

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Príprava derivátov pyrazínamidu ako potenciálnych antiinfektív.
(Štúdium vzťahov medzi chemickou štruktúrou a biologickou aktivitou)**

**Dizertačná práca
(Súbor publikovaných prác)**

PharmDr. Martin Juhás

Školiteľ: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

POĎAKOVANIE

Rád by som sa poďakoval hlavne svojmu školiteľovi **doc. PharmDr. Janovi Zitkovi, Ph.D.** a konzultantovi **prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D.** za odborné vedenie a cenné rady pri vypracovávaní tejto dizertačnej práce.

Ďalej by som sa rád poďakoval:

- **PharmDr. Ondřejovi Jand'ourkovi, Ph.D., RNDr. Kláre Konečnej, Ph.D. a Ide Dufkovej** z Katedry biologických a lekárskejších vied za hodnotenie antimykobakteriálnej (OJ), antibakteriálnej a antifungálnej aktivity (KK, ID)
- **MUDr. Pavle Paterovej, Ph.D.** z Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za hodnotenie antimykobakteriálnej aktivity na infekčných a rezistentných kmeňoch
- **PharmDr. Jiřímu Janouškovi, Ph.D. a PharmDr. Pavlovi Bártovi, Ph.D.** z Katedry farmakologie a toxikologie za meranie cytotoxicity
- **doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D.** z Katedry organické a bioorganické chemie za meranie NMR spektier
- a všetkým ostatným kolegom z Farmaceutickej fakulty vrátane mojich diplomantov, ktorí prispeli k vytvoreniu tejto práce.

Táto dizertačná práca bola podporená nasledujúcimi projektami a grantami:

- SVV 260 547
- ERASMUS+
- Grantové schémata na UK (reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935)
- Grantová agentúra ČR, projekt č. 20-19638Y
- Ministerstvo zdravotnictví ČR, grant č. NU21-05-00482

Výpočtové kapacity boli poskytnuté organizáciou MetaCentrum (MetaVO), projekt "e-Infrastruktura CZ" (e-INFRA CZ LM2018140) podporovaný Ministerstvom školství, mládeže a tělovýchovy ČR.

Prehlásenie autora:

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne (pod vedením svojho školiteľa a konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práce nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

PharmDr. Martin Juhás

V Hradci Králové dňa

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Školiace pracovisko

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Doktorský študijný program

Farmaceutická chemie

Kandidát

PharmDr. Martin Juhás

Školiteľ

doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant

prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Názov dizertačnej práce

Príprava derivátov pyrazínamidu ako potenciálnych antiinfektív. (Štúdium vzťahov medzi chemickou štruktúrou a biologickou aktivitou)

Rezistencia na antimikrobiálne látky sa považuje za jednu z najväčších hrozieb 21. storočia. Do pandémie COVID-19 bola tuberkulóza (TB) najsmrteľnejším infekčným ochorením a každý rok bola zodpovedná za približne jeden a pol milióna úmrtí. Rezistencia je u TB veľmi častá. Táto práca sa preto zaoberá výskumom nových potenciálnych antimikrobiálnych látok so zvláštnym zameraním na aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), hlavnému pôvodcovi TB.

Úvod práce stručne popisuje súčasný stav výskumu derivátov pyrazínamidu, ktorý slúžil ako predloková štruktúra pripravených látok a prináša základný prehľad o moderných počítačových metódach používaných v dizajne liečiv. Nasleduje komentár, ktorý prináša súhrn použitých chemických a biologických metód, a získaných vzťahov štruktúry a účinku v predkladaných prácach.

Všetky pripravené deriváty boli testované na štandardných mykobakteriálnych, ale aj bakteriálnych a fungálnych kmeňoch klinického významu zahrňujúcich niektoré rezistentné kmene. Najaktívnejšie zlúčeniny dosiahli MIC = 1,95–3.13 µg/ml (proti Mtb), čo pokladáme za vhodný štartovací bod pre ďalšie štruktúrne obmeny, niektoré zatiaľ nepublikované výsledky sú tiež súčasťou tohto komentára. Aktivita najatraktívnejších látok bola skúmaná aj na bakteriálnych a mykobakteriálnych klinických izolátoch či *in vivo* na myšom modeli TB. Z hľadiska toxicity sa jednalo o netoxické, či mierne toxické zlúčeniny s dobrou selektivitou. Pri riešení práce bola použitá široká paleta experimentálnych aj počítačových metód, ktoré pomohli pri štúdiu možného mechanizmu účinku. Výsledky popisované v komentovaných publikáciách tak prinášajú cenné poznatky o nových potenciálnych antimikrobiálnych liečivách.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Training Workplace Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Doctoral Degree Program Pharmaceutical Chemistry

Candidate **PharmDr. Martin Juhás**

Supervisor doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Advisor prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis **Preparation of Pyrazinamide Derivatives as Potential Antiinfectives. (Study of Structure Activity Relationships)**

Antimicrobial resistance is considered one of the greatest threats of the 21st century. Until the COVID-19 pandemic, tuberculosis (TB) was the deadliest infectious disease, responsible for approx. one and a half million deaths each year. Resistance is very common in TB. Therefore, this work deals with the research of new potential antimicrobial substances with a particular focus on the activity against *Mycobacterium tuberculosis*, the main cause of TB.

The introduction of this work briefly describes the current state of research on derivatives of pyrazinamide, which served as the prototype structure of the prepared substances and follows with a basic overview of modern computer-based methods used in drug design. The next part comments on the used chemical and biological methods, and the obtained structure-activity relationships in the presented publications.

All prepared derivatives were tested against standard mycobacterial but also bacterial and fungal strains of clinical importance, including some resistant strains. The most active compounds reached MIC = 1.95–3.13 µg/ml, which we consider a suitable starting point for further structural optimizations; some unpublished results are also part of this commentary. The activity of the most attractive derivatives was also investigated against bacterial and mycobacterial clinical isolates or *in vivo* on a TB mouse model. Prepared derivatives were non-toxic or slightly toxic with good selectivity. A wide variety of experimental and computer methods were used during the elaboration of the thesis, which helped in the study of the possible mechanism of action. The results described in the presented publications thus describe valuable knowledge about new potential antimicrobial drugs.

ZOZNAM SKRATIEK

CADD	počítačom podporovaný dizajn liečiv
CDI	<i>N,N'</i> -karbonyldiimidazol
DCS	D-cykloserín
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamín
DFT	teória funkcionálu hustoty
FAS	syntáza mastných kyselín
HTS, HTVS	vysokovýkonný skríning, vysokovýkonný virtuálny skríning
IČ	infračervená spektroskopia
MD	molekulová dynamika
MetAP	metionín aminopeptidáza
MM	molekulová mechanika
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
PDB	Protein Data Bank
PanD	aspartát dekarboxyláza
POA	pyrazínkarboxylová kyselina
PZA	pyrazínamid
QM	kvantová mechanika
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze
RR/MDR -TB	rifampicín rezistentná/multi-drug rezistentná tuberkulóza
SAR	vzťah štruktúry a účinku
SBDD	structure-based drug design
TB	tuberkulóza
THF	tetrahydrofurán
XDR-TB	extenzívne rezistentná tuberkulóza
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

OBSAH

ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	6
ZOZNAM SKRATIEK.....	7
1. CIELE PRÁCE.....	9
2. PREHLAD SÚČASNÉHO STAVU RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	10
2.1. INFEKČNÉ OCHORENIA A ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA.....	10
2.2. PYRAZÍNAMID A JEHO DERIVÁTY	11
2.2.1. <i>Mechanizmus účinku pyrazínamidu</i>	11
2.2.2. <i>Štruktúrne obmeny pyrazínamidu</i>	12
2.3. ZÍSKAVANIE NOVÝCH LIEČIV	14
2.4. POČÍTAČOM PODPOROVANÝ NÁVRH LIEČIV	14
2.4.1. <i>Molekulová mechanika verzus kvantová mechanika</i>	15
2.4.2. <i>Vybrané metódy počítačového dizajnu</i>	17
3. KOMENTÁR PUBLIKOVANÝCH PRÁC	22
3.1. POUŽITÉ METÓDY.....	22
3.1.1. <i>Chemická syntéza</i>	22
3.1.2. <i>Purifikácia a analytické hodnotenie</i>	25
3.1.3. <i>Počítačové metódy</i>	26
3.1.4. <i>Biologické testovanie</i>	28
3.2. ŠTRUKTÚRNE OBMENY PUBLIKOVANÝCH LÁTKO (P1–P4).....	30
3.2.1. <i>Deriváty pyrazínamidu (P1–P2)</i>	30
3.2.2. <i>Enzymatické ciele, racionálny dizajn (P3–P4)</i>	32
3.3. PUBLIKÁCIE S VÝRAZNÝM PODIELOM <i>IN SILICO</i> MODELOVANIA (P5–P8).....	39
3.3.1. <i>Analýza neväzbových interakcií pomocou silových polí (P5)</i>	39
3.3.2. <i>Dockingové štúdie sulfonamidových derivátov (P6)</i>	41
3.3.3. <i>Štúdie s využitím molekulovej dynamiky (P7, P8)</i>	42
3.4. ZATIAĽ NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY A MOŽNÉ NADVÄZNOTI.....	43
3.5. SÚHRNNÝ ZÁVER	45
4. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ.....	48
4.1. PUBLIKÁCIE POUŽITÉ V TOMTO KOMENTÁRI.....	48
4.2. PUBLIKÁCIE NEZAHNUTÉ DO KOMENTÁRA	50
5. PRÍSPEVKY NA KONFERENCIÁCH	51
5.1. PREDNÁŠKY	51
5.2. POSTEROVÉ ZDELENIA	52
6. VEDECKÉ OCENENIA.....	52
7. ÚČASŤ NA GRANTOCH	52
8. POUŽITÁ LITERATÚRA	53
9. ZOZNAM PRÍLOH	61

1. CIELE PRÁCE

Cieľom mojej práce bolo:

1. Pripraviť deriváty pyrazínamidu s potenciálnou antimikrobiálnou aktivitou
2. Definovať vzťahy štruktúry a antimikrobiálnej aktivity nasyntetizovaných látok
3. Pri návrhu látok použiť princípy a metódy racionálneho dizajnu, vrátane počítačom-podporovaného dizajnu

2. PREHLAD SÚČASNÉHO STAVU RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1. INFEKČNÉ OCHORENIA A ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA

Pandémia COVID-19 ukázala silu a ničivý potenciál infekčných ochorení, no problémy s ich zvládaním začali už dávnejšie. Podľa posledných celosvetových štatistík zverejnených Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) boli infekčné ochorenia (v terminológii WHO označované ako „communicable diseases“) zodpovedné v roku 2019 za viac než 7,7 miliónov úmrtí z celkového počtu cca 50 mil. Z tohto alarmujúceho čísla viac ako 1,2 mil. predstavovala tuberkulóza (TB) (dáta dostupné online [1, 2]). Bohužiaľ, TB opäť naberá na sile a v roku 2022 dosiahol počet úmrtí asi 1,4 mil [3]. Čísla nezahŕňajú HIV pozitívnych pacientov, u ktorých je TB častou koinfekciou. To robí z TB celosvetovo hlavnú príčinu úmrtí spôsobených jedným infekčným agens, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a to už viac než 20 rokov. Aj napriek rôznym pokrokom v liečbe a liekovej politike je stále vysoké percento prípadov TB spôsobených rezistentnými kmeňmi (RR/MDR-TB, XDR-TB), u ktorých je liečba výrazne komplikovanejšia, drahšia a pre pacienta menej účinná [3].

Práve rozvoj liekovej rezistencie predstavuje u infekčných ochorení veľkú hrozbu, ktorá však nie je limitovaná len na TB, ale je čím ďalej častejšie aj u bakteriálnych ochorení. Najhoršie v tomto smere sú baktérie súhrnne označované ako ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*) [4], zaradené na zoznam baktérií WHO urgentne vyžadujúcich nové antibiotiká [5]. U niektorých gram negatívnych baktérií je už teraz možné pozorovať „pan-drug“ rezistenciu, teda necitlivosť na všetky používané skupiny antibakteriálnych látok [6, 7]. Žiaľ, vývoj antimikrobiálnych liečiv je veľmi nákladný proces s neistým výsledkom, a preto nie je komerčne atraktívny.

Pojem antiinfektíva, tak ako je použitý v názve tejto dizertačnej práce zahrňuje všetky liečivá (účinné látky), ktoré sú používané pri liečbe infekčných ochorení. Zoznam esenciálnych liečiv WHO z roku 2019 pod antiinfektíva zahrňuje anthelmintika, antibakteriálne látky (zahrňujú antituberkulotiká), antifungálne látky, antivirotika, antiprotozoika a niektoré antiparazitika [8]. Vzhľadom na vyššie popísanú situáciu ohľadom narastajúcej antimikrobiálnej rezistencie, a tiež kvôli zameraniu skupiny vedenej prof. Martinom Doležalom, sa moja práca zameriavala špecificky na vývoj nových potenciálnych antituberkulotík, sekundárne antibakteriálnych a antifungálnych látok.

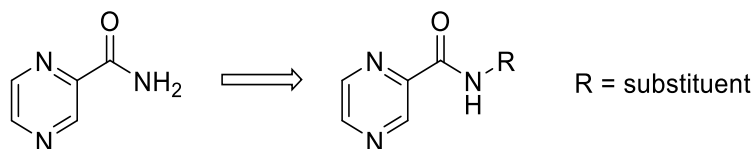
2.2.2. Štruktúrne obmeny pyrazínamidu

Molekula PZA je veľmi jednoduchá. Je preto logické, že jej štruktúrnym obmenám sa venovala veľká pozornosť. Vývoj derivátov PZA má dlhoročnú tradíciu aj na univerzitách v Českej a Slovenskej republike, viď napr. referencie [23-25].

Nasledujúca diskusia popisuje dôležité vzťahy štruktúry a účinku (SAR) PZA v kontexte zlúčenín pripravených v tejto práci. *In vivo* aktivita je paradoxne dostupná len u malého množstva starších derivátov pochádzajúcich hlavne z 50. rokov minulého storočia. V novších článkoch sa uvádza spravidla len aktivita *in vitro*, čo predstavuje značné problémy pri interpretácií SAR.

Samotný PZA má veľmi malé možnosti obmien. Náhrada pyrazínu za iný aromatický kruh, izosterné zámény karboxamidovej skupiny aj substitúcia PZA malým hydrofilným či lipofilným substituentom viedli až na niektoré výnimky k antituberkuloticky menej účinným látkam (niektoré testované aj *in vivo*) [26-29]. Dlhodobo nádejnou látkou bol 5-chlórpyrazínamid (5-Cl-PZA), ktorý mal výbornú širokospektrálnu *in vitro* aktivitu [30] a známy mechanizmus účinku – inhibícia FAS I [31]. Bohužiaľ sa ukázalo, že *in vivo* je neúčinný [32]. Sľubná bola tiež príprava proliečiv na báze esterov (5-Cl-)POA, ktoré dosahovali niekoľkonásobne lepšiu aktivitu ako PZA *in vitro* a *ex vivo* v makrofágoch [33-35]. *In vivo* bol v niektorých tkanivách zaznamenaný znížený rozvoj nekrózy, čo naznačovalo možné výhody oproti PZA. Vo všeobecnosti však bola aktivita esterov POA zrovnateľná s PZA, a preto sa zrejme v praxi neuplatnia [36].

Veľká časť syntetických obmien bola smerovaná na prípravu *N*-substituovaných karboxamidov (substituent R, Obrázok 1). V nasledujúcom texte sa ako *N*-substituent vždy myslí substituent na dusíku karboxamidovej skupiny.



Obrázok 1 *N*-substituované deriváty PZA

Alifatické amidy (R = alkyl) sa v porovnaní s alifatickými esterami neosvedčili [37-39]. Výnimku tvorili len niektoré, hlavne cyklické amíny (R = aminoalkyl). Látka morinamid (morfazinamid) pripravená v 60. rokoch sa dokonca určitú dobu využívala aj klinicky, išlo o proliečivo typu Mannichovej báze PZA s morfolínom. Dnes sa už nepoužíva [40, 41].

Zvýšená pozornosť bola venovaná príprave aromatických karboxamidov (R = aryl prípadne arylalkyl). Naša skupina prispela značným počtom zlúčenín tohto typu, a poukázala tak na niektoré dôležité vzťahy štruktúry a účinku. *N*-fenyلكarboxamidy ako najjednoduchšie aromatické *N*-substituované deriváty PZA boli *in vitro* neúčinné. Určitá, no stále slabá *in vitro* aktivita bola zaznamenaná len u derivátov obsahujúcich fenylové jadro substituované lipofilnou skupinou [42]. Výrazné zlepšenie aktivity priniesla následná substitúcia pyrazínového jadra napr. chlór (v polohe 5) [43] či alkylamino skupinou (v polohe 6) [42]. Iná substitúcia, napr. karboxylová skupina bola nežiadúca [44]. Dobrú aktivitu mali deriváty objemnejších *N*-heteroaryl karboxamidov (napr. R = 4-fenylthiazol) [45], zatiaľ čo malé *N*-heteroaryl karboxamidy (napr. R = pyridin-2-yl) neboli účinné [26]. Výrazne účinnejšie ako *N*-fenyلكarboxamidy boli ich vyššie homológy – *N*-benzyلكarboxamidy [44]. Aktivitu sa opäť podarilo zvýšiť substitúciou pyrazínového skeletu alkylamino skupinou v polohách 5 a 6 [44], poloha 3 sa neosvedčila [46].

Hydrolyza *N*-substituovaných karboxamidov PZA na POA je veľmi pomalá [34]. *N*-benzyلكarboxamidy preto patria k veľmi perspektívnym látkam, nakoľko s najväčšou pravdepodobnosťou fungujú iným mechanizmom účinku než PZA, ktorý vyžaduje hydrolyzu na POA (viď Schéma 1).

V ostatných rokoch sa výrazná pozornosť obrátila na štúdium derivátov POA ako aktívnej formy PZA. Súvisí to hlavne s dostupnosťou dlho očakávanej kryštalografickej štruktúry POA-PanD (PDB ID: 6OYY), ktorá umožnila uplatniť moderné prístupy dizajnu novej generácie antituberkulotík. Jedná sa hlavne o deriváty substituované na pyrazínovom skelete, nakoľko PanD vyžaduje okrem iného prítomnosť voľnej karboxylovej skupiny. Jej akákoľvek obmena je preto možná len s cieľom prípravy proliečiv či zlepšenia rozpustnosti prevedením na soli [21]. Systematickým obmenám POA sa v ucelenej sérii venoval Hegde a kolektív [47]. Podobne ako v prípade vyššie komentovaných *N*-benzylových derivátov [21], aj Hegde poukázal na dôležitosť alkylamino substitúcie pyrazínu. V ich prípade sa však jednalo o polohu 3 a 5, pričom poloha 6 tolerovala v podstate len chlór alebo prekvapivo zbytok odvodený od amidu kyseliny propiónovej (u *N*-benzyl derivátov popísaných vyššie bola vhodná substitúcia v polohe 5 a 6, a nie 3). Bohužiaľ, u študovaných derivátov POA bola slabá korelácia antimykobakteriálnej aktivity a inhibície PanD. Deriváty 3- a 5-alkylamino-POA majú tak iný, zatiaľ neznámy mechanizmus účinku, čo však žiadnym spôsobom neznižuje ich dôležitosť v kontexte nových potenciálnych antituberkulotík.

Na zlepšenie antimykobakteriálnej aktivity pri zachovaní inhibície PanD sa zdá byť vhodný arylkarboxamidový zbytok v polohe 3 ako popísal Rangunathan a kolektív [48]. Aktivita derivátov tohto štruktúrneho typu bola pozorovaná už v 60. rokoch minulého storočia [49]. Detailné SAR antimykobakteriálnych inhibítorov PanD sú bohužiaľ zatiaľ neúplné, no očakáva sa, že budú v budúcnosti pribúdať.

2.3. ZÍSKAVANIE NOVÝCH LIEČIV

Pri hľadaní nových liečiv sa obecné uplatňujú dva princípy, ktoré sa svojou podstatou dopĺňujú. Modernejší cieľový skrining (z angl. „target-based screening“) a starší fenotypický skrining (z angl. „phenotypic screening“).

Pri **cielenom skriningu** sa na základe znalostí patofyziologických procesov ochorení identifikuje konkrétny molekulárny cieľ, ktorého moduláciou by sa mal dosiahnuť žiadaný terapeutický efekt. Cieľový skrining je rýchlejší aj lacnejší než fenotypický skrining. Jeho limitácia je však zrejmá. Ak je cieľ zvolený nesprávne, získané látky sú prakticky nepoužiteľné (na dané ochorenie). Cieľový skrining preto vždy vyžaduje fenotypickú validáciu [50].

U **fenotypického skriningu** sa látky testujú priamo na celých organizmoch prípadne čo najlepších modeloch bez nutnosti *a priori* poznať ich mechanizmus účinku. Látky sú tak schopné ovplyvňovať ochorenie na všetkých potrebných úrovniach, ktoré u cieľového skriningu nemusia byť známe. Najväčšia nevýhoda fenotypického skriningu je vysoká cena a náročné následné hľadanie a validácia mechanizmu účinku. Fenotypický skrining má však stále nezastupiteľné miesto napríklad aj vo vývoji antimikrobiálnych liečiv [50, 51].

S ohľadom na bezpečnosť pacientov sa nové látky nemôžu testovať priamo na ľuďoch bez akejkoľvek znalosti o ich mechanizme účinku a toxicite. Preto sa oba princípy v praxi používajú súbežne a komplementárne.

2.4. POČÍTAČOM PODPOROVANÝ NÁVRH LIEČIV

Využitie počítačov je dnes už neoddeliteľnou súčasťou vývoja nových liečiv a má výrazný podiel aj v tejto práci. V anglickej literatúre sa používa termín „computer-aided drug design“, skrátene CADD. Je dôležité zdôrazniť, že hoci sú *in silico* (počítačové) metódy dnes už na veľmi vysokej úrovni, stále nedosiahli, a ešte dlho nedosiahnu stavu, ktorý by umožnil „vytvárať“ nové liečivá bez použitia bežných, tzv. „wet-lab“ pokusov.

CADD sa delí na „**structure-based drug design**“ (SBDD) a „**ligand-based drug design**“ (LBDD) podľa toho, či je známa štruktúra cieľa alebo sa používa len vedomosť aktivít látok,

ktoré na daný cieľ pôsobia (pozitívne či negatívne). V nasledujúcich kapitolách sa budem venovať len metódam SBDD, nakoľko som ich výrazne používal počas mojej práce, zatiaľ čo LBDD metódy som použil len okrajovo.

2.4.1. Molekulová mechanika verzus kvantová mechanika

Vo všeobecnosti platí, že čím je počítačová metóda presnejšia, tým viac počítačového výkonu potrebuje. Z hľadiska výpočtovej náročnosti sa rozlišujú metódy založené na princípe molekulovej mechaniky (MM) a kvantovej mechaniky (QM). Oba majú zatiaľ svoje nenahraditeľné miesto.

2.4.1.1. Molekulová mechanika

Molekulová mechanika (MM) popisuje správanie molekúl pomocou klasickej fyziky. Atómy molekúl sú aproximované ako guľové telesá, ktoré sú navzájom pospájané pružinami. Základom molekulovej mechaniky sú silové polia, matematické rovnice popisujúce potenciálnu energiu systému. Pri práci s MM sa uvažujú len jadrá atómov, vplyv elektrónov je vnímaný len implicitne napr. vo forme parciálneho náboja. Väčšina silových polí preto neumožňuje vznik a zánik kovalentných väzieb, a preto sa nehodia napr. na štúdium chemických reakcií [52].

Celková potenciálna energia chemického systému popísaného MM je daná sumou väzbovej a neväzbovej energie. Konkrétne matematické formy silových polí sa však často líšia. Pre ilustráciu vid' referenciu [52] alebo priamo napr. manuál softvéru Amber, ktorý implementuje rovnomenné silové pole AMBER [53].

Silové polia obsahujú množstvo konštánt, tzv. parametrov, ktoré sa získavajú na základe experimentálnych hodnôt (napr. z IČ alebo NMR spektroskopie, kryštalografie) alebo z presných kvantových výpočtov počas procesu, ktorý sa nazýva parametrizácia. Cieľom parametrizácie je nastaviť parametre tak aby silové pole korektné reprodukovalo „experimentálne“ hodnoty [54]. Základom silových polí je tiež „atom typing“, kategorizácia atómov do skupín ako napr. uhlík alifatického karbonylu, karboxylový kyslík atď. To umožňuje zovšeobecniť a zjednodušiť komplikované systémy na základe menšieho množstva typov atómov. U biologických makromolekúl (proteíny, nukleové kyseliny) je typing jednoduchší, pretože majú v zásade konečný počet podobných stavebných jednotiek. U malých molekúl je však problematický kvôli ich variabilite [52].

Uplatnenie silových polí je vo farmaceutickej chémii značné. Prakticky všetky SBDD metódy pracujú so silovými poľami, pretože sú v porovnaní metódami založenými na princípe

kvantovej mechaniky rýchlejšie. Pre príklad metód použitých v tejto práci viď kapitolu 2.4.2 Vybrané metódy počítačového dizajnu.

2.4.1.2. *Kvantová mechanika*

Pri výpočte niektorých vlastností molekúl je použitie molekulovej mechaniky príliš nepresné či úplne nemožné, a preto je nutné použiť kvantovú mechaniku (QM). Nakoľko sa jedná o veľmi komplexnú problematiku, nasledujúca časť je veľmi zjednodušená a má za cieľ ilustrovať len základné používané princípy.

Cieľom QM v chémii je vyriešenie Schrödingerovej rovnice v tvare $H\Psi = E\Psi$ popisujúcej elektrónovú konfiguráciu, kde Ψ je vlnová funkcia, ktorá predstavuje absolútny a úplný popis systému a H je Hamiltonský operátor, ktorý popisuje celkovú energiu. V metódach QM sa na rozdiel od MM nezanedbáva explicitný vplyv elektrónov a preto sú vhodné aj na modelovanie chemických reakcií, kde dochádza k vzniku a zániku kovalentných väzieb. Z toho dôvodu je popis systému v QM výrazne komplikovanejší než u MM [55].

Pri výpočtoch rozlišujeme *ab initio* metódy (tiež metódy z prvých princípov), metódy založené na teórii funkcionálu hustoty (DFT teória, z angl. „density-functional theory“) a semi-empirické metódy [56]. Pri ***ab initio* metódach** sa priamo počíta alebo lepšie povedané aproximuje vlnová funkcia, no dosiahnutie presných výsledkov je výpočtovo veľmi náročné. Ďalšou možnosťou je použitie **DFT metód**, ktoré predstavujú alternatívny prístup založený na výpočte elektrónovej hustoty (nepracuje sa s vlnovou funkciou). Tieto metódy sú menej výpočtovo náročné pri dosiahnutí pomerne vysokej presnosti (v závislosti od použitého funkcionálu), a momentálne sú najpoužívanejšie [57]. Metódy DFT sa v niektorej literatúre radia k *ab initio* metódam. U oboch metód sa uplatňuje niekoľko základných aproximácií, napr. Born-Oppenheimerova aproximácia oddeľujúca pohyb elektrónov od pohybu jadier, čo umožňuje aplikovať výpočty aj na väčšie molekuly než vodík (či jemu podobné). **Semi-empirické metódy**, na rozdiel od *ab initio* a DFT metód, využívajú ďalšie aproximácie a konštanty aby reprodukovali konkrétne experimentálne pozorovania. Sú preto výrazne rýchlejšie, no ich presnosť je obecné nižšia a veľmi závisí od použitej semi-empirickej metódy [55].

Aj napriek exponenciálnemu rastu výpočtového výkonu v posledných rokoch je *ab initio* QM stále vhodná na použitie len u relatívne malých molekúl. Postupom času však vzniklo niekoľko postupov, ktoré umožňujú použiť QM aj pri štúdiu väčších, biologicky relevantných systémov. Za zmienku stoja prístupy kombinujúce QM a MM (QM/MM metódy) kde sa dôležitejšia,

spravidla menšia časť systému popíše kvantovou mechanikou a zvyšná časť molekulovou mechanikou [55].

QM je široko využívaná vo farmaceutickom výskume [58]. Používa sa napr. na výpočet energie konformérov pri konformačnom samplingu [59], štúdium spektrálnych vlastností látok (aproximácia NMR, IČ, UV spektier) [60], štúdium enzymatických procesov [61], a iné. Dá sa tiež použiť na presné hodnotenie sily neväzbových interakcií, čo má veľký význam pri výpočte väzbových energií potenciálnych liečiv [62].

2.4.2. Vybrané metódy počítačového dizajnu

V nasledujúcich kapitolách predstavím dve najpoužívanejšie metódy SBDD, ktoré som v mojej práci používal: docking a molekulovú dynamiku.

Docking

Docking je jedna z najpoužívanejších metód SBDD a slúži na predikovanie väzbových módov študovaných molekúl v aktívnom mieste receptoru [63]. Z hľadiska terminológie sa pojmom receptor označuje akákoľvek makromolekula do ktorej sa má naviazať malá molekula, obecné označovaná ako ligand. Docking pozostáva z dvoch základných krokov. Najskôr dochádza k (1) *samplingu konformácií ligandu* v aktívnom mieste (konformačný sampling), ktoré sú následne (2) *energeticky ohodnotené* pomocou skórovacej funkcie. Výsledkom dockingu sú pravdepodobné polohy ligandu v receptore nazývané pózy a ich skóre, ktoré najčastejšie odpovedá väzbovej energii [63]. Samplingové a skórovacie algoritmy sa medzi softvérmi líšia a je preto bežné, že rôzne programy dávajú rozdielne pózy i skóre pri tom istom vstupe [64, 65]. Pred každým dokovaním sa preto odporúča overiť použiteľnosť dockovacieho algoritmu redockingom. Jedná sa v podstate o docking, v ktorom ako ligand vystupuje látka so známym väzbovým módom, napr. kokryštalizovaný inhibítor. Získané pózy sa porovnávajú s experimentálnou pózou a mali by ju čo najlepšie reprodukovat'.

I dnes je najbežnejší docking s rigidným receptorom („**rigid receptor docking**“). Jedná sa o aplikovanie väzbovej teórie zámku a kľúča [66] kde receptor predstavuje zámok a ligand hľadá pózu, v ktorej by sa z neho stal pasujúci kľúč. Atómy receptoru sú zafixované vo vstupných koordinátoch a nemenia sa. Ligand je voľne otáčavý, teda schopný plne preskúmať konformačný priestor vo fáze samplingu. V špecifických prípadoch, napr. reskórovanie už nadokovaných póz inou skórovacou funkciou alebo dokovanie predpripravených konformačných knižníc ligandov je možné zafixovať aj ligand („**rigid ligand and rigid receptor docking**“). Rigidný docking je menej výpočtovo náročný [63, 67].

Na získanie presnejších výsledkov sa používa tzv. „**flexible docking**“ alebo „**induced-fit docking**“, v ktorom je flexibilný ligand aj receptor. Ide o aplikáciu rovnomennej induced-fit väzbovej teórie popísanej Koshlandom [68], ktorá predpokladá, že naviazanie ligandu vyvolá vzájomné konformačné zmeny u ligandu i receptoru a dôjde k ich vzájomnému prispôbeniu sa. Kvôli výrazne vyšším nárokom na výpočtový výkon sa induced-fit teória často uplatňuje len v okolí aktívneho miesta, teda voľne otáčavé sú okrem ligandu len vybrané aminokyseliny, no existuje mnoho prístupov ako vyriešiť vzájomnú flexibilitu, ktoré sa u softvérov líšia [63, 67]. Pravý induced-fit docking by však predstavovala len molekulová dynamika, no ani tá často nie je dostatočná (dostatočne dlhá) na preskúmanie všetkých možných póz.

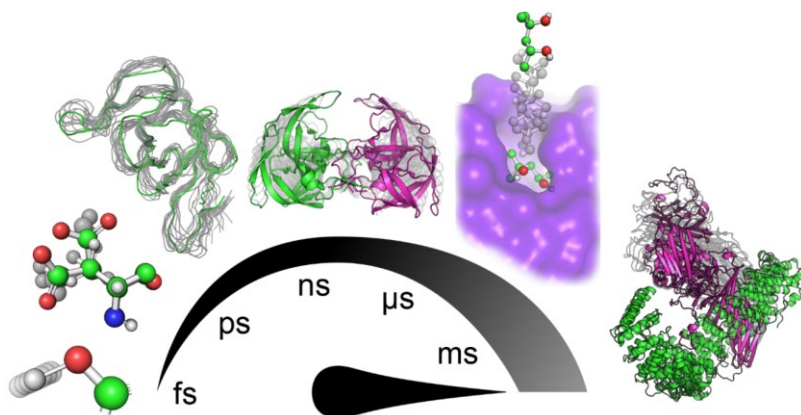
Najväčšie uplatnenie vo vývoji liečiv si docking našiel vo virtuálnom skríningu (HTVS, z angl. „high-throughput virtual screening“) [69], no je použiteľný prakticky v akomkoľvek výskume, ktorý vyžaduje zdefinovať potenciál (nie len) syntetizovaných látok interagovať v receptoroch. Docking dokáže pomerne presne odlíšiť látky, ktoré sa s najväčšou pravdepodobnosťou nebudú do receptora viazať (skutočne negatívne), no stále produkuje pomerne veľa falošne pozitívnych výsledkov tak ako iné HTS metódy [70]. Preto nikdy nie je použitý samostatne, ale v kombinácii s inými počítačovými a experimentálnymi metódami. Docking sa tiež používa ako jedna z častých metód tzv. „target fishingu“ [71, 72], teda hľadania potenciálnych cieľov pre látky s neznámym mechanizmom účinku.

Molekulová dynamika

Molekulová dynamika predstavuje jednu z najdôležitejších metód SBDD. Jej cieľom je realisticky simulovať pohyb atómov a molekúl v danom prostredí, pričom sa využíva klasická Newtonova rovnica pohybu [73]. Výsledkom molekulovej dynamiky je záznam pohybu všetkých atómov (trajektória) a výpis zmeny energií a ďalších parametrov v čase, ktoré sa dajú spracovávať pri následnej analýze.

Vo svojich počiatkoch bola MD limitovaná len na veľmi malé systémy v plynnej fáze a mala veľmi ďaleko od dnešného použitia v štruktúrnej biológii a chémii [74]. Výrazný pokrok priniesol rozvoj výpočtovej techniky, dostupnosť superpočítačov a hlavne grafických akcelerátorov (GPU, z angl. „graphical processing unit“), pomocou ktorých je dnes možné simulovať predtým nedosiahnuteľné časy. Bežná rýchlosť simulácie systému obsahujúceho desiatky tisíc molekúl pri použití silových polí na moderných GPU sa dnes pohybuje na úrovni stoviek nanosekúnd za deň. V optimálnom prípade to znamená, že týždňová simulácia získa cca jednu μ s. Je však dôležité si uvedomiť, že aj tento časový úsek je stále relatívne krátky

v porovnaní s časom potrebným na dôležité molekulárne procesy, napr. spontánne naviazanie ligandu alebo folding proteínu (viď Obrázok 2) [75].



Obrázok 2 Schematické znázornenie času dôležitých chemicky a biologicky relevantných pohybov. Od najkratších: vibrácie väzieb (fs-ps), rotácie postranných reťazcov aminokyselín (ps-ns), fluktuácie proteínovej kostry (ns), pohyby flexibilných slučiek (ns-ms), naviazanie a vyviazanie ligandu (>100 ns), pohyby domén (>μs). Prevzaté zo Surpeta a kolektív [75] (Creative Commons Attribution (CC BY) licenciacia).

Silové polia sú úzko prepojené s použitím MD simulácií a sú dôvodom ich rozkvetu. Momentálne najpoužívanejšie silové polia používané na simuláciu proteínov a nukleových kyselín sú AMBER a CHARMM, jedná sa zároveň aj o názvy MD programov, ktoré ich pôvodne implementovali. Na simuláciu malých molekúl boli vytvorené iné silové polia, napr. MM2, MMFF94. Dôležité je, že rôzne silové polia môžu využívať inú metodológiu parametrizácie, a preto sa parametre z rôznych silových polí spravidla nemôžu kombinovať [52].

MD simulácia prebieha nasledovne. Na začiatok (v čase $t = 0$) je nutné priradiť všetkým atómom pozíciu a vektorovú rýchlosť. Prvotné pozície sú známe nakoľko sa používajú experimentálne alebo predikované štruktúry. Počiatočné rýchlosti sa pridelujú náhodne, často podľa Maxwell-Boltzmannovej distribúcie pri danej teplote [76]. Nasleduje numerické riešenie Newtonovej rovnice, ktoré sa môže mierne líšiť v závislosti od použitého integrátora. Najpoužívanejší integrátor sa volá velocity-Verlet [77] algoritmus, a má dva kroky matematicky vyjadrené nasledovne:

$$1. \quad x(t + \Delta t) = x(t) + v(t)\Delta t + \frac{F(t)}{2m} \Delta t^2$$

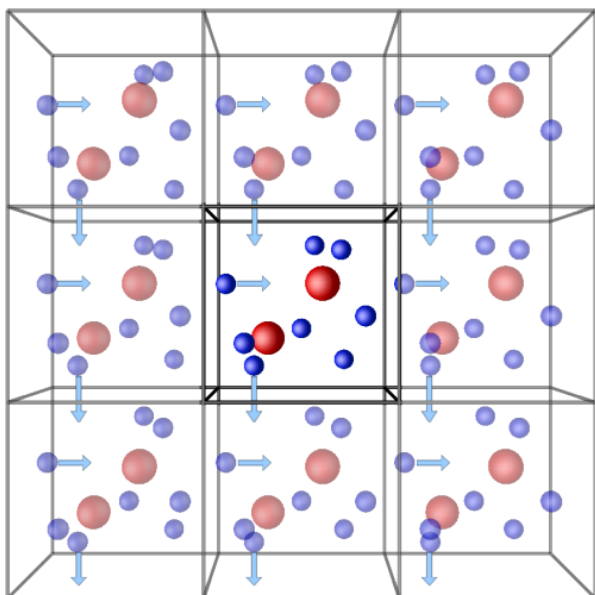
$$2. \quad v(t + \Delta t) = v(t) + \frac{F(t+\Delta t)+F(t)}{2m} \Delta t$$

x – pozície atómov, v – rýchlosť, F – sila, t – čas, Δt – časový krok (viď nižšie)

V kroku 1 sa vypočítavajú nové pozície (pozície v čase $t + \Delta t$) na základe momentálnych pozícií, rýchlostí a pôsobiacich síl. V kroku 2 sa potom podľa momentálnej rýchlosti a podľa síl, ktoré pôsobia na momentálnych pozíciách a budú pôsobiť na nových pozíciách vypočíta

nová rýchlosť a čas sa posunie na $t = t + \Delta t$. Atómy systému sa pohybujú iteratívne podľa pravidiel integrátora v krátkych časových úsekoch nazývaných časový krok označovaný Δt alebo dt (angl. „time-step“). Celý proces sa cyklicky opakuje až kým sa nedosiahne stanovená dĺžka simulácie (počet iterácií). Pri každej iterácii (prípadne ich násobkoch kvôli ušetreniu miesta) sa zaznamenávajú polohy atómov a vlastnosti systému, čím vzniká trajektória. Časový krok musí byť zvolený tak, aby bol čo najdlhší a minimalizoval sa počet nutných iterácií, no zároveň musí byť menší ako najrýchlejší proces v danom systéme [73, 78]. V prípade molekúl sú to vibrácie väzieb medzi ťažkými atómami a vodíkom (cca. 3000 cm^{-1}), štandardne používané Δt je 1–4 fs (v závislosti od ďalších nastavení). Sily, ktoré určujú pohyb atómov sa získavajú zo silového poľa (prípadne z QM výpočtov). Hoci sú silové polia veľmi rýchle, pri veľkom množstve vzájomne interagujúcich atómov sa jedná o podstatnú výpočtovú záťaž. Najdlhší čas každej MD simulácie sa strávi pri výpočte neväzbových interakcií, ktoré sa preto často zjednodušujú pomocou rôznych sofistikovaných či menej sofistikovaných metód [79, 80].

Na čo najlepšiu reprodukciu laboratórnych podmienok sa molekuly musia simulovať v rozpúšťadle, bežne vo vode. Rozlišujeme použitie **explicitného rozpúšťadla**, kde sú molekuly rozpúšťadla reálne prítomné v systéme alebo **implicitného rozpúšťadla**, ktoré predstavuje len úpravu niektorých fyzikálnych konštánt vo výpočtoch, ale molekuly rozpúšťadla sa do systému nepridávajú. Obe metódy majú svoje výhody i nevýhody, hlavne čo sa týka rýchlosti. Prednosť sa dáva explicitným podmienkam, ktoré viac napodobňujú experiment, hoci sú pomalšie. Dôležitou súčasťou každej MD je tiež definícia okrajových podmienok (z angl. „boundary conditions“), teda ako vyriešiť atómy na okraji simulovaného priestoru. Existuje niekoľko možností. U biomolekúl je najčastejšie použitie periodických okrajových podmienok (PBC, z angl. „periodic boundary conditions“), kde je systém obklopený nekonečnou sadou svojich kópií (viď Obrázok 3). Ak teda nejaká molekula unikne mimo „hlavný“ priestor, vráti sa zo svojej kópie na opačnej strane. U MD simulácií ďalej vystupuje niekoľko ďalších dôležitých parametrov ako koncentrácia solí, regulácia teploty a tlaku atď. Detailný popis by však bol nad rámec záujmu tejto práce.



Obrázok 3 Periodické okrajové podmienky. Prevzaté z <https://isaacs.sourceforge.net/phys/pbc.html>.

Molekulová dynamika je jedinou počítačovou metódou schopnou pomerne presne sa priblížiť experimentálnym podmienkam. V CADD sa MD najčastejšie používa na konformačný sampling malých a veľkých molekúl [81], štúdium pohybu molekúl (napr. v rozpúšťadle) [82, 83] či popis termodynamických a energetických vlastností, napr. väzbových energií [84]. Molekulová dynamika sa tiež často používa na overenie kvality nadokovaných póz či pri štúdiu stability interakcií ligandov s receptorom [85, 86].

3. KOMENTÁR PUBLIKOVANÝCH PRÁC

Ak nie je uvedené inak, pod pojmom „aktivita“ sa v nasledujúcom komentári myslí antimykobakteriálna aktivita, špecificky aktivita proti *M. tuberculosis*.

3.1. POUŽITÉ METÓDY

3.1.1. Chemická syntéza

3.1.1.1. Tvorba amidovej väzby

Veľká časť chemických reakcií za zaoberala prípravou amidov. V komentovaných publikáciách bolo použitých niekoľko metód. Väčšina látok predstavovala amidy odvodené od aromatických karboxylových kyselín, no v prípade publikácie **P1** sme pripravili sériu ureidov. Nakoľko sa formálne jedná o diamidy kyseliny uhličitej, je aj syntéza týchto látok komentovaná v tejto kapitole.

Mikrovlnami asistovaná syntéza ureidov

Pri príprave ureidov odvodených od 2-aminopyrazínu v publikácií **P1** (Schéma 2) sme na základe predchádzajúcich skúseností použili mikrovlnami asistovanú syntézu. Mikrovlnné reaktory sú v chemickej syntéze veľmi obľúbené nakoľko umožňujú skrátiť reakčný čas a často zvyšujú výťažnosť reakcií [87]. Reakcia bola robená v hexáne. Je jasné, že polárne rozpúšťadlá lepšie interagujú s elektromagnetickým žiarením, a sú preto na obecné vhodnejšie na syntézy asistované mikrovlnami. No i použitie nepolárnych rozpúšťadiel, napr. hexánu, má svoje výhody. Nepolárne rozpúšťadlá prakticky neinteragujú s dodávaným mikrovlnným žiarením, väčšina elektromagnetickej energie je preto dostupná reaktantom, čo môže zlepšovať ich reaktivitu [88]. Reakcia aj následné čistenie derivátov prebiehalo bez problémov, iné podmienky preto neboli testované.

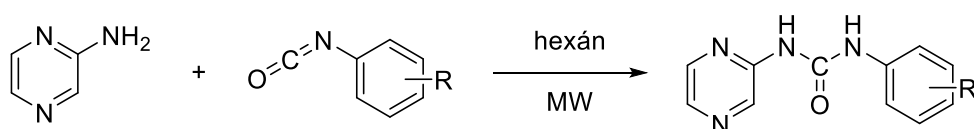


Schéma 2 Mikrovlnami asistovaná syntéza substituovaných ureidov.

Syntéza pomocou acylchloridov

Štandardným postupom prípravy amidov bola kondenzácia aktivovanej karboxylovej kyseliny, typicky chloridu, s amínom. Reakcia sa bežne robila v dvoch krokoch, no využili sme aj tzv. „one-pot“ syntézu, kde sa do pripravenej zmesi kyseliny a amínu prikvapkávalo aktivačné činidlo (napr. tionylchlorid, oxalylchlorid). Ako bázu sme používali pyridín, trietylamín alebo

N,N-diisopropyletylamín (DIPEA). Pridávanie aktivovanej kyseliny/aktivačného činidla prebiehalo za chladu a reakcia sa nechávala pri laboratórnej teplote alebo sa u málo reaktívnych látok zahrievala. Časté bolo použitie *N,N*-dimetylaminyridínu (DMAP), katalyzátora prenosu acylových zbytkov [89]. Ako rozpúšťadlo sme najčastejšie volili dichlórmetán prípadne neskôr acetonitril, ktoré majú relatívne nízke body varu a preto sa ľahko odparovali.

Syntéza s využitím pyrazinoylchloridu bola testovaná už pri publikácii **P2**, no vznikala ťažko oddeliteľná zmes, a preto sme sa rozhodli využiť radšej couplingové činidlá (viď Použitie couplingových činidiel).

Acylchloridy bolo nutné použiť v publikáciách **P3** a **P8** kvôli nízkej reaktivite 3-amino skupiny východiskovej látky (metylester 3-aminopyrazínkarboxylovej kyseliny). Na základe literárnej rešerše a našich optimalizácií sa ako najvhodnejšie podmienky ukázali acetonitril ako rozpúšťadlo a pyridín ako báza (bezvodé), čo umožnilo okrem iného aj zahrievať reakčnú zmes na 70–80°C. Pri takto vysokej teplote bola reakcia úspešná, a to až tak, že dochádzalo k diacylácii a vzniku zmesi mono- a diacylovaných produktov (viď Schéma 3). Ako najlepšie riešenie sa nám osvedčilo použiť nadbytok acylchloridu (2–4 molárne ekvivalenty), a vzniknutý diacyl následne pomocou hydrazínu v tetrahydrofuráne (THF) s prídavkom isopropylalkoholu (*i*PrOH) previesť na monoacyl. Tento postup bol síce časovo náročnejší, no mal veľmi dobré výťažky.

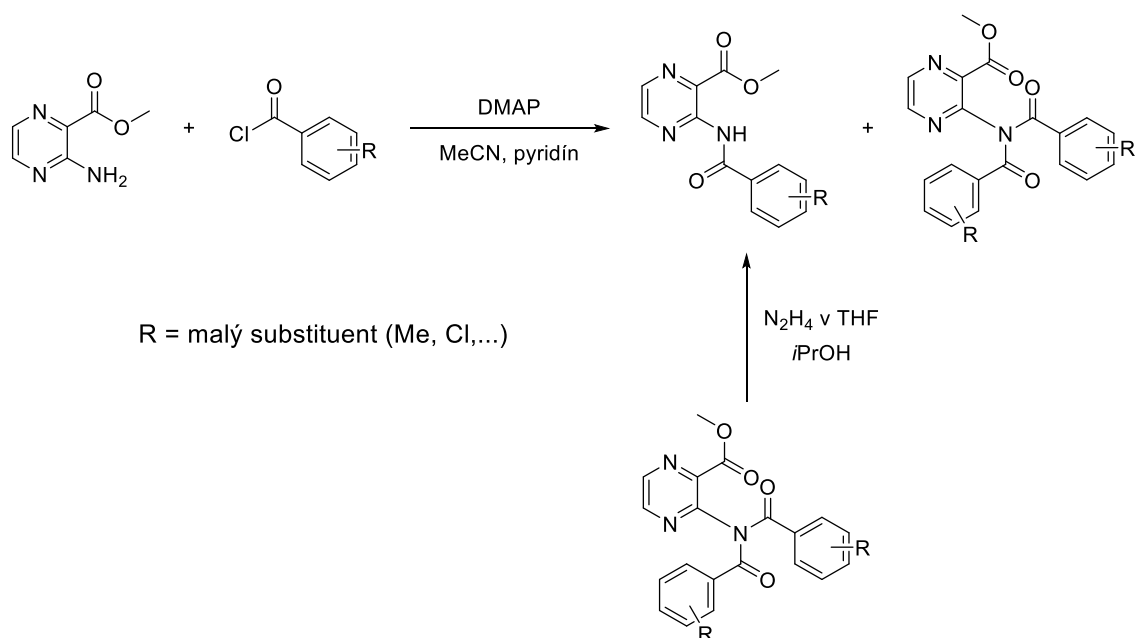


Schéma 3 Acylácia 3-aminoskupiny u metylesteru 3-aminopyrazínkarboxylovej kyseliny a schéma prípravy monoacylovaného produktu z diacylovaného

One-pot reakcia sa nám osvedčila pri syntéze 2-aminoxazolových derivátov v **P4** (Schéma 4), ktorú sme robili pri laboratórnej teplote. Ako bázu sme používali pyridín alebo DIPEA a ako rozpúšťadlo dichlórmetán. Dvojkrokové metódy neboli veľmi úspešné. Možná príčina bola, že sme nenechali kyselinu aktivovať dostatočne dlho. To by v prípade one-pot reakcie nebol problém nakoľko by každá molekula kyseliny aktivovaná *in situ* mohla ihneď reagovať s amínom, a tak posúvať rovnováhu reakcie smerom doprava.

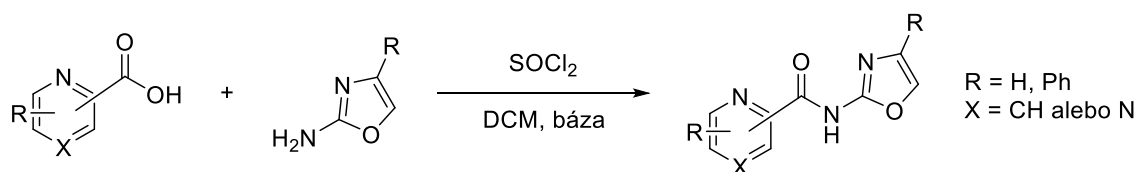
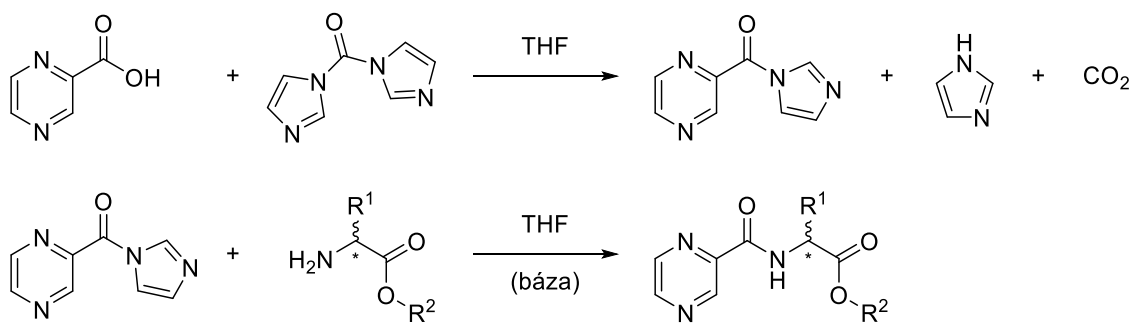


Schéma 4 Syntéza derivátov 2-aminoxazolu v **P4** one-pot syntézou

Použitie couplingových činidiel

Acylchloridy sú veľmi reaktívne, a preto bolo nutné niekedy uplatniť miernejší prístup – použitie couplingových činidiel. Jedná sa o činidlá, ktoré boli pôvodne používané v peptidovej chémii (kvôli ich tolerancii chrániacich skupín) [90], no sú hojne využívané aj pri syntéze iných organických zlúčenín. Ich úlohou je aktivovať karboxylovú kyselinu podobne ako napr. tionylechlorid a umožniť jej tak následnú reakciu s amino skupinou. Najbežnejšie couplingové činidlá sú DCC (dicyklohexylkarbodiimid), EDC (1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid) či CDI (*N,N'*-karbonyldiimidazol). Použitie couplingových činidiel je „čisté“ a selektívne, no sú málo účinné u nereaktívnych amínov napr. u deaktivovaných aromatických aminoskupín. Z couplingových činidiel sa nám najviac osvedčilo CDI, ktoré má oproti ostatným bežne používaným činidlám typu karbodiimidov (DCC, EDC) niekoľko výhod. Tou najdôležitejšou je, že nevzniká nežiadúci derivát močoviny, ktorý sa veľmi ťažko oddeľuje. Ďalšou, že imidazolové jadro, ktoré sa pri reakcii uvoľňuje, pôsobí ako báza. Preto už nie je absolútne nevyhnutné do reakcie pridávať ďalšiu, hoci sme ju kvôli zachovaniu bazického prostredia vždy pridávali.

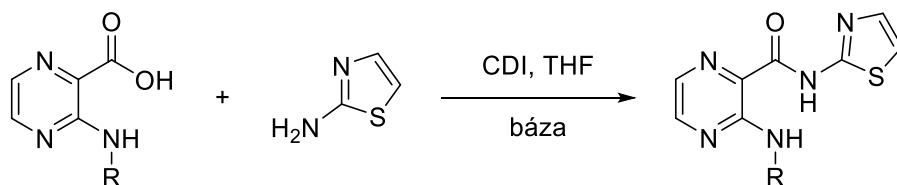
Vzhľadom na to, že sa couplingové činidlá používajú v peptidových syntézach, dávalo zmysel vyskúšať ich v publikácii **P2**, kde sme pracovali s aminokyselinami. Sprvu sme mali obavy z možnej epimerizácie či racemizácie, ktorá bola u CDI v malej miere popisovaná [91]. Výsledky chirálneho HPLC produktov však preukázali, že k epimerizáciám nedochádzalo. Použitie CDI ako popisuje Schéma 5 tak umožnilo prípravu veľkého množstva látok vo vysokej chemickej i enantiomérskej čistote. Epimerizácia bola pozorovaná len u derivátu fenylglycínu, ktorý je ale známy jednoduchým zvratom na chirálnom centre pri nedodržaní špecifických podmienok [92].



R¹ = postranný reťazec aminokyseliny
R² = Me, Et

Schéma 5 Využitie CDI pri príprave derivátov PZA s aminokyselinami

Na niektoré syntetické kroky sme v už spomínanej publikácii **P3** využívali okrem acylchloridov aj coupling pomocou CDI. Ten zahŕňoval tvorbu (ne)substituovaného 3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazínkarboxamidu (Schéma 6). Detaily vid' v publikácii **P3**.



R = H, aroylový zbytok

Schéma 6 Syntéza derivátov 3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazínkarboxamidu pomocou CDI

Táto reakcia už bohužiaľ nefungovala pri zamýšľanej príprave 2-aminooxazolových analógov ako popisujem v kapitole 3.2.2.1 Metionín aminopeptidáza (**P3**).

3.1.1.2. Hydrolýza esterov

Hydrolýzy esterov na voľné kyseliny v **P2** a **P3** prebiehali za štandardných podmienok v kyslom (HCl/H₂O/EtOH) alebo zásaditom prostredí (NaOH/H₂O/EtOH) podľa potreby ďalších krokov alebo stability prítomných skupín. Detaily sú opäť uvedené v príslušných publikáciách.

3.1.2. Purifikácia a analytické hodnotenie

Čistenie látok prebiehalo pomocou flash chromatografie na normálnych fázach (silikagel) alebo kryštalizáciou z vhodného rozpúšťadla. Publikované látky boli charakterizované ¹H- a ¹³C-NMR, IČ a hmotnostnými spektrami (MS), teplotou topenia a kde to bolo vyžadované aj optickou otáčavosťou (**P2**). Čistota bola ďalej preukázaná pomocou RP-HPLC s UV alebo MS detekciou. Pre viac detailov vid'. Metodickú časť príslušných komentovaných článkov.

3.1.3. Počítačové metódy

Vzhľadom na nedostupnosť rutinného enzymatického testovania, ktoré by experimentálne overilo mechanizmus účinku, sme sa pri racionalizácii pozorovaného SAR spoliehali prevažne na metódy *in silico*.

3.1.3.1. Docking

Najpoužívanejšou metódou bol docking. Ten bol využitý na overenie schopnosti látok zaujať podobnú pózu ako už známe ligandy alebo na nájdenie a/alebo racionalizáciu potenciálneho cieľa, *i.e.* target fishing.

Na docking sme využívali softvér Molecular Operating Environment (MOE [93]), ktorý obsahuje všetky potrebné utility. Koordináty receptorov boli získané z RCSB PDB databázy (<https://www.rcsb.org>). Je jasné, že použitie komerčných programov čiastočne znižuje reprodukovateľnosť. Avšak, práca výhradne len vo voľne dostupnom (tzv. „open-source“) softvéri je podstatne náročnejšia a často neumožňuje použitie niektorých metód, ktoré nie sú implementované open-source (napr. farmakofórové metódy).

V kryštalografických štruktúrach proteínov sa často vyskytujú chyby či nezrovnalosti. Preto bolo pred dockingom nutné tieto chyby opraviť. Detaily či príklady takýchto chýb sú uvedené napr. v Metodickej časti publikácie **P7**. Jedným z najproblematickejších krokov prípravy vstupu na docking (a MD) je definícia „správnych“ protonačných a s tým súvisiacich tautomérnych stavov podľa použitého pH prostredia (bežne pH 7). MOE na tento krok používa algoritmus Protonate3D [94]. Docking prebiehal typicky s využitím rigid receptor alebo induced-fit metodiky. Pózy boli analyzované najskôr podľa skóre a potom vizuálne.

Docking je pomerne rýchly aj relatívne presný, no často má problém s neštandardnými interakciami, napr. interakcie ligandu s kovom. Práca s metaloenzýmami je preto pri CADD návrhu výrazne komplikovanejšia, o čom sme sa presvedčili pri dockingu do mykobakteriálnej metionín aminopeptidázy 1c (MtMetAP1c) v **P3**. Vzhľadom na nejasnosti ohľadom počtu a identity kovových kofaktorov (detaily vid' v článku **P3**) sme nadviazali na už publikované dockingové práce a použili sme dva katióny dostupné v kryštalografickej štruktúre. Kvôli problémom s popisom ligandu a proteínu s kovom sme ale nemohli použiť pokročilejšie experimenty, napr. overenie stability póz pomocou molekulovej dynamiky.

3.1.3.2. Kvantovo-mechanické výpočty

Pri použití kvantových výpočtov sme sa riadili zaužívanými metodológiami. Vyskúšali sme viaceré programy, komerčné aj open-source. Osvedčil sa nám softvér Gaussian (<https://gaussian.com/>), ktorý bol najrýchlejší a najjednoduchší na nastavenie. Výpočty bežali na výpočtových klustroch MetaCentra (<https://metavo.metacentrum.cz/>).

V publikácií **P3** sme počítali optimálne geometrie a s nimi súvisiace energie konformácií enzymaticky najúčinnnejšej látky. Pri optimalizovaní geometrie pomocou QM bolo vždy nutné začínať s „rozumnými“ vstupnými koordinátmi. Preto bola štruktúra najskôr optimalizovaná pomocou silového poľa v MOE a až následne optimalizovaná v QM programe. Ak by boli vstupné koordináty priveľmi vzdialené od optimálnych mohlo by dôjsť až k zlyhaniu výpočtu. Analýza výsledkov QM výpočtov prebiehala opäť v MOE.

3.1.3.3. Molekulová dynamika

Na molekulovú dynamiku sme využívali softvér NAMD2 alebo NAMD3 [95]. Základným použitím bolo overenie stability ligandu v nadokovanej póze ako jedna z možností overenia „správnosti“ alebo posúdenie stability interakcií v čase. Príprava systému prebiehala rovnako ako pri dockingu. Zo štatistického hľadiska platí, že je lepšie spraviť viac kratších ako menej dlhších simulácií, nakoľko rôzne východiskové podmienky (hlavne počiatočné vektorové rýchlosti) vedú k samplingu väčšieho množstva konformácií. Preto boli trajektórie získané v multiplikátoch, každý s inými východiskovými vektormi rýchlostí.

V čase písania prvých publikácií využívajúcich MD (**P7**) som ešte nemal toľko skúseností ani prístup k verziám programov využívajúcich grafické karty, ktoré sú rýchlejšie než verzie používajúce „bežné“ procesory. Z toho dôvodu som zo začiatku používal kratšie MD simulácie (10 ns). Neskôr, s vydaním NAMD3 som už bol schopný efektívne využívať aj GPU akcelerátory, a preto sú v neskorších publikáciách (**P4**, **P8**) už trajektórie dlhšie (50 ns).

Nastavenie systému prebiehalo v MOE, samotná simulácia bežala už na výpočtových klustroch organizácie MetaCentrum. Analýza trajektórií zahrňovala výpočet podobnosti polôh atómov v jednotlivých snímkach vyjadrenej pomocou RMSD alebo RMSF (z angl. „root-mean-square deviation“ a „root-mean-square fluctuation“). Častý bol tiež výpočet vzdialeností a uhlov určených atómov, ktoré sme využili na sledovanie stability interakcií a dockingových póz. Nasledovala vizuálna kontrola.

Na analýzu MD trajektórií sa mi najviac osvedčil program VMD [96], ktorý má okrem grafického rozhrania aj možnosť skriptového vstupu v programovacom jazyku Tcl, čo nám výrazne uľahčilo analýzu multiplikátov.

3.1.4. Biologické testovanie

Vo väčšine komentovaných prác prezentujeme výsledky fenotypického biologického skríningu, pričom samotné biologické testovanie prebiehalo na iných pracoviskách. Presný zoznam a označenie testovaných kmeňov sú dostupné v komentovaných publikáciách.

3.1.4.1. Testovanie antimykobakteriálnej aktivity

Antimikrobiálne testovanie bolo zameraná hlavne na antimykobakteriálnu aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Nakoľko sa jedná o veľmi nebezpečný mikroorganizmus, testovanie vyžaduje laboratórium vybavené na prácu s infekčnými agens. Historicky sa však preukázalo, že Mtb je možné vo výskume nahradiť inými mykobaktériami, tzv. surogátmi, ktoré nie sú infekčné no majú podobnú citlivosť na antimikrobiálne látky a často aj rýchlejšiu rast [97, 98]. V našich testovaniach to boli štandardné kmene *M. smegmatis* a *M. aurum*. Citlivosť surogátov však nemusí byť vždy rovnaká ako u Mtb, čo je zrejmé aj z našich výsledkov. Preto sa naša skupina v poslednej dobe preorientovala na vyžitie štandardného avirulentného kmeňa Mtb s označením H37Ra. Jedná sa o oslabený kmeň štandardného virulentného kmeňa Mtb H37Rv, ktorý je ale možné kultivovať a testovať aj v bežných laboratóriách. Má tiež porovnateľnú citlivosť ako virulentný kmeň [99]. Okrem Mtb boli látky testované aj proti iným klinicky významným mykobaktériám ako referenčné kmene *M. avium* a *M. kansasii* [100]. Testovanie na neinfekčných referenčných kmeňoch prebiehalo na Katedre biologických a lekánských vied na našej fakulte PharmDr. Ondřejom Jand'ourkom, Ph.D.

Najaktívnejšie látky boli následne testované proti referenčnému virulentnému kmeňu Mtb H37Rv a dvom rezistentným klinickým izolátom vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Testovanie mala na starosti MUDr. Pavla Paterová, Ph.D.

3.1.4.2. Testovanie antibakteriálnej a antifungálnej aktivity

Ako sekundárny skrínig bola väčšina látok podrobená aj antibakteriálnemu a antifungálnemu skríningu. Aktivita bola testovaná na referenčných kmeňoch klinicky významných G⁺ a G⁻ baktérií, húb a kvasiniek. Testovanie prebiehalo na Katedre biologických a lekánských vied Idou Dufkovou a RNDr. Klárou Konečnou, Ph.D.

3.1.4.3. Testovanie cytotoxicity

Cytotoxické vlastnosti látok boli merané prostredníctvom línie buniek HepG2 [101]. Jedná sa o bunky hepatocelulárneho karcinómu, ktoré sú bežne používaným modelom toxicity látok pri antimykobakteriálnom výskume. Väčšina antituberkulotík prvej línie sú hepatotoxické, a preto by nové antituberkulotiká nemali nevykazovať výraznú hepatotoxicitu aby nepotencovali toxicitu iných liečiv pri kombinovanej terapii nevyhnutnej u TB. Cytotoxicitu (hepatotoxicitu) merali PharmDr. Jiří Janoušek, Ph.D. a PharmDr. Pavel Bárta, Ph.D. z Katedry farmakologie a toxikologie na našej fakulte.

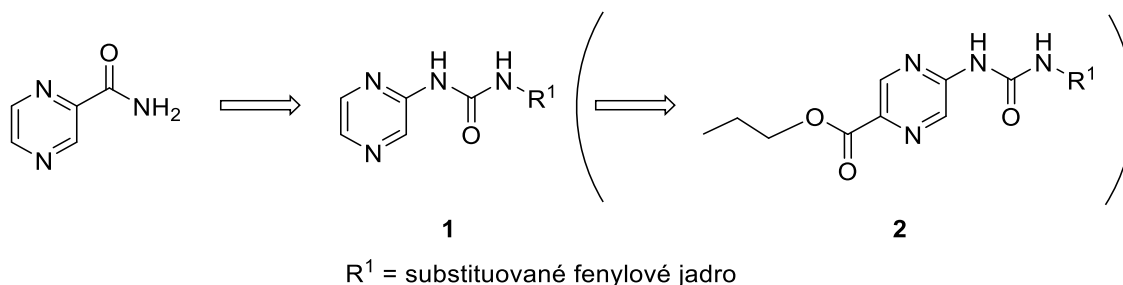
3.2. ŠTRUKTÚRNE OBMENY PUBLIKOVANÝCH LÁTKOK (P1–P4)

3.2.1. Deriváty pyrazínamidu (P1–P2)

3.2.1.1. Ureidy odvodené od pyrazínamidu (P1)

Naša skupina sa zaoberá syntézou aromaticky substituovaných derivátov PZA už viac než dvadsať rokov. Preto som aj ja pokračoval v syntéze látok tohto typu, pričom výsledky boli publikované v mojej prvej spoluautorskej publikácii **P1**.

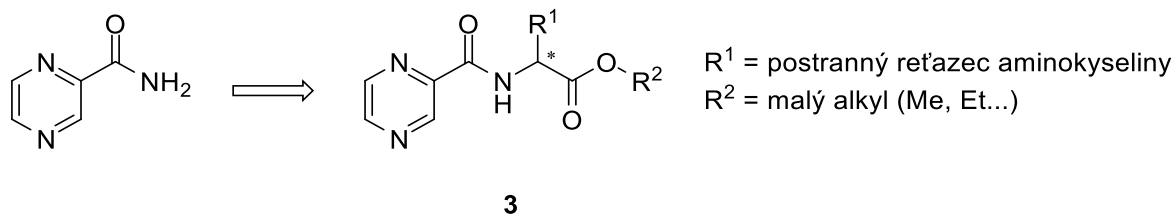
Jednalo sa o syntézu šiestich ureidov odvodených od PZA (štruktúrny typ **1**). Látky boli pripravené pomocou mikrovlnného reaktora (viď Schéma 2) a testované na paneli mykobaktérií, baktérií a húb klinického významu. Okrem toho bola testovaná aj cytotoxická aktivita a u vybranej látky (R = 4-chlórphenyl) tiež možnosť podpory syntézy rutínu u *Fagopyrum esculentum*. Deriváty vykazali len slabú antimykobakteriálnu účinnosť bez antibakteriálnej či antifungálnej aktivity. Bol však pozorovaný pozitívny vplyv na podporu biosyntézy rutínu. Antimykobakteriálna aktivita sa zvýšila až zavedením ďalšej lipofilnej esterovej skupiny do polohy 5 (štruktúrny typ **2**). Tieto esterové deriváty boli už pripravené mojimi kolegami. Nakoľko dizajn tejto série nebol mojím pôvodným dielom, nebudem ho detailne komentovať.



3.2.1.2. Deriváty PZA s využitím aminokyselín (P2)

Je prekvapivé, že hoci o esteroch a amidoch odvodených od PZA/POA sa toho v literatúre dočítame mnoho, viď napr. práce [33, 34, 102], len donedávna bolo veľmi málo informácií o použití aminokyselín ako amid-formujúceho amínu. Pritom použitie krátkych peptidov je vo vývoji antimikrobiálnych zlúčenín bežné [103], u antituberkulotík sa často používa napr. imunostimulačný tetrapeptid tuftsín [104, 105]. Moja hypotéza bola, že na rozdiel od „bežných“ amidických väzieb by sa väzby obsahujúce aminokyseliny mohli štepiť rýchlejšie vďaka podobnosti s telu vlastnými stavebnými zložkami a zároveň by mohli byť stabilnejšie než estery štepené nešpecifickými esterázami už v plazme. Túto myšlienku sme preskúmali v článku **P2**,

kde sme pripravili sériu 39 látok štruktúrneho typu **3** kombinujúcich PZA/POA s aminokyselinami.



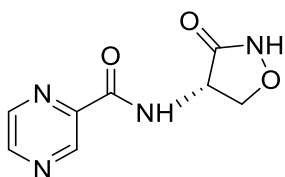
Látky boli zo syntetických dôvodov pripravené vo forme metyl- alebo etylesterov, a tak boli použité aj pri biologickom testovaní s cieľom zlepšiť ich permeabilitu cez lipofilnú mykobakteriálnu membránu. Na porovnanie boli nasyntetizované aj niektoré voľné kyseliny. Pripravené boli L- aj D-enantioméry.

Väčšina záverov SAR mohla byť sledovaná len nepriamo nakoľko sme nemali k dispozícii pokročilé experimenty ako štúdie metabolitov, ktoré by tu boli vhodné. Antimykobakteriálna aktivita PZA *in vitro* je výrazná len pri kyslom pH [13]. Preto boli látky testované pri pH 6 aj pri neutrálnom pH a porovnané. Výrazná aktivita bola zaznamenaná len pri pH 6, čo naznačovalo, že mechanizmus účinku môže byť spojený s mechanizmom PZA. Pozorovali sme tiež jasnú koreláciu aktivity s lipofilitou. Vyššia aktivita bola pozorovaná u lipofilnejších derivátov, či už sa porovnával ester s voľnou kyselinou alebo hydrofilnejšia a lipofilnejšia aminokyselina. Zaujímavé bolo, že aktivita bola viazaná prevažne na L-enantiomér pričom D-enantioméry boli neúčinné. Táto závislosť nebola dovtedy v literatúre popísaná a jasne naznačuje prítomnosť špecifického mechanizmu. Nie je ale jasné, či ide o mechanizmus na úrovni hydrolýzy alebo na úrovni receptora (molekulárneho cieľa), určenie by vyžadovalo ďalšie skúmanie. Päť látok preukázalo lepšiu aktivitu než PZA aj nízku *in vitro* cytotoxicitu (HepG2). Najaktívnejšia látka série s MIC <1.95 µg/mL, kombinujúca PZA s fenylglycínom (racemická zmes) postúpila do *in vivo* testovania na myšiach. Jej antituberkulotická aktivita na myšom modeli TB bola oproti použitému štandardu isoniazidu nízka (výsledky zatiaľ neboli n publikované).

Bohužiaľ, u niektorých látok nám použitie rôznych esterov spôsobilo nemalé problémy s interpretáciou SAR. Nebolo jasné, či je látka s danou aminokyselinou neúčinná, lebo nie je dostatočne lipofilná na prestup cez membránu (napr. porovnanie leucyl metyl- vs. etylesteru) alebo ide o iný dôvod. Retrospektívne je zrejmé, že by bolo lepšie použiť iba etylestery. Tie však neboli vždy komerčne dostupné a nepredpokladali sme, že by malý rozdiel v použitom

esteri mohol spôsobiť tak značné rozdiely v aktivitách. Všetky látky následne prešli skrúingom na antibakteriálnu a antifungálnu účinnosť, žiaľ bez výrazných aktivít.

Pri práci s aminokyselinami sme uvažovali o sérii látok kombinujúcich deriváty PZA s D-cykloserínom (DCS), antituberkulotikom druhej línie formálne odvodeným od serínu. Látky boli pôvodne zamýšľané buď ako dvojité proliečivá POA a DCS alebo ako inhibítory alanín racemázy (hlavný cieľ DCS [106]). Pripravili sme prototypickú látku tejto štruktúry (látka 4). Jej vysoká polarita sa však ukázala byť problematická pri chromatografickom čistení, a látka nakoniec nevykazovala žiadnu antimykobakteriálnu aktivitu pri testovaných koncentráciách (výsledky neboli publikované). Ďalšie štruktúrne obmeny sme preto neuvažovali.

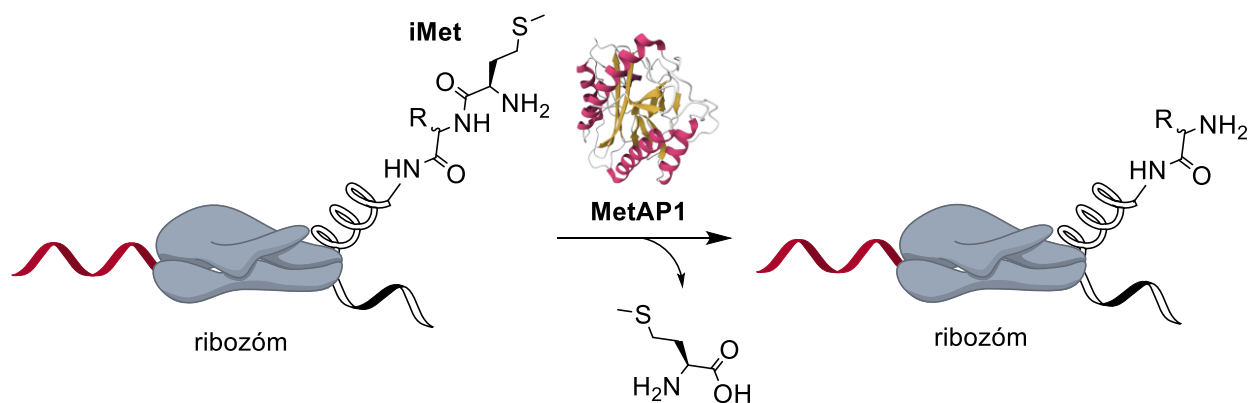


4

3.2.2. Enzymatické ciele, racionálny dizajn (P3–P4)

Kvôli problémom s určovaním mechanizmu účinku u derivátov aminokyselín som ďalšie série látok už dizajnoval s úmyslom ovplyvniť konkrétny, optimálne zatiaľ menej využívaný antimikrobiálny cieľ. Najväčší problém pri „target-based“ dizajne (vid' kapitolu 2.3 Získavanie nových liečiv) nových antituberkulotík je okrem bežných problémov danej metódy aj nízka dostupnosť mykobakteriálnych enzýmov. Preto som pri návrhu nových látok alebo validácií (racionalizácií) navrhovaného mechanizmu účinku používal takmer výhradne počítačové metódy.

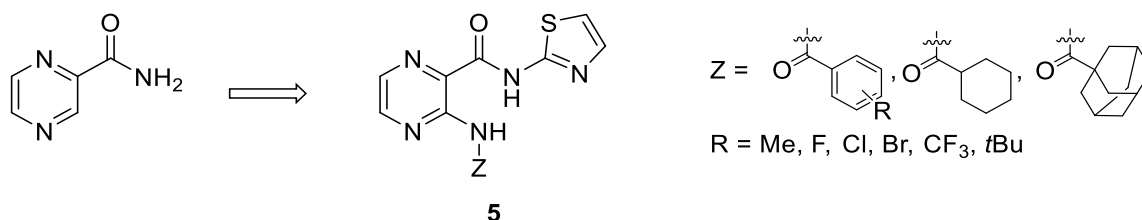
3.2.2.1. Metionín aminopeptidáza (P3)



Obrázok 4 Schématické znázornenie enzymatickej reakcie katalyzovanej metionín aminopeptidázou 1. (iMet – iniciátorový metionín, MetAP1 PDB ID: 3IL9)

Metionín aminopeptidáza (MetAP) je validovaný antimikrobiálny cieľ a často sa skloňuje aj pri výskume nových potenciálnych antituberkulotík [107]. Jedná sa o metaloenzým zodpovedný za štiepenie *N*-koncového (iniciátorového) metionínu u novo syntetizovaných bielkovín (Obrázok 4) a je pre život mikroorganizmov veľmi dôležitý [108]. Ako u iných metaloenzýmov, aj u MetAP je u inhibítorov dôležitá prítomnosť chelátujúceho zoskupenia, na čo sa pyrazínkarboxamidy výrazne hodia (viac o inhibítoroch MetAP je komentované v článku **P3**).

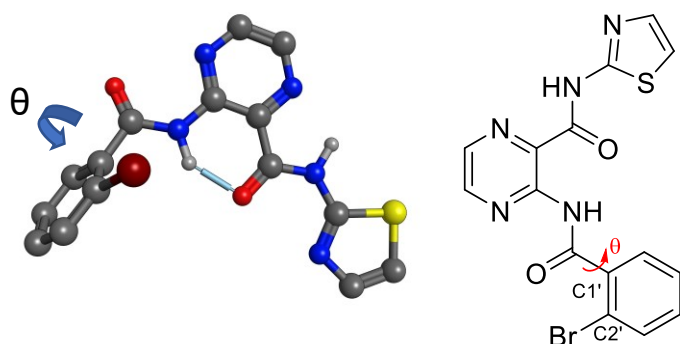
V publikácii **P3** popisujeme sériu 2-amino-*N*-(thiazolyl)pyrazínkarboxamidov (štruktúrny typ **5**), u ktorých bol jasný štruktúrny predpoklad (1) inhibície mykobakteriálnej metionín aminopeptidázy na základe štruktúrnej podobnosti s inhibítormi EcMetAP1 a (2) antimykobakteriálnej aktivity na základe účinných štruktúrne blízkych derivátov PZA. V oboch prípadoch sa jedná o látky obsahujúce 2-aminothiazolové jadro, obecné štruktúry a referencie sú uvedené vo *Figure 1* v publikácii **P3**.



Pripravených bolo 21 zlúčenín. Syntéza prebiehala v dvoch alebo troch krokoch ako popisuje Schéma 3 a čiastočne Schéma 6. Niektoré medziprodukty boli následne využité aj pri ďalších publikovaných sériách, ktorých som spoluautorom (publikácia **P8**). Pri tejto sérii som mal jedinečnú možnosť otestovať všetky nasyntetizované látky na zamýšľaný cieľ na stáži na Univerzite v Ľubľane a podrobne popísať ich vzťahy štruktúry a účinku, použitá bola izoforma

MtMetAP1a. Nakoľko sa jedná o metaloenzym, inhibičná aktivita bola testovaná s rozličnými kovovými kationmi, pričom najlepšie aktivity boli získané pri použití Ni^{2+} a Fe^{2+} kofaktorov. Keďže Fe^{2+} je s najväčšou pravdepodobnosťou fyziologický kofaktor [109], jedná sa o veľmi cenné výsledky.

Ako najsilnejšie inhibítory sa ukázali deriváty substituované objemnejším, elektronegatívnym substituentom v polohe 2 postranného benzamidového zbytku (substituent R u štruktúrneho typu 5). Najlepšia látka, R = 2-Br dosiahla viac než desaťnásobne lepšiu aktivitu ako štandard clioquinol ($\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$ verus $\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$). Naša hypotéza bola, že by 2-substitúcia mohla viesť ku nekoplanárnemu usporiadaniu kruhov. Energetickú výhodnosť nekoplanárnej konformácie sme potvrdili pokročilejšími metódami *in silico* s využitím QM, vid' Obrázok 5 v tejto práci, či podrobnejšie v *Supplementary material* publikácie **P3**, *Figure S3–S5*.



Obrázok 5 2-bromo substituovaný derivát štruktúrneho typu 5 v QM optimalizovanej geometrii (prevzaté z P3)

Aktivitu na izoforme MtMetAP1a sme *in silico* neracionalizovali, nakoľko bola experimentálne potvrdená. Význam 2-substitúcie u izoformy 1a však ostáva nejasný a vysvetlenie by vyžadovalo kryštalografické štúdie, ktoré nie sú dostupné. Zaoberali sme sa však možnou aktivitou na izoforme 1c, nakoľko sú známe veľké rozdiely v inhibícií týchto dvoch izoform (vid' článok **P3**). Kľúčové pre racionalizáciu účinku na izoforme 1c bolo použitie konkrétnej kryštalografickej štruktúry PDB ID: 3IU9, kde bolo aktívne miesto prispôbené flexibilnejšiemu ligandu a obsahovalo úzku hydrofóbnu kavitu, ktorá u iných PDB štruktúr nebola prítomná. Pózy z dockingu naznačili, že práve 2-substituovaný benzamidový fragment je vhodný na zasunutie do tejto kavity, čo by mohlo zlepšovať afinitu ligandov k izoforme 1c. Z vyššie uvedeného je jasné, že konformér jednej aminokyseliny cieľového proteínu je schopný výrazne ovplyvniť výsledky dockingu, a výber kryštalografickej štruktúry receptora je preto pri dockingu kriticky dôležitý.

Bohužiaľ, u látok bola slabá korelácia enzýmovej inhibície a celobunkovej antimykobakteriálnej aktivity. Pozorovali sme tri antimykobakteriálne aktívne látky (MIC = 15.625–31.25 µg/mL), z ktorých dve mali súčasne aj aktivitu proti MtMetAP1a pri použití Fe²⁺. Ako možné príčiny tak malého množstva aktívnych látok sme uvažovali hlavne zlý prestup látok do mykobaktérií a ich nízku rozpustnosť vo vode. Jasný záver by vyžadoval podrobnejšie testovanie, ktoré sme v tom čase hlavne kvôli zlej rozpustnosti neuvažovali. U najsilnejších inhibítorov MtMetAP1a bola zvýšená pozornosť venovaná meraniu cytotoxicity. Tou sme sledovali možnú skríženú reaktivitu proti ľudskej MetAP, ktorá by mohla nasmerovať ďalší vývoj týchto látok ako potenciálnych protinádorových liečiv.

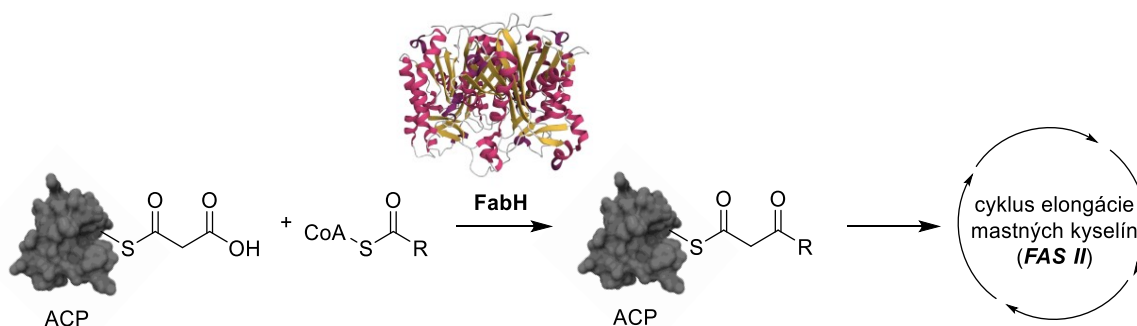
Okrem inhibície MtMetAP1a boli u vybraných látok testované aj chelatačné vlastnosti s cieľom naznačiť viac o interakciách látok s kovým kofaktorom, čo by prípadne mohlo ozrejmiť niektoré aspekty SAR na MtMetAP1a. Vznik komplexu pyrazínového derivátu s iónmi Ni²⁺ a Fe²⁺ bola sledovaná spektrofotometricky. Výsledky ukázali, že pyrazínový ligand bol schopný vyviazať kov v pomere 1:1. Snažili sme sa tiež o zmeranie energie väzby látka-kov pomocou izotermálnej titračnej kalorimetrie, žiaľ bez úspechov kvôli zlej rozpustnosti vo vode. Tieto výsledky nakoniec neboli súčasťou publikácie **P3**.

3.2.2.2. Od 2-aminothiazolov k 2-aminooxazolom

So zlou rozpustnosťou pripravených látok vo vode sme sa v skupine stretávali (a stále stretávame) opakovane. Napríklad v prípade Zitko a kolektív [45] viedla slabá rozpustnosť vo vode k neschopnosti testovať antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu u inak výrazne účinných antimykobakteriálnych zlúčenín. Za zlú rozpustnosť v tejto i komentovanej publikácii **P3** bol pravdepodobne zodpovedný fragment 2-aminothiazolu. Thiazol je v antimikrobiálnych látkach veľmi častý (viď úvod publikácie **P3**), a jeho použitie viedlo k vývoju viacerých významných liečiv ako aztreonam, či cefalosporíny 3. generácie. Okrem zlej rozpustnosti má thiazol aj mnoho ďalších potenciálnych problémov ako metabolická nestabilita spôsobená prítomnosťou síry [110, 111], či jeho zaradenie do kategórie PAINS („pan-assay interference compounds“) [112], látok často vykazujúcich falošne pozitívne výsledky v skríningoch vďaka nešpecifickým interakciám s receptormi alebo používanými činidlami. Jeho náhrada bez straty účinku by bola preto veľmi žiadúca. V príprave ďalšej série látok sme sa tak rozhodli podľa vzoru Azzali a kolektívu [113] otestovať použitie 2-aminooxazolu ako izosteru 2-aminothiazolu na zlepšenie fyzikálne chemických vlastností, *t. j.* rozpustnosť a hydrofilita (polarita) a elimináciu potenciálnych problémov thiazolov.

Sprvu sme zamýšľali obmeniť thiazol na látkach série z publikácie **P3** s cieľom overiť inhibíciu MetAP pri lepšej rozpustnosti vo vode, no reaktivita 2-aminooxazolu je výrazne nižšia než u 2-aminothiazolu a tieto deriváty sa nám nepodarilo pripraviť. Preto sme sa rozhodli využiť túto hypotézu na inom potenciálnom antimikrobiálnom celi – na β -ketoacyl-acyl carrier protein syntetáze III, nakoľko táto súvisela s derivátmi publikovanými v už spomínanej publikácii [45].

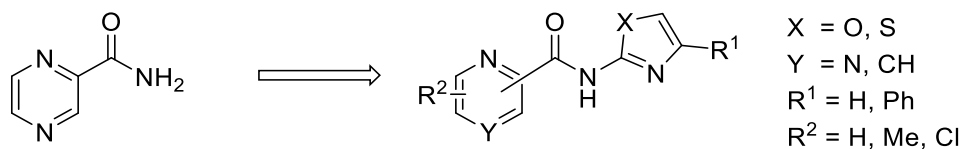
3.2.2.3. β -ketoacyl-acyl carrier protein syntetáza III (P4)



Obrázok 6 Schématické znázornenie enzymatickej reakcie katalyzovanej enzýmom FabH (ACP – acyl-carrier protein PDB ID: 2CGQ, FabH PDB ID: 1U6S)

β -ketoacyl-acyl carrier protein syntetáza III (KAS III alebo FabH) predstavuje jeden z esenciálnych enzýmov komplexu syntázy mastných kyselín FAS II a je dôležitý na elongáciu vznikajúceho uhlíkového reťazca (Obrázok 6) [114]. Narušením syntézy mastných kyselín u mikroorganizmov dochádza k poškodeniu ich membrány, ktorá vo finále môže viesť až k smrti [115]. Vzhľadom na to, že sa FAS II u človeka nevyskytuje (človek má FAS I) [116] jedná sa o ideálny antimikrobiálny cieľ. Tvorba a zloženie mastných kyselín je jedným z dôležitých rozdielov mykobaktérií a baktérií. Na rozdiel od baktérií majú mykobaktérie FAS II i FAS I, a to im umožňuje tvorbu atypických tzv. mykolových kyselín, ktoré tvoria významnú časť ich extrémne lipofilnej vonkajšej membrány [117]. A práve FabH je u mykobaktérií zodpovedné za prepojenie týchto dvoch cyklov [118]. Atypická tvorba mastných kyselín sa s úspechom využíva terapeuticky u antituberkulotík ako isoniazid či etionamid, ktoré inhibujú syntézu mykolových kyselín na rôznych úrovniach [119]. U baktérií nie je zatiaľ klinicky používané žiadne liečivo, u ktorého by inhibícia syntézy mastných kyselín pôsobila ako primárny mechanizmus účinku.

V publikácii **P4** sme pripravili sériu derivátov *N*-(thiazol-2-amin)arylkarboxamidu (látky **6**) odvodených od známych inhibítorov FabH s fragmentom 2-aminothiazolu a štruktúrne blízkyh látok s antimykobakteriálnou aktivitou syntetizovaných v našej skupine (vid' *Figure 1* v **P4** spolu s referenciami).



6

Séria zahrňovala 36 derivátov kombinujúcich 2-aminothiazol a 2-aminoxazol (zväčša ako porovnateľné dvojice) obsahujúcich pyrazín a pyridín. Pyridín bol použitý na základe izostérie s pyrazínom, a jeho použitie nám umožnilo otestovať väčšiu variabilitu substituentov, ktoré boli navyše komerčne dostupnejšie. Synteticky boli látky relatívne priamočiare no často s nižšími výťažkami (Schéma 4). Ako sme predpokladali, izosterná zámena 2-aminothiazolu za 2-aminoxazol znížila lipofilitu látok v priemere približne o jednu jednotku $\log P$, hodnotené ako $\log k'$ pomocou RP-HPLC. Zvýšila sa aj rozpustnosť vo vode približne o jeden až dva rády, čo sme testovali na vybraných reprezentatívnych dvojiaciach látok kinetickou metódou, ktorá je založená na stanovení koncentrácie roztoku po vyzrážaní nasýteného roztoku v DMSO vodou. Z pohľadu SAR bolo dôležité pozorovanie, že deriváty s najvyššou antimykobakteriálnou aktivitou obsahovali malý lipofilný substituent v polohe 3 číslovanom od karboxamidového linkra (R² u štruktúrneho typu 6).

Bližšie *in silico* skúmanie pomocou dockingu ukázalo, že spomínaný 3-substituent u látok 6 vyplňoval malú lipofilnú kapsu v aktívnom mieste neďaleko katalytickej triády, čo by mohlo stabilizovať jeho konformáciu. Na docking sme použili mtFabH (PDB ID: 1U6S). Bohužiaľ, žiadne štruktúrne príbuzné ligandy neboli zatiaľ vo FabH pochádzajúcej zo žiadneho organizmu vykryštalizované. Validitu získaných póz sme preto overili pomocou molekulovej dynamiky v troch nezávislých 50 ns MD simuláciách. Jedná sa o pokročilú *in silico* metódu rozlíšenia vhodných a nevhodných dockingových póz (v angl. literatúre označované ako „decoy poses“), ktorá je založená na pozorovaní, že kryštalografické pózy sú energeticky výhodnejšie, a preto sú počas MD simulácie stabilnejšie než decoy pózy [85, 86]. Zaujímavosťou FabH je, že ide o homodimér, ktorý obsahuje dve aktívne miesta na rozhraní podjednotiek. To sme využili na urýchlenie výpočtu, nakoľko bolo možné simulovať dve látky naraz, jednu v každej podjednotke. Látky boli v aktívnom mieste stabilné (na základe RMSD), a teda sme väzbový mód syntetizovaných látok v mtFabH pokladali za pravdepodobný.

Žiadny aktívny thiazolových derivát nestratil svoju aktivitu po náhrade za oxazol. U derivátov neobsahujúcich 4-fenylový fragment (R¹ u látok 6) bol dokonca po izosterej zámene thiazolu za oxazol pozorovaný extrémny nárast aktivity. U najúčinnjších derivátov série odvodených

od 2-chlorisonikotínovej kyseliny išlo o viac ako 200-násobný pokles MIC proti Mtb, a to z 500 na 3 µg/mL.

Najaktívnejšie látky preto postúpili do rozšíreného testovania antimikrobiálnej aktivity a vykázali silnú aktivitu proti multi-rezistentným klinickým izolátom Mtb a dokonca aj uspokojujú aktivitu proti niektorým G+ a G- baktériám, opäť vrátane rezistentných klinických izolátov. Vzhľadom na momentálnu krízu rezistencie proti antimikrobiálnym látkam predstavujú tieto látky veľmi atraktívnych kandidátov na ďalšie skúmanie.

3.3. PUBLIKÁCIE S VÝRAZNÝM PODIELOM *IN SILICO* MODELOVANIA (P5–P8)

Mal som možnosť využiť široké spektrum počítačových metód od tých najjednoduchších, napr. predpovedanie fyzikálne-chemických vlastností ($\log P$, pK_a), analýzu interakcií pomocou silových polí, až po komplexnejšie ako docking, molekulová dynamika či kvantové výpočty. Niektoré metódy už boli komentované spolu s príslušnými publikáciami (P3 a P4). V nasledujúcej časti sa preto budem už venovať len prvoautorským (P5) a spoluautorským (P6–P8) publikáciám, v ktorých som mal na starosti prevažne počítačové modelovanie, a nebudem preto výrazne komentovať ich iné aspekty.

3.3.1. Analýza neväzbových interakcií pomocou silových polí (P5)

Heteroaromatické cykly vhodne kombinujú nepolárne a polárne vlastnosti. Vďaka prítomnosti delokalizovaných elektrónov sú schopné zúčastňovať sa tzv. π -interakcií, ale prítomnosť heteroatómu im umožňuje tvoriť aj silnejšie polárne vodíkové väzby. Výhodou pyrazínu oproti iným šesťčlenným *N*-heteroaromátom je jeho ideálna poloha dusíkov schopných napr. stabilizácie dvoch peptidových reťazcov, či naopak silnej stabilizácie ligandu v aktívnom mieste. Táto charakteristika by mohla prevážiť nad jeho obecnou nižšou rozpustnosťou napr. oproti pyridínu, a robí z neho dôležitý fragment pri dizajne liečiv.

Dovtedy neexistovala žiadna práca, ktorá by systematicky sledovala interakcie pyrazínu v proteínoch. Na túto tému sme preto spravili rešeršnú prácu P5, kde sme analyzovali záznamy komplexov ligand-proteín v RCSB PDB databáze a sledovali, akých najčastejších interakcií sa zúčastňuje v proteínoch pyrazínový fragment, ktorý môže byť zároveň vhodne substituovaný napr. halogénom, OH alebo NH₂ skupinou a podobne.

Analýza prebiehala pomocou softvéru MOE, ktorý nám uľahčil úpravy PDB záznamov a umožnil jednoduchým spôsobom odhadnúť a vizualizovať silu (respektíve energiu) neväzbových interakcií, ktorých presný výpočet by inak vyžadoval nemalé úsilie zahrňujúce komplexné kvantové výpočty a empirické korekcie (pre ilustráciu vid' napr. referencie [120, 121]).

Zistili sme, že pyrazín v komplexoch ligand-proteín najčastejšie vystupuje ako akceptor silných vodíkových väzieb na jeden z jeho dusíkov. Ako heteroaromatický kruh je však tiež schopný tvorby tzv. slabých vodíkových väzieb v smere C_{pyrazín}H...akceptor, v ktorých vystupuje ako donor alebo ako CH... π _{pyrazín}, kde vystupuje *de facto* ako akceptor. Tradičné aromatické „sendvičové“ π - π interakcie boli v analyzovanej databáze málo časté. U štyroch

halogénpyrazínových ligandov sme pozorovali náznaky halogénovej väzby, ktorých dôležitosť v posledných rokoch výrazne vzrástla a ukazuje sa, že sú zodpovedná za niektoré predtým nepochopené javy. Súhrn hlavných pozorovaných interakcií je uvedený v Tabuľke 1, plná verzia tejto tabuľky je dostupná ako *Table 4* v **P5**.

Situáciu, kde by interagovali oba dusíky pyrazínu súčasne, a pyrazín tak naplno uplatňoval svoj potenciál sme našli v ľudskej prolyl t-RNA syntetáze (hsProRS, PDB ID: 5VAD). Ukázalo sa, že vhodne substituovaný pyrazín je schopný nahradiť adenosín a tým inhibovať funkciu hsProRS (viď *Figure 3* v **P5**). Na tému t-RNA syntetáz boli následne spracované dve experimentálne spoluautorské publikácie **P7** a **P8**.

*Tabuľka 1 Štatistika pozorovaných interakcií. pyrazínových ligandov v proteínoch.
(Upravené podľa Table 4 z článku P5)*

Počet analyzovaných PDB záznamov	207 + 1
Počet unikátnych ligandov obsahujúcich pyrazín	155 + 1
Počet neväzbových interakcií na pyrazín	147 (100%)
Pyrazín ako akceptor vodíkových väzieb	75 (51%)
Pyrazín ako donor vodíkových väzieb	31 (21%)
π-interakcie	38 (26%)
Koordinácia kovu	3 (2%)
Halogénové väzby	4
Ostatné interakcie s halogénom	>15

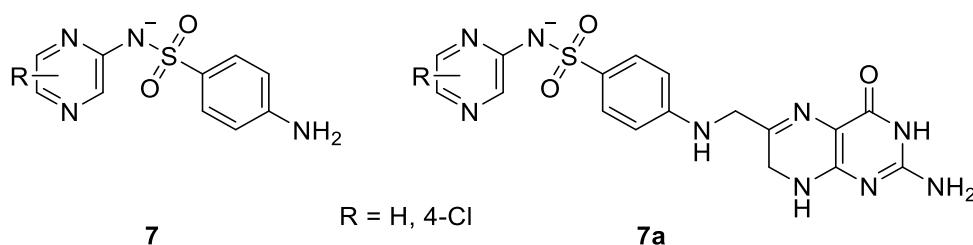
„+ 1“ : PDB ID: 4KN6 s ligandom 1RP. Ligand obsahoval *N*-metylovaný pyrazín, a preto nebol zaradený do celkovej analýzy

Okrem štatistického spracovania interakcií sme sa venovali aj problematike tautomérov a protomérov. U pyrazínových derivátov sa jedná napr. o hydroxy- či aminopyrazíny schopné vystupovať v závislosti od prostredia v keto/enol či laktám/laktim forme. Kvôli okolitým aminokyselinám, ktoré samotné majú viacero možných tautomérnych a protomérnych stavov (vrátane tzv. flipov [94]) je preto určenie správnych stavov kľúčové a môže mať vplyv na úspech alebo neúspech dizajnovaných látok. Význam sme názorne demonštrovali na príklade pyrazínového inhibítora tyrozyl-DNA fosfodiesterázy 1 (*Figure 15* v publikácii **P5**).

Práca **P5** potvrdila naše predpoklady, že pyrazín je vhodným fragmentom v dizajne liečiv a je schopný uplatňovať viaceré dôležité interakcie.

3.3.2. Dockingové štúdie sulfonamidových derivátov (P6)

Moja prvá publikovaná dockingová štúdia bola súčasťou spoluautorskej publikácie **P6**. Naším cieľom bolo ukázať, že syntetizované sulfonamidy typu **7** obsahujúce 4-amino substituent na aromatickom cykle môžu kompetitívne inhibovať mykobakteriálnu dihydropteroát syntetázu (mtDHPS, použili sme PDB ID: 1EYE) podobne ako antibakteriálne sulfonamidy. Pri príprave ligandov bolo nutné sulfonamidy ručne deprotonovať, nakoľko algoritmus MOE nesprávne vypočítal hodnotu pK_a sulfonamidovej skupiny a predpokladal protonovanú formu. Výpočtu pK_a sme sa v **P6** venovali bližšie a testovali sme niekoľko algoritmov. Ide o veľmi komplexnú problematiku a najpresnejšie výsledky v porovnaní s experimentálnymi hodnotami pK_a dával softvér Chemicalize (<https://chemicalize.com/>) od firmy ChemAxon.



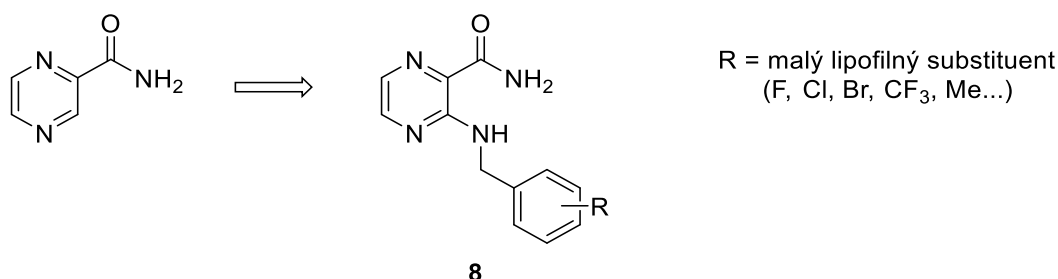
Zlúčeniny boli dokované vo forme finálneho produktu enzymatickej reakcie (**7a**), čo umožnilo použiť templátový docking. Pri tejto metóde sa zadefinuje akým spôsobom sa do aktívneho miesta viažu určené atómy ligandu, pričom zvyšné atómy sa riadia už bežnými pravidlami dokovacieho algoritmu. Používa sa hlavne pri dockingu látok obsahujúcich fragment známeho ligandu, u ktorých je vysoko pravdepodobné (alebo žiadané), že sa budú viazať obdobným spôsobom. Vznik takéhoto produktu bol podporený experimentálnymi i výpočtovými štúdiami na štruktúrne príbuzných zlúčeninách [122, 123]. Ako templát bolo použité dihydropterínové jadro. Pózy našich látok boli porovnávané s pózou 4-aminobenzoovej kyseliny (fyziologického substrátu) a vykazovali zhodné interakcie, ktoré racionalizovali predpokladaný mechanizmus účinku.

Nakoľko je sulfonamidový linker bežný aj u liečiv v iných indikáciách, rozhodli sme sa pomocou target fishingu nájsť ďalšie potenciálne ciele pripravených zlúčenín. V RCSB PDB databáze som identifikoval šesť potenciálnych receptorov, ktoré obsahovali kokryštalizované sulfonamidové ligandy, a následne som už bežným spôsobom (teda nie templátovým dockingom) nadokoval pripravené zlúčeniny. Získal som niekoľko perspektívnych receptorov, z ktorých najviac som sa venoval enzýmu matrix metaloproteináza 8 (MMP-8, PDB ID: 5H8X), kde sa pyrazínový fragment uplatňoval ako chelátor Zn^{2+} kofaktoru a sulfonamidová skupina interagovala podobne ako kokryštalizovaný inhibítor (viď *Figure 8* v článku **P6**).

3.3.3. Štúdie s využitím molekulovej dynamiky (P7, P8)

Podobne ako v už komentovanej publikácii **P4** som MD simuláciu využil aj pri spoluautorských publikáciách **P7** a **P8**.

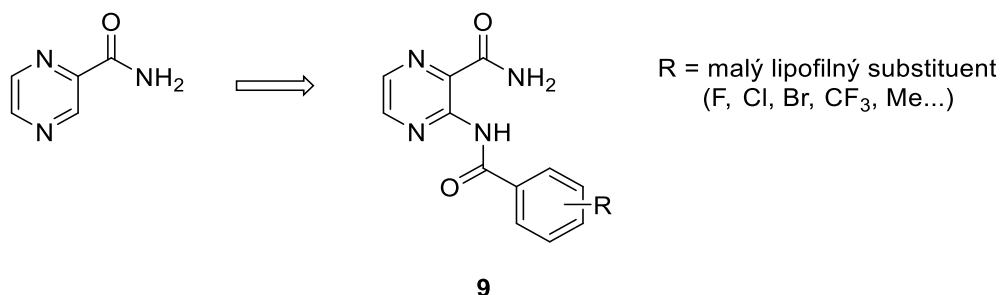
V štúdiu **P7** som racionalizoval a podporil závery kolegov z kryštalografie súvisiace s rastom stability väzby 2-substituovaných ligandov v ľudskej hsProRS (substituent R u štruktúrneho typu **8**). MD simulácia ukázala, že substituent v polohe 2 benzénového jadra vyplňoval v receptore malú kavitu a vytlačoval molekulu tzv. štruktúrálnej (kryštalografickej) vody. Ide o molekulu vody, ktorá je pevne stabilizovaná v aktívnom mieste a často sa zúčastňuje interakcie proteínu s ligandom alebo je naopak ligandom z aktívneho miesta vytlačovaná [124]. Tento substituent obmedzoval voľnú otáčavosť ligandu a zvyšoval jeho celkovú stabilitu v porovnaní s nesubstituovaným ligandom (R = H).



Látky štruktúrneho typu **8** popisované v **P7** sa ukázali ako perspektívne proti hsProRS. Zaujímalo nás však, či by bolo možné ich použiť napr. na inhibíciu MtProRS, nakoľko ide o zatiaľ nevyužívaný antimykobakteriálny cieľ. Analýzou možných interakcií a dockingom do MtProRS sme zistili, že namiesto použitia benzylamínovej skupiny by bolo výhodnejšie použiť benzamidové zoskupenie, pričom benzamidový karbonylový kyslík by následne mohol interagovať s molekulou (inej) štruktúrálnej vody. Kryštalografická štruktúra MtProRS nie je dostupná, preto sme na počítačové experimenty použili model predpovedaný umelou inteligenciou AlphaFold. Pripravené boli látky štruktúrneho typu **9**. Tie vykázali aktivitu len pri použití primárnej pyrazínkarboxamidovej skupiny. Estery, *N*-metylované, *N,N*-dimetylované či cyklické deriváty boli neúčinné. Bližšie k SAR vid' článok **P8**.

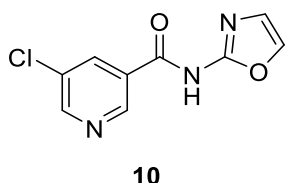
MD simuláciou bola opäť sledovaná stabilita póz a špecifických interakcií. Ligand bol počas 50 ns stabilný v nadokovanej póze. Primárna karboxamidová skupina bola stabilizovaná dvoma silnými vodíkovými väzbami, pričom každý vodík karboxamidu vystupoval ako donor na inú aminokyselinu. Jedna z týchto vodíkových väzieb však vznikla až počas MD simulácie, teda docking ju nezaznamenal, čo je pochopiteľné nakoľko sa jednalo o model a nie o kryštalografickú štruktúru. *N*-metylovaný derivát túto vodíkovú väzbu tvoriť nemohol, čo

racionalizovalo pozorované SAR a jeho nižšiu aktivitu. Počas MD simulácie sme tiež sledovali náznak halogénovej väzby, ktorá potenciálne vysvetľovala vyššiu aktivitu derivátov, kde R substituent predstavoval halogén v polohe 4.



3.4. ZATIAĽ NEPUBLIKOVANÉ VÝSLEDKY A MOŽNÉ NADVÄZNOTI

Na základe získaných aktivít látok **6** (potenciálne inhibítory mtFabH, **P4**) a ich jasných štruktúrnych preferencií (substitúcia v polohe 3 vzhľadom na karboxamidový linker) som rozpracoval ďalšiu sériu derivátov chlorpyrazínových a chlorpyridínových kyselín (napr. látka **10**) určenú na potvrdenie pozorovaného SAR.



Látky boli otestované obdobným spôsobom ako predtým a potvrdili, že na najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu musí byť substituent v už popísanej polohe. Poloha dusíka bola tolerovaná hlavne v polohe 3 a 4 (stále vzhľadom na karboxamid). V nadväznosti na tieto výsledky sa tejto sérii látok budem venovať aj naďalej a pokúsim sa pripraviť účinnejšie deriváty zavedením ďalšieho zbytku do polohy 4 oxazolového kruhu. Táto obmena predstavuje rozsiahle možnosti štruktúrnych obmien, ktoré by veľmi pravdepodobne viedli k látkam s vyššou aktivitou. Rád by som tiež validoval aktivitu na mtFabH a preto momentálne hľadáme vhodnú spoluprácu so zahraničným pracoviskom, ktoré by bolo schopné naše látky otestovať.

Ďalší projekt, ktorého som súčasťou prakticky od jeho začiatkov sa zaoberá virtuálnym skríningom látok na možnú inhibičnú aktivitu proti MtProRS a prípadne ProRS ďalších klinicky významných mikroorganizmov. Využitie tohto cieľa sme už čiastočne spracovali v publikácii **P8**. Tentokrát sme však použili veľké komerčné databázy (eMolecules, Enamine, atď) s cieľom nájsť potenciálne inhibítory nových štruktúrnych typov. Jedná sa tak o racionálny

dizajn v pravom slova zmysle. Priame enzymatické testovanie inhibičnej aktivity je plánované v spolupráci so zahraničnou univerzitou, no projekt je zatiaľ len v počiatkoch.

Poslednú sériu látok, ktorej sa venujem, predstavujú nové potenciálne inhibítory serín-acetyl transferázy (SAT). Ide o pomerne nový no nádejný antimikrobiálny cieľ [125]. Vzhľadom na obecné štruktúrne rysy inhibítorov, (Ar)-CONH-Ar-thiazol-Ar [126, 127] som navrhol niekoľko štruktúrnych obmien s využitím napr. pyrrolu a 1,3,4-oxadiazolu. Syntéza týchto látok je viackroková no podarilo sa nám pripraviť niekoľko derivátov, ktoré čakajú na mikrobiologické testovanie. Ako u väčšiny objemných aromatických zlúčenín, aj u týchto látok hrozí nízka rozpustnosť vo vode, ktorá by mohla znamenať ich neúspech už v skorých fázach. Preto bude potrebné nasyntetizované deriváty otestovať aj v tomto smere a prípadne optimalizovať ich štruktúru.

Pyrazín či pyrazínamidový skelet môžeme nájsť vo viacerých skupinách liečiv. Za zmienku stojí napríklad protinádorové liečivo bortezomib. Vhodné obmeny látok **5** s výraznejšou cytotoxicitou, respektíve inhibíciou ľudských izoforiem MetAP, by tak mohli viesť k látkam s potencovaným protinádorovým účinkom. Takýto typ repurposingu nie je v klinickej praxi zriedkavý [128] a aj v našej skupine sa už u niektorých sérií osvedčil [129].

3.5. SÚHRNNÝ ZÁVER

Pri riešení tejto dizertačnej práce bolo pripravených viac ako 100 nových zlúčenín, ktoré boli analyticky popísané a otestované na antimykobakteriálnu, antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu pomocou štandardných referenčných kmeňov aj klinických izolátov. Nie všetky získané aktivity boli zatiaľ publikované, no z publikovaných výsledkov je jasné, že sme pripravili niekoľko nádejných látok. Väčšina derivátov bola podrobená cytotoxickému skríningu s využitím buniek hepatocelulárneho karcinómu HepG2 a vykazovala prijateľnú selektivitu. Zo všetkých pripravených látok, pätnásť dosiahlo antimykobakteriálnu aktivitu proti Mtb lepšiu alebo rovnú 7,81 $\mu\text{g/mL}$, čo by pri priemernej $M = 250 \text{ g/mol}$ odpovedalo približne 31,24 μM . To pokladáme za dobrý štartovací bod pre ďalšie optimalizácie štruktúry, ktoré sú plánované. Naproti tomu len dve látky dosiahli antibakteriálnu aktivitu na zrovnateľnej úrovni, *t. j.* $\leq 31,25 \mu\text{M}$, žiadna látka v testovaných koncentráciách nepreukázala výraznú antifungálnu aktivitu. Prehľad najdôležitejších látok v komentovaných prácach je uvedený na Obrázku 7 nižšie.

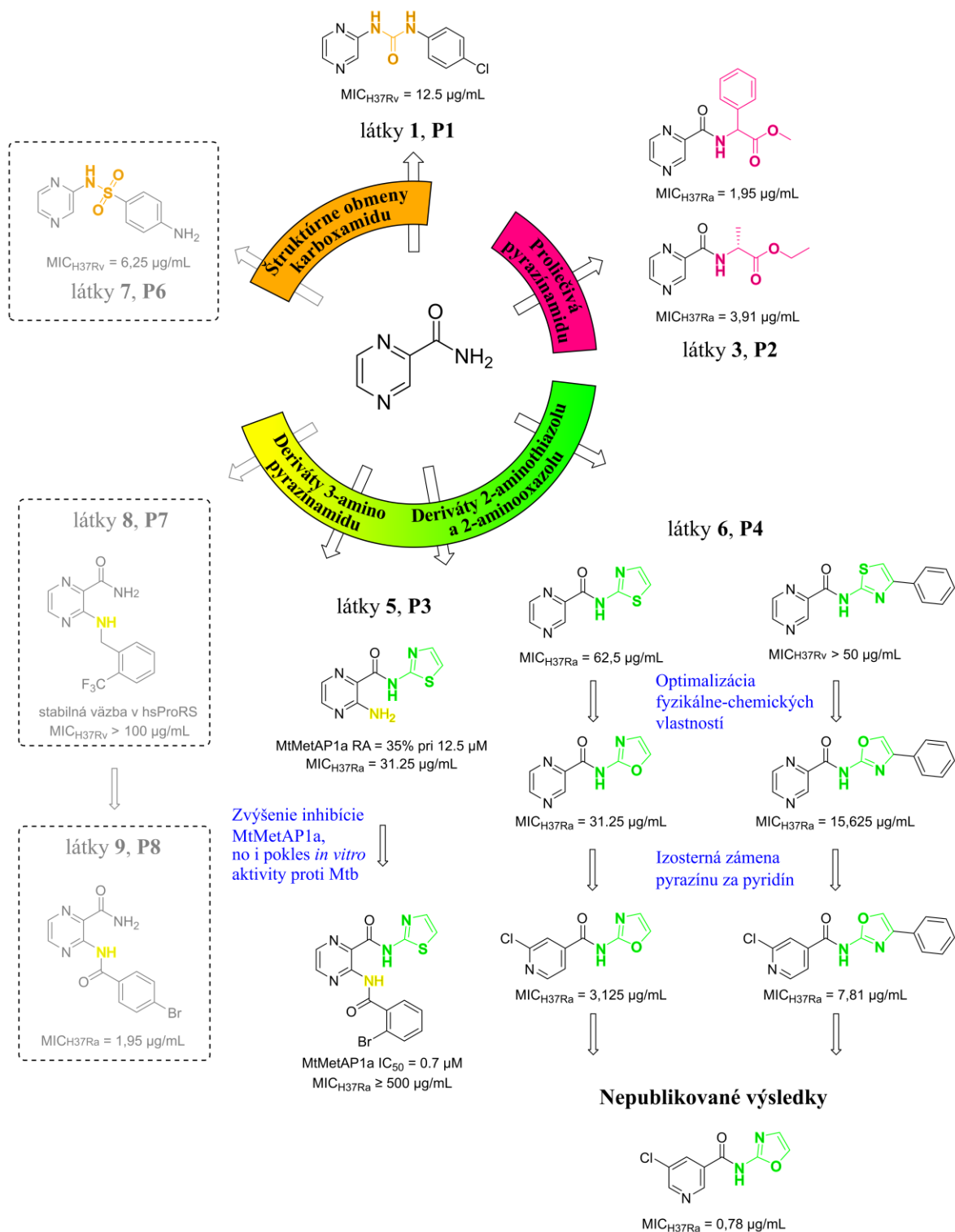
Prvé komentované práce popisujú štruktúrne modifikácie PZA bez „target-based“ dizajnu, teda látky nie sú cieleňé na konkrétny mechanizmus účinku. Jedná sa o ureidy **1** a amidy PZA pripravené pomocou aminokyselín **3**. Zatiaľ čo u látok **1** bola pozorovaná slabá antimikrobiálna účinnosť, látky **3** mali vysokú aktivitu viac-menej selektívne proti Mtb. Predpoklad je, že by sa mohlo jednať o proliečivá PZA aktívne po hydrolýze vhodnými peptidázami, no túto teóriu sme nemali možnosť experimentálne overiť. Najúčinnějšía látka tejto série, ktorá bola súčasne mojou zatiaľ najúčinnějšíou publikovanou látkou postúpila až do *in vivo* testovania. Žiaľ, neprejavila výrazné antituberkulotické účinky na myšom modeli TB.

Ďalšie publikované práce už využívajú racionálny „target-based“ dizajn založený na možnej inhibícii konkrétneho mikrobiálneho enzýmu. Ako prvý cieľ som zvolil metionín aminopeptidázu, a aktivitu pripravených látok **5** som experimentálne potvrdil pomocou enzymatických testov. Hoci niektoré látky vykazovali výraznú enzýmovú inhibíciu (najlepšia $\text{IC}_{50} = 0.7 \mu\text{M}$), boli veľmi málo aktívne *in vitro*, čo sme prisúdili ich zlej rozpustnosti vo vode či zlému prestupu cez membrány. Pokračoval som prípravou potenciálnych inhibítorov mtFabH **6**, u ktorých bolo okrem antimikrobiálnej aktivity testované aj zlepšenie fyzikálne-chemických vlastností izosternou zámennou síry za kyslík vo fragmente 2-aminothiazolu. Táto zámenná sa ukázala veľmi výhodná a viedla k sérii veľmi účinných látok s výraznou antimikrobiálnou aktivitou zahrňujúcou multi-drug rezistentné kmene. V posledných prácach som sa zaoberal

potenciálnymi inhibítormi mtProRS, veľmi sľubného a málo preskúmaného cieľa, použiteľného napr. u novej generácie potenciálnych antituberkulotík.

Využíval som väčšinu moderných počítačových metód. Pomocou dockingu som racionalizoval mechanizmus účinku či zisťoval možný vplyv nekoplanárneho usporiadania aromatických kruhov na enzymatickú aktivitu. K najpokročilejším počítačovým štúdiám patrila racionalizácia vplyvu substituentov pri interakciách derivátov s hsProRS a mtFabH molekulovou dynamikou. Tá potvrdila, že vhodná substitúcia stabilizuje konformáciu a tým by mohla viesť k zlepšeniu biologickej aktivity.

Je zaujímavé, že u pripravených derivátov pyrazínu bola pozorovaná len výrazná antimykobakteriálna aktivita, zatiaľ čo nevykazovali takmer žiadnu aktivitu proti baktériám a patogénnym hubám klinického významu. Takúto selektivitu sledujeme v našej skupine už dlho. Výraznejšia antibakteriálna aktivita bola u mnou publikovaných látok pozorovaná až pri izosternej zámene pyrazínu za pyridín. Mechanizmy antimikrobiálneho účinku ani ďalšie dôležité parametre ako schopnosť prestupu syntetizovaných látok cez membrány nie sú známe. Preto nie je jasné, či je za zmenou aktivity len zmena fyzikálne-chemických vlastností, napr. vyššia bazicita dusíka pyridínu, vyššia rozpustnosť vo vode alebo sa uplatňuje niektorý špecifický mechanizmus, napr. aktívny transportér. Je zrejmé, že pre dizajn antibakteriálnych látok by v budúcnosti bolo dobré sledovať tieto rozdiely naďalej a prispôsobiť tomu návrh novej generácie antimikrobiálnych zlúčenín.



Obrázok 7 Prehľad najdôležitejších látok v rámci komentovaných publikácií. Orámované časti popisujú látky syntetizované mojimi kolegami a publikované v rámci prác, kde som racionalizoval možný mechanizmus účinku pomocou počítačového modelovania. Aktivita derivátu štruktúrneho typu 8 bola prevzatá z referencie [130].

4. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

4.1. PUBLIKÁCIE POUŽITÉ V TOMTO KOMENTÁRI

- P1** [131] Bouz, G.; **Juhas, M.**; Niklova, P.; Jandourek, O.; Paterova, P.; Janousek, J.; Tumova, L.; Kovalikova, Z.; Kastner, P.; Dolezal, M.; Zitko, J. Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules*, **2017**, 22(10), E1797.
DOI: [10.3390/molecules22101797](https://doi.org/10.3390/molecules22101797).
IF₂₀₁₇ = 3.098 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
Podiel: syntéza a čistenie vybraných látok, písanie článku
- P2** [132] **Juhas, M.**; Kucerova, L.; Horacek, O.; Jandourek, O.; Kubicek, V.; Konecna, K.; Kucera, R.; Barta, P.; Janousek, J.; Paterova, P.; Kunes, J.; Dolezal, M.; Zitko, J. *N*-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents-The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules*, **2020**, 25(7), 1518.
DOI: [10.3390/molecules25071518](https://doi.org/10.3390/molecules25071518).
IF₂₀₂₀ = 4.412 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
Podiel: návrh, syntéza a čistenie látok, interpretácia získaných výsledkov a hodnotenie SAR, písanie a revízie článku
- P3** [133] **Juhas, M.**; Pallabothula, V. S. K.; Grabrijan, K.; Simovicova, M.; Jandourek, O.; Konecna, K.; Barta, P.; Paterova, P.; Gobec, S.; Sosic, I.; Zitko, J. Design, synthesis and biological evaluation of substituted 3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamides as inhibitors of mycobacterial methionine aminopeptidase 1. *Bioorg Chem*, **2022**, 118, 105489.
DOI: [10.1016/j.bioorg.2021.105489](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105489).
IF₂₀₂₁ = 5.307 (Q2Q1), AIS: Q3Q2
Podiel: návrh, syntéza a čistenie látok, interpretácia získaných výsledkov a hodnotenie SAR, enzymatické testovanie, počítačové štúdie, písanie a revízie článku

- P4** [134] **Juhas, M.**; Bachtikova, A.; Nawrot, D. E.; Hatokova, P.; Pallabothula, V. S. K.; Diepoltova, A.; Jandourek, O.; Barta, P.; Konecna, K.; Paterova, P.; Sestak, V.; Zitko, J. Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2022**, 15(5), 580.
DOI: [10.3390/ph15050580](https://doi.org/10.3390/ph15050580).
IF₂₀₂₁ = 5.215 (Q2Q1), AIS: Q1Q2
Podiel: návrh, syntéza a čistenie látok, interpretácia získaných výsledkov a hodnotenie SAR, počítačové štúdie, písanie a revízie článku
- P5** [135] **Juhas, M.***; Zitko, J.* Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. *J Med Chem*, **2020**, 63(17), 8901-8916.
DOI: [10.1021/acs.jmedchem.9b02021](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02021). *contributed equally
IF₂₀₂₀ = 7.446 (Q1), AIS: Q1
Podiel: literárna rešerš a analýza PDB záznamov, písanie a revízie článku
- P6** [136] Bouz, G.; **Juhas, M.**; Pausas Otero, L.; Paredes De La Red, C.; Jandourek, O.; Konecna, K.; Paterova, P.; Kubicek, V.; Janousek, J.; Dolezal, M.; Zitko, J. Substituted *N*-(Pyrazin-2-yl)benzenesulfonamides; Synthesis, Anti-Infective Evaluation, Cytotoxicity, and In Silico Studies. *Molecules*, **2019**, 25(1), 138.
DOI: [10.3390/molecules25010138](https://doi.org/10.3390/molecules25010138).
IF₂₀₁₉ = 3.267 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
Podiel: počítačové štúdie a predikcia p*K*_a, písanie a revízie článku
- P7** [137] Pang, L.; Weeks, S. D.; **Juhas, M.**; Strelkov, S. V.; Zitko, J.; Van Aerschot, A. Towards Novel 3-Aminopyrazinamide-Based Prolyl-tRNA Synthetase Inhibitors: In Silico Modelling, Thermal Shift Assay and Structural Studies. *Int J Mol Sci*, **2021**, 22(15), 7793.
DOI: [10.3390/ijms22157793](https://doi.org/10.3390/ijms22157793).
IF₂₀₂₁ = 6.208 (Q1Q2), AIS: Q2Q2
Podiel: počítačové štúdie s využitím MD, písanie a revízie článku

P8 [138] Pallabothula, V. S. K.; Kerda, M.; **Juhas, M.**; Jandourek, O.; Konecna, K.; Barta, P.; Paterova, P.; Zitko, J. Adenosine-Mimicking Derivatives of 3-Aminopyrazine-2-Carboxamide: Towards Inhibitors of Prolyl-tRNA Synthetase with Antimycobacterial Activity. *Biomolecules*, **2022**, 12(11), 1561.
DOI: [10.3390/biom12111561](https://doi.org/10.3390/biom12111561).
IF₂₀₂₁ = 6.064 (Q2), AIS: Q2

Podiel: syntéza vybraných prekursorov, počítačové štúdie s využitím MD, písanie článku

4.2. PUBLIKÁCIE NEZAHRNUTÉ DO KOMENTÁRA

Publikácia **P9** vznikla z výsledkov mojej diplomovej práce získaných počas Erasmus+ magisterského študijného pobytu na Univerzite v Göteborgu vo Švédsku.

P9 [139] Zalem, D.*; **Juhas, M.***; Terrinoni, M.; King-Lyons, N.; Lebens, M.; Varrot, A.; Connell, T. D.; Teneberg, S. Characterization of the ganglioside recognition profile of Escherichia coli heat-labile enterotoxin LT-IIc. *Glycobiology*, **2022**, 32(5), 391-403. *contributed equally
DOI: [10.1093/glycob/cwab133](https://doi.org/10.1093/glycob/cwab133).
IF₂₀₂₁ = 5.954 (Q2), AIS: Q1

Podiel: čistenie látok, enzymatické testovanie aktivity, písanie článku

5. PRÍSPEVKY NA KONFERENCIÁCH

5.1. PREDNÁŠKY

Juhás, M.; Teneberg, S.; Doležal, M. *Definition of the carbohydrate binding capacities of the novel enterotoxin LT-IIc*. XXVI. Študentská vedecká konferencia, Hradec Králové, 18.–19. apríl 2018. – výsledky použité v publikácii **P9**

Zitko, J.; **Juhás, M.** *Computer-aided drug design in medicinal chemistry*, 4EU+ workshop Mathematics Meet Pharmacy 2019, Hradec Králové, 23.–24. september 2019.

Juhás, M.; Kučerová, L.; Doležal, M. *N-pyrazinoyl substituted amino acids as potential antimycobacterial agents – synthesis and biological evaluation of enantiomers*, X. Postgraduálna a postdoktorandská vedecká konferencia, Hradec Králové, 22.–23. január 2020.

Juhás, M.; Zitko, J. *Design, synthesis and biological evaluation of pyrazine-based inhibitors of mycobacterial methionine aminopeptidase*, XI. Postgraduálna a postdoktorandská vedecká konferencia, Hradec Králové, 22.–23. január 2020.

Juhás, M.; Pallabothula, V. S. K.; Nawrot, D.; Hatoková, P.; Diepoltová, A. *De novo design of 2-aminoxazoles as inhibitors of bacterial β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH)*, Syntéza a analýza liečiv 2021, Hradec Králové, 16.–17. september 2021.

Juhás, M.; Bachtíková, A.; Pallabothula, V. S. K.; Nawrot, D.; Hatoková, P.; Diepoltová, A. *2-aminoxazoles as a viable alternative to 2-aminothiazoles in antimicrobial agents*, XII. Postgraduálna a postdoktorandská vedecká konferencia, Hradec Králové, 1.–2. február 2022.

Juhás, M.; Ecker, G. F. *Proteochemometric modelling of SLC5 transporters*, XIII. Postgraduálna a postdoktorandská vedecká konferencia, Hradec Králové, 1.–2. február 2023.

5.2. POSTEROVÉ ZDELENIA

Juhás, M.; Zitko, J.; Doležal, M. *Design, synthesis and biological evaluation of pyrazine derivatives*, Paul Ehrlich Euro-PhD Network & MuTaLig COST Action meeting, Catanzaro (Taliansko), 13.–15. jún 2019.

Juhás, M.; Zitko, J.; Doležal, M. *Design, synthesis and biological evaluation of pyrazine derivatives*, Joint Meeting on Medicinal Chemistry (JMMC) 2019, Praha, 27.–30. jún 2019.

Juhás, M.; Zitko, J. *Design, synthesis and biological evaluation of new inhibitors of mycobacterial methionine aminopeptidase 1a*, EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2021), online, 29. august–2. september 2021.

Juhás, M.; Bachtíková, A.; Zitko, J. *Improving activity and physico-chemical properties of antimicrobial 2-aminothiazole derivatives*, International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2022), Nice (Francúzsko), 4.–8. september 2022.

6. VEDECKÉ OCENENIA

3. miesto na XXVI. Študentskej vedeckej konferencii organizovanej Farmaceutickou fakultou v Hradci Králové 18.–19.4.2018. Sekcia chemických vied – analytická časť, prezentácia s názvom *Definition of the carbohydrate binding capacities of the novel enterotoxin LT-IIc*.

7. ÚČASŤ NA GRANTOCH

Grantové schémata na UK - reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935 - Design, synthesis and biological evaluation of 2-aminooxazoles as antibacterial compounds. (hlavný riešiteľ)

Grantová agentúra ČR - reg. č. 19-14886Y - Spolehlivé výpočty a predikce NMR chemických posunů pro strukturní charakterizaci fosforylovaných vnitřně neuspořádaných proteinů. (spoluriešiteľ)

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] *Number of deaths due to tuberculosis, excluding HIV* [online]. [citované 23.02.2023]. URL: <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-deaths-due-to-tuberculosis-excluding-hiv>>.
- [2] *Global health estimates: Leading causes of death* [online]. [citované 23.02.2023]. URL: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>>.
- [3] *Global Tuberculosis Report 2022* [online], Geneva: World Health Organization 2022. ISBN 978-92-4-006173-6
URL: <<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1474924/retrieve>>. [citované 23.2.2023].
- [4] De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J., et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*, **2020**, 33(3), e00181-00119. DOI: 10.1128/CMR.00181-19
- [5] *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed* [online], [citované 23.02.2023]. URL: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.
- [6] Falagas, M. E.; Bliziotis, I. A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*, **2007**, 29(6), 630-636. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012
- [7] Karakonstantis, S.; Kritsotakis, E. I.; Gikas, A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *J Antimicrob Chemother*, **2020**, 75(2), 271-282. DOI: 10.1093/jac/dkz401
- [8] *WHO model list of essential medicines - 21st list, 2019* [online], [citované 23.02.2023]. URL: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHOMVPEMPIAU2019.06>>.
- [9] Doležal, M.; Zitko, J.; Jampílek, J. Pyrazinocarboxylic Acid Derivatives with Antimycobacterial Activity. In: Cardona (ed.) *Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*. 1 vyd., IntechOpen, Rijeka 2012. ISBN 978-953-307-948-6
- [10] Tarnok, I.; Pechmann, H.; Krallmann-Wenzel, U., et al. [Nicotinamidase and the so-called pyrazinamidase in mycobacteria; the simultaneous occurrence of both activities (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, **1979**, 244(2-3), 302-308.
- [11] Scorpio, A.; Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*, **1996**, 2(6), 662-667. DOI: 10.1038/nm0696-662
- [12] Konno, K.; Feldmann, F. M.; McDermott, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis*, **1967**, 95(3), 461-469. DOI: 10.1164/arrd.1967.95.3.461
- [13] Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H., et al. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*, **1999**, 181(7), 2044-2049. DOI: 10.1128/JB.181.7.2044-2049.1999
- [14] Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A., et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*, **2003**, 52(5), 790-795. DOI: 10.1093/jac/dkg446
- [15] Peterson, N. D.; Rosen, B. C.; Dillon, N. A., et al. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2015**, 59(12), 7320-7326. DOI: 10.1128/AAC.00967-15
- [16] Zimhony, O.; Cox, J. S.; Welch, J. T., et al. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*, **2000**, 6(9), 1043-1047. DOI: 10.1038/79558
- [17] Sharma, V.; Grubmeyer, C.; Sacchetti, J. C. Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential TB drug target. *Structure (London, England : 1993)*, **1998**, 6(12), 1587-1599. DOI: 10.1016/s0969-2126(98)00156-7
- [18] Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X., et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **2011**, 333(6049), 1630-1632. DOI: 10.1126/science.1208813

- [19] Njire, M.; Wang, N.; Wang, B., et al. Pyrazinoic Acid Inhibits a Bifunctional Enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2017**, 61(7), DOI: 10.1128/AAC.00070-17
- [20] Zhang, S.; Chen, J.; Shi, W., et al. Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*, **2017**, 6(2), e8. DOI: 10.1038/emi.2017.1
- [21] Sun, Q.; Li, X.; Perez, L. M., et al. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat Commun*, **2020**, 11(1), 339. DOI: 10.1038/s41467-019-14238-3
- [22] Gopal, P.; Sarathy, J. P.; Yee, M., et al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun*, **2020**, 11(1), 1661. DOI: 10.1038/s41467-020-15516-1
- [23] Novacek, L.; Palat, K.; Celadnik, M. Chemie Pyrazinu. *Chem Listy*, **1963**, 57(3), 298-328.
- [24] Novacek, L.; Palat, K.; Celadnik, M., et al. [Antitubercular agents. XI. Function derivatives of 5-substituted 2-pyrazinecarboxylic acid]. *Cesk Farm*, **1972**, 21(4), 145-149.
- [25] Novacek, L.; Celadnik, M.; Palat, K. [Antitubercotics. XII. Function Derivatives of Pyrazinecarboxylic Acids Substituted on the Ring]. *Acta Fac Pharm Univ Comenianae*, **1975**, 27(5), 73-87.
- [26] Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L., et al. Experimental Chemotherapy of Tuberculosis. II. The Synthesis of Pyrazinamides and Related Compounds. *J Am Chem Soc*, **1952**, 74(14), 3617-3621. DOI: 10.1021/ja01134a045
- [27] Rogers, E. F.; Leanza, W. J.; Becker, H. J., et al. Antitubercular Diazine Carboxamides. *Science*, **1952**, 116(3010), 253-254. DOI: 10.1126/science.116.3010.253
- [28] Dlabal, K.; Palat, K.; Lycka, A., et al. Synthesis and ¹H and ¹³C NMR spectra of sulfur derivatives of pyrazine derived from amidation product of 2-chloropyrazine and 6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile. Tuberculostatic activity. *Collect Czech Chem Commun*, **1990**, 55(10), 2493-2501. DOI: 10.1135/cccc19902493
- [29] Foks, H.; Trapkowska, I.; Janowiec, M., et al. Studies on pyrazine derivatives - 38. Synthesis, reactions, and tuberculostatic activity of pyrazinyl-substituted derivatives of hydrazinocarbodithioic acid. *Khim Geterotsikl*, **2004**, 40(9), 1368-1376. DOI: 10.1023/b:cohc.0000048293.68655.d5
- [30] Cynamon, M. H.; Speirs, R. J.; Welch, J. T. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother*, **1998**, 42(2), 462-463. DOI: 10.1128/AAC.42.2.462
- [31] Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Barry, C. E., 3rd. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol*, **2002**, 184(8), 2167-2172. DOI: 10.1128/JB.184.8.2167-2172.2002
- [32] Ahmad, Z.; Tyagi, S.; Minkowsk, A., et al. Activity of 5-chloro-pyrazinamide in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis*. *Indian J Med Res*, **2012**, 136(5), 808-814.
- [33] Cynamon, M. H.; Gimi, R.; Gyenes, F., et al. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. *J Med Chem*, **1995**, 38(20), 3902-3907. DOI: 10.1021/jm00020a003
- [34] Simoes, M. F.; Valente, E.; Gomez, M. J., et al. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *Eur J Pharm Sci*, **2009**, 37(3-4), 257-263. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.02.012
- [35] Pires, D.; Valente, E.; Simoes, M. F., et al. Esters of Pyrazinoic Acid Are Active against Pyrazinamide-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Naturally Resistant *Mycobacteria* In Vitro and Ex Vivo within Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*, **2015**, 59(12), 7693-7699. DOI: 10.1128/AAC.00936-15
- [36] Montgomery, S. A.; Young, E. F.; Durham, P. G., et al. Efficacy of pyrazinoic acid dry powder aerosols in resolving necrotic and non-necrotic granulomas in a guinea pig model of tuberculosis. *PLoS One*, **2018**, 13(9), e0204495. DOI: 10.1371/journal.pone.0204495
- [37] Zhou, S.; Yang, S.; Huang, G. Design, synthesis and biological activity of pyrazinamide derivatives for anti-*Mycobacterium tuberculosis*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **2017**, 32(1), 1183-1186. DOI: 10.1080/14756366.2017.1367774

- [38] Heifets, L.; Higgins, M.; Simon, B. Pyrazinamide is not active against Mycobacterium tuberculosis residing in cultured human monocyte-derived macrophages. *Int J Tuberc Lung Dis*, **2000**, 4(6), 491-495.
- [39] Trnka, L.; Kuska, J.; Havel, A. Comparison of the antituberculous activity of morphazinamide and pyrazinamide on chronic experimental tuberculosis. I. The antimycobacterial efficacy made in vitro and in vivo. *Chemotherapy (Basel)*, **1964**, 9(3), 158-167. DOI: 10.1159/000220356
- [40] Dolezal, M.; Miletin, M.; Kunes, J., et al. Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: Synthesis and biological activity. *Molecules*, **2002**, 7(3), 363-373. DOI: 10.3390/70300363
- [41] Dolezal, M.; Palek, L.; Vinsova, J., et al. Substituted pyrazinecarboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2006**, 11(4), 242-256. DOI: 10.3390/11040242
- [42] Zitko, J.; Servusova, B.; Paterova, P., et al. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, **2013**, 18(12), 14807-14825. DOI: 10.3390/molecules181214807
- [43] Servusova-Vanaskova, B.; Paterova, P.; Garaj, V., et al. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 6-Alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chem Biol Drug Des*, **2015**, 86(4), 674-681. DOI: 10.1111/cbdd.12536
- [44] Servusova, B.; Eibinova, D.; Dolezal, M., et al. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2012**, 17(11), 13183-13198. DOI: 10.3390/molecules171113183
- [45] Zitko, J.; Jandourek, O.; Paterova, P., et al. Design, synthesis and antimycobacterial activity of hybrid molecules combining pyrazinamide with a 4-phenylthiazol-2-amine scaffold. *Medchemcomm*, **2018**, 9(4), 685-696. DOI: 10.1039/c8md00056e
- [46] Servusova-Vanaskova, B.; Jandourek, O.; Paterova, P., et al. Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Medchemcomm*, **2015**, 6(7), 1311-1317. DOI: 10.1039/c5md00178a
- [47] Hegde, P. V.; Aragaw, W. W.; Cole, M. S., et al. Structure activity relationship of pyrazinoic acid analogs as potential antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem*, **2022**, 74, 117046. DOI: 10.1016/j.bmc.2022.117046
- [48] Rangunathan, P.; Cole, M.; Latka, C., et al. Mycobacterium tuberculosis PanD Structure-Function Analysis and Identification of a Potent Pyrazinoic Acid-Derived Enzyme Inhibitor. *ACS Chem Biol*, **2021**, 16(6), 1030-1039. DOI: 10.1021/acscchembio.1c00131
- [49] Kakemi, K.; Arta, T.; Kitazawa, S., et al. [Studies on the synthesis of pyrazinoic acid derivatives. II. Derivatives of 3-aminopyrazinoic acid]. *Yakugaku Zasshi*, **1961**, 81(11), 1650-1653. DOI: 10.1248/yakushi1947.81.11_1650
- [50] Croston, G. E. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov*, **2017**, 12(5), 427-429. DOI: 10.1080/17460441.2017.1308351
- [51] Aulner, N.; Danckaert, A.; Ihm, J., et al. Next-Generation Phenotypic Screening in Early Drug Discovery for Infectious Diseases. *Trends Parasitol*, **2019**, 35(7), 559-570. DOI: 10.1016/j.pt.2019.05.004
- [52] Vanommeslaeghe, K.; Guvench, O.; Mackerell, A. D., Jr. Molecular mechanics. *Curr Pharm Des*, **2014**, 20(20), 3281-3292. DOI: 10.2174/13816128113199990600
- [53] *Amber 2022 Reference Manual* [online], [citované 23.02.2023]. URL: <<http://ambermd.org/doc12/Amber22.pdf>>.
- [54] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W., et al. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*, **2004**, 25(9), 1157-1174. DOI: 10.1002/jcc.20035
- [55] Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. 2 vyd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2004. ISBN 0-470-09181-9
- [56] Foresman, J. B.; Frisch, Æ. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. 3 vyd., Gaussian, Inc., Wallingford, CT 2015. ISBN 978-1-935522-03-4
- [57] Friesner, R. A. Ab initio quantum chemistry: methodology and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2005**, 102(19), 6648-6653. DOI: 10.1073/pnas.0408036102
- [58] Arodola, O. A.; Soliman, M. E. Quantum mechanics implementation in drug-design workflows: does it really help? *Drug Des Devel Ther*, **2017**, 11, 2551-2564. DOI: 10.2147/DDDT.S126344

- [59] Vreven, T.; Morokuma, K.; Farkas, O., et al. Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. *J Comput Chem*, **2003**, 24(6), 760-769. DOI: 10.1002/jcc.10156
- [60] Wang, Y. L.; Mebel, A. M.; Wu, C. J., et al. IR spectroscopy and theoretical vibrational calculation of the melamine molecule. *J Chem Soc Faraday T*, **1997**, 93(19), 3445-3451. DOI: 10.1039/a701732d
- [61] Sousa, S. F.; Ribeiro, A. J. M.; Neves, R. P. P., et al. Application of quantum mechanics/molecular mechanics methods in the study of enzymatic reaction mechanisms. *WIREs Comput Mol Sci*, **2016**, 7(2), e1281. DOI: 10.1002/wcms.1281
- [62] Emamian, S.; Lu, T.; Kruse, H., et al. Exploring Nature and Predicting Strength of Hydrogen Bonds: A Correlation Analysis Between Atoms-in-Molecules Descriptors, Binding Energies, and Energy Components of Symmetry-Adapted Perturbation Theory. *J Comput Chem*, **2019**, 40(32), 2868-2881. DOI: 10.1002/jcc.26068
- [63] Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M., et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des*, **2011**, 7(2), 146-157. DOI: 10.2174/157340911795677602
- [64] Guedes, I. A.; Pereira, F. S. S.; Dardenne, L. E. Empirical Scoring Functions for Structure-Based Virtual Screening: Applications, Critical Aspects, and Challenges. *Front Pharmacol*, **2018**, 9, 1089. DOI: 10.3389/fphar.2018.01089
- [65] Raha, K.; Merz, K. M., Jr. Large-scale validation of a quantum mechanics based scoring function: predicting the binding affinity and the binding mode of a diverse set of protein-ligand complexes. *J Med Chem*, **2005**, 48(14), 4558-4575. DOI: 10.1021/jm048973n
- [66] Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges*, **1894**, 27(3), 2985-2993.
- [67] Pagadala, N. S.; Syed, K.; Tuszyński, J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*, **2017**, 9(2), 91-102. DOI: 10.1007/s12551-016-0247-1
- [68] Koshland, D. E., Jr. Correlation of Structure and Function in Enzyme Action. *Science*, **1963**, 142(3599), 1533-1541. DOI: 10.1126/science.142.3599.1533
- [69] Zhang, B.; Li, H.; Yu, K., et al. Molecular docking-based computational platform for high-throughput virtual screening. *CCF Trans High Perform Comput*, **2022**, 4(1), 63-74. DOI: 10.1007/s42514-021-00086-5
- [70] Sink, R.; Gobec, S.; Pecar, S., et al. False positives in the early stages of drug discovery. *Curr Med Chem*, **2010**, 17(34), 4231-4255. DOI: 10.2174/092986710793348545
- [71] Lapillo, M.; Tuccinardi, T.; Martinelli, A., et al. Extensive Reliability Evaluation of Docking-Based Target-Fishing Strategies. *Int J Mol Sci*, **2019**, 20(5), 1023. DOI: 10.3390/ijms20051023
- [72] Wang, L.; Xie, X. Q. Computational target fishing: what should chemogenomics researchers expect for the future of in silico drug design and discovery? *Future Med Chem*, **2014**, 6(3), 247-249. DOI: 10.4155/fmc.14.5
- [73] Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*. 2 vyd., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2007. ISBN 978-0-470-01187-4
- [74] Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, **2018**, 99(6), 1129-1143. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.08.011
- [75] Surpeta, B.; Sequeiros-Borja, C. E.; Brezovsky, J. Dynamics, a Powerful Component of Current and Future in Silico Approaches for Protein Design and Engineering. *Int J Mol Sci*, **2020**, 21(8), 2713. DOI: 10.3390/ijms21082713
- [76] González, M. A. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, **2011**, 12, 169-200. DOI: 10.1051/sfn/201112009
- [77] Swope, W. C.; Andersen, H. C.; Berens, P. H., et al. A Computer-Simulation Method for the Calculation of Equilibrium-Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules - Application to Small Water Clusters. *J Chem Phys*, **1982**, 76(1), 637-649. DOI: 10.1063/1.442716
- [78] Fincham, D. Choice of Timestep in Molecular-Dynamics Simulation. *Comp Phys Comm*, **1986**, 40(2-3), 263-269. DOI: 10.1016/0010-4655(86)90113-X

- [79] Yonetani, Y. Liquid water simulation: a critical examination of cutoff length. *J Chem Phys*, **2006**, 124(20), 204501. DOI: 10.1063/1.2198208
- [80] Sagui, C.; Darden, T. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1999**, 28(1), 155-179. DOI: 10.1146/annurev.biophys.28.1.155
- [81] Bernardi, R. C.; Melo, M. C. R.; Schulten, K. Enhanced sampling techniques in molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochim Biophys Acta*, **2015**, 1850(5), 872-877. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.10.019
- [82] Melzer, F.; Breuer, R.; Dahlmann, R., et al. Calculating diffusion coefficients from molecular dynamics simulations for foam extrusion modelling of polypropylene with CO₂, N₂ and ethanol. *J Cell Plast*, **2022**, 58(4), 603-622. DOI: 10.1177/0021955x221087598
- [83] Wang, J.; Hou, T. Application of molecular dynamics simulations in molecular property prediction II: diffusion coefficient. *J Comput Chem*, **2011**, 32(16), 3505-3519. DOI: 10.1002/jcc.21939
- [84] Tsai, H. C.; Lee, T. S.; Ganguly, A., et al. AMBER Free Energy Tools: A New Framework for the Design of Optimized Alchemical Transformation Pathways. *J Chem Theory Comput*, **2023**, 19(2), 640-658. DOI: 10.1021/acs.jctc.2c00725
- [85] Liu, K.; Watanabe, E.; Kokubo, H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. *J Comput Aided Mol Des*, **2017**, 31(2), 201-211. DOI: 10.1007/s10822-016-0005-2
- [86] Liu, K.; Kokubo, H. Exploring the Stability of Ligand Binding Modes to Proteins by Molecular Dynamics Simulations: A Cross-docking Study. *J Chem Inf Model*, **2017**, 57(10), 2514-2522. DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00412
- [87] Henary, M.; Kananda, C.; Rotolo, L., et al. Benefits and applications of microwave-assisted synthesis of nitrogen containing heterocycles in medicinal chemistry. *RSC Adv*, **2020**, 10(24), 14170-14197. DOI: 10.1039/d0ra01378a
- [88] Rodriguez, A. M.; Prieto, P.; De La Hoz, A., et al. Influence of Polarity and Activation Energy in Microwave-Assisted Organic Synthesis (MAOS). *ChemistryOpen*, **2015**, 4(3), 308-317. DOI: 10.1002/open.201402123
- [89] Larionov, E.; Zipse, H. Organocatalysis: acylation catalysts. *Wires Comput Mol Sci*, **2011**, 1(4), 601-619. DOI: 10.1002/wcms.48
- [90] Valeur, E.; Bradley, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev*, **2009**, 38(2), 606-631. DOI: 10.1039/b701677h
- [91] Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming Reagent. *J Am Chem Soc*, **1960**, 82(17), 4596-4600. DOI: 10.1021/ja01502a038
- [92] Popovic, S.; Bieraugel, H.; Detz, R. J., et al. Epimerization-free C-terminal peptide activation. *Chemistry*, **2013**, 19(50), 16934-16937. DOI: 10.1002/chem.201303347
- [93] Molecular Operating Environment (MOE); 2020.0901; Chemical Computing Group ULC: Montreal, QC, Canada, 2019.
- [94] Labute, P. Protonate3D: assignment of ionization states and hydrogen coordinates to macromolecular structures. *Proteins*, **2009**, 75(1), 187-205. DOI: 10.1002/prot.22234
- [95] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W., et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, **2005**, 26(16), 1781-1802. DOI: 10.1002/jcc.20289
- [96] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **1996**, 14(1), 33-38, 27-38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- [97] Chaturvedi, V.; Dwivedi, N.; Tripathi, R. P., et al. Evaluation of Mycobacterium smegmatis as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Gen Appl Microbiol*, **2007**, 53(6), 333-337. DOI: 10.2323/jgam.53.333
- [98] Namouchi, A.; Cimino, M.; Favre-Rochex, S., et al. Phenotypic and genomic comparison of Mycobacterium aurum and surrogate model species to Mycobacterium tuberculosis: implications for drug discovery. *BMC Genomics*, **2017**, 18(1), 530. DOI: 10.1186/s12864-017-3924-y
- [99] Heinrichs, M. T.; May, R. J.; Heider, F., et al. Mycobacterium tuberculosis Strains H37ra and H37rv have equivalent minimum inhibitory concentrations to most antituberculosis drugs. *Int J Mycobacteriol*, **2018**, 7(2), 156-161. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_33_18

- [100] Johnson, M. M.; Odell, J. A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis*, **2014**, 6(3), 210-220. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24
- [101] Ramirez, T.; Strigun, A.; Verlohner, A., et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. *Arch Toxicol*, **2018**, 92(2), 893-906. DOI: 10.1007/s00204-017-2079-6
- [102] Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Arai, M., et al. Pyrazinoic acid and its *n*-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*, **2007**, 51(2), 752-754. DOI: 10.1128/AAC.01369-06
- [103] Blok-Perkowska, D.; Muzalewski, F.; Konopinska, D. Antibacterial properties of tuftsins and its analogs. *Antimicrob Agents Chemother*, **1984**, 25(1), 134-136. DOI: 10.1128/AAC.25.1.134
- [104] Agarwal, A.; Kandpal, H.; Gupta, H. P., et al. Tuftsins-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **1994**, 38(3), 588-593. DOI: 10.1128/AAC.38.3.588
- [105] Baranyai, Z.; Kratky, M.; Vosatka, R., et al. In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsins conjugates. *Eur J Med Chem*, **2017**, 133, 152-173. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.047
- [106] Lambert, M. P.; Neuhaus, F. C. Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J Bacteriol*, **1972**, 110(3), 978-987. DOI: 10.1128/jb.110.3.978-987.1972
- [107] Olaleye, O.; Raghunand, T. R.; Bhat, S., et al. Methionine aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as novel antimycobacterial targets. *Chem Biol*, **2010**, 17(1), 86-97. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.12.014
- [108] Chang, S. Y.; Mcgary, E. C.; Chang, S. Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. *J Bacteriol*, **1989**, 171(7), 4071-4072. DOI: 10.1128/jb.171.7.4071-4072.1989
- [109] Chai, S. C.; Wang, W. L.; Ye, Q. Z. FE(II) is the native cofactor for *Escherichia coli* methionine aminopeptidase. *J Biol Chem*, **2008**, 283(40), 26879-26885. DOI: 10.1074/jbc.M804345200
- [110] Jaladanki, C. K.; Khatun, S.; Gohlke, H., et al. Reactive Metabolites from Thiazole-Containing Drugs: Quantum Chemical Insights into Biotransformation and Toxicity. *Chem Res Toxicol*, **2021**, 34(6), 1503-1517. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00450
- [111] Smith, G. F. Designing Drugs to Avoid Toxicity. In: Lawton and Witty (eds.) *Progress in Medicinal Chemistry Volume 50* [online]. Elsevier, Amsterdam 2011. ISBN 978-0-12-381290-2. DOI: 10.1016/B978-0-12-381290-2.00001-X
- [112] Baell, J. B.; Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem Biol*, **2018**, 13(1), 36-44. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00903
- [113] Azzali, E.; Girardini, M.; Annunziato, G., et al. 2-Aminooxazole as a Novel Privileged Scaffold in Antitubercular Medicinal Chemistry. *ACS Med Chem Lett*, **2020**, 11(7), 1435-1441. DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00173
- [114] Lai, C. Y.; Cronan, J. E. Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for bacterial fatty acid synthesis. *J Biol Chem*, **2003**, 278(51), 51494-51503. DOI: 10.1074/jbc.M308638200
- [115] Lopez-Lopez, N.; Leon, D. S.; De Castro, S., et al. Interrogation of Essentiality in the Reconstructed *Haemophilus influenzae* Metabolic Network Identifies Lipid Metabolism Antimicrobial Targets: Preclinical Evaluation of a FabH beta-Ketoacyl-ACP Synthase Inhibitor. *mSystems*, **2022**, 7(2), e0145921. DOI: 10.1128/msystems.01459-21
- [116] Nofiani, R.; Philmus, B.; Nindita, Y., et al. 3-Ketoacyl-ACP synthase (KAS) III homologues and their roles in natural product biosynthesis. *Medchemcomm*, **2019**, 10(9), 1517-1530. DOI: 10.1039/c9md00162j
- [117] Barry, C. E., 3rd; Lee, R. E.; Mdluli, K., et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res*, **1998**, 37(2-3), 143-179. DOI: 10.1016/s0163-7827(98)00008-3
- [118] Pawelczyk, J.; Kremer, L. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. *Microbiol Spectr*, **2014**, 2(4), MGM2-0003-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0003-2013

- [119] Courtney, A. C.; Wallis, R. S.; Rimmel, R. P., et al. Antitubercular Agents. In: Abraham, Myers a Stewart (eds.) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery - Antiinfectives*. 8 vyd., Wiley, 2021. ISBN 978-1-119-53030-5
- [120] Hao, M. H. Theoretical Calculation of Hydrogen-Bonding Strength for Drug Molecules. *J Chem Theory Comput*, **2006**, 2(3), 863-872. DOI: 10.1021/ct0600262
- [121] Afonin, A. V.; Vashchenko, A. V.; Sigalov, M. V. Estimating the energy of intramolecular hydrogen bonds from (1)H NMR and QTAIM calculations. *Org Biomol Chem*, **2016**, 14(47), 11199-11211. DOI: 10.1039/c6ob01604a
- [122] Yun, M. K.; Wu, Y.; Li, Z., et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science*, **2012**, 335(6072), 1110-1114. DOI: 10.1126/science.1214641
- [123] Chotapatiwetchkul, W.; Boonyarattanakalin, K.; Gleeson, D., et al. Exploring the catalytic mechanism of dihydropteroate synthase: elucidating the differences between the substrate and inhibitor. *Org Biomol Chem*, **2017**, 15(26), 5593-5601. DOI: 10.1039/c7ob01272a
- [124] Barillari, C.; Taylor, J.; Viner, R., et al. Classification of water molecules in protein binding sites. *J Am Chem Soc*, **2007**, 129(9), 2577-2587. DOI: 10.1021/ja066980q
- [125] Magalhaes, J.; Franko, N.; Raboni, S., et al. Inhibition of Nonessential Bacterial Targets: Discovery of a Novel Serine O-Acetyltransferase Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, **2020**, 11(5), 790-797. DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00627
- [126] Magalhaes, J.; Franko, N.; Raboni, S., et al. Discovery of Substituted (2-Aminooxazol-4-yl)isoxazole-3-carboxylic Acids as Inhibitors of Bacterial Serine Acetyltransferase in the Quest for Novel Potential Antibacterial Adjuvants. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2021**, 14(2), DOI: 10.3390/ph14020174
- [127] Azzali, E.; Machado, D.; Kaushik, A., et al. Substituted *N*-Phenyl-5-(2-(phenylamino)thiazol-4-yl)isoxazole-3-carboxamides Are Valuable Antitubercular Candidates that Evade Innate Efflux Machinery. *J Med Chem*, **2017**, 60(16), 7108-7122. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00793
- [128] Turabi, K. S.; Deshmukh, A.; Paul, S., et al. Drug repurposing-an emerging strategy in cancer therapeutics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **2022**, 395(10), 1139-1158. DOI: 10.1007/s00210-022-02263-x
- [129] Bouz, G.; Bouz, S.; Jandourek, O., et al. Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Modeling of *N*-Substituted Quinoxaline-2-Carboxamides. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2021**, 14(8), DOI: 10.3390/ph14080768
- [130] Jandourek, O.; Tauchman, M.; Paterova, P., et al. Synthesis of Novel Pyrazinamide Derivatives Based on 3-Chloropyrazine-2-carboxamide and Their Antimicrobial Evaluation. *Molecules*, **2017**, 22(2), 223. DOI: 10.3390/molecules22020223
- [131] Bouz, G.; Juhas, M.; Niklova, P., et al. Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules*, **2017**, 22(10), E1797. DOI: 10.3390/molecules22101797
- [132] Juhas, M.; Kucerova, L.; Horacek, O., et al. *N*-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents-The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules*, **2020**, 25(7), 1518. DOI: 10.3390/molecules25071518
- [133] Juhas, M.; Pallabothula, V. S. K.; Grabrijan, K., et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted 3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamides as inhibitors of mycobacterial methionine aminopeptidase 1. *Bioorg Chem*, **2022**, 118, 105489. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105489
- [134] Juhas, M.; Bachtikova, A.; Nawrot, D. E., et al. Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2022**, 15(5), 580. DOI: 10.3390/ph15050580
- [135] Juhas, M.; Zitko, J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. *J Med Chem*, **2020**, 63(17), 8901-8916. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b02021
- [136] Bouz, G.; Juhas, M.; Pausas Otero, L., et al. Substituted *N*-(Pyrazin-2-yl)benzenesulfonamides; Synthesis, Anti-Infective Evaluation, Cytotoxicity, and In Silico Studies. *Molecules*, **2019**, 25(1), 138. DOI: 10.3390/molecules25010138

- [137] Pang, L.; Weeks, S. D.; Juhas, M., et al. Towards Novel 3-Aminopyrazinamide-Based Prolyl-tRNA Synthetase Inhibitors: In Silico Modelling, Thermal Shift Assay and Structural Studies. *Int J Mol Sci*, **2021**, 22(15), 7793. DOI: 10.3390/ijms22157793
- [138] Pallabothula, V. S. K.; Kerda, M.; Juhas, M., et al. Adenosine-Mimicking Derivatives of 3-Aminopyrazine-2-Carboxamide: Towards Inhibitors of Prolyl-tRNA Synthetase with Antimycobacterial Activity. *Biomolecules*, **2022**, 12(11), 1561. DOI: 10.3390/biom12111561
- [139] Zalem, D.; Juhas, M.; Terrinoni, M., et al. Characterization of the ganglioside recognition profile of Escherichia coli heat-labile enterotoxin LT-IIc. *Glycobiology*, **2022**, 32(5), 391-403. DOI: 10.1093/glycob/cwab133

9. ZOZNAM PRÍLOH

- P1** Bouz, G.; **Juhas, M.**; Niklova, P., et al. Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules*, **2017**, 22(10), E1797.
DOI: [10.3390/molecules22101797](https://doi.org/10.3390/molecules22101797). IF₂₀₁₇ = 3.098 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
- P2** **Juhas, M.**; Kucerova, L.; Horacek, O., et al. *N*-Pyrazinoyl Substituted Amino Acids as Potential Antimycobacterial Agents-The Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomers. *Molecules*, **2020**, 25(7), 1518.
DOI: [10.3390/molecules25071518](https://doi.org/10.3390/molecules25071518). IF₂₀₂₀ = 4.412 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
- P3** **Juhas, M.**; Pallabothula, V. S. K.; Grabrijan, K., et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted 3-amino-*N*-(thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamides as inhibitors of mycobacterial methionine aminopeptidase 1. *Bioorg Chem*, **2022**, 118, 105489.
DOI: [10.1016/j.bioorg.2021.105489](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105489). IF₂₀₂₁ = 5.307 (Q2Q1), AIS: Q3Q2
- P4** **Juhas, M.**; Bachtikova, A.; Nawrot, D. E., et al. Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2022**, 15(5), 580.
DOI: [10.3390/ph15050580](https://doi.org/10.3390/ph15050580). IF₂₀₂₁ = 5.215 (Q2Q1), AIS: Q1Q2
- P5** **Juhas, M.**; Zitko, J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. *J Med Chem*, **2020**, 63(17), 8901-8916.
DOI: [10.1021/acs.jmedchem.9b02021](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02021). IF₂₀₂₀ = 7.446 (Q1), AIS: Q1
- P6** Bouz, G.; **Juhas, M.**; Pausas Otero, L., et al. Substituted *N*-(Pyrazin-2-yl)benzenesulfonamides; Synthesis, Anti-Infective Evaluation, Cytotoxicity, and In Silico Studies. *Molecules*, **2019**, 25(1), 138.
DOI: [10.3390/molecules25010138](https://doi.org/10.3390/molecules25010138). IF₂₀₁₉ = 3.267 (Q2Q2), AIS: Q3Q2
- P7** Pang, L.; Weeks, S. D.; **Juhas, M.**, et al. Towards Novel 3-Aminopyrazinamide-Based Prolyl-tRNA Synthetase Inhibitors: In Silico Modelling, Thermal Shift Assay and Structural Studies. *Int J Mol Sci*, **2021**, 22(15), 7793.
DOI: [10.3390/ijms22157793](https://doi.org/10.3390/ijms22157793). IF₂₀₂₁ = 6.208 (Q1Q2), AIS: Q2Q2
- P8** Pallabothula, V. S. K.; Kerda, M.; **Juhas, M.**, et al. Adenosine-Mimicking Derivatives of 3-Aminopyrazine-2-Carboxamide: Towards Inhibitors of Prolyl-tRNA Synthetase with Antimycobacterial Activity. *Biomolecules*, **2022**, 12(11), 1561.
DOI: [10.3390/biom12111561](https://doi.org/10.3390/biom12111561). IF₂₀₂₁ = 6.064 (Q2), AIS: Q2