

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

**Virtuální screening
s využitím
molekulového dokování**

Diplomová práce

ANNA LYSKOVÁ

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Jiří Václavík, Ph.D.

Ústav přírodních léčiv
Program Farmacie

Brno 2023

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor:	Anna Lysková Farmaceutická fakulta Masarykova univerzita
Název práce:	Virtuální screening s využitím molekulového dokování
Studijní program:	Farmacie
Vedoucí práce:	Mgr. Ing. Jiří Václavík, Ph.D.
Rok:	2023
Počet stran:	100
Klíčová slova:	virtuální screening, molekulové dokování, design léčiv, polyketide synthase 13, antituberkulotika, in silico, farmakoforové modelování, optimalizace ligandů

Bibliographic record

Author: Anna Lysková
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Natural Drugs

Title of Thesis: Virtual screening using molecular docking

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: Mgr. Ing. Jiří Václavík, Ph.D.

Year: 2023

Number of Pages: 100

Keywords: virtual screening, molecular docking, drug design, polyketide synthase 13, antituberculotics, in silico, pharmacophore modelling, ligand optimization

Anotace

Tato práce se zabývá využitím virtuálního screeningu a molekulového modelování k identifikaci potenciálních inhibitorů enzymu Pks13, který má podstatnou úlohu v metabolismu *Mycobacterium tuberculosis*. Práce využívá molekulové dokování a farmakoforové modelování jako klíčové nástroje pro identifikaci a optimalizaci potenciálních inhibitorů enzymu Pks13. Výstupem této práce je analýza vazebné energie mezi ligandy a aktivním místem enzymu Pks13, která byla získána pomocí molekulového modelování.

Abstract

This thesis focuses on the use of virtual screening and molecular modeling to identify potential inhibitors of the enzyme Pks13, which plays an essential role in the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. This work uses molecular docking and pharmacophore modeling as key tools for the identification and optimization of potential inhibitors of the Pks13 enzyme. The output of this work is an analysis of the binding energy between ligands and the active site of the Pks13 enzyme, which was obtained by molecular modeling.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Virtuální screening s využitím molekulového dokování** zpracovala sama. Veškeré prameny a zdroje informací, které jsem použila k sepsání této práce, byly citovány v textu a jsou uvedeny v seznamu použitých pramenů a literatury.

V Brně 21. dubna 2023

.....
Anna Lysková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce Mgr. Ing. Jiřímu Václavikovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, obětavou pomoc, vřelý přístup a podnětné rady při zpracování této práce.

Obsah

Seznam obrázků	13
Seznam tabulek	16
Seznam pojmů a zkratk	17
1. Úvod a cíl práce	19
2. Teoretická část	20
2.1 Vývoj nového léčiva.....	20
2.2 Virtuální screening.....	21
2.3 Molekulové dokování.....	24
2.4 Hodnocení farmakokinetických vlastností	26
2.5 Tuberkulóza a antituberkulotika	28
2.6 Buněčná stěna <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
2.7 Polyketide synthase 13 (Pks13, „polyketidová syntáza“)	34
3. Praktická část	40
3.1 Hardware a software.....	40
3.1 Cíl experimentální části.....	40
3.2 Virtuální screening.....	41
3.3 Zkoušené látky	48
3.4 Nové inhibitory Pks13	53
3.5 Optimalizace ligandů.....	64
3.6 Návrh syntézy sloučenin.....	80
Diskuze	86
Závěr	87
Použité zdroje	89
Příloha A Přiřazení ZINC ID k ligandům	97

Seznam obrázků

Obr. 1 Odhadovaná míra výskytu tuberkulózy v roce 2020 [20].	28
Obr. 2 Struktura TAM16. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	35
Obr. 3 Thiofen. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	36
Obr. 4 Struktura Tetrahydrolipstatinu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	36
Obr. 5 Základní struktura kumestanu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	37
Obr. 6 Struktura chromonu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	38
Obr. 7 Struktura (-)-cubebin. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	39
Obr. 8 Enzym Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	41
Obr. 9 Ligand TAM16. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	41
Obr. 10 Základní struktura ligandu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	42
Obr. 11 Farmakofor TAM 16 získaný v programu ZINCPharmer [10].	43
Obr. 12 Validace výsledku (PyRx)	44
Obr. 13 Validace výsledku. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	44
Obr. 14 Vazba TAM16 v rámci enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	45
Obr. 15 Vazba TAM 16. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	45
Obr. 16 Radar biologické dostupnosti [56]	46
Obr. 17 Zkoušené ligandy. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	50
Obr. 18 Vazba ligandů v enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	51
Obr. 19 Radar biologické dostupnosti základní struktury [60].	53
Obr. 20 Struktury zkoušených ligandů. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	58
Obr. 21 Pozice zkoušených ligandů v enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].	60
Obr. 22 Pyrido[5,4-b]indol. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	61
Obr. 23 Pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dione. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	61
Obr. 24 Místo zavedení substituentů. Byl zkoumán vliv skupiny R na výslednou vazebnou energii Tab. 7. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	64
Obr. 25 Struktura ligandu o vazebné energii -10,6 kcal/mol= 9-[(piperidin-1-yl)methyl]-5-(propan-2-yloxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-on a vazba tohoto ligandu (žlutá barva) s tam16 (červená barva).	67
Obr. 26 Místo zavedení substituentů. Byl zkoumán vliv skupiny R na výslednou vazebnou energii. Vytvořeno v MarvinSketch [38].	68

- Obr. 27 Struktura ligandu o vazebné energii -10,7 kcal/mol= 4-methyl-9-[(piperidin-1-yl)methyl]-7H-furo[3,2-g]chromen-7-on a vazba tohoto ligandu (žlutá barva) s tam16 (červená barva). 71
- Obr. 28 Obr. 28 Ligand 7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin, R znázorňuje místo substituce viz Tab. 9. Vytvořeno v MarvinSketch [38]. 72
- Obr. 29 Pozice ligandu 9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin v enzymu Pks13. Původní ligand tam 16 je znázorněn růžově a ligand 9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin žlutě. Vytvořeno v programu PyMOL [55]. 75
- Obr. 30 Ligand 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin, R znázorňuje místo substituce. Vytvořeno v MarvinSketch [38]. 76
- Obr. 31 Pozice ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin v enzymu Pks13. Původní ligand tam 16 je znázorněn růžově a ligand 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin žlutě. Vytvořeno v programu PyMOL [55]. 79
- Obr. 32 Ukázka syntézy 6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin pomocí nukleofilní substituční reakce. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38]. 80
- Obr. 33 Návrh syntézy 6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin ve dvou krocích. V prvním je nukleofilní substituční reakce a v druhém kroku Williamsonova syntéza etherů. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38]. 81
- Obr. 34 Návrh syntézy ligandu 6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluormethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin nukleofilní aromatickou substitucí. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38]. 82
- Obr. 35 Návrh syntézy ZINC05926594 82
- Obr. 36 Návrh syntézy ligandu 6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluormethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin. První krokem syntézy je nukleofilní aromatická substituce a druhým krokem je Friedelova-Craftsova methylace. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38]. 83
- Obr. 37 Návrh syntézy ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin nukleofilní aromatickou substitucí. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38]. 84

Obr. 38 Syntéza ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin. První krokem je nukleofilní aromatická substituce a druhým krokem je Friedelova-Craftsova methylace. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].....	85
---	----

Seznam tabulek

Tab. 1 Vyjádření a popis fyzikálně chemických hodnot.....	47
Tab. 2 Lipinského pravidlo pěti.....	48
Tab. 3 Výsledná vazebná energie.....	51
Tab. 4 Hodnocení fyzikálně chemických vlastností.....	52
Tab. 5 Výsledek vazebné energie.....	60
Tab. 6 Výsledky fyzikálně chemických vlastností.....	63
Tab. 7 Výsledky vazebné energie druhé substituce.....	67
Tab. 8 Výsledky vazebné energie.....	71
Tab. 9 Výsledky vazebné energie.....	75
Tab. 10 Výsledky vazebné energie	79

Seznam pojmů a zkratk

Pks13	- Polyketide Synthase 13
CADD	- Computer Aided Drug Design, počítačový návrh léčiv
HTS	- High Throughput Screening, vysoce výkonnostní screening
TP	- true positives, skutečně pozitivní
FP	- false positives, falešně pozitivní
FN	- false negatives, falešně negativní
TN	- true negatives, skutečně negativní
VS	- virtuální screening,
SBDD	- structure-based drug design; návrh léčiv založený na struktuře
LBDD	- ligand-based drug design; návrh léčiv založený na ligandu
QSAR	- quantitative structure-activity relationship; kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou
NMR	- nuclear magnetic resonance; nukleární magnetická rezonance
PDB	- Protein Data Bank
ADME	- absorption, distribution, metabolism, and excretion; absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování
RO5	- rule of five, pravidlo pěti
logP	- octanol-water partition coefficient; rozdělovací koeficient oktanol/voda
HBD	- hydrogen bond donors, donory vodíkových vazeb
HBA	- hydrogen bond acceptors, akceptor vodíkových vazeb

SEZNAM POJMŮ A ZKRATEK

PG	- peptidoglykanu
AG	- arabinogalaktan
THL	- tetrahydrolipstatin

1. Úvod a cíl práce

Virtuální screening je v současné době důležitou metodou pro objevování nových potenciálních léčiv a má široké využití v oblasti farmacie. Jedná se o in silico metodu, která umožňuje identifikovat molekuly s potenciálním léčebným účinkem ze stovky tisíc až milionů molekul.

Cílem této práce je zkoumání potenciálních látek, které by mohly být použity proti *Mycobacterium tuberculosis*, bakterii způsobující tuberkulózu. Práce je zaměřená na enzym Pks13, který hraje důležitou roli v biologii této bakterie. Enzym Pks 13 (Polyketide Synthase 13) je klíčový pro syntézu mykolátů, které jsou hlavní složkou mykobakteriální buňčné stěny a zajišťují její stabilitu a odolnost.

Teoretická část je zaměřená na metody virtuálního screeningu, a jejich možnosti využití v rámci vývoje nových léčiv. Následně je zde nastíněna problematika tuberkulózy, možnosti terapie, rezistence na antibiotika a důležitost vývoje nových antituberkulotik. Dále je zde blíže popsán enzym Pks13 a jeho úloha v životnosti bakterie. Jsou zde popsány inhibitory tohoto enzymu.

Cílem praktické části je najít látky s vysokou afinitou pro Pks13, které by mohly být potenciálně využity jako inhibitory tohoto enzymu. V práci jsou použity některé in silico metody: molekulového modelování pomocí programu Pyrx, farmakokinetické hodnocení sloučenin v online programu SwissADME, optimalizace ligandů pomocí softwaru DeepFrag a návrh chemické syntézy sloučenin v programu MANIFOLD PostEra.

2. Teoretická část

2.1 Vývoj nového léčiva

Vývoj a výzkum nových léčiv, je velice nákladným a složitým procesem. Dle dostupných statistických dat, činí náklady na vývoj léčivého přípravku s novou účinnou látkou 800 mil. USD, současně doba vývoje je obvykle kolem deseti let. Příčinou takto vysokých nákladů je jednak výzkum a práce vynaložená na vyhledání nových použitelných molekul, jednak výdaje na preklinický výzkum, na klinické studie i na zavedení nového léčiva na trh [1]. Možnost využití moderních výpočetních technologií poskytuje velice podnětné informace o strukturách látek potencionálních léčiv, ale také usnadňuje efektivitu celého procesu, pomáhá snižovat finanční náklady a v neposlední řadě celý proces zrychluje [2].

Uvádí se, že do léčebné praxe je zavedena pouze jedna látka z 5000-10000 syntetizovaných látek [1].

Většina látek s potencionálním terapeutickým účinkem byla nalezena jedním z níže uvedených postupů:

- modifikací chemické struktury již známého léčiva
- vyhledáváním přírodních látek a jejich širokým farmakologickým testováním
- cílenou syntézou látek, jejichž struktura byla navržena na základě porozumění biologickým mechanismům účinku [1]

Snaha snížit náklady na výzkum a vývoj vedl k významnému rozvoji metod počítačového návrhu léčiv (angl. Computer Aided Drug Design, CADD). Po mnoha letech vývoje těchto metod, je zřejmé, že CADD nikdy zcela nenahradí in vitro a in vivo metody, i tak se jedná o velmi užitečný nástroj při vývoji nových léčiv [3].

Při hledání biologicky aktivních látek, se především využívá technologie vysoce výkonnostního screeningu (HTS, angl. High Throughput Screening). Přínos HTS spočívá v tom, že nevyžaduje apriorní znalost mechanismu působení, a dává tak možnost testovat chemicky rozmanité látky. Avšak limitujícím faktorem je nízký počet nalezených biologicky aktivních látek vzhledem k celkové velikosti testované chemické knihovny, což je známé jako "hit rate". A zde nachází uplatnění tzv. virtuální screening, jedná se o metodu, která umožňuje významně snížit počet látek, které je nutno experimentálně testovat [3].

Hlavním cílem CADD je především nalezení takové látky, která jakožto ligand je schopná interakce se specifickým biologickým cílem (receptorem), a vzniklá vazba zapříčiní žádoucí biologickou odpověď v terapii daného onemocnění [2].

Navrhování léčiv za využití CADD se stalo nepostradatelnou součástí moderního vývoje a výzkumu léčiv. Výpočetní technologie lze použít v různých stádiích celého procesu, ale majoritní úlohu sehrává především v prvních fázích výzkumu, a to při charakterizaci aktivního místa, validaci biologického cíle, prohledávání v databázích, identifikací „hit“ struktur (bioaktivních sloučenin, které ve specifickém testu vyvolávají pozitivní odpověď), optimalizaci vůdčích tzv. „lead“ struktur (bioaktivních sloučenin nadále vykazujících pozitivní odpověď v závislosti na dávce i ve složitějších testovacích modelech), a také při predikci farmakokinetických a farmakodynamických vlastností látek [2].

2.2 Virtuální screening

Jak již bylo zmíněno, do léčebné praxe je zavedena pouze jedna látka z 5000-10000 syntetizovaných látek. Právě virtuální screening umožňuje snížit počet látek, které je nutno experimentálně testovat. Virtuální screening má za cíl získat z velké chemické knihovny menší soubor látek s potenciální aktivitou, které je poté možné experimentálně ověřit [3].

Cílem je vyhledat z chemických knihoven co největší množství látek, které jsou označeny za skutečně pozitivní (TP, angl. true positives). Skutečně pozitivní látky jsou ty, které jsou po následném experimentálním testování opravdu aktivní. Jelikož se jedná spíše o počítačový odhad, který není nikdy stoprocentní, je nutno počítat rovněž s látkami, které jsou po experimentálním ověření neaktivní (FP, angl. false positives). FP nepředstavují velké omezení, i když jejich přítomnost navyšuje finanční a časovou náročnost procesu. Větší riziko představují falešně negativní látky (FN, angl. false negatives). Jedná se o látky, které jsou sice aktivní, ale nejsou počítačovou metodou odhaleny, a tak nejsou dále experimentálně testovány a jsou tak ztraceny. Poslední skupinu představují negativní látky (TN, angl. true negatives), které jsou neaktivní a VS metoda je za neaktivní skutečně označí [3].

Metody virtuálního screeningu lze rozdělit do dvou základních kategorií: virtuální screening založený na struktuře (SBVS, angl. Structure based virtual screening) a virtuální screening založený na ligandech (LBVS, angl. Ligand based virtual screening). SBVS je účinnější při vyhledávání nových chemických skeletů a mnohem častěji se využívá v akademických laboratořích. Pokud jsou dostupné informace o cílové struktuře, je velmi užitečný. Cílovou biologickou strukturu lze zvolit z rentgenové krystalografie a vyřešených struktur NMR. Metody LBVS používají informace o struktuře a aktivitě známých aktivních látek s cílem identifikovat strukturně odlišné molekuly s podobnou biologickou aktivitou. Mínusem LBVS je, že při vyhledávání molekul má tendenci k přebírání informací, z již existujících ligandů jako šablon, a tím dochází k omezenější diverzitě skeletů ve srovnání se strukturním virtuálním screeningem [4]. Jestliže je známá cílová biologická struktura, a také struktura ligandu, lze tyto přístupy kombinovat.

Pro prioritizaci sloučenin pro následné experimentální ověření, se používá celá řada různě přesných a výpočetně náročných metod, patří zde např. podobnostní metody, kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou látky (QSAR), farmakoforové modelování, molekulové dokování. Ve většině případů se metody nepoužívají osamoceně, ale postupy VS se kombinují [5].

2.2.1 Podobnostní metody

Metody podobnosti jsou založené na principu, který předpokládá, že strukturně podobné látky vykazují obdobné fyzikálně-chemické či biologické vlastnosti. Tyto metody lze využít v oblastech, kde je potřeba vyhledat molekuly s podobnými vlastnostmi. Může se jednat například o vývoj léčiv, u kterých známe biologicky aktivní látku s terapeutickým účinkem, nicméně některé její vlastnosti nejsou vyhovující (rozpuštěnost, toxicita), a tak je nutné hledat strukturně podobnou látku, jež může mít vhodnější vlastnosti [6].

Jedná se o metody založené na molekulárních deskriptorech. Kromě těchto metod existují rovněž přístupy založené na zarovnání molekul, u kterých se porovnávají jejich konformace nebo pole, jež je obklopují. Jedná se o metody vypočteně velmi náročné, ale přináší dobré výsledky [6].

2.2.2 Kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou látky (angl. Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)

Metoda modelování kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou využívá statistické postupy a metody pro analýzu dat za účelem tvorby predikčních modelů, které umožňují predikovat biologickou aktivitu na základě její molekulární struktury.

Metody QSAR lze vyjádřit jako $y = f(x)$, kde y je biologická aktivita, x je sada vypočítaných či naměřených deskriptorů a f je empiricky stanovená matematická funkce.

Cílem QSAR modelování je tedy vyhledání trendů v sadě deskriptorů, které korelují s trendem v biologické aktivitě látky. Tento proces, stejně jako všechny ostatní metody virtuálního screeningu, vychází ze základního cheminformatického konceptu, že „podobné molekuly mívají podobné vlastnosti“ (angl. molecular similarity principle), v tomto případě, že „podobné molekuly jsou schopny působit na podobné biologické cíle“ [7].

2.2.3 Farmakoforové modelování

Dle moderní definice IUPAC je za farmakofor považován soubor sterických a elektronických vlastností, které jsou nezbytné k zajištění optimálních supramolekulárních interakcí se specifickým biologickým cílem a k ovlivnění jeho biologické odpovědi. Farmakofor nepředstavuje skutečnou molekulu nebo skutečné spojení funkčních skupin, ale čistě abstraktní koncept, který popisuje společné molekulární interakční schopnosti skupiny sloučenin vůči jejich cílové struktuře. Farmakofor lze považovat za největší společný jmenovatel sdílený souborem účinných molekul [8].

Farmakofor popisuje strukturní uspořádání základních molekulárních rysů interakce mezi ligandem a jeho receptorem. Vyhledávání v chemických databázích pro látky, které odpovídají určitému farmakoforu, je standardní metodou virtuálního screeningu.

Zásadním úkolem, virtuálního screeningu založeného na farmakoforech, je identifikace vhodného farmakoforu pro interakci, a následné vyhledání sloučenin v příslušné chemické knihovně, které odpovídají tomuto farmakoforu [9].

Mezi programy pro farmakoforové modelování řadíme např. PharmMapper, PharmaGist, Pharmit a ZINCPharmer. ZINCPharmer je bezplatný software pro vyhledávání farmakoforů přímo z molekulární

struktury, následně umožňuje nalezení podobných struktur z databáze ZINC. ZINC je rozsáhlá sbírka komerčně dostupných, biologicky relevantních sloučenin vhodných pro screening. ZINCPharmer využívá open-source software Pharmer, který umožňuje interaktivní vyhledávání více než 176 milionů konformací během několika minut, ne-li sekund. Pokud je k dispozici struktura receptoru i vázaného ligandu, ZINCPharmer automaticky identifikuje interakční farmakofor. Vypočítají se všechny možné prvky farmakoforu na ligandu, ale povolí se pouze ty, které jsou v mezní vzdálenosti od komplementárních prvků na receptoru [10].

2.3 Molekulové dokování

Molekulové dokování hraje významnou úlohu při navrhování nových léčiv. Vzhledem k tomu, že stále více proteinových struktur je určováno experimentálně pomocí rentgenové krystalografie nebo spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR), je molekulární dokování stále častěji využíváno jako nástroj při objevování léčiv. Cílem těchto postupů je predikce způsobu vazby a predikce afinity malé molekuly v rámci vazebného místa cílového receptoru. Dokovací strategie umožňují vypočítat afinitu sloučenin vůči konkrétnímu cíli [11].

Před zahájením samotného dokování je nutné vyřešit některé problémy např: výběr vhodné reprezentace proteinů a ligandů. Stěžejní je především volba vhodné reprezentace proteinu, jelikož jeden protein je mnohdy k dispozici ve více strukturních variantách odlišné kvality, a tak je potřeba vybrat nejvhodnější strukturu pro modelování [12]. 3D strukturu proteinu je možné získat experimentálně rentgenovou krystalografií či NMR spektroskopií.

Protein Data Bank (PDB) nabízí především strukturu získanou rentgenovou krystalografií, která je přesnější a preferovanější. PDB zprostředkovává stálý a odborně spravovaný archiv dat, a tím poskytuje přístupy a metody ke zkoumání, analýze a vizualizaci experimentálně určených 3D struktur proteinů. Zpřístupňuje tak informace o biomolekulární struktuře široké veřejnosti, ať už z řad výzkumných pracovníků, pedagogů, tak také studentů. Založení PDB je datováno do roku 1971 v Brookhavanské národní laboratoři. Jednalo se o první volně dostupný zdroj digitálních dat v biologii [13].

V roce 1998 přešla správa PDB do kompetence Výzkumné kolaborace pro strukturní bioinformatiku (RCSB, angl. Research

Collaboratory for Structural Bioinformatics). Stěžejní vizí RCSB je tvoření zdroje, který je založený na nejmodernějších technologiích, jež zjednodušují využívání a analýzu strukturních dat a usnadní tak biologický výzkum [14].

Web RCSB PDB (RCSB.org) je podporován uživateli z celého světa. Dle Google Analytics navštívilo tyto webové stránky v roce 2021 každý měsíc kolem 757 000 uživatelů, ročně se jednalo o 4,7 milionu návštěvníků [13].

Jestliže není k dispozici 3D struktura proteinu, je možné ji predikovat homologním modelováním, tato metoda využívá předpokladu, že proteiny s podobnou sekvencí budou mít i podobnou strukturu. Jedná se o nepřesnou metodu, a proto je využívána v ojedinělých situacích [15].

V průběhu posledních dvaceti let bylo vyvinuto mnoho dokovacích nástrojů a programů jak pro akademické, tak také pro komerční účely. Mezi tyto programy patří DOCK, AutoDock, FlexX, GOLD, ICM, Glide, CDOCKER, LigandFit, MCDock, FRED, MOE-Dock, LeDock, AutoDock Vina, rDock a mnoho dalších [11].

2.3.1 Principy molekulového dokování

Molekulové dokování lze rozdělit do dvou fází: konformační vyhledávání (conformational sampling) a skórování (scoring).

1. Konformační vyhledávání

Tato fáze se vyznačuje snahou o co nejkompletnější pokrytí možných konformací ve struktuře pomocí algoritmů. Často je nutné zavést pravidla a omezení, jelikož není možné postihnout všechny možné konfigurace biomolekuly a ligandu (tzv. pózy) [12].

2. Skórování

Skórovací funkce jsou nezbytné pro identifikaci pózy, jež je z termodynamického hlediska nejpravděpodobnější. Nicméně díky komplexním termodynamickým dějům, které probíhají během interakce protein ligand, bývá přesné a rychlé vyhodnocení vazebné energie jednotlivých konfigurací značně složité [12]. Změnu volné vazebné energie lze vyjádřit dle vztahu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

ΔG je změna Gibbsovy energie, ΔH je změna entalpie, T je teplota a ΔS je změna entropie. Entalpie představuje vlastnost celého systému, a

kromě změn energie vyplývajících z ne vazebných interakcí mezi ligandem a proteinem zahrnuje také změny, jež jsou zapříčiněné interakcí s rozpouštědlem. Neboť když se ligand naváže dochází také k porušení vodíkových vazeb mezi proteinem a molekulami vody, které se nachází ve vazebném místě. Toto přerušení vazeb, během tvorby komplexu, je spíše nevýhodné, a tak je nutné vazby vykompenzovat jinými interakcemi jako je např. tvorba ne vazebných interakcí s molekulou ligandu. Entropie představuje míru neuspořádanosti systému, jež vzniká (dle druhého termodynamického zákona) přesunem tepla z míst s vyšší teplotou do míst s teplotou nižší [12].

2.4 Hodnocení farmakokinetických vlastností

Pomocí molekulového dokování lze získat látky, které vykazují *in silico* aktivitu vůči vybrané makromolekule. Je však nutné také zhodnotit, jak se budou tyto látky chovat v živém organismu, a jaké budou vykazovat farmakokinetické vlastnosti, jež jsou nezbytné pro výsledný účinek léčiva. Aby byla látka účinná, je nutné, aby se dostala v dostatečné koncentraci k cíli v těle a zůstala zde v bioaktivní formě dostatečně dlouho a mohlo tak dojít k očekávanému biologickému účinku. Při vývoji léčiv je proto nezbytné pamatovat na hodnocení farmakokinetických vlastností: absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování (ADME). Počítačové modely představují platnou alternativu k experimentům [16].

K posouzení fyzikálně-chemických a farmakokinetických parametrů malých molekul, lze využít několik nástrojů. Jedním z těchto webových softwarů, který byl vyvinutý skupinou vědců ze Švýcarského institutu bioinformatiky je SwissADME. Jedná se o nástroj, který je volně přístupný, otevřený, jednoduchý v obsluze, rychlý, spolehlivý a v éře CADD hraje významnou roli. Zahrnuje tedy použití algoritmů s otevřeným zdrojovým kódem a modelů vyvinutých samotnou výzkumnou skupinou, aby byla zajištěna svoboda jeho použití [17].

Predikce farmakokinetických parametrů na základě molekulární struktury je cílem celé řady *in silico* metod. Zde je nutné zmínit práci Lipinského, která zkoumala aktivitu perorálně podávaných látek. Toto tzv. pravidlo pěti vymezilo vztah mezi farmakokinetickými a fyzikálně-chemickými parametry [16].

2.4.1 Lipinského pravidlo pěti

Nepostradatelnou součástí CADD jsou také filtry, jež umožňují vyloučit sloučeniny, které postrádají požadované fyzikálně-chemické či farmakologické vlastnosti. Lipinského pravidlo pěti [18] RO5 (angl. Rule of five) umožňuje predikovat šanci látky stát se léčivem (angl. Drug-likeness). Jedná se o jakési měřítko biologické dostupnosti pro perorálně podávaná léčiva. Jestliže látka splňuje Lipinského pravidlo pěti, má pravděpodobně vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti pro perorální podání. Pokud však látka nespĺňuje 2 a více z těchto parametrů, nebude pro perorální podání příliš vhodná.

Autorem tohoto pravidla byl Christopher Lipinski, který jej odvodil zkoumáním a analýzou distribuce molekulové hmotnosti M_w , logaritmu rozdělovacího koeficientu mezi oktánem a vodou $\log P$, počtu donorů HBD (angl. Hydrogen bond donors) a akceptorů HBA (angl. Hydrogen bond acceptors) vodíkových vazeb u sloučenin z databáze World Drug Index, které prošly minimálně do druhé fáze klinických testů [3] [18]. Dle tohoto pravidla má většina per os podávaných léčiv:

$$M_w < 500 \text{ Da}$$

$$\log P < 5$$

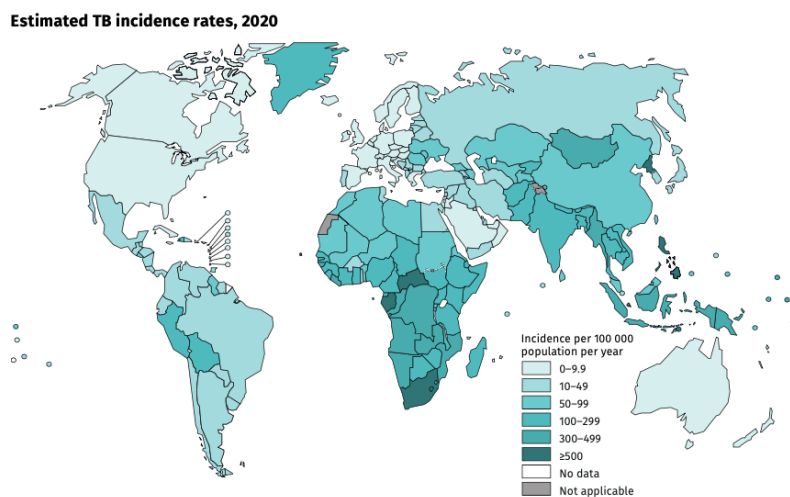
$$\text{HBD} \leq 5$$

$$\text{HBA} \leq 10$$

To, že sloučenina vyhovuje Lipinskému pravidlu pěti, ještě není zárukou úspěšnosti látky. Jedná se spíše o užitečnou nápovědu než jako pevně nastavený filtr. Ostatně kolem 16% orálně dostupných farmak porušuje jedno z Lipinského pravidel a 6% porušuje dvě a více pravidel. Proto se také látky, jež porušují jedno pravidlo považují za drug-like, a látky porušující dvě a více pravidel jsou zpravidla odfiltrovány jako nevyhovující [3].

2.5 Tuberkulóza a antituberkulotika

Tuberkulóza (TBC) patří mezi celosvětově závažné granulomatózní zá-
nětlivé infekční onemocnění. V některých zemích je nejčastější příčinou
úmrtí způsobenou jediným infekčním agens, a to na prvním místě před
HIV. Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje, že v roce 2020
onemocnělo tuberkulózou na celém světě přibližně 10 milionů lidí a mezi
lidmi negativními na virus lidské imunodeficiency (HIV) došlo k 1,3 mili-
onu úmrtí na tuberkulózu a mezi HIV pozitivními pacienty k dalším 214
000 úmrtím [19].



Obr. 1 Odhadovaná míra výskytu tuberkulózy v roce 2020 [20].

TBC je způsobená bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis*, jež se
přenášejí především kapénkami od osoby k osobě při delším kontaktu
s nemocnou osobou, která vylučuje velké množství původce. Pokud je
kontakt s nemocnou osobou krátkodobý, k přenosu onemocnění zpravi-
dla nedojde. Obvykle postihuje plíce, ale může se rozšířit rovněž na po-
kožku, ledviny, klouby, uzliny i jiné části organismu. Značná část lidské
populace zůstává nakažená latentní tuberkulózní infekcí. Latentní tuber-
kulózní infekce je asymptomatická, nepřenosná a u většiny jedinců zů-
stává pod kontrolou. Latentní tuberkulózní infekce je definovaná jako
stav, ve kterém přetrvávají odpovídající na stimulaci antigeny *Mycobacte-
rium tuberculosis*, bez známek klinické manifestace. Tj. jedinec je infiko-
ván *Mycobacterium tuberculosis* nicméně nevykazuje žádné klinické pří-
znaky aktivní tuberkulózy a není pro ostatní osoby nakažlivý. Riziko

rozvoje akutní formy tuberkulózy je nejvyšší 5 let po infekci [21]. Vzácnou formou aktivní tuberkulózy je tzv. miliární tuberkulóza, která může být smrtelná, jelikož se bakterie dostávají do krevního oběhu a v drobných uzlinách se rychle šíří po celém těle a postihují mnoho orgánů najednou [22].

V klinickém obraze tuberkulózy dominuje především únava, slabost, nevykonnost, kašel, hubnutí, noční pocení, subfebrilie až febrilie, hemoptýza. Diagnóza TB je stanovena na základě klinických obtíží, patologického radiologického nálezu a bakteriologického vyšetření sputa nebo jiného materiálu na bacily tuberkulózy, event. histologického nálezu. Po stanovení diagnózy je pacient léčen podle aktuálních doporučení a v závislosti na konkrétním klinickém nálezu [21].

Chudoba a také koinfekce s HIV zhoršuje boj s tímto onemocněním. Majoritním problémem koinfekce HIV a tuberkulózy je především fakt, že virus HIV narušuje imunitní odpověď organismu, a tím aktivuje latentní tuberkulózní infekci a rovněž urychluje progresi onemocnění. Na druhé straně tuberkulóza také zesiluje progresi i účinky HIV [23]. Tzn., že mezi hlavní rizikové faktory vzniku a rozvoje onemocnění patří nárůst HIV pozitivních pacientů, nedodržování zásad pacientem nebo nesprávně zvolená léčba antituberkulotiky lékařem. Mezi další rizikové faktory lze zařadit věk nad 65 let, přidružené choroby a stavy – diabetes mellitus, vředová choroba, chronická renální insuficience, hepatopatie, skolióza, malnutrice, imunoprese, vrozené či získané imunodeficity a rovněž biologická léčba preparáty blokující účinky TNF- α [21].

Většina lidí (asi 90 %), u nichž se onemocnění vyvine, jsou dospělí, přičemž více případů je mezi muži než mezi ženami. *M. tuberculosis* je nakažena přibližně čtvrtina světové populace. TBC je léčitelná a lze jí předcházet. Přibližně 85 % lidí, u nichž se onemocnění TBC rozvine, lze úspěšně léčit šestiměsíčním lékovým režimem. Počet lidí, kteří se nakazí a onemocní (a tím i počet úmrtí způsobených TBC), lze rovněž snížit prostřednictvím opatření zaměřených na řešení faktorů podmiňujících TBC, jako je chudoba, podvýživa, infekce HIV, kouření a cukrovka [24].

Světová zdravotnická organizace (WHO) každoročně zveřejňuje celosvětovou zprávu o tuberkulóze, a to již od roku 1997. Primárním cílem této zprávy je především poskytnout komplexní a aktuální hodnocení stavu epidemie TBC. Součástí je také hodnocení pokroku na úrovni globální, regionální a národní v kontextu globálních závazků, strategií a cílů. Zpráva jako obvykle vychází především z údajů, které WHO nashromáždila v rámci každoročních kol sběru dat. Zpráva za rok 2020 obsahovala

2. TEORETICKÁ ČÁST

předběžné hodnocení dopadu pandemie COVID-19 na služby v oblasti tuberkulózy, zátěž tuberkulózou a pokrok při plnění stanovených cílů.

V letech 2014 a 2015 se všechny členské státy WHO a Organizace spojených národů (OSN) zavázaly k ukončení epidemie tuberkulózy přijetím strategie WHO pro ukončení tuberkulózy a cílů udržitelného rozvoje OSN. Strategie a cíle udržitelného rozvoje zahrnují milníky a cíle pro velké snížení incidence tuberkulózy (nových případů na 100 000 obyvatel za rok), absolutního počtu úmrtí na TBC a náklady, kterým čelí pacienti s TBC a jejich domácnosti. Strategie pro boj proti tuberkulóze zahrnuje tři hlavní pilíře, a to [24]:

1. INTEGROVANÁ PÉČE A PREVENCE ZAMĚŘENÁ NA PACIENTA

- Včasná diagnostika tuberkulózy, včetně univerzálního testování citlivosti na léky, a systematický screening kontaktů a vysoce rizikových skupin.
- Léčba všech osob s TBC včetně TBC rezistentní na léky a podpora pacientů.
- Společné aktivity v oblasti TBC/HIV a léčba komorbidit.
- Preventivní léčba osob ve vysokém riziku a očkování proti TBC.

2. POLITICKÉ ZÁVAZKY

3. INTENZIVNĚJŠÍ VÝZKUM A INOVACE

- Objednávání, vývoj a rychlé zavádění nových nástrojů, intervencí a strategií.
- Výzkum s cílem optimalizovat provádění a dopad a podporovat inovace.

2.5.1 Terapie tuberkulózy

Je nezbytné, aby léčba tuberkulózy byla dostatečně dlouhá (6-12 měsíců z důvodu pomalého růstu mikroorganismů) a nepřerušovaná. Z důvodu časté rezistence probíhá léčba vždy kombinovaně. Kombinací umožníme synergické působení léčiv a zasažení intracelulárních i extracelulárních forem. Terapie se skládá z fáze iniciální a fáze pokračovací. Během iniciální fáze je nemocný léčen troj- nebo čtyřkombinací léků (v závislosti na konkrétním klinickém nálezu) následně většinou po 2-3 měsíce redukcí na dvoj- či trojkombinaci.

Mezi antituberkulotika patří dvě skupiny látek. Streptomycin, rifampicin, rifabutin, kapreomycin, viomycin a cykloserin zastupují antibiotika. Chemoterapeutika zastupují izoniazid, pyrazinamid a etambutol [1]. Dále dělíme antituberkulotika na dvě řady:

1.řada antituberkulotik-léky používané v případě standardního režimu terapie u tuberkulózy citlivé na léky po dobu nejméně 6 měsíců
– rifampicin, izoniazid, etambutol, streptomycin, pyrazinamid

2.řada antituberkulotik – jsou méně účinné nebo toxičtější anebo mohou být účinné proti atypickým kmenům
– kyselina paraaminosalicylová, kapreomycin, cykloserin, ethionamid, fluorochinolony, makrolidy

Důležitým faktorem pro zvolení správné a účinné terapie je nezbytné stanovit přesnou diagnózu a následně udělat screening rezistence k lékům.

Pacienti, kteří jsou léčení režimem pro multirezistentí formu tuberkulózy mají část vykazují mnohem vyšší četnost a závažnost nežádoucích účinků než pacienti v standardním terapeutickém režimu. Některé léky druhé řady mohou vykazovat závažné někdy i trvalé poškození, jako je hluchota a chronická neuropatie, deprese. Doporučované režimy druhé linie by měly obsahovat minimálně pět léků, včetně injekčního, který je obvykle aplikován intramuskulární lékovou formou po dobu několika měsíců. Tyto terapeutika mají dobře známé nežádoucí účinky a mnohdy je nutné je dočasně vyřadit či je nahradit. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří nevolnost a zvracení, ztráta sluchu, periferní neuropatie, deprese, alergické reakce, vyrážky, poruchy vidění, selhání ledvin a jater [20].

2.5.2 Rezistence

Rezistence na antibiotika je definovaná jako odolnost mikroorganismů vůči působení antibiotika. Tato rezistence vůči působení antibiotikům představuje progresivní ohrožení pro veřejné zdraví a poskytování zdravotní péče po celém světě. Infekce způsobené patogeny rezistentními vůči antibiotikům značně zvyšují zátěž zdravotní péče. Mezi hlavní příčiny vzniku a šíření bakteriální rezistence patří nevhodné používání a předepisování antibiotik lékařem např. nevhodné stanovení diagnózy, rozsáhlé používání v zemědělství a veterinárním sektoru, stárnutí populace, zvyšující se počet osob s oslabenou imunitou, rozsáhlé celosvětové cestování a migrace ze zemí, ve kterých je vyšší výskyt rezistentních patogenů a nedostačující vývoj, výzkum a konečný vznik nových antibiotik, u kterých se nevyskytuje rezistence. Přestože šíření rezistentních kmenů představuje značné ohrožení pro zdraví pacientů po celém světě, nedochází k významným objevům nových antibiotik, který by uspokojil klinickou potřebu nových terapeutik. Je velmi obtížné objevit nové třídy antibiotik, které jsou vysoce účinné, mají přijatelné farmakokinetické vlastnosti a jsou přiměřeně bezpečné. Nicméně stimulace výzkumu a vývoje antibakteriálních léčiv je nezbytné a hraje klíčovou úlohu ve strategiích WHO při řešení globální hrozby bakterií rezistentních vůči antibiotikům [24].

Mycobacterium tuberculosis, jakožto původce tuberkulózy a v dnešní době čím dál častěji i zcela rezistentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, vyvinuly jedinečné mechanismy, jak přežít v hostiteli. Exaktní příčina rozvoje rezistence u *Mycobacterium tuberculosis* není zcela známá, nicméně předpokládá se, že hlavním důvodem jsou genetické mutace [23].

Standardní čtyřlékový režim byl zaveden zhruba před 40 lety, ale nárůst výskytu multirezistentních kmenů si žádá identifikaci nových cílů a léčiv pro terapii infekce *Mycobacterium tuberculosis*. V posledních letech došlo k značnému pokroku, jež přinesl několik málo nových a slibných léků včetně bedaquilinu, delamanidu, a pretomanidu. Některé nové látky byly vyvinuty k léčbě jiných infekcí, ale s odstupem času se u nich projevila také aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis*. Každá třída terapeutik má specifický cíl a daný mechanismus účinku. Jedná se o cíle, jež se podílejí buď na biosyntéze buněčné stěny, syntéze proteinů, syntéze DNA/RNA, na metabolismu nebo ovlivňují jiné životně důležité funkce [23].

Je velmi náročné objevit nová antituberkulotika, která jsou vysoce účinná, mají přijatelné farmakokinetické vlastnosti a jsou přiměřeně bezpečná. Nová antituberkulotika by měla splňovat následující předpoklady: 1.měla by mít ověřenou bezpečnost 2.měla by směřovat ke kratším, bezpečnějším, levnějším a účinnějším alternativám léčby 3.měla by působit na nové cíle, a tím snížit riziko rozvoje rezistence 4.měla by rovněž být kompatibilní s antiretrovirovou terapií, pro léčbu velké skupiny pacientů koinfikovaných HIV 5.neměla by vést k lékovým interakcím s jinými léky proti tuberkulóze [23].

2.6 Buněčná stěna *Mycobacterium tuberculosis*

Rezistence *Mycobacterium tuberculosis* vůči lékům je závažný problém, který může značně zkomplikovat celosvětový boj s epidemií tuberkulózy. Proto je nezbytný výzkum a vývoj antituberkulotik s novými mechanismy účinku, které by byly účinné i vůči rezistentním kmenům.

Buněčná stěna mykobakterií je složena z unikátních mykolových kyselin. Mykolové kyseliny jsou α -větvené a β -hydroxylované mastné kyseliny s výjimečnou délkou řetězce (u mykobakterií C60-C90), které jsou charakteristické pro řád Corynebacteriales. Vytváří hlavní složku vnější membrány, a je tedy určujícím faktorem pro propustnost mykobembrány [25]. Mykolové kyseliny jsou kovalentně připojené k vrstvě peptidoglykanu (PG) prostřednictvím spojovacího polysacharidu arabinogalaktanu (AG). Toto specifické uspořádání, tzv. komplex mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykan, je do jisté míry odpovědné za schopnost *Mycobacterium tuberculosis* replikace v nepřívětivém prostředí imunitního systému hostitelské buňky a odolávat velkému množství chemoterapeutik [26]. Buněčná stěna mykobakterií je nezbytná pro jejich životaschopnost. Její lipidy, především mykolové kyseliny, vytváří bariéru, která brání vstupu mnoha rozpuštěným látkám z prostředí a propůjčuje přirozenou rezistenci k mnoha antibiotikům [27]. Nízká propustnost buněčné stěny je pravděpodobně nezbytná pro přežití mykobakterií v hostiteli. Proto jsou enzymy, jež se podílí na biosyntéze jednotlivých stavebních elementů buněčné stěny, stejně jako enzymy potřebné pro navázání těchto složek, potenciálními cíli pro nová léčiva. A proto byl v posledních letech velký zájem a snaha o identifikaci těchto enzymů a pochopení mechanismu jejich působení, jakož i o objevení látek schopných je inhibovat [28]. Mykobakteriální buněčná stěna je velice bohatým zdrojem nových

cílů pro vývoj antituberkulotik, je zde až 60 potenciálních cílů [26]. V klinické praxi se již několik chemoterapeutik působících na buněčnou stěnu *Mycobacterium tuberculosis* používá, jedná se např. o isoniazid, etambutol a také v roce 2014 schválený Evropskou lékovou agenturou (EMA) delamanid.

Delamanid je indikován k léčbě plicní multirezistentní tuberkulózy, v rámci vhodného kombinovaného léčebného režimu. Farmakologický mechanismus účinku delamanidu je založen na inhibici syntézy součástí mykobakteriální buněčné stěny, a to kyseliny methoxymykolové a ketomykolové. Identifikované metabolity delamanidu již antimykobakteriální aktivitu nevykazovaly. Mezi velmi časté nežádoucí účinky delamanidu patří snížená chuť k jídlu, nauzea, zvracení, gastritida, poruchy spánku, závratě a bolesti hlavy [29].

2.7 Polyketide synthase 13 (Pks13, „polyketidová syntáza“)

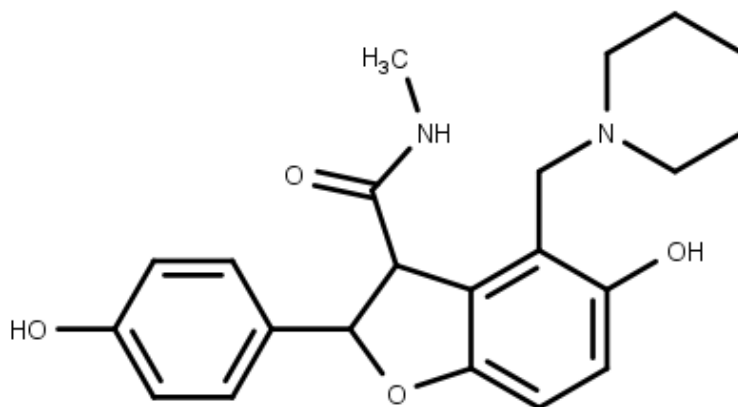
Polyketidová syntáza (Pks13) je zásadním enzymem při syntéze mykolových kyselin u *Mycobacterium tuberculosis*. Byla popsána jako enzymový komplex, který se podílí na konečné syntéze mykolových kyselin, které jsou nezbytné pro nepropustnost mykobakterií [30]. Tato cesta zahrnuje kondenzaci Claisenova typu mezi dvěma mastnými acyly s dlouhým řetězcem (meromykolyl-AMP a karboxyl-acyl-CoA) za vzniku α -alkyl- β -ketoacyl derivátů, prekurzorů mykolových kyselin [31]. Tioesterová doména Pks13 hraje rovněž roli v transportu lipidů, což je také zásadní funkce *Mycobacterium tuberculosis*. Zmíněné lipidy působí jako hlavní determinanty patologických stavů, které vyvolávají mykobakterie a působí buď jako prozánětlivé látky, či jako aktivátory T buněk [25]. Mnohé studie ukazují, že polyketidová syntetáza 13 může být potenciálním cílem pro nová antituberkulotika. Bylo rovněž zjištěno, že na tento enzym vykazují aktivitu různé strukturní třídy sloučenin, jako jsou benzofurany [32], thiofeny [33], β -laktony [34], kumestany [35], chromony [31] a přírodní látka α -cubebin [36].

2.7.1 Benzofurany

Benzofurany jsou základní strukturální jednotkou mnoha biologicky aktivních přírodních produktů a jejich deriváty mnohdy vykazují vhodné biologické vlastnosti.

Některé benzofuranové deriváty mají vhodné antituberkulózní a antibakteriální účinky a vykazují slibnou *in vitro* a *in vivo* aktivitu proti patogenům citlivým a také rezistentním na léčiva. Benzofurany mohou být vhodným farmakoforem pro vývoj nových antituberkulotik [37].

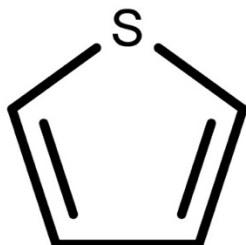
Mezi benzofurany je vedoucí molekulou TAM16 (Obr. 2), která má vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti, příznivé farmakologické vlastnosti a vyhovující bezpečnostní profil. Vykázal silnou *in vivo* účinnost na modelech akutní a chronické myší tuberkulózy při perorálním podání [32].



Obr. 2 Struktura TAM16. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

2.7.2 Thiofeny

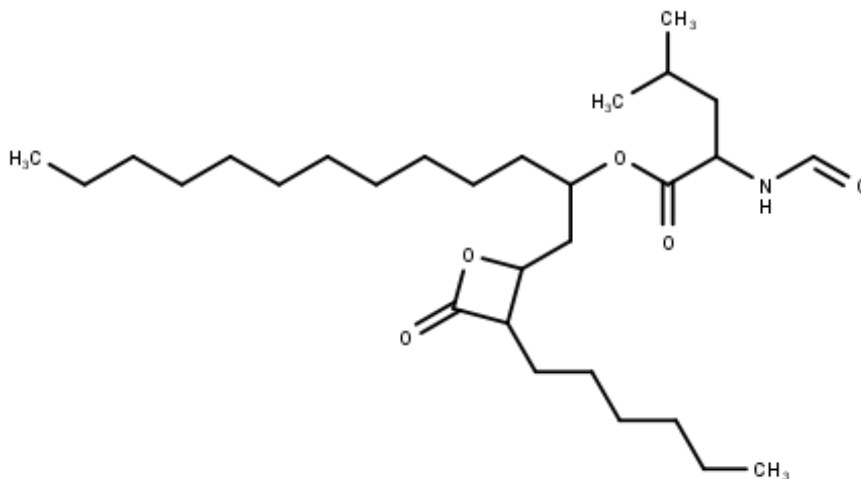
Sloučeniny na bázi thiofenu vykazují antimikrobiální [39], analgetickou, protizánětlivou [40] a protinádorovou aktivitu [41]. Byla u nich rovněž prokázána i antituberkulózní aktivita, např. ve studii [33] Wilson a spol. prověřili knihovnu obsahující 113 sloučenin a identifikovali dvě sloučeniny, které prokázaly schopnost inhibovat růst *Mycobacterium tuberculosis* tím, že blokují enzym Pks13 [42].



Obr. 3 Thiofen. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

2.7.3 β -laktony

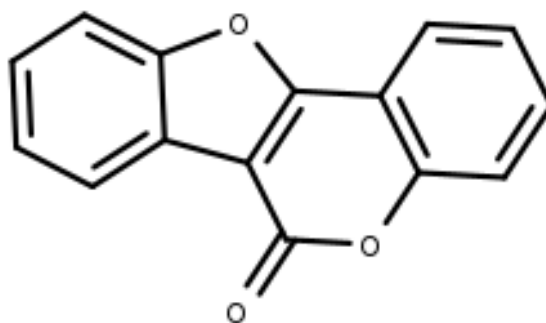
Tetrahydrolipstatin (THL) (Obr. 4) je derivátem přirozeně se vyskytující inhibitoru lidské lipázy tzv. lipstatinu, který má za úkol inhibovat vstřebávání mastných kyselin v organismu. THL jakožto derivát vykazuje větší stabilitu než lipstatin a je znám jako orlistat, schválený lék indikovaný k léčbě obezity. Jeho čtyřčlenný kruh třídy β -laktonů má slibný inhibiční potenciál vůči serin/cystein hydrolasám. Mimo jiné inhibuje aktivitu tzv. Ag85C, jež je nutná pro růst, životaschopnost a patogenезi bakterií. Následně bylo zjištěno, že THL inhibuje Pv3802 fosfolipázu A a thioesterovou doménu polyketidové syntetázy 13 [34] [43].



Obr. 4 Struktura Tetrahydrolipstatinu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

2.7.4 Kumestany

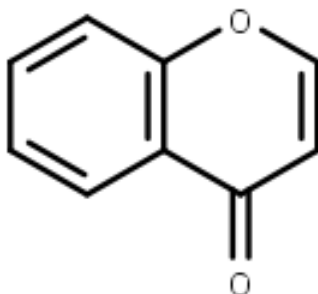
Kumestan (Obr. 5) je δ -lakton obsahující tetracyklus tvořící centrální jádro různých přírodních bioaktivních produktů, jako je mezi jinými kumestrol, wedelolakton a psoralidin. Kumestany vykazují řadu farmakologických účinků včetně protinádorového, antioxidačního, antibakteriálního a antidepressivního. Byly také identifikovány analoga kumestanů jakožto potenciální antituberkulotika zaměřená na inhibici Pks13. Tyto analoga vznikly strukturálními modifikacemi původních přírodních produktů. Tyto kumestany vykazovaly přiměřeně silnou antituberkulózní aktivitu *in vitro* [35] [44].



Obr. 5 Základní struktura kumestanu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

2.7.5 Chromony

Chromon (1,4-benzopyron Obr. 6) je derivátem benzopyranu s navázanou ketonovou skupinou na pyranovém jádru. Chromony představují strukturálně velmi rozmanitou skupinu sekundárních metabolitů, které vznikají konvergencí několika biosyntetických drah. Jejich specifická struktura a rozmanité farmakologické vlastnosti mohou přispět k objevení nových léčiv. Řada derivátů 4H-chromen-4-onu, které byly syntetizovány na základě morfologického tvarování benzofuranové sloučeniny TAM16 byla testována na antituberkulární aktivitu. Některé deriváty vykazují přijatelnou perorální biologickou dostupnost a nízkou cytotoxicitu. Ve studii *in vivo* byla prokázána účinnost v akutním myším modelu tuberkulózy po 3 týdnech léčby [45]. Další studie, která usilovala o objevení nových antituberkulotik založených na chromonech potvrdila možný inhibiční potenciál vůči Pks13 [31].

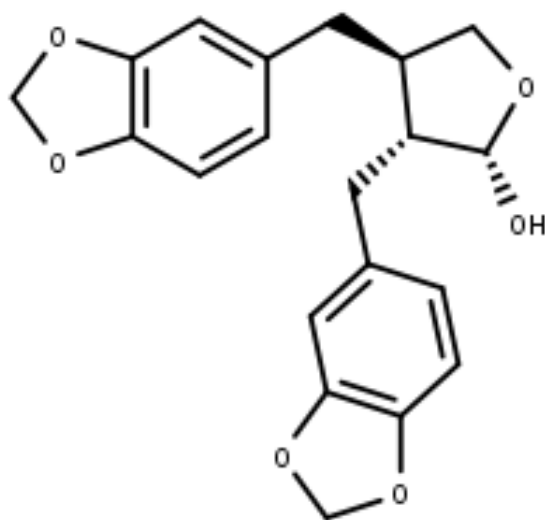


Obr. 6 Struktura chromonu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

2.7.6 (-)-cubebin

(-)-cubebin (Obr. 7) je hlavní sloučeninou přítomnou v semenech pepřovníku kubéba. *Piper cubeba* patří mezi významné léčivé rostliny a řadíme jej do čeledi *Piperaceae*. Kromě pepřovníku, je (-)-cubebin rozšířen také v jiných rostlinách. Tato sloučenina se řadí do skupiny dibenzylbutyrolaktonových lignanů, látka byla studována a testovaná, neboť má řadu biologických účinků [46]. Má protizánětlivé [47], analgetické [48], vazorelaxační [46], antimykrobiální a trypanocidní [49] [50].

Nicméně tato slibná látka vykazuje pouze mírnou aktivitu vůči několika mono – a multirezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Výsledek dokování (-)-cubebinu na Pks13 nepřinesl převratné hodnoty vazebné energie, ale (-)-cubebin interaguje s některými klíčovými zbytky Pks13, což naznačuje, že (-)-cubebin by si zasloužil další přezkoumání, a především tvorbu derivátů, aby se mohl stát potencionálním léčivem [36].



Obr. 7 Struktura (-)-cubebinu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

3. Praktická část

3.1 Hardware a software

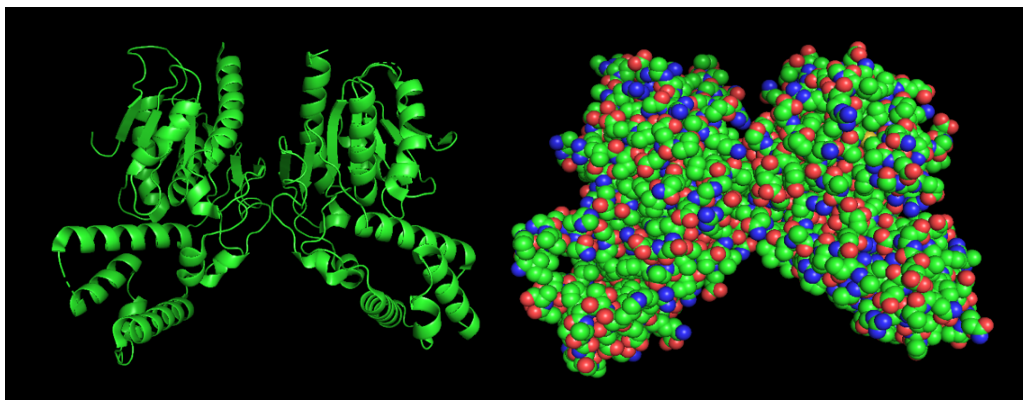
Experimentální část byla provedena na stolním počítači MacBookAir (13-inch, 2017) s 1,8GHz s dvoujádrovým procesorem Intel® Core i5, s operačním systémem macOS.

Makromolekula enzymu Pks 13 byla stažena z online databáze RCSB PDB [51]. Program MarvinSketch [38] byl použitý pro nakreslení struktur ligandů. Molekuly byly dokovány v programu PyRx [52]. Farmakovorové modelování bylo provedeno v online softwaru ZINCPharmer [10]. V programu PyRx byl použit nástroj Open Babel pro úpravu SDF souborů získaných z databází ZINC [53] a PubChem [54]. Vizualizace získaných výsledků byla provedena v programu PyMOL [55]. Analýza farmakokinetických vlastností vybraných ligandů proběhla v programu SwissADME [56]. K optimalizaci ligandů byl využitý program DeepFrag [57]. A pomocí programu MANIFOLD PostEra byla navržená chemická syntéza vybraných ligandů.

3.1 Cíl experimentální části

Záměr experimentální části bylo navržení nových inhibitorů polyketidové syntázy 13 (Polyketide synthase Pks13), molekulové dokování navržených inhibitorů, hodnocení farmakokinetických parametrů, a nakonec optimalizace ligandů.

V první části se věnují přípravě enzymu a ligandů, validaci výsledků, použité metodice virtuálního screeningu a také fyzikálně chemickým vlastnostem látek. Druhá část je zaměřena na představení již zkoušených inhibitorů Pks13, u kterých bylo provedeno molekulové dokování a hodnocení fyzikálně chemických vlastností. Třetí část se zabývá navrženým inhibitorům Pks13, jejich dokováním a hodnocením fyzikálně chemických vlastností. Poslední část je zaměřena na optimalizaci ligandů, zahrnuje chemické úpravy látek s cílem zdokonalení jejich vlastností.



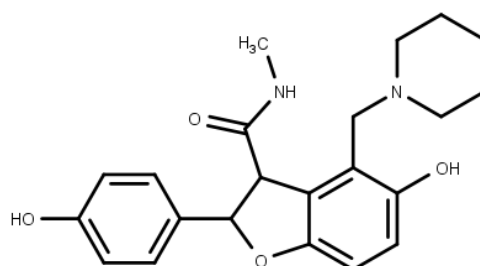
Obr. 8 Enzym Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

3.2 Virtuální screening

Jelikož byla na začátku známa struktura proteinu, a také ligandu bylo možné kombinovat strategie structure-based a ligand-based.

3.2.1 Příprava enzymu a ligandů

Nejdříve byl pomocí proteinové databáze RCSB nalezen cílový enzym. Krystalická struktura enzymového komplexu s inhibítorem TAM16 (Obr. 9), byla stažena ve formátu PDB (ID: 5V3Y) [51]. U takto staženého enzymu, bylo nutné odstranit ligand (TAM16), heteroatomy a molekuly vody.

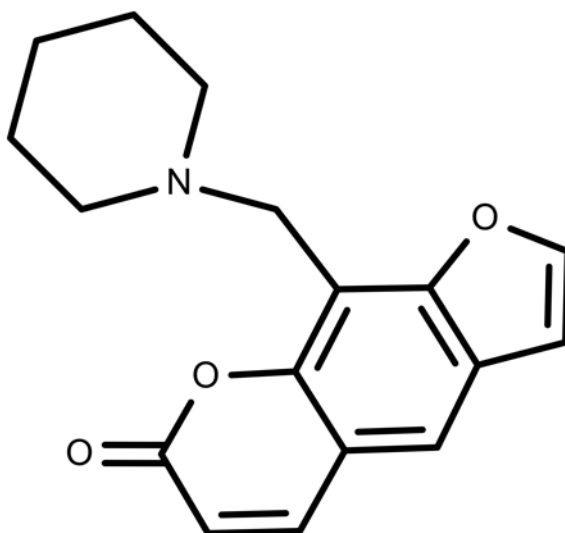


Obr. 9 Ligand TAM16. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

Ligandy byly nakresleny pomocí programu MarvinSketch [38], ve kterém byly vygenerovány také jejich 3D konformery, a ty byly převedeny

3.PRAKTICKÁ ČÁST

na pdbqt formát. Na základě znalosti cílového enzymu a jeho známých inhibitorů byla navržena základní struktura ligandu (viz Obr. 10). Tato struktura, byla poté použita pro tvorbu farmakoforu, a následně byly vyhledány sloučeniny vhodné k molekulovému dokování.

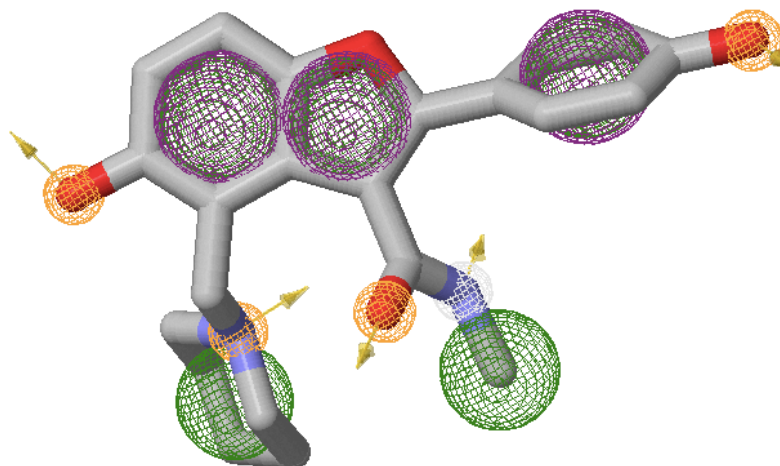


Obr. 10 Základní struktura ligandu. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

3.2.2 Farmakoforové modelování

Farmakoforové modelování je standardní metodou virtuálního screeningu.

Farmakoforové modelování bylo provedeno v online softwaru ZINCPharmer [10], který poskytuje nástroje pro tvorbu farmakoforu (Obr. 11) přímo z molekulární struktury, následně umožňuje nalezení podobných struktur z databáze ZINC. ZINC je velice obsáhlá sbírka komerčně dostupných a biologicky relevantních látek vhodných pro screening [53].



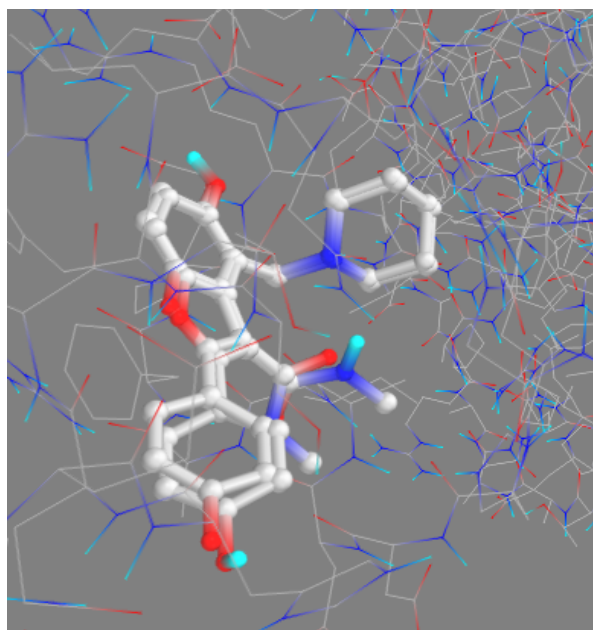
Obr. 11 Farmakofor TAM 16 získaný v programu ZINCPharmer [10].

3.2.3 Molekulové dokování

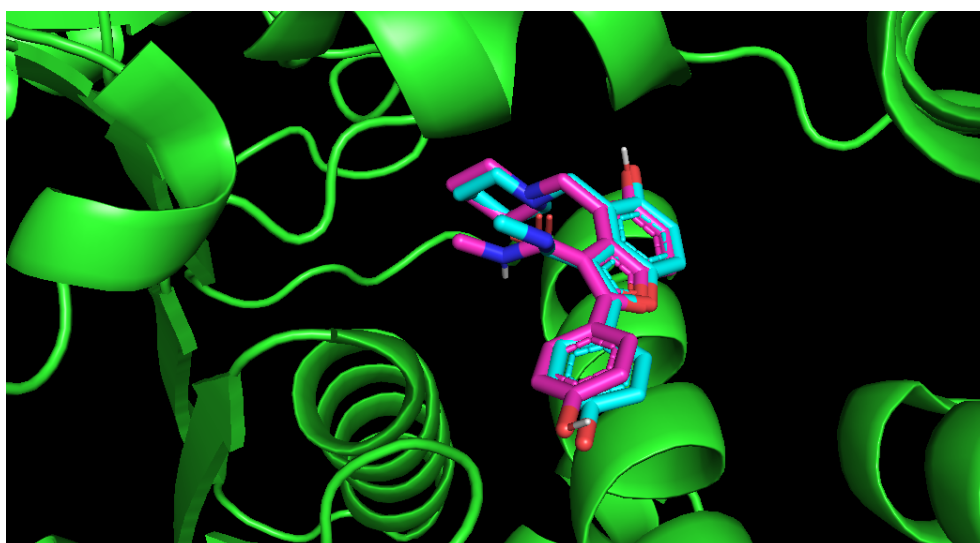
V diplomové práci byl použit dokovací program Pyrx [52]. Jedná se o volně dostupný software s otevřeným zdrojovým kódem, který je podporován všemi hlavními operačními systémy (Linux, Windows, Mac OS). Hlavním výstupem dokování je nejlépe předpovězená volná vazebná energie v [kcal/mol]. Záporné hodnoty vazebné afinity (nebo volné vazebné energie) naznačují předpoklad, že se ligand naváže na cílovou makromolekulu. Čím zápornější jsou číselné hodnoty vazebné afinity, tím lepší je předpokládaná vazba mezi ligandem a makromolekulou [52].

3.2.4 Validace výsledků

Před zahájením dokování bylo potřeba ověřit, zda je software schopný vhodně predikovat pozice ligandu v cílovém enzymu. Nejdříve byl nadokován inhibitor TAM16 na prázdné vazebné místo enzymu Pks13. Následně byla jeho pozice porovnána s komplexem protein-ligand, určeného rentgenovou krystalografií. Na Obr. 12 a Obr. 13 lze vidět úspěšnou validaci.

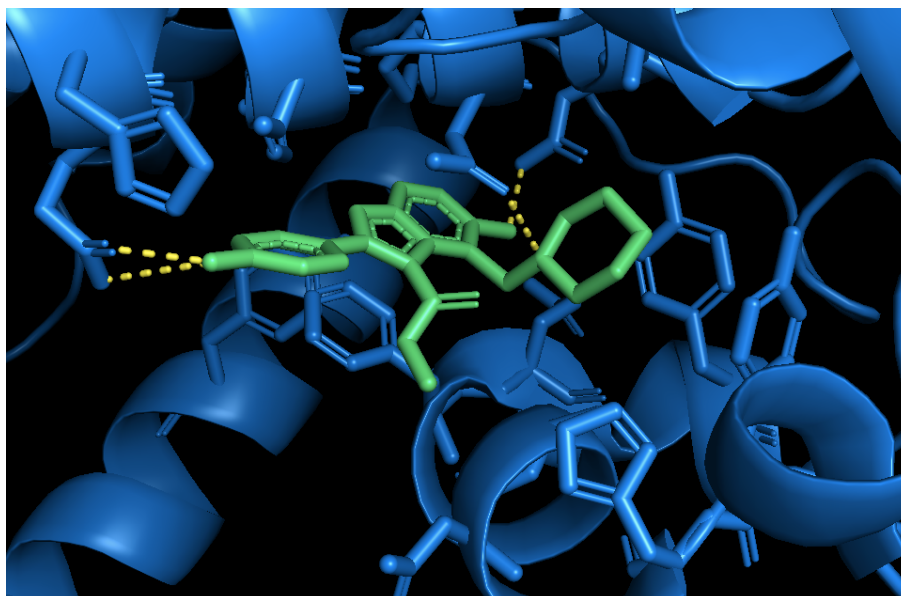


Obr. 12 Validace výsledku (PyRx)

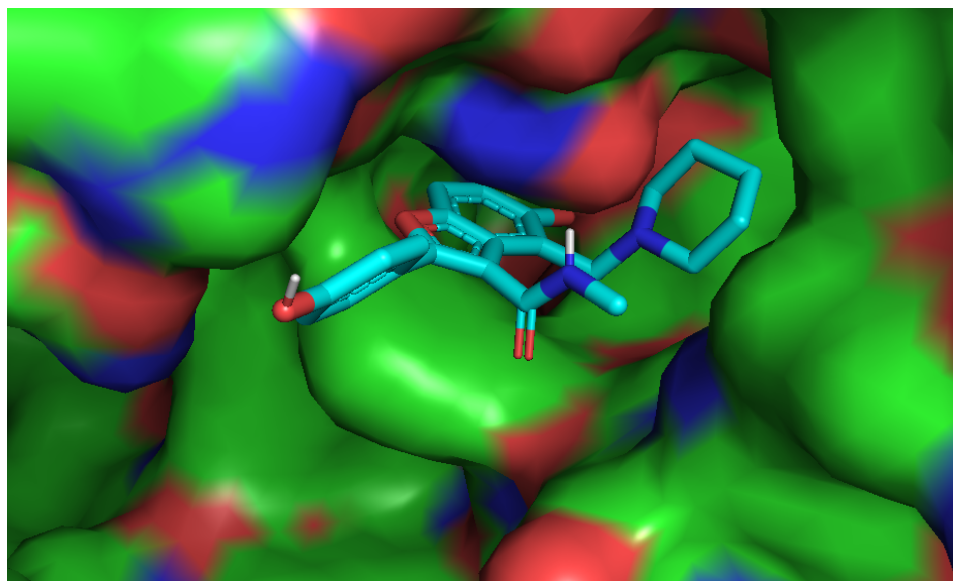


Obr. 13 Validace výsledku. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

Všechny další ligandy byly dokovány na shodné vazebné místo, do kterého se váže TAM16 v rámci enzymu Pks13 (Obr. 14, Obr. 15).



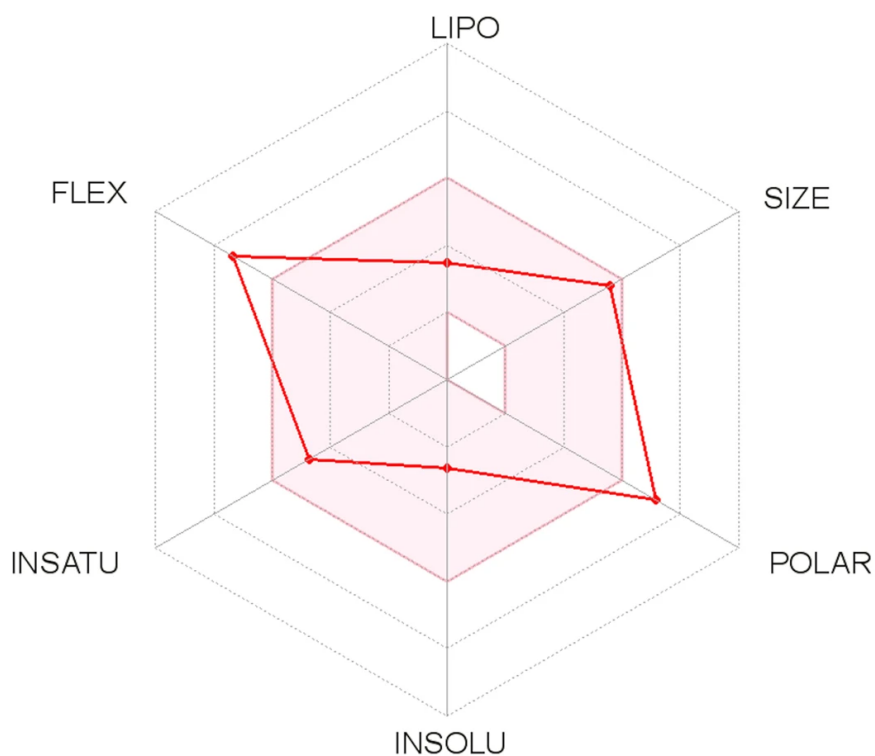
Obr. 14 Vazba TAM16 v rámci enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].



Obr. 15 Vazba TAM 16. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

3.2.5 Farmakokinetické hodnocení látek

Pomocí online programu SwissADME [36] byly hodnoceny farmakokinetické vlastnosti sloučenin. Tato online platforma umožňuje predikovat parametry ADME (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece), na základě znalostí molekulární struktury. Program vyhodnocuje: fyzikálně chemické vlastnosti, lipofilitu, rozpustnost ve vodě, farmakokinetiku, druglikeness. Pomocí radaru biologické dostupnosti (viz Obr. 16), software umožňuje rychlé posouzení vlastnosti molekuly a porovnání s ideálním léčivem. Pro tvorbu tohoto radaru používá šest fyzikálně chemických parametrů (viz Tab. 1) jako je: lipofilita, velikost molekuly, polarita, rozpustnost, flexibilita a nasycení [16].



Obr. 16 Radar biologické dostupnosti [56]

Růžová oblast představuje optimální fyzikálně chemické hodnoty pro perorální podání. Přesnější vyjádření a popis těchto hodnot je uvedeno v Tab. 1. Na tomto příkladu lze vidět, že látka má nižší perorální biologickou dostupnost, jelikož je příliš flexibilní a polární [16].

Parametr	Popis parametru	Význam pro léčivo	Hodnoty pro vhodnou biologickou dostupnost
MW (molecular weight) = molární hmotnost	-hmotnost 1 molu látky (g/mol)	Parametr permeability.	150g/mol < MW < 500 g/mol
RBN (number of rotatable bonds)	-počet vazeb, které umožňují volnou rotaci	Parametr určuje flexibilitu molekuly.	<9
LogP	-rozdělovací koeficient molekuly mezi vodnou a lipofilní fází	Souvisí s lipofilitou léčiva, která je důležitá pro rozpustnost, absorpci, membránový průnik, vazbu na plazmatické bílkoviny, distribuci a průnik do tkání [58].	-0,7 < XLogP < 5
TPSA (topological polar surface area)	-polární plocha molekuly	Predikuje transport molekuly.	20 Å ² < TPSA < 130 Å ²
LogS	-rozpustnost sloučeniny ve vodě	Ovlivňuje absorpci molekuly.	0 > LogS < 6
Fraction Csp3	-nasyčenost molekuly	Určuje složitost molekuly. Byla prokázáno, že Csp3 koreluje s rozpustností a bodem tání. [59]	0,25 < Csp3 < 1

Tab. 1 Vyjádření a popis fyzikálně chemických hodnot

Kromě parametrů uvedených v Tab. 1, bylo v této práci zohledněno také Lipinského pravidlo pěti. Jedná se o jakési měřítko biologické dostupnosti pro perorálně podávaná léčiva. Jestliže látka splňuje Lipinského pravidlo pěti (viz Tab. 2), má pravděpodobně vhodné fyzikálně chemické vlastnosti pro perorální podání. Pokud však látka nespĺňuje 2 a více z těchto parametrů, nebude pro perorální podání příliš vhodná.

3.PRAKTICKÁ ČÁST

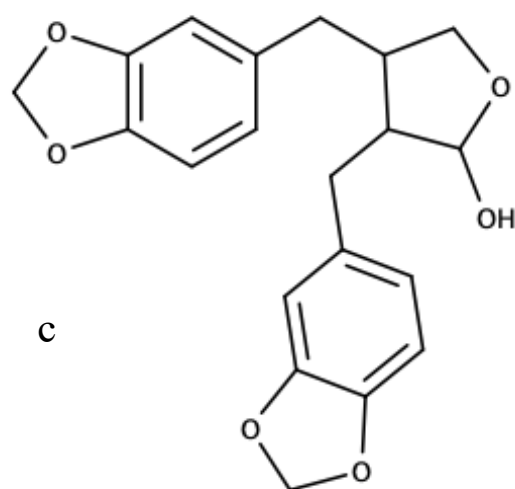
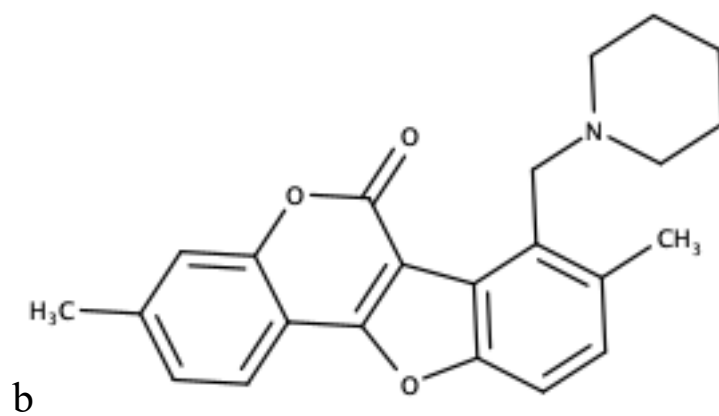
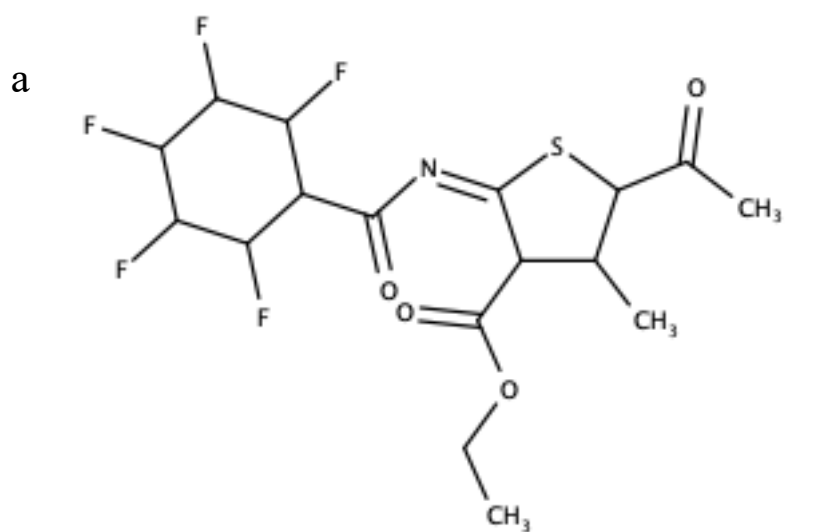
Parametr	Popis parametru	Lipinského pravidlo pěti
MW (molecular weight) =molární hmotnost	-hmotnost 1 molu látky (g/mol)	<500
LogP	-rozdělovací koeficient molekuly mezi vodnou a lipofilní fází	<4,15
Number of hydrogen-bond acceptors	-počet akceptorů vodíku	<10
Number of hydrogen-bond donors	-počet donorů vodíku	<5

Tab. 2 Lipinského pravidlo pěti

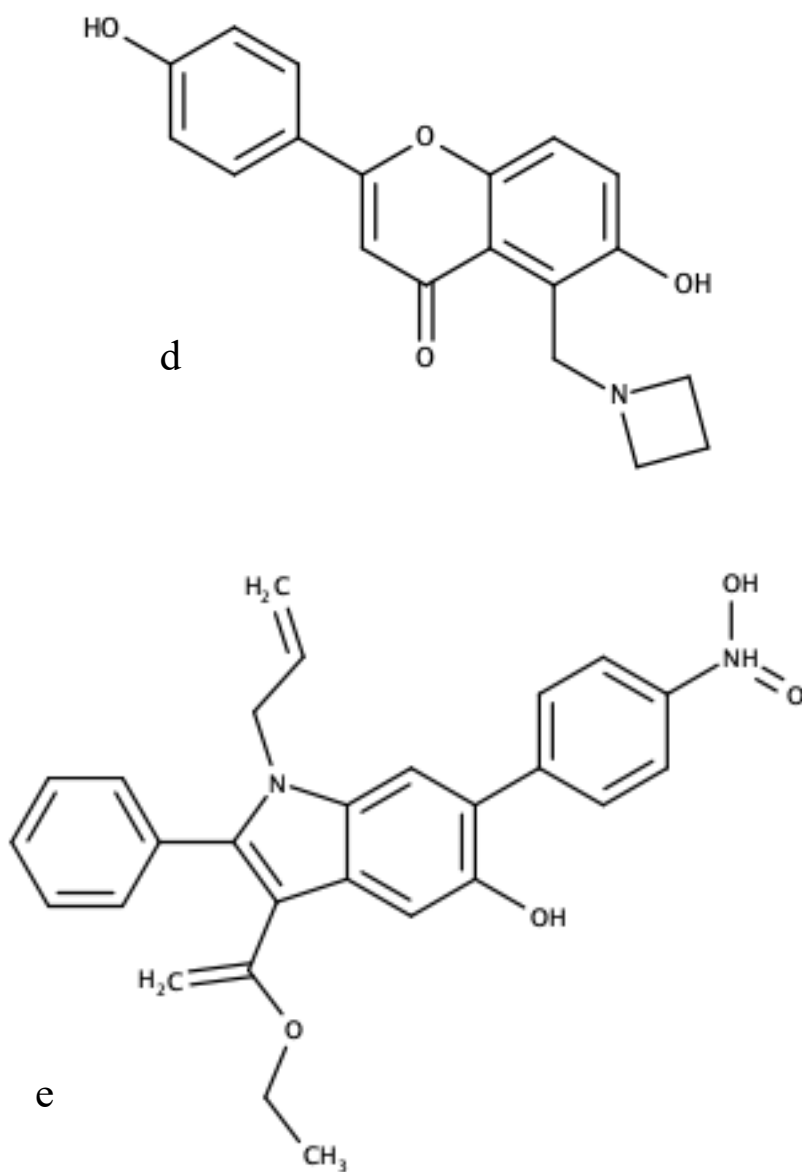
Lipinského pravidlo pěti bylo rovněž vyhodnoceno pomocí programu SwissADME.

3.3 Zkoušené látky

Dosud bylo popsáno několik druhů inhibitorů Pks13. Jedná se o: thiofenové sloučeniny [33], β -laktony [34], benzofuranové deriváty [32], kumestanové sloučeniny [35], chromony [31] a přírodní látka α -cubebin [36]. Nejvýznamnější představitelé těchto inhibitorů jsou uvedeny na Obr. 17.



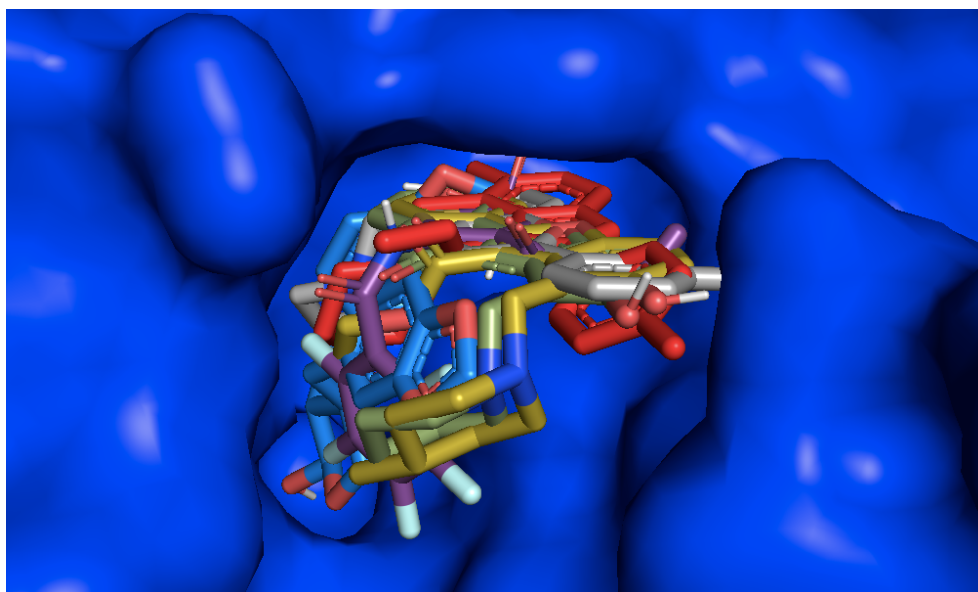
3.PRAKTICKÁ ČÁST



Obr. 17 Zkoušené ligandy. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

a: ethyl(2Z)-5-karbamoyl-4-methyl-2-[(2,3,4,5,6-pentafluorocyclohexankarbonyl)imino]thiolan-3-karboxylát; **b:** [1] benzofuro[3,2-c]chromen-6-on; **c:** (2R,3R,4R)-3,4-bis(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)oxolan-2-ol; **d:** (2R)-5-[[azetidin-1-yl)methyl]-6-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4-on; **e:** ethyl 2-cyklohexyl-4-[(4-methylpiperidin-1-yl)methyl]-5-oxo-3,3a,4,5,6,7-hexahydro-1lambda4-benzofuran-3-karboxylát hexakosahydrát

Tyto látky byly podrobeny molekulovému dokování v programu Pyrx. Všechny byly dokovány do shodného vazebného místa, do kterého se váže TAM16 v rámci enzymu Pks 13 (Obr. 18). Výsledky vazebné energie jsou uvedeny v Tab. 3.



Obr. 18 Vazba ligandů v enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

Ligandy	Vazebná energie [kcal/mol]
a	-8,7
b	-9,2
c	-9,7
d	-8,3
e	-8,4
TAM16	-10
Základní struktura ligandu	-9,9

Tab. 3 Výsledná vazebná energie

Poté byla u těchto ligandů sledována farmakokinetika (viz Tab. 4). Především byla pozornost vztahena na vlastnosti uvedené v Tab. 1 a Tab. 2. Kromě těchto parametrů byla hodnocena GIT absorpce a také Synthetic

3.PRAKTICKÁ ČÁST

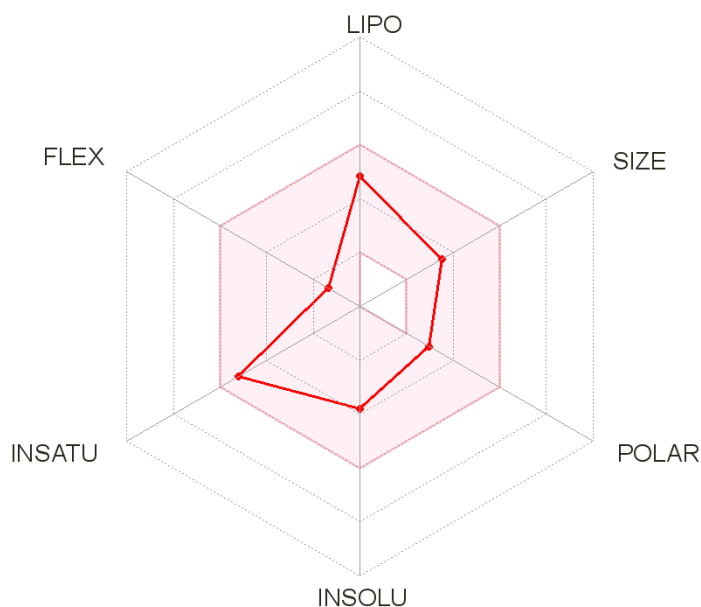
accessibility score. Jedná se o odhad snadnosti syntézy molekul, kde 1 (velmi snadná syntéza) a 10 (velmi obtížná syntéza). Tyto farmakokinetické ukazatele byly vyhodnoceny v online programu SwissADME.

	a	b	c	d	e	TAM16	Základní struktura ligandu
MW(g/mol)	429,4	379,4	356,37	323,34	442,46	380,44	283,32
RBN	6	2	4	3	8	5	2
LogP	2,59	1,81	2,38	1,21	3,15	1,78	2,19
TPSA(Å²)	98,1	83,14	66,38	73,91	97,28	85,94	46,59
LogS	-4,18	-3,86	-4,26	-3,68	-6,14	-4,3	-3,81
Csp3	0,76	0,27	0,4	0,21	0,12	0,32	0,35
Num. H-bond acceptors	10	6	6	5	5	5	4
Num. H-bond donors	0	2	1	2	1	3	0
GIT absorpce	vysoká	vysoká	vysoká	vysoká	nízká	vysoká	vysoká
Synthetic accessibility score	5,56	4,68	3,9	3,07	3,29	3,56	2,97

Tab. 4 Hodnocení fyzikálně chemických vlastností

Všechny tyto ligandy splňují Lipinského pravidlo pěti. Lze tak předpokládat vhodnou perorální biologickou dostupnost. Všechny, kromě ligandu e, vykazují vysokou GIT absorpci. Dle Synthetic accessibility score, lze odhadovat snadnou, popřípadě středně snadnou syntézu. Na Obr. 19, je vidět radar biologické dostupnosti navržené základní struktury.

Další část diplomové práce, je zaměřena na návrhů nových inhibitorů Pks13.



Obr. 19 Radar biologické dostupnosti základní struktury [60].

Látka má nízkou hodnotu RBN (počet vazeb, které umožňují volnou rotaci), což se odráží na její slabé flexibilitě.

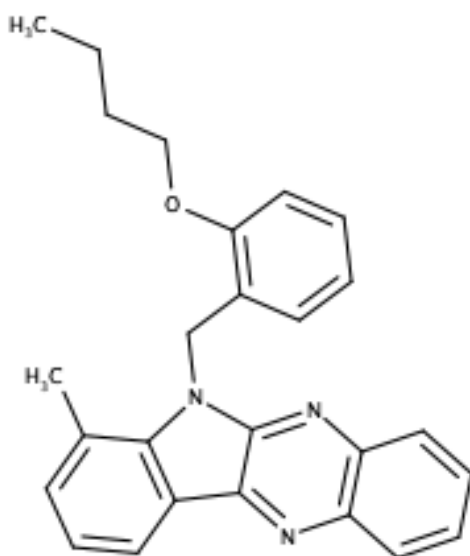
3.4 Nové inhibitory Pks13

Pro tvorbu nových inhibitorů enzymu Pks13, bylo zvoleno farmakoforové modelování. Farmakofor (Obr. 11) byl stanoven na základě interakce mezi navrženým ligandem (Obr. 10) a cílovým enzymem. Následně bylo vygenerováno celkem 243 sloučenin. Nemalá část z vygenerovaných molekul, byla před dokováním vyloučena z důvodu neodpovídajících farmakokinetických vlastností. Vyeliminovány byly také polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), které mohou vykazovat karcinogenní účinky. Samotné dokování bylo provedeno u 195 vybraných sloučenin.

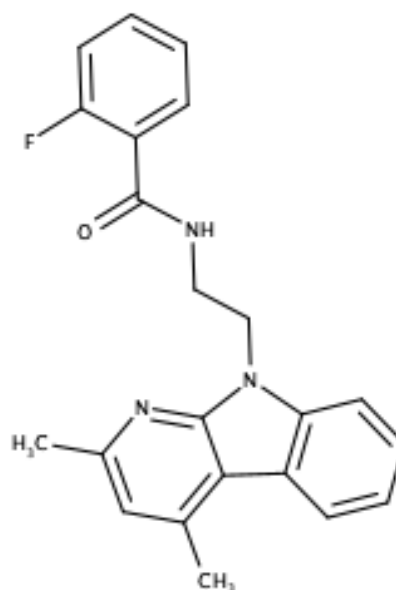
3.4.1 Molekulové dokování

Nejdříve byly sloučeniny staženy ve formátu SDF a převedeny do dokovacího programu PyRx. Zde, pomocí softwaru Open Babel, došlo k minimalizaci energie a převedení do formátu pdbqt. Sloučeniny byly vždy dokovány do shodného vazebného místa, do kterého se váže TAM16 v rámci enzymu Pks13.

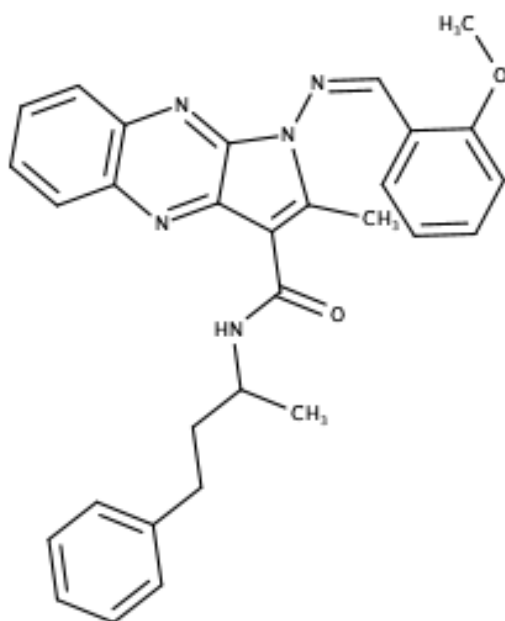
Ze 195 nadokovaných ligandů bylo vybráno 16 látek, které měly nejnížší vazebnou energii, zároveň vykazovaly výhodné farmakokinetické vlastnosti (viz Tab. 1 a Tab. 2) Struktury těchto 16 ligandů byly nakresleny v programu MarvinSketch [38]. Na Obr. 20 jsou tyto sloučeniny znázorněny.



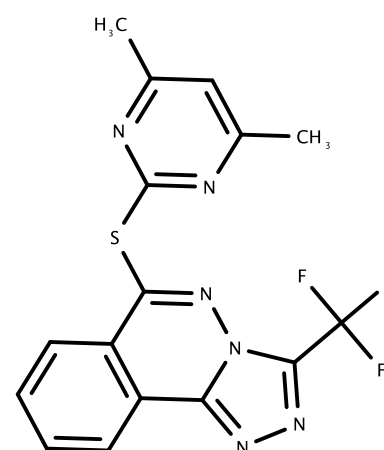
L1:6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin



L2:N-[2-(2,4-dimethylpyrido[2,3-b]indol-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid, N-[2-(2,4-dimethylindolo[2,3-b]pyridin-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid

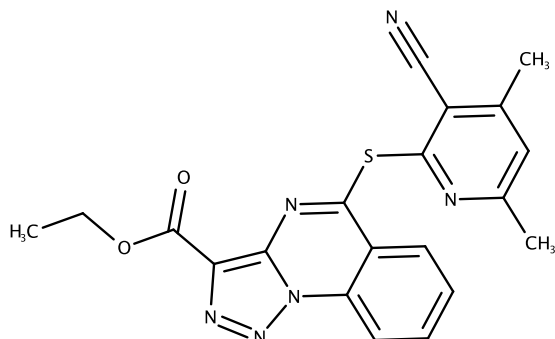


L3:2-amino-1-[(Z)-(2-methoxyfenyl)methylidenamino]-N-[(2R)-4-fenylbutan-2-yl]pyrrolo[3,2-b]chinoxalin-3-karboxamid

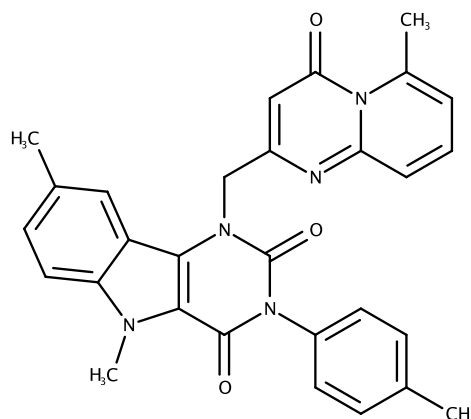


L4:6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluormethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin

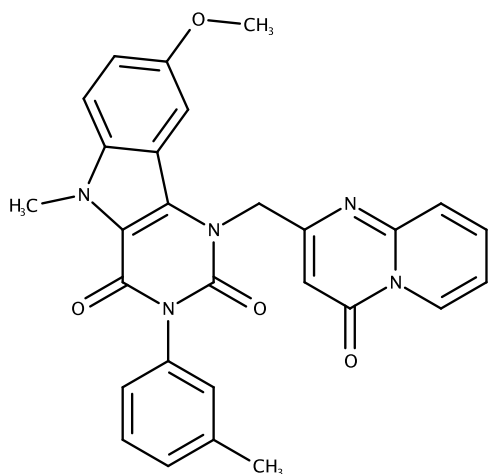
3.PRAKTICKÁ ČÁST



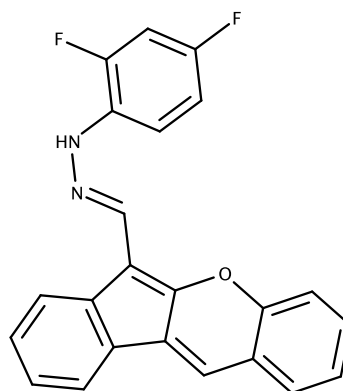
L5:ethyl 5-(3-kyano-4,6-dimethylpyridin-2-yl)sulfanyltriazolo[1,5-a]chinazolin-3-karboxylát



L6:5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]-3-(4-methylfenyl)pyrimido[5,4-b]indole-2,4-dion

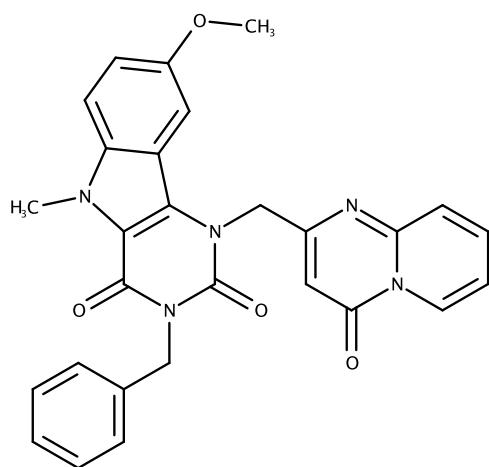


L7:8-methoxy-5-methyl-3-(3-methylfenyl)-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion

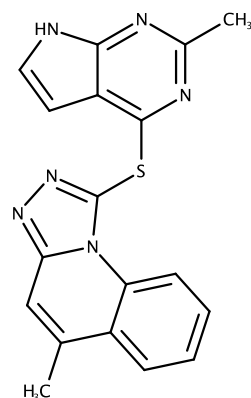


L8:2,4-difluoro-N-[(E)-inden[2,1-b]chromen-6-ylmethylidenamino]anilin

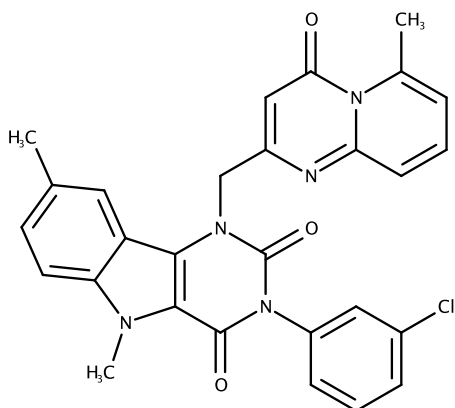
3. PRAKTICKÁ ČÁST



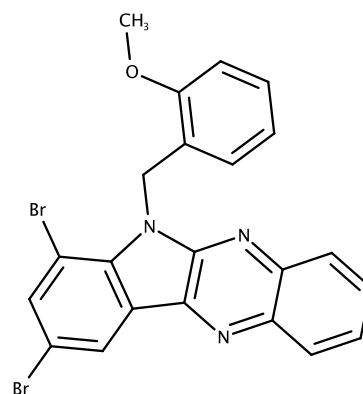
L9:3-benzyl-8-methoxy-5-methyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion



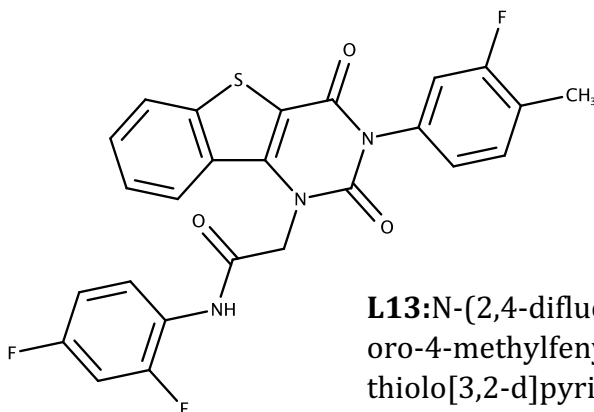
L10:5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin



L11: 3-(3-chlorofenyl)-5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion

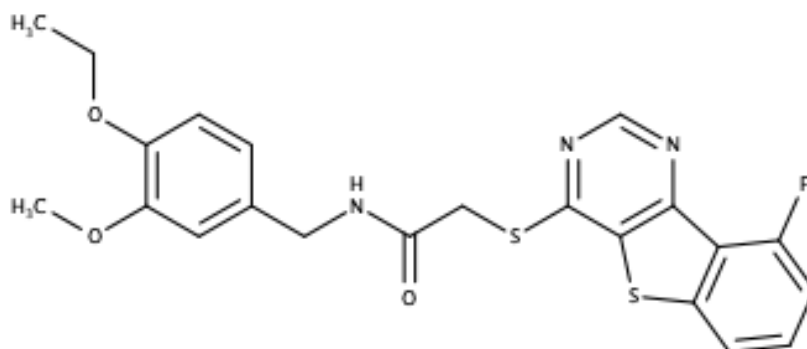


L12:7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin

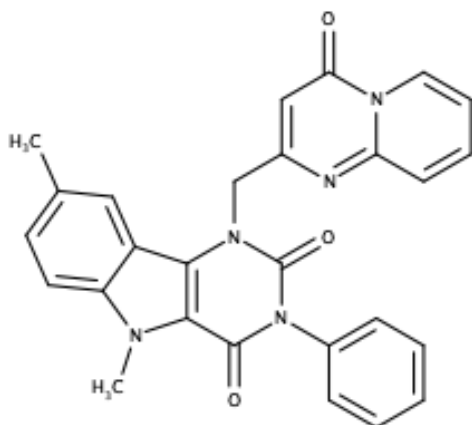


L13:N-(2,4-difluorofenyl)-2-[3-(3-fluoro-4-methylfenyl)-2,4-dioxo-[1]benzothiolo[3,2-d]pyrimidin-1-yl]acetamid

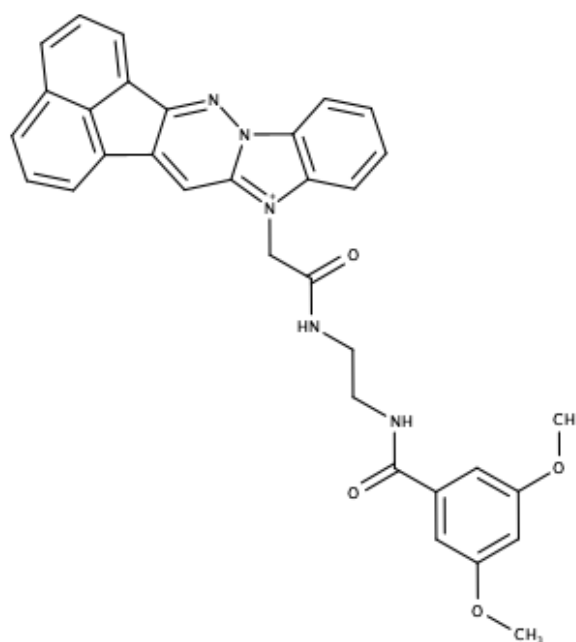
3.PRAKTICKÁ ČÁST



L14:N-[(4-ethoxy-3-methoxyfenyl)methyl]-2-[(9-fluoro-1]benzothio[3,2-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]acetamid



L15:5,8-dimethyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]-3-fenylpyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion



L16: N-{2-[(3,5-dimethoxyphenyl)formamido]ethyl}-2-{3,4,11lambda4-triazahexa-cyclo[13.7.1.0^{2,14}.0^{4,12}.0^{5,10}.0^{19,23}]tricosan-1(22),2,5,7,9,11,13,15(23),16,18,20-undecaen-11-yl}acetamid

Obr. 20 Struktury zkoušených ligandů. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

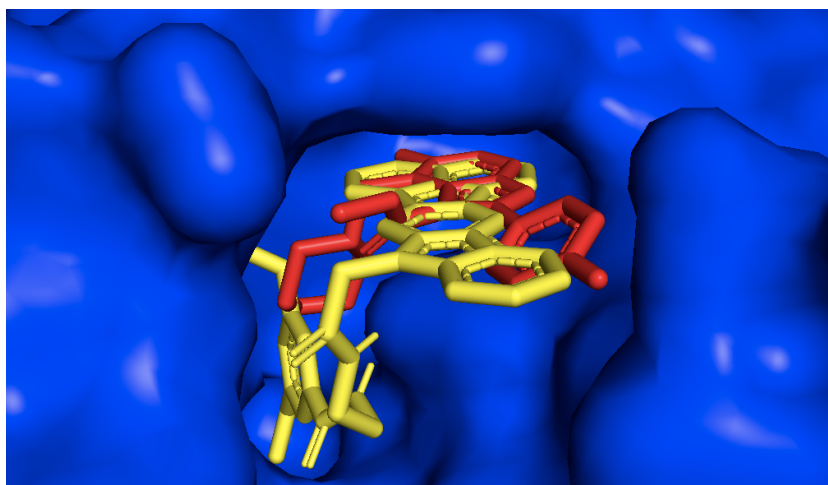
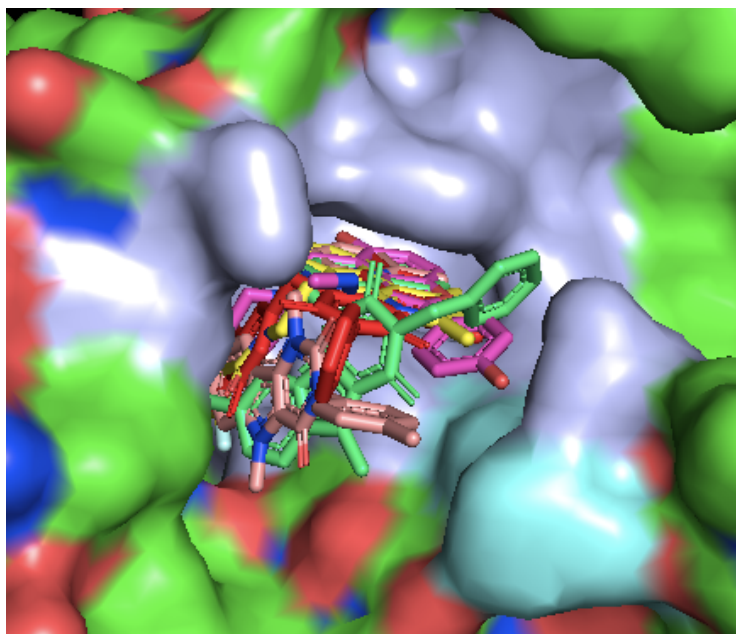
3. PRAKTICKÁ ČÁST

Ligan dy	IUPAC název	Vazebn á energie [kcal/ mol]
L1	6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin	-10,4
L2	N-[2-(2,4-dimethylpyrido[2,3-b]indol-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid, N-[2-(2,4-dimethylindolo[2,3-b]pyridin-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid	-11,1
L3	2-amino-1-[(Z)-(2-methoxyfenyl)methylidenamino]-N-[(2R)-4- fenylbutan-2-yl]pyrrolo[3,2-b]chinoxalin-3-karboxamid	-10,5
L4	6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluormethyl)- [1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin	-10,9
L5	ethyl 5-(3-kyano-4,6-dimethylpyridin-2-yl)sulfanyltriazolo[1,5- a]chinazolin-3-karboxylát	-10,3
L6	5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]- 3-(4-methylfenyl)pyrimido[5,4-b]indole-2,4-dion	-11,3
L7	8-methoxy-5-methyl-3-(3-methylfenyl)-1-[(4-oxopyrido[1,2- a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	-10,6
L8	2,4-difluoro-N-[(E)-indeno[2,1-b]chromen-6- ylmethylidenamino]anilin	-10,6
L9	3-benzyl-8-methoxy-5-methyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2- yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	-11,1
L10	5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]- [1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin	-10,2
L11	3-(3-chlorofenyl)-5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2- a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	-10,8
L12	7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin	-9,9
L13	N-(2,4-difluorofenyl)-2-[3-(3-fluoro-4-methylfenyl)-2,4-dioxo- [1]benzothiolo[3,2-d]pyrimidin-1-yl]acetamid	-10,2
L14	N-[(4-ethoxy-3-methoxyfenyl)methyl]-2-[(9-fluoro- [1]benzothiolo[3,2-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]acetamid	-10,1
L15	5,8-dimethyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]-3- fenylpyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	-11,1

3.PRAKTICKÁ ČÁST

L16	N-{2-[(3,5-dimethoxyphenyl)formamido]ethyl}-2-{3,4,11lambda4-triazahexacyclo[13.7.1.0 ^{2,14} .0 ^{4,12} .0 ^{5,10} .0 ^{19,23}]tricosan-1(22),2,5,7,9,11,13,15(23),16,18,20-undecaen-11-yl}acetamid	-11,7
-----	---	-------

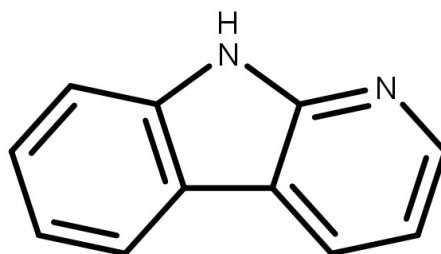
Tab. 5 Výsledek vazebné energie



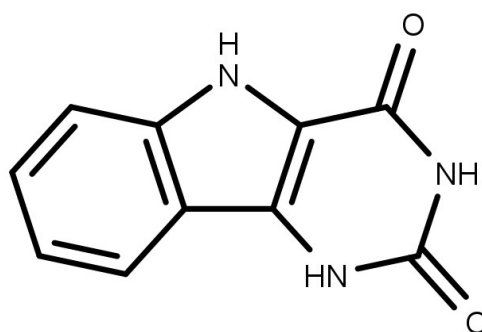
Obr. 21 Pozice zkoušených lgandů v enzymu Pks13. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

Výstupem molekulového dokování je výsledná vazebná energie a identifikace polohy ligandu, která je z termodynamického hlediska nejpravděpodobnější.

V Tab. 5 jsou uvedeny výsledky vazebné energie těchto ligandů. Na Obr. 21 jsou znázorněny některé pozice ligandů v rámci enzymu Pks13. Vazebná energie se pohybuje v rozmezí -9,9 až -11,7. Nejnižší vazebnou energií disponují ligandy: L2, L6, L9, L15, L16. Jedná se o látky, které mají ve své struktuře pyrido[5,4-b]indol (Obr. 22), respektive pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion (Obr. 23).



Obr. 22 Pyrido[5,4-b]indol. Vytvořeno v MarvinSketch [38].



Obr. 23 Pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dione. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

Tyto fragmenty, pravděpodobně, mají vliv na vazebnou afinitu. Obecně lze konstatovat, že všechny tyto ligandy vykazují zápornější vazebnou energii než základní struktura (Obr. 10). Lze, tedy, předpokládat vyšší afinitu k proteinu. Nicméně, na účinnosti sloučenin se podílí mnoho dalších faktorů. Jedná se především o fyzikálně chemické vlastnosti látek, které jsou představeny v následující části diplomové práce.

3.4.2 Farmakokinetické hodnocení látek

Bylo provedeno testování fyzikálně chemických vlastností u vygenerovaný ligandů, pomocí programu SwissADME [56]. V Tab. 6, lze porovnat výsledky jednotlivých sloučenin.

3. PRAKTICKÁ ČÁST

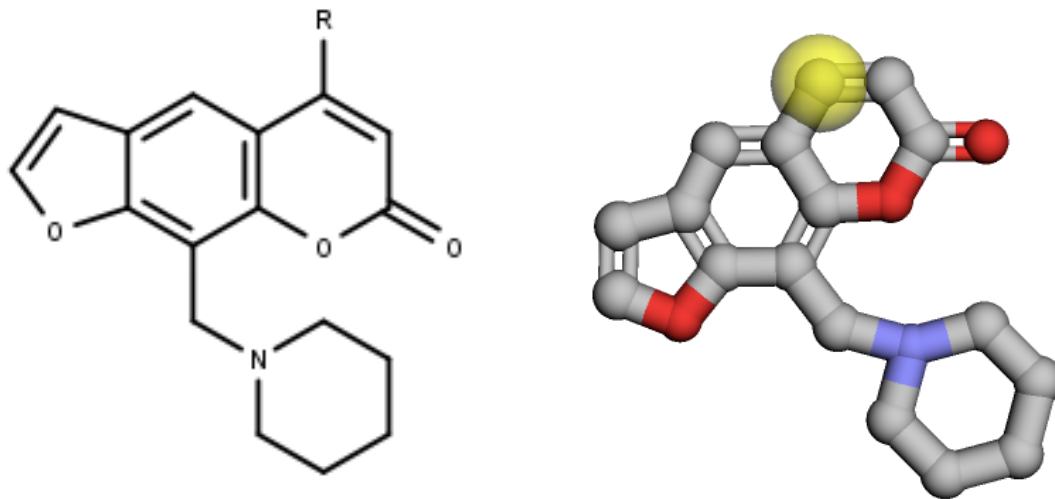
Ligandy	MW(g/mol)	R B N	LogP	TPSA (Å ²)	LogS	Csp3	H- a.	H- d.	GIT	Synth etic score
L1	395,5	6	4,51	39,94	-6,39	0,23	3	0	vysoká	3
L2	361,41	5	4,02	46,92	-5,02	0,18	3	1	vysoká	2,63
L3	492,57	9	3,46	107,42	-6,18	0,17	5	2	vysoká	4,38
L4	376,36	3	2,95	94,16	-4,87	0,19	8	0	vysoká	2,8
L5	404,45	5	2,47	131,36	-4,91	0,2	7	0	vysoká	3,35
L6	491,54	3	3,64	83,3	-5,53	0,17	4	0	vysoká	3,77
L7	493,51	4	3,34	92,53	-4,99	0,14	5	0	vysoká	3,56
L8	372,37	3	4,78	37,53	-6,6	0	4	1	nízká	3,61
L9	493,51	5	3,07	92,53	-4,66	0,14	5	0	vysoká	3,55
L10	346,41	2	2,92	97,06	-5,5	0,11	4	1	vysoká	2,9
L11	511,96	3	4,32	83,3	-5,82	0,14	4	0	vysoká	3,68
L12	497,18	3	4,84	39,94	-7,11	0,09	3	0	vysoká	2,56
L13	495,47	5	4,89	101,34	-6,44	0,08	6	1	nízká	3,54
L14	457,54	9	2,92	126,88	-5,52	0,23	6	1	nízká	3,45
L15	463,49	3	3,65	83,3	-4,92	0,11	4	0	vysoká	3,5
L16	558,61	1 0	3,41	98,58	-6,22	0,15	5	2	vysoká	4,12

Tab. 6 Výsledky fyzikálně chemických vlastností

Červeným stínováním, je znázorněno překročení jednoho z Lipinského pravidla pěti. Pouze jedna z látek nevyhovuje Lipinskému pravidlu pěti. Jedná se o ligand L11, jež nesplňuje více než jedno z pravidel, nebude tak pro perorální podání příliš vhodná.

3.5 Optimalizace ligandů

Další část diplomové práce je zaměřena na úpravu ligandů s cílem zvýšení vazebné afinity. S využitím volně dostupného programu DeepFrag [57] byla základní struktura ligandu (Obr. 10) upravena a následně dokována v programu Pyrx. DeepFrag je program určený k fragmentaci molekulárních struktur, jedná se o proces, při kterém dochází k rozdělení molekuly na menší fragmenty. Tyto fragmenty lze substituovat na zvolená místa vybraného ligandu a výstupem jsou zcela nové ligandy, které mohou být podrobené dalšímu zkoumání. Na Obr. 24 jsou uvedeny struktury ligandů a místa zavedení substituentů. Následně v Tab. 7 jsou uvedené výsledné hodnoty vazebné energie nově vygenerovaných ligandů.




Obr. 24 Místo zavedení substituentů. Byl zkoumán vliv skupiny R na výslednou vazebnou energii Tab. 7. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

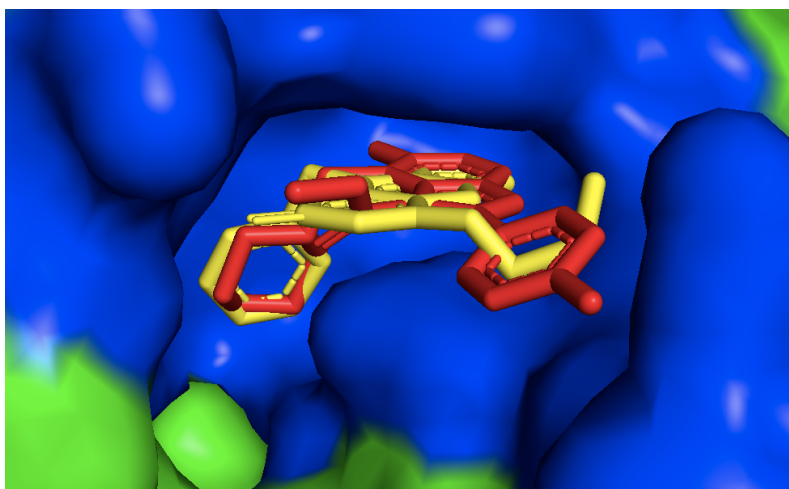
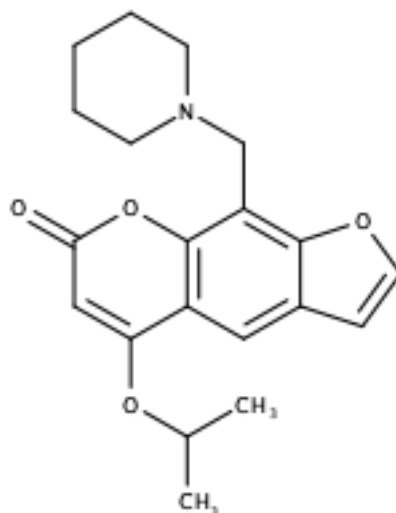
Skupiny R	Vazebná energie [kcal/mol]
$\text{HO}-\text{R}$	-9,8
$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{R}$	-10,1
$\text{H}_3\text{C}-\text{R}$	-10,4
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-9,8
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{R}$	-10,1
$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{O}-\text{R}$	-9,8
$\text{F}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-9,8
$\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{R}$	-10
$\text{HO}-\text{O}-\text{R}$	-9,9

3.PRAKTICKÁ ČÁST

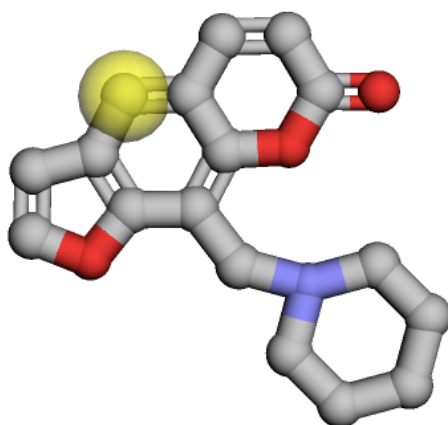
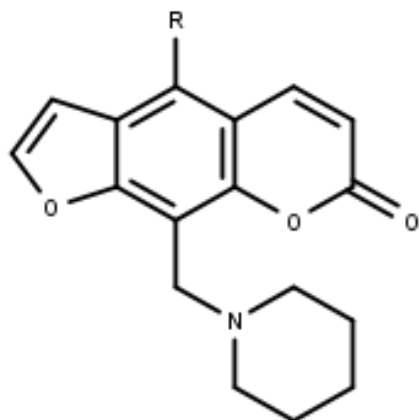
	-10,2
	-9,6
	-10,2
	-9,9
	-10,6
	-9,5
	-10,2
	-10,1
	-10
	-9,8

	-9,8
---	------

Tab. 7 Výsledky vazebné energie druhé substituce



Obr. 25 Struktura ligandu o vazebné energii -10,6 kcal/mol= 9-[(piperidin-1-yl)methyl]-5-(propan-2-yloxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-on a vazba tohoto ligandu (žlutá barva) s tam16 (červená barva).

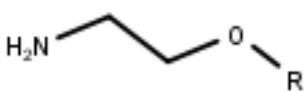
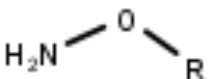
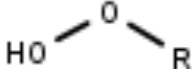

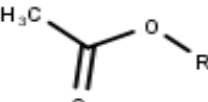



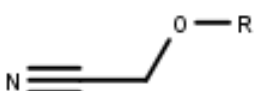



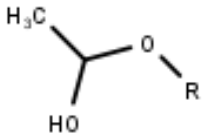
Obr. 26 Místo zavedení substituentů. Byl zkoumán vliv skupiny R na výslednou vazeb-nou energii. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

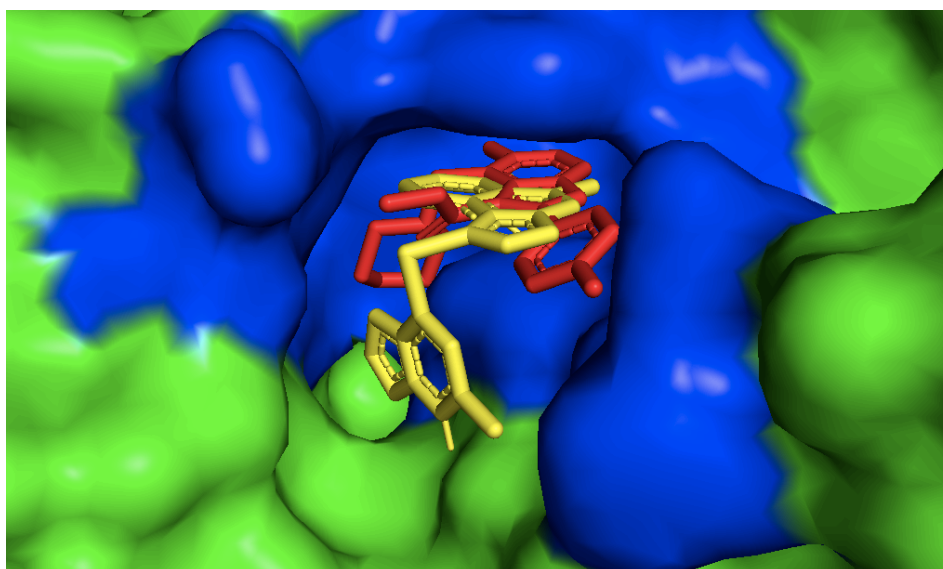
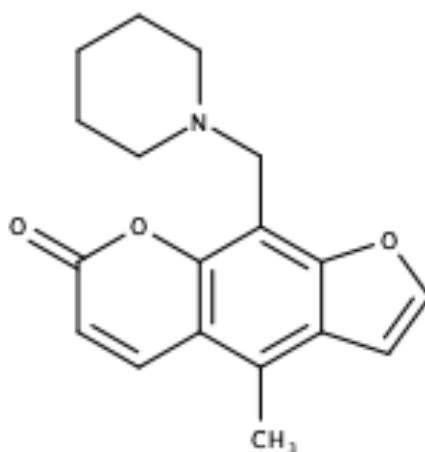
Skupiny R	Vazebná energie [kcal/mol]
$\text{HO}-\text{R}$	-10,1
$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{R}$	-10,2
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-10,3
$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{O}-\text{R}$	-10,2
$\text{F}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-10,2
$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-10
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$	-10,2
$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{H}_3)-\text{O}-\text{R}$	-9,6
$\text{H}_3\text{C}-\text{R}$	-10,7

3.PRAKTICKÁ ČÁST

	-9,6
	-10,1
	-10,1
	-10,2
	-9,4
	-10,4
	-10
	-10
	-9,9
	-10

	-9,8
---	------

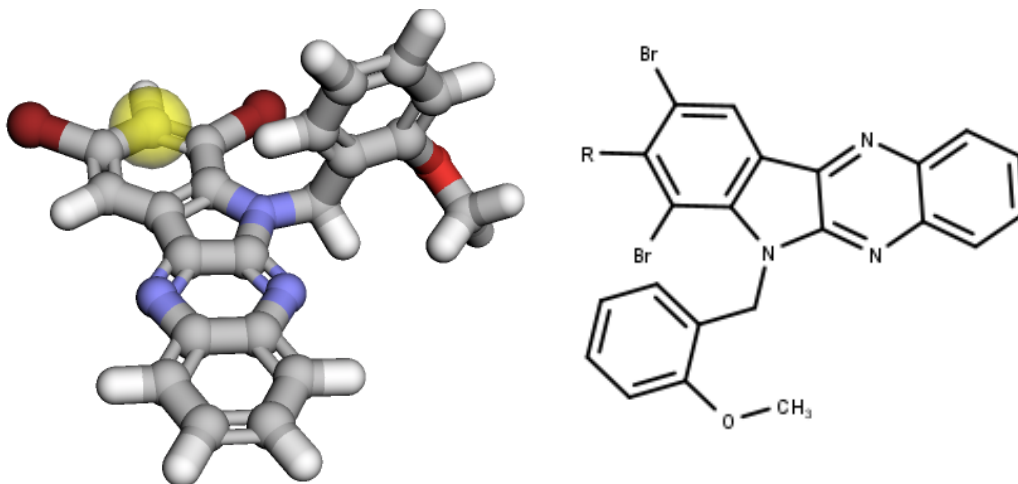
Tab. 8 Výsledky vazebné energie



Obr. 27 Struktura ligandu o vazebné energii -10,7 kcal/mol= 4-methyl-9-[(piperidin-1-yl)methyl]-7H-furo[3,2-g]chromen-7-on a vazba tohoto ligandu (žlutá barva) s tam16 (červená barva).

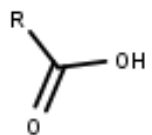
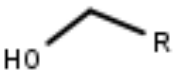
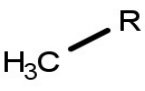
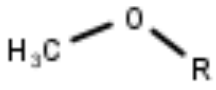
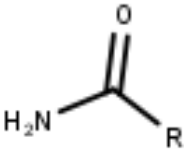
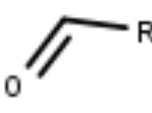
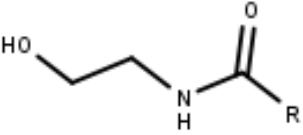
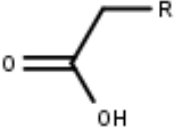
3.PRAKTICKÁ ČÁST

Poté byl zvolen ligand **7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin**. Následně s využitím volně dostupného programu DeepFrag byl ligand upraven a vzniklo nových 20 ligandů, které bylo možné dokovat. Nově vygenerované ligandy byly dokovány v programu Pyrx. Výsledky vazebné energie jsou zaznamenány v Tab. 9.



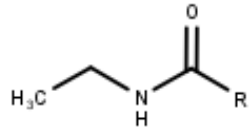
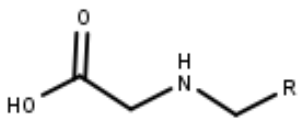
Obr. 28 Obr. 28 Ligand 7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin, R znázorňuje místo substituce viz Tab. 9. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

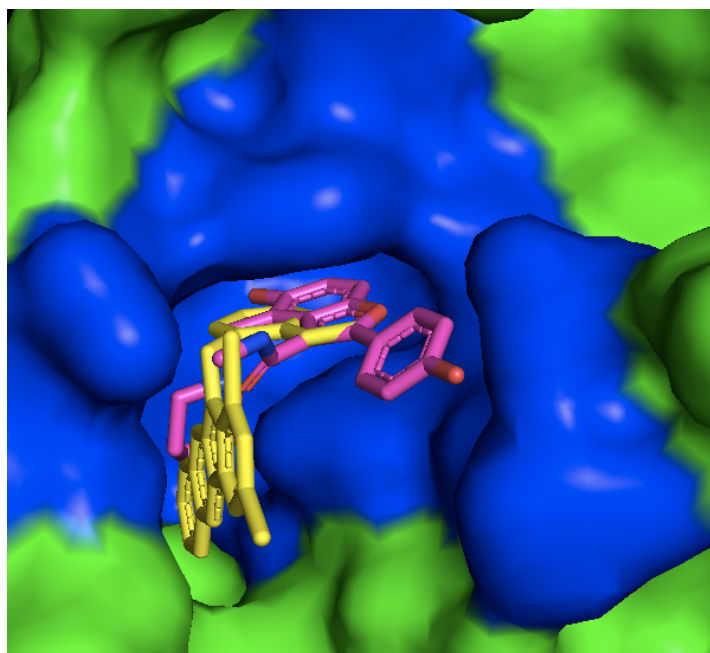
Skupiny R	Vazebná energie [kcal/mol]
	-9,8
	-9,5
	-9,2
	-8,8
	-10
	-8,8
	-8,5
	-10,3

3.PRAKTICKÁ ČÁST

	-8,9
	-9,2
	-9,4
	-8,8
	-9,4
	-8,8
	-9,3
	-8,6
	-8,7
	-8,7

	-9,2
	-9,8

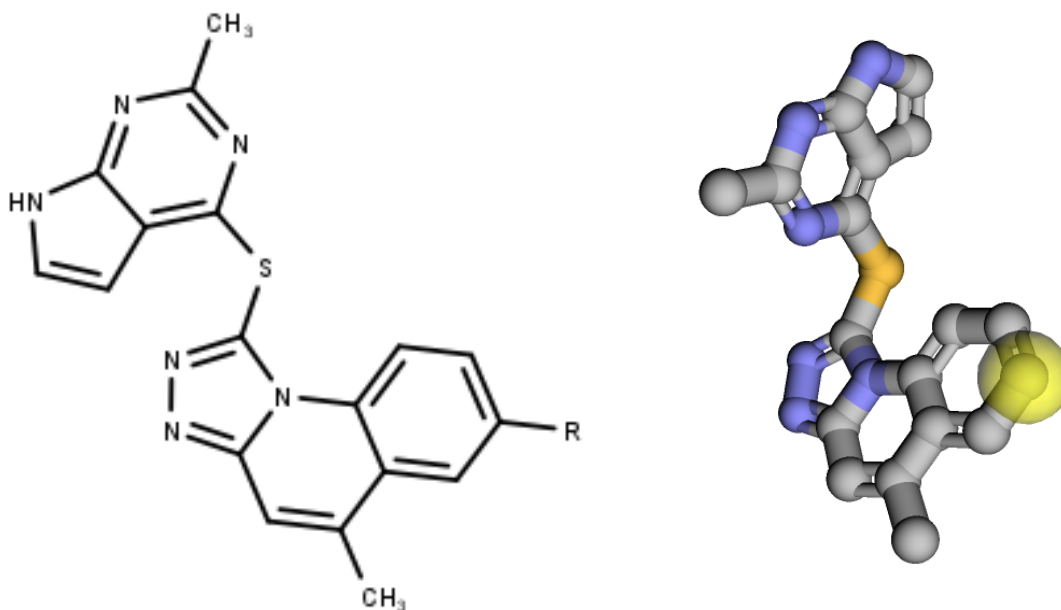
Tab. 9 Výsledky vazebné energie



Obr. 29 Pozice ligandu 9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin v enzymu Pks13. Původní ligand tam 16 je znázorněn růžově a ligand 9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin žlutě. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

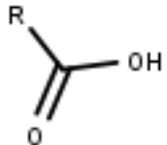
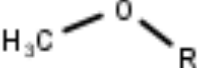

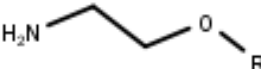
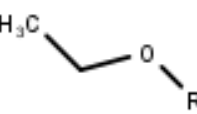
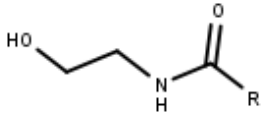
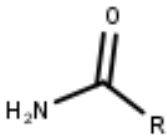
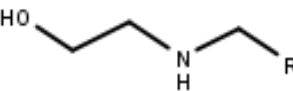
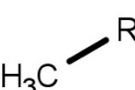
3.PRAKTICKÁ ČÁST

Následně byl zvolen ligand **5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin**, a byl zkoumán vliv skupiny R na výslednou vazebnou energii (výsledky viz Tab. 10).

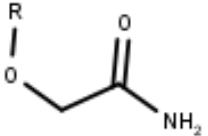
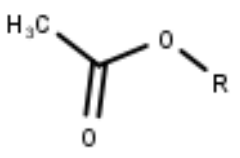
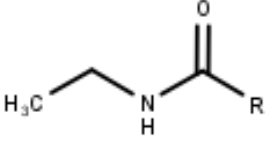
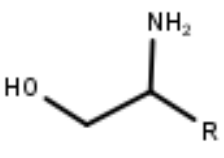
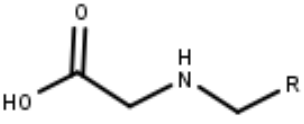
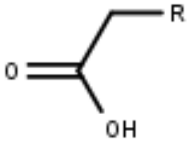
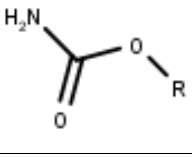
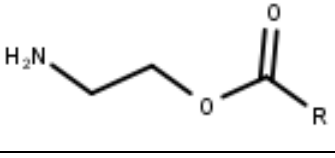


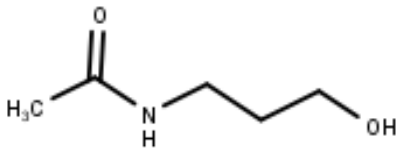
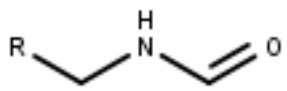

Obr. 30 Ligand 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin, R znázorňuje místo substituce. Vytvořeno v MarvinSketch [38].

3. PRAKTICKÁ ČÁST

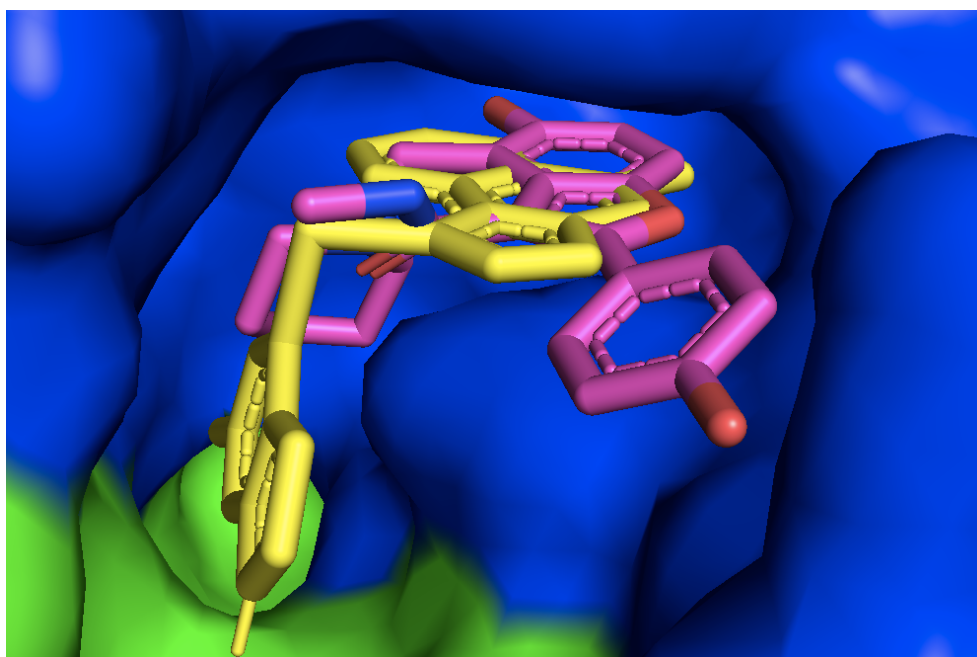
Skupiny R	Vazebná energie [kcal/mol]
	-10,3
	-9,0
	-9,5
	-9,2
	-10,2
	-10,1
	-9,7
	-9,4
	-10,5

3.PRAKTICKÁ ČÁST

	-10,4
	-9,7
	-10,6
	-8,9
	-10,9
	-9,8
	-10,5
	-9,6

	-9,5
	-9,9
	-9,4

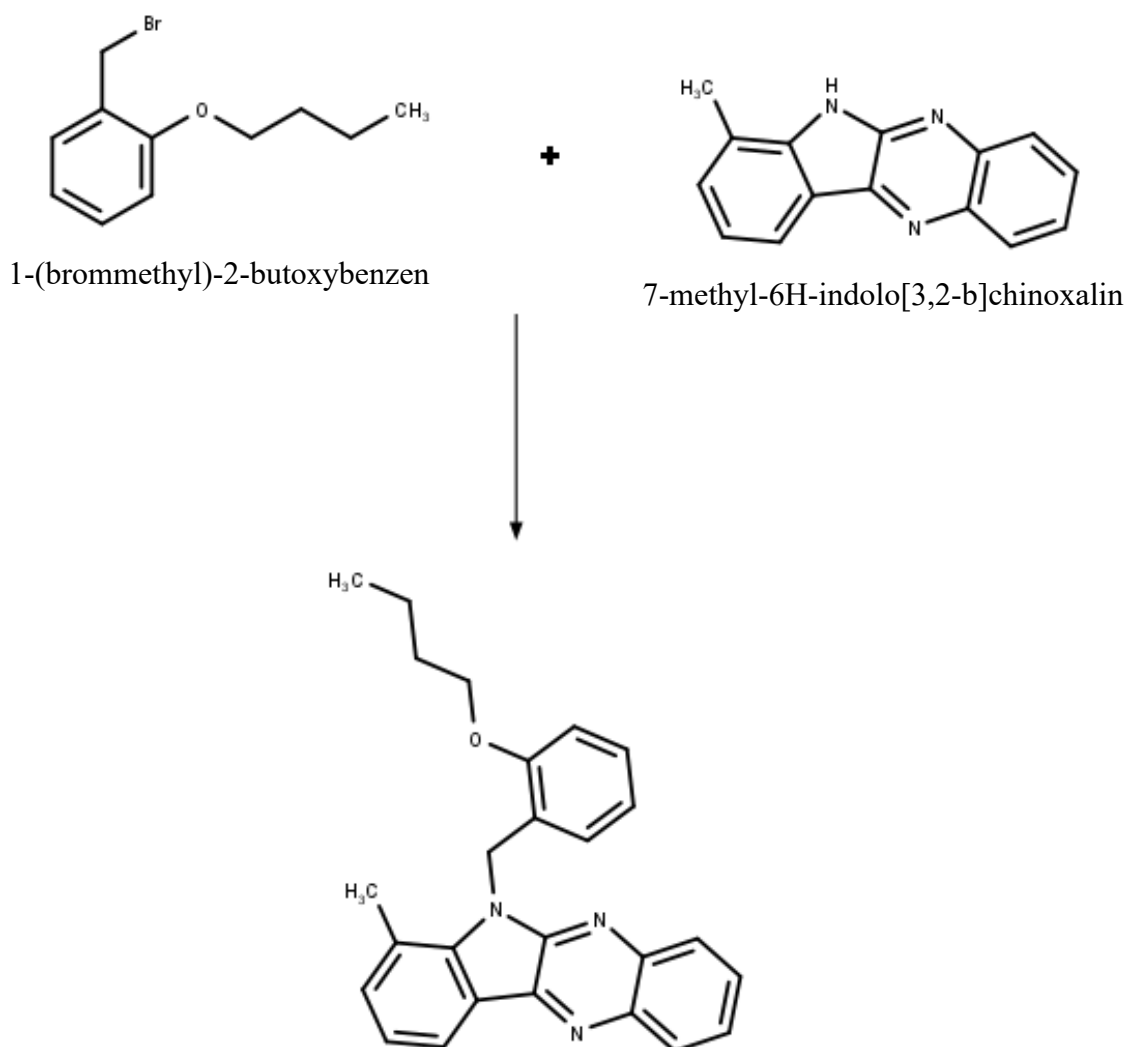
Tab. 10 Výsledky vazebné energie



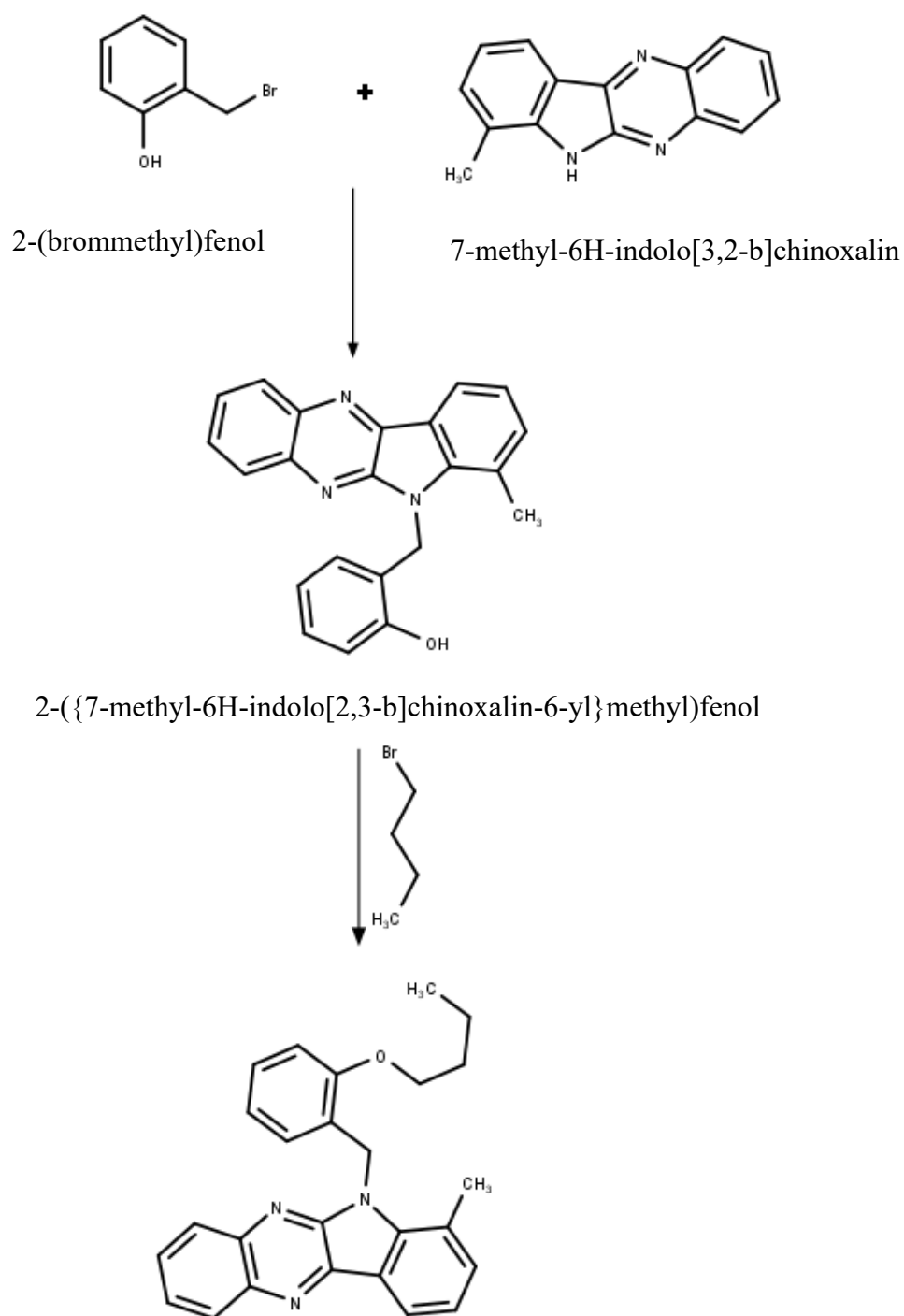
Obr. 31 Pozice ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin v enzymu Pks13. Původní ligand tam 16 je znázorněn růžově a ligand 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin žlutě. Vytvořeno v programu PyMOL [55].

3.6 Návrh syntézy sloučenin

Poslední část diplomové práce je zaměřená na návrh chemické syntézy získaných ligandů. MANIFOLD PostEra [61] je online platforma, která se specializuje na vývoj nových léčivých látek. Využívá strojové učení a umělou inteligenci k návrhu nových molekul s potenciální léčebnou účinností. MANIFOLD PostEra navrhuje možnosti chemické syntézy, které jsou nejefektivnější a nejlevnější pro výrobu těchto látek. Na následujících obrázcích jsou uvedené možnosti syntézy některých zkoumaných ligandů.

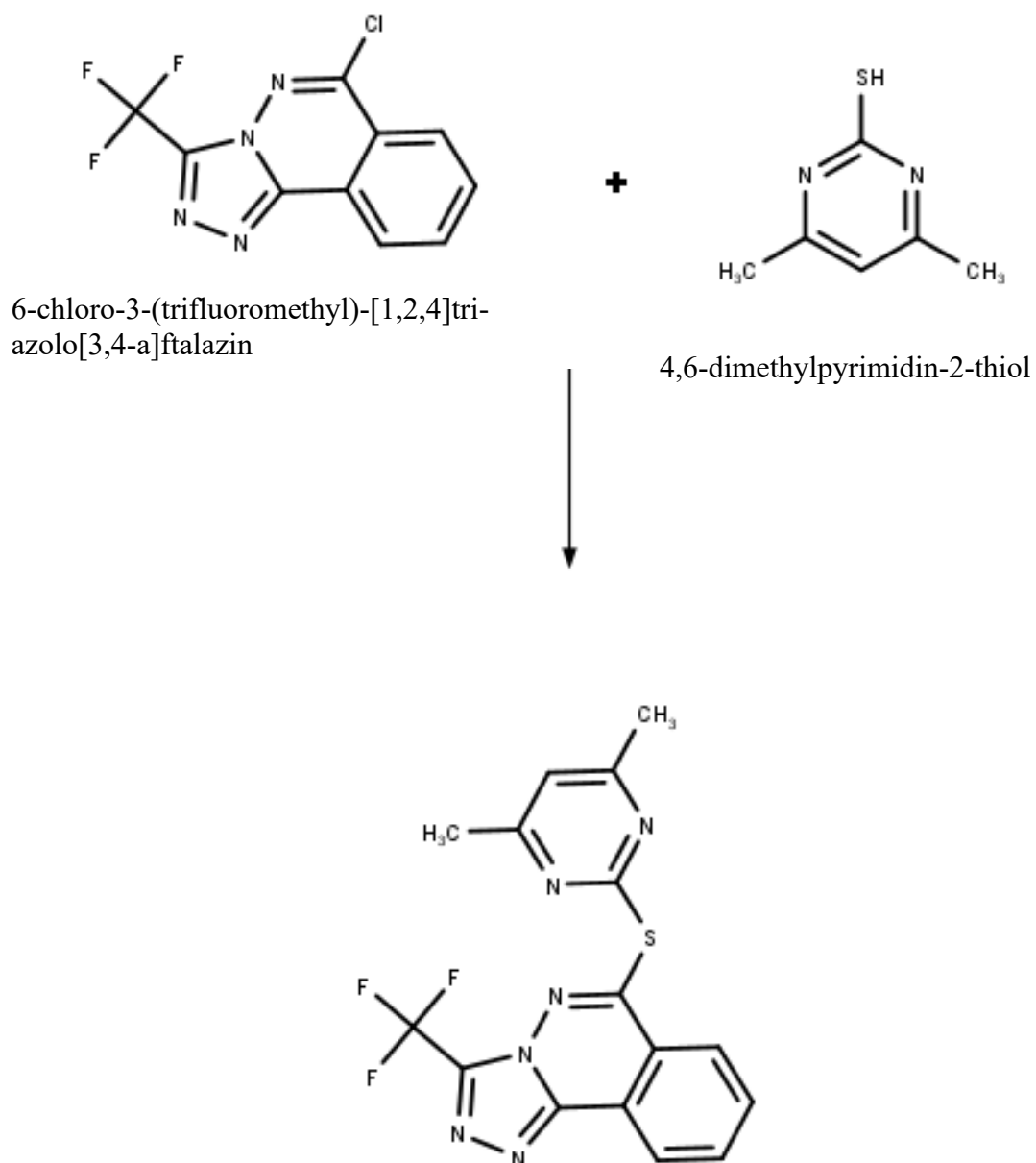


Obr. 32 Ukázka syntézy 6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin pomocí nukleofilní substituční reakce. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].

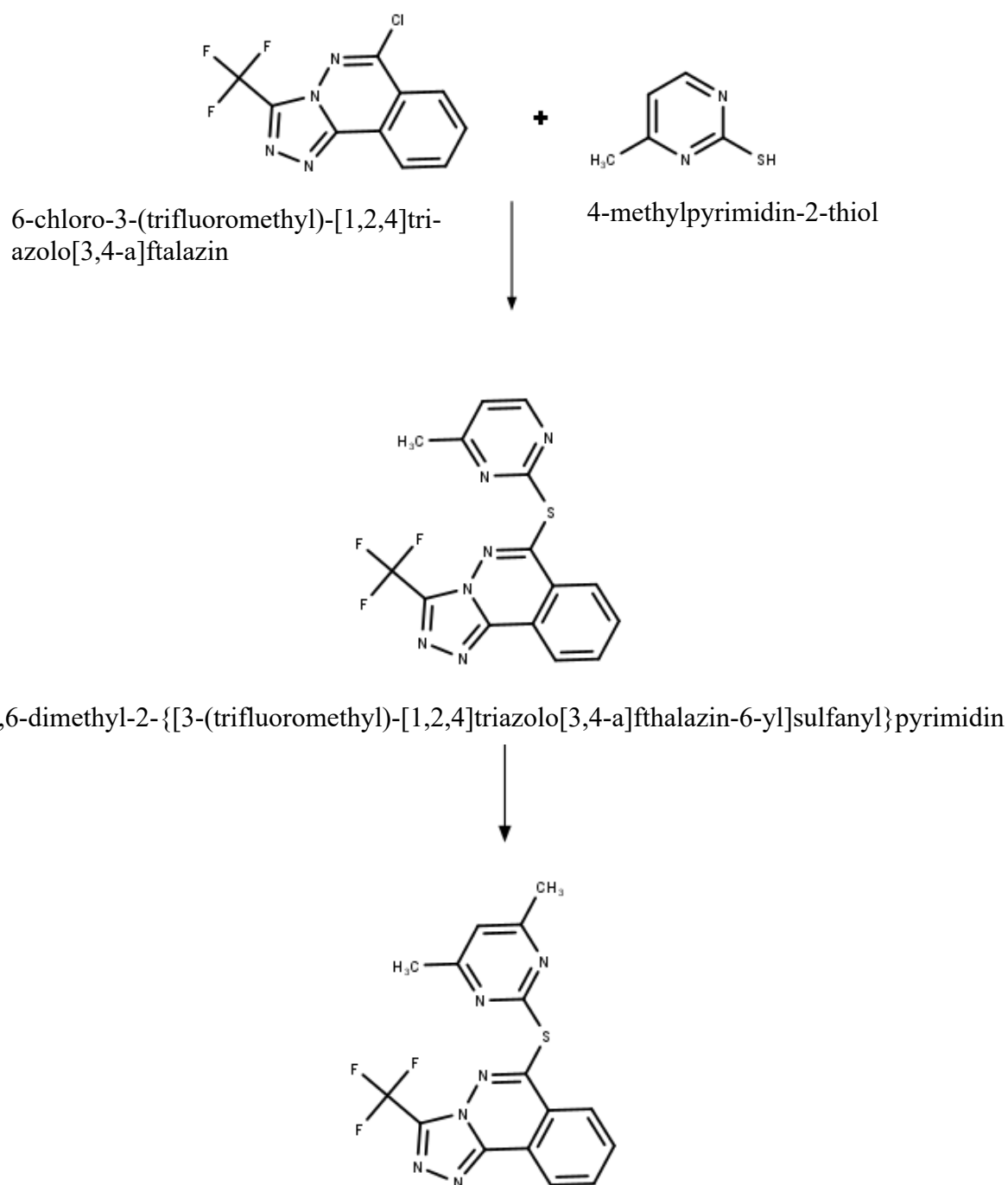


Obr. 33 Návrh syntézy 6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin ve dvou krocích. V prvním je nukleofilní substituční reakce a v druhém kroku Williamsonova syntéza etherů. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].

3.PRAKTICKÁ ČÁST

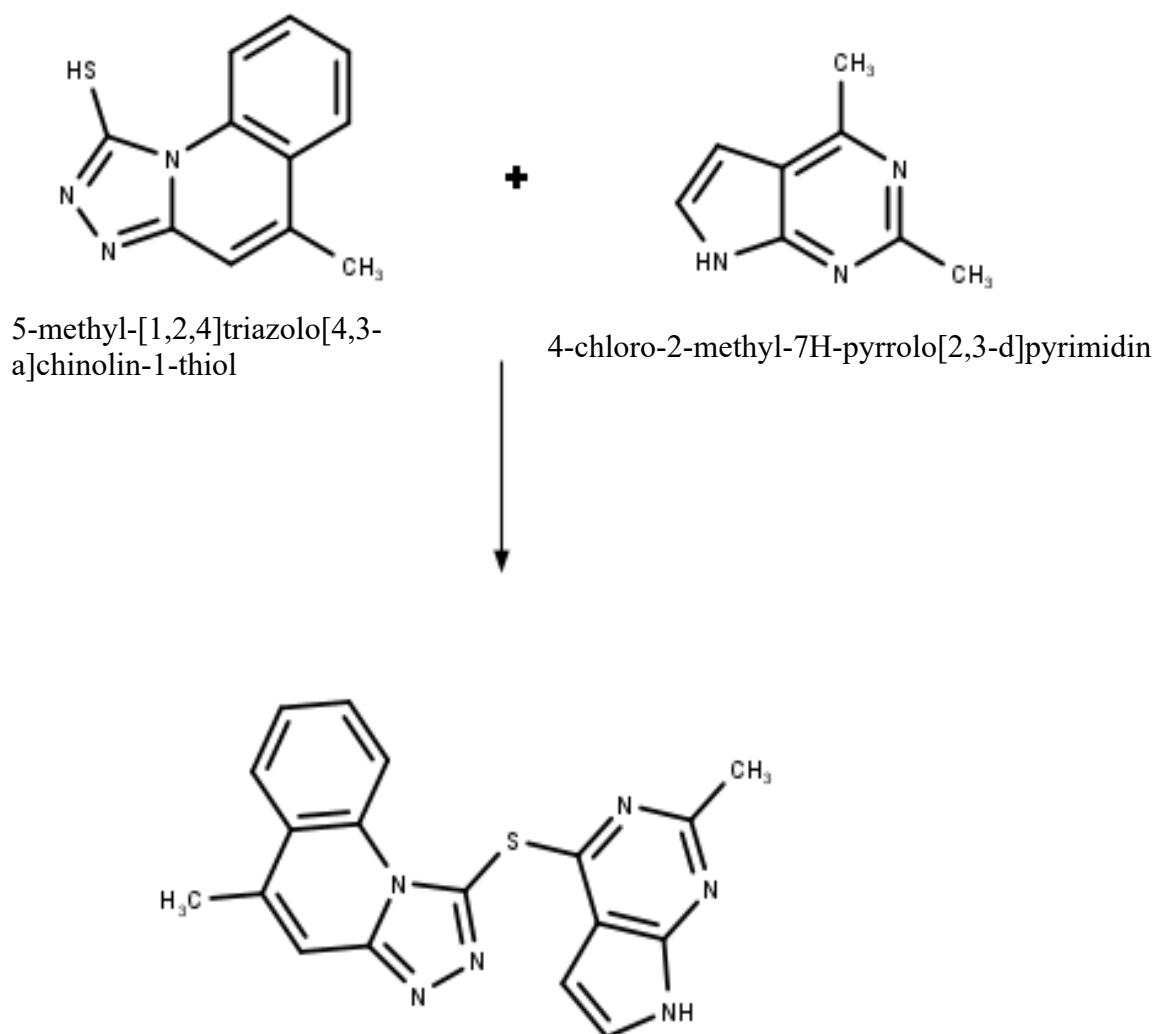


Obr. 34 Návrh syntézy ligandu 6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluoromethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin nukleofilní aromatickou substitucí. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].

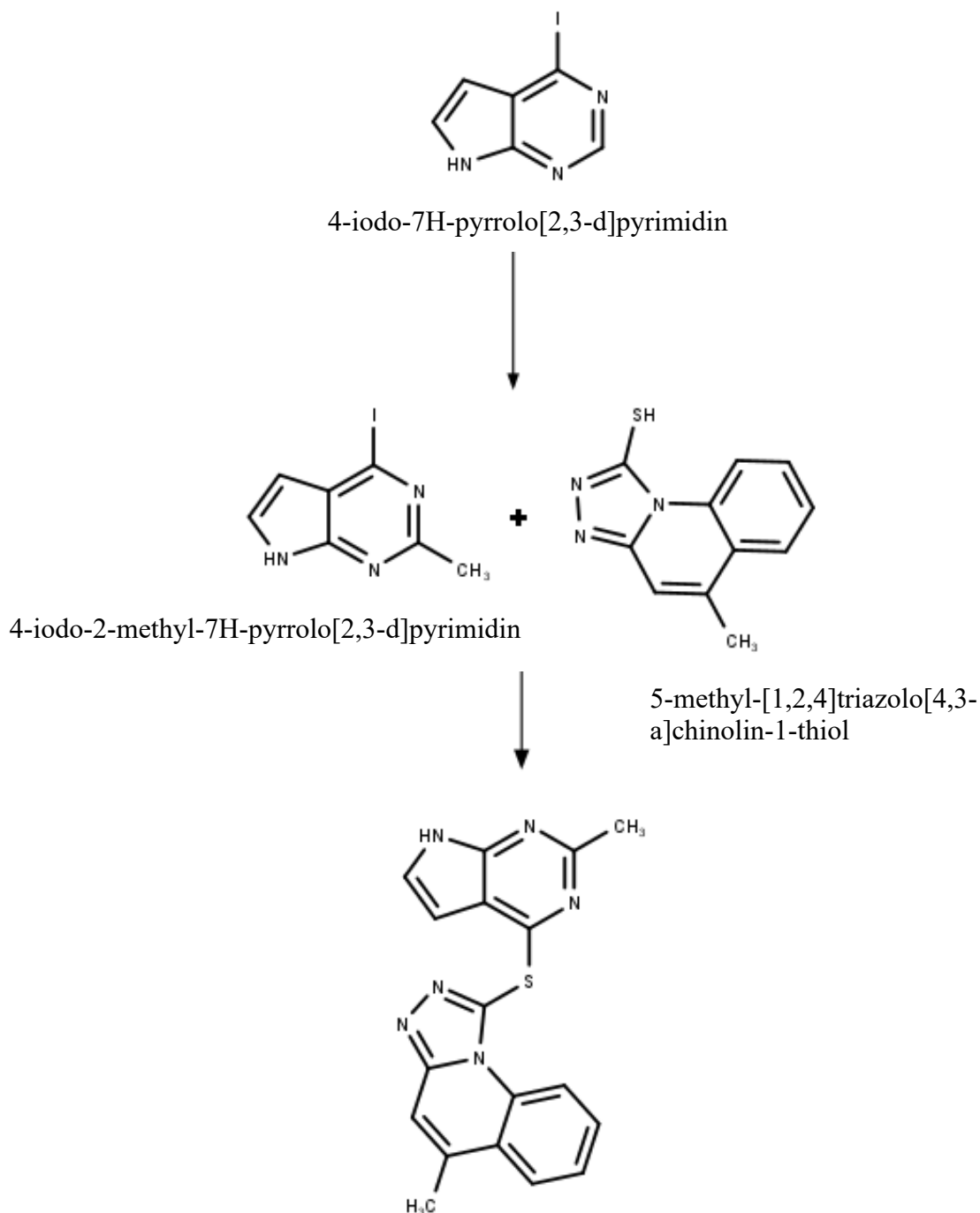


Obr. 36 Návrh syntézy ligandu 6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluoromethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]fthalazin. První krokem syntézy je nukleofilní aromatická substituce a druhým krokem je Friedelova-Craftsova methylace. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].

3.PRAKTICKÁ ČÁST



Obr. 37 Návrh syntézy ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin nukleofilní aromatickou substitucí. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].



Obr. 38 Syntéza ligandu 5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin. První krokem je nukleofilní aromatičká substituce a druhým krokem je Friedelova-Craftsova methylace. Struktury vytvořené v MarvinSketch [38].

Diskuze

V současné době jsou virtuální screeningové metody nezbytnou součástí výzkumu a vývoje léčiv, hlavně díky jejich rychlosti a přístupnosti. Tyto techniky umožňují v krátkém čase pomocí výpočetní techniky předpovědět aktivitu a interakce mnoha sloučenin s aktivním centrem. To umožňuje zvolit nejvhodnější sloučeniny pro další testování, což vede k urychlení, zvýšení efektivity a snížení nákladů celého procesu.

Experimentální část práce se zaměřila na identifikaci potenciálních inhibitorů enzymu Pks13, který má podstatnou úlohu v metabolismu *Mycobacterium tuberculosis*. Molekulové dokování a farmakoforové modelování byly klíčovými technikami použitými v této práci k identifikaci a optimalizaci inhibitorů.

Pro tvorbu nových inhibitorů enzymu Pks13, bylo zvoleno primárně farmakoforové modelování. Farmakofor byl stanoven na základě interakce mezi navrženým ligandem a cílovým enzymem. Následně bylo vygenerováno celkem 243 sloučenin a u 195 z nich bylo provedeno molekulové dokování, jejíž výstupem byla hodnota vazebné energie. Vazebná energie představuje míru interakce mezi molekulou ligandu a proteinem. Čím silnější je tato interakce, tím vyšší je afinita ligandu k cílové molekule a tím větší je pravděpodobnost, že tento ligand bude mít terapeutický účinek. Ligand s nejvyšší afinitou měl hodnotu -11,3 kcal/mol a nejmenší -9,9 kcal/mol (původní inhibitor TAM16 měl -10 kcal/mol).

Kromě zmiňované afinity, majoritní část zkoumaných látek splňovala Lipinského pravidlo pěti. Toto pravidlo pomáhá zajistit, že molekula léčiva bude mít optimální biologickou dostupnost a účinnost. To znamená, že tyto látky by mohly být dobře absorbovány v organismu a měly by mít vhodné fyzikálně chemické vlastnosti pro perorální podání. V závěru práce jsou nastíněné možnosti chemické syntézy získaných ligandů.

Je důležité pamatovat na to, že virtuální screening je pouze prvním krokem při hledání nových léčiv. Tyto sloučeniny je nutné dále testovat a ověřovat pomocí laboratorních experimentů a klinických studií, aby byla potvrzena jejich bezpečnost a účinnost na živých organismech.

Závěr

In silico metody, jako je virtuální screening a molekulové modelování, jsou velmi užitečné pro rychlé a efektivní testování velkého množství molekul, což může výrazně snížit náklady a čas potřebný pro vývoj nových léčiv. Pomocí in silico metod lze také testovat farmakokinetické vlastnosti molekul a navrhnout možnou chemickou syntézu látek. Nicméně, tyto metody mají svá omezení a nenahradí zcela in vitro a in vivo experimenty.

Vývoj nových antituberkulotik je důležitou oblastí výzkumu, protože tuberkulóza je dosud závažným zdravotním problémem v mnoha zemích. Současná terapie je navzdory významnému pokroku stále poměrně dlouhá a může mít závažné nežádoucí účinky. Navíc se objevují nové rezistentní kmeny, které jsou odolné vůči existujícím léčivům.

Byly využity mnohé in silico metody, včetně molekulového modelování, farmakoforové modelování, optimalizace ligandů, farmakokinetického hodnocení látek a návrhu chemické syntézy, jejíž cílem bylo identifikovat slibné kandidáty pro další vývoj.

Analýza vazebné energie mezi ligandy a aktivním místem enzymu Pks13 ukázala, že většina sloučenin má vysokou vazebnou afinitu, a tudíž velký potenciál antimikrobiální aktivity.

Další rozšíření této práce může zahrnovat syntézu navržených molekul, a následné in vivo testování účinnosti a bezpečnosti těchto látek.

Použité zdroje

1. **Jan Švihovec, Jan Bultas, Pavel Anzenbacher, Jaroslav Chládek, Jan Příborský, Jiří Slíva, Martin Votava.** *Farmakologie*. Praha : GRADA, 2018
2. **Koščová, P. a Provazník, I.** RACIONÁLNÍ NÁVRH LÉČIV S VYUŽITÍM FARMAKOFOROVÉHO MODELOVÁNÍ. *Chemické listy*. [Online] 2016. [Citace: 4. Říjen 2022.] http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_08_575-580.pdf
3. **Svozil, D.** Virtuální screening. *Chemické listy*. [Online] 2017. [Citace: 17. Září 2022.] <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2814>
4. **Danishuddin, M. and Khan, A. U.** Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: Necessary considerations and successful case studies. *Methods*. [Online] 2015. [Citace: 5. Říjen 2022.] <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2014.10.019>
5. **Svozil, D., & Bartůněk, P.** Počítačový návrh léčiv – přeceňovaný či užitečný pomocník? *Chemické Listy*. [Online] 2017. [Citace: 18. Září 2022.] <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2809>
6. **Novotný, J., & Svozil, D.** Popis a určování podobnosti molekul s pomocí molekulárních deskriptorů. *Chemické Listy*. [Online] 2017. [Citace: 2022. Září 20.] <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2811>
7. **Škuta, C., & Svozil, D.** QSAR – Modelování kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou chemických látek. *Chemické Listy*. [Online] 2017. [Citace: 21. Září 2022.] <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2815>
8. **C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg and L. A. Mitscher.** Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*. [Online] 2009. [Citace: 28. Září 2022.] <https://doi.org/10.1351/pac199870051129>

9. **Koes, D.R. a Camacho, C. J.** *Nucleic Acids Research. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database.* [Online] 2012.
<https://academic.oup.com/nar/article/40/W1/W409/1072552>
10. **Koes, D.R. and Camacho, C.J.** ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Research.* [Online] 2012. [Citace: 4. Říjen 2022.] 10.1093/nar/gks378
11. **Pagadala, N.S., Syed, K. & Tuszyński, J.** Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev.* [Online] 2017. [Citace: 6. Říjen 2022.] <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
12. **Šícho, M., & Svozil, D.** Molekulové dokování jako nástroj pro virtuální návrh léčiv. *Chemické Listy.* [Online] 2017.
<http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2816>
13. **Jose M. Duarte, Shuchismita Dutta, David S. Goodsell, Stephen K. Burley.** Exploring protein symmetry at the RCSB Protein Data Bank. *Emerg Top Life Sci.* [Online] 2022.
<https://doi.org/10.1042/ETLS20210267>
14. **Helen M. Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, Philip E. Bourne.** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* [Online] 2000.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
15. **CAVASOTTO, Claudio N. a Sharangdhar S. PHATAK.** Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today.* [Online] 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.04.006>
16. **A. Daina, O. Michielin, V. Zoete.** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. . [Online] 2017. doi: 10.1038/srep42717
17. **Bulti Bakchi, Ambati Dileep Krishna, Ekambarapu Sreecharan, Veeramallu Bala Jaya Ganesh, Muraboina Niharika, Suryadevara Maharshi, Srinivasa Babu Puttagunta, Dilep Kumar Sigalapalli, Richie R. Bhandare, Afzal B. Shaik.** An overview on applications of SwissADME web tool in the design and development of anticancer, antitubercular and antimicrobial agents:

- A medicinal chemist's perspective. *Journal of Molecular Structure*. [Online] 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132712>
18. **Lipinski, Christopher A.** Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. [Online] 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
 19. **Sarah Kim, Arnold Louie, George L. Drusano, Mohammed Almoslem, Soyoung Kim, Jenny Myrick, Jocelyn Nole, Brandon Duncanson, Charles A. Peloquin, Charles A. Scanga, Walter Yamada, Michael Neely, Stephan Schmidt.** Evaluating the effect of clofazimine against Mycobacterium tuberculosis given alone or in combination with pretomanid, bedaquiline or linezolid. *International Journal of Antimicrobial Agents*. [Online] 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106509>
 20. **Organization, WHO-World Health.** Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. *World Health Organization*. [Online] 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>
 21. **Ivana Hricíková, Emília Kopecká, Veronika Polcová, Zsuzanna Gyorfy, Martina Vašáková.** Problematika tuberkulózy a latentní tuberkulózní infekce u pacientů s idiopatickými střevními záněty léčenými biologickou léčbou. *Gastroenterologie a hepatologie*. [Online] 2017. doi:10.14735/amgh2017251
 22. **Wani, M.A., Dhaked, D.K.** argeting the cytochrome bc1 complex for drug development in M. tuberculosis: review. *Molecular Diversity*. [Online] 2021. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10335-y>
 23. **Aparna Bahuguna, Diwan S. Rawat.** An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. *Medical Research Reviews*. [Online] 2019. <https://doi.org/10.1002/med.21602>
 24. **Organization, World Health.** WHO. *Global tuberculosis report 2021*. [Online] 2021. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>
 25. **Sabine Gavalda, Fabienne Bardou, Françoise Laval, Cécile Bon, Wladimir Malaga, Christian Chalut, Christophe Guilhot, Lionel**

- Mourey, Mamadou Daffé, Annaïk Quémard.** The Polyketide Synthase Pks13 Catalyzes a Novel Mechanism of Lipid Transfer in Mycobacteria. *Chemistry & Biology*. [Online] 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.011>
26. **Barry CE, Crick DC, McNeil MR.** Targeting the formation of the cell wall core of *M. tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets*. [Online] 2007. 10.2174/187152607781001808
27. **Shichun Lun, Shiqi Xiao, Wei Zhang, Shuangshuang Wang, Hendra Gunosewoyo, Li-Fang Yu Ifyu, William R. Bishai.** Therapeutic Potential of Coumestan Pks13 Inhibitors for Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [Online] 2021. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.02190-20>
28. **Favrot L, Ronning DR.** Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. *Expert Rev Anti Infect Ther*. [Online] 2012. doi: 10.1586/eri.12.91
29. **Iéčiv, Státní ústav pro kontrolu.** Deltyba-doprovodné texty. *SÚKL*. [Online] 2021. <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0210404&tab=texts>
30. **Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffé M, Guilhot C.** A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Online] 2004. doi: 10.1073/pnas.0305439101. Epub 2003 Dec 26. PMID: 14695899; PMCID: PMC314182
31. **Xiao Wang, Wenting Zhao, Bin Wang, Wei Ding, Hao Guo, Hongyi Zhao, Jianzhou Meng, Sihan Liu, Yu Lu, Yishuang Liu, Dongfeng Zhang.** Identification of inhibitors targeting polyketide synthase 13 of *Mycobacterium tuberculosis* as antituberculosis drug leads. *Bioorganic Chemistry*. [Online] 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105110>
32. **Sacchettini, Anup Aggarwal Maloy K. Parai Nishant Shetty Petros C. Karakousis Anne J. Lenaerts James C.** Development of a novel lead that targets *M. tuberculosis* polyketide synthase 13. *Cell*. [Online] 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.025>

33. **Wilson, R., Kumar, P., Parashar, V. et al.** Antituberculosis thiophenes define a requirement for Pks13 in mycolic acid biosynthesis. *Nat Chem Biol* 9. [Online] 2013. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1277>
34. **Christopher M. Goins, Thanuja D. Sudasinghe, Xiaofan Liu, Yanping Wang, George A. O'Doherty, and Donald R. Ronning.** Characterization of Tetrahydrolipstatin and Stereoderivatives on the Inhibition of Essential Mycobacterium tuberculosis Lipid Esterases. *Biochemistry*. [Online] 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00152>
35. **Wei Zhang, Shichun Lun, Ling-Ling Liu, Shiqi Xiao, Guanfu Duan, Hendra Gunosewoyo, Fan Yang*, Jie Tang, William R. Bishai*, and Li-Fang Yu*.** Identification of Novel Coumestan Derivatives as Polyketide Synthase 13 Inhibitors against Mycobacterium tuberculosis. Part II. *Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00010>
36. **Baptista R, Bhowmick S, Shen J, Mur LAJ.** Molecular Docking Suggests the Targets of Anti-Mycobacterial Natural Products. *Molecules*. [Online] 2021. doi: 10.3390/molecules26020475
37. **Zhi Xu, Shijia Zhao, Zaosheng Lv, Lianshun Feng, Yinling Wang, Feng Zhang, Liuyang Bai, Jialun Deng.** Benzofuran derivatives and their anti-tubercular, anti-bacterial activities,. *European Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.025>
38. **Zde byly vytvářeny struktury použité v diplomové práci. MarvinSketch.** [Online] <https://chemaxon.com/marvin>
39. **Franca Zani, Paola Vicini, Matteo Incerti.** Synthesis and antimicrobial properties of 2-(benzylidene-amino)-benzo[d]isothiazol-3-ones,. *European Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.11.004>
40. **Issa M.I. Fakhr, Mohamed A.A. Radwan, Seham El-Batran, Omar M.E. Abd El-Salam, Siham M. El-Shenawy.** Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. *European Journal of*

- Medicinal Chemistry*. [Online] 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.034>
- 41. Wei Shi, Todd L. Lowary.** Structure–activity relationships in glycosylated 2-phenyl-indoles, 2-phenyl-benzo[b]thiophenes and 2-phenyl-benzo[b]furans as DNA binding and potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. [Online] 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.01.014>
- 42. Chhuttan L. Meena, Padam Singh, Ravi P. Shaliwal, Varun Kumar, Arun Kumar, Anoop Kumar Tiwari, Shailendra Asthana, Ramandeep Singh, Dinesh Mahajan.** Synthesis and evaluation of thiophene based small molecules as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112772>
- 43. Saniya S. Khan, Thanuja D. Sudasinghe, Alexander D. Landgraf, Donald R. Ronning, and Steven J. Sucheck.** Synthesis of Tetrahydrolipstatin, Its Derivatives, and Evaluation of Their Ability to Potentiate Multiple Antibiotic Classes against Mycobacterium Species. *ACS Infectious Diseases*. [Online] 2021. DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00283
- 44. Zhang W, Lun S, Liu L-L, Xiao S, Duan G, Gunosewoyo H, Yang F, Tang J, Bishai WR, Yu L-F.** Identification of novel coumestan derivatives as polyketide synthase 13 inhibitors against Mycobacterium tuberculosis. Part II. *Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00010>
- 45. Wenting Zhao, Bin Wang, Yuke Liu, Lei Fu, Li Sheng, Hongyi Zhao, Yu Lu, Dongfeng Zhang.** Design, synthesis, and biological evaluation of novel 4H-chromen-4-one derivatives as antituberculosis agents against multidrug-resistant tuberculosis,. *European Journal of Medicinal Chemistry*., [Online] 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112075>
- 46. Dhanya S. Rajalekshmi, Farha A. Kabeer, Arya R. Madhusoodhanan, Arun K. Bahulayan, Remani Prathapan, Nisha Prakasan, Sunil Varughese, Mangalam S. Nair.** Anticancer activity studies of cubebin isolated from Piper cubeba and its synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*., [Online] 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.041>

47. **Jairo K. Bastos, José C.T. Carvalho, Gustavo H.B de Souza, Antenor H.P. Pedrazzi, Silvio J. Sarti,** Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb., *Journal of Ethnopharmacology*. [Online] 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00171-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00171-4)
48. **Márcio L.C. Borsato, Cristiane F.F. Grael, Glória E.P. Souza, Norberto P. Lopes,** Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*. [Online] 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00388-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00388-5)
49. **Viviane Rodrigues Esperandim, Daniele da Silva Ferreira, Karen Cristina Souza Rezende, Wilson Roberto Cunha, Juliana Saraiva, Jairo Kenupp Bastos, Márcio Luis Andrade e Silva, Sérgio de Albuquerque,** Evaluation of the in vivo therapeutic properties of (-)-cubebin and (-)-hinokinin against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. [Online] 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.005>
50. **e Silva, M.L.A., Cicarelli, R.M.B., Pauletti, P.M. et al.** *Trypanosoma cruzi*: evaluation of (-)-cubebin derivatives activity in the messenger RNAs processing. *Parasitology Research*. [Online] <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2275-x>
51. **Aggarwal, A. a Sacchettini, J.C.** RCSB PDB. *Crystal Structure of Mtb Pks13 Thioesterase domain in complex with inhibitor TAM16*. [Online] 2017. <https://www.rcsb.org/structure/5V3Y>
52. **Dallakyan, S. a Olson, A.J.** Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Chemical Biology*. [Online] 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
53. **IRWIN, John J., Teague STERLING, Michael M. MYSINGER, Erin S. BOLSTAD a Ryan G. COLEMAN.** ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*. [Online] <https://doi.org/10.1021/ci3001277>
54. **WANG, Yanli, Jewen XIAO, Tugba O. SUZEK, et al.** PubChem's BioAssay Database. . *Nucleic Acids Research*. [Online] <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1132>
55. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0** Schrödinger, LLC. [Online]

- 56. Daina, A. a Michielin, O. & Zoete,** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 7. [Online] 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- 57. Green H, Koes DR, Durrant JD.** DeepFrag: a deep convolutional neural network for fragment-based lead optimization. *Chemical Science*. [Online] 2021. doi: 10.1039/d1sc00163a
- 58. KD, Freeman-Cook a Hoffman RL, Johnson TW.** Future Med Chem. . *Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry*. [Online] 2013. doi: 10.4155/fmc.12.208
- 59. Lovering, F., Bikke, J. a Humblet, Ch.** Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. *Journal of Medicinal Chemistry*. [Online] 2009. <https://doi.org/10.1021/jm901241e>
- 60. Michelin, O. a Zoete, V.** Swiss Institute of Bioinformatics. *SwissADME*. [Online] 2021
- 61. SYNTHESIS AND SEARCH across every available molecule.** *Manifold PostEra*. [Online] <https://app.postera.ai/library/guide>
- 62. ZINCPharmer.** *The ZincPharmer search technology uses the Pharmer open source pharmacophore search technology to efficiently search a large database of fixed conformers for pharmacophore matches*. [Online] <http://zincpharmer.csb.pitt.edu>
- 63. Tejas M. Dhameliya, Kaushikkumar A. Bhakhar, Normi D. Gajjar, Krupa A. Patel, Aanal A. Devani, Rajvi V. Hirani,** Recent advancements and developments in search of anti-tuberculosis agents: A quinquennial update and future directions., *Journal of Molecular Structure*. [Online] 2022. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131473>
- 64. Marles, Shahriar Khadem and Robin J.** Chromone and Flavonoid Alkaloids: Occurrence and Bioactivity. *molecules*. [Online] 2012. doi: 10.3390/molecules17010191

Příloha A Přiřazení ZINC ID k ligandům

ZINC ID	IUPAC název	Ligandy
ZINC02195423	6-[(2-butoxyfenyl)methyl]-7-methylindolo[3,2b]chinoxalin	L1
ZINC03765478	N-[2-(2,4-dimethylpyrido[2,3-b]indol-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid, N-[2-(2,4-dimethylindolo[2,3-b]pyridin-9-yl)ethyl]-2-fluorobenzamid	L2
ZINC04464672	2-amino-1-[(Z)-(2-methoxyfenyl)methylidenamino]-N-[(2R)-4-fenylbutan-2-yl]pyrrolo[3,2-b]chinoxalin-3-karboxamid	L3
ZINC05926594	6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanyl-3-(trifluormethyl)-[1,2,4]triazolo[3,4-a]ftalazin	L4
ZINC4661165	ethyl 5-(3-kyano-4,6-dimethylpyridin-2-yl)sulfanyltriazolo[1,5-a]chinazolin-3-karboxylát	L5
ZINC09153572	5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]-3-(4-methylfenyl)pyrimido[5,4-b]indole-2,4-dion	L6
ZINC09153731	8-methoxy-5-methyl-3-(3-methylfenyl)-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	L7
ZINC07026818	2,4-difluoro-N-[(E)-indeno[2,1-b]chromen-6-ylmethylidenamino]anilin	L8
ZINC09153804	3-benzyl-8-methoxy-5-methyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	L9
ZINC80944833	5-methyl-1-[(2-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinolin	L10
ZINC09673611	3-(3-chlorofenyl)-5,8-dimethyl-1-[(6-methyl-4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]pyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	L11
ZINC35551742	7,9-dibromo-6-[(2-methoxyfenyl)methyl]indolo[3,2-b]chinoxalin	L12
ZINC20354892	N-(2,4-difluorofenyl)-2-[3-(3-fluoro-4-methylfenyl)-2,4-dioxo-[1]benzothiolo[3,2-d]pyrimidin-1-yl]acetamid	L13
ZINC21153481	N-[(4-ethoxy-3-methoxyfenyl)methyl]-2-[(9-fluoro-[1]benzothiolo[3,2-d]pyrimidin-4-yl)sulfanyl]acetamid	L14
ZINC20558150	5,8-dimethyl-1-[(4-oxopyrido[1,2-a]pyrimidin-2-yl)methyl]-3-fenylpyrimido[5,4-b]indol-2,4-dion	L15
ZINC08439401	N-{2-[(3,5-dimethoxyphenyl)formamido]ethyl}-2-{3,4,11lambda4-triazahexacyclo[13.7.1.0 ^{2,14} .0 ^{4,12} .0 ^{5,10} .0 ^{19,23}]tricosan-1(22),2,5,7,9,11,13,15(23),16,18,20-undecaen-11-yl}acetamid	L16