

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**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:

<b>JMÉNO A PŘÍJMENÍ:</b>	Petr Vyvlečka
<b>NÁZEV PRÁCE:</b>	Syntéza nových analog GaMF1 jako potenciálních inhibitorů F-ATP synthasy
<b>TYP PRÁCE:</b>	bakalářská
<b>PRACOVNÍŠTĚ:</b>	Katedra organické chemie
<b>VEDOUCÍ PRÁCE:</b>	RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.
<b>ROK OBHAJOBY PRÁCE:</b>	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 *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 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, *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 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 *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase* enzyme. The practical part describes the synthesis routes of selected compounds.

**KEY WORDS:** tuberculosis, *Mycobacteria*, *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 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>F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP 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

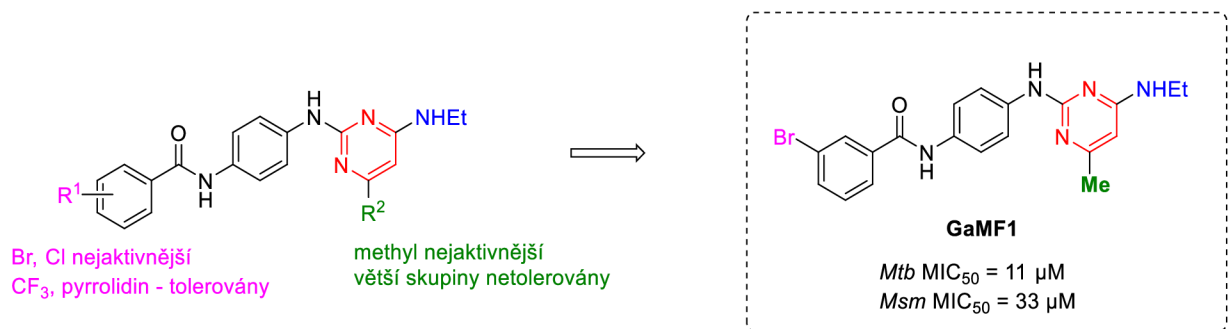
# Úvod

Tuberkulóza je bakteriální onemocnění, které ročně způsobí přibližně 1,5 milionů úmrtí.<sup>1</sup> 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.<sup>1,2</sup> 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 *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP-synthasa*, který je zodpovědný za syntézu životně důležité sloučeniny adenosintrifosfát (ATP).<sup>2,3</sup> 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.<sup>2,4,5</sup> Jinou skupinou byly sloučeniny s označením squaramidy.<sup>6</sup> V roce 2020 vyšel článek Hotra a kol.,<sup>2</sup> ve kterém byla představena GaMF1 jako sloučenina s antituberkulotickým potenciálem (Obr. 1).

Předložená bakalářská práce vychází ze zmíněného článku Hotra a kol.<sup>2</sup> 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  $\gamma$ .<sup>2</sup> 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.

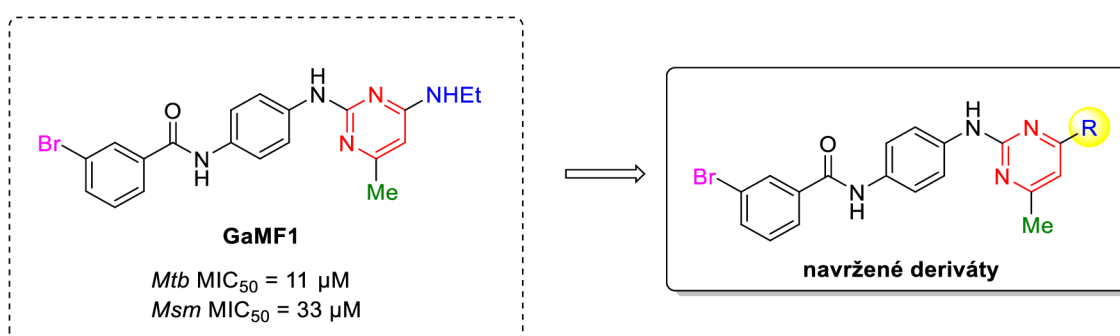




**Obr. 1:** Struktura GaMF1 a jejích derivátů

# Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce je syntéza nových analog GaMF1, která vychází z článku Hotra a kol.<sup>2</sup> 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)*.<sup>1</sup> 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.<sup>7</sup> Podle Světové zdravotnické organizace (dále WHO) způsobuje TB každý rok zhruba 1,5 milionů úmrtí, a řadí se tak k nejnebezpečnějším infekčním onemocněním současnosti.<sup>1</sup> V rámci infekce jedním infekčním patogenem byla TB dlouhou dobu nejčastější příčinou úmrtí, než byla vystřídána onemocněním COVID-19.<sup>1</sup> V roce 2021 bylo podle WHO ve světě 10,6 milionu nových případů nákazy TB a 1,6 milionu úmrtí v důsledku tohoto onemocnění.<sup>1</sup>

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

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.<sup>9</sup>

Mezi největší překážky při boji s TB patří v současné době vysoká schopnost rezistence určitých mykobakteriálních kmenů na dostupná léčiva.<sup>2</sup> 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.<sup>1</sup>

## 1.1 Historie tuberkulózy

„Tuberkulóza je nemoc známá již odnepaměti, dokonce lze říct, že je stará jako lidstvo samo.“<sup>7</sup> Tuto větu prohlásil slovenský lékař Anton Bajan (1927-2009) ve své knize *Tuberkulóza* (Osveta Martin, 1990).<sup>7</sup> (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.<sup>7,10</sup> 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.<sup>7,10</sup> Odhaduje se, že TB se poprvé vyskytla zhruba před 40 000 až 70 000 lety.<sup>11,12</sup>

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.<sup>7,10</sup> Jedním z takových dokumentů je babylonský zákoník krále Chammurapiho (± 2 200 př.n.l.), staroindický Manuův zákoník (± 1 200 př.n.l.) a Svaté písmo Starého zákona.<sup>7,10</sup> Za první ucelený obraz o plicní formě TB lze považovat *Corpus Hippocraticum*, ve kterém Hippokratés popisuje příznaky TB.<sup>7,10</sup> Hippokratova práce byla dále rozšířena dalšími řeckými mysliteli, Isokratem a Aristotelem, kteří navíc poukazují na nakažlivost choroby.<sup>10</sup> Aristoteles popsal, že se TB šíří vzduchem a vstupní branou do lidského organismu je dýchací soustava.<sup>10</sup> Z období středověku nemáme k dispozici doklady o rozvoji poznání TB,<sup>7</sup> až počátek novověku přinesl další poznatky v této oblasti. Paracelsus definoval tzv. *tartarus* jako konkrétní 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.<sup>10</sup> 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.<sup>7</sup> 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.<sup>1</sup> 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.<sup>13</sup> 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.<sup>13</sup> 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.<sup>1</sup> Země, kde byl v roce 2020 tento pokles nejvýznamnější, jsou Indie, Indonésie a Filipíny.<sup>1</sup> Z toho plyne rostoucí rozdíl mezi skutečným počtem nových případů a počtem nahlášených případů.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup>

## 2 Mykobakterie

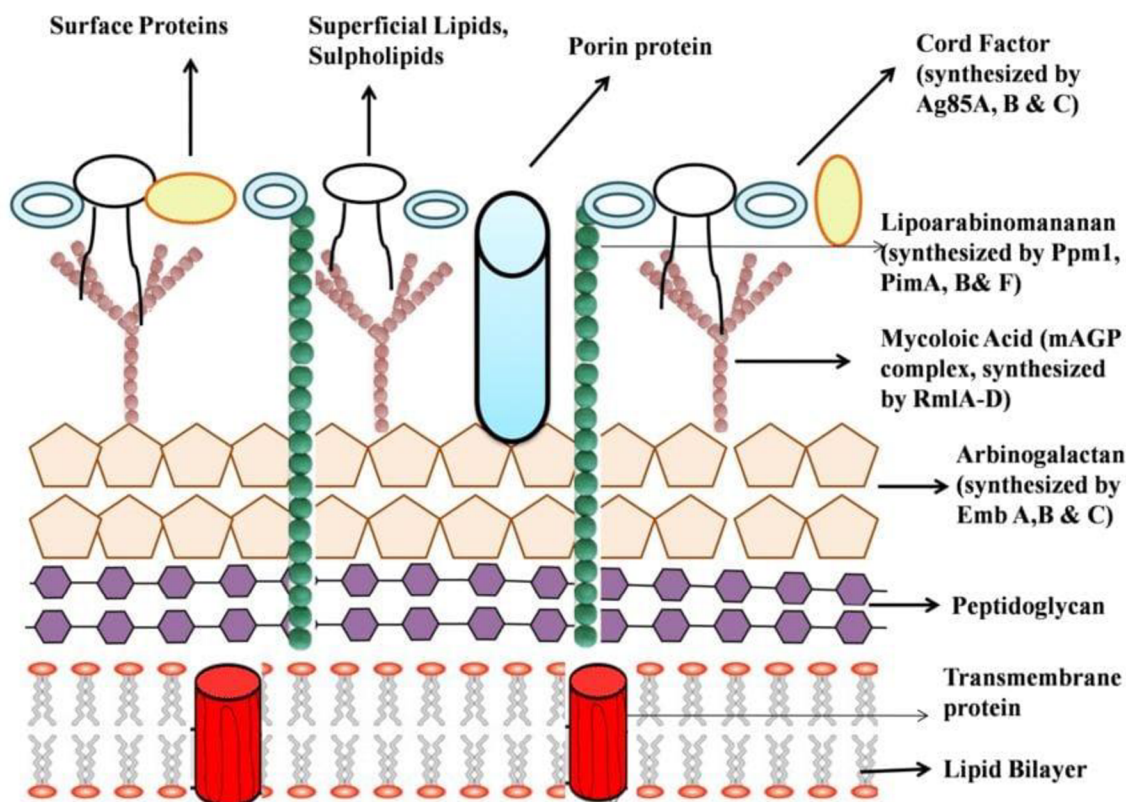
Mykobakterie neboli zástupci rodu *Mycobacterium* jsou součástí čeledi *Mycobacteriaceae*<sup>10</sup> a řádu *Actinomycetales*.<sup>14</sup> V 19. století popsal G. A. H. Hansen (1841-1912) mykobakterie jako původce malomocenství.<sup>15</sup> Mykobakterie jsou aerobní, nepohyblivé, nesporulující, grampozitivní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

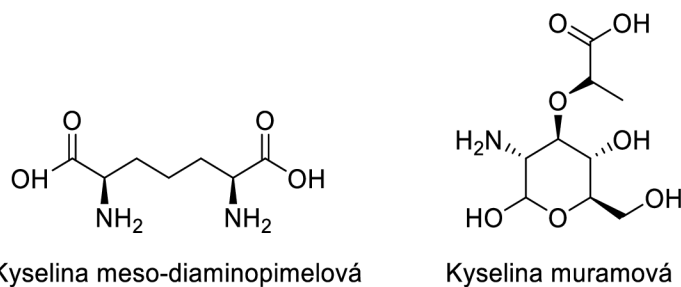
Na základě patogenity byly později mykobakterie rozděleny na tuberkulózní (pravé) mykobakterie a netuberkulózní mykobakterie (NTM).<sup>16</sup> Mezi tuberkulózní mykobakterie patří *Mycobacterium leprae* a zástupci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC).<sup>16</sup> Tyto bakterie nejsou schopny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

## 2.1 Stavba mykobakterií a chemické složení

Mezi základní složky mykobakterií patří lipidy, proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a pigmenty.<sup>7</sup> Mykobakterie se vyznačují specifickou buněčnou stěnou, která je hydrofobní, permeabilní a vyznačuje se vysokým podílem lipidické složky (Obr. 3).<sup>10</sup> Součástí buněčné stěny jsou peptidoglykolipidy (obsahující kyselinu meso-diaminopimelovou, alanin, kyselinu glutamovou, glukosamin, kyselinu muramovou, arabinózu a galaktózu), mykolové kyseliny a volné lipidy.<sup>10</sup> 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-formaci*.<sup>7</sup> Jádro mykobakterií obsahuje nukleové kyseliny.<sup>7</sup> Mykobakterie potřebují pro svůj život kromě kyslíku také dusík a uhlík.<sup>7</sup> Stopovými prvky v buňkách mykobakterií jsou sodík, draslík, hořčík, chlor, síra, fosfor a železo, které působí jako katalyzátory v dýchacích enzýmech.<sup>7</sup>



Obr. 3: Stavba mykobakteriální buněčné stěny.<sup>17</sup>



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

## 2.2 Tuberkulózní mykobakterie

Mezi tuberkulózní mykobakterie patří *Mycobacterium leprae* a bakterie komplexu MTBC.<sup>16</sup> V minulosti se předpokládalo, že TB je způsobena bakterií *Mtb*.<sup>12</sup> Později se uplatnila teorie, že tuberkulózu způsobuje více bakterií patřících do rodu *Mycobacterium*, které jsou označeny jako komplex MTBC.<sup>12</sup> V roce 2020 vyšel článek Kanipe a kol.,<sup>12</sup> 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 článku<sup>12</sup> u zmíněného seznamu citují Barbier a kol.,<sup>18</sup> Brites a kol.<sup>19</sup> a Orgeur a kol.<sup>20</sup>) Podle článku<sup>12</sup> jsou lidé nejcitlivější na *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* a *M. canetti*.<sup>12</sup> *M. bovis* je navíc považována za hlavního původce TB u zvířat.<sup>7,10</sup>

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.<sup>21,22</sup> Onemocnění, které *M. leprae* způsobuje, se nazývá lepra neboli malomocenství či Hansenova nemoc (dále jako HD).<sup>15,22</sup> Bakterie je obligátní nitrobuněčný parazit<sup>23</sup> interagující s keratocyty a makrofágy v kůži.<sup>22-24</sup> Bakterie působí i na myelinové a nemyelinové Schwannovy buňky,<sup>22,25</sup> a způsobuje tak jejich infekci vedoucí k nervovým poruchám.<sup>22,25</sup> Ačkoli hlavní cestou šíření HD je přenos z člověka na člověka,<sup>26</sup> pouze u 20 % lidí vystavených nákaze se vyvine aktivní forma nemoci díky genetickým obranným mechanismům.<sup>22,27</sup> V některých částech světa již byly zaznamenány rezistentní formy *M. leprae*.<sup>28</sup> Po zavedení multilékové terapie se výrazně snížil počet případů – z 5 milionů v 80. letech 20. století na 133 802 případů v roce 2021.<sup>29</sup> Jako zásadní krok k prolomení přenosu bylo doporučeno trasování kontaktů a jednodávková chemoprophylaxe rifampicinem.<sup>30</sup>

### 2.2.2 *Mycobacterium africanum*

Termínem *Mycobacterium africanum* se označují určité bakterie, které jsou významnou příčinou nákazy TB v západní Africe.<sup>31-32</sup> 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*.<sup>33-34</sup> V minulosti bylo pozorováno, že západoafrické řetězce *Mtb* jsou více biochemicky heterogenní než řetězce evropské.<sup>35</sup> Hoffner a kol.<sup>33</sup> provedli studii MTBC izolovaného v západoafrickém státě Guinea-Bissau,<sup>33</sup> 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*.<sup>33</sup> 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.<sup>33</sup> Collins a kol.<sup>36</sup> popsali 2 varianty *M. africanum* – varianta I (*African I variant*) a varianta II (*African II variant*).<sup>36</sup> Na základě svého výzkumu přiřadili Hoffner a kol.<sup>33</sup> biovary C a D k variantě I a biovar E k variantě II.<sup>33,36</sup> (pozn. označení biovarů písmeny A-E bylo vytvořeno za účelem sepsání této bakalářské práce) Podle studie Prat a kol.<sup>37</sup> tvoří bakterie *M. africanum* spojitě spektrum spojující na jedné straně *Mtb* a na druhé straně *M. bovis*.<sup>33,37</sup> Oproti tomu David a kol.<sup>34</sup> rozdělují *M. africanum* na 2 skupiny – jednu blížící se *Mtb* a druhou blížící se *M. bovis*.<sup>33,34</sup> 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*.<sup>35-34</sup>

### 2.2.3 *Mycobacterium bovis*

Původním hostitelským organismem bakterie *M. bovis* byl člověk,<sup>12</sup> 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.<sup>12</sup> Ze zvířat se jedná kromě již zmíněného dobytka o celou řadu dalších masožravců, všežravců a býložravců – Kanipe a kol.<sup>12</sup> na základě mnoha studií uvádí, že hostitelských druhů je přes 85.<sup>12</sup> Přestože hlavní příčinou nákazy člověka TB je *Mtb*, příčinou může být právě *M. bovis* nebo jiná bakterie z komplexu MTBC.<sup>12</sup> Kanipe a kol.<sup>12</sup> ve svém článku dále uvádí, že z čísla 10 milionů, což je počet nových případů TB v roce 2017 (podle WHO<sup>38</sup>), bylo 142 tisíc způsobeno právě *M. bovis*.<sup>12</sup> Podobně 12,5 tisíc úmrtí na TB z celkového počtu 1,6 milionů bylo způsobeno opět *M. bovis* (v roce 2017 podle WHO).<sup>12,38</sup> Nejčastější formou nákazy člověka bakterií *M. bovis* je konzumací produktů nakažených zvířat, například nepasterizovaného mléka.<sup>12,39,40</sup>

### 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.<sup>41,42</sup> Peterhans a kol.<sup>42</sup> 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.<sup>42</sup> Podle Burthe a kol.<sup>43</sup> je přírodním rezervoárem *M. microti* hraboš polní (*Microtus agrestis*).<sup>43</sup>

### 2.2.5 *Mycobacterium pinnipedii*

V roce 2003 vyšel článek Cousins a kol.,<sup>44</sup> ve kterém je tato bakterie popsána jako nový zástupce komplexu MTBC, který způsobuje TB u mořských savců.<sup>44</sup> První zmínka o tomto patogenu nicméně pochází již z roku 1913, kdy v novozélandské veterinářské zprávě byli popsáni nakažení ploutvonožci.<sup>45,46</sup> *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.<sup>45,47-48</sup>

### 2.2.6 *Mycobacterium caprae*

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

## 3 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* je nejčastějším původcem TB u člověka.<sup>7</sup> Generační čas in vitro je za optimálních podmínek 14-15 hodin, optimální teplota 37 °C a optimální pH 6,4-7,0.<sup>7</sup> Velikost buňky je 0,3-0,6 × 1,4 μm.<sup>7</sup> 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.<sup>10</sup> Mezi receptory hostitele, které rozpoznávají

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

Prozánětlivá odpověď vede k aktivaci jadrového transkripčního faktoru (NF)-κB a produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů a oxidu dusného.<sup>10</sup> Kromě makrofágů a dendritických buněk se na imunitní odpovědi vůči mykobakteriím podílejí také další složky imunitního systému, například T lymfocyty.<sup>10</sup> Jedním z obranných mechanismů makrofágů je fúze fagosomů s lysozomy obsahujícími baktericidní dusíkové metabolity.<sup>10</sup> Jiný mechanismus je založený na ubikvitinylovaných peptidech, které narušují buněčnou stěnu *Mtb*.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup> RD1 je obsažen u všech virulentních kmenů *Mtb* a *M. bovis*, chybí u vakcinačního kmene *M. bovis*.<sup>10</sup>

## 4 Vakcinace

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

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

První vakcína BCG byla podána v roce 1921, masová aplikace však započala až po druhé světové válce.<sup>10</sup> Zásluhy na šíření a aplikaci BCG měly v té době zejména skandinávský Červený kříž, UNICEF a později WHO.<sup>10</sup> Z důvodu rozdílných závěrů konkrétních institucí docházelo k různým přístupům států ke kalmetizaci.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup> Většina států následně zavedla rutinní kalmetizaci při, nebo těsně po narození, naopak USA a Nizozemsko se rozhodli využívat vakcínu jen ve výjimečných případech.<sup>10</sup>

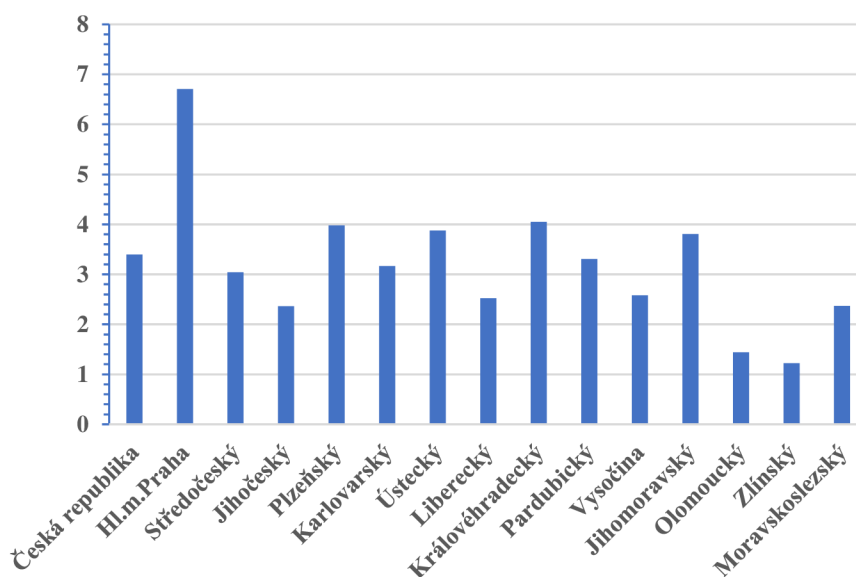
V současné době je plošná vakcinace novorozenců aplikována v řadě zemí Afriky, Asie (včetně Japonska) a Latinské Ameriky.<sup>10</sup> Z evropských zemí sem patří Polsko, Maďarsko a některé další státy v Pobaltí a na Balkánském poloostrově.<sup>10</sup> Ve většině evropských zemí (včetně České republiky),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

(údaje o evropských zemích pochází z mapy na Obr. 17.1 v knize Solovič, Vašáková: Tuberkulóza ve faktech a obrazech<sup>10</sup>; str. 246)

## 5 Epidemiologie *Mtb* v ČR

Česká republika se řadí mezi země s nejnižším výskytem TB v Evropě.<sup>10</sup> Od konce 90. let 20. století docházelo k poklesu ročních počtů hlášených případů TB, od roku 2013 jsou tato čísla téměř neměnná.<sup>10</sup> 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).<sup>54</sup> Z této hodnoty představovalo 90,2 % případů onemocnění plic.<sup>54</sup> Stejně jako v globálním měřítku trpí v České republice TB převážně muži (70 % případů).<sup>54</sup> 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).<sup>54</sup> 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).<sup>54</sup> 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*<sup>54</sup> 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*<sup>54</sup>

V roce 1953 byla v Československu zavedena plošná kalmetizace novorozenců, což spolu s dalšími opatřeními vedlo k rapidnímu poklesu nákazy TB do konce století.<sup>10,55</sup> 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.<sup>10</sup>

## 6 Léčba tuberkulózy

V knize *Tuberkulóza ve faktech a obrazech* (Maxdorf 2019)<sup>10</sup> na straně č. 175 uvádí I. Solovič a I. Porvazník zásady léčby tuberkulózy.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup>

## 6.1 Léčebné režimy

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

Antituberkulotická léčba musí být kombinovaná, aby se zamezilo vzniku rezistence mykobakterií na antituberkulotika.<sup>10</sup> Kombinovaná léčba TB antituberkulotiky bývá označena kombinací písmen představující jednotlivá antituberkulotika, například označení HRE představuje použití izoniazidu (H), rifampicinu (R) a ethambutolu (E).<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup>

## 6.2 Antituberkulotika

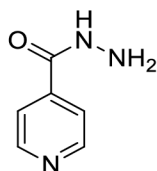
Antituberkulotika mají v různé míře zastoupení 3 vlastnosti – jsou baktericidní, mají schopnost sterilizace prostředí a schopnost prevence vzniku rezistence mykobakterií.<sup>10</sup> Do skupiny antituberkulotik patří zejména antibiotika streptomycin, rifampicin, kapreomycin a cykloserin a chemoterapeutika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

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

a pyrazinamid.<sup>10</sup> Tyto látky se používají k léčbě tuberkulózy v určitých kombinacích, které předcházejí vzniku rezistivity.<sup>10</sup> Rezervní antituberkulotika jsou toxičtější, používají se pouze v případě neúspěšnosti léčby základními antituberkulotiky.<sup>10</sup> Do této skupiny patří například streptomycin.<sup>10</sup> 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 izonikotinové<sup>10</sup> (syntetické analogum pyridoxinu<sup>10</sup>), jehož strukturní vzorec je na Obr. 6. Patří k neúčinnějším antituberkulotikům a je možné ho použít pro všechny formy plicní a mimoplicní tuberkulózy.<sup>10</sup> Kvůli rychlému vzniku rezistence se ve většině případů podává v kombinaci s dalšími antituberkulotiky.<sup>10</sup> Isoniazid je aktivován mykobakteriální peroxidázou (KatG).<sup>10</sup> Mutací nebo delecí genu kódujícího KatG dochází u mykobakterií ke vzniku rezistence na izoniazid.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup> Isoniazid bývá rychle vstřebáván z trávicího traktu a maximální hladiny v krvi je dosaženo po 1-2 hodinách od podání.<sup>10</sup> Mezi izoniazidem a jinými antituberkulotiky se většinou nevyskytuje zkřížená rezistence.<sup>10</sup> Isoniazid je metabolizován v játrech, převážně acetylací.<sup>10</sup> Biologický poločas rozpadu se pohybuje mezi 1,5-4 hodinami.<sup>10</sup> Mezi nežádoucí účinky patří deficit pyridoxinu vedoucí k periferní polyneuritidě, dále riziko onemocnění hepatitidou nebo neuritida zřetelného nervu.<sup>10</sup> Isoniazid také inhibuje metabolismus některých léčiv v játrech.<sup>10</sup> Obecně se však izoniazid považuje za bezpečný lék i v době těhotenství.<sup>10</sup>

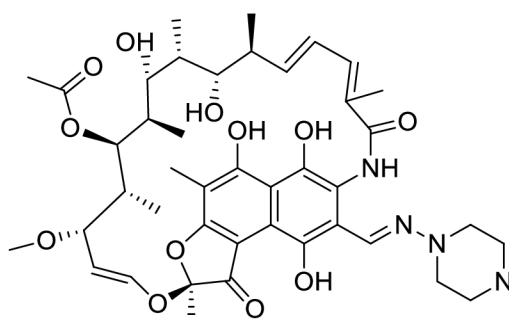


Obr. 6: Isoniazid

### 6.2.2 Rifampicin (R)

Rifampicin (derivát rifamycinu) je širokospektrální antibiotikum, které působí kromě mykobakterií i na chlamydie, legionely a *Staphylococcus aureus*.<sup>10</sup> Strukturní vzorec rifampicinu je na Obr. 7.<sup>10</sup> Podobně jako v případě izoniazidu se kvůli rychlému vzniku

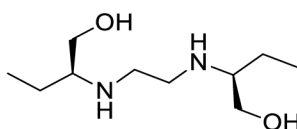
rezistence používá v kombinaci s jinými antituberkulotiky.<sup>10</sup> Rifampicin se rychle vstřebává, při perorálním podání je dosaženo maximální sérové koncentrace 1-3 hodiny po aplikaci.<sup>10</sup> Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bakteriálních nukleových kyselin vazbou na  $\beta$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



**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*.<sup>10</sup> Ethambutol zabraňuje včlenění D-arabiny do arabinogalaktanu, a tím znemožňuje výstavbu buněčné stěny.<sup>10</sup> Ethambutol navíc ovlivňuje syntézu nukleových kyselin bakterií.<sup>10</sup> Ethambutol je dobře vstřebatelný, většina látky je následně z těla vyloučena v nezmetabolizované formě.<sup>10</sup> 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.<sup>10</sup>

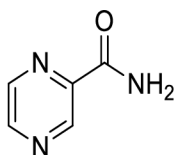


**Obr. 8:** Ethambutol



#### 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  $pH$ .<sup>10</sup> Pyrazinamid mění mykobakteriemi produkovanou pyrazinamidázu na pyrazinovou kyselinu.<sup>10</sup> Tato kyselina snižuje  $pH$  ve fagozomech, což je pro mykobakterie toxické.<sup>10</sup> Mutace mykobakteriálního genu *pncA*, zodpovědného za tvorbu pyrazinamidázy, způsobuje vznik rezistence mykobakterií na pyrazinamid.<sup>10</sup> Metabolismus pyrazinamidu probíhá v játrech, biologický poločas rozpadu se pohybuje v rozsahu 9-10 hodin.<sup>10</sup>



Obr. 9: Pyrazinamid

## 7 ATP synthasa a inhibitory

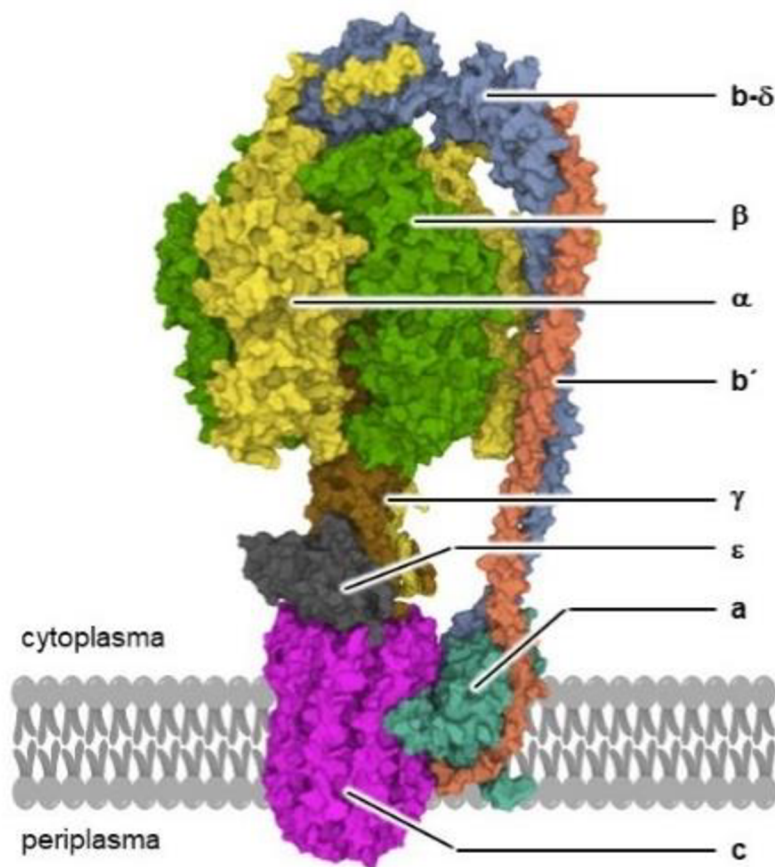
V průběhu let se vyskytlo mnoho skutečností, které komplikují léčbu TB. Kromě problémů, které způsobuje nákaza HIV viry, migrace obyvatelstva, obezita, alkoholismus a další jevy, je jednou z nejvýznamnějších komplikací léčby vysoká rezistivita *Mycobacterium tuberculosis* na současná léčiva.<sup>1,2</sup> Touto vlastností se vyznačují zejména konkrétní bakteriální kmeny *Mycobacterium tuberculosis* nazývané v angličtině *multidrug-resistant strains* (MDR) a *extensively-drug-resistant strains* (XDR).<sup>2</sup> 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.<sup>2</sup>

Jedním z validovaných klinických cílů je enzym  $F_1F_0$  ATP synthasa.<sup>2</sup> Mezi sloučeniny, které jsou schopné vazby na tento enzym, patří například diarylchinolinové léčivo bedaquilin (BDQ).<sup>2,4</sup> Důkazy vzniku rezistence na BDQ vedly k potřebě hledání dalších inhibitorů  $F_1F_0$  ATP synthasy.<sup>2,56,57</sup>

### 7.1 $F_1F_0$ ATP synthasa

Na Obr. 10 je vyobrazena struktura enzymu  $F_1F_0$  ATP synthasa. Mykobakteriální enzym se nachází na cytoplazmatické membráně bakterie.<sup>3</sup> V obecné rovině se jedná o bifunkční enzym, který je schopen adenosintrifosfát syntetizovat a zároveň hydrolyzovat, nicméně

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



**Obr. 10:** Mykobakteriální  $F_1F_0$  ATP synthasa

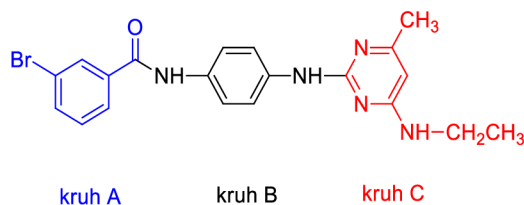
## 7.2 Inhibitory mykobakteriální ATP synthasy

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.<sup>4</sup> Unikátnost této látky spočívá v selektivě působení pouze na mykobakterie, na ostatní bakterie je neúčinný.<sup>4</sup>

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,<sup>59</sup> pyrazolopyrazinony<sup>60</sup> či squaramidy.<sup>6,58</sup>

### 7.3 GaMF1

Článek autorů Adam Hotra a kol.<sup>2</sup> publikovaný v roce 2020 představuje sloučeninu, jejíž strukturální vzorec je znázorněn na Obr. 11.<sup>2</sup> Tato sloučenina je nazvána GaMF1 a je prezentována jako nový inhibitor mykobakteriální *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthasy*.<sup>2</sup> Podle článku vykazuje sloučenina GaMF1 hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC<sub>50</sub>) 11 μM pro *M. smegmatis*, 17 μM pro *M. bovis* a 33 μM pro *Mtb* H37Rv.<sup>2</sup>



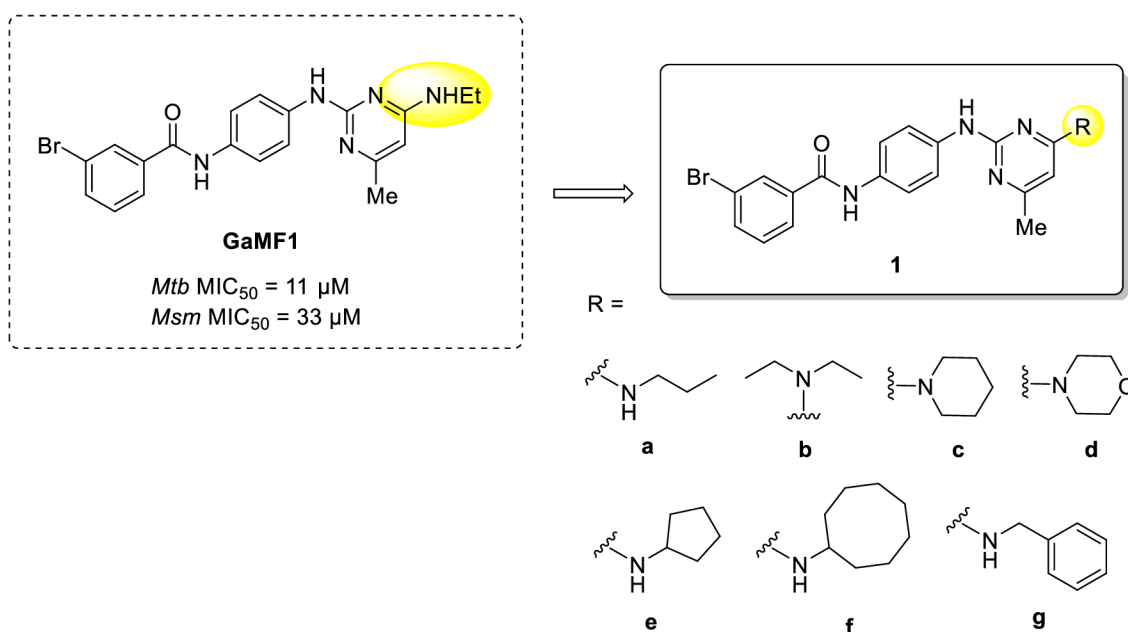
**Obr. 11:** GaMF1 s vyznačením stavebních kruhů

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

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

## Výsledky a diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodu, cílem bakalářské práce byla syntéza derivátů odvozených od sloučeniny GaMF1.<sup>2</sup> Ve zmíněném článku autoři popisují, že látka GaMF1 a její analoga cílí na  $\gamma$ -podjednotku mykobakteriální ATP synthasy.<sup>2</sup> 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).

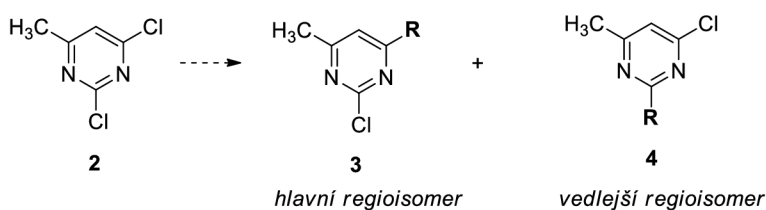


Obr. 12: Návrh nových analog odvozených od sloučeniny GaMF1.

## 8 Syntéza nových analog GaMF1

Syntéza finálních látek byla navržena podle Hotra a kol.<sup>2</sup> 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:

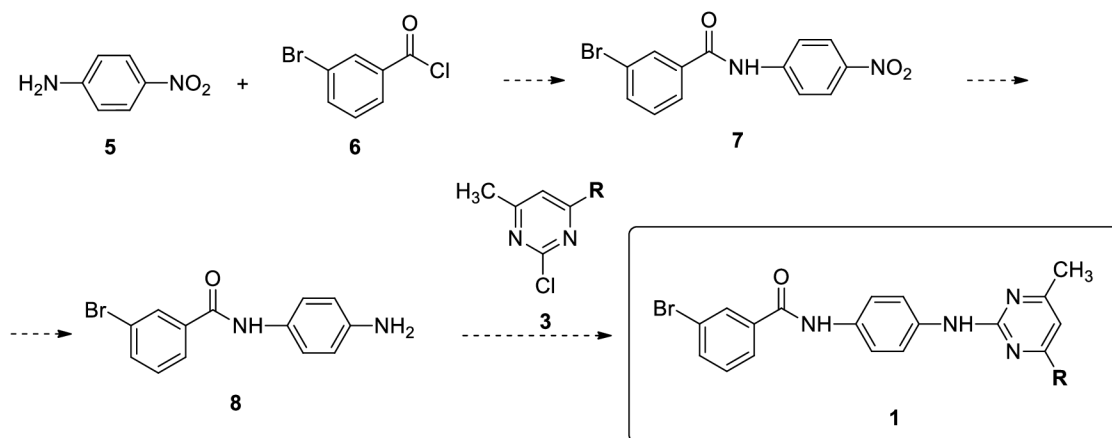
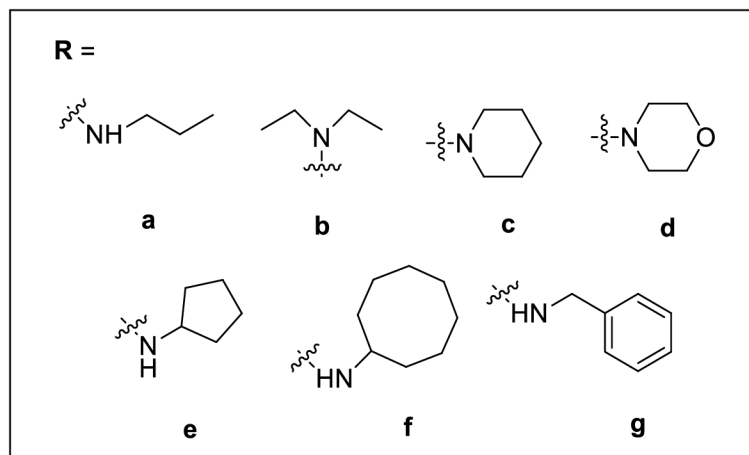
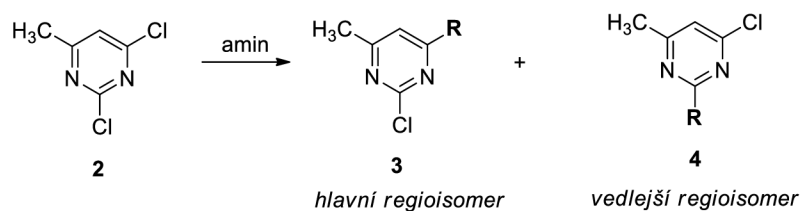


Schéma 1: Navržené schéma syntézy derivátů 1

## 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.



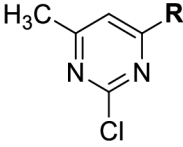
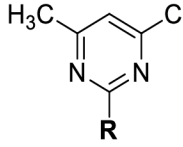
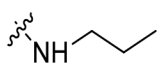
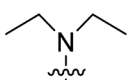
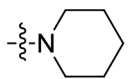
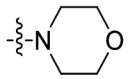
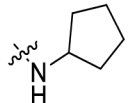
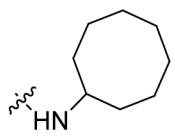
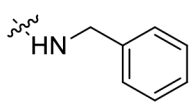
**Schéma 2:** Příprava derivátů pyrimidinu

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  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  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**.<sup>2</sup>

**Tabulka 1:** Souhrn výtěžků při přípravě jednotlivých prekurzorů

	výtěžek	
substituent <b>R</b>	 <b>3</b>	 <b>4</b>
	<b>3a</b> 40 %	<b>4a</b> 12 %
	<b>3b</b> 51 %	<b>4b</b> 9 %
	<b>3c</b> 51 %	<b>4c</b> 15 %
	<b>3d</b> 7 %	<b>4d</b> 2 %
	<b>3e</b> 43 %	<b>4e</b> 17 %
	<b>3f</b> 22 %	<b>4f</b> 5 %
	<b>3g</b> 39 %	<b>4g</b> 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.,<sup>2</sup> 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 %.

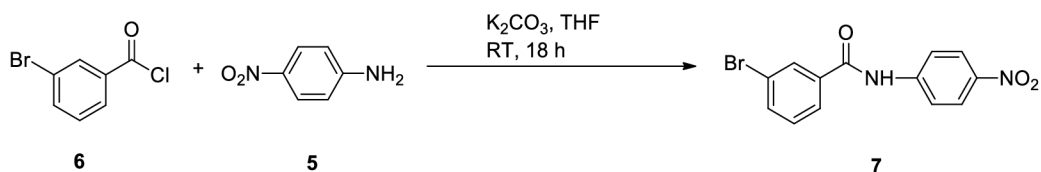


Schéma 3: Příprava sloučeniny **7**

## 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 PtO<sub>2</sub>.





**Schéma 4:** Redukce sloučeniny **7**

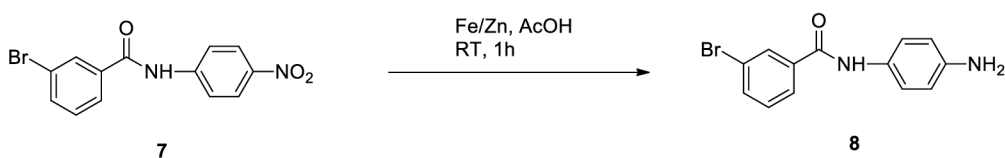
### 8.3.1 Redukce nitrosloučeniny kovem v kyselém prostředí

#### 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

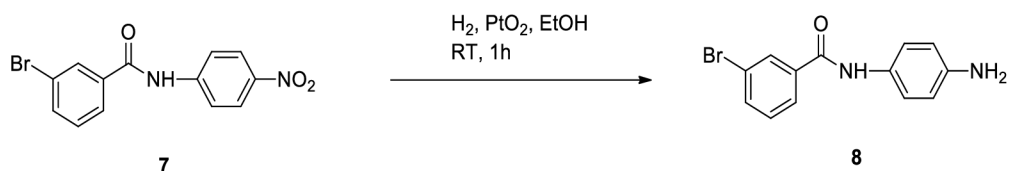
### 8.3.2 Katalytická redukce nitrosloučeniny vodíkem

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

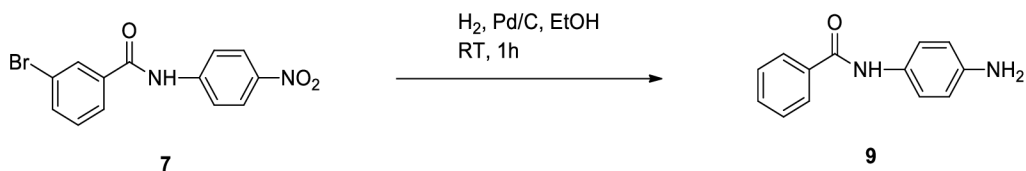
hodnotím jako výhodu reakce, nevýhodou je náročnější manuální provedení. Do reakční směsi musí být nejprve pomocí balonku zavedena inertní atmosféra (pro tento případ zvolen dusík) a následně je potřeba tuto inertní atmosféru nahradit reakční atmosférou vodíku. Po ukončení reakce je potřeba odfiltrovat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



**Schéma 6:** Redukce sloučeniny **7** vodíkem za katalýzy PtO<sub>2</sub>

#### 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.



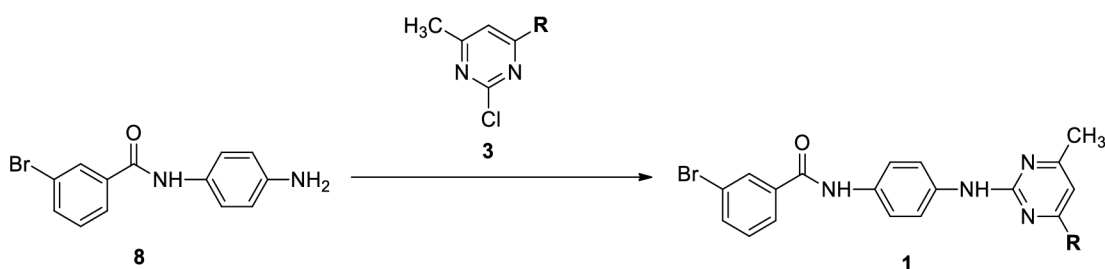
**Schéma 7:** Redukce sloučeniny **7** vodíkem za katalýzy palladiem – reálný průběh

Z výsledků vyplývá, že pro redukcí nitrosloučeniny **7** na aminosloučeninu **8** je nevhodnější redukce vodíkem za katalýzy Adamsonovým katalyzátorem (PtO<sub>2</sub>). Redukce zinkem v kyselém prostředí je nevhodná z důvodu komplikované purifikace sloupcovou chromatografií. Redukce železem v kyselém prostředí se ukázala být vhodnější než redukce zinkem, nicméně požadovaný produkt **8** není v reakční směsi obsažen v takové čistotě jako v případě redukce vodíkem za účasti katalyzátoru. Dále bylo zjištěno, že pro provedení redukce 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 PtO<sub>2</sub>. 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.



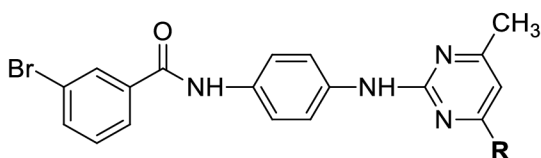
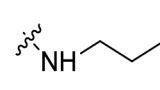
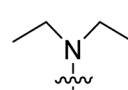
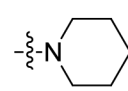
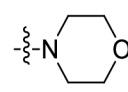
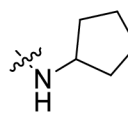
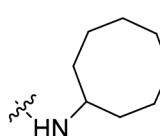
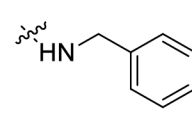
**Schéma 8:** Obecné schéma přípravy finální sloučeniny; **R** = aminový substituent

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 <b>R</b>	
	<b>1a</b> 19 %
	<b>1b</b> 43 %
	<b>1c</b> 19 %
	<b>1d</b> 9 %
	<b>1e</b> neúspěšná syntéza
	<b>1f</b> neúspěšná syntéza
	<b>1g</b> 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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.

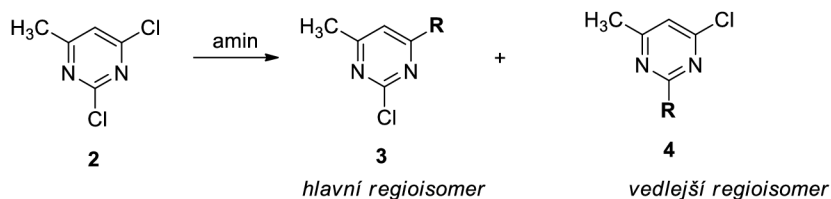
Analýzy LC-MS jsou prováděny pomocí ULC-MS-MS systému (Waters) složeného z ULC-MS chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s kvadrupolem. Byla použita Nucleodur Gravity C18 kolona při rychlosti průtoku 600  $\mu\text{l}/\text{min}$  a teplotě 30 °C. Mobilní fáze představuje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

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla pořízena za laboratorní teploty v rozpouštědle DMSO-*d*<sub>6</sub> pomocí spektrometru JEOL ECA400II pracujícího za magnetické indukce 9,39 T. Chemické posuny ( $\delta$ ) 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  $\mu\text{m}$  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.

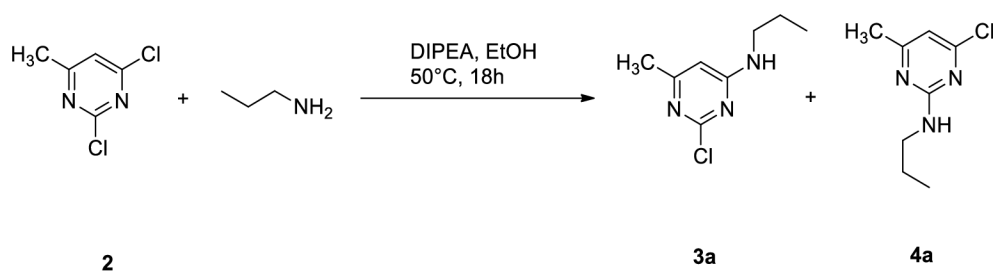
# 10 Příprava analog GaMF1

## 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  $\mu$ l propylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428  $\mu$ 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 %.

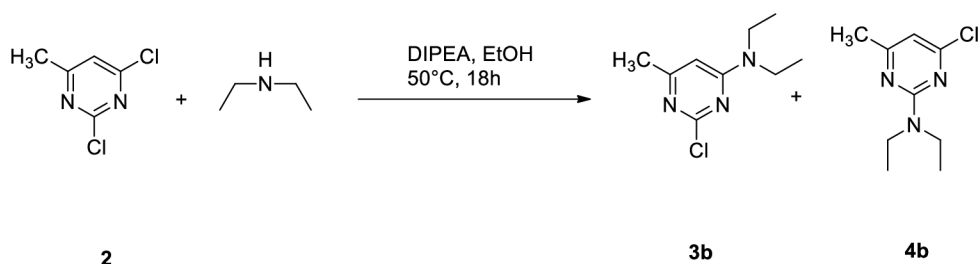
#### Majoritní isomer **3a**:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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  $\mu\text{l}$  diethylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428  $\mu\text{l}$  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 (**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 %.

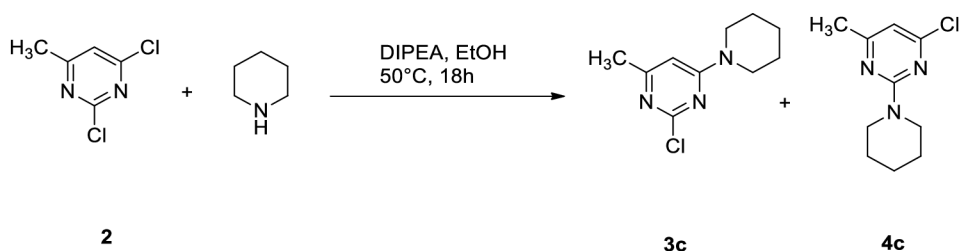
### Majoritní isomer 3b:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.10 (s, 1H), 3.48 (br. s, 4H), 2.31 (s, 3H), 1.18 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.32 (s, 1H), 3.60 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.17 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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  $\mu$ l piperidinu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 534  $\mu$ 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 %.

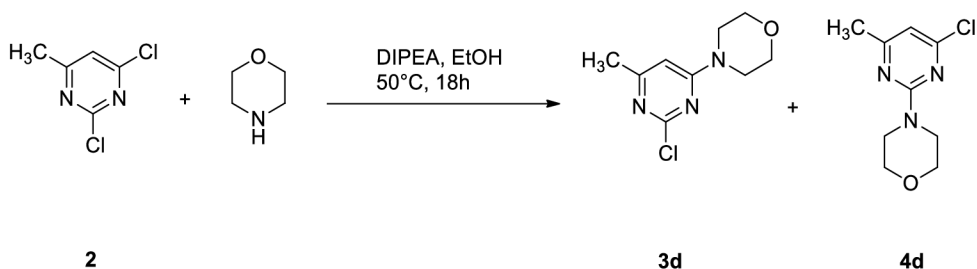
#### Majoritní isomer 3c:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.21 (s, 1H), 3.65 – 3.51 (m, 4H), 1.72 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.55 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  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 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (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 %.

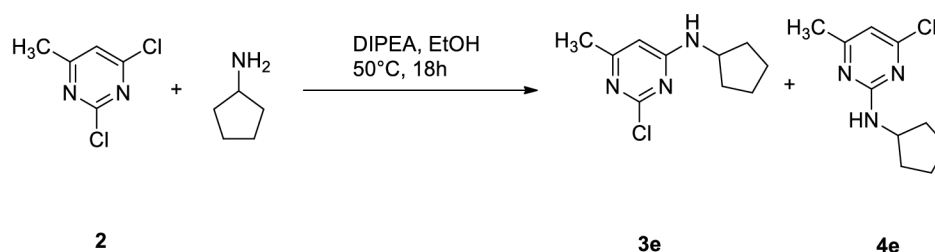
#### Majoritní isomer **3d**:

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.22 (s, 1H), 3.77 – 3.72 (m, 4H), 3.66 – 3.55 (m, 4H), 2.33 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.20, 163.59, 160.50, 99.76, 66.50, 44.44, 24.17. HRMS: m/z vypočteno pro C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O<sup>+</sup>: 214,0742 [M+H]<sup>+</sup>; nalezeno: 214,0741.

#### Minoritní isomer **4d**:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.42 (s, 1H), 3.85 – 3.78 (m, 4H), 3.77 – 3.71 (m, 4H), 2.30 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.46, 161.54, 161.21, 108.92, 66.93, 44.41, 23.72. HRMS: m/z vypočteno pro C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O<sup>+</sup>: 214,0742 [M+H]<sup>+</sup>; 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 %.

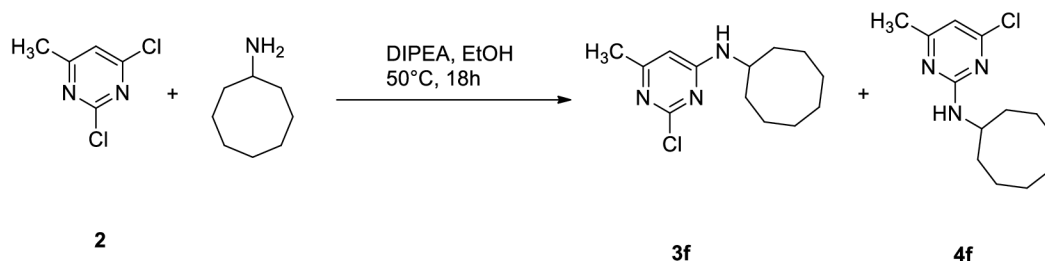
### Majoritní isomer 3e:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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  $\mu\text{l}$  cyklooktylamínu (1,23 mmol) a 428  $\mu\text{l}$  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 (**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 %.

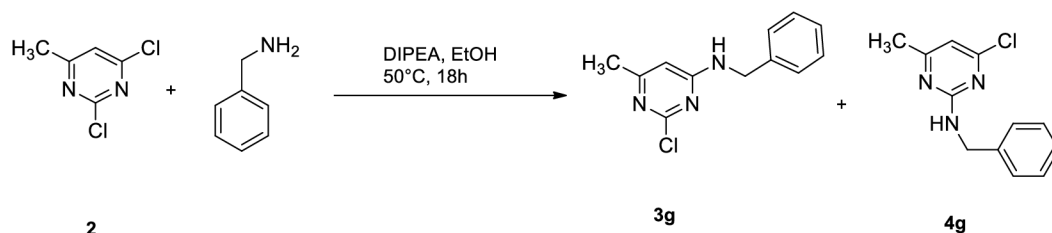
### Majoritní isomer 3f:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, )  $\delta$  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:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, )  $\delta$  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  $\mu\text{l}$  benzylaminu (1 ekvivalent; 1,23 mmol) a 428  $\mu\text{l}$  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 (**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 %.

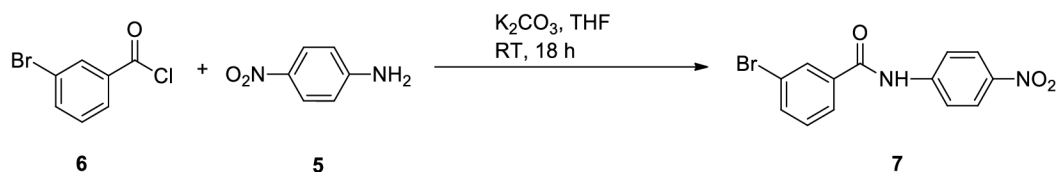
### Majoritní isomer 3g:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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:

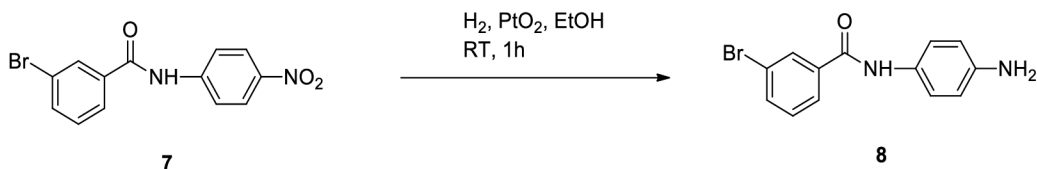
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35 – 7.24 (m, 5H), 6.47 (s, 1H), 5.62 (br. s, 1H), 4.64 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 2.30 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, )  $\delta$  169.80, 162.18, 161.34, 138.84, 128.73, 127.70, 127.47, 109.74, 45.61, 23.98. HRMS:  $m/z$  vypočteno 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



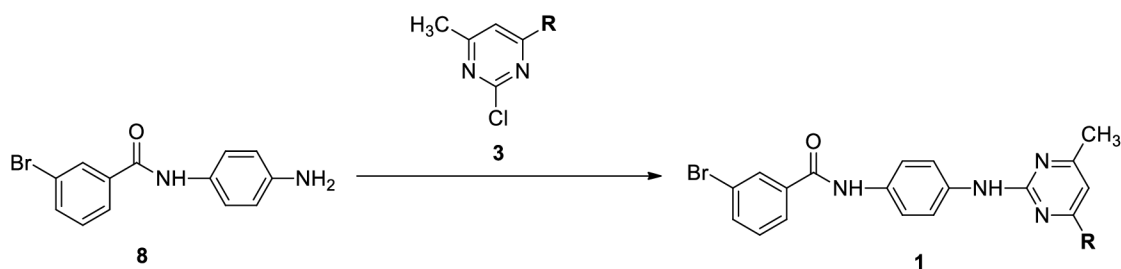
Do reakční baňky bylo odváženo 1000 mg *p*-nitroanilinu (7,24 mmol) a 2000 mg  $K_2CO_3$  (2 ekvivalenty; 14,48 mmol). (pozn. molární hmotnost  $K_2CO_3$  je téměř totožná s molární hmotností *p*-nitroanilinu) Ke směsi bylo přidáno 20 ml THF a 956  $\mu$ l 3-brombenzoylchloridu (1 ekvivalent; 7,24 mmol). 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 %.

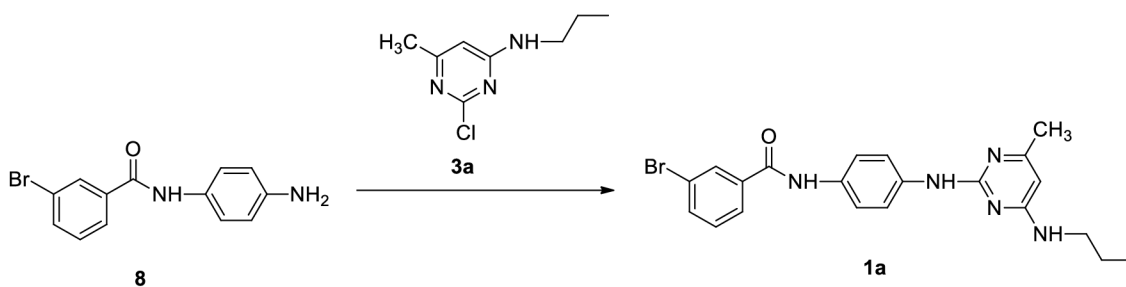
## 10.4 Příprava finálních sloučenin



**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**.

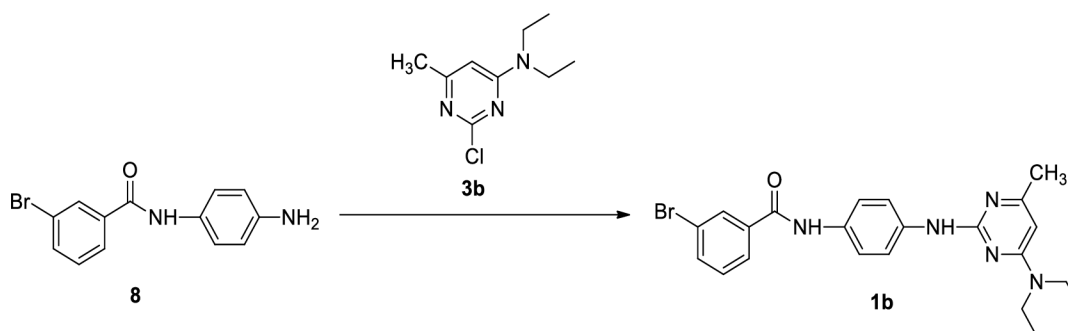
### 10.4.1 Příprava finální sloučeniny 1a



Do reakční vialky bylo odváženo 128 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidu **8** (0,44 mmol) a 82 mg isomeru **3a** (1 ekvivalent; 0,44 mmol). Ke směsi byly přidány 2 ml suchého DMF a 76  $\mu$ 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 MgSO<sub>4</sub>, 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 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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.

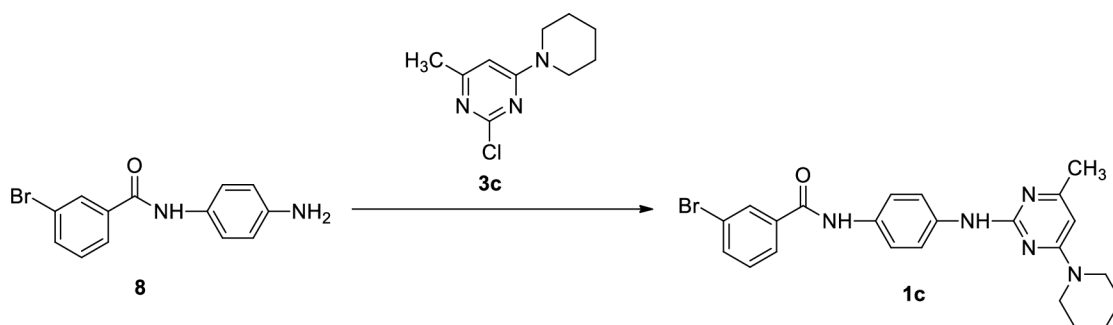
#### 10.4.2 Příprava finální sloučeniny 1b



Do reakční vialky bylo odváženo 131 mg *N*-(4-aminofenyl)-3-brombenzamidů (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  $\mu\text{l}$  DIPEA (1 ekvivalent; 0,45 mmol). Reakční směs byla umístěna na magnetickou míchačku k reakci při 140  $^{\circ}\text{C}$ . 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  $\text{MgSO}_4$ , 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 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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.

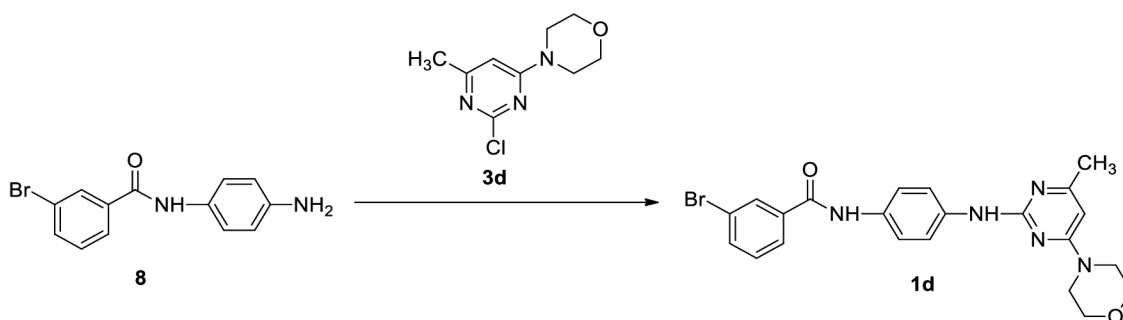
### 10.4.3 Příprava finální sloučeniny 1c



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  $\mu$ 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 MgSO<sub>4</sub> 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 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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 C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>5</sub>O<sup>+</sup>: 466,1237 [M+H]<sup>+</sup>; nalezeno: 468,1216.

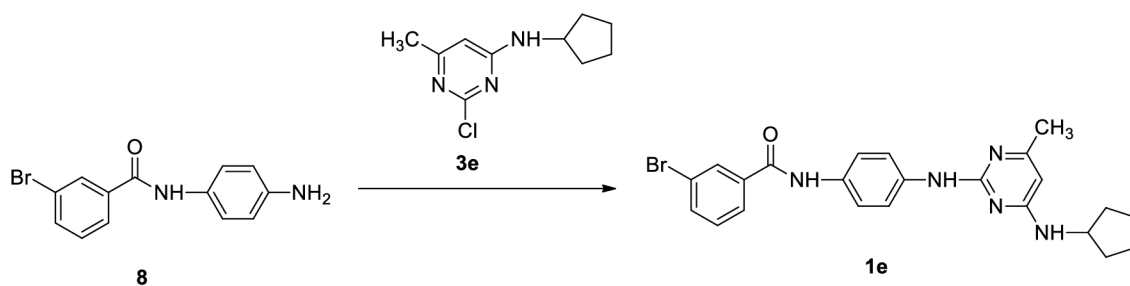
### 10.4.4 Příprava finální sloučeniny 1d



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  $\mu$ 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 MgSO<sub>4</sub>, 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 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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 C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 468,1030 [M+H]<sup>+</sup>; nalezeno: 468,1033.

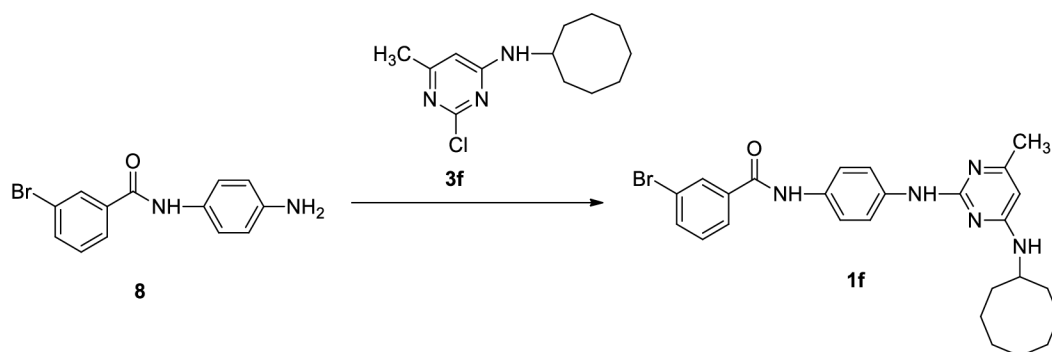
#### 10.4.5 Příprava finální sloučeniny **1e**



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  $\mu$ 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.**

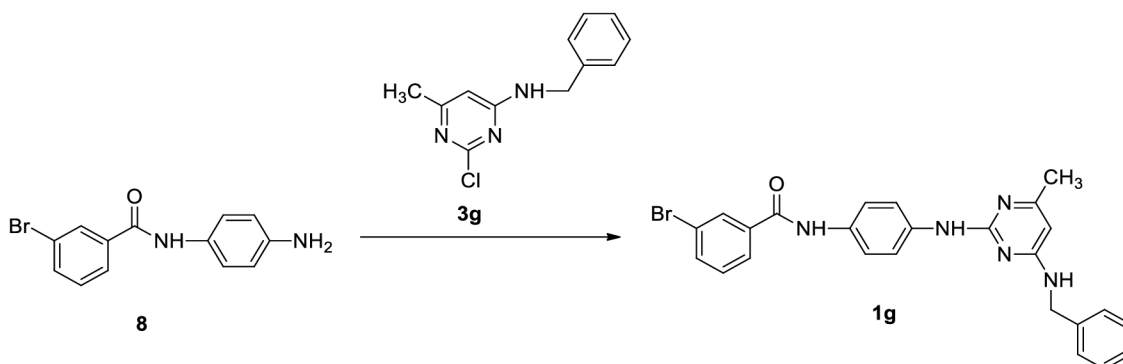


#### 10.4.6 Příprava finální sloučeniny 1f



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 *F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> 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 redukcí 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 zkratk

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](https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1).
- (9) [https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab\\_2](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.; Rüscher-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.* **1974**, *49*:53-62.
- (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>.

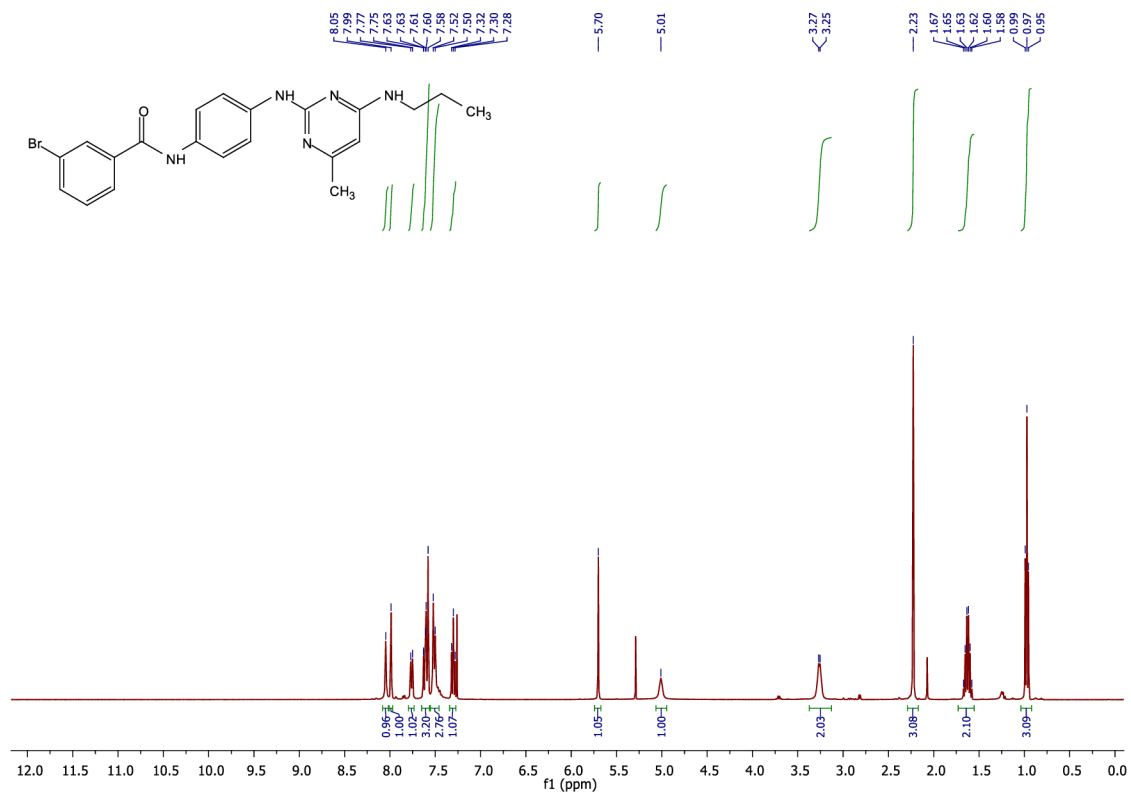
- (41) Pym, A. S.; Brodin, P.; Brosch, R.; Huerre, M.; Cole, S. T. Loss of RD1 Contributed to the Attenuation of the Live Tuberculosis Vaccines *Mycobacterium Bovis* BCG and *Mycobacterium Microti*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46* (3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x>.
- (42) Peterhans, 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/ijs.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.; Rüsck-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/ijms.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.; Demoitie, 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>.

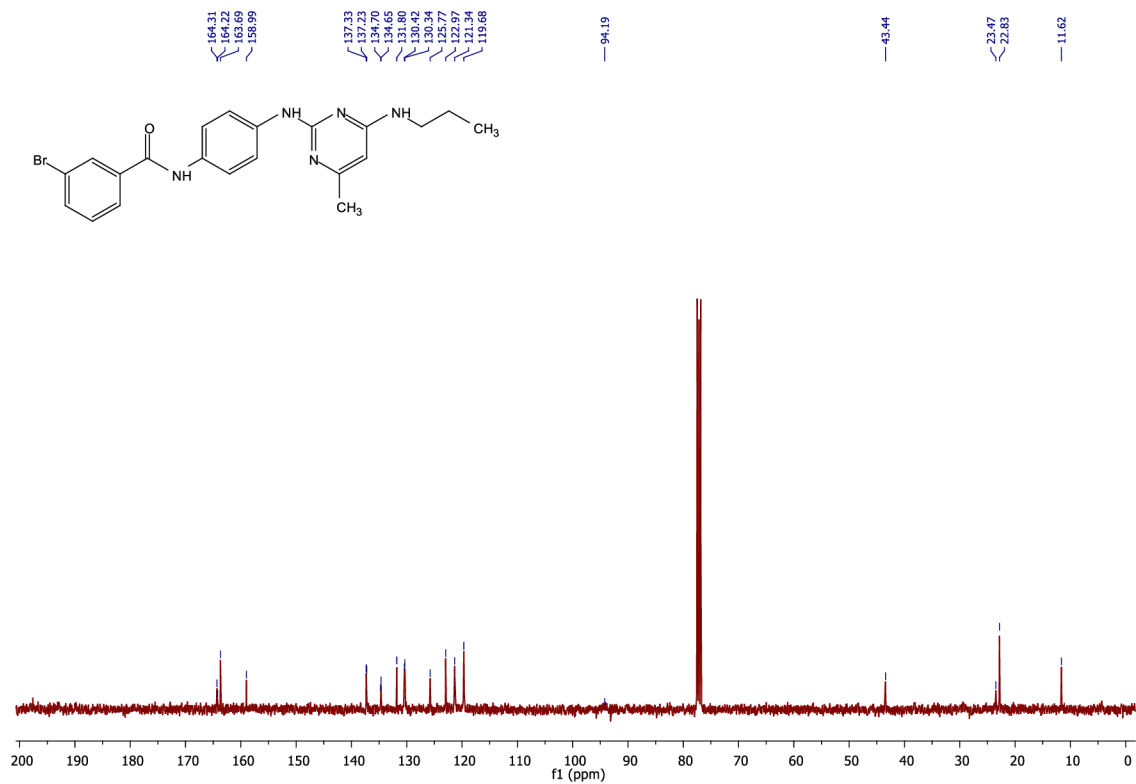
- (54) Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky. *Základní Přehled Epidemiologické Situace ve Výskytu Tuberkulózy v České Republice v Roce 2021*.
- (55) Dolezalova, K.; Maly, M.; Wallenfels, J.; Gopfertova, D. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Children in the Czech Republic in the Period 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**

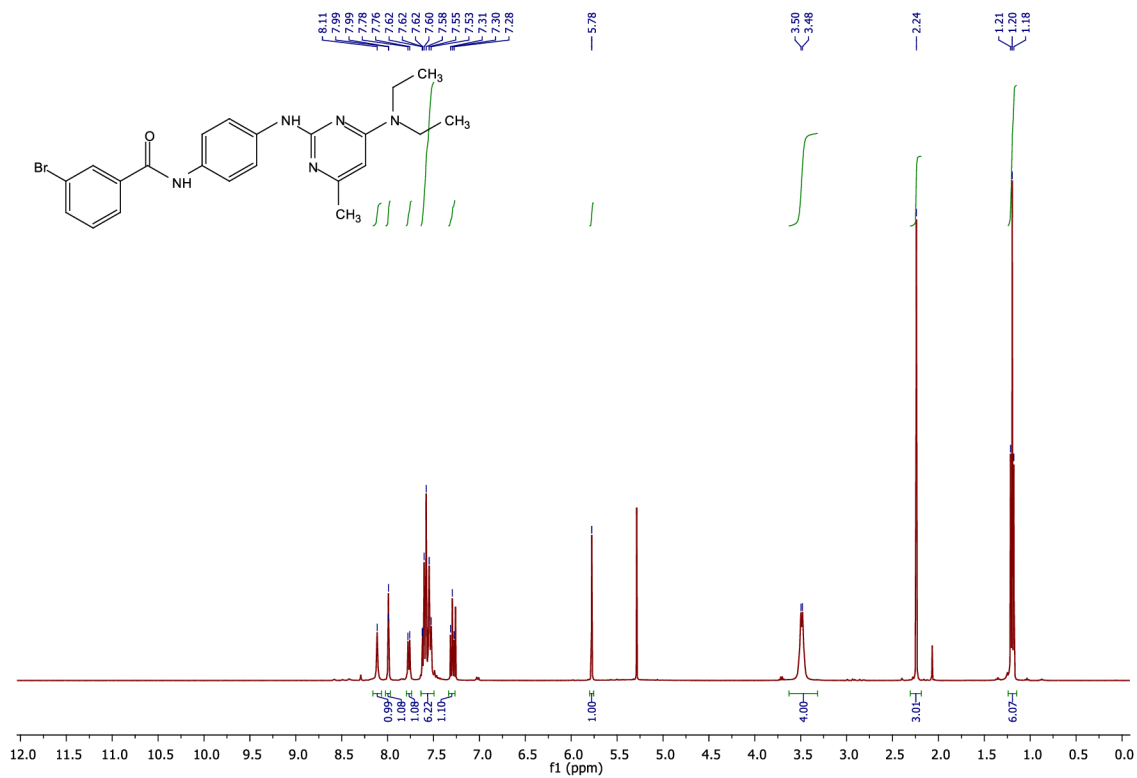
## Příloha 1: $^1\text{H}$ spektrum látky 1a



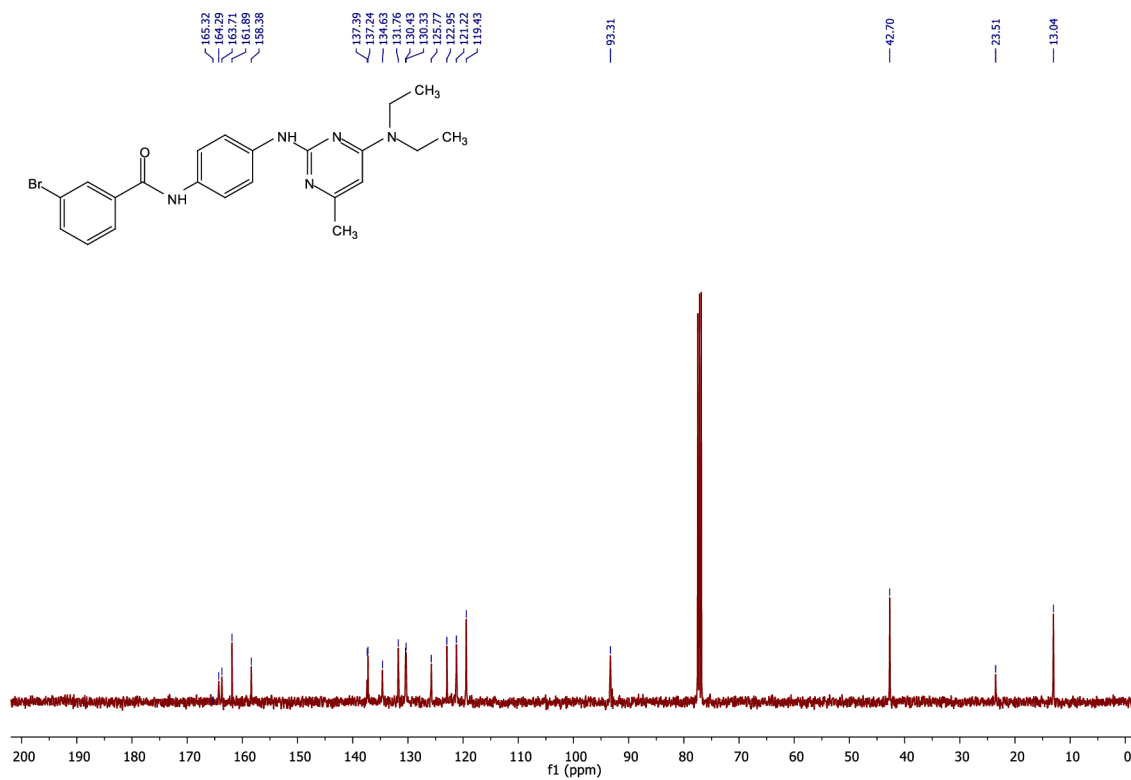
## Příloha 2: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 1a



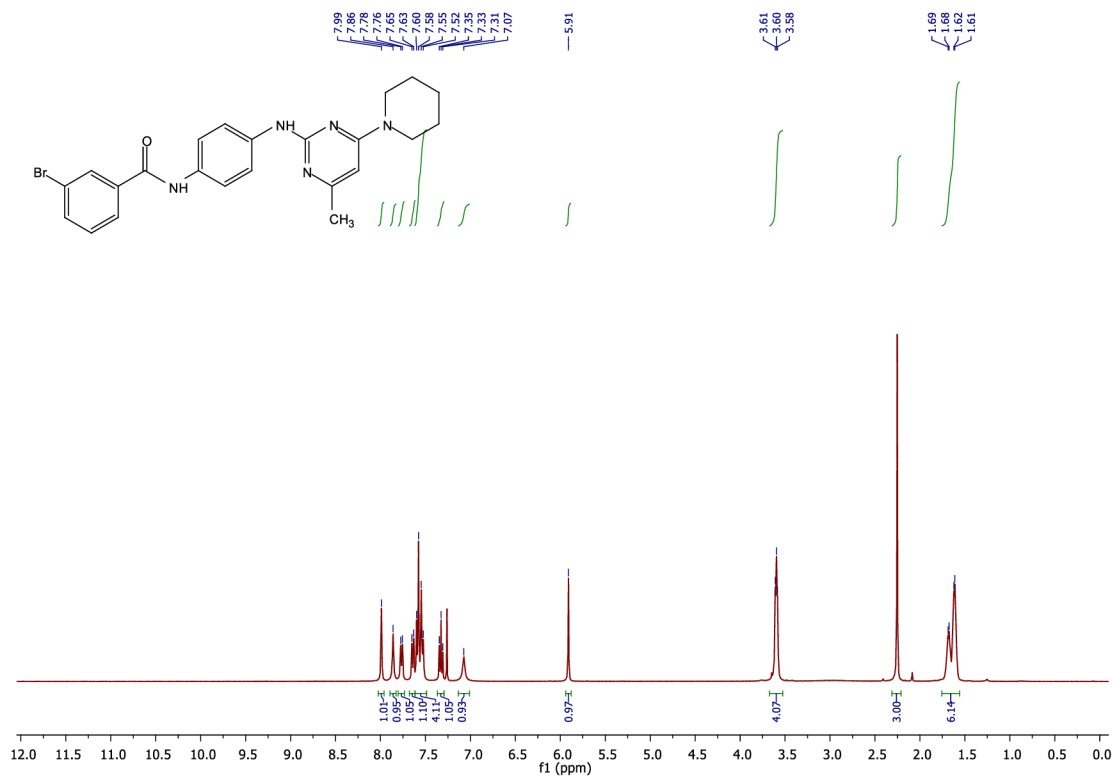
### Příloha 3: $^1\text{H}$ spektrum látky 1b



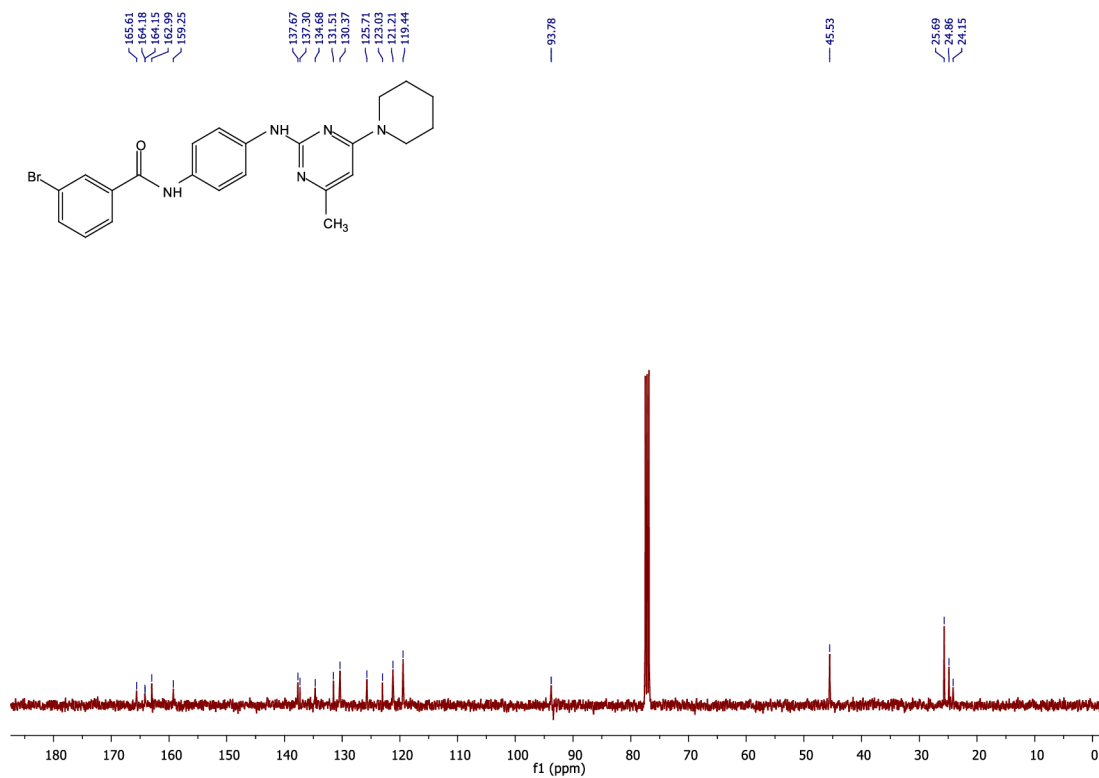
### Příloha 4: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 1b



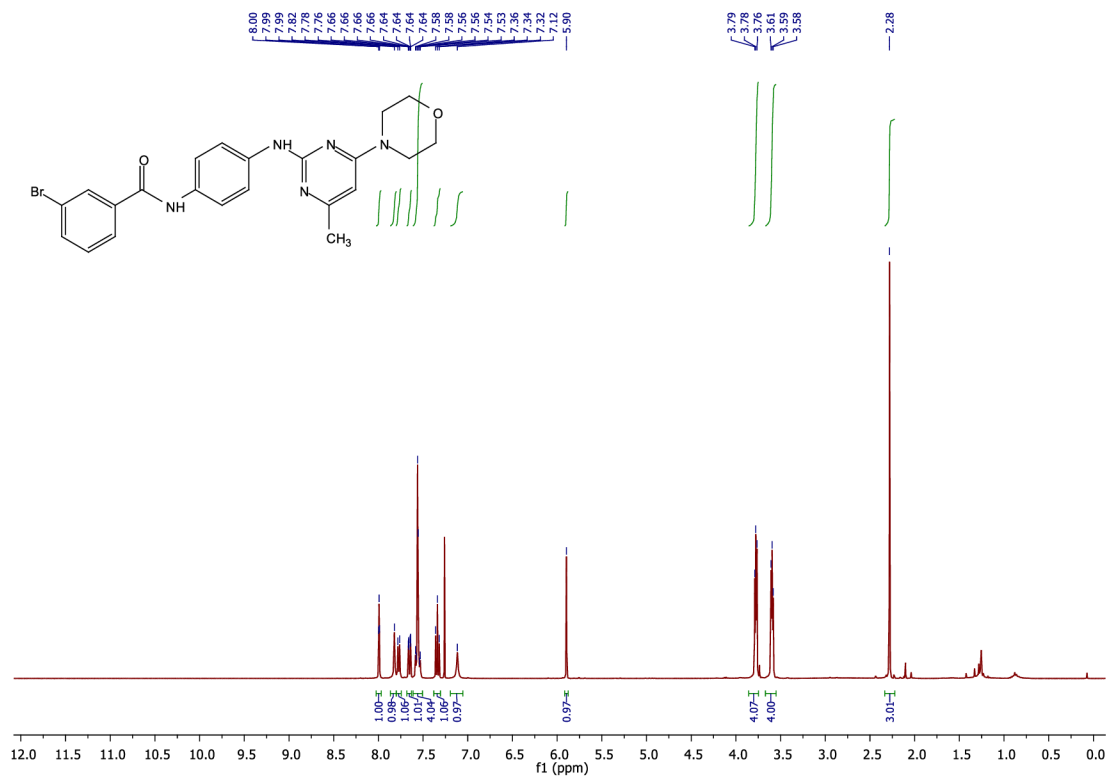
### Příloha 5: $^1\text{H}$ spektrum látky 1c



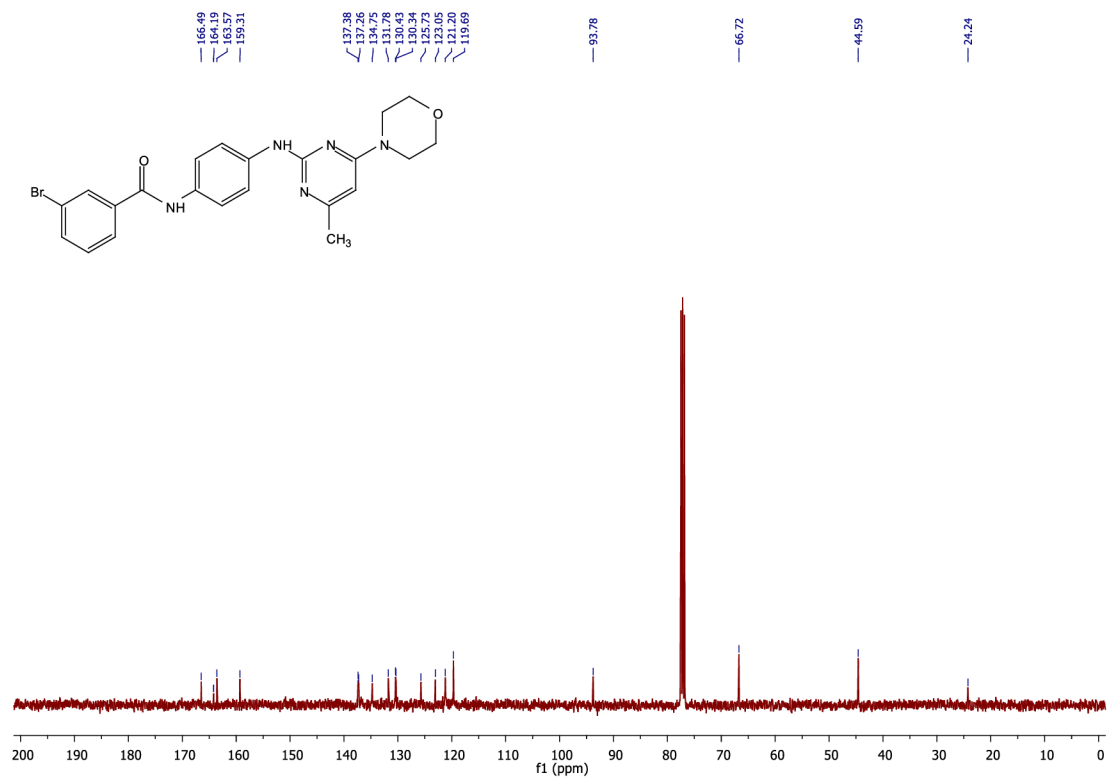
### Příloha 6: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 1c



## Příloha 7: $^1\text{H}$ spektrum látky 1d

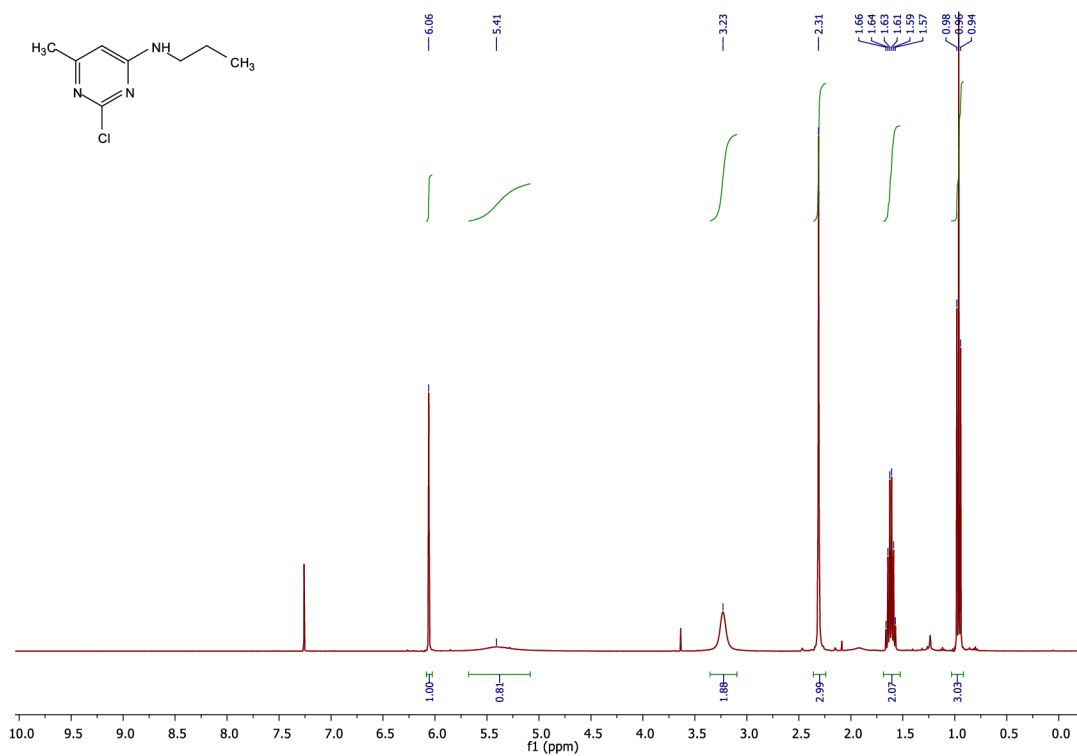


## Příloha 8: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 1d

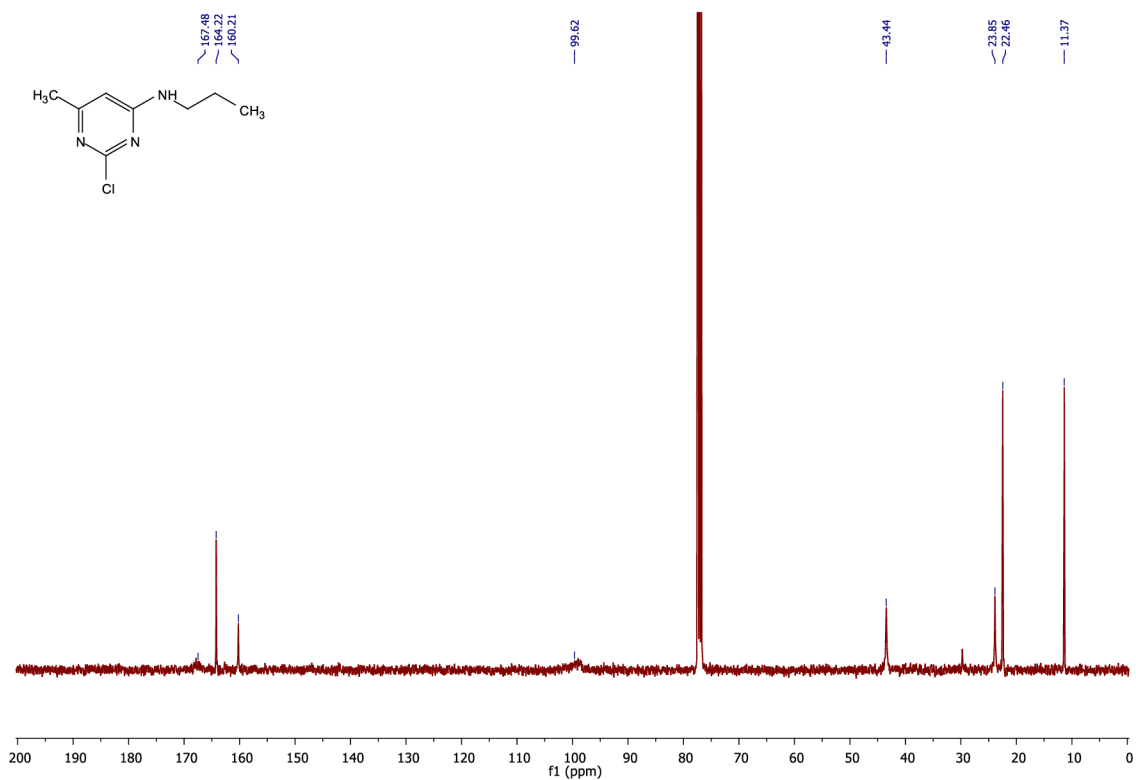




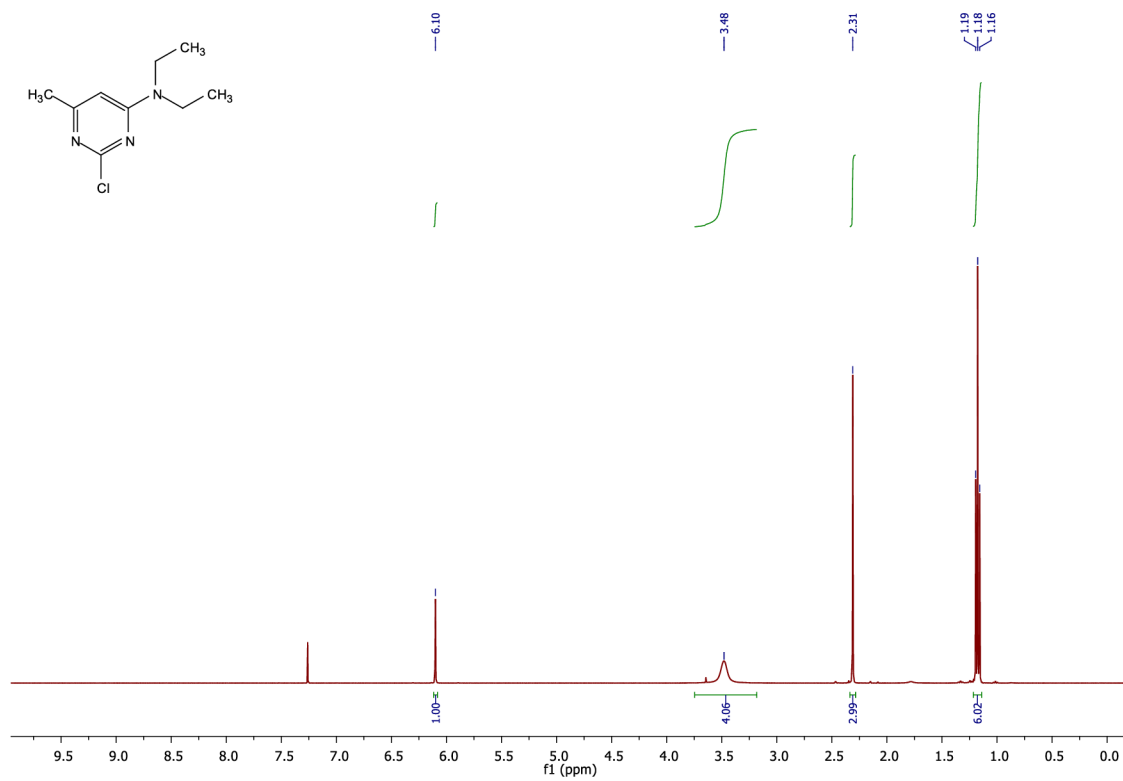
### Příloha 9: $^1\text{H}$ spektrum látky 3a



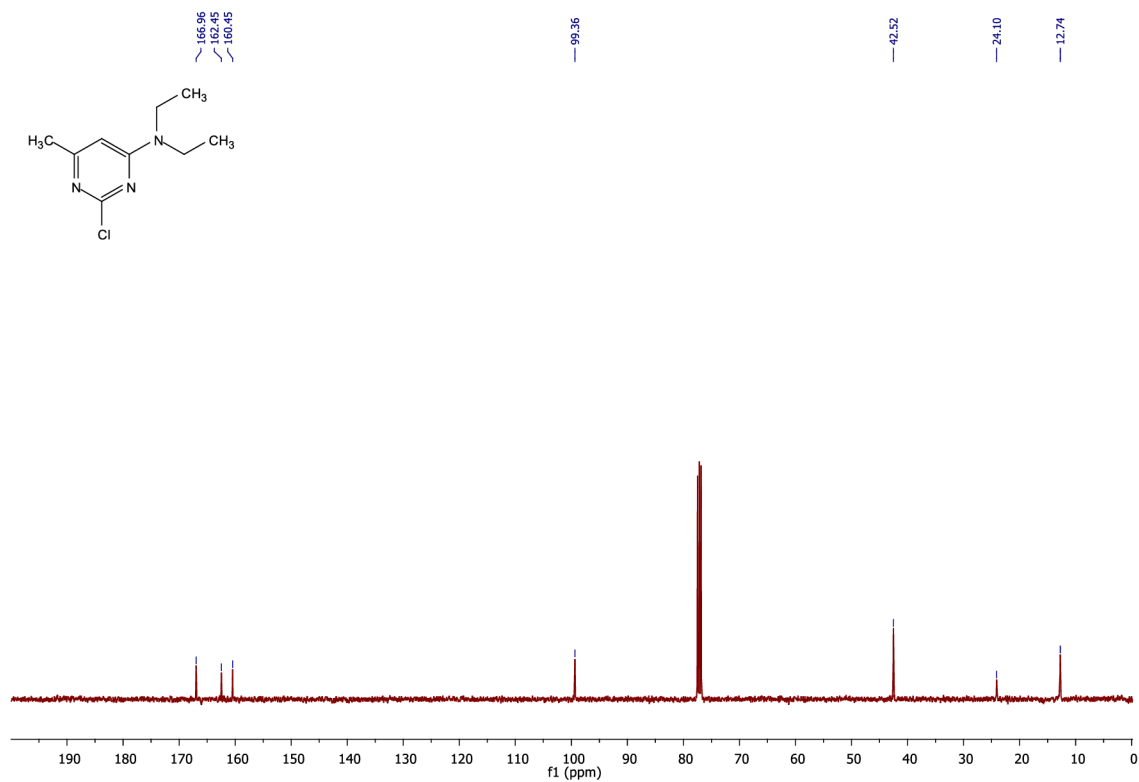
### Příloha 10: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 3a



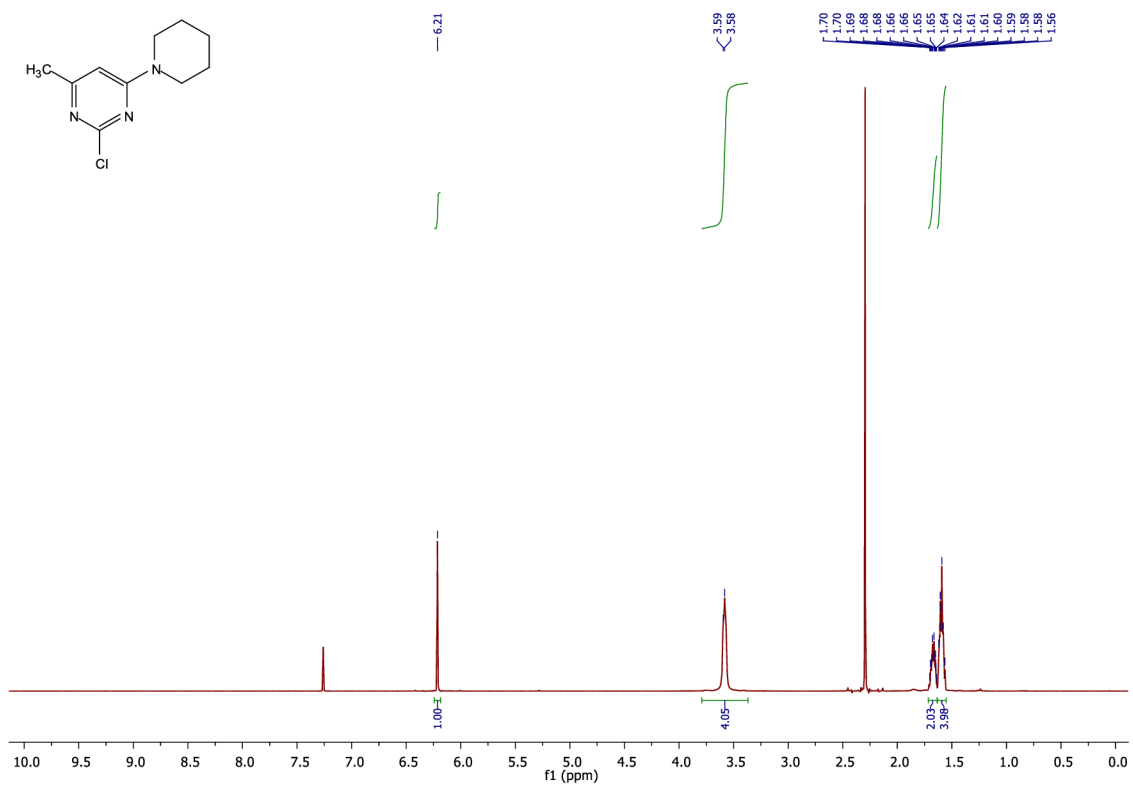
### Příloha 11: $^1\text{H}$ spektrum látky 3b



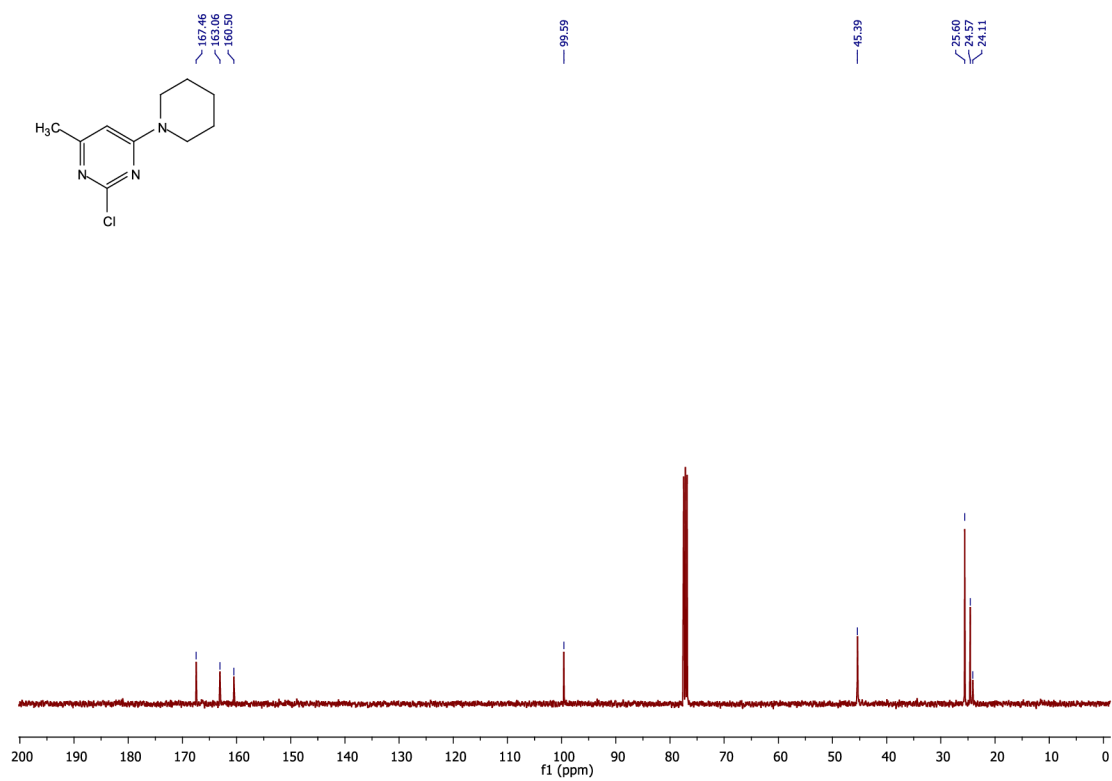
### Příloha 12: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 3b



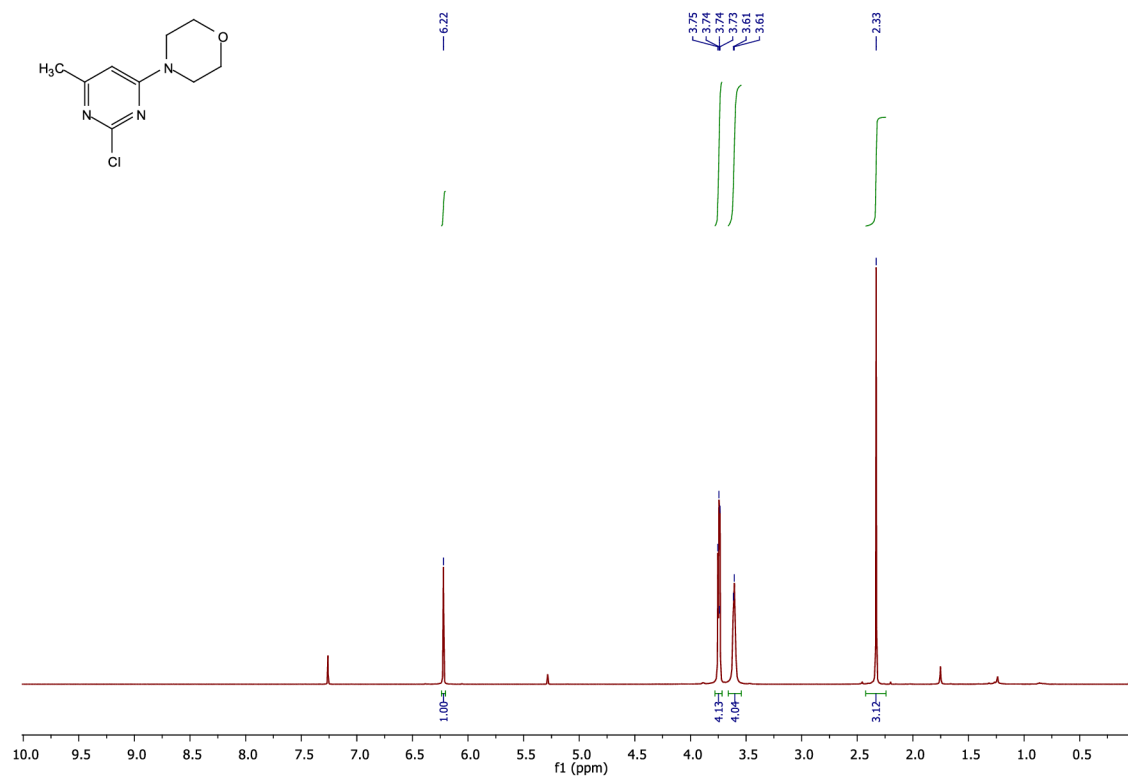
Příloha 13:  $^1\text{H}$  spektrum látky 3c



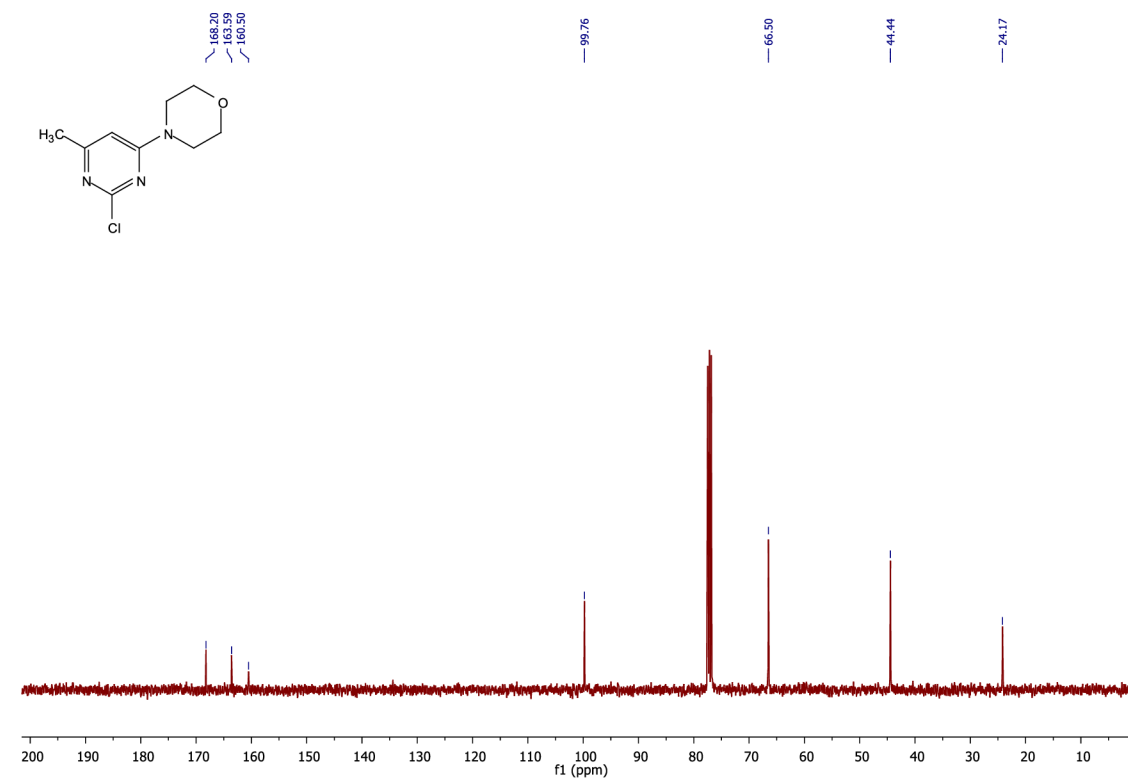
Příloha 14:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 3c



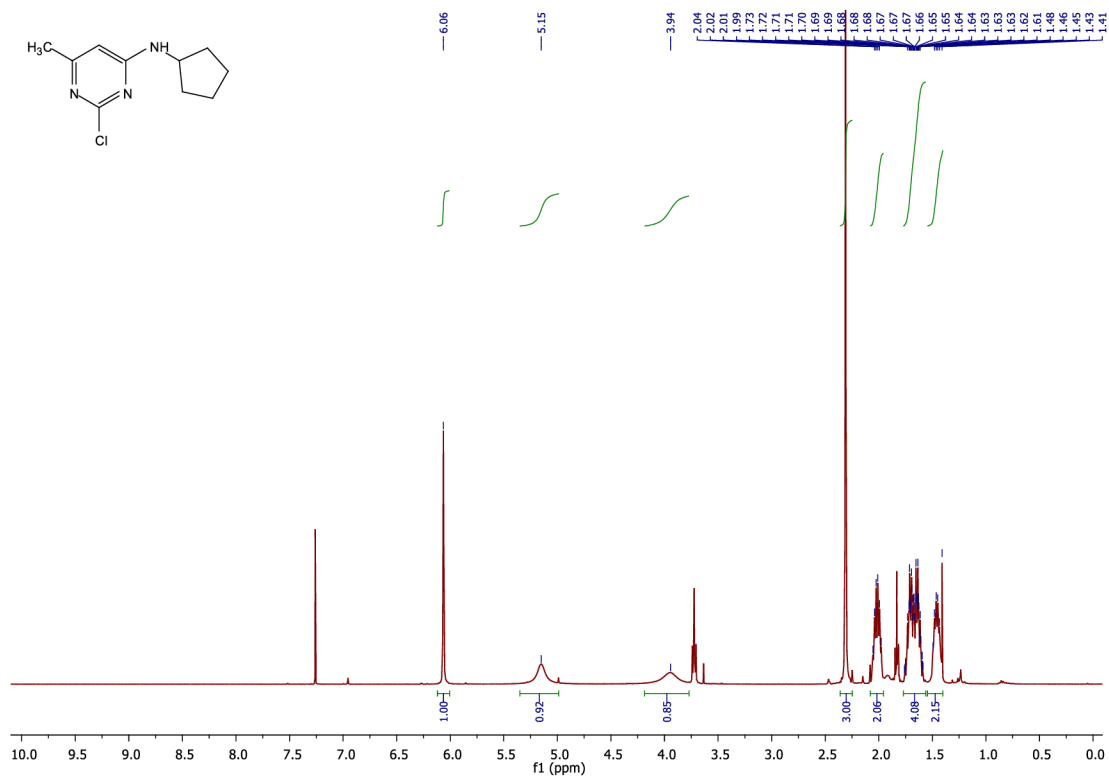
Příloha 15:  $^1\text{H}$  spektrum látky 3d



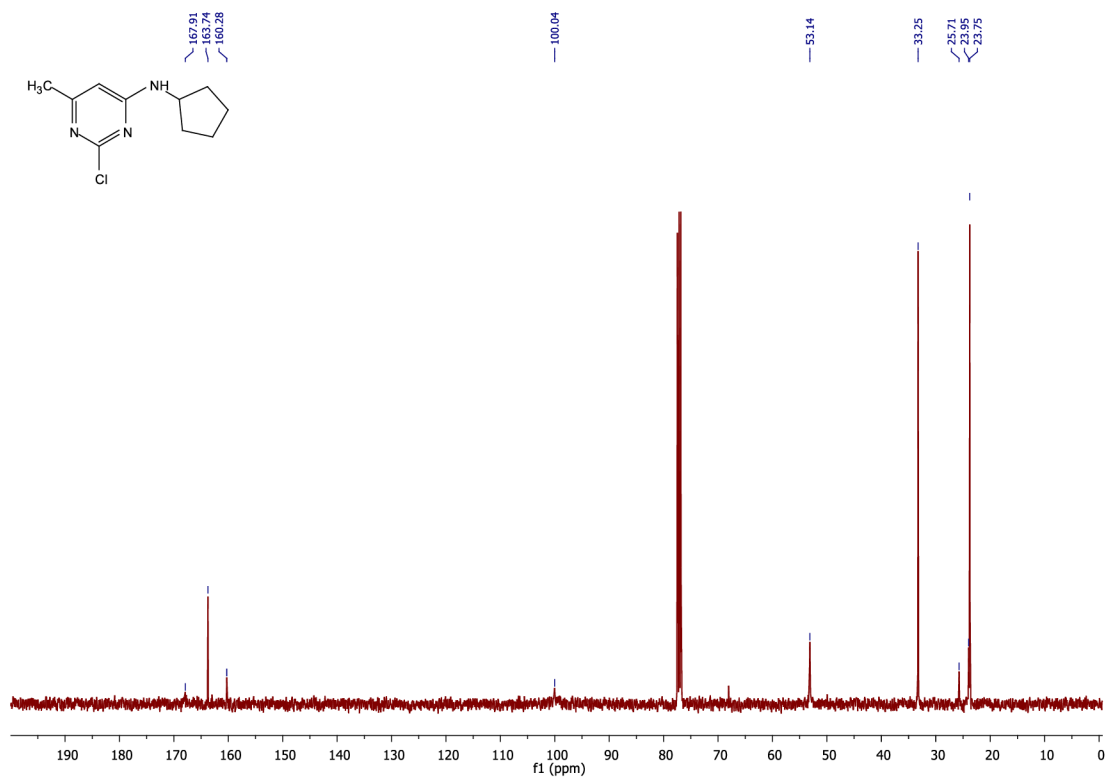
Příloha 16:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 3d



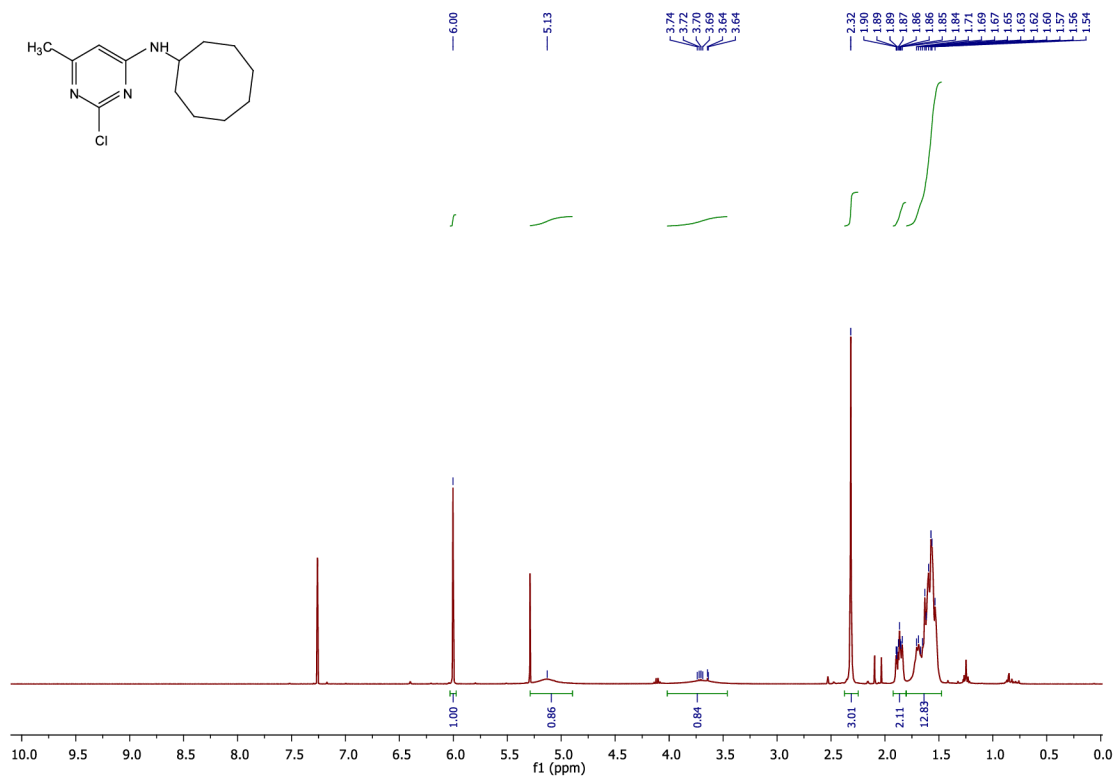
Příloha 17:  $^1\text{H}$  spektrum látky 3e



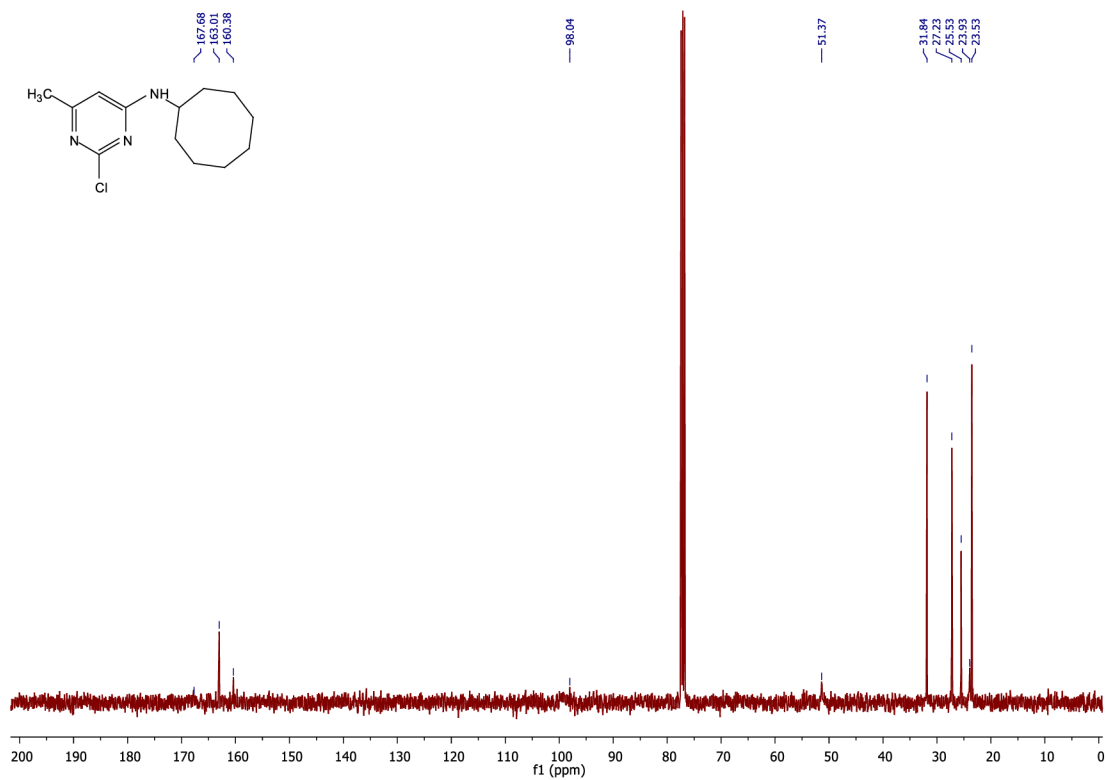
Příloha 18:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 3e



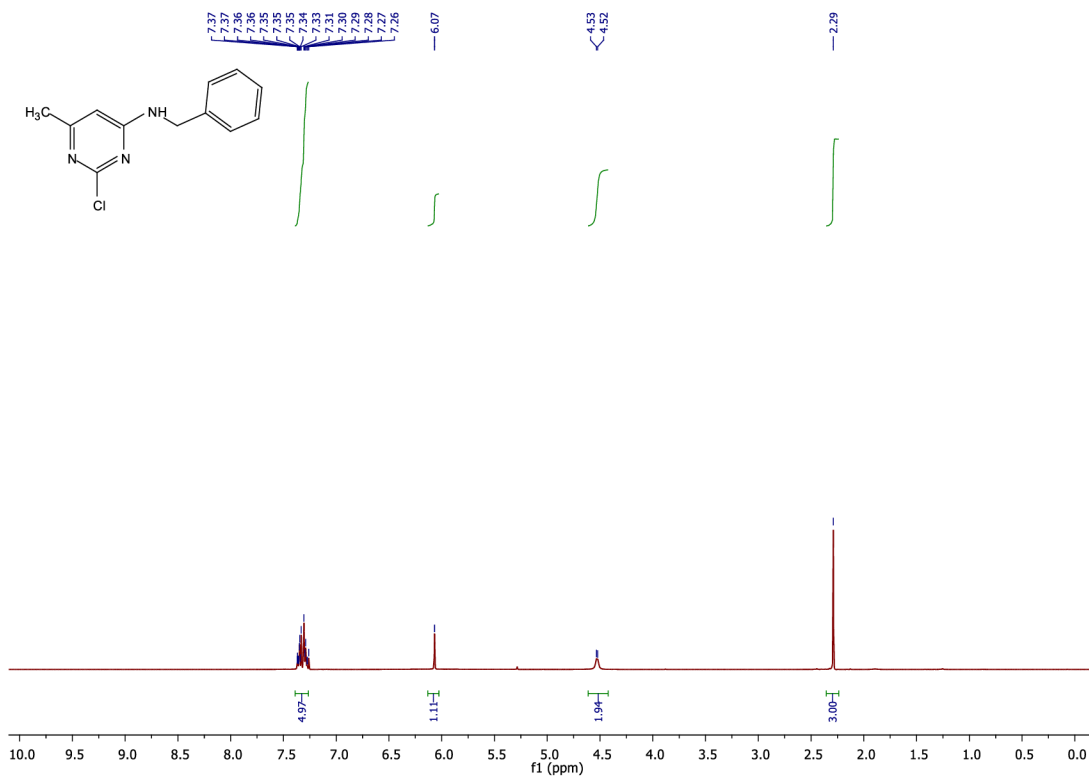
### Příloha 19: $^1\text{H}$ spektrum látky 3f



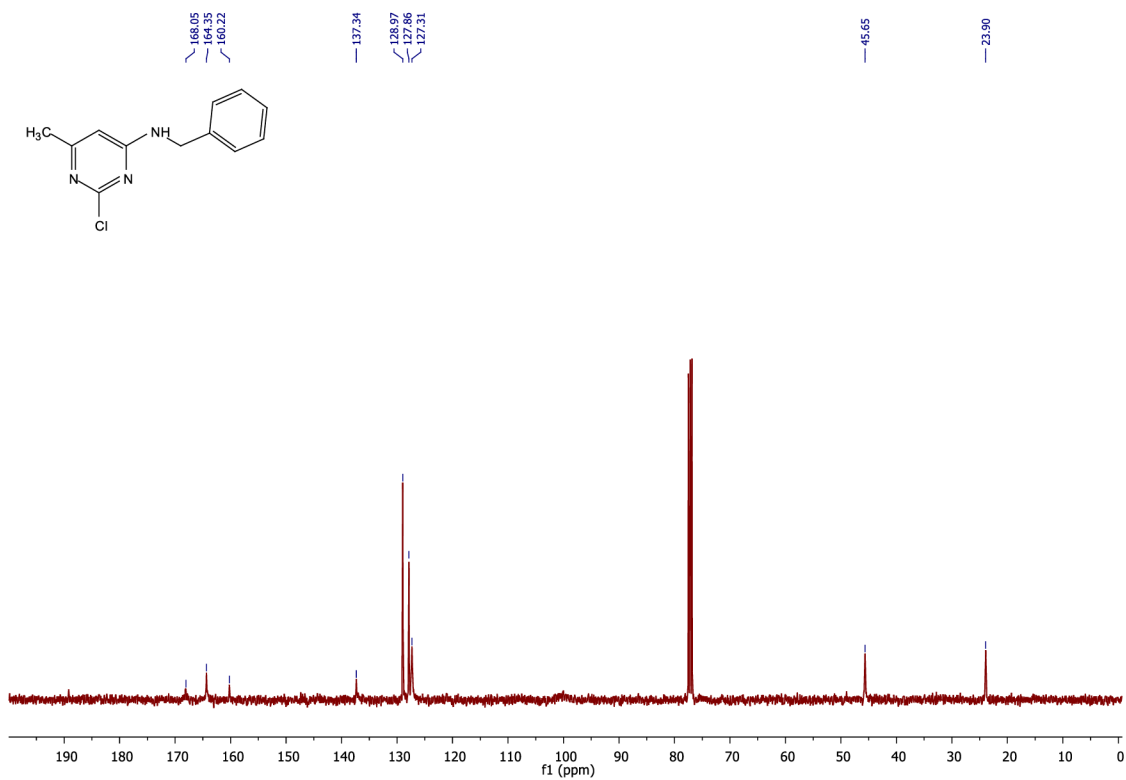
### Příloha 20: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 3f



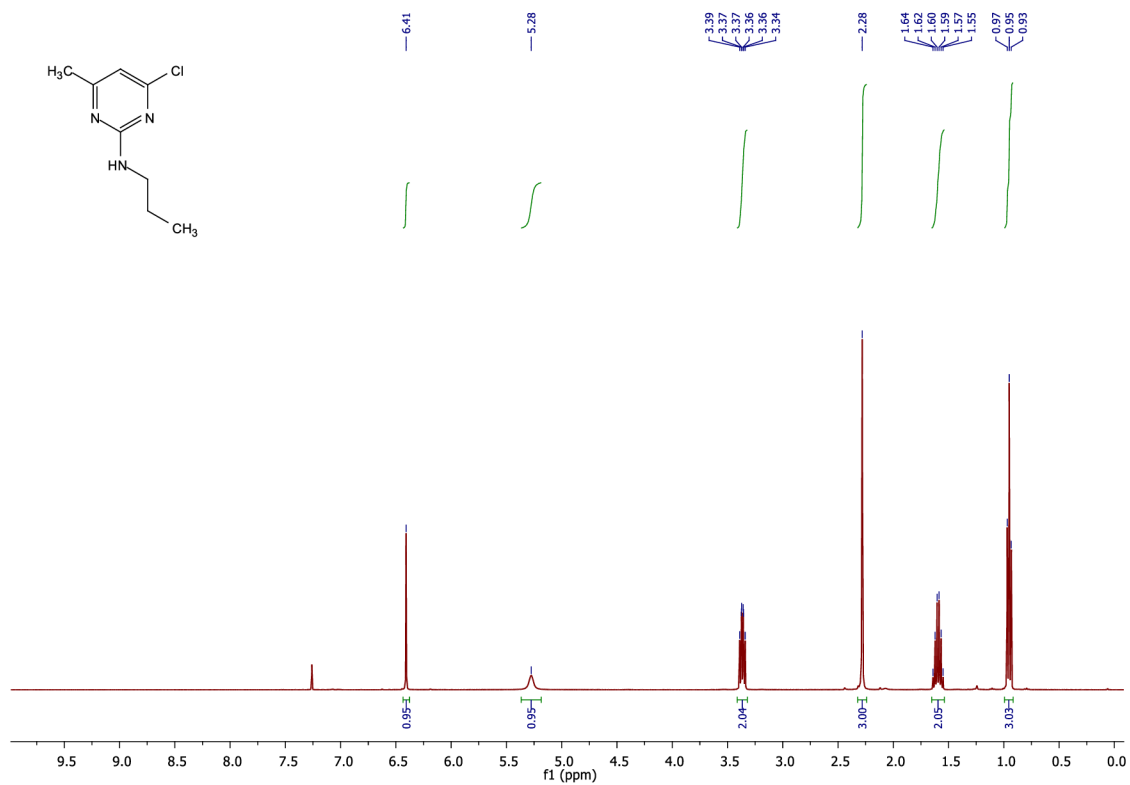
Příloha 21:  $^1\text{H}$  spektrum látky 3g



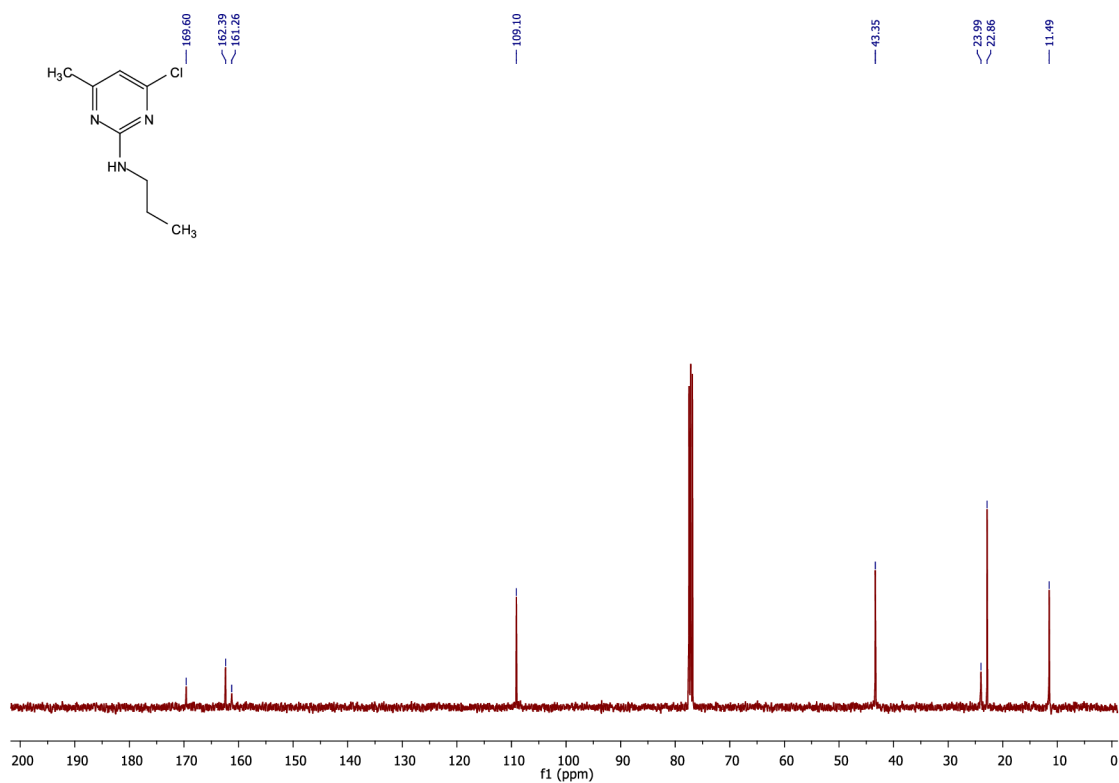
Příloha 22:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 3g



Příloha 23:  $^1\text{H}$  spektrum látky 4a

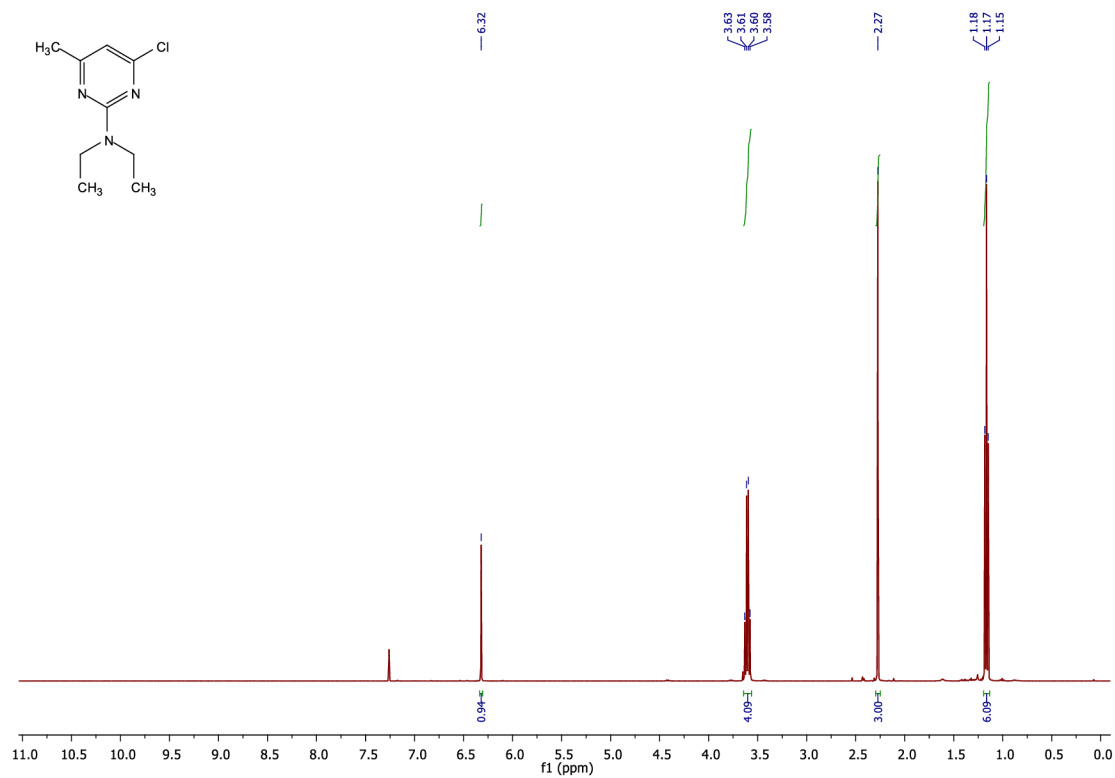


Příloha 24:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 4a

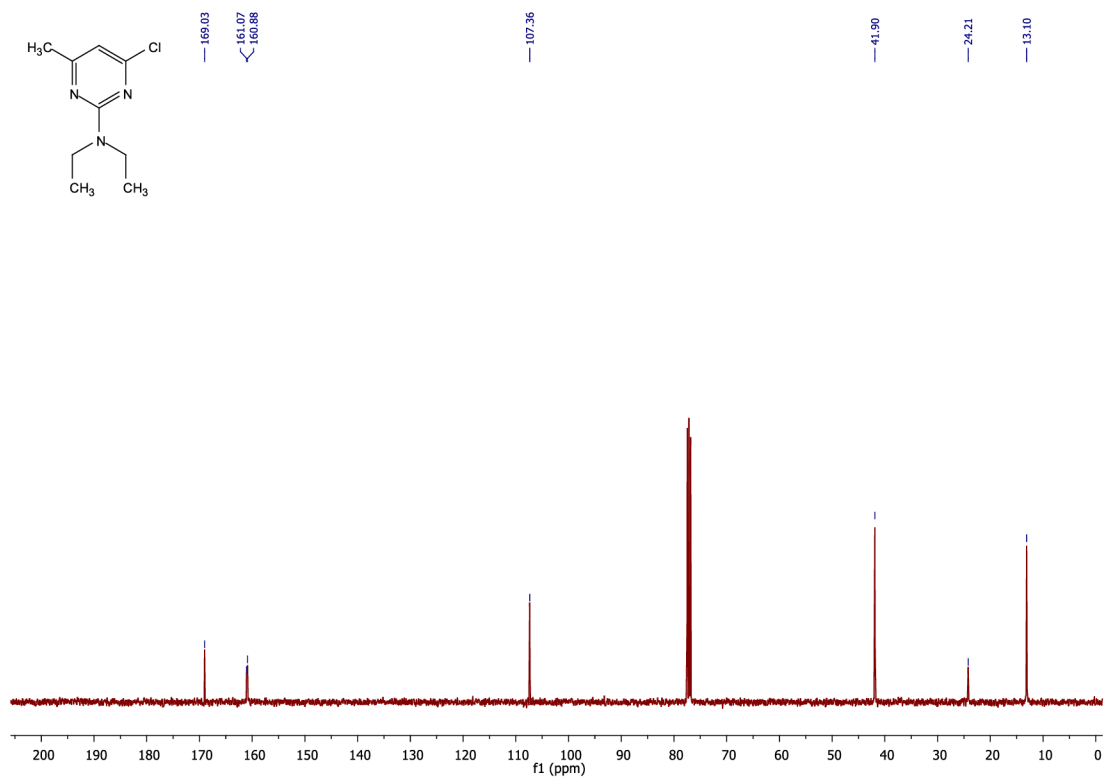




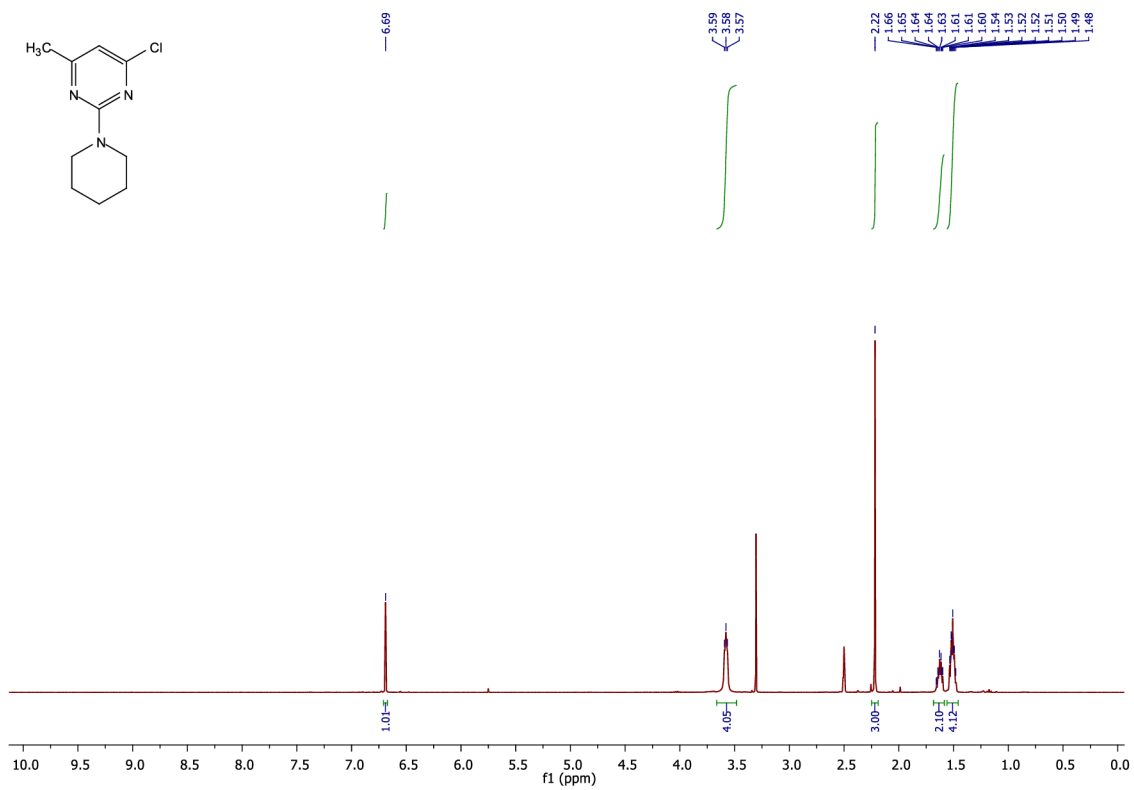
## Příloha 25: $^1\text{H}$ spektrum látky 4b



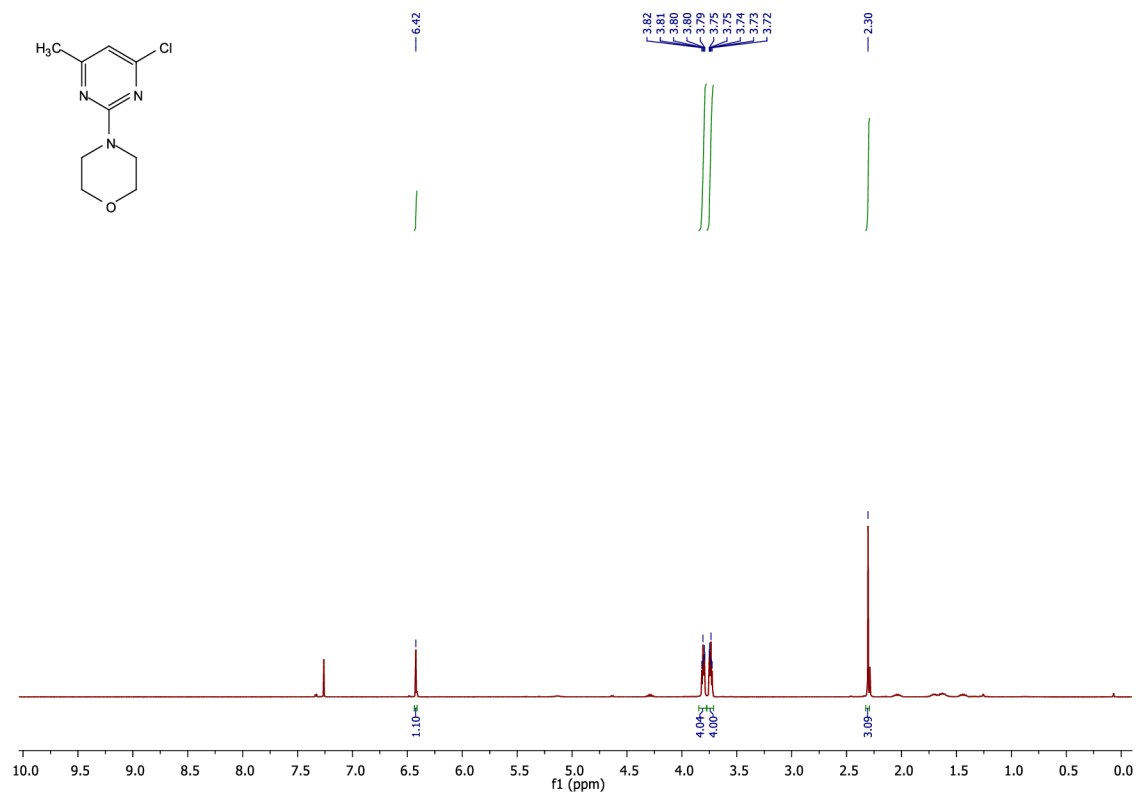
## Příloha 26: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 4b



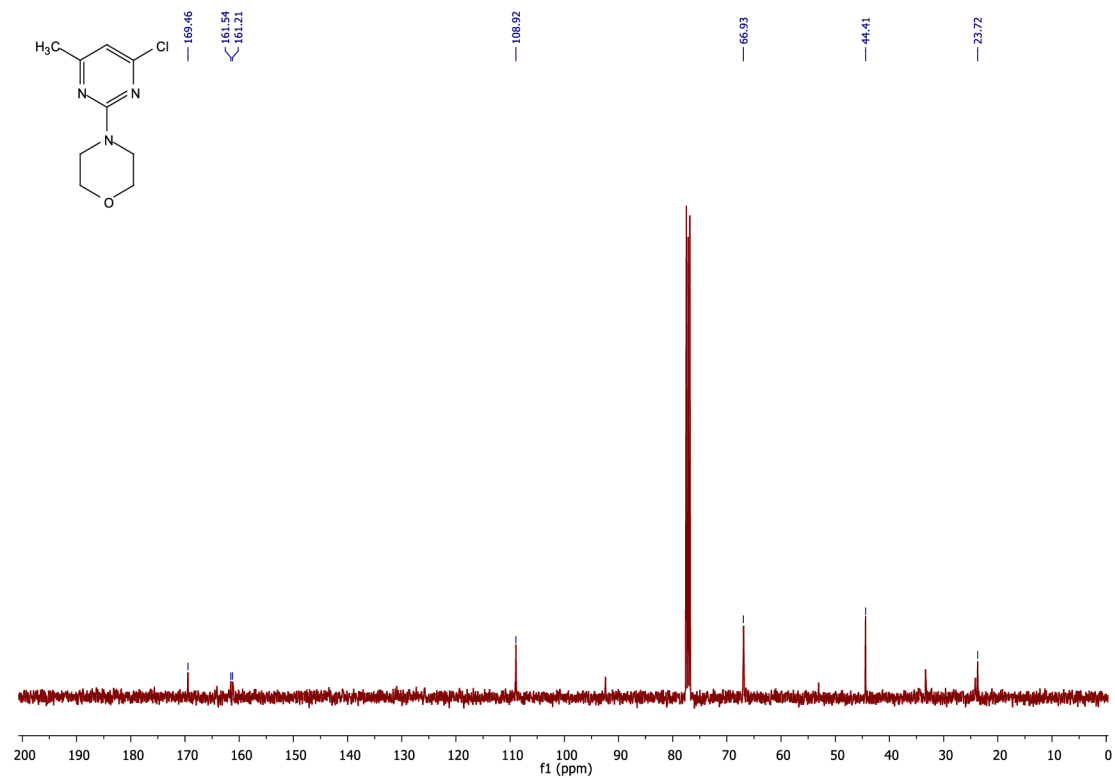
Příloha 27:  $^1\text{H}$  spektrum látky 4c



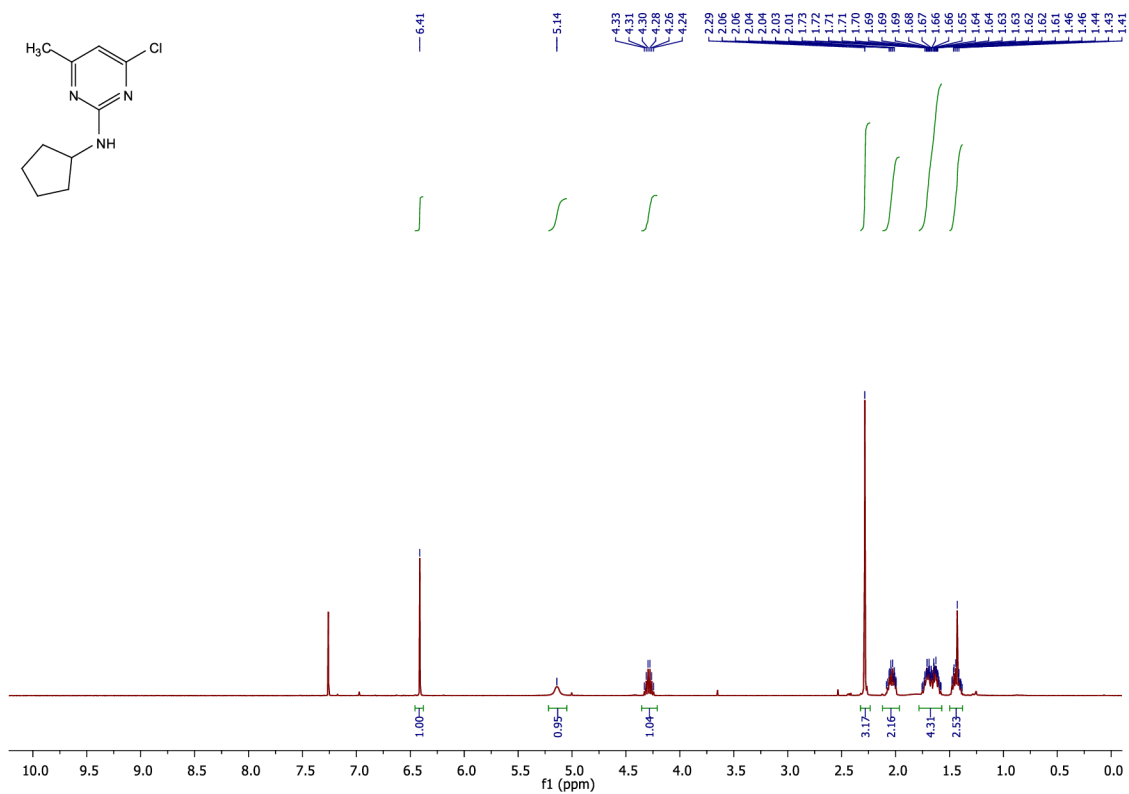
## Příloha 28: $^1\text{H}$ spektrum látky 4d



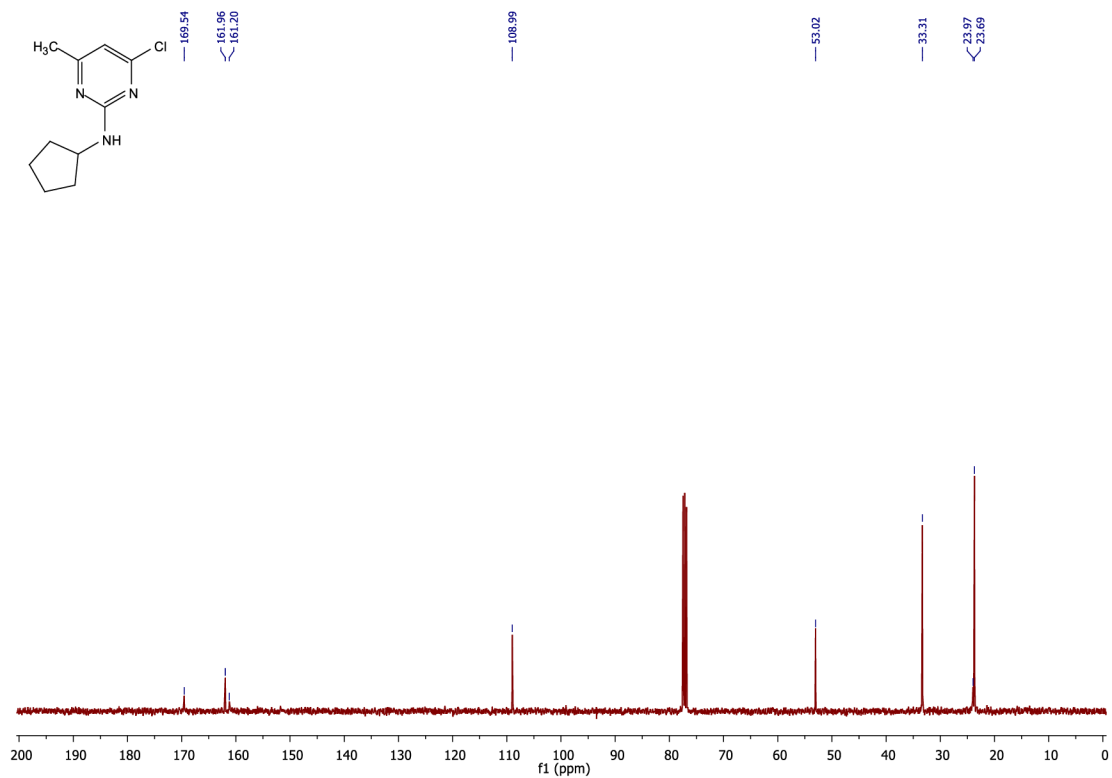
## Příloha 29: $^{13}\text{C}$ spektrum látky 4d



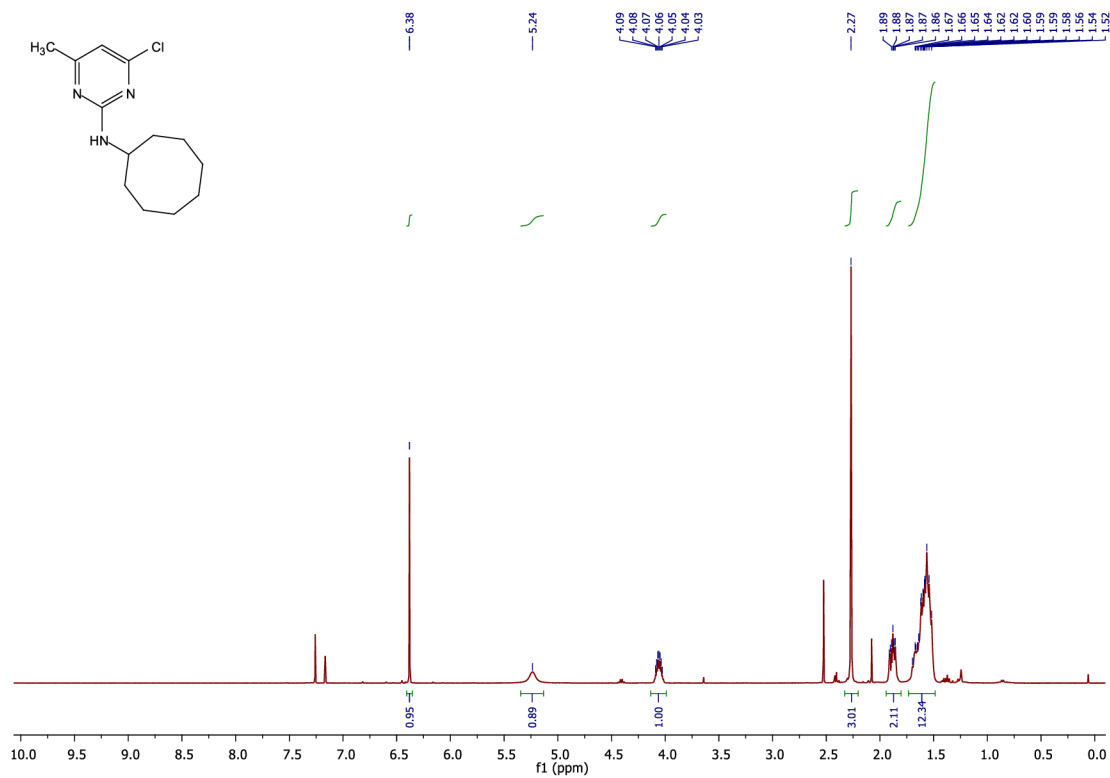
Příloha 30:  $^1\text{H}$  spektrum látky 4e



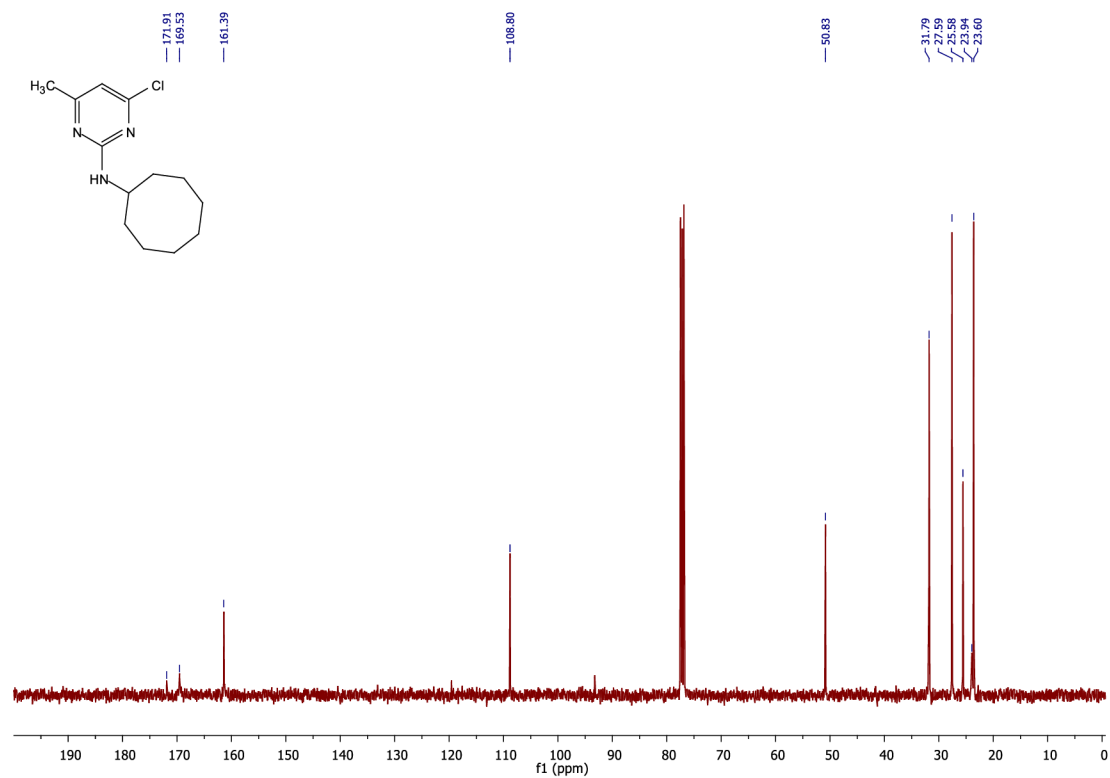
Příloha 31:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 4e



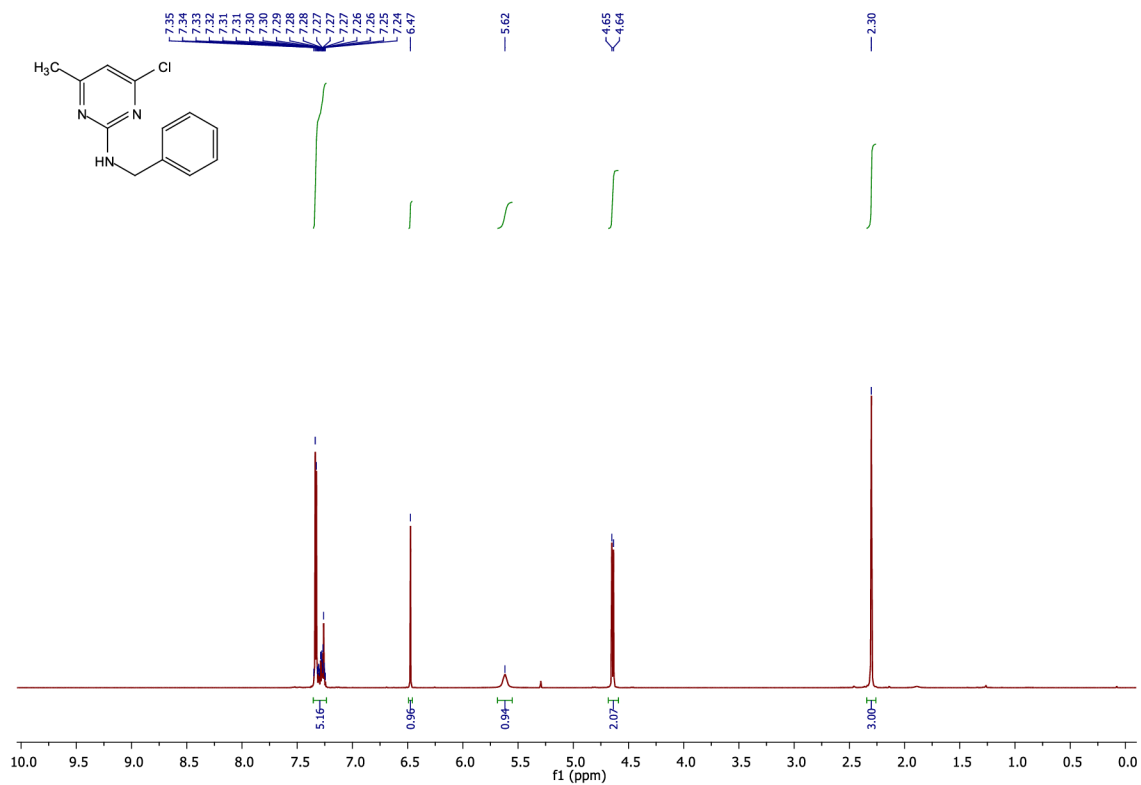
Příloha 32:  $^1\text{H}$  spektrum látky 4f



Příloha 33:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 4f



Příloha 34:  $^1\text{H}$  spektrum látky 4g



Příloha 35:  $^{13}\text{C}$  spektrum látky 4g

