalších chinolonových derivátů byly syntetizovány 6-nitrosubstituované deriváty. *In vitro* neúčinnější se jeví-

XIVa R¹ = F R² = -NH₂ R³ = XIVb R¹ = H R² = -CH₂NH₂ R³ =

Tabulka III
Další potenciální cíle antimykobakteriálních látek

| Cílová molekula/dráha | Příklady účinných sloučenin | Význam molekuly/dráhy; mechanismus působení, ev. důsledky |
|---|---|--|
| Serinové/threoninové proteinkiny ³³ | 2-(cyklopropankarboxamido)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[<i>b</i>]thiofen-3-karboxamid (AX20017) ³⁴ | brání v makrofázích splynutí lysosomu s fagosomem, zachovávají ho intaktním; inhibitory kinas toto spojení indukují |
| DNA gyrasa (topoisomerasa II), topoisomerasa IV | podobné chinolonům: kyseliny 2-substituované 3-nitro-5,12-dihydro-5-oxobenzothiazolo[3,2- <i>a</i>]-1,8-naftyridin-6-karboxylové ³⁵ , 2-substituované 3-fluor-5,12-dihydro-5-oxobenzothiazolo[3,2- <i>a</i>]chinolin-6-karboxylové ³⁶ , 6-fluor/nitro-4-oxo-7-(substituent)-4 <i>H</i> -[1,3]thiazeto[3,2- <i>a</i>]chinolin-3-karboxylové ³⁷ | nutné k replikaci, transkripci a reparaci DNA, katalyzuje tvorbu terciární struktury DNA (superhelix) a změny v jejím prostorovém uspořádání; blokáda topoisomeras, vznik ternárního komplexu přerušená DNA-topoisomerasa-chinolonový derivát, výsledkem je abnormální prostorová konfigurace, chybná funkce DNA, posléze její degradace |
| Efluxní transportní mechanismy ³⁸ | některé organokřemičité sloučeniny (SILA 421), fenothiaziny ⁴ | odstraňování toxických látek z buněk, snížení aktivace lysosomálních enzymů; blokáda efluxu antimykrobiálních látek, zvrát rezistence, facilitace zabíjení makrofágy; přímý antimykobakteriální účinek |
| Biosyntéza šikimátu ³⁹ | deriváty triazolu a tetrazolu | součást biosyntézy aromatických aminokyselin, chinonů (nafto-, ubi-, mena-), mykobaktinu, folátu apod.; blokáda šikimát kinyasy, blokáda konverse 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu na chorismát |
| Biosyntéza sideroforů ⁴⁰ | 2-triazolové deriváty 5'-[<i>N</i> -(2-hydroxybenzoyl)sulfamoyl]adenosinu | siderofory mykobakterií (mykobaktiny) jsou nutné mj. pro virulenci; inhibice adenylace aromatických kyselin |
| Biosyntéza biotinu ⁴¹ | amiclenomycin, 3-[(1 <i>s</i> ,4 <i>s</i>)-4-aminocyclohexa-2,5-dien-1-yl]propan-1-ol | biotin je kofaktor karboxylas, dekarboxylas a transkarboxylas; inhibice aminotransferasy kyseliny diaminopelargonové |
| Proteasom ⁴² | peptidyl boronát, epoxomycin | důležitý mj. pro přizpůsobení se měnícím podmínkám, degradace vadných a přebytečných molekul apod. |
| NADH-dependentní peroxy-nitrit reduktasa a peroxidasa ⁴² | rhodaniny | blokáda dihydrolipoamid transferasy (u morčat je nezbytná pro patogenezí) – zhoršená replikace, zvýšená citlivost vůči nitrosativnímu stresu, nižší persistence |
| Biosyntéza rhamnosy | rhodaniny ⁴³ 2,3,5-trisubstituované thiazolidin-4-ony ⁴⁴ | blokáda enzymů konverse dTTP a glukóza-1-fosfátu na dTDP-rhamnozu nutnou pro výstavbu buněčné stěny inhibice dTDP-6-deoxy-D-xylo-4-hexulosa 3,5-epimerasy |
| Purinové báze a nukleosidy | 9-benzyl-2-chlor-6-(furan-2-yl)purin, 2-[6-(dodecylthio)-9 <i>H</i> -purin-9-yl]butanová kyselina ⁴⁵ , 2-methyladenosin ⁴⁶ | syntéza nukleových kyselin, role v energetickém metabolismu, signálních drahách apod.; interference s fyziologickými purinovými deriváty? |



la kyselina XVIa, jejíž MIC vůči *M. tbc.*, MDR-TB a *M. smegmatis* se pohybovala od 0,08 do 0,16 μM , byla aktivní také *in vivo*. I zde, podobně jako u jiných chinolonů, byl výhodný cyklopropyl v poloze 1 a substituovaný piperazin v poloze 7 (cit.³¹). 6-Nitroskupina může být nahrazena bez ztráty aktivity za fluor. Nejnižší MIC (0,09 μM) byla nalezena u fluorochinolonu XVIb, který prokázal (stejně jako předchozí sloučenina) v dávce 50 mg kg^{-1} den^{-1} výraznou aktivitu na zvířecím modelu tuberkulózy³².

3. Další možné cíle a přístupy k zásahu rezistentních mykobakterií

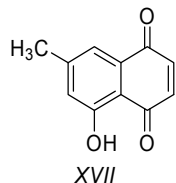
Přístupy k zásahu MDR-TB kmenů zahrnují výzkum dalších biochemických cílů a možností jejich zásahu, testování klinicky užívaných léčiv nepovažovaných za antituberkulotika, testování přírodních látek a jejich směsí a dále syntéza a hodnocení nově synteticky připravených sloučenin bez přesně známého mechanismu účinku⁴.

3.1. Potenciální cílová místa

Tabulka III přináší přehled některých cílových míst pro působení antimykobakteriálních látek včetně zástupců a významu uvedených cílových molekul.

3.2. Výzkum přírodních látek

Přírodní produkty představují alternativní zdroj potenciálních antituberkulotik. Byla izolována řada molekul účinných vůči MDR kmenům, např. aerothionin nebo naphochinony, ze kterých 7-methyljuglon (XVII) prokázal aktivitu v koncentracích od 0,32 do 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a navíc vykazuje synergii se základními antituberkulotiky⁴.



Literatura uvádí řadu případů *in vitro* účinnosti extraktů z léčivých rostlin vůči citlivým, rezistentním i MDR-TB kmenům. Problematické ovšem je, že se složení těchto extraktů, tedy i množství a zastoupení účinných látek, může poměrně výrazně lišit. Proto nelze používání

nestandardizovaných rostlinných extraktů řadit k vůdčím přístupům v hledání nových anti-TB léčiv, pokud nedojde k izolaci a charakterizaci účinné látky, jako se tomu stalo u 7-methyljuglonu⁴.

4. Závěr

Tento suplement podává přehled o dalších strategiích vývoje nových antituberkulotik působících vůči multilékově rezistentním kmenům *M. tuberculosis*. Pojednává podrobně o modifikacích klinicky užívaných antituberkulotik (INH, ETH, RIF, PZA, EMB a chinolony), výzkumu dalších cílových molekul neuvedených v hlavním článku a stručně zmiňuje zkoumání přírodních produktů.

LITERATURA

- Rich M. (ed.): *Guidelines for the Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis*. World Health Organization, Geneva 2008.
- Laughon B. E.: *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 463 (2007).
- Blanc L., Chaulet P., Espinal M., Graham S., Grzeszka M., Harries A., Luelmo F., Maher D., O'Brien R., Raviglione M., Rieder H., Starke J., Uplekar M., Wells C.: *Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes*. World Health Organization, Geneva 2003.
- Vinšová J., Krátký M., v knize: *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments* (Nguy S., K'ung Z., ed.), kap. 2. Nova Publishers, New York 2009.
- Vinsova J., Imramovsky A., Jampilek J., Monreal J. F., Dolezal M.: *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 7, 1 (2008).
- Imramovsky A., Polanc S., Vinsova J., Kocevar M., Jampilek J., Reckova Z., Kaustova J.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2551 (2007).
- Vavříková E., Vinšová J.: *Chem. Listy* 56, 103 (2009).
- Scior T., Garces-Eisele S. J.: *Curr. Med. Chem.* 13, 2205 (2006).
- Oliveira J. S., de Sousa E. H. S., de Souza O. N., Moreira I. S., Santos D. S., Basso L. A.: *Curr. Pharm. Design* 12, 2409 (2006).
- Shaharyar M., Siddiqui A. A., Ali M. A., Sriram D., Yogeewari P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3947 (2006).

11. Ali M. A., Yar M. S.: *Med. Chem. Res.* 15, 463 (2007).
12. da Silva P. E. A., Ramos D. F., Bonacorso H. G., de la Iglesia A. I., Oliveira M. R., Coelho T., Navarini J., Morbidoni H. R., Zanatta N., Martins M. A. P.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 139 (2008).
13. Ali M. A., Yar M. S., Kumar M., Pandian G. S.: *Nat. Prod. Res.* 21, 575 (2007).
14. Navarrete-Vazquez G., Molina-Salinas G. M., Duarte-Fajardo Z. V., Vargas-Villarreal J., Estrada-Soto S., Gonzalez-Salazar F., Hernandez-Nuneza E., Said-Fernandez S.: *Bioorg. Med. Chem.* 15, 5502 (2007).
15. Mamolo M. G., Zampieri D., Vio L., Fermeglia M., Ferrone M., Priel S., Scialino G., Banfi E.: *Bioorg. Med. Chem.* 13, 3797 (2005).
16. Sriram D., Yogeeswari P., Priya D. Y.: *Biomed. Pharmacother.* 63, 36 (2009).
17. Zhang Y., Post-Martens K., Denkin S.: *Drug Discov. Today* 11, 21 (2006).
18. Hudson A., Imamura T., Gutteridge W., Kanyok T., Nunn P.: *The Current Anti-TB Drug Research and Development Pipeline*. World Health Organization, Geneva 2003.
19. Reddy V. M., Nadadur G., Daneluzzi D., Dimova V., Gangadharam P. R. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2320 (1995).
20. Figueiredo R., Moiteiro C., Medeiros M. A., da Silva P. A., Ramos D., Spies F., Ribeiro M. O., Lourenço M. C. S., Junior I. N., Gaspar M. M., Cruz M. E. M., Curto M. J. M., Franzblau S. G., Orozco H., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Costa M. C.: *Bioorg. Med. Chem.* 17, 503 (2009).
21. Speirs R. J., Welch J. T., Cynamon M. H.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1269 (1995).
22. Cynamon M. H., Speirs R. J., Welch J. T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 462 (1998).
23. Dolezal M., Cmedlova P., Palek L., Vinsova J., Kunes J., Buchta V., Jampilek J., Kralova K.: *Eur. J. Med. Chem.* 43, 1105 (2008).
24. Sriram D., Yogeeswari P., Reddy S. P.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2113 (2006).
25. Tewari N., Tiwari V. K., Tripathi R. P., Chaturvedi V., Srivastava A., Srivastava R., Shukla P. K., Chaturvedi A. K., Gaikwad A., Sinha S., Srivastava B. S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 329 (2004).
26. Cynamon M. H., Sklaney M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2442 (2003).
27. Nuermberger E. L., Yoshimatsu T., Tyagi S., Williams K., Rosenthal I., O'Brien R. J., Vernon A. A., Chaisson R. E., Bishai W. R., Grosset J. H.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 1131 (2004).
28. Anderson D. L.: *Drugs Today* 44, 489 (2008).
29. Lai C. C., Tan C. K., Huang Y. T., Chou C. H., Hung C. C., Yang P. C., Luh K. T., Hsueh P. R.: *Clin. Infect. Dis.* 47, E57 (2008).
30. Dinakaran M., Senthilkumar P., Yogeeswari P., China P., Nagaraja V., Sriram D.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 1229 (2008).
31. Senthilkumar P., Dinakaran M., Yogeeswari P., Sriram D., China A., Nagaraja V.: *Eur. J. Med. Chem.* 44, 345 (2009).
32. Senthilkumar P., Dinakaran M., Yogeeswari P., China A., Nagaraja V., Sriram D.: *Biomed. Pharmacother.* 63, 27 (2009).
33. Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C., Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G., Pieters J.: *Science* 304, 1800 (2004).
34. Szekely R., Waczek F., Szabadkai I., Nemeth G., Hegymegi-Barakonyi B., Eros D., Szokol B., Pato J., Hafenbradl D., Satchell J., Saint-Joanis B., Cole S. T., Orfi L., Klebl B. M., Keri G.: *Immunol. Lett.* 116, 225 (2008).
35. Dinakaran M., Senthilkumar P., Yogeeswari P., Sriram D.: *Biomed. Pharmacother.* 63, 11 (2009).
36. Dinakaran M., Senthilkumar P., Yogeeswari P., China A., Nagaraja V., Sriram D.: *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3408 (2008).
37. Murugesan D., Palaniappan S., Perumal Y., Arnab C., Valakunja N., Sriram D.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 337 (2008).
38. Martins M., Viveiros M., Ramos J., Couto I., Molnar J., Boeree M., Amaral L.: *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 479 (2009).
39. Segura-Cabrera A., Rodriguez-Perez M. A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 3152 (2008).
40. Gupte A., Boshoff H. I., Wilson D. J., Neres J., Labello B. P., Somu R. V., Xing C., Barry C. E., Aldrich C. C.: *J. Med. Chem.* 51, 7495 (2008).
41. Mann S., Ploux O.: *FEBS J.* 273, 4778 (2006).
42. Nathan C., Gold B., Lin G., Stegman M., de Carvalho L. P. S., Vandal O., Venugopal A., Bryk R.: *Tuberculosis* 88, S25 (2008).
43. Ma Y. F., Stern R. J., Scherman M. S., Vissa V. D., Yan W. X., Jones V. C., Zhang F. Q., Franzblau S. G., Lewis W. H., McNeil M. R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1407 (2001).
44. Babaoglu K., Page M. A., Jones V. C., McNeil M. R., Dong C. J., Naismith J. H., Lee R. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3227 (2003).
45. Pathak A. K., Pathak V., Seitz L. E., Suling W. J., Reynold R. C.: *J. Med. Chem.* 47, 273 (2004).
46. Barrow E. W., Westbrook L., Bansal N., Suling W. J., Maddry J. A., Parker W. B., Barrow W. W.: *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 801 (2003).