

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Syntéza nových analogů GaMF1 jako potenciálních inhibitorů F-ATP
synthasy**

Bakalářská práce

Autor: Petr Vyvlečka

Studijní program: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

Čestně prohlašuji, že jsem závěrečnou bakalářskou práci na téma „Syntéza nových analog GaMF1 jako potenciálních inhibitorů F-ATP synthasy“ zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. s využitím dostupné literatury a informačních zdrojů, které cituji v seznamu zdrojů. Dále udílím souhlas se zpřístupněním této bakalářské práce v knihovně Katedry organické chemie Univerzity Palackého.

V Olomouci dne 16. 5. 2023

.....

Petr VYVLEČKA

PODĚKOVÁNÍ:

Na prvním místě bych rád poděkoval paní RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D. za odborné vedení a umožnění práce v její výzkumné skupině. Také chci poděkovat ostatním členům výzkumné skupiny za vytvoření přátelského pracovního prostředí a poskytnutí odborné pomoci při laboratorní činnosti. Z kolektivu výzkumné skupiny jsou to zejména Mgr. Milan Dak, Mgr. Jan Chasák a Mgr. Michal Kolařík.

Velké poděkování patří rovněž všem pracovníkům Katedry organické chemie, speciálně panu RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. a Mgr. Davidu Profousovi za konzultaci a pomoc při analýze syntetizovaných sloučenin.

Na závěr děkuji svým nejbližším příbuzným za materiální podporu a vytvoření optimálních podmínek pro studium.

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

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE:

JMÉNO A PŘÍJMENÍ:	Petr Vyvlečka
NÁZEV PRÁCE:	Syntéza nových analog GaMF1 jako potenciálních inhibitorů F-ATP synthasy
TYP PRÁCE:	bakalářská
PRACOVNÍŠTĚ:	Katedra organické chemie
VEDOUČÍ PRÁCE:	RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
ROK OBHAJOBY PRÁCE:	2023

ABSTRAKT:

Tématem předložené bakalářské práce je syntéza nových inhibitorů mykobakteriální F-ATP synthasy, jejichž struktura je odvozena od již popsané sloučeniny GaMF1. Teoretická část pojednává o významu tuberkulózy v historii a současnosti, stručně charakterizuje rod *Mycobacterium* a vybrané zástupce rodu, seznamuje se základními léčebnými principy a popisuje enzym *F₁F₀ ATP synthasu*. V praktické části jsou popsány syntetické postupy navržené pro přípravu finálních derivátů. Během bakalářské práce se podařilo připravit celou řadu intermediátů a čtyři zcela nové finální látky, u kterých bude dále testována jejich antimykobakteriální aktivita.

KLÍČOVÁ SLOVA: tuberkulóza, mykobakterie, *F₁F₀ ATP synthasa*, antituberkulotika

POČET STRAN: 78

POČET PŘÍLOH: 35

JAZYK: čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

AUTHOR'S NAME AND SURNAME: Petr Vyvlečka
TITLE: Synthesis of new GaMF1 analogues as potent F-ATP synthase inhibitors
TYPE OF THESIS: Bachelor
DEPARTMENT: Department of Organic Chemistry
ADVISOR: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
THE YEAR OF PRESENTATION: 2023

ABSTRACT:

The topic of the submitted bachelor thesis is design and synthesis of new inhibitors of mycobacterial F-ATP synthase, the structure of which is derived from GaMF1 compound. The theoretical part discusses the importance of tuberculosis in the past and nowadays, briefly characterizes the *Mycobacterium* genus and selected species, introduces the basic treatment principles and describes the *F₁F₀ ATP synthase* enzyme. The practical part describes the synthesis routes of selected compounds.

KEY WORDS: tuberculosis, *Mycobacteria*, *F₁F₀ ATP synthase*, antituberculotics

NUMBER OF PAGES: 78
NUMBER OF APPENDIXES: 35
LANGUAGE: Czech

Obsah

Obsah	6
Úvod	8
Cíle práce	10
Teoretická část	11
1 Tuberkulóza	11
1.1 Historie tuberkulózy	12
1.2 Strategie boje proti tuberkulóze	13
2 Mykobakterie	13
2.1 Stavba mykobakterií a chemické složení	14
2.2 Tuberkulózní mykobakterie	15
3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
4 Vakcinace	19
5 Epidemiologie <i>Mtb</i> v ČR	20
6 Léčba tuberkulózy	21
6.1 Léčebné režimy	22
6.2 Antituberkulotika	22
7 ATP synthasa a inhibitory	25
7.1 <i>F₁F₀ATP synthasa</i>	25
7.2 Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy	26

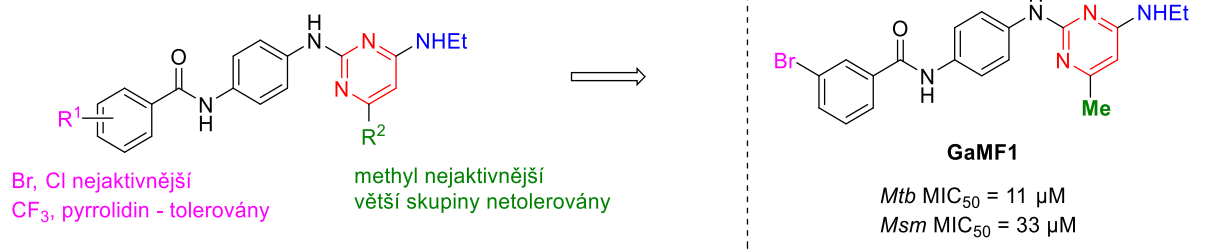
7.3	GaMF1	27
	Výsledky a diskuze	28
8	Syntéza nových analog GaMF1	28
8.1	Syntéza derivátů pyrimidinu	29
8.2	Příprava 3-brom- <i>N</i> -(4-nitrofenyl)benzamidů	32
8.3	Příprava <i>N</i> -(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů	32
8.4	Příprava finálních sloučenin	35
	Experimentální část	37
9	Obecné informace	37
10	Příprava analog GaMF1	38
10.1	Příprava derivátu pyrimidinu	38
10.2	Příprava 3-brom- <i>N</i> -(4-nitrofenyl)benzamidů	44
10.3	Příprava <i>N</i> -(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů	44
10.4	Příprava finálních sloučenin	45
	Závěr	50
	Seznam použitých zkratk	51
	Reference	52
	Přílohy	60

Úvod

Tuberkulóza je bakteriální onemocnění, které ročně způsobí přibližně 1,5 milionů úmrtí.¹ Navzdory řadě antituberkulotik je léčba a snaha o eradikaci tuberkulózy znemožněna mnoha faktory. Největší hrozbu při léčbě tuberkulózy v současné době představují bakteriální kmeny *Mycobacterium tuberculosis* s označením MDR (z anglického *multidrug-resistant*) a XDR (*extensively-drug-resistant*), které se vyznačují vysokou schopností rezistence vůči antituberkulotikům.^{1,2} Jednou z cest je aplikace nových kombinací podávaných antituberkulotik, další možností je hledání nových protituberkulotických cílů, jejichž návrhem a syntézou se zabývá i výzkumná skupina, ve které byla tato bakalářská práce zpracována.

Jedním z protituberkulotických cílů je mykobakteriální enzym *F₁F₀ATP-synthasa*, který je zodpovědný za syntézu životně důležité sloučeniny adenosintrifosfát (ATP).^{2,3} V posledních letech bylo navrženo několik strukturně odlišných sloučenin schopných vazby na tento enzym a potlačení správné katalytické funkce enzymu. Prvním z těchto derivátů byl bedaquilin a jeho deriváty.^{2,4,5} Jinou skupinou byly sloučeniny s označením squaramidy.⁶ V roce 2020 vyšel článek Hotra a kol.,² ve kterém byla představena GaMF1 jako sloučenina s antituberkulotickým potenciálem (Obr. 1).

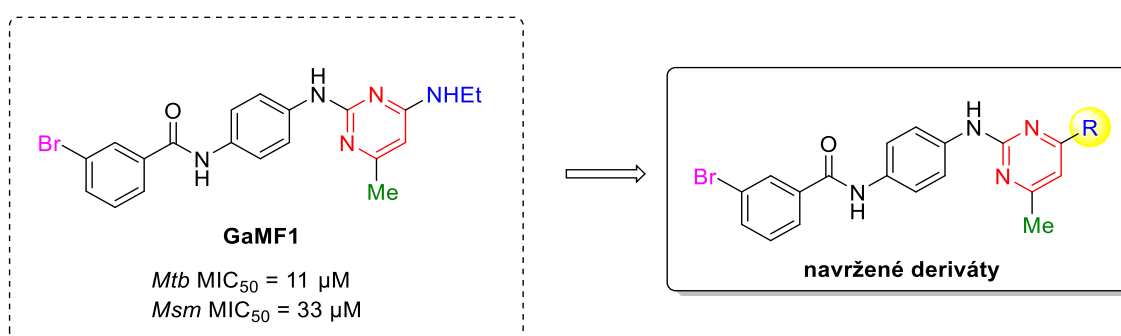
Předložená bakalářská práce vychází ze zmíněného článku Hotra a kol.² a v praktické části se zabývá syntézou sloučenin, které mají obdobnou strukturu jako sloučenina GaMF1. Autoři článku popisují, že tyto deriváty jsou schopné inhibice mykobakteriální ATP synthasy a vážou se na podjednotku γ .² Z popsání molekulového dokování a dalších experimentů však není patrné, jakou roli přesně hrají jednotlivé modifikace při vazbě do aktivního místa enzymu. Proto jsme se rozhodli těmito deriváty dále zabývat a rozšířit SAR studii těchto sloučenin.



Obr. 1: Struktura GaMF1 a jejích derivátů

Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce je syntéza nových analog GaMF1, která vychází z článku Hotra a kol.² Autoři zde představují sloučeninu GaMF1 a některé její deriváty, které vykazují značnou antimykobakteriální aktivitu. Bakalářská práce je zaměřena na syntézu sloučenin, které se od GaMF1 liší aminovým substituentem na pyrimidinovém jádře (Obr. 2).



Obr. 2: Nově navržené deriváty

Jednotlivé cíle práce:

- vypracování literární rešerše na téma tuberkulóza, mykobakterie a inhibitory ATP synthasy
- syntéza navržených látek a optimalizace reakčních podmínek
- předání finálních derivátů k testování biologické aktivity

Teoretická část

1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (dále TB) je bakteriální onemocnění způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*.¹ S TB se lidstvo potýká odnepaměti. Existují výzkumy dokládající nákazu TB v nejstarších civilizacích, například v mladší době kamenné, ve starověkém Egyptě nebo v antickém Řecku.⁷ Podle Světové zdravotnické organizace (dále WHO) způsobuje TB každý rok zhruba 1,5 milionů úmrtí, a řadí se tak k nejnebezpečnějším infekčním onemocněním současnosti.¹ V rámci infekce jedním infekčním patogenem byla TB dlouhou dobu nejčastější příčinou úmrtí, než byla vystřídána onemocněním COVID-19.¹ V roce 2021 bylo podle WHO ve světě 10,6 milionu nových případů nákazy TB a 1,6 milionu úmrtí v důsledku tohoto onemocnění.¹

Přibližně čtvrtina světové populace je nakažena TB s 5-10% pravděpodobností vývinu aktivní formy v průběhu života.⁸ Existuje mnoho faktorů zvyšujících pravděpodobnost vývinu aktivní formy onemocnění. Mezi tyto faktory patří nákaza virem HIV, obezita, diabetes, ale také například kouření nebo alkoholismus.⁸

Hostitelskými organismy mykobakterií jsou jak zvířata, tak člověk a v rámci hostitelského organismu parazitují v mnoha typech tkání. Lidská nákaza TB se dělí na plicní TB a mimoplicní TB. Plicní TB (ftíza) je nejznámější formou lidské TB. Z toho důvodu je v mnoha případech jednoslovným termínem *tuberkulóza* označována právě plicní forma TB. Společnými symptomy plicní TB jsou kašel, horečka, bolest v oblasti hrudníku, slabost a ztráta hmotnosti.⁹

Mezi největší překážky při boji s TB patří v současné době vysoká schopnost rezistence určitých mykobakteriálních kmenů na dostupná léčiva.² Dále můžeme zmínit imunokompromitované pacienty jako např. lidi trpící HIV či pacienty léčící se na rakovinu. V neposlední řadě se setkáváme s čím dál častější a početnější migrací obyvatel ze zemí, kde je nákaza více rozšířena a léčba méně dostupná. V posledních letech se objevila nová komplikace v podobě epidemie COVID-19, která výrazně zkomplikovala strategie jednotlivých států na eradikaci TB.¹

1.1 Historie tuberkulózy

„Tuberkulóza je nemoc známá již odnepaměti, dokonce lze říct, že je stará jako lidstvo samo.“⁷ Tuto větu prohlásil slovenský lékař Anton Bajan (1927-2009) ve své knize *Tuberkulóza* (Osveta Martin, 1990).⁷ (pozn. citace je do češtiny přeložena ze slovenského originálu; v knize na straně 10) Skutečně existuje mnoho archeologických a historických výzkumů, které potvrzují, že lidstvo se s TB potýká již od pravěkých dob.^{7,10} Za nejstarší doklad existence TB lze pokládat nález K. Pfaffa z roku 1904, při kterém byla identifikována nákaza TB u člověka žijícího v mladší době kamenné.^{7,10} Odhaduje se, že TB se poprvé vyskytla zhruba před 40 000 až 70 000 lety.^{11,12}

V současné době má lidstvo k dispozici písemné dokumenty, které dokládají nejen výskyt TB v dávné minulosti, ale i první formy vnímání problematiky tohoto onemocnění.^{7,10} Jedním z takových dokumentů je babylonský zákoník krále Chammurapiho (\pm 2 200 př.n.l.), staroindický Manuův zákoník (\pm 1 200 př.n.l.) a Svaté písmo Starého zákona.^{7,10} Za první ucelený obraz o plicní formě TB lze považovat *Corpus Hippocraticum*, ve kterém Hippokratés popisuje příznaky TB.^{7,10} Hippokratova práce byla dále rozšířena dalšími řeckými mysliteli, Isokratem a Aristotelem, kteří navíc poukazují na nakažlivost choroby.¹⁰ Aristoteles popsal, že se TB šíří vzduchem a vstupní branou do lidského organismu je dýchací soustava.¹⁰ Z období středověku nemáme k dispozici doklady o rozvoji poznání TB,⁷ až počátek novověku přinesl další poznatky v této oblasti. Paracelsus definoval tzv. *tartarus* jako konkrément ucpávající dýchací cesty, Sylvius popsal charakteristický projev tuberkulózy – tuberkul a na konci 17. století byly na území dnešní Itálie jako první zaváděny zákony mající za cíl zamezení šíření TB.¹⁰ Významným mezníkem poznání tuberkulózy byla práce německého lékaře Roberta Kocha, který 24. 3. 1882 na zasedání Berlínské fyziologické společnosti přednesl slavný projev, ve kterém referoval o svém objevu tuberkulotického bacilu a dokázal parazitickou podstatu infekční choroby.⁷ Na počest tohoto dne je tak 24. březen stanoven jako Světový den tuberkulózy.

1.2 Strategie boje proti tuberkulóze

V letech 2014-2015 členské státy WHO a Organizace spojených národů (dále OSN) přijaly Strategii konce TB (v angličtině *WHO's End TB Strategy*) a Udržitelné rozvojové cíle OSN (v angličtině *UN Sustainable Development Goals; SDGs*), a zavázaly se tak k ukončení epidemie TB.¹ V roce 2018 se na Valném shromáždění OSN v New Yorku konala poprvé v historii konference představitelů států na téma TB (v angličtině *UN high-level meeting on TB*), jejímž cílem bylo zrychlení kroků vedoucích k eliminaci TB a poskytnutí prevence a léčby všem lidem ovlivněným TB.¹³ Necelý měsíc po této konferenci přijalo Valné shromáždění OSN politickou deklaraci (*Resolution document A/RES/73/3*), která zavazuje členské státy OSN k aplikaci kroků vedoucích k eliminaci TB.¹³ Další konference tohoto typu je naplánována na rok 2023.

Významnou komplikací v naplňování cílů WHO a OSN je celosvětový pokles počtu hlášených případů TB v důsledku pandemie COVID-19.¹ Země, kde byl v roce 2020 tento pokles nejvýznamnější, jsou Indie, Indonésie a Filipíny.¹ Z toho plyne rostoucí rozdíl mezi skutečným počtem nových případů a počtem nahlášených případů.¹ Tento zvyšující se rozdíl má za následek zvýšení rizika úmrtí na TB, zintenzivnění přenosu infekce mezi lidmi, a v důsledku toho i rostoucí počet nových případů.¹ Kromě pandemie COVID-19 komplikují léčbu TB také válečné konflikty v mnoha částech světa, globální energetická krize a s těmito faktory související nebezpečí nedostatku potravin.¹

2 Mykobakterie

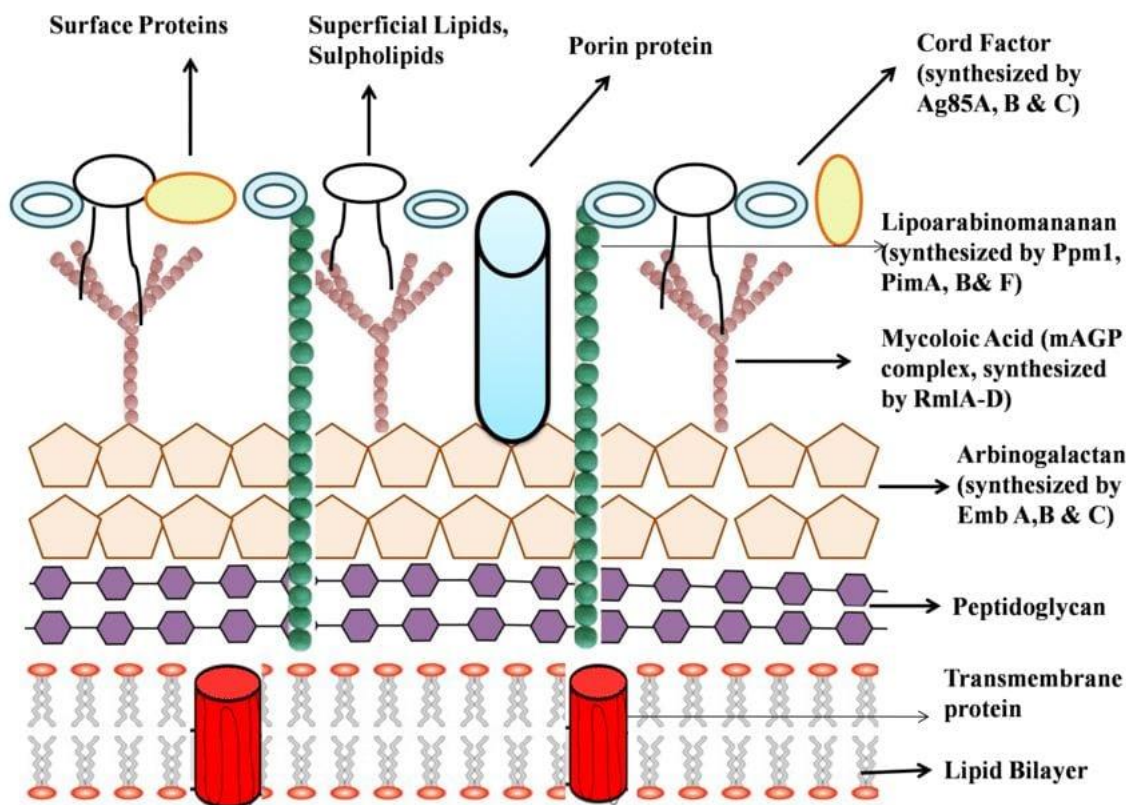
Mykobakterie neboli zástupci rodu *Mycobacterium* jsou součástí čeledi *Mycobacteriaceae*¹⁰ a řádu *Actinomycetales*.¹⁴ V 19. století popsal G. A. H. Hansen (1841-1912) mykobakterie jako původce malomocenství.¹⁵ Mykobakterie jsou aerobní, nepohyblivé, nesporulující, grampozitivní bakterie.^{10,14} Všechny mykobakterie jsou acidorezistentní, alkalirezistentní a alkoholrezistentní.⁷ Generační doba mykobakterií se pohybuje v rozmezí 20-48 hodin, rozmnožují se příčným a podélným dělením, případně pučením.⁷ Charakteristickým znakem mykobakterií je tvorba unikátních mykolových kyselin jako součást buněčné stěny a membrány, které významně ovlivňují vlastnosti celé bakterie.¹⁰ Do popředí zájmu se tento rod bakterií dostal především na konci 19. století,

kdy v roce 1882 německý lékař Robert Koch (1843-1910) objevil bakterii *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* a identifikoval ji jako původce TB.^{7,10}

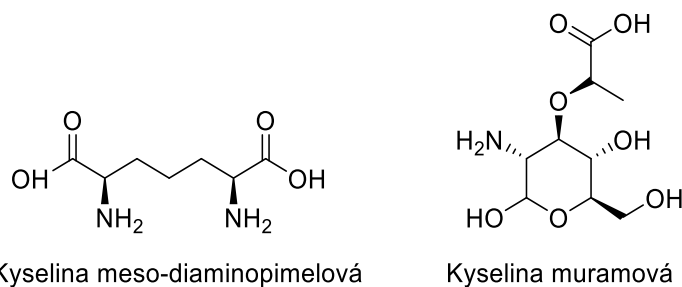
Na základě patogenity byly později mykobakterie rozděleny na tuberkulózní (pravé) mykobakterie a netuberkulózní mykobakterie (NTM).¹⁶ Mezi tuberkulózní mykobakterie patří *Mycobacterium leprae* a zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).¹⁶ Tyto bakterie nejsou schopny rozmnožovat se v neživém prostředí, jejich hlavním útočištěm jsou tkáně lidí a teplokrevných živočichů.¹⁰ Ostatní mykobakterie se řadí mezi netuberkulózní bakterie a řada z nich působí na člověka jako oportunní patogen.¹⁶ NTM jsou volně žijící bakterie a zpravidla se nachází ve vodním prostředí (jezera, řeky, vlhká půda).¹⁰

2.1 Stavba mykobakterií a chemické složení

Mezi základní složky mykobakterií patří lipidy, proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a pigmenty.⁷ Mykobakterie se vyznačují specifickou buněčnou stěnou, která je hydrofobní, permeabilní a vyznačuje se vysokým podílem lipidické složky (Obr. 3).¹⁰ Součástí buněčné stěny jsou peptidoglykolipidy (obsahující kyselinu meso-diaminopimelovou, alanin, kyselinu glutamovou, glukosamin, kyselinu muramovou, arabinózu a galaktózu), mykolové kyseliny a volné lipidy.¹⁰ Strukturní vzorec kyseliny meso-diaminopimelové a kyseliny muramové je uveden na Obr. 4. Na povrchu některých mykobakterií se nachází lipidní hlenovitá vrstva, tzv. *cord-faktor*, která umožňuje tvorbu kolonií, tzv. *cord-formací*.⁷ Jádro mykobakterií obsahuje nukleové kyseliny.⁷ Mykobakterie potřebují pro svůj život kromě kyslíku také dusík a uhlík.⁷ Stopovými prvky v buňkách mykobakterií jsou sodík, draslík, hořčík, chlor, síra, fosfor a železo, které působí jako katalyzátory v dýchacích enzymech.⁷



Obr. 3: Stavba mykobakteriální buněčné stěny.¹⁷



Obr. 4: Struktury kyselin meso-diaminopimelové a muramové.

2.2 Tuberkulózní mykobakterie

Mezi tuberkulózní mykobakterie patří *Mycobacterium leprae* a bakterie komplexu MTBC.¹⁶ V minulosti se předpokládalo, že TB je způsobena bakterií *Mtb*.¹² Později se uplatnila teorie, že tuberkulózu způsobuje více bakterií patřících do rodu *Mycobacterium*, které jsou označeny jako komplex MTBC.¹² V roce 2020 vyšel článek Kanipe a kol.,¹² ve kterém je do MTBC zahrnuto celkem 12 bakterií: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*,

Mycobacterium microti, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium suricattae*, šimpanzí bacilly (v článku jako *Chimpanzee bacilli*) a damaní bacilly (v článku jako *Dassie bacilli*). (pozn. autoři článku¹² u zmíněného seznamu citují Barbier a kol.,¹⁸ Brites a kol.¹⁹ a Orgeur a kol.²⁰) Podle článku¹² jsou lidé nejcitlivější na *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* a *M. canetti*.¹² *M. bovis* je navíc považována za hlavního původce TB u zvířat.^{7,10}

Dále budou stručně popsány vybraní zástupci komplexu MTBC. Bakterii *Mycobacterium tuberculosis* pak bude vzhledem k jejímu zvláštnímu významu v této bakalářské práci věnována zvláštní kapitola.

2.2.1 *Mycobacterium leprae*

M. leprae byla objevena v roce 1874 (Hansen) a jednalo se o první identifikovaný bakteriální patogen v lidském těle.^{21,22} Onemocnění, které *M. leprae* způsobuje, se nazývá lepra neboli malomocenství či Hansenova nemoc (dále jako HD).^{15,22} Bakterie je obligátní nitrobuněčný parazit²³ interagující s keratocyty a makrofágy v kůži.²²⁻²⁴ Bakterie působí i na myelinové a nemyelinové Schwannovy buňky,^{22,25} a způsobuje tak jejich infekci vedoucí k nervovým poruchám.^{22,25} Ačkoli hlavní cestou šíření HD je přenos z člověka na člověka,²⁶ pouze u 20 % lidí vystavených nákaze se vyvine aktivní forma nemoci díky genetickým obranným mechanismům.^{22,27} V některých částech světa již byly zaznamenány rezistentní formy *M. leprae*.²⁸ Po zavedení multilékové terapie se výrazně snížil počet případů – z 5 milionů v 80. letech 20. století na 133 802 případů v roce 2021.²⁹ Jako zásadní krok k prolomení přenosu bylo doporučeno trasování kontaktů a jednodávková chemoprophylaxe rifampicinem.³⁰

2.2.2 *Mycobacterium africanum*

Termínem *Mycobacterium africanum* se označují určité bakterie, které jsou významnou příčinou nákazy TB v západní Africe.³¹⁻³² Tyto bakterie mají nejednoznačné taxonomické zařazení, každopádně na základě mnoha výzkumů lze *M. africanum* považovat, co do vlastností za přechod mezi *Mtb* a *M. bovis*.³³⁻³⁴ V minulosti bylo pozorováno, že západoafrické řetězce *Mtb* jsou více biochemicky heterogenní než řetězce evropské.³⁵ Hoffner a kol.³³ provedli studii MTBC izolovaného v západoafrickém státě Guinea-Bissau,³³ kdy 56 řetězců MTBC od tamějších pacientů bylo testováno 4 biochemickými

metodami (produkce niacinu, test nitrát reduktázy, test pyrazinamidázy a test rezistence na hydrazid thiofen-2-karboxylové kyseliny) a na základě těchto testů rozříděno do 5 biovarů tvořících spektrum mezi charakteristickou bakterií *Mtb* a charakteristickou bakterií *M. bovis*.³³ Jeden z pěti biovarů (biovar A) odpovídal charakteristické *Mtb*, jeden biovar (biovar B) odpovídal charakteristické *M. bovis* a vlastnosti zbylých třech biovarů (biovar C, D, E) odpovídaly přechodu mezi těmito dvěma konci spektra.³³ Collins a kol.³⁶ popsali 2 varianty *M. africanum* – varianta I (*African I variant*) a varianta II (*African II variant*).³⁶ Na základě svého výzkumu přiřadili Hoffner a kol.³³ biovary C a D k variantě I a biovar E k variantě II.^{33,36} (pozn. označení biovarů písmeny A-E bylo vytvořeno za účelem sepsání této bakalářské práce) Podle studie Prat a kol.³⁷ tvoří bakterie *M. africanum* spojitě spektrum spojující na jedné straně *Mtb* a na druhé straně *M. bovis*.^{33,37} Oproti tomu David a kol.³⁴ rozdělují *M. africanum* na 2 skupiny – jednu blížící se *Mtb* a druhou blížící se *M. bovis*.^{33,34} Ačkoli se jednotlivé studie rozcházejí v názoru na taxonomické zařazení *M. africanum*, lze s jistotou říct, že skupina bakterií *M. africanum* obsahuje bakterie s vlastnostmi podobnými jak *Mtb*, tak *M. bovis*.³⁵⁻³⁴

2.2.3 *Mycobacterium bovis*

Původním hostitelským organismem bakterie *M. bovis* byl člověk,¹² přestože v současnosti je tato bakterie spojována především se zvířecí formou TB (často je zmiňována jako původce TB dobytka). Hostitelských organismů *M. bovis* je celá řada, včetně člověka.¹² Ze zvířat se jedná kromě již zmíněného dobytka o celou řadu dalších masožravců, všežravců a býložravců – Kanipe a kol.¹² na základě mnoha studií uvádí, že hostitelských druhů je přes 85.¹² Přestože hlavní příčinou nákazy člověka TB je *Mtb*, příčinou může být právě *M. bovis* nebo jiná bakterie z komplexu MTBC.¹² Kanipe a kol.¹² ve svém článku dále uvádí, že z čísla 10 milionů, což je počet nových případů TB v roce 2017 (podle WHO³⁸), bylo 142 tisíc způsobeno právě *M. bovis*.¹² Podobně 12,5 tisíc úmrtí na TB z celkového počtu 1,6 milionů bylo způsobeno opět *M. bovis* (v roce 2017 podle WHO).^{12,38} Nejčastější formou nákazy člověka bakterií *M. bovis* je konzumací produktů nakažených zvířat, například nepasterizovaného mléka.^{12,39,40}

2.2.4 *Mycobacterium microti*

M. microti je bakterie MTBC, která napadá opět řadu hostitelů. Hostitelem *M. microti* může být i člověk, každopádně tato bakterie je pro člověka méně virulentní a patogenní než jiní zástupci MTBC.^{41,42} Peterhans a kol.⁴² v článku z roku 2020 uvádí zajímavou

skutečnost, že nákaza *M. microti* jak u zvířat, tak u lidí byla zatím zaznamenána pouze v kontinentální Evropě a ve Velké Británii.⁴² Podle Burthe a kol.⁴³ je přírodním rezervoárem *M. microti* hraboš polní (*Microtus agrestis*).⁴³

2.2.5 *Mycobacterium pinnipedii*

V roce 2003 vyšel článek Cousins a kol.,⁴⁴ ve kterém je tato bakterie popsána jako nový zástupce komplexu MTBC, který způsobuje TB u mořských savců.⁴⁴ První zmínka o tomto patogenu nicméně pochází již z roku 1913, kdy v novozélandské veterinářské zprávě byli popsáni nakažení ploutvonožci.^{45,46} *M. pinnipedii* byla popsána u řady mořských savců, a přestože je tato bakterie spojována především s touto skupinou organismů, byla nákaza *M. pinnipedii* identifikována i u jiných organismů, a to i v případě suchozemských savců včetně člověka.^{45,47-48}

2.2.6 *Mycobacterium caprae*

V roce 1999 uvedli autoři Aranaz a kol.⁴⁹ článek, ve kterém prezentovali bakterii z komplexu MTBC a nazvali ji *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae*, tedy poddruh *Mtb*.⁴⁹ V roce 2002 Niemans a kol.⁵⁰ pozměnili definici zmíněné bakterie – podle nich se jednalo o poddruh *Mycobacterium bovis*,⁵⁰ o rok později Aranaz a kol.⁵¹ navázali na svoji práci⁴⁹ z roku 1999 a tuto bakterii povýšili v rámci MTBC na samostatný druh a nazvali ji *Mycobacterium caprae*.⁵¹

3 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je nejčastějším původcem TB u člověka.⁷ Generační čas in vitro je za optimálních podmínek 14-15 hodin, optimální teplota 37 °C a optimální pH 6,4-7,0.⁷ Velikost buňky je 0,3-0,6 × 1,4 μm.⁷ Při studiu *Mtb* jsou často používány 2 kmeny – virulentní H37Rv a avirulentní H37Ra.

3.1.1 Popis nákazy

Vstup buněk *Mtb* do fagocytujících buněk plicních sklípků začíná rozpoznáním patogen asociovaných molekulových vzorů určitými patogen rozpoznávajícími receptory, které spouštějí imunitní odpověď hostitele.¹⁰ Mezi receptory hostitele, které rozpoznávají

mykobakterie patří *toll-like* receptory (TLR), NOD-like receptory (z anglického *nucleotid binding oligomerisation domain*) a C-typ lektiny.¹⁰ Nejdůležitější povrchové buňkové ligandy *Mtb*, které interagují s TLR receptory jsou 19 a 27 kDa lipoproteiny, 38 kDa glykolipoprotein, glykolipidy a trehalosa dimycolát.¹⁰ Tato interakce spouští řetězec signálů, který vrcholí prozánětlivou odpovědí výhodnou pro hostitele.¹⁰ Mykobakterie vyvinuly způsoby tlumení této odpovědi.¹⁰

Prozánětlivá odpověď vede k aktivaci jadrového transkripčního faktoru (NF)- κ B a produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů a oxidu dusného.¹⁰ Kromě makrofágů a dendritických buněk se na imunitní odpovědi vůči mykobakteriím podílejí také další složky imunitního systému, například T lymfocyty.¹⁰ Jedním z obranných mechanismů makrofágů je fúze fagosomů s lysozomy obsahujícími baktericidní dusíkové metabolity.¹⁰ Jiný mechanismus je založený na ubikvitinylovaných peptidech, které narušují buněčnou stěnu *Mtb*.¹⁰ Genom mykobakterií obsahuje tzv. region difference 1 (RD1), který kóduje proteiny jako je ESAT-6 (*6 kDa early secretoric antigenic target protein*), které umožňují únik mykobakterií z makrofágů a jejich další šíření.¹⁰ RD1 je obsažen u všech virulentních kmenů *Mtb* a *M. bovis*, chybí u vakcinačního kmene *M. bovis*.¹⁰

4 Vakcinace

Současná vakcína, bacillus Calmette-Guérin (BCG), (dále jako BCG) je jedna z nejpoužívanějších vakcín na světě¹⁰ a je používána od 20. let 20. století.^{10,52} Jméno dostala po svých vynálezcích (lékař Léon Charles Albert Calmette a veterinář Jean-Marie Camille Guérin), kteří ji vyvinuli v Pasteurově institutu v Lille.¹⁰ Z jejího názvu je odvozen výraz *kalmetizace*, což je označení pro aplikaci této vakcíny. Aplikace je prováděna převážně intradermálně.¹⁰

Vakcína je oslabený kmen *M. bovis*, jehož genom neobsahuje tzv. region difference (RD1), čímž se liší od virulentní *M. tuberculosis*.^{10,52} Kmeny BCG jsou na základě odlišných růstových charakteristik, reziduální virulence u zvířat a reaktogenity u dětí klasifikovány na silné a slabé.¹⁰ Mezi silné kmeny se řadí například dánský kmen 1331 (Copenhagen), mezi slabé kmeny patří japonský kmen 172 (Tokio).¹⁰ V současné době není žádná licencovaná vakcína efektivní pro prevenci TB u dospělých, každopádně výsledky z klinického testování vakcíny *M72/AS01E* jsou slibné.^{1,53}

První vakcína BCG byla podána v roce 1921, masová aplikace však započala až po druhé světové válce.¹⁰ Zásluhy na šíření a aplikaci BCG měly v té době zejména skandinávský Červený kříž, UNICEF a později WHO.¹⁰ Z důvodu rozdílných závěrů konkrétních institucí docházelo k různým přístupům států ke kalmetizaci.¹⁰ Postup BMRC (*British Medical Research Council*), který aplikoval kmen Copenhagen 13letým tuberkulin-negativním dětem, a identifikoval tak vysoký stupeň ochrany, vedl k pozitivnějšímu postoji Velké Británie ke kalmetizaci.¹⁰ Naopak postup USPHS (*United States Public Health Service*), který aplikoval kmen Park a Tice tuberkulin-negativním osobám různého věku, a identifikoval tak nízký stupeň ochrany, vedl k negativnějšímu postoji USA ke kalmetizaci.¹⁰ Většina států následně zavedla rutinní kalmetizaci při, nebo těsně po narození, naopak USA a Nizozemsko se rozhodli využívat vakcínu jen ve výjimečných případech.¹⁰

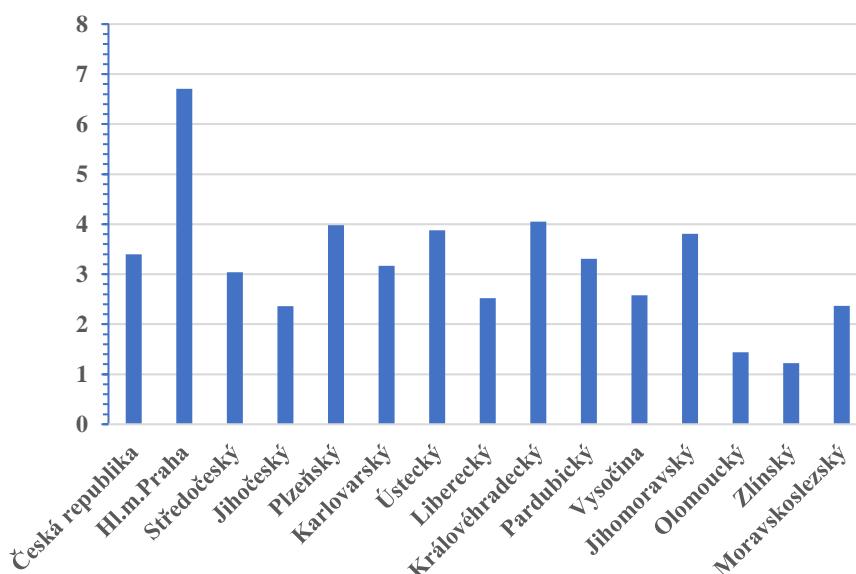
V současné době je plošná vakcinace novorozenců aplikována v řadě zemí Afriky, Asie (včetně Japonska) a Latinské Ameriky.¹⁰ Z evropských zemí sem patří Polsko, Maďarsko a některé další státy v Pobaltí a na Balkánském poloostrově.¹⁰ Ve většině evropských zemí (včetně České republiky), v USA, v Kanadě, v Austrálii a na Novém Zélandě v současné době plošná kalmetizace novorozenců není prováděna.¹⁰

(údaje o evropských zemích pochází z mapy na Obr. 17.1 v knize Solovič, Vašáková: Tuberkulóza ve faktech a obrazech¹⁰; str. 246)

5 Epidemiologie *Mtb* v ČR

Česká republika se řadí mezi země s nejnižším výskytem TB v Evropě.¹⁰ Od konce 90. let 20. století docházelo k poklesu ročních počtů hlášených případů TB, od roku 2013 jsou tato čísla téměř neměnná.¹⁰ Podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) bylo v roce 2021 v ČR hlášeno celkem 357 případů nákazy TB (tj. 3,4 případy na 100 000 obyvatel).⁵⁴ Z této hodnoty představovalo 90,2 % případů onemocnění plic.⁵⁴ Stejně jako v globálním měřítku trpí v České republice TB převážně muži (70 % případů).⁵⁴ Nejvyšší koncentrace nakažených byla zaznamenána v Praze (6,7 případů na 100 000 obyvatel), nejnižší koncentrace v kraji Zlínském (1,2 případů na 100 000 obyvatel).⁵⁴ V roce 2021 bylo zaznamenáno v ČR 37 případů úmrtí na TB, nejvyšší počet úmrtí v Praze (13 případů) a nejnižší v krajích Ústeckém, Libereckém a Olomouckém (po 1 případu).⁵⁴ Přehled počtu hlášených případů TB na 100 000 obyvatel v jednotlivých krajích České

republiky je shrnut v grafu na Obr. 5. Data jsou získána ze *Základního přehledu epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2021*⁵⁴ vydaného Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR.



Obr. 5: Počet hlášených případů TB na 100 000 obyvatel v jednotlivých krajích ČR v roce 2021 podle *Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR*⁵⁴

V roce 1953 byla v Československu zavedena plošná kalmetizace novorozenců, což spolu s dalšími opatřeními vedlo k rapidnímu poklesu nákazy TB do konce století.^{10,55} Od zrušení plošné kalmetizace v roce 2010 je očkování novorozenců v České republice prováděno na přání rodičů nebo v případě novorozence spadajícího do rizikové skupiny.¹⁰

6 Léčba tuberkulózy

V knize *Tuberkulóza ve faktech a obrazech* (Maxdorf 2019)¹⁰ na straně č. 175 uvádí I. Solovič a I. Porvazník zásady léčby tuberkulózy.¹⁰ Z uvedených zásad plyne, že léčba TB patří do rukou pneumologa, v léčbě TB má zásadní postavení farmakoterapie, hlavní zásadou léčby TB je dlouhodobé kombinované podávání antituberkulotik v jedné ranní dávce, chirurgická léčba je indikovaná jen v ojedinělých případech a léčba pacienta probíhá v izolovaném prostředí domácím nebo nemocničním.¹⁰

6.1 Léčebné režimy

Podle WHO zhruba 85 % pacientů může být vyléčeno při dodržení aktuálního doporučeného léčebného postupu.¹ Léčebné režimy mají vždy fázi iniciální a pokračovací.¹⁰ Léčba TB způsobené citlivým kmenem se uvádí 6 až 12 měsíců, u multirezistentních forem je to 20 měsíců po dosažení debacilizace.¹⁰ Nejnovější režimy tuto dobu zkracují na 9 měsíců.¹⁰ V České republice je preferováno denní podávání antituberkulotik před intermitentním režimem.¹⁰ V současné době se používají krátkodobé léčebné režimy vyžadující použití baktericidních antituberkulotik rifampicinu (R), izoniazidu (H) a pyrazinamidu (Z).¹⁰ (*pozn. písmena v závorce jsou všeobecně uznávané zkratky antituberkulotik*). Ethambutol (E) je účinný v kombinaci s R, H a Z při prevenci vzniku lékové rezistence.¹⁰ Při kombinaci antituberkulotik se v některých případech podává i streptomycin (S), který působí především proti mykobakteriím v extracelulárním prostředí.¹⁰

Antituberkulotická léčba musí být kombinovaná, aby se zamezilo vzniku rezistence mykobakterií na antituberkulotika.¹⁰ Kombinovaná léčba TB antituberkulotiky bývá označena kombinací písmen představující jednotlivá antituberkulotika, například označení HRE představuje použití izoniazidu (H), rifampicinu (R) a ethambutolu (E).¹⁰ Léčba TB u pacientů, kteří v minulosti s touto nemocí nebyli léčeni, se skládá z iniciální fáze, při které je pacientovi po dobu 2 měsíců podávána kombinace HRZE, a dále z pokračovací fáze, při které je po dobu 4 měsíců podávána kombinace HR.¹⁰ Léčba TB pacientů s recidivou onemocnění je složena z tříměsíční iniciální fáze, kdy je po dobu 2 měsíců podávána kombinace HRZES a 1 měsíc kombinace HRZE. Následuje pokračovací fáze, kdy je 5 měsíců podávána HRE.¹⁰

6.2 Antituberkulotika

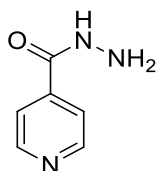
Antituberkulotika mají v různé míře zastoupení 3 vlastnosti – jsou baktericidní, mají schopnost sterilizace prostředí a schopnost prevence vzniku rezistence mykobakterií.¹⁰ Do skupiny antituberkulotik patří zejména antibiotika streptomycin, rifampicin, kapreomycin a cykloserin a chemoterapeutika izoniazid, ethambutol, pyrazinamid, ethionamid a kyselina paraaminosalicylová.¹⁰

Antituberkulotika dělíme na dvě skupiny, základní (prvoliniová) a rezervní (druholiniová).¹⁰ Mezi základní antituberkulotika patří izoniazid, rifampicin, ethambutol

a pyrazinamid.¹⁰ Tyto látky se používají k léčbě tuberkulózy v určitých kombinacích, které předcházejí vzniku rezistivity.¹⁰ Rezervní antituberkulotika jsou toxičtější, používají se pouze v případě neúspěšnosti léčby základními antituberkulotiky.¹⁰ Do této skupiny patří například streptomycin.¹⁰ V této práci budou charakterizována pouze prvoliniová antituberkulotika, a to izoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid.

6.2.1 Isoniazid (H)

Jedná se o hydrazid kyseliny izonikotinové¹⁰ (syntetické analogum pyridoxinu¹⁰), jehož strukturní vzorec je na Obr. 6. Patří k neúčinnějším antituberkulotikům a je možné ho použít pro všechny formy plicní a mimoplicní tuberkulózy.¹⁰ Kvůli rychlému vzniku rezistence se ve většině případů podává v kombinaci s dalšími antituberkulotiky.¹⁰ Isoniazid je aktivován mykobakteriální peroxidázou (KatG).¹⁰ Mutací nebo delecí genu kódujícího KatG dochází u mykobakterií ke vzniku rezistence na izoniazid.¹⁰ Antimykobakteriální aktivita izoniazidu spočívá v inhibici enzymů *enoyl-acyl-carrier-protein-reduktasy* a *β-ketoacyl-ACP-synthasy*, které umožňují syntézu mykolových kyselin jako základní stavební jednotky buněčné stěny.¹⁰ Isoniazid bývá rychle vstřebáván z trávicího traktu a maximální hladiny v krvi je dosaženo po 1-2 hodinách od podání.¹⁰ Mezi izoniazidem a jinými antituberkulotiky se většinou nevyskytuje zkřížená rezistence.¹⁰ Isoniazid je metabolizován v játrech, převážně acetylací.¹⁰ Biologický poločas rozpadu se pohybuje mezi 1,5-4 hodinami.¹⁰ Mezi nežádoucí účinky patří deficit pyridoxinu vedoucí k periferní polyneuritidě, dále riziko onemocnění hepatitidou nebo neuritida zřetelného nervu.¹⁰ Isoniazid také inhibuje metabolismus některých léčiv v játrech.¹⁰ Obecně se však izoniazid považuje za bezpečný lék i v době těhotenství.¹⁰

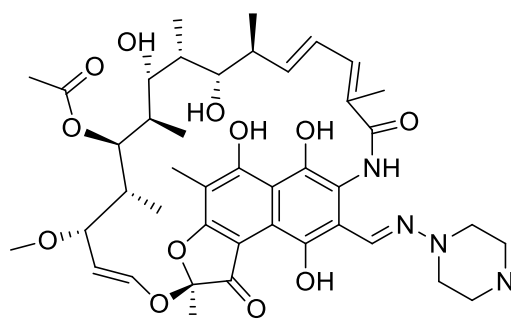


Obr. 6: Isoniazid

6.2.2 Rifampicin (R)

Rifampicin (derivát rifamycinu) je širokospektrální antibiotikum, které působí kromě mykobakterií i na chlamydie, legionely a *Staphylococcus aureus*.¹⁰ Strukturní vzorec rifampicinu je na Obr. 7.¹⁰ Podobně jako v případě izoniazidu se kvůli rychlému vzniku

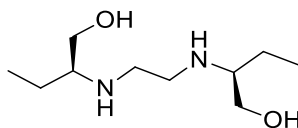
rezistence používá v kombinaci s jinými antituberkulotiky.¹⁰ Rifampicin se rychle vstřebává, při perorálním podání je dosaženo maximální sérové koncentrace 1-3 hodiny po aplikaci.¹⁰ Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bakteriálních nukleových kyselin vazbou na β -podjednotku *DNA-dependentní RNA-polymerasy*.¹⁰ Rifampicin je metabolizován v játrech, biologický poločas rozpadu se pohybuje v rozmezí 2-5 hodin.¹⁰ Mezi nežádoucí účinky patří vznik hyperbilirubinémie.¹⁰ Navzdory některým známým vedlejším účinkům je rifampicin považován za bezpečné léčivo.¹⁰



Obr. 7: Rifampicin

6.2.3 Ethambutol (E)

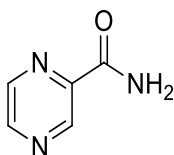
Ethambutol, jehož strukturní vzorec je na Obr. 8, se používá v kombinaci s jinými antituberkulotiky k léčbě všech forem tuberkulózy a infekcí způsobených jinými mykobakteriemi, a to *M. avium*, *M. kansasii* a *M. brasiliensis*.¹⁰ Ethambutol zabraňuje včlenění D-arabiny do arabinogalaktanu, a tím znemožňuje výstavbu buněčné stěny.¹⁰ Ethambutol navíc ovlivňuje syntézu nukleových kyselin bakterií.¹⁰ Ethambutol je dobře vstřebatelný, většina látky je následně z těla vyloučena v nezmetabolizované formě.¹⁰ Významným nežádoucím účinkem je porucha barvocitu, proto musí pacient při léčbě TB kombinací obsahující ethambutol (jedná se například o iniciální fázi v obou formách léčby uvedených v kapitole 6.1) podstupovat pravidelné oftalmologické kontroly.¹⁰



Obr. 8: Ethambutol

6.2.4 Pyrazinamid (Z)

Pyrazinamid, jehož strukturní vzorec je na Obr. 9, má slabší baktericidní účinek, ale silnou sterilizační aktivitu v prostředí s nízkým pH .¹⁰ Pyrazinamid mění mykobakteriemi produkovanou pyrazinamidázu na pyrazinovou kyselinu.¹⁰ Tato kyselina snižuje pH ve fagozomech, což je pro mykobakterie toxické.¹⁰ Mutace mykobakteriálního genu *pncA*, zodpovědného za tvorbu pyrazinamidázy, způsobuje vznik rezistence mykobakterií na pyrazinamid.¹⁰ Metabolismus pyrazinamidu probíhá v játrech, biologický poločas rozpadu se pohybuje v rozsahu 9-10 hodin.¹⁰



Obr. 9: Pyrazinamid

7 ATP synthasa a inhibitory

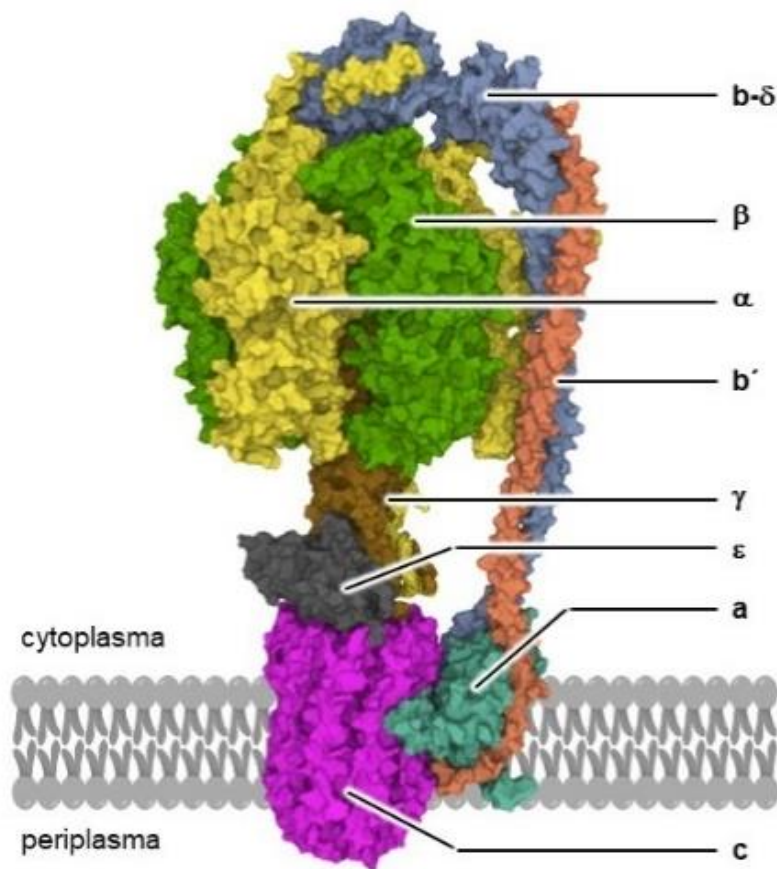
V průběhu let se vyskytlo mnoho skutečností, které komplikují léčbu TB. Kromě problémů, které způsobuje nákaza HIV viry, migrace obyvatelstva, obezita, alkoholismus a další jevy, je jednou z nejvýznamnějších komplikací léčby vysoká rezistivita *Mycobacterium tuberculosis* na současná léčiva.^{1,2} Touto vlastností se vyznačují zejména konkrétní bakteriální kmeny *Mycobacterium tuberculosis* nazývané v angličtině *multidrug-resistant strains* (MDR) a *extensively-drug-resistant strains* (XDR).² Vysoká rezistivita bakterií je jedním z hlavních důvodů, proč je potřeba neustále hledat nové protituberkulotické cíle (v angličtině *anti-TB targets*) a vyvíjet nová antituberkulotika.²

Jedním z validovaných klinických cílů je enzym *F₁F₀ ATP synthasa*.² Mezi sloučeniny, které jsou schopné vazby na tento enzym, patří například diarylchinolinové léčivo bedaquilin (BDQ).^{2,4} Důkazy vzniku rezistence na BDQ vedly k potřebě hledání dalších inhibitorů *F₁F₀ ATP synthasy*.^{2,56,57}

7.1 *F₁F₀ ATP synthasa*

Na Obr. 10 je vyobrazena struktura enzymu *F₁F₀ ATP synthasa*. Mykobakteriální enzym se nachází na cytoplazmatické membráně bakterie.³ V obecné rovině se jedná o bifunkční enzym, který je schopen adenosintrifosfát syntetizovat a zároveň hydrolyzovat, nicméně

v případě mykobakteriálního enzymu hydrolytická vlastnost chybí.^{3,58} Základní struktura enzymu je představována F_1 doménou s $(\alpha \beta)_3$, γ , δ a ϵ podjednotkami a F_0 doménou s podjednotkami a , b a c .^{3,58} Obě domény jsou spojeny centrální stopkou (v anglické literatuře se pracuje s termínem *central stalk*) složenou z podjednotek γ , δ a ϵ .⁵⁸ Doména F_0 je lipofilní a v případě mykobakterií se nachází se na cytoplazmatické membráně.^{3,58} Úlohou F_0 domény je transport protonů přes membránu a tvorba protonového gradientu, jehož energie je využita k syntéze ATP.^{3,58} Tato syntéza je katalyzována hydrofilní F_1 doménou.^{3,58} Katalytické centrum enzymu představuje hexamer $(\alpha \beta)_3$ obsažený v F_1 doméně.⁵⁸



Obr. 10: Mykobakteriální F_1F_0 ATP synthasa

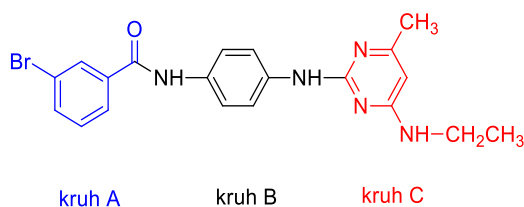
7.2 Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy

Prvním známým a rovněž nejvýznamějším inhibitorem mykobakteriální ATP synthasy je bedaquilin (BDQ), který byl v roce 2012 podmíněčně schválen FDA k léčbě drug-rezistentních forem tuberkulózy.⁴ Unikátnost této látky spočívá v selektivě působení pouze na mykobakterie, na ostatní bakterie je neúčinný.⁴

Objev BDQ byl dále následován celou řadou výzkumných prací popisujících nejen analoga BDQ, tedy látky obsahující diarylchinolin jako základní skelet, ale i jiné strukturální motivy jako např. thiazolidinony,⁵⁹ pyrazolopyrazinony⁶⁰ či squaramidy.^{6,58}

7.3 GaMF1

Článek autorů Adam Hotra a kol.² publikovaný v roce 2020 představuje sloučeninu, jejíž strukturální vzorec je znázorněn na Obr. 11.² Tato sloučenina je nazvána GaMF1 a je prezentována jako nový inhibitor mykobakteriální *F₁F₀ ATP synthasy*.² Podle článku vykazuje sloučenina GaMF1 hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC₅₀) 11 μM pro *M. smegmatis*, 17 μM pro *M. bovis* a 33 μM pro *Mtb* H37Rv.²



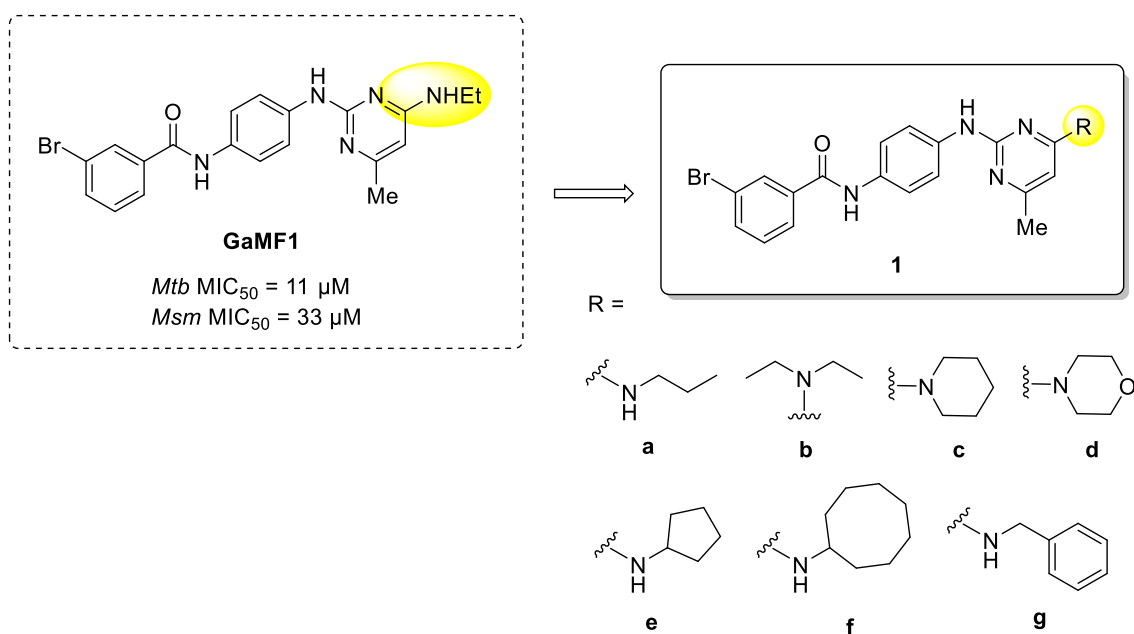
Obr. 11: GaMF1 s vyznačením stavebních kruhů

Sloučenina GaMF1 je specifická ve své selektivitě pouze proti mykobakteriím, proti ostatním bakteriím nevykazuje žádné významné hodnoty.²

Sloučenina GaMF1 je složena ze tří kruhů – brombenzoylového (kruh A), 1,4-diaminobenzenového (kruh B) a substituovaného pyrimidinového (kruh C).² Kromě sloučeniny GaMF1 bylo připraveno několik dalších analogů této sloučeniny a byla zkoumána jejich aktivita vůči mykobakteriím k vytvoření SAR studie.² Tyto experimenty vedly k objasnění funkce jednotlivých částí molekuly GaMF1.² Odstranění kruhu C vedlo ke ztrátě aktivity.² Záměna pořadí funkčních skupin spojujících kruhy A a B (karbonylová skupina a amidová skupina) vedly opět ke ztrátě aktivity.² Odstraněním atomu bromu z kruhu A došlo k mírnému poklesu aktivity.² Při nahrazení atomu bromu na kruhu A za elektronakceptorní trifluormethylovou skupinu nebo za elektrondonorní pyrrolidinovou skupinu nedošlo k výrazné změně aktivity.² Při oxidaci kruhu B za vzniku benzimidazolové podjednotky došlo k 10násobnému zvýšení aktivity.² Z uvedených experimentů vyplývá, že pro zachování antimykobakteriální aktivity analog GaMF1 musí být především ve struktuře ponechán kruh C a zachováno pořadí funkčních skupin spojujících kruhy A a B.²

Výsledky a diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodu, cílem bakalářské práce byla syntéza derivátů odvozených od sloučeniny GaMF1.² Ve zmíněném článku autoři popisují, že látka GaMF1 a její analoga cílí na γ -podjednotku mykobakteriální ATP synthasy.² Nicméně z uvedeného molekulového dokování není zřejmé, jakou roli hrají v aktivním místě jednotlivé modifikace. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli rozšířit sérii popsanych derivátů o modifikace znázorněné níže (Obr. 12).

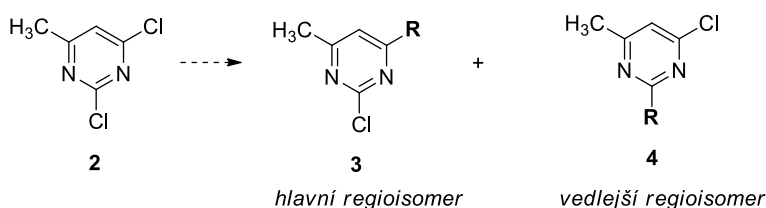


Obr. 12: Návrh nových analog odvozených od sloučeniny GaMF1.

8 Syntéza nových analog GaMF1

Syntéza finálních látek byla navržena podle Hotra a kol.² a je znázorněna ve Schématu 1. Syntéza se skládá ze dvou neoddělitelných paralelních cest – přípravy prekurzorů a přípravy finálních derivátů. Nejdříve byly připraveny vhodné pyrimidinové prekurzory **3**. Ty poté zreagovaly s aminem **8** připraveným reakcí komerčně dostupných sloučenin **5** a **6** s následnou redukcí nitroskupiny derivátu **7** (Schéma 1).

Příprava prekurzorů:



Příprava finálních derivátů:

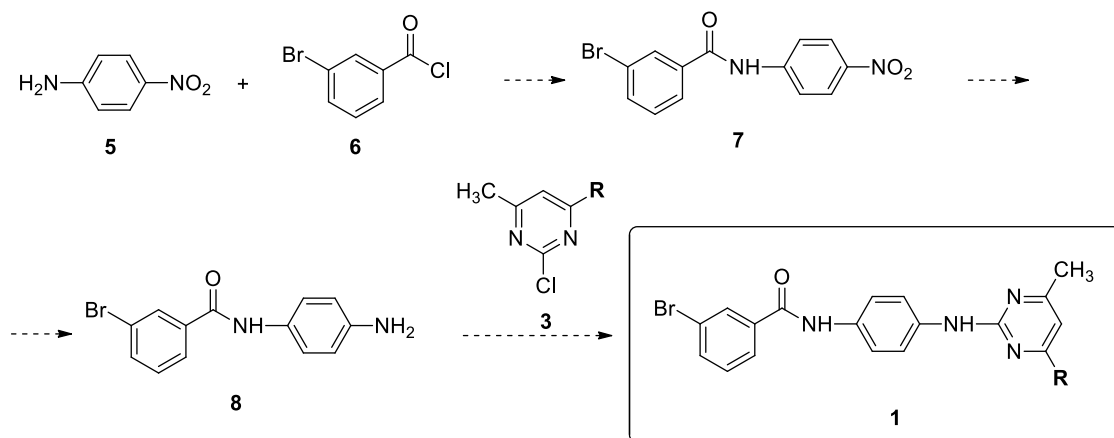


Schéma 1: Navržené schéma syntézy derivátů **1**

8.1 Syntéza derivátů pyrimidinu

Prvním krokem syntézy je příprava pyrimidinového derivátu **3**, ve kterém je jeden z atomů chloru nahrazen primárním nebo sekundárním aminem (substituent **R**). Volbou použitého aminu tak určíme typ finální sloučeniny.

Syntéza je obecně znázorněna ve Schématu 2. Zvolený amin reaguje za zvýšené teploty s 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinem **2**. Reakce probíhá v přítomnosti vhodné báze. Jak již struktura výchozího dichlorderivátu napovídá, při reakci je možný vznik dvou regioisomerů, přičemž požadovaný isomer **3** vždy vzniká v nadbytku.

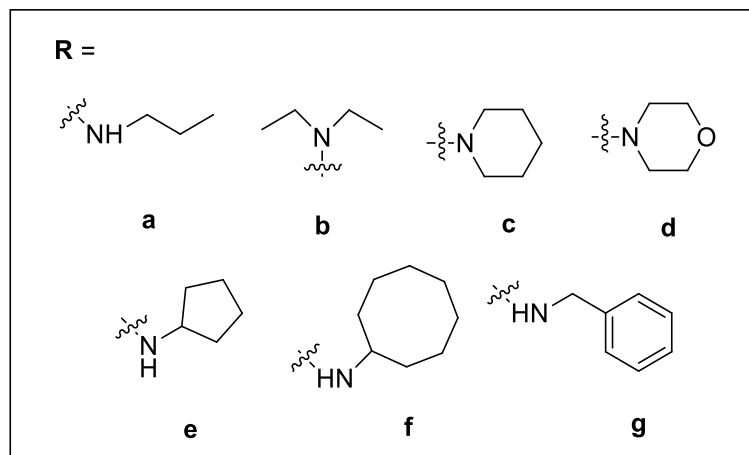
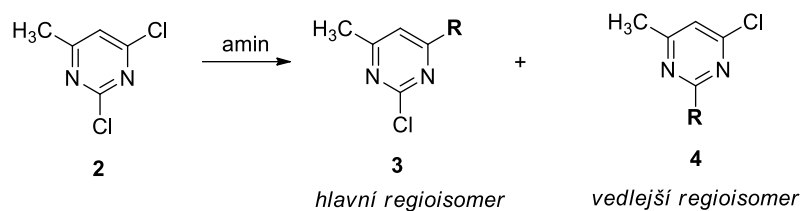


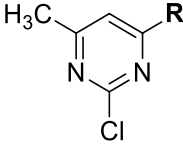
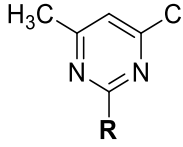
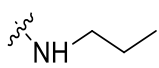
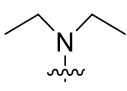
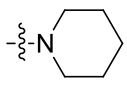
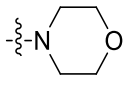
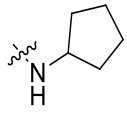
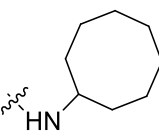
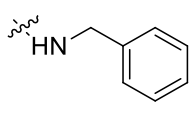
Schéma 2: Příprava derivátů pyrimidinu

Uvedená reakce byla provedena se 7 různými aminy (podle Schématu 2). Výběr substituentů byl primárně ovlivněn neznalostí přesné role této modifikace v aktivním místě ATP synthasy. Z toho důvodu byly navrženy různé typy aminů – primární, sekundární, alifatické, aromatické, cyklické a acyklické. Cílem je rozšíření seznamu popsaných derivátů a získání přesnější představy o roli substituentu v souvislosti s biologickou aktivitou.

Ve všech případech syntéza vycházela z komerčně dostupného 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu **2**, který reagoval s patřičným aminem za přítomnosti báze DIPEA. Reakce probíhala v prostředí ethanolu při teplotě 50 °C po dobu 18 hodin. Průběh reakce byl pokaždé monitorován analýzou TLC a LC-MS. Vznik isomerů byl pozorován ve všech případech. Z analýzy TLC bylo zřejmé, že retenční časy obou isomerů jsou značně rozdílné, proto bylo rozhodnuto o purifikaci surové směsi sloupcovou chromatografií za účelem separace regioisomerů. Mobilní fáze byla ve všech případech EtAc/hexan (1:1) a první byl z kolony eluován minoritní produkt. Významný rozdíl v elučním čase byl pozorován i na LC-MS. Dle záznamu UV-VIS bylo také přibližně určeno poměrové zastoupení jednotlivých isomerů, které činilo zhruba 70-80 % majoritního produktu a 20-30 % minoritního produktu. Tabulka 1 přehledně shrnuje jednotlivé syntetizované prekurzory a jejich výtěžky. Struktura uvedených regioisomerů

byla určena pomocí ^1H a ^{13}C NMR. U morfolinového derivátu **3d** byla rovněž měřena 2D NMR spektra. Z literatury je známo, že aromatický proton u regioisomeru **3** má vždy nižší chemický posun než u regioisomeru **4**.²

Tabulka 1: Souhrn výtěžků při přípravě jednotlivých prekurzorů

substituent R	výtěžek	
	 3	 4
	3a 40 %	4a 12 %
	3b 51 %	4b 9 %
	3c 51 %	4c 15 %
	3d 7 %	4d 2 %
	3e 43 %	4e 17 %
	3f 22 %	4f 5 %
	3g 39 %	4g 14 %

Syntézu výše uvedených prekurzorů jsme dále modifikovali tak, aby nám majoritní isomer **3** vznikal dominantně. O tyto optimalizace jsme usilovali především u morfolinového derivátu **3d**, kdy při reakci v ethanolu vznikaly další nečistoty blízké

svým retenčním časem požadovanému derivátu, což výrazně snižovalo výtěžek získaného derivátu.

Reakce s morfolinem byla provedena v acetonu za laboratorní teploty a za přítomnosti báze K_2CO_3 . Pomocí LC-MS analýzy však bylo zjištěno, že i v tomto případě vznikají oba isomery. Majoritní isomer byl purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie a získán ve výtěžku 36 %. Z časových důvodů a vzhledem ke skutečnosti, že požadované deriváty **3** byly pro další reakci získány v dostatečném množství, žádné další optimalizace již nebyly provedeny.

8.2 Příprava 3-brom-*N*-(4-nitrofenyl)benzamidů

Nitroderivát **7** byl syntetizován z komerčně dostupných sloučenin *p*-nitroanilinu **5** a 3-brombenzoylchloridu **6** (Schéma 3). Tato syntéza byla modifikována oproti metodě popsané Hotra a kol.,² kdy si autoři nejprve připravovali benzoylchlorid z kyseliny benzoové.

Reakce byla prováděna v THF, za přítomnosti K_2CO_3 jako báze, za laboratorní teploty po dobu 18 h. Jako vhodné se ukázalo zvýšit reakční teplotu na 50 °C a poté již stačil reakční čas 2 h. Reakce byla provedena několikrát, postupně se podařilo dosáhnout výtěžku až 75 %.

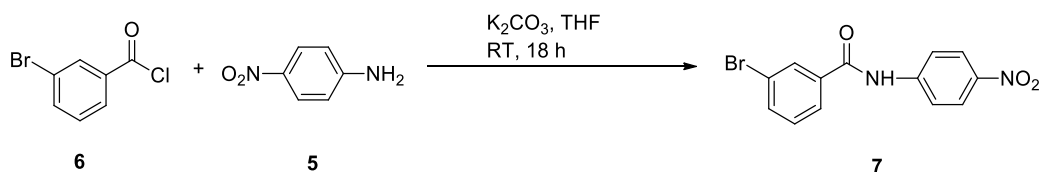


Schéma 3: Příprava sloučeniny **7**

8.3 Příprava *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů

Pro redukci nitrosloučeniny **7** na aminosloučeninu **8** (Schéma 4) byly navrženy celkem 4 postupy. Ve dvou případech se jednalo o redukci kovem v kyselém prostředí, ve zbývajících dvou šlo o redukce vodíkem za katalýzy Pd/C, resp PtO₂.



Schéma 4: Redukce sloučeniny **7**

8.3.1 Redukce nitrosloučeniny kovem v kyselém prostředí

Redukce zinkem

Nejprve byla provedena redukce nitrosloučeniny **7** zinkem v kyselém prostředí. Kyselé prostředí bylo zajištěno přítomností kyseliny octové, která měla zároveň úlohu rozpouštědla. Reakce probíhala 1 hodinu za laboratorní teploty. Surový produkt byl několikrát purifikován sloupcovou chromatografií, nicméně pro opakovaný neúspěch při separaci produktu **8** bylo rozhodnuto o hledání jiného postupu.

Redukce železem

Druhou z možností bylo použití železa, které je pro některé redukce vhodnější neboť průběh redukce za jeho přítomnosti je v porovnání se zinkem mírnější. Kyselé prostředí zde bylo opět zajištěno kyselinou octovou (zároveň úloha rozpouštědla). Reakce probíhala 1 hodinu za laboratorní teploty. Produkt **8** byl získán s výtěžkem 60 %.

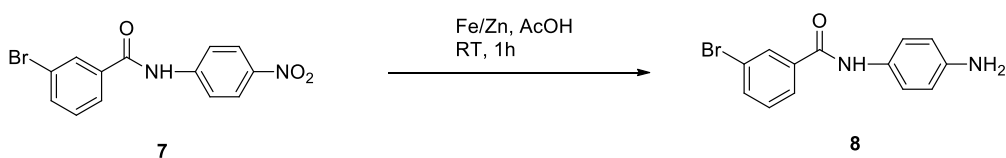


Schéma 5: Redukce sloučeniny **7** kovem v kyselém prostředí

8.3.2 Katalytická redukce nitrosloučeniny vodíkem

Přestože se nakonec podařilo redukcí nitroderivátu **7** pomocí kovu v kyselém prostředí úspěšně realizovat, bylo rozhodnuto ještě otestovat průběh stejné reakce pomocí vodíku. Hlavní motivací v tomto ohledu byla možnost získat aminoderivát **8** po reakci ve vysoké surové čistotě. Pokud by se toto podařilo, značně by se zjednodušil, a především urychlil proces purifikace kýženého produktu **8**.

Redukce Adamsonovým katalyzátorem

Nitrosloučenina **7** byla redukována vodíkem za katalýzy Adamsonovým katalyzátorem, tj. oxidem platičitým. Jako rozpouštědlo byl použit ethanol. Reakce probíhala velmi rychle, produkt byl v reakční směsi identifikován již po 1 hodině. Tento reakční čas

hodnotím jako výhodu reakce, nevýhodou je náročnější manuální provedení. Do reakční směsi musí být nejprve pomocí balonku zavedena inertní atmosféra (pro tento případ zvolen dusík) a následně je potřeba tuto inertní atmosféru nahradit reakční atmosférou vodíku. Po ukončení reakce je potřeba odfiltrovat a předepsaným způsobem zlikvidovat oxid platičitý.

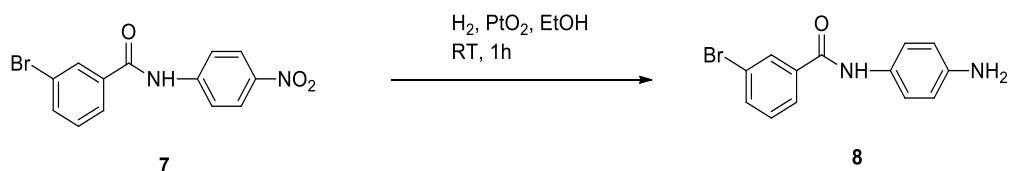


Schéma 6: Redukce sloučeniny **7** vodíkem za katalýzy PtO₂

Redukce palladiem na aktivním uhlí

V tomto případě je nitrosloučenina **7** redukována vodíkem za katalýzy palladiem na aktivním uhlí. Reakce je ve své podstatě velmi podobná předchozí zmíněné, a to i ve svém provedení. Jedinou změnou je užití jiného katalyzátoru. Po 1 hodině reakce bylo pomocí analýzy LC-MS zjištěno, že reakční směs obsahuje produkt **9**, tj. došlo k redukcí nitroskupiny a zároveň k dehalogenaci benzenového jádra. Produkt **9** byl získán ve vysoké čistotě, každopádně pro další reakční kroky není žádoucí. Z toho plyne, že palladium na aktivním uhlí je pro tuto reakci nevhodný katalyzátor. Při provedení této reakce bylo třeba dbát zvýšené opatrnosti a dodržovat bezpečnostní opatření.

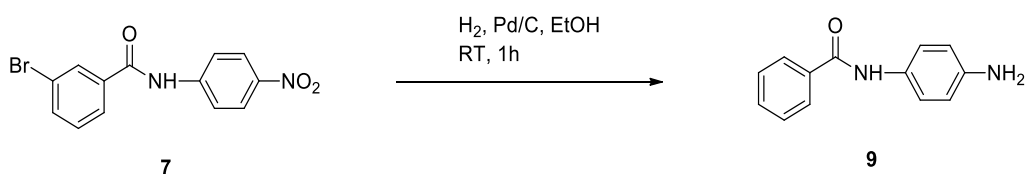


Schéma 7: Redukce sloučeniny **7** vodíkem za katalýzy palladiem – reálný průběh

Z výsledků vyplývá, že pro redukcí nitrosloučeniny **7** na aminosloučeninu **8** je nevhodnější redukcí vodíkem za katalýzy Adamsonovým katalyzátorem (PtO₂). Redukce zinkem v kyselém prostředí je nevhodná z důvodu komplikované purifikace sloupcovou chromatografií. Redukce železem v kyselém prostředí se ukázala být vhodnější než redukcí zinkem, nicméně požadovaný produkt **8** není v reakční směsi obsažen v takové čistotě jako v případě redukcí vodíkem za účasti katalyzátoru. Dále bylo zjištěno, že pro provedení redukcí vodíkem není vhodným katalyzátorem Pd/C. Reakce za jeho účasti probíhá příliš agresivně a současně s redukcí nitroskupiny dochází

i k redukci halogenu z aromatického jádra. Pro reakci se jako vhodný katalyzátor ukázal PtO₂. Reakce s ním probíhá jemněji, a přestože byl pomocí LC-MS detekován i dehalogenovaný produkt, podařilo se požadovaný derivát připravit s velmi dobrou konverzí a v akceptovatelné čistotě.

8.4 Příprava finálních sloučenin

Po úspěšné přípravě obou klíčových prekurzorů zbývalo obě komponenty nechat zreagovat společně za vzniku finálních sloučenin **1**. Přípravu finálních sloučenin znázorňuje Schéma 8 níže.

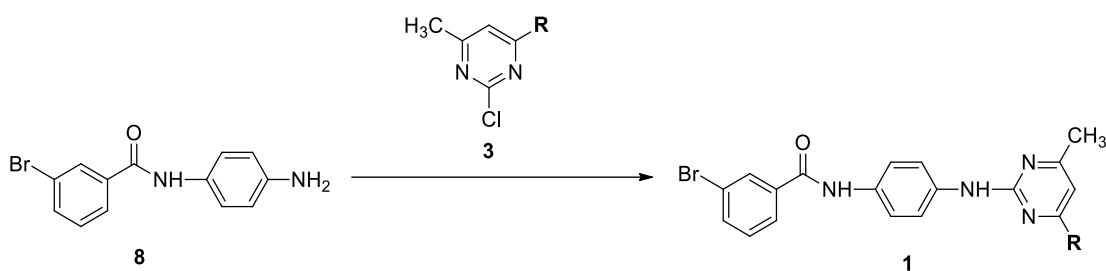


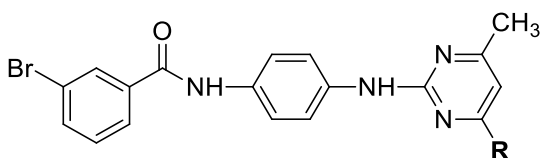
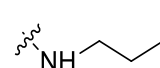
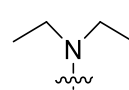
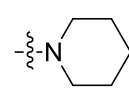
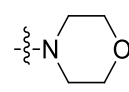
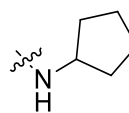
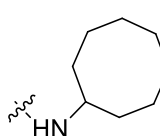
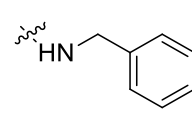
Schéma 8: Obecné schéma přípravy finální sloučeniny; **R** = aminový substituent

Jedná se o závěrečnou reakci navržené sekvence, kdy aminosloučenina **8** reaguje s derivátem pyrimidinu, konkrétně s regioisomerem **3**, za vzniku finální sloučeniny **1**. Finální deriváty se liší svým substituentem **R**, kterým jsou různé aminy. Pro mou bakalářskou práci byla navržena série obsahující celkem 7 těchto finálních sloučenin, bohužel jenom 4 z nich se podařilo úspěšně připravit. Optimalizace přípravy zbylých tří zůstává otevřeným tématem pro další výzkum.

Volbou 7 různých substituentů **R**, tak získáváme 7 různých finálních sloučenin **1a-g**. Tabulka 2 shrnuje výtěžky reakcí podle zvoleného aminového substituentu. Finální sloučeniny **1a-d** se podařilo nasyntetizovat. Příprava sloučenin **1e-g** byla ukončena z důvodu nedostatečné konverze za daných reakčních podmínek. Optimalizace podmínek vedoucí k syntéze produktů **1e-g** zůstává otevřeným tématem pro další výzkumy.

Všechny reakce probíhaly v prostředí rozpouštědla DMF, v přítomnosti DIPEA a při teplotě 110-140 °C. Produkty **1a-d** byly v reakční směsi identifikovány po 4 dnech reakce, produkty **1e-g** se ani po takto dlouhém reakčním čase nepodařilo detekovat (UV/VIS spektrum LC-MS).

Tabulka 2: Přehled výtěžků finálních sloučenin

	výtěžek
substituent R	
	1a 19 %
	1b 43 %
	1c 19 %
	1d 9 %
	1e neúspěšná syntéza
	1f neúspěšná syntéza
	1g neúspěšná syntéza

Vzhledem k tomu, že se ani přes velmi dlouhý reakční čas nedařilo připravit zmíněné tři deriváty, bylo rozhodnuto zkusit reakce optimalizovat. Konkrétně změnou rozpouštědla a změnou báze. Avšak ani průběh reakce v dioxanu v přítomnosti DIPEA jako báze ke vzniku produktu nevedl. Stejně tak ani reakce v DMA za přítomnosti Cs_2CO_3 nebyla úspěšná.

Experimentální část

9 Obecné informace

Chemikálie pocházejí od firmy Sigma-Aldrich (Missouri, USA) a Fluorochem (US). TLC analýza je prováděna pomocí TLC hliníkových fólií Silica gel 60 F254 (Merck). Detekce skvrn byla realizována UV zářením při vlnové délce 254 nm.

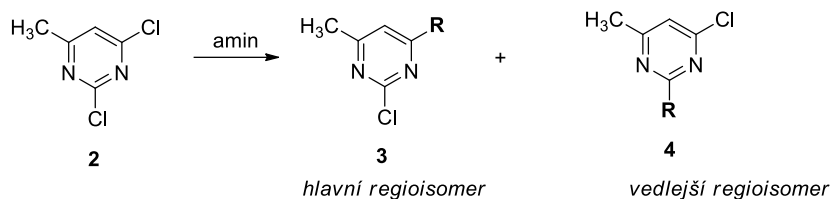
Analýzy LC-MS jsou prováděny pomocí ULC-MS-MS systému (Waters) složeného z ULC-MS chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupolem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona při rychlosti průtoku 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ a teplotě 30 °C. Mobilní fáze představuje 0,1% octan amonný ve vodě (roztok A) a 0,1% octan amonný v acetonitrilu (roztok B). ESI zdroj pracuje při proudu 5 μA s odpařovací teplotou 350 °C a kapilární teplotou 200 °C.

^1H a ^{13}C NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty v rozpouštědle DMSO-*d*₆ pomocí spektrometru JEOL ECA400II pracujícího za magnetické indukce 9,39 T. Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v ppm a interakční konstanty (*J*) v Hz.

Analýzy HRMS jsou prováděny na systému tvořeném kapalinovým chromatografem (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a hmotnostním spektrometrem Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej a spektra byla snímána v kladném módu v rozmezí 100-1000 m/z. Chromatografická separace byla prováděna na koloně Phenomenex Gemini (C18, 50 \times 2 mm, 3 μm částice), eluce byla izokratická, MF obsahuje 0,1% kyseliny mravenčí v roztoku Methanol (95 %) a voda (5 %). Analyty byly rozpuštěny v mobilní fázi o počátečním složení.

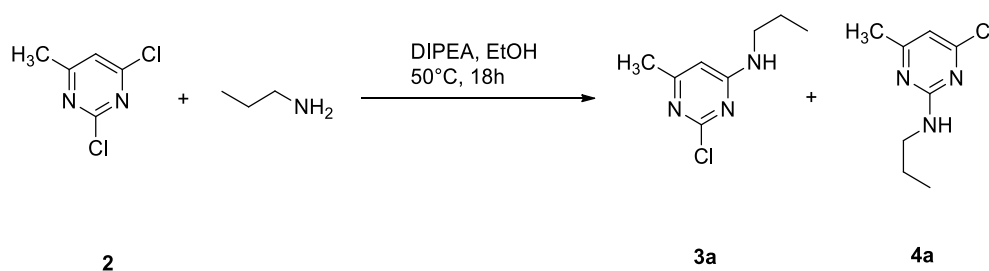
10 Příprava analog GaMF1

10.1 Příprava derivátu pyrimidinu



Zvolený amin reaguje za zvýšené teploty s 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinem **2**. Reakce probíhá za přítomnosti vhodné báze. Volbou aminů vstupujících do této reakce byl určen seznam finálních sloučenin. V reakci vzniká směs isomerů **3** a **4**. Pro další syntézu je požadovaným isomerem isomer **3**.

10.1.1 Příprava 2-chlor-4-(*N*-propylamin)-6-methylpyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol), následně byly přidány 2 ml ethanolu. Ke směsi bylo přidáno 101 μ l propylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428 μ l DIPEA (2 ekvivalenty; 2,46 mmol). Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 50 °C. Pomocí analýz LC-MS a NMR bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3a**, **4a**). Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1). Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 40 %, vedlejší isomer s výtěžkem 12 %.

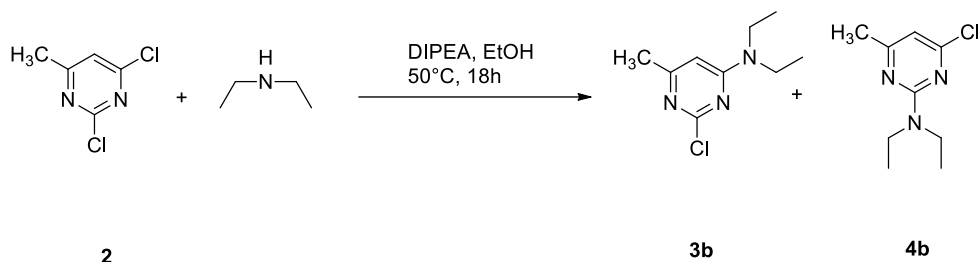
Majoritní isomer **3a**:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.06 (s, 1H), 5.41 (br. s, 1H), 3.23 (br. s, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.69 – 1.52 (m, 2H), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.48, 164.22, 160.21, 99.62, 43.44, 23.85, 22.46, 11.37. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{ClN}_3^+$: 186,0793 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 186,0795.

Minoritní isomer 4a:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.41 (s, 1H), 5.28 (br. s, 1H), 3.37 (td, $J = 7.0, 6.1$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.65 – 1.54 (m, 2H), 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.60, 162.39, 161.26, 109.10, 43.35, 23.99, 22.86, 11.49. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{ClN}_3^+$: 186,0793 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 186,0792.

10.1.2 Příprava 2-chlor-4-(*N,N*-diethylamin)-6-methylpyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichloro-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol) a následně přidáno 2 ml ethanolu. Ke směsi bylo přidáno 127 μl diethylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428 μl DIPEA (2 ekvivalenty; 2,46 mmol). Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 50 °C. Pomocí analýz LC-MS a NMR bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3b**, **4b**). Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem získu požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 51 %, vedlejší isomer s výtěžkem 9 %.

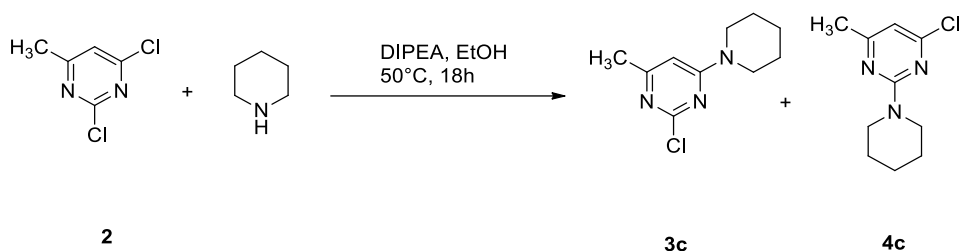
Majoritní isomer 3b:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.10 (s, 1H), 3.48 (br. s, 4H), 2.31 (s, 3H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 166.96, 162.45, 160.45, 99.36, 42.52, 24.10, 12.74. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 200,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 200,0950.

Minoritní isomer 4b:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.32 (s, 1H), 3.60 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.17 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.03, 161.07, 160.88, 107.36, 41.90, 24.21, 13.10. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 200,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 200,0949.

10.1.3 Příprava 2-chlor-4-methyl-6-(piperidin-1-yl)pyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol) a následně bylo přidáno 5 ml ethanolu za vzniku žluté suspenze. Ke směsi bylo přidáno 121 μ l piperidinu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 534 μ l DIPEA (2,5 ekvivalentu; 3,07 mmol). Reakce probíhala při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny. Po odpaření rozpouštědla bylo pomocí analýz LC-MS a NMR zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (3c, 4c). Surový produkt byl purifikován sloupcovou chromatografií (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem zisku požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 51 %, vedlejší isomer s výtěžkem 15 %.

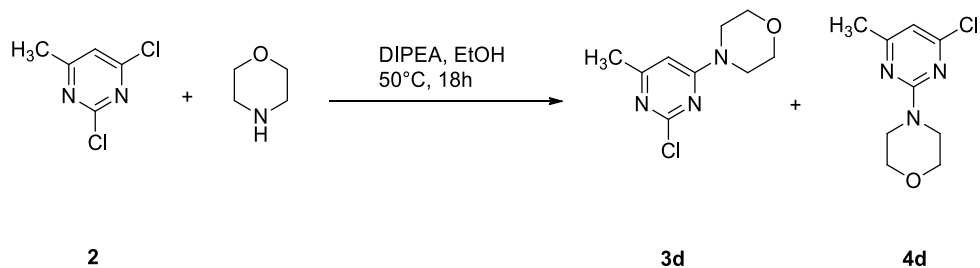
Majoritní isomer 3c:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.21 (s, 1H), 3.65 – 3.51 (m, 4H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.55 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.46, 163.06, 160.50, 99.59, 45.39, 25.60, 24.57, 24.11. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 212,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 212,0948.

Minoritní isomer 4c:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6.69 (s, 1H), 3.66 – 3.48 (m, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.67 - 1.58 (m, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 4H). HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 212,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 212,0948.

10.1.4 Příprava 2-chlor-4-methyl-6-(morfolin-1-yl)pyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 50 mg 2,4-dichloro-6-methylpyrimidinu (0,31 mmol) a 85,69 mg K₂CO₃ (2 ekvivalenty; 0,62 mmol). Ke směsi bylo přidáno 5 ml acetonu a 29,73 µl morfolinu (1,1 ekvivalentu; 0,34 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 1 hodiny. Po odpaření rozpouštědla bylo pomocí analýz LC-MS a NMR zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3d**, **4d**). Reakční směs byla purifikována sloupcovou chromatografií (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem zisku požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 7 %, vedlejší isomer s výtěžkem 2 %.

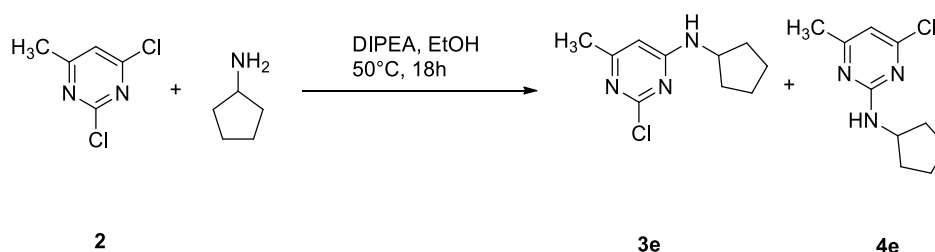
Majoritní isomer **3d**:

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.22 (s, 1H), 3.77 – 3.72 (m, 4H), 3.66 – 3.55 (m, 4H), 2.33 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.20, 163.59, 160.50, 99.76, 66.50, 44.44, 24.17. HRMS: m/z vypočteno pro C₉H₁₃ClN₃O⁺: 214,0742 [M+H]⁺; nalezeno: 214,0741.

Minoritní isomer **4d**:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.42 (s, 1H), 3.85 – 3.78 (m, 4H), 3.77 – 3.71 (m, 4H), 2.30 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.46, 161.54, 161.21, 108.92, 66.93, 44.41, 23.72. HRMS: m/z vypočteno pro C₉H₁₃ClN₃O⁺: 214,0742 [M+H]⁺; nalezeno: 214,0746.

10.1.5 Příprava 2-chlor-4-(*N*-cyklopentylamin)-6-methylpyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol) a následně přidáno 2 ml ethanolu. Ke směsi bylo přidáno 121 µl cyklopentylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428 µl DIPEA (2 ekvivalenty; 2,46 mmol). Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 50 °C. Pomocí analýzy LC-MS bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3e**, **4e**). Reakční směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem zisku požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 43 %, vedlejší isomer s výtěžkem 17 %.

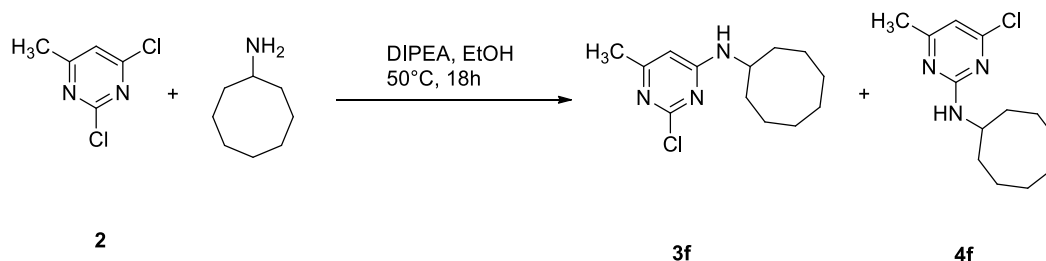
Majoritní isomer 3e:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.06 (s, 1H), 5.15 (br. s, 1H), 3.94 (br. s, 1H), 2.31 (s, 3H), 2.02 (td, $J = 12.2, 6.3$ Hz, 2H), 1.77 – 1.56 (m, 4H), 1.55 – 1.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 167.91, 163.74, 160.28, 100.04, 53.14, 33.25, 25.71, 23.95, 23.75. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 212,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 212,0954.

Minoritní isomer 4e:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.41 (s, 1H), 5.14 (br. s, 1H), 4.36 – 4.21 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.12 – 1.96 (m, 2H), 1.78 – 1.57 (m, 4H), 1.50 – 1.38 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.54, 161.96, 161.20, 108.99, 53.02, 33.31, 23.97, 23.69. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$: 212,0949 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 212,0950.

10.1.6 Příprava 2-chlor-4-(*N*-cyklooktylamín)-6-methylpyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol) a následně přidáno 2 ml ethanolu. Ke směsi bylo přidáno 169 μl cyklooktylamínu (1,23 mmol) a 428 μl DIPEA (2 ekvivalenty; 2,46 mmol). Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 50 °C. Pomocí analýz LC-MS a NMR bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3f**, **4f**). Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem zisku požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 22 %, vedlejší isomer s výtěžkem 5 %.

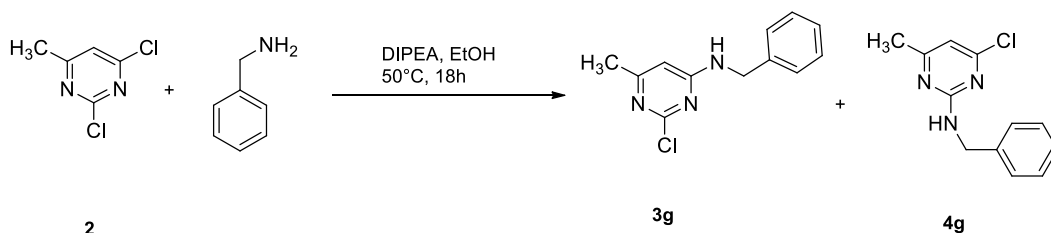
Majoritní isomer 3f:

^1H NMR (400 MHz,) δ 6.00 (s, 1H), 5.13 (br. s, 1H), 3.97-3.49 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 1.87 (ddd, $J = 10.0, 5.5, 3.7$ Hz, 2H), 1.80 – 1.47 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz,) δ 167.68, 163.01, 160.38, 98.04, 51.37, 31.84, 27.23, 25.53, 23.93, 23.53. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_3^+$: 254,1419 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 254,1423.

Minoritní isomer 4f:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.38 (s, 1H), 5.24 (br. s, 1H), 4.06 (dq, $J = 12.4$, 4.2 Hz, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.94 – 1.80 (m, 2H), 1.73 – 1.49 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz,) δ 171.91, 169.53, 161.39, 108.80, 50.83, 31.79, 27.59, 25.58, 23.94, 23.60. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_3^+$: 254,1419 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 254,1412.

10.1.7 Příprava 2-chlor-4-(*N*-benzylamin)-6-methylpyrimidinu



Do zábrusové baňky bylo odváženo 200 mg 2,4-dichlor-6-methylpyrimidinu (1,23 mmol) a následně přidáno 2 ml ethanolu. Ke směsi bylo přidáno 134 μl benzylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428 μl DIPEA (2 ekvivalenty; 2,46 mmol). Reakce probíhala 18 hodin při teplotě 50 °C. Pomocí analýz LC-MS a NMR bylo zjištěno, že reakční směs obsahuje 2 isomery produktu (**3g**, **4g**). Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1) za účelem zisku požadovaného isomeru. Požadovaný isomer byl získán s výtěžkem 39 %, vedlejší isomer s výtěžkem 14 %.

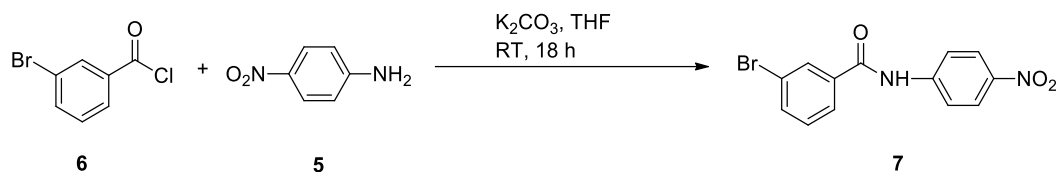
Majoritní isomer 3g:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39 – 7.26 (m, 5H), 6.07 (s, 1H), 4.53 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 2.29 (s, 3H). HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_3^+$: 234,0793 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 234,0793.

Minoritní isomer 4g:

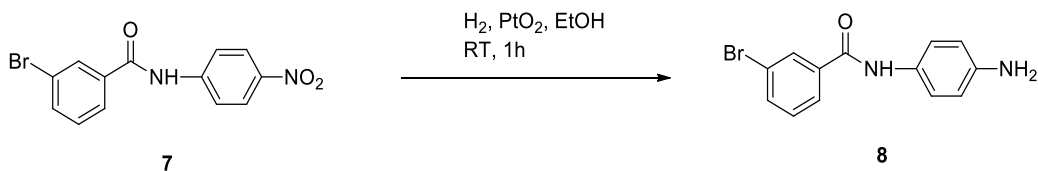
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 – 7.24 (m, 5H), 6.47 (s, 1H), 5.62 (br. s, 1H), 4.64 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.30 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz,) δ 169.80, 162.18, 161.34, 138.84, 128.73, 127.70, 127.47, 109.74, 45.61, 23.98. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_3^+$: 234,0793 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 234,0792.

10.2 Příprava 3-brom-*N*-(4-nitrofenyl)benzamidů



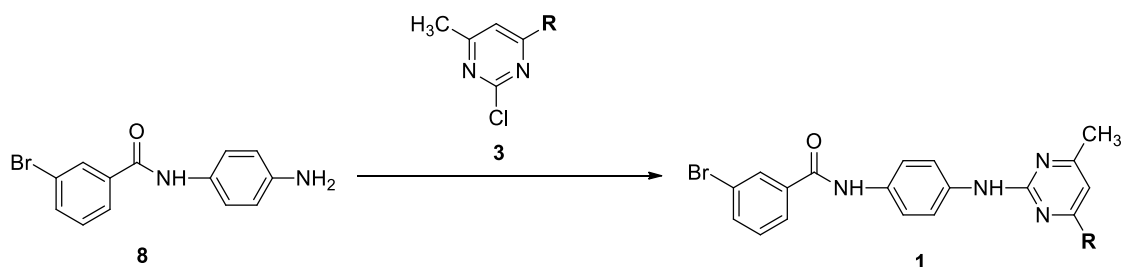
Do reakční baňky bylo odváženo 1000 mg *p*-nitroanilinu (7,24 mmol) a 2000 mg K_2CO_3 (2 ekvivalenty; 14,48 mmol). (pozn. molární hmotnost K_2CO_3 je téměř totožná s molární hmotností *p*-nitroanilinu) Ke směsi bylo přidáno 20 ml THF a 956 μ l 3-brombenzoylchloridu (1 ekvivalent; 7,24 mmol). Reakce probíhala 18 hodin za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla reakční směs nalita na led a následně extrahována do organické fáze, konkrétně do 3x 50 ml EtAc. Spojené organické extrakty byly vysušeny $MgSO_4$ a rozpouštědlo odpařeno pomocí RVO. Na základě analýzy LC-MS byla provedena purifikace sloupcovou chromatografií (mobilní fáze EtAc/hex 1:1). Požadovaný produkt byl získán s výtěžkem 75 %.

10.3 Příprava *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů



Do baňky s kulatým dnem bylo odváženo 940 mg 3-brom-*N*-(4-nitrofenyl)benzamidů (2,93 mmol) a přidáno 15 ml EtOH. Ke směsi bylo přidáno 33 mg Adamsonova katalyzátoru (PtO_2 ; 0,05 ekvivalentu; 0,147 mmol). Do baňky byla zavedena inertní atmosféra dusíku, která byla následně nahrazena reakční atmosférou vodíku. Reakce probíhala 1 hodinu za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byl z reakční směsi odfiltrován Adamsonův katalyzátor a předepsaným způsobem zlikvidován. Z reakční směsi bylo odpařeno rozpouštědlo pomocí RVO a na základě analýzy LC-MS byla provedena purifikace surového produktu sloupcovou chromatografií (mobilní fáze DCM/methanol 18:1). Požadovaný produkt byl získán s výtěžkem 86 %.

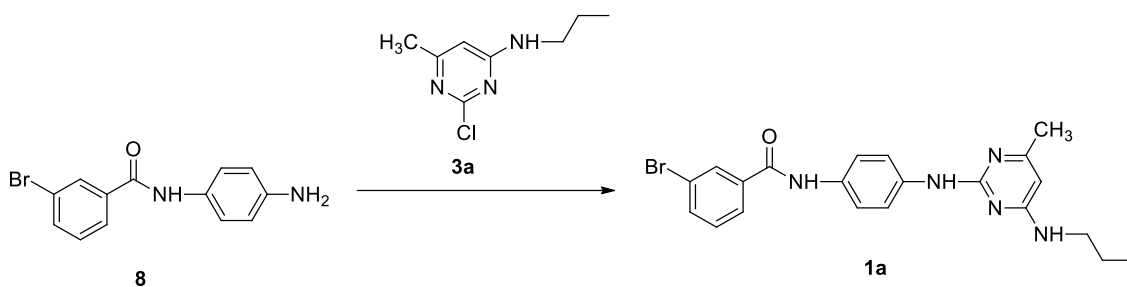
10.4 Příprava finálních sloučenin



R = aminový substituent

Jedná se o závěrečnou reakci, kdy aminosloučenina **8** reaguje s derivátem pyrimidinu, konkrétně s isomerem **3**, za vzniku finální sloučeniny **1**. Přesná struktura finální sloučeniny je určena substituentem **R**, který je navázaný na pyrimidinovém jádře. Volbou 7 různých substituentů **R**, tak získáváme 7 různých finálních sloučenin **1a-g**.

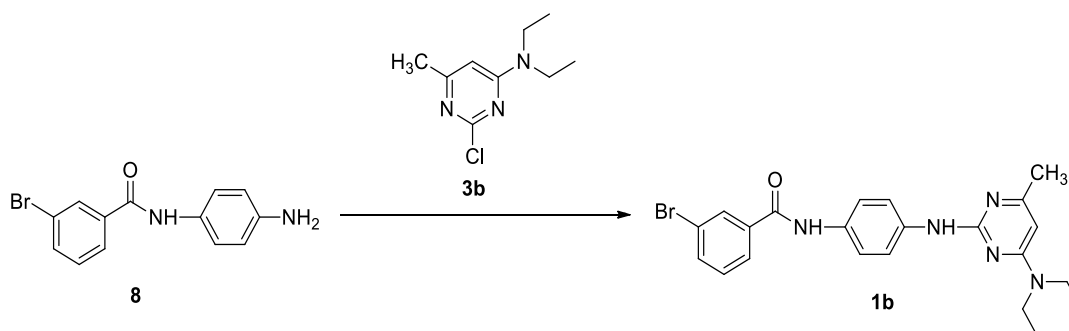
10.4.1 Příprava finální sloučeniny **1a**



Do reakční vialky bylo odváženo 128 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů **8** (0,44 mmol) a 82 mg isomeru **3a** (1 ekvivalent; 0,44 mmol). Ke směsi byly přidány 2 ml suchého DMF a 76 μ l DIPEA (1 ekvivalent; 0,44 mmol). Reakční směs byla umístěna na magnetickou míchačku k reakci při 140 °C. Po 3 dnech reakce bylo na základě analýzy TLC rozhodnuto o přidání 1 ekvivalentu DIPEA do reakční směsi. Po 4 dnech reakce byla provedena analýza LC-MS, která prokázala přítomnost produktu **1a** v reakční směsi. Reakční směs byla nalita do vody a následně extrahována 3 \times do 25 ml EtAc. Spojené organické extrakty byly vysušeny pomocí MgSO₄, který byl následně odfiltrován. Organický podíl byl odpařen pomocí RVO. Následně byla provedena purifikace pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1). Požadovaný produkt **1a** byl získán s výtěžkem 19 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.05 (br. s, 1H), 7.99 (br. s, 1H), 7.76 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.65 – 7.56 (m, 3H), 7.55 – 7.46 (m, 3H), 7.30 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.01 (br. s, 1H), 3.36 – 3.13 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.73 – 1.55 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.31, 164.22, 163.69, 158.99, 137.33, 137.23, 134.70, 134.65, 131.80, 130.42, 130.34, 125.77, 122.97, 121.34, 119.68, 94.19, 43.44, 23.47, 22.83, 11.62. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrN}_5\text{O}^+$: 440,1080 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 440,1081.

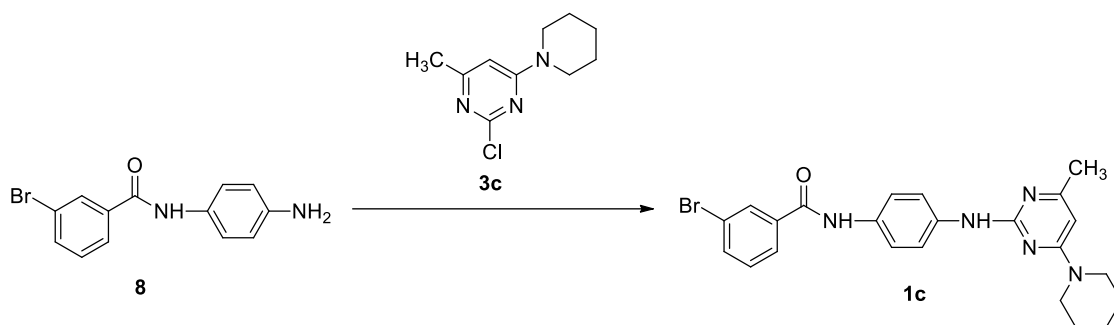
10.4.2 Příprava finální sloučeniny 1b



Do reakční vialky bylo odváženo 131 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidu (0,45 mmol) a 89 mg 2-chlor-4-(*N,N*-diethylamin)-6-methylpyrimidinu (1 ekvivalent; 0,45 mmol). Ke směsi bylo přidáno 2 ml suchého DMF a 78 μl DIPEA (1 ekvivalent; 0,45 mmol). Reakční směs byla umístěna na magnetickou míchačku k reakci při 140 °C. Po 3 dnech reakce bylo do reakční směsi přidán 1 ekvivalent DIPEA. Po 4 dnech reakce byla provedena analýza LC-MS, která prokázala přítomnost produktu 6c v reakční směsi. Reakční směs byla nalita do vody a následně extrahována 3 \times do 25 ml EtAc. Spojené organické extrakty byly vysušeny pomocí MgSO_4 , který byl následně odfiltrován. Organický podíl byl odpařen pomocí RVO. Následně byla provedena purifikace pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze EtAc/hexan 1:1). Požadovaný produkt 1b byl získán s výtěžkem 43 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (br. s, 1H), 8.02 – 7.97 (m, 1H), 7.77 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.64 – 7.49 (m, 6H), 7.30 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 3.56 – 3.39 (m, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 165.32, 164.29, 163.71, 161.89, 158.38, 137.39, 137.24, 134.63, 131.76, 130.43, 130.33, 125.77, 122.95, 121.22, 119.43, 93.31, 42.70, 23.51, 13.04. HRMS: m/z vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_5\text{O}^+$: 454,1237 $[\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno: 454,1236.

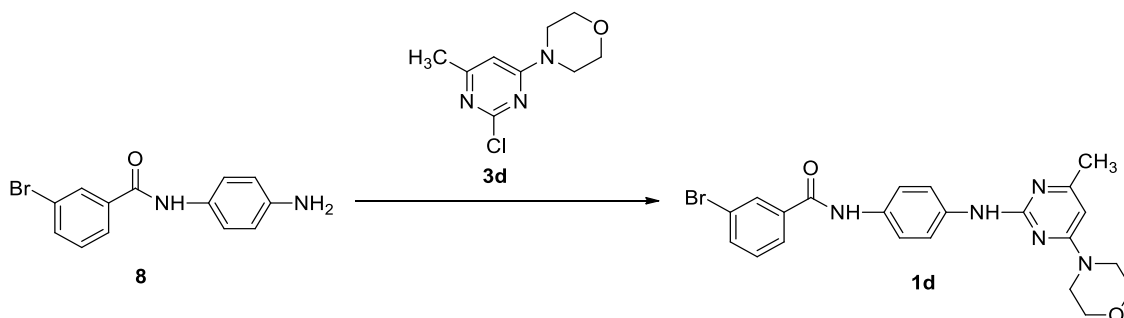
10.4.3 Příprava finální sloučeniny 1c



Do zábrusové baňky bylo odváženo 181 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů (0,62 mmol) a 131 mg 2-chlor-4-methyl-6-(piperidin-1-yl)pyrimidinu (1 ekvivalent; 0,62 mmol). Ke směsi byly přidány 2 ml suchého DMF a 108 μ l DIPEA (1 ekvivalent; 0,62 mmol). Reakce probíhala 48 hodin při teplotě 110 °C. Po ukončení reakce byla reakční směs nalita na led a následně extrahována do organické fáze. Extrakce probíhala 3 \times do 50 ml ethylacetátu. Spojené organické extrakty byly vysušeny MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno pomocí RVO. Na základě analýzy LC-MS byla provedena purifikace sloupcovou chromatografií (mobilní fáze DCM/methanol 18:1). Požadovaný produkt 1c byl získán s výtěžkem 19 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (br.s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.61-7.49 (m, 4H), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.07 (br.s, 1H), 5.91 (s, 1H), 3.67 – 3.53 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 1.74-1.56 (m, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.61, 164.18, 164.15, 162.99, 159.25, 137.67, 137.30, 134.68, 131.51, 130.37, 125.71, 123.03, 121.21, 119.44, 93.78, 45.53, 25.69, 24.86, 24.15. HRMS: m/z vypočteno pro C₂₃H₂₅BrN₅O⁺: 466,1237 [M+H]⁺; nalezeno: 468,1216.

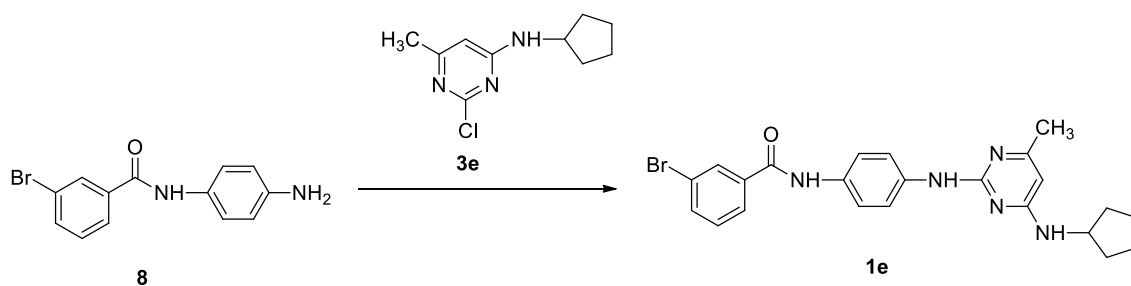
10.4.4 Příprava finální sloučeniny 1d



Do reakční vialky bylo odváženo 100 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů **8** (0,34 mmol) a 73 mg isomeru **3d** (1 ekvivalent; 0,34 mmol). Ke směsi byly přidány 2 ml suchého DMF a 59 μ l DIPEA (1 ekvivalent; 0,34 mmol). Reakční směs byla umístěna na magnetickou míchačku k reakci při 140 °C. Po 2 dnech reakce byla provedena analýza LC-MS, která prokázala přítomnost produktu **6b**. Reakční směs byla nalita na led a extrahována do organické fáze (3 \times do 50 ml EtAc). Spojené organické extrakty byly vysušeny MgSO₄, síran byl odfiltrován a po odpaření na RVO byla provedena purifikace sloupcovou chromatografií (mobilní fáze petrolether/ethanol). Požadovaný produkt **1d** byl získán s výtěžkem 9 %.

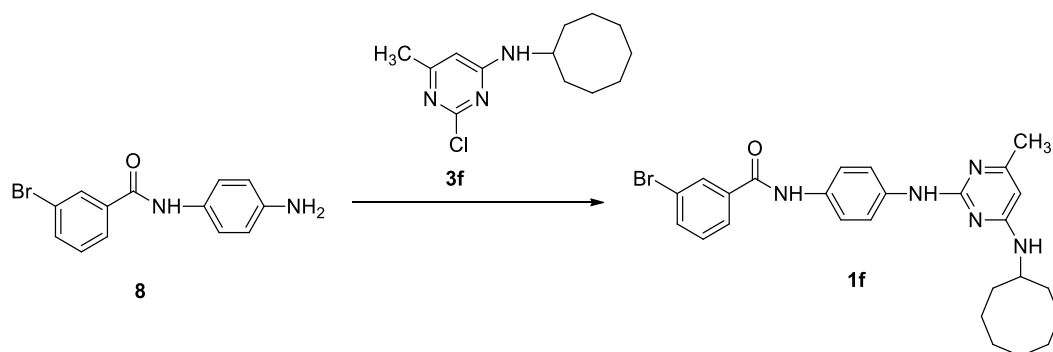
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.82 (br.s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (ddd, *J* = 8.0, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.61 – 7.51 (m, 4H), 7.34 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.12 (br.s, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.86 – 3.75 (m, 4H), 3.67 – 3.55 (m, 4H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.49, 164.19, 163.57, 159.31, 137.38, 137.26, 134.75, 131.78, 130.43, 130.34, 125.73, 123.05, 121.20, 119.69, 93.78, 66.72, 44.59, 24.24. HRMS: *m/z* vypočteno pro C₂₂H₂₃BrN₅O₂⁺: 468,1030 [M+H]⁺; nalezeno: 468,1033.

10.4.5 Příprava finální sloučeniny **1e**



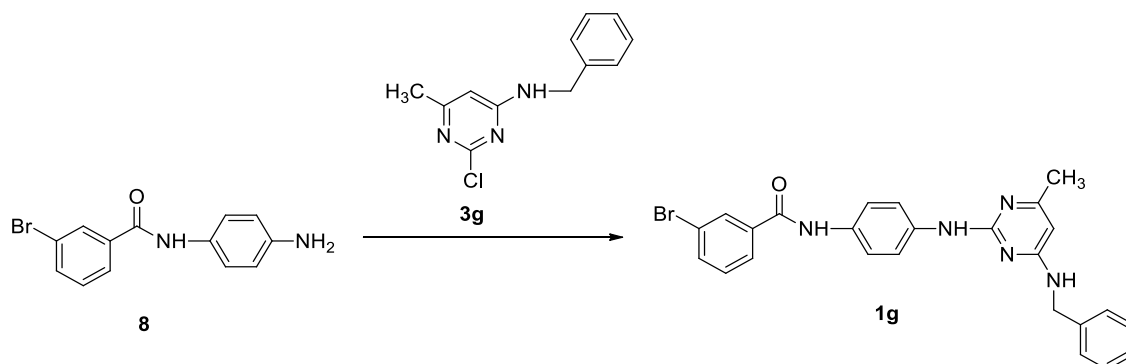
Do reakční vialky bylo odváženo 61 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů **8** (0,21 mmol) a 45 mg isomeru **3e** (1 ekvivalent; 0,21 mmol). Ke směsi bylo přidáno 2 ml suchého DMF a 37 μ l DIPEA (1 ekvivalent; 0,21 mmol). Reakční směs byla umístěna na magnetickou míchačku k reakci při 140 °C za průběžného monitorování analýzou TLC. Po 3 dnech reakce bylo na základě analýzy TLC a LC-MS rozhodnuto o přidání ekvivalentu DIPEA. **Po dalších 2 dnech se obsah produktu v reakční směsi nezměnil, a proto byla reakce ukončena.**

10.4.6 Příprava finální sloučeniny 1f



K odváženému množství *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidu **8** byl přidán 1 ekvivalent isomeru **3f**, 1 ekvivalent DIPEA a stanovené množství suchého DMF. Reakce probíhala při teplotě 140 °C za průběžného monitorování analýzou TLC. Po 3 dnech reakce bylo na základě analýzy TLC a LC-MS rozhodnuto o přidání 1 ekvivalentu DIPEA. **Po dalších 2 dnech se obsah produktu v reakční směsi nezměnil, a proto byla reakce ukončena.**

10.4.7 Příprava finální sloučeniny 1g



K odváženému množství *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidu **8** byl přidán 1 ekvivalent isomeru **3g**, 1 ekvivalent DIPEA a stanovené množství suchého DMF. Reakce probíhala při teplotě 140 °C za průběžného monitorování analýzou TLC. Na základě analýzy TLC, podle které reakční směs obsahovala minimální množství produktu, byl po 3 dnech reakce do reakční směsi přidán 1 ekvivalent DIPEA. **Po dalších 2 dnech se obsah produktu v reakční směsi nezměnil, a proto byla reakce ukončena.**

Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá návrhem a syntézou sloučenin odvozených od GaMF1, u kterých se předpokládá antimykobakteriální aktivita. Z tohoto důvodu lze tyto sloučeniny považovat za potenciální antituberkulotika.

V teoretické části je představena problematika onemocnění tuberkulóza, její historie, současná situace ve světě a v České republice, vakcinace, léčebné režimy a mykobakterie jako původci tohoto onemocnění. Teoretická část se také zabývá mykobakteriálním enzymem *F₁F₀ ATP synthasou* jako jedním z protituberkulotických cílů a dále sloučeninami, u kterých byla zaznamenána schopnost inhibice tohoto životně důležitého enzymu.

V diskuzi jsou navrženy deriváty GaMF1 a představeny jednotlivé syntetické kroky vedoucí k zisku těchto sloučenin. Jak již bylo řečeno, syntéza se skládá ze dvou neoddělitelných syntetických postupů, které jsou spojeny v závěrečné reakci, při které vzniká požadované analogum GaMF1. Jedním z postupů je syntéza aminosloučeniny **8**, která byla připravena reakcí *p*-nitroanilinu s brombenzoylchloridem a následnou redukcí. Této redukci byla věnována velká pozornost, neboť existuje mnoho možností jejího provedení. Ne všechny jsou však z hlediska časové náročnosti a výtěžku reakce výhodné. Druhým syntetickým postupem je substituce pyrimidinového jádra aminem, při které vzniká směs isomerů **3** a **4**. Z důvodu vzniku isomerů produktu zde hraje důležitou roli purifikace sloupcovou chromatografií, která v ideálním případě vede k dokonalému rozdělení isomerů **3** a **4**. Uvedené syntetické postupy se na závěr spojují, když aminosloučenina **8** reaguje s isomerem **3** za vzniku finální sloučeniny **1**. V diskuzi jsou navíc uvedeny i syntetické postupy, které byly z důvodu minimální konverze reakcí prohlášeny za nevyhovující. Optimalizace reakčních podmínek těchto reakcí může sloužit jako případné téma pro další výzkum a práci.

Experimentální část popisuje nejvhodnější pracovní postupy při syntéze výše diskutovaných produktů a meziproductů včetně výpisů z NMR a HRMS analýz. NMR spektra vybraných sloučenin jsou obsažena v příloze.

Seznam použitých zkratek

TB	tuberkulóza
MTBC	bakteriální komplex <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace (z anglického <i>World Health Organisation</i>)
MAC	bakteriální komplex <i>Mycobacterium avium</i>
BCG	Bacil Calmette-Guérinův
MDR	označení bakteriálního kmene (z anglického <i>multidrug-resistant</i>)
XDR	označení bakteriálního kmene (z anglického <i>extensively-drug-resistant</i>)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TLC	tenkovrstevná chromatografie (z anglického <i>thin-layer chromatography</i>)
LC	kapalinová chromatografie (z anglického <i>liquid chromatography</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>mass spectrometry</i>)
LC-MS	označení analytické techniky představující spojení technik LC a MS
NMR	nukleární magnetická rezonance
DIPEA	diisopropylethylamin
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DMA	dimethylacetamid
EtAc	ethylacetát
THF	tetrahydrofuran

Reference

- (1) Global Tuberculosis Report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- (2) Hotra, A.; Ragunathan, P.; Ng, P. S.; Seankongsuk, P.; Harikishore, A.; Sarathy, J. P.; Saw, W. G.; Lakshmanan, U.; Sae-Lao, P.; Kalia, N. P.; Shin, J.; Kalyanasundaram, R.; Anbarasu, S.; Parthasarathy, K.; Pradeep, C. N.; Makhija, H.; Dröge, P.; Poulsen, A.; Tan, J. H. L.; Pethe, K.; Dick, T.; Bates, R. W.; Grüber, G. Discovery of a Novel Mycobacterial F-ATP Synthase Inhibitor and Its Potency in Combination with Diarylquinolines. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, *59* (32). <https://doi.org/10.1002/anie.202002546>.
- (3) Nesci, S.; Trombetti, F.; Algieri, C.; Pagliarani, A. A Therapeutic Role for the F1FO-ATP Synthase. *SLAS Discov.* **2019**, *24* (9), 893–903. <https://doi.org/10.1177/2472555219860448>.
- (4) Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H. W. H.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; De Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium Tuberculosis. *Science (80-.)*. **2005**, *307* (5707). <https://doi.org/10.1126/science.1106753>.
- (5) Tong, A. S. T.; Choi, P. J.; Blaser, A.; Sutherland, H. S.; Tsang, S. K. Y.; Guillemont, J.; Motte, M.; Cooper, C. B.; Andries, K.; Van Den Broeck, W.; Franzblau, S. G.; Upton, A. M.; Denny, W. A.; Palmer, B. D.; Conole, D. 6-Cyano Analogues of Bedaquiline as Less Lipophilic and Potentially Safer Diarylquinolines for Tuberculosis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8* (10), 1019–1024. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00196>.
- (6) 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.; Gupta, 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. Discovery of Imidazo[1,2-A]pyridine Ethers and Squaramides as Selective and Potent Inhibitors of Mycobacterial Adenosine Triphosphate (ATP) Synthesis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (4). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01358>.
- (7) Bajan, A. *Tuberkulóza*, 1st ed.; Vydavateľstvo Osveta š. p.: Martin, 1990.
- (8) World Health Organization https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1.
- (9) https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_2.
- (10) Solovič, I.; Vašáková, M. *Tuberkulóza ve Faktech I Obrazech*; Maxdorf: Praha, 2019.
- (11) Wirth, T.; Hildebrand, F.; Allix-Béguet, C.; Wölbeling, F.; Kubica, T.; Kremer, K.; Van Soolingen, D.; Rüsche-Gerdes, S.; Locht, C.; Brisse, S.; Meyer, A.; Supply, P.; Niemann, S. Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium Tuberculosis Complex. *PLoS Pathog.* **2008**, *4* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>.
- (12) Kanipe, C.; Palmer, M. V. Mycobacterium Bovis and You: A Comprehensive Look at the Bacteria, Its Similarities to Mycobacterium Tuberculosis, and Its Relationship with Human Disease. *Tuberculosis* **2020**, *125* (September), 102006. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102006>.
- (13) <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/unga-high-level-meeting-on-the-fight-against-tb/unga-high-level-meeting-on-ending-tb/about-the-un-high-level-meeting>.

- (14) Sakamoto, K. The Pathology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Vet. Pathol.* **2012**, *49* (3), 423–439. <https://doi.org/10.1177/0300985811429313>.
- (15) Hruška, K. *Mykobakterie: Jak Škodí a Jak Se Proti Nim Chránit*, 1st ed.; Karel Hruška: Brno, 2016.
- (16) Van Ingen, J.; Turenne, C. Y.; Tortoli, E.; Wallace, R. J.; Brown-Elliott, B. A. A Definition of the Mycobacterium Avium Complex for Taxonomical and Clinical Purposes, a Review. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2018**, *68* (11), 3666–3677. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003026>.
- (17) <https://sites.gsu.edu/spatel228/2019/04/09/blog-Post-2/>.
- (18) Barbier M, Wirth T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Microbiol Spectr* 2016;4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0008-2016>.
- (19) Brites, D.; Loiseau, C.; Menardo, F.; Borrell, S.; Boniotti, M. B.; Warren, R.; Dippenaar, A.; Parsons, S. D. C.; Beisel, C.; Behr, M. A.; Fyfe, J. A.; Coscolla, M.; Gagneux, S. A New Phylogenetic Framework for the Animal-Adapted Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Front. Microbiol.* **2018**, *9* (NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820>.
- (20) Orgeur, M.; Brosch, R. Evolution of Virulence in the Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Current Opinion in Microbiology.* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.021>.
- (21) Hansen, G. A. Undersogelser Angående Spedalskhedens Årsager, Norwegian Magazines. 1874.
- (22) Acebrón-García-de-Eulate, M.; Blundell, T. L.; Vedithi, S. C. Strategies for Drug Target Identification in Mycobacterium Leprae. *Drug Discov. Today* **2021**, *26* (7), 1569–1573. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.03.026>.
- (23) Bloom, B. R.; Godal, T. Selective Primary Health Care: Strategies for Control of Disease in the Developing World. V. Leprosy. *Rev. Infect. Dis.* **1983**, *5* (4). <https://doi.org/10.1093/clinids/5.4.765>.

- (24) Cogen, A. L.; Walker, S. L.; Roberts, C. H.; Hagge, D. A.; Neupane, K. D.; Khadge, S.; Lockwood, D. N. J. Human Beta-Defensin 3 Is Up-Regulated in Cutaneous Leprosy Type 1 Reactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001869>.
- (25) Scollard, D. M.; Adams, L. B.; Gillis, T. P.; Krahenbuhl, J. L.; Truman, R. W.; Williams, D. L. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>.
- (26) Fava, V. M.; Dallmann-Sauer, M.; Schurr, E. Genetics of Leprosy: Today and beyond. *Human Genetics.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02087-5>.
- (27) Alemu Belachew, W.; Naafs, B. Position Statement: LEPROSY: Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2019**, *33* (7). <https://doi.org/10.1111/jdv.15569>.
- (28) Maeda, S.; Matsuoka, M.; Nakata, N.; Kai, M.; Maeda, Y.; Hashimoto, K.; Kimura, H.; Kobayashi, K.; Kashiwabara, Y. Multidrug Resistant Mycobacterium Leprae from Patients with Leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (12). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3635-3639.2001>.
- (29) Neglected Tropical Diseases World Health Organization. Global Leprosy (Hansen Disease) Update, 2021: Moving towards Interruption of Transmission. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2022**, *2021*, 429–450.
- (30) *Leprosy/Hansen Disease: Contact Tracing and Post-Exposure Prophylaxis. Technical Guidance. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*
- (31) de Jong, B. C.; Antonio, M.; Gagneux, S. Mycobacterium Africanum-Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4* (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744>.
- (32) De Jong, B. C.; Antonio, M.; Awine, T.; Ogungbemi, K.; De Jong, Y. P.; Gagneux, S.; Deriemer, K.; Zozio, T.; Rastogi, N.; Borgdorff, M.; Hill, P. C.; Adegbola, R. A. Use of Spoligotyping and Large Sequence Polymorphisms to Study the Population Structure of the Mycobacterium Tuberculosis Complex in a

- Cohort Study of Consecutive Smear-Positive Tuberculosis Cases in the Gambia. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47* (4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01216-08>.
- (33) Hoffner, S. E.; Svenson, S. B.; Norberg, R.; Dias, F.; Ghebremichael, S.; Kallenius, G. Biochemical Heterogeneity of Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolates in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* **1993**, *31* (8), 2215–2217. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.8.2215-2217.1993>.
- (34) David, H. L.; Jahan, M. T.; Jumin, A. Numerical Taxonomy Analysis of Mycobacterium Africanum. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1978**, *28* (4), 464–472. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-464>.
- (35) Källenius, G.; Koivula, T.; Ghebremichael, S.; Hoffner, S. E.; Norberg, R.; Svensson, E.; Dias, F.; Marklund, B. I.; Svenson, S. B. Evolution and Clonal Traits of Mycobacterium Tuberculosis Complex in Guinea-Bissau. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37* (12), 3872–3878. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.3872-3878.1999>.
- (36) Grange, J. M.; Yates, M. D. Subdivision of Mycobacterium Tuberculosis into Five Variants for Epidemiological Purposes: Methods and Nomenclature. *J. Hyg. (Lond)*. **1982**, *89* (2), 235–242. <https://doi.org/10.1017/S0022172400070765>.
- (37) Prat, R.; Rist, N.; Dumitrescu, N.; Mugabushaka, A.; Clavel, S.; Duponchel, C. Special Characteristics of the Cultures of Tubercle Bacilli Isolated in Ruanda. *Bull. Int. Union Tuberc.* 49:53-62. **1974**.
- (38) WHO. *Global Tuberculosis Report 2018*; 2018; Vol. 63.
- (39) Olea-Popelka, F.; Muwonge, A.; Perera, A.; Dean, A. S.; Mumford, E.; Erlacher-Vindel, E.; Forcella, S.; Silk, B. J.; Ditiu, L.; El Idrissi, A.; Raviglione, M.; Cosivi, O.; LoBue, P.; Fujiwara, P. I. Zoonotic Tuberculosis in Human Beings Caused by Mycobacterium Bovis—a Call for Action. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6).
- (40) Michel, A. L.; Geoghegan, C.; Hlokwé, T.; Raseleka, K.; Getz, W. M.; Marcotty, T. Longevity of Mycobacterium Bovis in Raw and Traditional Souring Milk as a Function of Storage Temperature and Dose. *PLoS One* **2015**, *10* (6), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129926>.

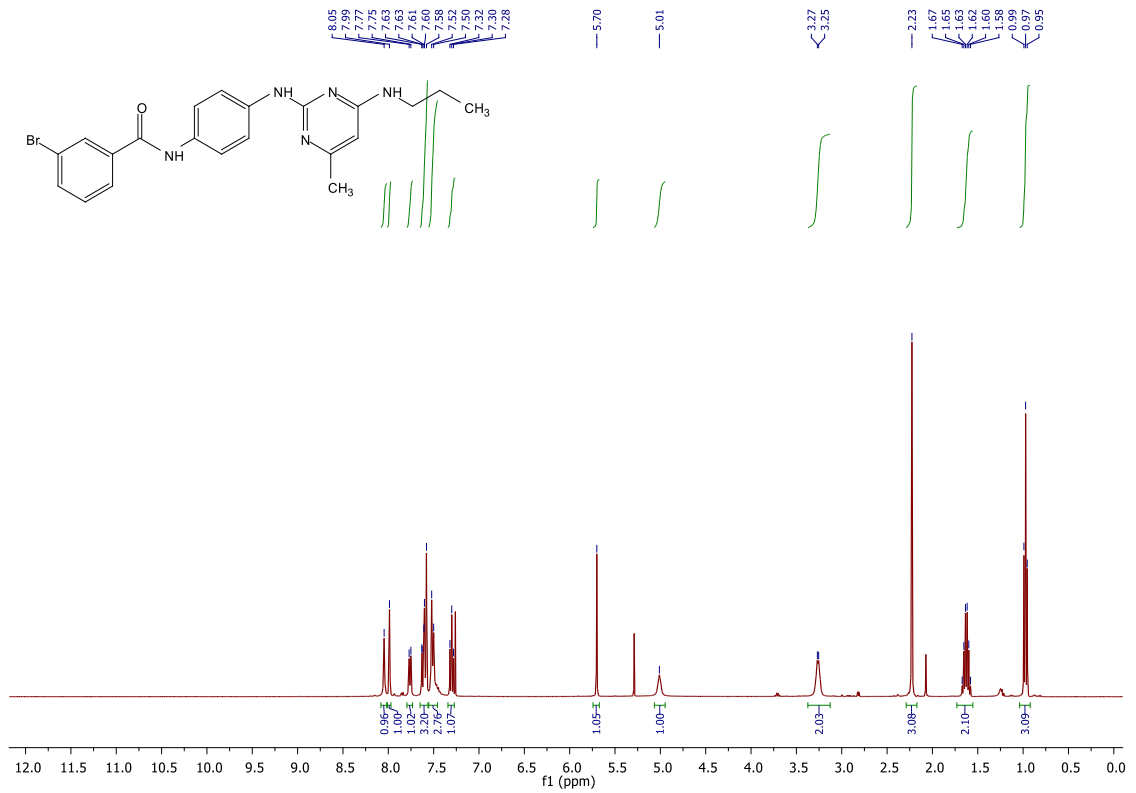
- (41) Pym, A. S.; Brodin, P.; Brosch, R.; Huerre, M.; Cole, S. T. Loss of RD1 Contributed to the Attenuation of the Live Tuberculosis Vaccines *Mycobacterium Bovis* BCG and *Mycobacterium Microti*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46* (3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x>.
- (42) Peterhans, S.; Landolt, P.; Friedel, U.; Oberhänsli, F.; Dennler, M.; Willi, B.; Senn, M.; Hinden, S.; Kull, K.; Kipar, A.; Stephan, R.; Ghielmetti, G. *Mycobacterium Microti*: Not Just a Coincidental Pathogen for Cats. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7* (December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.590037>.
- (43) Burthe, S.; Bennett, M.; Kipar, A.; Lambin, X.; Smith, A.; Telfer, S.; Begon, M. Tuberculosis (*Mycobacterium Microti*) in Wild Field Vole Populations. *Parasitology* **2008**, *135* (3). <https://doi.org/10.1017/S0031182007003940>.
- (44) Cousins, D. V.; Bastida, R.; Cataldi, A.; Quse, V.; Redrobe, S.; Dow, S.; Duignan, P.; Murray, A.; Dupont, C.; Ahmed, N.; Collins, D. M.; Butler, W. R.; Dawson, D.; Rodríguez, D.; Loureiro, J.; Romano, M. I.; Alito, A.; Zumarraga, M.; Bernardelli, A. Tuberculosis in Seals Caused by a Novel Member of the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex: *Mycobacterium Pinnipedii* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53* (5). <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02401-0>.
- (45) Roe, W. D.; Lenting, B.; Kokosinska, A.; Hunter, S.; Duignan, P. J.; Gartrell, B.; Rogers, L.; Collins, D. M.; De Lisle, G. W.; Gedye, K.; Price-Carter, M. Pathology and Molecular Epidemiology of *Mycobacterium Pinnipedii* Tuberculosis in Native New Zealand Marine Mammals. *PLoS One* **2019**, *14* (2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212363>.
- (46) Blair WR. Report of the Veterinarian. 17th Annual Report of the New York Zoological Society; 1913. **1913**.
- (47) Thompson, P. J.; Cousins, D. V.; Gow, B. L.; Collins, D. M.; Williamson, B. H.; Dagnia, H. T. Seals, Seal Trainers, and Mycobacterial Infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1993**, *147* (1). <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.1.164>.
- (48) Jurczynski, K.; Lyashchenko, K. P.; Gomis, D.; Moser, I.; Greenwald, R.;

- Moisson, P. Pinniped Tuberculosis in Malayan Tapirs (*Tapirus Indicus*) and Its Transmission to Other Terrestrial Mammals. *J. Zoo Wildl. Med.* **2011**, *42* (2). <https://doi.org/10.1638/2009-0207.1>.
- (49) Aranaz, A.; Liebana, E.; Gomez-Mampaso, E.; Galán, J. C.; Cousins, D.; Ortega, A.; Blázquez, J.; Baquero, F.; Mateos, A.; Suárez, G.; Domínguez, L. *Mycobacterium Tuberculosis Subsp. Caprae Subsp. Nov.: A Taxonomic Study of a New Member of the Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolated from Goats in Spain.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999**, *49* (3). <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1263>.
- (50) Niemann, S.; Richter, E.; Rüscher-Gerdes, S. Biochemical and Genetic Evidence for the Transfer of *Mycobacterium Tuberculosis Subsp. Caprae* Aranaz et Al. 1999 to the Species *Mycobacterium Bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved List 1980) as *Mycobacterium Bovis Subsp. Caprae* Comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52* (2). <https://doi.org/10.1099/00207713-52-2-433>.
- (51) Aranaz, A.; Cousins, D.; Mateos, A.; Domínguez, L. Elevation of *Mycobacterium Tuberculosis Subsp. Caprae* Aranaz et Al. 1999 to Species Rank as *Mycobacterium Caprae* Comb. Nov., Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53* (6), 1785–1789. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02532-0>.
- (52) Khader, S. A.; Divangahi, M.; Hanekom, W.; Hill, P. C.; Maeurer, M.; Makar, K. W.; Mayer-Barber, K. D.; Mhlanga, M. M.; Nemes, E.; Schlesinger, L. S.; Van Crevel, R.; Vankalayapati, R.; Xavier, R. J.; Netea, M. G. Targeting Innate Immunity for Tuberculosis Vaccination. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129* (9), 3482–3491. <https://doi.org/10.1172/JCI128877>.
- (53) Tait, D. R.; Hatherill, M.; Van Der Meeren, O.; Ginsberg, A. M.; Van Brakel, E.; Salaun, B.; Scriba, T. J.; Akite, E. J.; Ayles, H. M.; Bollaerts, A.; Demoitié, M.-A.; Diacon, A.; Evans, T. G.; Gillard, P.; Hellström, E.; Innes, J. C.; Lempicki, M.; Malahleha, M.; Martinson, N.; Mesia Vela, D.; Muyoyeta, M.; Nduba, V.; Pascal, T. G.; Tameris, M.; Thienemann, F.; Wilkinson, R. J.; Roman, F. Final Analysis of a Trial of M72/AS01 E Vaccine to Prevent Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381* (25), 2429–2439. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1909953>.

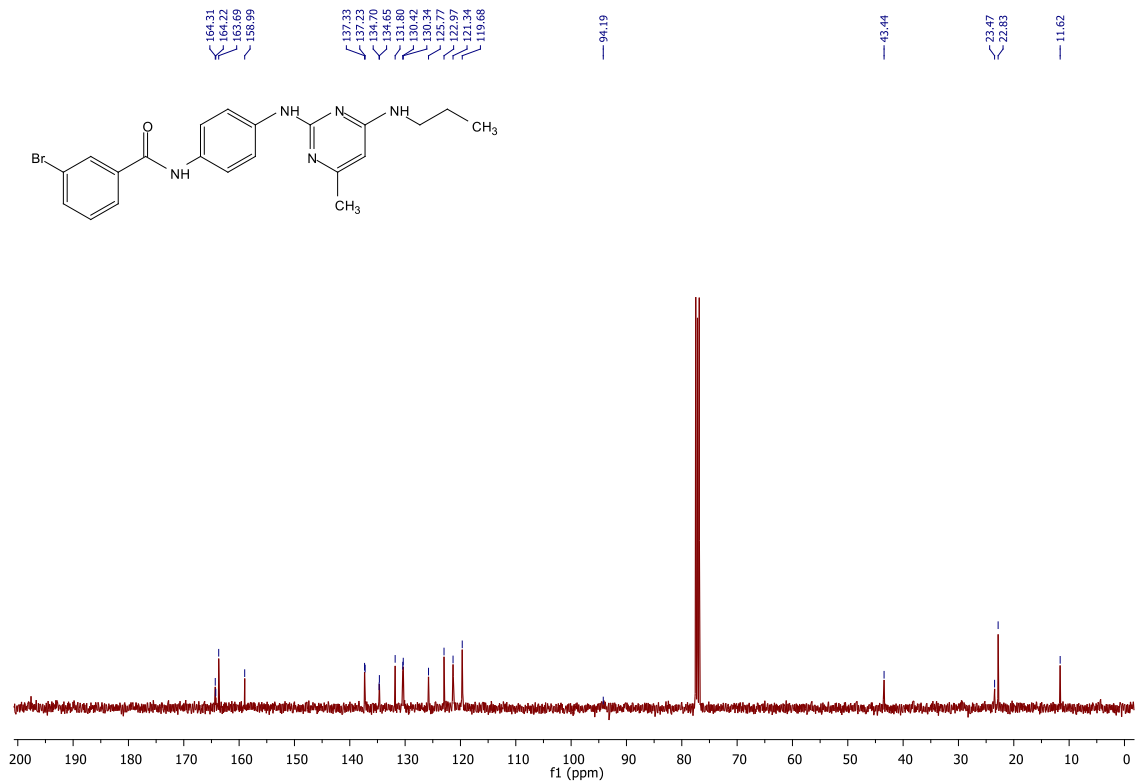
- (54) Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky. *Základní Přehled Epidemiologické Situace ve Výskytu Tuberkulózy v České Republice v Roce 2021*.
- (55) Dolezalova, K.; Maly, M.; Wallenfels, J.; Gopfertova, D. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Children in the Czech Republic in the Period 2003–2018. *Biomed. Pap.* **2021**, *165* (3). <https://doi.org/10.5507/bp.2020.025>.
- (56) Andries, K.; Villellas, C.; Coeck, N.; Thys, K.; Gevers, T.; Vranckx, L.; Lounis, N.; De Jong, B. C.; Koul, A. Acquired Resistance of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline. *PLoS One* **2014**, *9* (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102135>.
- (57) Hartkoorn, R. C.; Uplekar, S.; Cole, S. T. Cross-Resistance between Clofazimine and Bedaquiline through Upregulation of *mmp15* in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (5). <https://doi.org/10.1128/AAC.00037-14>.
- (58) Urban, M.; Šlachtová, V.; Brulíková, L. Small Organic Molecules Targeting the Energy Metabolism of Mycobacterium Tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *212*, 113139. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113139>.
- (59) Kumar, S.; Mehra, R.; Sharma, S.; Bokolia, N. P.; Raina, D.; Nargotra, A.; Singh, P. P.; Khan, I. A. Screening of Antitubercular Compound Library Identifies Novel ATP Synthase Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis* **2018**, *108*. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.10.008>.
- (60) 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. Identification and Synthesis of Novel Inhibitors of Mycobacterium ATP Synthase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (15), 3454–3459. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.081>.

Přílohy

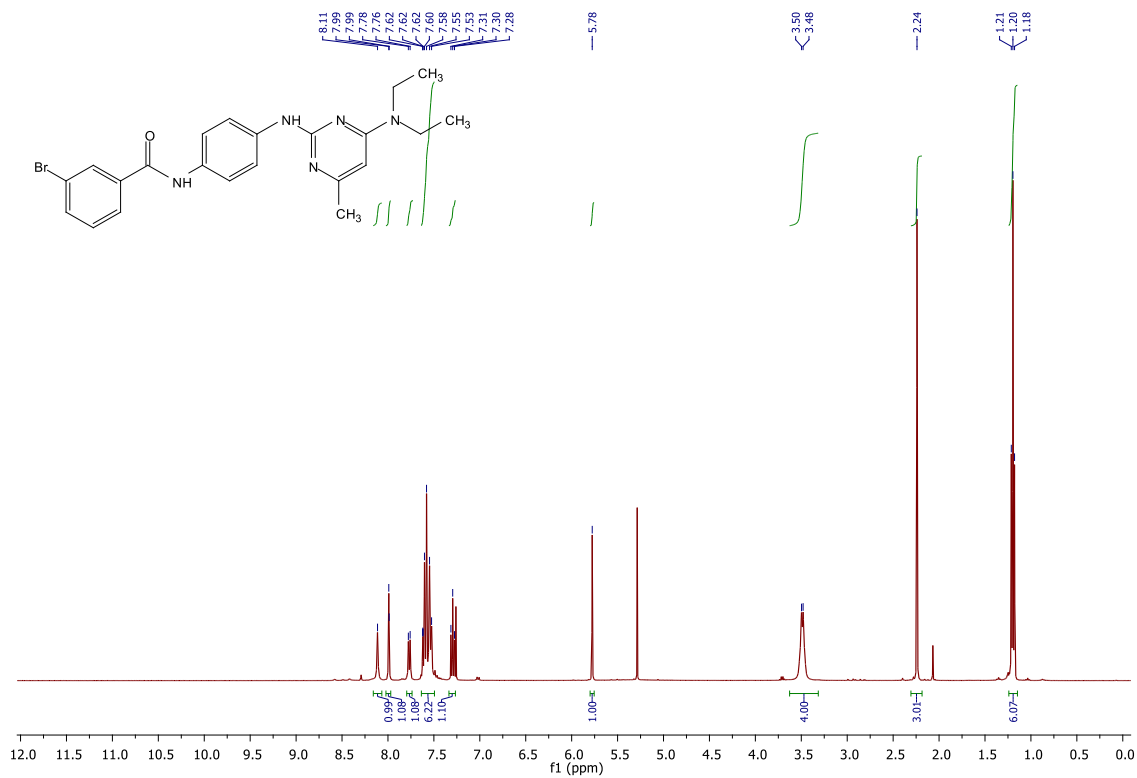
Příloha 1: ^1H spektrum látky 1a



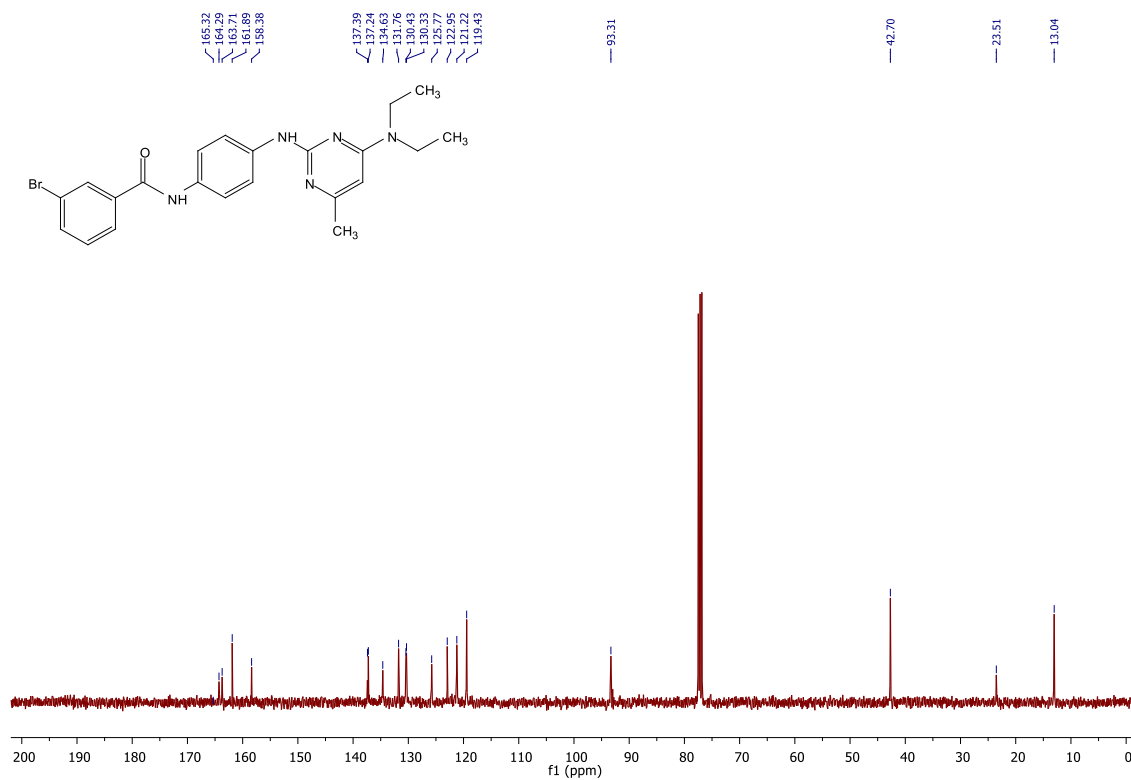
Příloha 2: ^{13}C spektrum látky 1a



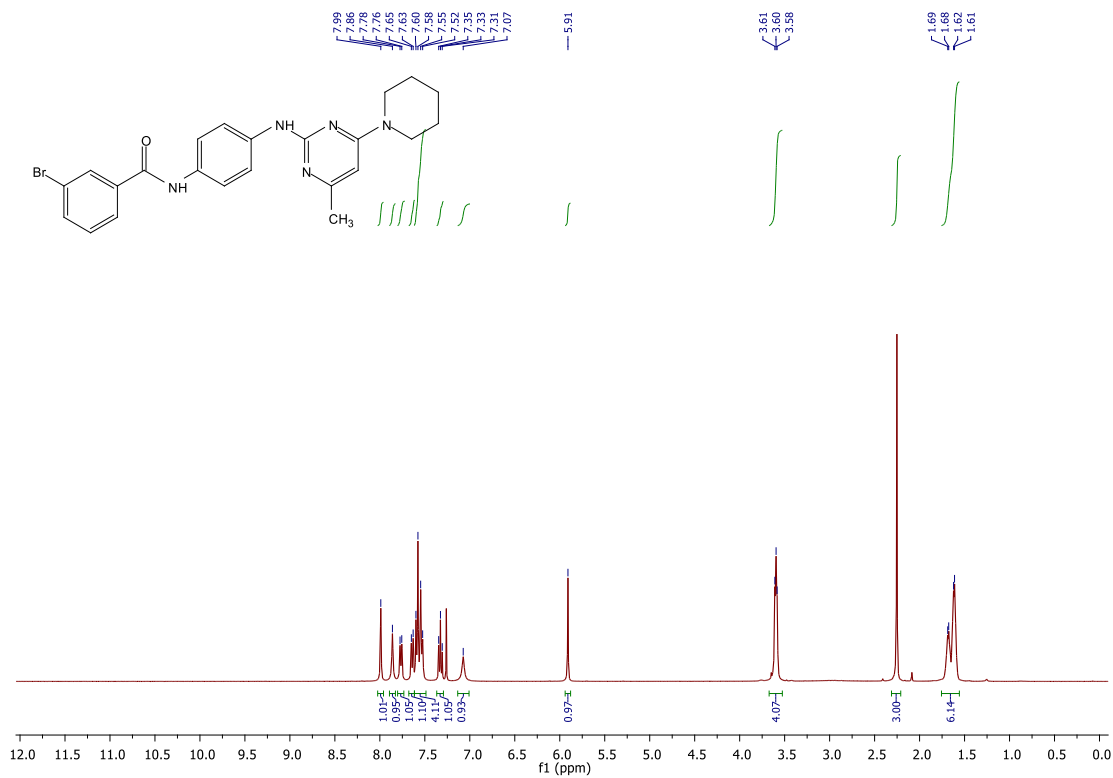
Příloha 3: ^1H spektrum látky 1b



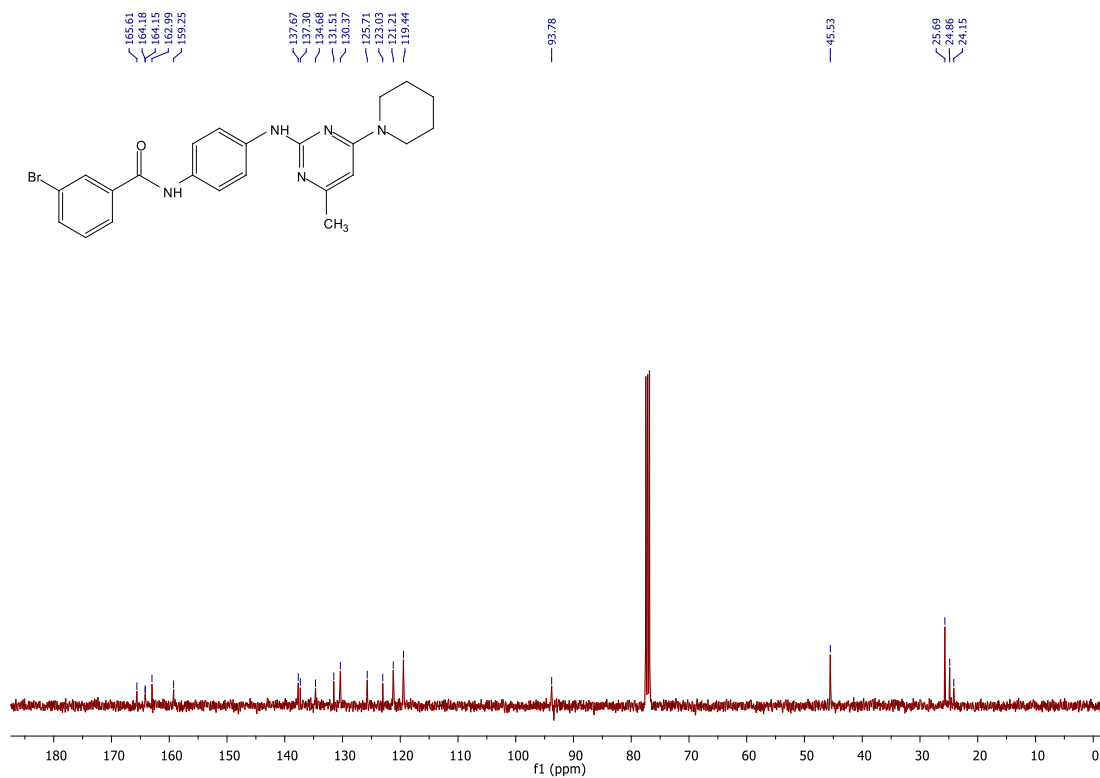
Příloha 4: ^{13}C spektrum látky 1b



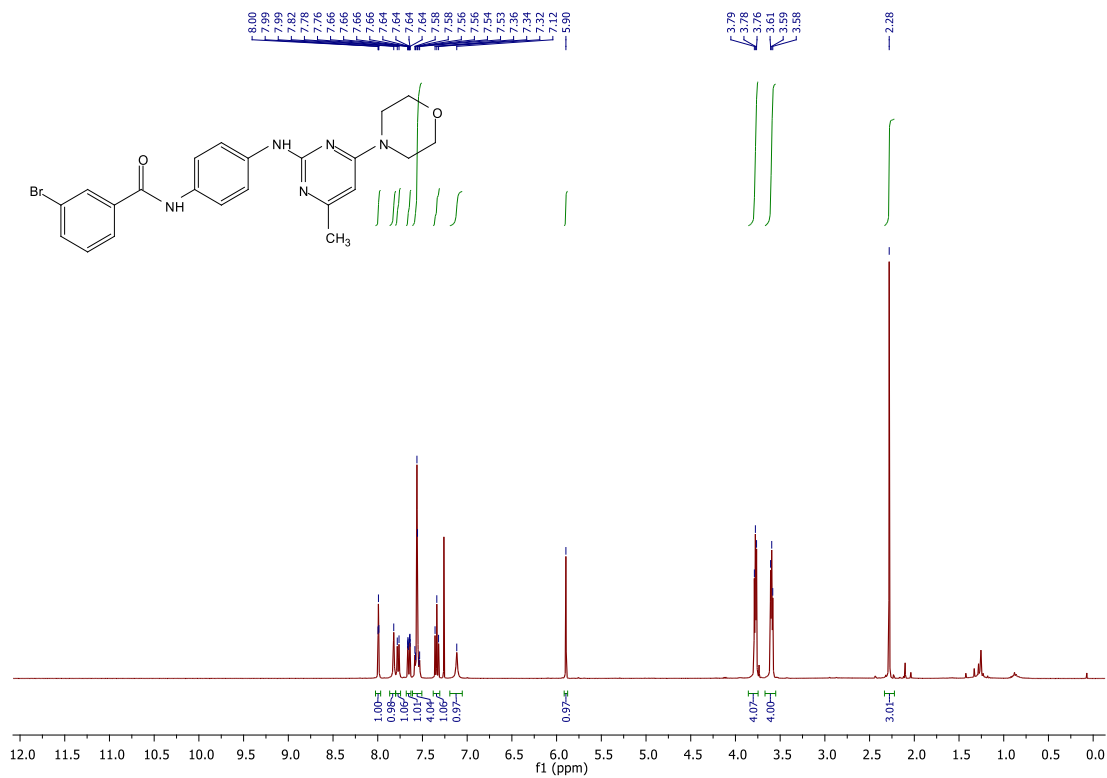
Příloha 5: ^1H spektrum látky 1c



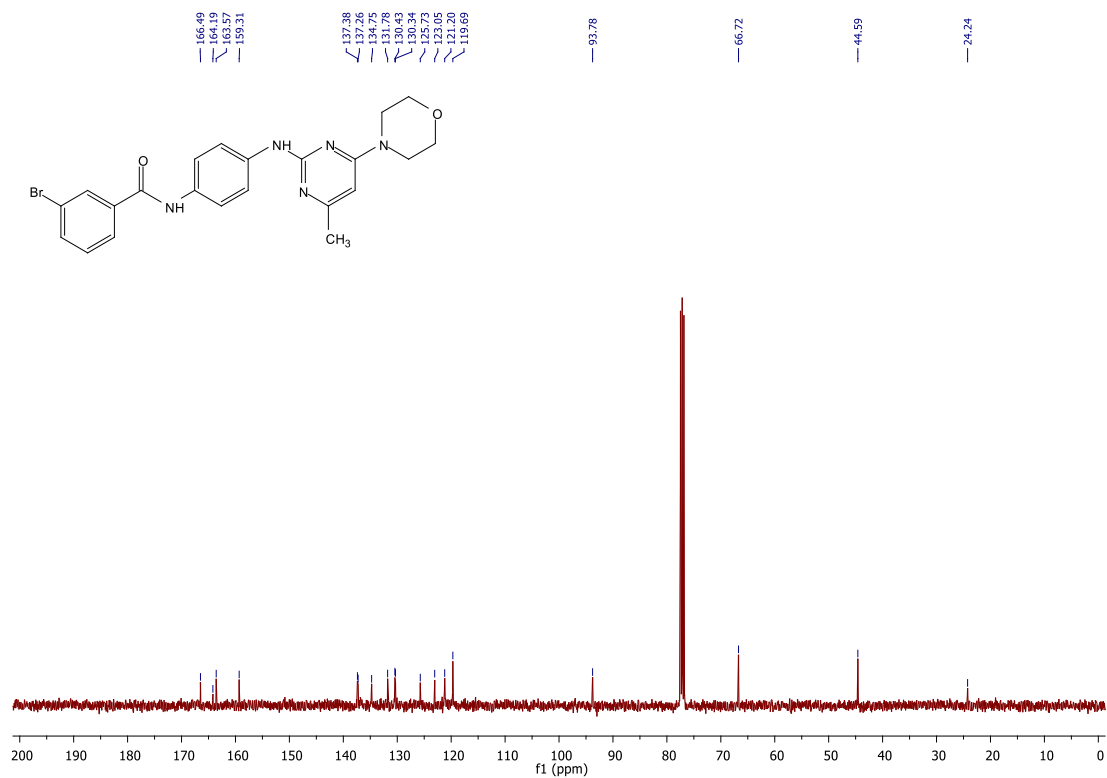
Příloha 6: ^{13}C spektrum látky 1c



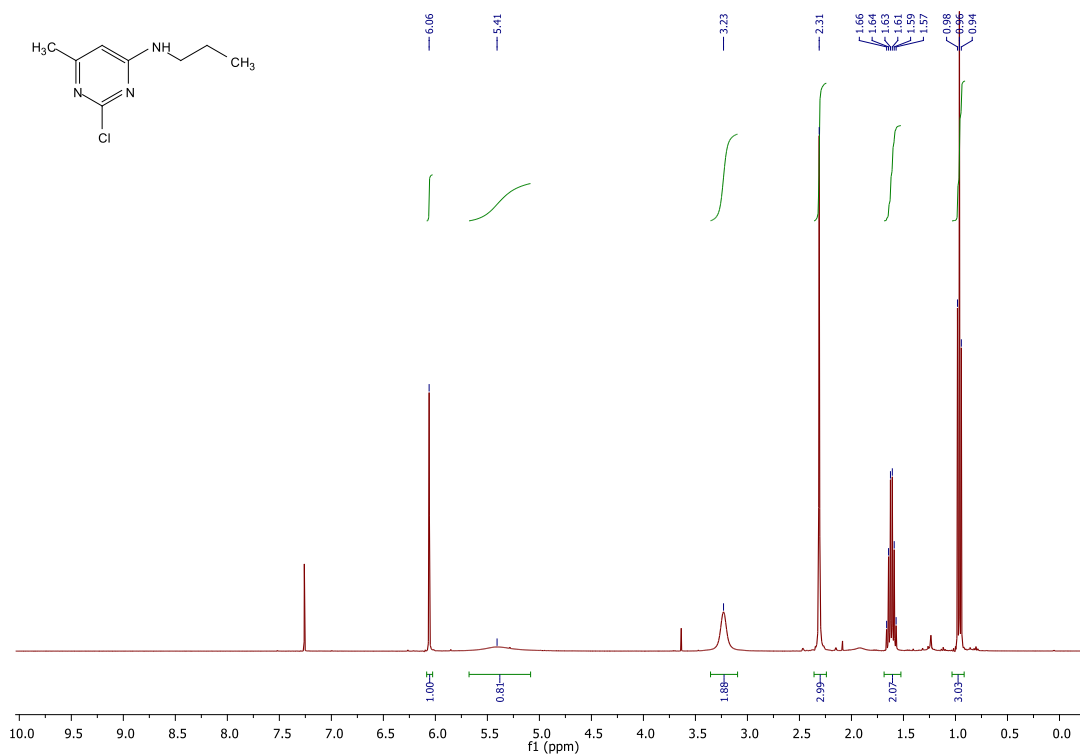
Příloha 7: ^1H spektrum látky 1d



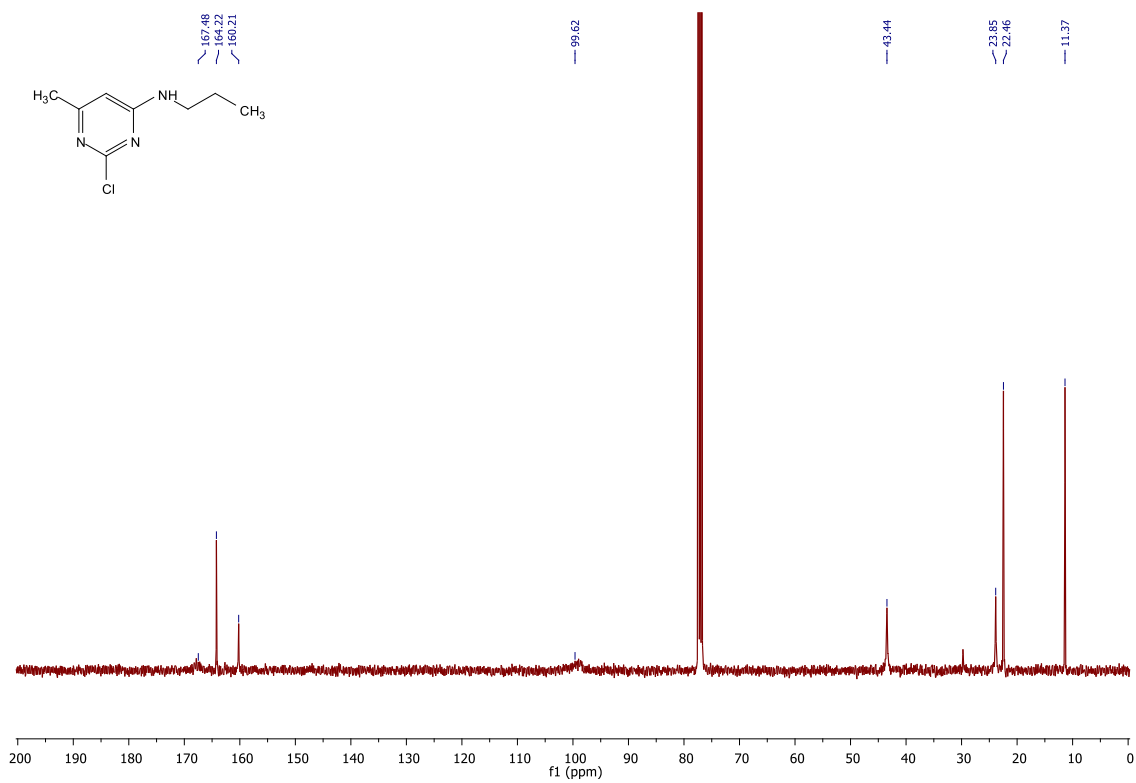
Příloha 8: ^{13}C spektrum látky 1d



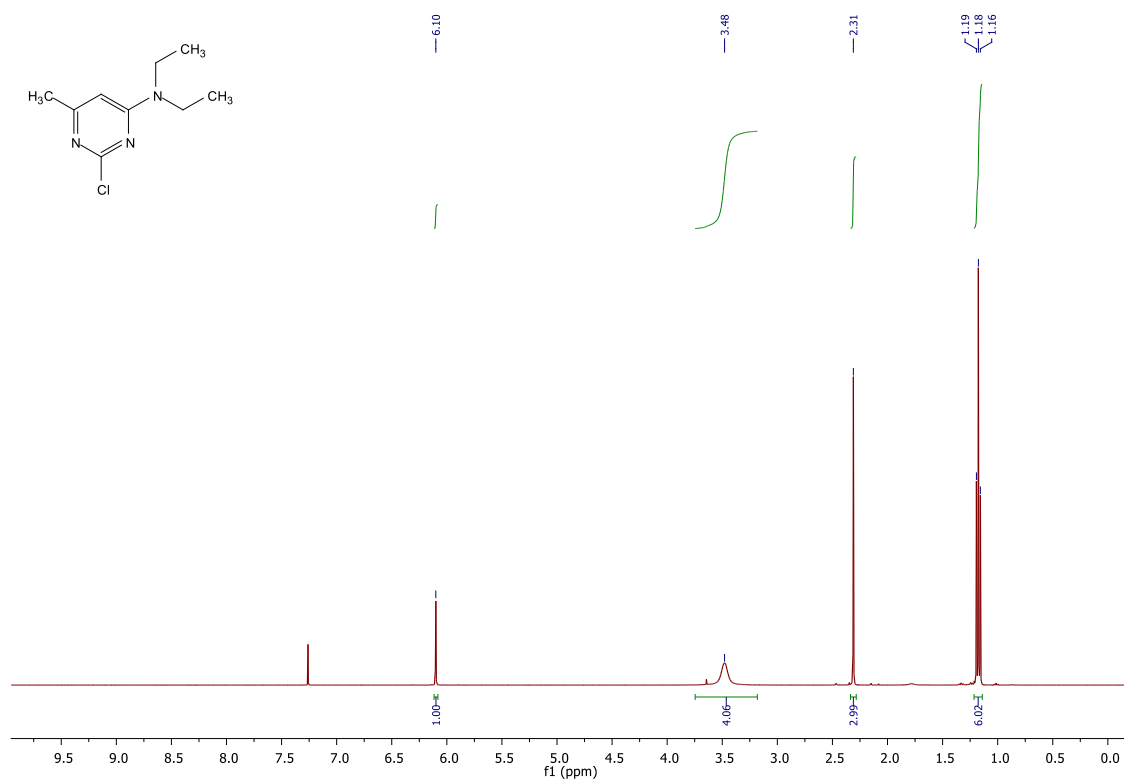
Příloha 9: ^1H spektrum látky 3a



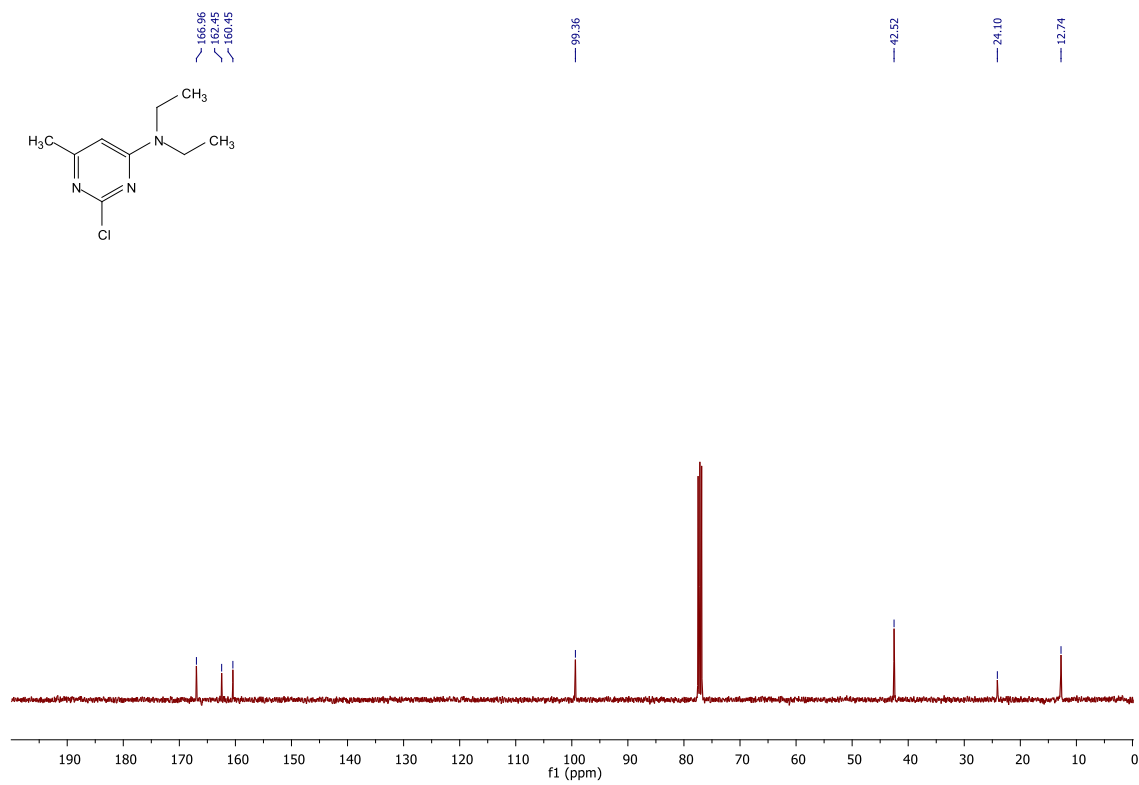
Příloha 10: ^{13}C spektrum látky 3a



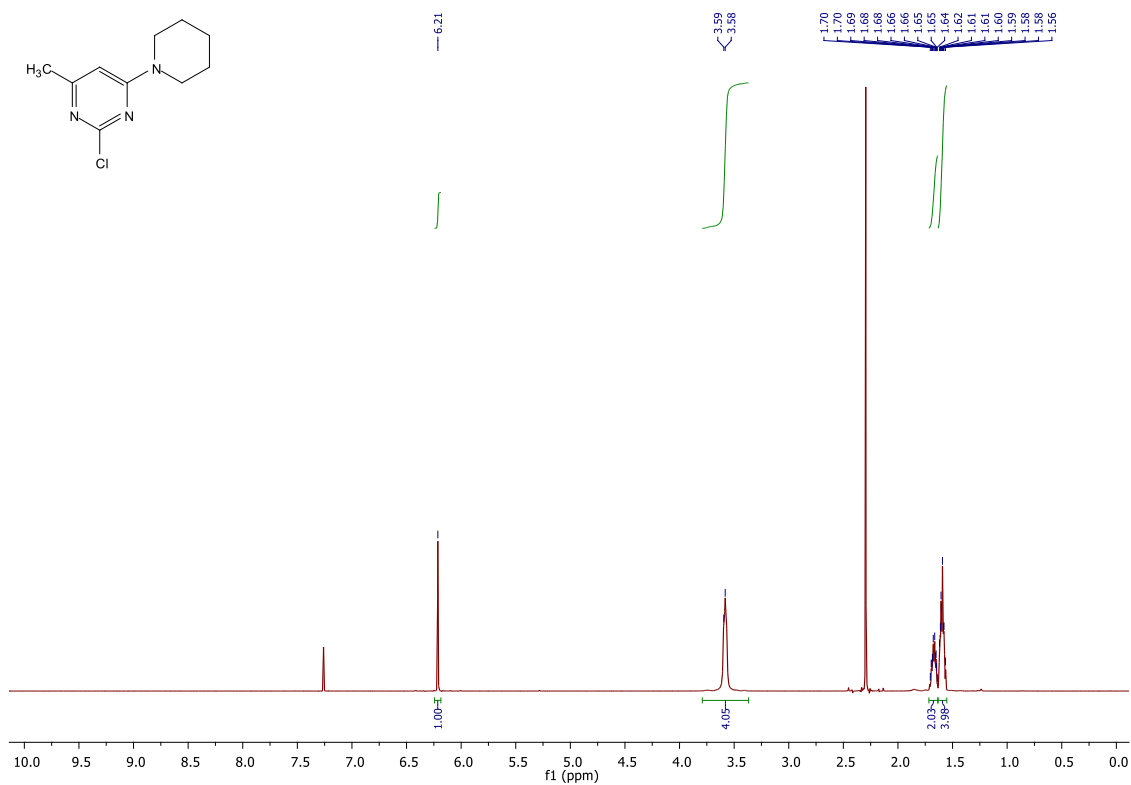
Příloha 11: ^1H spektrum látky 3b



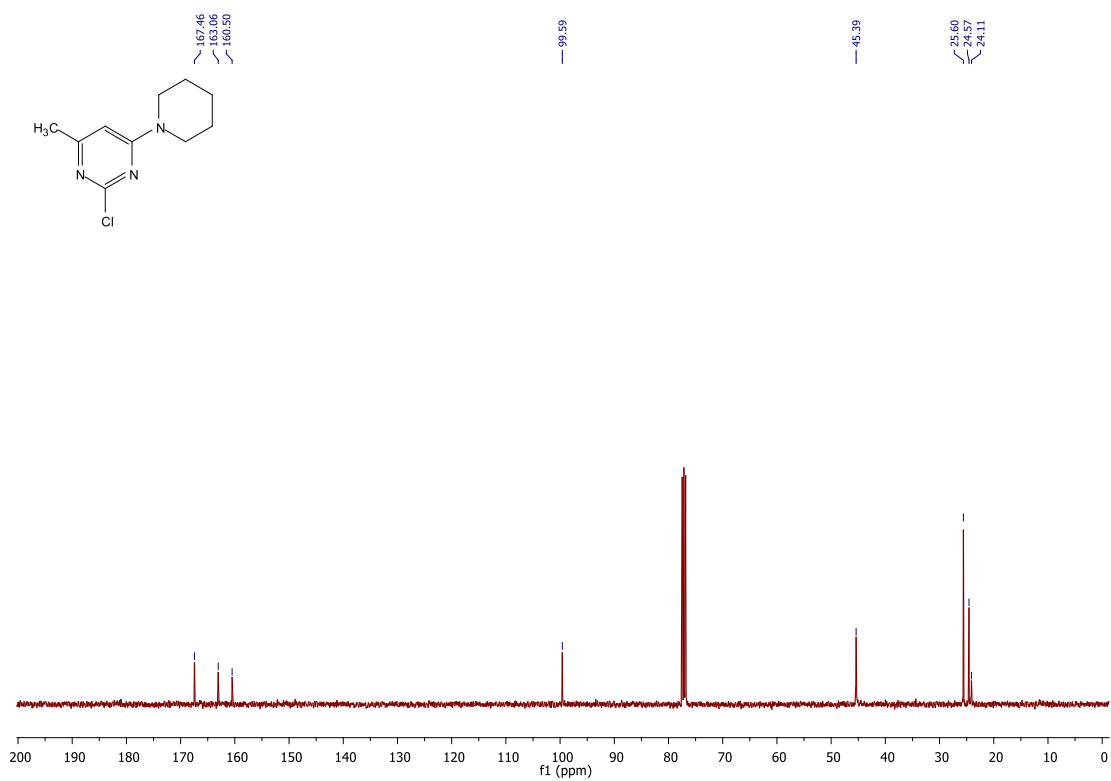
Příloha 12: ^{13}C spektrum látky 3b



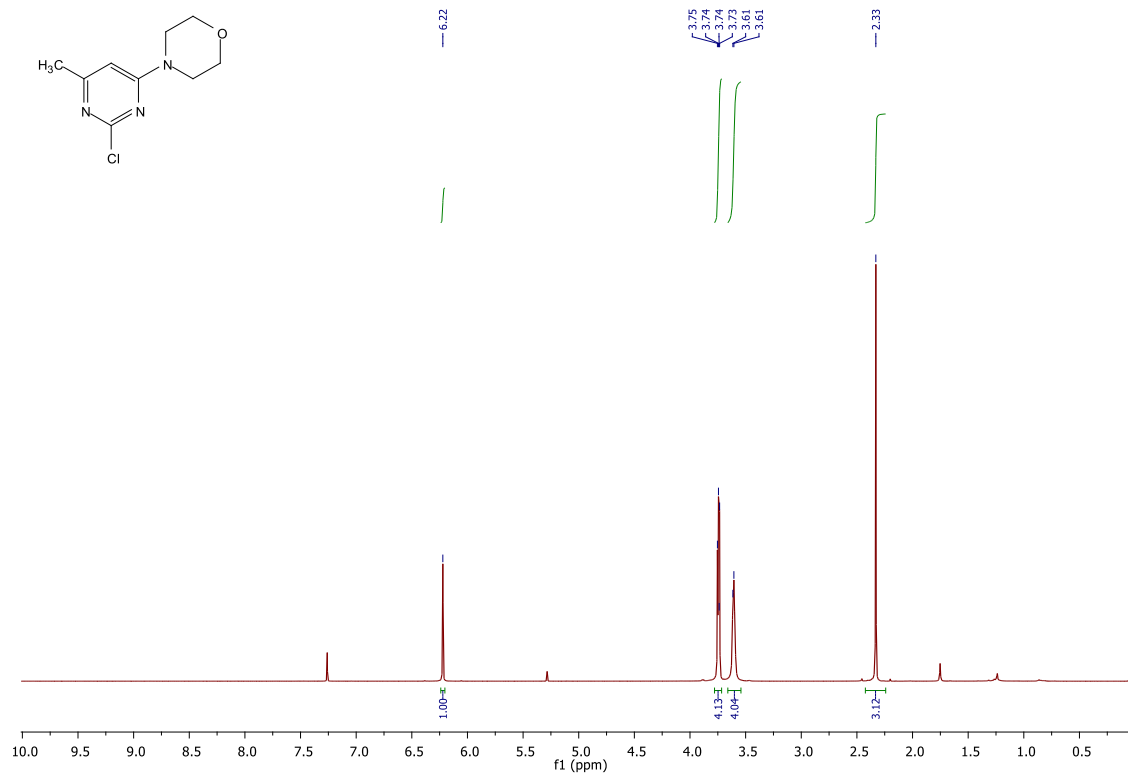
Příloha 13: ^1H spektrum látky 3c



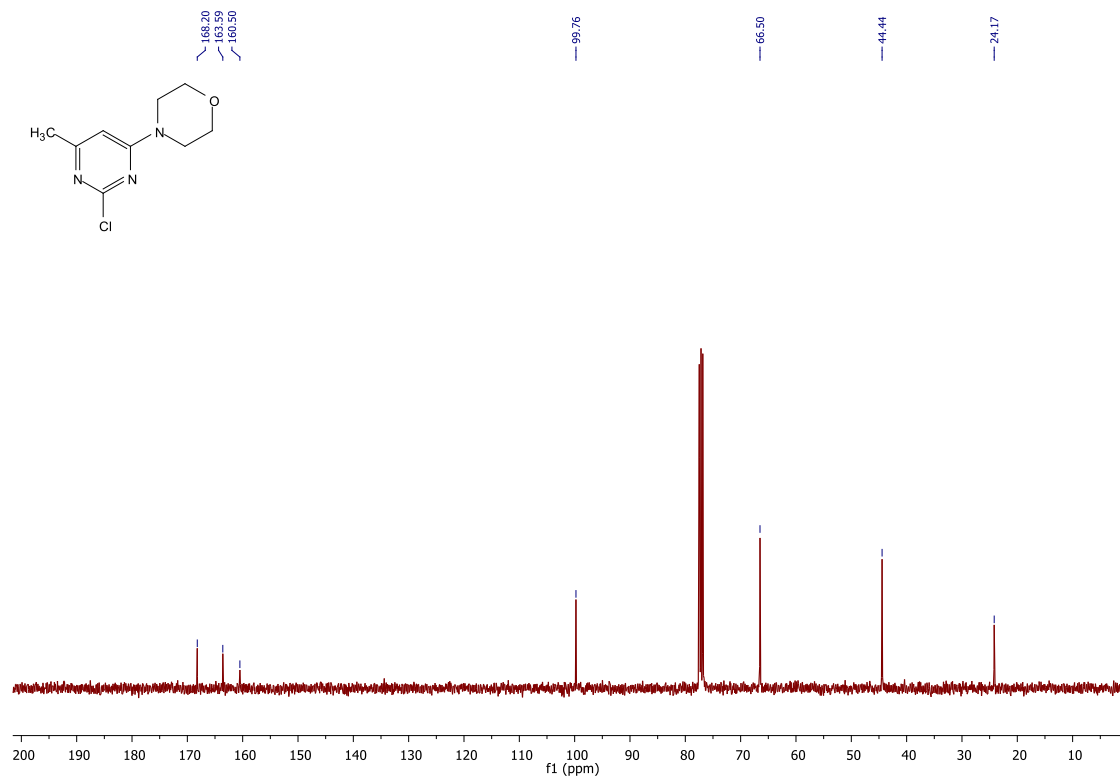
Příloha 14: ^{13}C spektrum látky 3c



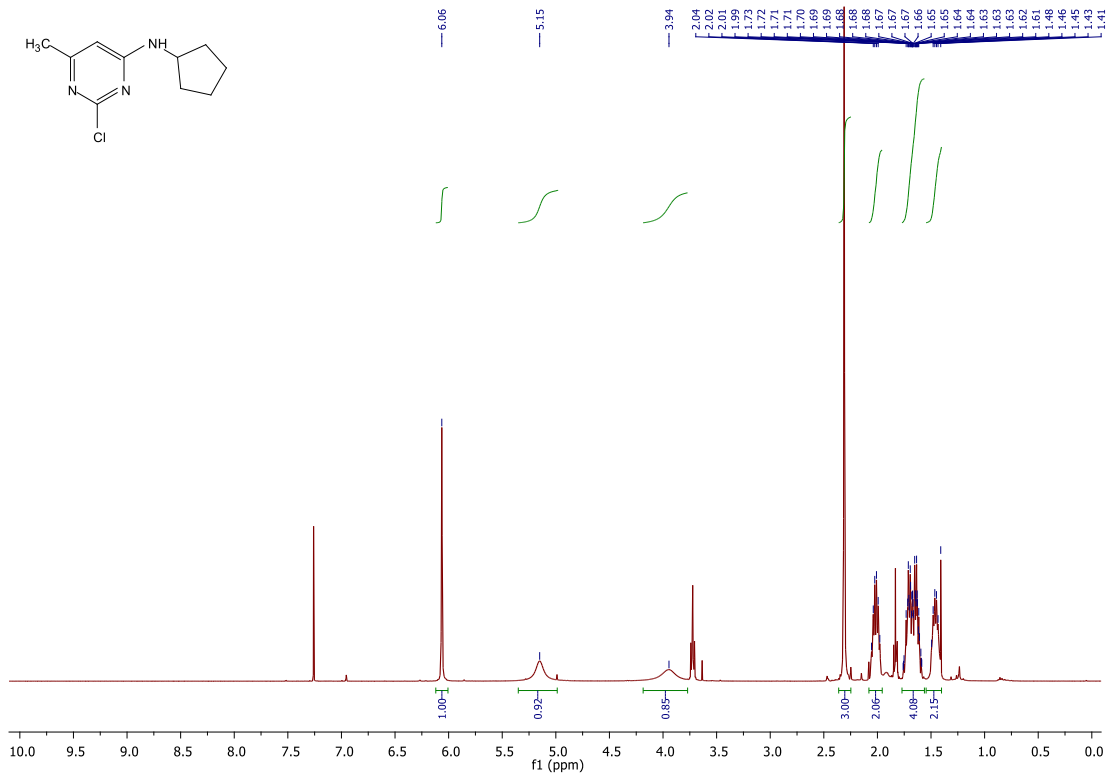
Příloha 15: ^1H spektrum látky 3d



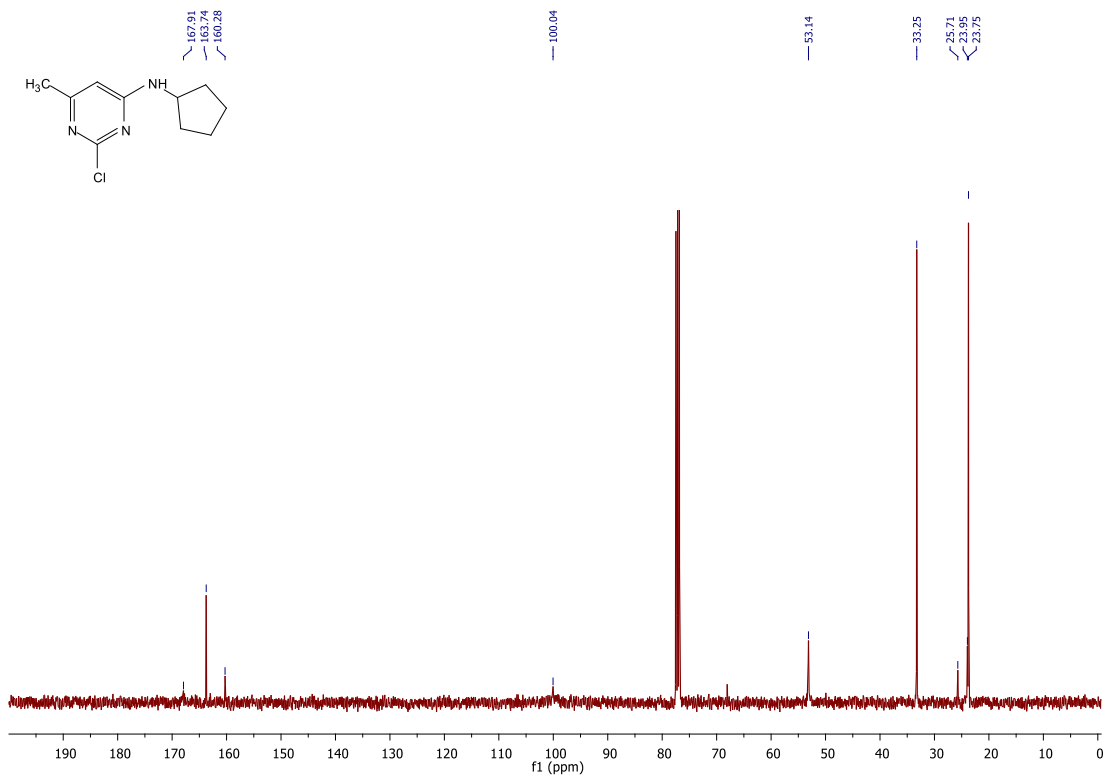
Příloha 16: ^{13}C spektrum látky 3d



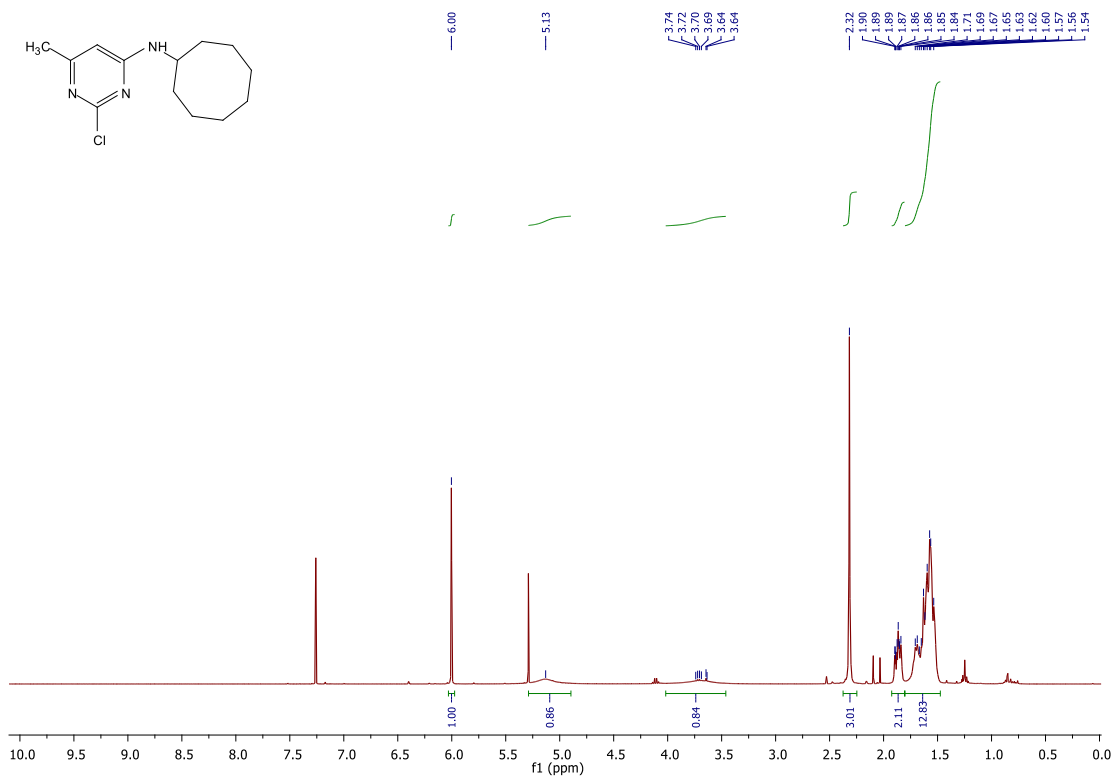
Příloha 17: ^1H spektrum látky 3e



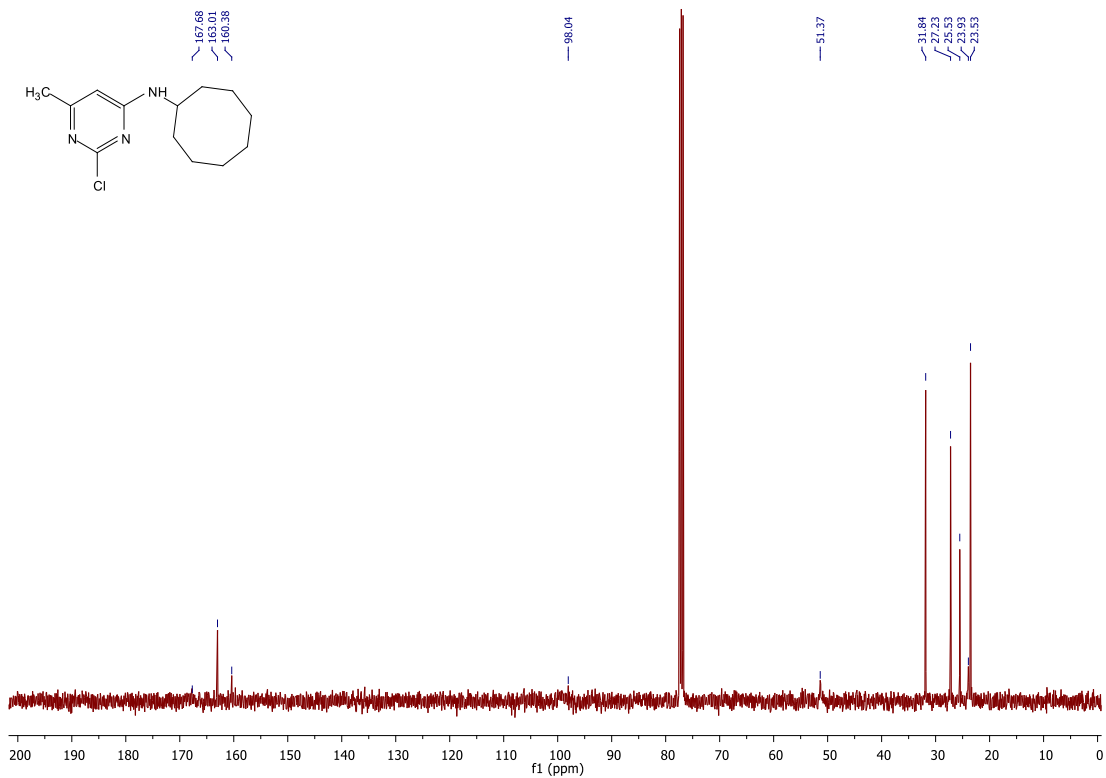
Příloha 18: ^{13}C spektrum látky 3e



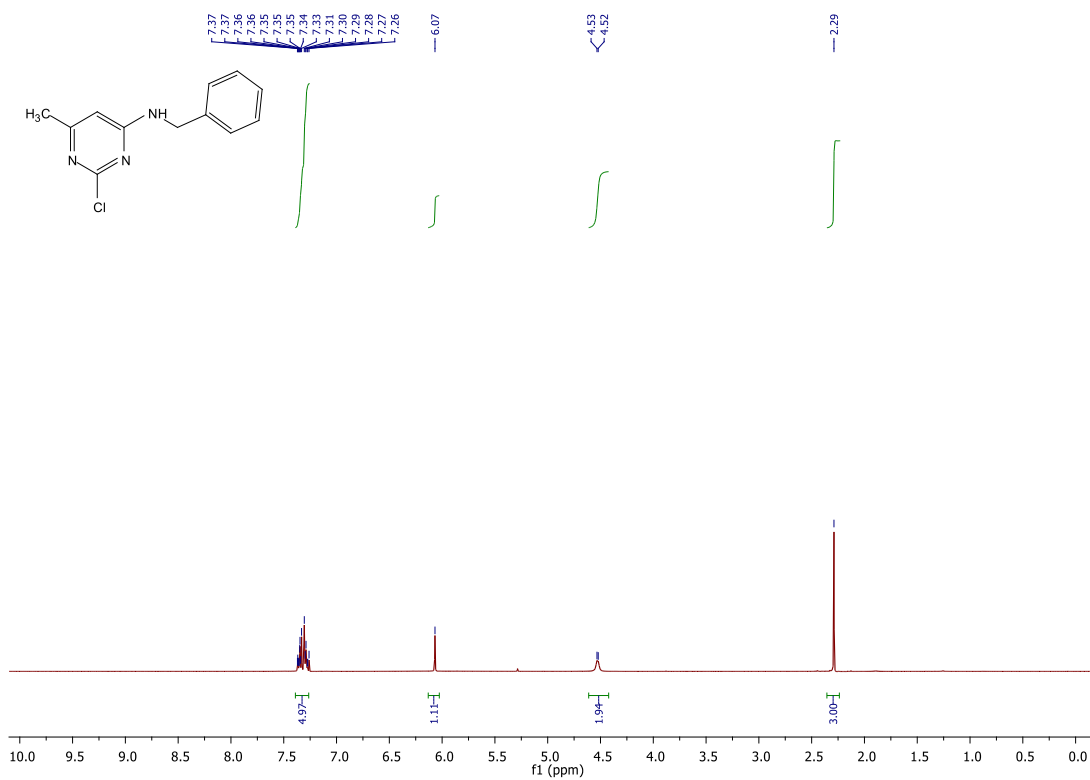
Příloha 19: ^1H spektrum látky 3f



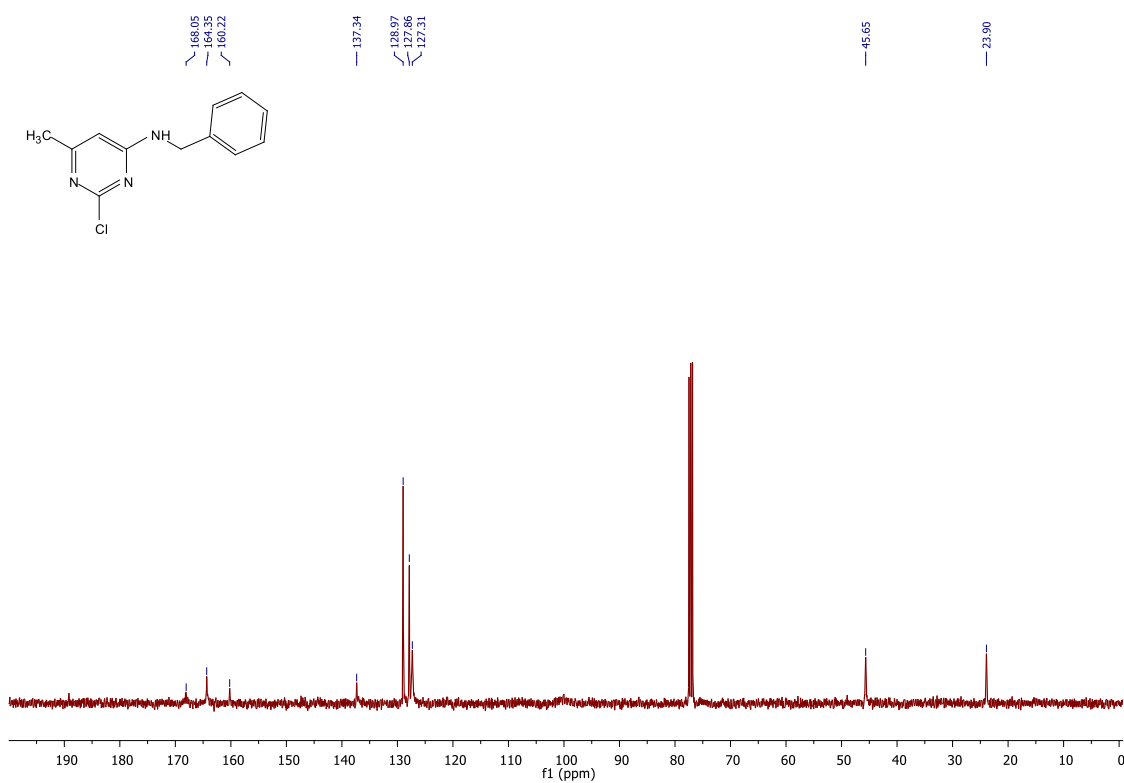
Příloha 20: ^{13}C spektrum látky 3f



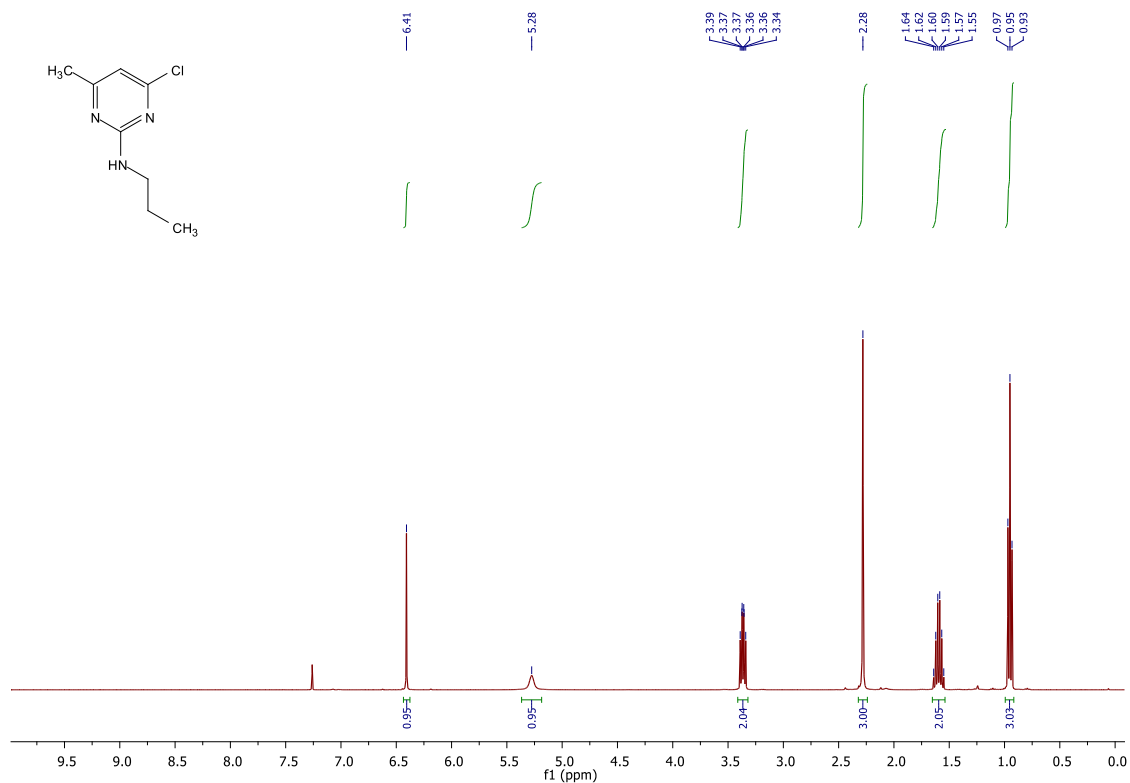
Příloha 21: ^1H spektrum látky 3g



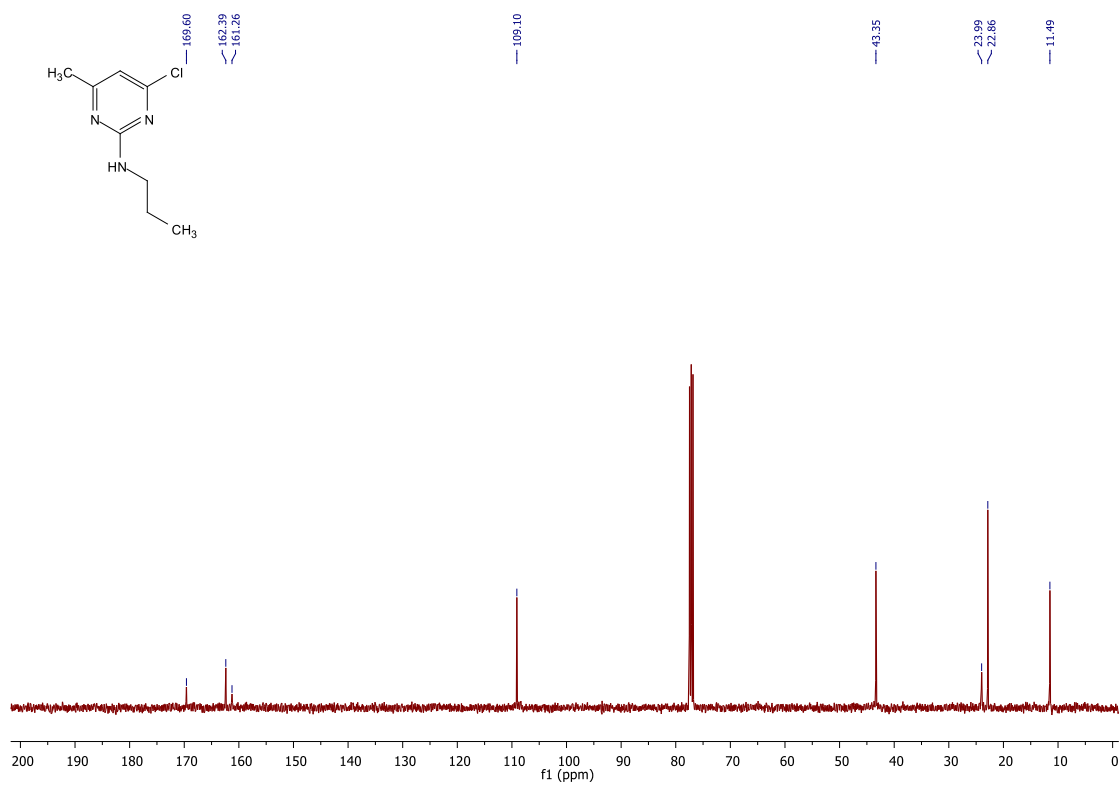
Příloha 22: ^{13}C spektrum látky 3g



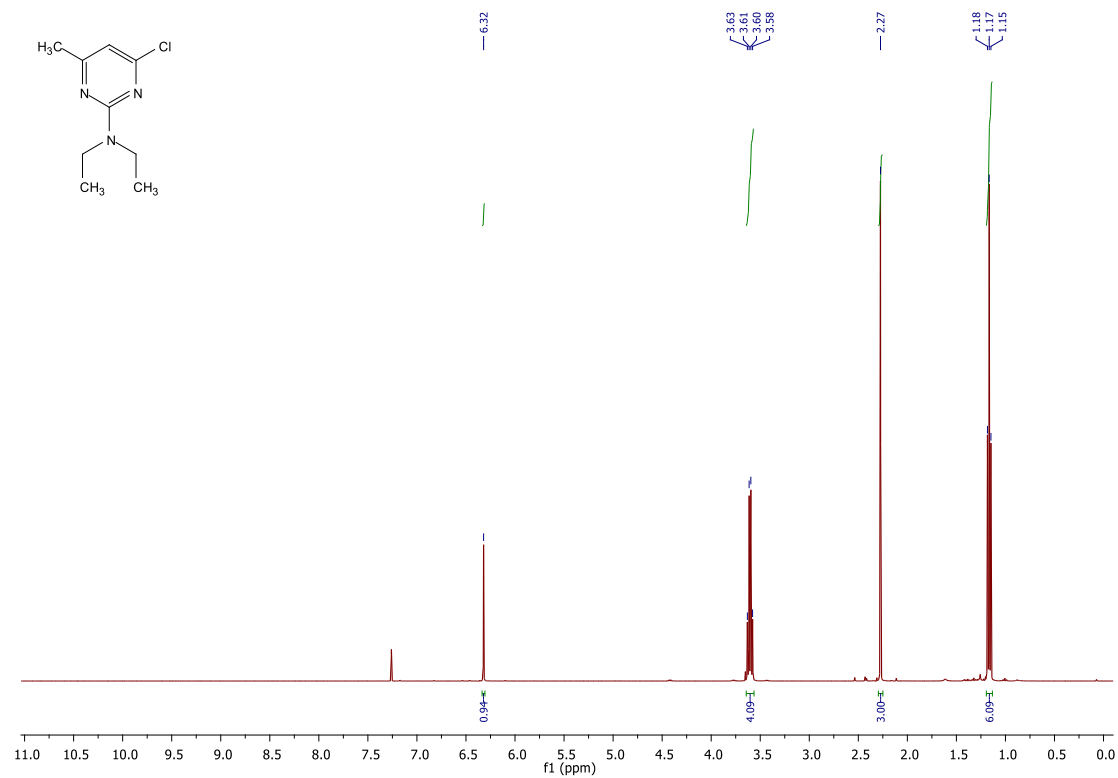
Příloha 23: ^1H spektrum látky 4a



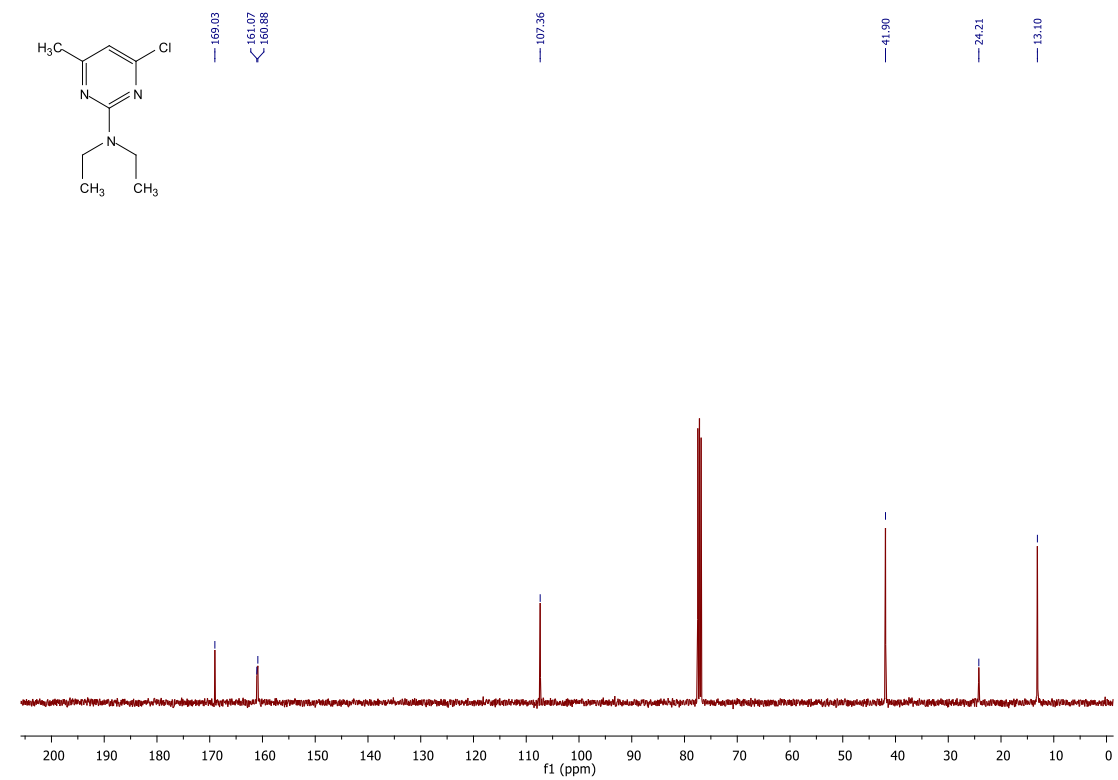
Příloha 24: ^{13}C spektrum látky 4a



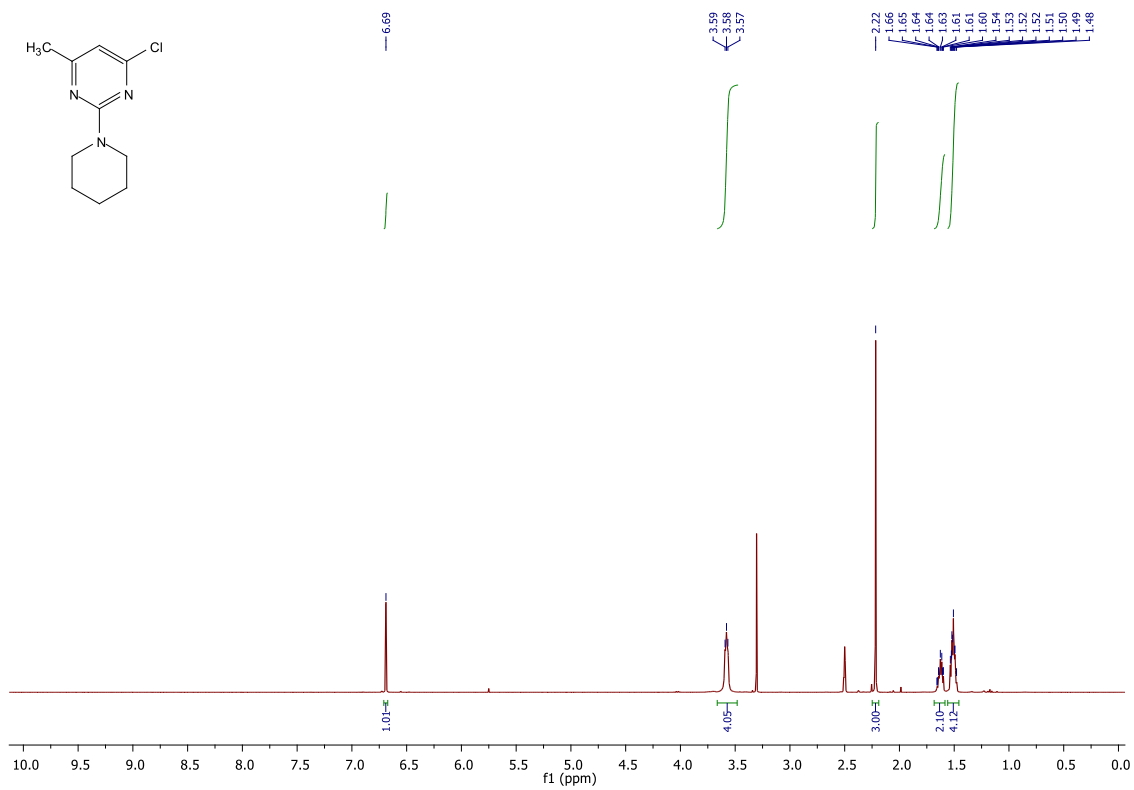
Příloha 25: ^1H spektrum látky 4b



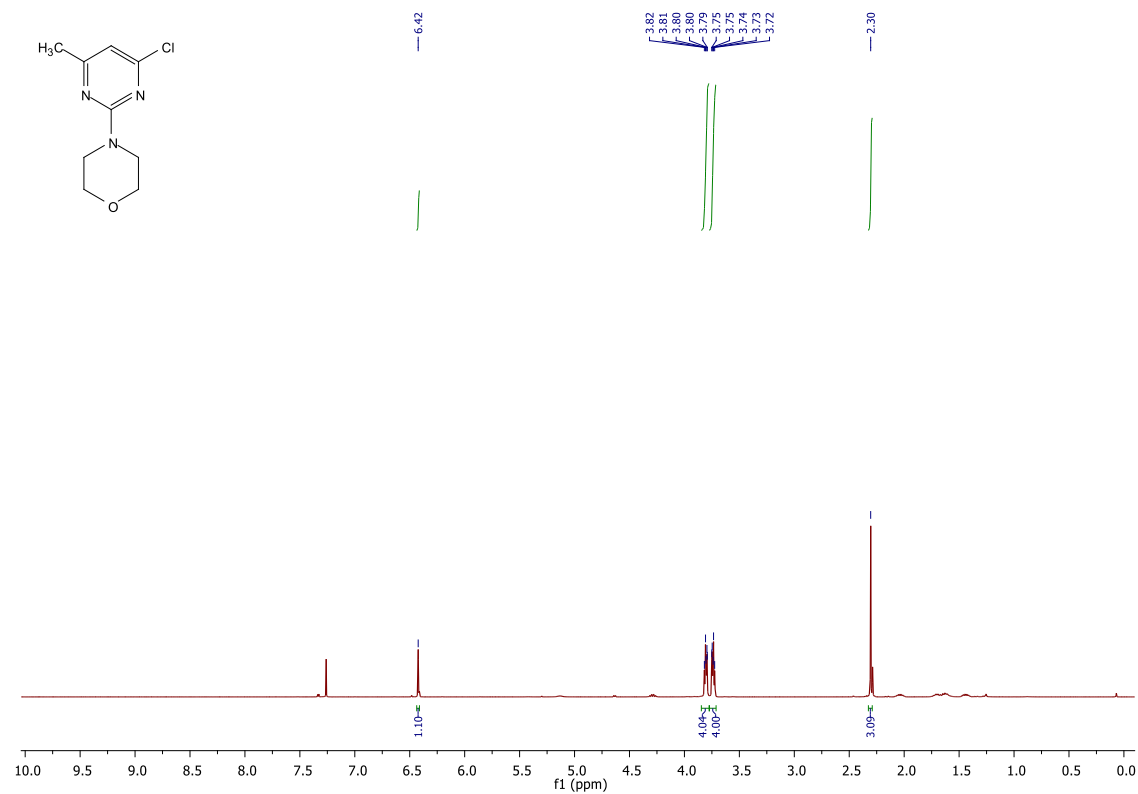
Příloha 26: ^{13}C spektrum látky 4b



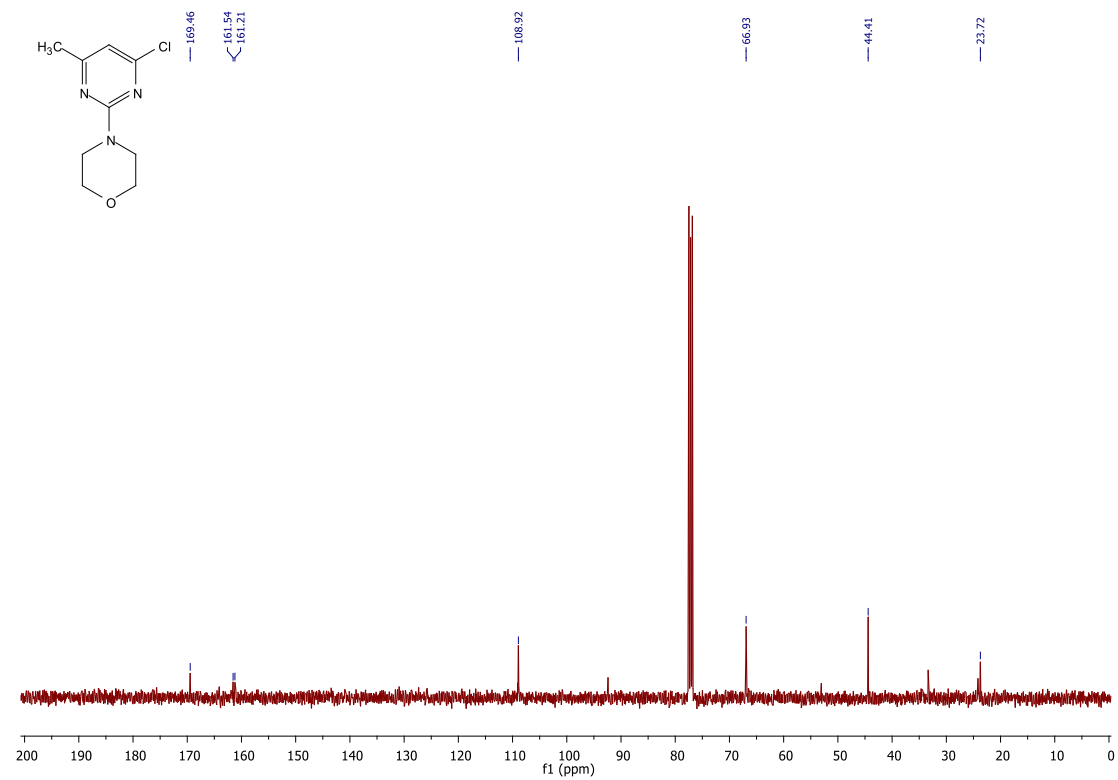
Příloha 27: ^1H spektrum látky 4c



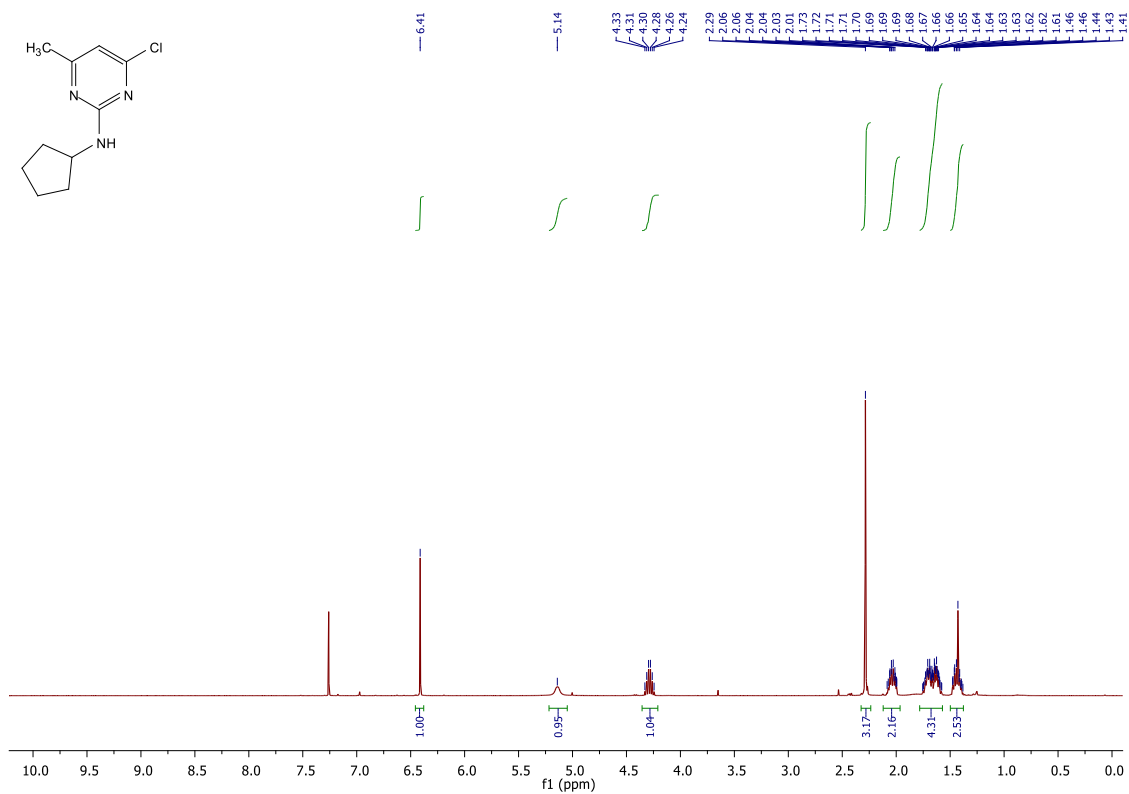
Příloha 28: ^1H spektrum látky 4d



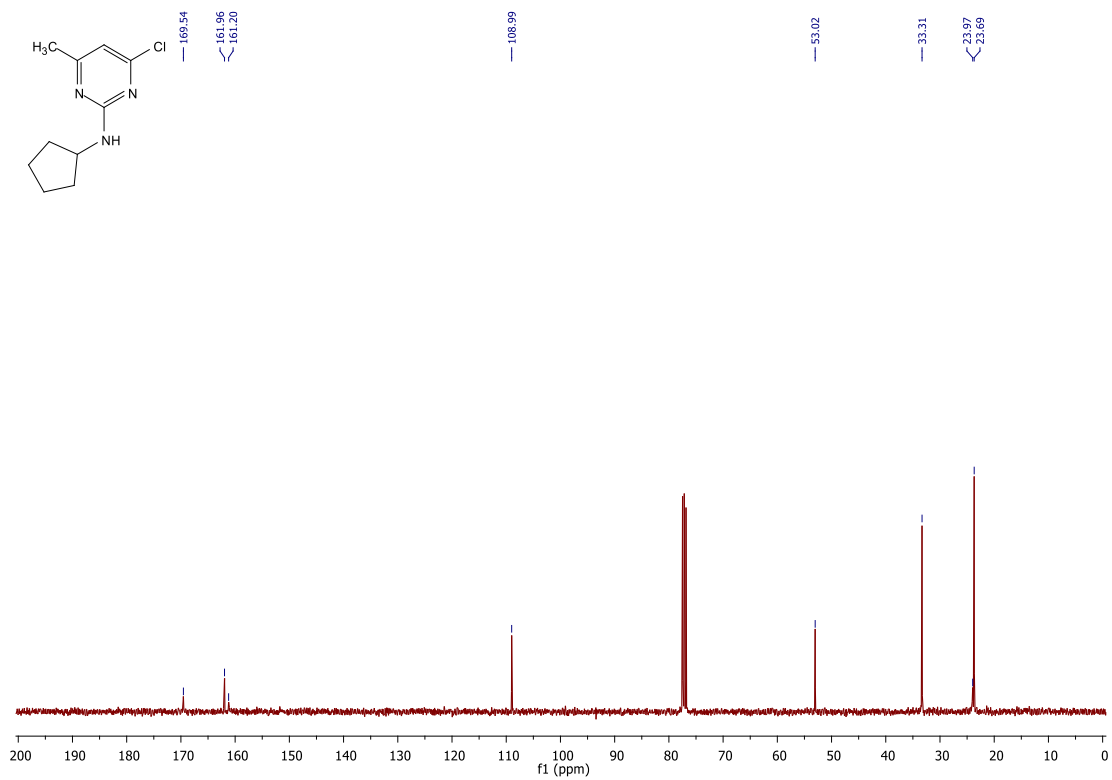
Příloha 29: ^{13}C spektrum látky 4d



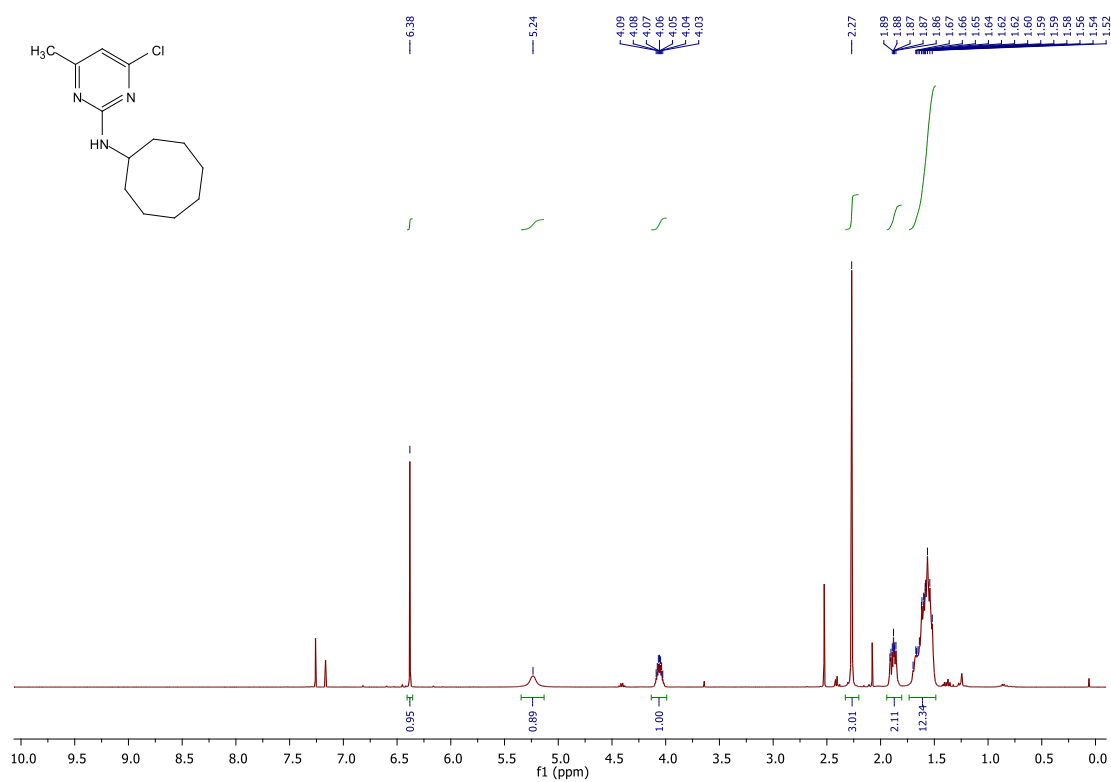
Příloha 30: ^1H spektrum látky 4e



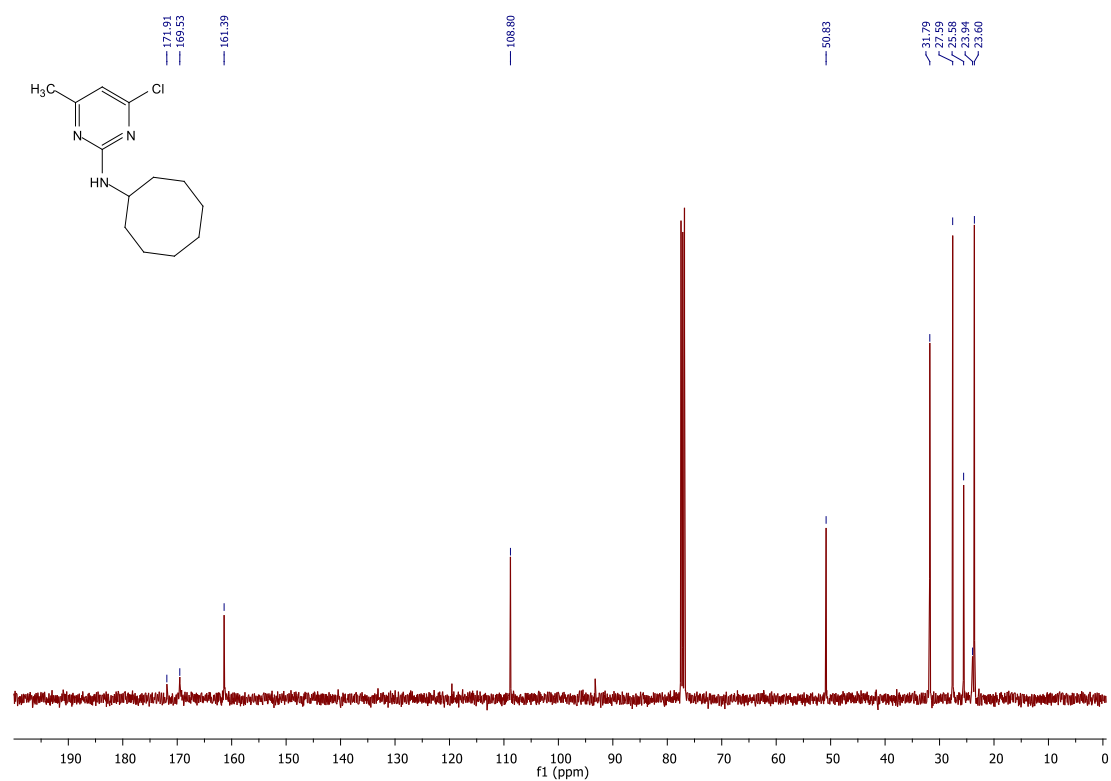
Příloha 31: ^{13}C spektrum látky 4e



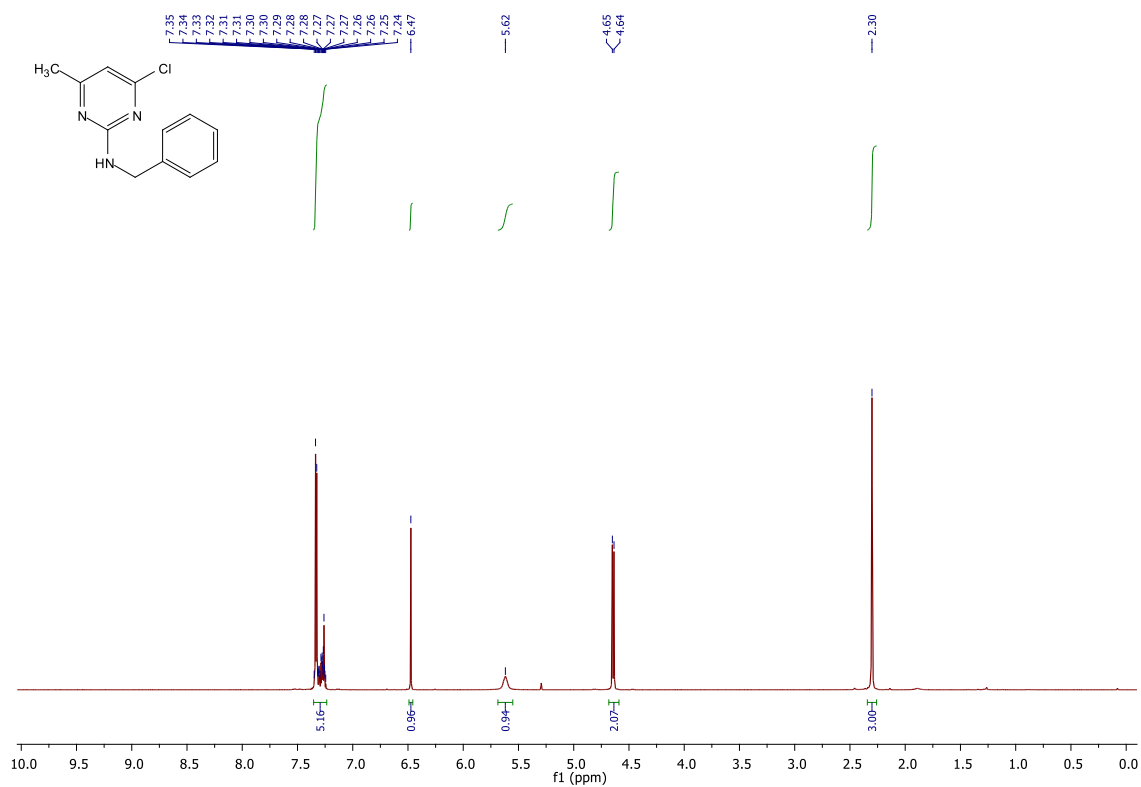
Příloha 32: ^1H spektrum látky 4f



Příloha 33: ^{13}C spektrum látky 4f



Příloha 34: ^1H spektrum látky 4g



Příloha 35: ^{13}C spektrum látky 4g

