

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

2018

Martin Krátký

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra organické a bioorganické chemie

**Vztahy mezi strukturou a aktivitou malých  
antimikrobně aktivních molekul a  
tuftsinových nosičů**

Habilitační práce

Martin Krátký

Hradec Králové

Listopad 2018

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

V Hradci Králové dne 7. 11. 2018

## Poděkování

Je hodně lidí, kterým bych chtěl ze srdce poděkovat. Na prvním místě je to moje bývalá školitelka a mentorka a můj vědecký vzor prof. Jarmila Vinšová. Vděčím jí opravdu za hodně.

Druhé velké poděkování míří do rodiny – původní, ze které jsem vyšel, i té, kterou jsem založil. Děkuji za nesmírnou trpělivost a všestrannou podporu, Slávce Urbanové pak též za lingvistickou pomoc při mé práci.

Třetí poděkování míří k mým současným i bývalým kolegům, spolupracovníkům – jak vědeckým, tak těm, kterým vděčím za rutinní servis, zejména při evaluaci biologické aktivity a charakterizaci sloučenin. Speciální poděkování míří do Budapešti na Maďarskou akademii věd k doc. Szilvii Bősze, která mi tam svou laskavostí a vstřícností vytvořila druhý „vědecký domov“, kam se vždy rád vracím.

Čtvrtý dík patří mým bývalým i současným studentům za spolupráci, odvedenou práci, inspiraci a spoustu legrace.

Páté poděkování je institucionální – jsem vděčný Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy a speciálně Katedře organické a bioorganické chemie za svobodné a podnětné prostředí k bádání a děkuji i ostatním spolupracujícím katedrám a mimofakultním pracovištím.

Předposlední dík je za finanční podporu. Během své vědecké kariéry byla má práce podpořena jak institucionálními financemi, tak celou řadou grantů. Děkuji všem lidem, kteří se aktivně podíleli na získání těchto finančních podpor. V současné době se jedná o granty GAČR 17-27514Y (Peptidové drug delivery systémy směřované do makrofágů pro antimykobakteriálně aktivní sloučeniny) a SVV 260 401. Práce vznikla také za podpory projektu EFSA-CDN (reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) spolufinancovaného z EFRR.

Last, but not least bych rád vzdal úctu nejvyšší Pravdě a Lásce a skautingu jako mým celoživotním průvodcům.

## Abstrakt

KRÁTKÝ, Martin. *Vztahy mezi strukturou a aktivitou malých antimikrobně aktivních molekul a tuftsinových nosičů*. Hradec Králové, 2018. 93 s. Habilitační práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra organické a bioorganické chemie.

Práce se zabývá problematikou hledání nových potenciálních antimikrobních léčiv působících proti *Mycobacterium tuberculosis*, netuberkulózním mykobakteriím, dalším bakteriím a patogenním houbám. Vzhledem k problémům s rezistencí se věnuje také sloučeninám účinným vůči multilékově rezistentním mykobakteriím a methicilin-rezistentnímu *Staphylococcus aureus*. Snaží se popsat vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou a identifikovat nejvýhodnější sloučeniny z pohledu nízké toxicity pro savčí buňky a tedy i selektivity.

První, nejrozsáhlejší skupinou jsou deriváty salicylanilidu – jak modifikované na salicylanilidovém jádře, tak především celá řada jejich esterů včetně karbamátů designovaných jako proléčiva, které se ukázaly být obecně výhodnější než výchozí salicylanilidy (submikromolární minimální inhibiční koncentrace). U této skupiny jsme studovali také mechanismus účinku, popsali jsme jejich inhibiční vliv na několik mykobakteriálních enzymů, a to takových, které zodpovídají za přežívání mykobakterií v latentním stádiu (isocitrátlyasa, L-alanin dehydrogenasa aj.).

K dalším prezentovaným sloučeninám náleží i rhodaniny, hydrazidy-hydrazony a deriváty nefyziologických aminokyselin. Druhým aplikovaným přístupem jsou „me-too“ obměny molekul léčiv se známou antimykobakteriální aktivitou, především isoniazidu a triklosanu jakožto inhibitorů syntézy buněčné stěny a sulfonamidů. Tyto modifikace byly designovány za účelem zvýšení aktivity, snížení toxicity, rozšíření spektra účinku a zlepšení průchodu skrze biologické bariéry. V rámci syntézy analog isoniazidu se podařilo připravit účinné deriváty, z nichž některé působí odlišným mechanismem než výchozí léčivo.

Celá řada připravených molekul vykazuje vynikající *in vitro* účinnost vůči mykobakteriím včetně netuberkulózních a rezistentních kmenů, stafylokokům, enterokokům a některým fungálním patogenům, některé jsou zároveň netoxické či dostatečně selektivní. Podařilo se také identifikovat sloučeniny působící jako účinné duální inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, tj. potenciálně využitelné jako léčiva demencí.

Druhá část práce se věnuje přípravě a hodnocení peptidových drug delivery systémů na bázi tuftsinových derivátů pro malé antimykobakteriální molekuly. Nosiče byly

konjugovány s vhodnými salicylanilidy a u těchto konjugátů byla stanovena biologická aktivita. Konjugáty si zachovávají antimykobakteriální aktivitu, mají zpravidla sníženou toxicitu, zvýšený buněčný uptake a oproti výchozím malým molekulám i dobrý účinek na intracelulární mykobakterie.

Podářilo se identifikovat několik nadějných skupin derivátů a vytyčit tak směr dalšího perspektivního vývoje jak v oblasti malých molekul, tak drug delivery systémů.

### **Klíčová slova**

Antibakteriální látky; antifungální látky; antimykobakteriální látky; biologická aktivita *in vitro*; drug delivery systémy; isoniazid; mechanismus účinku; rezistence; salicylanilidy; sulfonamidy; tuftsín; vztahy struktura-aktivita.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>7</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Východiska potřeby nových antimikrobních léčiv</b>	<b>10</b>
<b>3. Vývoj v oblasti malých molekul</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Salicylanilidy a jejich deriváty</b>	<b>14</b>
3.1.1. Salicylanilidové deriváty s volnou hydroxylovou skupinou	16
3.1.2. Salicylanilidové estery s různými typy kyselin	18
3.1.3. Salicylanilidové karbamáty a thiokarbamáty	28
3.1.4. Hledání mechanismu účinku	31
<b>3.2. Analoga isoniazidu a inhibitory InhA</b>	<b>35</b>
<b>3.3. Modifikace sulfonamidů</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Potenciální antimikrobní sloučeniny různých struktur</b>	<b>46</b>
<b>4. Peptidové nosiče pro antimykobakteriální léčiva na bázi tuftsínu</b>	<b>53</b>
4.1. Drug delivery systémy ve vývoji antituberkulotik	53
4.2. Nosiče na bázi tuftsínu	54
4.3. Konjugáty tuftsinových nosičů s námi připravenými antimykobakteriálními molekulami	58
4.3.1. 1. Krok: syntéza nosiče	58
4.3.2. 2. Krok: příprava konjugabilních antituberkulotik	60
4.3.3. 3. Krok: Spojení malé molekuly a nosiče	64
4.3.4. Peptidové konjugáty se salicylanilidy	66
<b>5. Závěr a perspektivy</b>	<b>72</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>75</b>
<b>Seznam obrázků</b>	<b>76</b>
<b>Seznam publikovaných článků, patentů a knih</b>	<b>78</b>
<b>Použitá literatura</b>	<b>83</b>

## Seznam použitých zkratek

AChE	acetylcholinesterasa
Aoa	aminooxyoctová kyselina
ATP	adenosin-trifosfát
BChE	butyrylcholinesterasa
BMM $\Phi$	murine bone marrow-derived macrophages
Boc	<i>N-terc</i> -butyloxykarbonyl
CFU	jednotky tvořící kolonie (colony-forming unit)
CNS	centrální nervová soustava
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyklohex-1-yliden)ethyl
DDS	drug delivery system
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
dUTP	deoxyuridin-trifosfát
EMB	ethambutol
Fmoc	<i>N</i> -fluorenylmethoxykarbonyl
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IC	inhibiční koncentrace
ICL	isocitrátlyasa
INH	isoniazid
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	multilékově rezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant tuberculosis)
MAP	methionin aminopeptidasa
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	methicilin-senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
MtAlaDH	mykobakteriální L-alanin dehydrogenasa
Mtt	4-methyltrityl
NADH	nikotinamidadeninukleotid



NTM	netuberkulózní mykobakterie
PAS	4-aminosalicylová kyselina
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RP-HPLC	chromatografie s obrácenými fázemi (reverse phase high-performance liquid chromatography)
SAL	salicylanilid, salicylanilidy
SAL2	<i>N</i> -(4-acetylphenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid
SAR	vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (structure-activity relationships)
SI	index selektivity
SPS	syntéza na pevné fázi (solid-phase synthesis)
<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -butyl
TB	tuberkulóza
TFA	trifluoroctová kyselina
TIS	triisopropylsilan
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XDR-TB	extenzivně lékově rezistentní tuberkulóza (extensively drug-resistant tuberculosis)
Z	<i>N</i> -benzyloxykarbonyl

# 1. Úvod

Vývoj nových terapeutických intervencí pro léčbu závažných nebo široce rozšířených chorob představuje nezbytnou součást vědeckého výzkumu.

Farmaceutická chemie nabízí celou řadu postupů k nalezení potenciálních léčiv – systematický screening nově připravených originálních sloučenin, modifikaci struktur se známou biologickou aktivitou („me-too“ přístup), syntézu a evaluaci celých knihoven připravených metodami kombinatoriální chemie, ale také objevování „zapadlých“ poznatků<sup>1</sup> či repurposing známých léčiv. Všechny tyto postupy se pochopitelně uplatňují i v oblasti antimikrobních látek. Nezbytná je interdisciplinární spolupráce s příbuznými biologickými a chemickými obory, a to jak při samotném návrhu a identifikaci kandidátních molekul, tak zejména při následném pátrání po mechanismu účinku a stanovení dalších farmakologických vlastností.

Vývoje nových antimikrobních léčiv náleží podle Světové zdravotnické organizace (WHO) k vysoce aktuálním prioritám biomedicínského výzkumu. Hlavní příčinou je vznik a epidemiologie rezistence mezi celou řadou problematických patogenů. Příkladem mohou být *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*) rezistentní na isoniazid a rifampicin, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomycin-rezistentní enterokoky, polyrezistentní gramnegativní tyčky či houby necitlivé na azolová antimykotika. Přestože existuje řada překážek pro vývoj nových antimikrobních léčiv (biologických, ekonomických, organizačních), je nezbytné pro zachování zdravé populace pokračovat v systematické práci v této oblasti.

Předložená habilitační práce „*Vztahy mezi strukturou a aktivitou malých antimikrobně aktivních molekul a tuftsinových nosičů*“ je sepsána jako komentář k 42 publikovaným pracím a kvalifikačním pracím vypracovanými pod vedením autora této práce v oblasti designu, syntézy a hodnocení potenciálních antimikrobních sloučenin na bázi nových molekul (především salicylanilidové deriváty), modifikací antituberkulotik, resp. léčiv s antimykobakteriálním účinkem (zejm. isoniazid, sulfonamidy) a jejich drug delivery systémům – nosičům na bázi peptidu tuftsinu. Rozebírá a popisuje vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) se zaměřením na mykobakterie, grampozitivní bakterie včetně MRSA a patogenní houby. Sumarizací a diskuzí získaných výsledků se snaží přispět k rozšíření a ucelení současného stavu poznání.

## 2. Východiska potřeby nových antimikrobních léčiv

Podle poslední zprávy WHO patří tuberkulóza (TB) celosvětově mezi deset nejčastějších příčin úmrtí a mezi infekčními chorobami způsobenými jedním patogenem je dokonce na prvním místě. Pro rok 2017 bylo odhadnuto 1,3 milionu úmrtí a dalších 300 000 obětí se vyskytlo mezi pacienty infikovanými virem HIV, onemocnělo 10,0 milionů lidí. Zároveň se uvádí, že cca 23 % světové populace je infikováno latentní tuberkulózou, tj. bezpříznakovou infekcí *Mycobacterium tuberculosis* komplex, která může přejít do otevřené formy. Ze zaznamenaných případů TB bylo 558 000 rezistentních na rifampicin (RIF) a 82 % z nich trpělo multilékově rezistentní TB (MDR-TB). Ta je definována jako rezistence na RIF a současně isoniazid (INH), dvě nejúčinnější léčiva první linie. Kromě toho byla popsána závažnější forma, extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB), která kromě MDR zahrnuje současnou rezistenci vůči jakémukoli fluorochinolonu a nejméně jednomu injekčnímu léčivu druhé řady (amikacin, kanamycin, kapreomycin). Vývoj nových antituberkulotik proto patří k prioritám WHO, která stanovila také ambiciózní plán eradikace tuberkulózy jako globálního problému. Tuberkulóza postihuje zejména respirační systém (plicní forma), ale může napadnout i jiné orgány a tkáně, potom se hovoří o extrapulmonární formě.<sup>2</sup>

První skutečně účinná léčiva TB se objevila až ve 40. letech 20. století. Současná léčba lékově citlivé plicní tuberkulózy trvá šest měsíců, přičemž první dva měsíce se v rámci iniciální fáze podává čtyřkombinace INH, RIF, pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB), následovaná čtyřměsíční dvojkombinací INH a RIF. Problémem léčby je zejména její délka, u rezistentních forem dokonce až 2 roky, s čímž souvisí špatná compliance, lékové interakce a také možný výskyt vedlejších účinků. Rizikem je též již zmíněný vývoj rezistence a koinfekce s HIV. V případě potřeby se v terapii používají i další léčiva, která WHO dělí do více kategorií (Tabulka 1):<sup>2,3</sup>

Tabulka 1: Kategorizace antituberkulotik dle WHO<sup>2,3</sup>

	Skupina	Léčiva
Kategorie 1	Perorální léčiva 1. linie	INH, RIF, PZA, EMB
Kategorie 2	Fluorochinolony	levofloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin, (ofloxacin)
Kategorie 3	Injekční léčiva	aminoglykosidy (streptomycin, amikacin, kanamycin), kapreomycin
Kategorie 4	Perorální léčiva 2. linie	thioamidy (ethionamid, prothionamid), 4-aminosalicylová kyselina (PAS), cykloserin, terizidon
Kategorie 5	Léčiva s nejasnou/nejistou účinností	Vysokodávkovaný INH, rifabutin, linezolid, amoxicilin/klavulanát, imipenem/cilastatin (+ klavulanát), klofazimin, klarithromycin, thiacetazon

Každé z těchto léčiv má svůj specifický mechanismus účinku, ačkoli u některých z nich není plně objasněn, a jejich „targety“ slouží jako cílové struktury pro nově vyvíjené antimykobakteriální sloučeniny.

Rezistence je u *Mtb.* způsobována výhradně spontánními chromozomálními mutacemi, přičemž neadekvátní terapie může selektovat právě tyto rezistentní kmeny. Při jejím pokračování dojde k eliminaci citlivých mykobakterií a převládnu ty odolné, což vede jednak z individuálního pohledu k selhání terapie, resp. relapsu, z pohledu epidemiologického pak k šíření rezistence.<sup>4</sup> Proto je zapotřebí mít k dispozici dostatečnou paletu antimykobakteriálních léčiv. Jedna z možných cest k dalším nezbytným léčivům vede přes repurposing známých molekul, z antibiotik např.  $\beta$ -laktamů, fluorochinolonů, rifamycinů, oxazolidinonů, z pohledu léčby mykobakterióz je však jejich nevýhodou široké spektrum účinku. Žádoucí jsou totiž především léčiva úzkospektrá, tj. se specifickým antimykobakteriálním účinkem.<sup>5</sup>

Ideální nové léčivo by mělo mít nízké hodnoty MIC, působit proti MDR a XDR kmenům, latentní TB, a to nejlépe inovativním mechanismem účinku, mít nízkou toxicitu a dobrou toleranci, umožňovat perorální podávání, zkracovat dobu léčby a snižovat frekvenci podávání, nemělo by mít nežádoucí interakce se stávajícími léčivy, především antivirotiky. Výzvou je též optimalizace využití současných léčiv.<sup>3,6</sup>

Ani objev inovativního vysoce účinného léčiva ale není důvodem k výzkumnému nihilismu. V nedávné době byla po dlouhé době schválena dvě nová antituberkulotika určená primárně k léčbě lékově rezistentních forem TB, diarylchinolin bedachilin (2012; inhibitor ATP synthasy) a nitroimidazol delamanid (2014; primárně působí inhibicí syntézy některých subtypů mykolových kyselin). Bohužel se záhy v klinické praxi objevila ve velké míře rezistence, již dříve popsaná v podmínkách *in vitro* i klinických studiích, přičemž molekulárních mechanismů rezistence existuje celá řada. Někteří autoři hovoří dokonce o možné „ztrátě“ těchto molekul.<sup>4,7</sup>

Základní fakta o potřebě nových léčiv proti MDR kmenům a jejich přehled jsme podali v kapitole v monografii,<sup>8</sup> následně vydané s minimálními úpravami jako samostatná kniha<sup>9</sup> a v českém přehledovém článku.<sup>10</sup> Aktuální trendy ve vývoji antituberkulotik na základě mechanismu účinku a chemické struktury aktivních sloučenin shrnuli např. Campanico *et al.*<sup>11</sup> Hlavní strategie t. č. směřují do oblasti zásahu biosyntézy buněčné stěny, ribosomální syntézy bílkovin a jejich homeostázy, nukleových kyselin, folátů, energetického metabolismu, centrálního intermediárního metabolismu, syntézy dalších makromolekul a

katabolismu cholesterolu. Důležitou roli hraje výzkum synergických nebo alespoň aditivních kombinací léčiv.<sup>3,5,11</sup>

Při hledání nových antituberkulotik lze rozlišit dva základní přístupy – „target-based approach“ a „whole-cells screening“. První z nich je založený na identifikaci inhibitoru, zpravidla pomocí high-throughput screeningu, působícího na specifický esenciální enzym známý buď jako cílová molekula klinicky užívaného léčiva, nebo určený na základě znalosti genetické informace. Ač se jedná o moderní a široce používaný přístup, má u nově navrženého cílení omezenou účinnost. Často se také podaří nalézt vysoce účinný inhibitor izolovaného enzymu, který však při následném testování na celých buňkách selže. Nejčastější vysvětlení spočívá v nedostatečné buněčné permeabilitě a/nebo alternativních metabolických drahách, cíl také nemusí být dostatečně validovaný. Naopak fenotypický screening v kultuře mykobakterií (tj. testování sloučenin na celých buňkách) vede daleko častěji k nalezení antimykobakteriální molekuly, mechanismus účinku pak musí být objasněn dodatečně. Tímto způsobem byly objeveny např. bedachilin a delamanid. Současný trend se opět začíná přiklánět k fenotypickému screeningu, ačkoli je delší a nákladnější. V obou případech je pak struktura nově objevené molekuly vzata jako základ pro chemické obměny.<sup>5,12,13</sup>

Řadu problémů přináší i netuberkulózní (atypické) mykobakterie (NTM), původně zcela „ve stínu“ *Mtb*. Mezi NTM patří mnoho desítek druhů, nejčastěji se u pacientů vyskytují pomalu rostoucí *Mycobacterium avium* komplex a obtížně léčitelný rychle rostoucí druh *Mycobacterium abscessus*, nazývaný také „antibiotická noční můra“, dále *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium marinum* a další druhy. Tyto ubikvitní, převážně environmentální bakterie se vzrůstající incidencí i častějším zachytem způsobují závažné infekce, a to nejen u imunokompetentních pacientů, ale především v případě imunodeficitu. V některých státech jsou častější než TB, za kterou někdy bývají zaměňovány. Infekce NTM postihují různé tkáně, namátkou plíce, kůži, měkké tkáně, kosti a klouby. Kombinační léčba je velice dlouhá (delší než u tuberkulózy) a obtíže způsobuje také vysoká míra přirozené i získané rezistence, problémem je též její stanovení. Současná terapeutická schémata zahrnující jen několik málo druhů léčiv mají proto omezenou účinnost, dlouhodobé podávání vede k nežádoucím účinkům, a proto zde existuje velká poptávka po nových, účinnějších léčivech, ideálně baktericidních a s dobrou intracelulární účinností.<sup>14,15,16</sup>

Rezistence se samozřejmě netýká pouze mykobakterií, ale je vlastní celé řadě problematických patogenů. Mezi grampozitivními bakteriemi jde na prvním místě

o methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, který si díky selekčnímu tlaku vyvinul odolnost k methicilinu a drtivě většině dostupných  $\beta$ -laktamových antibiotik. Tento kmen byl poprvé hlášen na začátku 60. let 20. století. Mechanismus rezistence spočívá buď v produkci  $\beta$ -laktamázy, enzymů hydrolyzujících tato antibiotika, nebo v modifikaci cílového místa těchto antimikrobiálních léčiv. MRSA kmeny jsou oproti těm citlivým (methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) obtížněji léčitelné, a tudíž nebezpečnější, zejména u pacientů s oslabeným imunitním systémem. Podle zdroje nákazy rozlišujeme dva typy – komunitní a nemocniční (hospital-associated) MRSA; MRSA se uplatňuje jako nejčastější rezistentní patogen nosokomiálních infekcí. Ale i v běžné populaci roste jeho incidence, může způsobovat infekce v celé řadě lokalizací, např. kůže a podkoží, endokarditidu, osteomyelitidu, pneumonii, invazivní infekce atp. Spektrum léčiv použitelných k léčbě MRSA je omezené, nové molekuly nejsou na trh uváděny s dostatečnou rychlostí. Na prvním místě se jedná o glykopeptid vankomycin, ovšem protože je hojně využíván nejen v této indikaci, rezistence narůstá. Dále je možné podávat klindamycin, některé aminoglykosidy, tetracykliny, nověji byly zavedeny např. oxazolidinon linezolid, lipopeptid daptomycin, lipoglykopeptidy telavancin, oritavancin a dalbavancin, cefalosporiny ceftobiprol a ceftarolin. Na všechny se ovšem též může vyvinout rezistence; proto zde existuje objektivní potřeba inovativních léčiv.<sup>17,18,19</sup>

Ani v případě patogenních hub není situace příznivá, kromě nárůstu rezistence také stoupá virulence, a tudíž morbidita a mortalita, což přináší problémy zejména u imunokompromitovaných jedinců. Ohroženi jsou zejména pacienti s imunodeficitem, onkologičtí, po transplantaci či léčení kortikoidy a jinými imunosupresivy. Používaná léčiva patří do několika málo chemických skupin a působí pouze na omezený počet buněčných cílů, navíc mají mnohé nevýhody jako je úzké spektrum, závažné vedlejší účinky, interakční potenciál či nevhodnou farmakokinetiku. Celkově lze hovořit o urgentní potřebě nových léčiv i v této oblasti, ideálně působících také proti biofilmům. Mezi problémové druhy patří kandidy (*Candida albicans* i non-*albicans* druhy), aspergily, fusarie a další.<sup>20,21</sup>

### 3. Vývoj v oblasti malých antimikrobních molekul

Vzhledem k uvedeným faktům týkajících se požadavků na nová léčiva aktivní proti mykobakteriím, dalším bakteriálním druhům a houbám včetně rezistentních kmenů, se zabýváme designem, syntézou, hodnocením a studiem mechanismu účinku nových antimikrobních látek různých chemických struktur. Výzkum je orientovaný jak na modifikace známých antimikrobních léčiv, tak na nové strukturní motivy.

Standardní panel testovaných mikroorganismů zahrnuje čtyři kmeny mykobakterií (plně citlivý kmen *M. tuberculosis* 331/88, tj. H<sub>37</sub>Rv, *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 235/80 a klinický izolát 6509/96), čtyři grampozitivní bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 – MSSA, *Staphylococcus aureus* H 5996/08 – MRSA, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus faecalis* J 14365/08), čtyři kmeny gramnegativních bakterií (*Escherichia coli* CCM 4517, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré  $\beta$ -laktamasy J 14368/08, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961) a také osm kmenů hub: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Lichtheimia (Absidia) corymbifera* 272 a *Trichophyton interdigitale (mentagrophytes)* 445. Nejúčinnější antituberkulotika jsou dále testována proti MDR kmenům s různým profilem rezistence a jednomu XDR-TB kmenu (Praha 131; rezistentní vůči INH, rifamycinům, EMB, streptomycinu, ofloxacinu, gentamicinu a amikacinu).

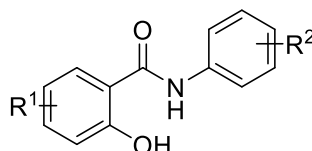
Cytotoxické a/nebo cytostatické účinky jsou studovány na buňkách lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2) a lidské monocytární linie MonoMac6, cytotoxicita některých sérií byla testována i na dalších buňkách liniích (vysoce chemosenzitivní myši bone marrow-derived macrophages, BMM $\Phi$ ; lidské peripheral blood mononuclear cells, PBMC). HepG2 slouží jako *in vitro* model hepatotoxicity, protože jaterní tkáň představuje nejpravděpodobnější cíl orgánové toxicity známých antituberkulotik, ostatní linie jako modely makrofágů. Poměr IC<sub>50</sub>/MIC představuje index selektivity (SI), jehož hodnota vyšší než 10 představuje v analogii s terapeutickým indexem akceptovatelnou selektivitu.

Následuje přehled skupin studovaných typů molekul.

#### 3.1. Salicylanilidy a jejich deriváty

Salicylanilidy (*N*-fenyl-2-hydroxybenzamidy; Obr. 1) a jejich deriváty jsou chemicky relativně jednoduché molekuly, které však mají řadu zajímavých využitelných biologických účinků: antibakteriální včetně antimykobakteriální, antifungální,

antiprotozoální,<sup>22,23,24</sup> „uncoupling“ aktivita,<sup>24,25</sup> protizánětlivé,<sup>26</sup> cytotoxické a protinádorové působení,<sup>27,28</sup> inhibice osteoresorpce<sup>29</sup> a fotosyntézy (potenciální herbicidy),<sup>30</sup> ovlivňují iontové kanály<sup>31</sup> a další. Mezi salicylanilidy patří mj. i léčiva niklosamid a klosantel. Antimikrobní aktivitu a v té době aktuální poznatky o mechanismu účinku salicylanilidů a především jejich esterů jsme shrnuli v práci<sup>22</sup> a protivirové účinky salicylamidů potom v review.<sup>32</sup> Naše pokusy o přípravu protivirových salicylanilidů ale nevedly k vysoce účinným derivátům.



Obrázek 1. Obecná struktura salicylanilidů

Na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy se výzkum salicylanilidových derivátů a jejich antimykobakteriálního působení provádí již přes dvacet let. Započala s nimi skupina prof. Karla Waissera (např.<sup>33,34,35,36,37</sup>) a ve výzkumu posléze pokračovala prof. Jarmila Vinšová s kolektivem, přičemž těžištěm jejich práce byly salicylanilidy modifikované na hydroxylové skupině (estery s karboxylovými kyselinami,<sup>38,39,40</sup> karbamáty<sup>41</sup>) a studium vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou, v čemž pokračoval i autor této práce, a to v práci diplomové<sup>42</sup> i disertační.<sup>43</sup>

Podařilo se připravit několik salicylanilidů, které byly srovnatelné s INH vůči *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv (MIC 1 μM), na NTM byly dokonce účinnější. Bylo zjištěno, že antimykobakteriální aktivita pozitivně koreluje s elektron-akceptorovými vlastnostmi a hydrofobicitou substituentů v anilidové části molekuly, na salicylu jsou nejvýhodnější brom a chlor v poloze 5, obecně pak malé lipofilní elektron-akceptorní substituenty. Mezi hlavní výhody salicylanilidů patří jejich širokospektrální antimykobakteriální aktivita, účinnost proti INH-resistentním kmenům, struktura odlišná od zavedených antituberkulotik a snadná syntetická dostupnost. Toxicita nebyla bohužel publikována.<sup>36</sup> Mezi nevýhody naopak patří cytotoxické působení, lokální dráždivost, nízká biodostupnost a permeabilita skrze biologické bariéry i malá rozpustnost ve vodě. Za nežádoucí působení zodpovídá fenolická skupina, která je však zároveň nezbytná pro antimikrobní aktivitu. Její maskování tak může pomoci s redukcí těchto nežádoucích účinků (mj. změnou fyzikálně-chemických vlastností) či přinést zvýšení aktivity.<sup>22,44,45</sup>

Proto byly navrženy a připraveny lipofilnější deriváty se zablokovanou fenolickou skupinou, první taková studie zabývající se salicylanilidovými acetáty byla inspirována



acetylsalicylovou kyselinou. Tyto estery měly vynikající antimykotickou aktivitu ( $\geq 0,49 \mu\text{M}$ ) a v porovnání s výchozími salicylanilidy obdobnou či lepší antimykobakteriální aktivitu. Ukázalo se, že je výhodné substituovat polohu 4 anilinu, resp. současně polohy 3 a 4.<sup>38</sup> Dvě následné práce<sup>39,40</sup> se týkaly esterů halogenovaných salicylanilidů s neutrálními Z-aminokyselinami (Gly, Ala, Val, Phe). I tyto estery měly antifungální<sup>39</sup> a antituberkulotickou aktivitu,<sup>39,40</sup> působily proti atypickým mykobakteriím, přičemž ty nejlepší z nich byly z hlediska toxicity selektivní pro *Mtb*. Měření stability ukázalo, že jsou hydrolyzovány v neutrálním a mírně kyselém prostředí, přičemž  $t_{1/2}$  jsou v rozmezí 14-34 min.<sup>40</sup> Velmi dobrou aktivitu vykazují i salicylanilidové *n*-alkylkarbamáty s účinností proti *Mtb*. H<sub>37</sub>Rv (MIC 0,5-4  $\mu\text{M}$ ) i NTM (1-32  $\mu\text{M}$ ). Důležitým zjištěním bylo, že současně inhibují spektrum MDR- a XDR-TB kmenů v identických koncentracích, bez zkřížené rezistence a s dostatečnou selektivitou. Oproti esterům vykazují větší hydrolytickou stabilitu – v kyselém prostředí se nerozkládají, v zásaditém a neutrálním ano, avšak s mnohem delším poločasem (při fyziologickém pH 7,4 je to 43 hod).<sup>41</sup>

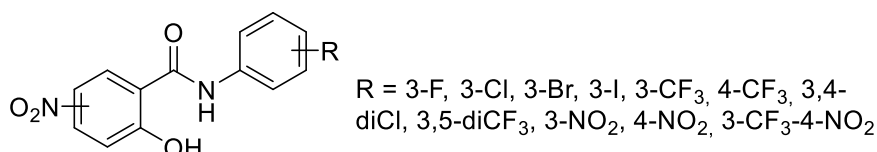
Je tedy zřejmé, že tyto modifikace smysl a přínos mají a mohou nabídnout sloučeniny s výhodnějšími vlastnostmi oproti parentním salicylanilidům. Na tomto základě jsme připravili a zhodnotili mnoho desítek analog, obvykle s vystupňovanou širokospektrální antimykobakteriální aktivitou. Podařilo se nám také identifikovat aktivitu těchto derivátů vůči grampozitivním bakteriím včetně MRSA, jako inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BChE) a také jsme pracovali na vysvětlení mechanismu antituberkulotického účinku.

### 3.1.1. Salicylanilidové deriváty s volnou hydroxylovou skupinou

Během vývoje salicylanilidových derivátů jsme připravili sloučeniny s novými substituenty na jednom či obou aromatických jádrech, salicylovém i anilinovém.<sup>44,46,47,48</sup>

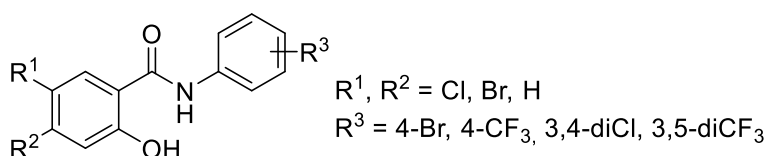
Na základě předchozích poznatků o SAR<sup>36</sup> (NO<sub>2</sub> skupinu navíc obsahuje řada potenciálních antituberkulotik)<sup>47,49</sup> a *in silico* predikce vlastností jsme připravili anilidy isomerních nitrosalicylových kyselin a stanovili jejich antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivitu a také cytotoxicitu. Nitrosalicylanilidy (Obr. 2) inhibovaly *Mtb*. s MIC 2-32  $\mu\text{M}$ , přičemž neaktivnější byl 2-hydroxy-4-nitro-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid a obecně 4-nitrosalicylové sloučeniny, v anilidové části se osvědčila CF<sub>3</sub> skupina v mono- či disubstituci. Naopak nejméně efektivní byly deriváty 3-nitrosalicylové kyseliny a nitroanilinů. MIC vůči *M. avium* byly podstatně vyšší ( $\geq 32 \mu\text{M}$ ). 4-Nitrosalicylanilidy byly též nejvíce účinné proti stafylokokům včetně MRSA kmene

(od 0,98  $\mu\text{M}$ ), kdežto gramnegativní bakterie, enterokoky i patogenní houby byly rezistentní. I když byla pro tyto sloučeniny *in silico* vypočtena nízká toxicita, působily značně toxicky na HepG2 buňky ( $\text{SI} \leq 1,113$ ).<sup>47</sup>



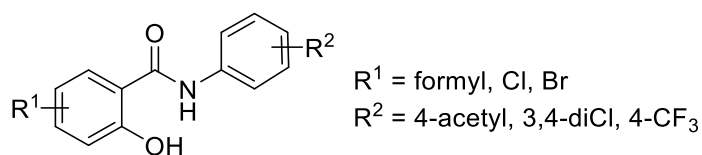
Obrázek 2. Nitrosalicylanilidové deriváty

Protože slabé elektron-akceptorní substituenty na salicylovém jádře v polohách 4 a 5 zvyšují antituberkulotickou aktivitu, připravili jsme sérii salicylanilidů odvozených od 4,5-dihalogenovaných (Br, Cl) salicylových kyselin (Obr. 3) a porovnali je s analogy substituovanými na tomto jádře pouze jedním halogenem. Ze syntetického pohledu bylo nutné připravit výchozí dihalogenované kyseliny, neboť nejsou komerčně dostupné. Výsledné dihalogenované sloučeniny měly nízké hodnoty MIC proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv (1-4  $\mu\text{M}$ ), nebyly však podstatně účinnější než monohalogenovaná analoga. Poprvé jsme také systematicky zkoumali účinnost anilidů 4-bromsalicylové kyseliny. Jak bylo zjištěno, tak tyto sloučeniny mají největší selektivitu ( $\text{SI}$  až 8,84) a byly účinné proti MDR- a XDR-TB kmenům v koncentracích od 0,5  $\mu\text{M}$ . Bromderiváty jsou zpravidla lepší než chlorované a pro substituci anilinu je preferována CF<sub>3</sub> skupina. Ani zde se nepodařilo vyhnout toxicitě ( $\text{IC}_{50}$  HepG2 v rozmezí 1,81-31,47  $\mu\text{M}$ ), ačkoli druhý halogen působil její žádoucí snížení.<sup>48</sup>



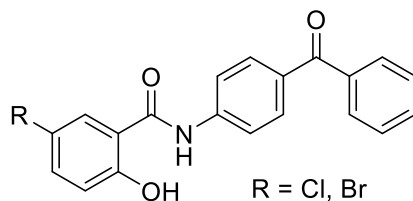
Obrázek 3. Anilidy odvozené od mono- a dihalogenovaných salicylových kyselin

Salicylanilidy substituované formylem či acetylem (Obr. 4) nebyly syntetizovány primárně za účelem vystupňované účinnosti, ale jako „konjugabilní“ deriváty pro vazbu na peptidový nosič. Jejich anti-TB aktivita se proto pohybuje v rozmezí 8,6-25,9  $\mu\text{M}$  (H<sub>37</sub>Rv), resp. 15,0-64,7  $\mu\text{M}$  (MDR-TB), proti *M. abscessus* jsou pak ještě méně aktivní (34,5-129,4  $\mu\text{M}$ ), zároveň tento účinek není selektivní.<sup>44</sup>



Obrázek 4. Salicylanilidy nesoucí karbonylovou skupinu

Dále byly připraveny *N*-(4-benzoylphenyl)-2-hydroxybenzamidy (Obr. 5), opět jako potenciálně konjugovatelné salicylanilidy. MIC proti lékově citlivému a MDR-TB kmeni byly identické, 12,7 (R = Br) a 14,2  $\mu\text{M}$  (R = Cl), proti *M. abscessus* byly tyto hodnoty dvojnásobné; cytotoxicita (MonoMac6) byla 21,8 a 48,0  $\mu\text{M}$ .<sup>46</sup> Deriváty tohoto typu byly též modifikovány za vzniku Schiffových bází.<sup>50</sup>

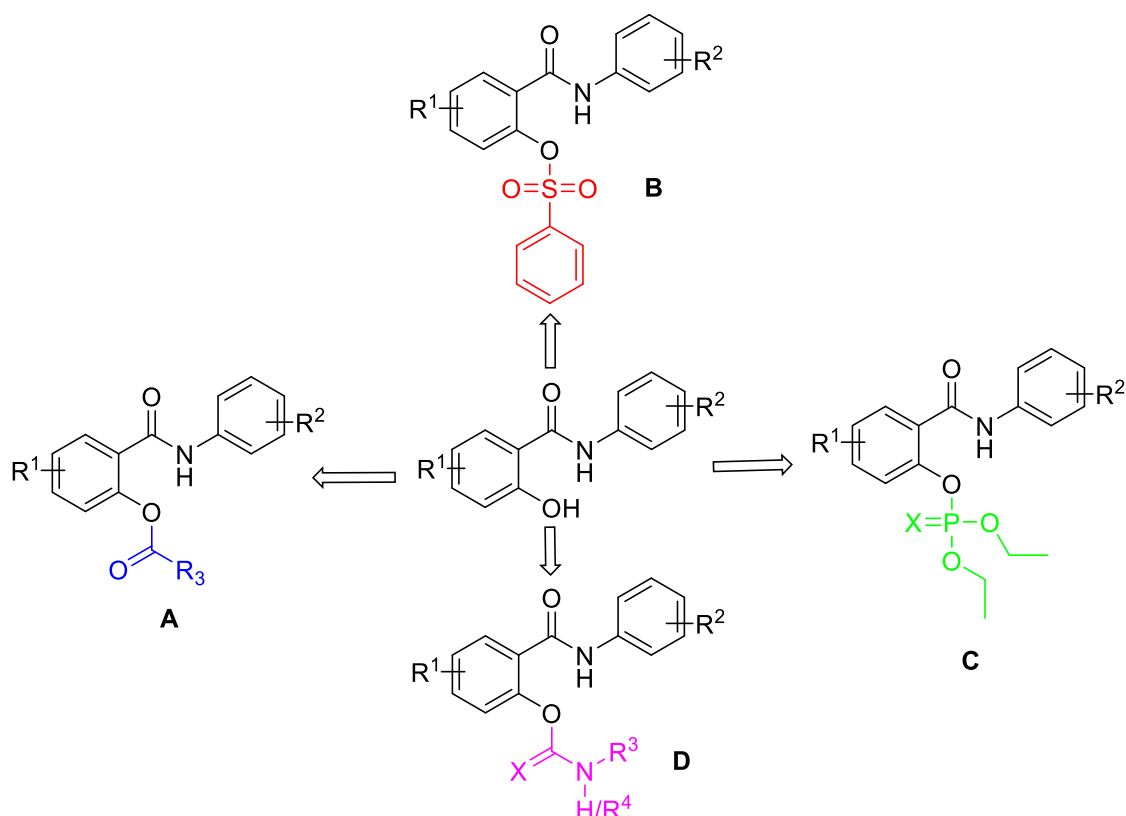


Obrázek 5. *N*-(4-Benzoylphenyl)-2-hydroxybenzamidy

Z hlediska vývoje nových salicylanilidů jsme připravili dvě výše citované nové série a několik dalších derivátů. Podařilo se sice připravit sloučeniny vysoce účinné proti mykobakteriím včetně rezistentních kmenů (podali jsme první důkaz o účinnosti samotných salicylanilidů vůči MDR- a XDR-TB) a některým gram pozitivním bakteriím s nízkými hodnotami MIC, hlavní problém salicylanilidů (cytotoxicita a tedy nízká selektivita) však vyřešen nebyl. Naopak se nám podařilo připravit „konjugabilní“ salicylanilidy určené pro vazbu na peptidové drug delivery systémy (DDSs), z nichž některé byly úspěšně konjugovány. Salicylanilidy se částečně zabývá i dokončovaná disertační práce, kde je autor této práce konzultantem.<sup>51</sup> Těžiště naší práce v oblasti salicylanilidů však byla rutinní syntéza „osvědčených“ nejúčinnějších derivátů pro další modifikace jejich fenolického hydroxyly a spojení s jinými bioaktivními molekulami.

### 3.1.2. Salicylanilidové estery s různými typy kyselin

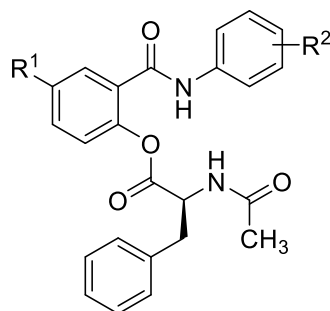
Připravili jsme celou řadu esterů salicylanilidů s různými organickými kyselinami. Nejprve jsme se věnovali esterům karboxylových kyselin (Obr. 6, obecná struktura A),<sup>46,52,53,54,55,56,57,58,59</sup> posléze benzensulfonové kyseliny<sup>60</sup> (obecná struktura B) a kyselin na bázi fosforu<sup>61,62,63,64</sup> (obecná struktura C).



Obrázek 6. Design salicylanilidových esterů (karboxylátů A, sulfonátů B, (thio)fosfátů C, (thio)karbamátů D)

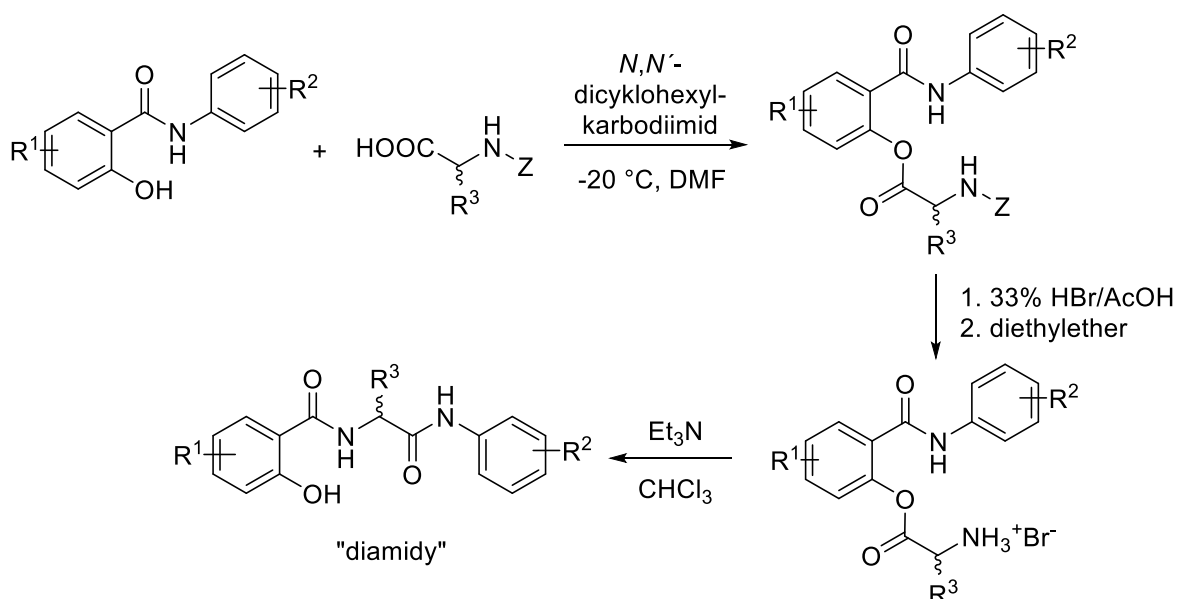
V návaznosti na dříve publikované estery salicylanilidů s chráněnými aminokyselinami,<sup>39,40</sup> kde se ukázal být výhodný Z-fenylalanin, jsme připravili prvotní sérii jedenácti esterů halogenovaných salicylanilidů s *N*-acetyl-L-fenylalaninem (Obr. 7), tj. použili jsme jinou *N*-chránicí skupinu, aniž bychom ovšem plánovali následné odchránění.<sup>52</sup> Pokud je k esterifikaci použita fyziologická aminokyselina, může tento ester jako dočasný drug delivery systém zvyšovat buněčný uptake, neboť aminokyseliny mají specifické transportní systémy a jsou aktivně vychytávány z prostředí (nespecifický targeting). Tyto aminokyselinové estery byly standardně testovány proti panelu mikrobu a také jsme stanovili toxicitu pro PBMC. Deriváty byly velmi dobře účinné vůči všem mykobakteriálním kmenům s hodnotami MIC  $\leq 0,25\text{-}32 \mu\text{M}$ , nejúspěšnější byl (*S*)-4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-2-acetamido-3-fenylpropanoát (Obr. 7;  $R^1 = \text{Cl}$ ,  $R^2 = 4\text{-CF}_3$ ) a jeho bromový isoster ( $R^1 = \text{Br}$ ), které též inhibovaly rezistentní kmeny ( $\leq 2 \mu\text{M}$ ). Brom derivát byl také nejméně cytotoxický s dostatečným indexem selektivity, což bylo společné všem třem nejúčinnějším sloučeninám jak proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv, tak rezistentním kmenům (SI až 195). Esterifikace vesměs zvýšila aktivitu salicylanilidů, výhodné byly ty připravené z 3,4-dichloranilinu a 4-(trifluormethyl)anilinu. Nejcitlivějším kmenem bylo *Mtb.*, mírně odolnější je *M. kansasii* a nejvyšší hodnoty MIC mělo *M. avium*. Nenalezli jsme

přímou korelaci mezi lipofilitou a antimikrobní účinností, ačkoli se jedná o důležitý faktor ovlivňující aktivitu antimykobakteriálních molekul. Uvedené rysy jsou společné všem připraveným salicylanilidovým derivátům. Prvně jsme také prokázali, že estery salicylanilidů s aminokyselinami mají antibakteriální účinky vůči grampozitivním bakteriím v nízkých mikromolárních koncentracích (*S. aureus* včetně MRSA kmene, *S. epidermidis*, enterokoky; MIC  $\geq 0,98 \mu\text{M}$ ), kdežto gramnegativní bakterie jsou podstatně méně citlivé (*E. coli*, klebsiely) až zcela rezistentní (pseudomonády). Kromě výše uvedených derivátů jsou dobře účinné i 4-bromanilidy. I to je společné prakticky všem salicylanilidovým esterům. Také jsme zjistili antifungální aktivitu v koncentracích od  $3,9 \mu\text{M}$ , nejcitlivějším kmenem (opět platí u našich esterů univerzálně) je vláknitá houba *Trichophyton mentagrophytes*, kdežto kvasinky tolerují podstatně větší koncentrace.<sup>52</sup> Tyto vynikající výsledky vůči mykobakteriím (až  $8\times$  větší účinnost a radikálně snížená toxicita v porovnání se salicylanilidy, lepší než acetáty<sup>38</sup> a estery Z-aminokyselin,<sup>39,40</sup> minimálně srovnatelné s karbamáty<sup>41</sup>) nás motivovaly k syntéze celé řady dalších salicylanilidových esterů.



Obrázek 7. Estery salicylanilidů s *N*-acetyl-L-fenylalaninem

Estery aminokyselin jsme studovali i v rámci přípravy antimykobakteriálních a antimykotických *N*-[(fenylkarbamoyl)methyl]-2-hydroxybenzamidů<sup>65,66</sup> („diamidů“), které byly identifikovány jako neočekávaný produkt při snaze odchránit estery Z-aminokyselin (Obr. 8). Benzyloxykarbonylová skupina (Z) byla odštěpena acidolyticky a při snaze převést vzniklý hydrobromid esteru bází na volný ester nebyl izolován tento očekávaný produkt, ale přesmykem vznikající *N*-[(fenylkarbamoyl)methyl]-2-hydroxybenzamid. Tento přesmyk byl studován z hlediska jeho versatility – ověřen různými substituenty v salicylové i anilinové části molekuly a diverzitou  $\alpha$ -aminokyseliny (fyziologické i nefyziologické různých vlastností, optické isomery, odlišné chránicí skupiny aj.). Ukázalo se, že přesmyk probíhá univerzálně bez ohledu na typ substituce. Zároveň jsme díky izolovaným meziproduktům přesmyku navrhli jeho mechanismus, který probíhá přes bicyklický intermediát.



Obrázek 8. Přesmyk vedoucí ke vzniku *N*-[(fenylylkarbamoyl)methyl]-2-hydroxybenzamidů

Dalšími studovanými estery byly benzoáty<sup>53,54</sup> a posléze rozličné 4-substituované benzoáty.<sup>55,56,57</sup> Výchozí premisou byl fakt, že kyselina benzoová má sama o sobě antimikrobní účinky proti bakteriím i houbám.<sup>53,67</sup> Dojde tak ke spojení dvou bioaktivních struktur do jedné molekulární entity, což by mohlo resultovat nejenom ve zvýšené lipofilitě, ale zejména ve vzájemné podpoře účinku (synergii či alespoň aditivitě).<sup>68</sup>

Benzoáty se ukázaly být účinnými vůči grampozitivním bakteriím bez ohledu na výskyt rezistence na methicilin ( $MIC \geq 0,98 \mu M$ ), nejúčinnějšími se ukázaly, podobně jako u mykobakterií, 4- a 5-chlor-2-[(3,4-dichlorfenyl)karbamoyl]fenyl-benzoáty a odpovídající trifluormethylová analoga, jeden derivát dokonce inhiboval v nízkých koncentracích i *P. aeruginosa* (7,81-15,62  $\mu M$ ). Antifungální aktivita je zřetelně nižší, účinných bylo pouze několik sloučenin s hodnotami MIC od 3,9  $\mu M$ , a to jen proti některým kmenům.<sup>53</sup> Naopak aktivita vůči mykobakteriím byla podstatně lepší (0,25-16  $\mu M$ ), a to včetně *M. avium*. Nejúčinnější deriváty byly vysoce aktivní i proti MDR- a XDR-TB v rozmezí koncentrací 0,25-2  $\mu M$  bez závislosti na profilu rezistence; některé z nich byly proti rezistentním izolátům účinnější než vůči lékově citlivému kmeni (až 8 $\times$ ). Vztahy struktura-aktivita byly identické jako u předchozích esterů. Pozitivním zjištěním byl vzestup aktivity vzhledem k samotným salicylanilidům (až 8 $\times$ ) a současně signifikantní pokles cytotoxicity (buněčná linie HepG2) v případě sloučenin 5-chlorsalicylové kyseliny, který je bohužel nedostatečný, neboť hodnoty SI přesáhly hodnotu 10 jen v případě lékově rezistentních kmenů.<sup>54</sup>

Vzhledem k vysoce pozitivnímu vlivu přítomnosti CF<sub>3</sub> skupiny na anilinovém jádře, nejlépe v poloze 4, jsme se rozhodli tuto skupinu zavést i do struktury kyseliny použité k esterifikaci a připravit tak 4-(trifluormethyl)benzoáty, iniciálně hodnocené spolu s jejich parentními salicylanilidy jako potenciální antifungální léčiva. Vystupňovaná lipofilita těchto esterů, ač byla naším záměrem, vedla k problémům s rozpustností v testovacím médiu, což vyřadilo z hodnocení mnoho derivátů. Plísňe, zejména *T. mentagrophytes* a *Absidia corymbifera*, byly citlivější než kvasinky (MIC od  $\leq 0,49$   $\mu\text{M}$ , resp. od 1,95  $\mu\text{M}$ ). Nejúčinnějším salicylanilidem se ukázal *N*-(4-bromfenyl)-4-chlor-2-hydroxybenzamid, esterem pak jeho 4-(trifluormethyl)benzoát, dobře účinné jsou i *N*-[4-(trifluormethyl)fenyl] deriváty. Preferovány jsou sloučeniny 5-chlorsalicylové kyseliny a obecně též 3-substituovaných anilinů. Nelze ovšem říci, že esterifikace vždy vede k vyšší inhibici růstu hub, některé estery měly jen velmi nízkou aktivitu, jiné byly naopak výrazně účinnější než salicylanilidy. 4-(Trifluormethyl)benzoáty dosáhly lepší *in vitro* účinnosti než předešlé benzoáty.<sup>55</sup> Problémy s rozpustností se vyskytly i při hodnocení antibakteriálních vlastností. Nicméně molekuly, které se podařilo otestovat, vykazují vysokou účinnost proti grampozitivním kmenům včetně MRSA a enterokoků s MIC od  $\leq 0,49$   $\mu\text{M}$ , lepší než jiné salicylanilidové estery. MIC pro mykobakterie se pohybovaly v rozmezí 0,5-32  $\mu\text{M}$ , nejlepším byl v souladu s přechozími poznatky a účinností výchozích salicylanilidů 4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-4-(trifluormethyl)benzoát. I zde substituce fenolického hydroxyly zvyšuje zpravidla aktivitu (až 8 $\times$ ), někde je stejná, pouze estery 5-brom-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamidů jsou méně účinné. 4-CF<sub>3</sub>-benzoáty s MIC  $\leq 1$   $\mu\text{M}$  jsme otestovali proti panelu MDR- a XDR-TB kmenů, přičemž jejich aktivita byla identická nebo dokonce lepší než v případě H<sub>37</sub>Rv. Zavedení další CF<sub>3</sub> skupiny do molekuly antimykobakteriální účinnosti (oproti houbám) nezvyšuje. Negativem zůstává vysoká cytotoxicita (HepG2) nejúčinnějších derivátů s hodnotami IC<sub>50</sub> 1,33-4,82  $\mu\text{M}$  a tím i nedostatečná selektivita (SI <10), i když lepší než u výchozích salicylanilidů. Alternativně se lze na tuto skupinu dívat jako na potenciální „anticancer“ léčiva s přídatnými širokospektrálními antimikrobními účinky.<sup>56</sup> Ve studiu cytotoxických a cytostatických účinků salicylanilidových analog pokračujeme ve spolupráci s Maďarskou akademií věd, vybrané sloučeniny mají vynikající aktivitu i proti leukemickým buňkám a chemorezistentnímu glioblastomu; některé deriváty indukují apoptosu rakovinných buněk.

Zjištění, že substituce na kyselině použité k esterifikaci má značný vliv na aktivitu, nás přivedlo k designu a syntéze esterů tří neaktivnějších salicylanilidů a různých 4-substituovaných benzoových kyselin. Použili jsme substituenty s různými elektronovými

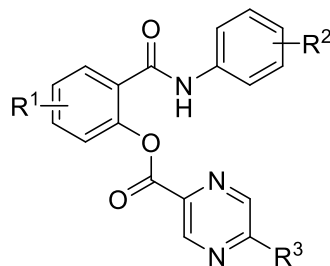
efekty (Br, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) a uvedli je do kontextu s předchozími benzoáty a 4-CF<sub>3</sub>-benzoáty. Hodnoty MIC byly v případě všech mykobakterií uniformně velmi nízké ( $\leq 0,125$ -8  $\mu\text{M}$ ), rezistentní tuberkulózní kmeny byly opět významně citlivější. Naopak houby byly převážně rezistentní včetně *T. mentagrophytes* a proti stafylokokům účinkovaly jen dva deriváty, zato s velmi nízkými hodnotami MIC  $\leq 0,49$   $\mu\text{M}$ , citlivý byl i enterokok. Ani jeden z esterů nebyl cytotoxický v koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , což vede k velmi vysokým hodnotám SI jak u koků, tak mykobakterií, většina sloučenin však působila cytostaticky (antiproliferativně) v nízkých mikromolárních koncentracích. Proti MDR- a XDR-TB kmenům byl nejúčinnější 4-chlor-2-[(3,4-dichlorfenyl)karbamoyl]fenyl-4-brombenzoát (0,125-0,5  $\mu\text{M}$ ), který se uplatnil nejen proti mykobakteriím, proti NTM pak byl nejlepší 4-brom-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-4-nitrobenzoát (0,5-2  $\mu\text{M}$ ).<sup>57</sup>

Přístup tzv. „mutual prodrugs“ jsme aplikovali při přípravě 2-(fenylkarbamoyl)fenylpyrazin-2-karboxylátů (Obr. 9, R<sup>3</sup> = H).<sup>58,59</sup> Pyrazin-2-karboxylová (POA) kyselina je aktivním metabolitem antituberkulotika pyrazinamidu, sama o sobě je ovšem jen velmi málo antimykobakteriálně aktivní. Problém spočívá zejména v nízkém buněčném uptake jako konsekvence značné hydrofility, její lipofilní estery mají aktivitu podstatně vyšší. Hlavní příčinou rezistence na PZA je defektní nikotinamidasa/pyrazinamidasa, enzym hydrolyzující PZA na POA. Příprava proléčiv (esterů) POA tak může představovat způsob, jak tento problém překonat. Jak přesně PZA a POA působí, není známo, ačkoli byla navržena celá řada možných mechanismů účinku a možných targetů.<sup>59,69,70</sup> Tuto skupinu esterů lze proto považovat jak za proléčiva salicylanilidů, tak POA.

Pyrazinoáty sice vykazaly velmi dobrou aktivitu v základním screeningu (0,5-8  $\mu\text{M}$  proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv a 1-32  $\mu\text{M}$  u NTM, která jsou na PZA přirozeně necitlivá), nebyly ale mezi estery nijak výjimečné. Naopak klíčovým výsledkem je jejich výrazně vyšší, excelentní účinnost na MDR- a XDR-TB s hodnotami MIC  $\leq 0,125$ -2  $\mu\text{M}$  bez zkřížené rezistence k užívaným léčivům. Patří tak, i přes komparativně nižší lipofilitu, k nejúspěšnějším salicylanilidovým derivátům, nejaktivnějším byl 4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-pyrazin-2-karboxylát ( $\leq 0,25$   $\mu\text{M}$ ; Obr. 9, R<sup>1</sup> = 4-Cl, R<sup>2</sup> = 4-CF<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> = H). SAR nijak nevybočují. U těchto kmenů jsme navíc zjistili dostatečný index selektivity stanovený na HepG2 (až 64), z tohoto pohledu vyšel nejlépe isosterní 4-bromderivát, také vysoce účinný a nejméně toxický. U *Mtb.* a *M. kansasii* je zřejmý aditivní/synergický efekt obou složek, přičemž kombinace obou entit v jedné molekule chemickou vazbou vede k lepšímu účinku než jejich prostá směs v ekvimolárním poměru, patrně díky lepšímu prostupu skrze mykobakteriální buněčnou stěnu a následně



intracelulární hydrolýze na výchozí složky. Kromě tohoto zlepšeného průniku lze uvažovat i o farmakodynamické synergii. Antimykobakteriální účinnost taktéž připravených methyl- a 4-chlorfenyl-pyrazinoátu byla nízká ( $\geq 250 \mu\text{M}$ ), což indikuje důležitost salicylanilidového „scaffoldu“. I v tomto případě ovšem estery zůstávají cytotoxické, ač méně než výchozí sloučeniny.<sup>59</sup> Pyrazinoáty inhibují také růst bakterií a hub, opět byly nejcitlivější všechny tři kmeny stafylokoků (MSSA, MRSA, *S. epidermidis*; MIC od  $0,98 \mu\text{M}$ ), dále *Enterococcus*, ačkoli na něj některé sloučeniny působily jen bakteriostaticky. Atypicky byl neaktivnější 5-chlor-2-[(3-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl-pyrazin-2-karboxylát (MIC  $0,98-7,81 \mu\text{M}$ ; Obr. 9,  $R^1 = 5\text{-Cl}$ ,  $R^2 = 3\text{-Cl}$ ,  $R^3 = \text{H}$ ), který navíc ve stejných koncentracích spolu s jeho isomerem unikátně inhiboval vysoce problémový gramnegativní patogen *P. aeruginosa*. Není zřejmý rozdíl mezi isomerními chlorsalicylovými kyselinami ani mezi 5-brom- a chlorsalicylovou kyselinou, výhodná je substituce anilinu v poloze 3. Naopak dle předpokladů 2-[(4-bromfenyl)karbamoyl]-4 (či 5)-chlorfenyl-pyrazin-2-karboxylát působily nejsilněji antifungálně ( $3,9-15,62 \mu\text{M}$ ), navíc se širokým spektrem účinku, a to na vláknité houby fungicidně, na kandidy pouze fungistaticky. Proti plísním, zejména *T. mentagrophytes*, se osvědčily i deriváty 4- $\text{CF}_3$ -anilinu (MIC  $\geq 1,95 \mu\text{M}$ ).<sup>58</sup>



Obrázek 9. Struktura salicylanilidových pyrazin-2-karboxylátů

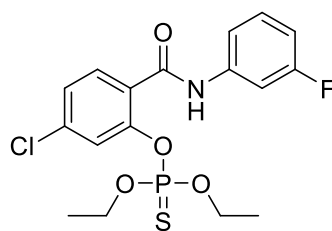
V navazující studii jsme se zabývali estery neaktivnějších polyhalogenovaných salicylanilidů s kyselinou 5-chlorpyrazin-2-karboxylovou (Obr. 9,  $R^3 = \text{Cl}$ ), nejen za účelem vystupňování anti-TB aktivity, ale i jako potenciálními „konjugabilními“ molekulami pro inkorporaci do DDSs. Příslušná kyselina má sama o sobě antimykobakteriální vlastnosti, inhibuje biosyntézu mastných kyselin a působí též na PZA-rezistentní kmeny. Lipofilnější 5-chlorpyrazinoáty byly vysoce účinné proti citlivým i rezistentním kmenům *Mtb.* i *M. abscessus* (MIC  $1-2 \mu\text{M}$ , resp.  $1-5,5 \mu\text{M}$ ). Jako první jsme objevili, že salicylanilidové deriváty inhibují tento kmen rezistentní na celou řadu léčiv (INH, RIF, PAS, thioamidy, polypeptidy, chinolony, tetracykliny a většinu aminoglykosidů) v nízkých mikromolárních koncentracích. 3,4-Dichloranilidy byly mírně účinnější než 4- $\text{CF}_3$ -anilidy. Esterifikace zachovává či zlepšuje aktivitu, naopak cytotoxicitu nikterak významně neovlivnila

(MonoMac6;  $SI \leq 9,2$ ). Zároveň jsme sledovali hydrolytickou stabilitu v testovacím médiu, zjištěný  $t_{1/2}$  byl  $\approx 3,7$  h, rozklad byl kompletní za 29 h. Potvrdili jsme, že se tyto estery jako proléčiva rozkládají na výchozí sloučeniny.<sup>46</sup>

Kromě karboxylátů jsme připravili i estery benzensulfonové kyseliny (Obr. 6, obecná struktura B). Mezi nimi se ukázal nejaktivnější proti *Mtb.* 4-chlor-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl} fenyl-benzensulfonát (MIC 1  $\mu\text{M}$ ), který byl ale inaktivní vůči NTM, kde byl naopak nejúčinnější jeho 5-chlor isomer (*M. kansasii* 2-4  $\mu\text{M}$ ). *M. avium* bylo inhibováno od 8  $\mu\text{M}$ . Souhrnně řečeno, benzensulfonáty nepřekonalu svou účinností karboxyláty, nejcitlivějším kmenem bylo *Mtb.* (1-16  $\mu\text{M}$ ). Lepší účinek měly deriváty kyseliny 5-chlorsalicylové než 4-isomery, mezi aniliny pak 3- a 4- $\text{CF}_3$ - nebo 3,4-dichloraniliny, nejméně výhodný byl 4-fluoranilin. Aktivita proti MDR kmenům ani jiným bakteriím a houbám nebyla testována.<sup>60</sup>

Nově studovanou skupinou byly estery s deriváty kyseliny thiofosforečné<sup>61</sup> a fosforečné (Obr. 6, obecná struktura C).<sup>62,63,64</sup>

Nejprve jsme připravili sérii diethyl-2-(fenylkarbamoyl)fenyl-thiofosfátů. *Mtb.* se ukázalo opět jako nejcitlivější (MIC 4-62,5  $\mu\text{M}$ ), naopak aktivita vůči *M. avium* byla nízká ( $\geq 62,5$   $\mu\text{M}$ ), *M. kansasii* bylo svou citlivostí intermediární (16 až  $>500$   $\mu\text{M}$ ). SAR byly analogické jako u většiny předchozích esterů. Z hlediska vývoje vysoce účinných antimykobakteriálních sloučenin tato modifikace nesplnila účel, zaostala za salicylanilidy, zejména proti NTM. Protože thiofosfáty patří mezi známé inhibitory cholinesteras, otestovali jsme je ve spolupráci s Univerzitou Pardubice vůči acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase – šlo o naši první takovouto studii. Slibné výsledky ukázaly, že všechny sloučeniny inhibují oba enzymy ( $\text{IC}_{50}$  8,04-20,2  $\mu\text{M}$ ), přičemž lepší inhibice AChE dosáhly deriváty chlorsalicylových kyselin, pro inhibici BChE jsou výhodné fluorované aniliny. Jde o doposud nepřekonané inhibitory AChE založené na salicylanilidové struktuře, nejefektivnější byl *O*-{5-chlor-2-[(3-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl}-*O,O*-diethyl-thiofosfát (Obr. 10). Žádný ester nebyl horší než léčivo rivastigmin, u BChE byly nejlepší sloučeniny srovnatelné také s galantaminem. Předpokládáme, že klíčovým faktorem antimykobakteriální aktivity je salicylanilidová část, která však v případě inhibice cholinesteras slouží jako nosič pro thiofosfátovou skupinu.<sup>61</sup>

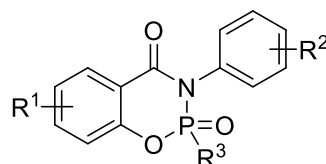


Obrázek 10. Nejúčinnější thiofosfatový inhibitor cholinesteras

Oproti tomu analogické méně lipofilní diethyl-fosfáty se ukázaly být účinnějšími antimikrobními sloučeninami. MIC proti mykobakteriím byly v rozmezí 0,5-62,5  $\mu\text{M}$ , proti rezistentním kmenům působily nejlepší deriváty uniformně (MIC = 1  $\mu\text{M}$ ). Oproti jiným esterům mají fosfáty vystupňovanou účinnost na *M. avium*. Nejlepších hodnot dosáhl 5-chlor-2- $\{[4-(\text{trifluormethyl})\text{fenyl}] \text{karbamoyl}\}$  fenyl-diethyl-fosfát (MIC 0,5-4  $\mu\text{M}$ ), následován jeho 4-chlor isomerem a 4-brom analogem. Další SAR byly analogické předchozím zjištěním. Stafylokoky včetně MRSA byly inhibovány od 1,95  $\mu\text{M}$ , ostatní kmeny byly necitlivé, antifungální aktivita byla poněkud nižší (MIC  $\geq 3,91$   $\mu\text{M}$ ), řada sloučenin byla ovšem inaktivních. Vynikající aktivitu proti grampozitivním bakteriím mají deriváty 5-bromsalicylové kyseliny, trifluormethylovaných a bromovaných anilinů, což je obecný rys většiny našich esterů. Ani diethyl-fosfáty se zcela nevyhnuly hepatotoxicitě, byly však méně toxické než výchozí salicylanilidy (IC<sub>50</sub> 1,6-33,8  $\mu\text{M}$ ). Design této skupiny vycházel z poznatků o fosfotriesterových proléčivech a jejich metabolismu, chemické stabilitě a následně snadné enzymatické hydrolyze v místě působení.<sup>62</sup> U těchto esterů jsme se věnovali také zkoumání mechanismu účinku.<sup>63</sup>

Vzhledem k tomu, že fosfatová skupina je všeobecně známý farmakofor pro ireversibilní inhibici cholinesteras,<sup>71</sup> také diethyl-fosfáty byly testovány na tuto aktivitu. Zjištěné hodnoty IC<sub>50</sub> byly v rozmezí 0,9 až 86,3  $\mu\text{M}$ , přičemž BChE byla inhibována podstatně silněji. Vůči AChE fosfáty překonaly účinnost rivastigminu, některé měly u BChE dokonce nižší hodnoty IC<sub>50</sub> než léčiva rivastigmin i galantamin. Deriváty 4-chlorsalicylové kyseliny se ukázaly nejúčinnější, nejvíce 2- $[(3\text{-bromfenyl})\text{karbamoyl}]$ -5-chlorfenyl-diethyl-fosfát. Oproti předpokladům jsme experimentálně prokázali, že tyto sloučeniny nejsou ireversibilními inhibitory jako drtivá většina známých fosfátů, ale působí pseudo-ireversibilně, podobně jako karbamát rivastigmin. Ačkoli podle literatury by měly být fosfáty inhibující cholinesterasy toxičtější než isosterní thiofosfáty, poměřováno mírou inhibice AChE jsme našli globálně opačnou závislost, ač v případě BChE bylo identifikováno několik vysoce účinných fosfátů.<sup>64</sup>

Ve studiu problematiky derivátů kyselin na bázi fosforu jsme pokračovali a pro velmi dobré výsledky byla tato skupina sloučenin patentována v České republice<sup>72</sup> a dále byla podána i mírně rozšířená mezinárodní patentová přihláška.<sup>73</sup> Chemicky se jedná o různě *O*-substituované fosfáty, fosfináty, fosfonáty a strukturně inovativní 2-substituované 3-difenyl-3-hydrobenzo[*e*][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxidy (Obr. 11). Těmto sloučeninám je vlastní vysoká antituberkulotická aktivita od 0,5  $\mu\text{M}$  i na MDR a XDR kmeny a snížená toxicita.



Obrázek 11. Obecná struktura 3-difenyl-3-hydrobenzo[*e*][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxidů

Antimykobakteriální aktivita je prakticky univerzální vlastností salicylanilidových esterů. Obecně lze shrnout, že celá řada z nich má účinnost proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv srovnatelnou s INH, případně jsou jen o něco méně aktivní. Neexistuje zde zkřížená rezistence s celou řadou užívaných antituberkulotik (INH, rifamyciny, EMB, streptomycin, gentamicin, amikacin, klofazimin, fluorochinolony), neboť MDR- a XDR-TB kmeny odolné vůči těmto léčivům jsou inhibovány ve stejných, velmi často dokonce nižších koncentracích než plně citlivý kmen H<sub>37</sub>Rv, a tato aktivita není závislá na profilu rezistence. Unikátní je účinnost proti NTM, zejména *M. abscessus*. Salicylanilidové estery jsou pochopitelně lepší než INH vůči INH-rezistentním kmenům NTM (*M. avium*, *M. kansasii* 235/80), u částečně citlivého klinického izolátu *M. kansasii* jsou aktivity srovnatelné, resp. některé estery jsou výrazně lepší, jiné mají hodnoty MIC analogické nebo vyšší. Při porovnání účinnosti s PAS, strukturně blízkým antimykobakteriálním léčivem druhé linie, vychází naše deriváty (estery včetně karbamátů) všeobecně lépe proti všem kmenům. Většina esterů má zároveň v porovnání s výchozími salicylanilidy alespoň mírně sníženou cytotoxicitu (bohužel testovanou na vzájemně se lišících buněčných liniích i na různých pracovištích), a tudíž zlepšené hodnoty SI (v řadě případů vyšší než 10), ačkoli vysloveně nízkou toxicitu mají jen některé skupiny (s *N*-acetyl-L-Phe a vybrané 4-substituované benzoáty). Z hlediska SAR jsou všeobecně nejvýhodnější estery halogenovaných salicylanilidů odvozených od 5-Cl- a 5-Br-salicylové kyseliny (ty bývají nadto zpravidla méně toxické), 3,4-dichloranilinu nebo (trifluormethyl)anilinu, ideálně v poloze 4 (obecně preferované), následuje 4-bromanilin. Naopak nevýhodné jsou deriváty monofluorované. Estery mají většinou lepší nebo podobnou aktivitu jako samotné salicylanilidy. Nenalezli jsme přímou korelaci antimykobakteriální účinnosti-lipofilita, jakkoli se jedná o klíčový parametr nutný mj.

pro nespecifický prostup skrze vysoce lipofilní buněčnou stěnu mykobakterií.

Estery sdílí také vynikající účinnost vůči stafylokokům, zejména *S. aureus* včetně MRSA kmene, kde neexistuje zkřížená rezistence s  $\beta$ -laktamem methicilinem. *Enterococcus* bývá o něco méně citlivý, gramnegativní bakterie jsou až na výjimky zcela necitlivé, ev. mají vysoké hodnoty MIC. Nejefektivnější sloučeniny jsou minimálně srovnatelné s benzylpenicilinem u citlivých kmenů a lepší než bacitracin. Přítomnost 4-bromanilinu a  $\text{CF}_3$ -anilinu v molekule je spojená s vyšším účinkem, a to i u patogenních hub. Právě antimykotická aktivita bývá o něco nižší a není tak univerzální jako v případě bakterií: některé série jsou poměrně málo účinné, v jiných se našlo jen několik dobře účinných sloučenin. Citlivější než kvasinky jsou vláknité houby (plísně), především *Trichophyton mentagrophytes*. Esterifikace výchozích salicylanilidů pak nemusí vést vždy ke stejné nebo lepší aktivitě.

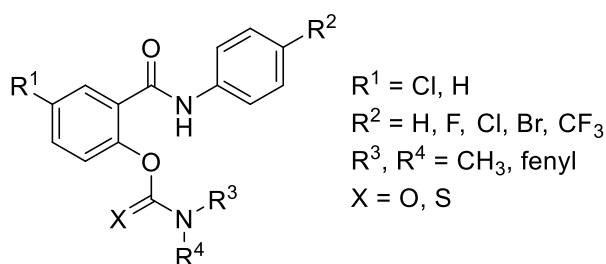
Inhibitory AChE a BChE na bázi salicylamidů a/nebo fosfátů se zabývají i dvě v současné době vypracovávané kvalifikační práce pod vedením autora této práce,<sup>74,75</sup> další „mutual prodrugs“ (estery salicylanilidů s pyrazinkarboxylovou a isonikotinovou kyselinou) jsou připravovány k publikačnímu výstupu a jsou součástí připravované disertační práce.<sup>51</sup>

### 3.1.3. Salicylanilidové karbamáty a thiokarbamáty

Další vývoj salicylanilidových karbamátů (Obr. 6, obecná struktura D), z hlediska anti-TB aktivity specifického podtypu esterů, byl motivován především prací Ferriz *et al.*<sup>41</sup> zabývající se *N-n*-alkyl karbamáty a jejich vynikající účinností zejména proti rezistentním kmenům mykobakterií, později byl popsán i jejich bakteriostatický a baktericidní účinek vůči MRSA.<sup>76</sup> Karbamátová<sup>77</sup> a méně i thiokarbamátová skupina patří ve farmaceutické chemii mezi často využívané motivy při designu léčiv a proléčiv.

Nejprve jsme se věnovali *N,N*-disubstituovaným karbamátům a též thiokarbamátům (Obr. 12).<sup>78</sup> Thiokarbamáty působily antimykobakteriálně od koncentrace 4  $\mu\text{M}$ , karbamáty pak 16  $\mu\text{M}$ , preferovaným substituentem anilinu je jako u samotných salicylanilidů a esterů trifluormethylová skupina, halogenace je nezbytná pro dobrou antimikrobní účinnost. Thiokarbamáty jsou účinnější než odpovídající karbamáty, výhodné jsou malé substituenty na karbamátovém dusíku. Aktivita (thio)karbamátů koreluje s jejich parentními salicylanilidy. Pozitivem je vysoký účinek proti INH-rezistentním NTM a lepší aktivita než má strukturně blízká PAS. Oproti očekávání nepřinesla příprava *N,N*-disubstituovaných (thio)karbamátů ze salicylanilidů zlepšení antimykobakteriálního účinku, nejlepší deriváty byly pouze srovnatelné, jinde došlo k podstatnému zvýšení MIC. Tento jev se v práci

pokoušíme vysvětlit. Účinnost vůči stafylokokům včetně MRSA byla podstatně vyšší (MIC od  $\leq 0,49 \mu\text{M}$ ), naopak gramnegativní kmeny a většina hub byla rezistentní (výjimkou byl *T. mentagrophytes* s MIC od  $1,95 \mu\text{M}$ ), ačkoli výsledky nebyly uniformní. Deriváty účinné proti stafylokokům inhibovaly vždy současně *T. mentagrophytes*, i zde byly výhodnější thiokarbamáty a *N*-methyl. Důležitým zjištěním je fakt, že popsaná modifikace výrazně (až  $18\,077\times$ ) snižuje cytotoxicitu (HepG2) a vede k vysokým hodnotám SI (až 175). Podařilo se identifikovat molekuly – i přes nominálně nižší antimykobakteriální aktivitu – dostatečně selektivní jak pro *Mtb.*, tak NTM, *S. aureus* i *T. mentagrophytes*.<sup>78</sup> U těchto karbamátů byla posléze zjištěna významná inhibiční aktivita na cholinesterasy (hodnoty  $\text{IC}_{50}$  1,60-311,0  $\mu\text{M}$ ), zejm. na BChE. Někteří zástupci tento enzym inhibovali lépe než standardní léčiva rivastigmin a galantamin, výhodná je substituce karbamátového dusíku alespoň jedním fenylem. Podle výsledků dockingu se zdá, že karbamáty působí jako kompetitivní inhibitory těchto enzymů, navíc z hlediska cytotoxicity dostatečně selektivně.<sup>79</sup>

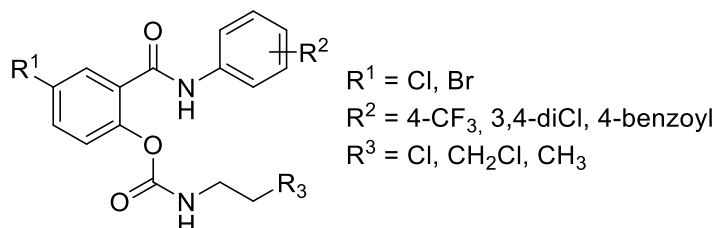


Obrázek 12. Obecná struktura salicylanilidových *N,N*-disubstituovaných (thio)karbamátů

Pro relativně nízkou antimykobakteriální účinnost *N,N*-disubstituovaných karbamátů a také kvůli potížím s rozpustností v testovacích médiích jsme se vrátili k přípravě *N*-monosubstituovaných analog (Obr. 13 a 14).<sup>46,80</sup>

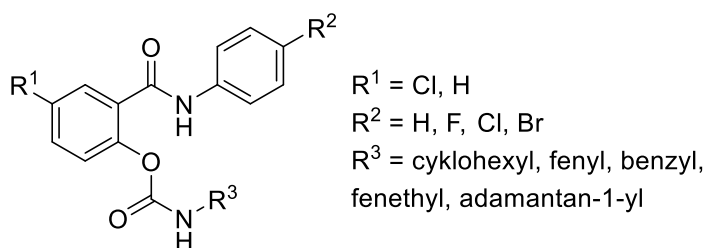
Salicylanilidy odvozené od 5-chlor- nebo 5-bromsalicylové kyseliny a 4- $\text{CF}_3$ -, 4-benzoyl- a 3,4-dichloranilinů byly reakcí s isokyanáty převedeny na *N*-propyl, *N*-(2-chlorethyl) a *N*-(3-chlorpropyl) karbamáty (Obr. 13). Ty byly aktivní vůči *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv, MDR- a XDR-TB kmenům a také *M. abscessus*. Za zmínku stojí aktivita právě proti tomuto kmeni, kdy osm karbamátů mělo MIC v rozmezí 0,2-2,1  $\mu\text{M}$ , tj. výrazně nižší než standardy ciprofloxacin (až  $15\times$ ) a gentamicin ( $53\times$ ). *Mtb.* bylo inhibováno v obdobných koncentracích, řada sloučenin byla účinnější než INH. Rezistentní kmeny měly obdobné nebo jen mírně vyšší hodnoty MIC. Pro aktivitu byly výhodnější halogenované aniliny a chlor na salicylovém jádře, karbamáty vedly u *Mtb.* bez ohledu na rezistenci obvykle ke srovnatelným či nižším hodnotám MIC než samotné salicylanilidy. Cytotoxicitu jsme stanovili na MonoMac6 buňkách,  $\text{IC}_{50}$  se pohybovaly se v rozmezí 1,1-48,0  $\mu\text{M}$ . Přesto měla

řada karbamátů dostatečné indexy selektivity pro *M. abscessus* i *Mtb.* (až 44), což je důsledkem lepší účinnosti, nikoli menší toxicity.<sup>46</sup>



Obrázek 13. Karbamáty vysoce aktivní vůči *M. abscessus*

Karbamátový dusík jsme substituovali i cykloalkyly, fenylem a fenylalkyly (Obr. 14). Iniciálně byly testovány proti bakteriím a houbám. Potvrdila se předpokládaná vysoká aktivita, sloučeniny efektivně inhibovaly stafylokoky (identicky MSSA i MRSA a také *S. epidermidis*) a plíseň *T. mentagrophytes* (MIC od  $\leq 0,49 \mu\text{M}$ ) a byly srovnatelné nebo lepší než referenční léčiva (benzylpenicilin, bacitracin, flukonazol). Žádný derivát nebyl inaktivní, cenná byla aktivita na polyrezistentní kmen *Klebsiella pneumoniae* ( $31,25 \mu\text{M}$ ) – jde o první salicylanilidové sloučeniny poměrně dobře účinné na tento kmen. Halogenace opět zvyšuje aktivitu, výhodný je brom v poloze 4 anilidové části molekuly a *N*-cyklohexyl pro antimykobakteriální aktivitu a benzyl pro antifungální.<sup>80</sup> Také zde (společně s 4-chlorfenyl karbamáty) jsme zjistili inhibiční účinek na cholinesterasy s hodnotami IC<sub>50</sub> 5-235  $\mu\text{M}$ . Většina z nich byla srovnatelná či lepší než rivastigmin vůči AChE, ale jen některé i v případě BChE. Zde se jako nejlepší substituent ukázal *N*-fenethyl. Vypočtené fyzikálně-chemické vlastnosti těchto sloučenin odpovídají požadovaným hodnotám pro průnik do CNS a tedy centrální působení.<sup>81</sup>



Obrázek 14. *N*-Monosubstituované karbamáty

Dále jsme po rozšíření této série o karbamáty odvozené od 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamidů hodnotili jejich aktivitu proti mykobakteriím, cytotoxické a cytostatické působení na několika buněčných liniích a vliv na mykobakteriální isocitrátlyasu (ICL). Příslušná publikace je těsně před odesláním do časopisu; potvrdila se vynikající *in vitro* antimykobakteriální účinnost *N*-monosubstituovaných karbamátů (nejlepší MIC nižší než  $1 \mu\text{M}$ ), přičemž některé z nich mají jen velmi nízkou toxicitu. Pod vedením autora

této práce byla též zpracována a obhájena diplomová práce týkající se salicylanilidových karbamátů a příbuzných sloučenin jako potenciálních inhibitorů cholinesteras.<sup>82</sup>

Karbamátové deriváty splnily očekávání do nich vkládané, tj. zlepšení selektivity výchozích salicylanilidů, zejména vůči mykobakteriím. U *N,N*-disubstituovaných to bylo především díky dramatickému poklesu cytotoxicity, ačkoli aktivita zvýšena nebyla, zatímco u *N*-monosubstituovaných karbamátů se jednalo primárně o vliv snížení hodnot MIC. Dále se potvrdila velmi dobrá aktivita *N*-monosubstituovaných sloučenin vůči MDR- a XDR-TB bez zkřížené rezistence ke klinicky užívaným léčivům a také signifikantní účinek proti grampozitivním bakteriím včetně MRSA a některým houbám. Podařilo se též připravit molekuly účinné vůči polyrezistentnímu kmeni *K. pneumoniae* a, což je obzvlášť přínosné, některé karbamáty velmi efektivně (submikromolární MIC) a zároveň selektivně inhibovaly *M. abscessus*, klinicky velice problematický a rezistentní druh NTM s pouze omezenou účinností používané léčby, navíc s rostoucí incidencí.<sup>83</sup> Také jsme na základě přítomnosti karbamátové skupiny, osvědčeného farmakoforu,<sup>79,84</sup> testovali připravené deriváty jako potenciální inhibitory AChE a BChE, tj. možná léčiva některých typů demencí, a získali zajímavé výsledky. Naše sloučeniny mají navíc vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti nezbytné pro velkou pravděpodobnost absorpce z trávicího traktu a přístup skrze hemoencefalickou bariéru. I na tomto poli se tak otevírá možnost jejich uplatnění, kdy jsme připravili na základě zjištěných SAR další analoga s vystupňovanou inhibiční účinností (a zároveň nižší antimikrobní aktivitou), u kterých byl také experimentálně stanoven druh a typ inhibice. Karbamáty a thiokarbamáty tak mají dobrý potenciál pro další vývoj jak antimikrobních agens, tak inhibitorů cholinesteras.

### 3.1.4. Hledání mechanismu účinku

Kromě racionálního designu, syntézy a biologického hodnocení připravených sloučenin na celých buňkách jsme se věnovali i hledání mechanismu jejich působení proti *M. tuberculosis*. Předchozí poznatky jsme shrnuli v přehledu.<sup>22</sup>

Salicylanilidům byly, podobně jako jiným fenolům, přisuzovány nespecifické účinky, např. zásah do energetického metabolismu buňky, poškození struktury a funkce biomembrán, okyselení intracelulárního prostředí, denaturace proteinů, inhibice uptake důležitých biogenních molekul.<sup>22</sup> V roce 1998 bylo popsáno, že salicylanilidy inhibují „two-component regulatory systems“, které zodpovídají za transdukcí signálů z vnějšího prostředí do nitra buňky, regulují transkripci a jsou potřebné k udržení homeostázy, expresi virulentních faktorů, podílí se i na rezistenci. U živočichů se tyto systémy nevyskytují.<sup>22,85,86</sup>



Dalším mechanismem účinku salicylanilidů je jejich „uncoupling“ aktivita, tj. působí jako rozpojovače oxidativní fosforylace v mitochondriích. Účinkují jako protonofory, kdy mohou cyklicky přenášet protony skrze membránu, a tím snižovat membránový potenciál, resp. protonmotivní sílu nezbytnou k syntéze ATP. Tato aktivita je podporována vysoce hydrofobními substituenty (*t*-Bu, isopropyl) a atomem chloru.<sup>22,24</sup> Některé novější publikace se rovněž přiklánějí k názoru, že za antituberkulotickou aktivitu primárně zodpovídá tento účinek.<sup>25,37</sup> Nicméně bylo popsáno, že je možné na základě obměn struktury oddělit „uncoupling“ od dalšího působení.<sup>24</sup> Salicylanilidy byly též reportovány jako inhibitory řady mikrobiálních enzymů různých metabolických cest, např. D-Ala-D-Ala ligasy<sup>87</sup>, sortasy A<sup>88</sup> či transglykosylasy<sup>89,90</sup> potřebných k výstavbě buněčné stěny.

Na základě strukturní podobnosti se známými inhibitory jsme pilotně otestovali devatenáct průřezově nejúčinnějších salicylanilidových derivátů (výchozí amidy, benzoáty, pyrazinkarboxyláty, benzensulfonáty, estery s *N*-acetyl-L-Phe) proti validovaným cílům isocitrátlyase a methionin aminopeptidase (MAP). Oba enzymy se podílí na udržování homeostázy během latentní a chronické fáze mykobakteriální infekce a jejich inhibitory by tak mohly být využitelné mj. k léčbě latentní TB a zkrácení doby léčby. ICL je cílem především pro latentní mykobakterie s obtížnou „drugability“. Tento enzym katalyzuje štěpení isocitrátu na sukcinát a glyoxylát, tvoří součást glyoxylátového cyklu. Tato dráha nemá u lidí obdobu. ICL je esenciální pro metabolismus mastných kyselin, virulenci a perzistenci infekce. Jeho inhibice neurychluje eliminaci *Mtb.* během akutní infekce, ale až při chronické a latentní infekci. MAP odštěpuje u prokaryot po proteosyntéze N-terminální methionin, je nezbytná pro posttranslační úpravy proteinů. Její inhibitory působí jak na replikující se buňky, tak latentní formy. Salicylanilidy a estery působí jako mírné inhibitory těchto enzymů, 4-brom-2-{{4-(trifluormethyl)fenyl}karbamoyl}fenyl-pyrazin-2-karboxylát inhiboval nejúčinněji a nejselektivněji mykobakteriální MAP (41% inhibice v koncentraci 10  $\mu$ M), většina zbylých derivátů však podstatně ovlivňovala i lidskou formu, což může resultovat v toxicitu vůči savcím buňkám. Pyrazinkarboxyláty byly nejúčinnější. 5-Chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid a jeho ester s pyrazinkarboxylovou kyselinou vedly v koncentraci 100  $\mu$ M k 59% inhibici ICL, v koncentraci 10  $\mu$ M pak nejlépe tento enzym inhiboval (22 %) ester s *N*-acetyl-L-Phe, srovnatelný se standardem 3-nitropropionovou kyselinou. Toto inhibiční působení se jistě podílí na celkovém anti-TB účinku, nelze jej tímto však vysvětlit zcela. Benzoylace a benzensulfonace vedly k poklesu aktivity.<sup>91</sup>

Vzhledem k prokázané aktivitě salicylanilidových derivátů jsme také u později připravených esterů či celých sérií stanovili inhibici ICL (Tabulka 2). Lze shrnout, že jsme nenalezli přímou korelaci mezi IC<sub>50</sub> a MIC, ostatně by to vzhledem k roli ICL ani nebylo adekvátní, neboť aktivitu stanovujeme na extracelulárně rostoucí buňky, ale účinek inhibice by se projevil u latentních mykobakterií, ovšem žádné z našich spolupracujících pracovišť tuto assay k dispozici doposud nemělo. Z teoretického pohledu by však sloučeniny duálně inhibující aktivně rostoucí mykobakterie i intracelulárně perzistující subpopulaci – jako naše deriváty – měly představovat přínos v terapii tuberkulózy.

Tabulka 2. Inhibice ICL salicylanilidovými deriváty

Estery	Inhibice v koncentraci 10 μM [%]	Inhibice v koncentraci 100 μM [%]	Nejúčinnější inhibitor (10 μM)	SAR
Pyrazin-2-karboxyláty <sup>59</sup>	9-17	13-59 (část se vysrážela)	5-chlor-2-[(3,4-dichlorfenyl)karbamoyl]fenyl-pyrazin-2-karboxylát	Lepší 3-substituované aniliny a deriváty 5-chlorsalicylové kyseliny
4-CF <sub>3</sub> -benzoáty <sup>56</sup>	12-27	ND (vysrážení)	4-chlor-2-[(3-bromfenyl)karbamoyl]fenyl-4-trifluormethylbenzoát	idem; naše nejlepší inhibitory
<i>N,N</i> -disubstituované (thio)karbamáty <sup>78</sup>	3-22	ND (vysrážení)	4-chlor-2-[(4-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl-difenylkarbamát	Halogeny, CF <sub>3</sub> a objemné karbamátové substituenty zvyšují účinek
Diethyl-fosfáty <sup>63</sup>	4-7	ND	<i>O</i> -{4-brom-2-[(3-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl}- <i>O,O</i> -diethyl-fosfát	-; některé deriváty ICL dokonce aktivovaly

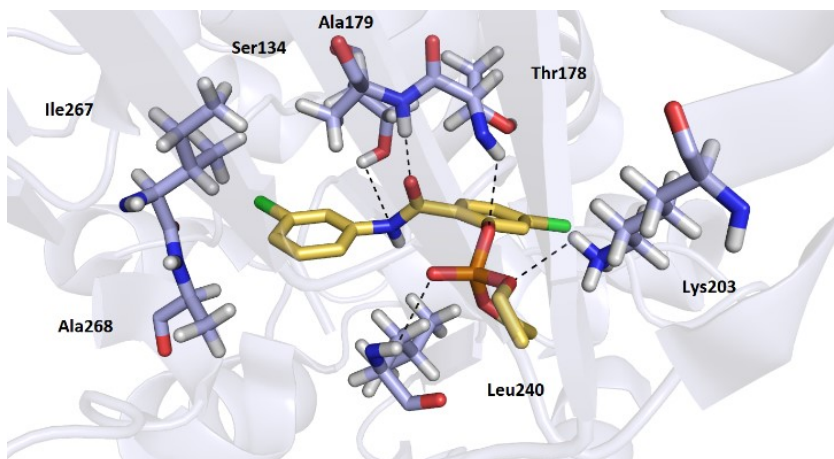
ND = netestováno/nebylo možné stanovit

V rámci studia teoretických aspektů funkce a inhibice ICL, rešerše doposud známých inhibitorů ICL a hledání SAR jsme sepsali přehledový článek.<sup>92</sup>

Mimo výše uvedené sloučeniny jsme otestovali vůči ICL i salicylanilidové *N*-monosubstituované karbamáty, článek je připraven k odeslání do časopisu, výsledky jsou konzistentní s předchozími zjištěními. Naše nejúčinnější doposud připravené inhibitory ICL patří chemicky mezi amidy kyseliny itakonové, interakci s enzymem jsme studovali i pomocí dockingu, zatím však výsledky publikovány nebyly.

V rámci hledání inhibitorů enzymů hrajících důležitou roli v udržování latentní infekce/perzistence *Mtb.* jsme otestovali salicylanilidové diethyl-fosfáty vůči dalším enzymům, jejichž inhibitory nejsou používány v klinické praxi:<sup>63</sup> L-alanin dehydrogenasa (MtAlaDH), lysin ε-aminotransferasa, chorismát mutasa<sup>93</sup> a pantothenát syntetasa. Fosfáty byly testovány v koncentraci 50 μM. Pantothenát syntetasy inhibovaly jen mírně (max. 26 %), účinnost vůči lysin ε-aminotransferase a chorismát mutase byla vyšší – až 54 %, resp. 61 %, ale jednoznačně nejvíce inhibovaným enzymem byla MtAlaDH. Tři estery působily více než 70% pokles aktivity, proto jsme stanovili i IC<sub>50</sub>. Nejúčinnějším inhibitorem byl

identifikován 5-chlor-2-[(3-chlorfenyl)karbamoyl]fenyl-diethyl-fosfát ( $IC_{50} = 4,96 \mu M$ ), zároveň také nejaktivnější sloučenina proti lysin  $\epsilon$ -aminotransferase a druhý nejlepší v případě chorismát mutasy. Interakce inhibitor-MtAlaDH byly studovány pomocí molekulového dockingu (Obr. 15). Naše fosfáty představují první známou sérii inhibitorů tohoto enzymu.<sup>63</sup>



Obrázek 15. Docking nejúčinnějšího inhibitoru na MtAlaDH<sup>63</sup>

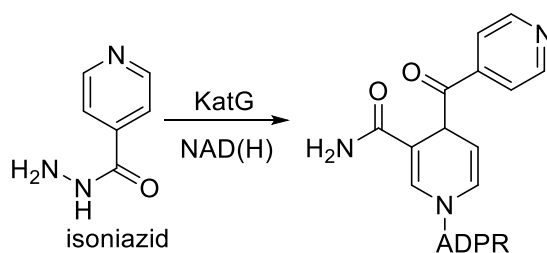
Popsali jsme tak nové targety salicylanilidů – ICL, MAP, MtAlaDH, lysin  $\epsilon$ -aminotransferasu a chorismát mutasu. Všechny tyto enzymy se podílejí na udržování chronické fáze TB, resp. latentní formy infekce. Poprvé jsme prokázali, že salicylanilidové deriváty mohou blokovat funkci těchto enzymů. Tato inhibice bude participovat na jejich antimykobakteriální aktivitě, ale vysvětlovat ji plně těmito výsledky by nebylo správné. Důležitým zjištěním však je, že by salicylanilidové sloučeniny mohly být duálně účinné i na mykobakterie v klidové fázi, což vyžaduje ještě experimentální verifikaci. Nejnadějnějším identifikovaným targetem je MtAlaDH s hodnotami  $IC_{50}$  v řádu jednotek a desítek  $\mu mol/l$ .<sup>63</sup>

Je prakticky jisté, že salicylanilidy a jejich *O*-modifikované deriváty jakožto poměrně malé a jednoduché molekuly interagují s celou řadou enzymatických cílů a buněčných struktur. Vhodná substituce může zvyšovat preferenci a naopak minimalizovat nežádoucí interakce. Tento „multitargeting“ může být výhodný pro antimikrobní účinek, neboť ztěžuje vznik získané rezistence, na druhou stranu může vést k nežádoucím účinkům na eukaryotické buňky. Lee *et al.*<sup>25</sup> uvádějí neúspěšnou snahu generovat mutanty *Mtb*. rezistentní na salicylanilidy, přisuzují ji ovšem nespécifickému uncoupling účinku.

Ve studiu mechanismu možného účinku salicylanilidových derivátů na mykobakterie dále pokračujeme.

### 3.2. Analoga isoniazidu a inhibitory InhA

Isoniazid (Obr. 16) hraje klíčovou roli v chemoterapii tuberkulózy. Toto léčivo má unikátní aktivitu a specifitu na *Mtb*. Mechanismus účinku je sice pleiotropní, ale podstata spočívá v inhibici enoyl-acyl carrier protein reductasy (InhA). Tento enzym se podílí na biosyntéze mykolových kyselin, esenciálního stavebního prvku mykobakteriální buněčné stěny, které jsou zodpovědné za její vystupňovanou lipofilitu. INH je sám o sobě proléčivo, musí být uvnitř mykobakteriálních buněk aktivován pomocí multifunkčního enzymu katalasy/peroxidasy (KatG). Vzniká tak především isonikotinoylový radikál, ten následně reaguje s NADH. Vzniklý komplex (Obr. 16) se naváže na InhA, čímž zablokuje její funkci.<sup>94,95,96</sup> Objev anti-TB aktivity INH v r. 1952 přinesl přelom v léčbě tuberkulózy, ovšem postupem času se na něj začala vyvíjet rezistence. Ta spočívá nejčastěji v mutaci genu *katG* způsobující nedostatečnou aktivaci, ale i *inhA* – vzniklý enzym má pak nízkou afinitu ke komplexu isonikotinoyl-NADH.<sup>97</sup> Proto vznikla potřeba takových derivátů isoniazidu, které nebudou k aktivaci vyžadovat KatG, či přímých inhibitorů InhA jiných chemických struktur.



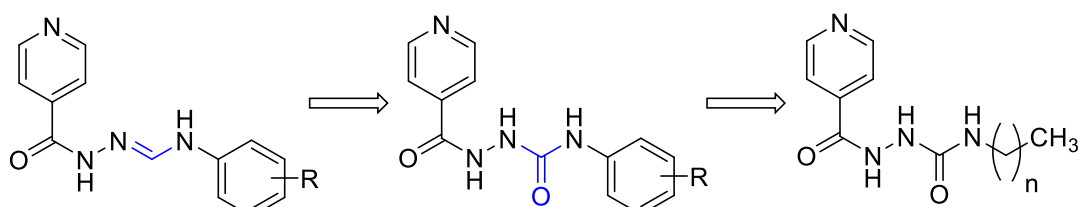
Obrázek 16. Aktivace isoniazidu enzymem KatG a vznik komplexu s NADH

Bylo připraveno velké množství isoniazidových analog, některé s výhodnějšími vlastnostmi, prakticky všechna však vykazují zkříženou rezistenci s parentním léčivem. Přehled známých derivátů INH a jejich SAR lze nalézt v četných souhrnných článkách.<sup>95,98,99</sup> Ideální léčivo založené na INH by mělo překonat získanou i přirozenou rezistenci vůči INH, mít stejné nebo lepší hodnoty MIC a současně nebyť hepatotoxické.<sup>100</sup> Modifikace INH lipofilními substituenty by měla zlepšovat transport přes biologické bariéry, zejména buněčnou stěnu mykobakterií,<sup>101</sup> substituent na *N*<sup>2</sup> by měl chránit molekulu před metabolickou acetylací.<sup>6</sup>

Modifikacemi INH se naše skupina zabývá systematicky přes deset let (např. přehledový článek<sup>95</sup> a experimentální práce<sup>102,103</sup>). Další výzkum navazuje na práci,<sup>103</sup> kdy byl použit ke spojení INH s další molekulou (substituovaným anilinem) hydrazonoformamidový můstek. Tyto deriváty si zachovaly vynikající aktivitu vůči *Mtb*. H<sub>37</sub>Rv, účinek proti INH-rezistentním atypickým mykobakteriím (*M. avium*, *M. kansasii*) byl někdy dokonce lepší. Nejaktivnější sloučeniny měly v případě *Mtb*. dostatečný index

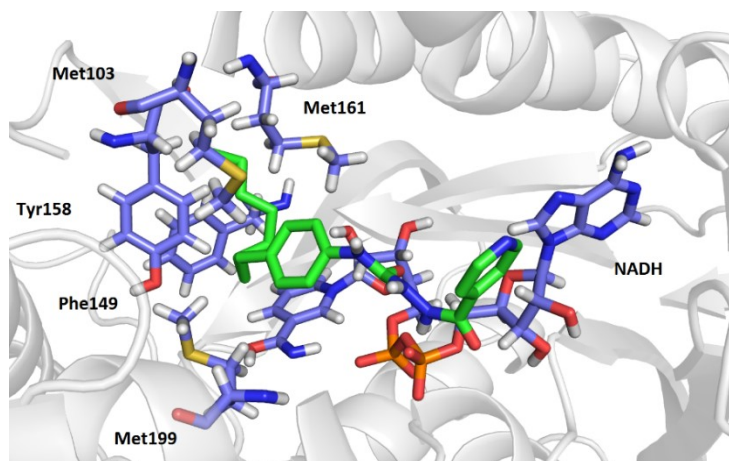
selektivity (stanovený na HepG2 a PBMC). Studována byla i jejich stabilita – při neutrálním pH jsou stabilní, v kyselém pomalu hydrolyzují. Hydrazonoformamidové uspořádání bylo úspěšně použito i pro spojení substituovaných benzohydrazidů s antimykobakteriálními léčivy (fluorochinolony, PAS, PZA).<sup>104</sup>

Design nových sérií INH derivátů byl založen na záměně methinového můstku za karboxylový (Obr. 17):<sup>100,105</sup>



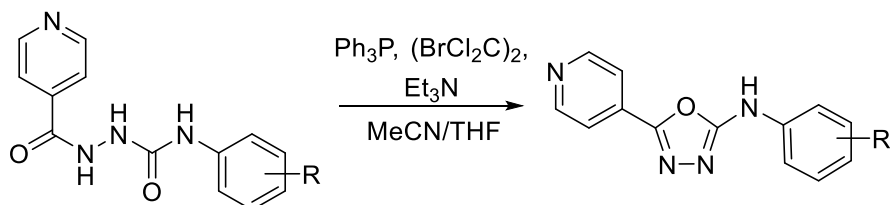
Obrázek 17. Design karboxamidových derivátů isoniazidu

V práci<sup>105</sup> byly k INH připojeny různě substituované aniliny. Nejúčinnějším vůči *Mtb.* se ukázal 2-isonikotinoyl-*N*-(4-oktylfenyl)hydrazin-1-karboxamid srovnatelný s INH (MIC 1-2  $\mu\text{M}$ ), proti atypickým kmenům pak 4-isopropylový derivát (8-32  $\mu\text{M}$ , významná je vysoká aktivita vůči *M. avium*), výhodný byl i *n*-butylový substituent. Pozitivním zjištěním je fakt, že řada těchto molekul je účinná vůči INH-rezistentním NTM. Mezi halogenovanými sloučeninami se jako nejvýhodnější ukázal anilid odvozený od 2,4,6-trichloranilinu (4  $\mu\text{M}$  pro *Mtb.*), vůči NTM je obecně jejich aktivita nižší než u alkylanilidů. Protože INH inhibuje InhA, zkusili jsme modelovat *in silico* interakci nejúčinnějších derivátů s tímto enzymem, kde se potvrdila výhodnost delšího alkyly pro afinitu a interakci. Podle této studie by mohly karboxamidy – oproti výchozímu INH – inhibovat InhA kompetitivně přímo (Obr. 18), bez nutné aktivace KatG,<sup>105</sup> čemuž nasvědčuje i účinnost vůči *M. avium*, kterému tento enzym chybí. Na aktivitě se může podílet i usnadněné neenzymatické uvolnění isonikotinoylového radikálu z méně stabilního hydrazidu.<sup>106</sup>



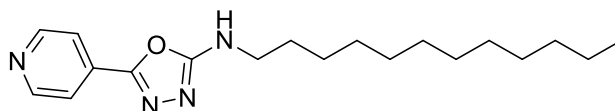
Obrázek 18. Konformace nejaktivnějšího hydrazinkarboxamidu v aktivním centru InhA<sup>104</sup>

Vzhledem k popsané účinnosti 1,3,4-oxadiazolů i na rezistentní mykobakterie<sup>107</sup> jsme přistoupili k cyklizaci 2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidů na *N*-substituované 5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (Obr. 19), pilotní *N*-fenyl oxadiazoly se však ukázaly neaktivními.<sup>105</sup>



Obrázek 19. Příprava 1,3,4-oxadiazolů cyklizací<sup>105</sup>

V navazující studii<sup>100</sup> jsme třemi syntetickými přístupy připravili INH deriváty spojené karboxamidovým můstkem s různě dlouhými alkyly (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>) a následně je stejným způsobem cyklizovali na oxadiazoly. Mezi *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidy byly nejúčinnější sloučeniny s krátkým alkylem (do C<sub>3</sub>), aktivita proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv byla obdobná jako isoniazidu (0,5-2 μM), MDR- a XDR-TB kmeny byly výrazně odolnější (MIC ≥16 μM). Mechanismus účinku byl experimentálně prokázán jako identický s INH (inhibice InhA, a tudíž produkce mykolových kyselin), i když výrazně lépe inhibovaly růst INH-rezistentních NTM (MIC ≥4 μM). U nejúčinnějších analog cyklizace aktivitu podstatně snižuje. V sérii *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů se osvědčily decyl, undecyl a zejména dodecyl. Nejúčinnější *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (Obr. 20) inhiboval H<sub>37</sub>Rv i rezistentní kmeny v koncentraci 4-8 μM, zároveň kmen *Mtb.* H<sub>37</sub>Ra nadprodukuje InhA a byl též nejúčinnější vůči *M. avium*. Experimentálně bylo prokázáno, že jeho mechanismus účinku je odlišný od INH, nepůsobí na výstavbu buněčné stěny a neexistuje zde zkřížená rezistence s jinými antituberkulotiky. I přes přítomnost dlouhého alkylu tento oxadiazol splňuje požadavky Lipinského pravidla pěti pro „drug-likeness“ při perorálním podání a je tak významnou výchozí molekulou pro další studium. Důležitý je i fakt, že žádná z připravených sloučenin nebyla cytotoxická (HepG2), u nejlipofilnějších derivátů hodnocení komplikovala malá rozpustnost v testovacím médiu.

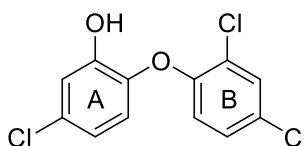


Obrázek 20. *N*-Dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Do skupiny inhibitorů InhA patří kromě nepřímých inhibitorů, tj. derivátů INH, také přímé inhibitory, které nepotřebují k účinnosti bioaktivaci (nejsou tedy proléčivý). Sem patří

například desinfekční látka triklosan (irgasan; Obr. 21), jejíž vývoj a použití jsme shrnuli v přehledovém článku.<sup>108</sup> Podobně jako v jiných případech nebyl původně biocid triklosan vůbec považován za antimykobakteriálně účinné léčivo a jeho mechanismus působení byl prisuzován řadě nespecifických efektů (poškození buněčné membrány, narušení proteosyntézy, působení jako protonofor aj.). Na přelomu 20. a 21. století byl prokázán jak účinek na mykobakterie, tak specifická inhibice InhA v nízkých koncentracích.<sup>108</sup> Inhibice mykolových kyselin, zejména pak InhA, je považována za velmi nadějný target při vývoji nových léčiv proti tuberkulóze.<sup>109</sup>

K nevýhodám triklosanu patří zejména nízká bioavailability, rozpustnost ve vodě a v porovnání s INH i nižší aktivita. Proto byla připravena celá řada jeho derivátů, difenyletherů. Existují dva hlavní směry vývoje – jednak difenylethery s A-cyklem substituovaným v poloze 5 delším lipofilním alkylem či arylalkylem, u nichž je přítomnost fenolické skupiny nezbytná pro inhibici enzymu. Pro substituci B-cyklu jsou preferovány substituenty vedoucí k tzv. „slow-onset“ inhibici, zejména *o*-methyl. Tento strukturní typ představuje nejnovější trend analog triklosanu. V této skupině difenyletherů je k dispozici rozsáhlejší evidence jak pro inhibici enzymu, tak aktivity vůči mykobakteriím, ačkoli zde vždy není přímá korelace. Některé sloučeniny byly testovány *in vivo*, základním problémem stále zůstává nedostatečná bioavailability a problémy s optimálním rozsahem lipofily. Druhý směr vývoje derivátů odvozených od triklosanu postrádá OH skupinu, jsou v ní zastoupeny difenylethery aktivní vůči mykobakteriím, ale nemají přesvědčivá data o schopnosti inhibovat InhA. Řada studií se opírá pouze o docking, ale experimentální potvrzení enzymové inhibice chybí.<sup>108</sup>



Obrázek 21. Triklosan

V review<sup>108</sup> shrneme základní poznatky v oblasti derivátů a analog triklosanu. Podařilo se nám postihnout recentní trendy a identifikovat základní směry vývoje. Uvedená oblast je poměrně rozpracovaná a hojně studovaná, setkávají se zde zdárně přístupy biochemické a farmaceuticko-chemické, ačkoli ne ve všech publikacích. Provedeny byly i četné *in vivo* studie, zatím bohužel s ne zcela uspokojivými výsledky, ale otevírá se prostor pro farmaceutickou technologii včetně DDSs. Tato práce nás inspirovala k přípravě proléčiv triklosanu na bázi esterů s karboxylovými kyselinami, karbamátů a thiokarbamátů, které jsou souhrnně shrnuty v disertační práci.<sup>51</sup> Tyto deriváty kromě širokospektrálního

antimykobakteriálního účinku potlačují růst patogenních hub, grampozitivních (včetně MRSA) a v rámci našich molekul unikátně i gramnegativních bakterií ( $MIC \geq 7,81 \mu M$ ). U mykobakterií je jejich aktivita obdobná jako u výchozího triklosanu, avšak oproti literárním údajům, které se shodují ohledně nízké toxicity triklosanu,<sup>108</sup> jsou naše sloučeniny včetně výchozího léčiva výrazně cytotoxické pro HepG2. Pracujeme také na studii kombinující struktury triklosanu a isoniazidu v jedné molekule, přičemž tato série by měla duálně cílit na InhA a tlumit růst i INH-rezistentních kmenů.

Naši další práci inspirovala především velmi slibná aktivita oxadiazolového derivátu. Přesvědčivě jsme demonstrovali, že jednoduchou chemickou modifikací (dvoukroková syntéza s dobrými výtěžky) zavedeného léčiva lze připravit sloučeniny sice se stejným strukturním motivem, ale odlišným mechanismem působení, tj. plně účinné (bez zkřížené rezistence) na kmeny, které tolerují výchozí INH. Cesta k novým, inovativním potenciálním léčivům tak může být z pohledu organické chemie jednoduchá. Jde o jednu z našich nejvýznamnějších prací, kde jsme udělali důležitý krok od syntézy a mikrobiologického hodnocení ke zkoumání mechanismu účinku. Oproti původnímu „me-too“ přístupu jsme připravili originální molekulu, u které bychom v budoucnu rádi určili přesný mechanismus účinku. Ve světle (nejen) této studie se ukazuje, že má stále smysl zabývat se systematickými obměnami známých a používaných léčiv, že se nejedná o neefektivní či překonaný přístup. V současné době začíná systematická SAR studie nejúčinnějšího oxadiazolu (Obr. 20), abychom identifikovali minimální strukturní požadavky pro anti-TB aktivitu a našli ještě účinnější analoga. Práce Rychtarčíkové *et al.*<sup>105</sup> byla především průpravnou pro klíčovou studii,<sup>100</sup> ale také jsme se v ní inspirovali ohledně výhodnosti 4-oktylanilinu, který jsme poměrně úspěšně začali inkorporovat do potenciálních antituberkulotik. Ze sloučenin INH se věnujeme derivátům 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)propanové a 2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)octové kyseliny (tj. opět jiný typ můstku), kdy volný karboxyl využíváme ke tvorbě esterů a především amidů za účelem zlepšení aktivity. Metodika a příklady takových molekul byly shrnuty v bakalářské<sup>110</sup> a diplomové<sup>111</sup> práci zpracované pod vedením autora této práce. Tento přístup umožňuje i kombinaci více anti-TB léčiv v jedné molekule. Připravované sloučeniny jsou zpravidla netoxické, řada z nich má několikanásobně lepší aktivitu než INH vůči NTM, často i *Mtb*. ( $MIC$  od  $\leq 0,03 \mu M$ ), hodnocení proti MDR- a XDR-TB probíhá. V budoucnu bychom se chtěli také věnovat ověření jejich mechanismu účinku. Drtivá většina námi připravených analog INH jsou selektivní antimykobakteriální agens, neovlivňují růst jiných bakterií ani hub.



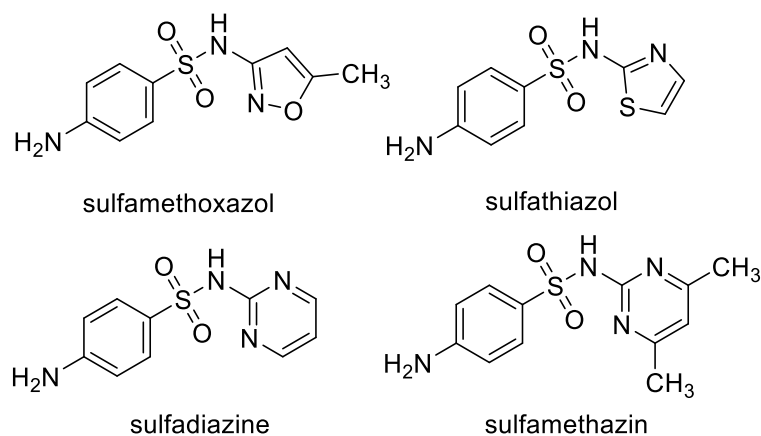
### 3.3. Modifikace sulfonamidů

Sulfonamidy, první skutečně efektivní celková antimikrobní léčiva, byly od svého objevu používány k léčbě řady bakteriálních a protozoálních infekcí. Pročelaly bouřlivý rozvoj, avšak vývoj rezistence a objev účinnějších a méně toxických antibiotik vedl k jejich ústupu z klinické praxe. Zpět do širšího použití se dostaly díky kombinaci s aminopyrimidinovým derivátem trimethoprimem, který se nejčastěji používá společně se sulfamethoxazolem v poměru 1:5 pod názvem kotrimoxazol. Obě složky kombinovaného preparátu inhibují synergisticky dva navazující kroky v biosyntéze folátů, hovoří se o tzv. sekvenční blokádě, která přispívá k obnově citlivosti u kmenů rezistentních na samotné sulfonamidy.<sup>1</sup> Kromě této „klasické“ inhibice dihydropteroát synthasy sulfonamidy blokují řadu dalších mykobakteriálních enzymů, např.  $\beta$ -karboanhydrasu<sup>112</sup> či  $\beta$ -ketoacyl synthasu,<sup>113</sup> což může participovat na jejich antimikrobní účinnosti.

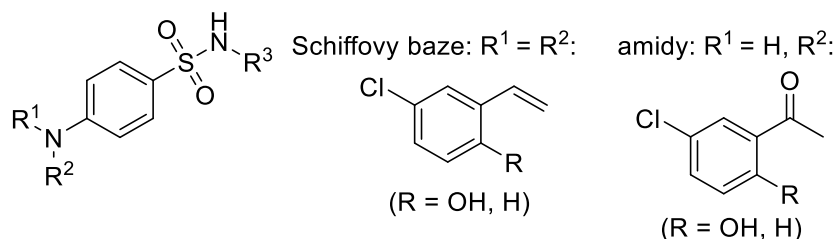
Sulfonamidy byly doporučeny jako součást terapeutických schémat pro léčbu některých NTM infekcí,<sup>114</sup> ne však TB. Sulfonamidy a sulfony se sice staly prvními léčivy s mírným antituberkulotickým efektem, ale později byly všeobecně považovány za klinicky neefektivní a bylo od nich ustoupeno,<sup>115</sup> resp. jejich role byla přinejmenším kontroverzní. V návaznosti na publikaci<sup>115</sup> vyšly v letech 2012 a 2013 tři významné práce, které demonstrovaly, že klinicky dosažitelné koncentrace sulfamethoxazolu (při podávání *per os*) včetně kombinace s trimethoprimem a též sulfadiazinu inhibují jak *Mtb.*, tak komplex *Mycobacterium avium*.<sup>116,117,118</sup> Huang a kol.<sup>116</sup> demonstrovali, že je za tento účinek zodpovědný sulfamethoxazol, neboť vůči trimethoprimu byly testované kmeny necitlivé a MIC sulfamethoxazolu a kotrimoxazolu se nelišily. Rovněž konstatovali, že navzdory jeho účinnosti je nutné najít účinnější a lipofilnější sulfonamidy s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi. Článků týkajících se antimykobakteriální aktivity sulfonamidových léčiv, které svědčily ve prospěch jejich aktivity, však byla v této době publikována celá řada, některé jsou citovány rovněž v naší práci.<sup>119</sup> Review z roku 2016<sup>120</sup> připouští repurposing kotrimoxazolu k léčbě lékově rezistentních forem tuberkulózy vzhledem k jeho *in vitro* i *in vivo* aktivitě.

Naše první práce v této oblasti vyšla v r. 2012<sup>119</sup> a byla „propojením“ problematiky salicylanilidů a sulfonamidů. Rozhodli jsme se zkombinovat dva farmakofory antimikrobní aktivity – deriváty salicylové kyseliny a sulfonamidy (sulfamethoxazol, sulfathiazol, sulfadiazin, sulfamethazin; Obr. 22). Prvním způsobem, jak uvedené molekuly spojit, byl karboxamidový můstek vznikající z karboxylu salicylové kyseliny a aminoskupiny

sulfonamidu (tj. vznikl salicylanilid se sulfamoylovým substituentem v poloze 4 anilidového jádra), druhým pak iminová vazba pocházející z reakce aminoskupiny se salicylaldehydem (Obr. 23). Kromě jiného jsme chtěli porovnat vliv těchto můstků na biologickou aktivitu, stejně jako samotnou substituci 4-aminoskupiny benzensulfonamidů, která je považována za nezbytnou pro jejich antimikrobní aktivitu.<sup>1</sup> Substituce 5-chlorsalicylidenem byla zvolena podle předcházejících zkušeností s jejich Schiffovými bázemi.<sup>121</sup>



Obrázek 22. Struktury použitých sulfonamidů



Obrázek 23. Schiffovy báze a amidy získané ze sulfonamidů

Testování ukázalo, že proti *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv byl nejúčinnější samotný sulfamethoxazol (32  $\mu$ M), MIC všech nových derivátů byly vyšší, a to v rozsahu 32-500  $\mu$ M, zkoušené modifikace tedy nepřinesly zvýšení účinnosti. U *M. avium* rovněž studovaná modifikace (bez ohledu na její typ) nemá výrazný vliv na aktivitu. V případě méně aktivních sulfonamidů (sulfadiazin, sulfamethazin) je výhodnější strategií tvorba amidů, u účinnějších (sulfathiazol, sulfamethoxazol) naopak Schiffových bází, stejně tomu je i u antibakteriální aktivity. Nejcitlivějším druhem bylo *M. kansasii* (MIC od 1  $\mu$ M). Zde se překvapivě ukázalo, že přítomnost 2-OH skupiny na benzenovém jádře není podmínkou *sine qua non*. Nejlepší antimykobakteriální sloučeninou byl souhrnně 4-(5-chlor-2-hydroxybenzylidenamino)-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid, tj. Schiffova báze sulfathiazolu a 5-chlorsalicylaldehydu (MIC 2  $\mu$ M), dobře účinná i proti stafylokokům (31,25  $\mu$ M).<sup>119</sup>

Ačkoli sulfonamidy byly a jsou používány jako antimikrobní léčiva, ukázaly se neúčinné vůči čtyřem gramnegativním kmenům, navíc aktivity proti dvěma grampozitivním

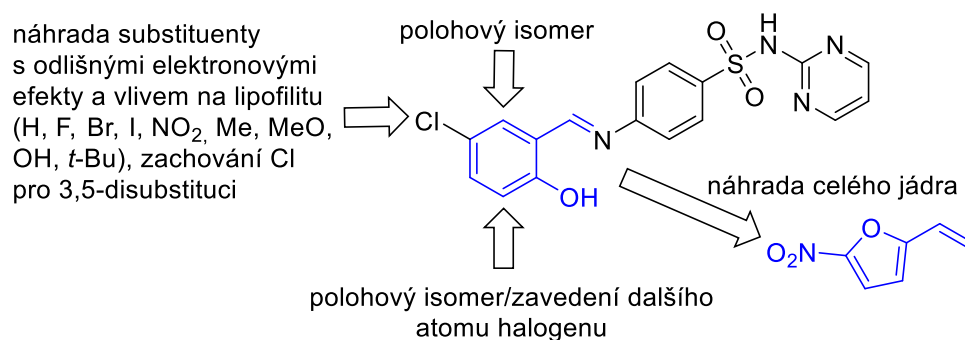
kmenům (MRSA i MSSA) byly v případě sulfadiazinu a sulfamethazinu nízké ( $\geq 500 \mu\text{M}$ ), u sulfamethoxazolu a především pak sulfathiazolu zřetelně lepší ( $31,25\text{-}500 \mu\text{M}$ ). Otázkou zůstává, zda je tento fenomén kompletní rezistence především u gramnegativních bakterií rezistencí primární, nebo získanou. Připravené deriváty byly v převážné většině případů účinnější proti stafylokokům než samotné sulfonamidy s MIC od  $15,62 \mu\text{M}$ , přičemž nejlepší aktivity dosáhl 5-chlorsalicylamid sulfamethazinu, který navíc oproti ostatním signifikantně inhiboval *S. epidermidis* a enterokoky. U amidové řady byla oproti Schiffovým bázím pro nízké hodnoty MIC nezbytná OH skupina. MIC pro gramnegativní bakterie se také snížily, i když jenom velmi mírně. Jednoznačným pozitivem je neexistence zkřížené rezistence s methicilinem, účinnost byla prakticky identická vůči MRSA i MSSA.<sup>119</sup> Ostatně kotrimoxazol je doporučován k léčbě MRSA infekcí.<sup>122</sup> Snížení hodnot MIC v porovnání s výchozími sulfonamidy (až  $32\times$ ) a rozšíření spektra účinku patří ke kladům námi připravených sloučenin. Antifungální vlastnosti byly zanedbatelné (MIC jen některých od  $62,5 \mu\text{M}$ ).<sup>119</sup>

Nejaktivnější produkty a výchozí sulfonamidy byly hodnoceny na cytotoxicitu (HepG2). Nově připravené deriváty mají  $\text{IC}_{50}$  ve stovkách  $\mu\text{M}$ , což je sice ve srovnání se sulfonamidy horší, ale přesto jsou hodnoty SI (až  $156,5$ ) jak pro *M. kansasii*, tak *S. aureus* včetně MRSA akceptovatelné. Jejich mírná toxicita je způsobena halogenovaným salicylovým fragmentem,<sup>119</sup> je však podstatně nižší než v případě samotných salicylanilidů.<sup>56</sup> Výstupem studie<sup>119</sup> oproti záměru nejsou antimykobakteriální sloučeniny efektivnější než výchozí sulfonamidy, ale molekuly vysoce účinné proti MRSA, což může být terapeuticky využitelné.

Práce<sup>119</sup> obrátila naši pozornost od amidů k Schiffovým bázím. Schiffovy báze, zpravidla snadno synteticky dostupné celou řadou metod, jsou považovány za všestranný farmakofor mj. pro antibakteriální, antituberkulotickou, antifungální, protivirovou a antiparazitární aktivitu, proto patří k hojně využívaným strukturním fragmentům v designu potenciálních léčiv.<sup>123,124,125</sup> Mohou být samy o sobě nositelem aktivity vázané na přítomnosti iminové vazby, ale také slouží k modifikaci známých bioaktivních molekul. I mezi sulfonamidovými deriváty byly dříve popsány antimikrobní Schiffovy báze, např.<sup>126,127</sup>

Vzhledem k účinnosti 4-[(5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzensulfonamidu,<sup>119</sup> jsme se v navazující práci<sup>128</sup> věnovali syntéze a biologické aktivitě Schiffových bází sulfadiazinu s řadou monosubstituovaných (zejména v poloze 5) a 3,5-disubstituovaných salicylaldehydů a 5-nitrofurán-2-karbaldehydem (jejich design a přehled

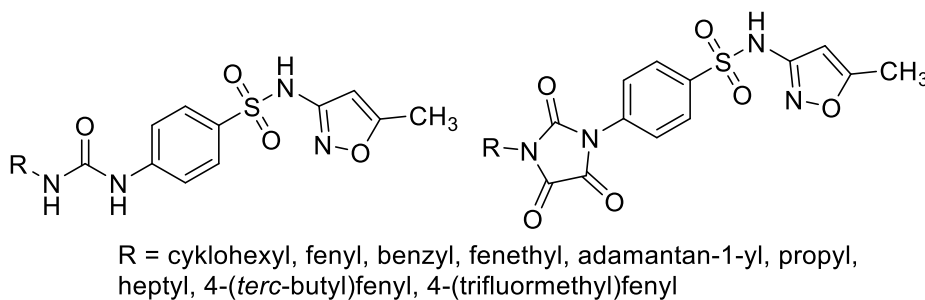
viz Obr. 24). Poloha 5 byla zvolena jako nejvýhodnější pro antimykobakteriální aktivitu. Podobně jako v předchozí studii<sup>119</sup> bylo využito spojení dvou antimikrobiálních „scaffoldů“, sulfonamidu a salicylidenu, v jedné molekule. MIC pro *Mtb.* H<sub>37</sub>Rv a *M. kansasii* se pohybovaly v rozmezí 8-250 μM (*M. avium* bylo odolnější), přičemž z pohledu SI je nejvýhodnější Schiffova báze připravená z nesubstituovaného salicylaldehydu. Tyto sulfonamidové deriváty byly též účinné zejména proti grampozitivním bakteriím včetně MRSA (MIC ≥7,81 μM), ale i některým kvasinkám a vláknitým houbám, dokonce v nižších koncentracích od 1,95 μM. 4-[(2,5-Dihydroxybenzyliden)amino]-*N*-(pyrimidin-2-yl)-benzensulfonamid byl dostatečně selektivní a netoxický (HepG2 buňky). Oproti antimykobakteriální aktivitě je zde, bohužel stejně tak u toxicity, pozitivní korelace účinku s dihalogenací salicylového jádra a molární hmotností přítomných halogenů. Některé ze sloučenin mají vyšší antibakteriální účinek než výchozí sulfadiazin. Cenná je i aktivita na NTM, není však v porovnání se samotným sulfadiazinem výrazně lepší. Identifikovali jsme i další vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou, korelace s lipofilitou nebyla potvrzena. 5-Nitrofuran-2-karbaldehyd se navzdory dříve popsané antimykobakteriální aktivitě jeho derivátů<sup>129</sup> neosvědčil, navíc byl produkt silně cytotoxický.



Obrázek 24. Design nových Schiffových bází sulfadiazinu

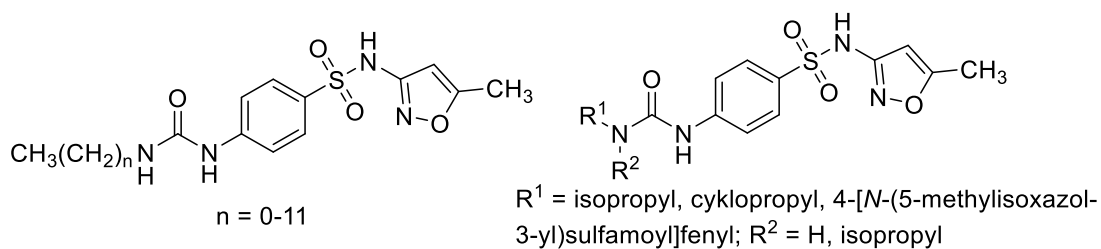
Primární 4-aminoskupinu sulfonamidů jsme dále modifikovali za vzniku 1,3-disubstituovaných močovín.<sup>130,131</sup> Řada autorů publikovala močoviny se signifikantní antituberkulotickou aktivitou,<sup>132,133,134</sup> proto jsme přistoupili ke kombinaci sulfonamidů a močovín v jedné entitě a připravili je z isokyanátů a sulfamethoxazolu, následně je cyklizovali oxalyl chloridem na imidazolidin-2,4,5-triony (Obr. 25). Tyto deriváty vykazaly antimykobakteriální aktivitu, zejména vůči NTM s rozsahem MIC od 4-1000 μM. Nejúčinnější *in vitro* a zároveň zcela netoxickou sloučeninou v sérii byl 4-(3-heptylureido)-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid, jehož indexy selektivity pro *M. kansasii* a *M. avium* byly 62,5-250, resp. 16-31,25. Účinek vůči grampozitivním bakteriím a *Mtb.* byl všeobecně nižší (≥125 μM), gramnegativní bakterie i houby byly prakticky rezistentní.

Ze substituentů močoviny v poloze 3 se kromě *n*-heptylu osvědčily také 4-substituované fenily a fenethyl, cyklizace nevede k jednoznačnému trendu ve změně biologické aktivity. Jistým překvapením byla nízká antimykobakteriální účinnost močoviny substituované adamantylem,<sup>130</sup> což je známý a hojně využívaný farmakofor pro antituberkulotickou aktivitu,<sup>135,136</sup> mj. díky jeho vlivu na lipofilitu a prostorové uspořádání. Připravené močoviny a imidazolidiny sice nepřekonalily aktivitou a/nebo selektivitou výchozí sulfamethoxazol, avšak uvedenou heptylmočovinu lze považovat za selektivní a netoxické agens proti atypickým mykobakteriím.<sup>130</sup>

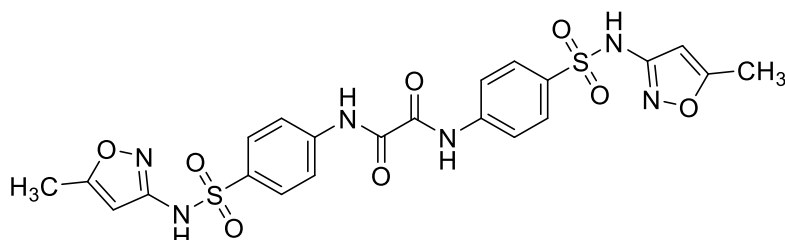


Obrázek 25. Močoviny a imidazolidin-2,4,5-triony odvozené od sulfamethoxazolu

Povzbuzeni heptylem jsme připravili celou sérii homologních sulfamethoxazolových *n*-alkylmočovín ( $C_1$ - $C_{12}$ ) a dalších příbuzných močovín (cyklopropyl-, 3,3-diisopropyl-, 4-[*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)sulfamoyl]fenyl-močoviny, Obr. 26) a oxalamid (Obr. 27) jako potenciálních chemoterapeutik zejména proti atypickým mykobakteriím, primárně abychom zjistili vliv délky alkylového řetězce na aktivitu.<sup>131</sup> Močoviny byly připraveny z isokyanátů, některých připravených *in situ* z aminů pomocí trifosgenu, nebo s využitím dalších činidel. Nejvyšší antimykobakteriální aktivita byla zjištěna u 4,4'-[karbonylbis(azandiyl)]bis[*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamidu] (Obr. 27) s hodnotami MIC 2-62,5  $\mu$ M, mezi *n*-alkyly se ukázal nejvýhodnější methyl. Delší alkyly vedou k vyšším MIC (s výjimkou heptylu v případě NTM) a kvůli vystupňované lipofilitě i problémům s rozpustností, naopak velmi dobře účinné byly cyklopropylmočovina a oxalamid.<sup>131</sup> Cyklopropylový fragment se vyskytuje v molekule řady antimykobakteriálně účinných fluorochinolonů, ale i jednoho subtypu mykolových kyselin vyskytujících se v buněčné stěně mykobakterií. Význam cyklopropylové substituce pro vývoj léčiv je popsán v přehledovém článku.<sup>137</sup> Řada derivátů byla účinnější než parentní léčivo a také výhodnější než molekuly popsané v naší výchozí práci,<sup>130</sup> plusem je navíc i *in vitro* aktivita proti *Mtb.* (2-4  $\mu$ M u nejlepších sloučenin).



Obrázek 26. 3-Alkylmočoviny a příbuzné močoviny odvozené od sulfamethoxazolu



Obrázek 27. 4,4'-[Karbonylbis(azandiyl)]bis[N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzonsulfonamid]

Kromě výše uvedených derivátů jsme připravili jako potenciální antimikrobní sloučeniny také amidy heterocyklických kyselin a *n*-alkyl, cykloalkyl, aryl a arylalkyl močoviny odvozené od sulfathiazolu, některé jsou součástí diplomové práce.<sup>138</sup> V současné době je připravována publikace reportující antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální a cytotoxickou (HepG2, erythrocyty) aktivitu dalších Schiffových bází salicylaldehydů a sulfamethoxazolu, sulfadiazinu, sulfathiazolu a sulfamethazinu. Některé z nich vykazují slibnou biologickou aktivitu (MIC v řádu jednotek  $\mu\text{M}$ ), a především selektivní účinek vůči mikroorganismům, což je obzvlášť důležité v době narůstající rezistence. Efektivně inhibují také klinické izoláty multirezistentních stafylokoků včetně kotrimoxazol-rezistentních kmenů, v. s. tedy působí jiným mechanismem účinku než samotné sulfonamidy, resp. jejich kombinace s trimethoprimem.

Porovnáním výše studovaných skupin sulfonamidových derivátů lze konstatovat, že močoviny účinkují převážně antimykobakteriálně s nízkou aktivitou vůči jiným bakteriím a houbám, naopak Schiffovy báze a amidy mají širší spektrum účinku zahrnující grampozitivní bakterie včetně MRSA a (i když méně často) také některé kvasinky a vláknité houby. Tyto sloučeniny připravené substitucí 4-aminoskupiny mají sice vyšší cytotoxicitu než prakticky netoxické výchozí sulfonamidy, nicméně i přesto řada z nich vykazuje dostatečné indexy selektivity proti různým patogenům. Podařilo se připravit i četné sloučeniny mající širší spektrum účinku a nižší hodnoty MIC než výchozí léčiva, a které jsou blízké hodnotám MIC isoniazidu (vůči *Mtb.*) nebo jeho aktivitu mnohanásobně překračují (NTM) a lze zdůraznit, že nemají zkříženou rezistenci.

Tato část práce přispěla ke konstatování, že „klasické“ sulfonamidy a jejich deriváty se substituovanou primární aminoskupinou zdaleka nejsou „mrtvé“ a mají v designu léčiv a ve farmaceutické chemii jako funkční koncept co nabídnout, zejména v oblasti antimykobakteriálních a anti-MRSA molekul. V rámci další práce bychom se chtěli zaměřit na přípravu dalších analog, kde by se ještě lépe podařilo separovat cytotoxicitu vůči savcím buňkám od antimikrobní aktivity. V úvahu připadá také spojení sulfonamidů s jiným antimikrobním fragmentem a také konjugace s peptidovými nosiči na bázi tuftsinu. Potřebná bude identifikace mechanismu účinku nejúčinnějších derivátů, který námi nebyl zatím studován. Závěrem lze říci, že účinnost vybraných testovaných sloučenin na kotrimoxazol-resistentní stafylokoky dává velký příslib pro nalezení odlišného mechanismu účinku oproti výchozím sulfonamidům.

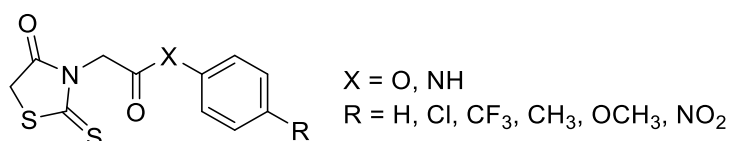
### 3.4. Potenciální antimikrobní sloučeniny různých struktur

Tato kapitola shrnuje připravené deriváty navzájem nepříbuzných struktur. Primárně byly designovány jako potenciální antimikrobní léčiva, nicméně u některých byla objevena významná inhibice cholinesteras, která je vyšší než standard rivastigmin a zajímavější než účinnost vůči patogenům.<sup>139,140</sup> Patří sem také přehledové články shrnující biologickou aktivitu různých skupin sloučenin, resp. působících na určitou biochemickou dráhu.

Mezi „privileged scaffolds“ ve farmaceutické chemii náleží mj. rhodaniny (2-thioxothiazolidin-4-ony), které vykazaly celou řadu biologicky zajímavých účinků, např. antibakteriální, antifungální, antiprotozoální, protivirové, protizánětlivé, protinádorové, jsou teoreticky využitelné i v léčbě Alzheimerovy choroby či komplikací diabetu, také byla popsána řada jimi inhibovaných enzymů.<sup>139,141,142,143</sup> Rhodaniny nabízí pro substituci dvě místa v molekule – C-5 a vodík situovaný na N-3. Deriváty s arylmethylidenovou substitucí uhlíku 5 mohou jakožto Michaelovy akceptory reagovat a interferovat nespecificky s celou řadou molekulárních a buněčných nukleofilů včetně glutathionu. Rhodaniny proto bývají označovány jako „pan assay interference compounds“,<sup>144</sup> nicméně podle nedávného review<sup>145</sup> se nejedná o striktní pravidlo a musí vždy být ověřeno experimentálně, navíc by takovéto „multitarget“ chování mohlo být v jistém ohledu výhodné.

Připravili jsme nejprve různými metodami sérii anilidů a aromatických esterů kyseliny rhodanin-3-octové (2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)octová kyselina). Tyto amidy a estery (Obr. 28) byly prvotně publikovány jako potenciální inhibitory cholinesteras. Hodnoty IC<sub>50</sub> pro AChE byly v rozmezí 24,05-86,85 μM, kdežto pro BChE měly širší

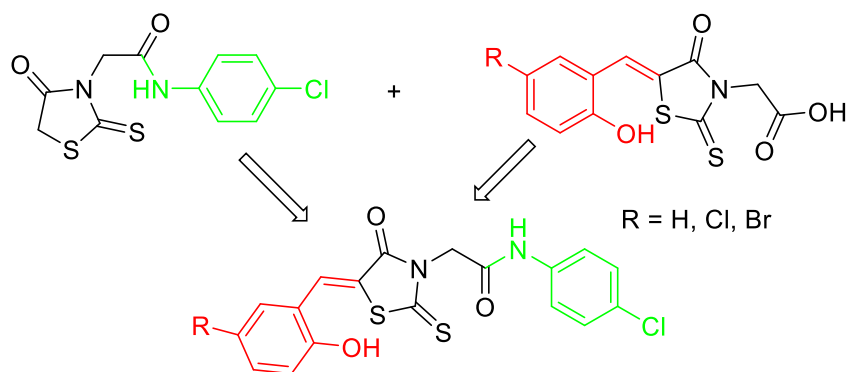
rozmezí 7,92-227,19  $\mu\text{M}$ , přičemž deriváty jsou obecně lepší než výchozí kyselina, zejména pokud obsahují 4-nitrofenylový fragment. V případě AChE dosáhly lepších výsledků estery. Některé rhodaniny měly nižší hodnoty  $\text{IC}_{50}$  než léčivo rivastigmin užívané v terapii některých demencí, další byly srovnatelné. V této studii jsme jako první prokázali, že rhodaniny mohou působit jako inhibitory BChE. Připravené sloučeniny mají navíc vhodné fyzikálněchemické parametry pro překonání hematoencefalické bariéry, a tudíž účinek v CNS, a splňují podmínky „drug-likeness“. Záměrně jsme se zde vyhnuli substituci uhlíku 5 rhodaninového jádra, neboť několik dříve známých AChE inhibitorů na bázi rhodaninů mělo vždy tento strukturní motiv.<sup>139</sup>



Obrázek 28. Estery a amidy rhodanin-3-octové kyseliny

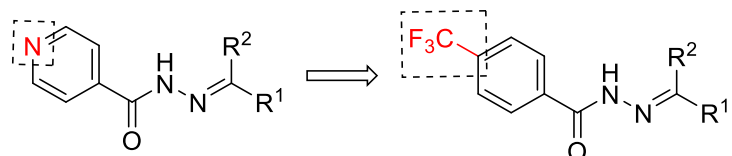
Připravené amidy a estery byly hodnoceny také na antimikrobní aktivitu vůči obvyklému panelu bakterií a hub. Paralelně jsme na základě dobrých zkušeností se salicylidenovým strukturním motivem<sup>119</sup> připravili kondenzací 5-(hydroxybenzyliden)-rhodanin-3-octové kyseliny a stanovili jejich biologickou aktivitu. Na základě výsledků bylo provedeno spojení nejúčinnějších zástupců amidů/esterů a 5-substituovaných rhodaninů do jedné molekulární entity (Obr. 29). Celkem bylo hodnoceno 24 sloučenin, všechny splňují Lipinského pravidlo pěti. Jako nejvýhodnější vůči *Mtb.* se ukázal (*Z*)-*N*-(4-chlorfenyl)-2-[5-(2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]acetamid (Obr. 29,  $\text{R} = \text{H}$ ) s MIC 8-16  $\mu\text{M}$ . Koncept spojení dvou fragmentů se osvědčil pouze u tohoto kmene. Proti NTM byly totiž neaktivnější 2-[5-(2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]octové kyseliny (tj. s nesubstituovaným karboxylem) a u grampozitivních kmenů včetně MRSA dosáhl nejnižších MIC ester s volným C-5: 4-(trifluormethyl)fenyl-2-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)acetát (MIC  $\geq 15,62$   $\mu\text{M}$ ), následován (*Z*)-2-[5-(2-hydroxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]octovou kyselinou a jejím *O*-acetyl esterem. Aktivita vůči gramnegativním bakteriím a houbám byla nevýznamná. U derivátů salicylaldehydu vede změna polohy OH skupiny či náhrada za pyridinové jádro k neaktivním sloučeninám, halogenace a u mykobakterií i acetylace překvapivě účinnost nezvyšují.<sup>142</sup>



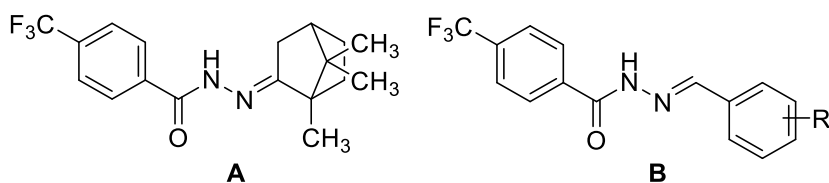


Obrázek 29. Design nových rhodaninových derivátů

Východiska pro studii týkající se hydrazidů-hydrazonů na bázi 4-(trifluormethyl)-benzohydrazidu<sup>146</sup> byla dvě: tento hydrazid lze považovat za isoster INH (Obr. 30), přičemž hydrazony INH mají dobře známou, zejména antimykobakteriální aktivitu (např.<sup>103,147</sup>), a jednak se deriváty salicylidenu, které jsou v této práci také zahrnuty, u antimikrobních látek osvědčily.<sup>119,121,142</sup> K modifikaci hydrazidu byly použity různé aldehydy a alifatické ketony, produkty byly testovány na antimikrobní aktivitu a také z hlediska jejich cytotoxických a cytostatických vlastností (MonoMac6, HepG2, BMMΦ). Žádná ze sloučenin nebyla cytotoxická pro HepG2 buňky. Selektivního účinku vůči *Mtb.* dosáhl derivát kafru (Obr. 31A; MIC = 4 μM, zároveň zcela netoxický v koncentraci 100 μM), zatímco *N'*-4-chlorbenzylidenový hydrazid (Obr. 31B; R = 4-Cl) dosáhl nejnižších MIC u *M. kansasii* (16 μM), působil mírně antifungálně a nijak negativně neovlivňoval HepG2 a MonoMac6. Hydrazon 5-chlorsalicylaldehydu (Obr. 31B, R = 5-Cl-2-OH) se ukázal nejúčinnější vůči čtyřem kmenům grampozitivních bakterií včetně MRSA a enterokoků a také některým kmenům hub (*Candida glabrata*, *Trichophyton mentagrophytes*) s rozsahem MIC ≤0,49-3,9 μM. Také nebyl cytotoxický pro HepG2 a BMMΦ, má ale cytostatické vlastnosti.<sup>146</sup> Takovéto cytostatické chování se současnou absencí cytotoxicity bylo dříve popsáno pro některé salicylanilidové estery.<sup>57</sup> Nejlepší hydrazidy-hydrazony svou aktivitou byly účinnější než INH vůči NTM, analogicky pak překonaly bacitracin u bakterií a flukonazol u hub, ev. s nimi byly srovnatelné. V rámci série jsme ovšem identifikovali i neaktivní sloučeniny (hydrazony získané z benzaldehydu, 2-Cl-benzaldehydu, 4-CH<sub>3</sub>/OCH<sub>3</sub>/CF<sub>3</sub>/Br-benzaldehydu). Pro signifikantní *in vitro* efektivitu je tak nezbytný chlor v poloze 4, OH skupina v poloze 4 nebo 2; halogenace aktivitu zlepšuje a oproti předchozím výsledkům dokonce paradoxně snižuje toxicitu.<sup>146</sup>

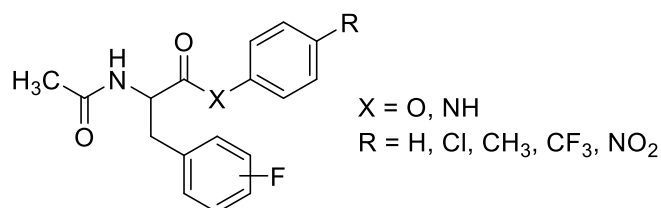


Obrázek 30. Isosterie isoniazidových a 4-CF<sub>3</sub>-benzohydrazidových hydrazonů



Obrázek 31. Nejúčinnější hydrazidy-hydrazony

Další naše publikace se věnuje třiceti jednoduchým a synteticky snadno dostupným aromatickým amidům a esterům tří isomerních fluor-DL-fenylalaninů (Obr. 32).<sup>140</sup> K přípravě nás vedl fakt, že estery salicylanilidů s *N*-acetyl-L-Phe<sup>52</sup> mají výbornou antibakteriální účinnost a literární údaje potvrzují antifungální,<sup>148</sup> antibakteriální<sup>149</sup> včetně antimykobakteriální<sup>150</sup> či cytotoxickou<sup>151</sup> aktivitu derivátů nefyziologických aminokyselin obsahujících fluor. Např. nové proléčivo cytostatika melfalanu, melflufen, je odvozen od 4-fluor-L-fenylalaninu.<sup>152</sup> Lipofilnějšími amidy a estery fluorovaných fenylalaninů jsme zamýšleli zvýšit průnik do buněk pasivní difuzí. Z hlediska antimikrobní aktivity se připravené sloučeniny neosvědčily, nejúčinnější estery měly MIC vůči mykobakteriím, grampozitivním bakteriím a vláknitým houbám 125 μM a vyšší; amidy a výchozí kyseliny byly ještě méně aktivní, resp. zcela neúčinné. Sloučeniny však inhibovaly jak AChE, tak BChE, a to s hodnotami IC<sub>50</sub> 57,88-130,75 μM, resp. 8,25-289,0 μM, některé srovnatelně či lépe než rivastigmin a v případě BChE jsou účinnější než výchozí kyseliny (až 27,5×). Fenyl-2-acetamido-3-(4-fluorfenyl)propanoát byl identifikován jako nejúčinnější a zároveň selektivní inhibitor BChE. Všeobecně platí, že estery jsou lepšími inhibitory BChE než amidy, 4-substituce anilinu skupinami NO<sub>2</sub> i CH<sub>3</sub> a u fenolu 4-CF<sub>3</sub> skupina vedou k lepší aktivitě. Poloha fluoru neměla významný vliv. Deriváty vykazují relativně nízkou cytotoxicitu pro HepG2 buňky (IC<sub>50</sub> 226,5-922,2 μM). Náš původní předpoklad o možném využití jako protinádorových léčiv zatím nebyl potvrzen, hodnocení komplikují problémy s rozpustností v testovacím médiu.<sup>140</sup>



Obrázek 32. Estery a amidy fluor-DL-fenylalaninů

V rámci studia antimykobakteriální aktivity molekul odlišných od zavedených struktur jsme také sepsali několik přehledových prací.<sup>13,93,153</sup>

V práci<sup>153</sup> jsme shrnuli poznatky o antimykobakteriální aktivitě kvarterních pyridiniových solí a pyridin-*N*-oxidů. Ačkoli pyridiniové soli jsou hojně využívané v medicíně, zejména jako desinficientia a antiseptika, jen velmi malá část z nich byla testována vůči mykobakteriím. Nicméně některé klinicky používané molekuly skutečně působí antimykobakteriálně (cetylpyridinium, dechalinium aj.), ačkoli samotná přítomnost nabitého dusíku nezaručuje účinnost, někdy kvarternizace působí dokonce kontraproduktivně. Dlouhý *N*-alkyl potřebný pro dezinfekční účinek naproti tomu není pro anti-TB působení nezbytný, i když zpravidla pozitivně moduluje aktivitu. Většina pyridiniových solí má mírnou aktivitu vůči pomalu i rychle rostoucím mykobakteriím, *N*-oxidace pyridinového dusíku nevede obvykle ke zlepšení MIC. Nehledě na dílčí poznatky, mechanismus účinku většiny sloučenin nebyl systematicky studován a plně vysvětlen, předpokládá se kombinace nespecifických a specifických zásahů do buňky mykobakterií. Pyridiniový fragment se též vyskytuje v řadě cefalosporinů, u kterých byl opakovaně reportován antimykobakteriální účinek (např. ceftazidim a cefsulodin), nicméně se nejedná o výlučný vliv pyridiniové soli a toto působení je vlastní i cefalosporinům, které jej neobsahují.<sup>153</sup>

Nadějnější výsledky byly referovány u sloučenin obsahujících sirné heterocykly thiofen a thiadiazoly, zejména 1,3,4-thiadiazol.<sup>13</sup> Sirné heterocykly lze obecně považovat za výhodné pro antimykobakteriální aktivitu, mohou fungovat jako isostery (thiofen benzenového jádra, thiadiazol oxadiazolů či pyrimidinu) a jsou nedílnou součástí výzkumu orientovaného jak na screening aktivity na celých buňkách, tak enzymového cílení. Některé sloučeniny dosahují submikromolárních hodnot MIC a také se podařilo identifikovat jejich buněčné cíle (InhA a jiné enzymy podílející se na biosyntéze buněčné stěny jako Pks13, DprE1 či MmpL3, dále karboanhydrasy, ATP synthasy či syntéza mykobaktinu), takže lze jednoznačně hovořit o potenciálních „leads“, některé efektivně potlačují i nereplikující se mykobakterie. Sirné heterocykly se v designu léčiv využívají jednak jako jeden z řady substituentů modifikujících základní účinnou strukturu v rámci studia SAR, ale také jsou známy sloučeniny, kde je aktivita vázána výhradně na jejich přítomnost. Výhodná je i molekulární hybridizace s jiným antimykobakteriálním derivátem, hojně se připravují hydrazony a Schiffovy báze. Opět však platí, že ne každá molekula obsahující thiofen či thiadiazol musí být automaticky účinným antituberkulotikem.<sup>13</sup>

Třetí review<sup>93</sup> není zaměřeno na chemicky definovanou skupinu sloučenin, ale jeho jednotící linií je přehled potenciálních inhibitorů chorismátů využívajících enzymů, tj. skupiny šesti enzymů podílejících se na metabolismu chorismátu na esenciální produkty (chorismát mutasa, anthranilát synthasa, chorismát pyruvát-lyasa, isochorismát synthasa, 4-amino-4-deoxychorismát synthasa a salicylát synthasa), např. aromatické aminokyseliny, foláty či siderofory. Tyto enzymy vykazují strukturní homologii a podobný mechanismus katalýzy, jeden inhibitor tedy může zasáhnout více enzymů (multitargeting).<sup>93</sup> Další výhodou, podobně jako v případě ICL,<sup>92</sup> je absence těchto enzymů u člověka, u bakterií jsou naopak nezbytné pro přežití i virulenci. Prvotně popsané inhibitory byly strukturně podobné substrátu, resp. jeho transitnímu stavu během katalýzy, kde byl studován zejména mechanismus účinku, kinetika inhibice a účinnost ve smyslu hodnot  $K_i$ . Později se objevily i sloučeniny bez strukturní podobnosti substrátu, které byly spíše ojediněle hodnoceny proti *Mtb.*, navíc většina publikovaných hodnot MIC nebyla excelentní – a to navzdory vysoké *in vitro* inhibiční účinnosti proti izolovaným enzymům. Velké množství testovaných derivátů je navíc hydrofilní, což komplikuje jejich potenciální aplikaci zejména ve smyslu omezeného průniku do mykobakteriální buňky.<sup>93</sup>

V rámci tří uvedených rešerší jsme shrnuli antituberkulotickou, antimykobakteriální aktivitu pyridiniových solí a pyridin-*N*-oxidů, vybraných sirných heterocyklů a inhibitorů chorismátů využívajících enzymů. První skupina sloučenin sice zahrnuje zástupce s antimykobakteriální aktivitou, ale výsledky nejsou příliš robustní ani predikovatelné, navíc většina z nich je založena pouze na fenotypickém screeningu aktivity, který, jakkoli cenný, je pouze iniciálním krokem k dalšímu vývoji. Největší potenciál v naší další práci mají konjugáty pyridiniového fragmentu a vhodné lipofilní molekuly, nejlépe s vlastní antimykobakteriální aktivitou, spojené pomocí delšího lipofilního linkeru. Mezi thiofeny a thiadiazoly jsme našli řadu derivátů se zajímavou biologickou aktivitou, jejichž některé strukturální fragmenty jsou vhodné jako součást systematických obměn námi dříve a nyní připravovaných sloučenin. Review týkající se inhibitorů biosyntetických drah vycházejících z chorismátu, vznikajícího z šikimátu, se zabývá převážně inhibitory zajímavými především z biochemického pohledu, farmaceuticko-chemické aspekty byly v době publikace práce (2015) spíše v plenkách, nemnohé inhibitory účinné i při fenotypickém screeningu měly poměrně vysoké hodnoty MIC, navíc není zcela jisté, zda působí výlučně tímto mechanismem.

Z hlediska derivátů rhodaninu, hydrazonů 4-(trifluormethyl)benzohydrazidu a fluorovaných fenylalaninů jsou cenné zejména první dvě skupiny, kdežto estery a amidy

nefyziologických aminokyselin zaostaly v antimikrobní aktivitě a cytotoxicitě za očekáváním. U derivátů rhodanin-3-octové kyseliny je přínosem zjištění, že obměnou substituentů na karboxylu i C-5 můžeme modulovat jejich vlastnosti směrem k vystupňované inhibici jednotlivých cholinesteras, antituberkulotické aktivitě či inhibici grampozitivních kmenů. Předmětem další studie by mohl být můstek spojující heterocyklický dusík s karboxylem či kombinace rhodaninového jádra s jinými antimykobakteriálními „scaffoldy“. Také u hydrazidů-hydrazonů lze pomocí odlišných substituentů připravit sloučeniny se selektivní anti-TB aktivitou, se zvýšenou účinností vůči NTM nebo aktivní vůči grampozitivním bakteriím a některým houbám. I zde byla zjištěna výborná účinnost *in vitro* vůči stafylokokům včetně MRSA kmene, která se nijak neliší od MSSA. Na základě práce<sup>146</sup> byla připravena rozsáhlá série hydrazidů-hydrazonů modifikovaných jak v části benzohydrazidu (různé substituenty, polohové isomery aj.), tak lišících se použitým aldehydem/ketonem. Ačkoli nejsou výsledky biologického hodnocení stále kompletní, podařilo se připravit sloučeniny s vylepšeným antituberkulotickým působením, aktivitou vůči MRSA a dalším grampozitivním rezistentním kmenům (u nich se zkoumá na spolupracujících pracovištích mechanismus účinku), některé deriváty mají i slibné cytotoxické účinky. Část těchto výsledků se stala součástí diplomové práce.<sup>154</sup>

Do této skupiny náleží i Schiffovy báze aminobenzoových kyselin, zatím zpracované jako jedna bakalářská<sup>155</sup> a rigorózní práce,<sup>156</sup> opět s nadějnou aktivitou vůči grampozitivním bakteriím, některým houbám a v případě derivátů PAS i mykobakteriím. Močoviny odvozené od PAS a jejího methylesteru jsou součástí disertační práce,<sup>51</sup> některé z nich aktivitou značně překonaly výchozí léčivo, značná část z nich si zachovává jeho netoxicitu.

## 4. Peptidové nosiče pro antimykobakteriální léčiva na bázi tuftsinu

### 4.1. Drug delivery systémy ve vývoji antituberkulotik

V současné době směřuje velké úsilí při vývoji antimykobakteriálních léčiv k identifikaci nových „drug candidates“, především malých molekul, nejlépe s inovativním mechanismem účinku. Ačkoli byla identifikována řada slibných targetů v buňce mykobakterií a mnohé z připravených malých molekul mají nízké hodnoty MIC, jedním z hlavních problémů nově vyvinutých sloučenin je jejich nedostatečná rozpustnost ve vodě, biodostupnost a/nebo prostupnost buněčnými membránami.<sup>157</sup>

Tyto, ale i jiné nevýhody, např. toxicitu, imunogenicitu, problémy spojené s podáváním léčiva pacientům aj., mohou být překonány pomocí metod farmaceutické technologie včetně použití nosičů, tzv. „drug delivery systems“. Lze je s výhodou využít i pro cílený transport („targeted delivery“), a to jak v rámci organismu, tak v rámci buněk a míst zásahu antimikrobních látek. DDSs umožňují kontrolovat nejen místo uvolňování léčiva, resp. bioaktivní molekuly, ale i jeho míru.<sup>158,159,160</sup>

Drug delivery systémy hrají významnou roli i ve výzkumu orientovaném na efektivnější léčbu TB a dalších mykobakterióz. Mohou přispět k dosažení dílčích cílů globální kontroly tuberkulózy tak, jak je definovali Koul *et al.*,<sup>161</sup> tj. zkrácení doby léčby, zjednodušení léčby snížením frekvence, počtu i dávky podávaných léčiv a možnost současného podávání antiretrovirální léčby při koinfekci s HIV. DDSs proto byly a jsou studovány jako jeden z klíčových pilířů<sup>162</sup> vývoje vedle „klasické“ farmaceutické chemie (tj. přípravy nových antimykobakteriálních molekul) a repurposingu známých léčiv. Recentní přehledy<sup>162,163</sup> uvádí mezi takovéto nejvýznamnější skupiny DDSs liposomy, niosomy, tekuté krystaly, pevné lipidové nanočástice, micely, dendrimery, nanoemulze, nanosuspenze, mikročástice, komplexy s cykloextriny, nanočástice na bázi SiO<sub>2</sub> a také polymerní nanočástice. V současnosti jsou hojně studovány polymery na bázi kyseliny mléčné a glykolové a zejména jejich kopolymery (PLGA). Z antituberkulotik byly takovéto polymerní částice připraveny a úspěšně ověřeny u INH, RIF, PZA, EMB, aminoglykosidů či fluorochinolonů.<sup>162,163,164,165</sup>

Specifickým cílem při léčbě TB je zasažení intracelulární populace mykobakterií; ty jsou převážně nitrobuněčnými patogeny. Značná část lidstva je nakažena bezpříznakovou latentní formou tuberkulózy, kdy bakterie přežívají, perzistují po mnoho let „ukryty“

ve fagocytech (monocyty, makrofágy) hostitele. Osoby infikované latentní TB mají celoživotní riziko 10 %, že nemoc přejde do otevřené, aktivní formy. Při aktivní tuberkulóze plic mykobakterie mj. vstupují do alveolárních makrofágů, kde intracelulárně přežívají, do značné míry chráněny před imunitním systémem, a replikují se v endosomech.<sup>44,166</sup> Pro kompletní vyléčení je nezbytná inhibice intracelulárních mykobakterií či jejich úplná eliminace z infikovaných makrofágů.<sup>167</sup> Proto je výhodné dosáhnout vysoké koncentrace léčiva přímo v makrofázích. K tomuto cílení do makrofágů lze principálně využít receptory pro manosu<sup>168</sup> či nosiče na bázi tuftsínu, které mají také specifické receptory. Odhaduje se, že na povrchu fagocytů je exprimováno na 70 000 vazebných míst pro tuftsín. Vazba ligandu na takovýto receptor vede k internalizaci komplexu léčivo-nosič (endocytóze), což následně vede k podpoře intracelulární eliminace patogenu.<sup>44</sup>

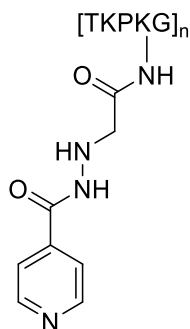
## 4.2. Nosiče na bázi tuftsínu

Tuftsín je přirozeně se vyskytující tetrapeptid (lidský TKPR, L-threonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-arginin) známý od 70. let 20. století. V organismech je produkován pomocí dvou enzymů, leukokininasy a tuftsín-endokarboxypeptidasy, které odštěpují tuto tetrapeptidovou sekvenci z Fc domény těžkého řetězce imunoglobulinu G (aminokyseliny 289-292). Vzniklý peptid následně aktivuje některé složky imunitního systému včetně makrofágů a granulocytů, stimuluje fagocytózu, migraci imunitních buněk, má chemotaktický účinek na monocyty.<sup>44,169,170</sup>

Mező *et al.*<sup>169</sup> připravili pilotní řadu oligopeptidů na bázi tuftsínu. Podobně jako předlohová molekula jsou i tyto deriváty biodegradabilní, netoxické, neindukují tvorbu protilátek, velmi dobře se rozpouští ve vodném prostředí, mají polyvalentní imunostimulační efekt. Při jejich designu posloužil jako základ psí tuftsín (TKPK), lišící se pouze v C-terminální bazické aminokyselině (arginin→lysin), což ale nemá podstatný vliv na biologické chování. Zavedení druhého lysinu do molekuly nabídlo další aminoskupinu v postranním řetězci ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) vhodnou pro chemické modifikace (připojení fluorescenční značky, další molekuly léčiva, zbytku mastné kyseliny aj.). C-Konec byl navíc modifikován připojením glycinu, aby se předešlo možné racemizaci při kondenzaci více fragmentů za vzniku větších oligomerů. Tento derivát tuftsínu (TKPKG) si zachoval vlastnosti předlohového peptidu, v některých ohledech byl dokonce výhodnější. Oproti již dříve popsanému monomernímu TKPKG,<sup>171</sup> byly v práci<sup>169</sup> popsány navíc oligomery o struktuře [TKPKG]<sub>n</sub>, kde n = 2, 4, 6 a 8.

K problematice peptidových nosičů pro antimykobakteriální léčiva se autor práce dostal během stáží na Maďarské akademii věd (MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry), kde se nosičům na bázi tuftsinu a jeho analog systematicky věnují nejméně od roku 2004.<sup>44,165,169,172,173,174,175,176</sup> Kromě antituberkulotik jsou zde studovány i jako nosiče pro cytostatika.<sup>177</sup>

V r. 2009 Horváti *et al.*<sup>172</sup> konjugovali INH s tuftsinovými deriváty (Obr. 33, n = 1, 4). Průlomová práce nastartovala intenzivní spolupráci týkající se konjugátů tuftsinových analog s našimi antituberkulotiky, která vedla k řadě experimentů, stáží a publikačních výstupů.<sup>44,165,173,174</sup> Ukázalo se, že tyto konjugáty mají obdobnou antimykobakteriální aktivitu jako výchozí léčivo (po přepočtení na jeho obsah v molekule), přičemž samotné peptidové nosiče (TKPKG, [TKPKG]<sub>4</sub>) byly neúčinné. Měření hydrolytické stability konjugátů ukázalo, že zůstávají při pH 6,5 stabilní po dobu 6 hodin (>90 %), teprve potom dochází k uvolňování parentního INH. Studované konjugáty s nosiči tak slouží jako proléčiva, která by měla cíleně proniknout do makrofágů a tam uvolnit samotnou molekulu působící baktericidně vůči intracelulárním mykobakteriím. Benefitem by měly také být imunostimulační účinek, snížení vedlejších účinků a dávek.<sup>172</sup>

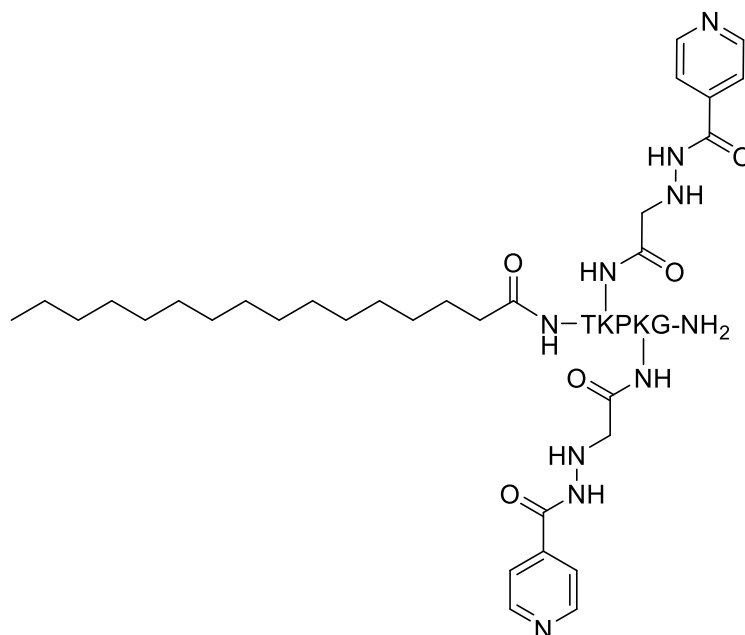


Obrázek 33. Konjugáty INH s tuftsinovými nosiči

Strukturu a vlastnosti tuftsinových nosičů je možné modulovat nejen počtem opakování sekvence, ale i navázáním substituentů buď na N-konec, nebo na postranní aminoskupiny lysinu. První popsanou modifikací bylo navázání palmitové kyseliny na N-konec sekvence TKPKG nesoucí dvě molekuly isoniazidu (lipopeptid; Obr. 34)<sup>165,178</sup> za účelem zvýšení lipofility a membránové afinity. Také tento derivát vykazoval antimykobakteriální aktivitu (*Mtb.* H<sub>37</sub>Rv) srovnatelnou s výchozím INH, navíc byl signifikantně účinnější proti intracelulárně rostoucím mykobakteriím (infikované MonoMac6), kde byl samotný INH inaktivní. Konjugát navíc postrádal toxicitu *in vitro* (PBMC) i hemolytické vlastnosti a po enkapsulaci do PLGA nanočástic za účelem dalšího

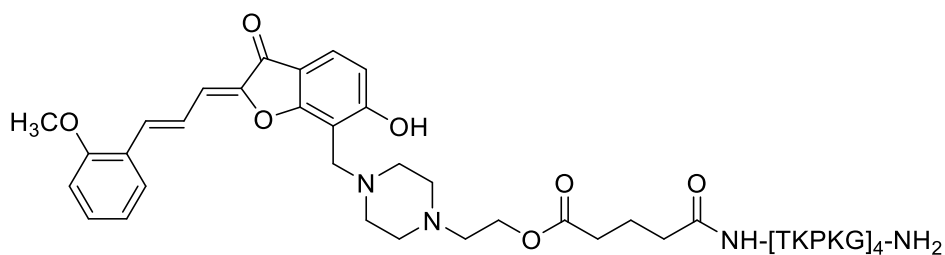


zvýšení bioavailability se ukázal být perorálně účinným *in vivo* v morčecím modelu TB, rovněž bez jakýchkoli známek toxicity.



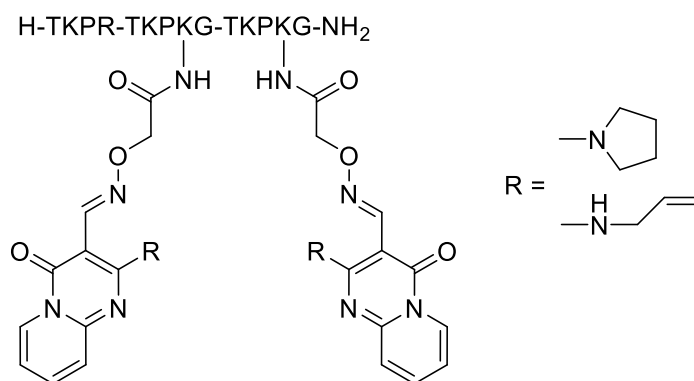
Obrázek 34. Konjugát INH s palmitoylovaným monotuftsinovým nosičem

Efektivita tuftsinových nosičů byla ověřena pro známá léčiva, ale i pro sloučeniny v preklinickém vývoji.<sup>173,174,175,176</sup> Tetraoligotuftsinový nosič byl použit pro *in silico* identifikované inhibitory mykobakteriální dUTPasy. Inhibitor byl připojen na N-konec pomocí můstku tvořeného kyselinou glutarovou, přičemž jedna vazba byla esterová (napojení malé molekuly), druhá amidová s NH<sub>2</sub> skupinou threoninu. Antimykobakteriální aktivita konjugátu byla oproti výchozí molekule přibližně poloviční (MIC 46, resp. 73 μM), na základě čehož autoři konstatují, že navázání na nosič podstatně neovlivňuje antimykobakteriální účinnost. Připravený konjugát (Obr. 35) byl pouze mírně toxický (IC<sub>50</sub> = 201 μM, výchozí derivát piperazinu i peptid >300 μM). Průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie demonstrovaly, že studovaný konjugát byl vychytáván lidskými monocyty (MonoMac6) v desetkrát větší míře než samotná malá molekula. Ukázal se také být intracelulárně účinný (baktericidní aktivita vůči *Mtb.*), přičemž obě složky konjugátu samy o sobě byly inaktivní.<sup>173</sup>

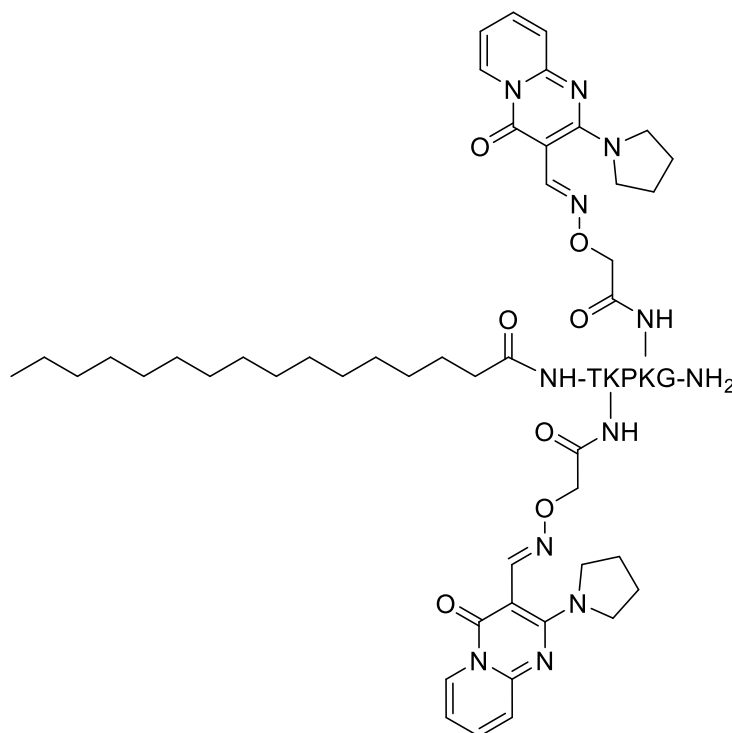


Obrázek 35. Konjugát tetraoligotuftsinu s derivátem piperazinu

Pro inhibitory dUTPasy byl využit také heterotrimerní nosič založený jak na lidském, tak psím tuftsinu: TKPR[TKPKG]<sub>2</sub> (Obr. 36). I zde vedla vazba malé molekuly (pyridopyrimidinů) na nosič oximovým můstkem na dvě nejlépe přístupné postranní aminoskupiny (Lys8 a Lys13) k nižší aktivitě vůči extracelulárně rostoucím mykobakteriím (pokles maximálně o jeden řád), nízká toxicita (>500 μM) zůstala nezměněna, zatímco buněčný uptake byl v porovnání se samotnými pyridopyrimidiny signifikantně vyšší. I zde byl samotný peptid neaktivní.<sup>175</sup> Obdobný N-terminálně palmitoylovaný monotuftsinný derivát (Obr. 37) inkorporovaný do PLGA nanočástic byl úspěšně studován *in vivo* na modelu tuberkulózy na morčatech.<sup>176</sup> Vliv na aktivitu a toxicitu byl analogický jako v práci.<sup>175</sup>



Obrázek 36. Tuftsinný konjugát inhibitorů dUTPasy



Obrázek 37. Konjugát pyridopyrimidinu s palmitoylovaným tuftsinným nosičem

Tuftsinová analoga lze principiálně využít ke kovalentní modifikaci povrchu nanočástic, které obsahují inkorporované biologicky aktivní molekuly, a to právě za účelem lepšího cílení do makrofágů. Tento přístup byl úspěšně aplikován u PLGA nanočástic.<sup>174</sup>

### 4.3. Konjugáty tuftsinových nosičů s námi připravenými antimykobakteriálními molekulami

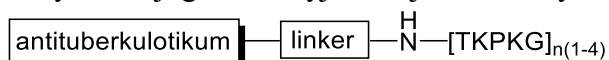
Na základě uvedených faktů jsme přistoupili ke studiu tuftsinových nosičů a jejich konjugátů s našimi antituberkulotickými malými molekulami, především na bázi derivátů salicylanilidů, ale i vhodně modifikovaných klinicky používaných léčiv, zejména 4-aminosalicylové kyseliny. Část získaných výsledků byla publikována ve společném článku s maďarským pracovištěm,<sup>44</sup> prezentována řadou konferenčních příspěvků a jsou dále zpracovávána do nových publikačních výstupů.

Předchozí studie nebyly z pohledu použitých nosičů příliš konzistentní (počet jednotek, modifikace struktury mastnými kyselinami, počet a poloha navázaných aktivních molekul), proto jsme přistoupili k jejich systematickému zkoumání. Začali jsme zkoumat vliv opakování tuftsinových jednotek, počtu molekul antituberkulotika a místa jeho navázání na nosič (N-konec či postranní řetězce lysinu), modifikace mastnými kyselinami či přítomnosti dalšího spaceru mezi malou molekulou a nosičem. Připravili jsme také fluorescenčně značené deriváty ke studiu buněčného uptake pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie, neboť naše antituberkulotika nemají sama o sobě vhodné spektrální vlastnosti.

Syntéza konjugátů zahrnuje tři kroky:

- 1) syntéza samotného peptidového nosiče (syntéza na pevné fázi),
- 2) modifikace struktury antituberkulotika, pokud samo o sobě neobsahuje skupinu vhodnou pro tvorbu vazby s nosičem (tj. zavedení takovéto skupiny či chemická modifikace funkční skupiny v molekule již přítomné), a/nebo zablokování dalších funkčních skupin, které by mohly reagovat nežádoucím způsobem,
- 3) konjugace malé molekuly s nosičem pomocí linkeru (na pevné fázi, v roztoku).

Obecnou strukturu vzniklých konjugátů lze vyjádřit zjednodušeným schématem (Obr. 38):



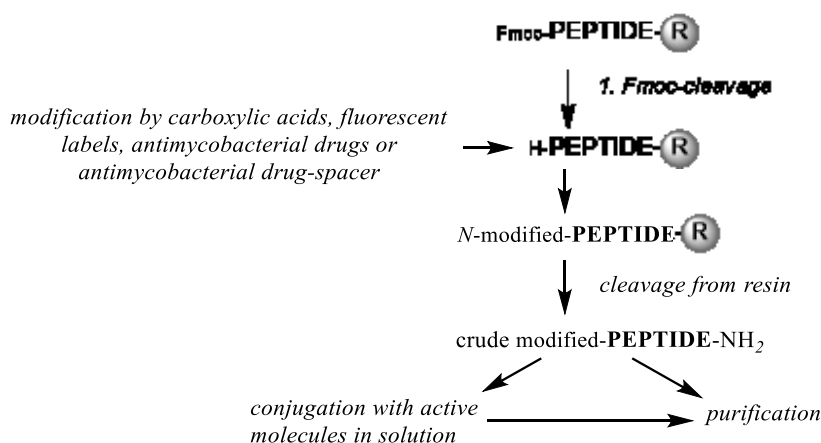
Obrázek 38. Obecná struktura konjugátů oligotuftsinu s antimykobakteriálními deriváty

#### 4.3.1. 1. Krok: syntéza nosiče

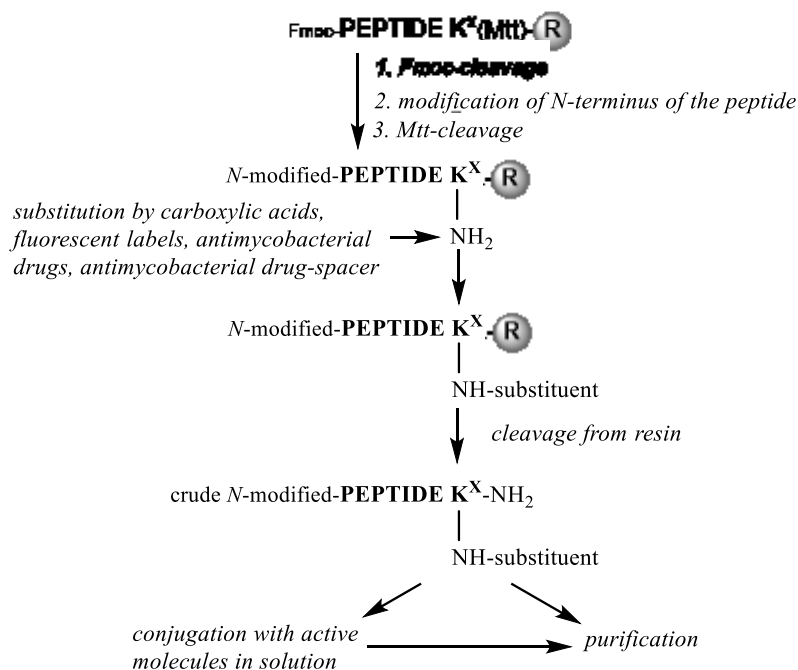
Peptidy jsou připravovány pomocí syntézy na pevné fázi (solid-phase synthesis,

SPS), s využitím Fmoc/*t*-Bu strategie. Ta spočívá v protekci  $\alpha$ -aminoskupiny aminokyselin Fmoc skupinou, reaktivní skupiny v postranních řetězcích threoninu a lysinu jsou ochráněny pomocí *t*-Bu, resp. *tert*-butyloxykarbonylu (Boc), k jejichž odštěpení dochází až při uvolňování peptidu z pryskyřice. Fmoc skupinu lze selektivně odstranit pomocí 2% DBU a 2% piperidinu nebo 40% piperidinu v DMF. Jako kondenzační činidlo se využívá DIC s přídatkem HOBt (3 ekvivalenty vztažené ke kapacitě pryskyřice). SPS lze realizovat buď manuálně, nebo pomocí peptidového syntetizátoru (konkrétně používán přístroj Syro I®). V případě manuální syntézy je efektivita každé kondenzace a deprotektce ověřována tzv. Kaiser testem, který je založen na ninhydrinové reakci, resp. isatinu v případě prolinu. Po dokončení syntézy je peptid odštěpen z pryskyřice pomocí směsi 95 % TFA, 2,5 % vody a 2,5% TIS jako scavengeru. Podle zvoleného typu pryskyřice je peptid získán s C-koncem v podobě amidu nebo s volným karboxylem. Následně je peptid izolován precipitací etherem, purifikován pomocí HPLC a charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie, analytické RP-HPLC a analýzy aminokyselin.

Tato syntéza umožňuje následnou modifikaci N-terminální skupiny různými substituenty – léčivem (přímo či přes spacer), zbytkem karboxylové kyseliny (pro modifikaci lipofility a membránové afinity, např. acetyl, butanoyl, dekanoyl, palmitoyl) či fluorescenční značkou (derivát fluoresceinu), viz Obr. 39. Pokud je do řetězce peptidu zabudován lysin s odlišnou postranní chránicí skupinou – Mtt (4-methyltrityl) a Dde (1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl), lze takto modifikovat i uvolněné aminoskupiny těchto lysinů (Obr. 40, ilustrováno na Mtt skupině).



Obrázek 39. Schéma modifikace N-konce peptidu (R = pryskyřice; obrázek podle grantového návrhu projektu GAČR 17-27514Y)



Obrázek 40. Schéma modifikace postranních řetězců lysinu (R = pryskyřice, <sup>X</sup> = pozice lysinu v řetězci peptidu; obrázek podle grantového návrhu projektu GAČR 17-27514Y)

Mezi libovolnou primární aminoskupinu peptidu a antimikrobiálně aktivní molekulu je možné kromě samotného spojovacího můstku „vložit“ i vhodný spacer k úpravě vlastností. Studovali jsme především tetrapeptidovou sekvenci GFLG, ale i další kratší peptidy jako pentaglycin (G<sub>5</sub>) či GFYA. GFLG byl navržen k vystupňovanému intracelulárnímu uvolňování léčiva z DDSs v lysosomech, neboť je specificky štěpen lysosomálním enzymem kathepsinem B.<sup>179</sup>

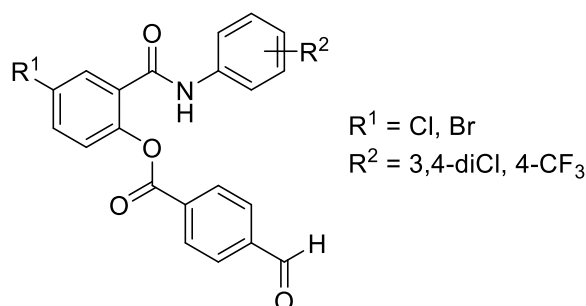
#### 4.3.2. 2. Krok: příprava konjugabilních antituberkulotik

Dalším dílčím krokem je syntéza „konjugabilních“ derivátů malých antimykobakteriálních molekul. Je důležité, aby měly vhodnou skupinu pro jednoznačně definované připojení na peptidový nosič. Preferovány jsou reakce jednoduché, synteticky nenáročné a levné, aby bylo možné připravit požadované množství sloučenin v relativně krátkém čase a v dostatečném množství. Z hlediska studia malých molekul jsme zatím získali největší zkušenosti s deriváty salicylanilidu a PAS.

Nejprve jsme vyšli z našich dříve připravených salicylanilidů,<sup>48,56</sup> které mají širokospektrální *in vitro* antimykobakteriální aktivitu včetně MDR a XDR kmenů a NTM, nepůsobí však na intracelulární mykobakterie. Jejich dalšími nevýhodami jsou špatná rozpustnost ve vodě i nedostatečná lipofilita nutná k průniku biologickými bariérami,

signifikantní toxicita pro savčí buňky, a tudíž nedostatečná selektivita. Proto jsou ideálními kandidáty k evaluaci efektivity tuftsinových nosičů.<sup>44,46</sup>

Původně jsme využili pro navázání nejúčinnějších námi připravených salicylanilidů (MIC pro *Mtb.* 1  $\mu$ M) na nosič jejich hydroxylovou skupinu, kterou jsme modifikovali Steglichovou esterifikací s kyselinou 4-formylbenzoovou (Obr. 41). Formylová skupina sloužila k tvorbě oximové vazby s příslušně modifikovaným peptidem. Estery samotné byly antimykobakteriálně účinnější a méně toxické než výchozí salicylanilidy, což potvrzuje námi popsany obecný trend.<sup>22,52,57,91</sup> Ze syntetického pohledu nepředstavovala esterifikace ani navazující konjugace s peptidem (po optimalizaci podmínek) problém. Při hodnocení biologické aktivity (anti-TB, cytotoxické a cytostatické vlastnosti vůči různým savcím liniím) se však neočekávaně ukázalo, že MIC a IC<sub>50</sub> salicylanilidových esterů a jejich peptidových konjugátů si jsou velmi blízké. Následně bylo zjištěno, že v podmínkách biologického hodnocení je esterová vazba velmi rychle hydrolyzována ( $t_{1/2}$  v řádu jednotek až několika málo desítek minut) a *de facto* tak dochází k evaluaci směsi výchozího salicylanilidu a peptidu s navázaným 4-karboxybenzylidenovým fragmentem. Proto jsme další vývoj tohoto typu sloučenin opustili, i když v předchozí práci byla esterová vazba v konjugátech prezentována jako úspěšná.<sup>173</sup> Principiálně lze estery ke konjugaci použít, avšak, jak uvádí i s příklady Majumdar a Siahaan,<sup>180</sup> je nutné ověřit jejich stabilitu.



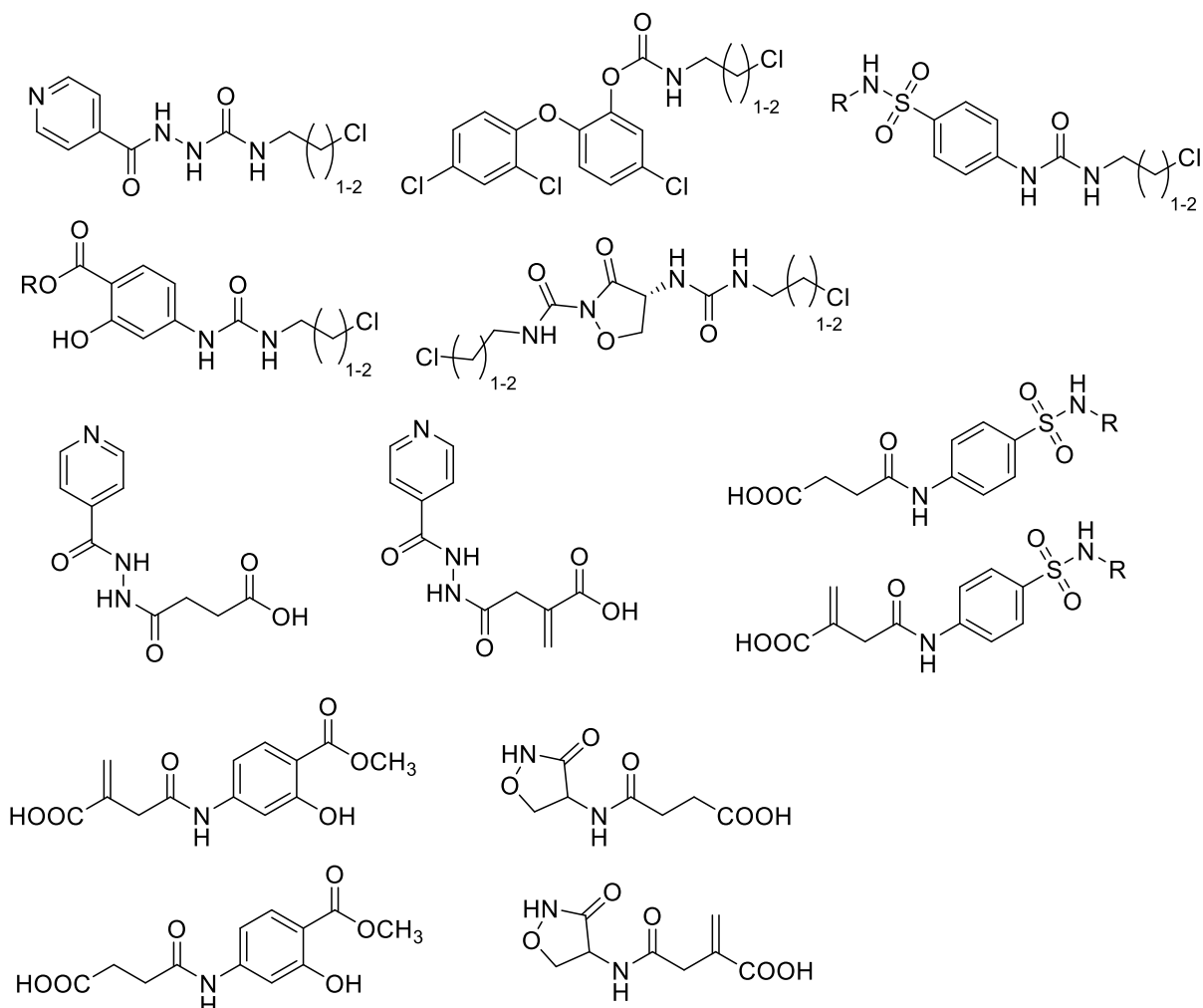
Obrázek 41. 4-Formylbenzoáty nejaktivnějších salicylanilidů

Pro konjugaci s peptidy jsme také připravili estery nejaktivnějších salicylanilidů s 5-chlorpyrazin-2-karboxylovou kyselinou. Tyto „mutual prodrugs“ obou složek působí antimykobakteriálně s odlišnými mechanismy účinku.<sup>44</sup> Chlor na pyrazinovém jádře měl být nukleofilní substitucí nahrazen cysteinem (přes -S- můstek), který by byl navázan na tuftsinový nosič. V práci<sup>46</sup> byly připraveny další dva typy konjugovatelných derivátů – karbamáty připravené z 2-chlorethyl či 3-chlorpropyl isokyanátu (Obr. 13) a také *N*-(4-benzoylfenyl)-5-halogen-2-hydroxybenzamidů (Obr. 5). Tyto karbamáty s vynikající účinností vůči H<sub>37</sub>Rv, MDR a XDR kmenům i *M. abscessus* a sníženou toxicitou se bohužel ukázaly být pro konstrukci DDSs nevhodné, a to kvůli nízké hydrolytické stabilitě ( $t_{1/2}$  < 1 h).

Podobně se chovaly estery 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (Obr. 9), tj. jako „mutual prodrugs“ uvolňovaly opět salicylanilid a výchozí kyselinu, i když s delším, ale stále poměrně krátkým poločasem ( $\approx 3,7$  h).<sup>44</sup> Nevýhodou *N*-(4-benzoylfenyl)-2-hydroxybenzamidů je relativně nízká reaktivita „benzofenonové“ ketonické skupiny, která je v podmínkách provádění konjugace s nosiči za vzniku oximové vazby nedostatečná.<sup>46</sup>

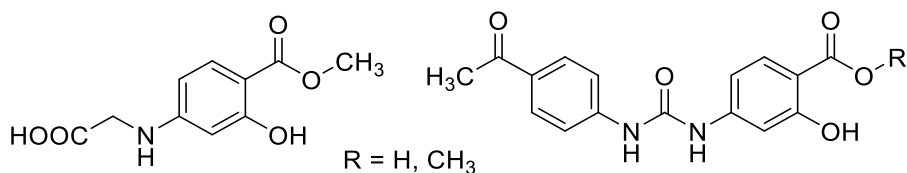
Na základě hydrolytické lability esterových/karbamátových derivátů a malé reaktivity *N*-(4-benzoylfenyl)-2-hydroxybenzamidů jsme proto přistoupili k zavedení reaktivnější skupiny (formyl, acetyl) přímo na salicylanilidový skelet při zachování volného hydroxyly (Obr. 4).<sup>44</sup>

Modifikace struktury za účelem jejich vazby na nosič byly provedeny i v případě „klasických“ antituberkulotik INH, PAS a cykloserinu, ale i dalších léčiv, která mají antimykobakteriální účinek – sulfonamidů (sulfamethoxazol, sulfathiazol, sulfadiazin, sulfamethazin)<sup>115,119</sup> a triklosanu.<sup>108</sup> Zde se však ukázalo, že řada připravených „konjugabilních“ derivátů (příklady na Obr. 42) je v porovnání s výchozími léčivy mnohem méně účinná (až o dva řády) nebo prakticky ztrácejí aktivitu ( $\omega$ -chloralkylmočoviny, monoamidy kyselin jantarové a itakonové), a proto nebyly navázány na nosiče, podobně jako triklosanové *N*- $\omega$ -chloralkylkarbamáty, které jsou sice srovnatelně účinné jako samotný triklosan, ale nevyhovují svou nízkou hydrolytickou stabilitou.  $\omega$ -Chloralkylmočoviny a karbamáty měly být navázány na cystein inkorporovaný do molekuly nosiče (sulfidový můstek), monoamidy dvojsytných karboxylových kyselin (v případě kyseliny itakonové s vlastním antimykobakteriálním účinkem<sup>92</sup>) byly zamýšleny ke tvorbě amidové vazby. Také jsme z důvodu nestability (hydrolyza vazby -N=CH-) během odštěpování hotového konjugátu z pryskyřice opustili přípravu sloučenin, které byly určeny ke konjugaci na pevné fázi (přes COOH skupinu) a nesly zároveň hydrazonovou či iminovou vazbu (deriváty glyoxalové či 4-formylbenzoové kyseliny a molekul obsahujících NH<sub>2</sub> skupinu).



Obrázek 42. Příklady „konjugabilních“ derivátů antimykobakteriálních léčiv

Vedle uvedených neaktivních močovín a amidů se nám podařilo připravit několik efektivních antimykobakteriálních derivátů vhodných pro konjugaci. Jedná se o močoviny odvozené od PAS a jejího methylesteru, které byly konjugovány přes oximový můstek, dále o [3-hydroxy-4-(methoxykarbonyl)fenyl]glycin (Obr. 43) vázaný přes karboxyl.

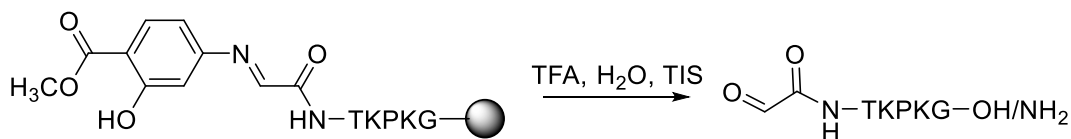


Obrázek 43. Deriváty PAS vázané na peptidový nosič

Původně jsme připravili a studovali také Schiffovu bázi methyl-4-aminosalicylátu s glyoxalovou kyselinou (2-{{3-hydroxy-4-(methoxykarbonyl)fenyl}imino}octová kyselina), nicméně se ukázalo, že po její konjugaci s nosičem na pevné fázi amidovou vazbou, jejíž vznik vyžadoval delší reakční čas a použití účinnějšího katalyzátoru (Oxyma Pure® místo standardně používaného HOBt), není tento konjugát za podmínek štěpení



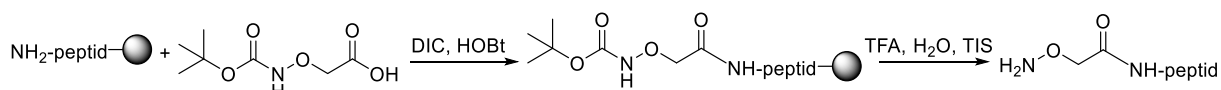
peptidu z pryskyřice stabilní a hydrolyzuje na výchozí malou molekulu a peptid nesoucí zbytek glyoxalové kyseliny, který může reagovat s volnými NH<sub>2</sub> skupinami (Obr. 44):



Obrázek 44. Štěpení hydrazonové vazby v konjugátu v kyselém prostředí

### 4.3.3. 3. Krok: Spojení malé molekuly a nosiče

Při studiu linkeru mezi peptidem a účinnou molekulou jsme se nejvíce věnovali oximové<sup>44</sup> a karboxamidové vazbě. Pro vznik oximu typicky využíváme karbonylovou skupinu (formyl, ale i méně reaktivní acetyl) v aktivní sloučenině a zbytek aminoxyoctové kyseliny (Aoa) navázaný na peptid. Ten se zavádí do nosiče podobně jako aminokyseliny při jeho výstavbě, tj. pomocí couplingu s HOBt a DIC (Obr. 45), aminoskupinu chrání Boc. Při odštěpení peptidu z pevné fáze dojde současně k odchránění Aoa fragmentu, který pak může v roztoku kondenzovat s karbonylovou funkcí. K navázání Aoa lze využít jak N-terminální aminoskupinu, tak po selektivní deprotekcí jednu či více postranních aminoskupin lysinu. K tomu je možné využít Mtt skupinu, kterou lze odštěpit acidolyticky za mírných podmínek, jež Fmoc toleruje (2% TFA v dichlormethanu), vyžaduje však následnou neutralizaci, nebo Dde skupinu odštěpitelnou 2% hydrazinem v DMF.<sup>181</sup> V takovémto případě lze selektivně modifikovat pouze postranní řetězce, zatímco N-konec zůstává zablokovaný Fmoc skupinou a následně může nést další bioaktivní molekulu, substituent kontrolující lipofilitu či fluorescenční značku.



Obrázek 45. Modifikace nosiče Aoa fragmentem

Jak již bylo uvedeno, konjugace nosiče s potenciálním léčivem probíhá v roztoku za eliminace vody. Zde se objevuje problém s rozpustností malé molekuly, peptid sám o sobě bývá rozpustný dostatečně, a to i v případě substituce vyšší mastnou kyselinou. Standardně se volí jako reakční prostředí acetátový pufr s přidavkem 2-ethoxyethanolu, 2-methoxyethanolu, MeCN, ev. DMF jako možnými kosolventy. U aldehydů není třeba reakci katalyzovat, u ketonů používáme CH<sub>3</sub>COOH. Kondenzace v tomto provedení vyžaduje dlouhý reakční čas (řádově dny) a mírně zvýšenou teplotu, výtěžky jsou v rozmezí 40-65 % a vznikají i vedlejší produkty. Tento přístup toleruje přítomnost acidolabilních skupin a

výhodou je také možná regenerace nezreagované malé molekuly při následné HPLC purifikaci.

Lze však také uvažovat o opačném designu, kdy je karbonylová skupina součástí peptidu a malá molekula obsahuje aminovou či hydrazidovou skupinu. Takto postupovali Horváti *et al.*,<sup>172</sup> kdy nejprve zoxidovali postranní hydroxylovou skupinu serinu na karbonyl, který pak kondenzoval s INH za vzniku hydrazonu.

Na základě literatury<sup>180</sup> jsme předpokládali, že oximová vazba bude hydrolyzována při nízkém pH a dojde tak k uvolnění výchozí malé molekuly, což by bylo obzvláště výhodné s ohledem na fakt, že *Mtb.* perzistuje v makrofázích ve fagozomech, kde je fyziologicky nízké pH.<sup>179</sup> Minimálně pro salicylanilidové konjugáty jsme však prokázali, že tomu tak není a tato vazba zůstává při simulaci intracelulárního prostředí v makrofázích (inkubace s lysozomálním homogenátem získaným z jater potkana) intaktní.<sup>44</sup> V tomto případě tedy konjugát nepůsobí jako proléčivo v klasickém slova smyslu. Také podle zdroje<sup>182</sup> je oximová vazba při kyselém pH stabilní.

Pro tvorbu amidové vazby je principiálně možné využít COOH skupinu v bioaktivní molekule a libovolnou primární aminoskupinu peptidu (N-konec, postranní řetězec lysinu). Preferenčně z důvodu snazší syntézy využíváme N-terminální skupinu, kde je možné provést deprotekcii (odstranění Fmoc skupiny) pomocí 2% DBU a 2% piperidinu v DMF, tj. analogicky jako při samotné syntéze nosiče. Odchránění  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> lysinu je pracnější, navíc vyžaduje jiná činidla (v závislosti na použitém chránění). Coupling s malou molekulou pak probíhá na pevné fázi, kde lze snadno ověřit, zda proběhla reakce kompletně, proto dosahujeme vysokých výtěžků, získaný surový konjugát má vyšší čistotu, reakce je navíc poměrně rychlá (v řádu hodin), nevýhodou je naopak větší spotřeba reaktantu a coupling činidel (přidávají se v nadbytku, typicky 3 molární ekvivalenty vztažené k peptidu) a také to, že v malé molekule nesmí být vazby inkompatibilní s podmínkami štěpení peptidu/konjugátu z pryskyřice, např. iminové či hydrazonové uskupení. Amidová vazba by měla být v podmínkách biologického testování konjugátů stabilní, nepodléhat degradaci a konjugát by proto měl dosáhnout cílového místa účinku nezměněný.<sup>180</sup>

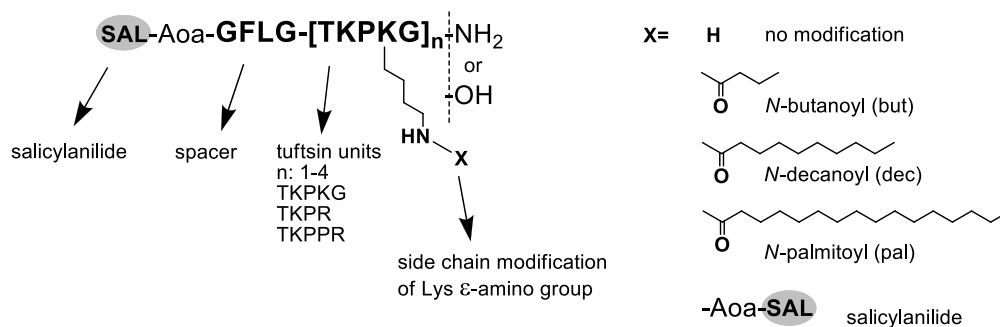
Dále jsme se zabývali např. možnostmi sulfidového a disulfidového můstku, (thio)močovinové, acidolabilní hydrazonové a karbamátové vazby, která by měla být stabilnější než esterová.<sup>180</sup> V této oblasti zatím nebyla realizována ucelená studie, na výsledcích se dále pracuje.

#### 4.3.4. Peptidové konjugáty se salicylanilidy

V oblasti peptidových konjugátů jsme publikovali rozsáhlou práci,<sup>44</sup> kde jsme jako malé antimykobakteriální molekuly použili formylované a acetylované salicylanilidy a jako nosiče různě modifikované deriváty tuftsinu lišící se:

- délkou: tetramer [TKPKG]<sub>4</sub>, heterotrimer TKPR-[TKPKG]<sub>2</sub>, dimer [TKPKG]<sub>2</sub> a monomerní TKPKG, lidský tuftsin TKPR a tuftsinový antagonist TKPPR,
- modifikací nosiče karboxylovými kyselinami (palmitová, dekanová, máselná, octová kyselina) či bez tohoto lipofilitu ovlivňujícího substituentu,
- (ne)přítomností GFLG spaceru,
- C-koncem peptidu: buď jako COOH, nebo CONH<sub>2</sub>,
- počtem nesených antimykobakteriálních molekul,
- ev. přítomností 5(6)-karboxyfluoresceinu ke studiu buněčného uptake.

K syntéze peptidů jsme využili Fmoc/*t*-Bu strategii, postranní řetězce lysinu byly chráněny Boc skupinou. U některých nosičů jsme vybrané ε-aminoskupiny lysinu chránili pomocí Dde nebo Mtt skupiny (ta není v publikaci uvedena, ač byla hojně používána), tyto skupiny pak byly využity pro coupling s mastnými kyselinami, Boc-Aoa, ev. včetně spaceru, či 5(6)-karboxyfluoresceinu (Obr. 46). N-Konec byl substituován analogickým způsobem. Spojení malé molekuly s nosičem bylo realizováno oximovou vazbou za katalýzy CH<sub>3</sub>COOH (pH cca 4,5) v reakčním prostředí acetátového pufru a 2-ethoxyethanolu.<sup>44</sup>



Obrázek 46. Přehled struktur salicylanilid-tuftsinových konjugátů<sup>44</sup> (nezahrnuje varianty s fluorescenčním značením; spacer GFLG nemusí být přítomen)

Připravené konjugáty byly stabilní v dimethylsulfoxidu i v médiích používaných při hodnocení biologické aktivity. Jejich lipofilita byla stanovena pomocí RP-HPLC, přičemž podle očekávání byly nejlipofilnější výchozí salicylanilidy, spojením s nosičem roste hydrofilita. Také další výsledky (typicky vliv mastných kyselin o různé délce řetězce) byly v souladu s očekáváním, ačkoli i místo vazby kyseliny ovlivňuje lipofilitu.<sup>44</sup>

Antimykobakteriální aktivita (extracelulárně rostoucí buňky) „konjugabilních“ salicylanilidů (Obr. 4) byla studována u H<sub>37</sub>Rv, MDR-TB a *M. abscessus*. Účinnější než 5-

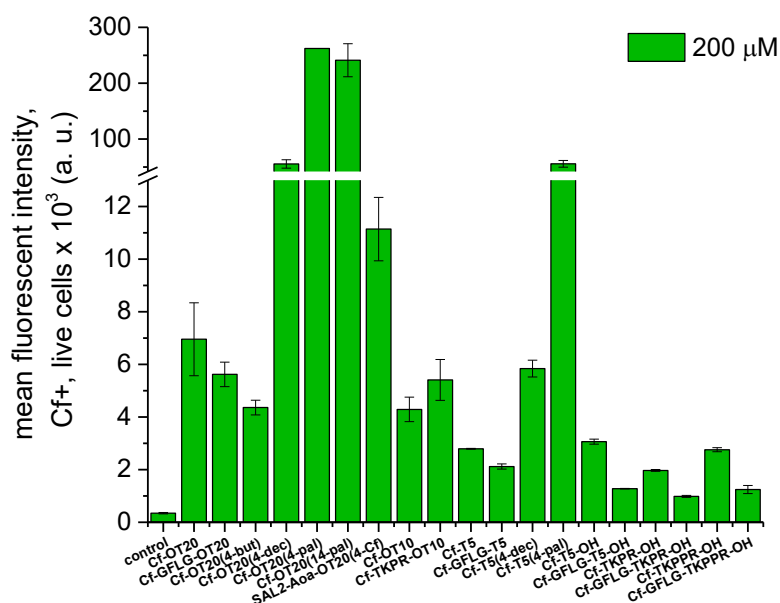
formyl-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid byly *N*-(4-acetylfenyl)-5-halogen-2-hydroxybenzamidy, zejména bromovaná varianta (SAL2), i když byly méně aktivní než dříve popsané polyhalogenované salicylanilidy. Aktivita vůči *M. abscessus* byla menší než u TB kmenů. Zároveň byly cytostatické pro linie HepG2 i MonoMac6 (SI 0,7-2,5), ale relativně netoxické (SI>10) pro BMMΦ.<sup>44</sup>

Tato antimykobakteriální aktivita zůstává po konjugaci s nosiči zachována, ačkoli jsou hodnoty MIC poněkud vyšší, jak už bylo zjištěno v dřívějších pracích (např.<sup>173,175</sup>). Z hlediska délky nosiče je nejúčinnější monotuftsinový TKPKG derivát (MIC SAL2-Aoa-TKPKG = 21,8 μM), následovaný tetratuftsinem [TKPKG]<sub>4</sub>, nejméně aktivní byl dituftsinový nosič [TKPKG]<sub>2</sub>. C-Konec v podobně karboxylu nemá proti amidu výhodu, také GFLG spacer antimykobakteriální účinnost nezlepšuje, u tetratuftsinu je dokonce kontraproduktivní. Naopak přítomnost dvou aktivních molekul v jednom DDS vede ke zlepšené inhibici bakterií. Zbytek mastné kyseliny moduluje u delších nosičů účinnost mírně pozitivně, jejich vliv je ale nejvíce patrný u kratších peptidů, kde je ovšem dysterapeutický. Obecně lze říci, že kratší peptidové konjugáty (tj. nosiče TKPKG, TKPKG-OH, TKPR-OH, TKPPR-OH) mají nejlepší aktivitu vůči extracelulárním mykobakteriím. Aktivita vůči MDR-TB a *M. abscessus* je obecně poněkud nižší než proti lékově citlivému *Mtb.*, některé konjugáty byly plně srovnatelné či dokonce lepší než výchozí salicylanilidy. U atypického kmene byly nejvýhodnější tetratuftsinové, dituftsinové a heterotrimerní konjugáty, kdežto monotuftsiny měly – v kontrastu s *Mtb.* – nejnižší aktivitu, mírně výhodnější byly konjugáty obsahující GFLG fragment.<sup>44</sup>

Cytostatické a cytotoxické účinky byly hodnoceny na stejných liniích jako výchozí salicylanilidy. Většina kontrolních acetylovaných peptidů byla netoxická v koncentraci 200 μM, palmitoylované nosiče naproti tomu vykazovaly značné cytostatické vlastnosti, které jsou vázány na kovalentní vazbu, neboť mechanická směs nosiče a kyseliny vykazovala nízkou toxicitu odpovídající samotné kyselině. Konjugáty salicylanilidů s monotuftsiny, ev. i se spacerem, jakož i tetra- a dituftsinové deriváty byly netoxické (>200 μM) pro MonoMac6 buňky a většinou i HepG2. Podobně jako v případě nosičů, tak i u konjugátů nesoucích mastné kyseliny došlo ke značnému zvýšení cytostatických vlastností, které rostou s délkou řetězce kyseliny. Ačkoli většina konjugátů měla mírnou nebo nulovou toxicitu při 200 μM, jejich indexy selektivity byly spíše nízké z důvodu vyšších hodnot MIC. Dostačující selektivita ≈10 a více byla nalezena u dvou konjugátů: SAL2-Aoa-TKPPR-OH a SAL2-Aoa-TKPKG. K výsledkům hodnocení toxicity a selektivity lze konstatovat, že konjugace salicylanilidů s peptidy snižuje toxicitu vůči savčím buňkám a zlepšuje

selektivitu. Přímá toxicita hodnocená na BMM  $\Phi$  buňkách byla nízká, dostatečně selektivní byl i výchozí SAL2, ale i zde byl popsán analogický negativní vliv mastných kyselin.<sup>44</sup>

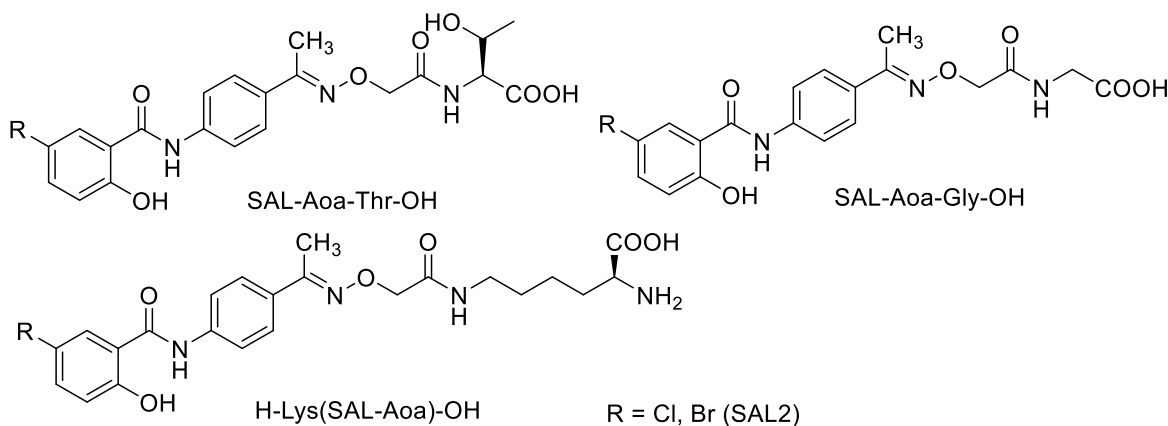
Dále jsme studovali závislost intenzity fluorescence značených nosičů a konjugátů na pH. Zde se ukázalo, že zbytek palmitové kyseliny i salicylanilidu v blízkosti fluoroforu má zhášecí efekt. Buněčný uptake jsme hodnotili u značených derivátů na linii MonoMac6 (Obr. 47), a to fluorescenční mikroskopií a průtokovou cytometrií. Uptake pozitivně koreluje s počtem tuftsinových jednotek, naopak je nezávislý na typu C-konce (amid nebo volná kyselina) a GFLG spacer internalizaci mírně snižuje. Jednoznačně nejvyšší uptake měly peptidy modifikované kyselinou palmitovou, bohužel však byly ve vyšších koncentracích značně toxické, narušovaly integritu membrány. Dekanová kyselina pak představuje vhodný kompromis mezi zvýšeným vychytáváním buňkami a přijatelnou toxicitou. I navázání salicylanilidu (pravděpodobně zvýšením lipofility) uptake zvyšuje.<sup>44</sup>



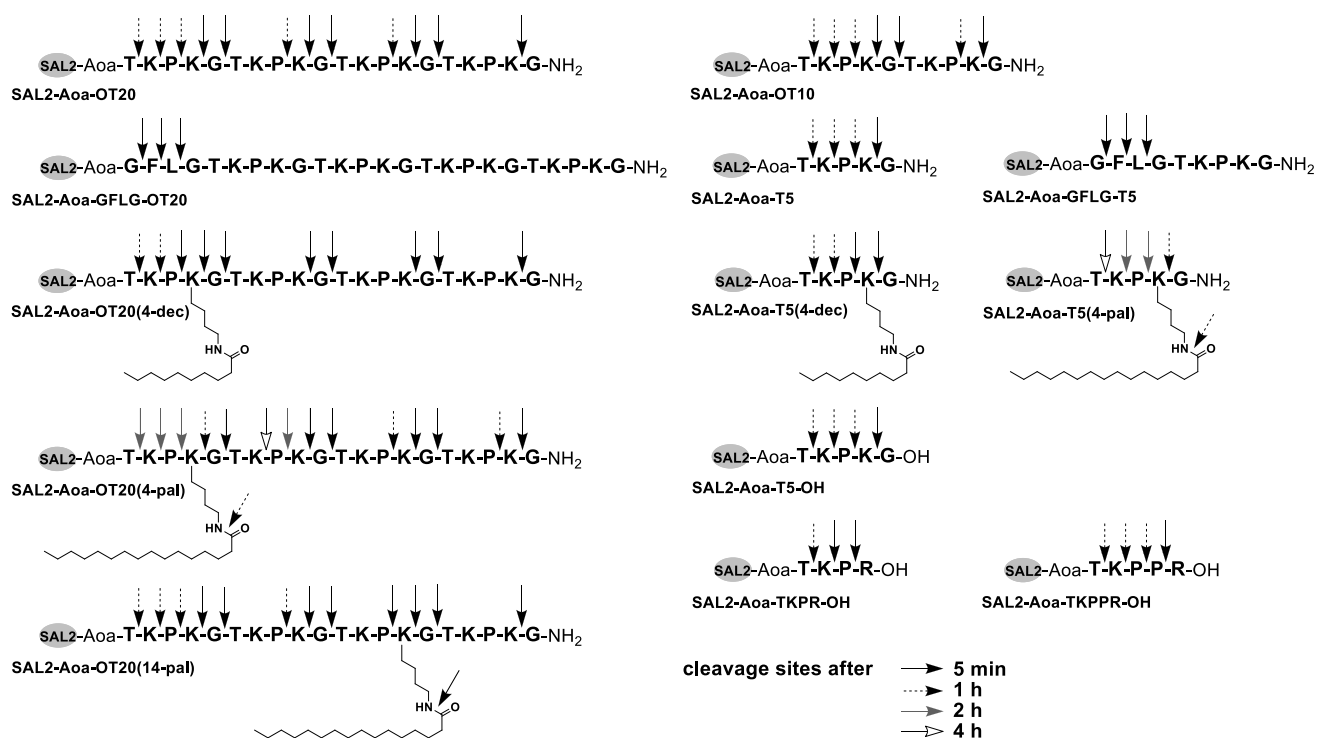
Obrázek 47. Porovnání buněčného uptake různých tuftsinových nosičů a konjugátů<sup>44</sup>

U konjugátů byla také stanovena stabilita, resp. degradace při působení lysozomálního homogenátu získaného z jater potkana po dobu 24 h, abychom zjistili, jak se malá molekula intracelulárně uvolňuje. V lysozomech panuje fyziologicky kyselé pH (4,5-5) a je v nich přítomna řada proteolytických enzymů. Očekávali jsme hydrolytické uvolnění výchozího salicylanilidu, ale jako nejmenší metabolity byly překvapivě identifikovány SAL-Aoa-Thr-OH (u konjugátů bez spaceru), H-Lys(SAL-Aoa)-OH (pokud byl SAL navázán na postranní řetězec lysinu) a SAL-Aoa-Gly-OH (Obr. 48) v případě přítomnosti GFLG spaceru, který zvyšoval dle očekávání degradaci. Oximová vazba zůstává zachována. Lze

také konstruovat „mapy“ popisující místa a rychlost štěpení jednotlivých vazeb (Obr. 49). I zde se ukázal vliv jednotlivých substituentů a vlastností samotného nosiče na stabilitu.<sup>44</sup>



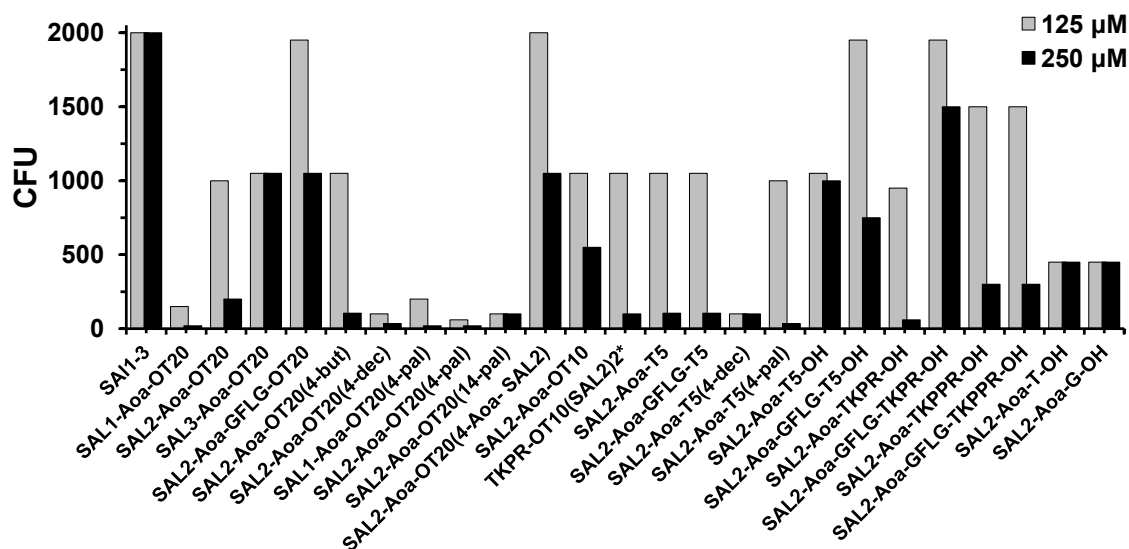
Obrázek 48. Nejmenší fragmenty obsahující účinnou molekulu vznikající působením lysozomálních enzymů na konjugáty



Obrázek 49. Degradační „mapy“ konjugátů při působení lysozomálních enzymů<sup>44</sup>

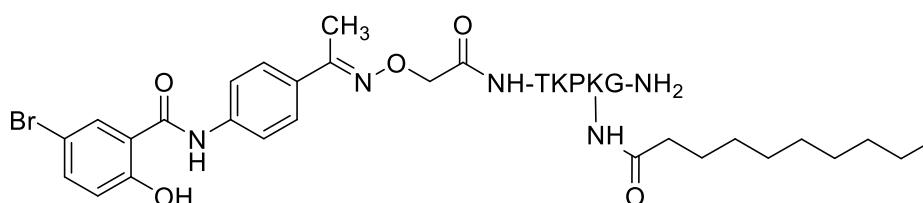
Potvrdilo se, že vazba na nosič zvyšuje intracelulární anti-TB aktivitu výchozích salicylanilidových molekul v infikovaných MonoMac6 buňkách, a to i přes celkově nižší lipofilitu konjugátů; salicylanilidy jsou samy o sobě inaktivní. To je důležité zejména z pohledu působení na chronickou a latentní formu TB závisící na intracelulární availabilitě léčiva. Infikované buňky jsou inkubovány s testovanými deriváty v koncentracích 125 a 250  $\mu\text{M}$ . Všechny konjugáty redukovaly v závislosti na koncentraci počet CFU intracelulárně rostoucího *Mtb.*, při 125  $\mu\text{M}$  jich několik bylo inaktivních

(Obr. 50). Obecně lze říci, že neúčinnější byly konjugáty substituované kyselinou palmitovou a dekanovou, výhodné jsou tetra- a monotuftsinové deriváty. C-Konec v podobě karboxylu není výhodnější než odpovídající amid, stejně tak více fragmentů léčiva v jedné molekule ani GFLG spacer aktivitu nezlepšují.<sup>44</sup>



Obrázek 50. Intracelulární aktivita salicylanilidů a jejich konjugátů proti *Mtb. H<sub>37</sub>Rv*<sup>44</sup>

V rámci práce<sup>44</sup> jsme připravili řadu nosičů a jejich konjugátů s vhodně substituovanými salicylanilidy. Konjugáty si zachovávají antimykobakteriální aktivitu vůči extracelulárně rostoucím mykobakteriím, i když mírně sníženou, naopak s výjimkou především palmitoylovaných DDSs u nich klesá toxicita pro savčí buňky. Významné je též podstatné zvýšení buněčné uptake a intracelulární anti-TB aktivity, která je u výchozích molekul prakticky nulová. Z hlediska extracelulární aktivity a selektivity se zdají být nejlepšími monotuftsinové deriváty bez substituce karboxylovými kyselinami, ovšem z hlediska vychytávání buňkami a intracelulární účinnosti se jako nejperspektivnější jeví nosiče substituované mastnými kyselinami, které jsou však současně středně či vysoce cytostatické. Nadějným kompromisem mezi těmito protichůdnými požadavky je konjugát SAL2 s decylovaným tuftsinovým monomerem (Obr. 51), dobrou intracelulární aktivitu mají ale i některé netoxické a extracelulárně účinné monotuftsinové konjugáty (SAL2-Aoa-TKPKG, SAL2-Aoa-GFLG-TKPKG či SAL2-Aoa-TKPR-OH).



Obrázek 51. Perspektivní konjugát SAL2 s decylovaným monotuftsinovým nosičem

Nosiče na bázi tuftsinu a jejich konjugáty s malými antimykobakteriálními molekulami mají tedy perspektivní potenciál, podařilo se redukovat některé z nevýhod výchozích salicylanilidů (nízká rozpustnost, selektivita a intracelulární aktivita, nedostatečný uptake) při zachování či jen mírném snížení aktivity proti extracelulárním mykobakteriím.

V současné době nadále na studiu nosičů a především jejich konjugátů s anti-TB léčivými pracujeme, pozornost je věnována zejména obměnám spaceru, studiu dalších linkerů (spojovacích můstků) mezi aktivní sloučeninou a peptidem, připravujeme také nové „konjugabilní“ malé molekuly. V současné době pracujeme na bioevaluaci konjugátů derivátů PAS s kratšími peptidy, kde cílíme především na vystupňování extracelulární a intracelulární aktivity (toto léčivo 2. linie nepatří k těm nejúčinnějším, navíc vzhledem k hydrofilně poměrně obtížně proniká do buněk) a také lepší toleranci, byť je PAS relativně netoxická. Perspektivní bude také konjugace s takovými antimykobakteriálními molekulami, které mají nízké MIC, např. chinolony vyšších generací. Na základě opakovaně prokázané hydrolytické lability, resp. krátkého  $t_{1/2}$ , esterové vazby jsme z dalšího vývoje vyloučili fenolické sloučeniny, které by musely být připojeny esterovou vazbou, např. triklosan, bedachilin, u PAS se pak k vazbě využívá karboxylová či  $\text{NH}_2$  skupina. Plánováno je i spojení tuftsinových nosičů, našich malých molekul a modifikovaných PLGA nanočástic za vzniku DDSs podobných tomu, jaký recentně publikovali Horváti *et al.*<sup>174</sup>

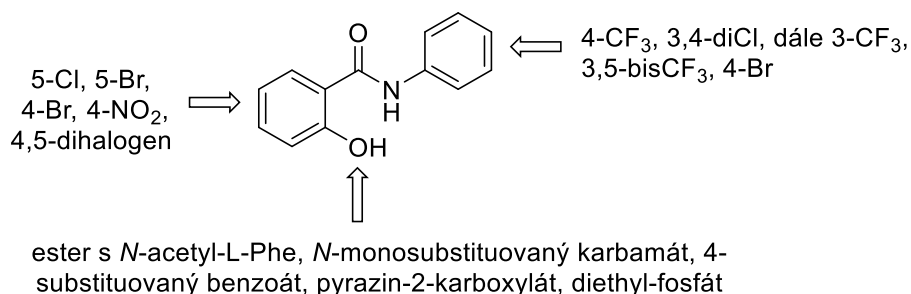
Další potenciální oblastí uplatnění tuftsinových nosičů a jejich konjugátů s našimi malými molekulami, tentokrát co nejvíce cytotoxickými a cytostatickými, je vývoj protirakovinných léčiv, zaměřený konkrétně na terapeuticky značně problematický glioblastom.



## 5. Závěr a perspektivy

Vzhledem k nárůstu rezistence, ale i z dalších důvodů existuje objektivní potřeba nových antiinfekčních léčiv. Předložená habilitační práce se proto věnuje malým molekulám aktivním zejména proti *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv i lékově rezistentní kmeny), atypickým mykobakteriím, grampozitivním bakteriím včetně MRSA a patogenním houbám, dále pak jejich konjugátům s peptidovými nosiči na bázi tuftsínu.

Nejvíce připravených sloučenin bylo z oblasti salicylanilidů a jejich esterů včetně karbamátů. Podařilo se syntetizovat celou řadu vysoce účinných derivátů s nízkými mikromolárními nebo dokonce submikromolárními hodnotami MIC. Estery zpravidla v porovnání s výchozími salicylanilidy působí účinněji na *Mtb.* (bez ohledu na přítomnost rezistence), dobrou aktivitu mají i na atypické kmeny a jsou méně toxické, i když u některých sérií nebylo cíle dosažení podstatně nižší toxicity dosaženo. Oba efekty (zlepšení aktivity a snížení toxicity) vedou ke zlepšení selektivity, ačkoli i zde je prostor pro další optimalizaci. Salicylanilidové deriváty také obvykle inhibují růst grampozitivních bakterií, zejm. stafylokoků, a někdy též fungálních patogenů, zde však účinnost není uniformní. Podařilo se také identifikovat vztahy mezi strukturou a antimikrobní aktivitou, optimální substitucei shrnuje Obr. 52, výhodnou se ukázala aplikace konceptu „mutual prodrugs“.



Obrázek 52. Preferované substituenty pro salicylanilidový „scaffold“ (antimikrobní aktivita)

Vedle prokázané inhibice isocitrátlyasy, L-alanin dehydrogenasy, methionin aminopeptidasy a dalších enzymů s potenciálem zásahu také latentních forem TB i nadále zkoumáme se spolupracujícími pracovišti mechanismus antimykobakteriálního účinku salicylanilidů a jejich derivátů. Velmi perspektivní je jejich aktivita vůči rezistentnímu a klinicky problematickému patogenu *Mycobacterium abscessus*, na nějž jsou naše sloučeniny unikátně vysoce aktivní, i zde bude probíhat další vývoj, podobně jako u MRSA, kde popsané molekuly (především salicylové, ale i sulfonamidové a hydrazidy-hydrazony)

slouží jako základ pro další design. Zamýšlíme a částečně již realizujeme i spojení s jinými antimikrobními strukturami v jedné molekule.

Také modifikace známých léčiv isoniazidu a sulfonamidů vedly k vysoce účinným derivátům, které byly s parentními molekulami buď srovnatelné, nebo dokonce účinnější. Mnohé naše sloučeniny INH měly dobrou účinnost proti INH-rezistentním mykobakteriálním kmenům. Podařilo se nám identifikovat analoga INH (1,3,4-oxadiazoly) účinná i proti MDR- a XDR-TB kmenům bez zkřížené rezistence a s experimentálně prokázaným odlišným mechanismem účinku, než jaký má výchozí léčivo. U sulfonamidů jsme připravili deriváty účinné i proti kotrimoxazol-rezistentním grampozitivním bakteriálním kmenům, kde také plánujeme objasnění mechanismu účinku. V budoucnu počítáme s vývojem nových modifikací INH, především spojením s dalšími biologicky aktivními sloučeninami tak, aby si zachovaly účinnosti i proti INH-rezistentním mykobakteriím, a též přímých InhA inhibitorů. Klíčové zjištění této části práce představuje fakt, že jednoduchou syntetickou obměnou lze ze zavedených a široce dostupných léčiv připravit molekuly, které mají jednak dobrou aktivitu, ale také si – průlomově – zachovávají účinnost i u kmenů necitlivých na původní léčivo, tj. působící inovativním mechanismem účinku.

Druhý směr představuje progresivní trend studia potenciálních nosičů jakožto DDSs, v naší práci konkrétně peptidových nosičů založených na tuftsínu. Připravili jsme „mini-knihovnu“ různě modifikovaných nosičů, pilotně je konjugovali s vhodnými salicylanilidovými deriváty a následně hodnotili jejich biologickou aktivitu. Stěžejním poznatkem je, že volbou vhodného nosiče lze dosáhnout zachování antimykobakteriálního působení (*Mtb.* H<sub>37</sub>Rv, MDR-TB, *M. abscessus*), podstatného zlepšení intracelulární antituberkulotické aktivity (model infikovaných makrofágů) i buněčného uptake a zároveň snížení nežádoucího toxického působení malých molekul na savčí buňky. Popsali jsme vztahy mezi strukturou a aktivitou peptidových nosičů. V budoucnu se budeme nadále zabývat především dalším studiem linkerů (vazeb) spojujících malé molekuly s nosiči a konjugací nejvýhodnějších nosičů s dalšími sloučeninami s nízkými hodnotami MIC po jejich ev. předchozí chemické modifikaci na vhodné „konjugabilní“ deriváty. Primárními cíli jsou především vystupňování intracelulární aktivity a zlepšení selektivity.

Při „doplňkovém“ biologickém hodnocení jsme identifikovali několik našich sérií jako účinné inhibitory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy s možným využitím pro léčbu demencí, jejich vlastnosti odpovídají obecným požadavkům na léčiva pronikající do CNS.

Závěrem lze konstatovat, že se nám podařilo připravit celou řadu slibných sloučenin, které jsou účinné mimo jiné vůči lékově rezistentním patogenům, tj. s inovativním mechanismem účinku, identifikovat vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou, syntetizovat a vyhodnotit biologické vlastnosti konjugátů vybraných malých molekul s peptidovými nosiči na bázi tuftsinu. Od těchto výsledků se odvíjí náš pokračující výzkum, který nadále směřuje do oblasti malých molekul (jak originálních, tak „me-too“ analog) a primárně jejich antimikrobní aktivity, ev. inhibice cholinesteras, peptidových nosičů a vzájemných konjugátů. Některé dosud nepublikované výsledky jsou velice nadějně.

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1. Kategorizace antituberkulotik podle WHO	10
Tabulka 2. Inhibice ICL salicylanilidovými deriváty	34

## Seznam obrázků

Obrázek 1. Obecná struktura salicylanilidů	15
Obrázek 2. Nitrosalicylanilidové deriváty	17
Obrázek 3. Anilidy odvozené od mono- a dihalogenovaných salicylových kyselin	17
Obrázek 4. Salicylanilidy nesoucí karbonylovou skupinu	17
Obrázek 5. <i>N</i> -(4-Benzoylfenyl)-2-hydroxybenzamid	18
Obrázek 6. Design salicylanilidových esterů (karboxylátů A, sulfonátů B, (thio)fosfátů C, (thio)karbamátů D)	19
Obrázek 7. Estery salicylanilidů s <i>N</i> -acetyl-L-fenylalaninem	20
Obrázek 8. Přesmyk vedoucí ke vzniku <i>N</i> -[(fenylkarbamoyl)methyl]-2-hydroxybenzamidů	21
Obrázek 9. Struktura salicylanilidových pyrazin-2-karboxylátů	24
Obrázek 10. Nejúčinnější thiofosfátový inhibitor cholinesteras	26
Obrázek 11. Obecná struktura 3-difenyl-3-hydrobenzo[ <i>e</i> ][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxidů	27
Obrázek 12. Obecná struktura salicylanilidových <i>N,N</i> -disubstituovaných (thio)karbamátů	29
Obrázek 13. Karbamáty vysoce aktivní vůči <i>M. abscessus</i>	30
Obrázek 14. <i>N</i> -Monosubstituované karbamáty	30
Obrázek 15. Docking nejúčinnějšího inhibitoru na MtAlaDH	34
Obrázek 16. Aktivace isoniazidu enzymem KatG a vznik komplexu s NADH	35
Obrázek 17. Design karboxamidových derivátů isoniazidu	36
Obrázek 18. Konformace neaktivnějšího hydrazinkarboxamidu v aktivním centru InhA	36
Obrázek 19. Příprava 1,3,4-oxadiazolů cyklizací	37
Obrázek 20. <i>N</i> -Dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin	37
Obrázek 21. Triklosan	38
Obrázek 22. Struktury použitých sulfonamidů	41
Obrázek 23. Schiffovy báze a amidy získané ze sulfonamidů	41
Obrázek 24. Design nových Schiffových bází sulfadiazinu	43
Obrázek 25. Močoviny a imidazolidin-2,4,5-triony odvozené od sulfamethoxazolu	44
Obrázek 26. 3-Alkylmočoviny a příbuzné močoviny odvozené od sulfamethoxazolu	45
Obrázek 27. 4,4'-[Karbonylbis(azandiyl)]bis[ <i>N</i> -(5-methylisoxazol-3-yl)benzensulfonamid]	45
Obrázek 28. Estery a amidy rhodanin-3-octové kyseliny	47

Obrázek 29. Design nových rhodaninových derivátů	48
Obrázek 30. Isosterie isoniazidových a 4-CF <sub>3</sub> -benzohydrazidových hydrazonů	49
Obrázek 31. Nejúčinnější hydrazidy-hydrazony	49
Obrázek 32. Estery a amidy fluor-DL-fenylalaninů	49
Obrázek 33. Konjugáty INH s tuftsinovými nosiči	55
Obrázek 34. Konjugát INH s palmitoylovaným monotuftsinovým nosičem	56
Obrázek 35. Konjugát tetraoligotuftsinu s derivátem piperazinu	56
Obrázek 36. Tuftsinový konjugát inhibitorů dUTPasy	57
Obrázek 37. Konjugát pyridopyrimidinu s palmitoylovaným tuftsinovým nosičem	57
Obrázek 38. Obecná struktura konjugátů oligotuftsinu s antimykobakteriálními deriváty	58
Obrázek 39. Schéma modifikace N-konce peptidu	59
Obrázek 40. Schéma modifikace postranních řetězců lysinu	60
Obrázek 41. 4-Formylbenzoáty nejaktivnějších salicylanilidů	61
Obrázek 42. Příklady „konjugabilních“ derivátů antimykobakteriálních léčiv	63
Obrázek 43. Deriváty PAS vázané na peptidový nosič	63
Obrázek 44. Štěpení hydrazonové vazby v konjugátu v kyselém prostředí	64
Obrázek 45. Modifikace nosiče Aoa fragmentem	64
Obrázek 46. Přehled struktur salicylanilid-tuftsinových konjugátů	66
Obrázek 47. Porovnání buněčného uptake různých tuftsinových nosičů a konjugátů	68
Obrázek 48. Nejmenší fragmenty obsahující účinnou molekulu vznikající působením lysozomálních enzymů na konjugáty	69
Obrázek 49. Degradční „mapy“ konjugátů při působení lysozomálních enzymů	69
Obrázek 50. Intracelulární aktivita salicylanilidů a jejich konjugátů proti <i>Mtb.</i> H <sub>37</sub> Rv	70
Obrázek 51. Perspektivní konjugát SAL2 s decylovaným monotuftsinovým nosičem	70
Obrázek 52. Preferované substituenty pro salicylanilidový „scaffold“ (antimikrobní aktivita)	72

## Seznam publikovaných článků, patentů a knih

### A) Články vyšlé v impaktovaných časopisech

1. Vinšová, J.; Imramovský, A.; **Krátký, M.**; Ferriz, J.M.; Palát, K.; Lyčka, A.; Růžička, A. Unprecedented rearrangement of salicylanilide derivatives: imidazolinone intermediate formation. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 23-26.
2. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově resistantní kmeny. *Chem. Listy* **2010**, *104*, 998-1005.
3. Imramovský, A.; Ferriz, J.M.; Pauk, K.; **Krátký, M.**; Vinšová, J. Synthetic Route for the Preparation of 2-Hydroxy-N-[1-(2-hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 414-416.
4. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Buchta, V.; Horvati, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 6106-6113.
5. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Antiviral Activity of Substituted Salicylanilides – a Review. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 956-967.
6. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents – a Review. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3494-3505.
7. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Buchta, V. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Pyrazine-2-carboxylates. *Med. Chem.* **2012**, *8*, 732-741.
8. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Rodriguez, N.G.; Stolaříková, J. Antimycobacterial Activity of Salicylanilide Benzenesulfonates. *Molecules* **2012**, *17*, 492-503.
9. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Buchta, V. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Benzoates. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, Article ID 290628.
10. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Novotná, E.; Wsól, V.; Ulmann, V.; Stolaříková, J.; Fernandes, S.; Bhat, S.; Liu, J.O. Salicylanilide Derivatives Block *Mycobacterium tuberculosis* through Inhibition of Isocitrate Lyase and Methionine Aminopeptidase. *Tuberculosis (Edinb.)* **2012**, *92*, 434-439.
11. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Volková, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 433-440.
12. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Advances in Mycobacterial Isocitrate Lyase Targeting and Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 6126-6137.

13. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Stolaříková, J. Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains. *Molecules* **2012**, *17*, 12812-12820.
14. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid. *Molecules* **2012**, *17*, 9426-9442.
15. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Novotná, E.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J. Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)benzoates. *Molecules* **2013**, *18*, 3674-3688.
16. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Antimycobacterial Activity of Quaternary Pyridinium Salts and Pyridinium *N*-oxides – Review. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1343-1355.
17. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Novotná, E.; Stolaříková, J. Salicylanilide Pyrazinoates Inhibit *in Vitro* Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Strains, Atypical Mycobacteria and Isocitrate Lyase. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 1-9.
18. Vinšová, J.; Kozic, J.; **Krátký, M.**; Stolaříková, J.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Buchta, V. Salicylanilide Diethyl Phosphates: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 728-737.
19. Rychtarčíková, Z.; **Krátký, M.**; Gazvoda, M.; Komlóová, M.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. *N*-Substituted 2-Isonicotinoylhydrazinecarboxamides – New Antimycobacterial Active Molecules. *Molecules* **2014**, *19*, 3851-3868.
20. **Krátký, M.**; Volková, M.; Novotná, E.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and Biological Activity of New Salicylanilide *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4073-4082.
21. Vinšová, J.; **Krátký, M.**; Komlóová, M.; Dadapeer, E.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Stolaříková, J. Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterases Inhibition. *Molecules* **2014**, *19*, 7152-7168.
22. **Krátký, M.**; Novotná, E.; Saxena, S.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Salicylanilide Diethyl Phosphates as Potential Inhibitors of Some Mycobacterial Enzymes. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, Article ID 703053.
23. **Krátký, M.**; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Salicylanilide Diethyl Phosphates as Cholinesterases Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2015**, *58*, 48-52.
24. **Krátký, M.**; Bösze, S.; Baranyai, Z.; Szabó, I.; Stolaříková, J.; Paraskevopoulos, G.; Vinšová, J. Synthesis and *in vitro* biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 868-875.



25. **Krátký, M.**; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Buchta, V.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and antimicrobial activity of sulphamethoxazole-based ureas and imidazolidine-2,4,5-triones. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 1108-1117.
26. Švarcová, M.; **Krátký, M.**; Vinšová, J. Investigation of potential inhibitors of chorismate-utilizing enzymes. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1383-1399.
27. Baranyai, Z.; **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Horváti, K.; Szabó, N.; Senoner, Z.; Dávid, S.; Bősze, S. Salicylanilide esters and carbamates active against fast-growing *Mycobacterium abscessus*, slow growing *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and multidrug-resistant A8 cultures. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 692-704.
28. Paraskevopoulos, G.; **Krátký, M.**; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Pávek, P.; Besra, G.; Vinšová, J. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7292-7301.
29. **Krátký, M.**; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules* **2016**, *21*, 191-201.
30. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Salicylanilide *N*-monosubstituted carbamates: Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1322-1330.
31. **Krátký, M.**; Vinšová, J. Sulphur-Containing Heterocycles as Antimycobacterial Agents: Recent Advances in Thiophene and Thiadiazole Derivatives. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2921-2952.
32. **Krátký, M.**; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel rhodanine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 23-29.
33. Paraskevopoulos, G.; Monteiro, S.; Vosátka, R.; **Krátký, M.**; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1524-1532.
34. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Stolaříková, J. Antimicrobial activity of rhodanine-3-acetic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1839-1845.
35. **Krátký, M.**; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel Sulfamethoxazole Ureas and Oxalamide as Potential Antimycobacterial Agents. *Molecules* **2017**, *22*, 535.

36. **Krátký, M.**; Vinšová, J.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J. Synthesis of readily available fluorophenylalanine derivatives and investigation of their biological activity. *Bioorg. Chem.* **2017**, *71*, 244-256.
37. Baranyai, Z.; **Krátký, M.**; Vosátka, R.; Szabó, N.; Senoner, Z.; Dávid, S.; Stolaříková, J.; Vinšová, J.; Bősze, S. *In vitro* biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 152-173.
38. **Krátký, M.**; Dzurková, M.; Janoušek, O.; Konečná, K.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Molecules* **2017**, *22*, 1573.
39. **Krátký, M.**; Bősze, S.; Baranyai, Z.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and biological evolution of hydrazones derived from 4-(trifluoromethyl)benzohydrazide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5185-5189.
40. Vosátka, R.; **Krátký, M.**; Vinšová, J. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 318-331.
41. Vosátka, R.; **Krátký, M.**; Švarcová, M.; Janoušek, J.; Stolaříková, J.; Madacki, J.; Huszár, S.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Trejtnar, F.; Vinšová, J. New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 824-835.
42. **Krátký, M.**; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Investigation of salicylanilide and 4-chlorophenol-based *N*-monosubstituted carbamates as potential inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 668-673.

## B) Patenty

1. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituovaný derivát kyslíkatých kyselin fosforu, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Původci: Jarmila VINŠOVÁ, **Martin KRÁTKÝ** a Georgios PARASKEVOPOULOS. Česká republika. Č. patentu 305738. 13. 1. 2016.
2. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituted derivative of oxyphosphorus acids, its use and pharmaceutical preparation containing it. Inventors: Jarmila VINŠOVÁ, **Martin KRÁTKÝ** a Georgios PARASKEVOPOULOS. Patent application No. WO 2016095878 A1. 23. 6. 2016 (patentová přihláška).

### **C) Monografie, kapitoly v monografiích**

1. VINŠOVÁ, Jarmila a **KRÁTKÝ, Martin**. Tuberculosis — The Development of New MDR-TB Drugs. In: SHUI, Nguy a ZHOU, K'ung. *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments*. New York: Nova Biomedical, 2009, s. 59-141. ISBN 978-1-60876-055-8.
2. VINŠOVÁ, Jarmila a **KRÁTKÝ, Martin**. *Development of New MDR-TB Drugs*. New York: Nova Biomedical, 2010. 100 s. ISBN 978-1-6168-233-0.

## Použitá literatura

- <sup>1</sup> HARTL, Jiří a kolektiv. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 160 s. ISBN 80-246-1169-4.
- <sup>2</sup> *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2018* [online]. WHO, 2018 [cit. 29.10.2018]. Dostupné z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646-eng.pdf?ua=1>
- <sup>3</sup> Bhat, Z.S.; Rather, M.A.; Maqbool, M.; Ahmad, Z. Drug targets exploited in *Mycobacterium tuberculosis*: Pitfalls and promises on the horizon. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 1733-1747.
- <sup>4</sup> Nguyen, T.V.A.; Anthony, R.M.; Bañuls, A.L.; Nguyen, T.V.A.; Vu, D.H.; Alffenaar, J.W.C. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 1625-1630.
- <sup>5</sup> Evans, J.C.; Mizrahi, V. Priming the tuberculosis drug pipeline: new antimycobacterial targets and agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 39-46.
- <sup>6</sup> Hu, Y.Q.; Zhang, S.; Zhao, F.; Gao, C.; Feng, L.S.; Lv, Z.S.; Xu, Z.; Wu, X. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 255-267.
- <sup>7</sup> Liu, Y.; Matsumoto, M.; Ishida, H.; Ohguro, K.; Yoshitake, M.; Gupta, R.; Geiter, L.; Hafkin, J. Delamanid: From discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). *Tuberculosis (Edinb.)* **2018**, *111*, 20-30.
- <sup>8</sup> VINŠOVÁ, Jarmila a KRÁTKÝ, Martin. Tuberculosis — The Development of New MDR-TB Drugs. In: SHUI, Nguy a ZHOU, K'ung. *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments*. New York: Nova Biomedical, 2009, s. 59-141. ISBN 978-1-60876-055-8.
- <sup>9</sup> VINŠOVÁ, Jarmila a KRÁTKÝ, Martin. *Development of New MDR-TB Drugs*. New York: Nova Biomedical, 2010. 100 s. ISBN 978-1-6168-233-0.
- <sup>10</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově resistantní kmeny. *Chem. Listy* **2010**, *104*, 998-1005.
- <sup>11</sup> Campaniço, A.; Moreira, R.; Lopes, F. Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 525-545.
- <sup>12</sup> Lee, B.S.; Pethe, K. Therapeutic potential of promiscuous targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *42*, 22-26.
- <sup>13</sup> Kratky, M.; Vinsova, J. Sulphur-Containing Heterocycles as Antimycobacterial Agents: Recent Advances in Thiophene and Thiadiazole Derivatives. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2921-2952.
- <sup>14</sup> van Ingen, J.; Boeree, M.J.; van Soolingen, D.; Mouton, J.W. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist. Update* **2012**, *15*, 149-161.
- <sup>15</sup> Sood, G.; Parrish, N. Outbreaks of nontuberculous mycobacteria. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2017**, *30*, 404-409.
- <sup>16</sup> Wu, M.L.; Aziz, D.B.; Dartois, V.; Dick, T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1502-1519.
- <sup>17</sup> Kong, E.F.; Johnson, J.K.; Jabra-Rizk, M.A. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005837.
- <sup>18</sup> Assis, L.M.; Nedeljković, M.; Dessen, A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Resist. Update* **2017**, *31*, 1-14.
- <sup>19</sup> Boswihi, S.S.; Udo, E.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Curr. Med. Res. Pract.* **2018**, *8*, 18-24.

- <sup>20</sup> Fuentefria, A.; Pippi, B.; Dalla Lana, D.; Donato, K.; Andrade, S. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, *66*, 2-13.
- <sup>21</sup> Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br. J. Haematol.* **2014**, *166*, 471-484.
- <sup>22</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Salicylanilide Ester Prodrugs as Potential Antimicrobial Agents – a Review. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3494-3505.
- <sup>23</sup> Fomovska, A.; Wood, R.D.; Mui, E.; Dubey, J.P.; Ferreira, L.R.; Hickman, M.R.; Lee, P.J.; Leed, S.E.; Auschwitz, J.M.; Welsh, W.J.; Sommerville, C.; Woods, S.; Roberts, C.; McLeod, R. Salicylanilide Inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8375-8391.
- <sup>24</sup> Garner, A.L.; Gloeckner, C.; Tricoche, N.; Zakhari, J.S.; Samje, M.; Cho-Ngwa, F.; Lustigman, S.; Janda, K.D. Design, Synthesis, and Biological Activities of Closantel Analogues: Structural Promiscuity and Its Impact on *Onchocerca volvulus*. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3963-3972.
- <sup>25</sup> Lee, I.Y.; Gruber, T.D.; Samuels, A.; Yun, M.; Nam, B.; Kang, M.; Crowley, K.; Winterroth, B.; Boshoff, H.I.; Barry, C.E. Structure-activity relationships of antitubercular salicylanilides consistent with disruption of the proton gradient *via* proton shuttling. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 114-126.
- <sup>26</sup> Brown, M.E.; Fitzner, J.N.; Stevens, T.; Chin, W.; Wright, C.D.; Boyce, J.P. Salicylanilides: Selective inhibitors of interleukin-12p40 production. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8760-8764.
- <sup>27</sup> Liu, Y.; Li, Y.J.; Liu, J.Z.; Yang, L.M.; Li, P.Z.; Zhao, G.S. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Salicylamide Analogues as Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *Lett. Drug Des. Discov.* **2016**, *13*, 314-323.
- <sup>28</sup> Wang, J.; Wu, H.; Li, J.M.; Xu, Q.L.; He, G.W.; Zhong, G.C.; Zhang, Y.C. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of *N*-Aryl-salicylamide Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Chin. J. Org. Chem.* **2013**, *33*, 1026-1034.
- <sup>29</sup> Chen C.L.; Lee, C.C.; Liu, F.L.; Chen, T.C.; Ali, A.A.A.; Chang, D.H.; Huang, H.S. Design, synthesis and SARs of novel salicylanilides as potent inhibitors of RANKL-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *117*, 70-84.
- <sup>30</sup> Kralova, K.; Sersen, F.; Pesko, M.; Waisser, K.; Kubicova, L. 5-Bromo- and 3,5-dibromo-2-hydroxy-*N*-phenylbenzamides – inhibitors of photosynthesis. *Chem. Pap.* **2014**, *68*, 46-52.
- <sup>31</sup> Biagi, G.; Giorgi, I.; Livi, O.; Scartoni, V.; Barili, P.L.; Calderone, V.; Martinotti, E. New 5-substituted-1-(2-hydroxybenzoyl)-benzotriazoles, potassium channel activators. IV. *Farmaco* **2001**, *56*, 827-834.
- <sup>32</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Antiviral Activity of Substituted Salicylanilides – A Review. *Mini Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 956-967.
- <sup>33</sup> Waisser, K.; Hladůvková, J.; Gregor, J.; Rada, T.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Kaustová, J. Relationships Between the Chemical Structure of Antimycobacterial Substances and Their Activity Against Atypical Strains. Part 14: 3-Aryl-6,8-dihalogeno-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, *331*, 3-6.
- <sup>34</sup> Waisser, K.; Macháček, M.; Dostál, H.; Gregor, J.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Kuneš, J.; Palát, K.; Hladůvková, J.; Kaustová, J.; Möllmann, U. Relationships Between the Chemical Structure of Substances and Their Antimycobacterial Activity Against Atypical Strains. Part 18. 3-Phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones and Isosteric 3-Phenylquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1999**, *64*, 1902-1924.

- <sup>35</sup> Waisser, K.; Hladůvková, J.; Kuneš, J.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Karajannis, P.; Kaustová, J. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Salicylanilides Substituted in Position 5. *Chem. Pap.* **2001**, *55*, 121-129.
- <sup>36</sup> Waisser, K.; Bureš, O.; Holý, P.; Kuneš, J.; Oswald, R.; Jirásková, L.; Pour, M.; Klimešová, V.; Kubicová, L.; Kaustová, J. Relationship between the Structure and Antimycobacterial Activity of Substituted Salicylanilides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, *336*, 53-71.
- <sup>37</sup> Waisser, K.; Matyk, J.; Divišová, H.; Husáková, P.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J.; Möllmann, U.; Dahse, H.; Miko, M. The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2006**, *339*, 616-620.
- <sup>38</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Ceckova, M.; Doležal, M.; Staud, F.; Jampilek, J.; Kaustová, J. Salicylanilide Acetates: Synthesis and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2007**, *12*, 1-12.
- <sup>39</sup> Imramovský, A.; Vinšová, J.; Ferriz, J.M.; Buchta, V.; Jampilek, J. Salicylanilide esters of *N*-protected amino acids as novel antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 348-351.
- <sup>40</sup> Imramovský, A.; Vinšová, J.; Ferriz, J.M.; Doležal, R.; Jampilek, J.; Kaustová, J.; Kunc, F. New antituberculotics originated from salicylanilides with promising *in vitro* activity against atypical mycobacterial strains. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3572-3579.
- <sup>41</sup> Ferriz, J.M.; Vávrová, K.; Kunc, F.; Imramovský, A.; Stolaříková, J.; Vavříková, E.; Vinšová, J. Salicylanilide carbamates: Antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1054-1061.
- <sup>42</sup> KRÁTKÝ, Martin. *Syntéza salicylanilidových proléčiv*. Hradec Králové, 2008. 75 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Jarmila Vinšová.
- <sup>43</sup> KRÁTKÝ, Martin. *Design and Synthesis of New Compounds Active Especially Against Multidrug-Resistant Mycobacterial Strains*. Hradec Králové, 2012. 116 s. Disertační práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra anorganické a organické chemie. Školitel Jarmila Vinšová.
- <sup>44</sup> Baranyai, Z.; Krátký, M.; Vosátka, R.; Szabó, E.; Senoner, Z.; Dávid, S.; Stolaříková, J.; Vinšová, J.; Bősze, S. *In vitro* biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsins conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 152-173.
- <sup>45</sup> Ferriz, J.M.; Vinšová, J. Prodrug Design of Phenolic Drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 2033-2052.
- <sup>46</sup> Baranyai, Z.; Krátký, M.; Vinšová, J.; Szabó, N.; Senoner, Z.; Horváti, K.; Stolaříková, J.; Dávid, S.; Bősze, S. Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 692-704.
- <sup>47</sup> Paraskevopoulos, G.; Krátký, M.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Pávek, P.; Besra, G.; Vinšová, J. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7292-7301.
- <sup>48</sup> Paraskevopoulos, G.; Monteiro, S.; Vosátka, R.; Krátký, M.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1524-1532.
- <sup>49</sup> Olender, D.; Żwawiak, J.; Zaprutko, L. Multidirectional Efficacy of Biologically Active Nitro Compounds Included in Medicines. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 54.
- <sup>50</sup> TVRDÝ, Václav. *Syntéza antimikrobiálních látek na bázi derivátů salicylové kyseliny*. Hradec Králové, 2016. 56 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>51</sup> VOSÁTKA, Rudolf. *Design a syntéza nových potenciálně antibakteriálně účinných*

---

sloučenin. Hradec Králové, 2018. Disertační práce (zatím neodevzdáno). Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra organické a bioorganické chemie. Školitel Jarmila Vinšová, konzultant Martin Krátký.

<sup>52</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V.; Horvati, K.; Bősze, S.; Stolaříková, J. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 6106-6113.

<sup>53</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Benzoates. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, Article ID 290628.

<sup>54</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Stolaříková, J. Antimycobacterial Assessment of Salicylanilide Benzoates including Multidrug-Resistant Tuberculosis Strains. *Molecules* **2012**, *17*, 12812-12820.

<sup>55</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid. *Molecules* **2012**, *17*, 9426-9442.

<sup>56</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, E.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J. Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)-benzoates. *Molecules* **2013**, *18*, 3674-3688.

<sup>57</sup> Krátký, M.; Bősze, S.; Baranyai, Z.; Szabó, I.; Stolaříková, J.; Paraskevopoulos, G.; Vinšová, J. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 868-875.

<sup>58</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of salicylanilide pyrazine-2-carboxylates. *Med. Chem.* **2012**, *8*, 732-741.

<sup>59</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, E.; Stolaříková, J. Salicylanilide pyrazinoates inhibit *in vitro* multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 1-9.

<sup>60</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Rodriguez, N.G.; Stolaříková, J. Antimycobacterial Activity of Salicylanilide Benzenesulfonates. *Molecules* **2012**, *17*, 492-503.

<sup>61</sup> Vinšová, J.; Krátký, M.; Komlóová, M.; Dadapeer, E.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Stolaříková, J. Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterase Inhibition. *Molecules* **2014**, *19*, 7152-7168.

<sup>62</sup> Vinšová, J.; Kozic, J.; Krátký, M.; Stolaříková, J.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Buchta, V. Salicylanilide diethyl phosphates: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 728-737.

<sup>63</sup> Krátký, M.; Novotná, E.; Saxena, S.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Salicylanilide Diethyl Phosphates as Potential Inhibitors of Some Mycobacterial Enzymes. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, Article ID 703053.

<sup>64</sup> Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Salicylanilide diethyl phosphates as cholinesterases inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2015**, *58*, 48-52.

<sup>65</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A.; Krátký, M.; Ferriz, J.M.; Palát, K.; Lyčka, A.; Růžička, A. Unprecedented rearrangement of salicylanilide derivatives: imidazolinone intermediate formation. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 23-26.

<sup>66</sup> Imramovský, A.; Ferriz, J.M.; Pauk, K.; Krátký, M.; Vinšová, J. Synthetic Route for the Preparation of 2-Hydroxy-N-[1-(2-hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 414-416.

<sup>67</sup> Wei, Q.; Wang, X.; Cheng, J.H.; Zeng, G.; Sun, D.W. Synthesis and antimicrobial activities of novel sorbic and benzoic acid amide derivatives. *Food Chem.* **2018**, *268*, 220-232.

<sup>68</sup> Aljuffali, I.A.; Lin, C.F.; Chen, C.H.; Fang, J.Y. The codrug approach for facilitating drug delivery and bioactivity. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 1311-1325.

- <sup>69</sup> Anthony, R.M.; den Hertog, A.L.; Soolingen D. 'Happy the man, who, studying nature's laws, Thro' known effects can trace the secret cause.' Do we have enough pieces to solve the pyrazinamide puzzle? *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1750-1754.
- <sup>70</sup> Segretti, N.D.; Simões, C.K.; Corrêa, M.F.; Felli, V.M.A.; Miyata, M.; Cho, S.H.; Franzblau, S.G.; Fernandes, J.P.S. Antimycobacterial activity of pyrazinoate prodrugs in replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* **2016**, *99*, 11-16.
- <sup>71</sup> Costa, L.G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162*, 24-35.
- <sup>72</sup> UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituovaný derivát kyslíkatých kyselin fosforu, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Původci: Jarmila VINŠOVÁ, Martin KRÁTKÝ a Georgios PARASKEVOPOULOS. Česká republika. Č. patentu 305738. 13. 1. 2016.
- <sup>73</sup> UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituted derivative of oxyphosphorus acids, its use and pharmaceutical preparation containing it. Inventors: Jarmila VINŠOVÁ, Martin KRÁTKÝ a Georgios PARASKEVOPOULOS. Patent application No. WO 2016095878 A1. 23. 6. 2016.
- <sup>74</sup> VU, Quynh Anh. *Syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů cholinesteráz*. Bakalářská práce (řešená). Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>75</sup> HOUNGBEDJI, Neto-Honorius. *Syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů cholinesteráz*. Diplomová práce (řešená). Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>76</sup> Zadrazilova, I.; Pospisilova, S.; Masarikova, M.; Imramovsky, A.; Ferriz, J.M.; Vinsova, J.; Cizek, A.; Jampilek, J. Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high *in vitro* activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 197-207.
- <sup>77</sup> Ghosh, A.K.; Brindisi, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2895-2940.
- <sup>78</sup> Krátký, M.; Volková, M.; Novotná, E.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and biological activity of new salicylanilide *N,N*-disubstituted carbamates and thiocarbamates. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4073-4082.
- <sup>79</sup> Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules* **2016**, *21*, 191.
- <sup>80</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Salicylanilide *N*-monosubstituted carbamates: Synthesis and *in vitro* antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1322-1330.
- <sup>81</sup> Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Investigation of salicylanilide and 4-chlorophenol-based *N*-monosubstituted carbamates as potential inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 668-673.
- <sup>82</sup> JAKLOVÁ, Karolína. *Syntéza a charakterizace inhibitorů cholinesteras na bázi hydroxybenzoových kyselin*. Ústí nad Labem, 2018. 93 s. Diplomová práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>83</sup> Mougari, F.; Guglielmetti, L.; Raskine, L.; Sermet-Gaudelus, I.; Veziris, N.; Cambau, E. Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **2016**, *14*, 1139-1154.
- <sup>84</sup> Chaudhaery, S.S.; Roy, K.K.; Shakya, N.; Saxena, G.; Sammi, G.R.; Nazir, A.; Nath, C.; Saxena, A.K. Novel Carbamates as Orally Active Acetylcholinesterase Inhibitors Found to



---

Improve Scopolamine-Induced Cognition Impairment: Pharmacophore-Based Virtual Screening, Synthesis, and Pharmacology. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6490-6505.

<sup>85</sup> Macielag, M.J.; Demers, J.P.; Fraga-Spano, S.A.; Hlasta, D.J.; Johnson, S.G.; Kanojia, R.M.; Russell, R.K.; Sui, Z.; Weidner-Wells, M.A.; Werblood, H.; Foleno, B.D.; Goldschmidt, R.M.; Loeloff, M.J.; Webb, G.C.; Barrett, J.F. Substituted Salicylanilides as Inhibitors of Two-Component Regulatory Systems in Bacteria. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2939-2945.

<sup>86</sup> Hlasta, D.J.; Demers, J.P.; Foleno, B.D.; Fraga-Spano, S.A.; Guan, J.; Hilliard, J.J.; Macielag, M.J.; Ohemeng, K.A.; Sheppard, C.M.; Sui, Z.; Webb, G.C.; Weidner-Wells, M.A.; Werblood, H.; Barrett, J.F. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with Gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1923-1928.

<sup>87</sup> Triola, G.; Wetzel, S.; Ellinger, B.; Koch, M.A.; Hübel, K.; Rauh, D.; Waldmann, H. ATP competitive inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase based on protein kinase inhibitor scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1079-1087.

<sup>88</sup> Chenna, B.C.; Shinkre, B.A.; King, J.R.; Lucius, A.L.; Narayana, S.V.; Velu, S.E. Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 380-385.

<sup>89</sup> Cheng, T.J.; Wu, Y.T.; Yang, S.T.; Lo, K.H.; Chen, S.K.; Chen, Y.H.; Huang, W.I.; Yuan, C.H.; Guo, C.W.; Huang, L.Y.; Chen, K.T.; Shih, H.W.; Cheng, Y.S.; Cheng, W.C.; Wong, C.H. High-throughput identification of antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the transglycosylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8512-8529.

<sup>90</sup> Wu, W.S.; Cheng, W.C.; Cheng, T.J.R.; Wong, C.H. Affinity-Based Screen for Inhibitors of Bacterial Transglycosylase. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2752-2755.

<sup>91</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Novotná, E.; Mandíková, J.; Wsól, V.; Trejtnar, F.; Ulmann, V.; Stolaříková, J.; Fernandes, S.; Bhat, S.; Liu, J.O. Salicylanilide derivatives block *Mycobacterium tuberculosis* through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase. *Tuberculosis (Edinb.)* **2012**, *92*, 434-439.

<sup>92</sup> Kratky, M.; Vinsova, J. Advances in Mycobacterial Isocitrate Lyase Targeting and Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 6126-6137.

<sup>93</sup> Svarcova, M.; Kratky, M.; Vinsova, J. Investigation of Potential Inhibitors of Chorismate-Utilizing Enzymes. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 1383-1399.

<sup>94</sup> Wang, J.Y.; Burger, R.M.; Drlica, K. Role of superoxide in catalase-peroxidase-mediated isoniazid action against mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 709-711.

<sup>95</sup> Vinsova, J.; Imramovsky, A.; Jampilek, J.; Monreal, J.F.; Dolezal, M. Recent Advances on Isoniazide Derivatives. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2008**, *7*, 12-31.

<sup>96</sup> Vilcheze, C.; Jacobs, W.R. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 35-50.

<sup>97</sup> Schroeder, E.K.; de Souza, O.N.; Santos, D.S.; Blanchard, J.S.; Basso, L.A. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2002**, *3*, 197-225.

<sup>98</sup> Judge, V.; Narasimhan, B.; Ahuja, M. Isoniazid: The magic molecule. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 3940-3957.

<sup>99</sup> Beena; Rawat, D.S. Antituberculosis Drug Research: A Critical Overview. *Med. Res. Rev.* **2012**, *33*, 693-764.

<sup>100</sup> Vosátka, R.; Krátký, M.; Švarcová, M.; Janoušek, J.; Stolaříková, J.; Madacki, J.; Huszár, S.; Mikušová, K.; Korduláková, J.; Trejtnar, F.; Vinšová, J. New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 824-835.

- <sup>101</sup> Matei, L.; Bleotu, C.; Baciú, I.; Diaconu, C.C.; Hanganu, A.; Banu, O.; Ionita, P.; Paun, A.; Tatibouet, A.; Zarafu, I. Synthesis and biological activities of some new isonicotinic acid 2-(2-hydroxy-8-substituted-tricyclo[7.3.1.0<sup>2,7</sup>]tridec-13-ylidene)-hydrazides. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 401-410.
- <sup>102</sup> Imramovský, A.; Polanc, S.; Vinšová, J.; Kočevár, M.; Jampílek, J.; Rečková, Z.; Kaustová, J. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2551-2559.
- <sup>103</sup> Vavříková, E.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Košmrlj, J.; Horváti, K.; Bősze, S.; Stolaříková, J.; Imramovský, A.; Vinšová, J. New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing substituents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5902-5909.
- <sup>104</sup> Vavříková, E.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Horváti, K.; Bősze, S.; Stolaříková, J.; Vávrová, K.; Vinšová, J. New fluorine-containing hydrazones active against MDR-tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4937-4945.
- <sup>105</sup> Rychtarčíková, Z.; Krátký, M.; Gazvoda, M.; Komlóová, M.; Polanc, S.; Kočevár, M.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. *N*-Substituted 2-Isonicotinoylhydrazinecarboxamides — New Antimycobacterial Active Molecules. *Molecules* **2014**, *19*, 3851-3868.
- <sup>106</sup> Scior, T.; Garcés-Eisele, S.J. Isoniazid is Not a Lead Compound for its Pyridyl Ring Derivatives, Isonicotinoyl Amides, Hydrazides, and Hydrazones: A Critical Review. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2205-2219.
- <sup>107</sup> Navarrete-Vázquez, G.; Molina-Salinas, G.M.; Duarte-Fajardo, Z.V.; Vargas-Villarreal, J.; Estrada-Soto, S.; Gonzalez-Salazar, F.; Hernandez-Nunez, E.; Said-Fernandes, S. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5502-5508.
- <sup>108</sup> Vosátka, R.; Krátký, M.; Vinšová, J. Triclosan and its derivatives as antimycobacterial active agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *114*, 318-331.
- <sup>109</sup> Rozman, K.; Susic, I.; Fernandez, R.; Young, R.J.; Mendoza, A.; Gobec, S.; Encinas, L. A new 'golden age' for the antitubercular target InhA. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 492-502.
- <sup>110</sup> PFLÉGR, Václav. *Syntéza a charakterizace potenciálních antimikrobních sloučenin*. Ústí nad Labem, 2016. 78 s. Bakalářská práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>111</sup> PFLÉGR, Václav. *Syntéza a hodnocení analog antimykobakteriálně účinných molekul*. Ústí nad Labem, 2018. 135 s. Diplomová práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>112</sup> Wani, T.V.; Bua, S.; Khude, P.S.; Chowdhary, A.H.; Supuran, C.T.; Toraskar, M.P. Evaluation of sulphonamide derivatives acting as inhibitors of human carbonic anhydrase isoforms I, II and *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -class enzyme Rv3273. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 962-971.
- <sup>113</sup> Abrahams, K.A.; Chung, C.W.; Ghidelli-Disse, S.; Rullas, J.; Rebollo-López, M.J.; Gurcha, S.S.; Cox, J.A.G.; Mendoza, A.; Jiménez-Navarro, E.; Martínez-Martínez, M.S.; Neu, M.; Shillings, A.; Homes, P.; Argyrou, A.; Casanueva, R.; Loman, N.J.; Moynihan, P.J.; Lelièvre, J.; Selenski, C.; Axtman, M.; Kremer, L.; Bantscheff, M.; Angulo-Barturen, I.; Izquierdo, M.C.; Cammack, N.C.; Drewes, G.; Ballell, L.; Barros, D.; Besra, G.S.; Bates, R.H. Identification of KasA as the cellular target of an anti-tubercular scaffold. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12581.
- <sup>114</sup> Brown-Elliott, B.A.; Nash, K.A.; Wallace, R.J. Antimicrobial Susceptibility Testing, Drug Resistance Mechanisms, and Therapy of Infections with Nontuberculous Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 545-582.

- <sup>115</sup> Forgacs, P.; Wengenack, N.L.; Hall, L.; Zimmerman, S.K.; Silverman, M.L.; Roberts, G.D. Tuberculosis and Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4789-4793.
- <sup>116</sup> Huang, T.S.; Kunin, C.M.; Yan, B.S.; Chen, Y.; Lee, S.S.J.; Syu, W. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to sulfamethoxazole, trimethoprim and their combination over a 12 year period in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 633-637.
- <sup>117</sup> Ameen, S.M.; Drancourt, M. *In Vitro* Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Trimethoprim and Sulfonamides in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 6370-6371.
- <sup>118</sup> Ameen, S.M.; Drancourt, M. In vitro susceptibility of *Mycobacterium avium* complex mycobacteria to trimethoprim and sulfonamides. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**, *42*, 281-282.
- <sup>119</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Volková, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 433-440.
- <sup>120</sup> Palomino, J.C.; Martin, A. The potential role of trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 539-547.
- <sup>121</sup> Shi, L.; Ge, H.M.; Tan, S.H.; Li, H.Q.; Song, Y.C.; Zhu, H.L.; Tan, R.X. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 558-564.
- <sup>122</sup> VanEperen, A.S.; Segreti, J. Empirical therapy in Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* infections: An Up-To-Date approach. *J. Infect. Chemother.* **2016**, *22*, 351-359.
- <sup>123</sup> Da Silva, C.M.; da Silva, D.L.; Modolo, L.V.; Alves, R.B.; de Resende, M.A.; Martins, C.V.B.; de Fátima, A. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *J. Adv. Res.* **2011**, *2*, 1-8.
- <sup>124</sup> Qin, W.; Long, S.; Panunzio, M.; Biondi, S. Schiff Bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules* **2013**, *18*, 12264-12289.
- <sup>125</sup> Kajal, A.; Bala, S.; Kamboj, S.; Sharma, N.; Saini, V. Schiff bases: A versatile pharmacophore. *J. Catal.* **2013**, *2013*, Article ID 893512.
- <sup>126</sup> Chohan, Z.H.; Youssoufi, M.H.; Jarrahpour, A.; Hadda, T.B. Identification of antibacterial and antifungal pharmacophore sites for potent bacteria and fungi inhibition: Indolenyl sulfonamide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1189-1199.
- <sup>127</sup> El-Baradie, K.Y. Preparation and characterization of sulfadiazine Schiff base complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), and Mn(II). *Monatsh. Chem.* **2005**, *136*, 1139-1155.
- <sup>128</sup> Krátký, M.; Dzurková, M.; Janoušek, J.; Konečná, K.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Molecules* **2017**, *22*, 1573.
- <sup>129</sup> Sriram, D.; Yogeewari, P.; Dhakla, P.; Senthilkumar, P.; Banerjee, D.; Manjashetty, T.H. 5-Nitrofuranyl derivatives: Synthesis and inhibitory activities against growing and dormant mycobacterium species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1152-1154.
- <sup>130</sup> Krátký, M.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Buchta, V.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and antimicrobial activity of sulphamethoxazole-based ureas and imidazolidine-2,4,5-triones. *Chem. Pap.* **2015**, *69*, 1108-1117.
- <sup>131</sup> Krátký, M.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel Sulfamethoxazole Ureas and Oxalamide as Potential Antimycobacterial Agents. *Molecules* **2017**, *22*, 535.
- <sup>132</sup> Brown, J.R.; North, E.J.; Hurdle, J.G.; Morisseau, C.; Scarborough, J.S.; Sun, D.; Korduláková, J.; Scherman, M.S.; Jones, V.; Grzegorzewicz, A.; Crew, R.M.; Jackson, M.; McNeil, M.R.; Lee, R.E. The structure-activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5585-5595.

- <sup>133</sup> North, E.J.; Scherman, M.S.; Bruhn, D.F.; Scarborough, J.S.; Maddox, M.M.; Jones, V.; Grzegorzewicz, A.; Yang, L.; Hess, T.; Morisseau, C.; Jackson, M.; McNeil, M.R.; Lee, R.E. Design, synthesis and anti-tuberculosis activity of 1-adamantyl-3-heteroaryl ureas with improved *in vitro* pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2587-2599.
- <sup>134</sup> Brunner, K.; Maric, S.; Reshma, R.S.; Almqvist, H.; Seashore-Ludlow, B.; Gustavsson, A.L.; Poyraz, Ö.; Yogeewari, P.; Lundbäck, T.; Vallin, M.; Sriram, D.; Schnell, R.; Schneider, G. Inhibitors of the Cysteine Synthase CysM with Antibacterial Potency against Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6848-6859.
- <sup>135</sup> Nayyar, A.; Patel, S.R.; Shaikh, M.; Coutinho, E.; Jain, R. Synthesis, anti-tuberculosis activity and 3D-QSAR study of amino acid conjugates of 4-(adamantan-1-yl) group containing quinolones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2017-2029.
- <sup>136</sup> Bhakta, S.; Scalacci, N.; Maitra, A.; Brown, A.K.; Dasugari, S.; Evangelopoulos, D.; McHugh, T.D.; Mortazavi, P.N.; Twist, A.; Petricci, E.; Manetti, F.; Castagnolo, D. Design and Synthesis of 1-((1,5-Bis(4-chlorophenyl)-2-methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)methyl)-4-methylpiperazine (BM212) and *N*-Adamantan-2-yl-*N'*-((*E*)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) Pyrrole Hybrid Derivatives: Discovery of Potent Antitubercular Agents Effective against Multidrug-Resistant Mycobacteria. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2780-2793.
- <sup>137</sup> Talele, T.T. The “Cyclopropyl Fragment” is a Versatile Player that Frequently Appears in Preclinical/Clinical Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8712-8756.
- <sup>138</sup> KUFA, Martin. *Modifikace antimykobakteriálně aktivních sulfonamidů*. Hradec Králové, 2016. 53 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>139</sup> Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Synthesis and *in vitro* evaluation of novel rhodanine derivatives as potential cholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 23-29.
- <sup>140</sup> Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis of readily available fluorophenylalanine derivatives and investigation of their biological activity. *Bioorg. Chem.* **2017**, *71*, 244-256.
- <sup>141</sup> Tomasic, T.; Masic, L.P. Rhodanine as a Privileged Scaffold in Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1596-1629.
- <sup>142</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Stolaříková, J. Antimicrobial activity of rhodanine-3-acetic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1839-1845.
- <sup>143</sup> Liu, J.; Wu, Y.; Piao, H.; Zhao, X.; Zhang, W.; Wang, Y.; Liu, M. A Comprehensive Review on the Biological and Pharmacological Activities of Rhodanine Based Compounds for Research and Development of Drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* **2018**, *18*, 948-961.
- <sup>144</sup> Tomasic, T.; Masic, L.P. Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 549-560.
- <sup>145</sup> Kaminsky, D.; Kryshchyshyn, A.; Lesyk, R. Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *12*, 1233-1252.
- <sup>146</sup> Krátký, M.; Bösze, S.; Baranyai, Z.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Synthesis and biological evolution of hydrazones derived from 4-(trifluoromethyl)benzohydrazide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5185-5189.
- <sup>147</sup> Verma, G.; Marella, A.; Shaquiquzzaman, M.; Akhtar, M.; Ali, M.R.; Alam, M.M. A review exploring biological activities of hydrazones. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2014**, *6*, 69-80.
- <sup>148</sup> Wakiec, R.; Gabriel, I.; Prasad, R.; Becker, J.M.; Payne, K.W.; Milewski, S. Enhanced Susceptibility to Antifungal Oligopeptides in Yeast Strains Overexpressing ABC Multidrug Efflux Pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 4057-4063.

- <sup>149</sup> Laske, R.; Schonenberger, H.; Holler, E. Investigation on the antiproliferative effects of amino-acid antagonists targeting for aminoacyl-transfer-RNA synthetases. 1. The antibacterial effect. *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 847-852.
- <sup>150</sup> Rastogi, N.; Goh, K.S. Action of 1-isonicotinyl-2-palmitoyl hydrazine against the *Mycobacterium avium* complex and enhancement of its activity by *m*-fluorophenylalanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2061-2064.
- <sup>151</sup> Li, X.; Wang, J.; Zhang, L.; Xu, W. Design, Synthesis, and Preliminary Activity Evaluation of Novel Peptidomimetics as Aminopeptidase N/CD13 Inhibitors. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2011**, *344*, 494-504.
- <sup>152</sup> Strese, S.; Hassan, S.B.; Velander, E.; Haglund, C.; Höglund, M.; Larsson, R.; Gullbo, J. *In vitro* and *in vivo* anti-leukemic activity of the peptidase-potentiated alkylator melflufen in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6341-6352.
- <sup>153</sup> Kratky, M.; Vinsova, J. Antimycobacterial Activity of Quaternary Pyridinium Salts and Pyridinium *N*-oxides – Review. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1343-1355.
- <sup>154</sup> PŘIBÍKOVÁ, Michaela. *Studium jodovaných arenů jako potenciálních léčiv*. Ústí nad Labem, 2018. 134 s. Diplomová práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>155</sup> PŘIBÍKOVÁ, Michaela. *Syntéza a hodnocení biologické aktivity nových Schiffových bazí*. Ústí nad Labem, 2016. 68 s. Bakalářská práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem. Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>156</sup> BROKEŠOVÁ, Kateřina. *Deriváty aminobenzoových kyselin jako potenciální antimikrobní látky*. Hradec Králové, 2018. 108 s. Rigorózní práce (odevzdaná). Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Martin Krátký.
- <sup>157</sup> Svenson, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 445-462.
- <sup>158</sup> Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S.K. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2*, 2-11.
- <sup>159</sup> Suri, S.S.; Fenniri, H.; Singh, B.S. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2007**, *2*, 16.
- <sup>160</sup> Petros, R.A.; DeSimone, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615-627.
- <sup>161</sup> Koul, A.; Arnoult, E.; Lounis, N.; Guillemont, J.; Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **2011**, *469*, 483-490.
- <sup>162</sup> Grotz, E.; Tateosian, N.; Amiano, N.; Cagel, M.; Bernabeu, E.; Chiappetta, D.A.; Moretton, M.A. Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead. *Pharm. Res.* **2018**, *35*, 213
- <sup>163</sup> Patil, K.; Bagade, S.; Bonde, S.; Sharma, S.; Saraogi, G. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 735-745.
- <sup>164</sup> Kaur, M.; Garg, T.; Narang, R.K. A review of emerging trends in the treatment of tuberculosis. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2016**, *44*, 478-484.
- <sup>165</sup> Horváti, K.; Bacsá, B.; Kiss, É.; Gyulai, G.; Fodor, K.; Balka, G.; Rusvai, M.; Szabó, E.; Hudecz, F.; Bősze, S. Nanoparticle Encapsulated Lipopeptide Conjugate of Antitubercular Drug Isoniazid: In Vitro Intracellular Activity and in Vivo Efficacy in a Guinea Pig Model of Tuberculosis. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 2260-2268.
- <sup>166</sup> Houben, E.N.; Nguyen, L.; Pieters, J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 76-85.
- <sup>167</sup> Mitchison, D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* **1985**, *66*, 219-225.

- <sup>168</sup> Filatova, L.Y.; Klyachko, N.L.; Kudryashova, E.V. Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: targeting mannose receptors. *Russ. Chem. Rev.* **2018**, *87*, 374-391.
- <sup>169</sup> Mező, G.; Kalászi, A.; Reményi, J.; Majer, Z.; Hilbert, A.; Láng, O.; Köhidai, L.; Barna, K.; Gaál, D.; Hudecz, F. Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers* **2004**, *73*, 645-656.
- <sup>170</sup> Najjar, V.A.; Nishioka, K. 'Tuftsin': a Natural Phagocytosis Stimulating Peptide. *Nature* **1970**, *228*, 672-673.
- <sup>171</sup> Tzeheval, E.; Segal, S.; Stabinsky, Y.; Fridkin, M.; Spirer, Z.; Feldman, M. Tuftsin (an Ig-Associated Tetrapeptide) Triggers the Immunogenic Function of Macrophages: Implications for Activation of Programmed Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3400-3404.
- <sup>172</sup> Horváti, K.; Mező, G.; Szabó, N.; Hudecz, F.; Bősze, S. Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid – Design, synthesis and antimycobacterial effect. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 385-391.
- <sup>173</sup> Horváti, K.; Bacsa, B.; Szabó, N.; Dávid, S.; Mező, G.; Grolmusz, V.; Vértessy, B.; Hudecz, F.; Bősze, S. Enhanced Cellular Uptake of a New, *in Silico* Identified Antitubercular Candidate by Peptide Conjugation. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 900-907.
- <sup>174</sup> Horváti, K.; Gyulai, G.; Csámpai, A.; Rohonczy, J.; Kiss, É.; Bősze, S. Surface Layer Modification of Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles with Targeting Peptide: A Convenient Synthetic Route for Pluronic F127–Tuftsin Conjugate. *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 1495-1499.
- <sup>175</sup> Ábrahám, A.; Baranyai, Z.; Gyulai, G.; Pári, E.; Horváti, K.; Bősze, S.; Kiss, É. Comparative analysis of new peptide conjugates of antitubercular drug candidates—Model membrane and *in vitro* studies. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2016**, *147*, 106-115.
- <sup>176</sup> Horváti, K.; Bacsa, B.; Szabó, N.; Fodor, K.; Balka, G.; Rusvai, M.; Kiss, É.; Mező, G.; Grolmusz, V.; Vértessy, B.; Hudecz, F.; Bősze, S. Antimycobacterial activity of peptide conjugate of pyridopyrimidine derivative against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of *in vitro* and *in vivo* models. *Tuberculosis (Edinb.)* **2015**, *95*, S207-S211.
- <sup>177</sup> Bai, K.B.; Láng, O.; Orbán, E.; Szabó, R.; Köhidai, L.; Hudecz, F.; Mező, G. Design, Synthesis, and *In Vitro* Activity of Novel Drug Delivery Systems Containing Tuftsin Derivatives and Methotrexate. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2260-2269.
- <sup>178</sup> Kiss, É.; Schnöller, D.; Pribranská, K.; Hill, K.; Péntes, C.B.; Horváti, K.; Bősze, S. Nanoencapsulation of Antitubercular Drug Isoniazid and Its Lipopeptide Conjugate. *J. Disper. Sci. Technol.* **2011**, *32*, 1728-1734.
- <sup>179</sup> Vandal, O.H.; Nathan, C.F.; Ehrt, S. Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4714-4721.
- <sup>180</sup> Majumdar, S.; Siahaan, T.J. Peptide-mediated targeted drug delivery. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 637-658.
- <sup>181</sup> Bycroft, B.W.; Chan, W.C.; Chhabra, S.R.; Hone, N.D.J. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, *9*, 778-779.
- <sup>182</sup> Shao, J.; Tam, J.P. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.