

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



SYNTÉZA A HODNOCENÍ DERIVÁTŮ BENZOXABOROLU JAKO
POTENCIÁLNÍCH ANTIMIKROBNÍCH SLOUČENIN

Diplomová práce
Adam Anthony Needle

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Petr Šlechta

Hradec Králové, 2024

Prohlášení autora:

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

Adam Anthony Needle

V Hradci Králové, květen 2024

Poděkování

Rád bych tuto stránku s poděkováním věnoval PharmDr. Petru Šlechtovi za nespočet cenných rad a konzultací, vedení a oporu při práci a také za ochotu a trpělivost. Dále díky patří vedoucí této práce PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. Děkuji panu PharmDr. Ondřejovi Jand'ourkovi, Ph.D., paní RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. a paní MUDr. Pavle Paterové, Ph.D. za biologické testování. Dále poděkování patří panu Mgr. Pavlu Bártovi, Ph.D. za screening cytotoxicity, paní Ivě Vencovské za změření IČ spekter, paní Bc. Daně Štěpánové za CHNS analýzy, panu doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření NMR spekter, panu Ing. Vladimírovi Kubíčkoví, CSc. za stanovení čistoty sloučenin pomocí HPLC a panu prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. za vedení týmu.

Tato diplomová práce byla podpořena projektem Univerzity Karlovy SVV 260 666 (ČR).

OBSAH

1	Abstrakt.....	8
2	Abstract.....	9
3	Seznam použitých zkratk 10	10
4	Cíl diplomové práce.....	11
5	Teoretická část	12
5.1	Rezistentní tuberkulóza.....	12
5.1.1	Epidemiologie.....	13
5.1.2	Mechanismy vzniku rezistence.....	14
5.2	Leucyl-tRNA synthetasa.....	16
5.2.1	Struktura a funkce LeuRS.....	16
5.2.2	Příklady zkoumaných inhibitorů LeuRS.....	18
5.3	Deriváty benzoxaborolu.....	19
5.3.1	OBORT mechanismus	19
5.3.2	Možná využití derivátů benzoxaborolu v oblasti medicíny.....	23
5.3.2.1	Klinicky používané a experimentální deriváty benzoxaborolu	23
5.3.2.1.1	Tavaborol (AN2690).....	23
5.3.2.1.2	Epetraborol (AN3365, GSK-221052).....	24
5.3.2.1.3	Krisaborol (AN2728).....	25
5.3.2.1.4	Akoziborol (N5568, SCYX-7158).....	25
5.3.2.1.5	Ganfeborol (GSK656).....	26
5.3.2.2	Antifungální aktivita derivátů benzoxaborolu	28
5.3.2.3	Antimykobakteriální aktivita derivátů benzoxaborolu	29
5.3.2.4	Antiprotozoální aktivita derivátů benzoxaborolu	31
5.3.2.5	Anthelmintické účinky derivátů benzoxaborolu.....	35
5.3.2.6	Vliv derivátů benzoxaborolu na atopickou dermatitidu	36

6	Experimentální část.....	38
6.1	Použité chemikálie, přístrojové vybavení a identifikační a analytické metody 38	
6.2	Obecné schéma syntézy 6-(acylamino)benzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-1(3 <i>H</i>)-olů	40
6.3	Postup přípravy derivátů benzoxaborolu	41
6.4	Nově připravené látky	42
6.4.1	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)-4- chlorbenzamid (PS-BZX-17)	42
6.4.2	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)pikolinamid (PS-BZX-8.1).....	43
6.4.3	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)-5- (trifluormethyl)pikolinamid (PS-BZX-12)	44
6.4.4	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)-6- (trifluormethyl)nikotinamid (PS-BZX-19)	45
6.4.5	6-hydroxy- <i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6- yl)nikotinamid (PS-BZX-21)	45
6.4.6	5-hydroxy- <i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6- yl)pyrazin-2-karboxamid (PS-BZX-20)	46
6.4.7	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)-3- methylpyrazin-2-karboxamid (PS-BZX-7).....	47
6.4.8	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)thiazol-4- karboxamid (PS-BZX-14).....	48
6.4.9	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)chinolin-2- karboxamid (PS-BZX-18).....	49
6.4.10	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)-3-oxo-3,4- dihydrochinoxalin-2-karboxamid (PS-BZX-13).....	50
6.5	Neúspěšně syntetizované látky	50

6.5.1	2-amino- <i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)thiazol-4-karboxamid (PS-BZX-15).....	51
6.5.2	<i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)isochinolin-1-karboxamid (PS-BZX-16).....	52
6.5.3	5-hydroxy- <i>N</i> -(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[<i>c</i>][1,2]oxaborol-6-yl)nikotinamid (PS-BZX-22).....	52
6.6	<i>In silico</i> studie.....	53
6.6.1	Molekulový docking.....	53
6.6.2	Predikce drug-like vlastností připravených sloučenin.....	54
6.7	Stanovení biologických aktivit připravených látek <i>in vitro</i>	55
6.7.1	Antimykobakteriální aktivita.....	55
6.7.1.1	Stanovení antimykobakteriální aktivity vůči <i>M. tuberculosis</i> H37Ra, <i>M. smegmatis</i> , <i>M. aurum</i> , <i>M. avium</i> a <i>M. kansasii</i>	55
6.7.1.2	Stanovení antimykobakteriální aktivity vůči <i>M. tuberculosis</i> H37Rv a multi-rezistentním kmenům <i>M. tuberculosis</i>	56
6.7.2	Stanovení antibakteriální a antifungální aktivity <i>in vitro</i>	58
6.7.2.1	Stanovení antibakteriální aktivity.....	58
6.7.2.2	Stanovení antifungální aktivity.....	59
6.7.3	Screening cytotoxicity.....	60
7	Výsledky a diskuse.....	62
7.1	Zhodnocení syntetických postupů.....	62
7.2	Zhodnocení výsledků <i>in silico</i> studie.....	64
7.2.1	Výsledky templátového dockingu.....	64
7.2.2	Zhodnocení predikovaných parametrů připravených látek z hlediska drug-like aspektů.....	69
7.3	Zhodnocení výsledků antimikrobiálního a cytotoxického screeningu.....	70
8	Závěr.....	78

9	Zdroje a použitá literatura.....	80
---	----------------------------------	----

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Student: Adam Anthony Needle

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Petr Šlechta

Název diplomové práce: Syntéza a hodnocení derivátů benzoxaborolu jako potenciálních antimikrobiálních sloučenin

Bylo zjištěno, že deriváty benzoxaborolu působí OBORT (oxaborol vychytávající tRNA [oxaborole tRNA trapping]) mechanismem, který vede k přerušení syntézy proteinů v mikroorganismech. Tato práce byla zaměřena na syntézu a primární *in vitro* hodnocení série *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)(hetero)aryl-2-karboxamidů. Sloučeniny byly připraveny reakcí aktivovaných (hetero)arylkarboxylových kyselin s 6-aminoskupinou benzoxaborolové části molekuly za vzniku amidové vazby. Úspěšně bylo připraveno deset sloučenin a všechny byly otestovány *in vitro* proti klinicky významným kmenům bakterií, hub a mykobakterií. Byla odhalena významná aktivita vůči několika mykobakteriálním kmenům a cytotoxický screening na lidských buňkách prokázal nízkou toxicitu látek. Tato selektivita může být způsobena rozdíly v aktivním místě mykobakteriálního a lidského cílového enzymu. Testovaná série látek prokázala selektivní antimykobakteriální vlastnosti a mohla by nasměrovat výzkum nových léčiv proti tuberkulóze.

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Adam Anthony Needle

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Petr Šlechta

Title of diploma thesis: Synthesis and Evaluation of Benzoxaborole Derivatives as Potential Antimicrobial Compounds

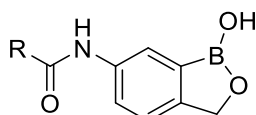
It has been revealed, that benzoxaborole moiety can exert OBORT (oxaborole tRNA trapping) mechanism leading to protein synthesis cessation in microorganisms. This work focused on the synthesis and primary *in vitro* evaluation of *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)(hetero)aryl-2-carboxamide series. The compounds were prepared by reaction between activated (hetero)aryl carboxylic acid and 6-amino group of benzoxaborole moiety *via* amidic bond formation. Ten compounds were successfully prepared and tested *in vitro* against clinically important strains of bacteria, fungi and mycobacteria. Noticeable activity against several mycobacterial strains was revealed and the human cell cytotoxicity screening showed low toxicity. This outcome could originate in differences between active sites of human and mycobacterial target enzyme. This series of substances showed selective antimycobacterial properties and may streamline the search for novel anti-tuberculosis drugs.

3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CDI	1,1'-karbonyldimidazol
CFU	colony forming units, jednotky tvořící kolonie
CIP	ciprofloxacin
CPSF3	podjednotka 3 faktoru štěpení a polyadenylační specifity (cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3)
DMSO	dimethylsulfoxid
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ED ₉₀	efektivní dávka, kdy se efekt projeví u 90 % populace
EEA	European Economic Area (Evropský hospodářský prostor)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici
IL	interleukin
INH	isoniazid
LeuRS	leucyl-tRNA synthetasa
MDR-TBC	multi-drug resistant tuberculosis, tuberkulóza rezistentní na více léčiv
MIC	minimální inhibiční koncentrace
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OBORT	oxaborol vychytávající tRNA (oxaborole tRNA trapping)
PDB	Protein Data Bank
PDE4	fosfodiesterasa 4
pre-XDR-TBC	tuberkulóza pre-extensivně rezistentní na léčiva
RIF	rifampicin
RR-TBC	rifampicin-rezistentní tuberkulóza
TBC	tuberkulóza
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
XDR-TBC	extensivně rezistentní tuberkulóza

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo připravit sérii derivátů benzoxaborolu a zhodnotit jejich antimikrobiální potenciál. Potenciálním farmakologickým cílem působení připravovaných sloučenin je enzym leucyl-tRNA synthetasa (LeuRS)¹, jejíž inhibicí dojde k přerušení proteosyntézy a následně smrti buněk. Zamýšlené látky byly amidy (hetero)aryl kyselin s aminobenzoxaborolem (obrázek č. 1). Měly být řádně charakterizovány spektrálními metodami a měla být ověřena jejich čistota. Záměrem byla příprava slibných sloučenin, které by mohly vykazovat zajímavý účinek proti mykobakteriím, navazující hodnocení nejúčinnějších látek a následné zhodnocení vztahu strukturních faktorů a biologického účinku.



Obrázek 1: Obecná struktura syntetizovaných látek, R = (hetero)aryl

Pro zkoumání vztahu struktury a účinku mělo být použito *in silico* metod molekulového dockingu a zkoumání potenciálního ADME profilu. Hodnocení biologické aktivity mělo být provedeno za pomoci *in vitro* testování. Připravené látky měly být předány ke stanovení antimikrobiálních účinků na šesti kmenech mykobakterií, osmi kmenech klinicky významných bakterií a osmi kmenech klinicky významných fungálních organismů. Pro posouzení hepatotoxicity měly látky podstoupit screening na HepG2 buňkách. Výsledky biologického hodnocení měly být shrnuty a řádně komentovány v Diskusi.

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Rezistentní tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění způsobené bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Zpravidla napadá plicní tkáň, existují ovšem i extrapulmonální formy nemoci. Mezi rizikové faktory pro rozvoj choroby patří kouření, alkoholismus, dále demografické faktory jako je věk, pohlaví a socioekonomický stav, komorbidity jako je diabetes mellitus, chronická obstrukční plicní nemoc a infekce HIV². Základními symptomy jsou kašel trvající alespoň po dobu dvou týdnů, úbytek váhy a charakteristická hemoptýza. Komplikace choroby zahrnují závažnou obstrukci dýchacích cest, hemoptýzu, zápal plic, bronchiální stenózu a poškození jater. Dále může dojít k aspergilózám a infekcím způsobeným netuberkulózními bakteriemi³, příkladem budiž *M. avium*. Dle literatury⁴ je takřka čtvrtina světové populace infikována latentní TBC bez klinických příznaků.

Léčivý první linie jsou rifampicin (RIF), isoniazid (INH), ethambutol a pyrazinamid při půlroční terapii. Tak jako další bakterie i *Mtb* provází fenomén rezistence na antiinfektiva, tichá hrozba, která se stále rozrůstá. Rifampicin je považován za antituberkulotikum s nejrobustnějším účinkem, bohužel i na něj již existuje rezistence. Jako RR-TBC označujeme TBC rezistentní na RIF, ale může být odolná i vůči více léčivům. MDR-TBC je TBC rezistentní na RIF a INH. Pre-XDR-TBC nazýváme TBC rezistentní na RIF (možno i na INH) a také na alespoň jeden fluorochinolon (levofloxacin či moxifloxacin). XDR-TBC je názvem pro TBC rezistentní na rifampicin (možno i na isoniazid), na alespoň jeden fluorochinolon (levofloxacin či moxifloxacin) a dále na jedno léčivo ze skupiny A (bedachilin, či linezolid)⁵. Rezistence bakterií se zjišťuje pomocí kultivačních testů či genomového sekvencování⁶.

Mezi zjištěné rizikové faktory onemocnění MDR-TBC náleží přítomná plicní kavita, pozitivní průkaz acidorezistentních bakterií ve sputu, předešlá anamnéza TBC a léčba antituberkulotiky v minulosti⁷. Pacientům s těmito aspekty by měla být věnována dostatečná pozornost pro prevenci exacerbace. Včasné odhalení rizikových faktorů je nutnou podmínkou strategie kontroly onemocnění TBC. Šíření rezistentních bakterií představuje ohromnou zátěž pro zdravotnické systémy po celém světě.

5.1.1 Epidemiologie

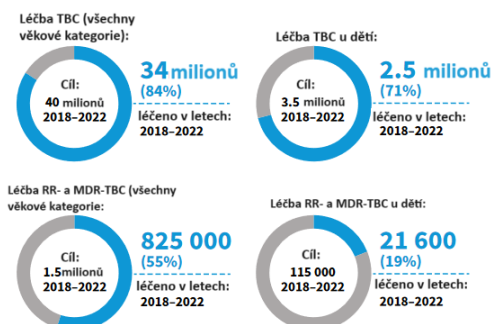
Globální zpráva⁸ WHO o TBC z roku 2023 odhaduje, že v roce 2022 nově onemocnělo TBC celosvětově 10,6 milionů lidí. Počet nemocných od roku 2015 klesal jen v Evropě, ne však v ostatních světových regionech, avšak ve dvou letech pandemie COVID-19 toto číslo kleslo globálně, zřejmě díky zvýšené izolaci, v roce 2022 opět došlo ke vzestupu. Celosvětová úspěšnost léčby TBC v roce 2021 byla 88 %. Mezi nejvíce zasažené regiony patří jihovýchodní Asie, Afrika a západní Pacifik, a to hlavně v zemích jako je Indie (27 % všech případů), Indonésie (10 %), Čína (7,1 %), dále Filipíny, Nigérie, Pákistán, Bangladěš a Demokratická republika Kongo. Incidence TBC koreluje s nízkým HDP na osobu a prevalencí podvýživy. Počet zemřelých v roce 2022 na TBC dosáhl 1,30 milionu. Úmrtnost za poslední desetiletí mimo pandemii COVID-19 klesala. Dle WHO je TBC třináctá nejčastější příčina úmrtí. Počet MDR či RR-TBC v roce 2022 byl odhadován na 410 tisíc nemocných. Do pouhých tří zemí spadá 42 % případů těchto rezistentních TBC, přičemž se jedná o Indii (27 %), Filipíny (7,5 %) a Ruskou federaci (7,5 %). Dle meta-analýzy² by skutečná aktuální prevalence MDR-TBC mohla být až 11,6 %, což už může působit jako alarmující (odhadovaná incidence na Obr. 2).



Obrázek 2: Odhadovaná incidence RR- a MDR-TBC pro rok 2022 v zemích, kde je diagnostikováno alespoň 1000 případů. Převzato z *Global tuberculosis report 2023*⁸.

V roce 2022 bylo přímo laboratorně globálně potvrzeno 27 075 případů pre-XDR-TBC či XDR-TBC z celkového počtu 176 586 MDR- či RR-TBC případů⁸. Úspěšnost léčby MDR- a RR-TBC byla celosvětově odhadována v roce 2020 na asi 63 %. Úspěšnou léčbu podmiňuje citlivá diagnostika, dostupnost zdravotních služeb

a přístup k metodám léčby. WHO monitoruje počet pacientů léčených na MDR- či RR-TBC teprve od roku 2012. Více informací o počtu léčených případů poskytuje obrázek 3.



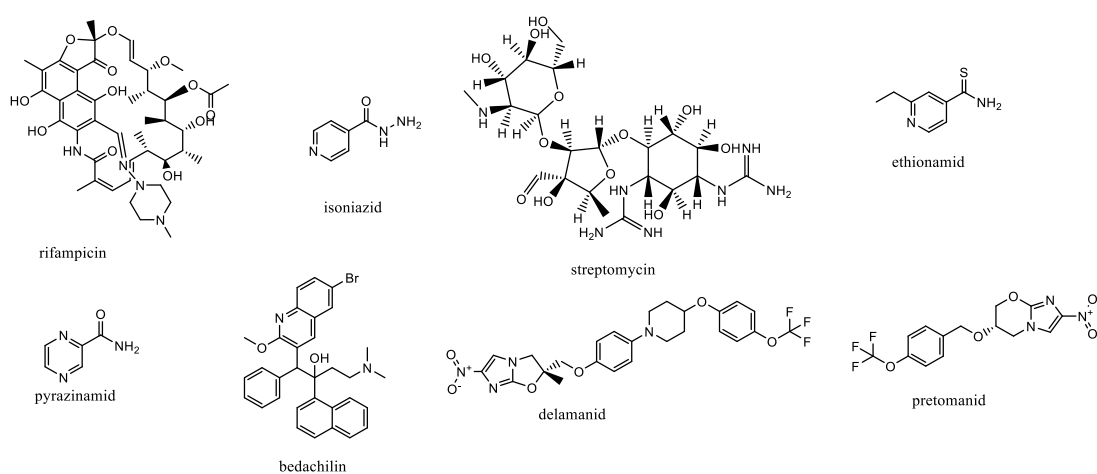
Obrázek 3: Počet léčených případů v letech 2018–2022, převzato z *Global tuberculosis report 2023*⁸

Dle zprávy Evropského centra pro kontrolu nemocí (ECDC) o Sledování a monitorování tuberkulózy v Evropě za rok 2023⁹ byl v roce 2021 v zemích EU a Evropského hospodářského prostoru (EEA) podíl RR či MDR-TBC případů 3,2 % u nově diagnostikovaných plicních forem TBC, zatímco v evropských zemích mimo tento prostor byl podíl 27,4 %. Úspěšnost léčby při zahájení podávání léků první linie byla u EU/EEA států kolem 70 %. Klasickým fenoménem je výskyt TBC u HIV-pozitivních pacientů (14,8 % z 92,8 % všech TBC případů) a dalším nemálo zajímavým faktem je, že 4,9 % případů nových i recidivujících případů TBC bylo hlášeno z věznic, především ze zemí mimo EU a EEA. V České republice bylo v roce 2021 hlášeno 357 případů TBC, z čehož 9 bylo pulmonálních RR- či MDR-TBC a z nich dva pre-XDR-TBC.

5.1.2 Mechanismy vzniku rezistence

Není výjimkou, že se běžně vyskytují genotypicky rezistentní *Mtb* a nemusí být přitom fenotypicky rezistentní, což může být dáno nepříznivými podmínkami vyvolanými hostitelem jako je kyselé pH, hypoxie či nedostatek živin¹⁰. Nejčastějším důvodem rezistence je chromosomální mutace, zatímco horizontální přenos genů nebyl prokázán¹¹. Nejedná se vždy o mutaci cíle farmakologického působení antibiotik, další častou příčinou je zvýšený reflux léčiv. Dalším problémem pro antibiotika je vůbec proniknout mohutnou bakteriální stěnou s dlouhými mykolovými

kyselinami. Mechanismy rezistence spočívají ve zpomalení metabolismu v dormantním stádiu bakterie, kdy vzniká méně toxických metabolitů antituberkulotika, v obcházení určitých metabolických cest, tvorbě porinů či ztlustění buněčné stěny¹². Samotná délka terapie je rizikovým faktorem rozvoje rezistence, hlavní komplikací tohoto faktoru je pak nízká adherence pacientů k léčbě Nejčastějším důvodem rezistence na RIF (obr. 4) je mutace v hotspotu 81bp na genu *rpoB* kódující RNA-polymerasu¹³. Účinek INH je ohrožen mutacemi *katG* katalasy, která jej přeměňuje na aktivní formu, a následně nemožností se vázat na zmutovaný enzym *inhA*, jenž je cílem působení INH¹⁴. Účinek fluorochinolonů může být snížen mutací *gyras*¹⁵. Mykobakteria jsou primárně rezistentní vůči beta-laktamovým antibiotikům, jelikož produkují enzym beta-laktamasu¹¹. U aminoglykosidů byla popsána inaktivace acetyltransferasou *Eis* a jejich účinek snižují mutace proteinů *rrs* a *rspL*¹⁶. Ethionamid nemusí být aktivován, pokud je přítomna mutace proteinu *ethA*. Rezistence u bedachilinu se předpokládá při mutaci *AtpE* genu kódujícího cíl působení tohoto léčiva¹⁷. Nejvíce popisovanou mutací ovlivňující účinnost delamanidu je mutace genu *ddn* kódujícího F₄₂₀-dependentní nitroreduktasu, která právě aktivuje delamanid na aktivní metabolit¹⁸. Rezistenci na pretomanid provází stejné mutace proteinů jako u delamanidu vzhledem ke stejnému mechanismu účinku, kdy tyto dvě látky po aktivaci a tvorbě oxidu dusnatého inhibují syntézu methoxy- a ketomykolových kyselin. Především se jedná o mutace proteinu *fbiC* a nově objevenou je mutace na proteinu *Rv2983*¹⁹. Majoritní příčinou rezistence na většinu léčiv je ovšem aktivita efluxních pump jako jsou *efpA*, *mmr*, *mmpL7*, *Rv1285c* a *p55*²⁰.



Obrázek 4: Přehled vybraných antituberkulotik první i druhé linie

5.2 Leucyl-tRNA synthetasa

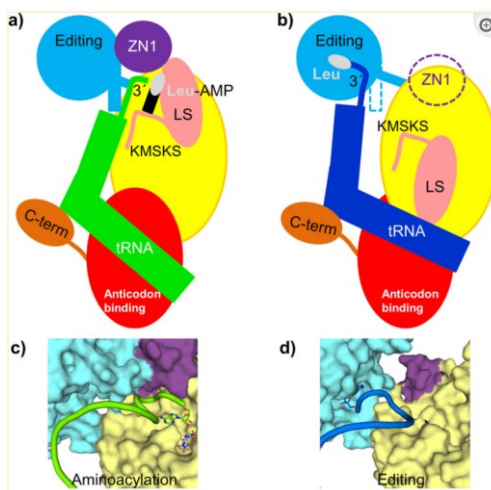
Leucyl-tRNA synthetasa (LeuRS, EC 6.1.1.4), též známá i jako leucin-tRNA ligasa, patří mezi aminoacyl-tRNA synthetasy. Její funkcí je tvořit tRNA nesoucí leucin v cytosolu buňky (i v mitochondriích), což je zcela zásadní pro syntézu proteinů v buňkách. Právě proteosyntéza je jedním z cílů působení antibiotik, a proto inhibice enzymů zahrnutých do tvorby tRNA je slibnou cestou pro objevení nových léčiv, včetně nových antituberkulotik. Aminoacyl-tRNA synthetasy se vyskytují v každém živém organismu a existuje alespoň dvacet různých těchto enzymů rozlišujících se podle aminokyseliny, kterou mají spojit s tRNA. Dále se zdá, že se katalytické domény napříč těmito enzymy jen málo odlišují a pokud se tedy najde látka inhibující tuto doménu, mohla by působit i na více takových synthetas u jednoho druhu. Lze usoudit, že se jedná o silně konzervativní struktury a že by vývoj rezistence z hlediska rizika vzniku mutace na genech kódující tyto domény mohl být pro bakterii obtížný²¹. Nejedno antibiotikum registrované na trhu působí na tyto enzymatické cíle, příkladem budiž mupirocin inhibující izoleucin-tRNA synthetasu²².

5.2.1 Struktura a funkce LeuRS

LeuRS patří v rámci aminoacyl-tRNA synthetas do třídy Ia. Takové enzymy jsou tvořeny dvěma strukturními motivy Rossmann fold, které váží nukleotidy²³. Dále synthetasy třídy I esterifikují tRNA přes 2'-hydroxylovou skupinu ribosy terminálního adenosinu, zatímco přes 3'-hydroxylovou skupinu tak provádí enzymy třídy II, toto je dáno přístupem enzymu k tRNA buď přes malý žlábek (třída I), nebo velký žlábek (třída II)²¹. Aminoacyl-tRNA synthetasy rozeznávají příslušnou aminokyselinu na základě antikodonu, akceptorového ramene a diskriminační základny nukleotidu N73 tRNA. K uskutečnění procesu je potřeba, aby se aminokyselina aktivovala pomocí ATP za vzniku konjugátu AMP a aminokyseliny, který se pak esterifikuje s hydroxylovými skupinami ribosy adenosinu 76 na 3' konci tRNA. Enzym disponuje také kontrolním editujícím mechanismem. Pretransferově dokáže hydrolyzovat aktivovanou aminokyselinu zpět na AMP a kyselinu, zatímco posttransferově je špatně acylovaná tRNA hydrolyzována na aminokyselinu a nukleovou kyselinu. LeuRS má totiž schopnost vázat i norvalin, který by způsobil nefunkčnost proteinu²⁴. Dále může

katalytické místo působit jako síto, do kavity se totiž vejdou pouze aminokyseliny určité velikosti. Jako hypotetické druhé kontrolní místo pak působí editující doména schopná hydrolýzy nesprávně aktivovaných kyselin²⁵.

LeuRS je tvořena hlavním tělem enzymu, s katalytickou a antikodon vázající doménou, a čtyřmi flexibilně vázanými doménami – označená zinkem, editující (někdy též jako CP1), leucin-specifická a C-terminální doména. Oprava produkované tRNA závisí na translokaci substrátu od syntetického místa k editující doméně, které jsou od sebe vzdáleny 30 Å²⁵. Byly popsány dva konformační stavy – aminoacylační a editující (Obr. 5). Hlavním rysem odlišující tyto stavy je otočení leucin-specifické domény o 33° směrem k syntetickému místu, ale dochází k mnoha dalším pohybům, které nejsou ani spolehlivě objasněny²⁶.



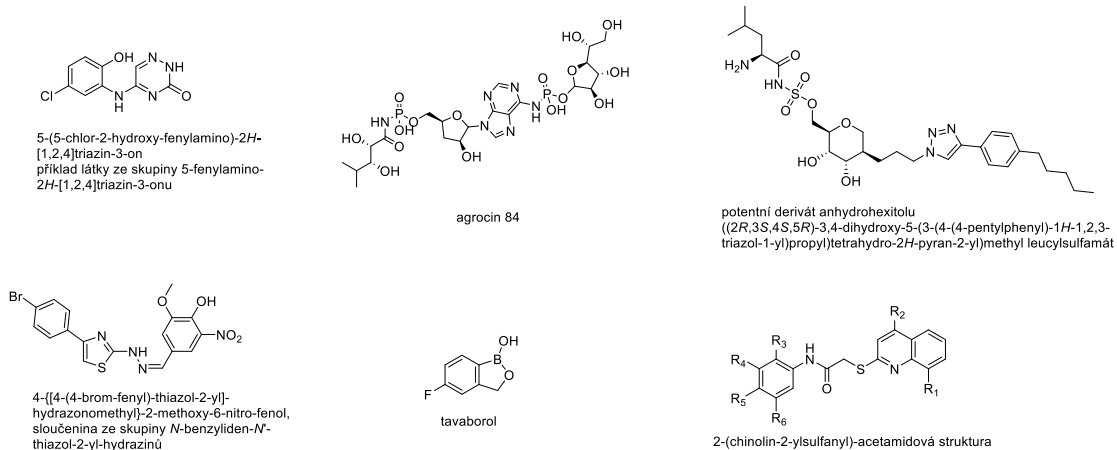
Obrázek 5: Obrázky a) a c) zobrazují konformaci během aminoacylace, b) a d) během editace tRNA. Modře je editující doména, ZN1 je doména značená zinkem, oranžově je C-terminální a růžově leucin-specifická doména.

Konkrétně je zobrazena LeuRS organismu *E. coli*. Převzato z ref. Palencia A, et al.²⁶

Důležitým aspektem je skutečnost, že enzymy jako celek jsou svou stavbou odlišné mezi bakteriálními a archeálními či eukaryotickými organismy, avšak neplatí tak o katalytickém místě, jak je psáno výše. Zásadní je pak rozdíl mezi strukturou editující domény lidské a mykobakteriální LeuRS. LeuRS patřící *Mtb* H37Rv je tvořena 969 aminokyselinami a její molekulová hmotnost je asi 108 kDa²⁷.

5.2.2 Příklady zkoumaných inhibitorů LeuRS

Jedním typem sloučenin, které byly zkoumány jako inhibitory zmiňovaných synthetas, jsou falešné substráty aminoacylsulfamoyl-adenosiny napodobující AMP. Neukázalo se však, že by oplývaly vysokou biodostupností a byly poměrně neselektivní – syntetické místo enzymu je totiž strukturně podobné napříč eukaryotickými a prokaryotickými organismy²¹. Jednou ze známých látek, která inhibuje LeuRS, je agrocin 84 (Obr. 6), která se používá k inhibici rostlinných tumorů způsobených kmenem *Agrobacterium tumefaciens*, avšak i zde se vyskytl problém s rezistencí. Tato látka se chová jako takový trojský kůň díky D-glukofuranosyloxyfosforylové části molekuly, díky níž je látka transportována do buňky, a zároveň je ve struktuře inkorporován leucyladenylát²⁸. Byly zkoumány i deriváty anhydrohexitolu s triazolovým fragmentem nahrazující adenin. Série těchto látek byla zkoušena *in vitro* na LeuRS s nanomolárními inhibičními aktivitami, při testování inhibice růstu *Mtb* však nejvyšší aktivitu vykazala jen jedna látka ($IC_{50} = 24 \mu\text{M}$), hodnota IC_{50} byla však stonásobně vyšší než u standardu moxifloxacinu²⁹. Cílem působení má být katalytické místo LeuRS. Na *Mtb* LeuRS byly také testovány deriváty 5-fenylamino-2*H*-[1,2,4]triazin-3-onu (Obr. 6) cílící na aktivní místo, kde dvě látky ze série dosáhly IC_{50} kolem $7 \mu\text{M}$ a dále byla zjišťována inhibice lidské cytosolické LeuRS s desetinásobně vyššími IC_{50} ³⁰. Dále jsou aktivní i deriváty *N*benzyliden-*N'*-thiazol-2-yl-hydrazinu (Obr. 6), opět cílící na aktivní místo LeuRS, kde nejaktivnější látka dosáhla $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ při inhibici *Mtb* LeuRS a MIC = $25 \mu\text{M}$ při inhibici růstu *Mtb* H37Rv³¹. Stejný výzkumný tým pak dospěl k látkám, které dokáží duálně inhibovat i methionyl-tRNA synthetasu³². Pomocí metod založených na strojovém učení byly objeveny a v aminoacylačním testu otestovány látky vycházející z 2-(chinolin-2-ylsulfanyl)-acetamidu (Obr. 6), které taktéž cílí na mykobakteriální methionyl- i LeuRS³³. V neposlední řadě je třeba zmínit benzoxaboroly, kterým se věnuje i tato práce. První zavedenou látkou inhibující LeuRS, a to na editující doméně, byl tavaborol (původní označení AN-2690, Obr. 6) s terapeutickou indikací pro onychomykózu²¹. Dle počítačových studií se váže k LeuRS i irinotekan³⁴, inhibitor topoisomerasy, s podobnou afinitou jako GSK656 (více o této látce níže).



Obrázek 6: Vybrané inhibitory LeuRS

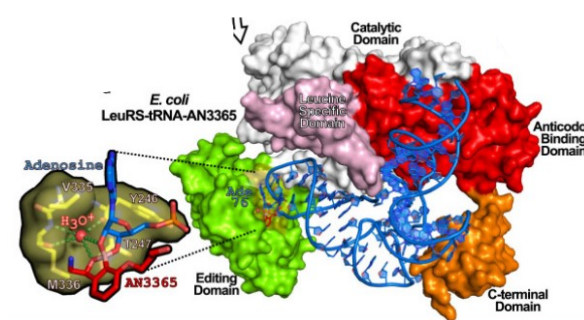
Optimální by bylo najít inhibitor, který by byl ovšem selektivní vůči mikrobiálním LeuRS, valin- a isoleucin-tRNA syntetasam²¹. Taková sloučenina by byla vysoce efektivní v léčbě bakteriálních nebo protozoálních infekcí a obtížně by na ni vznikala rezistence.

5.3 Deriváty benzoxaborolu

5.3.1 OBORT mechanismus

V oboru medicíny a farmacie se používá jen málo sloučenin boru. Bor je polokov a je zvláštní svými elektron-deficitními a koordinačními vlastnostmi³⁵. Zajímavými deriváty s vysokým potenciálem jsou deriváty benzoxaborolu. U prvního klinicky používaného derivátu – tavorolu – byl objasněn mechanismus působení inhibicí LeuRS¹. Při zjišťování mechanismu byly některé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* 32–512× méně citlivé na tavorol než ostatní kmeny této kvasinky. Při sekvencování se ukázalo, že se shodují v mutaci genu CDC60, který kóduje editující doménu LeuRS. Byly objeveny mutace v oblasti bohaté na threonin i vysoce konzervativních sekvencích. Dokonce sedm z devíti zkoumaných mutantních kmenů prokázalo defekt při editaci založený na citlivosti k norvalinu. Ukázalo se, že bez přítomnosti tRNA není dosaženo antimykotického, respektive antibakteriálního účinku. Benzoxaborol se má s tRNA vázat do aktivního místa editující domény vázající aminoacyl tam, kde s enzymem interaguje aminokyselina nesprávně vázaná na tRNA. Pro inhibici enzymu je nezbytné, aby se vytvořil kovalentní adukt s terminálním adenosinem A76 na

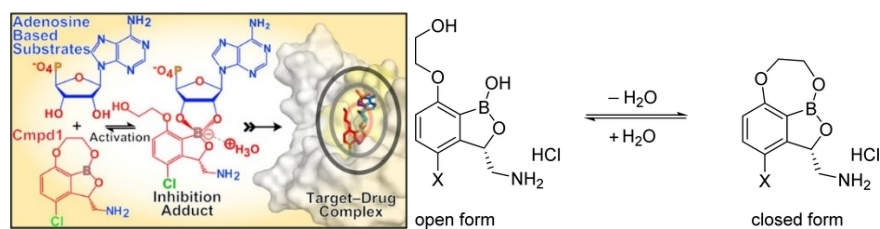
volném 3' konci tRNA reakcí s vicinálními hydroxyskupinami ribosy. Vzniklá tetrahedrální spiroborátová struktura znemožní LeuRS v cytoplasmě hydrolyzovat tRNA vázané s nesprávnými aminokyselinami, čímž je ovlivněn právě ten kontrolní mechanismus, který umožňuje editující doména, a tím pádem není možná translokace tRNA mezi syntetickou a editující doménou i syntéza samotné tRNA s leucinem^{24,35,36}. Ve výsledku je pak inhibována proteosyntéza. V experimentech byla zkoumána reakce i se samotným AMP či ATP. Ve strukturálních studiích pak adukt tavaborolu s AMP zaujímal stejnou polohu v editující doméně jako adukt norvalyl-AMP a jelikož tavaborol nedisponuje mnoha skupinami schopnými vázat se s aminokyselinami enzymu, je tak vysvětleno, proč má samotný tak nízkou afinitu k LeuRS a je nutný onen kovalentní adukt s adenosinem. Benzoxaborolová sloučenina se může vázat pouze na volnou tRNA, aby mohl vzniknout adukt, tRNA nesmí být již acylována aminokyselinou. Samotný adukt s adenosinem nemá schopnost zastavit funkci LeuRS, nutné je navázání celého aduktu s tRNA. Ve výsledku dojde inhibicí LeuRS také k hromadění tRNA bez navázaných aminokyselin a ty se pak váží na ribosomy, což narušuje proteosyntézu³⁷. Další studie ukázaly, že rozšíření kruhu s borem ani náhrada boru za uhlík nezvyšují aktivitu látky. Celý tento adenosin-dependentní mechanismus inhibujícího aduktu je pak nazýván jako mechanismus benzoxaborolu vychytávající tRNA do pasti – OBORT (oxaborole tRNA trapping mechanism). Prostorovou situaci aduktu tRNA s enzymem znázorňuje obrázek 7.



Obrázek 7: Adukt benzoxaborolové látky AN3365 s tRNA při inhibici LeuRS pocházející z *E. coli*. Zeleně je zobrazena editující doména, modře tRNA. Převzato z ref. Hoffmann G. et al.³⁸

Výzkum zabývající se aktivací benzoxaborolových proléčiv³⁸ a snahou potvrdit přesný OBORT mechanismus ukázal, že vždy vzniknou nezávisle na enzymu dva diastereomery aduktů benzoxaborolu a adenosinu vzájemně otočené o 180°, tedy

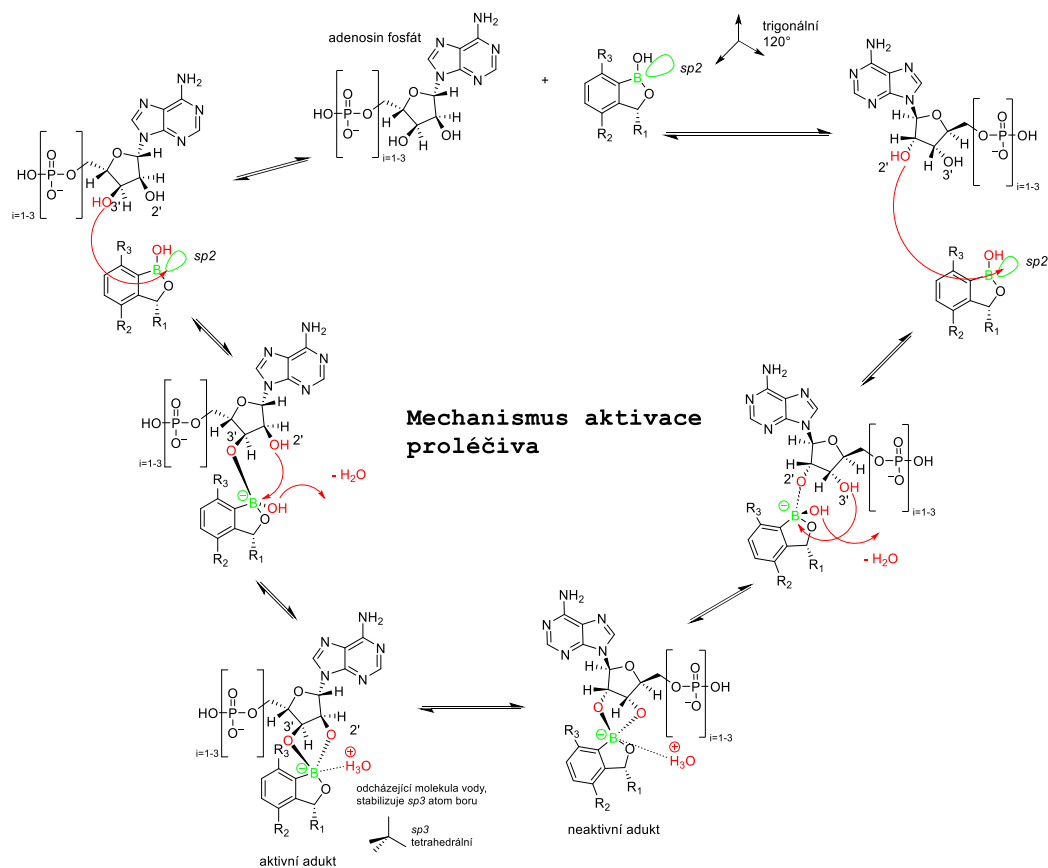
optické isomery, z nichž jeden se stericky nedokáže navázat do editující domény. Záporně nabitá oxaborolová skupina aduktu je stabilizována kladně nabitým hydroxoniovým iontem. Za fyziologických koncentrací adenosinových molekul je vznik aduktů reversibilní. Mechanismus byl zkoumán za pomoci izotermické titrační kalorimetrie, NMR a krystalografické studie. Benzoxaboroly mohou být považovány za proléčiva, která jsou aktivována adicí s adenosinem. Benzoxaboroly jsou tedy nepřímé inhibitory LeuRS. NMR analýza odhalila, že látka GSK656 tvoří reversibilně ještě jeden cyklus navíc, přes ethylendioxidový můstek, a je otvírán reakcí s adenosinem nebo molekulou vody (Obr. 8). Tato perspektivní struktura obsahuje (*S*)-3-aminomethyl- a 7-(2-hydroxy)ethylsubstituenty. Dále byl popsán onen hydroxoniový kation vázající se do malé kavity, kde tvoří vodíkové můstky s Phe335, Ile441 a Met440. Stejná póza tohoto iontu byla pozorována i u podobných benzoxaborolových látek v komplexu s LeuRS z organismů *Mtb*, *Cryptosporidium hominis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae* a *Escherichia coli*. Dále záleží na pH okolního prostředí, lehce kyselější prostředí je výhodnější. Předpokládá se, že zmiňovaný hydroxoniový kation se zde koordinuje hned po nukleofilní atace (Obr. 9 podle³⁸) jednoho z ribosových hydroxylů na atom boru.



Obrázek 8: Reversibilní tvorba ethylendioxidového intramolekulárního můstku u GSK656 (v obr. jako Cmpd1).

Převzato z ref. Hoffmann G. et al.³⁸ Vpravo je znázorněna reakce s vodou a reversibilní tvorbou třetího cyklu

(pro GSK656 X = Cl). Převzato z ref. Li X. et al.³⁹

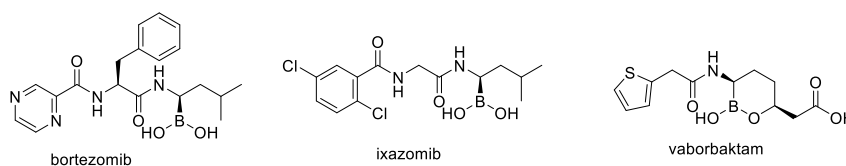


Obrázek 9: Pravděpodobný mechanismus vzniku aduktu benzoxaborolu s adenosinovou molekulou

Benzoxaborol může tvořit adukty i s ostatními molekulami obsahujícími ribosu, nemůže však pak inhibovat LeuRS³⁸. Jedná se například o UTP, GTP, CTP, UDP-*N*-acetylglukosamin, UDP- α -D-glukosu či D-ribose-5-fosfát. Rovnováha mezi volným benzoxaborolem a vznikajícím aduktem určuje permeaci agens do buňky, nejspíše proto pronikají podobné sloučeniny v různé míře do svých cílových buněk – od plasmodií po mykobakterie. Uvnitř i vně buňky dochází reversibilně k tvorbě aduktů. Hydrofilní povaha aduktů jim pomáhá vniknout do buňky pomocí koncentračních a ekvilibrativních nukleosidových transportérů. Spiroborátová struktura pak tvoří řadu vodíkových můstků s regionem bohatým na threonin, jedná se o threoniny Thr336 a Thr337. Adenosinmonofosfátová část aduktu interaguje s Leu432 a Tyr435 na tzv. smyčce vázající AMP⁴⁰.

5.3.2 Možná využití derivátů benzoxaborolu v oblasti medicíny

Bor má své nezastupitelné místo při využití v terapii a také v organické syntéze. Arylboronové kyseliny slouží v organické chemii jako chránicí činidla v syntéze nebo při Suzuki-Miyaurově couplingu. V radioterapii nádorů se používá technika borové záchytové neutronové terapie (boron neutron capture therapy, BNCT) využívající sloučeniny obsahující izotop ^{10}B . Dále je v klinické praxi několik léčiv obsahujících bor (^{11}B). Bortezomib (Obr. 10) je významné léčivo používané rovněž v onkologii, jedná se o inhibitor proteozomu obsahující boronovou kyselinu indikovaný k léčbě mnohočetného myelomu. Později byl ve stejné indikaci zaveden další derivát ixazomib. Za zmínku stojí i hemiestery boronových kyselin. Derivátem 2-hydroxy-1,2-oxyborinanu je vaborbaktam, což je inhibitor beta-laktamasy schválený FDA i EMA v letech 2017 a 2018³⁷. Relativně novým strukturním typem hemiesterů boronových kyselin jsou benzoxaboroly. Dosáhly pověsti dobré chemické stability, nízké toxicity, specifické působení vůči biologickému cíli a jednoduchosti syntézy³⁵.



Obrázek 10: Ostatní borové sloučeniny s využitím jakožto léčiva

5.3.2.1 Klinicky používané a experimentální deriváty benzoxaborolu

5.3.2.1.1 Tavaborol (AN2690)

Tavaborol (Obr. 11) byl registrován FDA v roce 2014 pod značkou Kerydin jako 5% roztok pro dermální použití indikovaný k léčbě onychomykózy. Aplikuje se jednou denně. Tavaborol může interagovat s CYP450⁴¹, ovšem výhodou topického podání je právě omezení tohoto jevu. V 1 % případů se objevují nežádoucí účinky jako olupování nehtu, erytém, zarůstající nehet či dermatitida v místě aplikace. Při klinické studii na 1194 pacientech při 48 týdnech podávání léku se úplného vyléčení dočkalo 6,5 % pacientů v jednom klinickém testování, 9,1 % v druhém. Vymizení mykologického původce se dosáhlo u 31,1 % a v druhém případě zkoušení 35,9 %⁴².

Tavaborol vykazuje významnou inhibici růstu *Trichophyton rubrum* a *T. mentagrophytes*⁴³.

5.3.2.1.2 Epetraborol (AN3365, GSK-221052)

Epetraborol (Obr. 11) působí inhibičně na gramnegativní bakterie, nepodléhá jejich efluxním mechanismům²⁴. 7-*O*-propanolový substituent tvoří aditivní interakce s fosfátem v řetězci tRNA. Inhibuje růst *P. aeruginosa* i bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* včetně kmenů produkujících NDM-1 a KPC karbapenemasy. Látka byla účinná na myších modelech infekcí. V malém měřítku se našly i rezistentní kmeny, více byl zkoumán kmen *P. aeruginosa* ATCC 27853. Byly objeveny dokonce mutace (Thr252Pro) v editující doméně LeuRS. Látka se dostala do stádia klinického testování pro léčbu komplikovaných infekcí močových cest, nicméně ve druhé fázi bylo testování pozastaveno pro rozvíjející se rezistenci. Stejně tak se stalo ve fázi II pro léčbu komplikovaných intraabdominálních infekcí⁴⁴. Epetraborol byl dále zkoumán jako látka aktivní vůči *M. abscessus*⁴⁵, což by mohlo hrát roli při nelehké léčbě netuberkulózních mykobakteriálních infekcí. Tyto infekce jsou provázeny rezistencí na makrolidy, která omezuje možnosti léčby. Epetraborol inhiboval růst těchto mykobakterií, ale i zde byly zaznamenány případy rezistence. Je sledováno, že je možné toto obejít kombinační terapií. Na myším modelu infekce se ukázalo, že při dávce 300 mg/kg docházelo k redukci kolonií *M. abscessus* jako při působení klarithromycinu. V rámci projektu MMV Pandemic Response Box byl testován *in vivo* účinek na *M. abscessus* v infekčním modelu u dávná pruhovaného a epetraborol byl účinnější než tigecyklin⁴⁶.

Epetraborol podporuje akumulaci alarmonů (p)ppGpp (pozorováno na *E. coli*)⁴⁷, tedy malých nukleotidů – guanosin tetra- a pentafosfáty, které spouští „přísnou odezvu“, což vede k redukci růstu bakterií a zastavení replikace. *E. faecium* je organismus necitlivý na benzoxaboroly kvůli odlišné struktuře LeuRS. Dále se zjistilo, že synergický efekt epetraborolu s jinými antibiotiky nefungoval na několika testovaných bakteriích. Výjimkou byla kombinace s kolistinem, kdy se dokonce snižovala četnost vzniku mutací u klinických izolátů *K. pneumoniae*.

Analogem epetraborolu je 1,2-dioxolanová tricyklická látka DS86760016 (Obr. 11), která má nižší riziko vzniku rezistence než epetraborol^{48,49}. Inhibuje růst

bakterií *Enterobacter*, *M. abscessus* a *P. aeruginosa*. Látka dosáhla v modelové léčbě dána pruhovaného infikovaného *M. abscessus* podobnou aktivitu jako epetraborol a rezistentní mutace se objevovaly jen velmi málo. Tato látka má lepší farmakokinetický profil, nižší plazmatickou clearance, delší plazmatický poločas a renální exkreci s větším rozsahem než epetraborol. Nicméně epetraborol je právě testován u netuberkulózních mykobakteriálních infekcí, obzvláště na plicní formu spojenou s *Mycobacterium avium*-komplexem (NCT05327803).

5.3.2.1.3 Krisaborol (AN2728)

Mast s 2% obsahem krisaborolu (struktura na Obr. 11) je registrována v USA již od roku 2016 pod názvem Eucrisa s indikací na atopickou dermatitidu pro pacienty starší dvou let. Ve dvou 28denních studiích v rámci III. fáze klinických studií, se ukázalo, že tento léčivý přípravek snižuje závažnost lehké až středně těžké atopické dermatitidy a svědění oproti čistému vehikulu⁵⁰. Další příznaky atopické dermatitidy, jako jsou zčervenání, olupování a šupinatění kůže, léčivo také ovlivnilo. Incidence bolesti v místě aplikace byla nízká. Dle jiného zdroje⁵¹ je incidence nežádoucího účinku pálení nebo píchání v místě aplikace 4 %. Vzácně se může objevit i infekce v místě podání. Úspěšnost terapie byla v rozmezí 31 až 47 %. Pokud dojde k absorpci krisaborolu do krevního oběhu, rychle se mění v neaktivní metabolity.

5.3.2.1.4 Akoziborol (N5568, SCYX-7158)

Akoziborol (Obr. 11) byl již klinicky testován ve fázi II/III⁵². Konvenční léčba trypanosomiázy způsobené *T. brucei gambiense* vyžaduje systémové podání léčiv, což je právě složité v rozvojových zemích. Ve studii byla použita jednorázová perorální dávka 960 mg akoziborolu. Studie probíhala se 208 pacienty v Demokratické republice Kongo a Guineji. Pacienti byli pozorováni 18 měsíců po podání léčiva. U 95,2 % pacientů byl zaznamenán úspěch léčby podobný NECT terapii (kombinace nifurtimoxu a eflornithinu). Akoziborol má dobrou biologickou dostupnost i přestup přes HEB do CNS (mozkomíšni mok), což je zásadní pro léčbu⁵³. Většina pacientů byla v pozdní fázi nemoci. Ze všech pacientů mělo 75 % náhlou nepříznivou událost související s léčbou. Většinou se jednalo o mírné potíže, často procedurální bolesti

a bolesti hlavy, dále horečku i malárii. Z těchto případů bylo 14 % souvisejících s léčivem, především horečka (5 %) a astenie (3 %). Plazmatický poločas látky je 14 dní a velmi pravděpodobně si zachovává antiparazitický efekt minimálně po dobu dvou měsíců. Jedná se tedy o léčivo efektivní bez ohledu na fázi nemoci u dospělých a adolescentů s dobrou bezpečností. Výhodou je, že odpadá nutnost lumbálních punkcí, které jsou někdy nutné ke kontrole stavu pacienta a jsou provázeny komplikacemi. Jedna jediná dávka je dostatečná pro terapii, a to velmi podporuje dostupnost terapie. Do roku 2023 probíhala dvojité zaslepená studie bezpečnosti v Demokratické republice Kongo a v Guineji (NCT05256017).

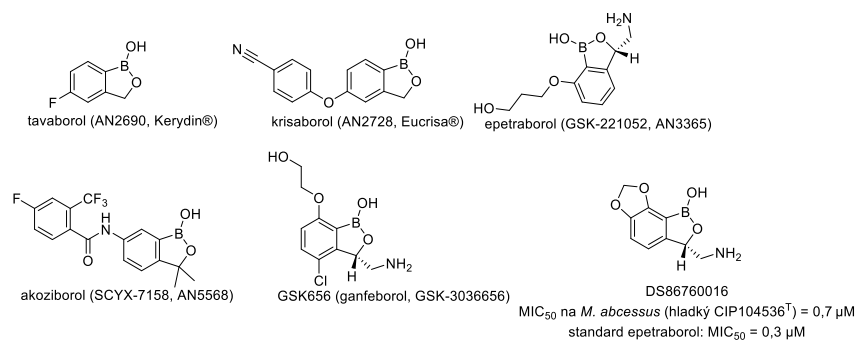
5.3.2.1.5 Ganfeborol (GSK656)

Ze studií vztahu struktury a účinku (*S*)-3-aminomethyl-4-halogenderivátů benzoxaborolů vzešla látka s označením GSK3036656 (GSK656, Obr. 11). V poloze 7 se nachází 2-hydroxyethoxysubstituce. Tato poloha byla vystavena okolnímu vodnému prostředí, tudíž se zde nabízelo zavedení hydrofilní strukturní modifikace. Tato sloučenina prokázala výraznou inhibici *Mtb* H37Rv s MIC = 0,08 μ M a mykobakteriální LeuRS IC₅₀ = 0,20 μ M. Zároveň vykazuje selektivitu na mykobakteriální enzym (IC₅₀ >300 μ M na mitochondriální lidské LeuRS a IC₅₀ = 132 μ M vůči cytosolické LeuRS)³⁹. V myším modelu infekce byla látka účinná (ED₉₉ = 0,4 mg/kg) a ukázal se také její zajímavý farmakokinetický profil, zde byl efekt porovnáván s linezolidem. Látka GSK656 má lepší bezpečnostní profil než její 7-ethoxysubstituovaní předchůdci, kdy dávka 50 mg/kg nebyla u myši tolerována. Díky své struktuře může tato látka v závislosti na prostředí tvořit i uzavřenou tricyklickou formu (Obr. 8). Látka má skvělou perorální biologickou dostupnost a dosahuje dobrých výsledků na myším modelu akutní i chronické *Mtb* infekce. Se svou dobrou biodostupností, nízkou molekulovou hmotností a nízkou hodnotou clogD se látka GSK656 vyrovná antituberkulotikům první linie jako je INH, pyrazinamid a ethambutol. Stala se tak kandidátem na léčivo proti tuberkulóze a v letech 2017 až 2019 podstupovala klinické hodnocení bezpečnosti u lidí (NCT03075410).

Látka GSK656 byla rozsáhle testována na velké množství kmenů *Mtb*, kdy u 102 ze 105 MDR a XDR kmenů byla MIC < 0,5 mg/l, což pak bylo označeno jako ECOFF hodnota (nejvyšší MIC hodnota u izolátů, u kterých se nejedná o rezistenci).

U non-MDR-*Mtb* pak byla vždy MIC < 0,063 mg/l a u *Mtb* H37Rv MIC = 0,024 mg/l⁵⁴. U třech kmenů se jednalo o nízkourovňovou rezistenci, nejspíš způsobenou silnější bakteriální stěnou nežli mutací LeuRS. Dále byla látka testována na 82 izolátech netuberkulózních mykobakterií – *M. abscessus*, *M. avium* a *M. intracellulare*. GSK656 není účinná vůči *M. avium* a *M. intracellulare*, její LeuRS je mírně odlišná od ostatních mykobakteriálních druhů a v okolí aktivního místa je nejspíše odlišnou strukturou zabráněno látce dostat se k aktivnímu místu editující domény.

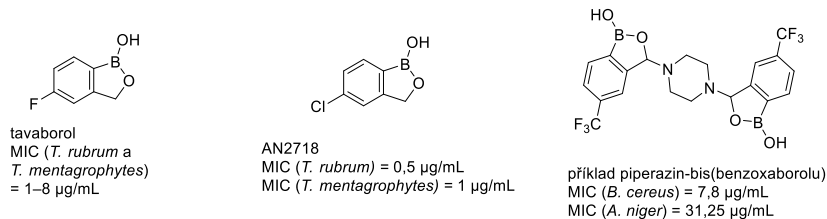
Během první fáze klinického testování⁵⁵ bylo zjištěno, že látka GSK656 se metabolizuje v játrech jen velice málo, není substrátem P-glykoproteinu, je to dobře rozpustná látka se střední permeabilitou a absorbuje se velmi rychle. Ve studiích toxicity byla odhalena mírná kardiovaskulární a hematopoetická toxicita. Byly podávány jednorázové dávky 5 mg, 15 mg, 25 mg a placebo. U dávky 5 mg se sledovalo podání nalačno, či po jídle a ukázalo se, že to nemá vliv na absorpci. V další fázi byl sledován účinek dávky 5 a 15 mg podávané jednou denně opakovaně po dobu 14 dní v porovnání s placebem. Závažné nežádoucí účinky se neobjevily, 6 pacientů z 20 u testování s jednorázovými dávkami si stěžovalo na lehké nežádoucí jevy – bolest hlavy ve dvou případech, abdominální bolest také ve dvou případech, závrať a průjem po dvou případech. To se pak projevilo v malé míře i u pacientů dostávajících opakované dávky, kde se zapojilo celkem 29 subjektů. V plazmě se nenašel žádný blízký metabolit látky GSK656, v moči byl pak detekován oxidovaný a deboronovaný metabolit (pouze 10 % materiálu bylo identifikováno jako strukturně blízkého GSK656). Látka byla obecně dobře tolerována. Při opakování dávek dochází k akumulaci látky. Dávky 10 a 15 mg byly navrženy jako dávky léčiva vhodné k léčbě TBC. Hodnoty časně baktericidní aktivity (early bactericidal activity (EBA₀₋₁₄)) byly podobné aktivitě pretomanidu. Autoři si slibují, že GSK656 umožní zkrátit léčbu TBC. Látka GSK656 se nyní zkouší ve fázi IIa klinického zkoušení (ukončená studie NCT03557281 a probíhající NCT05382312, stav k roku 2024).



Obrázek 11: Přehled vybraných derivátů benzoxaborolu s jejich chráněnými názvy i kódovými označeními

5.3.2.2 Antifungální aktivita derivátů benzoxaborolu

Aryl-, heteroaryl- a vinyldihydrobenzoxaboroly projevily antifungální aktivitu³⁵. První vůdčí strukturou byl 1-fenyldihydrobenzoxaborol. Substituce fluorem v poloze 5 benzoxaborolu pak vedla ke dvou až osminásobnému zvýšení inhibiční aktivity proti různým fungálním kmenům. Pro zvýšení hydrofility byla zavedena hydroxyskupina na bor. Byl tak získán tavaborol (AN2690, Obr. 12) s výraznou inhibiční aktivitou vůči *Aspergillus fumigatus* a *Cryptococcus neoformans*, nejvíce však aktivní proti *T. rubrum* a *T. mentagrophytes*, což jsou jedni z nejčastějších původců onychomykózy^{42,56}, která se stala indikací tavaborolu. Společnost Anacor Pharmaceuticals zkoumá dále látku AN2718 (Obr. 12) substituovanou chlorem v poloze 5 jako potenciální léčivo pro léčbu tinea pedis⁵⁷. V rámci zkoumání vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou benzoxaborolu bylo zjištěno, že rozšíření kruhu s borem na šestičlenný kruh vede ke ztrátě aktivity a je nutné zachovat pětičlenný kruh⁵⁸. Zjištění mechanismu účinku inhibicí LeuRS také urychlilo definování vztahů mezi strukturou a účinkem. Seiradake et al.³⁶ publikoval sérii benzoxaborolů s 6-ethylaminosubstitucí s inhibiční aktivitou vůči *C. albicans*. Dále byly zkoumány deriváty 4-trifluormethylfenylboronové kyseliny a jejich spojení v piperazin-bis(benzoxaboroly) (Obr. 12) se slabší inhibiční aktivitou vůči *C. albicans*, ale výraznou inhibicí růstu *B. cereus*⁵⁹.



Obrázek 12: Vybrané benzoxaboroly s antifungální aktivitou

5.3.2.3 Antimykobakteriální aktivita derivátů benzoxaborolu

Léčba rezistentní tuberkulózy léčivý druhé linie se stává nedostatečnou a je tak stále potřeba hledat nová antituberkulotika, která by měla nižší nežádoucí účinky a zkrátila dobu terapie (může dosáhnout až dvou let), což by méně zatěžovalo zdravotnické systémy⁶⁰.

Antifungálně účinné deriváty 6-aminobenzoxaborolu byly testovány také na inhibici růstu *Mtb* H37Rv a byly nalezeny sloučeniny vykazující MIC v mikromolárních koncentracích. Podobně jako adukt tRNA s norvalinem může (*S*)-3-aminomethylskupina benzoxaborolu interagovat se stejnými aminokyselinami Asp342, Asp345 a Met336 a tím zvyšovat inhibici LeuRS z *E. coli*²⁴. Tato aktivita byla potvrzena také na kmeni *Mtb* Erdman, 7-ethoxysubstituce benzoxaborolu interagovala s Arg449 a navíc stabilizovala adukt koordinačně kovalentní vazbou s adeninem 76, ještě výhodnější byla substituce (2-hydroxy)ethylem v poloze 7⁴⁰. Dále se osvědčily substituce chlorem nebo bromem v poloze 4. Látky s 4-halogenovou substitucí a zároveň 7-ethoxysubstitucí (Obr. 13) prokázaly v myších modelech akutní i chronické TBC účinek srovnatelný s INH. Ve stejné studii byly benzoxaborolové deriváty testovány na inhibici lidské mitochondriální LeuRS, neboť mitochondrie jsou pravděpodobně původně endosymbiotické bakterie. Benzoxaborolové sloučeniny však vykazaly vysokou selektivitu vůči bakteriálnímu enzymu, jejich efekt na mitochondriální LeuRS byl nižší. O mitochondriální LeuRS je známo, že je vadná při editaci tRNA. I při tomto výzkumu se vědci setkali s rezistencí bakterií díky SNP mutaci editující domény. Domnívají se, že případnou rezistenci bude možné překonat kombinační terapií. Pomocí zjištěných vztahů struktury a účinku pak byl vyvinut ganfeborol (GSK656^{39,61}, Obr. 13).

Zvyšování lipofility 7-alkoxyřetězce nepřineslo zvýšení aktivity, naopak výhodnou se ukázala být hydroxylová skupina na krátkém alkoxyřetězci³⁹. Byl

vyvozen závěr, že ideální inhibitor LeuRS má nízkou molekulovou hmotnost, malý celkový polární povrch molekuly a nízkou hodnotu $\text{clog}D_{7,4}$ blízkou antituberkulotikům první linie.

Patel et al. publikoval sérii derivátů 6-benzyloxybenzoxaborolu (Obr. 13) s aktivitou vůči intracelulárním bakteriím⁶². Zajímavou aktivitu prokázaly také deriváty 7-fenylbenzoxaborolů. Navíc se zvažuje, že by jejich mechanismus působení mohl tkvět spíše v inhibici NADH dehydrogenasy⁶³. Dále byly zkoumány dimerní benzoxaborolové sloučeniny aktivní vůči *Mtb*⁶⁴. Jednalo se o benzoxaboroly spojené amidovou vazbou a PEG linkerem. Jejich mechanismus účinku spočívá ve vazbě na extracelulární glykany *Mtb*, tedy bez nutnosti dostat se do intracelulárního prostoru, což je výhodou. Neměla by se na ně rozvíjet rezistence.

Jedna z dalších cest v boji s rezistentní *Mtb* může vést skrze inhibici kaseinolytických proteas P1 a P2. Inspirací v chlormethylketonech inhibujících serinové proteasy a bortezomibu vznikly dipeptidylderiváty boronových kyselin (Obr. 13) a hledaly se takové, které budou co nejméně ovlivňovat lidský proteasom, tedy aby byly selektivní. Při působení na *Mtb* byly hodnoty MIC v jednotkách mikromolárních koncentrací⁶⁵.

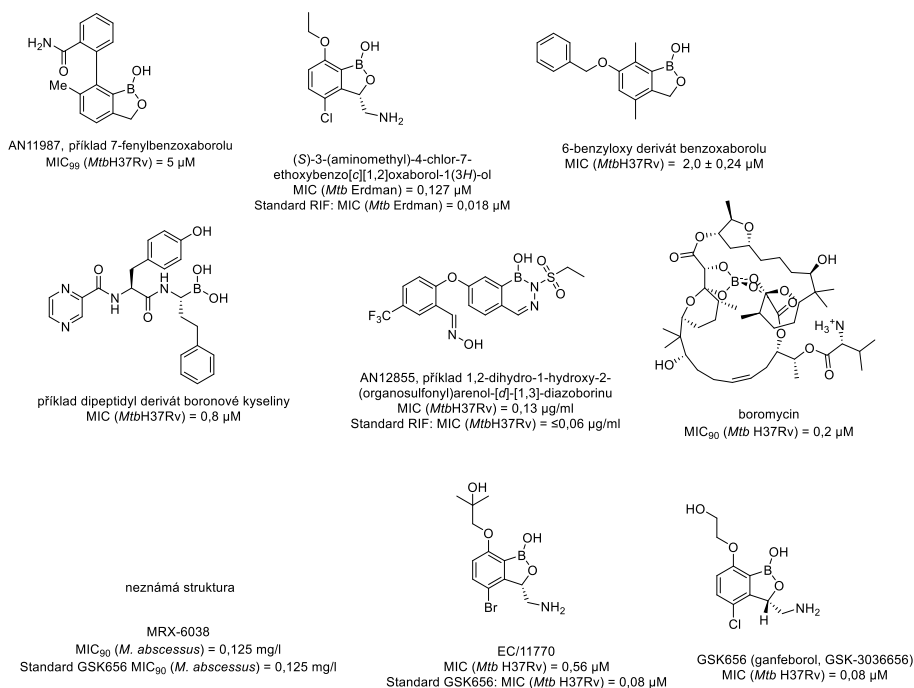
Další možností jsou 1,2-dihydro-1-hydroxy-2-(organosulfonyl)arenol-[*d*]-[1,3]-diazoborinové sloučeniny. Bylo zjištěno, že tyto látky působí mechanismem vazby na NAD^+ za vzniku kovalentní vazby B-O na C2' ribosy kofaktoru, a následně je inhibována enoyl-reduktasa v případě *E. coli*. U *Mtb* se jedná o podobný enzym, InhA, což je enoyl(acyl-přenašečový protein) reduktasa, která je potřebná při syntéze mykolových kyselin. Látka AN12855 (Obr. 13) s IC_{50} 0,03 μM na InhA má enzym inhibovat bez závislosti na kofaktoru⁶⁶. Podobné látky působily inhibičně i na fungální organismy⁶⁷.

Zajímavou sloučeninou je i boromycin (Obr. 13). Tento polyetherový makrolid izolovaný ze *Streptomyces antibioticus* vykazuje MIC_{50} (*Mtb* H37Rv) v řádech desítek nanomolů. Působí jako ionofor na bakteriální stěnu a naruší tak gradient draslíku a usmrtí mykobakterii. Cytotoxicita na HepG2 byla velmi nízká a míra rezistence rovněž⁶⁸.

Na *M. abscessus* působila inhibičně látka MRX-6038 (Obr. 13), která je podobná GSK656. Testována byla na myších modelech a nebyl zjištěn antagonismus

s běžnými antibiotiky používanými k léčbě netuberkulózních mykobakteriálních infekcí. Hodnota MIC₅₀ byla 0,063 µg/ml⁶⁹.

Látka EC/11770 (Obr. 13) vychází strukturně z (S)-3-aminomethyl-4-halogenderivátů benzoxaborolu. V poloze 7 je připojena 2-hydroxy-2-methylpropyloxysubstituce. S MIC = 0,56 µM vůči *Mtb* je látka o něco méně aktivní než GSK656, ale bylo zjištěno, že inhibuje růst *M. avium* 11 (MIC = 4,0 µM) i *M. abscessus* Bamboo, zatímco GSK656 je vůči *M. avium* jen slabě aktivní (MIC = 50 µM)⁷⁰. Dále byla látka úspěšně zkoušena *in vivo* na myším modelu infekce *M. abscessus*, kdy dávka 10 mg/kg způsobila stejný efekt jako 250 mg/kg klarithromycinu, což ji činí zajímavým kandidátem na léčbu netuberkulózních mykobakteriálních infekcí.



Obrázek 13: Vybrané sloučeniny boru s antimykobakteriální aktivitou

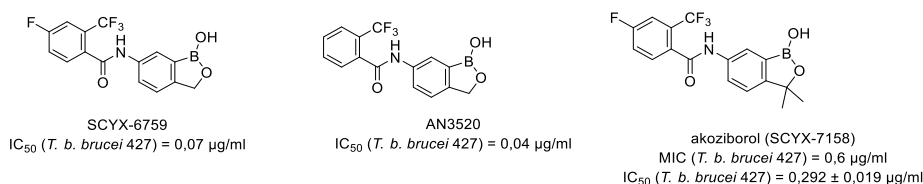
5.3.2.4 Antiprotozoální aktivita derivátů benzoxaborolu

Trypanozomiáza neboli spavá nemoc je způsobená prvoky *Trypanosoma brucei gambiense* a *Trypanosoma brucei rhodiense*, které jsou přenášeny mouchou tse-tse. Běžnými léčivy jsou pentamidin, suramin, eflornitin a melarsoprol. Jsou drahé a mají časté nežádoucí účinky, v pozdních fázích nemoci nejsou dobře účinné a po

perorálním podání špatně dostupné. Trypanozomiáza se řadí mezi tzv. opomíjené tropické nemoci³⁵.

Primární screening derivátů ukázal, že pro antitrypanozomiální aktivitu je nutné zachování benzoxaborolového kruhu a arylového substituentu na C6. Jako linker mezi C6 benzoxaborolového skeletu a arylem se osvědčily sulfonamidové a amidové vazby. Novými vůdčími strukturami byly látky AN3520 a SCYX-6759 (Obr. 14) s $IC_{50} = 0,05 \mu\text{g/ml}$ vůči *T. b. brucei*. Tyto látky jsou strukturně podobné látkám testovaným v této diplomové práci svými arylovými substituenty substituovanými dále fluorem a trifluormethyly. Jsou dobře perorálně dostupné, nejsou substrátem P-glykoproteinu a jsou schopné přestoupit hematoencefalickou bariéru. Myši s prvním stádiem nemoci vyléčily za 4 dny⁷¹.

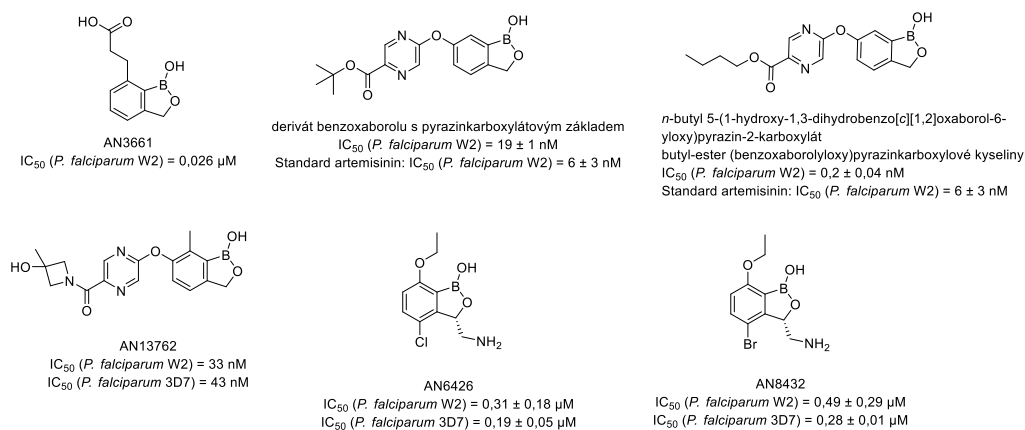
Na C3 byl zaveden methyl, který významně neovlivnil antitrypanozomiální aktivitu, ale zvýšil cytotoxicitu. Naopak dimethylsubstituce vedla k necytotoxickým látkám. Takto vznikl akoziborol (SCYX-7158, Obr. 14), opět dobře přecházející přes HEB, s významnou inhibiční aktivitou a dobře perorálně dostupný, proto se dostal do stádia klinického testování^{35,72}. Dále byly nalezeny další aktivní sloučeniny s cílem působení na trypanosomiální LeuRS⁷³⁻⁷⁶.



Obrázek 14: Deriváty benzoxaborolu s antitrypanozomiální aktivitou

Dalším onemocněním, jehož léčba je komplikována rezistencí a špatnou dostupností léčby, je malárie. Testováním série benzoxaborolů na inhibici růstu *Plasmodium falciparum* byl nalezen aktivní 7-(2-karboxyethyl)-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborol (AN3661, Obr. 15) s $IC_{50} = 0,026 \mu\text{M}$ ⁷⁷. Později se ukázalo, že jejím cílem působení má být, na rozdíl od ostatních cílicích na LeuRS, enzym CPSF3 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor subunit 3), což je metalo- β -laktamasa s dvěma zinečnatými kationty v aktivním místě a podílí se na tvoření pre-mRNA, jejím štěpení a polyadenylaci⁷⁸. Dalším zajímavým objevem byly deriváty s 6-aryloxyskupinou, jejichž aktivita se dále zvyšovala přítomností slabě

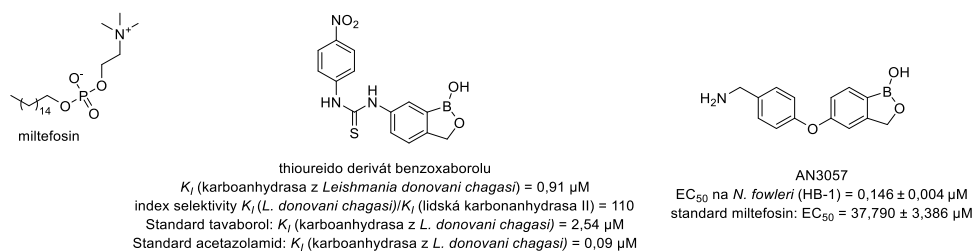
bazického dusíku v *meta*-poloze arylu. Zavedením pyrazinového substituentu (Obr. 15) stoupla aktivita proti kmeni *P. falciparum* W2 ($IC_{50} = 0,0019 \mu M$). Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že butyl-ester (Obr. 15, karboxyl v *para* poloze vůči kyslíku, na pyrazinovém jádře) má ještě výraznější aktivitu ($IC_{50} = 0,0002 \mu M$)⁷⁹. U derivátů s karboxamidovým linkerem měla amidová vazba pomoci zvýšit aktivitu, podpořit stabilitu a farmakokinetický profil. Novou vůdčí strukturou s čtyřčlenným cyklem ve vedlejším řetězci se tak stal 6-{2-[(3-hydroxy-3-methylazetidín-1-yl)karbonyl]pyrazinyl-5-oxy}-1,3-dihydro-1-hydroxy-7-methyl-2,1-benzoxaborol (AN13762, Obr. 15) s hodnotou $ED_{90} = 1,9 \text{ mg/kg}$. V myším modelu infikovaném *P. falciparum* se látka chovala se stejným clearance profilem jako artesunát. Látka nevykázala mutagenní účinky. Rychlost účinku při hodnocení míry úbytku parazitů (kolik látky zničí parazity za jeden životní cyklus parazita – též PRR) v krvi *in vivo* se dokázala vyrovnat chlorochinu či artesunátu. Byla testována na inhibici jedenácti rezistentních kmenů *P. falciparum* a hodnota IC_{50} se zde pohybovala mezi 0,033 a 0,080 μM ⁸⁰. Neprokázala se zkřížená rezistence. Látka je aktivní i vůči *Toxoplasma gondii* a *Cryptosporidium parvum*⁸¹. Cílem působení se zdá být faktor CPSF3. Látka ze skupiny 3-aminomethylbenzoxaborolů byly testovány též. AN6426 a AN8432 (Obr. 15) byly vybrány jako nejúčinnější, ale inhibovat plasmodia bylo možné pouze za přítomnosti exogenně dodávaného norvalinu⁸².



Obrázek 15: Deriváty benzoxaborolu s antiplasmodiální aktivitou

Leishmanióza, infekční onemocnění způsobené parazitickým prvokem *Leishmania*, má tři formy dle manifestace příznaků – viscerální, kutánní

a mukokutánní. Perorálním lékem první volby je miltefosin (hexadecyl-2-(trimethylazaniumyl)ethyl-fosfát, Obr. 16), jehož účinnost poslední roky klesá, tudíž je potřeba hledat nové účinné látky³⁵. Antimykoticky účinný tavaborol prokázal i inhibici LeuRS z *L. donovani* s $IC_{50} = 0,83 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Dalším cílem působení benzoxaborolů by mohla být karboanhydrasa, kterou inhibovaly deriváty ureido- a thioureidobenzoxaborolů (Obr. 16)⁸³. Výrazné účinnosti dosáhly také karboxamidy při topickém podání v myším modelu kutánní formy nemoci⁸⁴.

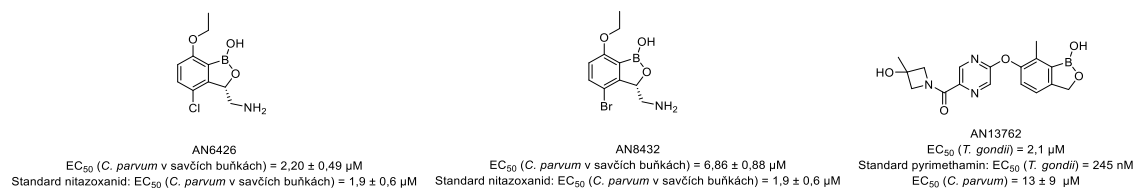


Obrázek 16: Miltefosin, thioureidoderivát benzoxaborolu s antileishmaniální aktivitou a AN3057 s inhibiční aktivitou na *Naegleria fowleri*

Ženišková et al.⁸⁵ zkoumali efekt látky AN3057 (Obr. 16) na amébu *Naegleria fowleri*, původce primární amébové meningoencefalitidy, vzácné nemoci s velkou smrtností. Jedná se o 4-aminomethylfenyloxyderivát benzoxaborolu. Ukázal se být vysoce účinný *in vitro* proti standardu miltefosinu. Testován byl i na infikovaných myších, kde se ukázalo, že se bez relapsu vyléčilo 28 % myší.

Kryptosporidióza je infekční onemocnění způsobené prvokem s vysokou morbiditou v rozvojových zemích. Toxoplazmóza je rovněž infekce způsobená prvokem, nebezpečná je hlavně pro novorozence a její pohlavní cyklus probíhá v kočkách³⁵. I proti původcům těchto infekcí *Cryptosporidium parvum* a *Toxoplasma gondii* byly testovány 3-aminomethylderiváty. Benzoxaboroly AN6426 a AN8432 (Obr. 15 a 17) byly aktivní v řádu jednotek μM ⁸⁶, což je srovnatelné s účinkem nitazoxanidu – standardem v léčbě kryptosporidiózy. Mechanismus účinku spočívá opět v inhibici LeuRS. Látka AN13762 (Obr. 17) prokázala účinek i na myši nakažené *T. gondii* ($EC_{50} = 2,1 \mu\text{M}$) i *C. parvum* ($EC_{50} = 13 \pm 9 \mu\text{M}$)⁸¹. Jako molekulární cíl působení byl však určen faktor CPSF3. U *P. falciparum* látka působí nejspíše na vícero cílů. Látka má EC_{50} u plasmodia v řádech nM, protože zde dochází k intracelulární

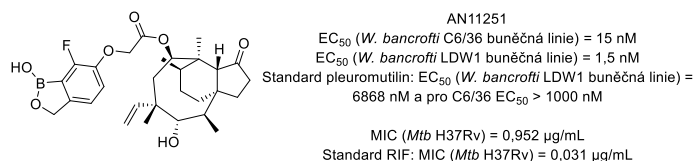
aktivaci, kdežto u dvou zmiňovaných prvoků nikoli. Práce se zabývala i mapováním mutací způsobujících rezistenci.



Obrázek 17: Deriváty benzoxaborolu s inhibiční aktivitou vůči *T. gondii* a *C. parvum*

5.3.2.5 Anthelmintické účinky derivátů benzoxaborolu

Onchocerkóza zvaná říční slepota je parazitární infekční choroba způsobená hlísticí *Onchocerca volvulus* přenášená mouchami rodu *Simulium*. Lymfatická filarióza, též elefantiáza, je způsobena infekcí hlísticemi *Wolbachia*³⁵. I při léčbě těchto opomíjených tropických nemocí by se mohly využívat benzoxaboroly. Jacobs et al.⁸⁷ se zabývali zdvojenými molekulami – borpleuromutiliny spojené etherovou nebo esterovou vazbou. Pleuromutilin je antibiotikum cílící na inhibici proteosyntézy na jednotce 50S ribosomů. Vůdčí struktura se 7-fluor-6-oxybenzoxaborolovým fragmentem (látka AN11251, Obr. 18) prokázala významnou aktivitou vůči hlísticím *Wolbachia* s dobrým farmakokinetickým profilem. Po perorálním podání myším byl redukován počet parazitů v těle. Látka by mohla být účinná i na říční slepotu. Podle další studie⁸⁸ z roku 2023 zaměřené na preklinické testování se jedná o perspektivního kandidáta s účinkem na hlístice *Wolbachia* a grampozitivní bakterie. Byly zkoumány jeho farmakokinetické a farmakodynamické charakteristiky na krysím modelu. Hodnota MIC proti *Wolbachia* se pohybovala mezi 0,79 a 7,9 $\mu\text{g/ml}$. Dávka pro člověka byla stanovena na 1,7 mg dvakrát denně nebo 14,7 mg jednou denně. Je to látka s vysokou lipofilitou, dobrou biodostupností, s nízkou mírou vazby na jaterní proteiny a vysokou mírou vazby na plazmatické proteiny. Clearance byla hodnocena jako mírná až dobrá. Byla měřena i MIC vůči *Mtb* H37Rv, jejíž hodnota byla 0,952 $\mu\text{g/ml}$.



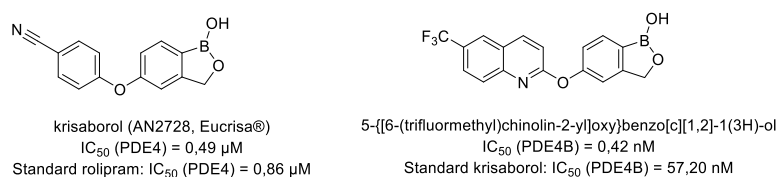
Obrázek 18: AN11251 a zjištěné aktivity

5.3.2.6 Vliv derivátů benzoxaborolu na atopickou dermatitidu

Atopická dermatitida je zánětlivé onemocnění kůže a je jedním z projevů atopie. Klasickými léčivy jsou lokálně podávané kortikosteroidy, antihistaminika a inhibitory kalcineurinu. Podpůrně se aplikují promašťovací přípravky. Stále jsou hledána nová léčiva s bezpečnějším profilem. Jednou ze skupin mohou být inhibitory fosfodiesterasy 4 (PDE4). Inhibicí PDE4 se v buňce hromadí cAMP, nedochází k produkci NF- κ B a tím se tlumí zánětlivá reakce⁸⁹. Další indikací vhodných inhibitorů je léčba psoriázy.

Série 5-fenoxybenzoxaborolů ukázala inhibiční aktivitu na hladinu cytokinů TNF- α a IFN- γ . Mechanismus účinku částečně spočívá v inhibici PDE4. Látky spíše inhibovaly PDE-4, ovšem deriváty s 4-kyanofenoxy- (IC₅₀ = 0,49 µM), 4-morfolinylkarbonyl- a 4-trifluormethylfenoxysubstitucí významně snižovaly i uvolnění cytokinů z periferních krevních mononukleárních buněk, které jsou stimulovány fytohemaglutininem a lipopolysacharidy. Tyto tři látky inhibovaly PDE4 více než rolipram. Přesunem 4-kyanoskupiny z polohy *para* do jiných poloh byla aktivita zeslabena. 5-Fenoxyskupina se ukázala jako nezbytná pro inhibici PDE4 a inhibici uvolňování cytokinů. Skupiny odtahující elektrony na tomto jádře pak účinek zesilovaly. Dále byly stanoveny hodnoty IC₅₀ u uvolňování IL-2, IL-5 a IL-10. 4-Kyanofenoxyderivát inhiboval také enzymy PDE1A3, PDE3Cat a PDE7A1. Látka pak byla zkoušena na modelu edému ucha u myši indukovaném forbol-esterem a byly prokázány dobrá prostupnost kůží a hlavně protizánětlivý efekt, který byl srovnatelný s dexamethasonem⁹⁰. Dnes je 4-kyanofenoxyderivát (AN2728) znám jak krisaborol (Obr. 19) a je registrován FDA pro léčbu atopické dermatitidy od roku 2016⁹¹. Benzoxaboroly se vážou u PDE4 do katalytické domény na bi-metalický komplex zinku a hořčíku. Krisaborol má výrazný účinek na inhibici uvolňování IL-4, další benzoxaboroly ovlivňují i uvolňování IL-13, IL-17, IL-22 a IL-23⁹².

Pomocí designu léčiv založeném na znalosti 3D struktury biologického cíle (structure-based drug design) byla navržena a následně připravena látka 5-{{6-(trifluormethyl)chinolin-2-yl}oxy}benzo[*c*][1,2]-1(3*H*)-ol (Obr. 19). Orthokondenzací dalšího aromatického jádra mají být podpořeny interakce s enzymem PDE4 přes tzv. adeninovou kapsu. Látka inhibovala PDE4 s $IC_{50} = 0,42$ nM, takže je účinnější než krisaborol ($IC_{50} = 57,20$ nM). Látka nezpůsobovala fototoxicitu a byla účinnější u myšního modelu ušního edému indukovaného forbol-esterem i atopické dermatitidy u myši indukované kalcipotriolem⁹³.



Obrázek 19: Deriváty benzoxaborolu inhibující PDE4, potenciální léčiva atopické dermatitidy

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Použité chemikálie, přístrojové vybavení a identifikační a analytické metody

Syntéza sloučenin proběhla v laboratořích Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Použité látky pro přípravu sloučenin pocházely od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) či firmy Fluorochem (Hadfield, Derbyshire, Spojené království) a byly použity v dodané jakosti:

6-aminobenzo[c][1,2]oxaborol-1(3*H*)-ol hydrochlorid

1,1'-karbonyldiimidazol (CDI)

3-methylpyrazin-2-karboxylová kyselina

pikolinová kyselina

5-(trifluormethyl)pyridin-2-karboxylová kyselina

3,4-dihydro-3-oxo-2-chinoxalinkarboxylová kyselina

1,3-thiazol-4-karboxylová kyselina

2-aminothiazol-4-karboxylová kyselina

isochinolin-1-karboxylová kyselina

4-chlorbenzoová kyselina

chinolin-2-karboxylová kyselina

6-(trifluormethyl)nikotinová kyselina

5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina

6-hydroxynikotinová kyselina

5-hydroxynikotinová kyselina

kurkumin

Kontrola průběhu reakcí byla prováděna pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách TLC Merck Silica 60 F₂₅₄ výrobce Merck (Darmstadt, SRN) s detekcí pod UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Základní mobilní fáze byla směs chloroformu a methanolu 20:1 (v/v), v některých případech byl zvýšen obsah methanolu. Pro důkaz sloučenin boru na TLC deskách posloužil roztok

kurkuminu (250 mg) v 250 ml roztoku ethanolu a 1M HCl v poměru 99:1 (v/v) a následně byl vypálen horkovzdušnou pistolí.

Ve zmíněných případech byly látky izolovány flash chromatografií za použití flash chromatografu puriFlash XS420Plus (Interchim, Montluçon, Francie). Detekce probíhala měřením absorbance při vlnových délkách 254 a 280 nm za současné kontroly UV skenem v rozmezí 200–800 nm.

Před identifikací byly vzorky sušeny v exsikátoru nad oxidem fosforečným za sníženého tlaku 1,33 kPa po dobu jednoho či dvou dní.

Měření NMR spekter bylo provedeno na přístroji Jeol JNM-ECZ600R (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) při frekvenci 600 MHz pro ^1H -NMR spektra, při frekvenci 151 MHz pro ^{13}C -NMR spektra a při frekvenci 160 MHz pro ^{11}B -NMR spektra při laboratorní teplotě. Spektra byla měřena v deuterovaném DMSO- d_6 . Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v jednotkách ppm, vztažené k referenčnímu signálu tetramethylsilanu (TMS) přes zbytkové signály rozpouštědla (2,49 ppm v ^1H -NMR spektrech a 39,7 ppm v ^{13}C -NMR spektrech). V zápisu dat se pak objevují signály pro pyridinový vodík (PyH), pyrazinový vodík (PzH), thiazolový vodík (TzH), aromatický vodík (ArH), laktamový vodík (LmH), pyridinový uhlík (PyC), singlet (s), broad singlet (bs, široký singlet), dublet (d), dublet dubletu (dd) a multiplet (m).

Infračervená spektra byla měřena pomocí spektrofotometru NICOLET 6700 FT-IR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) za použití ATR-Ge metody.

Elementární analýza sloučenin byla změřena pomocí analyzátoru MICRO cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, SRN).

Čistota zkoumaných látek byla stanovena za užití kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 SL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Přístroj sestával z vakuového mikroodplyňovače, 1200 SL binární pumpy, 1200 SL plus autosampler, TCC infinity 1290 sloupcového termostatu a 1200 SL detektoru diodového pole. K měření byla použita kolona ZOBRA XDB C-18 250 × 4.6 mm, 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Jako mobilní fáze byla zvolena směs vody a acetonitrilu v poměru 7:3 (v/v), rychlost průtoku byla 0,6 ml/min a teplota systému byla 25 °C. Tento chromatografický systém by ovládán softwarem Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), verze B.04.02 rozšířený

o spektrální modul. Metoda procentuálního obsahu při vlnové délce 250 nm byla použita tam, kde se potvrdila více než 95% čistota.

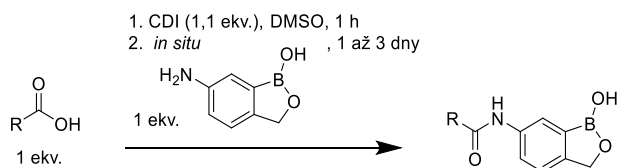
Hmotnostní spektra, ať již v pozitivně nabitým či negativně nabitým módu, byla změřena na přístroji Expression® Compact Mass Spectrometer (Advion, Ithaca, NY, USA) s jednoduchým kvadrupólovým detektorem za pomoci chemické ionizace (APCI-MS). Vzorky byly nanášeny v pevném stavu a měřeny za atmosférického tlaku metodou ASAP.

Teploty tání látek byly změřeny v kapilárách pomocí přístroje Stuart SMP20 a SMP30 (Bibby Scientific Ltd., Stone, UK) a nejsou zkorigovány.

Program ChemDraw Professional, verze 20.1.1.125 (PerkinElmer Informatics, Inc., Waltham, MA, USA) byl použit k vytvoření strukturálních vzorců, generování sumárních vzorců a k výpočtům molekulové hmotnosti a teoretického parametru látek $ClogP$.

6.2 Obecné schéma syntézy 6-(acylamino)benzo[*c*][1,2]oxaborol-1(3*H*)-olů

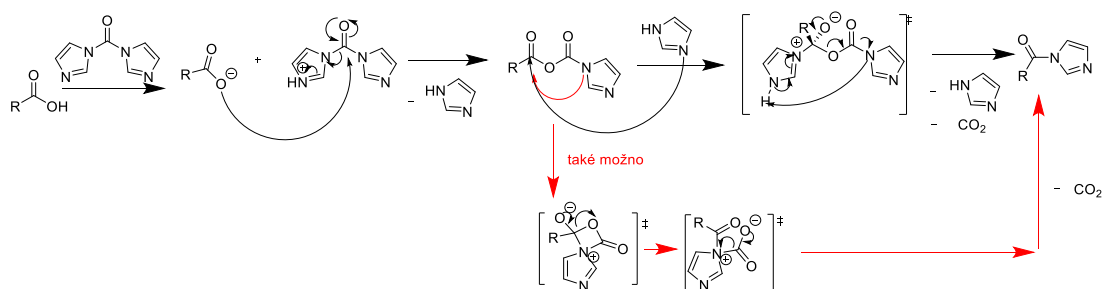
Pro přípravu všech sloučenin byla použita dvoukroková syntéza, kdy měla vzniknout amidová vazba mezi 6-aminobenzo[*c*][1,2]oxaborol-1(3*H*)-olem (dále jako aminobenzoxaborol) a aromatickou kyselinou, která nese zbytek dusíkatého heterocyklu nebo substituovaného benzenu (Obr. 20).



Obrázek 20: Obecné reakční schéma přípravy derivátů benzoxaborolu

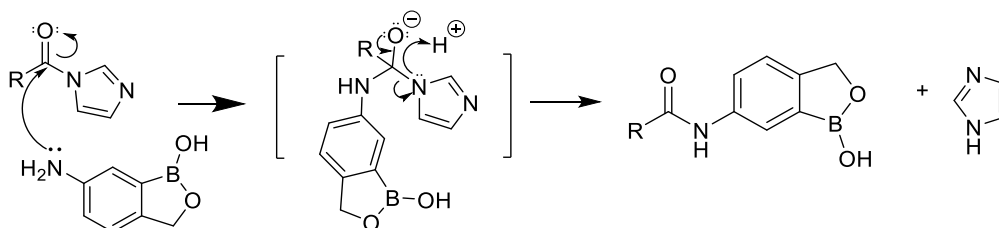
Karboxylová skupina je aktivována 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI). Takto aktivovaná sloučenina ve formě *N*-acylimidazolu dobře reaguje za laboratorní teploty s aminoskupinami. CDI se na karboxylovou funkci navazuje mechanismem nukleofilní substituce, což se vysvětluje kaskádou kroků dvěma cestami (Obr. 21). Jde o reakci (tedy včetně druhého kroku – navázání aminoskupiny), jež bývá v literatuře

označována jako Staabova reakce⁹⁴. Aktivace karbonylu byla provedena v našich podmínkách v roztoku výchozí kyseliny a CDI v DMSO. Při reakci dochází k uvolňování oxidu uhličitého, což se projeví tvorbou bublin v roztoku, přičemž se tohoto jevu dá využít jako indikátoru ukončení reakce. Výchozí kyselina je tedy připravena k reakci s aminobenzoxaborolem. Stává se tak poměrně brzy, proces je relativně rychlý.



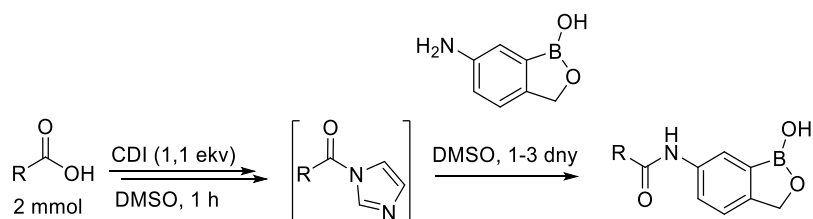
Obrázek 21: Mechanismus aktivace karboxylové funkce během Staabovy reakce

Reakce *N*-acylimidazolu s aminobenzoxaborolem je podstatou druhého kroku syntézy. Aminoskupina v poloze 6 na benzoxaborolu vystupuje jako nukleofil a důsledkem je uvolnění imidazolu za vzniku kýžené amidové vazby (Obr. 22).



Obrázek 22: Reakce aktivované karboxylové funkce s nukleofilem

6.3 Postup přípravy derivátů benzoxaborolu



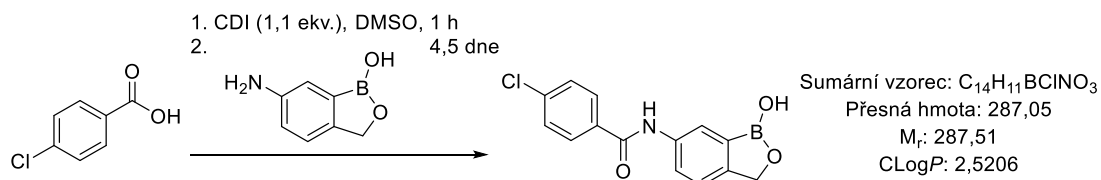
V 50ml baňce byla smíchána aromatická kyselina (2 mmol) a CDI (356,74 mg; 2,2 mmol), směs byla zevně mírně zahřáta horkovzdušnou pistolí nastavenou na 70 °C

a následně byl přidán DMSO (2–4 ml dle rozpustnosti příslušné kyseliny). Reakce byla míchána na elektromagnetické míchačce za laboratorní teploty po dobu 1 h. Poté bylo přidáno ekvimolární množství aminobenzoxaborol-hydrochloridu (370,84 mg; 2 mmol) rozpuštěného v DMSO (5–17 ml podle rozpustnosti). Reakce byla míchána za laboratorní teploty po dobu 1–3 dní a její průběh byl monitorován pomocí TLC. Reakce byla ukončena precipitací produktu přidáním 10 ml 1M vodného roztoku HCl. V případě, že acylová část amidu obsahovala bazické centrum (aminoskupina, pyridinový dusík) proběhla precipitace šetrněji nejprve přidáním 30 ml destilované vody a mícháním po dobu 10 min. Posléze byly přidány po kapkách asi 3 ml 1M vodného roztoku HCl do slabě kyselé reakce a suspenze byla míchána dalších 10 min. Sraženina byla odsáta a promyta vodou do neutrální pH reakce. Vzorek byl podroben prvotní kontrole čistoty pomocí TLC a důkazové reakci boru s kurkuminovým roztokem na TLC za vzniku červeného zbarvení. V případě přítomnosti nečistot na TLC, byla směs čištěna flash chromatografií. Tímto postupem byly připraveny následující produkty: PS-BZX-7, PS-BZX-8.1, PS-BZX-12 až PS-BZX-14, PS-BZX-17 až PS-BZX-21.

6.4 Nově připravené látky

6.4.1 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-4-chlorbenzamid (PS-BZX-17)

Pro přípravu byla použita 4-chlorbenzoová kyselina (313,14 mg; 2 mmol).



Číslo CAS: 1222508-98-6

Vzhled: béžová pevná látka

Reakční výtěžek: 531,9 mg (92 %)

R_f = 0,7 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 20:1 (v/v))

Teplota tání: 225,5–228,1 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm^{-1}): 3298 (ν O-H), 1638 (δ , C=O), 1536 (δ CONH), 1366 (ν B-O), 982 (ν C-O ether)

^1H NMR: (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,34 (s, 1H, CONH); 9,22 (s, 1H, OH); 8,16 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, ArH); 8,02–7,97 (m, 2H, ArH); 7,75 (dd, $J = 8,1; 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,62–7,57 (m, 2H, ArH); 7,38 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, ArH); 4,96 (s, 2H, CH_2)

^{13}C NMR: (151 MHz, DMSO- d_6) δ 164,95; 149,93; 138,27; 136,88; 134,23; 131,43; 130,17; 128,99; 124,26; 123,04; 122,00; 70,28

^{11}B NMR: (160 MHz, DMSO- d_6) δ 35,07

Elementární analýza:

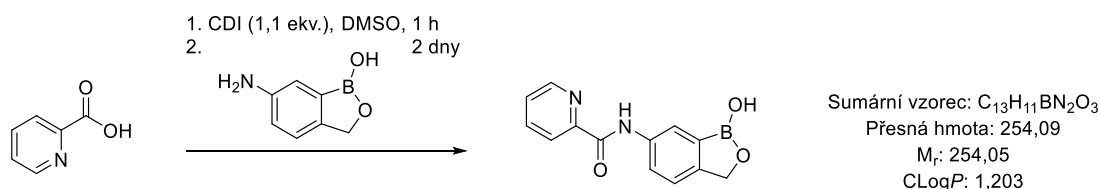
Vypočítaná: C 58,49 %; H 3,86 %; N 4,87 %

Naměřená: C 58,43 %; H 3,64 %; N 4,85 %

MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 287,9$

6.4.2 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)picolinamid (PS-BZX-8.1)

K přípravě byla použita pikolinová kyselina (246,22 mg; 2 mmol).



Vzhled: žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 407,6 mg (80 %)

$R_f = 0,8$ (mobilní fáze: $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$ 10:1 (v/v))

Teplota tání: 183,7–186,1 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm^{-1}): 3311 (ν O-H), 1677 (δ , C=O), 1540 (δ CONH), 1366 (ν B-O), 980 (ν C-O ether)

^1H NMR: (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,64 (s, 1H, CONH); 9,23 (s, 1H, OH); 8,73 (m, 1H, PyH); 8,30 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, ArH); 8,16 (m, 1H, PyH); 8,06 (m, 1H, PyH); 7,85 (dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,67 (m, 1H, PyH); 7,42–7,35 (m, 1H, ArH); 4,97 (s, 2H, CH_2)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,00; 150,54; 150,03; 148,98; 138,66; 137,68; 131,50; 127,41; 124,16; 122,90; 122,68; 122,08; 70,29

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 31,61

Elementární analýza:

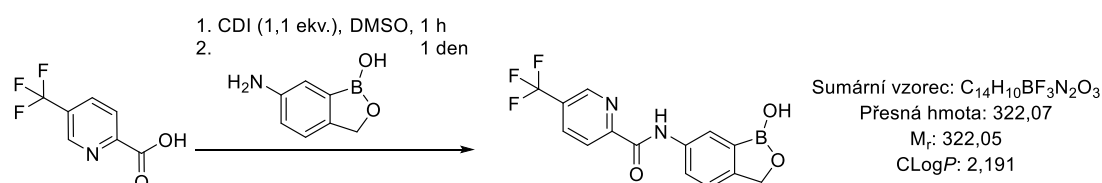
Vypočítaná: C 61,46 %; H 4,36 %; N 11,03 %

Naměřená: C 61,19 %; H 3,99 %; N 10,99 %

MS: [M + H]⁺ = 255,0

6.4.3 N-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-5-(trifluormethyl)pykolinamid (PS-BZX-12)

K přípravě byla použita 5-(trifluormethyl)pyridin-2-karboxylová kyselina (382,22 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 530,8 mg (82 %)

R_f = 0,8 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 20:1 (v/v))

Teplota tání: 188,1–188,9 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3343 (ν O-H), 1682 (δ, C=O), 1531 (δ CONH), 1366 (ν B-O), 978 (ν C-O ether)

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,79 (s, 1H, CONH); 9,24 (s, 1H, OH); 9,10 (m, 1H, PyH); 8,50–8,45 (m, 1H, PyH); 8,34 (m, 1H, PyH); 8,30 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, ArH); 7,86 (dd, *J* = 8,2; 2,0 Hz, 1H, ArH); 7,40 (dd, *J* = 8,2; 0,8 Hz, 1H, ArH); 4,97 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,95; 154,13; 150,38; 145,83; 137,42; 136,31; 131,52; 127,92 (q, *J* = 32,5 Hz, 1C, PyC); 124,37; 123,92 (q, *J* = 273,8 Hz, 1C, CF₃), 123,30; 122,98; 122,11; 70,29

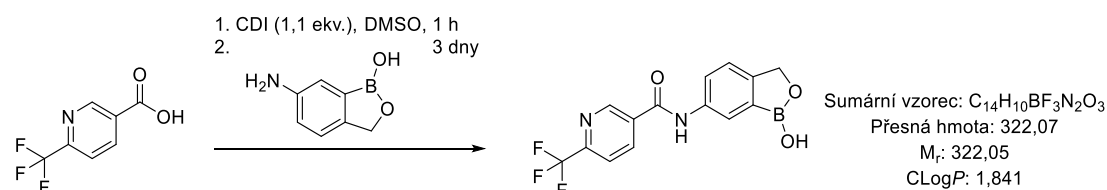
¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 30,36

HPLC čistota: 95,1 %

MS: $[M + H]^+ = 323,1$; $[M - H]^- = 321,0$

6.4.4 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-6-(trifluormethyl)nikotinamid (PS-BZX-19)

K přípravě byla použita 6-(trifluormethyl)nikotinová kyselina (382,22 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 560,7 mg (87 %)

$R_f = 0,3$ (mobilní fáze: $CHCl_3 + CH_3OH$ 20:1 (v/v))

Teplota tání: 227,3–229,4 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm^{-1}): 3298 (ν CONH), 1649 (δ , C=O), 1524 (δ CONH), 1372 (ν B-O), 985 (ν C-O ether)

1H NMR: (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10,67 (s, 1H, CONH); 9,26 (s, 1H, OH); 9,25 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, PyH); 8,57 (dd, $J = 8,1; 2,1$ Hz, 1H, PyH); 8,17 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, ArH); 8,09 (dd, $J = 8,1; 0,9$ Hz, 1H, PyH); 7,78 (dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,43–7,39 (m, 1H, ArH); 4,98 (s, 2H, CH_2)

^{13}C NMR: (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ 163,38; 150,35; 149,85; 148,67 (q, $J = 34,1$ Hz, 1C, PyC); 138,40; 137,88; 134,38; 131,57; 124,13; 122,98; 122,16; 121,95 (q, $J = 273,9$ Hz, 1C, CF_3); 121,14; 70,29

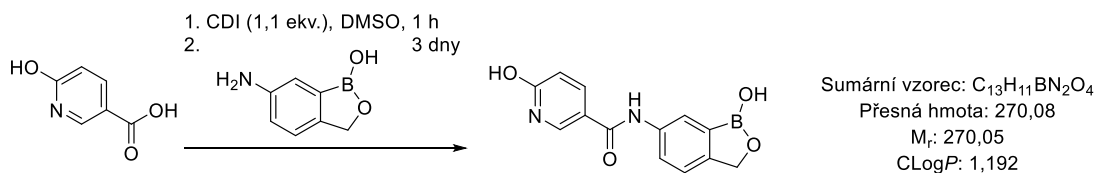
^{11}B NMR: (160 MHz, $DMSO-d_6$) δ 32,24

HPLC čistota: 95,0 %

MS: $[M + H]^+ = 323,1$

6.4.5 6-hydroxy-*N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)nikotinamid (PS-BZX-21)

K přípravě byla použita 6-hydroxynikotinová kyselina (278,22 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 150,0 mg (28 %)

$R_f = 0,9$ (mobilní fáze: $CHCl_3 + CH_3OH$ 5:1 (v/v) + 3 kapky CH_3COOH)

Teplota tání: 304,8–306,9 °C (za rozkladu)

IR spektrum (ATR-Ge, cm^{-1}): 3457 (ν O-H), 3131 (ν C-H arom.), 2918 (ν CH_2), 2868 (NH, laktam), 1662 (δ , C=O), 1556 (δ CONH), 1394 (ν B-O), 1001 (ν C-O ether)

1H NMR: (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12,07 (bs, 1H, OH); 10,00 (s, 1H, CONH); 9,20 (s, 1H, OH); 8,19 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, PyH); 8,07 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,97 (dd, $J = 9,6; 2,7$ Hz, 1H, PyH); 7,69 (dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,35 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, ArH); 6,40 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, PyH); 4,95 (s, 2H, CH_2)

^{13}C NMR: (151 MHz, DMSO- d_6) δ 163,10; 162,90; 149,60; 139,90; 138,52; 138,34; 131,37; 124,09; 122,85; 121,95; 119,69; 113,37; 70,25

^{11}B NMR: (160 MHz, DMSO- d_6) δ 33,55

Elementární analýza:

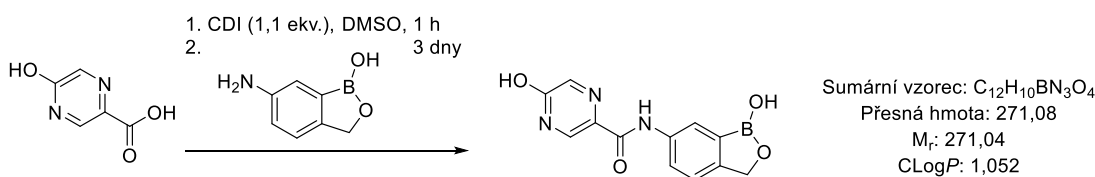
Vypočítaná: C 57,82 %; H 4,11 %; N 10,37 %

Naměřená: C 57,39 %; H 4,35 %; N 9,95 %

MS: $[M + H]^+ = 270,9$

6.4.6 5-hydroxy-*N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)pyrazin-2-karboxamid (PS-BZX-20)

K přípravě byla použita 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina (280,2 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle hnědá pevná látka

Reakční výtěžek: 503,5 mg (93 %)

R_f = 0,6 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 5:1 (v/v))

Teplota tání: 338,3–340,1 °C (za rozkladu)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3357 (ν O-H), 2796 (NH, laktam), 1677 (δ, C=O), 1659 (CO, CONH), 1529 (δ CONH), 1367 (ν B-O), 968 (ν C-O ether)

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,84 (bs, 1H, OH); 10,15 (s, 1H, CONH); 9,18 (bs, 1H, OH); 8,20 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H, ArH); 8,09 (m, 1H, PzH); 8,05–8,01 (m, 1H, PzH); 7,80–7,74 (m, 1H, ArH); 7,37–7,32 (m, 1H, ArH); 4,96–4,93 (m, 2H, CH₂)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,68; 156,80; 149,82; 146,83; 137,77; 131,26; 127,04; 124,21; 122,76; 121,96; 70,26

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 32,73

Elementární analýza:

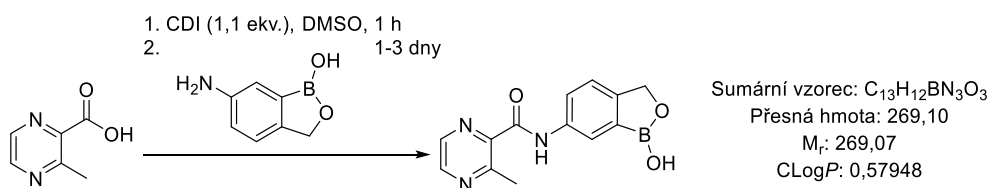
Vypočítaná: C 53,18 %; H 3,72 %; N 15,50 %

Naměřená: C 52,74 %; H 3,45 %; N 15,10 %

MS: [M + H]⁺ = 271,8

6.4.7 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-3-methylpyrazin-2-karboxamid (PS-BZX-7)

Pro přípravu byla použita kyselina 3-methylpyrazin-2-karboxylová kyselina (276,24 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 388,0 mg (72 %)

R_f = 0,7 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 90:10 (v/v))

Teplota tání: 262,9–264,0 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3344 (ν O-H), 3068 (ν C-H arom.), 1683 (δ, C=O), 1525 (δ CONH), 1373 (ν B-O), 978 (ν C-O ether).

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,66 (s, 1H, CONH); 9,24 (bs, 1H, OH); 8,72 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, PzH); 8,60 (dd, $J = 2,5; 0,8$ Hz, 1H, PzH); 8,26 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,76 (dd, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H, ArH); 7,39 (dd, $J = 8,2; 0,9$ Hz, 1H, ArH); 4,96 (s, 2H, CH₂); 2,76 (d, $J = 0,6$ Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,39; 153,49; 150,10; 146,18; 146,12; 141,33; 137,87; 131,54; 123,83; 122,47; 122,15; 70,27; 22,93

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 32,51

Elementární analýza:

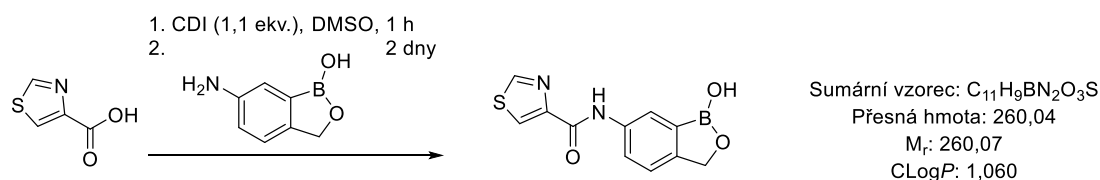
Vypočítaná: C 58,03 %; H 4,5 %; N 15,62 %

Naměřená: C 57,58 %; H 4,22 %; N 15,18 %

MS: [M + H]⁺ = 270,0

6.4.8 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)thiazol-4-karboxamid (PS-BZX-14)

K přípravě byla použita 1,3-thiazol-4-karboxylová kyselina (258,28 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 448,2 mg (86 %)

R_f = 0,4 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 17:3 (v/v))

Teplota tání: 225,7–227,9 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3373 (ν O-H), 3019 (ν C-H arom.), 2918 a 2868 (ν CH₂), 1664 (δ, C=O), 1538 (δ CONH), 1361 (ν B-O), 977 (ν C-O ether)

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,33 (s, 1H, CONH); 9,26 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, ArH); 9,22 (bs, 1H, OH); 8,49 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, TzH); 8,22 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, TzH); 7,80 (dd, $J = 8,2; 2,1$ Hz, 1H, ArH); 7,37 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, ArH); 4,96 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,67; 155,58; 151,33; 149,99; 137,78; 131,42; 125,93; 124,35; 122,96; 122,00; 70,28

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 33,03

Elementární analýza:

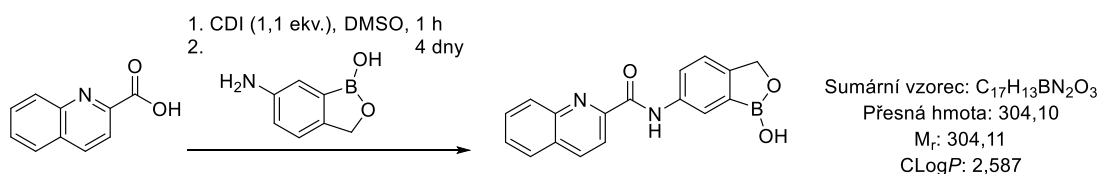
Vypočítaná: C 50,80 %; H 3,49 %; N 10,77 %; S 12,33 %

Naměřená: C 50,45 %; H 3,47 %; N 10,62 %; S 12,48 %

MS: [M + H]⁺ = 260,9; [M - H]⁻ = 259,0

6.4.9 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)chinolin-2-karboxamid (PS-BZX-18)

K přípravě byla použita chinolin-2-karboxylová kyselina (346,34 mg; 2 mmol).



Vzhled: světle žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 539,8 mg (87 %)

R_f = 0,7 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 20:1 (v/v))

Teplota tání: 201,0–203,1 °C

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3355 (ν O-H), 3319 (ν CONH), 1675 (δ, C=O), 1528 (δ CONH), 1361 (ν B-O), 976 (ν C-O ether)

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76 (s, 1H, CONH); 9,26 (bs, 1H, OH); 8,62 (dd, *J* = 8,6; 0,8 Hz, 1H, ArH); 8,34 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, ArH); 8,25 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, ArH); 8,11 (dd, *J* = 8,2; 1,4 Hz, 1H, ArH); 7,95–7,88 (m, 2H, ArH); 7,75 (ddd, *J* = 8,1; 6,8; 1,2 Hz, 1H, ArH); 7,43 (dd, *J* = 8,1; 0,8 Hz, 1H, ArH); 4,99 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,21; 150,69; 150,10; 146,45; 138,74; 137,65; 131,60; 131,21; 129,89; 129,47; 128,88; 128,68; 124,08; 122,69; 122,17; 119,30; 70,33

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 32,53

Elementární analýza:

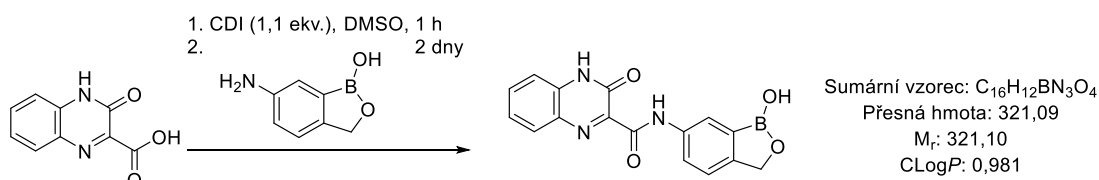
Vypočítaná: C 67,14 %; H 4,31 %; N 9,21 %

Naměřená: C 66,88 %; H 4,04 %; N 9,18 %

MS: [M + H]⁺ = 305,0

6.4.10 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxamid (PS-BZX-13)

K přípravě byla použita 3,4-dihydro-3-oxo-2-chinoxalinkarboxylová kyselina (380,32 mg; 2 mmol).



Vzhled: sytě žlutá pevná látka

Reakční výtěžek: 454,2 mg (71 %)

R_f = 0,2 (mobilní fáze: CHCl₃ + CH₃OH 17:3 (v/v))

Teplota tání: 348,9–350,2 °C (za rozkladu)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3328 (ν O-H), 1706 (δ, C=O), 1550 (δ CONH), 1369 (ν B-O), 973 (ν C-O ether)

¹H NMR: (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,92 (s, 1H, LmH); 11,10 (s, 1H, CONH); 9,28 (s, 1H, OH); 8,12 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, ArH); 7,92–7,87 (m, 1H, ArH); 7,75 (dd, *J* = 8,2; 2,1 Hz, 1H, ArH); 7,68–7,62 (m, 1H, ArH); 7,44–7,37 (m, 3H, ArH); 4,97 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR: (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,06; 154,43; 152,31; 150,11; 137,75; 133,05; 132,52; 131,77; 129,86; 124,58; 123,08; 122,44; 121,90; 116,24; 70,29

¹¹B NMR: (160 MHz, DMSO-*d*₆) δ 31,28

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 59,85 %; H 3,77 %; N 13,09 %

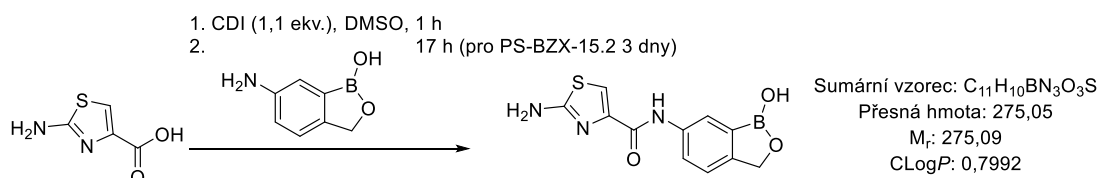
Naměřená: C 59,38 %; H 3,68 %; N 12,73 %

MS: [M + H]⁺ = 322,0

6.5 Neúspěšně syntetizované látky

Následující sloučeniny se nepodařilo připravit v požadované čistotě a v adekvátním množství, i za použití modifikovaných postupů.

6.5.1 2-amino-*N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)thiazol-4-karboxamid (PS-BZX-15)

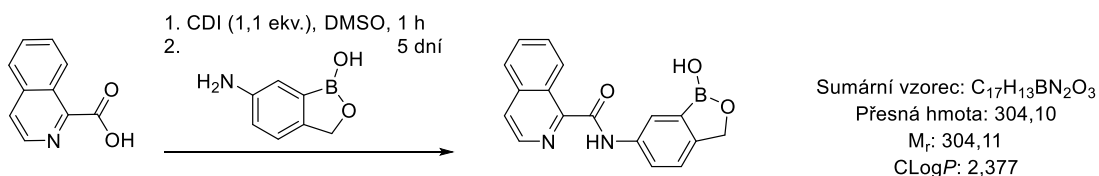


Použité postupy:

Pro syntézu byl použit výše uvedený postup. K přípravě byla použita 2-aminothiazol-4-karboxylová kyselina (navážka 288,3 mg; 2 mmol). Po 17 h od nasazení reakce bylo na TLC chromatogramu (CHCl₃ + CH₃OH 2:1 (v/v)) patrných více skvrn, avšak jedna byla výraznější, proto byla reakce ukončena precipitací přidáním 30 ml destilované vody, po 10 min bylo přidáno 5 ml 1M HCl, dokud nebylo dosaženo slabě kyselé reakce. Po dalších 10 min míchání byl produkt zfiltrován. Na TLC chromatogramu precipitátu byly patrné dvě skvrny, proto byla směs podrobena separaci flash chromatografií za použití originální kolony PF-30SIHP-JP-F0025 (Interchim, Montluçon, Francie) naplněné 25 g silikagelu o velikosti částic 30 μm a isokratické eluce s mobilní fází hexan + ethyl-acetát + methanol 40:55:5 (v/v/v). Bylo získáno 132,9 mg béžově žluté pevné látky (R_f = 0,4). NMR analýza odhalila, že látka není čistá.

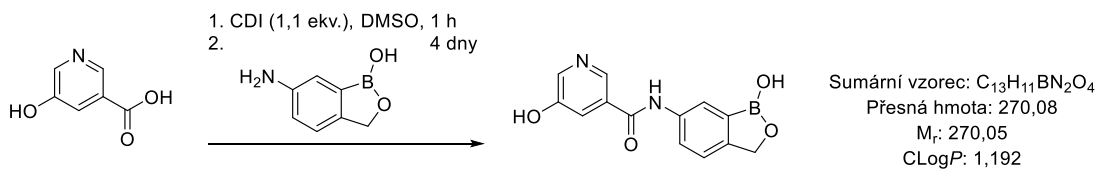
Vzhledem k tomu, že při první syntéze nebyla při zpracování přesně dodržena oblast pH selháním lidského faktoru, byla syntéza provedena podruhé stejným způsobem, avšak byla striktněji dodržena oblast pH (pH bylo zhruba u hodnoty 5) při promývání roztokem HCl a reakční směs nebyla podrobena dělení flash chromatografií. NMR spektrum precipitátu ukázalo nečistoty, proto byl produkt rekrystalizován z DMSO při teplotě 110 °C. Po ochlazení roztoku byl precipitát odsán, a promyt destilovanou vodou. Při TLC analýze precipitátu byla patrna nerozlišená skvrna s chvostem i po zvýšení poměru CH₃OH a NMR analýza opět prokázala přítomnosti nečistot v produktu.

6.5.2 *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)isochinolin-1-karboxamid (PS-BZX-16)



Pro syntézu byl použit výše uvedený postup. Pro přípravu byla použita isochinolin-1-karboxylová kyselina (346,34 mg; 2 mmol). Po 5 dnech od nasazení reakce byly na TLC chromatogramu (CHCl₃ + CH₃OH 20:1 (v/v)) sice mírně patrné výchozí látky, ale precipitace byla přesto provedena přidáním 10 ml 1M vodného roztoku HCl. Filtrací a promytím bylo izolováno 395,2 mg žluté pevné látky. Na TLC chromatogramu produktu bylo patrné minoritní znečištění, avšak NMR analýza potvrdila významnou přítomnost nečistot. Následoval pokus o přečištění flash chromatografií za použití větší kolony PF-30SIHP-JP-F0080 (Interchim, Montluçon, Francie) s 80 g silikagelu o velikosti částic 30 μm a isokratické eluce s mobilní fází hexan + ethyl-acetát + methanol 48:50:2 (v/v/v). Bylo získáno 227,6 mg žluté pevné látky s R_f = 0,7 (CHCl₃ + CH₃OH 20:1 (v/v)). Následná NMR analýza ukázala, že látka není čistá či mohlo dojít k jejímu rozkladu.

6.5.3 5-hydroxy-*N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)nikotinamid (PS-BZX-22)



Pro syntézu byl použit výše uvedený postup s delší reakční dobou 4 dny, protože hydroxylované deriváty pyridinu potřebují podle naší dřívější zkušenosti delší čas na reakci. Pro monitorování reakce pomocí TLC byla použita mobilní fáze složená z CHCl₃ + CH₃OH 10:1 (v/v) s 3 kapkami kyseliny octové. Látka byla precipitována šetrněji nejprve přidáním 30 ml destilované vody a následně 2,5 ml 1M roztoku HCl.

Filtrací bylo získáno 406,0 mg zelenožluté pevné látky a NMR analýza prokázala příměsí v produktu či jeho postupný rozklad.

6.6 *In silico* studie

6.6.1 Molekulový docking

Přípravené látky byly podrobeny dockingové studii v programu MOE (Molecular Operating Environment) v.2022.02 (Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Kanada) s použitím silového pole Amber10:EHT. Jako cíl byly použity krystalografické struktury editující domény LeuRS z databáze Protein Data Bank: mykobakteriální protein PDB ID: 5AGR a lidský protein PDB ID: 2WFD.

Ve struktuře proteinu 5AGR (rozlišení 1,30 Å, R-value free 0,197, R-value work 0,169, Ramachandran outliers 0 %) byl ponechán ligand a molekuly vody v blízkosti aktivního místa, zbylé molekuly vody a ostatní artefakty byly odstraněny. Pomocí funkce Quickprep byl protein strukturně opraven a energeticky minimalizován.

Struktura 2WFD (rozlišení 3,25 Å, hodnota R-value free 0,240, hodnota R-value work 0,202 a Ramachandran outliers 0,4 %) byla dimerem. Po odstranění řetězce B, byly odstraněny také molekuly vody a artefaktů, poté byl protein upraven pomocí funkce Quickprep. V sekvenčním editoru MOE byla za účelem překryvu mykobakteriálního a lidského enzymu vybrána funkce „structure only align“, následovaná funkcí „superpose“.

Pro molekulový docking byla připravena databáze ligandů – aduktů zkoumaných látek s AMP zastupující terminální adenosin tRNA. Z důvodu vzniku chirálního centra při konjugaci AMP s benzoxaboroly, byly připraveny v ChemDraw 20.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA) oba enantiomery a vloženy do databáze. Molekuly byly upraveny funkcí „wash“, protonizovány do preferovaného stavu při pH = 7, byly vypočteny jejich parciální náboje a byly energeticky minimalizovány.

Následoval re-docking původního ligandu do vazebného místa 5AGR metodou templátového dockingu podle AMP s defaultním nastavením metodou „induced fit“, aby byla zachována část molekuly v nejpravděpodobnějším místě vázání.

Dalším krokem byl templátový docking databáze aduktů zkoumaných látek se stejným nastavením do struktury 5AGR. Lidský enzym byl inaktivován a jako templát

byla opět vybrána část molekuly, která představovala AMP. Skóre póz určila funkce GBVI/WSA dG. Počet póz byl nastaven na „placement“ 5 a „refinement“ 2. Generované pózy látek byly seřazeny dle vzrůstajícího skóre S a dle nich i vyhodnoceny s přihlédnutím na hodnoty RMSD.

6.6.2 Predikce drug-like vlastností připravených sloučenin

Na sloučeniny bylo aplikováno pět pravidel posuzujících šanci látky stát se léčivem. K hodnocení byl použit online dostupný software SwissADME⁹⁵ (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Švýcarsko). Prvním pravidlem je Lipinského pravidlo pěti zaměřené na biologickou dostupnost látek po perorálním podání s parametry molární hmotnost do 500 g.mol⁻¹, vypočítaný rozdělovací koeficient log*P* nepřesahující hodnotu 5, přítomnost maximálně 5 donorů vodíkové vazby a maximálně 10 akceptorů vodíkové vazby. Ideální léčivo by nemělo porušit žádné z těchto pravidel, existuje však řada výjimek, například biologická léčiva. Dalším pravidlem je Ghoseovo pravidlo, které říká, že molekula má vlastnosti ideálního léčiva, pokud je její molekulová hmotnost v rozmezí 160 a 480 g.mol⁻¹, log*P* dle Wildmana je v rozmezí -0,4 a 5,6, molární refraktivita látky má hodnotu mezi 40 a 130 m³.mol⁻¹ a sestává z 20 až 70 atomů. Dále bylo posuzováno Veberovo pravidlo, kdy ideální léčivo má maximálně 10 otáčivých vazeb a topologický polární povrch molekuly menší než 140 Å². Eganovo pravidlo pro potenciální léčivo se zakládá na hodnotě log*P* nepřesahující 5,88 a celkový polární povrch molekuly je maximálně 131,6 Å². Pátým posuzovaným pravidlem bylo Mueggeho pravidlo říkající, že molární hmotnost je mezi 200 a 600 g.mol⁻¹, log*P* dle programu XLOGP v rozmezí hodnot -2 až 5, celkový polární povrch molekuly je menší nebo roven 150 Å², počet cyklů ve struktuře je menší či roven 7, počet uhlíků je větší než čtyři, počet heteroatomů je větší než jeden, počet otáčivých vazeb je max. 15, struktura nemá obsahovat více než 10 akceptorů a ne více než 5 donorů vodíkové vazby.

Vždy se jedná o teorii a odhadnutí pravděpodobnosti, že se daná chemická entita bude chovat jako většina léčivých látek a má nějaký potenciál stát se takovou látkou, kdyby překonala všechny klinické fáze testování léčiv.

6.7 Stanovení biologických aktivit připravených látek *in vitro*

6.7.1 Antimykobakteriální aktivita

Připravené látky byly podrobeny screeningu na pěti druzích mykobakterií, přičemž testování zahrnovalo různé kmeny *Mycobacterium tuberculosis*. Testy zajistila Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy pod vedením PharmDr. Ondřeje Jand'ourka, Ph.D. Stanovení aktivit na klinických izolátech a virulentním kmeni *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv proběhlo na Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové pod vedením MUDr. Pavly Paterové, Ph.D.

Antimykobakteriální aktivita syntetizovaných látek byla stanovena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC v $\mu\text{g/ml}$ a následně přepočítány na μM) diluční metodou v mikrotitračních destičkách za použití alamarové modři (ThermoFisher Scientific, USA). Podstatou této metody je redukce modrého resazurinu na fluorescentní růžový resorufin živými organismy. Usmrcením organismu je tato redukce znemožněna. Jedna z neaktivnějších sloučenin, PS-BZX-8.1, byla zkoušena i na klinických izolátech *Mtb*.

6.7.1.1 Stanovení antimykobakteriální aktivity vůči *M. tuberculosis* H37Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. avium* a *M. kansasii*

Pro testování byly použity následující kmeny: *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) zakoupený ze sbírky Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (Antverpy, Belgie), atypické mykobakterie *Mycobacterium avium* DSM 44156 (ATCC 25291) a *Mycobacterium kansasii* DSM 44162 (ATCC 12478), obě z německé sbírky German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, SRN), dále mykolicibakterie *Mycolicibacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) a rychle rostoucí *Mycolicibacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607), rovněž z německé sbírky. Stanovení MIC probíhalo v 96jamkových mikrotitračních destičkách v kultivační médiu Middlebrook 7H9 bujónu (Merck, Darmstadt, SRN) obohaceném o růstový doplněk Middlebrook OADC (Himedia, Bombaj, Indie) a o glycerol (Merck, Darmstadt, Německo). Mikroorganismy byly kultivovány na obohaceném agaru Middlebrook 7H9 a suspenze

bakterií byly připraveny v obohaceném bujónu Middlebrook 7H9, jejich hustota byla upravena na 1,0 dle McFarlandovy stupnice. Poté byly naředěny bujonem v poměru 1:10 pro většinu kmenů, pro rychle rostoucí kmeny v poměru 1:20.

Testované látky rozpuštěné v DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byly přidány k bujónu Middlebrook 7H9 za vytvoření roztoku o koncentraci 2000 µg/ml. Pro porovnání byly MIC stanoveny i u tří antituberkulotik první i druhé linie – isoniazidu (INH), rifampicinu (RIF) a ciprofloxacinu (CIP) (Merck). Pomocí dvojkového ředění a přidáním suspenze mykobakterií byly připraveny výsledné koncentrace látek 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 µg/ml. Výsledná koncentrace DMSO 2,5 % (v/v) neovlivňovala růst mykobakterií. Jako negativní kontrola posloužil roztok bujónu a DMSO, jako pozitivní směs bujónu, DMSO a bakterií.

Destičky s napipetovanými směsmi byly inkubovány ve tmě při 37 °C bez míchání, v případě pomalu rostoucích kmenů byly destičky pevně zakryty polyesterovým adhezivním filmem. Po 48 hodinách inkubace kmenů *M. smegmatis* byl přidán 0,01% roztok sodné soli resazurinu, stejně tak bylo provedeno po 72 h u *M. aurum*, po 96 hodinách u *M. avium* a *M. kansasii* a po 120 hodinách inkubace u *Mtb* H37Ra. Poté následovala další inkubace pro proběhnutí redukce resazurinu. U kmene *M. smegmatis* doba činila 2,5 hodiny, u *M. aurum* 4 hodiny, u *M. avium* i *M. kansasii* 5–6 hodin a 18 hodin u *Mtb* H37Ra. MIC bylo stanoveno dle proběhlé změny zbarvení, kdy fluorescentní růžová indikovala již nepůsobící koncentraci či neaktivní látku, zatímco modrá v poslední jamce v řadě nejnižší účinnou koncentraci látky. Každý experiment byl proveden dvakrát.

6.7.1.2 Stanovení antimykobakteriální aktivity vůči *M. tuberculosis* H37Rv a multi-rezistentním kmenům *M. tuberculosis*

Ke screeningu byl použit virulentní kmen *Mtb* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294) z České národní sbírky typových kultur, Státní zdravotní ústav (Praha, Česká republika). MDR kmeny *Mtb* nesoucí označení IZAK a MATI byly získány z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové. Pro kultivaci těchto kmenů bylo použito bujónu Middlebrook 7H9 o pH 6,6 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) obohaceného o 10% růstový doplněk OADC (Himedia, Bombaj, Indie) a o 0,4% glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a smíchány s bujónem (25 µl roztoku DMSO s 2,475 ml bujónu) a tyto roztoky byly umístěny do jamek mikrotitrační destičky (100 µl). Suspenze kmenů mykobakterií byla připravena v isotonickém roztoku NaCl a její hustota byla upravena na hodnotu 5,0 až 1,0 podle McFarlandovy stupnice. Tyto suspenze byly naředěny na poměr 1:10 a po 100 µl se jimi inokulovaly jamky mikrotitrační destičky. Výsledné koncentrace roztoků testovaných sloučenin v jamkách byly 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 a 1,56 µg/ml. Pozitivní kontrola, kde kolonie viditelně rostly, sestávala z bujónu, mykobakteriální suspenze a DMSO. Jako standard posloužil INH. Po pěti dnech inkubace bylo přidáno 30 µl roztoku alamarové modři (0,02% vodný roztok sodné soli resazurinu a 10% Tweenu 80 v poměru 1:1). Hodnocení výsledků proběhlo po 24 hodinách inkubace. MIC byla stanovena (v µg/ml) jako koncentrace zabraňující přechodu modrého zbarvení na růžové. Každý experiment byl proveden dvakrát.

Citlivost klinických izolátů *Mtb* (Tab. 1) s označením IZAK z bronchiálního aspirátu 63letého pacienta mužského pohlaví z roku 2020 a MATI ze sputa 23letého muže z roku 2021 byla po izolaci stanovena podle kritérií Clinical and Laboratory Standards Institute.

Tabulka 1: Citlivost použitých klinických izolátů *Mtb* vůči vybraným antituberkulotikům

klinický izolát	léčivo	koncentrace (µM)	citlivost
IZAK	streptomycin	6,88	rezistentní
	INH	29,17	rezistentní
	RIF	>9,72	rezistentní
	ethambutol	2,45	citlivý
	pyrazinamid	>129,96	rezistentní
MATI	streptomycin	>27,51	rezistentní
	INH	>58,33	rezistentní
	RIF	>9,72	rezistentní
	ethambutol	2,45	citlivý
	pyrazinamid	>1039,70	rezistentní

6.7.2 Stanovení antibakteriální a antifungální aktivity *in vitro*

Tyto testy byly provedeny na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy pod vedením RNDr. Kláry Konečné, Ph.D.

6.7.2.1 Stanovení antibakteriální aktivity

Pro screening antibakteriální aktivity látek byla použita mírně upravená mikrodiluční bujónová metoda podle Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST)⁹⁶. Látky byly zkoušeny na osmi klinicky významných kmenech bakterií (čtyři gramnegativní a čtyři grampozitivní). Tyto organismy byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) nebo německé sbírky German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSM, Braunschweig, SRN). Jednalo se o bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 4223 (ATCC 29213), methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA) CCM 4750 (ATCC 43300), *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (ATCC 29212), *Escherichia coli* CCM 3954 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* DSM 30007 (ATCC 19606) a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853).

Jako kultivační médium posloužil Mueller-Hintonové bujón (CAMHB, M-H 2 Broth, Merck, Darmstadt, SRN) a kultivace probíhala při 35 ± 2 °C. Testované sloučeniny byly rozpuštěné v DMSO (Merck), finální koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) v kultivačním médiu a neovlivňovala růst bakterií. Negativní růstová kontrola obsahovala směs kultivačního média a DMSO, pozitivní růstová kontrola navíc testované mikroby. Aktivita antimikrobiálních látek byla vyjádřena jako MIC v μM , a byla hodnocena po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a zvlhčené atmosféře při 35 ± 2 °C. Alamarová modř (AlamarBlue™ Cell Viability reagent, ThermoFisher Scientific, USA) byla opět použita jako vizuální indikátor metabolické aktivity živých buněk. Jako porovnávací standardy, pro hodnocení vnitřní kvality této metody, byly použity gentamicin a ciprofloxacin (Merck, Tab. 2). Spektrofotometrická detekce MIC byla vyhodnocena pomocí destičkového spektrofotometru při 530 nm (Synergy™ HTX, BioTek Instruments, Inc., USA).

Tabulka 2: Výsledky kontroly vnitřní kvality metody u screeningu antibakteriální aktivity

standard	ciprofloxacin (μM)		gentamicin (μM)	
	MIC (spektrofotometrická detekce, 530 nm)	MIC (hodnoceno vizuálně)	MIC (spektrofotometrická detekce, 530 nm)	MIC (hodnoceno vizuálně)
<i>S. aureus</i> spp. <i>aureus</i> CCM 4223	0,773	0,386–0,773	2,094	1,047
<i>S. aureus</i> spp. <i>aureus</i> MRSA, CCM 4750	0,386	0,386	>16,751	>16,751
<i>S. epidermidis</i> , CCM 4418	0,773	0,386	0,131	0,131
<i>E. faecalis</i> , CCM 4224	3,090	3,090	>16,751	>16,751
<i>E. coli</i> , CCM 3954	0,024	0,024	2,094	>2,094
<i>K. pneumoniae</i> , CCM 4415	0,193	0,386	1,047	1,047
<i>A. baumannii</i> , DSM 30007	1,545	1,545	16,751	16,751
<i>P. aeruginosa</i> , CCM 3955	1,545	0,773	1,047	1,047

6.7.2.2 Stanovení antifungální aktivity

Pro screening antifungální aktivity byla použita mírně upravená mikrodiluční bujónová metoda dle Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST)^{97, 98}. Pro testování byly vybrány klinicky významné mikroorganismy, čtyři kmeny kvasinek a čtyři kmeny plísni z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) nebo z americké sbírky The American Type Collection Cultures (ATCC, Manassas, VA, USA). Jednalo se o kmeny *Candida albicans* CCM 8320 (ATCC 24433), *Candida krusei* CCM 8271 (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* CCM 8260 (ATCC 22019), *Candida tropicalis* CCM 8264 (ATCC 750), *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Lichtheimia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* CCM 8377 (ATCC 9533).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním kultivačním médiem RPMI 1640, glutaminem a 2% roztokem glukosy pufovaném na pH = 7,0 pomocí 3-morfolinopropan-1-sulfonové kyseliny. Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesahovala 1 % (v/v). Statická inkubace probíhala ve tmě a ve zvlhčené atmosféře při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 24 a 48 h, u *Trichophyton interdigitale* po dobu 72 a 120 hodin. Negativní kontrola se skládala ze směsi kultivačního média a DMSO, kdežto pozitivní kontrola růstu obsahovala navíc mikroorganismy. MIC byla stanovena vizuálně pomocí indikátoru alamarová modř (ThermoFisher Scientific, USA). Amfotericin B (Merck) a vorikonazol (Toronto Research Chemicals, CA) posloužily jako vnitřní standardy. Aktivity standardů (Tab. 3) byly stanoveny spektrofotometricky jako IC₅₀ (u vorikonazolu, nejnižší koncentrace léčiva poskytující inhibici růstu organismu z 50 % vůči kontrole bez léčiva) a IC₉₀

(u amfotericinu B, nejnižší koncentrace léčiva poskytující inhibici růstu organismu z 90 % vůči kontrole bez léčiva) při 530 nm (Synergy™ HTX, BioTek Instruments, Inc., USA). MIC standardů a testovaných látek byly stanoveny vizuálně.

Tabulka 3: Výsledky kontroly vnitřní kvality metody u screeningu antifungální aktivity

standard	amfotericin B (μM)		vorikonazol (μM)	
	IC ₉₀ (spektrofotometrická detekce, 530 nm)	MIC (hodnoceno vizuálně)	IC ₅₀ (spektrofotometrická detekce, 530 nm)	MIC (hodnoceno vizuálně)
<i>C. albicans</i> , CCM 8320	1,082	1,082	0,086	>45,806
<i>C. krusei</i> , CCM 8271	1,082	1,082	0,716	>45,806
<i>C. parapsilosis</i> , CCM 8260	0,541	0,541	0,086	>45,806
<i>C. tropicalis</i> , CCM 8321	1,082	1,082	0,179	>45,806
<i>A. fumigatus</i> , ATCC 204305	4,329	4,329	0,716	2,863
<i>A. flavus</i> , CCM 8363	4,329	4,329	5,726	>45,806
<i>L. corymbifera</i> , CCM 8077	1,082	1,082	>45,806	>45,806
<i>T. interdigitale</i> , CCM 8377	1,082	1,082	2,863	>45,806

6.7.3 Screening cytotoxicity

Testování cytotoxicity provedl na Katedře biofyziky a fyzikální chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy Mgr. Pavel Bárta, Ph.D. Perspektivní látky byly testovány na hepatotoxicitu proti buněčné linii HepG2 lidského hepatocelulárního karcinomu zakoupeného z britské sbírky Health Protection Agency Collections (ECACC, Salisbury, Spojené království). Kultivace proběhla v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium–high glucose) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), doplněném o 1% roztok L-glutaminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10% fetální bovinní sérum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a roztok neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v podmínkách zvlhčené atmosféry obsahující 5 % CO₂ při teplotě 37 °C. Jako kontrola při screeningu sloužily buňky HepG2 bez přidané testované látky.

Buňky byly očkované do 96-jamkové mikrotitrační destičky v hustotě 10 000 buněk na jamku 24 h před testováním. Další den byly buňky vystaveny jednotlivým testovaným látkám rozpuštěným v DMSO. Látky byly naředěny na koncentrace 1–1000 μM podle jejich rozpustnosti. Současně byly připraveny kontroly představující 100% životnost buněk, 0% životnost (buňky ošetřené 10% roztokem DMSO), kontrola bez buněk a kontrola obsahující pouze vehikula. Všechny experimenty byly provedeny v triplicátech. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C v humidní atmosféře s 5 % CO₂ bylo

přidáno činidlo ze soupravy CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96, PROMEGA, Fitchburg, WI, USA). Po dvou hodinách inkubace při 37 °C byla měřena absorbance vzorků při vlnové délce 490 nm (TECAN, Infinita M200, Grödig, Rakousko). Pomocí programu GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) byl ze semilogaritmického grafu závislosti absorbance na procentu absorbance (log (koncentrace) vs. model normalizované odezvy, metoda nejmenších čtverců) vypočten nelineární regresí standardní toxikologický parametr IC_{50} .

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Zhodnocení syntetických postupů

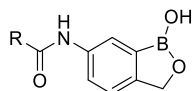
V rámci experimentální části bylo úspěšně syntetizováno deset látek (struktury v Tab. 4), další tři se nepodařilo připravit. Jednalo se o pevné látky se žlutavou barvou. Snadnější detekci produktů na TLC pomohla aplikace ethanolickeho roztoku kurkuminu, který s borem tvoří při zvýšené teplotě červeně zbarvený komplex. Látka PS-BZX-13 (oxo-chinoxalinový substituent) vykazovala schopnost snadného nabití statickou elektřinou, což značně znesnadňovalo manipulaci s ní. Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 28–92 %. Medián výtěžků je 84 %, tedy častěji se jednalo o vyšší výtěžnost reakce.

Vlastnosti výchozího aminobenzoxaborol-hydrochloridu ovlivňovala vzdušná vlhkost. V průběhu vypracovávání této práce byla použita dvě balení různých šarží hydrochloridu a hygroskopicky vázaná vlhkost u déle otevřeného balení zvyšovala potřebný objem DMSO na rozpuštění až dvakrát. Záměrem bylo připravit látku v co nejmenším nutném množství DMSO tak, aby byla usnadněna precipitace vodným roztokem HCl. Dalším důvodem nižšího výtěžku mohlo být proplachování produktu destilovanou vodou, kdy se mohla část precipitátu rozpustit.

Nejrizikovějším krokem syntézy byla tepelná aktivace (hetero)aryl kyseliny s CDI pomocí horkovzdušné pistole, kdy nebyla zcela přesně hlídána teplota v baňce. Pokud byla aplikována vyšší teplota, mohly výchozí látky začít tát. Zde byla potřeba opatrnost a v některých případech k mírnému tání došlo, což mohlo ovlivnit výtěžnost reakce. Na podobném principu jako CDI by mohl fungovat i dicyklohexylkarbodiimid používaný v syntéze peptidů.

Při porovnání vlivu různých okolností reakce na výtěžek reakce jako charakter výchozí kyseliny, celkový objem použitého DMSO nebo natavení směsi kyseliny a CDI při tepelné aktivaci, nebyla pozorována žádná závislost. Nižší výtěžek je možné korelovat pouze s faktem, že nebyl pozorován únik plynu CO₂ při aktivačním kroku u látek PS-BZX-21 a PS-BZX-15. Co však bylo příčinou tohoto jevu, je těžké určit. Optimalizace syntetického postupu ale nebyla cílem této práce. Teoreticky by bylo možné použít k syntéze acylchlorid nebo použít jiné způsoby aktivace.

Tabulka 4: Porovnání výtěžků, celkového množství použitého DMSO, dob trvání reakce a struktur látek



Označení látky	R	výtěžek	objem použitého DMSO celkem [ml]	dobu reakce	poznámka - odchylky od standardního postupu
PS-BZX-17		92%	8	4,5 dne	delší doba reakce
PS-BZX-8.1		80%	7,5	2 dny	
PS-BZX-12		82%	18	1 den	
PS-BZX-19		87%	7,5	3 dny	
PS-BZX-21		28%	10	3 dny	výchozí kyselina se rozpouští v DMSO hůře než ostatní, nebyl indikován vznik bublinek CO ₂ v aktivačním kroku
PS-BZX-20		93%	8	3 dny	
PS-BZX-7		72%	20	1 den	
PS-BZX-14		86%	16	2 dny	ano, aktivační směs mírně natavena
PS-BZX-18		87%	10	4 dny	delší doba reakce
PS-BZX-13		71%	17	2 dny	
PS-BZX-15		neúspěšné	12	17 h	nebyl indikován vznik bublinek CO ₂ v aktivačním kroku, reakce 17 h
PS-BZX-15.2		neúspěšné	9	3 dny	reakce 3 dny, rekrystalizace pro izolaci
PS-BZX-16		neúspěšné	10	5 dní	delší doba reakce
PS-BZX-22		neúspěšné	12	4 dny	delší doba reakce

Flash chromatografie jako čisticí metoda se neosvědčila. Je možné se domnívat, že silikagel způsobuje další rozklad látky. Rekrystalizace jako izolační metoda nebyla použitelná, látky se v teple rozložily ještě ve větším rozsahu, což bylo patrné ze změny barvy produktu.

Látky byly charakterizovány teplotou tání, ¹H-, ¹³C- a ¹¹B-NMR spektry a IČ spektry. Čistota byla ověřena u nefluorovaných látek elementární analýzou a u fluorovaných látek HPLC analýzou.

7.2 Zhodnocení výsledků *in silico studie*

7.2.1 Výsledky templátového dockingu





















Výsledky templátového dockingu s nastaveným módem „induced fit“ do editující domény mykobakteriálního enzymu (PDB ID: 5AGR) by mohly pomoci s interpretací vztahu struktury a účinku. Použitý přístup je založen na předpokladu, že látky působí OBORT mechanismem¹. Databáze připravená k dokování zahrnovala všechny enantiomery (chirální bor) aduktů syntetizovaných látek s AMP. Enantiomer vzniká konjugací s AMP v cytosolu i extracelulárně. Jako mykobakteriální cíl látek byla vybrána krystalografická struktura editující domény LeuRS (PDB ID: 5AGR) pocházející z organismu *Mtb* H37Rv. Domény enzymů 5AGR a lidského analogického enzymu 2WFD byly překryty tak, aby se jejich vazebná místa shodovala a bylo možné porovnávat rozdílný způsob vázání látek, či případnou selektivitu mezi enzymy.

Tabulka 5 představuje výsledky dvaceti póz s nejnižším skórem S, jsou to tedy pózy látek s nejvyšší aktivitou predikovanou virtuálním screeningem. Dále ukazuje hodnoty RMSD, které by měly být co nejnižší. Screening pouze predikuje pózu látky v minimalizované konformaci ve vazebném místě proteinu včetně interakcí s aminokyselinami a počítá skóre, které koreluje s energií uvolněnou při tvorbě komplexu látky s proteinem. Nelze vyvozovat přímou korelaci látky s nejnižším skórem a nejnižší MIC.

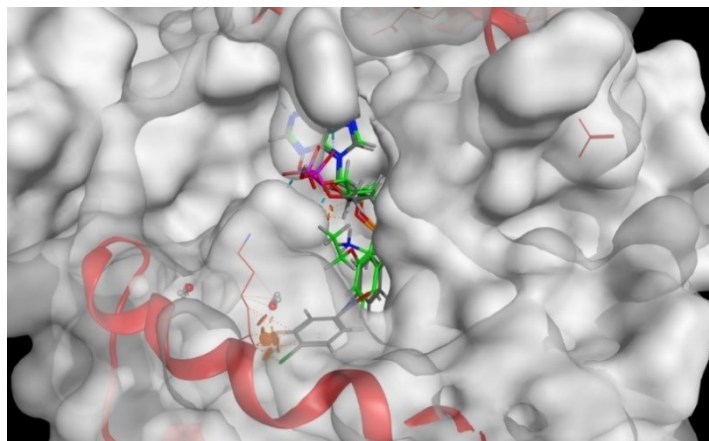
Nemálo zajímavým trendem je ostrý přechod hodnot skóre S mezi adukty s (*R*)-nebo (*S*)-konfigurací na atomu boru. (*R*)-isomery dosahují kladných hodnot skóre, tedy do enzymu se ze sterických důvodů vůbec nevážou, zatímco (*S*)-enantiomery aduktů mají tyto hodnoty záporné, do aktivního místa cestu najdou a tvoří zde interakce.

Při hodnocení byl brán ohled na to, zda látka vůbec měla v oblasti AMP stejné interakce, někdy úplně neodpovídaly póze původního ligandu z krystalografické struktury enzymu.

Tabulka 5: Výsledky 20 póz s nejnižším skórem *S* při induced-fit templátovém dockingu seřazené dle vzrůstajícího skóre *S*

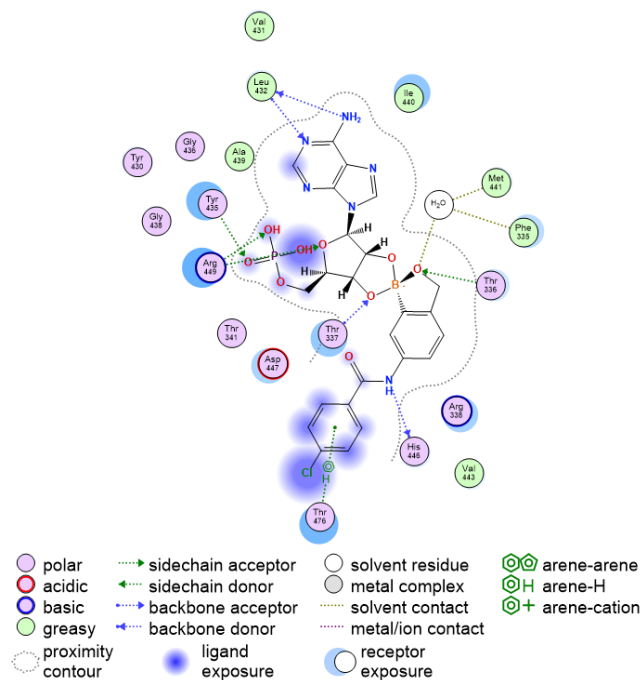
pořadí pózy	označení	substituent	skóre <i>S</i>	RMSD
1	PS-BZX-17		-9,9256	2,7574
2	PS-BZX-20		-9,9133	1,6535
3	PS-BZX-17		-9,8833	2,6000
4	PS-BZX-20		-9,7531	1,1285
5	PS-BZX-18		-9,5417	2,0501
6	PS-BZX-13		-9,5402	2,7663
7	PS-BZX-13		-9,5271	1,9109
8	PS-BZX-18		-9,4565	2,9036
9	PS-BZX-12		-9,4323	3,0549
10	PS-BZX-12		-9,4308	3,2527
11	PS-BZX-8.1		-9,3762	1,6801
12	PS-BZX-8.1		-9,0864	1,5869
13	PS-BZX-21		-9,0493	1,8794
14	PS-BZX-14		-9,0170	2,4933
15	PS-BZX-14		-8,9057	2,0979
16	PS-BZX-21		-8,8628	2,1214
17	PS-BZX-7		-8,7672	2,1462
18	PS-BZX-7		-8,7544	2,4123
19	PS-BZX-19		-8,7444	2,0240
20	PS-BZX-19		-8,6829	2,3351

Nejlepší pózu podle skóre měla látka PS-BZX-17 ($S = -9,9256$). Obrázek 23 ukazuje situování látky do aktivního místa překrytých editujících domén lidské a mykobakteriální LeuRS. Interakce jsou zobrazeny pouze vůči mykobakteriálnímu enzymu. Překrytí společné části molekul, AMP, je dáno templátovým dockinem. Právě sterické překážení (hetero)arylů v acylové části syntetizovaných sloučenin v poloze 6 benzoxaborolu s alfa-helixem lidského enzymu, který není přítomen u mykobakteriálního enzymu, je předpokladem selektivity k mykobakteriálnímu enzymu.



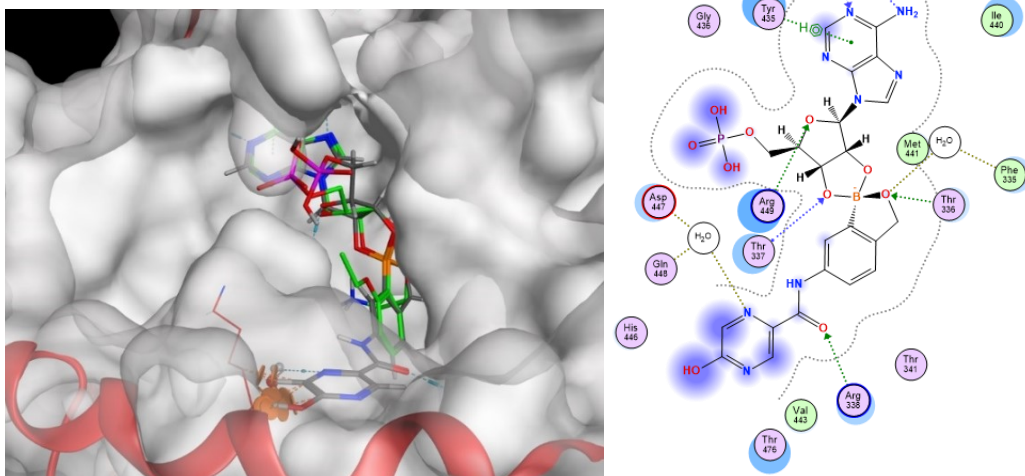
Obrázek 23: Interakce látky PS-BZX-17 v překrytých aktivních místech editující domény LeuRS (PDB ID: 5AGR a 2WFD). Šedě je zobrazena látka PS-BZX-17, zeleně původní ligand po redockingu. Oranžově jsou znázorněny prostorové kolize s alfa-helixem lidského enzymu, který se nevyskytuje u bakteriálního enzymu. Toto platí i pro všechny následující obrázky.

Interakce v části AMP aduktu s benzoxaborolem (Obr. 24) jsou u všech zde uvedených obrázků stejné a zajišťují většinu vazeb s enzymem. Aminokupina adeninu interaguje vodíkovými vazbami s Leu432. Kyslík v oxaborolovém kruhu tvoří vodíkový můstek přes molekulu vody s Met441 a Phe335 a také vodíkový můstek s Thr336. Kyslík v poloze 3' adenosinu tvoří vodíkový můstek také s Thr337. Fosfát u jednotlivých derivátů interaguje proměnlivě, nejčastěji vodíkovým můstkem s Tyr435 a Arg449. Chlorfenylové jádro interaguje s Thr476 π -H vazbou. (Hetero)aryl ovlivňuje, jaké vodíkové můstky se budou formovat na amidové vazbě, u látky PS-BZX-17 se jedná o interakci amidového dusíku s His446.



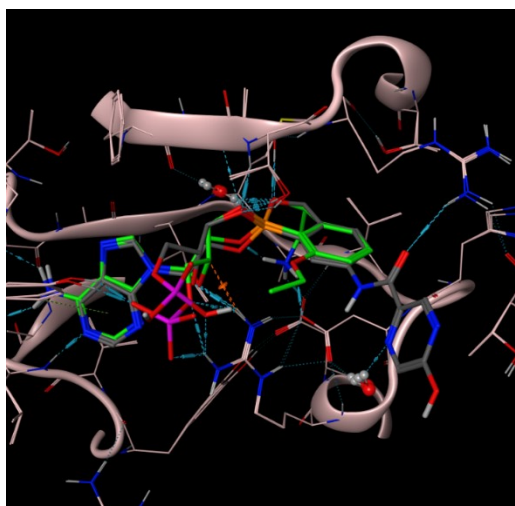
Obrázek 24: 2D interakční diagram látky PS-BZX-17 s enzymem 5AGR

Na obrázku 25 je zobrazena póza látky PS-BZX-20, dle skóre S druhá v pořadí (S = -9,9133). (Hetero)aryl si dle teorie překáží s alfa-helixem lidského enzymu. Překvapující interakcí je vodíkový můstek dusíku přes molekulu vody s Asp447. Interakční diagram látky PS-BZX-20 (Obr. 25) ukazuje, že dusík v *ortho* poloze vůči amidové vazbě interaguje s Asp447 a Gln448 přes molekulu vody vodíkovým můstkem. Tento jev by mohl vést ke zvýšené afinitě, což bude srovnáno dále. Pro změnu oproti póze PS-BZX-17 se v této póze tvoří interakce karbonylového kyslíku amidové vazby s Arg338, namísto dusíku s His446, jako u první pózy. Zřejmě stačí jen minimálně změnit faktory ovlivňující správné natočení amidové vazby. Interakce aren-H nebyla zjištěna. Interakce společné části molekuly se takřka shodují s ostatními, jinou vazbu lze pozorovat u adeninu s tyrosinem, zde je předpokládána aren-H interakce.



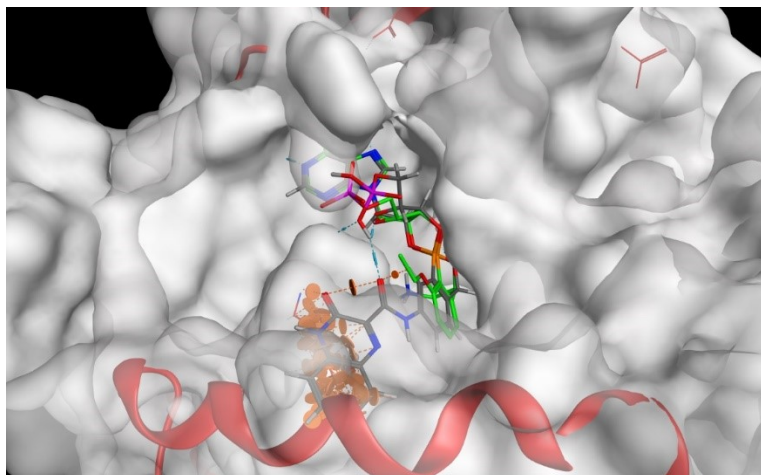
Obrázek 25: Póza PS-BZX-20 v překrytých enzimech 5AGR a 2WFD, vpravo interakční diagram látky PS-BZX-20 v enzymu 5AGR, vysvětlivky jsou na Obr. 24

Další pohled na významně se odlišující interakci onoho dusíku heterocyklu přes molekulu vody poskytuje 3D znázornění pózy látky PS-BZX-20 (Obr. 26).



Obrázek 26: Póza PS-BZX-20 v 5AGR s vodíkovým můstkem jinou perspektivou

Póza 7. v pořadí patří látce PS-BZX-13. Stejná látka má i 6. pózu ve výsledcích, ovšem s vyšší hodnotou RMSD. Na obrázku 27 můžeme vidět větší intenzitu clash interakcí této látky s alfa-helixem lidského enzymu, zcela zřejmě z důvodu přítomnosti bicyklu v acylové části.



Obrázek 27: Póza látky PS-BZX-13 v překrytí enzymů 5AGR a 2WFD

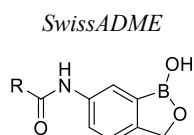
Při porovnání překryvů sekvencí mykobakteriálního enzymu (PDB ID: 5AGR) s lidskými enzymy (PDB ID: 2WFD, 6LPF) byly zjištěny analogické alfa-helixy R²³⁶EKLAEAKEKIYLLKGFYE²⁵³, které jsou obsaženy v blízkosti vazebného místa pouze v lidském enzymu⁹⁹.

Použitá *in silico* metoda v softwaru MOE nezohledňuje farmakokinetické parametry testovaných sloučenin a nelze stavět přímou korelaci výhodných póz s výsledky *in vitro* screeningů, lze však pozorovat jisté faktory preference k vyšší antimikrobiální aktivitě, což bude diskutováno dále.

7.2.2 Zhodnocení predikovaných parametrů připravených látek z hlediska drug-like aspektů

Výsledky získané programem SwissADME uvádí tabulka č. 6. U všech látek byly posuzovány parametry podle pěti pravidel (Lipinského, Ghoseovo, Veberovo, Eganovo a Mueggeho), která hodnotí šanci látek na klinickou úspěšnost.

Tabulka 6: Predikce klinické úspěšnosti látek podle parametrů jednotlivých pravidel (sloupce) dle programu



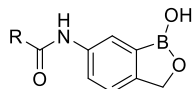
látka	substituent R	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
PS-BZX-17		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-8.1		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-12		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-19		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-21		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-20		splňuje	nesplňuje, WLogP je < -0,4	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-7		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-14		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-18		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje
PS-BZX-13		splňuje	splňuje	splňuje	splňuje	splňuje














Z hlediska počtu donorů a akceptorů vodíkových vazeb, molární hmotnosti, hodnoty $\log P$, celkového polárního povrchu molekuly, počtu atomů, otáčivých vazeb, počtu uhlíků, počtu heteroatomů a počtu cyklů ve struktuře dle jednotlivých kritérií látky pravidla splňují a mají tedy předpoklad mít vlastnosti léčiva. V kapitole 6.8.2 jsou pravidla specifikována. Jednou jedinou výjimkou je látka PS-BZX-20, která nesplňuje Ghoseovo pravidlo, protože má nižší $\log P$ dle Wildmana ($W\log P = -0,69$), než je požadováno, tedy méně než $-0,4$, není tedy dostatečně lipofilní.

7.3 Zhodnocení výsledků antimikrobiálního a cytotoxického screeningu

Většina látek vykázala inhibiční aktivitu vůči *Mtb*, atypickým mykobakteriím a mykolicibakteriím (Tab. 7).

Tabulka 7: Porovnání antimykobakteriální aktivity (MIC) připravených sloučenin se standardy s uvedením vypočítaných hodnot lipofility ($\log P$) a cytotoxické aktivity vůči HepG2 (IC_{50})



Označení látky	R	cLogP	MIC <i>Mtb</i> H37Ra (μM)	MIC <i>Mtb</i> H37Rv (μM)	MIC <i>M. kansasii</i> (μM)	MIC <i>M. avium</i> (μM)	MIC <i>M. aurum</i> (μM)	MIC <i>M. smeg.</i> (μM)	IC ₅₀ HepG2 (μM)
PS-BZX-17		2,52	434,77	43,48	217,39	434,77	13,60	217,39	>1000
PS-BZX-8.1		1,20	61,50	49,20	30,74	61,50	15,39	61,50	>1000
PS-BZX-12		2,19	97,03	9,72	12,14	97,03	24,25	24,25	>100
PS-BZX-19		1,84	194,07	155,26	194,07	388,14	12,14	24,25	>250
PS-BZX-21		1,19	462,88	>370,30	115,72	462,88	115,72	115,72	>1000
PS-BZX-20		1,05	115,30	184,48	115,30	230,59	230,59	57,65	>1000
PS-BZX-7		0,58	>1851,4	92,91	58,07	>1851,4	14,53	14,53	>500
PS-BZX-14		1,06	120,16	96,13	30,03	240,32	15,03	30,03	>1000
PS-BZX-18		2,59	205,52	82,21	205,52	25,68	25,68	25,68	466,70
PS-BZX-13		0,98	>1851,47	>311,43	>1851,47	48,66	24,32	24,32	243,70
INH		-0,67	3,65	2,84	45,57	7291,87	28,51	227,87	na
RIF		2,49	0,01	na	0,06	0,08	0,47	15,19	na
CIP		-0,73	1,51	na	0,75	1,51	0,05	0,19	na
benzoxaborol		1,10	na	55,99*	na	na	na	na	na
aminomethylbenzoxaborol		0,35	na	11,04*	na	na	na	na	na
(S)-3-(aminomethyl)-4-chloro-7-ethoxybenzo[c][1,2]oxaborol-1(3H)-ol		1,65	na	0,08*	na	na	na	na	na

*ref. 40

Nejcitlivějším kmenem k působení připravených sloučenin byl virulentní kmen *Mtb* H37Rv. Tři látky (PS-BZX-17, PS-BZX-8.1 a PS-BZX-12) inhibovaly jeho růst s nižší MIC než nesubstituovaný benzoxaborol. Sloučenina PS-BZX-12 s 5-trifluormethyl-2-pyridylem v acylové části (MIC = 9,72 μM) inhibovala dokonce řádově stejně jako INH (MIC = 2,84 μM) a inhibovala vlastně růst všech testovaných kmenů v řádu desítek μM. Nejvýrazněji inhibovala z celé série také růst *M. kansasii* s MIC = 12,14 μM. Dále látky PS-BZX-7, 14 a 18 byly výrazně aktivnější vůči *Mtb* H37Rv než ostatní. Hydroxylované deriváty nedisponují výraznými aktivitami.

Je zajímavé, že avirulentní kmen nebyl vůči působení látek tak citlivý. Nejaktivnější látkou byl 2-pyridylový derivát PS-BZX-8.1 s MIC = 61,50 μM, nedosáhl ale aktivity standardů.

Nejcitlivějším organismem vůči testovaným látkám byl kmen *M. aurum*. Nejúčinnější látkou byl derivát PS-BZX-19 substituovaný 6-trifluormethyl-3-

pyridylem (MIC = 12,14 μM), ale i většina dalších látek inhibovala jeho růst s MIC v řádu desítek μM , což bylo srovnatelné s aktivitou INH (MIC = 28,51 μM).

Nejnižší MIC při inhibici růstu *M. avium* dosáhla sloučenina PS-BZX-18 s MIC = 25,68 μM .

Nejvyšší aktivitou proti *M. smegmatis* disponuje 3-methylpyrazin-2-ylové agens PS-BZX-7 s MIC = 14,53 μM , avšak většina látek byla poměrně aktivní vůči této mykolicibakterii. Standard RIF dosáhl aktivity MIC = 15,19 μM .

Nejvyšší inhibice růstu *Mtb* H37Rv tedy dosahují 5-trifluormethyl-2-pyridylový derivát PS-BZX-12 (MIC = 9,72 μM), 4-chlorofenylový derivát PS-BZX-17 (MIC = 43,48 μM) a 2-pyridylový derivát PS-BZX-8.1 (MIC = 49,20 μM). Látky PS-BZX-12 a PS-BZX-8.1 prokázaly poměrně výraznou inhibici i ostatních testovaných mykobakterií a mykolicibakterií (vždy MIC < 100 μM), tedy neztrácí u nich svou antimykobakteriální účinnost.

Mezi antimykobakteriální aktivitou sloučenin a jejich vypočítanou lipofilitou (cLogP) nebyla nalezena žádná korelace, z toho vyplývá, že látky působí specificky a při jejich působení bude hrát roli pro vazbu na biologický cíl konkrétní uspořádání funkčních skupin v molekule a v prostoru.





Při porovnání s publikovanými sloučeninami lze konstatovat, že látka PS-BZX-12 má i lehce vyšší aktivitu vůči virulentnímu kmenu *Mtb* než 3-aminomethylbenzoxaborol. (*S*)-3-(aminomethyl)-4-chloro-7-ethoxybenzo[*c*][1,2]oxaborol-1(3*H*)-ol z výzkumu pana Palencia⁴⁰ má však mnohem nižší MIC (Tab. 7). Za zmínku stojí, že se tato sloučenina strukturně velice blíží klinickému kandidátu GSK656, rozdíl je pouze v terminálním hydroxyly na ethylovém řetězci.

Výsledky cytotoxického screeningu ukazují, že látky nepůsobí toxicky na lidské jaterní nádorové buňky ve velké míře. Trifluormethylované deriváty mají nižší hodnoty IC₅₀. Je nutné poznamenat, že testování provázely problémy s rozpustností látek. Předpoklad selektivity látek je výsledky podpořen, testování cytotoxicity na HepG2 se používá standardně jako indikátor potenciální jaterní toxicity. Toxický vliv na další eliminační orgán – ledviny, by mohl být v budoucnu též zkoumán, takto byla zjištěna data pouze na jaterní nádorové buňky.

Prezentovaná série sloučeniny je součástí širší série 19 látek (výběr v Tab. 8) publikované v článku Šlechty et al⁹⁹. Nejvyšší inhibice růstu *Mtb* H37Rv dosáhla látka





z této práce, 5-trifluoromethyl-2-pyridylový derivát PS-BZX-12 (MIC = 9,72 μM). Druhou nejaktivnější látkou byl chinoxalinový derivát označený v publikaci jako sloučenina 17 (MIC = 20,49 μM). Tato látka inhibovala z celé série nejvýrazněji mykolicibakterie (MIC na *M. aurum* i *smegmatis* = 12,82 μM). Třetí nejaktivnější látkou byla sloučenina 5 s 5-chlorpyrazin-2-ylovou substitucí (MIC = 21,59 μM), která byla nejaktivnější vůči kmeni *Mtb* H37Ra (MIC = 26,98 μM). Kmen *M. avium* se ukázal být nejodolnějším z mykobakterií vůči sérii testovaných látek, výrazně aktivní byla látka 4 s 6-chlorpyrazin-2-ylovou substitucí (MIC = 26,98 μM , struktura na Obr. 28), se stejnou MIC inhibovala i růst *M. kansasii*, zatímco 5-chlorpyrazin-2-ylový derivát (látka 5) byl na tyto dva kmene méně aktivní. Nejaktivnější látka PS-BZX-12 inhibovala nejvýrazněji také růst *M. kansasii* (MIC = 12,14 μM). Aminopyrazin-2-ylová substituce v acylové části se pro antimykobakteriální aktivitu neosvědčila.

Tabulka 8: Nejaktivnější látky na *Mtb* H37Rv z publikace Šlechta et al.⁹⁹ mimo látky z této diplomové práce

označení látky publ.	substituent R	MIC <i>Mtb</i> H37Rv (μM)
17		20,49
5		21,59
15		42,59
2		46,46

V sérii látek z publikace⁹⁹ byly celkem čtyři látky včetně PS-BZX-8.1 (pyridinový derivát) testovány na klinických izolátech MDR *Mtb* IZAK a MATI (Tab. 9). Jejich citlivost, resp. rezistence je popsána v kapitole 6.7.1.2. Z testovaných antituberkulotik byl kmen MATI rezistentní vůči INH (MIC > 91,15 μM) a u kmene IZAK měl INH 30násobně vyšší MIC (91,15 μM) nežli u kmene H37Rv. Vybrané čtyři látky ze série inhibovaly růst klinických izolátů bakterií buď stejně jako kmen H37Rv, anebo jen dvojnásobně slaběji. Látky mají unikátní mechanismus účinku a prokázaly inhibici růstu i u rezistentních kmenů.

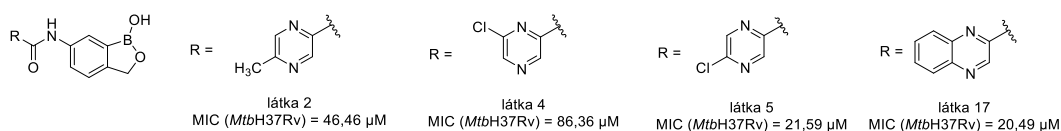
Tabulka 9: Porovnání antimykobakteriální aktivity derivátů PS-BZX-8.1 a dalších látek ze série⁹⁹ (látky 4, 5 a 17) s antituberkulotiky vůči klinickým izolátům IZAK a MATI

Označení látky	Substituen	MIC Mtb H37Rv (μM)	MIC Mtb IZAK (μM)	MIC Mtb MATI (μM)
PS-BZX-8.1 (10)		49,20	98,41	98,41
4		86,36	86,36	86,36
5		21,59	43,18	43,18
17		20,49	40,97	40,97
izoniazid	-	2,84	91,15	>91,15
ciprofloxacín	-	0,6	0,6	0,6
ethambutol	-	1,91	7,64	7,64

Z výsledků antimykobakteriálního screeningu látek (Tab. 7) lze vyvodit vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou vůči kmeni *Mtb* H37Rv. Látky se liší charakterem aromátu v acylové části amidu s 6-aminobenzoxalolem. Na základě porovnání hodnot MIC lze konstatovat, že je výhodnější substituce jedním aromatickým kruhem než bicyckickým aromátem (látky s označením PS-BZX-18 a PS-BZX-13). Šestičlenný aromát se zdá být pro biologickou aktivitu výhodnější než pětičlenný. Z těchto závěrů vybočuje pouze aktivní derivát substituovaný chinoxalinem (Obr. 28) s MIC = 20,49 μM. Porovnáním inhibiční aktivity trifluorpyridylových derivátů (PS-BZX-12 a PS-BZX-19) lze vysledovat pozitivní vliv heterocyklického dusíku v poloze sousedící s amidovou vazbou (*ortho*-poloha). Toto experimentální zjištění může být podpořeno závěry *in silico* studie, že pouze dusík v této poloze (derivát pikolinamidu) může tvořit vodíkový můstek přes molekulu vody s Asp447. Nikotinamidový derivát, s dusíkem v poloze *meta* vůči amidové vazbě, má biologickou aktivitu výrazně nižší. Tento fenomén lze aplikovat i na látky PS-BZX-20 (5-hydroxypyrazin-2-yllová substituce) a PS-BZX-21 (6-hydroxy-3-pyridylový derivát, tedy s fragmentem nikotinamidu). Látka PS-BZX-20 není neaktivnější (MIC na *Mtb* H37Rv = 184,48 μM), ale je výrazně aktivnější než PS-BZX-21 (MIC > 370,30 μM), a to zřejmě díky přítomnosti dusíku v oné *ortho* poloze.

Zajímavé je porovnání aktivit látek PS-BZX-7, tedy 3-methylpyrazin-2-yllový derivát, s látkou 2 (5-methylpyrazin-2-yllový acyl, Obr. 28) ze článku⁹⁹. Methyl v *para* poloze vůči amidové skupině přináší vyšší aktivitu. Látka PS-BZX-7 není však

aktivnější než samotný pyridinový derivát (PS-BZX-8.1). Dále ve stejném článku, u látek 4 (6-chlorpyrazin-2-yl) a 5 (5-chlorpyrazin-2-yl), lze dojít ke stejnému závěru s dusíkem v *ortho* poloze vůči amidové linkerové vazbě. Tento fenomén se uplatňuje i u pyrazinových derivátů, což je možné doložit *in silico* studiemi, o čemž je psáno výše.



Obrázek 28: Antimykobakteriální aktivity vybraných látek ze série z publikace⁹⁹

Preferovanou substitucí na aromatických jádrech derivátů je poloha *para* vůči amidové vazbě, jak dokládají látky PS-BZX-17 a 12. Vyšší aktivitu mají halogenové či halogenmethylové, tedy lipofilní, nežli hydrofilní (hydroxyl) či čistě methylové substituenty.

Zajímavé je ještě porovnat látky tohoto výzkumu s kandidátní látkou na léčbu tuberkulózy s benzoxaborolovou strukturou v klinických studiích známá pod označením GSK656 (ganfeborol, Obr. 14). Dle zdroje³⁹ je její MIC vůči *Mtb H37Rv* 0,08 μM . Taková hodnota je nižší než MIC nejučinnější testované látky této práce PS-BZX-12. Ve struktuře látky GSK656 se nenalézá žádný objemný substituent v poloze 6. V poloze 7 je vázán hydroxyethoxyřetězec a v poloze 3 je vázán (*S*)-aminomethylový substituent.

Výsledky screeningu antimikrobiálních aktivit u bakterií (Tab. 10) nás mohou vést k závěru, že struktura editující domény LeuRS se bude lišit od struktury enzymu u *Mtb*. Roli samozřejmě hrají i struktury bakteriálních membrán a různé další obranné mechanismy cílené proti xenobiotikům.

Při stanovení inhibiční aktivity vůči osmi klinicky významným gram pozitivním a gram negativním bakteriím nebyly nalezeny významně aktivní sloučeniny (Tab. 10). Látky účinkují selektivně vůči acidorezistentním mykobakteriím, zatímco růst ostatních testovaných bakterií příliš neovlivňují.

Hodnoty MIC často přesahují 500 μM , mohlo by to být dáno špatnou rozpustností. Většina látek byla shledána jako neaktivní. Střední aktivita byla zaznamenána u látek PS-BZX-14 a PS-BZX-18 (chinolinový derivát) při inhibici

S. aureus (MIC = 125 μ M) a slabá aktivita při růstu *S. aureus* a MRSA látkami PS-BZX-8.1 a PS-BZX-14 (MIC = 250 μ M). Po 24 h inkubace byl *S. epidermidis* velmi slabě citlivý vůči působení PS-BZX-8.1 a PS-BZX-14. Látky vůbec neinhibovaly gramnegativní bakterie.

Tabulka 10: Antibakteriální aktivita připravených sloučenin (standarty v Tab. 2)

kmen	doba inkubace	MIC (μ M)										
		PS-BZX-17	PS-BZX-8.1	PS-BZX-12	PS-BZX-19	PS-BZX-21	PS-BZX-20	PS-BZX-7	PS-BZX-14	PS-BZX-18	PS-BZX-13	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	24 h	>500	250	>125	>500	>500	>500	>500	>500	125	125	>500
	48 h	>500	250	>125	>500	>500	>500	>500	>500	125	125	>500
methicilin rezistentní <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (MRSA)	24 h	>500	250	>125	>500	>500	>500	>500	>500	250	>125	>500
	48 h	>500	250	>125	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125	>500
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24 h	>500	500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125	>500
	48 h	>500	500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
<i>Enterococcus faecalis</i>	24 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
<i>Escherichia coli</i>	24 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
<i>Acinetobacter baumannii</i>	24 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500
	48 h	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>500

Tabulka 11 poskytuje přehled inhibiční aktivity sloučenin vůči vybraným klinicky významným fungálním organismům, tedy čtyřem kvasinkovým kmenům a čtyřem kmenům vláknitých hub. Testované sloučeniny nevykázaly žádnou biologickou aktivitu. Tímto faktem lze dedukovat, že série připravených derivátů benzoxaborolu má žádoucí selektivní účinek vůči mykolici- a mykobakteriím. To může hrát roli v případných rozvíjejících se mykobakteriálních rezistencích.

Tabulka 11: Antifungální aktivita připravených sloučenin (standardy v Tab. 3)

kmen	doba inkubace	MIC (μM)									
		PS-BZX-17	PS-BZX-8.1	PS-BZX-12	PS-BZX-19	PS-BZX-21	PS-BZX-20	PS-BZX-7	PS-BZX-14	PS-BZX-18	PS-BZX-13
<i>Candida albicans</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Candida krusei</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Candida parapsilosis</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Candida tropicalis</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Aspergillus flavus</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	24 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
<i>Trichophyton interdigitale</i>	72 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125
	120 h	>125	>500	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>125	>125

8 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla úspěšně připravena série deseti amidů 6-aminobenzoxaborolu s (hetero)arylkarboxylovými kyselinami. Dle hledání CAS čísla syntetizovaných sloučenin (SciFinder 24.2.2024) se jednalo o zcela nově připravené látky s jednou výjimkou – látkou s označením PS-BZX-17, s CAS číslem 1222508-98-6. Byla publikována antiprotozoální aktivita vůči *T. b. gambiense* DAL 1402 (IC₅₀ 0,03 µg/ml), nikoli však identifikační charakteristiky v patentu Jacobse R et al¹⁰⁰. Biologická aktivita vůči mykobakteriím nebyla u této látky předtím stanovena. Látky z této práce byly podrobeny *in vitro* screeningu biologických aktivit proti mykobakteriím a mykolicibakteriím, vybraným klinicky významným bakteriím, kvasinkám a vláknitým houbám. U jedné látky byly dokonce stanoveny aktivity na dva klinické izoláty MDR *Mtb*. Dále byla stanovena *in vitro* cytotoxicita látek na HepG2 linii buněk lidského hepatokarcinomu. Rovněž byly *in silico* zkoumány způsoby vazby látek do vazebného místa editační domény mykobakteriální i lidské LeuRS za pomoci templátového dockingu. Na základě všech těchto testů je možné konstatovat, že látky působí selektivně na mykobakterie a mnohem slabší vliv mají na lidské buňky. Byly vyzorovány některé preferované strukturní motivy vedoucí k vyššímu antimykobakteriálnímu účinku. Substituent acylové části amidu je ideálně monocyklický heteroaromát s dusíkem v *ortho* poloze vzhledem ke spojovací amidové vazbě. V *para* poloze vůči amidové vazbě by měl být s výhodou lipofilní substituent jako halogen, či trihalogenmethyl (trifluormethyl). Právě tyto atributy splňuje neaktivnější látka PS-BZX-12 s MIC = 9,72 µM vůči kmeni *Mtb* H37Rv. Všechny testované látky zároveň vykazaly inhibiční účinek pouze vůči mykobakteriím a mykolicibakteriím, ne však vůči jiným bakteriím či fungálním organismům.

Všechny vytyčené cíle této práce byly splněny, s drobnou komplikací přípravy některých látek. Látky s benzoxaborolovým strukturním motivem mohou mít potenciální využití i v terapii atopické dermatitidy, rakoviny, či při léčbě trypanozomiázy. Výsledky této práce byly publikované⁹⁹ v roce 2023 a byly součástí větší série látek. Vzhledem k situaci v oblasti antimikrobiálních látek a všeobecně známé rezistenci bakterií bude vždy vyvíjen tlak na hledání nových antiinfektiv a deriváty benzoxaborolu otevírají jednu ze slibných možných cest. V budoucnu by

mohlo být zajímavé zkombinovat zde vyzorované strukturní motivy s 3-aminomethylem již klinicky testovaného antituberkulotika GSK656, tento přístup by mohl v nadcházejících časech vyřešit i případně vzniklou rezistenci. Otázkou zůstávají farmakokinetické parametry připravených sloučenin, jejich metabolismus a průchod přes několik biologických bariér *in vivo*. Připravená série látek může sloužit pro strukturní modifikace v budoucnu.

9 ZDROJE A POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Rock, F. L.; Mao, W. M.; Yaremchuk, A.; Tukalo, M.; Crepin, T.; Zhou, H. C.; Zhang, Y. K.; Hernandez, V.; Akama, T.; Baker, S. J.; et al. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science* **2007**, *316* (5832), 1759-1761. DOI: 10.1126/science.1142189.
- (2) Salari, N.; Kanjoori, A. H.; Hosseini-Far, A.; Hasheminezhad, R.; Mansouri, K.; Mohammadi, M. Global prevalence of drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty* **2023**, *12* (1). DOI: 10.1186/s40249-023-01107-x.
- (3) Hsu, D.; Irfan, M.; Jabeen, K.; Iqbal, N.; Hasan, R.; Migliori, G. B.; Zumla, A.; Visca, D.; Centis, R.; Tiberi, S. Post tuberculosis treatment infectious complications. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, *92*, S41-S45. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.02.032.
- (4) Houben, R.; Dodd, P. J. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *Plos Medicine* **2016**, *13* (10). DOI: 10.1371/journal.pmed.1002152.
- (5) *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment 2022 update*. World Health Organization, 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240063129> (accessed 2023 17.06.).
- (6) Boshoff, H. I. M.; Warner, D. F.; Gold, B. Editorial: Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2023**, *13*. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1215294.
- (7) Xi, Y.; Zhang, W.; Qiao, R. J.; Tang, J. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Plos One* **2022**, *17* (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0270003.
- (8) *Global Tuberculosis Report 2023*. World Health Organisation, 2023. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1> (accessed 2024 09.04.).
- (9) *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2023 – 2021 data*. European Centre for Disease Prevention and Control and WHO Regional Office for Europe, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/tuberculosis-surveillance-monitoring-2023.pdf> (accessed 2023 21.6.).
- (10) Mandal, S.; Njikan, S.; Kumar, A.; Early, J. V.; Parish, T. The relevance of persists in tuberculosis drug discovery. *Microbiology-Sgm* **2019**, *165* (5), 492-499. DOI: 10.1099/mic.0.000760.
- (11) Bhagwat, A.; Deshpande, A.; Parish, T. How Mycobacterium tuberculosis drug resistance has shaped anti-tubercular drug discovery. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2022**, *12*. DOI: 10.3389/fcimb.2022.974101.
- (12) Goossens, S. N.; Sampson, S. L.; Van Rie, A. Mechanisms of Drug-Induced Tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* **2021**, *34* (1). DOI: 10.1128/cmr.00141-20.
- (13) Zaw, M. T.; Emran, N. A.; Lin, Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Infection and Public Health* **2018**, *11* (5), 605-610. DOI: 10.1016/j.jiph.2018.04.005.

- (14) Seifert, M.; Catanzaro, D.; Catanzaro, A.; Rodwell, T. C. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *Plos One* **2015**, *10* (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0119628.
- (15) Avalos, E.; Catanzaro, D.; Catanzaro, A.; Ganiats, T.; Brodine, S.; Alcaraz, J.; Rodwell, T. Frequency and Geographic Distribution of *gyrA* and *gyrB* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates: A Systematic Review. *Plos One* **2015**, *10* (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0120470.
- (16) Willby, M. J.; Green, K. D.; Gajadeera, C. S.; Hou, C. X.; Tsodikov, O. V.; Posey, J. E.; Garneau-Tsodikova, S. Potent Inhibitors of Acetyltransferase Eis Overcome Kanamycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Acs Chemical Biology* **2016**, *11* (6), 1639-1646. DOI: 10.1021/acschembio.6b00110.
- (17) Khawbung, J. L.; Nath, D.; Chakraborty, S. Drug resistant Tuberculosis: A review. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **2021**, *74*. DOI: 10.1016/j.cimid.2020.101574.
- (18) Khoshnood, S.; Taki, E.; Sadeghifard, N.; Kaviar, V. H.; Haddadi, M. H.; Farshadzadeh, Z.; Kouhsari, E.; Goudarzi, M.; Heidary, M. Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology* **2021**, *12*. DOI: 10.3389/fmicb.2021.717045.
- (19) Rifat, D.; Li, S. Y.; Ioerger, T.; Shah, K.; Lanoix, J. P.; Lee, J.; Bashiri, G.; Sacchettini, J.; Nuermberger, E. Mutations in *fbiD* (Rv2983) as a Novel Determinant of Resistance to Pretomanid and Delamanid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65* (1). DOI: 10.1128/aac.01948-20.
- (20) Machado, D.; Coelho, T. S.; Perdigao, J.; Pereira, C.; Couto, I.; Portugal, I.; Maschmann, R. D.; Ramos, D. F.; von Groll, A.; Rossetti, M. L. R.; et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00711.
- (21) Vondenhoff, G. H. M.; Van Aerschot, A. Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potential antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46* (11), 5227-5236. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.049.
- (22) Khoshnood, S.; Heidary, M.; Asadi, A.; Soleimani, S.; Motahar, M.; Savari, M.; Saki, M.; Abdi, M. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 1809-1818. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.131.
- (23) Hurdle, J. G.; O'Neill, A. J.; Chopra, I. Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49* (12), 4821-4833. DOI: 10.1128/aac.49.12.4821-4833.2005.
- (24) Hernandez, V.; Crepin, T.; Palencia, A.; Cusack, S.; Akama, T.; Baker, S. J.; Bu, W.; Feng, L. S.; Freund, Y. R.; Liu, L.; et al. Discovery of a Novel Class of Boron-Based Antibacterials with Activity against Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (3), 1394-1403. DOI: 10.1128/aac.02058-12.
- (25) Lincecum, T. L.; Tukalo, M.; Yaremchuk, A.; Mursinna, R. S.; Williams, A. M.; Sproat, B. S.; Van Den Eynde, W.; Link, A.; Van Calenbergh, S.; Grotli, M.; et al. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol. Cell* **2003**, *11* (4), 951-963. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00098-4.
- (26) Palencia, A.; Crepin, T.; Vu, M. T.; Lincecum, T. L.; Martinis, S. A.; Cusack, S. Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of

- bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nature Structural & Molecular Biology* **2012**, *19* (7), 677-+. DOI: 10.1038/nsmb.2317.
- (27) Hu, Q. H.; Huang, Q.; Wang, E. D. Crucial role of the C-terminal domain of Mycobacterium tuberculosis leucyl-tRNA synthetase in aminoacylation and editing. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41* (3), 1859-1872. DOI: 10.1093/nar/gks1307.
- (28) Ataide, S. F.; Ibba, M. Small molecules: Big players in the evolution of protein synthesis. *Acs Chemical Biology* **2006**, *1* (5), 285-297. DOI: 10.1021/cb600200k.
- (29) De Ruyscher, D.; Pang, L. P.; Lenders, S. M. G.; Cappoen, D.; Cos, P.; Rozenski, J.; Strelkov, S. V.; Weeks, S. D.; Van Aerschot, A. Synthesis and structure-activity studies of novel anhydrohexitol-based Leucyl-tRNA synthetase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *211*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113021.
- (30) Gudzera, O. I.; Golub, A. G.; Bdzhola, V. G.; Volynets, G. P.; Kovalenko, O. P.; Boyarshin, K. S.; Yaremchuk, A. D.; Protopopov, M. V.; Yarmoluk, S. M.; Tukalo, M. A. Identification of Mycobacterium tuberculosis leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) inhibitors among the derivatives of 5-phenylamino-2H-1,2,4 triazin-3-one. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31*, 201-207. DOI: 10.1080/14756366.2016.1190712.
- (31) Gudzera, O. I.; Golub, A. G.; Bdzhola, V. G.; Volynets, G. P.; Lukashov, S. S.; Kovalenko, O. P.; Kriklivyi, I. A.; Yaremchuk, A. D.; Starosyla, S. A.; Yarmoluk, S. M.; et al. Discovery of potent anti-tuberculosis agents targeting leucyl-tRNA synthetase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24* (5), 1023-1031. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.01.028.
- (32) Kovalenko, O. P.; Volynets, G. P.; Rybak, M. Y.; Starosyla, S. A.; Gudzera, O. I.; Lukashov, S. S.; Bdzhola, V. G.; Yarmoluk, S. M.; Boshoff, H. I.; Tukalo, M. A. Dual-target inhibitors of mycobacterial aminoacyl-tRNA synthetases among N-benzylidene-N'-thiazol-2-yl-hydrazines. *Medchemcomm* **2019**, *10* (12), 2161-2169. DOI: 10.1039/c9md00347a.
- (33) Volynets, G. P.; Usenko, M. O.; Gudzera, O. I.; Starosyla, S. A.; Balanda, A. O.; Syniugin, A. R.; Gorbatiuk, O. B.; Prykhod'ko, A. O.; Bdzhola, V. G.; Yarmoluk, S. M.; et al. Identification of dual-targeted Mycobacterium tuberculosis aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors using machine learning. *Future Medicinal Chemistry* **2022**, *14* (17), 1223-1237. DOI: 10.4155/fmc-2022-0085.
- (34) Alsulaimany, F. A.; Almukadi, H.; Zaberemawi, N. M. O.; Aljuhani, T. A.; Rashidi, O. M.; Albaqami, W. F.; Alghamdi, A. A.; Ahmad, A.; Shaik, N. A.; Banaganapalli, B. Identification of novel mycobacterium tuberculosis leucyl-tRNA synthetase inhibitor using a knowledge-based computational screening approach. *Journal of King Saud University Science* **2022**, *34* (4). DOI: 10.1016/j.jksus.2022.102032.
- (35) Coghi, P. S.; Zhu, Y. H.; Xie, H. M.; Hosmane, N. S.; Zhang, Y. J. Organoboron Compounds: Effective Antibacterial and Antiparasitic Agents. *Molecules* **2021**, *26* (11). DOI: 10.3390/molecules26113309.
- (36) Seiradake, E.; Mao, W.; Hernandez, V.; Baker, S. J.; Plattner, J. J.; Alley, M. R. K.; Cusack, S. Crystal Structures of the Human and Fungal Cytosolic Leucyl-tRNA Synthetase Editing Domains: A Structural Basis for the Rational Design of Antifungal Benzoxaboroles. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *390* (2), 196-207. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.04.073.

- (37) Silva, M. P.; Saraiva, L.; Pinto, M.; Sousa, M. E. Boronic Acids and Their Derivatives in Medicinal Chemistry: Synthesis and Biological Applications. *Molecules* **2020**, *25* (18), Review. DOI: 10.3390/molecules25184323 Scopus.
- (38) Hoffmann, G.; Le Gorrec, M.; Mestdach, E.; Cusack, S.; Salmon, L.; Jensen, M. R.; Palencia, A. Adenosine-Dependent Activation Mechanism of Prodrugs Targeting an Aminoacyl-tRNA Synthetase. *Journal of the American Chemical Society* **2023**. DOI: 10.1021/jacs.2c04808.
- (39) Li, X. F.; Hernandez, V.; Rock, F. L.; Choi, W.; Mak, Y. S. L.; Mohan, M.; Mao, W. M.; Zhou, Y.; Easom, E. E.; Plattner, J. J.; et al. Discovery of a Potent and Specific M-tuberculosis Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor: (S)-3-(Aminomethyl)-4-chloro-7-(2hydroxyethoxy)benzo c 1,2 oxaborol-1(3 H)-ol (GSK656). *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (19), 8011-8026. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00631.
- (40) Palencia, A.; Li, X. F.; Bu, W.; Choi, W.; Ding, C. Z.; Easom, E. E.; Feng, L.; Hernandez, V.; Houston, P.; Liu, L.; et al. Discovery of Novel Oral Protein Synthesis Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis That Target Leucyl-tRNA Synthetase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (10), 6271-6280, Article. DOI: 10.1128/aac.01339-16.
- (41) Gupta, A. K.; Daigle, D. Potential role of tavaborole for the treatment of onychomycosis. *Future Microbiology* **2014**, *9* (11), 1243-1250. DOI: 10.2217/fmb.14.76.
- (42) Sharma, N.; Sharma, D. An upcoming drug for onychomycosis: Tavaborole. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* **2015**, *6* (4), 236-239. DOI: 10.4103/0976-500x.171870.
- (43) Baker, S. J.; Zhang, Y. K.; Akama, T.; Lau, A.; Zhou, H.; Hernandez, V.; Mao, W. M.; Alley, M. R. K.; Sanders, V.; Plattner, J. J. Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (15), 4447-4450. DOI: 10.1021/jm0603724.
- (44) O'Dwyer, K.; Spivak, A. T.; Ingraham, K.; Min, S.; Holmes, D. J.; Jakielaszek, C.; Rittenhouse, S.; Kwan, A. L.; Livi, G. P.; Sathe, G.; et al. Bacterial Resistance to Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor GSK2251052 Develops during Treatment of Complicated Urinary Tract Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59* (1), 289-298. DOI: 10.1128/aac.03774-14.
- (45) Ganapathy, U. S.; Gengenbacher, M.; Dick, T. Epetraborole Is Active against Mycobacterium abscessus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65* (10). DOI: 10.1128/aac.01156-21.
- (46) Kim, T.; Hanh, B. T. B.; Heo, B.; Quang, N.; Park, Y.; Shin, J.; Jeon, S.; Park, J. W.; Samby, K.; Jang, J. A Screening of the MMV Pandemic Response Box Reveals Epetraborole as A New Potent Inhibitor against Mycobacterium abscessus. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (11). DOI: 10.3390/ijms22115936.
- (47) Monteferrante, C. G.; Jirgensons, A.; Varik, V.; Hauryliuk, V.; Goessens, W. H. F.; Hays, J. P. Evaluation of the characteristics of leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) inhibitor AN3365 in combination with different antibiotic classes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2016**, *35* (11), 1857-1864. DOI: 10.1007/s10096-016-2738-1.
- (48) Nguyen, T. Q.; Heo, B. E.; Hanh, B. T. B.; Jeon, S.; Park, Y.; Choudhary, A.; Lee, S. J.; Kim, T. H.; Moon, C.; Min, S. J.; et al. DS86760016, a Leucyl-tRNA

- Synthetase Inhibitor, Is Active against Mycobacterium abscessus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2023**, *67* (6). DOI: 10.1128/aac.01567-22.
- (49) Purnapatre, K. P.; Rao, M.; Pandya, M.; Khanna, A.; Chaira, T.; Bambal, R.; Upadhyay, D. J.; Masudaa, N. In Vitro and In Vivo Activities of DS86760016, a Novel Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor for Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62* (4). DOI: 10.1128/aac.01987-17.
- (50) Hoy, S. M. Crisaborole Ointment 2%: A Review in Mild to Moderate Atopic Dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology* **2017**, *18* (6), 837-843. DOI: 10.1007/s40257-017-0327-4.
- (51) McDowell, L.; Olin, B. Crisaborole: A Novel Nonsteroidal Topical Treatment for Atopic Dermatitis. *Journal of Pharmacy Technology* **2019**, *35* (4), 172-178. DOI: 10.1177/8755122519844507.
- (52) Kumeso, V. K. B.; Kalonji, W. M.; Rembry, S.; Mordt, O. V.; Tete, D. N.; Pretre, A.; Delhomme, S.; Kyhi, M. I. W.; Camara, M.; Catusse, J.; et al. Efficacy and safety of acoziborole in patients with human African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a multicentre, open-label, single-arm, phase 2/3 trial. *Lancet Infectious Diseases* **2023**, *23* (4), 463-470. DOI: 10.1016/s1473-3099(22)00660.
- (53) Wring, S.; Gaukel, E.; Nare, B.; Jacobs, R.; Bacchi, C.; Beaudet, B.; Bowling, T.; Chen, D. T.; Freund, Y.; Jenks, M.; et al. DEVELOPMENT OF PK-PD MODELS TO PREDICT THE THERAPEUTIC DOSE AND CNS DISPOSITION OF SCYX-7158 IN THE TREATMENT OF STAGE 2 HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2010**, *83* (5), 204-204.
- (54) Dong, W. Z.; Li, S. S.; Wen, S. A.; Jing, W.; Shi, J.; Ma, Y. F.; Huo, F. M.; Gao, F.; Pang, Y.; Lu, J. In Vitro Susceptibility Testing of GSK656 against Mycobacterium Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2020**, *64* (2). DOI: 10.1128/aac.01577-19.
- (55) Tenero, D.; Derimanov, G.; Carlton, A.; Tonkyn, J.; Davies, M.; Cozens, S.; Gresham, S.; Gaudion, A.; Puri, A.; Muliaditan, M.; et al. First-Time-in-Human Study and Prediction of Early Bactericidal Activity for GSK3036656, a Potent Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor for Tuberculosis Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63* (8). DOI: 10.1128/aac.00240-19.
- (56) Jinna, S.; Finch, J. Spotlight on tavaborole for the treatment of onychomycosis. *Drug Design Development and Therapy* **2015**, *9*, 6185-6190. DOI: 10.2147/dddt.s81944.
- (57) Mao, W. M.; Seiradake, E.; Cusack, S.; Crepin, T.; Zhu, Y. AN2718 has broad spectrum antifungal activity necessary for the topical treatment of skin and nail fungal infections. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2009**, *60* (3), AB116-AB116.
- (58) Mereddy, G. R.; Chakradhar, A.; Rutkoski, R. M.; Jonnalagadda, S. C. Benzoboroxoles: Synthesis and applications in medicinal chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry* **2018**, *865*, 12-22. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2018.03.017.
- (59) Adamczyk-Wozniak, A.; Tarkowska, M.; Lazar, Z.; Kaczorowska, E.; Madura, I. D.; Dabrowska, A. M.; Lipok, J.; Wieczorek, D. Synthesis, structure, properties and antimicrobial activity of para trifluoromethyl phenylboronic derivatives. *Bioorganic Chemistry* **2022**, *119*. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105560.

- (60) Vjecha, M. J.; Tiberi, S.; Zumla, A. Accelerating the development of therapeutic strategies for drug-resistant tuberculosis. *Nature Reviews Drug Discovery* **2018**, *17* (9), 607-608. DOI: 10.1038/nrd.2018.28.
- (61) *Ganfeborole (GSK3036656)*. The Working Group for New TB Drugs, 2023. <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/ganfeborole-gsk-3036656> (accessed 2023 11.09.2023).
- (62) Patel, N.; O'Malley, T.; Zhang, Y. K.; Xia, Y.; Sunde, B.; Flint, L.; Korkegian, A.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J.; Alley, M. R. K.; et al. A Novel 6-Benzyl Ether Benzoxaborole Is Active against Mycobacterium tuberculosis In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**, *61* (9). DOI: 10.1128/aac.01205-17.
- (63) Korkegian, A.; O'Malley, T.; Xia, Y.; Zhou, Y. S.; Carter, D. S.; Sunde, B.; Flint, L.; Thompson, D.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J.; et al. The 7-phenyl benzoxaborole series is active against Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* **2018**, *108*, 96-98. DOI: 10.1016/j.tube.2017.11.003.
- (64) Guy, C. S.; Murray, K.; Gibson, M. I.; Fullam, E. Dimeric benzoboroxoles for targeted activity against Mycobacterium tuberculosis. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2019**, *17* (43), 9524-9528. DOI: 10.1039/c9ob02222h.
- (65) Moreira, W.; Santhanakrishnan, S.; Ngan, G. J. Y.; Low, C. B.; Sangthongpitag, K.; Poulsen, A.; Dymock, B. W.; Dick, T. Towards Selective Mycobacterial ClpP1P2 Inhibitors with Reduced Activity against the Human Proteasome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2017**, *61* (5). DOI: 10.1128/aac.02307-16.
- (66) Xia, Y.; Zhou, Y.; Carter, D. S.; McNeil, M. B.; Choi, W.; Halladay, J.; Berry, P. W.; Mao, W. M.; Hernandez, V.; O'Malley, T.; et al. Discovery of a cofactor-independent inhibitor of Mycobacterium tuberculosis InhA. *Life Science Alliance* **2018**, *1* (3). DOI: 10.26508/lsa.201800025.
- (67) Kanichar, D.; Roppiyakuda, L.; Kosmowska, E.; Faust, M. A.; Tran, K. P.; Chow, F.; Buglo, E.; Groziak, M. P.; Sarina, E. A.; Olmstead, M. M.; et al. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Structurally Complex 2-Acylated 2,3,1-Benzodiazaborines and Related Compounds. *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11* (9), 1381-1397. DOI: 10.1002/cbdv.201400007.
- (68) Moreira, W.; Aziz, D. B.; Dick, T. Boromycin Kills Mycobacterial Persisters without Detectable Resistance. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00199.
- (69) Wu, W. Y.; He, S. Y.; Li, A. Q.; Guo, Q.; Tan, Z. L.; Liu, S. C.; Wang, X. H.; Zhang, Z. M.; Li, B.; Chu, H. Q. A Novel Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor, MRX-6038, Expresses Anti-Mycobacterium abscessus Activity In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2022**, *66* (9). DOI: 10.1128/aac.00601-22.
- (70) Ganapathy, U. S.; del Rio, R. G.; Cacho-Izquierdo, M.; Ortega, F.; Lelievre, J.; Barros-Aguirre, D.; Lindman, M.; Dartois, V.; Gengenbacher, M.; Dick, T. A Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor with Broad-Spectrum Antimycobacterial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2021**, *65* (5). DOI: 10.1128/aac.02420-20.
- (71) Nare, B.; Wring, S.; Bacchi, C.; Beaudet, B.; Bowling, T.; Brun, R.; Chen, D. T.; Ding, C.; Freund, Y.; Gaukel, E.; et al. Discovery of Novel Orally Bioavailable Oxaborole 6-Carboxamides That Demonstrate Cure in a Murine Model of Late-Stage Central Nervous System African Trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54* (10), 4379-4388. DOI: 10.1128/aac.00498-10.
- (72) Jacobs, R. T.; Nare, B.; Wring, S. A.; Orr, M. D.; Chen, D.; Sligar, J. M.; Jenks, M. X.; Noe, R. A.; Bowling, T. S.; Mercer, L. T.; et al. SCYX-7158, an Orally-Active

- Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2011**, *5* (6). DOI: 10.1371/journal.pntd.0001151.
- (73) Qiao, Z. T.; Wang, Q.; Zhang, F. L.; Wang, Z. L.; Bowling, T.; Nare, B.; Jacobs, R. T.; Zhang, J.; Ding, D. Z.; Liu, Y. G.; et al. Chalcone-Benzoxaborole Hybrid Molecules as Potent Antitrypanosomal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (7), 3553-3557. DOI: 10.1021/jm2012408.
- (74) Wu, P. H.; Zhang, J.; Meng, Q. Q.; Nare, B.; Jacobs, R. T.; Zhou, H. C. Novel pyrrolobenzoxaboroles: Design, synthesis, and biological evaluation against *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *81*, 59-75. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.04.079.
- (75) Gumbo, M.; Beteck, R. M.; Mandizvo, T.; Seldon, R.; Warner, D. F.; Hoppe, H. C.; Isaacs, M.; Laming, D.; Tam, C. C.; Cheng, L. W.; et al. Cinnamoyl-Oxaborole Amides: Synthesis and Their in Vitro Biological Activity. *Molecules* **2018**, *23* (8). DOI: 10.3390/molecules23082038.
- (76) Ding, D. Z.; Meng, Q. Q.; Gao, G. W.; Zhao, Y. X.; Wang, Q.; Nare, B.; Jacobs, R.; Rock, F.; Alley, M. R. K.; Plattner, J. J.; et al. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship of *Trypanosoma brucei* Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitors as Antitrypanosomal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (5), 1276-1287. DOI: 10.1021/jm101225g.
- (77) Jacobs, R. T.; Plattner, J. J.; Keenan, M. Boron-based drugs as antiprotozoals. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2011**, *24* (6), 586-592. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32834c630e.
- (78) Sonoiki, E.; Ng, C. L.; Lee, M. C. S.; Guo, D. H.; Zhang, Y. K.; Zhou, Y.; Alley, M. R. K.; Ah Yong, V.; Sanz, L. M.; Lafuente-Monasterio, M. J.; et al. A potent antimalarial benzoxaborole targets a *Plasmodium falciparum* cleavage and polyadenylation specificity factor homologue. *Nature Communications* **2017**, *8*. DOI: 10.1038/ncomms14574.
- (79) Zhang, Y. K.; Plattner, J. J.; Easom, E. E.; Jacobs, R. T.; Guo, D. H.; Sanders, V.; Freund, Y. R.; Campo, B.; Rosenthal, P. J.; Bu, W.; et al. Benzoxaborole Antimalarial Agents. Part 4. Discovery of Potent 6-(2-(Alkoxy carbonyl)pyrazinyl-5-oxy)-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaboroles. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (13), 5344-5354. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00678.
- (80) Zhang, Y. K.; Plattner, J. J.; Easom, E. E.; Jacobs, R. T.; Guo, D. H.; Freund, Y. R.; Berry, P.; Ciaravino, V.; Erve, J. C. L.; Rosenthal, P. J.; et al. Benzoxaborole Antimalarial Agents. Part 5. Lead Optimization of Novel Amide Pyrazinyloxy Benzoxaboroles and Identification of a Preclinical Candidate. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (13), 5889-5908, Article. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00621.
- (81) Bellini, V.; Swale, C.; Brenier-Pinchart, M. P.; Pezier, T.; Georgeault, S.; Laurent, F.; Hakimi, M. A.; Bougdour, A. Target Identification of an Antimalarial Oxaborole Identifies AN13762 as an Alternative Chemotype for Targeting CPSF3 in Apicomplexan Parasites. *IScience* **2020**, *23* (12). DOI: 10.1016/j.isci.2020.101871.
- (82) Sonoiki, E.; Palencia, A.; Guo, D. H.; Ah Yong, V.; Dong, C.; Li, X. F.; Hernandez, V. S.; Zhang, Y. K.; Choi, W.; Gut, J.; et al. Antimalarial Benzoxaboroles Target *Plasmodium falciparum* Leucyl-tRNA Synthetase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (8), 4886-4895. DOI: 10.1128/aac.00820-16.
- (83) Nocentini, A.; Cadoni, R.; Dumy, P.; Supuran, C. T.; Winum, J. Y. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* chagasi are inhibited

- by benzoxaboroles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2017**, *33* (1), 286-289. DOI: 10.1080/14756366.2017.1414808.
- (84) Van Bocxlaer, K.; Gaukel, E.; Hauser, D.; Park, S. H.; Schock, S.; Yardley, V.; Randolph, R.; Plattner, J. J.; Merchant, T.; Croft, S. L.; et al. Topical Treatment for Cutaneous Leishmaniasis: Dermato-Pharmacokinetic Lead Optimization of Benzoxaboroles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62* (5). DOI: 10.1128/aac.02419-17.
- (85) Zeniskova, K.; Mach, J.; Arbon, D.; Stursa, J.; Werner, L.; Zoltner, M.; Sutak, R. The 4-Aminomethylphenoxy-Benzoxaborole AN3057 as a Potential Treatment Option for Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2023**, *67* (2). DOI: 10.1128/aac.01506-22.
- (86) Palencia, A.; Liu, R. J.; Lukarska, M.; Gut, J.; Bougdour, A.; Touquet, B.; Wang, E. D.; Li, X. F.; Alley, M. R. K.; Freund, Y. R.; et al. Cryptosporidium and Toxoplasma Parasites Are Inhibited by a Benzoxaborole Targeting Leucyl-tRNA Synthetase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (10), 5817-5827. DOI: 10.1128/aac.00873-16.
- (87) Jacobs, R. T.; Lunde, C. S.; Freund, Y. R.; Hernandez, V.; Li, X. F.; Xia, Y.; Carter, D. S.; Berry, P. W.; Halladay, J.; Rock, F.; et al. Boron-Pleuromutilins as Anti-Wolbachia Agents with Potential for Treatment of Onchocerciasis and Lymphatic Filariasis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62* (5), 2521-2540. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01854.
- (88) Han, M. J.; Pan, M. M.; Xiao, G. H.; Yuan, Y.; Chen, S. W.; Zou, Z. Y. Assessing Boron-Pleuromutilin AN11251 for the Development of Antibacterial Agents. *Molecules* **2023**, *28* (12). DOI: 10.3390/molecules28124628.
- (89) Crocetti, L.; Floresta, G.; Cilibrizzi, A.; Giovannoni, M. P. An Overview of PDE4 Inhibitors in Clinical Trials: 2010 to Early 2022. *Molecules* **2022**, *27* (15). DOI: 10.3390/molecules27154964.
- (90) Akama, T.; Baker, S. J.; Zhang, Y. K.; Hernandez, V.; Zhou, H. C.; Sanders, V.; Freund, Y.; Kimura, R.; Maples, K. R.; Plattner, J. J. Discovery and structure-activity study of a novel benzoxaborole anti-inflammatory agent (AN2728) for the potential topical treatment of psoriasis and atopic dermatitis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (8), 2129-2132. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.03.007.
- (91) Paton, D. M. Crisaborole: Phosphodiesterase inhibitor for treatment of atopic dermatitis. *Drugs of Today* **2017**, *53* (4), 239-245. DOI: 10.1358/dot.2017.53.4.2604174.
- (92) Dong, C.; Virtucio, C.; Zemska, O.; Baltazar, G.; Zhou, Y.; Baia, D.; Jones-Iatauro, S.; Sexton, H.; Martin, S.; Dee, J.; et al. Treatment of Skin Inflammation with Benzoxaborole Phosphodiesterase Inhibitors: Selectivity, Cellular Activity, and Effect on Cytokines Associated with Skin Inflammation and Skin Architecture Changes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2016**, *358* (3), 413-422. DOI: 10.1124/jpet.116.232819.
- (93) Chu, Z. X.; Xu, Q. L.; Zhu, Q. H.; Ma, X. D.; Mo, J. J.; Lin, G. F.; Zhao, Y.; Gu, Y. F.; Bian, L. C.; Shao, L.; et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel benzoxaborole derivatives as potent PDE4 inhibitors for topical treatment of atopic dermatitis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *213*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113171.
- (94) Siengalewicz, P.; Mulzer, J.; Rinner, U. Comprehensive

Organic Synthesis. second ed.; Elsevier, 2014; pp 355-410. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097742-3.00612-1>.

(95) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* **2017**, *7*. DOI: 10.1038/srep42717.

(96) Hasselmann, C.; European Soc Clinical, M. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* **2003**, *9* (8).

(97) Arendrup, M. C.; Meletiadis, J.; Mouton, J. W.; Lagrou, K.; Hamal, P.; Guinea, J. *EUCAST*

DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 7.3.1. Method for the Determination of Broth Dilution

Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts. AFST-EUCAST, 2017.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf (accessed 2023 15.03.).

(98) Arendrup; C, M.; Meletiadis, J.; Mouton, J. W.; Lagrou, K.; Hamal, P.; Guinea, J. *EUCAST*

DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1. Method for the Determination of Broth Dilution

Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Conidia Forming Moulds. AFST-EUCAST, 2017.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing_definitive.pdf (accessed 2023 15.03.).

(99) Slechta, P.; Needle, A. A.; Jand'ourek, O.; Paterova, P.; Konecna, K.; Barta, P.; Kunes, J.; Kubicek, V.; Dolezal, M.; Kucerova-Chlupacova, M. Design, Synthesis and Antimicrobial Evaluation of New N-(1-Hydroxy-1,3-dihydrobenzo c 1,2 oxaborol-6-yl)(hetero)aryl-2-carbox amides as Potential Inhibitors of Mycobacterial Leucyl-tRNA Synthetase. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (3). DOI: 10.3390/ijms24032951.

(100) Jacobs, R.; Orr, M.; Wring, S.; Chen, D.; Zhou, H.; Ding, D.; Feng, Y.; Ye, L.; Hernandez, V. S.; Zhang, Y.-K.; et al. Boron-containing small molecules as anti-protozoal agents. WO2010045503, CAplus AN 2010:500932, 2010.