

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Hybridizace jako přístup při objevování nových antiinvazivních léčiv

Disertační práce

(Komentář k publikovaným pracím)

PharmDr. Petr Šlechta

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

Konzultant: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením svého školitele a konzultantky). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

PharmDr. Petr Šlechta

V Hradci Králové dne

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval zejména své konzultantce PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. a školiteli prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady v průběhu vypracovávání této disertační práce.

Dále bych rád poděkoval:

- PharmDr. Ondřejovi Jandourkovi, Ph.D., RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. a Idě Dufkové z Katedry biologických a lékařských věd za hodnocení antimykobakteriální (OJ), antibakteriální a antifungální aktivity (KK, ID).
- MUDr. Pavle Paterové, Ph.D. z Fakultní nemocnice v Hradci Králové za hodnocení antimykobakteriální aktivity na infekčních a rezistentních kmenech *Mycobacterium tuberculosis*.
- Mgr. Pavlovi Bártovi, Ph.D. a Ing. Vladimíru Kubičkovi, CSc. z Katedry biofyziky a fyzikální chemie za měření cytotoxicity (PB) a stanovování čistoty pomocí HPLC (VK).
- Mgr. Bc. Romanu Vitákovi z Ústavu farmakologie a toxikologie, Lékařské fakulty UK v Plzni za měření cytotoxicity na androgen-dependentních nádorových liniích a jeho školiteli prof. PharmDr. Radku Kučerovi, Ph.D. za zprostředkování této spolupráce.
- Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. z Katedry organické a bioorganické chemie za měření a konzultace nad interpretacemi NMR spekter.
- Mgr. Marku Kerdovi, Ghadě Bouz, Ph.D. a Mgr. Michalu Kadaníkovi za pomoc s praktickou prací v laboratoři a konzultace syntetických problémů.
- Všem diplomantům/diplomantkám a rigorozantkám, kteří svou prací přispěli k syntéze diskutovaných látek, jmenovitě Kateřině Koucké, Adamu Anthony Needlovi, Monice Berkové, Mgr. Dianě Žďárové a Mgr. Andree Petříkové.
- Nakonec bych rád poděkoval všem ostatním kolegům a laborantkám z Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, kteří přispěli k vytvoření této práce.

Tato disertační práce byla finančně podpořena následujícími projekty a granty:

- SVV 260 666
- Ministerstvo zdravotnictví ČR, grant č. NU21-05-00482

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Školící pracoviště:	Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Doktorský studijní program:	Farmaceutická chemie
Kandidát:	PharmDr. Petr Šlechta
Školitel:	prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Konzultantka:	PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.
Název disertační práce:	Hybridizace jako přístup při objevování nových antiinvazivních léčiv

Celosvětově vzrůstající rozvoj rezistence infekčních onemocnění spolu se vzrůstajícím počtem pacientů diagnostikovaných s různými druhy rakoviny tvoří základní výzvy v oblasti medicínální chemie a vytváří tak potřebu neustálého vývoje nových účinných molekul.

Předložená disertační práce se v teoretické části zabývá hybridizací molekul jako nástrojem při objevování nových léčiv, kategorizuje hybridní sloučeniny podle jejich složení do několika skupin a uvádí příklady úspěšných hybridů jak registrovaných, tak pouze experimentálních. Dále se zaměřuje na organické sloučeniny boru, přesněji boronové kyseliny, definuje jejich vlastnosti a diskutuje možnosti jejich použití v oblasti farmaceutické chemie s uvedením preklinicky a klinicky významných molekul. V praktické části následuje komentář shrnující chemické postupy, biologické a počítačové metody použité v experimentální části práce. Dále jsou komentovány publikované práce, které ve většině případů vychází z konceptu hybridních sloučenin a jsou prezentovány jejich antimykobakteriální, antibakteriální a antiproliferativní účinky s tím, že je kladen zvláštní důkaz na definování vztahů mezi strukturou a účinkem. Část z komentovaných publikací pak ukazuje možnosti využití unikátních fyzikálně chemických vlastností boru při navrhování nových sloučenin. Nejméně aktivní sloučeniny dosáhly hodnot MIC = 2,6–21,59 μM při působení na *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Perspektivní kandidáti byli testováni na klinických izolátech rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* a v části případů *in vivo* na myších modelech tuberkulózy. Zajímavostí pak jsou připravené deriváty boronových kyselin, které v několika případech vykazaly vyšší inhibici proliferace studované linie buněk rakoviny prostaty (IC_{50} = 19,2–27,8 μM) než standard bicalutamid a představují svou strukturou potenciální inovaci v kategorii experimentálních

nesteroidních antiandrogenů. Získané výsledky přinášejí cenný vhled do kategorie antiinvazivních léčiv.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Training Workplace: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Doctoral Degree Program: Pharmaceutical Chemistry

Candidate: PharmDr. Petr Šlechta

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

Advisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Hybridization approach in the discovery of new antiinvasive drugs

The worldwide increasing development of drug-resistant infectious diseases together with the increasing number of patients diagnosed with various types of cancer constitute fundamental challenges in the field of medicinal chemistry and thus create the need for the continuous development of new effective molecules.

In the theoretical part, the presented dissertation deals with the hybridization of molecules as a tool in the discovery of new drugs, it categorizes hybrid compounds according to their composition into several groups and gives examples of successful hybrids, both registered and experimental ones. Furthermore, it focuses on organic boron compounds, more specifically boronic acids, defines their properties, and discusses the possibilities of their use in the field of pharmaceutical chemistry with the introduction of preclinically and clinically important molecules. The following practical part is a commentary on summarizing the chemical procedures, and biological and computational methods used in the experimental part of the work. Furthermore, the published works are commented on. They are in most cases based on the concept of hybrid compounds, and their antimycobacterial, antibacterial, and antiproliferative effects are presented, with special emphasis is placed on defining their structure-activity relationships. Part of the annotated publications then shows the possibilities of using the unique physicochemical properties of boron when designing new compounds. The most active compounds achieved MIC values = 2.6–21.59 μM against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Perspective candidates were tested on clinical isolates of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and in some cases *in vivo* on mouse models of tuberculosis. Interestingly, the prepared boronic acid derivatives showed higher inhibition of proliferation

of the studied prostate cancer cell line ($IC_{50} = 19.2\text{--}27.8 \mu\text{M}$) than the bicalutamide standard and represent a potential innovation in the category of experimental non-steroidal antiandrogens due to their structure. The obtained results bring valuable insight into the category of anti-invasive drugs.

Seznam zkratek

AChE	acetylcholinesteráza
AD	androgen-dependentní
AMP	adenosinmonofosfát
AR	androgenní receptor
B ₂ Pin ₂	bis(pinakoláto)dibor
Boc	terc-butyloxykarbonyl
BZX	benzoxaborol
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CFU	jednotky tvořící kolonie
DCM	dichlormethan
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DHFS	dihydrofolátsyntáza
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DfrA	specifická forma enzymu dihydrofolátreduktázy
EDO	1,2-ethandiol
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
EtOAc	ethyl-acetát
FAF UK v HK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
HER-2	humánní epidermální receptor
HFB	boronový bioisoster hydroxyflutamidu
HDAC	histondeacetyláza

hLeuRS	lidská leucyl-tRNA syntetáza
INH	isoniazid
LBD	doména vázající ligand
LeuRS	leucyl-tRNA syntetáza
MAO	monoaminoxidáza
MOA	mechanismus účinku
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR	savčího cíle rapamycinu (mammalian target of rapamycin)
mtbLeuRS	mykobakteriální leucyl-tRNA syntetáza
MDR-TB	lékově multi-rezistentní tuberkulóza
NAT-1	<i>N</i> -acetyltransferáza 1
NSAA	nesteroidní anti-androgeny
OBORT	oxaborol tRNA trapping mechanismus
PC	rakovina prostaty
PDB	Protein Data Bank
Pd(dppf)Cl ₂	chlorid [1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen] palladnatý
PASA	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RibD	riboflavin biosyntetizující protein
ROS	reaktivní forma kyslíku
SAM	<i>S</i> -adenosyl-methionin
SAR	vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou

SERD	selektivní down-regulátory estrogenního receptoru
SI	index selektivity
TB	tuberkulóza
TK	tyrozinkináza
TFA	trifluoroctová kyselina
WHO	Světová zdravotnická organizace
WT	wild-type

Obsah

Poděkování	4
Abstrakt	5
Abstract	7
Seznam zkratk.....	9
Cíle práce	14
Přehled současného stavu řešené problematiky.....	15
Výzvy ve vývoji nových léčiv	15
Hybridizace jako přístup při vývoji nových léčiv.....	16
Hybridní molekuly typu „linked hybrids“	17
Hybridní molekuly typu „fused hybrids“	19
Hybridní molekuly typu „merged hybrids“.....	20
Antimykobakteriální hybridy	21
Antibakteriální hybridy	22
Protinádorové hybridy.....	24
Bor v designu léčiv.....	26
Boronové kyseliny.....	27
Benzoxaboroly	32
Metody syntéz cílových sloučenin.....	33
Acylační postupy.....	33
Syntéza amidů z acylchloridů	33
Syntéza amidů z aktivovaných karboxylových kyselin	34
1,1'-Karbonyldiimidazolem aktivovaný coupling.....	35
Deprotekce pinakol-esterů boronových kyselin pomocí transesterifikace	36
Miyauraova borylace	37
Hydrolyza esterů.....	38

Acetylace fenolů	39
Čištění, charakterizace a analytické hodnocení látek.....	39
Metody použitého molekulárního dockingu	40
Metodika templátového dockingu v rámci publikace P2	40
Metodika kovalentního dockingu v rámci publikace P4.....	41
Biologický screening	42
Antimykobakteriální screening.....	42
Antibakteriální a antifungální screening.....	43
Antiproliferativní screening	43
Pokročilé biologické testování	43
Komentář k publikovaným pracím.....	44
Publikace P1: hybridní sloučeniny pyrazinamidu a <i>p</i> -aminosalicylové kyseliny.....	44
Publikace P2: hybridy cílící na inhibici leucyl-tRNA syntetázy.....	49
Publikace P3: odklon od hybridů a snaha objasnění neznámého mechanismu účinku.....	53
Publikace P4: cílení na androgenní receptor	55
Závěr	61
Seznam publikovaných prací	64
Publikované práce nezahrnuté do komentáře	65
Příspěvky na konferencích.....	65
Přednášky	65
Posterová sdělení	66
Účast na grantech.....	66
Literatura	66
Seznam příloh.....	73

Cíle práce

1. Příprava hybridních sloučenin a screening jejich antimikrobní aktivity.
2. Příprava organických sloučenin boru a screening jejich antimikrobní aktivity.
3. Definování vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou syntetizovaných látek.

Přehled současného stavu řešené problematiky

Výzvy ve vývoji nových léčiv

Je tomu zhruba pět let, co udeřila pandemie onemocnění COVID-19, která tak demonstrovala ničivý potenciál infekčních onemocnění. I tak se za rok 2023 dovíme, že tuberkulóza (TB) zůstává světově druhým největším zabijákem v kategorii onemocnění způsobených jedním infekčním agens hned po onemocnění COVID-19. Podle výroční zprávy WHO o TB se dozvídáme, že způsobuje dvakrát více úmrtí než onemocnění AIDS. Zároveň se stále častěji objevují případy onemocnění způsobených rezistentními kmeny *Mycobacterium tuberculosis*.¹ Pokud k tomu přičteme fakt, že disponujeme pouze omezeným chemickým arsenálem k léčbě tohoto onemocnění, který ve všech případech vyžaduje kombinační terapii několika účinných látek a mnohdy je jejich použití spojeno s vážnými nežádoucími riziky, dojdeme rychle k závěru, že je aktuální neustálá potřeba výzkumu a hledání nových a bezpečnějších léčiv.

Tuberkulóza ovšem není jediným rizikovým infekčním onemocněním, podceňovat nelze ani další bakteriální infekce. I zde vede neuvážlivé používání antibiotik k rozvoji rezistence u gram-pozitivních a gram-negativních patogenů. Vznikající rezistence proti klinicky významným kmenům bakterií označovaným akronymem ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a kmeny *Enterobacter*) se začíná stávat celosvětovou krizí. Přes existenci celé škály antibiotik se můžeme dočkat doby, kdy jejich použití nebude možné z důvodu ztráty jejich účinnosti.²⁻⁴ Z těchto důvodů i výzkum inovativních antibakteriálních chemoterapeutik je a v blízké budoucnosti ještě dlouho bude výzvou pro výzkum v oblasti farmaceutické chemie.

Obdobně pak rostoucí počet diagnostikovaných pacientů s nádorovým onemocněním je podnětem a nespornou výzvou pro oblast objevování nových léčiv. Navzdory pokroku dosaženého v terapii nádorů je rakovina stále jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích.⁵ I přes nesčetné množství nových specifických látek je protinádorová farmakoterapie mnohdy spojena se značnými nežádoucími účinky a často čelí také možnosti rozvoje rezistentních nádorů.

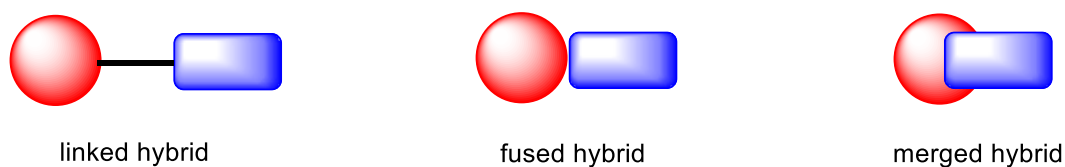
Pojem antiinvazivní léčiva používaný v této disertační práci zahrnuje účinné látky, které se používají v terapii infekčních a nádorových onemocnění. Vzhledem k současným výzvám v oblasti farmaceutické chemie a tomu, že má práce probíhala ve výzkumné skupině prof.

Martina Doležalová tak se moje práce zaměřovala primárně na vývoj látek, které by mohly sloužit jako potenciální antituberkulotika. V průběhu svých experimentů jsem dospěl i k látkám, které vykazovaly zejména antiproliferativní aktivitu.

Hybridizace jako přístup při vývoji nových léčiv

V posledním desetiletí se v medicíně stále častěji objevují výrazy jako hybridní léčivo, „conjugate drug“ nebo „codrug“. Hybridní léčivo může být obecně definováno jako kombinace dvou nebo více biologicky aktivních molekul, které jsou vzájemně spojeny a vytváří tak novou molekulární entitu, hybridní molekulu. Hybridní molekula by pak v ideálním světě měla nést charakteristiky molekul, ze kterých je složena a měla by jim být svými vlastnostmi nadřazena. Za hybridní molekuly mohou být považovány látky vzniklé kombinací dvou a více stejných molekul spojených kovalentní vazbou nebo látky vzniklé kovalentním spojením alespoň dvou různých molekul, většinou molekul s rozdílným mechanismem účinku. Kombinací bioaktivních molekul lze připravit sloučeninu, která může fungovat jako „multitarget ligand“ a může působit různými částmi struktury na cíle v rámci jedné biochemické dráhy (sekvenční inhibice), na cíle v odlišných biochemických drahách (paralelní inhibice) nebo obojí (síťová inhibice).⁶ Z toho důvodu by se nemělo na hybridizaci hledět pouze jako na náhradu k tzv. co-formulacím (kdy se dvě a více účinných látek kombinují v jedné lékové formě), ale jako na přístup objevování nových účinnějších molekulárních entit, které mohou poskytovat výhody v porovnání s molekulami, ze kterých jsou vytvořeny, např. zlepšení farmakokinetického profilu, snížení toxicity, zvýšení biologické aktivity atd.^{7, 8} Termín „codrug“ se většinou používá ve spojitosti se sloučeninami, které jsou tvořeny spojením dvou identických nebo rozdílných molekul pomocí štěpitelného spojovacího můstku neboli linkeru. Na druhou stranu termín „conjugate drug“ většinou popisuje hybridy, které představují funkční spojení mezi molekulou nesoucí účinek a další přírodní nebo syntetickou strukturou (polymer, polypeptid, lipid, sacharid, glykoprotein) sloužící většinou jako nosič pro cílení účinku nebo jako inhibitor/aktivátor specifického enzymu se zvýšenou biologickou aktivitou.⁹ Bez ohledu na různá názvy, kterými můžeme hybridní léčiva označovat (codrug, conjugate), ve všech případech se jedná o nové molekulární entity, které jsou vytvářeny za účelem dosažení určité farmakologické aktivity skrze známý mechanismus účinku. Avšak je nutné podotknout, že při jejich vývoji může dojít ke změně farmakokinetických, a i farmakodynamických vlastností vzhledem k parentním léčivům, ze kterých se skládají.

Při tvorbě hybridních molekul, zejména při kombinaci dvou farmakoforů s rozdílným mechanismem účinku je pak zásadní otázkou způsob napojení jednotlivých farmakoforů. V této fázi vývoje hraje stěžejní roli znalost vztahů mezi chemickou strukturou a biologickým účinkem daného farmakoforu (structure-activity relationships - SAR).¹⁰ Logicky je nežádoucí hybridy spojovat na funkčních skupinách, které jsou esenciální pro zachování mechanismu účinku, pokud se nejedná o spojení rozštěpitelné v organismu. Z hlediska způsobu napojení můžeme hybridní sloučeniny rozdělit do těchto kategorií: „linked hybrids“, „fused hybrids“ nebo „merged hybrids“ (Obrázek 1).^{11, 12} „Linked hybrids“ se v literatuře občas označují také jako konjugáty s různou úrovní inkorporace jednotlivých farmakoforů. Zde zatím není literatura jednotná.



Obrázek 1: Způsoby spojení původních molekul v hybridní sloučenině.

Hybridní molekuly typu „linked hybrids“

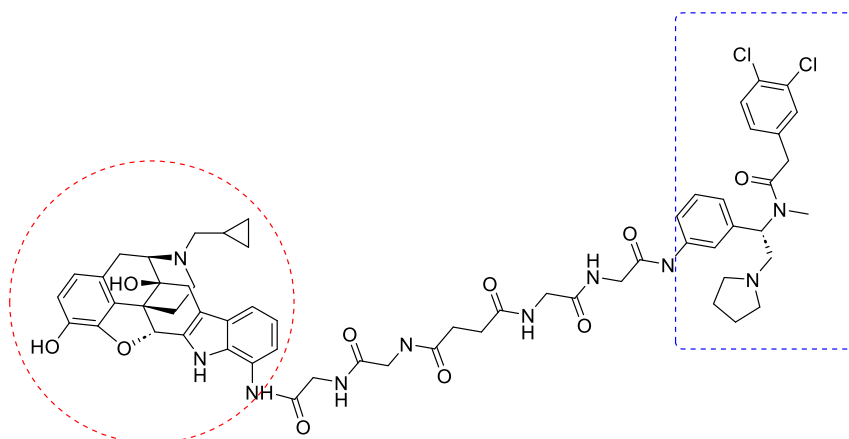
Jako „linked hybrids“ označujeme molekulární entity spojené pomocí spojovacího můstku (linkeru). Každý parentní farmakofor takového hybridu je zodpovědný za biologickou aktivitu na svém biologickém cíli. Podle stability spojovací vazby můžeme rozlišovat dva typy hybridů:

1. Neštěpitelné konjugáty: Dva samostatné farmakofory jsou spojeny pomocí různě dlouhého linkeru. Každý farmakofor vykazuje aktivitu na příslušném biologickém cíli. Spojovací můstek, kterým jsou spojeny, je většinou metabolicky stabilní a neovlivňuje vlastní mechanismus účinku.¹³
2. Štěpitelné konjugáty: V těchto případech je linker hybridu navržen tak aby při jeho metabolickém rozpadu došlo k uvolnění obou účinných farmakoforů. Kdy každý reaguje se svým molekulárním cílem zcela nezávisle.^{11, 14}

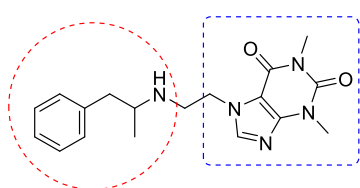
Při využití tohoto způsobu je stěžejní volba délky a flexibility spojovacího můstku. V závislosti na jeho délce může medicínální chemik ovlivnit molekulovou hmotnost připraveného hybridu. Obecně platí, že linkery by neměly být stericky objemné a měly by obsahovat dvě až tři funkční skupiny pro napojení aktivních farmakoforů do hybridní struktury. Linker může být lineární nebo větvený s hydrofobním či hydrofilním charakterem v závislosti na požadovaných

vlastnostech hybridní struktury. Nejčastěji využívané funkční skupiny spojovacích můstků jsou alkoholy, primární aminy nebo thioly. Jako enzymaticky štěpitelné linkery se nejčastěji používají řetězce napojené pomocí esterových vazeb, které jsou v plazmě lehce štěpitelné pomocí esteráz. Pro tvorbu stabilních linkerových spojení se většinou využívá alkylových řetězců, případně stabilních etherových vazeb. Celkové fyzikálně chemické vlastnosti a napojení linkeru jsou zásadní pro úspěch takového hybridu. V případě neštěpitelných konjugátů jsou spojované farmakofory napojeny v oblastech neinteragujících s biologickým cílem, tak aby nedošlo ke ztrátě jejich aktivity.

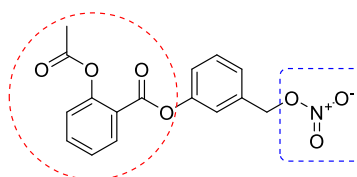
Příklady konjugátů můžeme vidět na obrázku dole (Obrázek 2). Výzkumná skupina Portugese zkoumala homo- a heterodimerní konjugáty s rozdílnou délkou spojovacího řetězce navržené k prozkoumání uspořádání opioidních receptorů δ a κ . Na obrázku lze vidět heterodimerní konjugát obsahující δ -antagonistu (naltrindol) a κ_1 -agonistu (ICI-199,441) spojené oligoglycylovým můstkem.^{15, 16} Příkladem konjugátu s krátkým můstkem je fenethylin, který vznikl spojením molekuly amfetaminu a teofylinu. Samozřejmě, tento hybrid by bylo možné zařadit do kategorie fúzních hybridů, pokud bychom uvažovali spojení struktur metamfetaminu a kofeinu, nicméně díky tomu, že fenethylin se v těle rozkládá dealkylací za uvolnění amfetaminu a teofylinu, přikláníme se k jeho zařazení mezi konjugáty. Posledním příkladem tentokrát štěpitelného konjugátu je spojení nitroaspirinu, který obsahuje funkční skupinu uvolňující oxid dusný a kyselinu acetylsalicylovou. Zde je zajímavostí, že linker je tvořen aromatickým jádrem a je připojen esterovou vazbou.¹⁷



konjugát naltrindolu a ICI-199,441



fenetylin



3-[(nitrooxy)methyl]fenyl 2-acetoxybenzoát

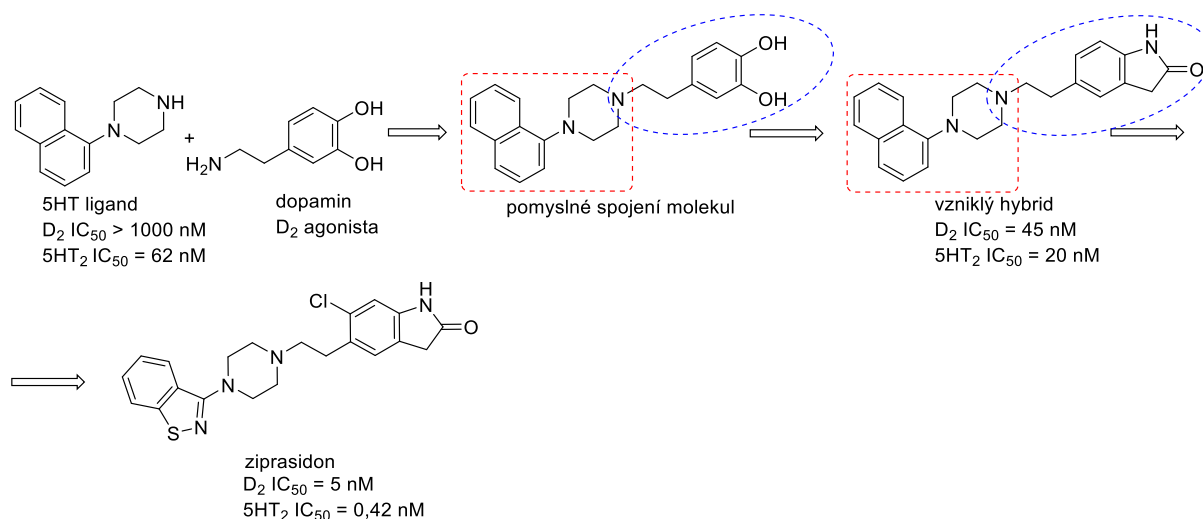
"nitroaspirin"

Obrázek 2: Příklad hybridních molekul typu konjugátů s výraznými farmakofory.

Hybridní molekuly typu „fused hybrids“

Látky označované jako „fused hybrids“ jsou molekuly, ve kterých jsou struktury dvou léčiv napojeny tak, že dochází k blízkému kontaktu mezi nimi, buď přítomností zanedbatelného linkeru nebo bez něj.^{11, 12} Dochází tak k přímému kontaktu s tím, že jsou oba farmakofory plně zachováni, aby zároveň byla zachována i jejich schopnost vazby na biologické cíle.

Jako příklad takových hybridů můžou být uvedeny struktury z práce skupiny Loweho (Obrázek 3), který kombinoval molekulu dopaminu jako agonisty D₂-receptorů spolu s ligandem 5-HT receptoru. Touto fúzí molekul došlo ke zvratu D₂-agonistické aktivity na antagonistickou. Při vývoji byl dále upraven fragment dopaminu inkorporací dalšího heterocyklu do struktury tak, aby došlo k napodobení interakcí, které tvořily fenolické hydroxyskupiny.¹⁸ Pfizer uvedl na základě těchto výsledků spolu s dalšími optimalizacemi na trh sloučeninu ziprasidon pro léčbu schizofrenie v roce 2001.

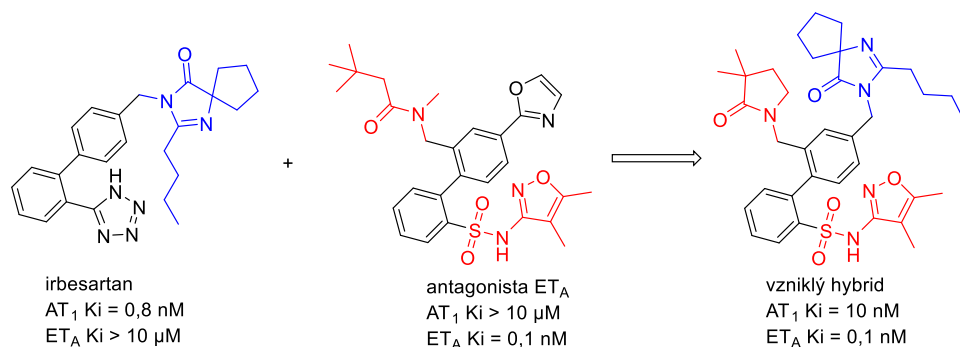


Obrázek 3: Design $D_2/5HT_{2A}$ ligandu a vývoj klinicky používaného ziprasidonu.

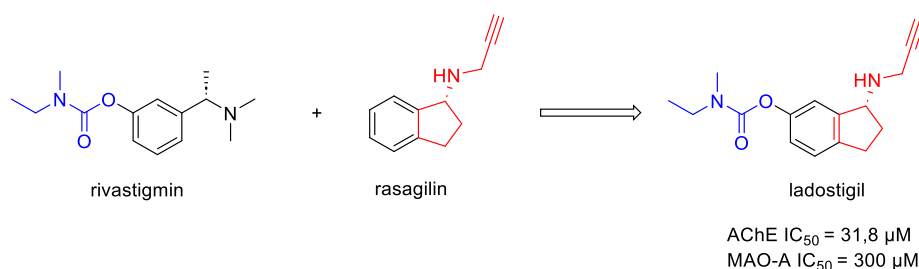
Hybridní molekuly typu „merged hybrids“

„Merged hybrids“ jsou takové sloučeniny, ve kterých jsou jednotlivé farmakofory spojeny za využití shodných prvků ve struktuře parentních sloučenin. Tímto způsobem dochází ke vzniku menších a jednodušších molekul.^{11, 12} Samozřejmě i v těchto případech může dojít ke spojení metabolizovatelnou funkční skupinou, která v organismu uvolní parentní molekuly, jež budou působit vlastním mechanismem účinku nebo se bude jednat o pevně spojené farmakofory s dostatečně zachovalými strukturálními rysy tak, aby dokázaly ovlivnit oba molekulární cíle.

Příkladem můžou být látky, které inhibují chelatací enzymy obsahující zinek. Výzkumný tým Murugesana popsal duální antagonisty angiotensin-1/endothelin-A receptoru pro léčbu hypertenze (Obrázek 4). Design těchto AT_1/ET_A antagonistů vycházel z překryvu biarylových jader nalezených v selektivních AT_1 a ET_A antagonistech. Dalším příkladem „merged hybrids“ může být duální inhibitor acetylcholinesterázy (AChE) a monoaminoxidázy (MAO) ladostigil, který se využívá k léčbě neurodegenerativních poruch (Obrázek 5). Ladostigil ve své struktuře kombinuje farmakofory rivastigminu a rasagilinu.¹⁹ Na základě uvedených SAR vidíme, že právě funkční skupina karbamátů a propargylaminu jsou klíčovými složkami farmakoforu zodpovědnými za inhibici enzymů AChE a MAO.



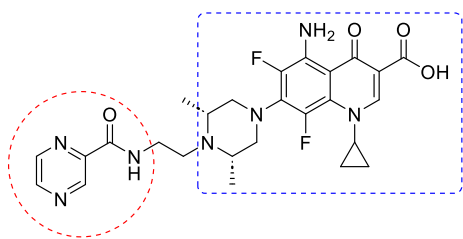
Obrázek 4: Design hybridu s duální inhibicí AT_1/ET_A .



Obrázek 5: Design struktury hybridu ladostigilu.

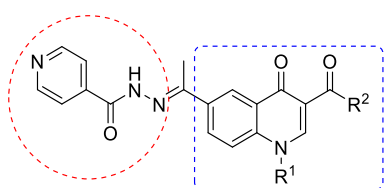
Antimykobakteriální hybridy

Komplexní a mnohdy časově náročná terapie TB, která vyžaduje kombinaci několika léčiv s různými mechanismy účinku neboli multiple-target therapy, spolu s obecně se rozvíjející rezistencí na dostupná antituberkulotika a častějším výskytem případů multi-drug rezistentní (MDR-TB) nebo extensive-drug rezistentní tuberkulózy, vyvíjí tlak na objevení nových antituberkulotik. Jeden z často využívaných přístupů je právě tvorba hybridních sloučenin, které by mohly vykazovat duální mechanismus účinku. V této kapitole jsou uvedeny některé příklady takových hybridních sloučenin. Zatím žádná z nalezených struktur nedosáhla komerčního významu. Například na Katedře medicínální chemie The Bombay College of Pharmacy v Indii experimentovali Shindikar a Viswanathan s tvorbou nových hybridů kombinací fluorochinolonů s pyrazinamidem nebo isoniazidem (INH) (Obrázek 6). Tyto hybridy vykazaly v *in vivo* experimentech na myších modelech srovnatelnou aktivitu se standardem sparfloxacinu při dávce 200 mg/kg.²⁰



Obrázek 6: Hybridní molekula – fragment pyrazinamidu v červené bublině, fragment sparfloxacinu v modré bublině, propojeny ethylenovým můstkem.

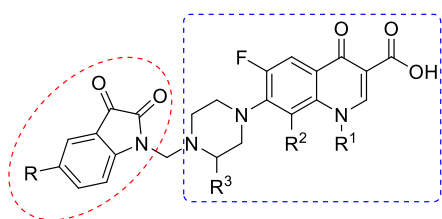
Jiná výzkumná skupina pod vedením Betecka se zabývala do jisté míry podobným tématem. Zkoušeli spojit různé deriváty chinolonů s isoniazidem pomocí hydrazid-hydrazonové vazby a měřili jejich inhibiční aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (Obrázek 7).²¹



Mtb H37Rv MIC₉₀ = 0,8—7,8 μM
INH MIC₉₀ = 0,2 μM

Obrázek 7: Hybridní molekula – fragment isoniazidu v červené bublině, farmakofof chinolonů v modré bublině.

Další zajímavým pokusem z pohledu použití hybridizace při vývoji nových antituberkulotik byla práce publikovaná pod vedením Xu. Tým tohoto vědce se zabýval syntézou molekul kombinující molekuly fluorochinolonů s deriváty isatinu (Obrázek 8).²² Isatin je farmakofof, jehož deriváty mají různou biologickou aktivitu. Využívá se jako základní stavební kámen pro přípravu řady chemoterapeutik a antivirotik.^{23, 24}



Mtb H37Rv MIC = 1,21–3,09 nM
ciprofloxacin MIC = 6,04 nM

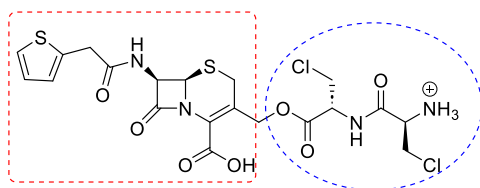
Obrázek 8: Hybridní molekula – fragment isatinu v červené bublině, farmakofof chinolonů v modré bublině.

Antibakteriální hybridy

Obecně neuvážlivé nadužívání antibiotik vedlo k rozvoji antibiotické rezistence u gram-positivních a gram-negativních patogenů. Tato rezistence se začíná pomalu stávat celosvětovou zdravotní krizí. Většina nosokomiálních infekcí je způsobena kmeny ESKAPE.²⁵ Tvorba

hybridních léčiv je jedním ze způsobů boje proti rozvoji antibiotické rezistence a možnosti rozšíření dostupného antibiotického arsenálu.²⁶ V této kapitole uvedeme několik příkladů hybridních molekul vyvíjených za účelem léčby bakteriálních infekcí.

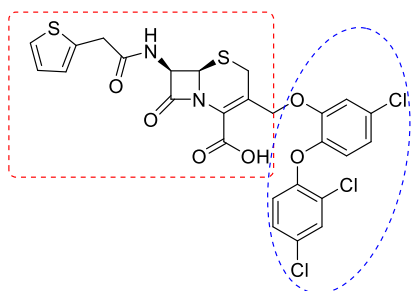
Jedním z příkladů antibakteriálních hybridů může být molekula desacetylcefalotinu připojená k dipeptidu β -chloralaninu, ten funguje jako inhibitor alaninracemázy (Obrázek 9).²⁷ Takto připravený hybrid vykázal zajímavou inhibici kmene *E. coli*.



E. coli MIC = 7,05–14,1 $\mu\text{g/ml}$

Obrázek 9: Hybridní molekula – fragment desacetylcefalotinu v červené bublině, dipeptid β -chloralaninu v modré bublině.

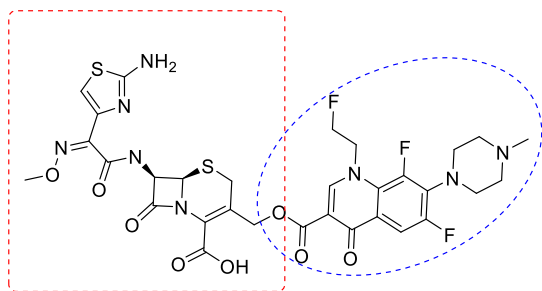
Dalším příkladem slibného hybridu, založeného na struktuře cefalosporinů, je molekula NB2001 vyvíjená společností NewBiotics Inc. NB2001 se skládá ze struktury desacetylcefalotinu fúzaného se strukturou triklosanu (Obrázek 10). Tato látka vykázala široké spektrum bakteriostatického účinku proti gram-pozitivním/gram-negativním kmenům bakterií.²⁸



E. coli MIC = 0,0002–0,008 $\mu\text{g/ml}$

Obrázek 10: Hybridní molekula – fragment desacetylcefalotinu v červené bublině, triklosan v modré bublině.

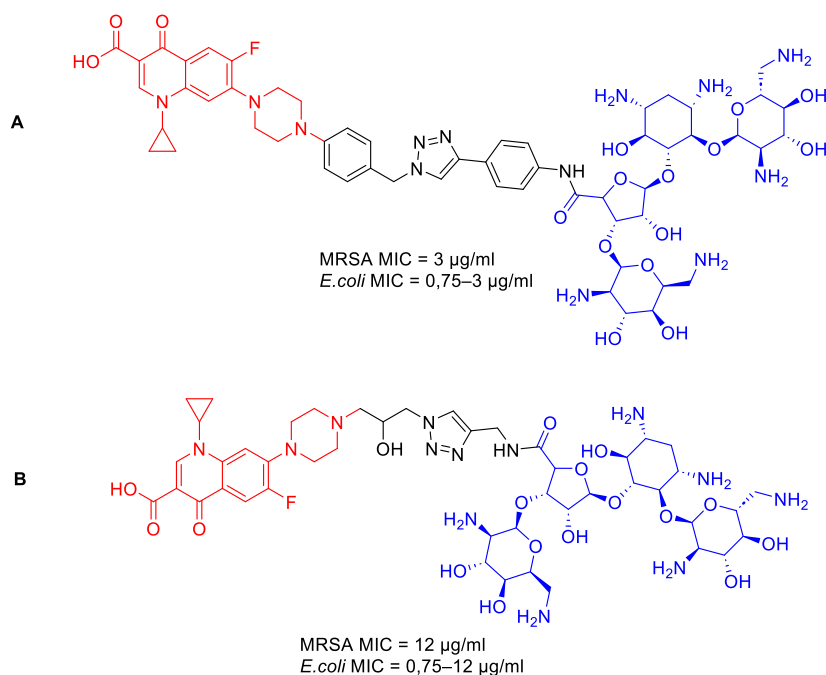
Jiným příkladem antibakteriálního hybridu, který využívá spojení pomocí štěpitelného linkeru je molekula zobrazena na obrázku dole (Obrázek 11), zde vidíme strukturu složenou z molekuly desacetylcefotaximu spojenou s fleroxacinem pomocí esterového linkeru. Tato látka dosahuje širokého baktericidního spektra proti gram-pozitivním a gram-negativním mikroorganismům.²⁹



E. coli MIC = 0,12–4 µg/ml

Obrázek 11: Hybridní molekula – fragment desacetylcefotaxim v červené bublině, fleroxacin v modré bublině.

Mezi další zajímavé hybridy můžeme zařadit molekuly vzniklé propojením neomycinu B s ciprofloxacinem. První z hybridů je spojen pomocí linkeru složeného ze tří aromatických jader, druhý pomocí linkeru substituovaného hydroxyskupinou (Obrázek 12). Oba neomycin B-ciprofloxacin hybridy vykazovaly slibnou aktivitu proti gram-negativním rezistentním kmenům *E. coli*.³⁰

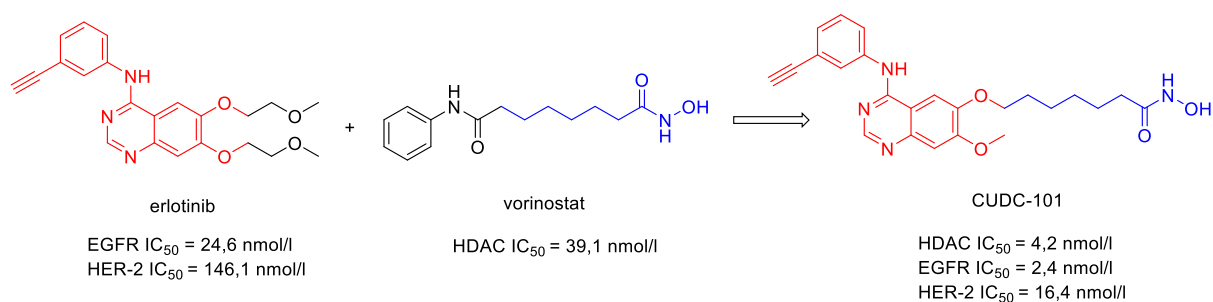


Obrázek 12: Hybridní molekuly – červeně zvýrazněna struktura ciprofloxacinu, modře zvýrazněna struktura neomycinu B. A) Molekula spojena pomocí aromatického linkeru (černě). B) Molekula spojena pomocí linkeru substituovaného hydroxyskupinou (černě).

Protinádorové hybridy

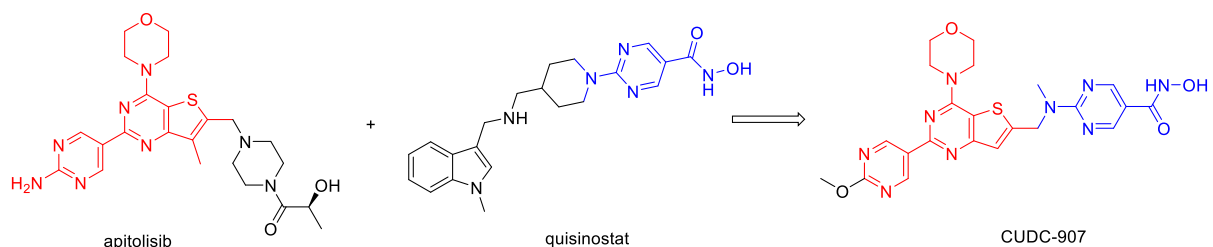
Navzdory pokroku dosaženého v terapii nádorů, zůstává rakovina stále jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích. V oblasti objevování alternativních, bezpečných a efektivních chemoterapeutik získává i hybridizace jako koncept pro vývoj nových chemoterapeutik na významu.³¹

Erlotinib a vorinostat jsou klinicky používaná léčiva pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic a kožního T-lymfomu. Z důvodu rozvíjející se rezistence k těmto léčivům, byl navržen „merged“ hybrid kombinující ve své struktuře farmakofory obou léčiv (Obrázek 13). Výsledný hybrid CUDC-101 inhibuje receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), histondeacetylázu (HDAC) a humánní epidermální receptor 2 (HER-2). CUDC-101 úspěšně prošel první fází klinického testování.³²



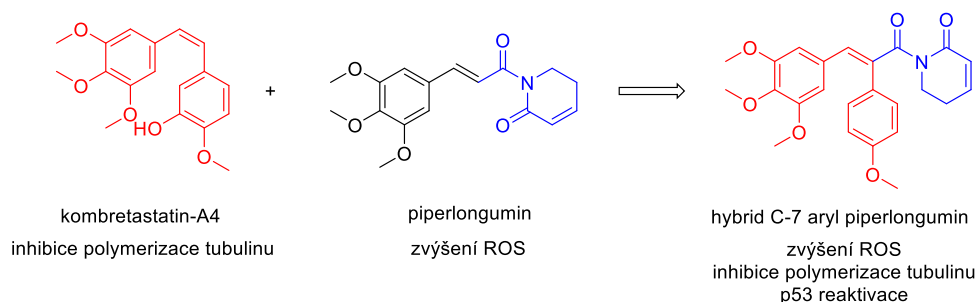
Obrázek 13: Hybrid CUDC-101 s výrazněnými farmakofory. Červeně znázorněn farmakofor erlotinibu, modře farmakofor vorinostatu.

Quisinostat derivát hydroxamové kyseliny, který působí jako inhibitor HDAC. Apitolisib je preklinický inhibitor savčího cíle rapamycinu (mTOR) a PI3-kinázy. Kombinací farmakoforů těchto dvou látek došlo ke vzniku merged hybridu CUDC-907 (Obrázek 14), tento hybrid inhibuje jak HDAC, tak PI3-kinázu.³³



Obrázek 14: Hybrid CUDC-907 s výrazněnými farmakofory. Červeně znázorněn farmakofor apitolisib, modře farmakofor quisinostat.

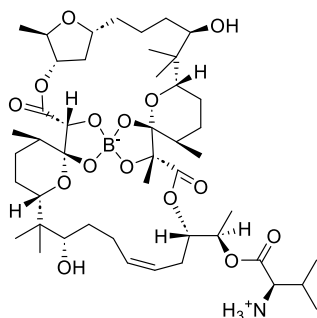
Kombretastatin-A4 je známý inhibitor polymerizace tubulinu, který cílí na vazebné místo kolchicinu. Piperlongumin je alkaloid, který vykazuje cytotoxicitu proti několika lidským rakovinným liniím. Výzkumná skupina Punganury syntetizovala merged hybrid těchto dvou molekul (Obrázek 15), který prokázal schopnost narušení polymerizace tubulinu a reaktivace P53 mutace.³⁴



Obrázek 15: Hybrid C-7 arylpiperlongumin s výrazněnými farmakofory. Červeně znázorněn farmakofof kombretastatinu-A4, modře farmakofof piperlonguminu.

Bor v designu léčiv

Bor s protonovým číslem 5 patří mezi polokovy a je zařazen do III. skupiny periodické tabulky prvků, zde se nachází ve stejné periodě jako uhlík a dusík, dva esenciální prvky, které se dají považovat za stěžejní stavební kameny živých organismů. Bor je mikrobiogenním prvkem rostlin. Konzumací rostlinné stravy se dostává i do lidského těla.^{35, 36} Přírodní deriváty obsahující bor jsou shrnuty v přehledovém článku Dembitsky a kol., příkladem je boromycin vykazující antibiotické účinky (Obrázek 16).³⁷



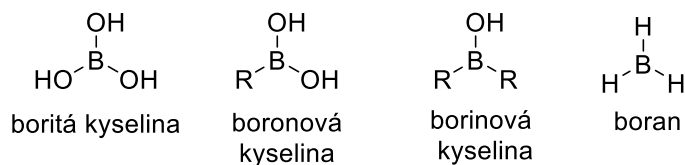
Obrázek 16: Molekula boromycinu.

Atom boru se díky svému prázdnému p-orbitálu chová jako Lewisova kyselina a je elektrofilní. Z tohoto důvodu dokáže tvořit dativní vazbu (koordináčně kovalentní vazbu) s nukleofily jako například hydroxy- a aminoskupiny obsažené v aminokyselinových zbytcích enzymů, v cukrech nebo nukleových kyselinách.³⁸⁻⁴⁰

Bor může být vázán v různých typech sloučenin, pro farmacii jsou nejdůležitější následující:

- přírodní anorganická kyselina boritá H_3BO_3 , ev. její estery boráty
- organoborany, definovány jako sloučeniny obsahující vazbu C-B: kyseliny boronové $RB(OH)_2$, borinové R_2BOH , jejich estery a karborany neboli boronové klastry

Organoboronové kyseliny můžeme jednoduše odvodit od kyseliny borité, kdy pomyslnou záměnou jednoho z hydroxylů alkylovým nebo arylovým zbytkem získáme kyselinu boronovou. Záměnou dvou hydroxylů uhlovodíkovým zbytkem získáme kyselinu borinovou (Obrázek 17). Vzhledem k zaměření této práce a jejích experimentálních součástí se v následujícím textu zaměřujeme pouze na deriváty boronových kyselin.

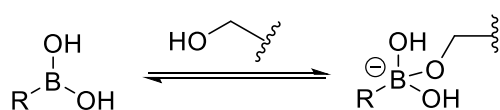


Obrázek 17: Odvození organoboronových kyselin od kyseliny borité.

Boronové kyseliny

Boronové kyseliny nejsou v organické chemii žádnou novinkou. Své uplatnění našly v syntetické chemii, kde sloužily k tvorbě C-C vazby pomocí Suzuki-Miyaura couplingové reakce.⁴¹ Jejich použití ve farmaceutické chemii jako funkční skupiny v potenciálních léčivech bylo do určité doby jistým tabu, zejména z důvodu předpokladu o jejich potenciální toxicitě. Boronové kyseliny se *in vivo* metabolizují na kyselinu boritou.⁴⁰ Kyselina boritá je přírodní sloučenina, původně izolovaná z půdy a mravenčího jedu. Její toxicita ($\text{LD}_{50} = 2660 \text{ mg/kg}$ u myši po *per os* podání) je srovnatelná s toxicitou soli (NaCl $\text{LD}_{50} = 3000 \text{ mg/kg}$ u myši po *per os* podání).⁴⁰ Toto tabu padlo až v roce 2005 s prvním registrovaným léčivem obsahujícím ve své struktuře boronovou funkční skupinu, kterým byl bortezomib (popsán níže). Od té doby došlo k registraci několika dalších látek obsahujících tuto funkční skupinu a zároveň ke zkoumání mnoha dalších látek v pokročilých fázích klinického testování.^{38, 42}

Boronové kyseliny jsou za fyziologických podmínek neionizované, vykazují pK_a přibližně 7–9 v závislosti na typu substituce. Přijetím volného elektronového páru z různých funkčních skupin (hydroxy-, aminoskupiny biogenních makromolekul), může docházet k tvorbě reverzibilní koordinačně kovalentní vazby s daným nukleofilem. Při tvorbě této koordinační vazby dochází k přechodu z přirozené trigonální planární sp^2 hybridizace boronové kyseliny na tetrahedrální sp^3 hybridizaci a získání záporného náboje (Obrázek 18).³⁸⁻⁴⁰

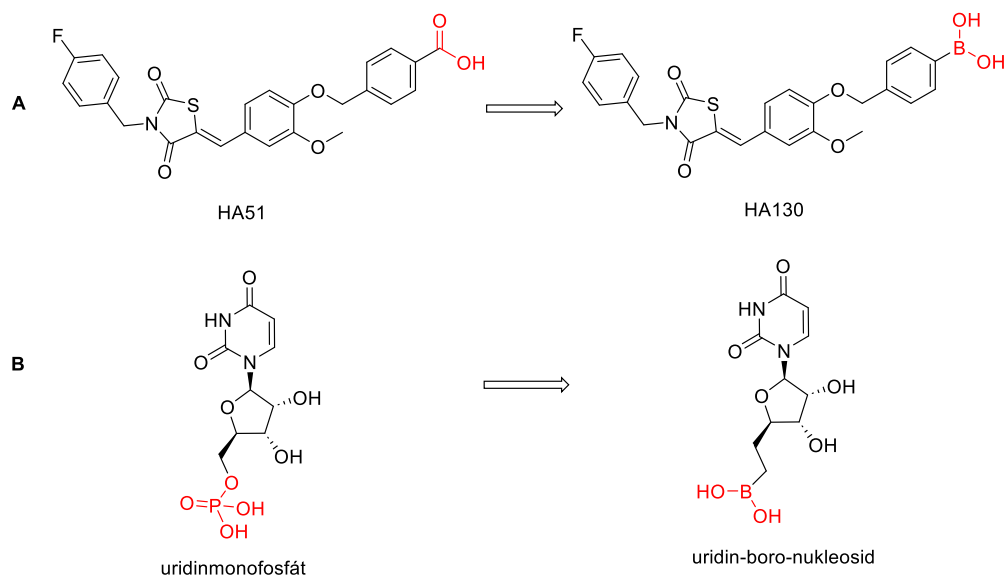


Obrázek 18: Schéma znázornění tvorby reversibilní koordinačně kovalentní vazby.

Důvody pro zavedení boronové kyseliny do struktur potenciálních léčiv se velice liší napříč strukturami, ve kterých byly použity. U derivátů boronových kyselin byla popsána inhibice celé řady enzymů, např. serinových proteáz jako je faktor XIa, β -laktamáza nebo NS3 serinové proteáza, dále inhibice histondeacetylázy, leucyl-tRNA syntetázy ad.⁴³ Mohou se tedy uplatnit jako protinádorové látky, antivirotika a antibakteriální sloučeniny.^{39, 44}

Boronové kyseliny jako bioisostery

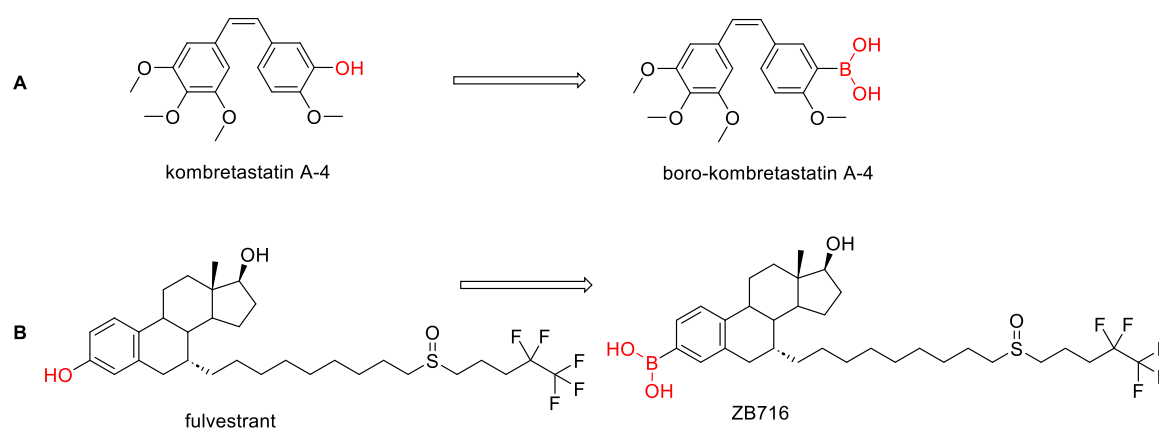
Boronové kyseliny jsou iontově stabilní při fyziologickém pH, což z nich činí slibné neionizované alternativy k ionizovatelným funkčním skupinám.⁴⁵ V tomto kontextu byly boronové kyseliny studovány jako možné bioisostery pro karboxylové funkční skupiny. V prostoru zauímají podobné postavení a zároveň se v obou případech jedná o kyselé látky, ale s tím rozdílem, že vyšší pK_a boronových kyselin jim umožňuje být neionizovaný při fyziologickém pH. Příkladem takového přístupu může být studie Albers a kol. a také Gosh a kol. (Obrázek 19A).^{46, 47} Fosfáty, byť ne tak strukturně podobné boronovým kyselinám jako karboxylové kyseliny, byly také zaměňovány boronovými kyselinami ve strukturách nukleosidů.⁴⁸ Vasseurova výzkumná skupina syntetizovala analoga DNA nukleotidů náhradou fosfátové funkční skupiny za boronovou (Obrázek 19B).⁴⁹



Obrázek 19: Příklady využití boronových kyselin jako bioisosterů. A) Bioisosterní záměna karboxylové funkční skupiny u molekuly HA51 za boronovou kyselinu. B) Bioisosterní záměna fosfátové funkční skupiny u molekuly uridinmonofosfátu za boronovou kyselinu.

Využití boronových kyselin pro zlepšení farmakokinetických vlastností

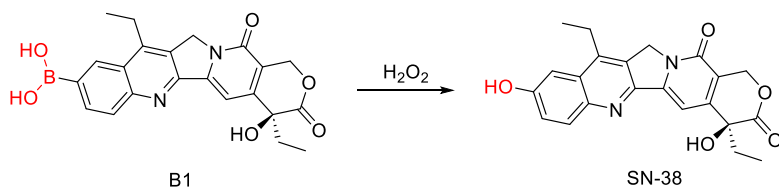
Inkorporace boronové funkční skupiny nebo náhrada určitých funkčních skupin za boronovou kyselinu vede k ovlivnění logaritmu rozdělovacího koeficientu ($\log P$) a zákonitě také ovlivnění logaritmu distribučního koeficientu ($\log D$), což ovlivní farmakokinetické vlastnosti dané molekuly.⁵⁰ Jedním z příkladů takového použití boronových kyselin byla náhrada fenolického hydroxyly za účelem úpravy rozpustnosti studované výzkumnou skupinou Kong a kol.⁵¹ V práci se autoři věnovali analogům kombretastatinu A-4.⁵² Jejich cílem bylo zvýšení její aktivity a rozpustnosti sloučeniny bez toho, aniž by se uchýlovali k tvorbě fosfátového proléčiva. Záměna fenolického hydroxyly za boronovou kyselinu v jejich případě vedla ke zvýšení biologické aktivity a také téměř dvojnásobnému zvýšení rozpustnosti v kyselém médiu (Obrázek 20).⁵¹ Dalším příkladem využití boronové funkční skupiny za účelem zlepšení biodostupnosti je práce výzkumné skupiny Liu a kol.⁵³ V rámci jejich výzkumu se zabývali selektivními downregulátory estrogenního receptoru (SERD). Cílem jejich práce byla modifikace molekuly fulvestrantu tak, aby překonali její metabolizaci pomocí glukuronidace fenolické skupiny. Náhrada fenolické skupiny boronovou kyselinou v tomto případě vedla k zachování aktivity boronového analogu, ale také vedla k výraznému zlepšení farmakokinetických vlastností (Obrázek 20). Inkorporace boronové kyseliny vedla ke zpomalení clearance fulvestrantu, způsobené zpomaleným uvolňováním aktivní látky metabolickou oxidací na původní fenol.⁵³ Stejná výzkumná skupina pokračovala ve výzkumu boronových analogů SERD jako orálně dostupných bioisosterních alternativ k původním látkám obsahujícím fenolickou funkční skupinu.⁵⁴



Obrázek 20: Příklady použití boronové funkční skupiny pro optimalizaci farmakokinetických vlastností. A) Modifikace molekuly kombretastatinu A-4. B) Modifikace molekuly fulvestrantu.

Boronové kyseliny a jejich estery jako proléčiva

Dalším způsobem využití této funkční skupiny může být tvorba protinádorových proléčiv. Několik výzkumných skupin popsalo zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) v některých druzích nádorových buněk, to vede k vyšším hladinám H_2O_2 . Boronové kyseliny se v takových podmínkách mohou rychleji oxidovat na hydroxylové skupiny. Na tomto principu lze vytvořit proléčivo obsahující boronovou kyselinu, které cílí na nádorové buňky, tím že se aktivují až v cílové tkáni.⁵⁵ Příkladem může být práce výzkumné skupiny Wanga,⁵⁶ která substituovala hydroxylovou skupinu derivátu kamptotecinu B1 boronovou kyselinou tak, aby bylo vytvořeno cílené proléčivo látky SN-38 (Obrázek 21). Zvýšené hladiny ROS v rakovinných buňkách způsobují oxidaci boronové kyseliny proléčiva B1 na aktivní formu molekuly SN-38 obsahující hydroxylovou skupinu. Bylo prokázáno že téměř 60 % proléčiva B1 je metabolizováno na aktivní látku SN-38 po 48 hodinách inkubace. Navíc látka B1 sama o sobě vykazuje lepší cytotoxicitu než původní aktivní metabolit SN-38 a způsobuje větší inhibici cílového enzymu, DNA topoisomerázy 1.⁵⁶

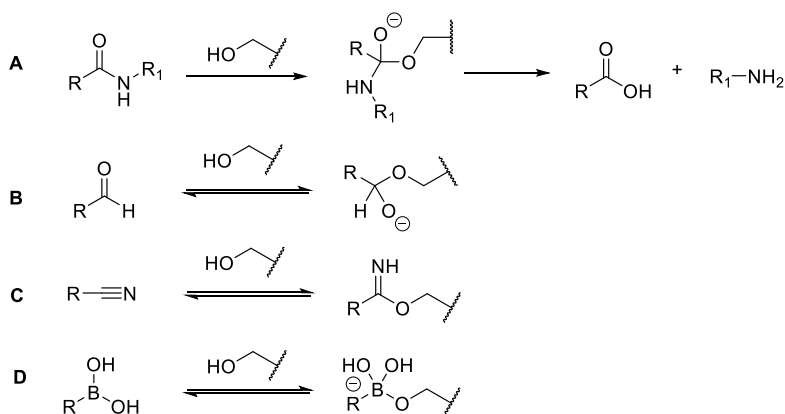


Obrázek 21: Příklad využití boronových kyselin jako proléčiv.

Boronové kyseliny jako reversibilní kovalentní inhibitory

Nejčastějším důvodem inkorporace boronové funkční skupiny do struktury potenciálních léčiv je její schopnost tvořit reverzibilní kovalentní interakce ve vazebných místech cílových struktur. Většina výzkumů v oblasti farmaceutické chemie studujících boronové kyseliny se opírá o schopnost boru interagovat se serinovým nebo cysteinovým aminokyselinovým zbytkem v aktivním místě různých proteáz.⁵⁷ Na obrázku 22 můžeme vidět reakce obecných kovalentních inhibitorů obsahujících tři různé funkční skupiny interagujících se serinovým aminokyselinovým zbytkem v porovnání s přirozeným peptidovým substrátem. Na rozdíl od reakce nitrilu jako slabého elektrofilu, vedou reakce aldehydu nebo boronové kyseliny k tvorbě tetrahedrálních meziproduktů, což odpovídá reakci přirozeného substrátu ve fázi meziproduktu. To pravděpodobně vysvětluje jejich vyšší potenciál a delší dobu setrvání v aktivním místě serinových proteáz. Nicméně musíme podotknout, že použití aldehydů je

problematické z důvodu jejich vysoké reaktivity, která způsobuje oxidativní stres u lidí a vede k cytotoxicitě, mutagenitě a dalším nežádoucím efektům.⁵⁸ Naproti tomu boronové kyseliny jsou obecně považované za bezpečné a z toho důvodu jsou ve farmaceutické chemii preferované před aldehydy.

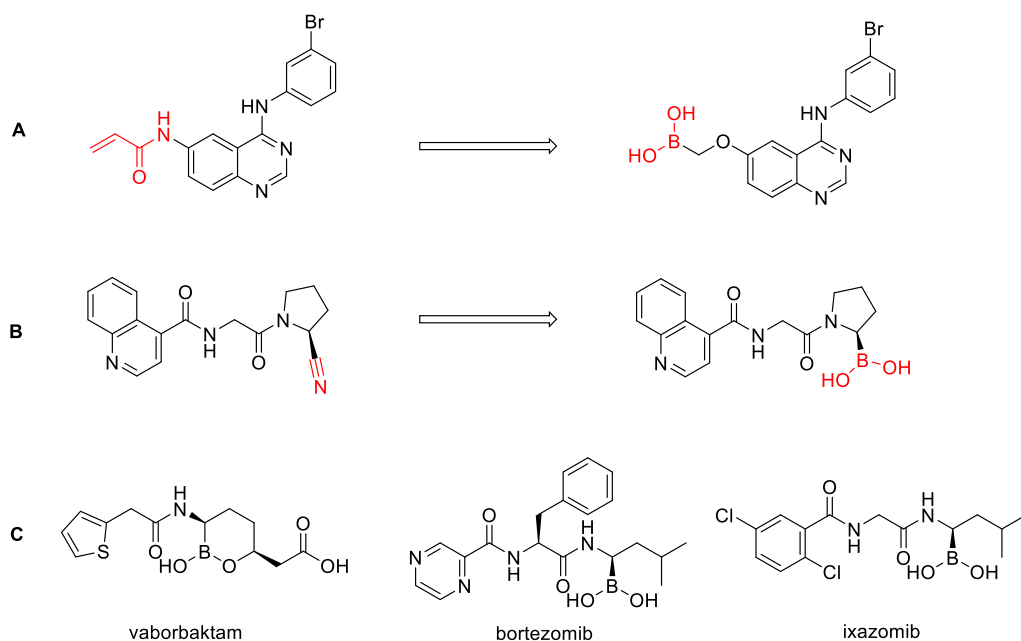


Obrázek 22: Porovnání reakcí přirozeného substrátu (A) a tří funkčních skupin schopných reverzibilní kovalentní reakce (B–D) se serinovým zbytkem peptidázy.

Jako příklad využití kovalentně se vázající boronové kyseliny můžeme uvést studie látek cílících na inhibici β -laktamáz a dnes již registrovaný inhibitor vaborbaktam (Obrázek 23C). Ve struktuře tohoto léčiva byla právě β -laktamová skupina nesoucí účinek úspěšně zaměněna za boronovou funkční skupinu.⁵⁹ Výzkumná skupina Ban představila analoga EGFR tyrozinkináz (TK) inhibitorů, která původně obsahovala Michaleovy akceptory. Záměnou těchto kovalentně reagujících funkčních skupin za boronovou kyselinu došlo ke vzniku specifických inhibitorů EGFR TK neovlivňujících ostatní lidské kinázy a reagujících s cysteinovým aminokyselinovým zbytkem bez potřeby ireversibilní inhibice (Obrázek 23A).⁶⁰

Dalším příkladem využití boronových funkčních skupin může být i jejich úspěšná záměna za nitrilovou funkční skupinu popsána výzkumným týmem Plescia, který se zabýval potenciálními inhibitory polylooligopeptidázy (Obrázek 23B).⁶¹

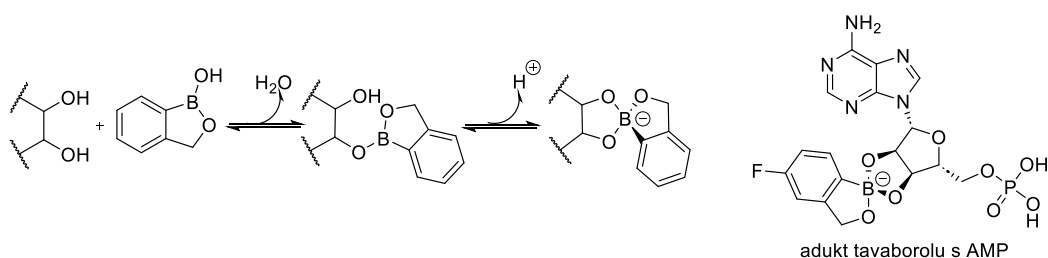
V této kapitole je třeba zmínit také již delší dobu registrované inhibitory proteasomu bortezomib a ixazomib (Obrázek 23C),^{62, 63} které se používají k léčbě mnohočetného myelomu. Boronová kyselina v těchto látkách vytváří reverzibilní kovalentní interakci právě se serinovým reziduem proteasomu.⁶²



Obrázek 23: A) Příklad záměny Michaelova akceptoru za boronovou funkční skupinu. B) Příklad záměny nitrilové funkční skupiny za boronovou kyselinu. C) Struktury léčiv vaborbaktamu, bortezomibu a ixazomibu.

Benzoxaboroly

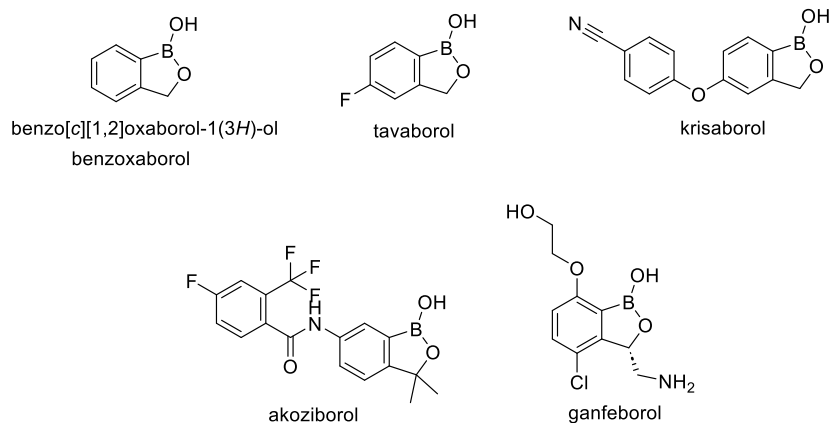
V rámci diskuse o boronových kyselinách je potřeba zvláště zmínit určitý strukturní farmakofor, na který lze pohlížet jako na cyklický ester boronové kyseliny s inkorporovanou funkční skupinou v rámci pětičlenného cyklu. Jedná se o strukturu systematicky označovanou jako benzo[*c*][1,2]oxaborol-1(3*H*)-ol, která se často v literatuře označuje pouze jako benzoxaborol. Tento fragment je velmi stálý a je lépe rozpustný ve vodě než samotné boronové kyseliny.⁴⁴ Díky jeho schopnosti tvořit spiroadukty s dioly (Obrázek 24) se stal základem dvou registrovaných léčiv, a to tavaborolu a krisaborolu (Obrázek 25).⁶⁴



Obrázek 24: Reakce benzoxaborolu s *cis*-dioly za vzniku spiroaduktu. Příklad aduktu molekuly tavaborolu s AMP.

V případě tavaborolu je jeho účinek spojený s inhibicí leucyl-tRNA syntetázy pomocí tzv. oxaborol tRNA trapping mechanismu (OBORT). Dále se tento fragment objevuje i ve struktuře dalších potenciálních léčiv, které jsou v pokročilých fázích klinického testování. Jako příklad můžeme uvést molekulu akoziborolu, která se nachází ve třetí fázi klinického testování na léčbu

africké formy trypanozomiázy, nebo molekulu s označením ganfeborol, která úspěšně prošla druhou fází klinického testování (Obrázek 25).^{65, 66} Syntézy benzoxaborolu jsou popsány v literatuře, stejně tak antimykobakteriální účinky derivátů benzoxaborolu.⁶⁶⁻⁷²



Obrázek 25: Benzoxaborol, příklady klinicky používaných léčiv a molekul v pokročilých fázích klinického výzkumu obsahujících benzoxaborol.

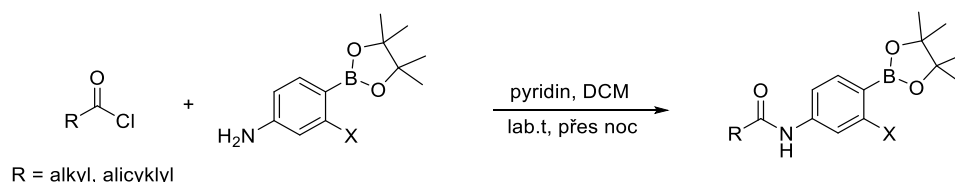
Metody syntéz cílových sloučenin

V následující kapitole budou shrnuty a okomentovány veškeré syntetické postupy použité k dosažení meziproductů anebo finálních sloučenin v komentovaných publikacích (**P1—P4**). Každá z komentovaných publikací zahrnovala syntézu karboxamidů substituovaných dusíkatými heterocykly, zejména pyrazinu a pyridinu, proto zásadní postavení v komentovaných syntetických postupech zaujímá zejména acylace aminosloučenin.

Acylační postupy

Syntéza amidů z acylchloridů

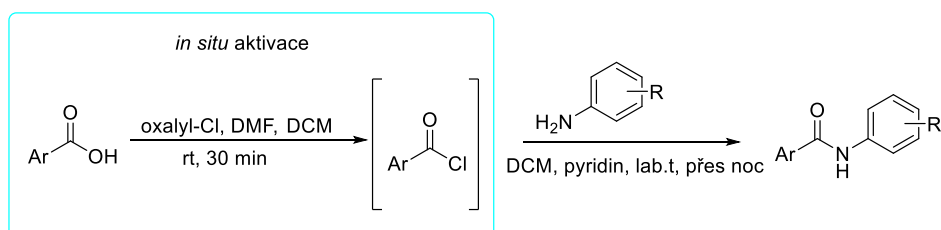
Tento přímočarý acylační přístup byl využit při přípravě alifatických, alicyklických amidů (4-amino-2-fluorfenyl)boronových kyselin nebo (4-amino-2-trifluormethylfenyl)boronových kyselin diskutovaných v publikaci **P4**. V této metodě byly využity komerčně dostupné alifatické a alicyklické acylchloridy, které byly nejprve rozpuštěny v potřebném množství dichlormethanu (DCM). Připravený roztok byl za chlazení v ledové lázni přikapáván k roztoku příslušného anilinu v DCM s přidavkem pyridinu (Obrázek 26). Reakce byla nasazována v ekvimolárním množství s mírným nadbytkem pyridinu (nejčastěji 1,5 ekvivalentu) pro vychytávání vznikajícího chlorovodíku. Takto připravená reakční směs se obvykle nechala míchat do druhého dne za laboratorní teploty.



Obrázek 26: Schéma acylace s využitím alifatických a alicyklických acylchloridů.

Syntéza amidů z aktivovaných karboxylových kyselin

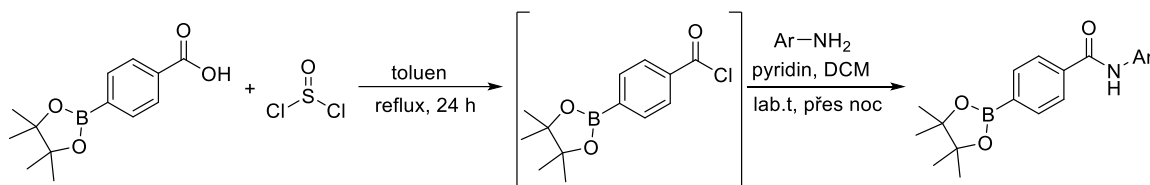
Při syntéze některých (hetero)aromatických karboxamidů bylo nutné vycházet z karboxylových kyselin, které byly převedeny na příslušný reaktivní acylchlorid jednou ze dvou metod. První metodou aktivace bylo využití oxalylchloridu (Obrázek 27). Při využití této aktivace byla příslušná (hetero)aromatická karboxylová kyselina nejprve suspendována v DCM s malým nadbytkem oxalylchloridu, poté bylo do směsi přidáno katalytické množství *N,N*-dimethylformamidu (DMF) pro urychlení aktivace. Směs začala většinou po přidání DMF bouřlivě bublat, což indikovalo zahájení aktivace a uvolňování CO₂, zároveň se původní suspenze začala přeměňovat na roztok v důsledku rozpuštění vznikajícího acylchloridu v DCM. Po ukončení procesu aktivace se roztok začal po kapkách přidávat za stálého chlazení v ledové lázni do baňky obsahující směs ekvimolárního množství příslušného anilinu rozpuštěného ve směsi DCM a molárního nadbytku pyridinu. Po přidání karboxylové kyseliny aktivované *in-situ* ke směsi anilinu byla reakce míchána při laboratorní teplotě do druhého dne. Tento postup *in-situ* aktivace pomocí oxalylchloridu byl využit zejména při acylaci aminoskupiny na dusíkatých heterocyklech, kde jejich nukleofilita byla silně oslabena právě blízkostí heteroaromatického dusíku. Z tohoto důvodu byl tento postup s úspěchem využíván zejména pro syntézu látek diskutovaných v publikaci **P3**. Zároveň však šlo o proceduru, která napomohla syntéze některých látek diskutovaných v publikaci **P4**, při kterých nebylo možné připravit látky pomocí rutinně používané aktivace 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI).



Obrázek 27: Schéma acylace s využitím aktivace karboxylové kyseliny pomocí oxalylchloridu.

Specifického přístupu bylo potřeba využít při syntéze pinacol-esteru 4-((5-chloropyrazin-2-yl)karbamoyl)fenylboronové kyseliny diskutovaného v publikaci **P4**, případně jejích blízkých

derivátů s obrácenou orientací amidové vazby (*retro*-amid), které nebyly doposud publikovány. Při syntéze těchto derivátů nedocházelo k dostatečné konverzi výchozí karboxylové kyseliny na acylchlorid pomocí oxalylchloridu, a proto bylo nutné tyto deriváty aktivovat pomocí thionylchloridu (Obrázek 28). Při této metodě byla příslušná karboxylová kyselina rozpuštěna v toluenu, byl přidán mírný nadbytek (1,1 ekvivalentu) thionylchloridu a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byla směs odpařena do sucha. Vzniklý acylchlorid byl rozpuštěn v DCM a byl po kapkách opět přidáván do směsi příslušného anilinu v DCM s mírným nadbytkem pyridinu za stálého chlazení na ledové lázni. Po smísení byla reakce míchána za laboratorní teploty do druhého dne. Důvody nutnosti použití thionylchloridu jako aktivačního činidla při těchto syntézách nebyly blíže zkoumány. Nicméně můžeme usuzovat, že substituce pinakol-esteru boronové kyseliny v *para*-poloze vůči karboxylové kyselině na benzenovém jádře způsobuje deaktivaci diskutované skupiny, a tudíž její sníženou reaktivitu.



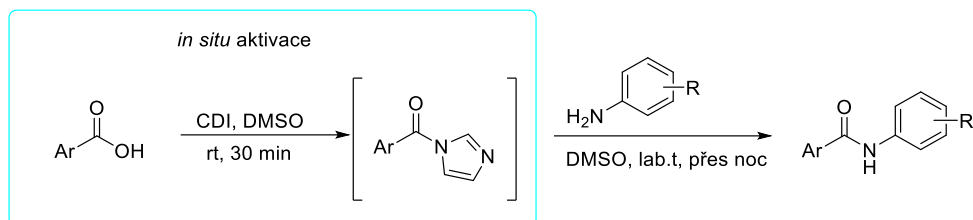
Obrázek 28: Schéma acylace s využitím aktivace karboxylové kyseliny pomocí thionylchloridu.

1,1'-Karbonyldiimidazolem aktivovaný coupling

Jak již bylo naznačeno výše, tak právě karboxylové kyseliny aktivované CDI byly většinou výchozími látkami pro vznik amidových vazeb při přípravě různých karboxamidů heterocyklických sloučenin (Obrázek 29). Aktivace kyseliny pomocí CDI byla využita zejména při syntéze látek diskutovaných v publikacích (**P1**, **P2** a **P4**).

Pro zahájení této reakce byla navážena výchozí heterocyklická karboxylová kyselina, která se v prostředí dimethylsulfoxidu (DMSO) nechala reagovat s mírným nadbytkem CDI. Při zahájení aktivace karboxylové kyseliny pomocí CDI dochází k vývoji plynu vlivem uvolňování vznikajícího CO₂, takže začátek i konec aktivace je pozorovatelný pouhým okem. Jakmile byla aktivace ukončena, byl smíchán tento intermediát aktivovaný *in-situ* s roztokem 1 ekvivalentu příslušného anilinu v DMSO. Takto připravená reakční směs byla míchána do druhého dne za laboratorní teploty. Izolace vzniklého produktu pak probíhala vždy metodou precipitace z DMSO přidáním zhruba 3násobku objemového množství vody ku původnímu rozpouštědлу.

Pokud se pracovalo s deriváty kyseliny *para*-aminosalicylové, diskutovanými v publikaci **P1**, tak směs musela být ještě okyselena do kyselé reakce na indikátorovém pH papírku tak, aby byla potlačena ionizace kyselých funkčních skupin (COOH a Ar-OH) a bylo možné produkty precipitovat.



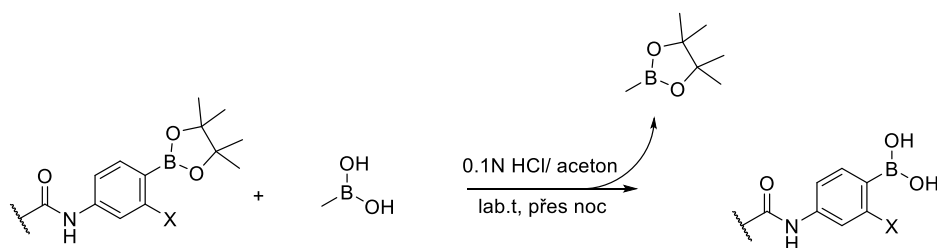
Obrázek 29: Syntéza amidu z kyseliny aktivované 1,1'-karbonyldiimidazolem.

Deprotekce pinakol-esterů boronových kyselin pomocí transesterifikace

Publikace **P4** se zabývala syntézou substituovaných boronových kyselin. Z důvodů reaktivity boronových kyselin bylo potřeba při syntézách vycházet z výchozích látek s ochráněnými boronovými kyselinami ve formě jejich pinakol-esterů. Pro konečné odchraňování látek se ukázala užitečnou elegantní metoda transesterifikace (Obrázek 30), tedy převedení pinakolu z připraveného intermediátu na methylboronovou kyselinu. Tento postup byl velice jednoduchý a představoval stěžejní krok v přípravě konečných boronových kyselin.

Při reakci byl smíchán pinakol-ester s nadbytkem methylboronové kyseliny (10 ekvivalentů) a vzniklá směs byla suspendována ve směsi acetonu a 0,2 M roztoku HCl (V/V 1:1). Takto připravená reakční směs byla za pokojové teploty míchána do druhého dne. Následující den byla reakce zpracována odpařením rozpouštědla, následným suspendováním odparku v deionizované vodě a opětovným odpařením rozpouštědla. Poté byl vzniklý odparek opět suspendován ve vodě a následně přefiltrován přes fritu, aby byl získán konečný produkt. Postup suspendování nepředstavoval pouze zpracování reakce, ale zároveň také metodu čištění konečné látky. Důvtip této metody spočívá v tom, že methylboronová kyselina jakožto výchozí látka a také vznikající pinakol-ester methyl-boronové kyseliny jsou těkavé látky, takže několikanásobné odpaření za sníženého tlaku slouží k odstranění nadbytku methylboronové kyseliny a vedlejších produktů reakce. Dalším přínosem je skutečnost, že pinakol-ester methylboronové kyseliny je těkavější než volná methylboronová kyselina, tudíž v průběhu odpařování dochází k posunu reakční rovnováhy směrem doprava. Tento syntetický postup byl převzat z práce Hinkese a kol., a právě v této publikaci bylo komentováno, že lze při této reakci

využít rozdílných podmínek, např. kombinaci 5% trifluoroctové kyseliny (TFA) v prostředí DCM s použitím pouze 5 ekvivalentů methylboronové kyseliny.⁷³ Tyto podmínky byly v našich pilotních syntetických postupech také vyzkoušeny, avšak vedly pouze k získání rozkladných produktů, proto jsme se přiklonili k využití mírnějších podmínek slabého roztoku HCl v prostředí acetonu. Dalším úskalím této metody, na které jsme v průběhu jejího používání narazili, je možnost vzniku anhydridů boronové kyseliny, nazývaných heteroboroxiny.⁷⁴ Jejich vznik je naštěstí reverzibilní proces a dá se snadno zvrátit rozpuštěním ve vodě s mírně kyselým pH, proto bylo nutné finální produkty suspendovat ve vodě a následně ji odpařit alespoň dvakrát.



Obrázek 30: Transesterifikace pinakol-esterů boronových kyselin.

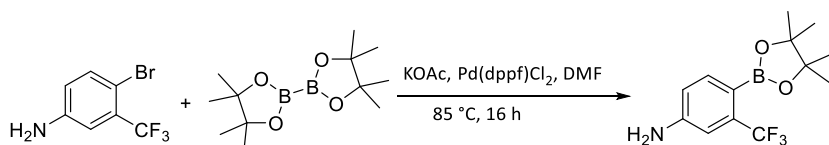
Miyaurova borylace

Při přípravě boronových bioisosterů flutamidu diskutovaných v publikaci **P4** bylo nezbytné syntetizovat 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3-(trifluoromethyl)anilin. K jeho přípravě jsme se rozhodli vyjít z 4-brom-3-(trifluormethyl)anilinu, který jsme za bezvodých podmínek pod ochranou atmosférou argonu nechali reagovat s bis(pinakolato)diborem (B_2Pin_2) v prostředí bezvodého DMF za přídavku baze KOAc a komerčně dostupného komplexu katalyzátoru s ligandem, konkrétně chloridu [1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen] palladnatého ($Pd(dppf)Cl_2$). Takto připravená reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 85 °C po dobu 16-ti hodin (Obrázek 31). Poté byla směs extrahována ethyl-acetátem (EtOAc) a produkt byl získán po čišťení sloupcovou chromatografií s použitím silikagelu jako stacionární fáze a DCM jako mobilní fáze.

Při vývoji této syntetické metody nám byla inspirací práce výzkumné skupiny Westcotta, ve které je popsána borylace bromovaných anilinů za pomoci různých komplexů dvojmocného palladia.⁷⁵ Z praktických důvodů jsme se rozhodli pro použití komerčně dostupného komplexu dvojmocného palladia $Pd(dppf)Cl_2$. Po sérii neúspěšných pilotních pokusů o optimalizaci reakčních podmínek (baze a rozpouštědlo), jsme došli ke zjištění, že reakce neprobíhá s (4-

brom-3-(trifluormethyl)anilinem v kvalitě dodané výrobcem (Fluorochem). Úspěšné borylace bylo dosaženo až po přečištění výchozího anilinu flash chromatografií.

Cílem této práce nebyla další optimalizace diskutované reakce, ale příprava vybraných derivátů v dostatečném množství a čistotě pro biologický screening. Další prostor pro zvýšení reakčního výtěžku borylace by mohlo představovat ochránění aminoskupiny výchozího anilinu, např. pomocí terc-butyloxykarbonylové (boc) funkční skupiny.



Obrázek 31: Schéma Miyaurovi borylace.

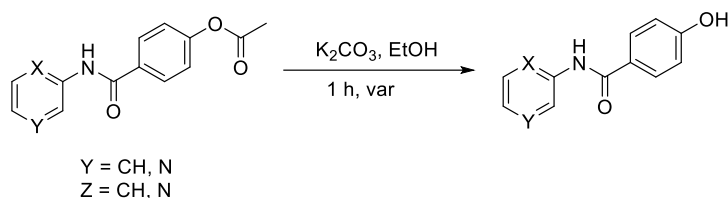
Hydrolyza esterů

Publikace **P3** se zabývala syntézou *N*-pyrazinylhydroxybenzamidů a *N*-pyridylhydroxybenzamidů a byla hodnocena biologická aktivita jak hydroxybenzamidů, tak jejich acetylovaných prekurzorů. Výchozí látkou pro syntézu amidů byla acetoxybenzoová kyselina a příslušný heterocyklický amin. Pro získání konečných hydroxybenzamidů byla nutná hydrolyza esterové funkční skupiny (Obrázek 32). Při této reakci byl příslušný acetoxybenzamid rozpuštěn v ethanolu s přidavkem K_2CO_3 a celá směs se byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Poté byla směs ochlazena, pevný K_2CO_3 byl odfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Vzniklý odparek byl vytřepán mezi EtOAc a vodnou fází s přidavkem triethylaminu (TEA). Vodná fáze byla nakonec okyselena 2 M HCl na pH 5 a uložena do lednice na dobu 3 hodin. Posledním krokem byla filtrace vzniklého precipitátu.

Nutno podotknout, že při syntéze těchto hydroxybenzamidů docházelo mnohdy k hydrolyze esteru již ve fázi syntézy amidu. To vedlo k izolaci směsi acetoxybenzamidů a finálního hydroxybenzamidů. Pravděpodobným důvodem štěpení může být vznik HCl během probíhající reakce, který způsobuje hydrolyzu acetoxy skupiny. Během práce s těmito deriváty bylo zjištěno, že namísto obtížného separování obou produktů bylo snazší celou směs podrobit hydrolyze pomocí K_2CO_3 a pro získání acetoxybenzamidů ji případně znovu acetylovat (vizte kapitolu níže).

Tento postup hydrolyzy esterů byl úspěšně využit i v rámci publikace **P4**, kde napomohl ke konverzi 2-methyl-1-oxo-1-[[4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3-

(trifluoromethyl)fenyl]amino}propan-2-yl acetátu na 2-hydroxy-2-methyl-*N*-[4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-3-(trifluoromethyl)fenyl]propanamid. Výsledný produkt byl poté použit k syntéze boronového bioisosteru hydroxyflutamidu.

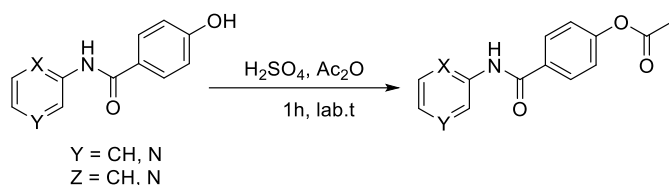


Obrázek 32: Hydrolýza esterů.

Acetylace fenolů

Jak je výše naznačeno, tak pro získání acetylovaných prekurzorů *N*-pyrazinylhydroxybenzamidů nebo *N*-pyridylhydroxybenzamidů, diskutovaných v publikaci **P3**, je výhodnější pro získání potenciálních proléčiv (nebo látek se zvýšenou lipofilitou) je acetylovat až zpětně.

Při této reakci byl navážen vhodný hydroxyderivát a rozpuštěn v acetanhydridu. Do této směsi bylo dále přidáno několik kapek koncentrované kyseliny sírové a celá směs byla míchána za laboratorní teploty po 1 hodinu (Obrázek 33). Poté byla reakční směs nalita na led a míchána do rozpuštění ledu. Poté byl vzniklý precipitát přefiltrován a promyt.



Obrázek 33: Acetylace fenolů.

Čištění, charakterizace a analytické hodnocení látek

Čištění látek probíhalo většinou metodou flash chromatografie na komerčně dostupných kolonách obsahujících sférický silikagel s použitím soustavy hexan+EtOAc jako mobilní fáze v gradientovém módu. Dále se pro čištění používala klasická sloupcová chromatografie na sférickém silikagelu s použitím DCM. Výjimkou nebylo ale ani použití rekrystalizace z vhodného rozpouštědla. Publikované látky byly vždy charakterizovány pomocí ^1H , ^{13}C NMR spekter, u finálních látek obsahujících ve struktuře bor bylo pro charakterizaci měřeno i ^{11}B NMR spektrum (**P2**, **P4**). Dále byla měřena IČ spektra, hmotnostní spektra (MS) a teploty tání. Čistota látek byla ověřována pomocí elementární analýzy s výjimkou fluorovaných látek, jejichž čistota

byla ověřována pomocí HPLC s UV detekcí. Detailní popis jednotlivých metod lze nalézt v metodické části komentovaných publikací (**P1—P4**).

Metody použitého molekulárního dockingu

V této kapitole bych rád shrnul a jasně definoval obecnou metodiku, kterou jsem použil při svých *in-silico* experimentech v publikacích **P2** a **P4**. V ostatních publikacích byly *in-silico* experimenty provedeny jinými členy autorského kolektivu.

Metodika templátového dockingu v rámci publikace P2

Dockovací experiment byl proveden s využitím dockovací funkce v MOE 2022.02 (Chemical Computing Group, Montreal, QC, Canada) s použitím silového pole AMBER10: EHT. Editující doména mykobakteriální leucyl-tRNA syntetázy (mtbLeuRS) (PDB ID: 5AGR), editující doména lidské LeuRS (hLeuRS1, PDB ID: 2WFD) a lidská cytosolická LeuRS (hLeuRS2, PDB ID: 6LPF) byly staženy z RCSB Protein Data Bank (PDB) databáze ([RCSB.org](https://www.rcsb.org)).⁷⁶ Struktura 5AGR byla nejprve upravena odstraněním artefaktů z krystalografie v sekvenčním editoru, jmenovitě se jednalo o molekuly Met-Leu a EDO (1,2-ethandiol). Poté byly vymazány molekuly rozpouštědla krom těch, které tvořily klíčové vodíkové můstky s aminokyselinovými zbytky. Struktura 2WFD byla upravena odstraněním nadbytečného řetězce B v sekvenčním editoru. Struktura 6LPF byla upravena v sekvenčním editoru odstraněním řetězce A, některých ligandů (LSS, GOL) a molekul rozpouštědla. Následně byl proveden prostorový překryv (superpozice) následujících enzymů: 5AGR bylo překryto s 2WFD a 5AGR s 6LPF. Pozice 5AGR byla nejprve fixována a poté musela být superponována na základě strukturních motivů, až poté bylo provedeno zarovnání sekvencí tak, aby odpovídalo superpozici. Pokud bylo překrytí provedeno jinak, tak nedošlo k úspěšnému překrytí krystalografických struktur. Všechny krystalografické struktury proteinů nebo jejich komplexů byly připraveny pro následný docking s použitím funkce QuickPrep (defaultní nastavení). Bivalentní adukty syntetizovaných sloučenin v rámci publikace **P2** a AMP byly vytvořeny pomocí ChemDraw 20.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA). Po importu těchto struktur do MOE, byly molekuly upraveny protonizací při pH 7, výpočtem parciálních nábojů a energetickou minimalizací do $\text{RMS} = 0.00001 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$. Adukty syntetizovaných sloučenin byly následně dockovány do struktury 5AGR s využitím funkce templátového dockingu, kdy templát byl definován na AMP část molekuly původního ko-krystalizovaného ligandu. Superponované struktury hLeuRS1 a hLeuRS2 byly inaktivovány

v průběhu dockování. Z třiceti nejlepších póz byly vybrány dvě finální pózy pro každý vstup (energetická minimalizace uvnitř induced-fit receptoru), za využití skórovací funkce GBVI, WSA dG. Výsledné pózy byly seřazeny podle vzestupné hodnoty skóre a byly hodnoceny vizuálně.

Metodika kovalentního dockingu v rámci publikace P4

Dockovací experiment byl proveden s využitím dockovací funkce v MOE 2022.02 (Chemical Computing Group, Montreal, QC, Canada) s použitím silového pole AMBER10: EHT. Krystalografická struktura domény vázající ligand (LBD) „wild type“ androgenního receptoru (WT AR), co-krystalizovaného s (*R*)-3-bromo-2-hydroxy-2-methyl-*N*-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)fenyl]propanamid (PDB ID: 2AX9), byla stažena z RCSB PDB ([RCSB.org](https://www.rcsb.org)).⁷⁶ Struktura 2AX9 byla upravena nejprve odstraněním přebytečných molekul vody vyjma těch, které tvořily vodíkové můstky mezi ligandem a dalšími dvěma aminokyselinovými zbytky Arg752 a Gln711. Poté byla struktura WT AR LBD připravena pro následný docking s použitím funkce QuickPrep (v defaultním nastavením). Struktury sloučenin **9a-P4** a **HFB** byly nakresleny v programu ChemDraw 20.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA). Po importu těchto struktur do programu MOE, byly molekuly upraveny protonizací při pH = 7, výpočtem parciálních nábojů a energetickou minimalizací do RMS = 0,00001 kcal.mol⁻¹Å⁻¹. Po těchto úpravách byly sloučeniny dockovány do struktury 2AX9 s využitím funkce „general docking“ s definovaným farmakoforovým modelem. Farmakoforový model byl definován na základě struktury co-krystalizovaného ligandu ve struktuře 2AX9, pozice kyslíkového atomu z amidové vazby byla nastavena jako akceptor, pozice dusíkového atomu z amidové vazby jako donor a „R-value“ byla nastavena na 1 Å. Z třiceti nejlepších póz bylo vybráno pět finálních póz pro každý vstup (energetická minimalizace uvnitř rigidního receptoru), za využití skórovací funkce GBVI, WSA dG. Připravené sloučeniny byly také dockovány do 2AX9 s využitím funkce kovalentního dockingu. Reaktivní místo bylo definováno jako dusíkový atom guanidinové funkční skupiny z aminokyselinového zbytku Arg752. Schéma popisující vznik kovalentní vazby mezi boronovou funkční skupinou a guanidinovou funkční skupinou bylo nakresleno v ChemDraw 20.0 a bylo uloženo ve formátu .rdf, poté bylo použito k formátování kovalentní reakce v MOE (Obrázek 34). Z třiceti nejlepších póz bylo vybráno pět finálních póz pro každý vstup (energetická minimalizace uvnitř rigidního receptoru) za využití skórovací funkce GBVI, WSA dG. Výsledné pózy tohoto *in-silico* experimentu byly hodnoceny vizuálně.



Obrázek 34: Reakční schéma použité pro definování vzniku kovalentní vazby v MOE.

Biologický screening

Ve všech komentovaných publikacích se opíráme o výsledky fenotypového biologického screeningu, jehož vlastní provedení probíhalo na spolupracujících pracovištích. Přesný seznam testovaných kmenů a příslušná metodika je uvedena v komentovaných pracích (**P1—P4**). V této sekci jsou pouze shrnuty základní varianty screeningu, které během vypracování práce byly použity.

Antimykobakteriální screening

Ve většině komentovaných prací jsme se soustředili na syntézu a hodnocení látek, které by vykazovaly inhibiční aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Vzhledem k tomu, že Mtb je velice infekční a nebezpečný agens, je pro práci s ním potřeba pracoviště s vyšším zabezpečením biohazardu. Z tohoto důvodu antimykobakteriální screening probíhal na dvou pracovištích. Na Katedře biologických a lékařských věd pod vedením PharmDr. Ondřeje Jandourka, Ph.D v rámci Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové probíhal screening na takzvaných surogátech a nepatogenních mykobakteriálních kmenech. Surogáty jsou mykobakterie, které nejsou infekční a vykazují podobnou citlivost na antimikrobiální látky.^{77, 78} Typickými surogáty jsou kmeny *M. smegmatis* a *M. aurum*. Jelikož citlivost surogátů není vždy identická s citlivostí Mtb, tak byly látky testovány standardně také proti avirulentnímu kmeni Mtb H37Ra. Jedná se o oslabený kmen standardního virulentního kmene Mtb H37Rv, se kterým lze pracovat i v běžných laboratořích.⁷⁹ Mimo těchto komentovaných kmenů se dále testovalo i proti dalším mykobakteriálním kmenům jako *M. avium* a *M. kansasii*.⁸⁰

Perspektivní látky byly testovány proti patogennímu kmeni Mtb H37Rv či v některých případech proti dvěma rezistentním klinickým izolátům Mtb. Testování probíhalo ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové pod vedením MUDr. Pavly Paterové, Ph.D.

Antibakteriální a antifungální screening

Ve většině komentovaných publikací (**P1**, **P2** a **P3**) byly diskutované látky rutinně podrobovány screeningu proti referenčním kmenům klinicky významných gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, hub a kvasinek. Testování probíhalo na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Testování prováděla paní Ida Dufková pod vedením RNDr. Kláry Konečné, Ph.D.

Antiproliferativní screening

V publikacích **P1**, **P2** a **P4** se odkazujeme na výsledky antiproliferativního screeningu. Látky zamýšlené jako antituberkulotika byly rutinně testovány na zjištění aktivity proti HepG2 linii buněk hepatocelulárního karcinomu s 24hodinovou inkubací látek. Tato linie buněk se běžně používá jako model hepatotoxicity při výzkumu potenciálních léčiv. Publikace **P4** se zaměřuje na screening látek proti buněčným liniím rakoviny prostaty. V rámci tohoto screeningu byly látky testovány na dvou liniích rakoviny prostaty. Na linii buněk rakoviny prostaty senzitivní na inhibici androgenního receptoru tzv. androgen-dependentní (AD) linii buněk rakoviny prostaty LAPC-4 se 72hodinovou inkubací, dále na androgen non-dependentní linii buněk rakoviny prostaty PC-3 s inkubací 24 hodin. Pro důkladné prozkoumání selektivity diskutovaných látek, byly perspektivní látky testovány proti PC-3 linii buněk také se 72hodinovou inkubací a jejich selektivita proti nádorovým buňkám byla dále zkoumána v porovnání s inhibicí lidských zdravých nenádorových ledvinných buněk HK-2.

Screening látek proti liniím HepG2, PC-3 a HK-2 probíhal na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové pod vedením PharmDr. Pavla Bárty PhD. Testování látek proti linii LAPC-4 probíhalo na Katedře farmakologie a toxikologie Lékařské fakulty v Plzni pod vedením Mgr. Romana Vitáka.

Pokročilé biologické testování

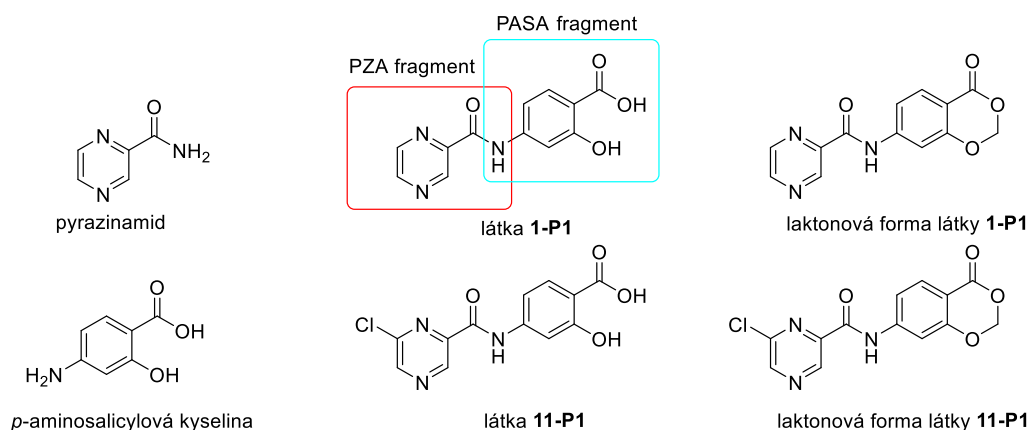
Příležitostně se v rámci některých komentovaných publikací (zejména **P1** a **P3**) naskytla možnost pokročilých biologických experimentů. Tyto experimenty byly provedeny vždy v rámci spolupráce s jinými pracovišti a jejich metodika je důkladně popsána v metodické části příslušných publikací. Z důvodu nárazovosti a rozličnosti těchto experimentů zde nebudou blíže komentovány.

Komentář k publikovaným pracím

Z důvodu přehlednosti a jednotného číslování připravených derivátů v komentáři a publikacích, jsou zde látky označovány číslem sloučeniny v publikaci a číslem publikace. To znamená, pokud je komentována látka **1-P1**, znamená to, že se jedná o látku, která je v publikaci **P1** označena číslem **1**.

Publikace P1: hybridní sloučeniny pyrazinamidu a *p*-aminosalicylové kyseliny

Tato práce se soustředila na design, syntézu a biologického hodnocení hybridních sloučenin, které by se daly využít jako potenciální antituberkulotika. Terapie TB, přesněji inhibice mykobakteriálních kmenů je jednou z oblastí, která se může zdát ideální pro uplatnění principu hybridizace při vývoji potenciálních léčiv. Důvodem je fakt, že při léčbě TB se v terapii kombinuje několik antituberkulotik, přičemž každé působí jiným mechanismem účinku tak, aby došlo k úplné eliminaci mikroba z organismu a omezilo se riziko rozvoje resistance. Proto se nabízí jako vhodné řešení snaha připravit molekulu kombinující dva a více farmakoforů, která by dokázala ovlivňovat více než jeden molekulární cíl. V této práci se vychází ze dvou komerčně dostupných antituberkulotik (Obrázek 35). Na jedné straně je to pyrazinamid (PZA), který se používá jako antituberkulotikum první linie, které v kombinační terapii slouží pro zkrácení léčby z 9 na 6 měsíců. Na straně druhé se PZA kombinuje s *para*-aminosalicylovou kyselinou (PASA), jakožto antituberkulotikem druhé linie, který se v dnešní době používá zejména v rozvojových zemích z důvodů své nízké ceny a vysoké dostupnosti. Jeho zásadní nevýhodou jsou zejména nízká biologická dostupnost po perorálním podání, nutnost podávání vysokých dávek z důvodu rychlého metabolismu pomocí *N*-acetyl transferázy 1 (NAT-1) a s tím spojená gastrointestinální intolerance. Cílem této práce byla příprava originálních molekul, které by vykazovaly slibnou antimykobakteriální aktivitu proti citlivým a rezistentním mykobakteriálním kmenům. Dále bylo cílem zlepšit farmakokinetický profil, zejména pak kompenzovat výše popsané nedostatky PASA.



Obrázek 35: Souhrnný obrázek významných struktur vztahujících se k publikaci P1.

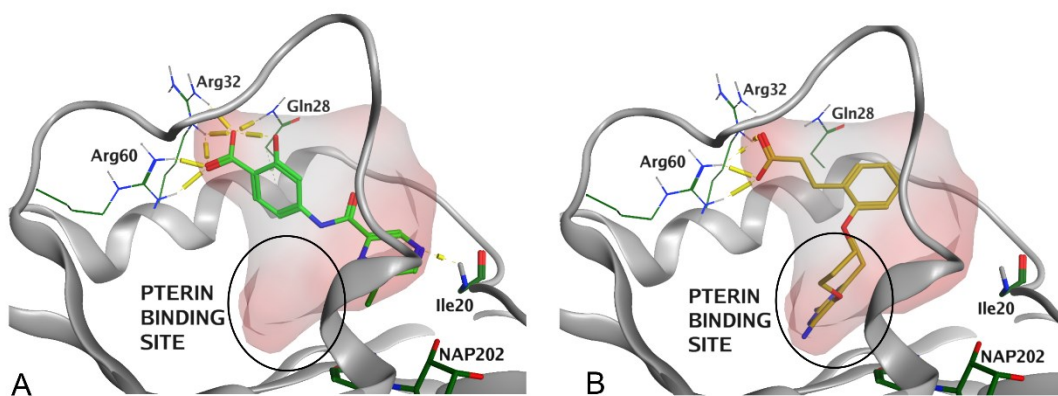
Výchozí strukturou pro diskutovanou sérii hybridních molekul byla látka **1-P1**, ve které je farmakofor PZA spojen pomocí amidové vazby s aminoskupinou farmakoforu PASA (Obrázek 35). V první části této práce bylo připraveno jedenáct pilotních hybridních sloučenin lišících se v substituci na PZA farmakoforu. Tyto látky byly nejprve podrobeny screeningu inhibiční aktivity mykobakteriálních kmenů (podrobněji v publikaci **P1**), zejména jsme se soustředili na aktivitu získanou proti virulentnímu kmeni *Mtb* H37Rv. Pokud nebude uvedeno jinak, diskutovaná aktivita se bude vztahovat právě k tomuto kmeni. Výsledky tohoto pilotního screeningu můžeme shrnout následovně: všechny sloučeniny vykazovaly střední až silnou inhibici *Mtb* H37Rv s MIC = 25–3,13 µg/ml, lipofilně substituované deriváty vykazovaly obecně silnější inhibici než hydrofilně substituované deriváty. Derivát, který měl pyrazinový fragment zastoupený ve formě imidazopyrazinu byl jediným ze série, který nevykázal žádnou aktivitu. Nejvíce se osvědčil hybrid **11-P1** substituovaný chlorem v poloze šest pyrazinového jádra. Ve srovnání se standardy deriváty vykazaly inhibici srovnatelnou s PASA a nižší inhibici než INH. Z výsledků pilotního screeningu lze usuzovat, že vlastní substituce pyrazinového heterocyklu není zcela zásadní pro tuto sérii sloučenin a vyšší aktivitu lipofilních látek lze jednoduše vysvětlit obecně snazším průnikem látek přes velice lipofilní membránu mykobakterií. Abychom tuto tezi důkladněji prozkoumali, bylo připraveno několik analogů neaktivnější sloučeniny z pilotního screeningu, které měly za úkol ověřit význam přítomnosti pyrazinového jádra ve struktuře diskutovaných látek. Proto byly připraveny strukturální analoga, ve kterých byl 6-chlorpyrazinový fragment zaměněn za 3-chlorfenylový, 6-chlor-2-pyridylový a 5-chlor-2-thienylový substituent. Z výsledků screeningu bylo patrné, že pyrazinové jádro nemá ve struktuře zásadnější postavení pro zachování *in vitro* antimykobakteriální aktivity proti *Mtb* H37Rv. Tato skutečnost nás i přes neznalost mechanismu účinku již v těchto fázích navedla

k myšlence, že dost pravděpodobně je účinek vázán zejména na farmakofor PASA. Tato teze byla záhy podpořena dalšími experimenty, pro které byla připravena série látek se zachovaným fragmentem pyrazinkarboxamidu nebo 6-chlorpyrazinkarboxamidu (nejúčinnější kandidát z původní série) s obměněnými fragmenty původního PASA farmakoforu, kdy se měnilo postavení a pozice COOH a OH skupiny na benzenovém jádře, zkoumala se také možnost nahrazení OH skupiny methylem a také methylace OH skupiny. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že jakákoliv modifikace PASA fragmentu vedla ke ztrátě antimykobakteriální aktivity. Tento fakt podtrhuje jeho význam pro působení navrhovaných hybridních sloučenin a jednoznačně poukazuje na možný mechanismus účinku spojený s působením PASA fragmentu. Pro úplnost komentáře z hlediska SAR je třeba zmínit, že další optimalizace struktury se ubíraly směrem k přípravě proléčiv se zvýšenou lipofilitou, jež měla za cíl zvýšit průnik sloučeniny **11-P1** mykobakteriální membránou. Připravené propyl-estery hybridních sloučenin přinesly pouze mírné zvýšení inhibiční aktivity. Jako velice efektivní se ukázal druhý přístup přípravy proléčiv cyklizací PASA fragmentu na formu δ -laktonu. Pokud porovnáme biologickou aktivitu laktonových forem s původními hybridy, můžeme vidět na příkladu nejaktivnější sloučeniny **11-P1** s MIC = 10,7 μ M proti MIC = 2,6 μ M parentní látky **11'-P1**, že došlo přibližně k 5-ti násobnému zvýšení aktivity, na příkladu sloučeniny **1-P1** s MIC = 96,4 μ M proti **1'-P1** s MIC = 11,5 μ M došlo k 9-ti násobnému zvýšení aktivity.

V rámci komentování této práce nelze nezmínit snahu o objasnění mechanismu účinku těchto hybridních sloučenin. Jak již vyplynulo ze studia vztahů SAR, bylo zjevné, že mechanismus účinku komentovaných hybridů úzce souvisí s fragmentem PASA. Na základě tohoto zjištění jsme spekovali, zda potenciálním mechanismem účinku nemůže být právě inhibice folátové cesty. PASA jakožto antimetabolit *para*-aminobenzoové kyseliny (PABA) působí jako substrát pro dihydropteroátsyntázu (DHPS) a vede k produkci hydroxydihydrofolátu, ten pak funguje jako inhibitor dihydrofolátoreduktázy (DHFR). Pro ověření této hypotézy byla provedena série nepřímých testů, které poukazují na fakt, že právě inhibice DHFR je cílem těchto hybridních sloučenin v mykobakteriích. Mezi základními důkazy patří zejména skutečnost, že nadprodukce enzymů DHFR DfrA nebo RibD vedla k výraznému zvýšení rezistence kmene Mtb H37Ra na sloučeninu **11-P1**. Toto tvrzení bylo dále nepřímo potvrzeno studiem profilu mykolových kyselin v buňkách patogenní Mtb H37Rv, při kterém se ukázalo, že dochází k narušení produkce methoxymykolových kyselin a mykolových kyseliny obsahující cyklopropylovou substituci.

Jelikož je produkce těchto kyselin katalyzována S-adenosyl-methionin (SAM)-dependentní methyltransferázou, předpokládáme, že pozorovaný efekt našich látek na produkci mykolových kyselin je způsobený deplecí SAM v důsledku původního přerušení folátové cesty.^{81, 82}

Ve snaze přiblížit možný způsob vazby sloučeniny **11-P1** do mykobakteriální DHFR bylo provedeno několik *in-silico* experimentů. Prvním z experimentů byl molekulární docking látky **11-P1** do krystalografické struktury Mtb DHFR dostupné z PDB (PDB ID: 5U26). Z výsledků molekulárního dockingu můžeme vyvozovat několik závěrů. Prvním velice zjevným závěrem je, že diskutované hybridy, se nemohou vázat do vazebného místa DHFR stejným způsobem, jako přirozený substrát dihydrofolát nebo potvrzený inhibitor methotrexát. Důvodem je neschopnost hybridů vytvořit ohnutý tvar do písmene „L“, který přirozeně zaujímá pteridinové jádro k fragmentu PABA (Obrázek 36). Příčinou toho je amidická vazba, která funguje jako linker pro diskutované „fused hybrids“, její rigidita způsobuje nemožnost většího vychýlení jader z planárního uspořádání. Přesněji řečeno, pokud by se námi diskutované hybridy měly přizpůsobit do tohoto ohnutého uspořádání došlo by k výraznému navýšení energie systému. Dále můžeme pozorovat, že karboxylát látky **11-P1** vykazuje silnou iontovou interakci s Arg32 a Arg60, tato interakce je charakteristická pro většinu karboxylátů inkorporovaných ve strukturách inhibitorů DHFR popsaných v literatuře. Další zajímavou interakci tvoří pyrazinové jádro látky **11-P1**, zde slabý vodíkový můstek stabilizuje pozici pyrazinového jádra ke kostře Ile20. Chlor v pozici 6 dle našich výsledků zaujímá stejný prostor jako atom chloru v potvrzených inhibitech DHFR cykloquanilu a pyrimethaminu, což by částečně mohlo podtrhovat význam této polohy pro lipofilní substituci. Z výsledků provedené molekulové dynamiky bylo patrné, že farmakofor PASA je velice stabilně ukotven ve vazebném místě. Na rozdíl od pyrazinového jádra, které oscilovalo zejména mezi dvěma polohami, přičemž se vždy vracelo do původní pózy z dockingu.



Obrázek 36: Výsledky dockingu do krystalografické struktury Mtb DHFR (PDB ID: 5U26). A) Predikovaná póza látky 11-P1 (zelená barva) v aktivním místě Mtb DHFR. B) Póza vykrytalizovaného inhibitoru p218 (žlutá barva) v aktivním místě Mtb DHFR.

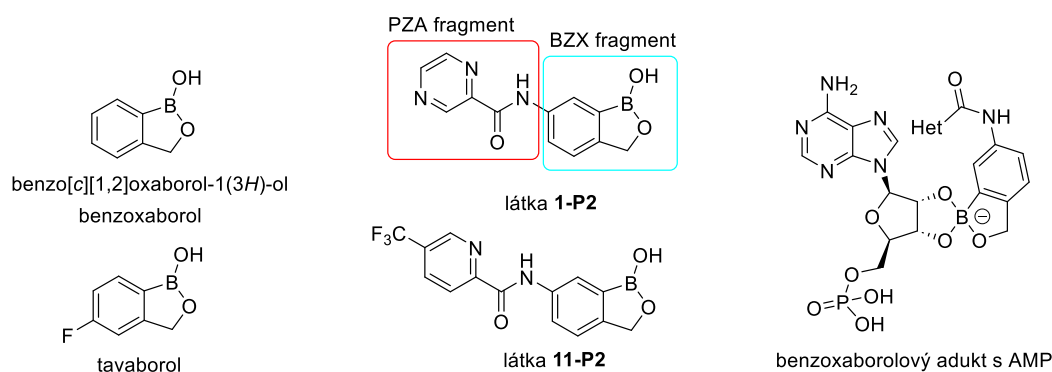
V rámci diskutované práce byly provedeny testy metabolické stability. Stabilita testovaná v lidské plazmě *in vitro* potvrdila velice rychlý rozpad δ -laktonu na původní hybrid obsahující farmakofor PASA s biologickým poločasem $t_{1/2} = 21,4$ minuty. Metabolické studie v jaterních mikrozomech *in vitro* prokázaly opět rozpad laktonového proléčiva na původní hybrid. Dále lze z výsledků vyvodit, že látka **11-P1** se s největší pravděpodobností metabolizuje hydrolýzou amidové vazby na původní karboxylovou kyselinu a PASA. Při porovnání biologických poločasů laktonového proléčiva ($t_{1/2} = 13$ min) a hybridní molekuly ($t_{1/2} = 187$ min) je zřejmé, že mnohem rychleji dochází rozpadu laktonu než k hydrolýze amidové vazby. Z důvodů, že jedním z hlavních negativ PASA jako léčiva je rychlý first-pass efekt způsobený rychlou *N*-acetylací, která vede k tvorbě acetyl-PASA (neaktivní metabolit) a glycyl-PASA (částečně aktivní), nabízí se porovnání biologického poločasu hybridu **11-P1** právě s PASA ($t_{1/2} = 0,7 - 1$ h).⁸³ Zde lze vidět, že tvorbou hybridu došlo k výraznému prodloužení biologického poločasu, zvýšení stability molekuly a obecné optimalizaci farmakokinetických parametrů PASA při zachování antimykobakteriální aktivity.

Z důvodu velice slibných výsledků připravených hybridů byly provedeny pokročilé biologické testy, které ze své povahy nejsou zcela stěžejní pro objasnění vztahu mezi strukturou a účinkem, proto budou v tomto komentáři pouze stručně shrnuty. Hybrid **11-P1** a jeho lakton **11'-P1** byly dále otestovány na inhibici dvou klinických izolátů MDR-Mtb kmenů. MDR-Mtb je definován jako kmen rezistentní proti INH a zároveň rifampicinu (RIF). Z výsledků je patrné, že diskutovaný hybrid **11-P1** si udržel svou antimykobakteriální aktivitu i proti dvěma MDR-Mtb kmenům. *In vitro* cytotoxický screening proti linii buněk HepG2 neprokázal výraznou cytotoxicitu napříč diskutovanou sérií, vyjma připravených propyl-esterů fragmentu PASA, kdy

tato modifikace vedla ke zvýšení jejich cytotoxicity. Hybrid **11-P1** neprokázal žádnou toxicitu během *in vivo* hodnocení na *Galleria mellonella* a zebrafish modelu. Testování na myších modelech infikovaných TB *in vivo* prokázalo, že hybrid **11-P1** přesněji jeho sodná sůl je schopný snižovat počet CFU v myších slinivkách. Antibakteriální a antifungální screening diskutované série hybridů neprokázal žádnou významnou aktivitu na testovaných kmenech. Tento fakt podporuje potřebnou selektivitu látek a lze jej vysvětlit objasněným MOA, neboť bakterie nejsou schopné využít PASA jako stavební kámen ve folátové biosyntetické cestě.

Publikace P2: hybridy cílící na inhibici leucyl-tRNA syntetázy

Tato publikace se zaměřuje na design, syntézu a *in-vitro* biologické hodnocení série sloučenin, které cílí svůj účinek na inhibici enzymu leucyl-tRNA syntetázy (LeuRS). Tento enzym přenáší leucyl na molekulu tRNA, která je pak využita pro syntézu proteinu. Inhibicí tohoto enzymu dochází k inhibici proteosyntézy, a tudíž buněčné smrti.⁸⁴ Jako slibné inhibitory LeuRS mimo jiných molekul se ukázaly látky nesoucí farmakofofor (3*H*)-benzo[*c*][1,2]oxaborol-1-olu pro přehlednost označovaného jako benzoxaborol (BZX). Látky nesoucí tento farmakofofor mnohdy vykazují tzv. oxaborol tRNA-trapping (OBORT) mechanismus účinku. OBORT mechanismus účinku využívá schopnosti atomu boru se kovalentně vázat na *cis*-dioly 3'-terminálního adenosinového nukleotidu Ade76 tRNA^{Leu} za vzniku kovalentního aduktu (Obrázek 37).⁸⁴ Takto vzniklý adukt pak způsobuje zaseknutí 3'konce tRNA^{Leu} v editující doméně enzymu LeuRS a vytváří neproduktivní komplex. To v konečném důsledku vede k inhibici leucylace a tím pádem inhibici proteosyntézy.

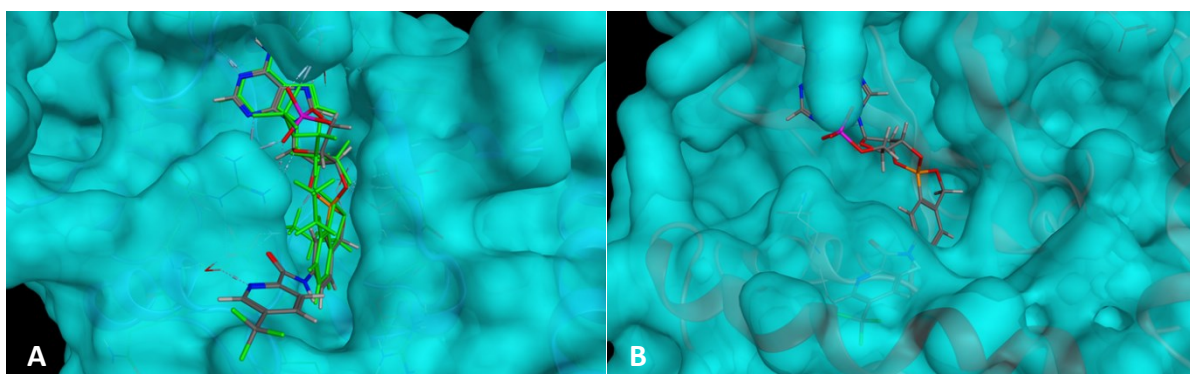


Obrázek 37: Souhrnný obrázek významných struktur vztahujících se k publikaci P2.

Při vývoji látek diskutovaných v této práci jsme vyšli na rozdíl od předchozí publikace přímo od cílové struktury, kterou jsme měli v plánu inhibovat, tedy Mtb LeuRS. Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že bakteriální a lidská LeuRS mají mezi sebou značné strukturní rozdíly,

zejména v oblasti editující domény. Tyto rozdíly jsou způsobeny čtyřmi inserty specifickými pro eukaryota, které se právě nachází v lidské cytosolické LeuRS.⁸⁵ Jeden z těchto insertů způsobuje částečný překryv vstupu do vazebného místa a způsobuje nemožnost vazby více objemných sloučenin.⁷¹ Tento rozdíl mezi mykobakteriální a lidskou LeuRS vedl k tezi pro vývoj selektivních molekul. Pro ověření této hypotézy byly z PDB databáze staženy dvě dostupné krystalografické struktury editující domény LeuRS, na jedné straně to byla editující doména Mtb H37Rv LeuRS (mtbLeuRS) vykryštalizovaná s aduktem benzoxaborolového derivátu s AMP (PDB ID: 5AGR). AMP v rámci tohoto aduktu sloužilo jako modelová látka místo Ade76 tRNA^{Leu}. Na straně druhé to byla editující doména lidské cytosolické LeuRS (hLeuRS) (PDB ID: 2WFD). Při překrytí obou krystalografických struktur v MOE jsme došli ke dvěma závěrům, prvním bylo zjištění že sekvenční podobnost mtbLeuRS a hLeuRS je velice nízká, což do značné míry nahrává vývoji selektivních látek. Druhým závěrem bylo zjištění, že v blízkosti aktivního místa enzymu se opravdu u hLeuRS nachází navíc specifický alfa-helix (Arg⁴⁵⁷GluLysLeuAlaGluAlaLysGluLysIleTyrLeuLysGlyPheTyrGlu⁴⁷⁴), který zakrývá přístup k vazebnému místu. Z důvodu slabého rozlišení struktury 2WFD jsme se rozhodli tyto výsledky ještě ověřit překrytím 5AGR s další krystalografickou strukturou hLeuRS (PDB ID: 6LPF). Nicméně závěry z tohoto překrytí byly totožné jako při překrytí s 2WFD. Na základě tohoto zjištění bylo navrženo několik sloučenin vycházejících ze struktury benzoxaborolu substituovaného v poloze 6 objemným aromatickým nebo heteroaromatickým substituentem napojeným pomocí amidové vazby. Při designu pilotní látky se jednalo opět o kombinaci PZA s benzoxaborolem spojených amidovou vazbou. Stejně jako v případě předchozí komentované publikace, tak i zde můžeme na některé sloučeniny pohlížet jako na fúzované hybridní molekuly, ve kterých se kombinuje právě pyrazinamid, či jeho blízké deriváty s farmakoforem benzoxaborolu, který by se dal považovat za zjednodušenou variantu antimykotického léčiva tavaborolu. Objemná substituce do polohy 6 BZX farmakoforu byla vybrána za předpokladu, že v případě mtbLeuRS bude objemná substituce exponovaná zejména do vnějšího prostoru, ale v případě hLeuRS bude objemný substituent příliš velký na to, aby se vměstnal do aktivního místa a bude tvořit výraznou prostorovou překážku s α -helixem hLeuRS. Tyto sterické zábrany byly předpokladem selektivity účinku těchto látek. Pro ověření této hypotézy byl v rámci diskutované práce proveden molekulární docking plánované série pilotních látek do struktury mtbLeuRS. Vzhledem k tomu, že jsme u série předpokládali OBORT mechanismu účinku bylo zjevné, že látky musí fungovat ve formě aduktu s Ade76 tRNA^{Leu}. Pro zjednodušení výpočetních

prací jsme zaměnili Ade76 molekulou AMP a pro praktické dockování byla připravena série hotových aduktů pilotních látek s AMP v obou možných optických izomerech, byť je nutné podotknout, že z logiky věci je pouze jeden z izomerů schopný se vázat do aktivního místa. Docking předpokládaných aduktů byl proveden pomocí templátového dockingu, který je velice výhodný v případech, kdy je znám způsob vazby látek do receptoru a zkoumá se pouze vliv substitucí. Jelikož v tomto případě je známo, že vazba aduktu v oblasti AMP bude poskytovat vždy stejné interakce a zajímá nás pouze výskyt nových interakcí v oblasti aromatické substituce, příp. sterických překážek, tak je tento způsob dockingu zcela ideální. Zvolený templát byl nastaven na oblast AMP ze struktury 5AGR. Z výsledků *in-silico* experimentu bylo zjevné, že látky by měly mít potenciál pro vazbu do mtbLeuRS (Obrázek 38). Získané pózy odpovídali našim předpokladům a nedocházelo u nich k výraznému vychýlení AMP fragmentu aduktů oproti původnímu templátu, které by v případě neoptimální substituce bylo patrné. Nebyly pozorovány ani případné sterické zábrany, které by indikovaly problém s vazbou našich látek do mtbLeuRS. Některé pyrazinové a pyridinové deriváty nesoucí dusíkový atom v sousedství karboxamidové skupiny tvořily specifický vodíkový můstek s Asp447 přes molekulu vody. Interakce tohoto aminokyselinového zbytku s aminomethylskupinou byla popsána jako zásadní u derivátů studovaných Palenciou a kol.⁷¹ V některých případech aromatická substituce také vykazovala další arene-H interakce s vodíkovým atomem Thr476. Pro dokončení našeho předpokladu byly výsledky dockingu do mtbLeuRS srovnány s hLeuRS v superpozici. Z výsledků bylo zjevné, že přídatný α -helix v lidském enzymu by měl působit výrazné prostorovou překážku pro navázání látek s objemným substituentem, zejména z důvodu přítomnosti Tyr468. Na základě těchto výsledků předpokládáme selektivitu a neschopnost látek ovlivňovat lidský enzym.



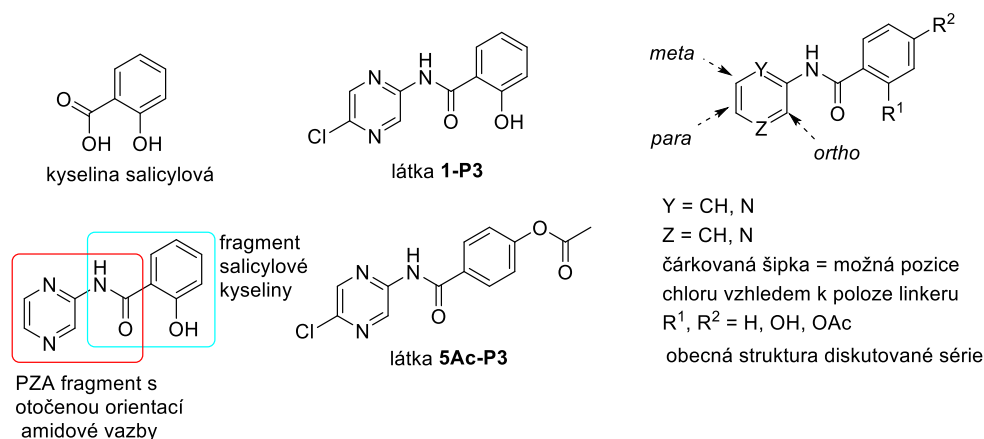
Obrázek 38: Výsledky *in-silico* experimentu v rámci publikace P2. A) Krystalografická struktura mtbLeuRS (PDB ID: 5AGR) ko-krytalizovaná s aduktem potvrzeného inhibitoru (zelená barva) se znázorněnou predikovanou pózou aduktu látky 11-P2 (šedá barva). B) Superponovaná krystalografická struktura hLeuRS (PDB ID: 2WFD) se znázorněnou predikovanou pózou aduktu 11-P2 (šedá barva).

Celkem bylo v rámci této práce připraveno devatenáct nových látek. Tyto látky byly podrobeny screeningu na inhibici panelu mykobakteriálních kmenů. Zároveň byly z důvodu ověření selektivity podrobeny screeningu na buněčné linii HepG2, která se běžně využívá pro ověření jaterní toxicity. Z důvodu stručnosti zde bude dále komentována aktivita jen proti patogennímu kmeni Mtb H37Rv. Na základě získaných výsledků můžeme usuzovat, že substituce BZX v poloze 6 arylem případně heteroarylem propojených pomocí amidové vazby vede k látkám s antimykobakteriálním účinkem. Většina látek vykazovala inhibiční aktivitu. Z pyrazinových derivátů byl nejaktivnější derivát substituovaný v poloze 5 chlorem. Jedná se o mírnou změnu při srovnání s předchozí publikací **P1**, kde se jako nejvhodnější jevila substituce chlorem v poloze 6, nicméně substituce v této poloze se v publikaci **P2** ukázala jako méně výhodná. Celkově vykazovaly vyšší aktivitu opět látky s lipofilní substitucí než látky s hydrofilní substitucí (amino, hydroxy). Nicméně je nutné zmínit, že nebyla nalezena přímá korelace mezi vypočítanými hodnotami lipofility a inhibiční aktivitou. Substituce pyrazinového jádra v poloze 3 aminoskupinou vedla k úplné ztrátě aktivity proti Mtb H37Rv. Jako preferovaná se zdá být halogenová substituce v poloze 5 na dusíkatém heterocyklu. I v této publikaci jsme sledovali vliv přítomnosti pyrazinového jádra na aktivitu sloučenin. V této práci však benzenový analog vykázal nepatrnou ztrátu aktivity proti sledovanému kmeni a výraznou ztrátu aktivity proti většině zbylých testovaných kmenů. Naproti tomu záměna pyrazinu za 2-pyridyl se zdá být tolerovatelná. Při srovnání pyridinových derivátů vidíme, že výrazně vyšší aktivity bylo dosaženo u derivátů obsahujících dusík v poloze 2 vůči karboxamidové skupině. To by částečně mohlo být podpořeno výsledky počítačového modelování, protože pouze tyto deriváty a jejich pyrazinová analoga jsou schopny tvořit interakci s Asp447 přes molekulu vody. Tento jev lze dále podpořit srovnáním výsledků sloučeniny **9-P2** a **13-P2**, kdy pouze pyrazinový analog může tvořit tento vodíkový můstek, a proto je u něj alespoň částečně zachována příslušná aktivita. Jako nejaktivnější sloučenina z celé série se ukázal derivát substituovaný 5-trifluor-2-pyridylem **11-P2**, který dosáhl MIC = 9,72 μ M. Přibližně polovina látek z diskutované série vykazovala aktivitu vyšší než nesubstituovaný BZX, sloučenina **11-P2** pak vykazovala srovnatelnou inhibiční aktivitu s aktivitou 3-aminomethylbenzoxaborolu, syntetizovaného vědeckým týmem Palencii, na kterém je právě poukázán význam interakce s Asp447.⁷¹ Žádná z testovaných látek se nepřiblížila svoji aktivitou standardu INH. Slibní kandidáti z diskutované série byli dále podrobeni testování proti klinickým izolátům MDR-TB z fakultní nemocnice v Hradci Králové (IZAK, MATI), testování na těchto kmenech neprokázalo významný pokles inhibice proti

rezistentním kmenům. Z hlediska toxicity většina ze zkoumaných látek nevykázala v testovaném rozmezí žádnou inhibici na HepG2 buněčné linii, vyjma několika derivátů, které prokázaly slabou inhibici. Je nutné zde podotknout, že během screeningu na buněčné linii HepG2 jsme narazili na problémy s rozpustností a z toho důvodu zejména u lipofilních derivátů nebylo možné testování provést v plném rozsahu testovaných koncentrací. Nicméně při pohledu na celkový trend rozpustných analogů můžeme soudit, že až na výjimky látky nevykazovaly žádnou toxicitu proti linii HepG2. Screening diskutovaných látek proti panelu klinicky významných kmenů bakterií a hub neukázal významné aktivity a podtrhuje tak selektivitu diskutovaných sloučenin.

Publikace P3: odklon od hybridů a snaha objasnění neznámého mechanismu účinku

Výše diskutované struktury by jednoduše mohly být klasifikovány jako „fused hybrids“. Do tohoto označení již jen těžko zahrneme struktury popisované v této experimentální práci. Přesto však u těchto sloučenin nalezneme značnou podobnost zejména s molekulami diskutovanými v publikaci **P1**. V této práci se zaměřujeme na syntézu a optimalizaci derivátů *N*-pyrazinyl- a *N*-pyridylhydroxybenzamidů (Obrázek 39). V tom prvním případě je podobnost s látkami diskutovanými v **P1** zjevná. Jedná se o sloučeniny obsahující pyrazinový kruh spojený amidovou vazbou s druhým aromatickým jádrem. Původní fragment PASA u struktur diskutovaných v **P1** je zbaven karboxylové funkční skupiny a poloha hydroxylové funkční skupiny je obměněna. Další změnou, kterou zde můžeme pozorovat je změna orientace amidové vazby, která je otočena na rozdíl od hybridních molekul v **P1**. Nicméně i přes tyto rozdíly, zde stále můžeme najít jistou spojovací niť s hybridními molekulami, a to derivát **1-P3**, který při bližším srovnání můžeme považovat za hybrid mezi kyselinou salicylovou a PZA s tím rozdílem, že je zde otočen amidový linker. Vlastním cílem této práce byla zejména snaha podrobně zmapovat a optimalizovat SAR a odhalit MOA u dvou slibných kandidátních struktur popsanych již dříve naší skupinou.⁸⁶ Vzhledem k tomu, že nebyl znám molekulární cíl kandidátních látek, tak jedinou možností pro dosažení vytyčeného cíle v rámci komentované práce byla snaha co nejvíce systematicky obměňovat jednotlivé části molekul a porovnat vliv obměn s výsledky aktivit získaných z celobuněčného screeningu.



Obrázek 39: Souhrnný obrázek významných struktur vztahujících se k publikaci P3.

V rámci této práce bylo připraveno celkem padesát devět derivátů *N*-pyrazinyl- a *N*-pyridylhydroxybenzamidů lišících se v poloze substituce heterocyklu atomem chloru, polohou hydroxylové skupiny na benzenovém jádře, protekcí hydroxyskupiny acylem a v případě pyridinových derivátů polohou dusíku v heterocyklu. Připravené látky byly zamýšleny původně jako látky vykazující slibnou antibakteriální aktivitu proti stafylokokům. Z výsledků je patrné, že nejvyšší antibakteriální aktivita byla pozorována u derivátů *N*-pyrazinylbenzamidů s vysokou selektivitou vůči kmenu *Staphylococcus*. Isosterní záměna původního pyrazinového jádra vedla ke sloučeninám se srovnatelnou aktivitou v případě 3-aminopyridinů nebo sníženou aktivitou v případě 2-aminopyridinů. To opět podtrhuje význam polohy dusíku v heterocyklu pro zachování aktivity, kdy se zdá být nejvhodnější, pokud je zachován zejména dusík v poloze 4 z původního pyrazinového jádra. To je při srovnání s **P2** naprosto opačný trend. I zde ale můžeme pozorovat, že substituce atomem chloru jak u pyrazinových, tak u pyridinových jader byla preferovaná zejména v polohách 3 nebo 4 vůči poloze linkeru. Naproti tomu substituce jádra atomem chloru v sousední poloze vůči spojovacímu amidu se ukázala jako nevhodná. Biologická inaktivita derivátů substituovaných chlorem v této poloze byla objasněna *in-silico* experimentem, který predikoval energeticky nejvýhodnější konformace. Z výsledků *in-silico* experimentu bylo patrné, že deriváty substituované chlorem v sousední poloze vůči amidu upřednostňují nekoplanární uspořádání aromatických jader, které se z pohledu biologické aktivity zdá být nevýhodné. Deriváty obsahující na benzenovém jádře hydroxyskupinu v poloze 2 vykazovaly obecně vyšší antimikrobiální aktivitu se širším spektrem účinku ve srovnání s deriváty obsahující hydroxyskupinu v poloze 4, případně s deriváty obsahující 2,4-dihydroxysubstituci. Většina zde diskutovaných sloučenin vykazovala mimo jiné také

významnou antimykobakteriální aktivitu. Nejnižší dosažená hodnota MIC byla 6,25 µg/ml při inhibici Mtb H37Rv.

I přes nebývalý rozsah provedených chemických obměn a detailní popsání vztahů SAR nevedly naše obměny k získání látek s vyšší antibakteriální aktivitou v porovnání se sloučeninami **1-P3** a **5Ac-P3**, ze kterých jsme při optimalizacích původně vycházely. Z toho důvodu se další část naší práce zabývala snahou osvětlit mechanismus jejich antistafylokokové aktivity. V rámci provedené makromolekulární eseje na kmeni MRSA CCM 4750 (ATCC 43300) byla zjištěna statisticky významná inhibice proteosyntézy u látky **1-P3**. Látka **5Ac-P3** nevykázala žádné statisticky významné inhibice na zkoušených biosyntetických drahách. Obě zkoumané látky prokázaly statisticky významnou schopnost membránové depolarizace na kmeni MRSA. Zajímavostí ovšem zůstává, že i přes významnou schopnost membránové depolarizace zkoumané látky působily bakteriostaticky. Z dostupných výsledků by se dalo usoudit, že i přes značnou strukturní podobnost látek **1-P3** a **5Ac-P3**, obě látky pravděpodobně nedosahují svého účinku stejně. Zatímco obě látky působí pomocí nescifické membránové depolarizace, která je pravděpodobně způsobená přítomností fenolického hydroxyly ve struktuře, tak se zdá, že právě látka **1-P3** navíc k tomuto efektu působí pravděpodobně strukturně specificky na úrovni inhibice proteosyntézy. Příčina této specifické aktivity by dle mého osobního názoru mohla být připisována právě podobnosti a obsahu salicylového farmakoforu ve struktuře a možnosti rozkladu původní látky za uvolnění kyseliny salicylové (vizte metabolické studie **P1**).

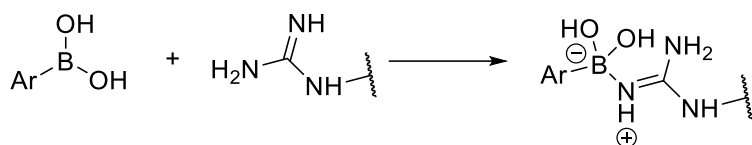
Zajímavý náhled do SAR týkajících se této série přinesly také experimenty stanovení rozpustnosti ve vodě u diskutovaných sloučenin. Bylo zjištěno, že deriváty 3-aminopyridinu byly víc rozpustné ve vodě než deriváty aminopyrazinu a nejhůře rozpustné z této série byly deriváty 2-aminopyridinu. Tento fakt může mít rozhodující vliv na sledovanou aktivitu těchto derivátů a může stát za neaktivitou derivátů 2-aminopyridinu.

[Publikace P4: cílení na androgenní receptor](#)

Čtvrtá komentovaná práce obdobně jako **P2** obrátila pozornost ke konkrétnímu molekulárnímu cíli. V tomto případě to byl androgenní receptor, který hraje klíčovou roli v rozvoji androgen-dependentní rakoviny prostaty. Přímá inhibice androgenního receptoru pomocí nesteroidních anti-androgenů (NSAA) je jedním z možných přístupů v léčbě rakoviny prostaty (PC). Při důkladném studiu původních a používaných zástupců z této skupiny léčiv bylo zjištěno, že většina léčiv sdílí velice podobné strukturní prvky. Ve většině případů se totiž jedná o různě

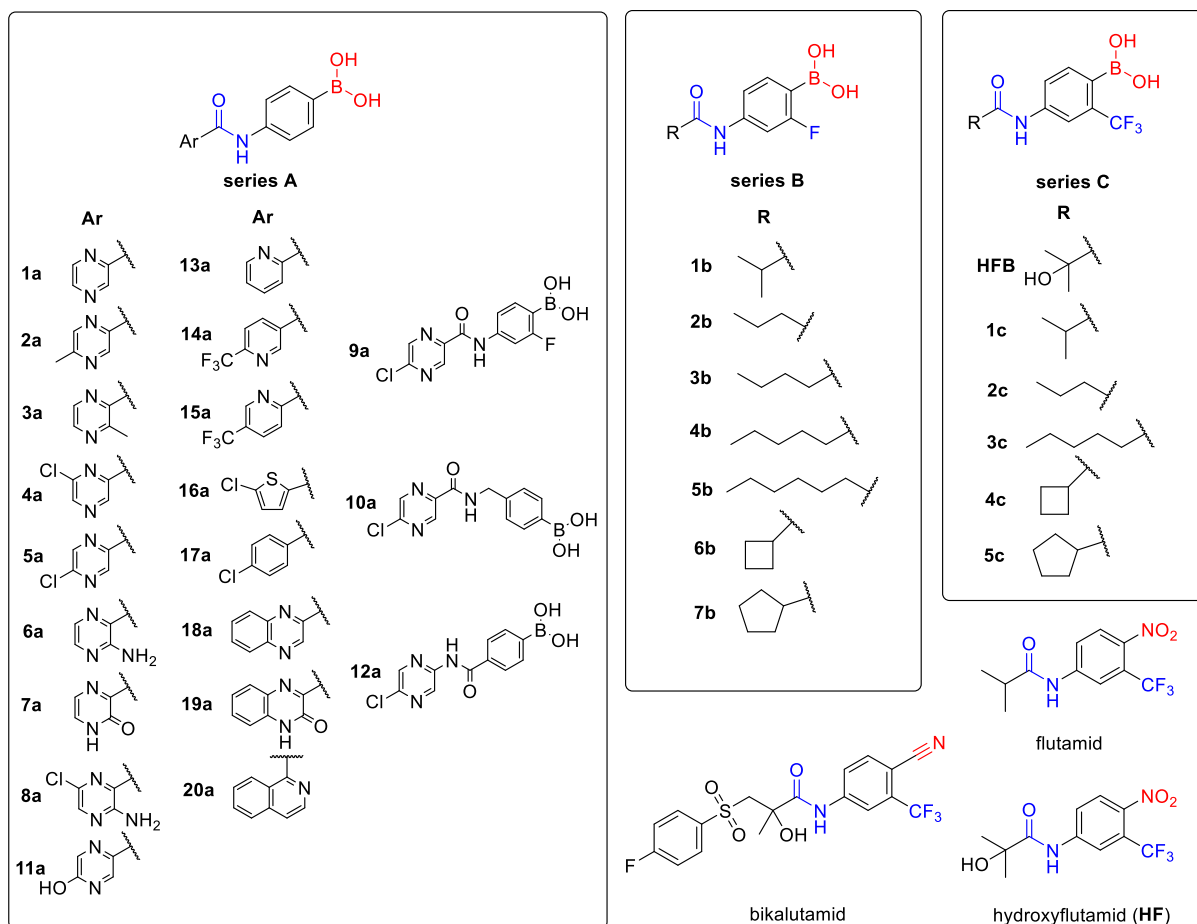
substituované 4-nitro-3-trifluormethylanilidy. Nitroskupina se vyskytuje zejména u starších zástupců, jakými jsou například flutamid a nilutamid, v případě novějších derivátů se v této poloze častěji vyskytuje nitrilová funkční skupina. Trifluormethylová substituce v *ortho* poloze vůči nitroskupině nebo nitrilové skupině je charakteristická nicméně může být zaměněná jinou lipofilní substitucí například atomem chloru v případě molekuly darolutamidu. Amidová funkční skupina může být ve struktuře začleněna do dusíkatého heterocyklu, ve výjimečných případech můžeme amidovou funkční skupinu nalézt ve struktuře až výrazně vzdálenou od aromatického jádra nesoucího nitroskupinu nebo nitril. Pro hlubší pochopení významu jednotlivých strukturních prvků byl v rámci diskutované práce **P4** prozkoumán androgenní receptor z dostupných krystalografických struktur obsažených v PDB databázi. Pro správné pochopení musí být zmíněno, že v PDB databázi není dostupná krystalografická struktura wild-type (WT) androgenního receptoru (AR) s vykrystalizovaným inhibitorem AR. K dispozici jsou pouze dostupné struktury WT AR co-krystalizované s blízkými deriváty flutamidu, které vykazují již částečnou agonistickou aktivitu nebo struktury AR s bodovými mutacemi ko-krystalizované s hydroxyflutamidem anebo bikalutamidem, kdy tyto bodové mutace pravděpodobně stojí za rozvojem agonistické aktivity zmíněných zástupců NSAA a tudíž rozvojem rezistence.⁸⁷ Důvodem pro absenci této krystalografické struktury je pravděpodobně nemožnost vykrystalizovat receptor v neaktivní/antagonizované formě, z důvodu expozice polárních částí svých řetězců na svém povrchu. V částečně aktivované/agonizované formě, která spouští buněčnou odpověď, pak pravděpodobně dochází ke složení a stažení těchto polárních povrchů, a tudíž je možné WT AR krystalizovat.⁸⁷ Tento fakt způsobuje, že nemáme k dispozici přesnou podobu tohoto molekulárního cíle. Přesto se domníváme, že dostupné krystalografické struktury by nám měly dát alespoň přibližnou představu o vazbě NSAA do WT AR. Na základě dostupných informací můžeme s relativní jistotou tvrdit, že nitroskupina, příp. nitril tvoří s AR relativně významné vodíkové můstky s aminokyselinovými zbytky Arg752 a Gln711 (přímo nebo přes molekulu vody), trifluormethylová substituce v *ortho* poloze směřuje do lipofilní kavity AR. Dusík amidové skupiny hraje významnou roli ve formování vodíkového můstku s kyslíkem Leu704.⁸⁷ Tyto poznatky nás vedly k tezi, zda by bylo možné příslušnou nitroskupinu/nitril zaměnit za boronovou kyselinu. Ta by díky svému podobnému planárnímu uspořádání v prostoru a unikátním elektrochemickým vlastnostem mohla vést k tvorbě obdobné interakce s aminokyselinovými zbytky Arg752 a Gln711. Vzhledem k tomu, že boronová funkční skupina nese na atomu boru vakantní orbital a byla potvrzena její schopnost

tvořit reverzibilní koordinačně kovalentní vazby s nukleofily⁸⁸, předpokládali jsme mimo klasických elektro-statických interakcí i možnost tvorby koordinačně kovalentní interakce s volným elektronovým párem dusíku guanidinové skupiny Arg752 (Obrázek 40).



Obrázek 40: Teoretický vznik koordinačně kovalentní vazby B-N mezi boronovou kyselinou a aminokyselinovým zbytkem argininu.

V rámci této práce bylo připraveno celkem třicet tři nových sloučenin obsahujících boronovou kyselinu. Tyto látky lze strukturně rozdělit do tří sérií. Série v publikaci označena jako C (látky **HFB-P4**, **1c-P4—5c-P4**) je tvořena deriváty strukturně nejbližšími molekule flutamidu. Jedná se tak o boronové kyseliny substituované v poloze *ortho* trifluormethylovou skupinou, obsahujícími v *para* poloze amidovou vazbu. Jednotlivé deriváty v rámci série C se pak vzájemně liší alifatickou a alicyklickou substitucí na amidové vazbě. Strukturně vzdálenější od předlohy flutamidu jsou deriváty série B (**1b-P4—7b-P4**), ty se od série C liší náhradou trifluormethylu atomem fluoru. Poslední a zároveň strukturně nevdálenější látky od předlohy flutamidu jsou deriváty série A (**1a-P4—20a-P4**), kde trifluormethylová substituce chybí a jednotlivé deriváty se navzájem liší aromatickou a heterocyklickou substitucí na amidové vazbě. Jistou přechodovou strukturou mezi sérií A a B je látka **9a-P4**, ve které je zachována substituce fluorem v *ortho* poloze a zároveň je substituovaná na amidu heteroaromatickým jádrem. Pro úplnost SAR nalezneme mezi těmito deriváty i látky s amidickou vazbou v opačném uspořádání (*retro*-amid **12a-P4**) a prodlouženým spojovacím linkerem (**10a-P4**). Výše popsané látky byly v rámci diskutované práce podrobeny *in-vitro* screeningu pro stanovení antiproliferativní aktivity na několika rakovinných buněčných liniích. Z nejdůležitějších linií je třeba zmínit androgen-non-dependentní linii buněk rakoviny prostaty PC-3 a androgen-dependentní linii buněk rakoviny prostaty LAPC-4. Pro ověření selektivity látek, byla u slibných derivátů otestována také antiproliferativní aktivita na nenádorové linii zdravých lidských buněk proximálního tubulu HK-2. Kompletní výsledky s dobami inkubace lze nalézt v diskutované práci.



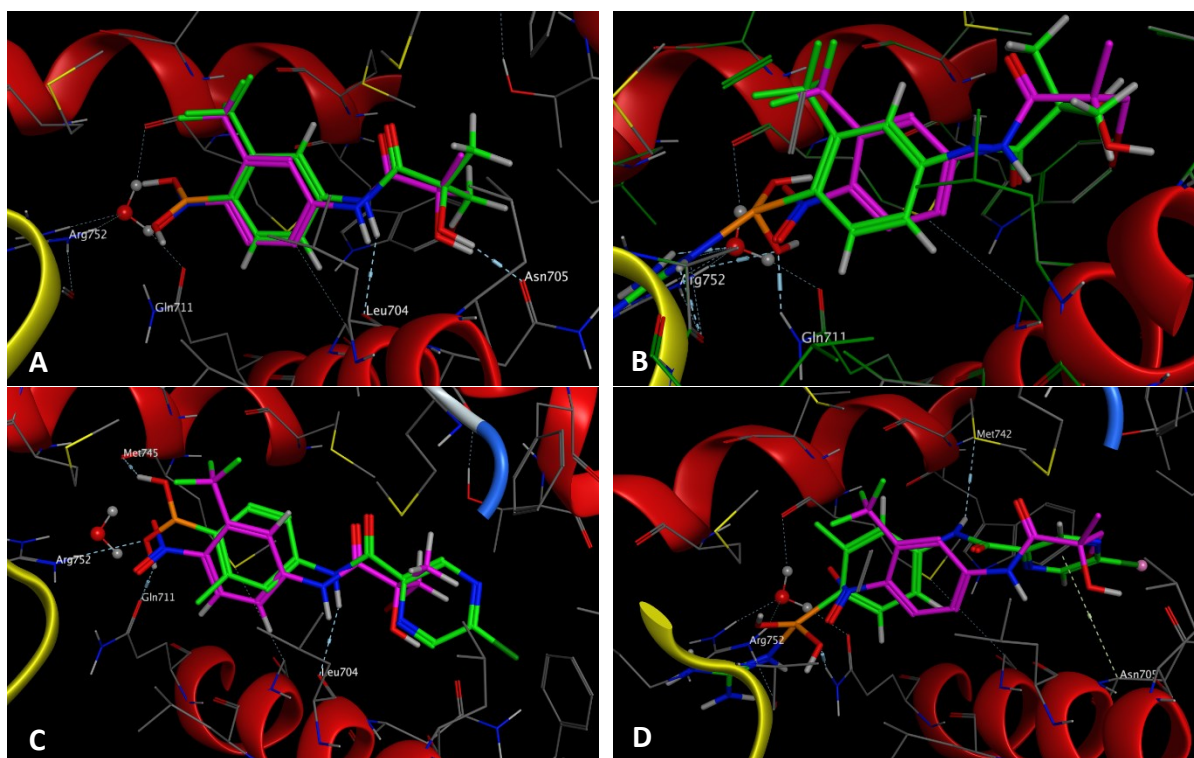
Obrázek 41: Knihovna připravených látek v rámci P4 spolu se strukturami použitých standardů.

Z důvodu přípravy látek inhibujících androgenní receptor, hrála zásadní roli antiproliferativní aktivita vůči androgen-dependentní linii rakovinných buněk LAPC-4. Navzdory očekávání je nutné konstatovat, že nejbližší strukturální analoga flutamidu tzn. látky ze série C včetně kompletního boronového bioisosteru hydroxyflutamidu a flutamidu tzn. látky **HFB-P4** a **1c-P4** a ani deriváty ze série B nevykázaly žádnou významnou inhibici růstu buněk LAPC-4. Na druhou stranu část derivátů ze série A vykázala zajímavou inhibici linie LAPC-4. Z připravených derivátů byly aktivní pouze látky obsahující ve své struktuře pyrazinové jádro substituované chlorem. Pyrazinové deriváty bez chlořsubstituce, příp. deriváty substituované jiným heterocyklem či chlorbenzenem byly neaktivní. Jako jediná tolerovaná poloha chloru se ukázala poloha 5 na pyrazinovém jádře (**5a-P4**), přesun chloru do polohy 6 vedl k úplné ztrátě aktivity. Jedinou výjimkou byl derivát **8a-P4**, kde byla 6-chlořsubstituce pyrazinu doplněna 3-aminosubstitucí, což vedlo pouze ke snížení aktivity. Záměna chloru v poloze 5 za hydroxyskupinu vedla k úplné ztrátě aktivity. Stejně tak změna orientace amidové vazby na *retro*-amid vedla ke ztrátě inhibiční aktivity, což by se dalo vysvětlit nemožností atomu dusíku tvořit vodíkový můstek

s atomem kyslíku Leu704. Podobně prodloužení amidového linkeru o methylenový uhlík u molekuly **10a-P4** vedlo ke snížení aktivity. Přidáním atomu fluoru do *ortho* polohy vůči boronové funkční skupině došlo k dalšímu navýšení antiproliferativní aktivity. Tyto výsledky by se daly až překvapivě dobře korelovat se závěry získanými ze studia krystalografických struktur AR. Zároveň je třeba zmínit, že látky **5a-P4**, **9a-P4** a **10a-P4** dosáhly srovnatelných aktivit proti linii LAPC 4 jako standardy flutamid a bikalutamid. Nejaktivnější látkou z celé série tak byl derivát **9a-P4** s $IC_{50} = 19,2 \mu M$ proti LAPC-4. Zároveň je nutné zmínit, že látka **9a-P4** vykazovala vyšší inhibici proti androgen-dependentní linii buněk LAPC4 než proti androgen-non-dependentní linii PC-3 což podporuje tezi o jejím pro antiandrogenním působení. Nicméně bohužel nebylo možné tuto tezi řádně ověřit přímým testováním inhibice androgeního receptoru. Dále je třeba podotknout, že látka **9a-P4** vykazovala slabou inhibici nenádorové linie buněk HK-2 s vypočteným indexem selektivity $SI = 7,2$ což svědčí o potenciální selektivě látek a nižší toxicitě ve srovnání s molekulou flutamidu, který dosáhl $SI = 1,3$. V poslední řadě je nutné z výsledků vypíchnout aktivity standardu flutamidu, který zhruba ve stejné míře působil inhibici na všech studovaných liniích, což nás vedlo k závěru, že flutamid je neselektivní molekula, pravděpodobně dosahující svého hlavního účinku toxicitou nitroskupiny, respektive jejích metabolických produktů.⁸⁹⁻⁹¹

Pro alespoň částečné ověření možnosti vazby diskutovaných látek do androgeního receptoru byl proveden *in-silico* experiment, během kterého byla dockována pilotní látka **1c-P4** a nejaktivnější látka z celé série **9a-P4** do vazebného místa WT AR dostupného z PDB databáze (PDB ID: 2AX9) (Obrázek 42). Jelikož jsme předpokládali stejnou formu metabolizace na aktivní metabolit u látky **1c-P4** jako u předlohového flutamidu (hydroxyflutamid), tak byla látka **1c-P4** upravena na její hydroxylovaný derivát, v publikaci P4 označený jako hydroxy-flutamid bioisoster (**HFB-P4**). V rámci této práce jsme také předpokládali dva potenciální typy interakce mezi boronovou funkční skupinou a klíčovým Arg752. Z toho důvodu byly provedeny dva dockovací experimenty, v případě uvažování pouze nekovalentních forem interakcí byl proveden konvenční docking do rigidního receptoru. V případě uvažování možnosti vzniku koordinačně kovalentní vazby mezi guanidinovým dusíkem Arg752 a boronovou funkční skupinou byl proveden kovalentní docking s definovanou reakcí. Z výsledků *in silico* experimentů, bylo usouzeno, že látky mají potenciál se vázat do WT AR. V případě konvenčního dockingu **HFB-P4** derivát kopíroval pózu vykrystalizovaného ligandu se zachováním interakcí

s klíčovými aminokyselinovými zbytky, boronová funkční skupina se pak nacházela v dostatečné vzdálenosti od Arg752 a Gln711 pro tvorbu vodíkových můstků. U derivátu **9a-P4** pak došlo k zachování vodíkových interakcí boronové funkční skupiny s Arg752 a Gln711 a zároveň k další stabilizaci aditivní interakcí s Met745. Zachována byla také vodíková vazba mezi dusíkem amidové skupiny a Leu704, naopak atom fluoru směřoval do opačného směru, než kde leží lipofilní kavita AR. U kovalentního dockování došlo v případě obou molekul (**HFB-P4**, **9a-P4**) k posunu struktury oproti původnímu ligandu směrem k aminokyselinovým zbytkům Arg752 a Gln711, v obou případech také došlo k další stabilizaci boronové kyseliny několika vodíkovými můstky. U derivátu **9a-P4** se pak vyskytla zajímavá elektrostatická interakce mezi Asn705 a pyrazinovým jádrem. Tento aminokyselinový zbytek byl popsán, že tvoří vodíkový můstek s hydroxyskupinou hydroxyflutamidu a bikalutamidu.⁸⁷



Obrázek 42: Výsledky *in-silico* experimentu s použitím struktury WT AR co-krytalizované s ligandem (*R*)-3-bromo-2-hydroxy-2-methyl-*N*-[4-nitro-3-(trifluormethyl)fenyl]propanamid (fialová barva) (PDB ID: 2AX9). A) Výsledky konvenčního dockingu HFB (zelená barva) do 2AX9. B) Výsledky kovalentního dockingu HFB (zelená barva) do 2AX9. C) Výsledky konvenčního dockingu látky **9a-P4** (zelená barva) do 2AX9. Výsledky kovalentního dockingu látky **9a-P4** (zelená barva) do 2AX9.

Za účelem ověření možnosti vzniku koordinačně kovalentní vazby mezi guanidinovou skupinou argininu a boronovou kyselinou byl proveden jednoduchý NMR experiment ve kterém byla měřena ¹⁹F a ¹¹B NMR spektra látek **1c-P4**, **9a-P4** a ekvimolární směsi těchto látek s methyl-esterem argininu v prostředí deuterovaného DMSO.⁹²⁻⁹⁴ Z výsledků tohoto experimentu jsme

došli k závěru, že nedochází ke vzniku kovalentní vazby mezi argininem a boronovou kyselinou a pokud zde diskutované látky interagují s AR, tak pouze na základě nekovalentních interakcí.

Závěr

V rámci této disertační práce bylo připraveno přes sto různých chemických sloučenin. Značnou část zde prezentovaných látek lze označit za hybridy PZA s různě začleněnými farmakofory jiných struktur. V publikacích **P2** a **P4** je design látek aktivně cílen na ovlivnění specifických buněčných cílů pomocí metod počítačové modelování a inkorporuje do připravovaných struktur boronovou funkční skupinu příp. farmakofor benzoxaborol ve snaze využít unikátních chemických vlastností boru. Všechny připravené látky byly testovány na inhibici panelu mykobakteriálních kmenů, klinicky významných kmenů bakterií a hub, včetně látek komentovaných v publikaci **P4**, kde tato aktivita nebyla uvedena z důvodu zaměření publikace. Cytotoxicita připravených látek byla běžně stanovována na buněčné linii HepG2. Z připravených látek dosáhly nejvyšší antimykobakteriální aktivity proti kmeni MtbH37Rv napříč publikacemi deriváty: 4-(6-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina (**11-P1**) s MIC = 10,7 μM resp. její laktonové proléčivo 6-chloro-*N*-(4-oxo-4H-benzo[*d*][1,3]dioxin-7-yl)pyrazin-2-karboxamid (**11'-P1**) s MIC = 2,6 μM ; *N*-(1-hydroxy-1,3-dihydrobenzo[*c*][1,2]oxaborol-6-yl)-5-(trifluormethyl)pikolinamid (**11-P2**) s MIC = 9,72 μM a *N*-(5-chlor-3-pyridyl)-2,4-dihydroxybenzamid (**26-P3**) s MIC = 23,6 μM . Navzdory obsáhlému množství testovaných derivátů byla významnější antibakteriální aktivita pozorována pouze u látky 4-[(5-chloropyrazin-2-yl)karbamoyl]fenyl-acetát (**5Ac-P3**) s MIC = 62,5 μM proti kmeni *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. V rámci připravených sérií nebyla nalezena látka, která by vykazovala významnou inhibici růstu testovaných kmenů hub ani v rámci hybridů diskutovaných publikaci **P2**, které obsahují farmakofor tavaborolu. Jistou odchylkou v rámci diskutovaných látek jsou deriváty popisované v **P4** cílené na inhibici androgenního receptoru a jejich potenciální použití v rámci terapii rakoviny prostaty. Mezi nimi byla nejúčinnější látkou vůči stěžejní androgen-dependentní linii nádorových buněk LAPC 4 [4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-fluorfenyl]boronová kyselina (**9a-P4**) s hodnotou IC₅₀ = 19,2 μM srovnatelnou s aktivitou standardu bikalutamidu.

Při širším pohledu na struktury aktivních sloučenin si můžeme povšimnout, že napříč publikacemi se nehledě na molekulární cíl nebo potenciální mechanismus účinku jeví jako

nejúčinnější deriváty substituované 5-chlor- nebo 6-chlorpyrazinem. Nutno ovšem podotknout, že při bližším zkoumání SAR napříč publikacemi, se význam tohoto fragmentu a jeho zaměnitelnost ve struktuře liší. V rámci publikace **P1** zjišťujeme, že stěžejní pro zachování aktivity hybridů je farmakofor PASA a že 6-chlorpyrazinový farmakofor může být obdobně nahrazen chlorbenzenovým, chlorthiofenovým a dalšími analogy. 6-Chlorpyrazin v této struktuře se zdá mít vliv pouze na ovlivnění farmakokinetiky a metabolizace PASA, proto můžeme očekávat obdobnou aktivitu i v případě 5-chlorpyrazinu a obdobné aktivity můžeme očekávat i u pyridinových analog. Velice podobný, ale zároveň jiný případ nastává v případě derivátů diskutovaných v **P2**, kde můžeme pozorovat určitý rozdíl mezi aktivitami hybridů s chlorem v poloze 6 a 5. Dále zde vidíme také značný rozdíl mezi aktivitami pyrazinových, pyridinových a benzenových analogů, který zdůrazňuje do určité míry význam pyridinového dusíku v poloze 1 pro tvorbu strukturně specifické interakce s Asp447. Nicméně pro jisté tvrzení by bylo nutné přímé ověření na enzymu mtbLeuRS. V případě **P3** opět nevidíme rozdíl v aktivitách analogů substituovaných chlorem v poloze 5 nebo 6 na pyrazinovém jádře, tzn. že se můžeme opět domnívat, že význam v těchto strukturách je pouze v pozitivním ovlivnění fyzikálně chemických vlastností. Rozdíly v aktivitách pyridinových analog byly dle získaných výsledků přisuzovány prokazatelně rozdílné rozpustnosti jednotlivých derivátů ve vodě. V sérii látek cílících na androgenní receptor se ukázaly jako účinné pouze deriváty 5-chlorpyrazinu. Substituce atomem chloru v poloze 6 vedla překvapivě k naprosté ztrátě aktivity stejně jako otočení spojovacího amidového můstku. Benzenový a thiofenový analog 5-chlorpyrazinového derivátu nevykázaly žádnou aktivitu v testovaných koncentracích, příčinou může být výše diskutované nežádoucí ovlivnění rozpustnosti. Uvažovat ale můžeme i význam 5-chlorpyrazinového fragmentu pro interakci s androgenním receptorem, kdy víme, že pyrazinové jádro může fungovat jako donor vodíkové vazby.⁹⁵ Tudíž můžeme předpokládat, že pyrazin ve strukturách studovaných látek může suplovat hydroxyskupinu interagující s Asn705. Tato interakce ovšem nebyla v našich *in-silico* experimentech prokázána. Možnost vzniku této interakce by bylo nutné do budoucna experimentálně prověřit.

I přes naznačenou řadu nedostatků diskutovaných prací (**P1—P4**), látky v nich prezentované přinášejí celou řadu nových informací, zejména pak objasnění jejich biologických vlastností. Slibná aktivita některých zde diskutovaných kandidátů napříč publikacemi pak spolu s množstvím nezodpovězených otázek dává podnět k jejich dalšímu zkoumání.

Seznam publikovaných prací

- P1** Bouz, G.; **Šlechta, P.**; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Bárta, P.; Novák, M.; Kučera, R.; Dal, N. J. K.; Fenaroli, F.; et al. Hybridization Approach Toward Novel Antituberculars: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Compounds Combining Pyrazinamide and 4-Aminosalicylic Acid. *Acs Infectious Diseases* **2023**, 9 (1), 79–96.

DOI: [10.1021/acsinfecdis.2c00433](https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00433).

IF = 4,0; AIS = 1,065

Podíl: Syntéza a čištění částí látek diskutovaných v publikaci. (Syntéza látek obsahujících volnou karboxylovou kyselinu)

- P2** **Šlechta, P.**; Needle, A. A.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Konečná, K.; Bárta, P.; Kuneš, J.; Kubíček, V.; Doležal, M.; Kučerová-Chlupáčová, 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), 2951.

DOI: [10.3390/ijms24032951](https://doi.org/10.3390/ijms24032951).

IF = 4,9; AIS = 1,053

Podíl: Koncepce práce, návrh, syntéza a čištění látek, interpretace získaných výsledků a hodnocení SAR, počítačové experimenty, psaní a revize článku.

- P3** Kerda, M.; **Šlechta, P.**; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Hatoková, P.; Paterová, P.; Zitko, J. *N*-Pyrazinylhydroxybenzamides as biologically active compounds: a hit-expansion study and antimicrobial evaluation. *Future Medicinal Chemistry* **2023**, 15 (19), 1791–1806.

DOI: [10.4155/fmc-2023-0189](https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0189).

IF = 3,2; AIS = 0,663

Podíl: Syntéza a čištění částí látek diskutovaných v publikaci. Podílení se na interpretaci získaných výsledků a hodnocení SAR. Revize článku.

- P4** **Šlechta, P.**; Viták, R.; Bárta, P.; Koucká, K.; Berková, M.; Žďárová, D.; Petříková, A.; Kuneš, J.; Kubíček, V.; Doležal, M.; Kučera, R.; Kučerová-Chlupáčová, M. Replacement

of nitro function by free boronic acid in non-steroidal anti-androgens. *RSC Medicinal Chemistry* **2024**. (accepted: 5.9.2024)

DOI:

IF = 4,1; AIS = 0,894

Podíl: Koncepce práce, návrh, syntéza a čištění látek, interpretace získaných výsledků a hodnocení SAR, počítačové experimenty, psaní a revize článku.

Publikované práce nezahrnuté do komentáře

P5 Šlechta, P.; Jandourek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Bárta, P.; Kubíček, V.; Doležal, M.; Kučerová-Chlupáčová, M. Design, synthesis, and biological evaluation of new benzoxaborole derivatives as potential antimycobacterial agents. *Medical Sciences Forum* **2022**, 14(1).

DOI: [10.3390/ECMC2022-13454](https://doi.org/10.3390/ECMC2022-13454).

Podíl: Koncepce práce, návrh, syntéza a čištění látek, interpretace získaných výsledků a hodnocení SAR, počítačové experimenty, tvorba posteru a jeho prezentace.

Příspěvky na konferencích

Přednášky

Šlechta, P., Kučerová-Chlupáčová, M., Jandourek, O., Konečná, K., Doležal, M. *Design, synthesis and preliminary biological evaluation of new boronic acids derivatives*. 49. Syntéza a analýza léčiv (SAL 2021), Hradec Králové (Česká republika), 16.–17. září 2021.

Šlechta, P., Kučerová-Chlupáčová, M., Jandourek, O., Konečná, K., Paterová, P., Doležal, M. *Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of new boronic acids derivatives*. 12th Postgraduate and Postdoc Conference (FAF UK v HK), Hradec Králové (Česká republika), 1.–2. února 2022.

Šlechta, P. Jandourek, O., Konečná, K., Paterová, P., Kučerová-Chlupáčová, M. *Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of new boronic acids derivatives*. 9th EFMC Young Medical Chemist Symposium (EFMC-YMCS 2022), Nice (Francie), 8.–9. září 2022.

Šlechta, P., Bárta, P., Koucká, K., Berková, M., Jand'ourek, O., Konečná, K., Doležal, M., Kučerová-Chlupáčová, M. *Design, synthesis, and preliminary results of biological evaluation of new boronic acids derivatives*. 13th Postgraduate and Postdoc Conference (FAF UK v HK), Hradec Králové (Česká republika), 1.–2. února 2023.

Šlechta, P., Bárta, P., Koucká, K., Berková, M., Jand'ourek, O., Konečná, K., Doležal, M., Kučerová-Chlupáčová, M. *Design, synthesis, and preliminary results of biological evaluation of new boronic acids derivatives*. 14th Postgraduate and Postdoc Conference (FAF UK v HK), Hradec Králové (Česká republika), 30.–31. ledna 2024.

Posterová sdělení

Šlechta, P., Jand'ourek, O., Konečná, K., Paterová, P., Bárta, P., Kubíček, V., Doležal, M., Kučerová-Chlupáčová, M. *Design, synthesis, and biological evaluation of new Benzoxaborole derivatives as potential antimycobacterial agents*. The 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, Online, 1.–30. listopadu 2022

Šlechta, P., Bárta, P., Koucká, K., Berková, M., Jand'ourek, O., Konečná, K., Doležal, M., Kučerová—Chlupáčová, M. *Design, synthesis, and preliminary results of biological evaluation of new boronic acids derivatives*. (flash poster presentation) XII Paul Ehrlich PhD NetWork in Medicinal Chemistry, Thessaloniki (Řecko), 16.–18. července 2023.

Účast na grantech

AZV ČR – Ministerstvo zdravotnictví – projekt NU21-05-00482 – Experimentální vývoj nových antibakteriálních látek a posouzení jejich potenciálu pro kombinovanou terapii. (spoluředitel)

Literatura

(1) Geneva: World Health Organization. *Global tuberculosis report 2023*. 2023.

<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports> (accessed 27.08.2024).

(2) De Oliveira, D.; Forde, B.; Kidd, T.; Harris, P.; Schembri, M.; Beatson, S.; Paterson, D.; Walker, M. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* **2020**, *33*, Review. DOI: 10.1128/CMR.00181-19.

(3) Falagas, M.; Bliziotis, I. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS* **2007**, *29*, 630-636, Review. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012.

- (4) Karakonstantis, S.; Kritsotakis, E.; Gikas, A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY* **2020**, *75*, 271-282, Review. DOI: 10.1093/jac/dkz401.
- (5) Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Laversanne, M.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024. <https://gco.iarc.who.int/today/enho.int> (accessed 27.08.2024).
- (6) Li, K.; Schurig-Briccio, L. A.; Feng, X. X.; Upadhyay, A.; Pujari, V.; Lechartier, B.; Fontes, F. L.; Yang, H. L.; Rao, G. D.; Zhu, W.; et al. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (7), 3126-3139, Article. DOI: 10.1021/jm500131s.
- (7) Decker, M. Hybrid Molecules Incorporating Natural Products: Applications in Cancer Therapy, Neurodegenerative Disorders and Beyond. In *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY*, 2011; Vol. 18, pp 1464-1475.
- (8) Shaveta; Mishra, S.; Singh, P. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. In *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 2016; Vol. 124, pp 500-536.
- (9) Pawelczyk, A.; Sowa-Kasprzak, K.; Olender, D.; Zaprutko, L. Molecular Consortia-Variou Structural and Synthetic Concepts for More Effective Therapeutics Synthesis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* **2018**, *19*, Review. DOI: 10.3390/ijms19041104.
- (10) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A rule of three for fragment-based lead discovery? In *DRUG DISCOVERY TODAY*, 2003; Vol. 8, pp 876-877.
- (11) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. In *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, 2005; Vol. 48, pp 6523-6543.
- (12) Muregi, F.; Ishih, A. Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH* **2010**, *71*, 20-32. DOI: 10.1002/ddr.20345.
- (13) Jayaraman, P.; Sakharkar, K.; Lim, C.; Siddiqi, M.; Dhillon, S.; Sakharkar, M. Novel phytochemical-antibiotic conjugates as multitarget inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* GyrB/ParE and DHFR. *DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY* **2013**, *7*, 449-475. DOI: 10.2147/DDDT.S43964.
- (14) Sangani, C.; Makawana, J.; Zhang, X.; Teraiya, S.; Lin, L.; Zhu, H. Design, synthesis and molecular modeling of pyrazole-quinoline-pyridine hybrids as a new class of antimicrobial and anticancer agents. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2014**, *76*, 549-557. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.01.018.
- (15) Portoghese, P. Alfred Burger Award address in medicinal chemistry. From models to molecules: Opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptor probes. (vol 44, pg 2266, 2001). *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2001**, *44*, 3758-3758.
- (16) Daniels, D.; Kulkarni, A.; Xie, Z.; Bhushan, R.; Portoghese, P. A bivalent ligand (KDAN-18) containing δ -antagonist and k -agonist pharmacophores bridges δ_2 and k_1 opioid receptor phenotypes. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2005**, *48*, 1713-1716. DOI: 10.1021/jm034234f.
- (17) NCX-4016. *DRUGS OF THE FUTURE* **2002**, *27*, 197-198.
- (18) LOWE, J.; SEEGER, T.; NAGEL, A.; HOWARD, H.; SEYMOUR, P.; HEYM, J.; EWING, F.; NEWMAN, M.; SCHMIDT, A.; FURMAN, J.; et al. 1-NAPHTHYLPIPERAZINE DERIVATIVES AS POTENTIAL ATYPICAL ANTIPSYCHOTIC AGENTS. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **1991**, *34*, 1860-1866.

- (19) Sterling, J.; Herzig, Y.; Goren, T.; Finkelstein, N.; Lerner, D.; Goldenberg, W.; Miskolczi, I.; Molnar, S.; Rantal, F.; Tamas, T.; et al. Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2002**, *45*, 5260-5279. DOI: 10.1021/jm020120c.
- (20) Shindikar, A. V.; Viswanathan, C. L. Novel fluoroquinolones: design, synthesis, and in vivo activity in mice against Mycobacterium tuberculosis H(37)Rv. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (7), 1803-1806. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.02.037.
- (21) Beteck, R. M.; Seldon, R.; Jordaan, A.; Warner, D. F.; Hoppe, H. C.; Laming, D.; Legoabe, L. J.; Khanye, S. D. Quinolone-isoniazid hybrids: synthesis and preliminary in vitro cytotoxicity and anti-tuberculosis evaluation. *Medchemcomm* **2019**, *10* (2), 326-331. DOI: 10.1039/c8md00480c.
- (22) Xu, Z.; Zhao, S. J.; Lv, Z. S.; Gao, F.; Wang, Y. L.; Zhang, F.; Bai, L. Y.; Deng, J. L. Fluoroquinolone-isatin hybrids and their biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *162*, 396-406. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.032.
- (23) Tripathy, R.; Reiboldt, A.; Messina, P. A.; Iqbal, M.; Singh, J.; Bacon, E. R.; Angeles, T. S.; Yang, S. X.; Albom, M. S.; Robinson, C.; et al. Structure-guided identification of novel VEGFR-2 kinase inhibitors via solution phase parallel synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (8), 2158-2162. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.01.063.
- (24) Jiang, T.; Kuhen, K. L.; Wolff, K.; Yin, H.; Bieza, K.; Caldwell, J.; Bursulaya, B.; Wu, T. Y. H.; He, Y. Design, synthesis and biological evaluations of novel oxindoles as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Part I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (8), 2105-2108. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.01.073.
- (25) Pendleton, J.; Gorman, S.; Gilmore, B. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY* **2013**, *11*, 297-308. DOI: 10.1586/ERI.13.12.
- (26) Domalaon, R.; Idowu, T.; Zhanel, G.; Schweizer, F. Antibiotic Hybrids: the Next Generation of Agents and Adjuvants against Gram-Negative Pathogens? *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* **2018**, *31*. DOI: 10.1128/CMR.00077-17.
- (27) MOBASHERY, S.; JOHNSTON, M. INACTIVATION OF ALANINE RACEMASE BY BETA-CHLORO-L-ALANINE RELEASED ENZYMATICALLY FROM AMINO-ACID AND PEPTIDE C10-ESTERS OF DEACETYLCEPHALOTHIN. *BIOCHEMISTRY* **1987**, *26*, 5878-5884.
- (28) Stone, G.; Zhang, Q.; Castillo, R.; Doppalapudi, V.; Bueno, A.; Lee, J.; Li, Q.; Sergeeva, M.; Khambatta, G.; Georgopapadakou, N. Mechanism of action of NB2001 and NB2030, novel antibacterial agents activated by β -lactamases. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **2004**, *48*, 477-483. DOI: 10.1128/AAC.48.2.477-483.2004.
- (29) JONES, R.; BARRY, A.; THORNSBERRY, C. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF RO-23-9424, A NOVEL ESTER-LINKED CODRUG OF FLEROXACIN AND DESACETYLCEFOTAXIME. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **1989**, *33*, 944-950.
- (30) Pokrovskaya, V.; Belakhov, V.; Hainrichson, M.; Yaron, S.; Baasov, T. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Fluoroquinolone-Aminoglycoside Hybrid Antibiotics. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2009**, *52*, 2243-2254. DOI: 10.1021/jm900028n.
- (31) Fortin, S.; Bérubé, G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY* **2013**, *8*, 1029-1047. DOI: 10.1517/17460441.2013.798296.
- (32) Lai, C.; Bao, R.; Tao, X.; Wang, J.; Atoyian, R.; Qu, H.; Wang, D.; Yin, L.; Samson, M.; Forrester, J.; et al. CUDC-101, a Multitargeted Inhibitor of Histone Deacetylase, Epidermal Growth Factor Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, Exerts Potent Anticancer Activity. *CANCER RESEARCH* **2010**, *70*, 3647-3656. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3360.

- (33) Younes, A.; Berdeja, J.; Patel, M.; Flinn, I.; Gerecitano, J.; Neelapu, S.; Kelly, K.; Copeland, A.; Akins, A.; Clancy, M.; et al. Safety, tolerability, and preliminary activity of CUDC-907, a first-in-class, oral, dual inhibitor of HDAC and PI3K, in patients with relapsed or refractory lymphoma or multiple myeloma: an open-label, dose-escalation, phase 1 trial. *LANCET ONCOLOGY* **2016**, *17*, 622-631. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00584-7.
- (34) Punganuru, S.; Madala, H.; Venugopal, S.; Samala, R.; Mikelis, C.; Srivenugopal, K. Design and synthesis of a C7-aryl piperlongumine derivative with potent antimicrotubule and mutant p53-reactivating properties. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2016**, *107*, 233-244, Article. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.10.052.
- (35) Matthes, M. S.; Robil, J. M.; McSteen, P. From element to development: the power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants. *Journal of Experimental Botany* **2020**, *71* (5), 1681-1693, Review. DOI: 10.1093/jxb/eraa042.
- (36) Rainey, C. J.; Nyquist, L. A.; Christensen, R. E.; Strong, P. L.; Culver, B. D.; Coughlin, J. R. Daily boron intake from the American diet. *Journal of the American Dietetic Association* **1999**, *99* (3), 335-340, Article. DOI: 10.1016/s0002-8223(99)00085-1.
- (37) Dembitsky, V. M.; Smoum, R.; Al-Quntar, A. A.; Abu Ali, H.; Pergament, I.; Srebnik, M. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science* **2002**, *163* (5), 931-942, Review. DOI: 10.1016/s0168-9452(02)00174-7.
- (38) Plescia, J.; Moitessier, N. Design and discovery of boronic acid drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *195*, 20, Review. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112270.
- (39) Fernandes, G. F. S.; Denny, W. A.; Dos Santos, J. L. Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *179*, 791-804, Review. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.092.
- (40) Baker, S. J.; Ding, C. Z.; Akama, T.; Zhang, Y. K.; Hernandez, V.; Xia, Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Medicinal Chemistry* **2009**, *1* (7), 1275-1288, Review. DOI: 10.4155/fmc.09.71.
- (41) Miyaura, N.; Suzuki, A. PALLADIUM-CATALYZED CROSS-COUPPLING REACTIONS OF ORGANOBORON COMPOUNDS. *Chemical Reviews* **1995**, *95* (7), 2457-2483, Review. DOI: 10.1021/cr00039a007.
- (42) Lesnikowski, Z. J. Recent developments with boron as a platform for novel drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2016**, *11* (6), 569-578, Review. DOI: 10.1080/17460441.2016.1174687.
- (43) Fu, H.; Fang, H.; Sun, J.; Wang, H.; Liu, A.; Sun, J.; Wu, Z. Boronic Acid-based Enzyme Inhibitors: A Review of Recent Progress. *Current Medicinal Chemistry* **2014**, *21* (28), 3271-3280, Review. DOI: 10.2174/0929867321666140601200803.
- (44) 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.
- (45) Westmark, P.; Gardiner, S.; Smith, B. Selective monosaccharide transport through lipid bilayers using boronic acid carriers. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* **1996**, *118*, 11093-11100.
- (46) Albers, H.; van Meeteren, L.; Egan, D.; van Tilburg, E.; Moolenaar, W.; Ovaa, H. Discovery and Optimization of Boronic Acid Based Inhibitors of Autotaxin. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2010**, *53*, 4958-4967. DOI: 10.1021/jm1005012.
- (47) Ghosh, A.; Xia, Z.; Kovala, S.; Robinson, W.; Johnson, M.; Kneller, D.; Wang, Y.; Aoki, M.; Takamatsu, Y.; Weber, I.; et al. Potent HIV-1 Protease Inhibitors Containing Carboxylic and

Boronic Acids: Effect on Enzyme Inhibition and Antiviral Activity and Protein-Ligand X-ray Structural Studies. *CHEMMEDCHEM* **2019**, *14*, 1863-1872. DOI: 10.1002/cmdc.201900508.

(48) Elliott, T.; Slowey, A.; Ye, Y.; Conway, S. The use of phosphate bioisosteres in medicinal chemistry and chemical biology. *MEDCHEMCOMM* **2012**, *3*, 735-751. DOI: 10.1039/c2md20079a.

(49) Martin, A.; Mohanan, K.; Luvino, D.; Floquet, N.; Baraguey, C.; Smietana, M.; Vasseur, J. Expanding the boronucleotide family: synthesis of borono-analogues of dCMP, dGMP and dAMP. *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY* **2009**, *7*, 4369-4377. DOI: 10.1039/b912616c.

(50) Gleeson, M. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2008**, *51*, 817-834. DOI: 10.1021/jm701122q.

(51) Kong, Y.; Grembecka, J.; Edler, M.; Hamel, E.; Mooberry, S.; Sabat, M.; Rieger, J.; Brown, M. Structure-based discovery of a boronic acid bioisostere of combretastatin A-4. *CHEMISTRY & BIOLOGY* **2005**, *12*, 1007-1014. DOI: 10.1016/j.chembiol.2005.06.016.

(52) Libutti, S.; Anthony, L.; Chaplin, D.; Sosa, J. A phase II study of combretastatin A4-phosphate (CA4P) in the treatment of well-differentiated, low-to intermediate-grade, unresectable, recurrent, or metastatic pancreatic, or GI neuroendocrine tumors/carcinoid (GI-NETs/PNETs) with elevated biomarkers. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* **2017**, *35*.

(53) Liu, J.; Zheng, S.; Akerstrom, V.; Yuan, C.; Ma, Y.; Zhong, Q.; Zhang, C.; Zhang, Q.; Guo, S.; Ma, P.; et al. Fulvestrant-3 Boronic Acid (ZB716): An Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Downregulator (SERD). *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2016**, *59*, 8134-8140. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00753.

(54) Liu, J.; Zheng, S.; Guo, S.; Zhang, C.; Zhong, Q.; Zhang, Q.; Ma, P.; Skripnikova, E.; Bratton, M.; Wiese, T.; et al. Rational Design of a Boron-Modified Triphenylethylene (GLL398) as an Oral Selective Estrogen Receptor Downregulator. *ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS* **2017**, *8*, 102-106. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.6b00410.

(55) Ling, B.; Chen, H.; Liang, D.; Lin, W.; Qi, X.; Liu, H.; Deng, X. Acidic pH and High-H₂O₂ Dual Tumor Microenvironment-Responsive Nanocatalytic Graphene Oxide for Cancer Selective Therapy and Recognition. *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES* **2019**, *11*, 11157-11166. DOI: 10.1021/acsami.8b22487.

(56) Wang, L.; Xie, S.; Ma, L.; Chen, Y.; Lu, W. 10-Boronic acid substituted camptothecin as prodrug of SN-38. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2016**, *116*, 84-89. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.03.063.

(57) Smoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V.; Srebnik, M. Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors. *CHEMICAL REVIEWS* **2012**, *112*, 4156-4220. DOI: 10.1021/cr608202m.

(58) Laskar, A.; Younus, H. Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *DRUG METABOLISM REVIEWS* **2019**, *51*, 42-64. DOI: 10.1080/03602532.2018.1555587.

(59) Rojas, L.; Taracila, M.; Papp-Wallace, K.; Bethel, C.; Caselli, E.; Romagnoli, C.; Winkler, M.; Spellberg, B.; Prati, F.; Bonomo, R. Boronic Acid Transition State Inhibitors Active against KPC and Other Class A β -Lactamases: Structure-Activity Relationships as a Guide to Inhibitor Design. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **2016**, *60*, 1751-1759. DOI: 10.1128/AAC.02641-15.

(60) Ban, H.; Usui, T.; Nabeyama, W.; Morita, H.; Fukuzawa, K.; Nakamura, H. Discovery of boron-conjugated 4-anilinoquinazoline as a prolonged inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY* **2009**, *7*, 4415-4427. DOI: 10.1039/b909504g.

- (61) Plescia, J.; Dufresne, C.; Janmamode, N.; Wahba, A.; Mittermaier, A.; Moitessier, N. Discovery of covalent prolyl oligopeptidase boronic ester inhibitors. *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2020**, *185*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111783.
- (62) Kane, R.; Farrell, A.; Sridhara, R.; Pazdur, R. United States Food and Drug Administration approval summary: Bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *CLINICAL CANCER RESEARCH* **2006**, *12*, 2955-2960. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0170.
- (63) Shirley, M. Ixazomib: First Global Approval. *DRUGS* **2016**, *76*, 405-411. DOI: 10.1007/s40265-016-0548-5.
- (64) Berube, M.; Dowlut, M.; Hall, D. G. Benzoboroxoles as efficient glycopyranoside-binding agents in physiological conditions: Structure and selectivity of complex formation. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (17), 6471-6479, Article. DOI: 10.1021/jo800788s.
- (65) Baker, C. H.; Welburn, S. C. The Long Wait for a New Drug for Human African Trypanosomiasis. *Trends Parasitol.* **2018**, *34* (10), 818-827, Review. DOI: 10.1016/j.pt.2018.08.006.
- (66) 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), 15, Article. DOI: 10.1128/aac.00240-19.
- (67) 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, Article. DOI: 10.1016/j.tube.2017.11.003.
- (68) 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, Article. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00631.
- (69) Adamczyk-Wozniak, A.; Cyranski, M. K.; Zubrowska, A.; Sporzynski, A. Benzoxaboroles - Old compounds with new applications. *Journal of Organometallic Chemistry* **2009**, *694* (22), 3533-3541, Review. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2009.07.022.
- (70) Adamczyk-Wozniak, A.; Borys, K. M.; Sporzynski, A. Recent Developments in the Chemistry and Biological Applications of Benzoxaboroles. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (11), 5224-5247, Review. DOI: 10.1021/cr500642d.
- (71) 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (10), 6271-6280, Article. DOI: 10.1128/aac.01339-16.
- (72) 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), 7, Article. DOI: 10.1128/aac.01577-19.
- (73) Hinkes, S. P. A.; Klein, C. D. P. Virtues of Volatility: A Facile Transesterification Approach to Boronic Acids. *Organic Letters* **2019**, *21* (9), 3048-3052, Article. DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00584.
- (74) Korich, A. L.; Iovine, P. M. Boroxine chemistry and applications: A perspective. *Dalton Transactions* **2010**, *39* (6), 1423-1431, Article. DOI: 10.1039/b917043j.

- (75) Wheaton, S.; Kabir, S.; Zhang, H.; Vogels, C.; Decken, A.; Westcott, S. PXPd-catalyzed borylation of aniline derivatives. *CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF CHEMISTRY* **2010**, *8*, 725-731. DOI: 10.2478/s11532-010-0076-1.
- (76) Berman, H.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.; Weissig, H.; Shindyalov, I.; Bourne, P. The Protein Data Bank. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* **2000**, *28*, 235-242, Article.
- (77) Namouchi, A.; Cimino, M.; Favre-Rochex, S.; Charles, P.; Gicquel, B. Phenotypic and genomic comparison of *Mycobacterium aurum* and surrogate model species to *Mycobacterium tuberculosis*: implications for drug discovery. *Bmc Genomics* **2017**, *18*. DOI: 10.1186/s12864-017-3924-y.
- (78) Chaturvedi, V.; Dwivedi, N.; Tripathi, R. P.; Sinha, S. Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of General and Applied Microbiology* **2007**, *53* (6), 333-337. DOI: 10.2323/jgam.53.333.
- (79) Heinrichs, M. T.; May, R. J.; Heider, F.; Reimers, T.; Sy, S. K. B.; Peloquin, C. A.; Derendorf, H. *Mycobacterium tuberculosis* Strains H37ra and H37rv have Equivalent Minimum Inhibitory Concentrations to Most Antituberculosis Drugs. *International Journal of Mycobacteriology* **2018**, *7* (2), 156-161. DOI: 10.4103/ijmy.ijmy_33_18.
- (80) Johnson, M.; Odell, J. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *JOURNAL OF THORACIC DISEASE* **2014**, *6*, 210-220. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24.
- (81) Nixon, M.; Saionz, K.; Koo, M.; Szymonifka, M.; Jung, H.; Roberts, J.; Nandakumar, M.; Kumar, A.; Liao, R.; Rustad, T.; et al. Folate Pathway Disruption Leads to Critical Disruption of Methionine Derivatives in *Mycobacterium tuberculosis*. *CHEMISTRY & BIOLOGY* **2014**, *21*, 819-830, Article. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.04.009.
- (82) Hajian, B.; Scocchera, E.; Shoen, C.; Krucinska, J.; Viswanathan, K.; G-Dayananandan, N.; Erlandsen, H.; Estrada, A.; Mikusova, K.; Kordulakova, J.; et al. Drugging the Folate Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The Role of Multi-targeting Agents. *Cell Chemical Biology* **2019**, *26* (6), 781-+, Article. DOI: 10.1016/j.chembiol.2019.02.013.
- (83) Handbook of anti-tuberculosis agents. *TUBERCULOSIS* **2008**, *88*, 85-169.
- (84) 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.
- (85) 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.
- (86) Zitko, J.; Mindlová, A.; Valásek, O.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Janousek, J.; Konečná, K.; Dolezal, M. Design, Synthesis and Evaluation of *N*-pyrazinylbenzamides as Potential Antimycobacterial Agents. *MOLECULES* **2018**, *23* (9), Article. DOI: 10.3390/molecules23092390.
- (87) Bohl, C. E.; Miller, D. D.; Chen, J. Y.; Bell, C. E.; Dalton, J. T. Structural basis for accommodation of nonsteroidal ligands in the androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (45), 37747-37754, Article. DOI: 10.1074/jbc.M507464200.
- (88) António, J. P. M.; Russo, R.; Carvalho, C. P.; Cal, P.; Gois, P. M. P. Boronic acids as building blocks for the construction of therapeutically useful bioconjugates. *Chemical Society Reviews* **2019**, *48* (13), 3513-3536, Review. DOI: 10.1039/c9cs00184k.

- (89) Gao, W. Q.; Kim, J.; Dalton, J. T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nonsteroidal androgen receptor ligands. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23* (8), 1641-1658, Review. DOI: 10.1007/s11095-006-9024-3.
- (90) Penning, T. M.; Su, A. L.; El-Bayoumy, K. Nitroreduction: A Critical Metabolic Pathway for Drugs, Environmental Pollutants, and Explosives. *Chemical Research in Toxicology* **2022**, *35* (10), 1747-1765, Review. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.2c00175.
- (91) Coe, K. J.; Jia, Y.; Ho, H. K.; Rademacher, P.; Bammler, T. K.; Beyer, R. P.; Farin, F. M.; Woodke, L.; Plymate, S. R.; Fausto, N.; et al. Comparison of the cytotoxicity of the nitroaromatic drug flutamide to its cyano analogue in the hepatocyte cell line TAMH: Evidence for complex I inhibition and mitochondrial dysfunction using toxicogenomic screening. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20* (9), 1277-1290, Article. DOI: 10.1021/tx7001349.
- (92) Otsuka, H.; Uchimura, E.; Koshino, H.; Okano, T.; Kataoka, K. Anomalous binding profile of phenylboronic acid with *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (12), 3493-3502, Article. DOI: 10.1021/ja021303r.
- (93) Zhu, L.; Shabbir, S. H.; Gray, M.; Lynch, V. M.; Sorey, S.; Anslyn, E. V. A structural investigation of the N-B interaction in an *o*-(*N,N*-dialkylaminomethyl)arylboronate system. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (4), 1222-1232, Article. DOI: 10.1021/ja055817c.
- (94) Iannazzo, L.; Benedetti, E.; Catala, M.; Etheve-Quellejeu, M.; Tisné, C.; Micouin, L. Monitoring of reversible boronic acid-diol interactions by fluorine NMR spectroscopy in aqueous media. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13* (33), 8817-8821, Article. DOI: 10.1039/c5ob01362c.
- (95) Juhás, M.; Zitko, J. Molecular Interactions of Pyrazine-Based Compounds to Proteins. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY* **2020**, *63*, 8901-8916. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b02021.

Seznam příloh

- P1** Bouz, G.; Šlechta, P.; Jandůrek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Bárta, P.; Novák, M.; Kučera, R.; Dal, N. J. K.; Fenaroli, F.; et al. Hybridization Approach Toward Novel Antituberculars: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Compounds Combining Pyrazinamide and 4-Aminosalicylic Acid. *Acs Infectious Diseases* **2023**, *9* (1), 79–96.

DOI: [10.1021/acsinfecdis.2c00433](https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00433).

IF = 4,0; AIS = 1,065

- P2** Šlechta, P.; Needle, A. A.; Jandůrek, O.; Paterová, P.; Konečná, K.; Bárta, P.; Kuneš, J.; Kubíček, V.; Doležal, M.; Kučerová-Chlupáčová, 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), 2951.

DOI: [10.3390/ijms24032951](https://doi.org/10.3390/ijms24032951).

IF = 4,9; AIS = 1,053

- P3** Kerda, M.; **Šlechta, P.**; Jandourek, O.; Konečná, K.; Hatoková, P.; Paterová, P.; Zitko, J. *N*-Pyrazinylhydroxybenzamides as biologically active compounds: a hit-expansion study and antimicrobial evaluation. *Future Medicinal Chemistry* **2023**, 15 (19), 1791–1806.

DOI: [10.4155/fmc-2023-0189](https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0189).

IF = 3,2; AIS = 0,663

- P4** **Šlechta, P.**; Viták, R.; Bárta, P.; Koucká, K.; Berková, M.; Žďárová, D.; Petříková, A.; Kuneš, J.; Kubíček, V.; Doležal, M.; Kučera, R.; Kučerová-Chlupáčová, M. Replacement of nitro function by free boronic acid in non-steroidal anti-androgens. *RSC Medicinal Chemistry* **2024**. (accepted: 5.9.2024)

DOI:

IF = 4,1; AIS = 0,894