

Kam směřuje vývoj nových antituberkulotik? Část 2 – Hodnocení *in vitro*

Where does the development of new antituberculosics go? Part 2 – *In vitro* evaluation

Karel Waisser

Došlo 6. prosince 2013 / Přijato 18. prosince 2013

Souhrn

Článek pokračuje v publikaci z roku 2012 (Čes. slov. Farm. 2012; 31, 150–158). Je orientován na hodnocení potenciálních antituberkulotik *in vitro*, což je nejčastější přístup testování. Článek je založen na informacích z téměř 3000 informací pro pomoc výzkumníkům. Největší pozornost je věnována multirezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Hodnocení *in vitro* pro vývoj nových léčiv je velmi důležité, avšak je to jen první část cesty k novým léčivům.

Klíčová slova: antituberkulotika • hodnocení *in vitro* • multirezistentní kmeny

Summary

The present paper is a continuation of a publication of 2012 (Čes. a slov. Farm. 2012; 31, 150–158). It is oriented at the evaluation of potential antituberculosics *in vitro*, which is the most widely used approach to testing. The paper is based on the information from *Chemical Abstracts* 2011–2013. It is a selection from nearly three thousand items of information intended to help researchers. The greatest attention is paid to the multiresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *In vitro* evaluation for the development of new drugs is of great importance, but it is just the first stretch of the road to new medicinal drugs.

Keywords: antituberculosics • *in vitro* evaluation • multiresistant strains

Úvod

V předešlé práci jsme ukázali, kam směřuje vývoj nových antituberkulotik¹⁾. Dříve se předpokládalo, že okolo roku 2000 tuberkulóza zanikne ve vyspělé části světa. Tehdy vycházelo méně než 1000 prací ročně. Potenciální antituberkulotika tehdy bylo možné registrovat a rozřadit podle jejich struktury. Tak vznikla série přehledných referátů pod názvem „Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik za posledních 15 let“^{2–8)}, která udávala přehled výzkumu tehdejší doby. Prognóza o zániku onemocnění nebyla však správná. Pro nesmírný nárůst počtu onemocnění se vývoj antituberkulotik stal jedním ze stěžejních zájmů farmaceutického výzkumu. Změnu způsobil vznik rezistentních kmenů, na růstu onemocnění se podílela také nemoc HIV a klesající imunita populace léčené od dětských let antibiotiky. Evidenční růstu vědeckých prací je uvedena v předchozím sdělení¹⁾. Rostoucí počet vědeckých prací dále pokračuje. Pouze za rok 2012 jich bylo uveřejněno více než 3400. Za současné situace již není možné k registraci prací přistupovat dřívějším způsobem.

Hodnocení v České republice a Slovenské republice

V předchozím referátu jsme zcela ignorovali hodnocení *in vitro*, které je nejrozšířenější (ročně čítá několik tisíc sdělení). K hodnocení postačí běžně vybavená mikrobiologická laboratoř. Je to prakticky jediný způsob používaný v České republice a ve Slovenské republice. Sledování antimykobakteriální aktivity se provádí na živých kapalných nebo pevných půdách (v České republice a v Slovenské republice se nejčastěji používá Šulova kapalná půda, která je dostupná komerčně). Při sledování se hledají minimální inhibiční koncentrace látek (MIC), což jsou koncentrace, které způsobí inhibici růstu sledovaných bakterií. Odečtu předchází doba inkubace za standardních podmínek, nejčastěji v případě pomalu rostoucích mykobakterií je to doba 14 dní (méně často 1 týden) při 37 °C. Mikrobiologové vždy postupují tak, že roztok nejvyšší koncentrace studované látky ředí postupně v určitém poměru (např. 1 : 1 nebo 1 : 2 či

prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc. (✉)
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové
e-mail: waisser@faf.cuni.cz

1 : 3). Za minimální inhibiční koncentraci považují hraniční hodnotu intervalu v použité stupnici ředění. V našich laboratořích používáme molární koncentrace ($\mu\text{mol/l}$), většina laboratoří převážně používá váhové koncentrace ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Náš způsob je vhodnější pro následné studie QSAR, protože vystihují efekty stejných počtů molekul. Při váhových koncentracích některá pracoviště provádějí následné přepočty na molární koncentrace. Je to však správné pouze ve skupinách látek podobné molekulární hmotnosti, jinak rozdíl molární hmotnosti nepříznivě ovlivní výpočet. V QSAR studiích se vždy pracuje s log MIC nikoliv s vlastními MIC. Mikrobiologové pokládají hraniční hodnotu intervalu za vlastní minimální inhibiční koncentraci. Lze však předpokládat, že vlastní inhibiční koncentrace se nachází uvnitř intervalu odpovídajícímu postupu ředění. Lze dokázat, jak je velký tento interval, jehož velikost závisí na způsobu ředění. Velikost tohoto intervalu lze vypočítat⁹⁻¹¹). Pro postup ředění 1 : 1 v logaritmické stupnici je 0,3. V našich studiích převážně spojujeme hodnocení antimykobakteriální aktivity se studiemi QSAR. Studie QSAR poskytují perspektivu strukturních variací.

Z jiných, méně běžných způsobů vyjádření antimykobakteriální aktivity je to průměr zóny na pevném mediu a nebo % inhibice.

V další části referátu jsme se snažili ukázat nejdůležitější práce. Dnes je hlavním zaměřením hledání látek proti multirezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*.

Antituberkulotika při kultivacích *in vitro*

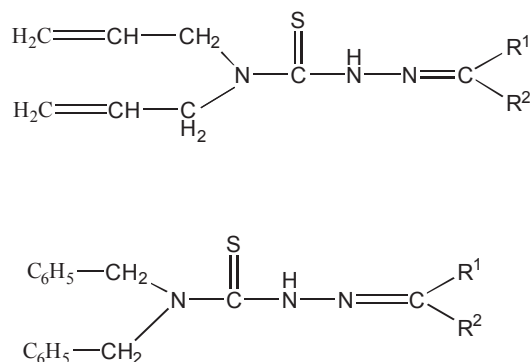
V České republice a Slovenské republice se do současné doby hodnocení provádí *in vitro*. Je to nejčastější a nejlevnější způsob. K vývoji léčiva je třeba ještě mnoho dalších kroků. Snad proto se nedostala v České republice a Slovenské republice žádná naše antituberkulotika do praxe, i když zde jsou početné výzkumné skupiny. V současné době se poslední děkan Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové (prof. A. Hrabálek) snaží dovést výzkum do perspektivní fáze. Ve spolupráci s Centrem biologické ochrany v Těchoníně v Orlických horách bude výzkum nejúspěšnějších látek prováděn na zvířatech (*in vivo*).

V našem článku z tisíce prací o hodnocení *in vitro* potenciálních antituberkulotik jsme dali přednost sdělením zaměřeným na potenciální léčiva proti multirezistentním kmenům. Tím končíme studii, která začala v předchozím sdělení¹). Multirezistentní kmeny *M. tuberculosis* jsou nejnebezpečnější mykobakterie. Onemocnění často mají fatální konec. Minulé sdělení bylo věnováno různým metodám výzkumu (hodnocení *in vivo*, QSAR, metody opírající se o biochemické pochody v mykobakteriích) a zcela záměrně bylo vynecháno hodnocení *in vitro*¹). V této části chceme tento nedostatek odstranit. Zaměřili jsme se na pochody *in vitro* a zvláštní pozornost jsme věnovali jejich orientaci proti multirezistentním kmenům.

Protituberkulózní aktivita thiosemikarba-

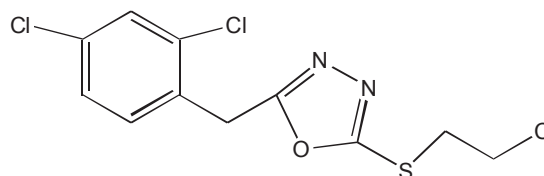
zonů je známá dlouho. V poslední době byla u některých derivátů nalezena aktivita proti multirezistentním kmenům¹²). Studie ukazuje, že by se jim měla ještě věnovat pozornost. Na obrázku 1 R^1 je H nebo CH_3 , R^2 je fenyl, substituovaný fenyl, substituovaný furyl nebo ethyl.

V naší pracovní skupině jsme studovali aktivitu isothiosemikarbazonů.



Obr. 1. Thiosemikarbazony účinné proti multirezistentním kmenům

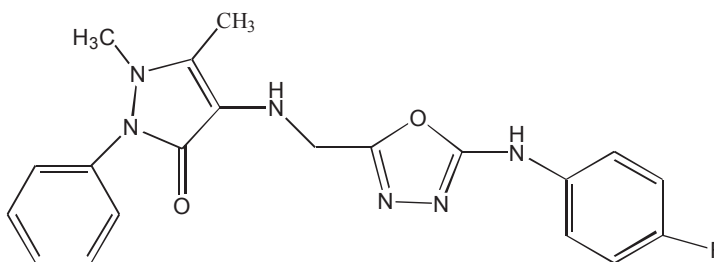
Častými studovanými sloučeninami pro aktivitu vůči multirezistentním kmenům byly heterocykly. 2,5-disubstituované oxadiazoly byly účinné i vůči extrémně rezistentním kmenům (XDR)¹³) (obr. 2).



Obr. 2. Příklad účinného 2,5-disubstituovaného oxadiazolu

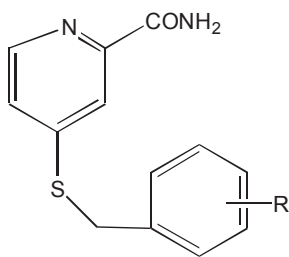
Naproti tomu deriváty 1,5-dimethyl-2-fenyl-4-([5-(arylamino)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methylamino)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-onu (obr. 3) nejsou považovány za látky proti MDR kmenům, i když působí proti rezistentním kmenům vůči INH¹⁴). Aby byly látky řazeny do skupiny sloučenin působících proti multirezistentním kmenům řady MDR, muselo by být zjištěno působení také proti kmenům rezistentním k rifampicinu.

Ve vývoji látek aktivních proti multirezistentním kme-



Obr. 3. Struktura nejúčinnější látky ve sledované skupině derivátů 1,5-dimethyl-2-fenyl-4- ([5-(arylamino)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methylamino)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-onu

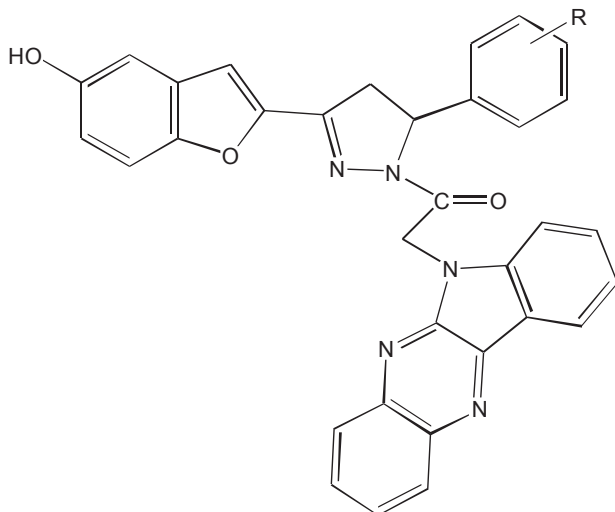
nům se uplatňovaly i některé heterocyklické sloučeniny se šestičlenným heterocyklem. Jako příklad si uvedeme deriváty 4-(substituovaného benzylsulfanyl)pyridin-2-karboxamidu (obr. 4)¹⁵.



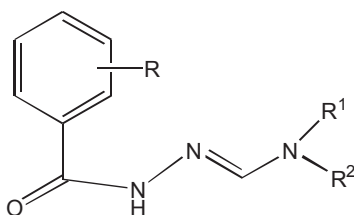
Obr. 4. Deriváty benzylsulfanylpyridin-2-karboxamidu

Skupinu R tvořily H, 3-Cl, 4-Cl, 3-F, 4-F, 3-Br, 4-Br, 3-CH₃, 4-CH₃, 3-CF₃, 4-CF₃, 3-CN, 3-OCH₃, 4-NO₂, 3,5-(NO₂)₂. Je to příklad přístupu, kde se syntetizuje skupina látek a hledá se směr k nejučinnější.

Uvedeme si další příklad složitějších sloučenin (obr. 5 a 6)¹⁶. Tyto studie jsou však hodnotnější, protože po hodnocení *in vitro* přistupuje k hodnocení *in vivo*. Podobné studie nebyly v České a Slovenské republice po odchodu Odlerové z Ústavu preventivního lékařství možné provést.



Obr. 5. Příklad spojení studie *in vitro* a *in vivo*. R je *o*-OH, *p*-OH, *o*-OCH₃, *p*-OCH₃, *p*-N(CH₃)₂, *o*-COOH, *m*-NO₂, *o*-NO₂, *o*-OH a současně *p*-OCH₃, *p*-Cl, *o*-Cl, H, furyl, CH=C^H-Aryl



Obr. 6. Antimykobakteriálně aktivní hydrazony (aktivní vůči MD). Skupina je velmi početná. Jako substituenty obsahují řadu různých strukturních částí.

Z uvedených ukázek je vidět, že se jedná o látky rozličných struktur, od velmi jednoduchých, po značně složitě, u kterých jsou úspěchy spojeny s náročnými syntézami¹⁸.

Pohled na výzkum Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy

Výzkum nových potenciálních antituberkulotik na Farmaceutické fakultě UK má dlouhou tradici. Tématika navázala na předchozí studie z Farmaceutické fakulty UK v Bratislavě a lze tedy říci, že v Hradci Králové uvedená témata existuje již od vzniku fakulty v roce 1969. Kromě období, kdy hodnocení prováděla Odlerová, vycházely studie pouze z testů prováděných *in vitro*. V antimykobakteriálním hodnocení se střídaly různé týmy, např. Státní zdravotní ústav v Praze a Regionální zdravotní ústav v Ostravě. Poslední pracoviště bylo spojeno se jménem Kaustová. V současné době hodnocení *in vitro* látek proti multirezistentním kmenům provádí J. Stolaříková. Výstupem bývala publikační sdělení ve převážně významných vědeckých časopisech, která jsou často citována. Publikovaná sdělení nelze však patentově chránit. Význam studií byl proto jen teoretický. V posledních letech testy bývaly zaměřeny i na multirezistentní mykobakterie. Na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové probíhaly návrhy struktur a syntetické přípravy látek. Zaměření na multirezistentní kmeny mykobakterií je většinou spojeno se jmény Vinšová, Vávrová, Hrabálek, Klimešová a Krátký. Uvádím jen některé odkazy na práce uveřejněné v poslední době^{17, 19}. Vinšová a Krátký jsou autory monografie o vývoji multirezistentních mykobakterií²⁰.

Omezený přístup na hodnocení *in vitro* vysvětluje, proč se žádná ze syntetizovaných látek v Hradci Králové neprosadila do praxe. Byla však podána řada československých a českých patentů. Tuto situaci chce změnit bývalý děkan fakulty (prof. A. Hrabálek). Dohodl se s Centrem biologické ochrany o hodnocení nejvýznamnějších látek přístupem *in vivo* (na pokusných zvířatech) a stanovení i toxicity sloučenin. Na tuto spolupráci dostal i finanční dotaci.

Závěr

Na závěr článku uzavírá odpověď na otázku, kam směřuje vývoj současných antituberkulotik. V minulém sdělení jsme uvedli nové metodiky a záměrně jsme vynechali hodnocení *in vitro* (pro rozsáhlé zastoupení). V posledních letech je výzkum směřován proti multirezistentním mykobakteriím. Multirezistentní bakterie označované MDR jsou rezistentní vůči nejdůležitějším protituberkulózním léčivům, INH a rifampicinu. Pokud jsou dále také rezistentní i proti fluorovaným chinolinům, označují se XDR (extrémně rezistentní). Byl nalezen kmen vzdorující všem soudobým léčivům, označuje se TDR (totálně rezistentní kmen). Na onemocnění vyvolané těmito bakteriemi se převážně umírá. Při sledování směru vývoje výzkumu musíme přihlídnout i k tomuto faktu. Lze však říci, že hodnocení *in vitro* je úvodem ke studiím. Od uzavření laboratoře Odlerová nebylo v České a ve Slovenské republice možné dále postupo-

vat. Nyní se Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové snaží situaci zlomit a umožnit vývoj nových léčiv. Přehled ukazuje, že katedra má pod vedením A. Hrabálka mnoho vyspělých pracovníků, kteří pracují ve významném směru vývoje antituberkulotik. Lze ještě dodat, že i český patent je bezcenný, protože látka je veřejně přístupná pro celý svět kromě České republiky, a patentování látek celosvětovým (nebo evropským) patentem je velice nákladné. Rozšíření českého patentu na evropský nebo světový je možné pouze do jednoho roku po přijetí českého patentu. Vývoj nového léčiva trvá přibližně 10 let. Největší náklady připadají na farmakologii s prokázáním nezávadnosti preparátu. Vývoj často vyžaduje zahraničního sponzora. Můžeme jen přát kolektivu prof. Hrabálka, aby dosáhl úspěchu. Tímto referátem končí přehled studií o vývoji látek proti tuberkulóze. Věříme, že budoucnost v České republice bude patřit prof. Hrabálkovi a jeho spolupracovníkům.

Střet zájmů: žádný.

Literatura

1. **Waisser K.** Kam směřuje vývoj antituberkulotik? Čes. slov. Farm. 2012; 61(4), 150–152.
2. **Waisser K., Holý P., Bureš O.** Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupiny derivátů pyridinu. Čes. a slov. Farm. 2000; 49(5), 211–220.
3. **Waisser K., Holý P., Bureš O.** Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupiny monocyklických šestičlenných heterocyklických sloučenin o více atomech dusíku. Čes. slov. Farm. 2000; 49(6), 268–277.
4. **Waisser K., Bureš O., Holý P.** Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupiny ortokondenzovaných heterocyklických sloučenin. Část 1. Látky obsahující v šestičlenném kruhu jeden heteroatom. Čes. slov. Farm. 2001; 50(4), 159–165.
5. **Waisser K., Bureš O., Holý P.** Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupiny ortokondenzovaných heterocyklických sloučenin. Část 2. Látky obsahující v šestičlenném kruhu více atomů dusíku. Čes. slov. Farm. 2001; 50(5), 211–218.
6. **Waisser K., Bureš O., Holý P.** Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupiny ortokondenzovaných heterocyklických sloučenin. Část 3. Látky obsahující v šestičlenném kruhu více druhů heteroatomů. Čes. slov. Farm. 2001; 50(6), 267–273.
7. **Waisser K., Dražková K.** Pokroky ve vývoji antituberkulotik neobsahujících heteroatomy ve farmakoforu. Část 1. Deriváty karboxylových kyselin. Čes. slov. Farm. 2003; 52(6), 77–81.
8. **Waisser K., Dražková K.** Pokroky ve vývoji antituberkulotik neobsahujících heteroatomy ve farmakoforu. Část 2. Ostatní deriváty kromě karboxylových kyselin. Čes. slov. Farm. 2004; 53(3), 124–130.
9. **Waisser K.** Vyhodnocování mikrobiologických dat a kvantifikace vztahů mezi strukturou a aktivitou. In: Kohout L., Holý A. (ed.) Chemie a léčiva. Praha: ÚOChB ČSAV 1989; 268–395.
10. **Waisser K.** Methodic questions of QSAR. III. Quantification of antibacterial activity. Folia Pharmaceutica Univ. Carol. 1992; 16, 39–42.
11. **Waisser K.** Použití QSAR při vývoji antituberkulotik. Českoslov. Farm. 1990; 42(5), 223–227.
12. **Sriram D., Banerjee D., Varuna T. S. T. V., Sankar M., Yogeeswari P.** Novel antitubercular allyl/dibenzylthiosemicarbazones endowed with high activity toward multi-drug resistant tuberculosis. Med. Chem. Res. 2012; 21, 810–815.
13. **Bakar R. L., Gattani S. G.** Identification and development of 2,5-disubstituted oxadiazole as potential candidate for treatment of XDR and MDR tuberculosis. Eur. J. Med. Chem. 2012; 47, 278–282.
14. **Ahsan M. J., Samy J. G., Jain Ch. B., Dutt K. R., Khalilullah H., Nomani M. S.** Discovery of novel antitubercular 1,5-dimethyl-2-phenyl-4-((5-(arylamino)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methylamino)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one analogues. Bioorg. Med. Chem. Letters 2012; 22, 969–972.
15. **Klímešová V., Herzigová F., Palát K., Macháček M., Stolaříková J., Dahse H.-M., Möllmann U.** The synthesis and antimycobacterial properties of 4-(substitutedbenzylsulfanyl)pyridine-2-carboxamides. ARKIVOC 2012, Part 3, pp. 90–103; <http://www.arkat-usa.org/get-file/42667/> (accessed 2012-01-21).
16. **Manna K., Agreval K.** Potent in vitro and in vivo antitubercular activity of certain newly synthesized indophenazine 1,3,5-trisubstituted pyrazoline derivatives bearing benzofuran. Med. Chem. Res. 2011; 20, 300–306.
17. **Vavříková E., Polanc S., Kočevár M., Horváti K., Böse S., Stolaříková J., Vávrová K., Vinšová J.** New fluorine-containing hydrazones active against MDR-tuberculosis. Eur. J. Med. Chem. 2011; 46, 4937–4945.
18. **Kumar P., Singh A., Snarma U., Singh D., Dobhal M. P., Singh S.** Anti-mycobacterial activity of plumericin and isoplumericin against MDR *Mycobacterium tuberculosis*. Pharmac. Pharmacol. and Therapeutics 2013; 26, 332–335.
19. **Krátký M., Vinšová J., Stolaříková J.** Antimycobacterial assessment of salicylanilide benzoates including multidrug-resistant tuberculosis strains. Molecules 2012; 17(11), 12812–12820.
20. **Vinšová J., Krátký M.** Development of new MDR tuberculosis drugs. New York: Nova Biomedical 2010.