

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Syntéza nových derivátů
pyrazolopyrazinonu jako potenciálních
inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy

Bakalářská práce

Autor práce: Gabriela PUCHÝŘOVÁ
Studijní program: Bioorganická chemie a chemická biologie
Vedoucí práce: RNDr. Lucie BRULÍKOVÁ, Ph.D.

Olomouc 2023

PROHLÁŠENÍ:

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci na téma „Syntéza nových derivátů pyrazolopyrazinonu jako potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy“ zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. a s použitím informačních zdrojů a literatury, které dále cituji v seznamu zdrojů. Dále souhlasím, aby tato bakalářská práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 9. 4. 2023

Gabriela PUCHÝŘOVÁ

PODĚKOVÁNÍ:

V první řadě bych chtěla poděkovat paní RNDr. Lucii BRULÍKOVÉ, Ph. D. za odborné vedení, profesionální přístup, cenné rady i trpělivost. Velice si vážím možnosti pracovat v její výzkumné skupině, které rovněž patří velký dík. Poděkovat bych chtěla také paní laborantce Lence Pospíšilové za pomoc s biologickými testy a RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph. D. za měření HRMS analýz.

Velké poděkování patří celé mé rodině za podporu nejen během psaní bakalářské práce, ale i během celého studia. Na závěr bych chtěla také skvělým přátelům, které mám kolem sebe, bez nichž by to bylo mnohem složitější.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantu Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2023_20).

BIBLIOGRAFICKÁ KLASIFIKACE

JMÉNO A PŘÍJMENÍ AUTORA:	Gabriela Puchýřová
NÁZEV PRÁCE:	Syntéza nových derivátů pyrazolopyrazinonu jako potencionálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy
TYP PRÁCE:	Bakalářská
PRACOVIŠTĚ:	Katedra organické chemie
VEDOUcí PRÁCE:	RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
ROK OBHAJOBY PRÁCE:	2023

ABSTRAKT:

Tato práce v teoretické části seznamuje čtenáře s onemocněním zvaným tuberkulóza (TB) a jejími formami. Přehledně je nastíněno rozdělení a popis známých rezistencí na léčiva. Dále se práce věnuje popisu léčby TB, léčiv včetně mechanismů účinků, důvodů vzniku rezistence i vedlejších účinků. Jsou zde shrnuty molekulové cíle, na které léčba v buňce cílí i problematika vakcinace. Kapitola je zakončena epidemiologickou situací v ČR za rok 2021 v jednotlivých krajích. Druhá kapitola se zaměřuje na detailní popis mykobakteriální ATP synthasy a na princip fungování tohoto důležitého enzymu. Ve třetí kapitole je řeč o inhibici tohoto multienzymového komplexu, která rovněž znamená i smrt mykobakterie. Zmíněna jsou léčiva fungující na tomto principu.

Praktická část se zabývá syntézou derivátů pyrazolopyrazinonu jako potenciálních inhibitorů zmíněného multienzymového komplexu a optimalizací reakčních kroků. Krom výsledků samotné syntézy jsou v práci také k dispozici výsledky biologické aktivity jednotlivých látek.

KLÍČOVÁ SLOVA: tuberkulóza, léčiva, deriváty pyrazolopyrazinonu, antimykobakteriální aktivita, ATP synthasa, syntéza, antibakteriální aktivita

POČET STRAN:	66
POČET PŘÍLOH:	18
JAZYK:	čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

AUTHOR'S NAME A SURNAME: Gabriela Puchýřová
TITLE: Synthesis of new pyrazolopyrazinone derivatives as potential inhibitors of mycobacterial ATP synthase
TYPE OF THESIS: Bachelor
DEPARTMENT: Department of Organic Chemistry
ADVISOR: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
THE YEAR OF PRESENTATION: 2023

ABSTRACT:

The theoretical part discusses the illness called tuberculosis and its forms. Some known forms of resistance to the antituberculosis agents are briefly described. The thesis is further focused on tuberculosis treatment, including the mechanism of the drug action, considering the side effects and the development of antituberculous resistance. There are also some antituberculosis targets within the mycobacteria cell described. The thesis also discusses the issue of vaccination. The final topic of the first chapter is devoted to the epidemiological situation in the regions of the Czech Republic in 2021. The next chapter is focused on the study and description of the mycobacterial ATP synthase and the working mechanism of this vital enzyme complex. The third chapter is about the inhibition of the mycobacterial ATP synthase, which is connected to the cell death of mycobacteria. Some drugs described are based on this inhibition.

The experimental part focuses on synthesising pyrazolopyrazinone derivatives as potent inhibitors of the mentioned enzyme complex and the synthesis optimization. Apart from the synthesis results, there are also some results of the biological activity tests of the synthesized compounds included in the thesis.

KEYWORDS: tuberculosis, drugs, pyrazolopyrazinone derivatives, antimycobacterial activity, ATP synthase, synthesis, antibacterial activity

NUMBER OF PAGES: 66
NUMBER OF APPENDIXES: 18
LANGUAGE: Czech

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
ÚVOD	11
CÍL PRÁCE	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1. Tuberkulóza	14
1.1 Rezistence	15
1.2 Latentní forma tuberkulózy	16
1.3 Diagnostika TB	16
1.4 Léčiva	17
1.5 Nedávno schválená léčiva	22
1.6 Léčba tuberkulózy	25
1.7 Vakcinace	26
1.8 Situace TB v ČR	28
2. Mykobakteriální ATP synthasa	30
2.1 Mechanismus mykobakteriální ATP synthasy	31
3. Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy	32
VÝSLEDKY A DISKUSE	34
4. Reakční strategie syntézy A	35
4.1 Příprava diethyl-1-(2-bromethyl)- <i>IH</i> -pyrasol-3,5-dikarboxylátu	35
4.2 Příprava diethyl-1-(2-azidoethyl)- <i>IH</i> -pyrazol-3,5-dikarboxylátu	36
4.3 Cyklizace vedoucí k ethyl 4-oxo-4,5,6,7-tetrahydropyrazol[1,5- <i>a</i>]pyrazin-2- karboxylátu	36
4.4 Reakce vedoucí na benzylový derivát s esterovou skupinou	37

4.5	Hydrolýza A	38
4.6	Hydrolýza B.....	39
4.7	Substituce morfolinem na benzylový derivát	39
5.	Reakce strategie syntézy B	40
5.1	Přímá substituce za vzniku morfolinového derivátu	41
5.2	Reakce s morfolinem.....	41
5.3	Reakce vedoucí na konečné deriváty	41
6.	Biologická aktivita.....	43
6.1	Kultivování a měření inhibiční zóny	43
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		45
7.	Obecné informace	45
8.	Příprava derivátů pyrazolopyrazinonu.....	46
8.1	Příprava brom-derivátu 2.....	46
8.2	Příprava azid-derivátu z brom-derivátu.....	46
8.3	Cyklizace azid derivátu	47
8.4	Substituce morfolinem.....	47
8.5	Obecný postup pro přípravu finálních derivátů 10.....	48
ZÁVĚR		51
ZDROJE.....		52
PŘÍLOHY		58

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
AK	aminokyselina, aminokyselinová
$\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6$	trimethylaluminium
AMK	amikacin
BCG	Bacille Calmette–Guérin
BD	benzylový derivát
BDQ	bedaquiline
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
CH_3CN	acetonitril
$\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}_2$	dibromethan
CFZ	klofazimin
CF_3	trifluormethyl
CN	kyanid/nitrilová skupina
Cl	chlor
CS	cykloserin
Cs_2CO_3	uhličitan cesný
CYP3A4	cytochrom P 3A4
ČR	Česká republika
DCM	dichlormethan
DLM	delamanid
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	<i>Escherichia coli</i>
Ekv.	ekvivalent
EMB	ethambutol
ETO	ethionamid
EtOAc	ethylacetát

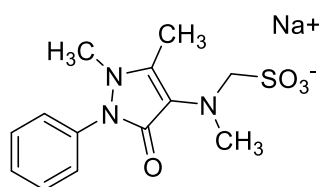
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration Drug)
FQ	Fluorochinolony
HCl	kys. chlorovodíková
HDT	terapie zaměřená na hostitele (Host-Directed Therapy)
Hex	hexan
H ₂ O	voda
INH	isoniazid
INH-TB	isoniazid drug-rezistentní
IPA	isopropyl alkohol (propanol)
KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O	tetrahydrát šťavelanu sodno-draselný
K ₂ CO ₃	uhličitan draselný
KOCH	Katedra organické chemie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LFX	levofloxacin
LiOH	hydroxid lithný
LLO	listeriolysin O
LZD	linezolid
MDR	multidrug-rezistence
MF	mobilní fáze
MFX	mixifloxacin
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MV	<i>Mycobacterium vaccae</i>
NaH	hydrid sodný
NaN ₃	azid sodný
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAS	kyselina p-aminosalicylová
PBN	fenylbutylnitron
PCR	polymerázová řetězová reakce

P _i	anorganický fosfát
PMF	protonmotivní hnací síla (proton motive force)
Pre-XDR	preextenzivně drug-rezistentní
PPD	purifikovaný proteinový derivát
PPh ₃	trifenyl fosfin
PPh ₃ O	trifenyl fosfin oxid
PTO	prothionamid
PZA	pyrazinamid
Δp	transmembránový elektrochemický potenciál
RIF	rifampicin
RR-TB	rifampicin drug-rezistentní
RVO	rotační vakuová odparka
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SiO ₂	oxid siřičitý
STM	streptomycin
SQ	squaramidy
TB	tuberkulóza
TDM	trehalosa dimykolát
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná kapalinová chromatografie
TMM	trehalosa monomykolát
TRD	terizidon
VL	výchozí látka
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR	extenzivně drug-rezistentní

ÚVOD

Předkládaná bakalářská práce se zabývá syntézou nových derivátů pyrazolopyrazinonu, přičemž důvodem syntézy jsou biologické vlastnosti těchto látek.

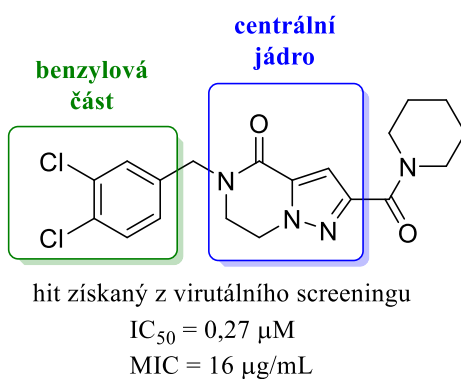
Již u samotných derivátů pyrazolu byla v minulosti prokázána celá řada biologických vlastností, např. vlastnosti antimikrobiální,^{1,2} protirakovinné³, protizánětlivé,⁴ antituberkulární,^{5,2} nebo kardiovaskulární. Mimo to některé deriváty odvozené od pyrazolu fungují jako analgetika⁶ či antikonvulziva⁷ (skupina léčiv využívaných např. na léčbu a prevenci epileptických záchvatů k potlačení křečí s nemocí souvisejících). Lze zmínit např. Novalgin (Dipyron nebo Metamizol), což je účinné analgetikum, antipyretikum vykazující rovněž spasmolytickou aktivitu (Obr. 1).⁷



Novalgin

Obr. 1: Struktura léčiva na bázi pyrazolového kruhu ve struktuře

Později se pozornost vědeckých skupin zaměřila na syntézu a studium biologické aktivity derivátů odvozených od pyrazolopyrazinonu. Toto spojení dvou heterocyklických struktur přineslo zajímavé výsledky zvláště pak v oblasti antimykobakteriálních účinků.⁸ V roce 2017 byla publikována studie uvádějící výsledky automatizovaného screeningu 10 000 sloučenin. Mezi testovanými sloučeninami byl i derivát 6,7-dihydropyrazolo[1,5-*a*]pyrazin-4-one (Obr. 2), který byl vybrán jako hit pro další optimalizaci struktury.⁸ Autoři zmíněného článku dále studovali různé strukturní modifikace této sloučeniny, a to jak modifikace benzylové části, tak i centrálního skeletu (Obr. 2).

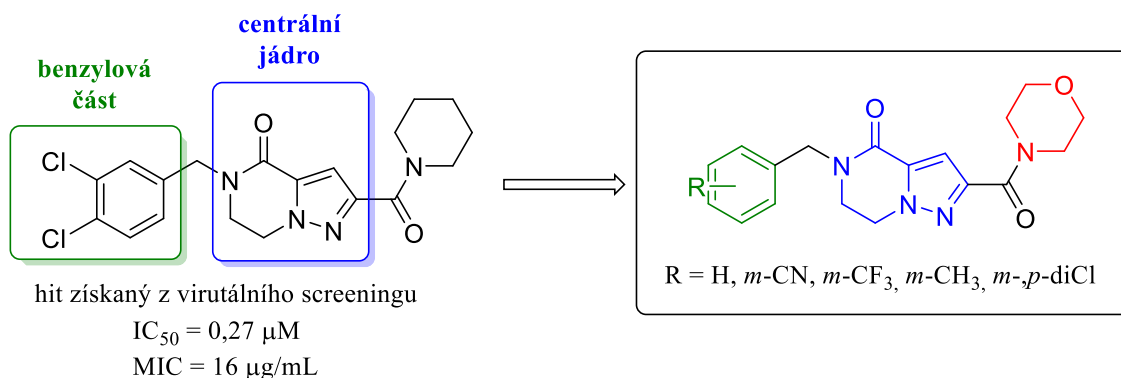


Obr. 2: Pyrazolopyrazinon jako inhibitor Mykobakteriální ATP synthasy.⁸

Pozornost naší výzkumné skupiny zaujal zvláště fakt naznačující, že tyto látky⁸ cílí na mykobakteriální ATP synthasu. Mykobakteriální ATP synthasa je jedním z atraktivních molekulárních cílů při léčbě drug-rezistentních kmenů tuberkulózy. Z tohoto důvodu byla pozornost předkládané bakalářské práce zaměřena na vytvoření SAR studie navazující na publikaci z roku 2017.⁸

CÍL PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce je syntéza a studium biologické aktivity nových derivátů pyrazolopyrazinonu jejichž obecná struktura je znázorněna na Obr. 3 vpravo. Při návrhu jednotlivých modifikací jsme vycházeli z několika faktů. Zásadním faktem byla neznalost přesného cíle v rámci mykobakteriální ATP synthasy, a tudíž nemožnost smysluplně predikovat nové struktury. V první řadě jsme ponechali centrální jádro, které předchozí publikace vcelku podrobně prozkoumala v rámci scaffold hoppingu. Následně jsme se rozhodli zaměnit piperidinový skelet za morfolinový, jelikož kyslíkový atom morfolinového derivátu může přispět k dalším nekovalentním interakcím v aktivním místě. A v poslední řadě jsme se rozhodli prozkoumat další strukturální modifikace v benzylové části.



Obr. 3: Struktura popsaneho pyrazolopyrazinoveho derivatu a nove navrzené deriváty.

Jednotlivé dílčí cíle práce zahrnují:

1. Vypracování literární rešerše
2. Vytvoření návrhu syntetického plánu a cílových sloučenin
3. Optimalizace reakčních podmínek vedoucích k cílovým derivátům
4. Příprava série cílových derivátů a jejich plná charakterizace
5. Předání finálních látek na testování biologické aktivity
6. Sepsání bakalářské práce

TEORETICKÁ ČÁST

1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je bakteriální, infekční onemocnění přenášené patogenem ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex*, bakterií *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*.⁹ Jde o tyčinkovitou, nepohyblivou a slabě grampozitivní bakterii. Tuto bakterii objevil lékař Robert Koch na konci 19. století (1882). V roce 1905 získal Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. TB se šíří kapénkovou infekcí a patří mezi nejrozšířenější infekční onemocnění na světě.^{9,10} Tuberkulóza se řadila dlouhá léta mezi nečastější příčinu smrti způsobenou jediným patogenem. Nyní je na pomyslném prvním místě onemocnění, které způsobilo pandemii Covid 19.¹¹ Právě pandemie Covid 19 měla dopad na nákazu TB. Výrazně totiž přispěla a změnila přístup k diagnostice a léčbě tohoto onemocnění, kdy čísla počtu nově nakažených opticky výrazně klesla. Za rok 2021 mělo pozitivní test na TB asi 6,4 milionů lidí, z nichž nemoci podlehl asi 1,4 milionů a 187 000 úmrtí bylo evidováno u lidí s pozitivním HIV testem. Pro srovnání v roce 2020 se uvádí 5,8 milionu nově diagnostikovaných případů.¹²

Jeden z hlavních problémů při léčbě TB je vznik rezistentních kmenů. Rezistenci můžeme rozdělit na získanou, což se stává v případě, že nemoc nebyla dostatečně zaléčena. Pokud se rezistentním kmenem nakazí další osoba, která pro tuto nemoc nebyla doposud léčena, hovoříme o tzv. primární rezistenci. V poslední dekádě hovoříme hlavně o multilékově rezistentních (MDR) a extenzivně rezistentních (XDR) kmenech mykobakterií, které představují závažný problém i ve vyspělých zemích s rozvinutým zdravotnickým systémem. V zemích třetího světa se pak tato závažnost násobí.⁹

Dle WHO je čtvrtina celosvětové populace nakažena tzv. latentní formou TB, která se těžce identifikuje, protože postižená osoba nevykazuje žádné symptomy.

Nejčastější formou onemocnění jsou plicní formy, ale onemocnění může postihnout i ostatní orgány či tkáň. Plicní formy zaujímají asi 80% zastoupení z celkové nákazy.^{9,13} Léčba TB obvykle trvá přibližně 6-9 měsíců, v případě multirezistentních kmenů se však může protáhnout až na 24 měsíců. Léčebný režim je rozdělen do dvou fází. Délku léčby samozřejmě ovlivňuje i celkový zdravotní stav pacienta. Při léčbě TB

se užívají nejrůznější kombinace léčiv, mezi ta standardně používaná patří *Isoniazid* (INH), *Rifampicin* (RIF), *Pyrazinamid* (PZA), *Streptomycin* (STM) a bakteriostatický *Etambutol* (EMB) (bude podrobně popsáno dále). Dlouhodobá léčba s kombinací mnoha přípravků najednou vyvolává bohužel spoustu nežádoucích účinků (nefrotoxicita, závratě a další). Doléčení infekce je však přesto naprosto zásadní, a to jak z pohledu zdraví pacienta, tak i z pohledu zamezení vzniku rezistence mykobakterie. Prevencí může být očkování, přičemž k tomuto účelu se používá vakcína z mykobakteriálního kmene *Mycobacterium bovis* tzv. *Bacille Calmette–Guérin* (BCG) vakcína. Důležité je také vyhledávání zdrojů nákazy u pacientů, kteří jsou infekční pro své okolí.^{9,13}

1.1 Rezistence

Rezistentní kmeny jsou imunní vůči běžně doporučené léčbě tzv. léčbě první linie. Dle světové zdravotnické organizace (WHO) se rezistentní kmeny tuberkulózy nacházejí na všech kontinentech. Důvodem vzniku rezistentních forem tuberkulózy je nevhodná nebo nepravidelná léčba.¹⁴ Hlavní příčina však spočívá ve schopnosti bakterie přizpůsobovat se a vytvářet nejrůznější mutantní kmeny,¹⁵ které způsobují, že u proléčiv může být např. snížena jejich aktivace na aktivní látku. Může rovněž docházet ke snížení propustnosti léčiva přes membránu nebo ke změně struktury léčiva či samotného cíle.¹⁶

Mechanismy vzniku rezistence jsou spojeny s genomovými variantami u cílů léčiv nebo pro-lékových aktivátorů, které se mohou vyskytovat při genových interakcích. Cílem těchto aktivátorů je přeměnit mykobakteriální enzymy, které následně proléčivo transformují na jeho aktivní formu (př. INH). V případě, že kódovací geny těchto enzymů jsou mutované, mohou ztratit svou funkci, nedochází k přeměně proléčiva na jeho aktivní formu a vzniká rezistence.¹⁷

K detekci takovýchto mutantů se využívá metoda PCR (= polymerázová řetězová reakce). Diagnostika fenotypové rezistence je založena na kultivaci, kdy je ze sputa pacientovi izolována bakterie (agens), která je následně testována na růst za přítomnosti léčiv. Kultivace trvá týdny až měsíce, je finančně nákladná a těžko proveditelná.¹⁸

Na základě rezistence na určité léčivo nebo skupinu léčiv rozlišujeme několik druhů rezistentních kmenů TB:

- **INH-TB** (= isoniazid rezistentní TB), kmen rezistentní na INH¹⁹
- **RR-TB** (= rifampicin rezistentní), kmen rezistentní na rifampicin (RIF)²⁰

- **MDR-TB** (= multilékově rezistentní TB), kmen rezistentní na dvě nejefektivnější léčiva první linie INH a RIF
- **pre-XDR-TB** (= pre-extenzivně rezistentní TB), definována jako rezistence na INH, RIF a dále na jakýkoli fluorochinolon (FQ) (třída léčiv druhé linie)
- **XDR-TB** (= extenzivně rezistentní TB), definována jako rezistence na INH, RIF, FQ a nejméně jedno aditivní léčivo bedaquiline nebo linezolid¹⁹

1.2 Latentní forma tuberkulózy

Latentní infekce se označuje jako stav, kdy byl organismus vystaven a infikován *Mtb*, ale jedinec nemá žádné příznaky aktivního onemocnění.²¹ Touto formou infekce trpí dle WHO 1/4 světové populace.¹⁹ V latentním stádiu dokáže *Mtb* přežít několik let. Skupina takto infikované populace je vystavena riziku reaktivace. Latentní forma jako taková není přenosná na ostatní jedince, a tak nepředstavuje riziko pro okolí. Problém nastává až při reaktivaci. Rizikovým faktorem pro rozvinutí nákazy je vysoký věk, alkoholismus, oslabený imunitní systém, drogová závislost, stres a slabé sociální zázemí.⁹

Asi nejzávažnější příčinou reaktivace TB, co se léčby týče, je souběžné onemocnění HIV, kdy dochází k tzv. koinfekci. HIV neboli virus lidské imunitní nedostatečnosti se s TB výrazně ovlivňují ve všech aspektech jako je patogeneze, epidemiologie, klinické projevy, léčba i prevence.²² Naopak TB je nejčastější příčinou smrti u pacientů, kterým bylo diagnostikováno HIV.^{10,13}

1.3 Diagnostika TB

Diagnostika probíhá pozitivním tuberkulinovým kožním testem s použitím intradermálně purifikovaného proteinového derivátu (PPD), rentgenovým snímkem hrudníku, který vykazuje jizvy svědčící o staré TB či vyšetřením sputa.²³ Pro identifikaci tyčinek se využívá Ziehl-Neelsenové barvení (za horka, karbolfuchsin-kyselý alkohol-malachitová zeleň). Při pozitivním nálezů jsou pod mikroskopem patrné růžové až červené tyčinky. Tato metoda často selhává a setkáváme se i s falešně negativními nálezy.²⁴ Tuberkulinový test není vždy zcela průkazný a mohou se objevit i falešně

pozitivní výsledky a to např. v případě vakcinace *Mycobacterium bovis bacillus Calmette–Guérin* (BCG).²⁵

1.4 Léčiva

TB je léčena podáváním antituberkulotik. Při léčbě je důležité dodržovat všeobecné léčebné zásady.¹⁰ Léčiva lze rozdělit do dvou skupin: baktericidní, jejichž úkolem je bakterii usmrtit (např. streptomycin) a bakteriostatická, která mají zabránit bakterii v růstu a množení (např. ethambutol). Léky se dále dělí do čtyř základních skupin (Tabulka 1). Tzv. první linie zahrnuje nejúčinnější preparáty pro sensitivní kmeny. Tyto léky však v případě rezistentních kmenů selhávají a přistupuje se tak k léčbě dalšími léky rozdělenými do tří skupin A, B a C (Tabulka 1).²⁶

Tab. 1: Základní skupiny léčiv proti tuberkulóze

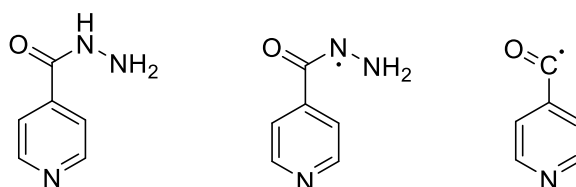
Skupina	Léčiva	Cíl působení
Léčiva první linie	isoniazid (INH)	inhibice syntézy mastných kyselin (MK) prostřednictvím InhA
	rifampicin (RIF)	inhibice bakteriální DNA dependentní RNA polymerázy ²⁷
	ethambutol (EMB)	inhibice syntézy buněčné stěny (arabinogalaktan)
	pyrazinamid (PZA)	inhibice membránového transportu
Skupina A	levofloxacin (LFX)	inhibice bakteriální DNA gyrázy ²⁸
	mixifloxacin (MFX)	
	bedaquiline (BDQ)	inhibice ATP synthasy
	linezolid (LZD)	inhibice iniciace syntézy bakteriálních proteinů ²⁹
Skupina B	klofazimin (CFZ)	předpokládá se působení na buněčnou membránu
	cykloserin (CYS)	inhibice biosyntézy peptidoglykanů ³⁰

	terizidon (TRD)	inhibice syntézy proteinů ³¹
Skupina C	ethionamid (ETO)	inhibice InhA
	prothionamid (PTO)	inhibice InhA ³²
	kyselina p-aminosalicylová (PAS)	inhibice tvorby redukovaných druhů folátu (kofaktory – syntéza methioninu) ³³
	delamanid (DLM)	inhibice biosyntézy kys. mykolové ³⁰
	ethambutol (EMB)	inhibice syntézy buněčné stěny (arabinogalaktan)
	pyrazinamid (PZA)	inhibice membránového transportu
	amikacin (AMK) nebo streptomycin (STM)	inhibice iniciace translace při syntéze proteinů

1.4.1 Léčiva první linie

Isoniazid (INH): chemicky hydrazid kyseliny isonikotinové (Obr. 4) je silné a vysoce citlivé léčivo. Toto proléčivo je aktivováno mykobakteriálním enzymem KatG (bifunkční enzym důležitý pro obranu mnoha bakterií a plísní před oxidačním stresem, který vzniká při imunitní odpovědi hostitele) a multifunkční katalázou-peroxidázou. Principem aktivace (oxidace) je vytvoření volných radikálů na uhlíku, kyslíku a dusíku (Obr. 4), s tvorbou acylových, acylperoxo a pyridylových radikálových aduktů fenylobutylnitronu (PBN).³⁴ Po aktivaci je vzniklý adukt schopen inhibovat InhA³⁵ a to má za následek inhibici biosyntézy kyseliny mykolové.³⁶ Hlavním místem mutace vedoucí k rezistenci je gen *katG*. Tento gen je zodpovědný za snížení toxicity léčiva a podporu přežití bakterie.³⁴

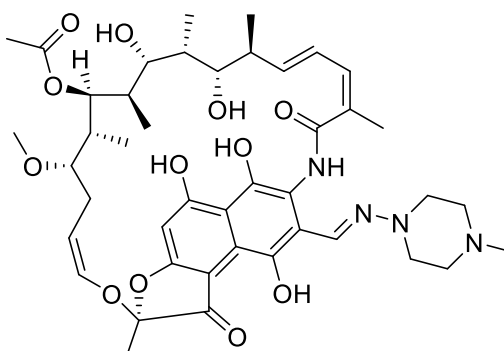
Při užívání je nejčastěji negativně ovlivněna nervová soustava a játra. Dále se objevuje zvracení, nauzea, dyspepsie a kožní vyrážky. Závažnost negativních účinků je ovlivněna celkovým stavem pacienta.³⁷



Obr. 4: Struktura isoniazidu a jeho radikálů³⁴

Rifampicin (RIF): patří mezi nejúčinnější a širokospektrální antibiotika, které jsou zcela zásadní v léčbě TB (Obr. 5). Léčivo volně difunduje do tkání, buněk a bakterií a díky tomu je velmi účinné proti intracelulárním patogenům. Mechanismus působení RIF spočívá v inhibici bakteriální DNA dependentní RNA polymerázy (RNAP). Rezistence na toto léčivo je spojována s mutací genu *rpoB*, který kóduje RNAP β podjednotku.²⁷ β -podjednotka polymerasy inhibuje transkripci respektive dochází k terminaci prodlužování řetězce RNA.³⁸ V případě mutace dochází ke konformačním změnám snižujícím afinitu léčiva k enzymu.³⁹

Nejzásadnějším vedlejším účinkem je porucha krvetvorby, dále se může vyskytovat nauzea, nechutenství, zvracení, bolesti břicha nebo hepatitida. Proto je nutné provádět jaterní testy. Často se objevuje červené zbarvení moči, slz či sputa.³⁷

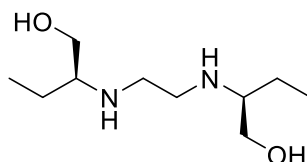


Obr. 5: Rifampicin

Ethambutol (EMB): je bakteriostatické léčivo (Obr. 6) narušující biosyntézu arabinogalaktanu v buněčné stěně a inhibuje tak syntézu buněčné stěny. Existují spekulace, že by rezistence mohla být spojena s mutací v genu *embB*.⁴⁰ Není to však jediná možná mutace, protože existuje významné procento případů, kdy rezistence není způsobena mutací v *embB*, proto je nutné se mechanismem rezistence tohoto léčiva dále zabývat.⁴¹

Při léčbě tímto preparátem se jako vedlejší účinek objevuje retrobulbární neuritida projevující se sníženou zrakovou ostroší, zúžením zřetelného pole a červenozelenou

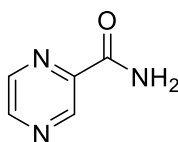
barvoslepostí. Závažnost poškození je závislá na množství dávky a délce léčby. Při medikaci jsou nutné návštěvy u očního lékaře. U pacientů trpících dnou, může dojít k jejímu zhoršení. Méně časté vedlejší účinky jsou: zmatenost, halucinace, leukopenie, kovová pachuť, nauzea až jaterní dysfunkce.³⁷



Obr. 6: Ethambulol

Pyrazinamid (PZA): je analogem nikotinamidu (Obr. 7). Zavedení tohoto léčiva jako léku proti tuberkulóze umožnilo zkrácení doby léčby na 6 měsíců. Jedná se o proléčivo aktivované enzymem pyrazinamidázou/nikotinamidázou, které je kódováno genem *pncA*. Pyrazinamid se prostřednictvím tohoto enzymu přemění na kyselinu pyrazinovou narušující bakteriální membránu a inhibující membránový transport. V případě rezistence dochází k mutaci na už zmíněném genu *pncA*. Není to jediná možná příčina rezistence, může být způsobena také doposud neidentifikovanými regulačními geny.^{39,42}

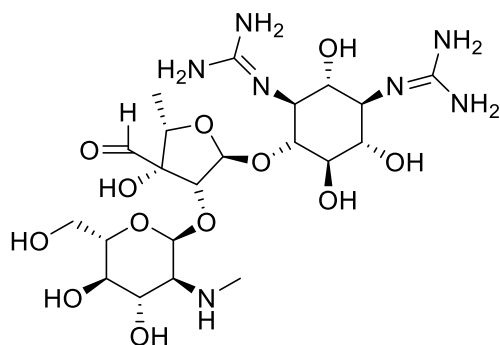
Nejzávažnějším a nejvíce závažným účinkem při terapii je porucha jaterní funkce, která často vede k přerušení léčby a snížení dávky. Dále potom nauzea, myalgie, artralgie nebo kožní vyrážka. Může také dojít k záchvatu dny související s hyperurikémií.³⁷



Obr. 7: Pyrazinamid

Streptomycin (STM): je aminoglykosidové antibiotikum řadící se do první linie (Obr. 8). Pacientům je toto léčivo podáváno injekčně. Tato látka byla původně izolovaná z mikroorganismu *Actinomyces griseus*. Mechanismem účinku aminoglykosidů, kam lze streptomycin zařadit, je inhibice iniciace translace při syntéze proteinů.⁴³ Dochází k nevratnému navázání na 16S rRNA s proteinem S12. Streptomycin také indukuje nesprávné čtení mRNA, což vede k předčasnému ukončení rámce a v konečném důsledku ke smrti bakterie.⁴⁴

Vedlejší účinky jsou ototoxicita, nefrotoxicita a neurotoxicita.³⁷

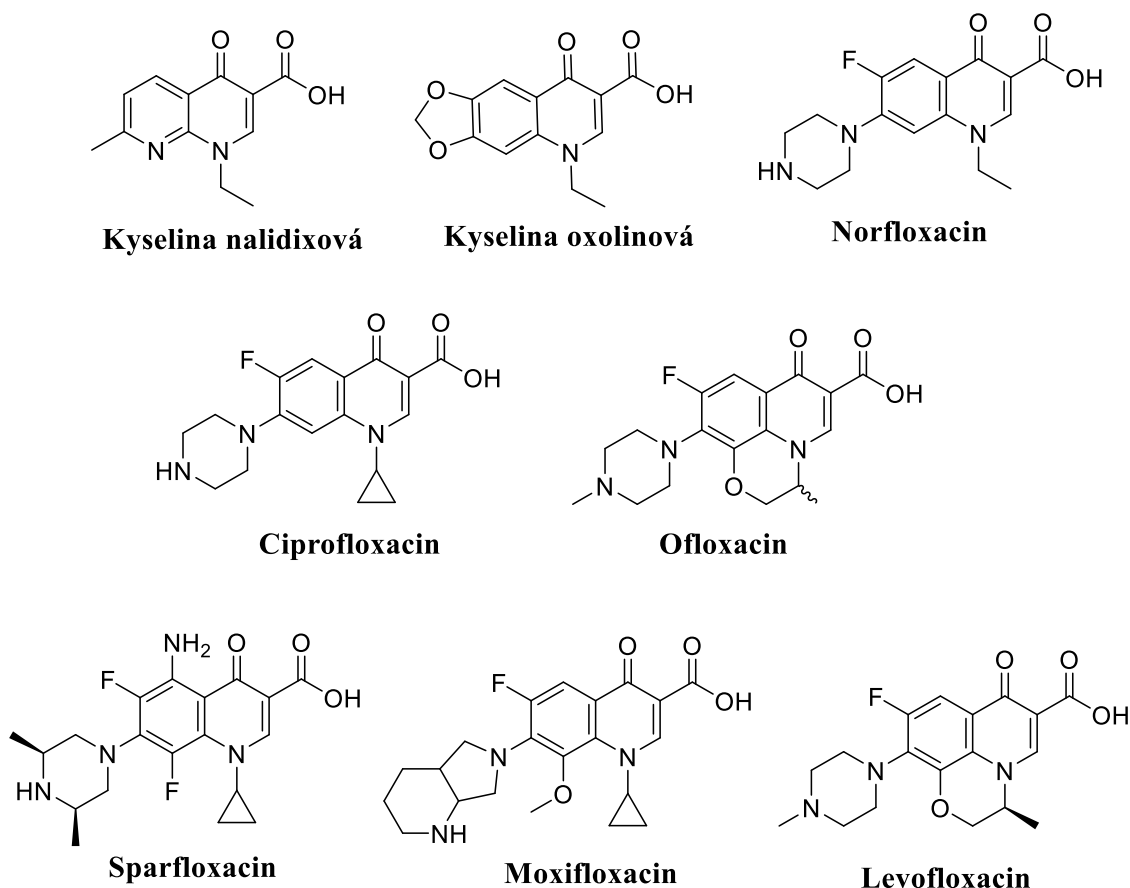


Obr. 8: Streptomycin

1.4.2 Fluorochinolony

Fluorochinolony (Obr. 9) jsou širokospektrální antibakteriální léky s vysokou antimykobakteriální účinností. Tato skupina látek zahrnuje léčiva A z Tabulky 1 (viz výše). Obecně mechanismus účinku fluorochinolonů spočívá v navázání na jednu nebo obě domény bakteriálního enzymu topoizomerázy typu II, DNA gyrázy a topoizomerázy IV a tím dojde k inhibici replikace a transkripce DNA. V případě TB je jediným cílem DNA gyráza. Případná mutace (primárně) ovlivňuje geny kódující tento enzym, tedy *gyrA* a *gyrB*.⁴⁵ Používají se pro léčbu plicní, extrapulmonární a diseminované TB.

Mezi hlášené vedlejší účinky patří např. zánět šlach a ruptura šlach (nejčastěji při léčbě pefloxacinu),⁴⁶ fototoxicita, záchvaty, nauzey, zvracení, zřídka průjemy, dále se pacient může setkat s bolestmi hlavy, závratěmi nebo nespavostí. Fluorochinolony se nepoužívají u léčby dětí, protože může docházet k mutagenezi a abnormalitě chrupavky.⁴⁷



Obr. 9: Chemické struktury nejznámějších fluorochinolonů⁴⁸

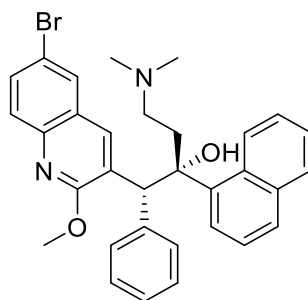
1.5 Nedávno schválená léčiva

Díky lepšímu chápání TB a *Mtb* se v průběhu let vědcům podařilo objevit řadu slibných a nových molekulárních cílů proti TB. Stále je však nesmírně důležité v hledání nových možných strategií léčby pokračovat. Nový lék by měl mít nižší toxicitu, lepší účinnost, být účinný i proti rezistentním kmenům TB a pokud možno by měl být schopný významně zkrátit délku terapie.⁴⁹

Po 50 letech došlo ke schválení nových léčiv proti MDR-TB (jmenovitě Bedaquiline a Delamanid) a na řadu přišla i další nová léčiva.⁵⁰ Krom toho je několik nadějných kandidátů v různých fázích klinického testování např. SQ109.⁵¹

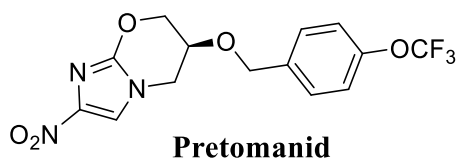
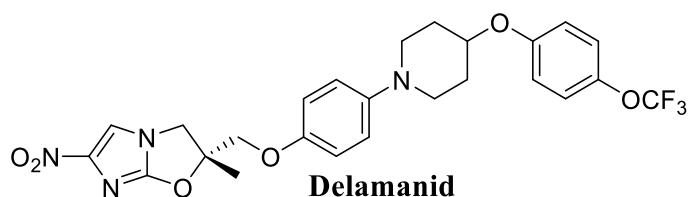
Bedaquiline (schválen FDA v roce 2012) je diarylchinolinové léčivo pro léčbu multidrug a extensivně-drug rezistentních kmenů TB (Obr. 10).⁵² Působí bakteriocidně a sterilizačně.⁵³ Metabolizace léčiva probíhá na CYP3A4.⁵⁴ Jde o první léčivo na trhu zaměřující se na inhibici mykobakteriální ATP synthasy. V terapii se využívá v případě, kdy není možná jiná alternativa. Jako nežádoucí účinky se často objevují bolesti hlavy,

nauzea, zvracení nebo bolesti kloubů.⁵⁵ S léčbou je také spojeno riziko náhlé úmrtnosti, protože kromě inhibice klíčové části enzymu (c a ϵ podjednotky)⁵⁶ důležité pro léčbu TB byla prokázána také inhibice genu hERG srdečního draslíkového kanálu, který je důležitý pro repolarizaci srdečních akčních potenciálů. Disfunkce tohoto genu způsobuje prodloužení QT a to vede k nepravidelnému srdečnímu rytmu a potenciálně i k možné smrti.⁵⁷



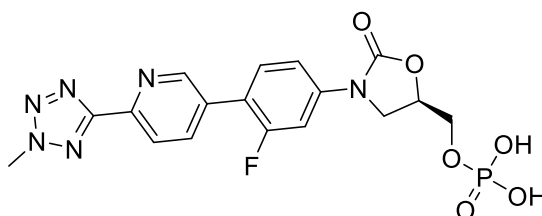
Obr. 10: Bedaquilin

Delamanid (schváleno Evropskou agenturou pro léčivé přípravky a japonskou agenturou pro zdravotnické prostředky a léčiva v roce 2014, Obr. 11)⁵⁰ je činidlo odvozené od nitroimidazooxazolové skupiny sloučenin specializující se na inhibici biosyntézy kyseliny mykolové⁵⁸ (hlavní složka buněčného obalu). Aktivace nitroreduktázy závislá na deazaflavinu dává vznik několika metabolitům a s tím i uvolnění oxidu dusnatého. Tato klíčová molekula v konečném důsledku zodpovídá za inhibici.⁵⁹ Metabolizace je uskutečňována cytochromem P450 a tvorba hlavního metabolitu je regulována albuminem v plazmě. Při léčbě tímto léčivem se jako vedlejší účinky nejčastěji objevují bolesti hlavy, nauzea a závratě. Léčivo je určeno pro pacienty s MDR-TBC.⁶⁰ Obdobně funguje také **pretomanid**.⁵⁹



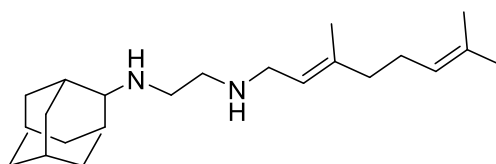
Obr. 11: Struktury delamanidu a pretomanidu

Tedizolid fosfát (schváleno FDA v červnu 2014, Obr. 12)⁶¹ je novým oxazolidinovým pro léčivem, které se v séru metabolizuje na aktivní formu TR-700 (telizolid). Působí proti gram pozitivním mikroorganismům.⁶² Mechanismus účinku je obdobný jako u linezolidu, kde dochází k inhibici proteosyntézy vazbou na podjednotku ribosomu.⁶³ Vedlejší účinky nejsou tak časté ve srovnání s linezolidem, hlášené jsou gastrointestinální poruchy jako je nauzea, průjem či zvracení nebo myelotoxicita. V menšinovém počtu případů se objevil snížený počet červených krvinek.⁶⁴



Obr. 12: Tedizolid fosfát

SQ109 (analog ethambutolu, Obr. 13) má ve srovnání s EMB lepší účinky v *in vivo* i *in vitro* experimentech na myších. Látka se hromadí v plicích v místě infekce, což je příznivá vlastnost vzhledem k účinnosti léčiva.⁶⁵ Mechanismus účinku spočívá v inhibici esenciálního proteinu MmpL3, který je zodpovědný za přenos kyseliny mykolové. Inhibice enzymu znamená efektivní inhibici syntézy mykobakteriální buněčné stěny.⁶⁶



Obr. 13: Struktura SQ109

1.6 Léčba tuberkulózy

Jak už bylo řečeno výše, léčba TB je poměrně komplikovaná a zdlouhavá. V případě, že pacient není nakažen rezistentním kmenem, jsou mu podávány léky spadající do skupiny léčiv první linie. Mezi léčiva první linie se řadí kombinace léků RIF, INH, EMB, PZA. V případě zjištěné rezistence se přistupuje k léčivům druhé linie v upravených léčebných protokolech, kam se řadí *fluorochinolony*¹⁴ a injekční léčiva (*amikacin*, *kapreomycin* a *kanamycin*)¹⁸, ETO, CYS a PAS.¹⁴

Tuberkulóza je v případě senzitivních kmenů léčena ve dvou etapách. V první etapě tzv. intenzivní fázi se obvykle používá kombinace 4 léčiv: STM, RIF, INH, PZA, nebo INH, RIF, PZA, EMB. Tato léčba si klade za cíl co nejrychleji zlikvidovat/zneškodnit počet choroboplodných zárodků a zabránit tak bakterii vytvářet rezistentní kmeny. Takto léčení pacienti jsou během několika dní neinfekční. Doba léčby trvá obvykle 2 měsíce a při léčbě je nutná hospitalizace pacienta.^{10,67}

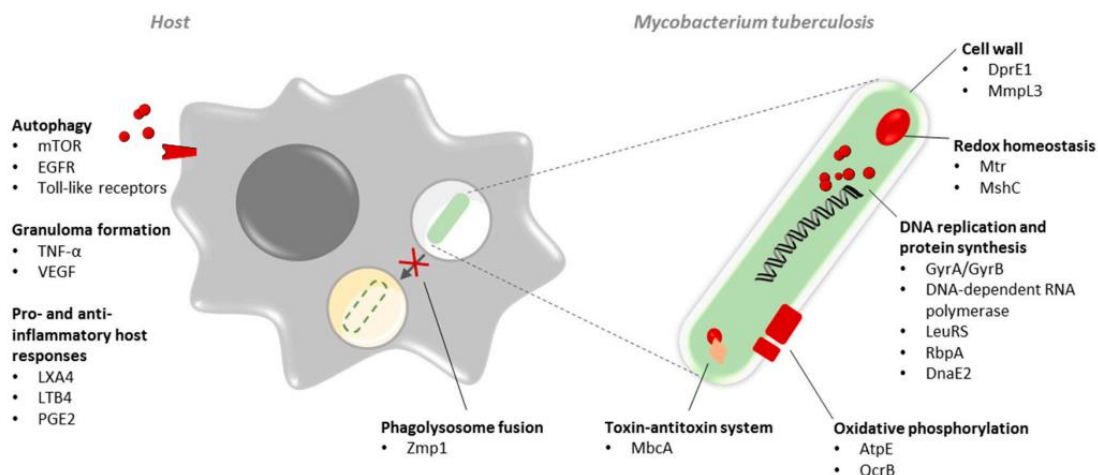
Druhá etapa tzv. pokračovací fáze probíhá ihned po ukončení fáze intenzivní. Pacientovi jsou často podávány dva léky RIF a INZ. Léčba probíhá ambulantně a trvá obvykle 4 měsíce.^{10,67}

Pro léčbu MDR-TB je nutné využití nejméně 5 léků. Ty však nejsou bohužel tak účinné, a navíc u nich pozorujeme výraznější toxicitu než u RIF a INH, které nelze použít díky vzniklé rezistenci. Doba léčby se v takovém to případě prodlužuje na 18-24 měsíců.⁶⁸

1.6.1 Léčba TB z pohledu molekulových cílů

Terapie pacientů trpících TB je z pohledu molekulových cílů vedena dvěma směry (Obr. 14). Na úrovni bakterie je mířeno především na životně důležité metabolické dráhy, kam řadíme např. replikaci DNA a syntézu proteinů nebo oxidativní fosforylaci (buněčné dýchání). Dalšími cíli jsou buněčná stěna nebo homeostáza.

Právě syntéza buněčné stěny je velmi oblíbený a častý cíl při designu a přípravě nových léčiv. Mykobakteriální buněčná stěna se skládá z kovalentně vázaného komplexu tří heteropolymerů: peptidoglykanu, arabinogalaktanu a mykolových kyselin, tzv. komplex mykoly-l-arabinogalaktan-peptidoglykan.⁶⁹ Tato komplexní sestava tvoří asymetrickou netekutou monovrstvu, která je na svém povrchu modifikována nekovalentně asociovanými „kapsulárními“ lipidy, jako je trehalosa monomykolát (TMM), trehalosa dimykolát (TDM) a další.⁶⁶



Obr. 14: Terapie na úrovni bakterie a řízená hostitelem⁷⁰

Druhou variantou je tzv. terapie zaměřená na hostitele (HDT) představující atraktivní strategii mezi *Mtb* a hostitelskou imunitou. Vědecké bádání je zaměřeno např. na tvorbu granulomů nebo autofagie.

Princip HDT spočívá v modulaci imunitního systému podáváním látek, které zlepšují imunitní odpověď hostitele anebo snižují zánět související s tkáňovou patologií. Očkování lze také považovat za formu imunomodulační terapie, která je zároveň jednou z nejúspěšnějších a cenově nejefektivnějších forem terapie.⁷¹ Léčba může být účinná proti MDR/XDR mykobakteriím, které jsou necitlivé na současná antibiotika. Tato cesta se nezaměřuje na konkrétní cíl v bakterii, proto zde existuje mnohem nižší pravděpodobnost vytvoření rezistence. Sloučeniny zaměřené na hostitele mají vysokou šanci v boji proti metabolicky neaktivním, nereplikujícím se bacilům. Mohlo by dojít ke zkrácení zdoluhavé doby terapie a s tím související potenciální snížení dávky podávaných antibiotik.⁷²

Hledání nových cílů léčiv je nezbytné v boji proti rezistencím na dosavadní léčiva. Vývoj nového léčiva mající odlišný mechanismus účinku by mohl pomoci v léčbě rezistentních kmenů a případně zamezit vzniku rezistence při léčbě v kombinaci se současnými léčivy.⁷⁰

1.7 Vakcinace

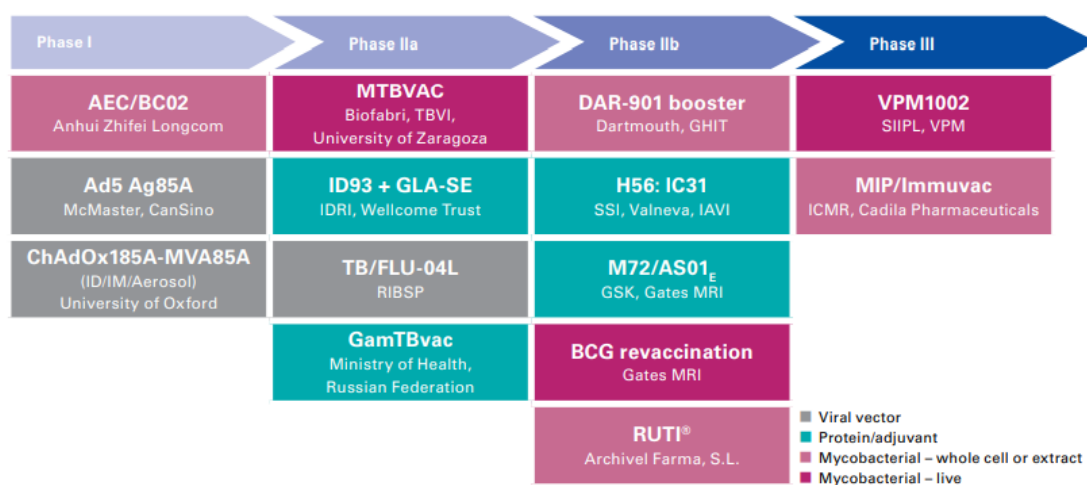
V současnosti stále existuje jediná licencovaná vakcína proti tuberkulóze a tou je *Bacille Calmette–Guérin* (BCG). Vakcinačním kmenem je *M. bovis* způsobující TB u skotu.

Cílem vakcíny bylo zabránit závažným formám TB u kojenců. Ve 20. století byla právě TB jedním z nejčastějších důvodů úmrtí u této skupiny obyvatel. Vakcína byla poprvé podána člověku v roce 1921. Očkované děti vyrůstaly s TB nakaženým pacientem, aniž by se u nich nemoc rozvinula. Bohužel tato vakcína není dostatečně účinná na ochranu proti plicní formě TB u dospělých a dospívajících, což je v dnešní době nejrozšířenější forma a navíc získaná ochrana je pouze přechodná a trvá jen několik let.⁷³ V ČR bylo povinné očkování zavedeno v roce 1952 a platilo až do 1. 11. 2010, kdy byl změněn očkovací kalendář dle vyhlášky č. 299/2010 Sb.^{74,75}

V klinických studiích je několik kandidátů na vznik další vakcíny (Obr. 15). Pro jednoduchost je lze rozdělit na dvě skupiny:

a) **mykobakteriální celobuněčné vakcíny** – Lze sem zařadit potenciální vakcíny s názvy *VPM 1002*, *MTBVAC* (živé vakcíny oslabené genetickou modifikací) nebo [*MIP*], *DAR-901*, *RUTI*, *Vaccae* (odvozené od usmrcených nebo frakcionovaných celých mykobakterií). Tato skupina je velice atraktivní, protože na podobném principu funguje i schválená vakcína BCG.⁷⁶ *VPM 1002* je rekombinantní BCG, kdy je gen ureázy C nahrazen genem kódujícím listeriolysin O (LLO). Přičemž LLO je cytolyzin závislý na cholesterolu. Tvoří póry ve fagolyzozomální membráně, což umožňuje únik *L. monocytogenes* do cytosolu.⁷⁷ Exprese a následné uvolnění antigenu vede k autofagii, aktivaci inflamazomů a apoptóze.⁷⁸

b) **podjednotkové vakcíny** – Tyto vakcíny obsahují malý počet klíčových antigenů a lze je rozdělit na subskupinové vakcíny s adjuvans proteinem a rekombinantní vakcíny s virovým vektorem.⁷⁶



Obr. 15: Klinické fáze testování jednotlivých potencionálních vakcín, srpen 2020⁷⁹

1.7.1 Kontraindikace BCG

Kontraindikace se týká předčasně narozených dětí a stejně tak i dětí podvyživených. Nebezpečné je to také pro těhotné ženy, onkologické pacienty a imunokompromitované pacienty ať už imunodeficit je způsobený vrozeně, imunosupresivou, zářením nebo infekcí HIV. Dále by rovněž neměli být očkovaní pacienti, kteří podstoupili v posledních 30 dnech léčbu antibiotiky. Kontraindikace nastává i v případě pozitivního tuberkulinového kožního testu. Naopak u lidí s latentní formou TB je očkování bezpečné.⁸⁰

1.8 Situace TB v ČR

V České republice je oproti zbytku světa situace příznivější, protože v posledních letech nemocných ubývá. Stává se tak pomyslným mezníkem mezi západní a východní Evropou.⁹

Dle údajů zjištěných ze Zdravotnické statistiky ČR (vydává Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR) se v roce 2021 nakazilo 357 lidí, což je nižší číslo oproti rokům předchozím (Obr. 16). Mezi nemocnými bylo 25 lidí, kteří byli již v minulosti antituberkulotiky léčeni. Z výše uvedeného celkového počtu nakažených bylo v 90, 2 % (tedy v 322 případech) potvrzena plicní forma. V tomto roce byl zaznamenán rostoucí trend onemocnění u mladších pacientů ve věku do 14 let a stejně tak ve věkové kategorii 20-29 let. Celkově se však TB nejčastěji objevovala ve věkové kategorii 55-59 let. Nejvíce nakažených osob zaznamenalo hlavní město Praha (85 případů), pomyslné druhé místo zaujmul Jihomoravský kraj (45 případů) a na třetím v pořadí byl evidován kraj Středočeský (42 případů). Naopak nejnižší počet nakažených lidí byl dle statistiky v kraji Zlínském (7 případů). Situaci v ostatních krajích zobrazuje graf níže.⁸¹



Obr. 16: Graf situace počtu nemocných v ČR v roce 2021

Biologický materiál od 274 pacientů byl testován na citlivost k léčivům. Z testování vyplývá, že u 9,5 % testovaných vzorků se prokázala rezistence na INH, 8,8 % testovaných vzorků připadá na STM 4,0 % pro RIF, 2,9 % pro PZA 2,6 % pro EMB. Multirezistentní kmen se prokázal u 3,6 % případů. Hlášeno bylo 37 úmrtí.⁸¹

2. Mykobakteriální ATP synthasa

ATP synthasa je důležitý všudypřítomný multiproteinový komplex podílející se na energetickém metabolismu prakticky všech živých buněk. Skládá se ze dvou hlavních funkčních domén F_0 a F_1 spojených centrálním blokem a periferní stopkou.⁸² Protein využívá energii uloženou v transmembránovém elektrochemickém potenciálu Δp , kdy se molekula ADP (adenosyndifosfát) fosforyluje na ATP (adenosyntrifosfát) katalytickou částí F_1 . Podjednotka F_0 obsahuje motor generující rotaci prostřednictvím energie uložené v Δp . Složení ATP synthasy je rozdílné vzhledem k typu organismu.⁸³ U bakterií najdeme multiproteinový komplex v plazmatické membráně, u fotosyntetizujících organismů v membráně tylakoidů a eukaryotické buňky mají ATP synthasu umístěnou ve vnitřní straně mitochondriální membrány.⁸⁴

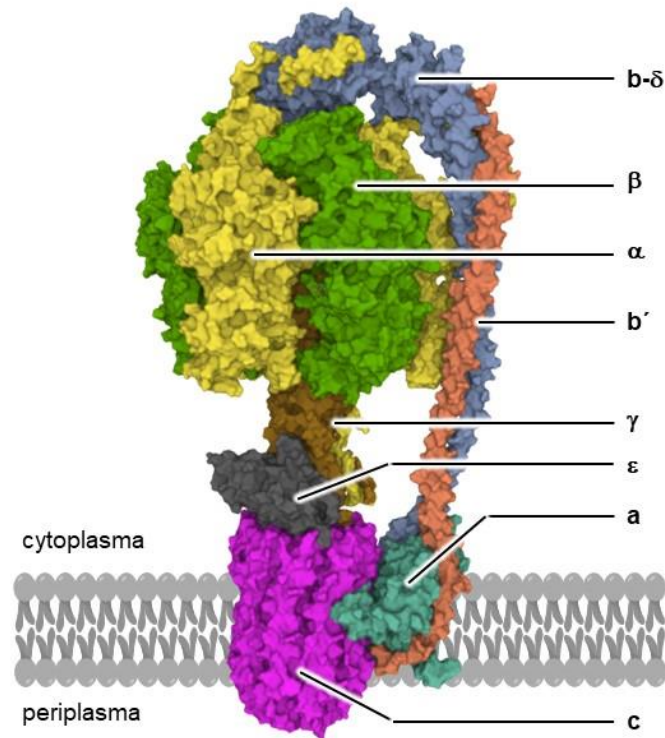
V případě mykobakteriální ATP (Obr. 17) synthasy se F_1 doména skládá z 5 globulárních proteinů $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ a molekulární hmotnost těchto podjednotek je přibližně 350 kDa.⁸³ Má tři katalytická vazebná místa, která jsou primárně umístěna v β podjednotkách a tři nekatalytická místa umístěná primárně v α podjednotkách.⁸⁵ Oba dva typy podjednotek jsou střídavě uspořádány a tvoří společně hlaveň, kam proniká vinutá část γ -podjednotky.⁸⁶ β katalytická místa se označují β_{TP} (vazba na ATP), β_{DP} (vazba na ADP) a β_E (prázdný).⁸⁷

F_0 doména se skládá obecně z ab_2c_n podjednotek, přičemž počet c podjednotek není pevně dán a souvisí s konkrétním druhem života. Mykobakteriální doména je složena z podjednotek ab_2c_9 , naopak např. bakteriální F_0 doména obsahuje 10-15 c podjednotek. C -podjednotka má vlásenkovou strukturu a skládá se ze dvou α -helixů a spojovací smyčky.⁸⁸

Syntéza ATP je v řadě případů reverzibilní reakcí. Pokud chybí protonová hnací síla, dochází k hydrolýze ATP za vzniku ADP a P_i (anorganický fosfát), která je indukována γ - ϵ - c rotorem otáčejícím se v opačném směru, než jak to bývá při ATP syntáze. Při tomto procesu dochází k vypotřebování zásoby buněčné energie.⁸⁷ Inhibice hydrolýzy ATP synthasy je důležitá u patogenních mykobakterií, které v hostitelské buňce musí přežít v nízkoenergetických podmínkách.⁸²

Tato reverzní reakce slouží některým druhům bakterií k udržení hnací síly za nepříznivých podmínek, jinde však může být tato funkce potlačena.⁸⁹ Blokace této funkce je typická pro mykobakteriální kmeny žijící v hostitelích (např. u savců – *M.*

tuberculosis či *M. bovis*), ale také pro saprofytické kmeny, kam řadíme *M. smegmatis*.⁸² ATP získává mykobakterie krom oxidativní fosforylace ukončené multiproteinovým enzymem také fosforylací na úrovni substrátu. Fosforylace na úrovni substrátu však není dostatečná. Pro růst je klíčová právě oxidativní fosforylace, kde se přes komplexy dýchacího řetězce přenášejí protony a vytváří se protonová hnací síla (PMF).⁹⁰



Obr. 17: Struktura mykobakteriální ATP synthasy

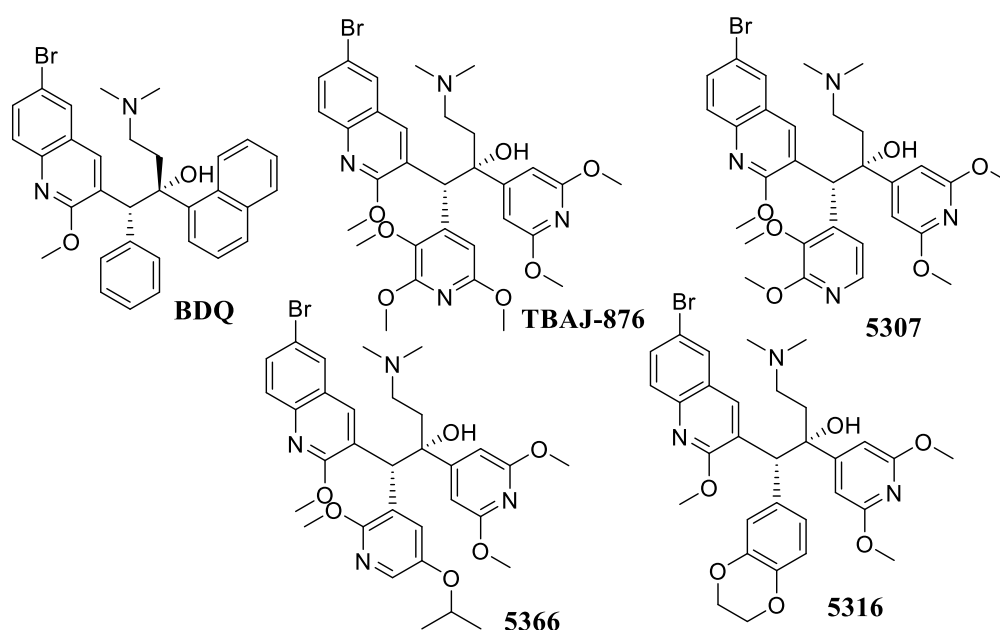
2.1 Mechanismus mykobakteriální ATP synthasy

Tři katalytické jednotky β jsou nezbytné pro fungování cyklického procesu. Tento model je známý jako mechanismus vazebné změny. Rotací γ -podjednotky se v každém okamžiku protáčí konformace β -podjednotek⁹¹ mezi třemi stavy, které se značí T (= těsná, ATP obsazená), L (= volná, ADP + P_i – obsazená) a O (= otevřená a prázdná).^{92,93} Výsledkem přepínání těchto stavů je syntéza tří molekul ATP.⁹⁴

3. Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy

ATP synthasa je ověřený cíl z pohledu vývoje nového léčiva účinného na rezistentní kmeny mykobakterií. Inhibice je založena na tvorbě polárních a nepolárních interakcí ligandu s enzymem, které v konečném důsledku způsobí smrt mykobakterie.⁹⁵ Bylo objeveno více než 250 přírodních a syntetických inhibitorů se známými i neznámými inhibičními místy.⁹⁶

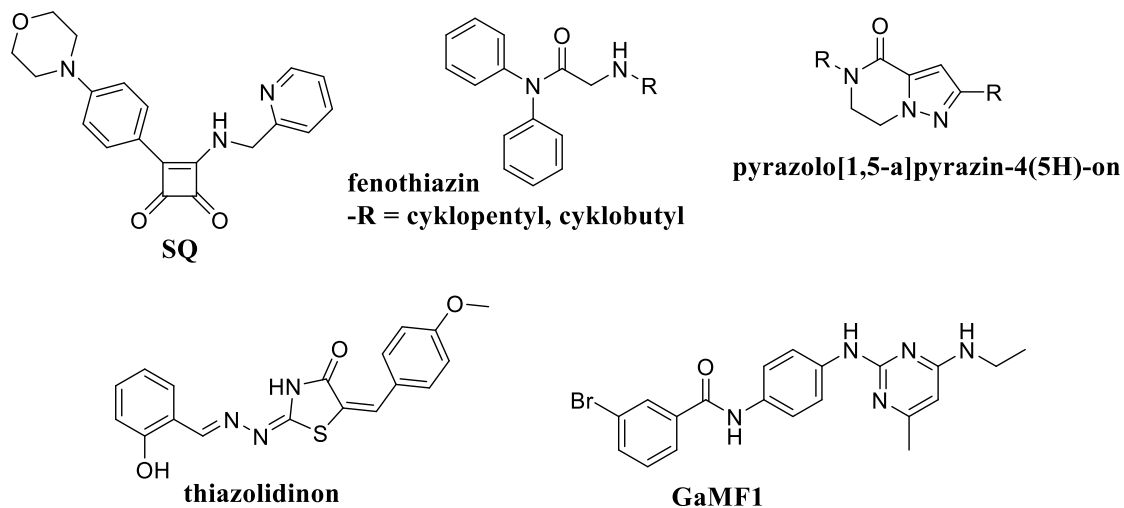
Jak už bylo psáno výše, jedním z léčiv působících jako inhibitor proteinu mykobakteriální ATP synthasy je **Bedaquiline (BDQ)**, který se váže na c i ε podjednotku tohoto multiproteinového komplexu a zabraňuje tak rotaci.⁵⁶ Rezistence na toto léčivo je způsobena mutací v genu *atpE*, což je gen, který má zásadní vliv na kódování aminokyselinové (AMK) sekvence. Mutace způsobuje drastické snížení vazebné afinity BDQ k receptorovému proteinu (ATP synthasa).⁹⁵ Protože i na poměrně nedávno schválené léčivo byla potvrzena rezistence, bádání vědců se zaměřilo na přípravu analogů tohoto terapeutika ve snaze připravit něco nového. Jedním z nich je látka s názvem **TBAJ - 876**. Tato látka se pravděpodobně váže na vazebné místo BDQ na ε podjednotku. Mechanismus účinku je obdobný a týká se c a ε podjednotky. Do stejné skupiny patří i další analoga známá jako **5366**, **5316** nebo **5307** (Obr. 18).⁹⁷ TBAJ-876 a TBAJ-587 mají dokonce lepší anti-TB aktivitu než BDQ a zároveň nižší inhibiční aktivitu hERG.⁵⁷



Obr. 18: Bedaquiline a jeho analoga

Mezi další publikované inhibitory mykobakteriální syntasy můžeme řadit např. deriváty **pyrazolopyrazinonu** (Obr. 19). Tyto látky obsahují pyrazolo[1,5-a]pyrazin-4(5H)-on⁸ jako základní skelet a jsou předmětem dalšího výzkumu v rámci této bakalářské práce (viz dále).

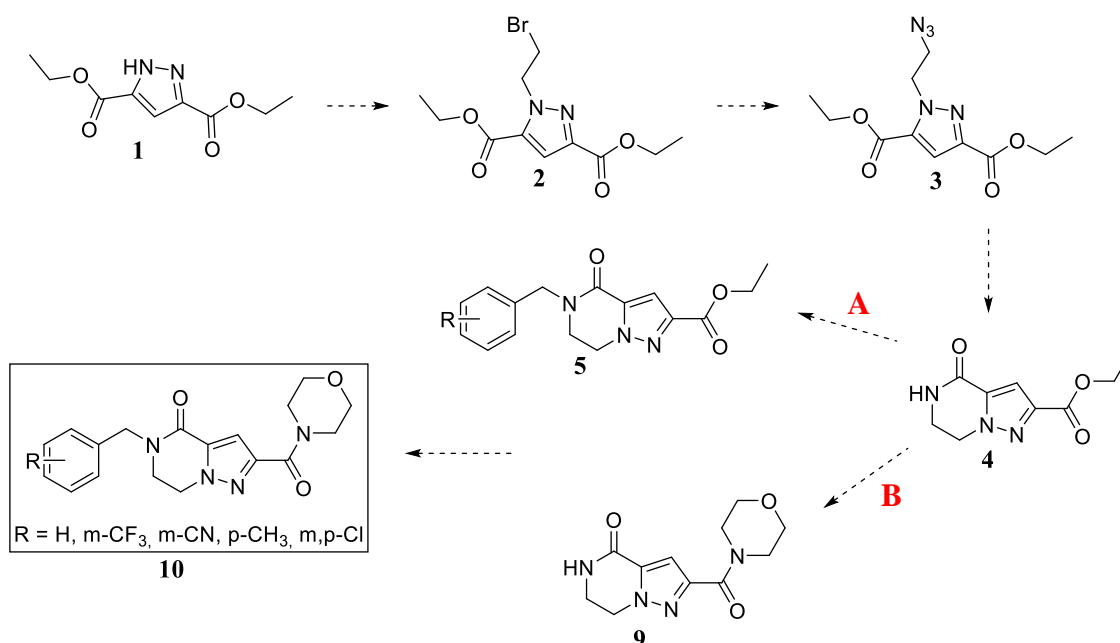
Dalšími inhibitory jsou např. **deriváty kyseliny squarové** (systematickým názvoslovím 3,4-dihydrocyklobut-3-en-1,2-dion) působící rovněž na c podjednotku ATP syntasy.⁹⁵ Tato skupina látek je zajímavá pro řadu možných aplikací. Její deriváty squaramidy (SQ) mají schopnost selektivně se vázat s biologickým cílem.⁹⁸ Kromě schopnosti inhibice mykobakteriální ATP syntasy,⁹⁹ vykazují tyto látky antiparazitickou,^{100,101} antibakteriální,¹⁰² antivirovou aktivitu. Byla studována série látek s tímto motivem, kde se prokázala schopnost inhibice HIV-1 proteázy, která je klíčová při léčbě pacientů s infekcí HIV.¹⁰³ Inhibitory **GaMF1** účinně cílí na γ podjednotku ATP syntasy. Jde o bakteriocidní látku efektivní na rezistentní formy TB. Dále pak např. **deriváty chinolinu** jsou účinné pro nereplikující se bakterie, proto se využívají k terapii latentní formy nebo **thiazolidinonu**.⁹⁵ Zajímavé jsou rovněž deriváty 3-(4-N,N-dimethylaminomethyl)fenyl)chinolinů, fenothiaziny nebo pyrazolopyrimidiny (Obr. 19).⁹⁸



Obr. 19: Struktury nejzajímavějších anti-TB látek

VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem bakalářské práce je syntéza derivátů pyrazolopyrazinonu jako potenciálních inhibitorů mykobakteriální ATP synthasy, jak už bylo nastíněno v úvodu této práce. V této kapitole bude pozornost směřována na samotný průběh syntézy (obr. 20) včetně nastínění syntetické cesty vedoucí k finálním produktům.



Obr. 20: Navrhované schéma syntézy

Navržená syntéza vychází z komerčně dostupné látky diethyl-1H-pyrazol-3,5-dikarboxylátu **1**. Výchozí látka **1** byla převedena na brom-derivát **2**. V následujícím kroku byl brom-derivát **2** převeden na azid-derivát **3**. Cyklizací látky **3** byl připraven meziprodukt **4**. V tomto okamžiku byly pro vznik konečných derivátů dvě možnosti: První variantou byla reakce benzylbromidu s komponentou **4** a po řádné optimalizaci vznik meziproduktu **5**. V dalším kroku by reakcí s morfolinem byla připravena finální látka **10**. Druhou možností bylo nejprve provést reakci s morfolinem (látka **9**) a až následně připravit konečné produkty reakcemi s příslušnými benzylbromidy.

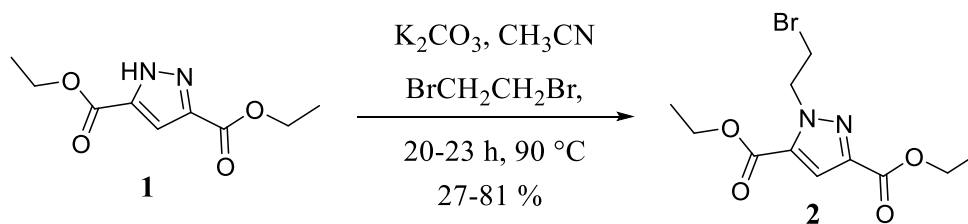
Podrobný popis příprav včetně postupu a optimalizací prováděných reakcí je komentován v následující kapitole.

4. Reakční strategie syntézy A

Jak už bylo uvažováno výše, po vzniku meziprojektu **4** se teoreticky bylo možné dostat k navrhovaným konečným derivátům dvěma cestami. Zde bude uvažována možnost **A**, tedy nejprve byla modifikována levá část molekuly za vzniku benzyl-derivátu **5** a poté bylo přistoupeno k modifikaci části pravé reakcí s morfolinem.

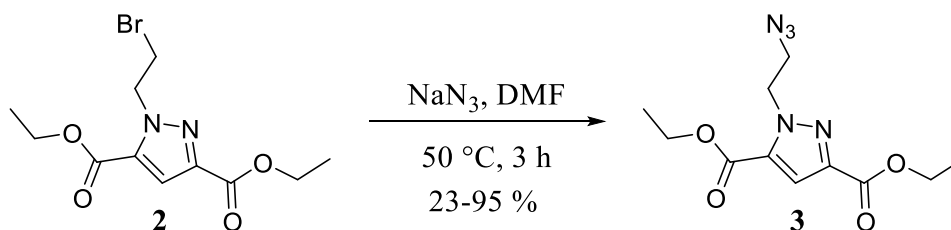
Příprava benzylového derivátu vyžadovala několik optimalizací, které jsou diskutovány níže. Pro modifikaci pravé části molekuly po vzniku benzyl-derivátu **5** bylo prováděno několik reakcí. Z důvodů nízkých výtěžků byla tato strategická cesta nahrazena strategií **B**, která bude blíže specifikována později.

4.1 Příprava diethyl-1-(2-bromethyl)-1*H*-pyrasol-3,5-dikarboxylátu



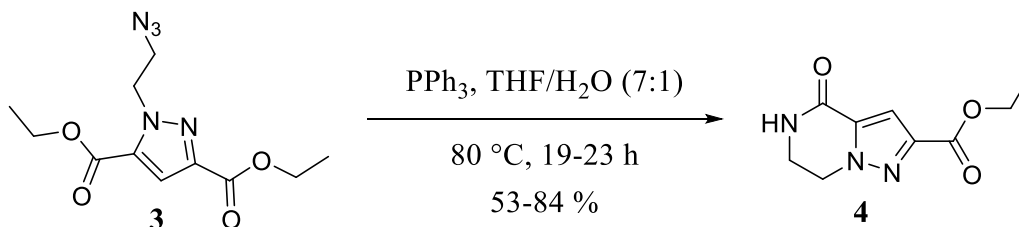
Příprava sloučeniny **2** vychází z komerčně dostupné látky **1** (diethyl-1*H*-pyrasol-3,5-dikarboxylát), která byla postupně smíchána s K_2CO_3 , CH_3CN a $C_2H_4Br_2$. Reakční čas se pohyboval v rozmezí 18-23 h a reakce probíhala za refluxu (90 °C). Po vychlazení na laboratorní teplotu byla směs přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). Po odpaření vznikl nažloutlý olej. Ten byl purifikován sloupcovou chromatografií (SiO_2 , MF: Hex/EtOAc (7:3)). Látka byla rozpustná v MF. Frakce obsahující produkt (detekce pod UV lampa) byly odpařeny na RVO. Vzniklý žlutý olej se ponechal v exikátoru pro doschnutí obvykle 24-48 h (výsledkem byla bezbarvá krystalická látka **2**). Rozmezí výtěžků se pohybovalo od 27 do 81 %. Reakce byla provedena celkem v 16 šaržích, nejprve z minimálního množství navážek a postupně se navážka zvyšovala (čím byla reakce prováděna z většího množství, tím vyšší byl finální výtěžek produktu po purifikaci). Purifikací se získalo několik frakcí, některé byly dokonale čisté, jiné méně. Zprvu byly smíchány, odpařeny a zváženy pouze dokonale čisté frakce, proto byl výtěžek čistého produktu nižší.

4.2 Příprava diethyl-1-(2-azidoethyl)-1*H*-pyrazol-3,5-dikarboxylátu



Azid-derivát **3** byl připraven reakcí brom derivátu **2** s azidem sodným v DMF. Reakce probíhala 3 h, kdy směs byla zahřívána na 50 °C. Následně byla horká surová směs nalita na led. Směs vody a surového produktu byla 3x extrahována do organického rozpouštědla (zvolen byl EtOAc), potom byl produkt v EtOAc promyt vodou a solankou, a nakonec sušen Na₂SO₄. Po odpaření byl produkt dosušen v exikátoru. Následně byl produkt lyofilizován, protože dle NMR analýzy byly v produktu obsaženy zbytky DMF. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO₂, MF: Hex/EtOAc (7:3)). Reakce byla provedena celkem v 16 šaržích, u dalších šarží již nebyl produkt purifikován, jelikož surová čistota dosahovala 90 % a byla tak pro další reakce dostatečná. Výtěžky všech 16 šarží se pohybovaly v rozmezí 23-95 %. Nižší výtěžky byly v případě, že byl produkt purifikován a byl připraven z nižšího množství reaktantů. Výtěžky blízké se 100 % jsou naopak z důvodu neúplného odstranění DMF z reakce extrakcí.

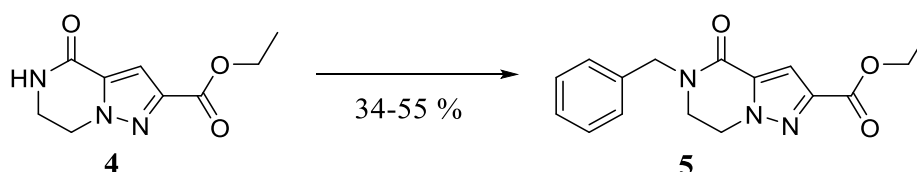
4.3 Cyklizace vedoucí k ethyl 4-oxo-4,5,6,7-tetrahydropyrazol[1,5-*a*]pyrazin-2-karboxylátu



Molekula **4** byla připravena reakcí s látkou **3**, která byla smíchána s PPh₃ a THF/H₂O v poměru 7:1. Směs byla refluxována při 80 °C po dobu 19-23 h. Následně byla směs odpařena a přečištěna na sloupcové kapalinové chromatografii (SiO₂, DCM/CH₃OH (9:0,5)). Produkt byl rozpustný v MF jen částečně. Určitý podíl surové látky se v MF srážel, a proto byl za vakua odfiltrován. Analýza LC-MS potvrdila, že odfiltrovaný podíl

je čistý produkt **4**. Frakce z kapalinové chromatografie obsahující další podíl produktu byly odpařeny na RVO a získala se tak perleťová krystalická látka. Ze sloupcové chromatografie bylo také možno získat čistý PPh₃O z reakce, který byl z důvodu polaritivy získán jako první. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 53-84 %. Čím vyšší byla navážka pro reakci, tím bylo dosaženo vyšších výtěžků čistého produktu. Produkt byl znovu připravován v 16 šaržích.

4.4 Reakce vedoucí na benzylový derivát s esterovou skupinou



Dalším syntetickým krokem je alkylace dusíkového heteroatomu benzylbromidem. Reakční podmínky se v průběhu přípravy látky **5** dle získaných výsledků postupně modifikovaly (Tab. 2). Výchozí látka **4** byla navážena do baňky s kulatým dnem a rozpuštěna v rozpouštědle. Následně byla ke směsi přidána báze a směs se ponechala reagovat 15 min. Benzylbromid se do směsi přidával v případě pokusů 1-6 za chlazení a potom směs reagovala za rt. V případě pokusu č. 4 se další den do směsi přidal další podíl báze (v tomto případě NaH) i benzylbromidu. Vše přehledně ukazuje již zmiňovaná Tab. 2. Intermediát **4** s THF tvořil bílou suspenzi, která se změnila ve žlutou suspenzi po přidání benzylbromidu. Výsledný produkt byla bílá krystalická látka. Produkt nebyl z počátku z důvodu velmi nízkého potenciálního výtěžku izolován. Po optimalizaci se výtěžky po purifikaci pohybovaly v rozmezí 34-55 %. Krom nutnosti optimalizace samotné reakce pro získání lepších výtěžků, byla pro výtěžnost také zásadní purifikace, protože se z chromatografické kolony nepodařilo nikdy získat více jak 50 % hmotnosti z předem zvážené surové směsi.

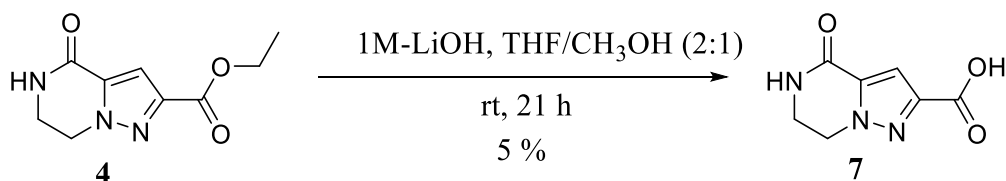
Tab. 2: Přehled provedených pokusů pro optimalizaci reakce vedoucí na benzylový intermediát

Pokusy	Reaktanty			Teplota	Výsledky, výtěžnost
	Báze (ekv.)	Benzylbromid ekv.	Rozpouštědlo		
1	60% NaH (1,5)	1,3	THF	0 °C-rt	neizolováno
2	60% NaH (2,5)	1,3	THF	0 °C-rt	neizolováno
3	60% NaH (4)	1,5	THF suchý	0 °C-rt	neizolováno
4	60% NaH (1,5+0,5)	1,3+0,5	THF suchý	0 °C-rt	34 %
5	60% NaH (1,5)	1,3	DMF	0 °C-rt, 50 °C	39-55 %
6	60% NaH (1,5)	1,3	DMF suchý	0 °C-rt, 50 °C	49 %
7	Cs ₂ CO ₃ (2)	1,1	DMF	rt	47 %

Po přípravě benzyl-derivátu **5** následovaly reakce snažící se o přípravu finální látky. Níže jsou popsány reakce jako přímá substituce nebo hydrolyza. Úmyslem těchto reakcí bylo připravit finální látku bez použití trimethylaluminia, kvůli problematickým vlastnostem této látky (samozápalnost na vzduchu).

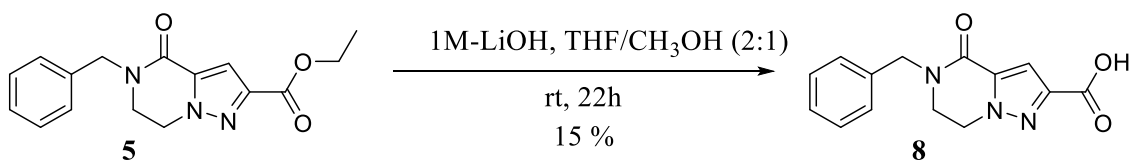
4.5 Hydrolýza A

Další zkoušenou reakcí byla hydrolyza. Po přípravě kyseliny **6** bylo v úmyslu dále pokračovat substitucí z pravé části molekuly morfolinem bez využití trimethylaluminia (důvody popsány výše). Hydrolyza byla zkoušena na dvou molekulách **4** a **5**. Ani v jednom případě nedošlo k uspokojivým výsledkům, díky kterým by bylo možné v úvaze o substituci dále pokračovat.



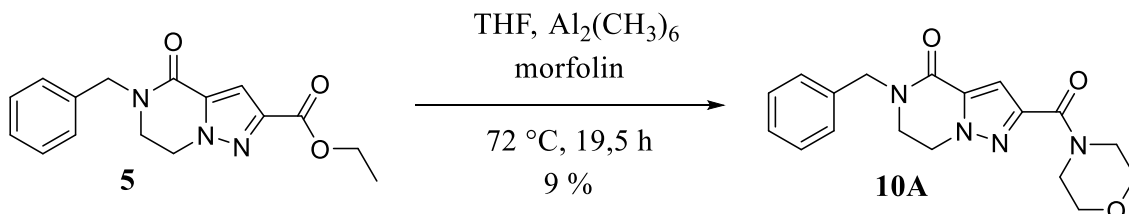
Látka **4** byla navážena do baňky a rozpuštěna v THF/CH₃OH (2:1). Ke směsi byl následně přidán roztok LiOH. Směs se nechala reagovat 21 h. Po ukončení reakce byla provedena TLC destička (nutné okyselení – 1M-HCl, protože po reakci vznikla sůl). Následně byla okyselena celá směs stejnou kyselinou za stálého míchání. Okyselení probíhalo, dokud směs nedosáhla pH přibližně 6 (kontrola pH papírky). Při nižším pH by došlo pravděpodobně k protonaci na dusíku (pětičetný kruh), které jsme se vyšším pH snažili zabránit. Toto pH však nebylo pravděpodobně dostatečné pro vznik dostatečného množství kyseliny. Po okyselení byla směs extrahována do EtOAc, vysušena Na₂SO₄ a odpařena na RVO. Bohužel problém nastal i v tomto kroku, kdy se nedařilo surový produkt vyextrahovat do zmíněného EtOAc všechen. Podařilo se takto získat pouze 8 mg látky, což znamenalo (s ohledem na navážky) 5% výtěžek.

4.6 Hydrolýza B



Reakce byla připravena obdobně jako v předchozím případě (hydrolýza A). Touto reakcí se podařilo získat po extrakci, vysušení a odpaření 3,7 mg, což znamená 15% výtěžek.

4.7 Substituce morfolinem na benzylový derivát



Před reakcí byla nejprve důkladně vyžihána dvouhrdlá baňka s vloženým míchadlem Ar atmosférou a uzavřena septem. Po vyžihání se baňka nechala zchladnout. Mezi tím byl nabrán do Erlenmeyerovy baňky suchý THF a do Dewarovy nádoby byla připravena směs

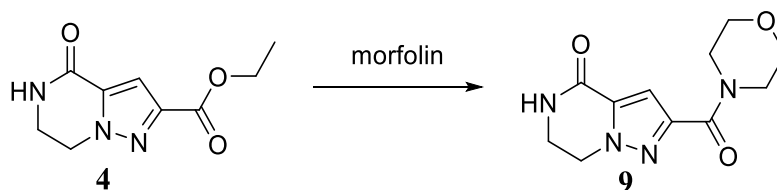
ledu se solí a vodou (-10 °C). Vychladlá vyžíhaná dvouhrdlá baňka byla následně umístěna do ledové lázně (Dewarova nádoba) a vše vloženo na míchačku. Nejprve byl stříkačkou přidán morfolin k němuž se přidal suchý THF a potom po malých dávkách (10 min) se do reakce přidával $\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6$. Následně se baňka s reakční směsí nechala vytemperovat na laboratorní teplotu (45 min). Po vytemperování byla reakční směs znovu zchlazena na -10 °C a ke směsi se přidala látka **5**, která se předtím rozpustila v 10 ml THF. Potom se opět přistoupilo k vytemperování a následně byla baňka s reakční směsí refluxována při 72 °C. Druhý den byla reakce ukončena nejprve přidáním isopropanolu (IPA) a po 10 min byl přidán CH_3OH , vše se provádělo za chlazení. Na závěr byl přidán $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Vznikla mléčná, jemně nažloutlá reakční směs, která se nechala s výše zmíněnými komponentami 15 min reagovat a následně byla reakční směs zfiltrována za vakua, filtr byl promyt DCM a filtrát odpařen na RVO. Po ukončení reakce byla provedena TLC destička. Po purifikaci (SiO_2 , MF: Hex/EtOAc (0,5:2,5)) bylo získáno 5 mg produktu s 9% výtěžností. Při reakci došlo pouze k částečné konverzi, purifikací byly potom zaznamenány ztráty. Látka nebyla rozpustná v MF, proto bylo nutné sorbování na silikagel.

Pro neuspokojivé výtěžky a průběh reakcí, který se nepodařilo ani přes četné optimalizace zlepšit jsme se rozhodli pro přípravu finálních látek zvolit odlišnou strategii (viz kap. 5).

5. Reakce strategie syntézy B

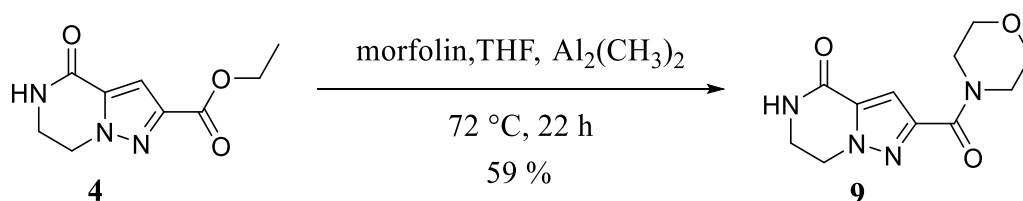
První tři kroky reakce byly provedeny obdobně jako v předchozím případě (strategie A). Následovala reakce, kde se očekávala substituce pravé části molekuly morfolinem. Znovu proběhly pokusy o zavedení morfolinového kruhu do molekuly bez použití trimethylaluminia (přímou substitucí). Byly provedeny čtyři reakce. Tři z nich se týkaly přímé substituce za různých teplot. Čtvrtá reakce již byla komentována dříve, jde o reakci s morfolinem a trimethylalumiem.

5.1 Přímá substituce za vzniku morfolinového derivátu



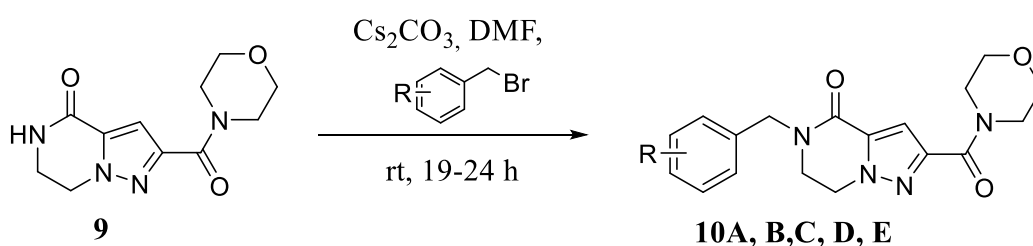
Tato reakce byla nasazena celkem třikrát pokaždé s jinou reakční teplotou. Výchozí látka byla rozpuštěna v morfolinu a směs byla vložena na olejovou lázeň. Reakce probíhala při 50 °C 1 h, 100 °C 1 h a 100 °C 30 min. (mikrovlnka). Ani jedna z optimalizačních reakcí však neposkytovala produkt v uspokojivé konverzi. I přes bezpečnostní riziko bylo třeba proto přistoupit k tvorbě amidu za účasti trimethylaluminia.

5.2 Reakce s morfolinem



Produkt byl připraven naprosto totožně jako v předchozím případě viz reakce 4.8. Oproti předchozímu pokusu byla tentokrát k purifikaci zvolena sloupcová kapalinová chromatografie (SiO_2 , MF: DCM/ CH_3OH (9:0,5)). Látka byla v MF rozpustná. V tomto případě byl však výtěžek po purifikaci 694 mg, tedy 59 %.

5.3 Reakce vedoucí na konečné deriváty



Cílem práce bylo původně připravit touto syntetickou cestou celkem 4 deriváty. Později se rozhodlo, že bude připraven i pátý derivát se substitucí *m,p*-diCl. V plánu bylo porovnat biologickou aktivitu pátého derivát s molekulou z vědeckého textu, která má zajímavé biologické účinky.

Všech pět derivátů bylo připraveno totožně. Pro přípravu konečných derivátů byl navážen meziprodukt **9** a rozpouštěn v DMF za použití ultrazvuku (vznikla suspenze). K bílé suspenzi byl přidán Cs₂CO₃ jako báze a reakční směs se nechala 15 min reagovat za rt. Po 15 min se přidal konkrétní derivát benzylobromidu. Pro ukončení reakce byla vyvinuta TLC destička, reakční směs byla naředěna vodou a třepána do EtOAc (3x). EtOAc vrstva byla promyta s vodou a solankou, následně sušena Na₂SO₄ a odpařena na RVO. Pro plné vysušení byl surový produkt umístěn na lyofilizátor. Ve výsledku byl produkt purifikován sloupcovou kapalinovou chromatografií (SiO₂, DCM:CH₃OH (9,5:0,5)). Úspěšnost jednotlivých příprav po purifikaci včetně procentuálních výtěžků zobrazuje Tab. 3. Všechny konečné deriváty byly připraveny jako krystalické produkty.

Tab. 3: Výsledky výtěžků finálních látek po purifikaci

Finální látka	Výtěžek (mg)	Výtěžek (%)
Nesubstituovaný benzylový derivát (BD)	72,8	54
BD s <i>m</i> -CF ₃	90,4	55
BD s <i>m</i> -CH ₃	23,2-91	16-64
BD s <i>m</i> -CN	64,5	44
BD s <i>m</i> - a <i>p</i> - diCl	55,9	34

6. Biologická aktivita

Připravené finální deriváty a také veškeré intermediáty byly testovány na svou antibakteriální aktivitu na katedře Organické chemie (KOCH) pod vedením zkušené laborantky Lenky Pospíšilové, se kterou jsem testování prováděla. Testování bylo prováděno na bakterie Gram-pozitivních i Gram-negativních kmenů, jmenovitě *Bacillus subtilis* (BS), *Micrococcus luteus* (ML), *Mycobacterium vaccae* (MV), *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a *Escherichia coli* (EC). Jako standard pro porovnání aktivity byl použit Ciproflaxacin.

6.1 Kultivování a měření inhibiční zóny

Kultivace na agaru probíhala 24 h při 37 °C. Nejprve byly připraveny dva roztoky: agarosa (9,5 g v 250 ml) a bujon (2,3 g v 100 ml), obě látky byly rozpouštěny v ultra čisté vodě. Následovala 15min temperace při 121 °C v autoklávu. Potom bylo přistoupeno k přípravě vzorku. Navážené látky v eppendorfkách byly rozpuštěny v DMSO, objem přidávaného DMSO byl vypočítán na základě naváženého množství jednotlivých látek a molekulové hmotnosti každé z látek (Tab. 3). Následně z takto připravených roztoků bylo odebíráno 40 µl do sterilní eppendorfky a k tomuto objemu bylo přidáno 360 µl CH₃OH. Vzorky se zvortexovaly a pokud nebyla látka dostatečně rozpuštěná použil se ultrazvuk. Negativní kontrola byla tvořena vzorkem obsahující DMSO a CH₃OH. Dalším krokem bylo správně naředit bujon obsahující bakterie. Pro určení koncentrace byl využit denzitometr, přičemž chtěná koncentrace byla 0,8 (neboli 1,5.10⁸ cf/ml). Samotné kultivační médium bylo potom složeno z 1 ml bujonu s bakterií, který byl pipetován k 34 ml agaru. Tato směs byla nalita do Petriho misky, kam se vyznačily spoty, kde se vytvořily otvory pro nanesení našich vzorků.

Tab. 4: Hodnoty pipetovaného DMSO pro jednotlivé vzorky

Sloučenina	Molekulová hmotnost (g/cm ³)	Hmotnost navážené látky (mg)	Objem DMSO (µl)
1	319	1,1	172
2	281	1,0	178

3	209	1,5	359
4	399	1,6	267
9	250	1,0	200
10A	340	1,5	220
10B	408	2,5	306
10C	354	1,4	198
10D	365	2	274
10E	408	1,2	147

Primárně byl sledován rozměr inhibiční zóny (Tab. 4). Pokud inhibiční zóna dosáhla 20 mm, byla stanovována minimální inhibiční koncentrace (MIC). Stanovení MIC bylo prováděno na mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo pipetováno 50 μ l bujony s bakterií a následně 50 μ l bujony s připravenou látkou (případně s Ciproflaxacinem jako standardem nebo DCM/CH₃OH pro blank) vždy do první jamky. Směs byla smíchána a postupně rozpipetována do dalších jamek mikrotitrační destičky. Kultivace probíhala 24 h. Přestože inhibiční zóny některých látek vypadaly nadějně, MIC test neprokázal žádnou výraznou aktivitu proti studovaným bakteriím, jelikož se žádná z látek nevyrovnala standardu (minimum pro výpočet MIC látky).

Tab. 5: *In vitro* testování antibakteriální aktivity připravených sloučenin

Sloučenina	<i>BS</i>	<i>ML</i>	<i>MV</i>	<i>SA</i>	<i>PA</i>	<i>EC</i>
	zóna (mm)	zóna (mm)	zóna (mm)	zóna (mm)	zóna (mm)	zóna (mm)
1	17	18	18	18	15	16
2	14	18	18	17	16	17
3	16	19	19	18	16	16
4	17	19	20	20	17	18
9	18	18	24	21	18	19
10A	17	17	23	18	17	18
10B	17	20	19	18	16	17
10C	18	24	24	22	18	18
10D	18	25	25	25	20	21
10E	17	17	20	21	18	20

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. Obecné informace

Rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) nebo Fluorochem (US).

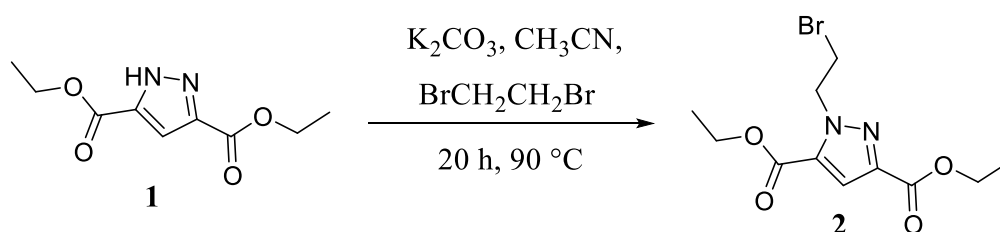
LC-MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému (Waters) složeném z UHPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupólem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona (rozměry 1,8 μm , 2,1 x 50 mm) při 30 °C a rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$. Mobilní fáze byla (A) 0,1% octan amonný ve vodě a (B) 0,1% octan amonný v acetonitrilu, lineárně naprogramovaná od 10 do 80 % B po 2,5 minuty, udržováno po dobu 1 minuty. Kolona byla reekvilibrována pomocí 10% roztoku B po dobu 1 minuty. ESI zdroj operoval pod proudem 5 μA s odpařovací teplotou 350 °C a kapilární teplotou 200 °C.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL ECA400II (400 MHz) spektrometru za magnetické indukce 9,39 T (s užívanými frekvencemi 399,78 MHz pro ^1H a 100,53 MHz pro ^{13}C). Všechna NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty (21 °C) v rozpouštědlech DMSO- d_6 . ^1H a ^{13}C signály byly kalibrovány na signál těchto rozpouštědel. Chemické posuny δ jsou uvedeny v ppm (parts per million) a interakční konstanty (J) v hertzech (Hz).

HRMS analýza byla provedena na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a snímána byla spektra v kladném módu v rozmezí 100–1000 m/z. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce byla izokratická, MF obsahovala 95 % CH_3OH a 5 % vody + 0,1 % HCOOH . Vzorokly byly připraveny rozpuštěním látek v počáteční mobilní fázi.

8. Příprava derivátů pyrazolopyrazinonu

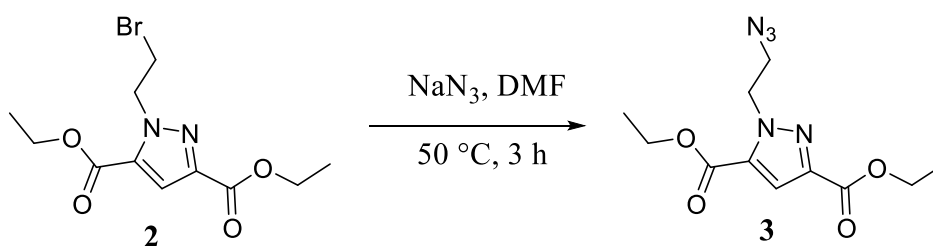
8.1 Příprava brom-derivátu 2



Do baňky byla navážena látka **1** (1,5033 g, 7,04 mmol) a K_2CO_3 (1,1760 g, 8,501 mmol, 1,2 ekv.). Obě pevné látky byly rozpuštěny v CH_3CN (45 ml) a nakonec byl přidán 1,2-dibrometan (3 ml, 5 ekv.). Směs byla vložena do olejové lázně a refluxována při $90\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byl odfiltrován nerozpuštěný K_2CO_3 , filtrát odpařen a surový produkt purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , MF: Hex/EtOAc (7:3)). Byl získán žlutý olej (látka **2** ve schématu), který byl ponechán v exikátoru pro jeho dosušení (po 48 h v exikátoru byla získána krystalická látka). Po purifikaci bylo získáno 1,8266 g (81 %). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.27 (s, 1H), 4.99 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.32 (dq, $J = 10.3, 7.1$ Hz, 4H), 3.88 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.31 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 160.65, 158.39, 141.94, 134.16, 113.17, 61.49, 60.71, 52.60, 31.17, 14.09, 13.87.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}_4^+$: 319,0288 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 319,0294.

8.2 Příprava azid-derivátu z brom-derivátu



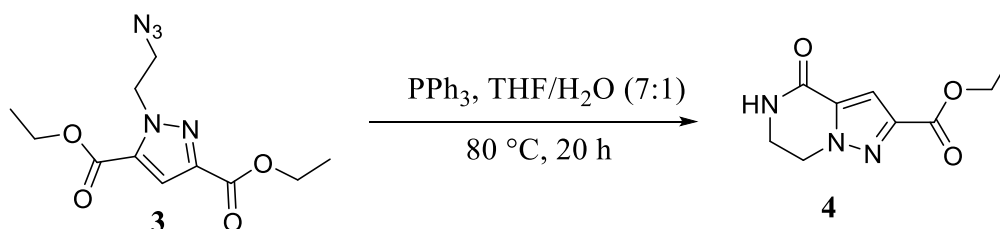
Do baňky byl navážen brom derivát **2** (3,364 g, 0,011 mol), který byl rozpuštěn v DMF (54 ml) a ke směsi byl přidán NaN_3 (1,37 g, 0,021 mol, 2 ekv.). Reakční směs byla vložena na míchačku, na které byla zahřívána na $50\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 h. Po ukončení reakce byla vyvinuta TLC destička. Horký produkt byl nalit na led, po jehož rozpuštění byla

provedena extrakce (3x) do 100 ml EtOAc. Směs byla následně vysušena Na₂SO₄, filtrována, odpařena na RVO a lyofilizována. Produkt byl získán jako žlutý gel ve výtěžku 2,55 g (86 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.28 (s, 1H), 4.79 – 4.75 (m, 2H), 4.32 (dq, *J* = 11.8, 7.1 Hz, 4H), 3.80 – 3.76 (m, 2H), 1.35 – 1.27 (m, *J* = 9.1, 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.23, 158.95, 142.44, 134.64, 113.94, 62.03, 61.24, 51.58, 50.68, 14.64, 14.43.

HRMS: *m/z* vypočteno pro C₁₁H₁₆N₅O₄⁺: 282,1197 [M+H]⁺; nalezeno: 282,1193.

8.3 Cyklizace azid derivátu

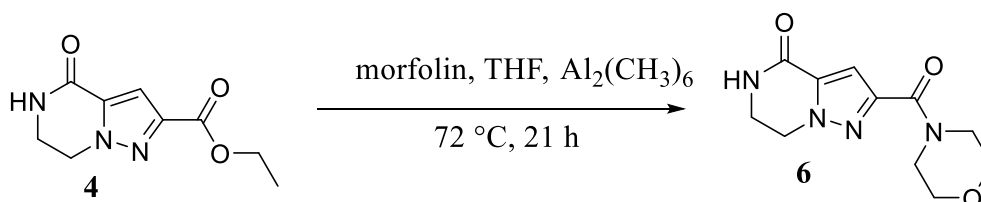


Intermediát **3** (1,25 g, 4,443 mmol) byl navážen do baňky s kulatým dnem a rozpuštěn ve směsi rozpouštědel THF/H₂O (7:1, 36 ml). Dále byl ke směsi přidán PPh₃ (1,63 g, 6,221 mmol, 1,4 ekv.). Směs byla refluxována při 80 °C 20 hodin. Následně byla provedena TLC destička, produkt byl odpařen a přečištěn na koloně (SiO₂, DCM/CH₃OH (9:0,5)). Přečištěný a vysušený produkt **4** byl analyzován. Touto reakcí se podařilo připravit perleťová krystalická látka ve výtěžku 0,78 g (84% výtěžnost).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.38 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 4.44 – 4.36 (m, 2H), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.70 – 3.57 (m, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.10, 157.73, 142.09, 135.62, 108.68, 60.46, 46.53, 38.74 14.12.

HRMS: *m/z* vypočteno pro C₉H₁₀N₃O₃⁺: 208,0728 [M-H]⁺; nalezeno: 208,0714.

8.4 Substituce morfolinem



Před reakcí byla nejprve důkladně vyžihána dvouhrdlá baňka s vloženým míchadlem, Ar atmosférou, uzavřena septem. Po vyžihání byla baňka vypláchnuta Ar a baňka se

ponechala zchladnout. Mezitím byl nabrán do Erlenmeyerovy baňky suchý THF a do Dewarovy nádoby byla připravena směs ledu se solí a vodou (-10 °C). Vychladlá vyžíhaná dvouhrdlá baňka byla následně umístěna do ledové lázně (Dewarova nádoba) a vše vloženo na míchačku. Nejprve byl stříkačkou přidán morfolin (0,5434 ml, 6,214 mmol, 1,3 ekv.) k němuž byl přidán suchý THF (40 ml) a nakonec se po malých dávkách (10 min) k reakci přidával $\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6$ (3,107 ml, 6,214 mmol, 1,3 ekv.). Následně se baňka s reakční směsí nechala vytemperovat na laboratorní teplotu (45 min.). Po vytemperování byla reakční směs znovu zchlazena (na -10 °C) a k reakční směsi byl přidán intermediát **4** (1 g, 4,780 mmol), který byl předtím rovněž rozpuštěn v THF (10 ml). Potom se opět přistoupilo k vytemperování a následně byla baňka s reakční směsí refluxována při 72 °C.

Po 21 h hodinách byla reakce ukončena přidáním isopropanolu (10 ml) a po 10 min se přidal CH_3OH (10 ml), vše se provádělo za chlazení. Na závěr byl přidán $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 ml). Vznikla mléčná, jemně nažloutlá reakční směs, která se nechala s výše zmíněnými komponentami 15 min reagovat potom se směs za vakua zfiltrovala, filtr byl promyt DCM a filtrát odpařen na RVO. Provedena TLC destička. Reakci se podařilo připravit 694 mg, výtěžnost 59 %.

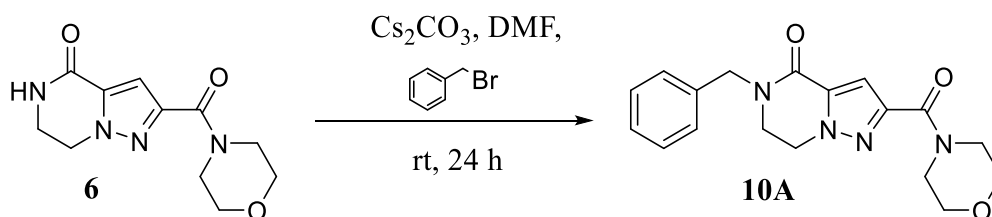
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.31 (br. s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.39 – 4.30(m, 2H), 3.87 (br. s, 2H), 3.70 – 3.55 (m, 8H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 161.21, 157.91, 146.64, 134.82, 108.45, 66.37, 66.12, 47.06, 46.20, 42.31, 38.85.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3^+$: 251,1139 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 251,1135.

8.5 Obecný postup pro přípravu finálních derivátů 10

Meziprodukt **6** (100 mg, 0,3996 mmol) byl smíchán s DMF (5 ml) a ke vzniklé suspenzi byl následně přidán Cs_2CO_3 (260,4 mg, 0,799 mmol, 2 ekv.). Reakční směs byla míchána za rt 15 min. Následně byl přidán odpovídající benzylbromid (0,440 mmol, 1,1 ekv.) a směs míchána za rt 24 h, monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla do reakční směsi přidána voda (20 ml) a produkt extrahován do EtOAc (3x), EtOAc vrstva třepána s vodou a solankou, vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO_2 , $\text{DCM}:\text{CH}_3\text{OH}$ (9,5:0,5)).

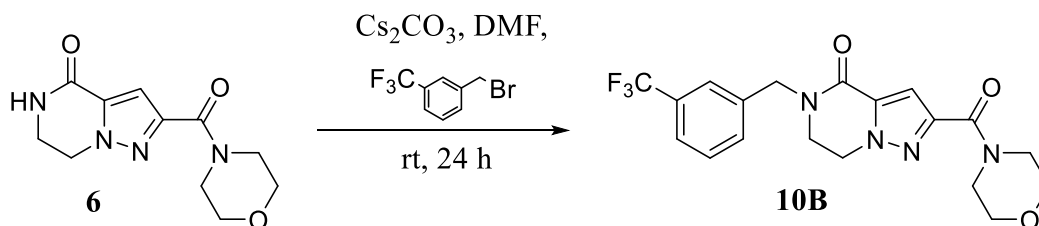
8.5.1 Reakce s benzylbromidem, příprava benzylového derivátu



Derivát **10A** byl připraven dle obecného postupu ve výtěžku 72,8 mg (54 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.39 – 7.27 (m, 5H), 7.01 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.44 – 4.38 (m, 2H), 3.86 (br. s, 2H), 3.77 – 3.72 (m, 2H), 3.62 (br. s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.16, 156.65, 146.00, 136.77, 134.47, 128.60, 127.73, 127.37, 108.90, 66.34, 66.10, 48.67, 47.06, 45.91, 44.71, 42.28.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3^+$: 341,1608 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 341,1602.

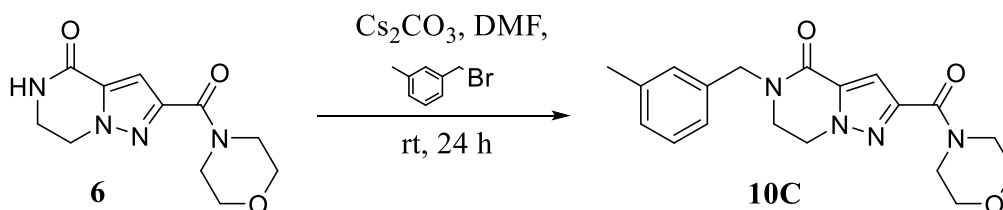
8.5.2 Příprava benzylového derivátu s $m\text{-CF}_3$ skupinou



Derivát **10B** byl připraven dle obecného postupu ve výtěžku 90,4 mg (výtěžnost 55 %). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.74 – 7.57 (m, 4H), 7.02 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.46 – 4.41 (m, 2H), 3.89 – 3.78 (m, 4H), 3.62 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 161.15, 156.89, 146.00, 138.47, 134.40, 131.83, 129.70, 129.26 (q, $J = 31.6\text{ Hz}$), 124.46 (d, $J = 3.6\text{ Hz}$), 124.16 (d, $J = 3.4\text{ Hz}$), 124.15 (q, $J = 272.4\text{ Hz}$), 108.97, 66.35, 66.13, 48.44, 47.08, 45.94, 44.97, 42.30.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3^+$: 409,1482 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 409,1475.

8.5.3 Příprava benzylového derivátu s $m\text{-CH}_3$ skupinou

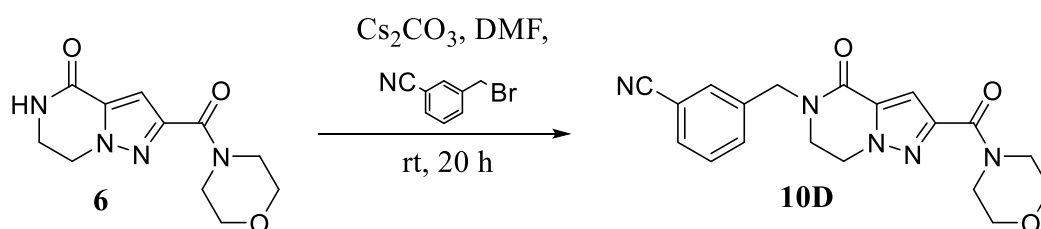


Derivát **10C** byl připraven dle obecného postupu ve výtěžku 23,2 mg (výtěžnost 16 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.16 – 7.08 (m, 3H), 7.01 (s, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.44 – 4.36 (m, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.68 – 3.54 (m, 6H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.16, 156.61, 146.00, 137.80, 136.67, 134.50, 128.50, 128.30, 128.04, 124.85, 108.91, 66.31, 66.15, 48.57, 47.09, 45.91, 44.63, 42.30, 20.96.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3^+$: 355,1765 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 355,1761.

8.5.4 Příprava benzylového derivátu s m-CN skupinou

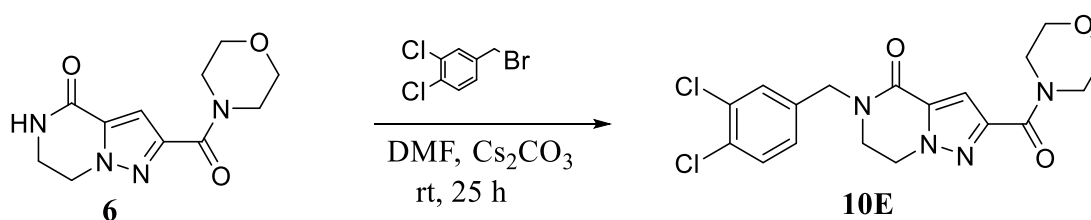


Derivát **10D** byl připraven dle obecného postupu ve výtěžku 64,5 mg (výtěžnost 44 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.84 – 7.81 (m, 1H), 7.76 (dt, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.72 – 7.66 (m, 1H), 7.61 – 7.54 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.48 – 4.41 (m, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.84 – 3.78 (m, 2H), 3.63 (br. s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.16, 156.91, 145.96, 138.68, 134.44, 132.60, 131.15, 131.12, 129.76, 118.69, 111.55, 108.93, 66.35, 66.13, 48.27, 47.09, 45.94, 45.04, 42.29.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_3^+$: 366,1561 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 366,1554.

8.5.5 Příprava benzylového derivátu s m-, p-Cl skupinou



Derivát **10E** byl připraven dle obecného postupu ve výtěžku 55,9 mg (výtěžnost 34 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.35 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.46 – 4.39 (m, 2H), 3.95 – 3.76 (m, 4H), 3.69 – 3.54 (m, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 161.14, 156.84, 145.98, 138.20, 134.38, 131.14, 130.71, 129.98, 129.87, 128.15, 108.96, 66.35, 66.12, 47.81, 47.09, 45.94, 44.92, 42.31.

HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3^+$: 409,0829 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 409,0837.

ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce byla syntéza derivátů pyrazolopyrazinonu a studium biologické aktivity těchto látek.

Teoretická část této práce je zaměřena na tuberkulózu a její léčbu. Rezistentní kmeny představují spolu s latentní formou celosvětový problém. Velký důraz je kladen na léčiva, která se dělí do 4 kategorií podle použití v terapii. Jsou zde diskutovány mechanismy účinku, důvody vzniku rezistence a vedlejší účinky, které při léčbě nastávají. Léčba je také komentována z pohledu molekulových cílů, které jsou důležité pro přípravu nových léčiv. Jedinou schválenou vakcínou pro TB stále zůstává BCG vakcína. V klinických studiích je však několik dalších potenciálních kandidátů. Dále se čtenář v teoretické části dočte o stavbě a fungování mykobakteriální ATP synthasy. Na závěr teoretické části jsou diskutována léčiva mající schopnost inhibovat tento multiproteinový komplex a tím usmrtit mykobakterii.

V kapitole Výsledky a diskuse je detailně komentován průběh syntézy nových derivátů včetně optimalizací reakčních podmínek. Kapitola je zakončena studiem biologické aktivity. Podařilo se připravit 5 derivátů, které byly po řádné charakterizaci (NMR, HRMS) testovány na některé bakterie Gram-pozitivních i Gram-negativních kmenů, jmenovitě *Bacillus subtilis* (BS), *Micrococcus luteus* (ML), *Mycobacterium vaccae* (MV), *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a *Escherichia coli* (EC). Jako standard pro porovnání aktivity byl použit Ciproflaxacin. Žádná z testovaných látek nevykazovala významnou aktivitu proti výše zmíněným kmenům bakterií. Finální látky budou ještě testovány na svou antimykobakteriální aktivitu na univerzitě v Belgii.

V experimentální části jsou uvedeny reakční schémata jednotlivých reakcí a přesné postupy, jakými byly produkty připraveny a posléze purifikovány.

ZDROJE

- (1) B'Bhatt, H.; Sharma, S., *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S1590–S1596.
- (2) Pathak, R. B.; Chovatia, P. T.; Parekh, H. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5129–5133.
- (3) Dawood, K. M.; Eldebss, T. M. A.; El-Zahabi, H. S. A.; Yousef, M. H.; Metz, P., *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 740–749.
- (4) Maggio, B.; Daidone, G.; Raffa, D.; Plescia, S.; Mantione, L.; Cutuli, V. M. C.; Mangano, N. G.; Caruso, A., *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 737–742.
- (5) Khunt, R. C.; Khedkar, V. M.; Chawda, R. S.; Chauhan, N. A.; Parikh, A. R.; Coutinho, E. C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 666–678.
- (6) Vijesh, A. M.; Isloor, A. M.; Shetty, P.; Sundershan, S.; Fun, H. K., *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 410–415.
- (7) Khan, M. F.; Alam, M. M.; Verma, G.; Akhtar, W.; Akhter, M.; Shaquiquzzaman, M., *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *120*, 170–201.
- (8) Surase, Y. B.; Samby, K.; Amale, S. R.; Sood, R.; Purnapatre, K. P.; Pareek, P. K.; Das, B.; Nanda, K.; Kumar, S.; Verma, A. K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 3454–3459.
- (9) MUDr. Václava Bártů, *Medicina pro praxi* **2008**, 245–248.
- (10) h. doc. MUDr. Ivan Solovič, Cs., *Via Pract.* **2004**, 215–219.
- (11) Parrish, N. M.; Dick, J. D.; Bishai, W. R., *Trends Microbiol.* **1998**, *6*, 107–112.
- (12) Organization, W. H., **2022**.
- (13) Chakaya, J.; Khan, M.; Ntoumi, F.; Aklillu, E.; Fatima, R.; Mwaba, P.; Kapata, N.; Mfinanga, S.; Hasnain, S. E.; Katoto, P. D. M. C.; Bulabula, A. N. H.; Sam-Agudu, N. A.; Nachega, J. B.; Tiberi, S.; McHugh, T. D.; Abubakar, I.; Zumla, A., *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **2021**, *113 Suppl*, S7–S12.
- (14) Mihaela Obrovac ; Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, H. mail; Vera Katalinić-Janković ; Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, H.; Magdalena Grce ; Institut “Ruđer Bošković”, Zagreb, H., **2007**, *43*, 47–54.
- (15) Gillespie, S. H., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 267–274.
- (16) Singh, V.; Chibale, K., *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2361–2376.

- (17) Deelder, W.; Napier, G.; Campino, S.; Palla, L.; Phelan, J.; Clark, T. G., *BMC Genomics* **2022**, *23*, DOI 10.1186/s12864-022-08291-4.
- (18) Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L., *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5*, a017863.
- (19) World Health Organization, (WHO), **2021**.
- (20) Organization, W. H., **2014**.
- (21) Unissa, A. N.; Subbian, S.; Hanna, L. E.; Selvakumar, N., *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *45*, 474–492.
- (22) Yona Arisena Magdalena Silitonga; Intanri Kurniati; Retno Ariza; Mukhlis Imanto; Jhond Fatriyadi S, *Med. Prof. J. Lampung* **2019**, *9*, 266–274.
- (23) H. Esmail, C. E. Barry, D. B. Y. and R. J. W., *R. Soc. Publ.* **2014**, *369*, DOI <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0437>.
- (24) Kolektiv, M. V. a, *Lékařská Mikrobiologie Speciální*, **2003**.
- (25) Barry, C. E.; Boshoff, H. I.; Dartois, V.; Dick, T.; Ehrt, S.; Flynn, J.; Schnappinger, D.; Wilkinson, R. J.; Young, D., *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 845–855.
- (26) Organization, W. H., **2022**.
- (27) Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustae, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A., *Cell* **2001**, *104*, 901–912.
- (28) Alvarez, N.; Zapata, E.; Mejía, G. I.; Realpe, T.; Araque, P.; Peláez, C.; Rouzard, F.; Robledo, J., *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–9.
- (29) Clemett, D.; Markham, A., *Drugs* **2000**, *59*, 815–827.
- (30) Perveen, S.; Kumari, D.; Singh, K.; Sharma, R., *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *229*, 114066.
- (31) Verboven, L.; Callens, S.; Black, J.; Maartens, G.; Dooley, K. E.; Potgieter, S.; Cartuyvels, R.; Laukens, K.; Warren, R. M.; Van Rie, A., **2023**.
- (32) Kumar, G.; Kapoor, S., *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *81*, 117212.
- (33) Minato, Y.; Thiede, J. M.; Kordus, S. L.; McKlveen, E. J.; Turman, B. J.; Baughn, A. D., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 5097–5106.
- (34) Timmins, G. S.; Deretic, V., *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1220–1227.
- (35) Dessen, A.; Quémard, A.; Blanchard, J. S.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C., *Science (80-.)*. **1995**, *267*, 1638–1641.
- (36) Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R., *Science (80-.)*. **1994**, *263*, 227–230.
- (37) Jiří Wallenfels, Martina Vašáková, I. S., *Klin. Farmakol. a Farm.* **2018**, *32*, 10–

- 14.
- (38) Koch, A.; Mizrahi, V.; Warner, D. F., *Emerg. Microbes Infect.* **2014**, *3*, 1–11.
- (39) Palomino, J. C.; Martin, A., *Antibiotics* **2014**, *3*, 317–340.
- (40) Ahmad, S.; Jaber, A.-A.; Mokaddas, E., *Tuberculosis* **2007**, *87*, 123–129.
- (41) Almeida Da Silva, P. E.; Palomino, J. C., *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 1417–1430.
- (42) Cheng, S. J.; Thibert, L.; Sanchez, T.; Heifets, L.; Zhang, Y., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 528–532.
- (43) Moazed, D.; Noller, H. F., *Nature* **1987**, *327*, 389–394.
- (44) 19649, P. C. S. for C., *Národní Cent. pro Biotechnol. Inf.* **2004**.
- (45) Hooper, D. C.; Jacoby, G. A., *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a025320.
- (46) Ball, P.; Mandell, L.; Niki, Y.; Tillotson, G., *Drug Saf.* **1999**, *21*, 407–421.
- (47) Ginsburg, A. S.; Grosset, J. H.; Bishai, W. R., *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 432–442.
- (48) Aldred, K. J.; Kerns, R. J.; Osheroff, N., *Biochemistry* **2014**, *53*, 1565–1574.
- (49) Adeniji, A. A.; Knoll, K. E.; Loots, D. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 5633–5662.
- (50) Brigden, G.; Hewison, C.; Varaine, F., *Infect. Drug Resist.* **2015**, *8*, 367–378.
- (51) Alsayed, S. S. R.; Gunosewoyo, H., *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5202.
- (52) Chahine, E. B.; Karaoui, L. R.; Mansour, H., *Ann. Pharmacother.* **2014**, *48*, 107–115.
- (53) Matteelli, A.; Carvalho, A. C.; Dooley, K. E.; Kritski, A., *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 849–858.
- (54) Lakshmanan, M.; Xavier, A. S., *J. Young Pharm.* **2013**, *5*, 112–115.
- (55) Goulooze, S. C.; Cohen, A. F.; Rissmann, R., *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *80*, 182–184.
- (56) Kundu, S.; Biukovic, G.; Grüber, G.; Dick, T., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 6977–6979.
- (57) Sutherland, H. S.; Tong, A. S. T.; Choi, P. J.; Blaser, A.; Conole, D.; Franzblau, S. G.; Lotlikar, M. U.; Cooper, C. B.; Upton, A. M.; Denny, W. A.; Palmer, B. D., *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1292–1307.
- (58) Gler, M. T.; Skripconoka, V.; Sanchez-Garavito, E.; Xiao, H.; Cabrera-Rivero, J. L.; Vargas-Vasquez, D. E.; Gao, M.; Awad, M.; Park, S.-K.; Shim, T. S.; Suh, G. Y.; Danilovits, M.; Ogata, H.; Kurve, A.; Chang, J.; Suzuki, K.; Tupasi, T.; Koh,

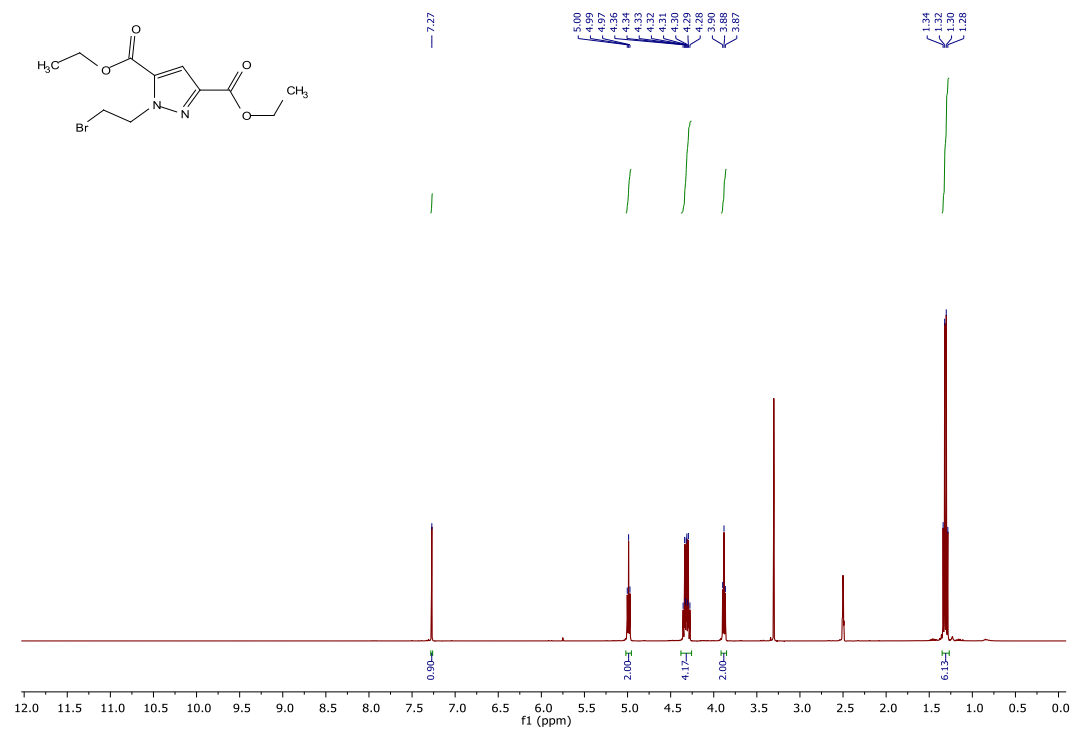
- W.-J.; Seaworth, B.; Geiter, L. J.; Wells, C. D., *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2151–2160.
- (59) Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E., *Science (80-.)*. **2008**, *322*, 1392–1395.
- (60) *World Heal. Organ.* **2014**, 20–24.
- (61) Yookyung, L. E.; R., C. A., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *62*, e01453-17.
- (62) Kanafani, Z. A.; Corey, G. R., *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21*, 515–522.
- (63) Moellering, R. C., *Ann. Intern. Med.* **2003**, *138*, 135.
- (64) F., S. A.; P., L. T.; Ralph, C. G.; Carisa, D. A.; Edward, F.; F., D. A.; Philippe, P., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 864–871.
- (65) Jia, L.; Tomaszewski, J. E.; Hanrahan, C.; Coward, L.; Noker, P.; Gorman, G.; Nikonenko, B.; Protopopova, M., *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 80–87.
- (66) Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1797–1809.
- (67) Janin, Y. L., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2479–2513.
- (68) Millard, J.; Ugarte-Gil, C.; Moore, D. A. J., *BMJ* **2015**, *350*, h882–h882.
- (69) Brennan, P. ., *Tuberculosis* **2003**, *83*, 91–97.
- (70) Torfs, E.; Piller, T.; Cos, P.; Cappoen, D., *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2868.
- (71) Hancock, R. E. W.; Nijnik, A.; Philpott, D. J., *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 243–254.
- (72) Kiliç, G.; Saris, A.; Ottenhoff, T. H. M.; Haks, M. C., *Immunol. Rev.* **2021**, *301*, 62–83.
- (73) Weiner 3rd, J.; Kaufmann, S. H. E., *J. Intern. Med.* **2014**, *275*, 467–480.
- (74) https://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/TBC.htm
- (75) <https://www.pmatras.cz/inpage/zruseni-ockovani-proti-tuberkuloze/>
- (76) Schragar, L. K.; Vekemens, J.; Drager, N.; Lewinsohn, D. M.; Olesen, O. F., *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, e28–e37.
- (77) Shaughnessy, L. M.; Hoppe, A. D.; Christensen, K. A.; Swanson, J. A., *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 781–792.
- (78) Nieuwenhuizen, N. E.; Kulkarni, P. S.; Shaligram, U.; Cotton, M. F.; Rentsch, C. A.; Eisele, B.; Grode, L.; Kaufmann, S. H. E., *Front. Immunol.* **2017**, *8*, DOI 10.3389/fimmu.2017.01147.

- (79) *Glob. Tuberc. Rep.* **2020**
- (80) Martin, C.; Aguilo, N.; Gonzalo-Asensio, J., *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **2018**, *36*, 648–656.
- (81) Základní Přehled Epidemiologické Situace ve Výskytu Tuberkulózy v České Republice v Roce 2021.
- (82) Lu, P.; Lill, H.; Bald, D., *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, *1837*, 1208–1218.
- (83) Walker, J. E., *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 1–16.
- (84) Sielaff, H.; Börsch, M., *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **2013**, *368*, 20120024.
- (85) Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E., *Nature* **1994**, *370*, 621–628.
- (86) Shirakihara, Y.; Shiratori, A.; Tanikawa, H.; Nakasako, M.; Yoshida, M.; Suzuki, T., *FEBS J.* **2015**, *282*, 2895–2913.
- (87) Guo, H.; Courbon, G. M.; Bueler, S. A.; Mai, J.; Liu, J.; Rubinstein, J. L., *Nature* **2021**, *589*, 143–147.
- (88) Iino, R.; Noji, H., *IUBMB Life* **2013**, *65*, 238–246.
- (89) von Ballmoos, C.; Cook, G. M.; Dimroth, P., *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 43–64.
- (90) Bald, D.; Koul, A., *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *308*, 1–7.
- (91) Boyer, P. D., *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1993**, *1140*, 215–250.
- (92) Capaldi, R. A.; Aggeler, R., *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 154–160.
- (93) Menz, R. I.; Walker, J. E.; Leslie, A. G. W., *Cell* **2001**, *106*, 331–341.
- (94) Dimroth, P.; von Ballmoos, C.; Meier, T., *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 276–282.
- (95) Mapari, M.; Bhole, R. P.; Khedekar, P. B.; Chikhale, R. V., *J. Mol. Struct.* **2022**, *1247*, 131331.
- (96) Neupane, P.; Bhujju, S.; Thapa, N.; Bhattarai, H. K., *Biomol. Concepts* **2019**, *10*, 1–10.
- (97) Sarathy, J. P.; Ragunathan, P.; Shin, J.; Cooper, C. B.; Upton, A. M.; Grüber, G.; Dick, T., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, DOI 10.1128/AAC.01191-19.
- (98) Chasák, J.; Šlachťová, V.; Urban, M.; Brulíková, L., *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112872.
- (99) Tantry, S. J.; Markad, S. D.; Shinde, V.; Bhat, J.; Balakrishnan, G.; Gupta, A. K.; Ambady, A.; Raichurkar, A.; Kedari, C.; Sharma, S.; Mudugal, N. V.; Narayan,

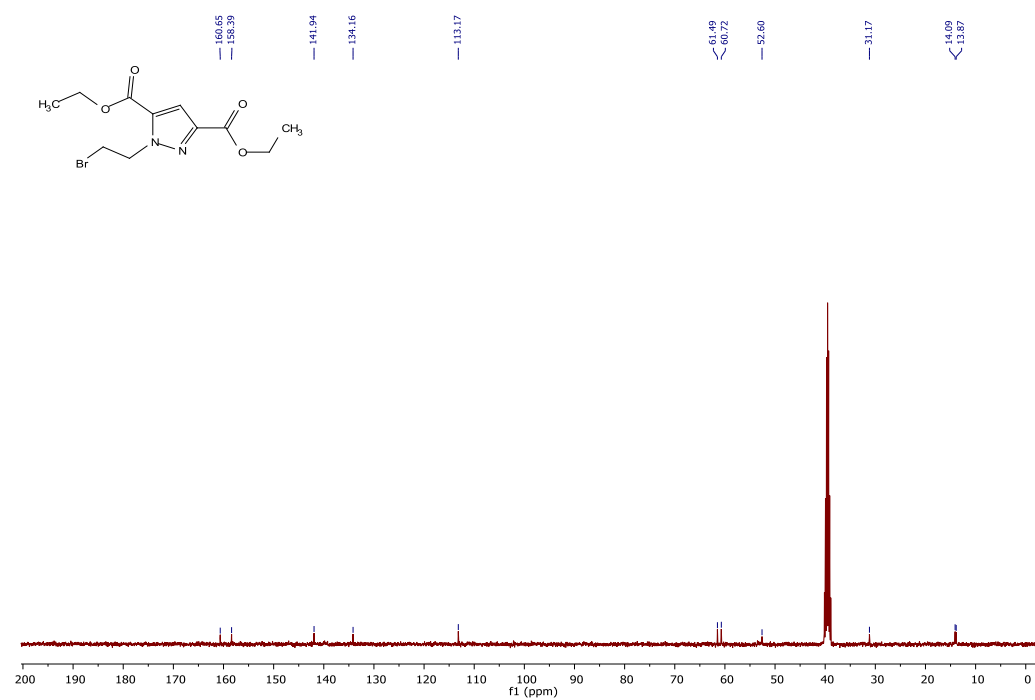
- A.; Naveen Kumar, C. N.; Nanduri, R.; Bharath, S.; Reddy, J.; Panduga, V.; Prabhakar, K. R.; Kandaswamy, K.; Saralaya, R.; Kaur, P.; Dinesh, N.; Guptha, S.; Rich, K.; Murray, D.; Plant, H.; Preston, M.; Ashton, H.; Plant, D.; Walsh, J.; Alcock, P.; Naylor, K.; Collier, M.; Whiteaker, J.; McLaughlin, R. E.; Mallya, M.; Panda, M.; Rudrapatna, S.; Ramachandran, V.; Shandil, R.; Sambandamurthy, V. K.; Mdluli, K.; Cooper, C. B.; Rubin, H.; Yano, T.; Iyer, P.; Narayanan, S.; Kavanagh, S.; Mukherjee, K.; Balasubramanian, V.; Hosagrahara, V. P.; Solapure, S.; Ravishankar, S.; Hameed P, S., *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1379–1399.
- (100) Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macías, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; Rosales, M. J.; Sánchez-Moreno, M.; Costa, A., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 987–999.
- (101) Ribeiro, C. J. A.; Kumar, S. P.; Gut, J.; Gonçalves, L. M.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. M., *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 365–372.
- (102) Kojima, K.; Nakajima, K.; Kurata, H.; Tabata, K.; Utsui, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1795–1798.
- (103) Ghosh, A. K.; Williams, J. N.; Kovala, S.; Takayama, J.; Simpson, H. M.; Walters, D. E.; Hattori, S.; Aoki, M.; Mitsuya, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2565–2570.

PŘÍLOHY

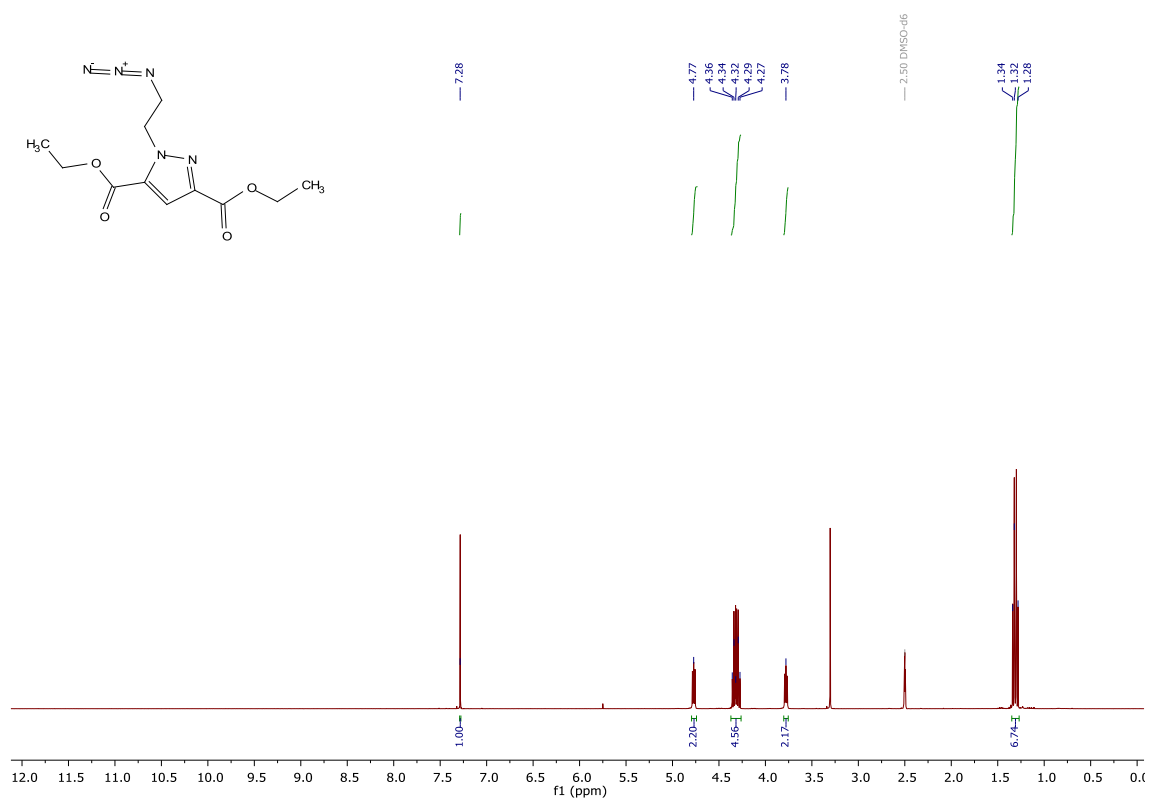
Příloha 1: ^1H NMR spektrum látky 2



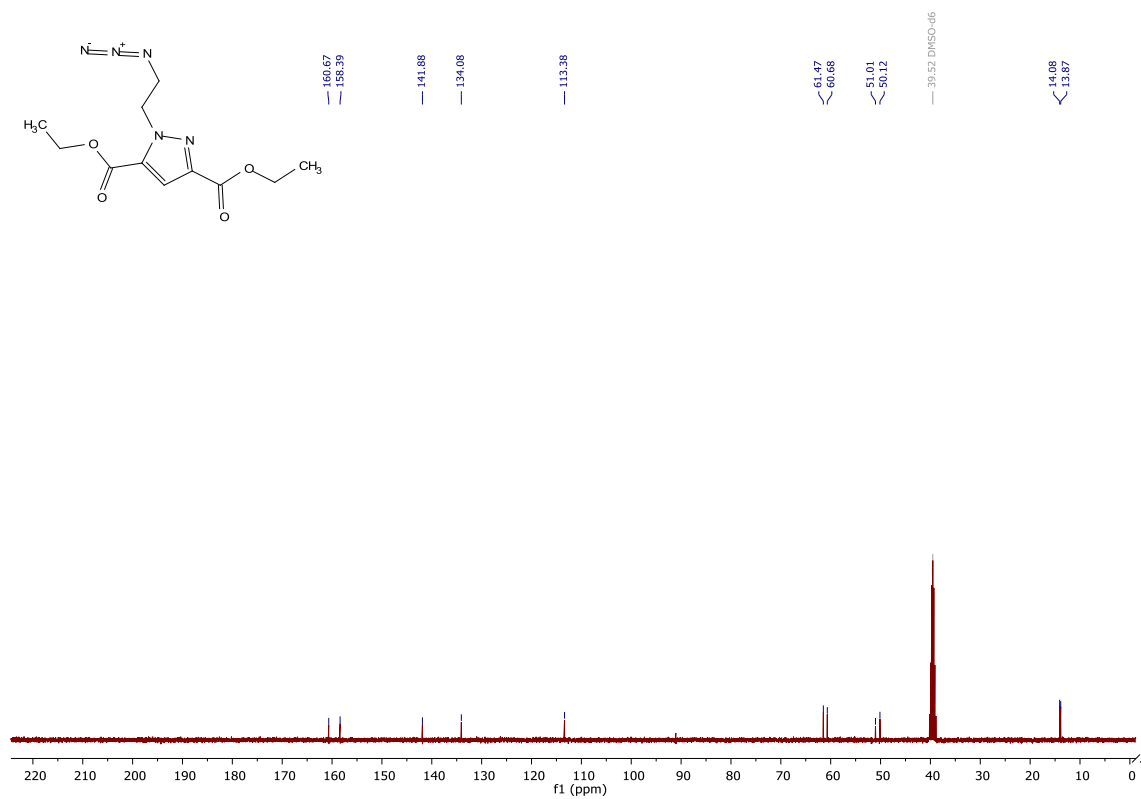
Příloha 2: ^{13}C NMR spektrum látky 2



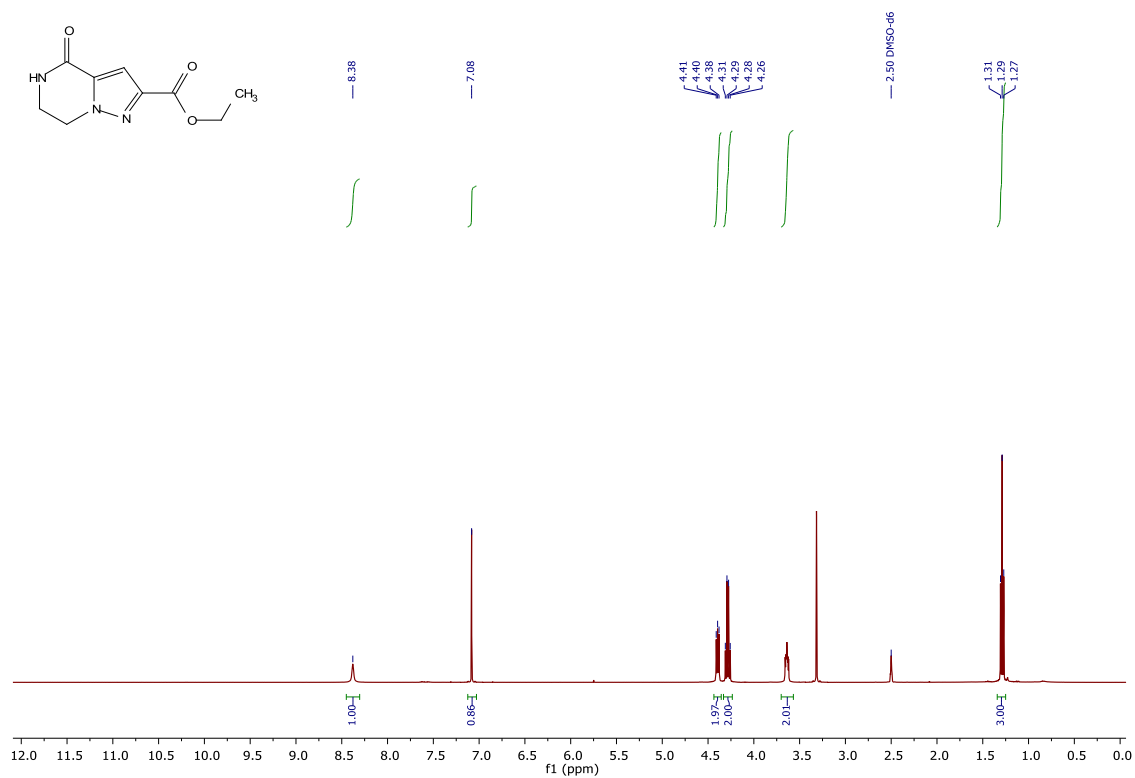
Příloha 3: ^1H NMR spektrum látky 3



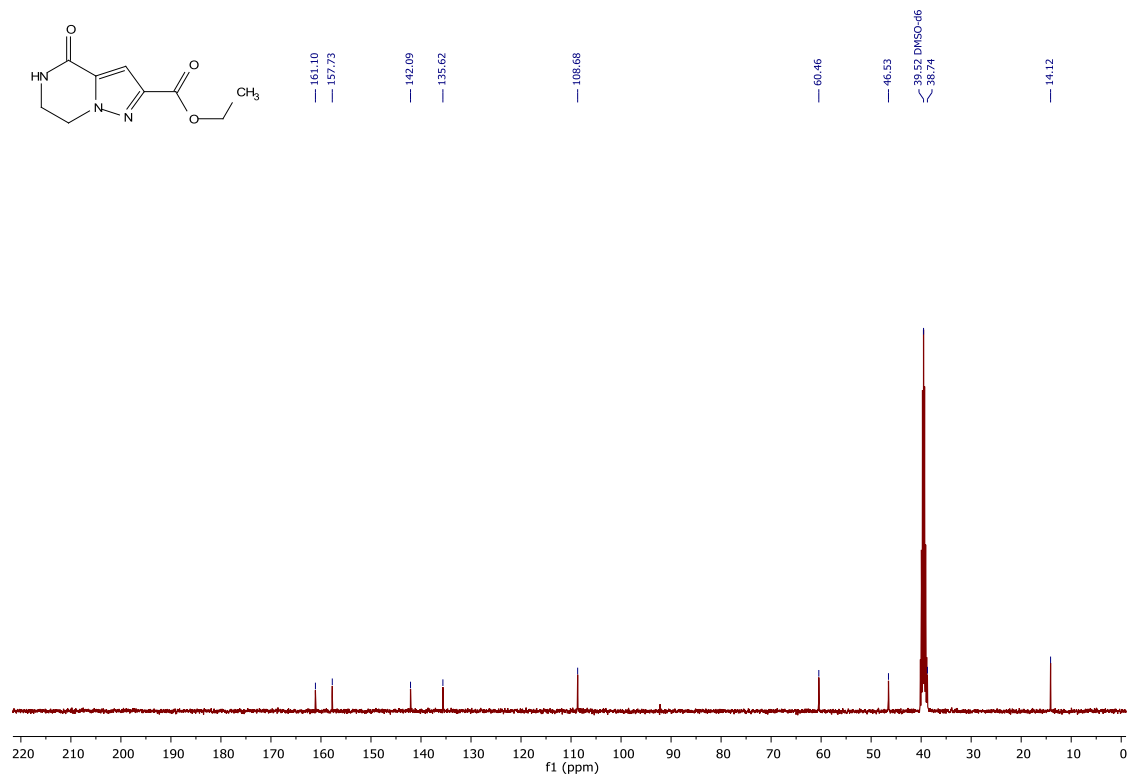
Příloha 4: ^{13}C NMR spektrum látky 3



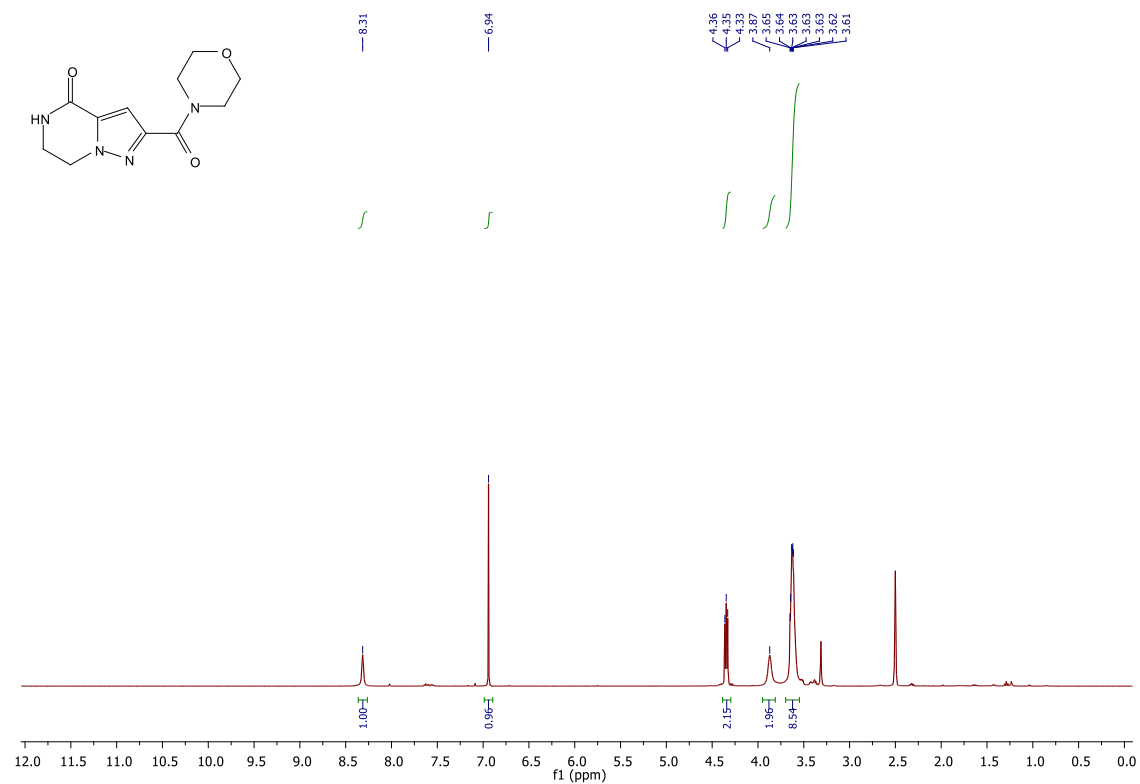
Příloha 5: ^1H NMR spektrum látky 4



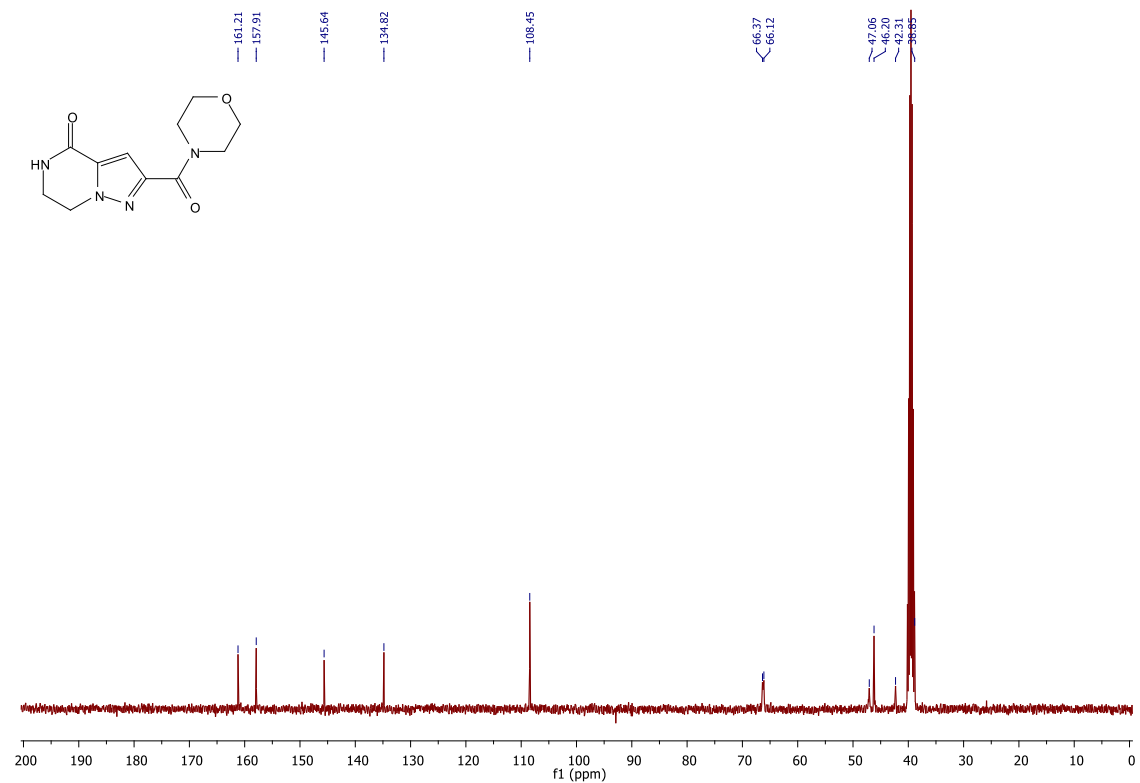
Příloha 6: ^{13}C NMR spektrum látky 4



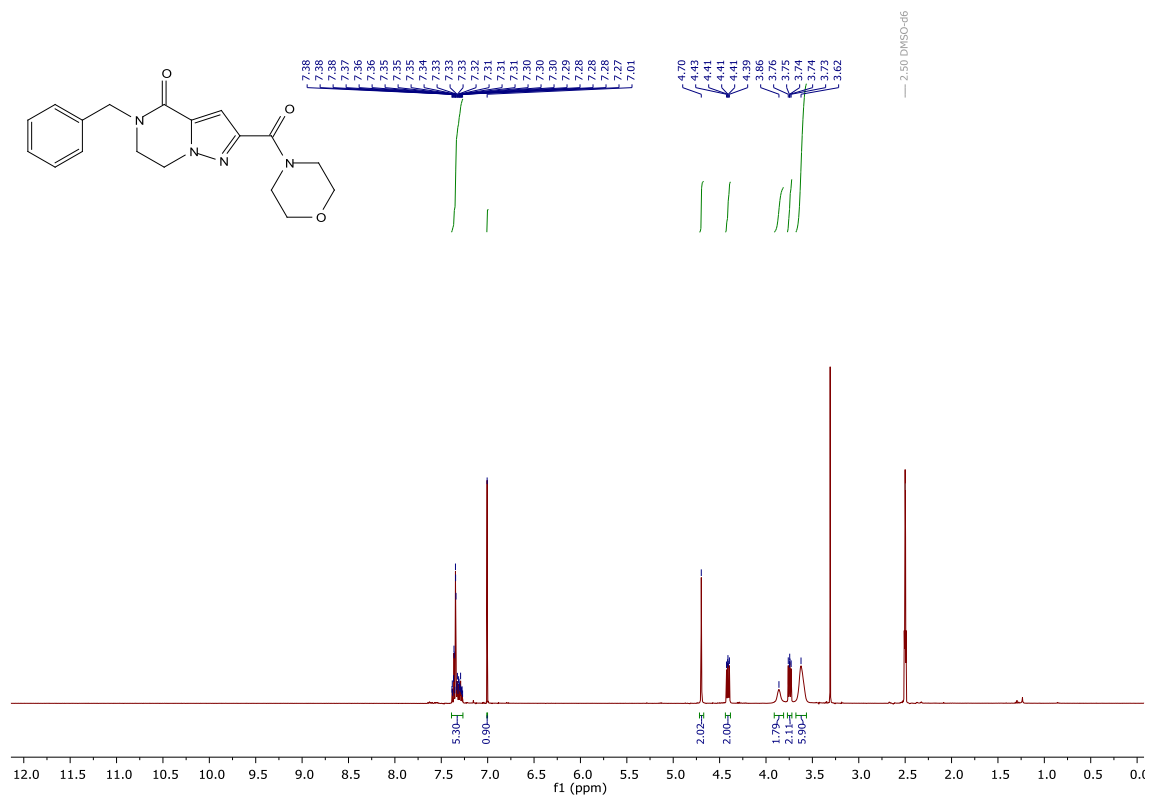
Příloha 7: ^1H NMR spektrum látky 9



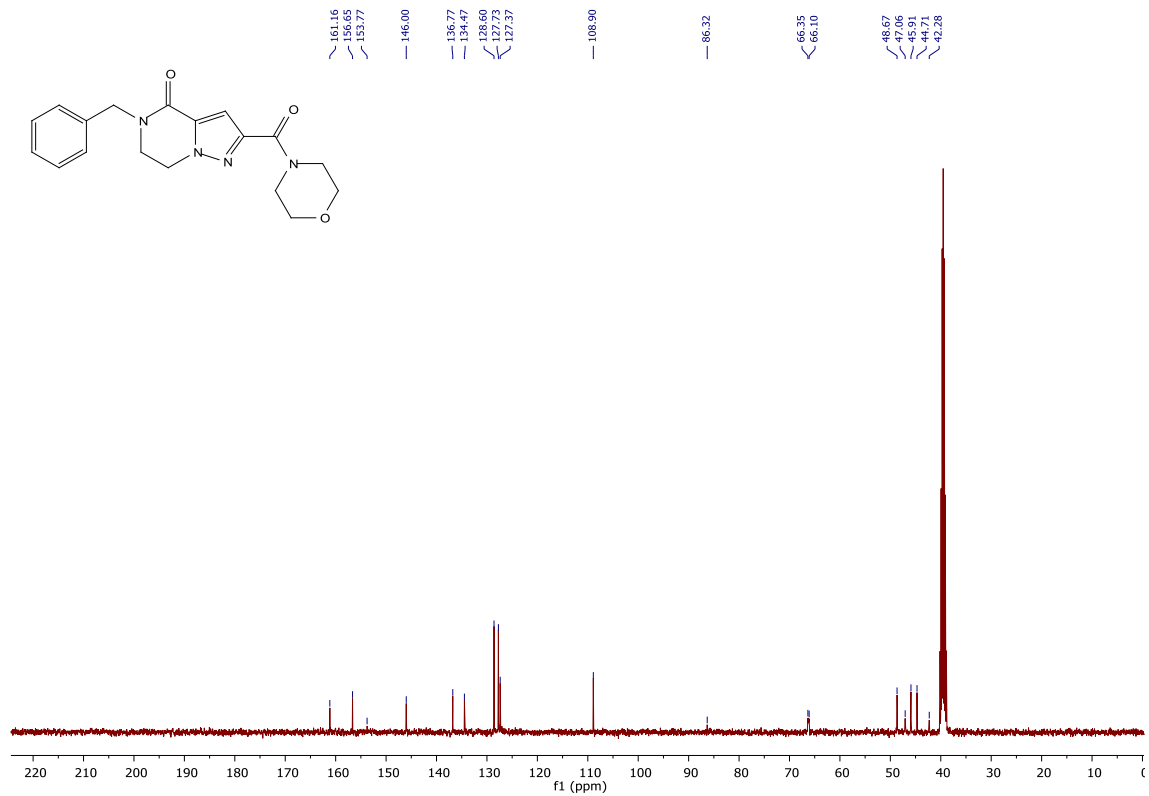
Příloha 8: ^{13}C NMR spektrum látky 9



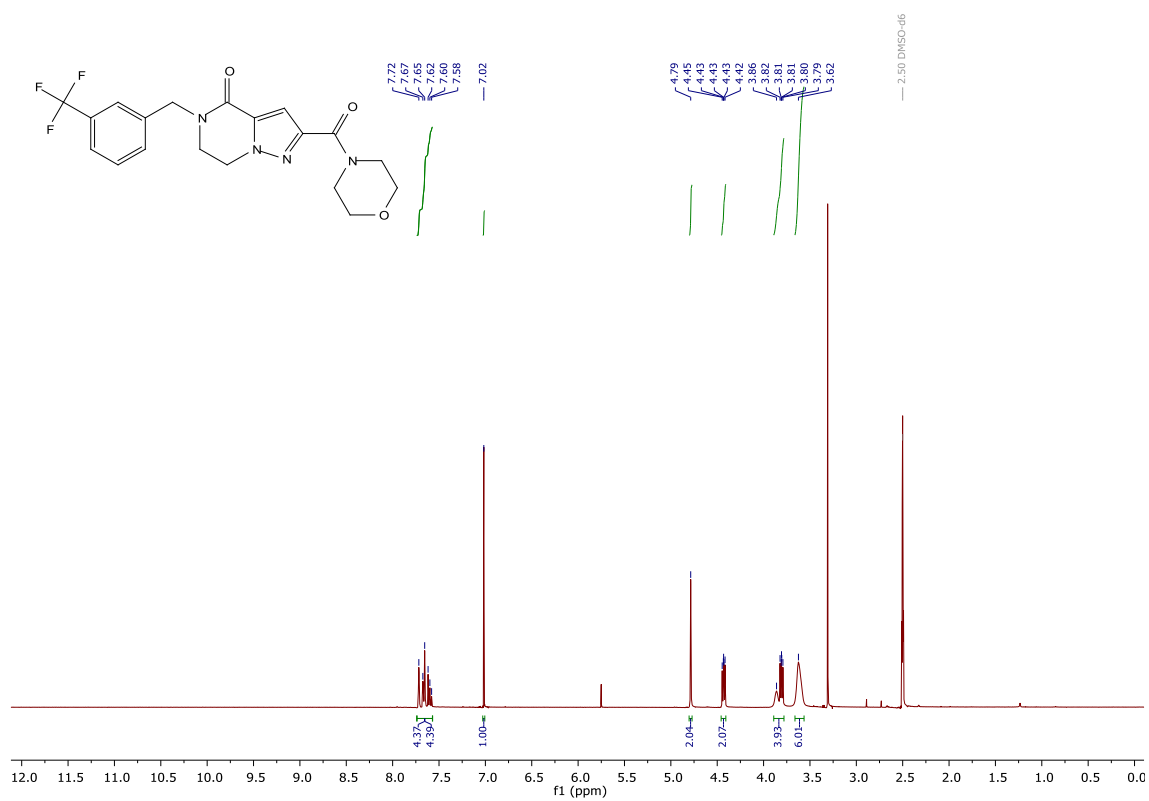
Příloha 9: ^1H NMR spektrum látky 10A



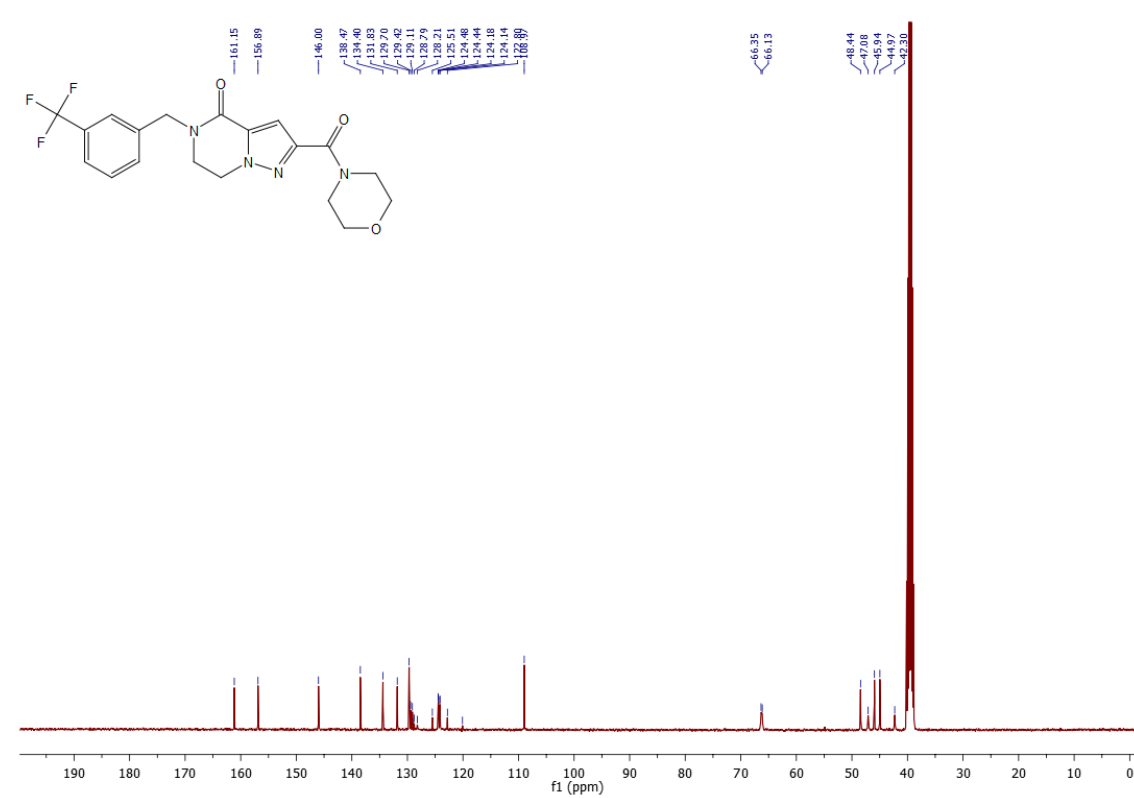
Příloha 10: ^{13}C NMR spektrum látky 10A



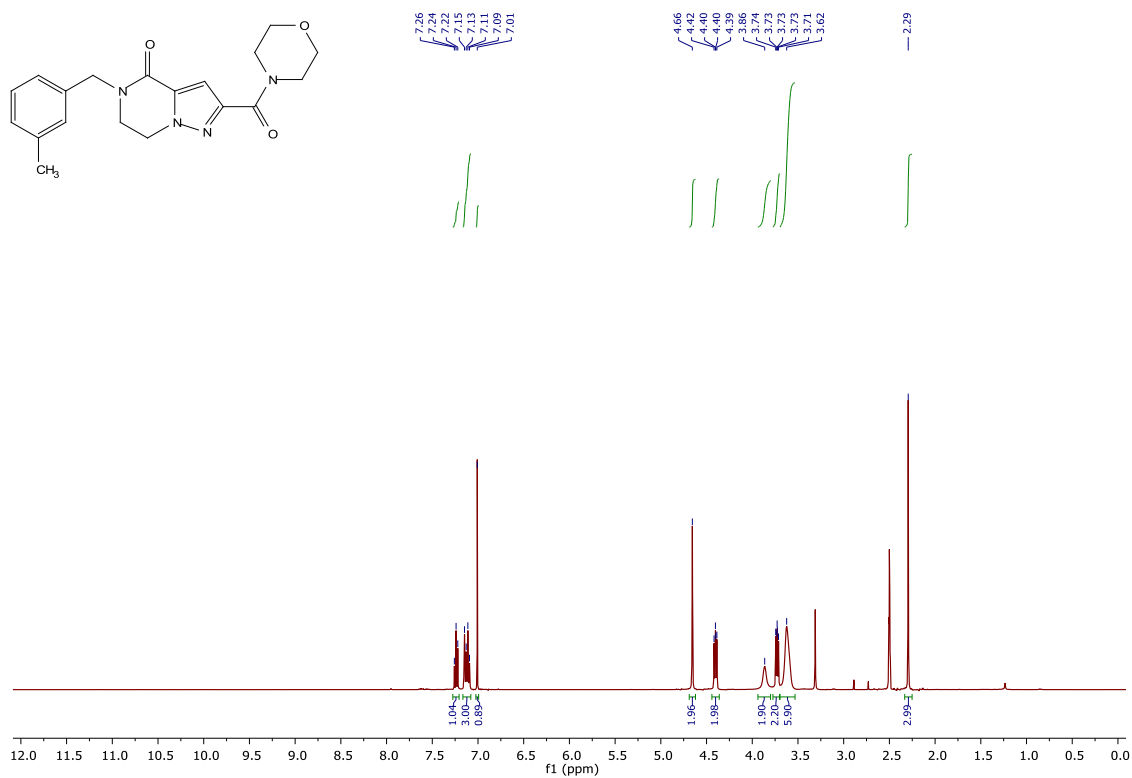
Příloha 11: ^1H NMR spektrum látky 10B



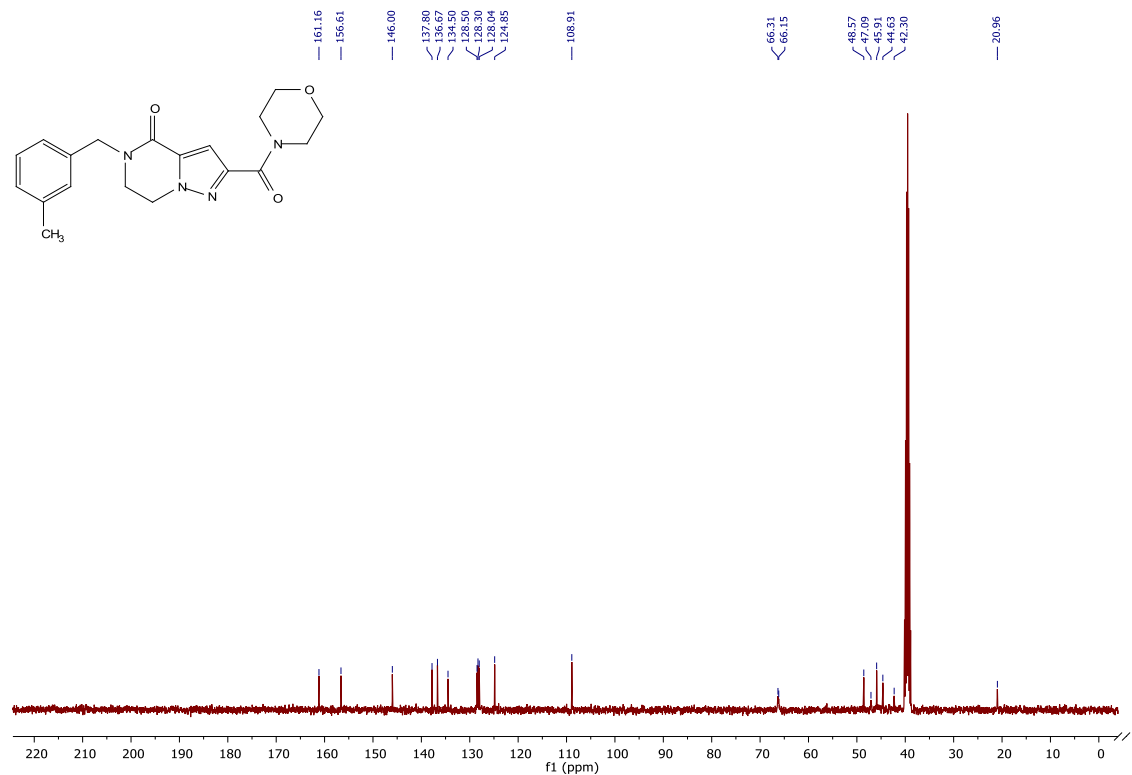
Příloha 12: ^{13}C NMR spektrum látky 10B



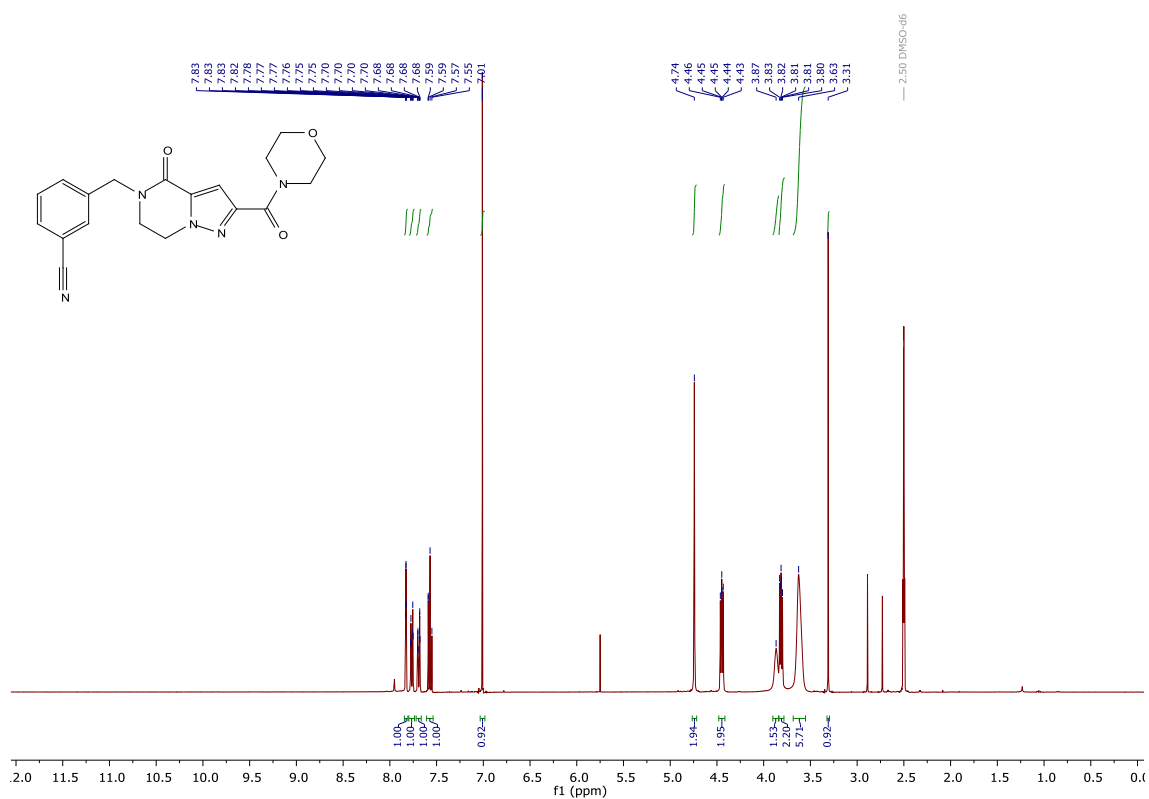
Příloha 13: ^1H NMR spektrum látky 10C



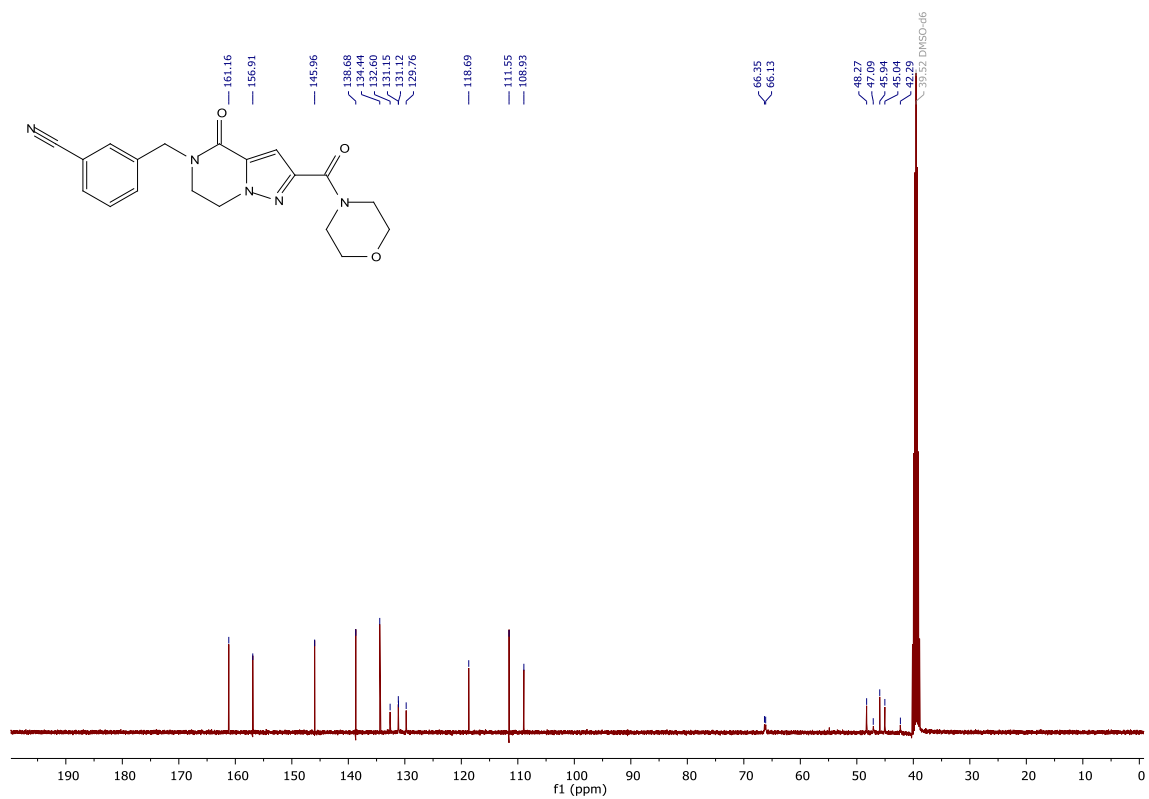
Příloha 14: ^{13}C NMR spektrum látky 10C



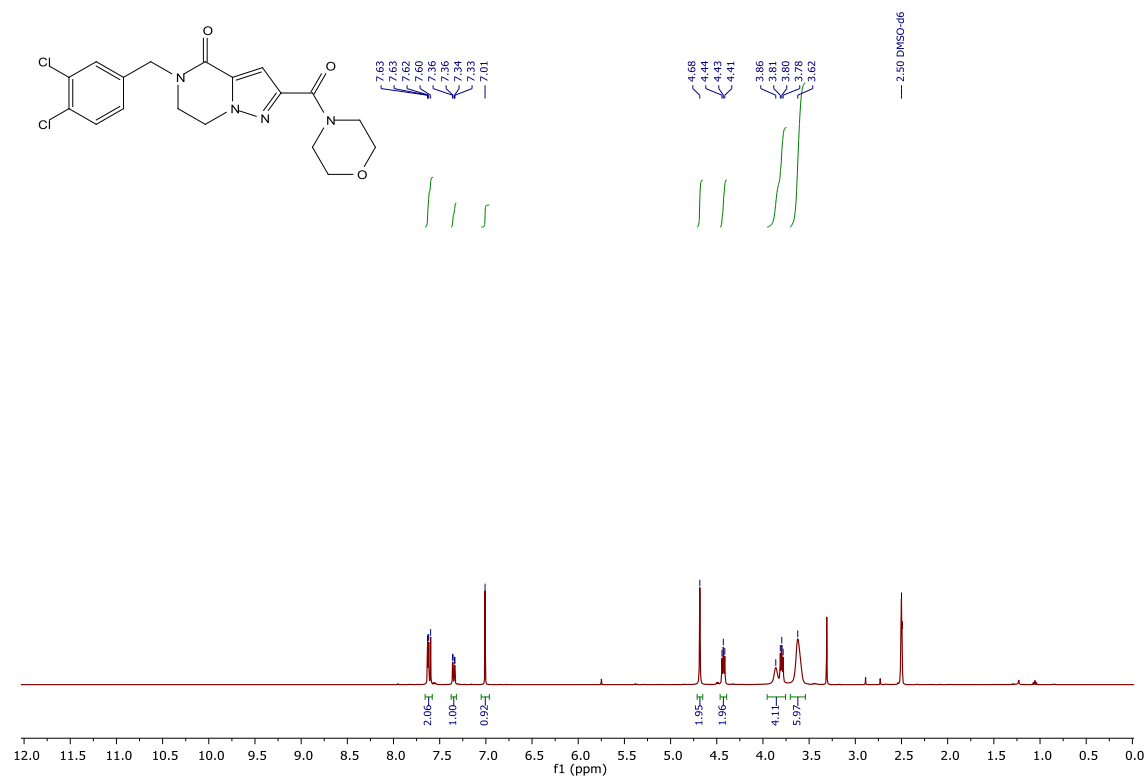
Příloha 15: ^1H NMR spektrum látky 10D



Příloha 16: ^{13}C NMR spektrum látky 10D



Příloha 17: ^1H NMR spektrum látky 10E



Příloha 18: ^{13}C NMR spektrum látky 10E

