UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE

Syntéza derivátů purinu s potenciální antimykobakteriální aktivitou

Disertační práce

Ing. Vladimír Finger

Školitel: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Prohlášení

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

Vladimír Finger

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. a školiteli specialistovi doc. PharmDr. Janovi Korábečnému, Ph.D. za rady, vedení během celého studia a hlavně za možnost realizovat celou řadu mých nápadů. Děkuji Dr. Danielu Castagnolovi z University College London, že jsem mohl být půl roku součástí jeho týmu a rozvíjet tak jeho vědecké projekty v době, kdy ještě působil na King´s College v Londýně.

Děkuji všem blízkým kolegům z Katedry Toxikologie a Vojenské farmacie, jmenovitě Barče S., Honzovi K., Martinovi K., Ondrovi K., Evě M., Lukášovi G. a Jakubovi O. za příjemné pracovní prostředí, v kterém jsem mohl s pohodou a klidem pracovat na všech vědeckých projektech.

Děkuji svým nejbližším, bez kterých bych se rozhodně nedostal až sem.

Práce vznikla s finanční podporou projektu Ministerstva zdravotnictví České republiky (projekt AZV č. NU21-05-00446) a projektu Národního institutu virologie a bakteriologie (program EXCELES, č. LX22NPO5103) a za finanční podpory Univerzity Karlovy (SVV projekt 260 547).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Doktorský studijní program Bioorganická chemie

Kandidát: Ing. Vladimír Finger

Školitel: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Název disertační práce: Syntéza derivátů purinu s potenciální antimykobakteriální aktivitou

Předkládaná disertační práce v teoretické části stručně shrnuje základní údaje o tuberkulóze (TB), tedy infekčním onemocnění, které je způsobeno bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*). Jsou zde uvedena epidemiologická data vydávaná v každoročním reportu Světové zdravotnické organizace (WHO) a struktury léčiv využívaných v současné terapii TB. V teoretické části je dále stručně přiblížena léčba TB a jsou zde zmíněny čtyři sloučeniny, které jsou v současné době ve druhé fázi klinického testování. Mechanismem účinku těchto látek je inhibice enzymu dekaprenylfosforyl-β-D-ribóza-2´-epimerázy, konkrétně podjednotky DprE1. Tento enzym hraje významnou roli v syntéze mykobakteriální stěny. Další část disertační práce shrnuje výsledky výzkumu týkající se potenciálních purinových a pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinových antituberkulotik odvozených od purin-6-onu **10**. Derivát **10** byl identifikován jako sloučenina se střední anti-TB účinností (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM) v rámci screeningu prováděného farmaceutickou firmou Eli Lilly jako součást programu Eli Lilly Open Innovation. U připravené purinové a pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinové série byl definovaný vztah mezi strukturou a účinkem (SAR) s ohledem antimykobakteriální aktivity proti *Mtb*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, multilékově rezistentním kmenům *Mtb* (MDR-TB) a extenzivně rezistentním kmenům *Mtb* (XDR-TB). U vybraných sloučenin byla stanovena rovněž antibakteriální aktivita (proti G+ a G- bakteriím), mikrosomální stabilita, stabilita v plasmě, cytotoxicita a rozpustnost sloučenin ve vodě. V purinové sérii byly identifikovány tři nejúčinnější deriváty s označením **53**, **61** a **72** se shodnou anti-TB aktivitou (MIC_{99} = 1 μM). U purinové série byl stanoven mechanismus antimykobakteriálního účinku (MÚ), kterým je inhibice enzymu DprE1. MÚ byl stanoven s využitím genové sekvenace kmenů *Mtb* rezistentních ke sloučenině **10** a potvrzen pomocí sledování osudu radioaktivně značeného substrátu ([C^{14}]acetát) v mykobakteriích za a bez přítomnosti látky **10**.

V pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinové sérii jsme identifikovali dva vysoce účinné deriváty **151** a **152** se shodnou anti-TB aktivitou nejen proti lékově citlivému kmenu *Mtb* (MIC_{99}(*Mtb*) = 0,06 μM), ale i proti MDR/XDR-TB kmenům (MIC_{99} = 0,06 μM). Tyto deriváty navíc vykázaly významnou aktivitu i proti G+ bakteriím. Dále u nich byla stanovena cytotoxicita, solubilita, mikrosomální stabilita a v současné době je studován jejich MÚ. Výše zmíněné výsledky vedly k designu nového pyrimidinového typu potenciálních antituberkulotik, který je v současné době na našem pracovišti intenzivně studován.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Doctoral Degree Program Bioorganic Chemistry

Candidate: Ing. Vladimír Finger

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Synthesis of purine derivatives with potential antimycobacterial activity

The theoretical part of this dissertation briefly summarizes basic data on tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*). The epidemiological data published in the annual report of the World Health Organization (WHO) and the structure of drugs used in current TB therapy are presented. The theoretical section also gives a brief overview of the treatment of TB and mentions four compounds that are currently in phase II clinical trials. The mechanism of action of these compounds is inhibition of the enzyme decaprenylphosphoryl-β-D-ribose-2'-epimerase, specifically the DprE1 subunit. This enzyme plays an important role in the synthesis of mycobacterial call wall. The next part of the dissertation summarizes the results of research on potential purine and pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine antituberculosis agents derived from purine-6-one **10**. Compound **10** was identified as derivative with moderate anti-TB activity (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM) in a high-throughput screening of pharmaceutical company Eli Lilly. Structure-activity relationships (SARs) in both purine and pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine series were elucidated with respect to antimycobacterial activity against *Mtb*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, multidrug-resistant *Mtb* strains (MDR-TB) and extensively drug-resistant *Mtb* strains (XDR-TB). and is commented. Results of antibacterial activity (against G+ and G- bacteria), microsomal stability, plasma stability, cytotoxicity and water solubility of the most active compounds are also presented.

In the purine series, three most active compounds **53**, **61** and **72** with identical anti-TB activity (MIC_{99} = 1 μM) were identified. For the purine series, the exact mechanism of their antimycobacterial action, which is inhibition of the DprE1 enzyme, was determined. The mechanism of action was determined by using whole-genome sequencing of *Mtb* strains

resistant to compound **10**. In addition, target was confirmed by monitoring the fate of the radiolabeled substrate ([C^{14}]acetate) in *Mtb* in the presence or absence of compound **10**. In the pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine series, we identified two highly potent derivatives **151** and **152** with identical anti-TB activity against the drug-sensitive *Mtb* strain and also against MDR/XDR-TB strains (MIC_{99} = 0.06 μM). Moreover, these derivatives also showed significant activity against G+ bacteria. Furthermore, their cytotoxicity, solubility, microsomal stability was determined and their mechanism of action is currently being studied. The above-mentioned results led to the design of a new pyrimidine type of potential anti-TB agents, which is currently being intensively studied at our institute.

Seznam použitých zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AMI	amikacin
BDQ	bedachilin
CFZ	klofazimine
Cl_{int}	clearance
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019
DCM	dichlormethan
Ddn	deazaflavin (F_{420})-dependentní nitroreduktáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTS	directly observed therapy short-course (krátkodobý léčebný režim s přímou a trvalou kontrolou užívání léků)
DPA	dekaprenylfosforyl-β-D-arabinóza
DPR	dekaprenylfosforyl-D-ribóza
DprE1	dekaprenylfosforyl-β-D-ribóza 2´-epimeráza
DPX	dekaprenylfosforyl-D-2´-keto-*erythro*-pentofuranóza
DS-TB	tuberkulóza citlivá na léky
EMB	ethambutol
EtOAc	ethyl-acetát
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GEN	gentamicin
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLM	lidské jaterní mikrosomy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
INH	isoniazid
LTBI	latentní forma tuberkulózy

MBC	minimální baktericidní koncentrace
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
NMR	nukleární magnetická rezonance
OFX	ofloxacin
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
SAR	vztah mezi strukturou a účinkem
STR	streptomycin
TB	tuberkulóza
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza

Obsah

Prohlášení ... 2

Poděkování ... 3

Abstrakt ... 4

Abstract ... 6

Seznam použitých zkratek ... 8

Úvod ... 11

Léčba TB ... 13

Nová léčiva schválená k léčbě rezistentních forem TB ... 15

Vývoj nových léčiv k léčbě TB ... 16

Sloučeniny v klinických studiích ... 17

Deriváty purinu s anti-TB aktivitou ... 20

Cíle práce ... 22

Výsledky a diskuse ... 23

Nová antituberukulotika obsahující purin ... 23

Syntéza nových derivátů odvozených od derivátu **10** ... 26

In vitro anti-TB aktivita sloučenin na bázi purinu a jejich vztah mezi strukturou a účinkem ... 30

Antituberkulotika na bázi pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů ... 40

Syntéza nových derivátů pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů ... 43

In vitro anti-TB aktivita pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů ... 46

Antibakteriální aktivita pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů ... 53

Mikrosomální stabilita derivátů **151** a **152** ... 56

Cytotoxicita ... 57

Závěr ... 58

Experimentální část ... 60

Stanovení *in vitro* antimykobakteriální a antibakteriální aktivity ... 61

Stanovení cytotoxicity, solubility, mikrosomální stability a stability v lidské plasmě ... 61

In silico výpočetní metody ... 61

Syntéza a charakterizace sloučenin ... 61

Syntéza purinových derivátů ... 61

Syntéza pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů ... 61

Seznam publikovaných prací ... 97

Původní vědecké práce ... 97

Vědecké práce zahrnuty do disertační práce ... 97

Seznam ostatních vědeckých prací ... 98

Patenty ... 99

Patentové přihlášky ... 100

Účast na konferencích ... 100

Zahraniční ... 100

Domácí ... 100

Reference ... 101

Úvod

Tuberkulóza je infekční onemocnění způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, poprvé objevené Robertem Kochem v roce 1882.[1] Podle zprávy, kterou vydává každý rok světová zdravotnická organizace (WHO), se jedná o jednu z 10 nejčastějších příčin úmrtí způsobené jedním infekčním agens. Každoročně se TB nakazí kolem 10 milionů lidí a kolem 1,5 milionu lidí této chorobě ročně podlehne. Toto onemocnění se nejčastěji přenáší vzduchem pomocí kapének, které se po vdechnutí dostávají do plic. Následně může dojít k propuknutí tzv. aktivní formy TB, která, pokud se jedná o plicní TB, je doprovázena neustálým kašlem s vykašláváním hlenu, bolestí na hrudi, ztrátou váhy, horečkou a nočním pocením.[2,3] Pokud *Mtb* napadne kosti, mozek, srdce a/nebo lymfatické uzliny, tak mluvíme o tzv. extrapulmonární tuberkulóze. Tato forma TB není tolik infekční jako plicní TB. Pokud však není léčena, zejména u pacientů se sníženou funkcí imunitního systému (HIV/AIDS) může mít stejně fatální důsledky jako plicní TB.[4]

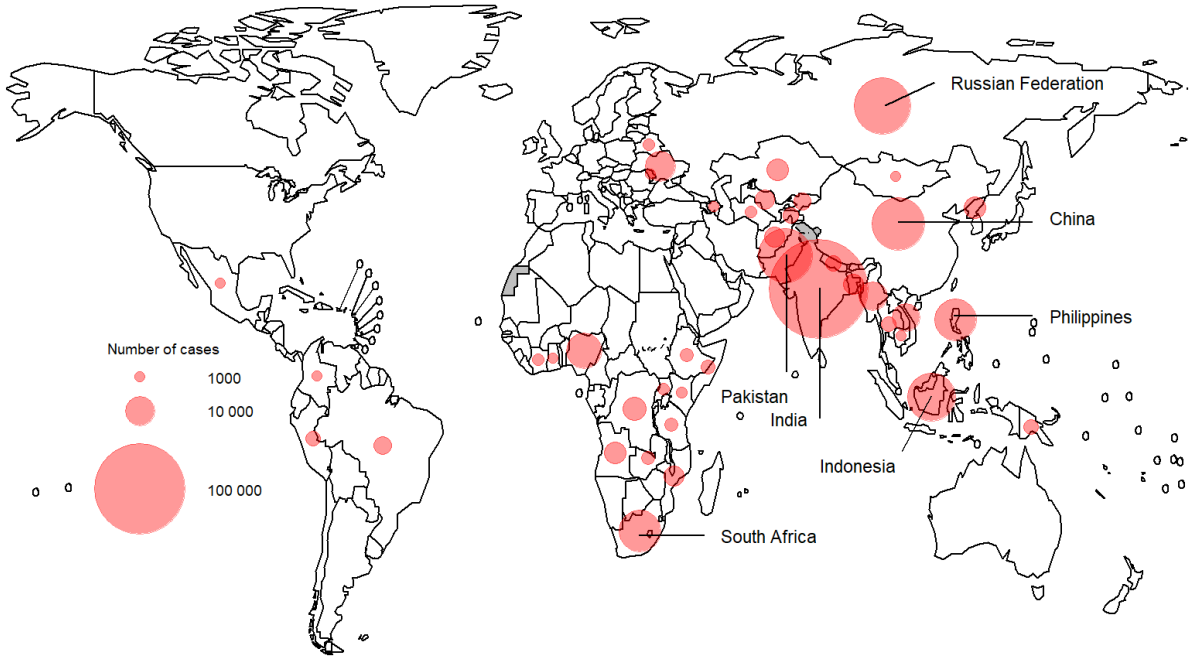
Mtb může být přítomna v organismu několik desítek let, aniž by došlo k rozvinutí aktivní formy. Tato tzv. latentní forma TB (LTBI) podle WHO postihuje dokonce až jednu čtvrtinu světové populace. K propuknutí aktivní formy pak dochází především u imunosuprimovaných pacientů.[4]

WHO shromažďuje údaje z 205 zemí světa zahrnující prevalenci, diagnostiku a další fakta týkající se TB. Na základě těchto informací byl stanoven epidemiologický plán, který obsahuje "Cíle udržitelného rozvoje (SDGs)" a "Strategii pro ukončení tuberkulózy". Podle reportu WHO jsou TB nejvíce postiženy země z Asie (44 %) a Afriky (24 %), kde je hůře dostupná zdravotní péče a současně nižší životní úroveň. Těmito zeměmi jsou především Indie, Čína, Indonésie, Filipíny, Pákistán, Nigérie, Bangladéš a Jihoafrická republika.[5] Nedostatečná zdravotní péče, špatné zásobování léky proti TB a nedodržování léčebných režimů ze strany pacientů vedly k rozvoji multirezistentní formy TB (MDR-TB), která je charakterizována rezistencí vůči dvěma nejúčinnějším lékům tzv. první volby, isoniazidu (INH) a rifampicinu (RIF). MDR-TB byla poprvé popsána v 80. letech 20. století, kdy se objevily nové případy TB nereagující na standardní léčebné režimy.

Celosvětově jsou 3-4 % nově diagnostikovaných případů TB klasifikovány jako MDR-TB. WHO odhadovala v roce 2021 výskyt přibližně 450 000 nových případů MDR-TB a celosvětově jsou touto formou TB nejvíce zasaženy Rusko, Pákistán, Indie, Čína, Indonésie, Jihoafrická republika a Filipíny (Obr. 1). Pandemie COVID-19 výrazně ztížila léčbu MDR-TB.

V důsledku špatného zásobování léky bylo přibližně 15 % pacientů s MDR-TB neadekvátně léčeno. Podle oficiálních statistik WHO se léčba MDR-TB stala dostupnou pouze jednomu ze tří lidí na planetě.

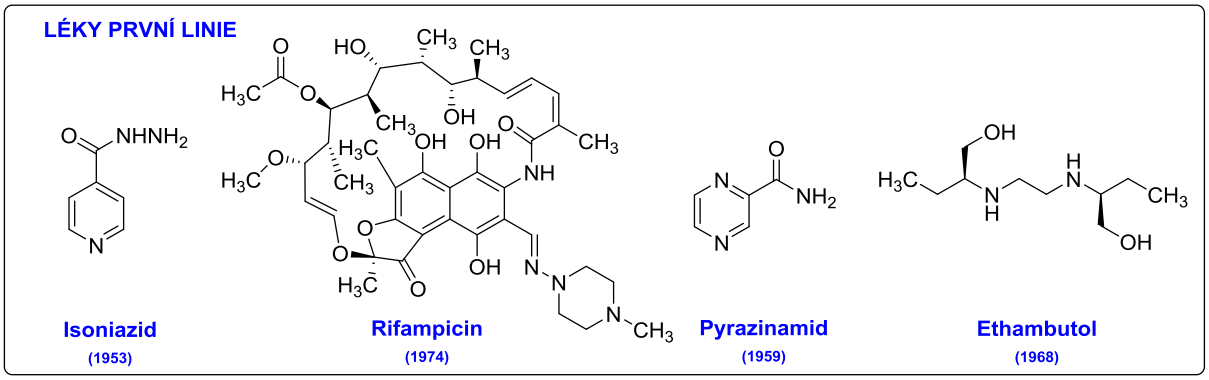
Ze 450 000 nových případů MDR-TB se přibližně 30 000 případů dále rozvine v extenzivně rezistentní formu TB (XDR-TB). Kmeny XDR-TB jsou rezistentní vůči všem lékům první linie, fluorochinolonům a alespoň jednomu z injekčně podávaných antibiotik (amikacin, kapreomycin, kanamycin).[4]



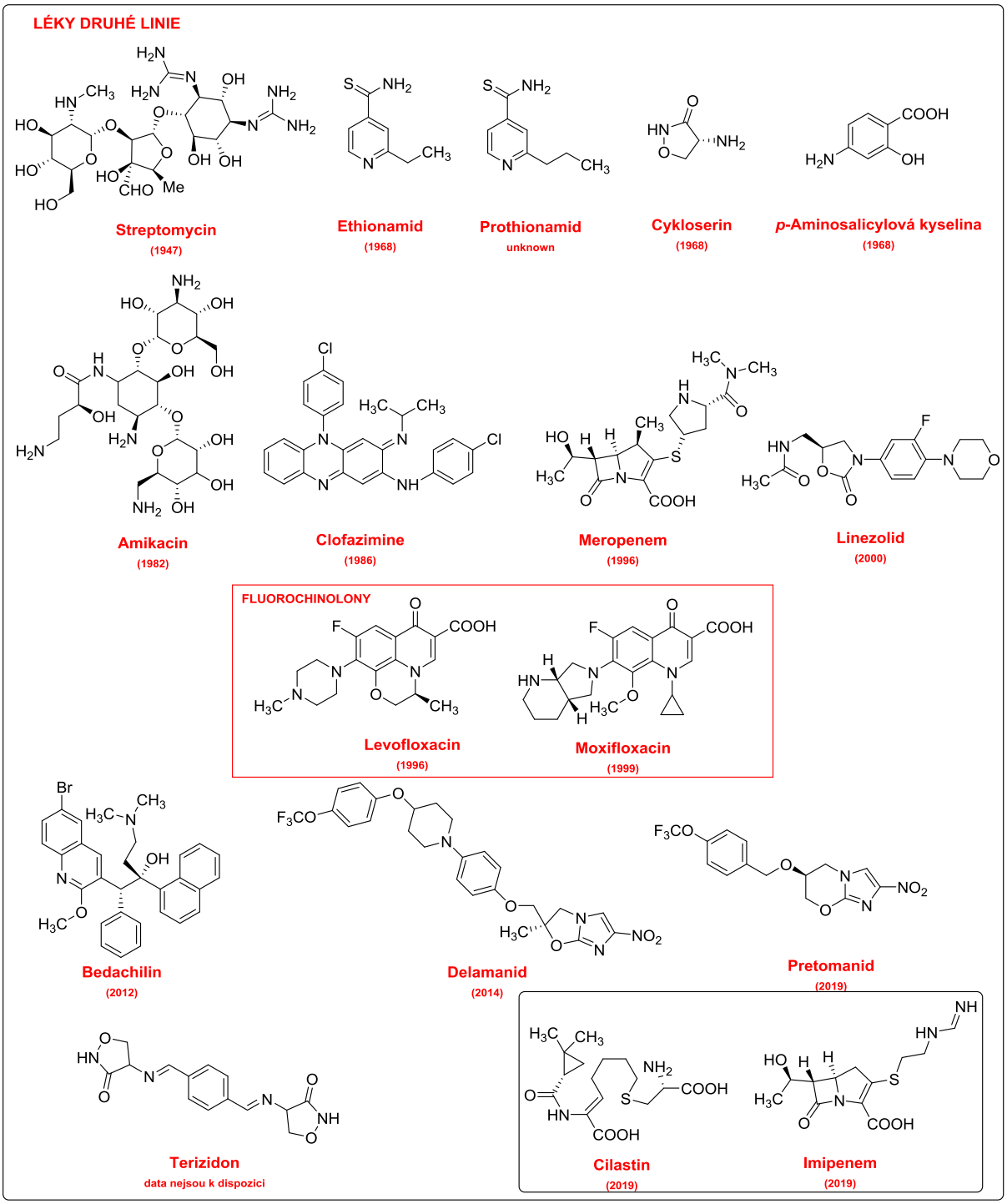
Obr. 1 *Mapa incidence MDR-TB. Státy uvedené jmenovitě na mapě patří mezi ty, kde je incidence MDR-TB vůbec nejvyšší (převzato ze stránek WHO: https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden/2-3-drug-resistant-tb).*[6]

Léčba TB

Standardní léčba TB citlivé na léky (DS-TB) se již několik desetiletí nezměnila, takže léčebná opatření stanovená WHO dříve stále platí. Obecně lze říci, že směrnice WHO pro léčbu TB byly stanoveny na základě dlouhodobých zkušeností získaných z klinických studií s cílem minimalizovat toxicitu léků a zvýšit pravděpodobnost úspěšného vyléčení. Základním léčebným přístupem je využití tzv. krátkodobého léčebného režimu s přímou a trvalou kontrolou užívání léků (DOTS, z angl. directly observed therapy short-course). V tomto léčebném režimu, s úspěšností přibližně 82 %, je nejprve podávaná kombinace léčiv tzv. první volby po dobu dvou měsíců. Léky první volby představují čtyři antimikrobiální látky – isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB) (Obr. 2). Hlavním cílem této fáze léčby je stabilizovat pacienta snížením počtu aktivně rostoucích mykobakterií, což vede k výraznému zlepšení zdravotního stavu a pacient přestává být infekční. Následuje čtyřměsíční terapie sestávající z podávání INH a RIF. Léčebný režim nerozlišuje mezi plicní a mimoplicní TB, což však neplatí pro TB CNS, kostí a kloubů. V takových případech je prodloužení léčby nevyhnutelné.[7]



Obr. 2 *Struktury léčiv první linie užívaných v léčbě TB. V závorkách je uveden rok schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Převzato z literatury 8 – viz Příloha 2).*[8]



Obr. 3 *Struktury léčiv druhé linie užívaných v léčbě TB. V závorkách je uveden rok schválení FDA (Převzato z literatury 8 – viz Příloha 2).*[8]

Léčba rezistentních forem (MDR-TB a XDR-TB) je časově a finančně náročnější oproti léčbě DS-TB. K léčbě se používá kombinace léčiv tzv. druhé řady (Obr. 3), a to podle doporučení vydávané WHO a ATS/CDC/ERS/IDSA směrnice pro klinickou praxi. Úspěšnost léčby těchto forem TB se sice výrazně zvýšila po schválení třech nových léčiv (bedachilin, delamanid a pretomanid), ale i přes tento pokrok v terapii TB se uvádí úspěšnost léčby XDR-TB pouze

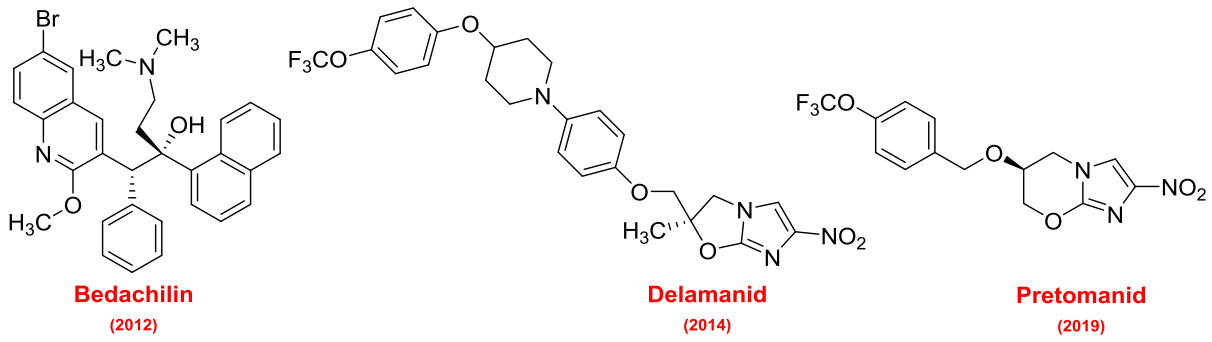
34 %.[9–12] V posledních letech byl zaznamenán výskyt kmenů *Mtb* rezistentních vůči bedachilinu, delamanidu a pretomanidu.[13–15]

Nová léčiva schválená k léčbě rezistentních forem TB

Bedachilin (BDQ; Obr. 4), známý rovněž pod obchodním názvem Sirturo, byl schválen pro léčbu MDR-TB a XDR-TB v roce 2012 americkým Ústavem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako součást léčebných režimů v kombinaci s jinými anti-TB léčivy. Toto léčivo patřící do skupiny diarylchinolinů je v současnosti jediným schváleným anti-TB léčivem, které inhibuje energický metabolismus *Mtb*. MÚ BDQ spočívá v selektivní inhibici mykobakteriální ATP syntázy, enzymu klíčového pro tvorbu adenosintrifosfátu (ATP). BDQ účinně inhibuje růst bakterií TB a díky svému baktericidnímu účinku je rovněž i účinný i proti latentní formě TB (LTBI).[16,17]

Dalším schváleným léčivem je delamanid (Obr. 4) patřící do skupiny bicyklických nitroimidazolů, který byl vyvinut farmaceutickou firmou Otsuka Pharmaceutical Co. Toto léčivo známé také pod obchodním názvem Deltyba bylo schváleno americkou agenturou FDA v roce 2014 k léčbě MDR-TB a XDR-TB v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Delamanid je v principu proléčivem, které je aktivováno mykobakteriální deazaflavin (F_{420})-dependentní nitroreduktázou (Ddn). Tato aktivace pravděpodobně vede k uvolnění oxidu dusnatého a dalších reaktivních intermediátů, které inhibují syntézu keto a methoxy mykolových kyselin a rovněž narušují respirační systém *Mtb*.[18]

V roce 2019 byl schválen pretomanid (PA-824, Obr. 4) jako poslední léčivo k terapii MDR-TB a XDR-TB, který se podává v režimu BPaL jako kombinace s BDQ a linezolidem. Stejně jako delamanid je i pretomanid proléčivem, které je aktivováno Ddn a uvolněné reaktivní formy dusíku inhibují syntézu mykolových kyselin a ovlivňují respirační systém *Mtb*.[19,20]



Obr. 4 *Struktury léčiv schválených v minulé dekádě k léčbě TB.*

Ve studii z roku 2023 byl navržen nový mechanismus účinku pro pretomanid a delamanid, kterým je inhibice dekaprenylfosforyl-β-D-ribóza-2´-epimerázy, konkrétně isoformy DprE2 (DprE2, EC: 1.1.1.333). Enzym DprE2 je společně s DprE1 (EC:1.1.98.3) stěžejní pro syntézu arabinogalaktanu, klíčové složky mykobakteriální stěny. DprE2 má být inhibován metabolity uvedených léčiv po příslušné aktivaci Ddn.[21]

Vývoj nových léčiv k léčbě TB

Hledání nových léčiv se nejčastěji děje pomocí farmakologického screeningu. Fenotypový screening je pak nejčastěji používaným typem screeningu, který umožňuje objevit sloučeniny ovlivňující jeden nebo více biologických cílů s celobuněčnou aktivitou. Přidanou hodnotou tohoto screeningu je, že umožňuje identifikovat i proléčiva, která se stávají účinnými teprve po enzymatické biotransformaci. K výhodám takového screeningu nadále patří možnost identifikovat sloučeniny bez nutnosti znát jejich MÚ. Vedle toho tato stanovení poukazují přímo na schopnost léčiva překonávat jinak velmi těžce permeabilní mykobakteriální stěnu. U sloučenin identifikovaných ve fenotypovém screeningu se tak strukturní optimalizace zaměřují zejména na strukturní obměny, které zvyšují účinnost, snižují toxicitu a zlepšují farmakokinetický profil.[22–25]

Neznalost přesného MÚ může být rovněž i nevýhodou, protože provedené strukturní obměny jsou velmi často vedeny empiricky s využíváním isosterie, navýšení/snížení lipofility nebo rozdílné elektronové distribuce v molekule, což má často za následek větší časovou i finanční náročnost strukturních optimalizací. I určení samotného MÚ může být v mnoha případech neúspěšné. Strukturní optimalizace mnohdy tendenčně vede k využití strukturních fragmentů, které mohou interferovat s více biologickými cíli najednou (tzv. „promiskuitní farmakofory“). Takové strukturní obměny snižují šanci připravit potenciální léčivo s novým MÚ a často vedou k sloučeninám se zkříženou rezistencí vůči již zavedeným léčivům. Poslední nevýhodou fenotypového screeningu je malá rozmanitost screeningových knihoven. V důsledku nízké diverzity jsou objevovány známé třídy inhibitorů, jejichž aktivita bude jen mírně vylepšena. Přesto všechno je třeba zmínit, že právě s využitím fenotypového screeningu bylo identifikováno mnoho současně používaných léčiv.[23,24,26,27]

Na rozdíl od fenotypového screeningu umožňuje koncept návrhu nových léčiv na předem známém biologickém cíli využití *in silico* a dalších teoretických přístupů, které mohou využít data z volně přístupných databází krystalografických struktur (např. PDB databáze). Tyto strukturní obměny mohou často vést k látkám s mnohem vyšší selektivitou a vyšší inhibiční

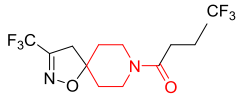
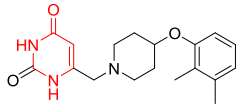
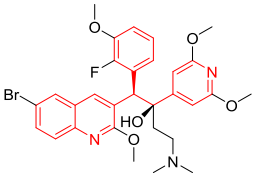
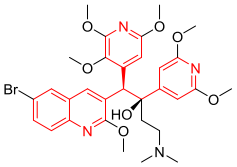
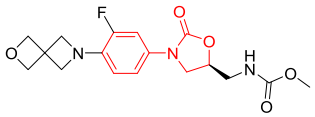
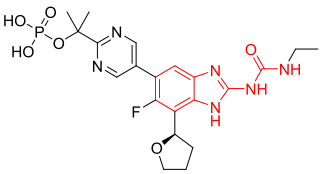
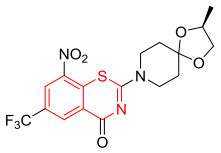
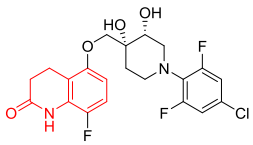
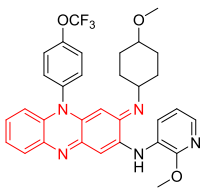
aktivitou k danému biologickému cíli. Problémem je, že řada takto připravených vysoce účinných a selektivních inhibitorů vykazuje nízkou celobuněčnou aktivitu, zejména kvůli špatné prostupnosti přes mykobakteriální stěnu, nebo nevhodným farmakokinetickým vlastnostem v podmínkách *in vivo*. Tento screening rovněž není často schopen reflektovat i další biologické cíle, na které může daná sloučenina působit. Tímto typem screeningu zatím nebyla identifikována žádná sloučenina užívaná k léčbě TB.[23,24,28,29]

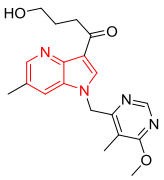
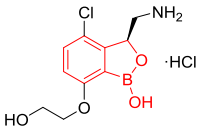
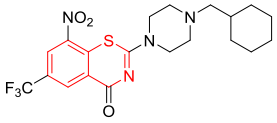
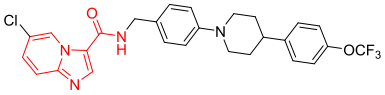
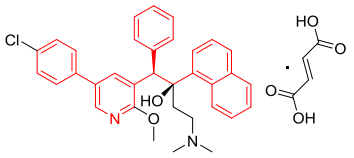
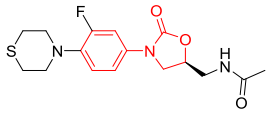
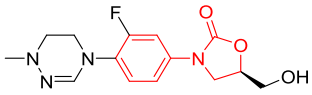
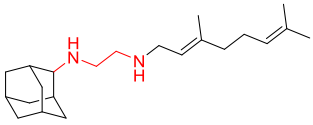
Nejnovější přístup v hledání nových léčiv proti TB může nabídnout výhody obou metod, tedy jak fenotypového screeningu, tak i přístupu využívající předem známý biologický cíl (v anglickém jazyce: target-based whole-cell screening).[30,31]

Sloučeniny v klinických studiích

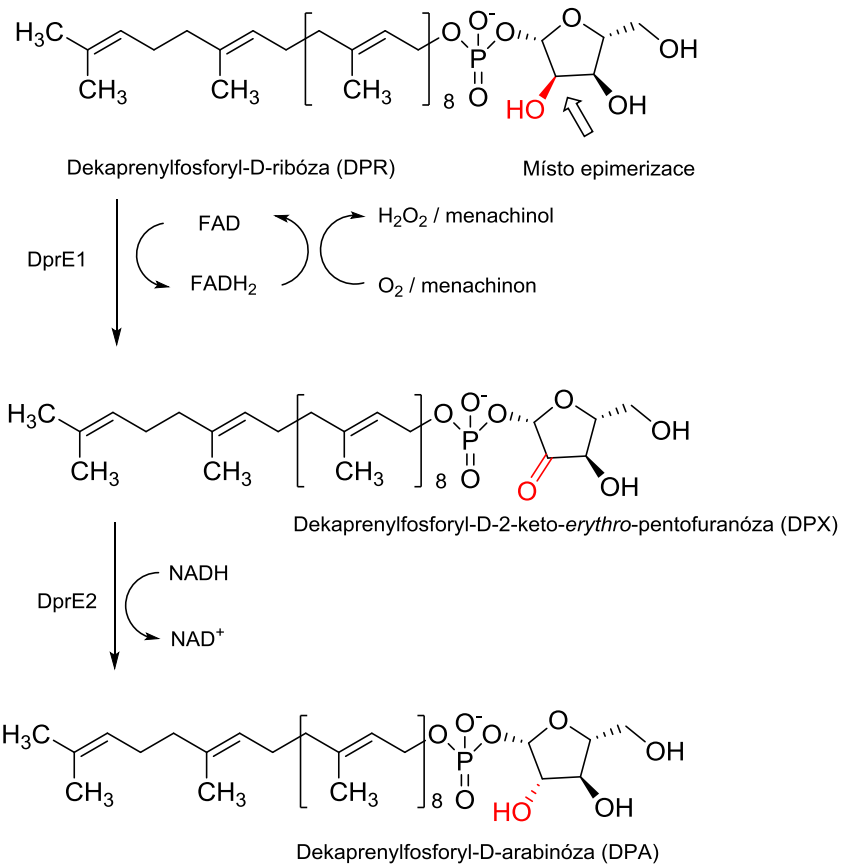
V devadesátých letech minulého století došlo k strmému nárůstu počtu nových případu TB v důsledku rostoucí rezistence na používaná léčiva a výskytu koinfekce HIV. Z tohoto důvodu se v roce 2000 uskutečnila schůzka zástupců soukromého i veřejného sektoru v Jihoafrické republice, kde byla diskutována naléhavá potřeba vyvinout lepší a efektivnější léčbu TB.[32,33] Dnes, po více než dvaceti letech, se nachází v klinických studiích 17 nadějných kandidátů v různých fázích klinického testování (Tabulka 1). Z těchto 17 kandidátů má 10 z nich zcela nový mechanismus účinku, přičemž čtyři z nich inhibují enzym DprE1 (TBA-7371, OPC-167832, BTZ-043 a PBTZ169). Dva z těchto čtyř inhibitorů DprE1, BTZ-043 a PBTZ169, obsahují ve struktuře benzothiazinonový strukturní motiv. Zbývajících sedm sloučenin je strukturně odvozeno už od dříve schválených léčiv. Těchto sedm kandidátů tak potvrzuje pravidlo, že nejčastějším přístupem k tvorbě nových léků je strukturní optimalizace/modifikace již zavedeného léčiva.[34]

Tabulka 1 *Léčiva nacházející se v současné době v různých fázích klinických testů. Jsou zde uvedeny názvy, chemické vzorce, zařazení do strukturní skupiny, klinická fáze a biologický cíl.*

Název	Struktura	Strukturní motiv	Klinická fáze	Biologický cíl
BVL-GSK098		amido-piperidin	I	Mykobakteriální transkripční regulátor[35]
GSK2556286		pyrimidin-2,4-dion	I	Katabolismus cholesterolu[37]
TBAJ-587		Diarylchinolin	I	ATP syntáza[38]
TBAJ-876		Diarylchinolin	I	ATP syntáza[38]
TBI-223		Oxazolidinon	I	Syntéza proteinů (50S ribosomální podejednotky)[39]
SPR720		Benzimidazol-močovina	I	Syntéza DNA[40]
BTZ043		Benzothiazinon	IIa	DprE1[41]
OPC-167832		3,4-dihydrokarbostyril	IIb/IIc	DprE1[42]
Pyrifazimine (TBI-166)		Riminofenazin	IIa	Destabilizace membrány skrz produkci reaktivních forem kyslíku[43]

TBA-7371		1,4-azaindol	IIa	DprE1[44]
GSK3036656		Benzoxaborol	IIa	Syntéza proteinu (leucyl-tRNA syntetáza)[37]
Macozinone (PBTZ169)		Benzothiazinon	IIa	DprE1[41]
Telacebec (Q203)		Imidazopyridin-amid	IIa	Inhibice QcrB[45]
Sudapyridin (WX-081)		Triarylpyridin	IIa/IIb	ATP syntáza[46]
Sutezolid		Oxazolidinon	IIb	Syntéza proteinů (50S ribosomální podjednotky)[39]
Delpazolid		Oxazolidinon	IIb	Syntéza proteinů (50S ribosomální podjednotky)[39]
SQ-109		Ethylendiamin	IIb/III	MmpL3[47,48]

S ohledem směřování disertační práce je další teoretická část orientována na sloučeniny BTZ-043, PBTZ169, OPC-167832 a TBA-737. Tyto látky, které jsou shodně ve druhé fázi klinického testování, inhibují enzym DprE1 (Obr. 5). Enzym DprE1 katalyzuje oxidaci dekaprenylfosforyl-D-ribózy (DPR) na dekaprenylfosforyl-D-2´-keto-*erythro*-pentofuranózu (DPX), která je následně redukována DprE2 (dekaprenylfosforyl-D-2-keto-*erythro*-pentózo reduktáza) na dekaprenylfosforyl-D-arabinózu (DPA).



Obr. 5 *Epimerizace DPR na DPA pomocí DprE1/DprE2. Enzym DprE1 inhibují BTZ-043, PBTZ169, OPC-167832 a TBA-7371. Enzym DprE2 je dle nejnovějších poznatků pravděpodobně inhibován pretomanidem a delamanidem po předchozí Ddn aktivaci (převzato z lit.*[49,50]*).*

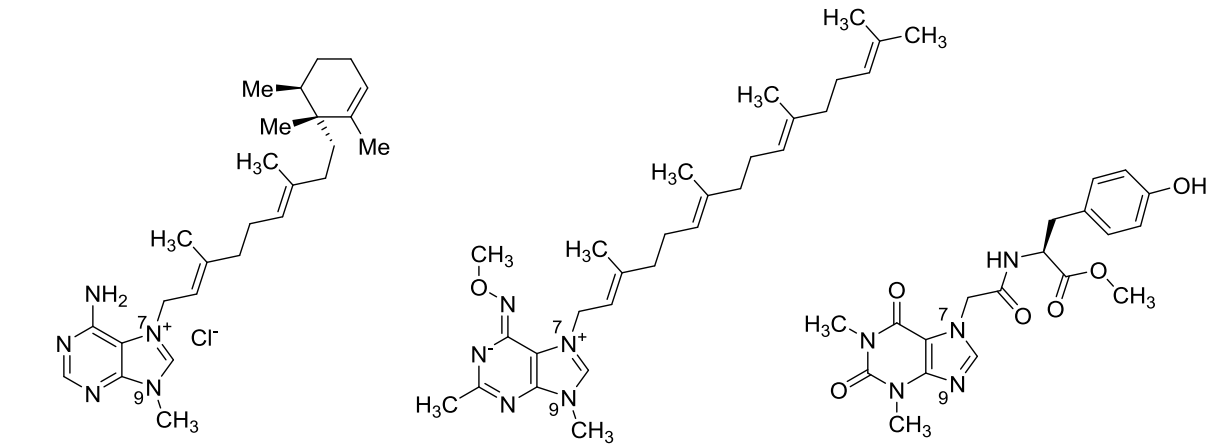
Inhibitory DprE1 můžeme dále dělit na kovalentní a nekovalentní. Přítomnost nitroskupiny je určující pro kovalentní inhibici DprE1. Ta je metabolicky redukována na reaktivní nitroso intermediát, který se sulfanylovou skupinou Cys387 DprE1 vytváří stabilní adukt v aktivním místě enzymu.[51] Dva kovalentní inhibitory, BTZ-043 a PBTZ169, vykazují vyšší anti-TB aktivitu než všechna v současnosti používaná antituberkulotika (BTZ043: MIC(*Mtb*) = 1 ng/ml; PBTZ169: MIC(*Mtb*) ≤ 0,19 ng/ml).[52,53] Nekovalentní inhibitory rovněž působí v aktivním místě enzymu, avšak interakce se sulfanylem Cys387 není pro jejich aktivitu nezbytná. Tento fenomén nepřímo koreluje s vysokou aktivitou OPC-167832 a TBA-7371 proti kmenům *Mtb* rezistentních vůči BTZ-043 s bodovou mutací Cys387 (Cys387Ser). Nekovalentní inhibitory OPC-167832 a TBA-7371 vykazují srovnatelnou anti-TB aktivitu (OPC-167832: MIC(*Mtb*) = 0,5 ng/ml; TBA-7371: MIC(*Mtb*) = 0,5 ng/ml) s benzothiazinony BTZ-043 a PBTZ169.[42,44]

Deriváty purinu s anti-TB aktivitou

Purinové deriváty jsou přirozeně se vyskytující sloučeniny, které jsou součástí biologicky důležitých systémů, jako jsou nukleové báze (guanin a adenin), ATP, alkaloidy (kofein,

theobromin, theofylin) a jsou i součástí některých skupin léčiv, např. antivirotik a antineoplastik.[54–57] V literatuře je popsaná i celá řada purinových derivátů s anti-TB aktivitou, toto téma je dobře shrnuté v přehledovém článku autorů Gruzdev *et al*.[58] U řady nukleosidových derivátů purinu je rovněž znám i biologický cíl, protože se autoři v těchto studiích soustředili zejména na inhibici specifického enzymu. Vysoká inhibiční aktivita vůči danému enzymu se však u těchto látek mnohdy neprojevila na celobuněčné úrovni, zejména s ohledem nedostupnosti biologického cíle kvůli lipofilní mykobakteriální buněčné stěně. U nenukleosidových derivátů purinu většinou samotný biologický cíl znám není.

Purinové deriváty s anti-TB aktivitou lze rozdělit i podle polohy substituce na imidazolovém kruhu. Většina derivátů s anti-TB aktivitou popsaných v literatuře je substituována v poloze 9-, protože tato substituce se vyskytuje v biologicky významných systémech popsaných výše. Z tohoto důvodu je substituce v poloze 7- raritní a derivátů s anti-TB aktivitou je tak popsáno velice málo.[59–64] Derivát se substitucí v poloze 7- a s vysokou anti-TB aktivitou proti $H_{37}Rv$ a MDR-TB kmenům je např. agelasin F (MIC = 3,13-6,25 μg/ml), který byl izolován z mořské houby *Agelase nakamurai* (Obr. 6).[65,66] Strukturní zjednodušení *agelasinu F* vedlo k derivátu **1** (Obr. 6), který vykazuje ještě vyšší anti-TB aktivitu (MIC < 0,2 μg/ml).[67] Nejvyšší *in vitro* anti-TB účinnost mezi 7-substituovanými puriny vykazovaly deriváty theofylin-7-octové kyseliny (MIC = 0,12 μg/ml pro nejúčinnější derivát **2**; Obr. 6).[68,68]

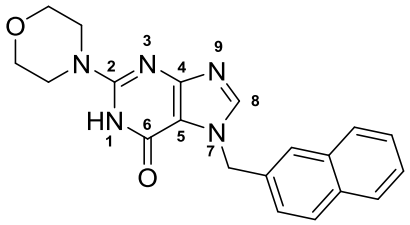


Obr. 6 *7-Substituované puriny s vysokou anti-TB aktivitou popsané v literatuře.*

Cíle práce

Cílem této práce bylo prozkoumat vztah mezi strukturou a účinkem (SAR) sloučeniny **10** (Obr. 7), která byla identifikována ve screeningu naší knihovny sloučenin, a na jejím základě vyvinout sloučeniny s optimalizovanými *in vitro* vlastnostmi, především vyšší anti-TB aktivitou, nižší cytotoxicitou, vyšší mikrosomální stabilitou a vyšší rozpustností ve vodě.

K prvotním informacím týkající se SAR posloužily rovněž i výsledky ze samotného screeningu. Ve struktuře předlohové sloučeniny byla provedena vždy jedna strukturní obměna, aby bylo z výsledků zřejmé, jaký je efekt této změny na anti-TB účinnost a byl vyloučen synergický, aditivní nebo naopak antagonistický efekt několika změn ve struktuře najednou.



***Obr. 7** Struktura sloučeniny **10** s číslováním purinového skeletu*

V rámci strukturních obměn předlohové látky byly provedeny substituce nejprve v poloze 2-. Do této polohy byly zavedeny primární a sekundární aminy, ze sekundárních aminů pak ty cyklické jako jsou pyrrolidin, piperidin a thiomorfolin. Z výsledků *in vitro* testování bylo určeno, který fragment je z pohledu anti-TB aktivity pro polohu 2- nejvýhodnější.

Následně byly provedeny strukturní obměny v poloze 6-. Do této polohy byly rovněž zavedeny primární a sekundární aminy, dále alkoxy a thioalkoxy skupiny, chlor a sulfanylová skupina. Poloha 7- byla dobře prozkoumána v prvotním screeningu, i přesto bylo na závěr několik obměn v této poloze provedeno.

V další fázi byla aplikována metoda molekulárního zjednodušení, která vyústila v novou sérii potenciálních antituberkulotik na bázi pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů. Tato skupina látek byla rovněž strukturně modifikována s cílem definovat SAR s ohledem na antimykobakteriální účinnost. Prvotní změny byly provedeny v poloze 2- a byly inspirovány předešlou sérií potenciálních antituberkulotik. Dále byla modifikována poloha 4-, do které byly zavedeny hlavně primární a sekundární aminy. Poloha 5- byla modifikována jako poslední. Na základě výsledků *in vitro* studií byly připraveny finální struktury, které ve struktuře kombinují právě ty fragmenty, které významně zvýšily anti-TB aktivitu.

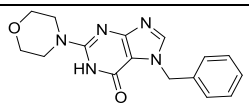
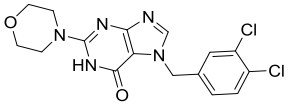
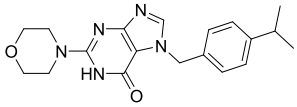
Výsledky a diskuse

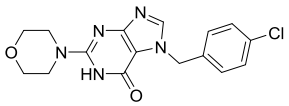
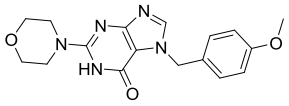
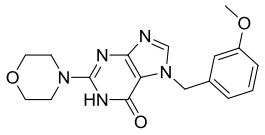
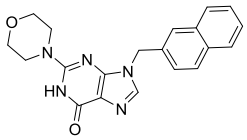
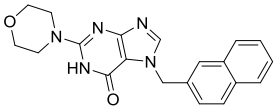
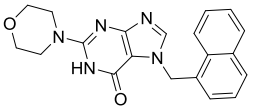
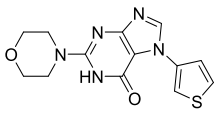
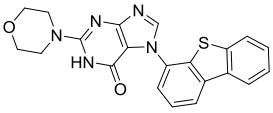
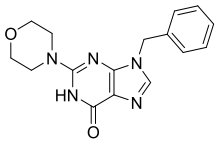
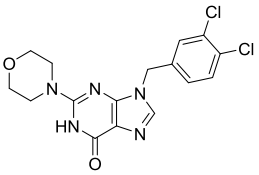
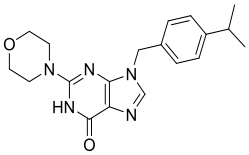
Nová antituberkulotika obsahující purin

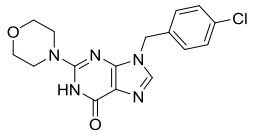
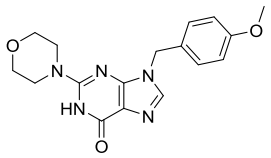
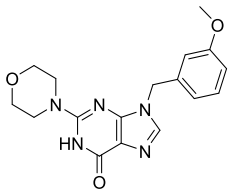
Na pracovišti Centra biomedicínského výzkumu (CBV) Fakultní nemocnice v Hradci Králové byla v minulosti připravena série látek na bázi purin-6-onů a pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-onů.[69] Tyto skupiny látek se původně profilovaly jako potenciální cytostatika, ale bohužel žádný z derivátů nevykázal významnou cytostatickou aktivitu. Z toho důvodu se tým doc. Korábečného rozhodl odeslat těchto 42 sloučenin do farmaceutické firmy Eli Lilly, která v rámci své výzvy Eli Lilly Open Innovation v high-throughtput screeningu otestovala tyto a další látky na jejich potenciální antituberkulotickou aktivitu. V tomto screeningu byla identifikována sloučenina **10** se střední anti-TB aktivitou (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM). Bohužel se jednalo o jediný takto účinný derivát, navíc účinnost byla vyhodnocena jako hraniční pro další vývoj, a proto firma od další spolupráce ustoupila.

Výsledky anti-TB aktivity od Eli Lilly byly ověřeny ve Zdravotním ústavě se sídlem v Ostravě (Tabulka 2), který potvrdil anti-TB aktivitu derivátu **10** (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM). Mimo potvrzení anti-TB aktivity derivátu **10** nám tyto výsledky daly základní vhled do vztahů mezi strukturou a účinkem (SAR). Z výsledků bylo patrné, že pro anti-TB aktivitu je stěžejní substituce v poloze 7- na purinu a že nejvýhodnějším substituentem je naftalen-2-ylmethyl, jelikož isomer 9 s naftalen-2-ylmethylem byl zcela neúčinný stejně jako derivát, kde byl purin v poloze 7- substituovaný naftalen-1-ylmethylem.

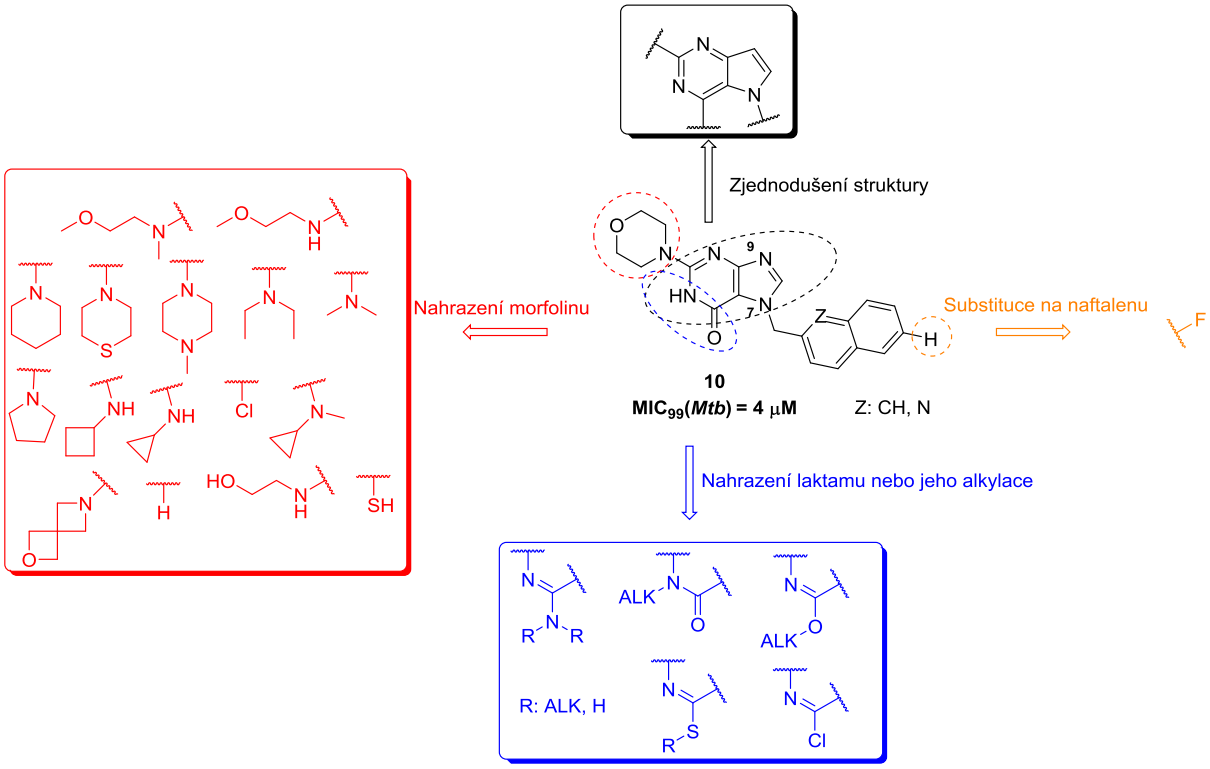
Tabulka 2. *Sloučeniny* ***3-19*** *a jejich antimykobakteriální aktivita proti Mtb, M. avium a M. kansasii vyjádřená jako* MIC_{99} *(μM) po 7 (v případě M. kansasii), 14 nebo 21 dnech inkubace. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Sloučenina	Struktura	*Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM) 14/21 dnů	*M. avium* MIC_{99} (μM) 14/21 dnů	*M. kansasii* MIC_{99} (μM) 7/14/21 dnů
3		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
4		16/32	>500/>500	>500/>500/>500
5		16/32	>500/>500	>500/>500/>500

6		>500/>500	>500/>500	125/250/>500
7		32/64	>500/>500	500/>500/>500
8		500/>500	500/>500	>500/>500/>500
9		>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
10		4/4	>500/>500	32/64/125
11		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
12		>500/>500	>500/>500	>500/>500
13		>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
14		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
15		>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
16		125/>250	>250/>250	>250/>250/>250

17		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
18		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
19		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

Pozice 7- z hlediska SAR byla dobře prozkoumaná již prvotním screeningem, protože byly testovány deriváty purin-6-onů, které mimo naftalen 2-ylmethylu obsahovaly ve struktuře i substituované benzyly či aryly (Tabulka 2). Žádný z těchto derivátů však nedosahoval anti-TB aktivity derivátu **10** obsahující ve struktuře naftalen-2-ylmethylovou skupinu v poloze 7-. V další fázi byly strukturní modifikace zaměřeny na polohy 2- a 6- (Obr. 8). Vždy byla provedena pouze jedna změna ve struktuře, aby bylo z *in vitro* testování anti-TB aktivity zřejmé, že za změnu v anti-TB aktivitě je odpovědná právě tato modifikace.



Obr. 8 *Provedené strukturní obměny sloučeniny* ***10****.*

Nejprve jsme se zaměřili na polohu 2, která se ze syntetického hlediska jevila jako nejjednodušší pro prvotní strukturní obměny. V této poloze byl nejprve bioisosterně nahrazen morfolin za jiné sekundární cyklické aminy jako jsou thiomorfolin, piperidin a pyrrolidin. Rovněž byl připraven derivát obsahující spiromorfolin, deriváty s otevřenými analogy morfolinu a dále byly do této polohy zavedeny i vybrané primární aminy. Mimo derivátů obsahující v této poloze amin byly na testování zaslány i deriváty s halogenem, vodíkem a sulfanylovou funkční skupinu. Byla provedena rovněž methylace dusíku *N*1 u derivátu **10** a do polohy 6- byly zavedeny primární a sekundární aminy, chlor, alkoxy a thioalkoxy skupiny a sulfanylová skupina.

Syntéza nových derivátů odvozených od sloučeniny **10**

Všechny nové deriváty purin-6-onů byly připraveny podle syntetického přístupu popsaného v literatuře.[71] Výchozími látkami v syntéze finálních derivátů **10**, **25-37**, **39**, **51-61**, **64-74**, **78** a **79** byly 2,6-dichlorpurin a 6-chlorpurin. 2,6-Dichlorpurin **20** byl alkylován alkylačními činidly 2-(brommethyl)naftalenem **21a**, 2-(brommethyl)-6-fluornaftalenem **21b**, resp. 2-(brommethyl)chinolinem (**21c**) v přítomnosti uhličitanu draselného v DMF (Schéma 1). Všechny alkylační reakce poskytly dva regioisomery 7 a 9, které byly od sebe odděleny pomocí sloupcové chromatografie. *N*-7 Substituované deriváty (**23a-c**) byly minoritními produkty, které měly vyšší retenci na silikagelu (nižší Rf) než *N*-9 produkty. *N*-7 Substituované deriváty byly klíčovými intermediáty, které byly izolovány ve výtěžku 16-23 %.

Purin-6-on **24**, který představoval klíčový intermediát při syntéze finálních sloučenin **10**, **25-37** a **39**, byl připraven podle publikovaného syntetického protokolu.[71] Chlor v poloze 6- byl substituován za hydroxy skupinu nukleofilní aromatickou substitucí probíhající ve vodném roztoku 1M NaOH při 100 °C. Reakce byla kvantitativní a derivát **24** byl připraven ve výtěžku 94 %.

Intermediát **24** byl podroben alkylaci dusíku *N*1 methyl jodidem v suchém DMF za použití hydridu sodného jako báze. Vzniklý derivát **38** byl připraven ve výtěžku 62 %.[72]

Finálním krokem reakční sekvence v přípravě purin-6-onů **10**, **25-37** a **39** byla druhá nukleofilní aromatická substituce, při které byl u derivátů **24** a **38** substituován chlor v poloze 2- za příslušný amin. Tato reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru v *terc*-butanolu a finální sloučeniny **10**, **25-37** a **39** byly připraveny ve výtěžcích 39-62 %.

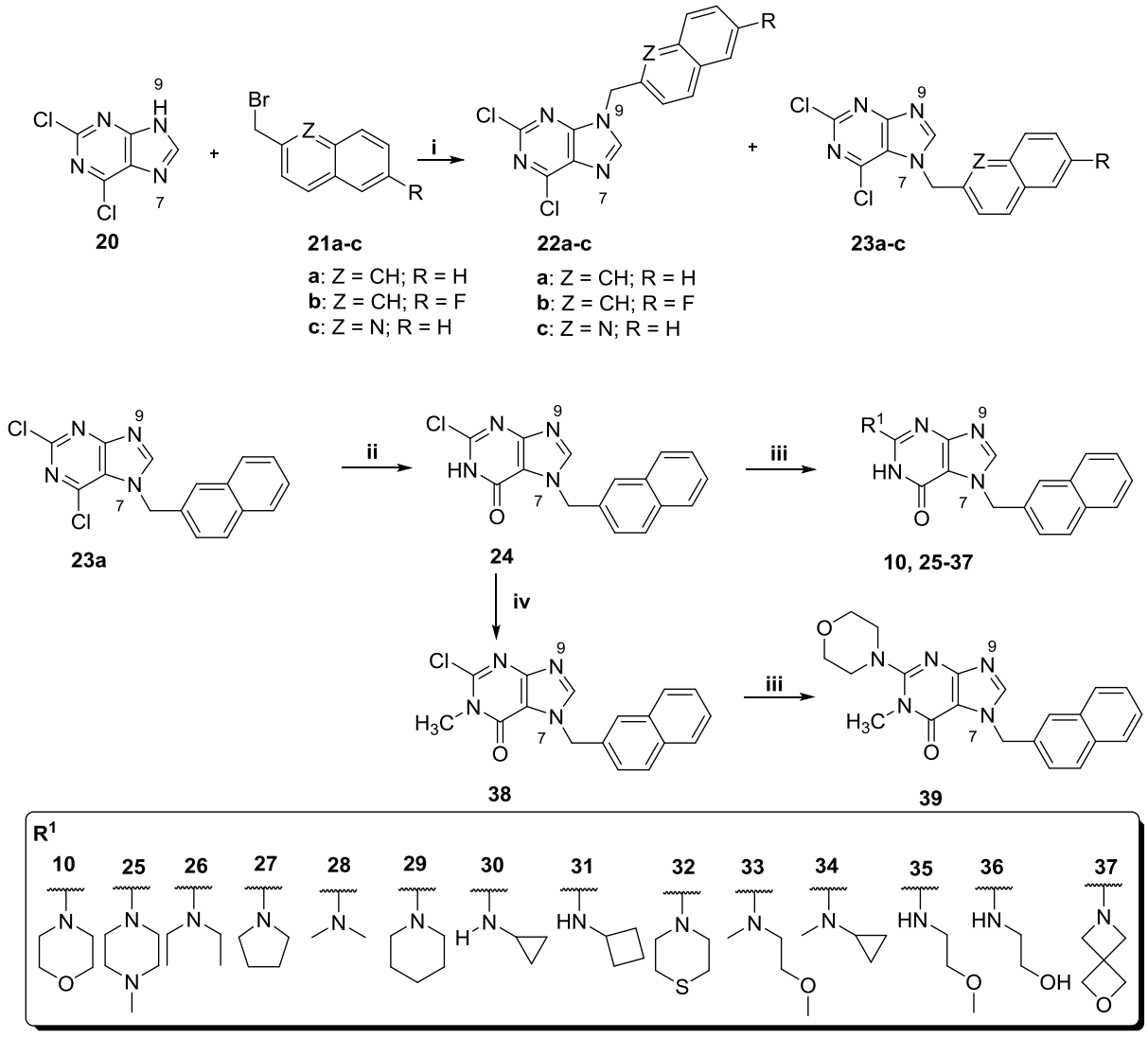


***Schéma 1**. Syntéza purinových derivátů **10**, **25-37** a **39**.* [a] *Činidla a podmínky: (i) K_2CO_3, DMF, 24 h, RT, 16-23 %; (ii) 1M NaOH, 100 °C, 24 h, 94 %; (iii) MW, amin, t-BuOH, 110 °C, 150 W, 3 h, 39-62 %; (iv) NaH, methyl jodid, DMF, 4h, RT, 62 %. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Deriváty **51-61** a **64-65** s amino skupinami v polohách 2- a 6- byly připraveny rovněž sekvencí dvou po sobě jdoucích nukleofilních aromatických substitucí (Schéma 2). První aromatická substituce, při které byl chlor v poloze 6- u derivátů **23a-c** substituován primárním a sekundárním aminem probíhala selektivně již při teplotě 45 °C v acetonitrilu. Deriváty **40-50** a **62-63** připravené touto syntetickou cestou byly získány ve výtěžcích 27-98 %. Druhá nukleofilní aromatická substituce, při které byl nahrazen chlor v poloze 2- za morfolin, vyžadovala drastičtější reakční podmínky a tato reakce probíhala za podmínek mikrovlnné aktivace při teplotě 180 °C. Deriváty **51-61** a **64-65** připravené touto reakční cestou byly získány ve výtěžku 34-81 %.

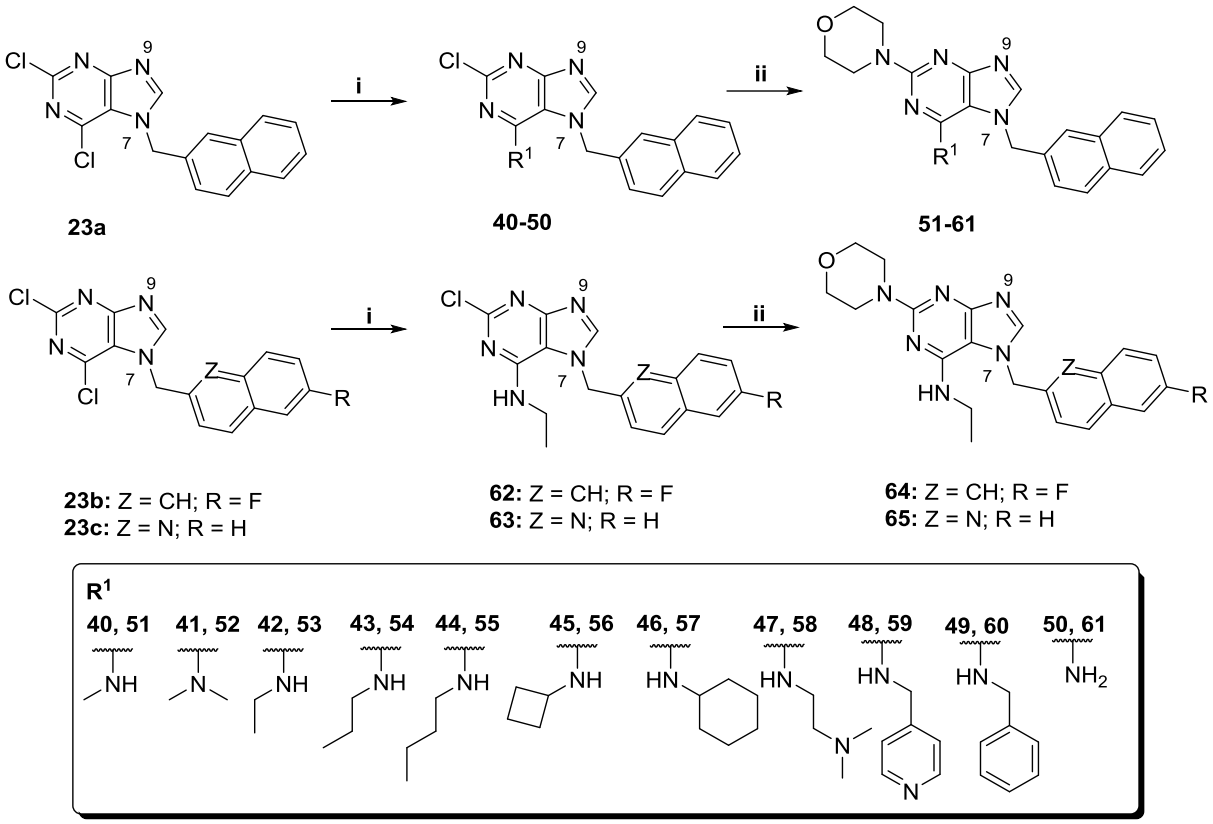


Schéma 2 *Syntéza purinových derivátů* ***51-61*** *a* ***64-65****.* [a] *Reakční podmínky: (i) příslušný amin, CH_3CN, 24 h, 45 °C, 45-98 %; (ii) morfolin, MW, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 34-81 %. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Intermediát **23a** byl výchozí látkou i při syntéze derivátů **66**-**69**. Intermediáty obsahující alkoxy skupinu (methoxy **66**, ethoxy **67**) v poloze 6- a chlor v poloze 2- byly připraveny reakcí derivátu **23a** s methoxidem a ethoxidem sodným ve výtěžcích 74 % (derivát **66**) a 64 % (derivát **67**). Finální sloučenina **68** byla připravena reakcí intermediátu **23a** s nadbytkem morfolinu za podmínek mikrovlnné aktivace, což umožnilo substituci obou atomů chloru v polohách 2- i 6-. Derivát **69** nesoucí dvě sulfanylové skupiny v polohách 2- a 6- byl připraven ve výtěžku 87 % reakcí intermediátu **23a** s thiomočovinou v ethanolu (EtOH) při 78 °C.[73]

Intermediáty obsahující v poloze 2- chlor a v poloze 6- methoxy nebo ethoxy skupinu měly být prekurzory pro přípravu finálních derivátů **71** a **72**. Reakce derivátů **66** a **67** s morfolinem v mikrovlnném reaktoru však poskytla pouze směs produktů, mimo jiné byla pozorována i substituce alkoxy skupin morfolinem. Z toho důvodu byl zvolen alternativní syntetický přístup, kdy byla nejprve finální sloučenina **10** převedena reakcí s $POCl_3$ na 6-chloro derivát **70** ve výtěžku 48 %. Intermediát **70** byl v dalším kroku podroben nukleofilní aromatické substituci, při které byl chlor v poloze 6- substituován methoxidem sodným (derivát **71**, výtěžek 90 %) nebo ethoxidem sodným (derivát **72**, výtěžek 61 %).

Pro kompletní doplnění vztahů mezi strukturou a účinkem byly reakcí derivátu **71** se sodnými solemi thioalkoholátů připraveny i deriváty **73** (výtěžek 93 %) a **74** (výtěžek 91 %).

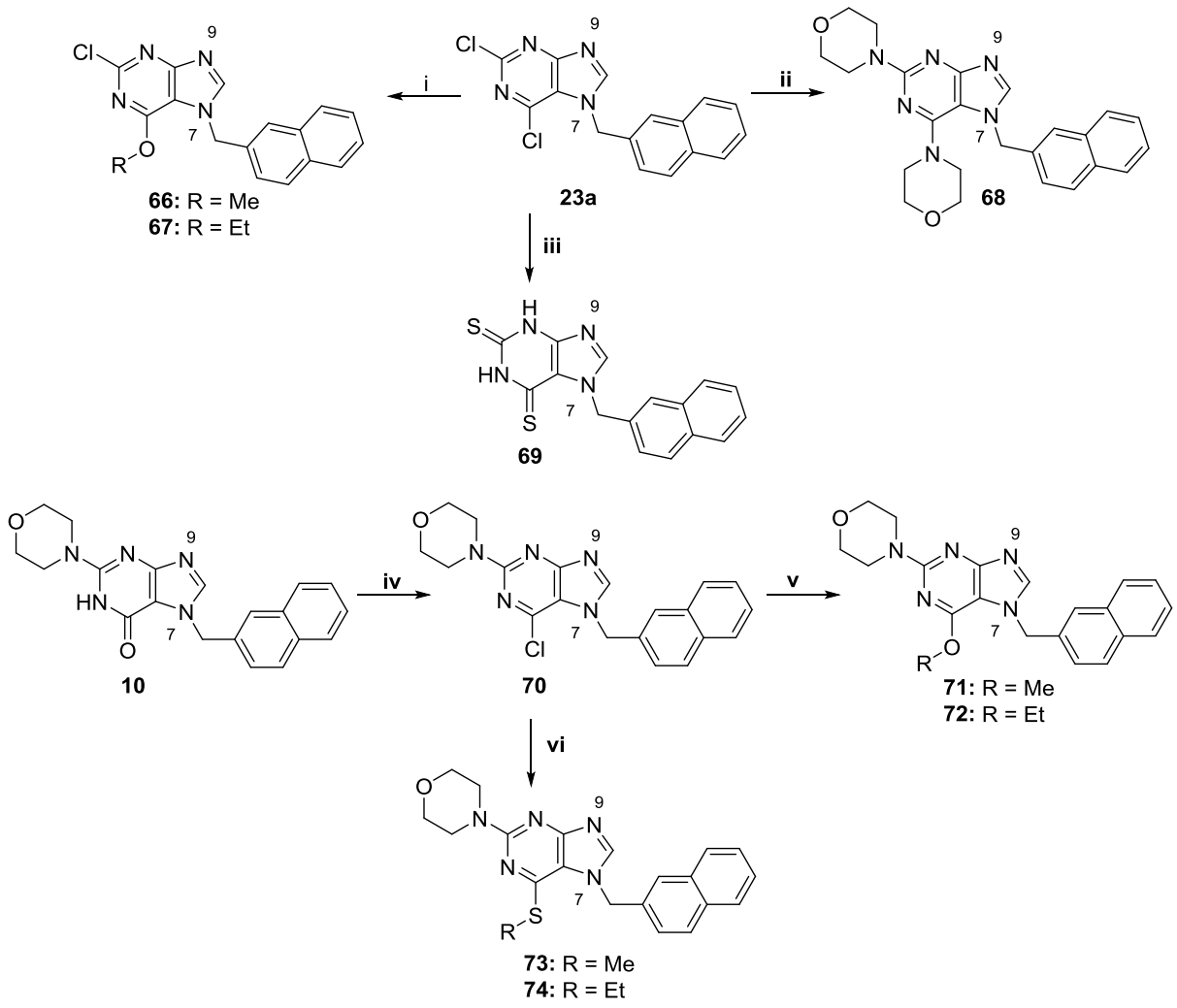


Schéma 3. *Syntéza purinových derivátů* ***66-74***. *[a] Reakční podmínky: (i) příslušný alkoxid sodný, alkohol, reflux, 2h, 64-74 %; (ii) morfolin, MW, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 76 %; (iii) thiomočovina, EtOH, 78 °C, 24 h, 87 %; (iv) $POCl_3$, 0 °C-135 °C, 3 h, 48 %; (v) příslušný alkoxid sodný, THF, 25 °C, 2 h, 61-90 %; (vi) příslušný alkoxid sodný, THF, 25 °C, 2 h, 91-93 %. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Derivát **77** byl připraven stejným postupem jako v případě sloučenin **23a-c** (Schéma 4). Výchozí látkou pro přípravu derivátu **77** byl 6-chlor-9*H*-purin (**75**), který reagoval s 2-(brommethyl)naftalenem **21a** a poskytl tak derivát **77** ve výtěžku 16 %. Hydrolýza derivátu **77** probíhala kvantitativně a poskytla derivát **78** ve vysokém výtěžku 96 %. Reakce s thiomočovinou probíhala téměř kvantitativně, poskytla derivát **79** ve výtěžku 91 %. Pro objasnění role dusíku v poloze 9- na anti-TB aktivitu byl připraven i 9-deazapurinový derivát **83**. Klíčovým intermediátem byl derivát **81**, který byl připraven ve výtěžku 86 % reakcí 2,4-dichlor-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu **80** s 2-(brommethyl)naftalenem **21a** v DMF s využitím

uhličitanu draselného jako báze. Hydrolýza derivátu **81** neprobíhala již v roztoku 1M NaOH jako v případě derivátů **24** a **78**, ale byla provedena v roztoku 2M NaOH v přítomnosti dioxanu, který byl použit jako kosolvent. Reakce probíhala při 100 °C a po dvou hodinách poskytla derivát **82** ve výtěžku 72 %. Posledním krokem byla nukleofilní aromatická substituce, při které byl v mikrovlnném reaktoru nahrazen chlor v poloze 2- derivátu **82** za morfolin. Tento reakční krok poskytl derivát **83** ve výtěžku 81 %.

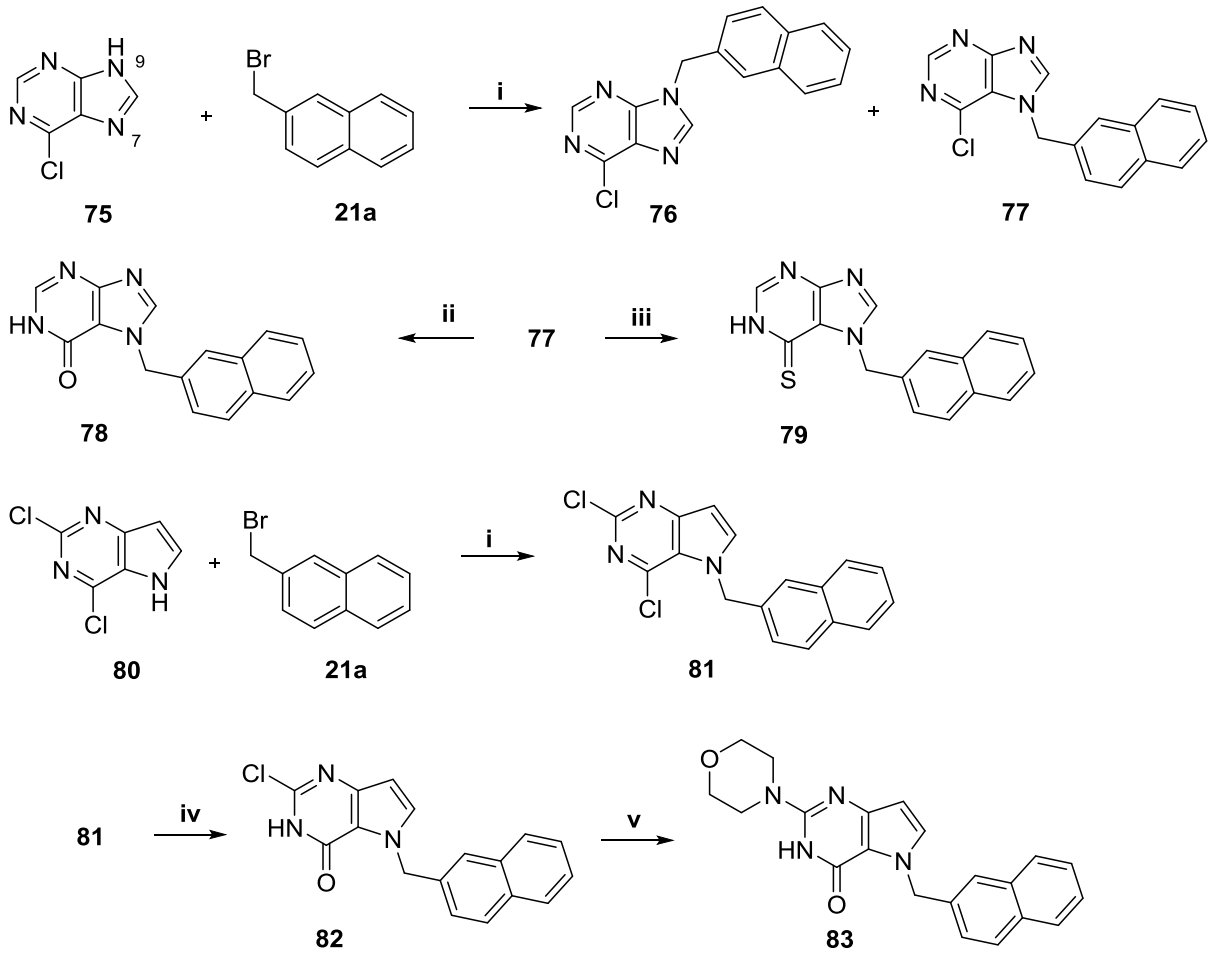


Schéma 4 *Příprava purinových derivátů* ***78-79*** *a 9-deazapurinového derivát* ***83****.* [a] *Reakční podmínky: (i) K_2CO_3, DMF, 24 h, 25 °C; (ii) 1M NaOH, 100 °C, 24 h, 96 %; (iii) thiomočovina, EtOH, 78 °C, 24 h, 89 %; (iv) 2M NaOH/dioxan, 100 °C, 2 h, 72 %; (v) morfolin, MW, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 81 %. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

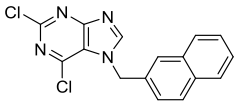
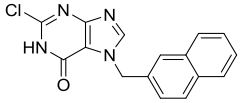
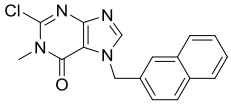
In vitro anti-TB aktivita sloučenin na bázi purinu a vztah mezi strukturou a účinkem

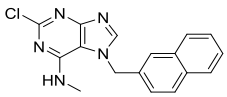
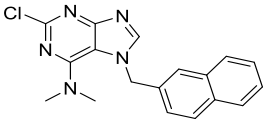
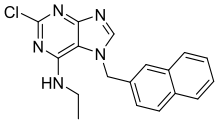
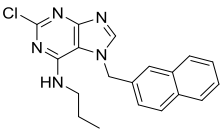
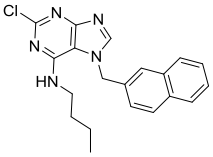
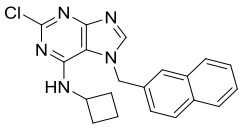
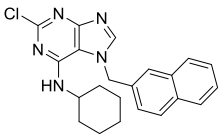
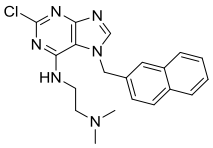
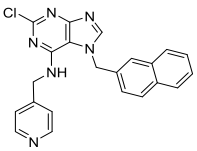
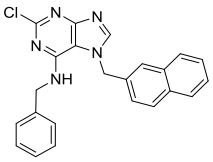
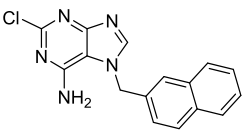
Všechny sloučeniny byly odeslány na Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, kde byly otestovány proti sbírkovému kmenu *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88 a sbírkovým atypickým kmenům mykobakterií *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88 a *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 a jejich aktivita byla porovnána s účinností standardu INH.

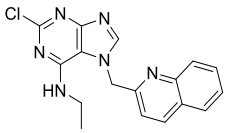
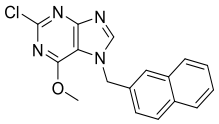
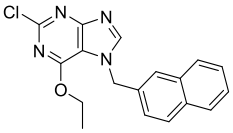
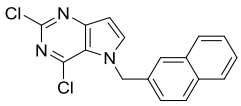
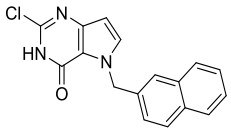
Deriváty **10**, **29**, **32**, **56**, **60-61** a **71-72**, které vykazovaly aktivitu MIC_{99} alespoň 2 μM, byly dále testovány na multirezistentní kmeny mykobakterií (MDR kmeny) s označením Praha 1, Praha 4, Praha 131, 9449/2007, 234/2005, 7357/1998 a 8666/2010, které byly klinicky izolovány z pacientů a jsou uloženy na Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě.

Screening naší knihovny látek nám kromě potvrzení anti-TB aktivity derivátu **10** (MIC_{99} = 4 μM) dal rovněž základní vhled do vztahů mezi strukturou a účinkem (SAR). Z výsledků uvedených v Tabulce 1 bylo patrné, že pro anti-TB aktivitu je stěžejní zejména substituce v poloze 7- na purinu (Tabulka 1, deriváty **4**,**5** a **10**) a že nejvýhodnějším substituentem v této poloze je naftalen-2-ylmethyl (Tabulka 1, derivát **10**). Na testování anti-TB aktivity jsme mimo finálních sloučenin zaslali rovněž intermediáty, jejichž anti-TB aktivita je uvedena v Tabulce 2. Sloučeniny obsahující v poloze 2- substituenty méně objemné než naftalen byly poslány rovněž na testování anti-TB aktivity, protože vědecká skupina L.L. Gundersenové již dříve publikovala studii, v níž autoři připravili deriváty purinu, které byly v poloze 9- substituovány benzyly a v poloze 6- aryly. Tyto deriváty vykazovaly vysokou anti-TB aktivitu, pokud v poloze 2- obsahovaly vodík nebo chlor.[60,62] Všechny deriváty v purinové sérii obsahující v poloze 2- chlor **23a**, **24**, **38**, **40-50**, **62**, **66-67**, **81-82** nebo vodík **77-79** však byly zcela neúčinné (MIC_{99}(*Mtb*) ≥ 32 μM). Pro další diskusi anti-TB aktivity připravených sloučenin budou deriváty s hodnotami MIC_{99}(*Mtb*) ≥ 32 μM považovány za neúčinné, MIC_{99}(*Mtb*) 4-16 μM za středně účinné a deriváty s hodnotami MIC_{99}(*Mtb*) ≤ 2 μM za vysoce účinné.

Tabulka 2. *Sloučeniny **23a, 24, 38, 40-50, 62, 66-67** a **81-82** a jejich antimykobakteriální aktivita proti Mtb, M. avium a M. kansasii vyjádřená jako MIC_{99} (μM) po 7 (v případě M. kansasii), 14 nebo 21 dnech inkubace. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Sloučenina	Struktura	*Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. avium* MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. kansasii* MIC_{99} (μM) 7/14/21 dní
23a		64/125	>500/>500	125/250/500
24		64/125	>500/>500	500/>500/>500
38		1000/>1000	>1000/>1000	500/1000/>1000

40		64/125	>500/>500	250/250/250
41		32/64	500/100	250/250/500
42		64/64	500/1000	250/500/1000
43		64/125	>1000/>1000	1000/>1000/>1000
44		>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000
45		125/125	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000
46		64/64	>1000/>1000	125/125/125
47		>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000
48		64/64	>500/>500	250/500/>500
49		64/64	500/1000	500/1000/>1000
50		>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250

62		>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000
66		64/125	>1000/>1000	1000/>1000/>1000
67		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
81		125/125	>1000/>1000	125/125/250
82		125/125	>500/>500	250/250/250

Prvotní strukturní modifikace purinového skeletu byly zaměřeny především na náhradu morfolinu v poloze 2- za jiné aminy. Z výsledků uvedených v Tabulce 3 lze vyčíst, že pro anti-TB aktivitu purin-6-onů je stěžejní zavedení sekundárního aminu do této polohy, zejména výhodné je zavedení cyklických sekundárních aminů (pyrrolidin, piperidin, thiomorfolin). Z necyklických sekundárních aminů vykázal střední anti-TB aktivitu pouze derivát obsahující *N*-methylcyklopropylamin (**34**: MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM). Dále byla provedena methylace dusíku *N*1 derivátu **10**, která vyústila ve sloučeninu **39** se střední anti-TB aktivitou (**39**: MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM).

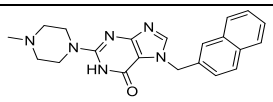
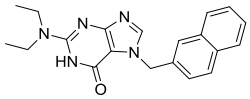
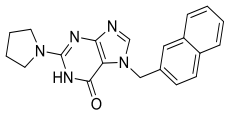
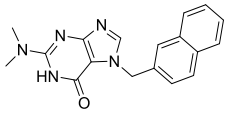
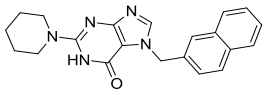
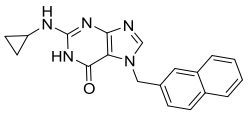
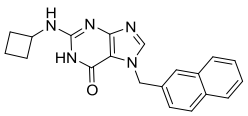
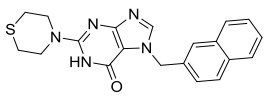
Další strukturní modifikace byly provedeny v poloze 6-. Pro anti-TB aktivitu bylo nejvýhodnější zavedení primárního aminu do této polohy. Deriváty, u kterých byl zaveden sekundární amin, dosahovaly nižších anti-TB aktivit (např. derivát **52** s *N*,*N*-dimethylamino skupinou: (MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM) než derivát **51** s methylamino skupinou (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM). Z 6-amino purinových derivátů vykazovaly nejvyšší anti-TB aktivitu sloučeniny obsahující primární amino (**61**: MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM) nebo ethylamino (**53**: MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM) skupiny.

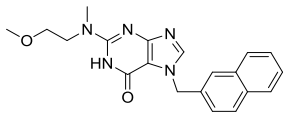
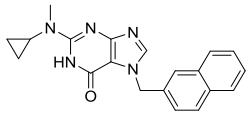
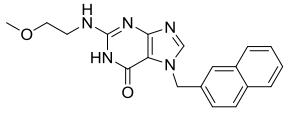
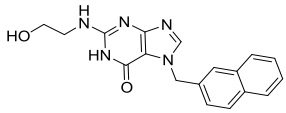
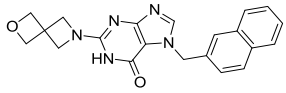
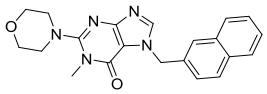
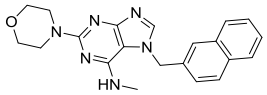
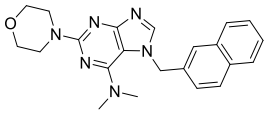
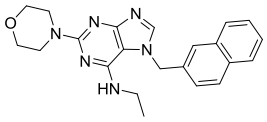
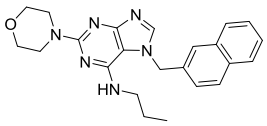
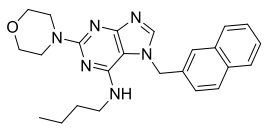
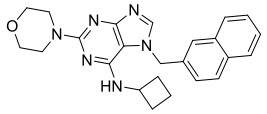
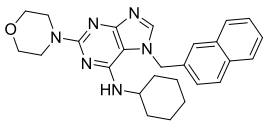
Pro hlubší prozkoumání SAR byly do této polohy zavedeny chlor, alkoxy a thioalkoxy skupiny. Derivát **70** s chlorem v poloze 6- vykazoval pouze střední anti-TB aktivitu (MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM). Deriváty s thiomethoxy (**73**: (MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM) a thioethoxy (**74**: (MIC_{99}(*Mtb*) = 4 μM) skupinou vykazovaly čtyřikrát nižší anti-TB aktivitu než deriváty

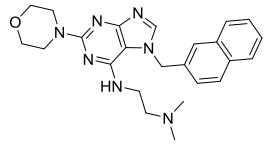
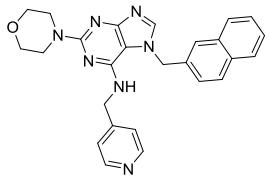
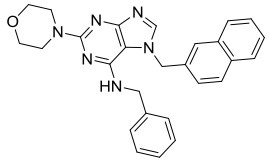
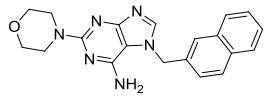
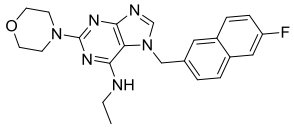
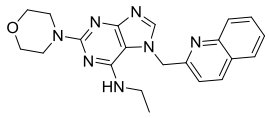
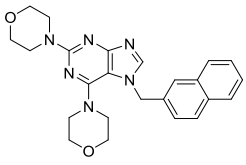
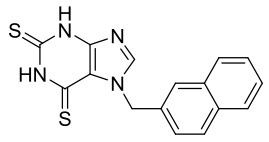
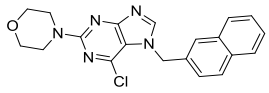
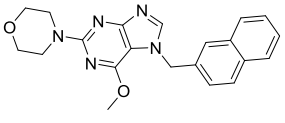
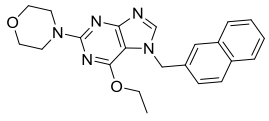
s methoxy skupinou (**71**: (MIC_{99}(*Mtb*) = 2 μM) a ethoxy (**72**: (MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM) substituenty.

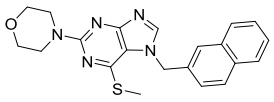
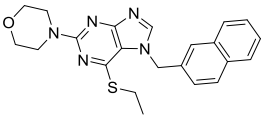
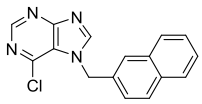
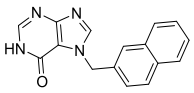
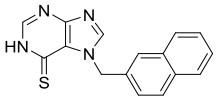
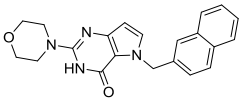
Rovněž byl připraven i derivát **83** (MIC_{99}(*Mtb*) > 500 μM), který je 9-deazapurinovým derivátem **10**. Tento derivát byl zcela neúčinným, což poukazuje na fakt, že pro anti-TB aktivitu této skupiny látek je stěžejní i přítomnost dusíku N9.

Tabulka 3. *Sloučeniny **25-39**, **51-61**, **64-65**, **68-74** a **77-78** a jejich antimykobakteriální aktivitu proti Mtb, M. avium a M. kansasii vyjádřená jako MIC_{99} (μM) po 7 (v případě M. kansasii), 14 nebo 21 dnech inkubace. Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.*[70]

Sloučenina	Struktura	*Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. avium* MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. kansasii* MIC_{99} (μM) 7/14/21 dní
25		250/500	>500/>500	250/500/500
26		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
27		8/16	>500/>500	>500/>500/>500
28		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
29		2/4	>500/>500	>500/>500/>500
30		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
31		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
32		2/4	>500/>500	32/64/125

33		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
34		16/16	>500/>500	125/250/500
35		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
36		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
37		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
39		32/64	>500/>500	500/>500/>500
51		4/4	>500/>500	8/8/8
52		8/16	500/500	32/64/125
53		1/1	250/250	4/8/8
54		4/4	125/125	8/8/16
55		4/4	64/125	8/8/8
56		2/4	250/500	8/8/8
57		32/64	>500/>500	64/125/250

58		32/64	500/500	64/125/125
59		8/8	250/500	64/64/64
60		2/4	64/64	4/4/8
61		1/2	>500/>500	4/8/16
64		4/8	>500/>500	16/16/16
65		4/8	>250/>250	64/64/64
68		125/125	250/500	125/125/250
69		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
70		16/16	>500/>500	16/32/64
71		2/4	250/500	16/32/64
72		1/2	>500/>500	8/16/16

73		8/8	>500/>500	32/64/64
74		4/4	>500/>500	32/64/125
77		125/125	>1000/>1000	1000/>1000/ >1000
78		>500/>500	>500/>500	125/>500/>500
79		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
83		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

Deriváty s anti-TB aktivitou MIC_{99} = 2 μM a vyšší byly testovány i proti klinicky izolovaným kmenům MDR-TB a XDR-TB (Tabulka 4). Deriváty **10**, **29** a **32** s purin-6-onovým strukturním fragmentem vykazovaly výraznější pokles v aktivitě proti těmto kmenům (osmkrát) než deriváty s alkylamino **53**, **56**, a **60**, amino **61** a alkoxy **72** skupinou. Jedinou výjimku tvořil derivát **71** s methoxy skupinou v poloze 6-, který stejně jako purin-6-ony vykazoval přibližně osminásobný pokles v anti-TB aktivitě. Naproti tomu si nejúčinnější deriváty **53**, **61** a **72** zachovaly vysokou účinnost (MIC_{99} = 2-4 μM).

Tabulka 4. *In vitro antimykobakteriální aktivita nejvíce účinných purinových derivátů a anti-TB léčiv proti klinicky izolovaným kmenům Mtb MDR/XDR.[a,b] Převzato z literatury 70 – viz Příloha I.[70]*

	***Mtb* (kmeny MDR/XDR)**						
Derivát	PRAHA 1	PRAHA 4	PRAHA 131	9449/ 2007	234/ 2005	7357/ 1998	8666/ 2010
10	32/64	16/32	32/32	32/64	16/32	32/64	32/64
29	16/16	8/16	8/16	8/16	16/16	16/16	8/8
32	16/16	8/16	8/16	8/16	16/16	16/16	8/8
53	ND	ND	2/4	2/4	ND	ND	2/2
56	4/4	4/8	4/8	4/8	4/8	4/8	4/8

60	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	4/4
61	ND	ND	2/4	2/4	ND	ND	2/4
71	16/16	8/16	8/16	8/16	16/16	16/16	8/8
72	ND	ND	2/4	2/4	ND	ND	2/2
INH	16 (R)	16 (R)	16 (R)	64 (R)	16 (R)	16 (R)	32 (R)
EMB [b]	32 (R)	16 (R)	32 (R)	8 (C)	16 (R)	16 (R)	16 (R)
RIF	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)
STR [b]	16 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
AMI [b]	0,5 (C)	1 (C)	>32 (R)	0,5 (C)	0,5 (C)	1 (C)	2 (C)
GEN [b]	1 (C)	0,5 (C)	>8 (R)	1 (C)	0,25 (C)	1 (C)	2 (C)
CFZ [b]	0,5 (R)	0,5 (R)	0,25 (C)	0,125 (C)	0,125 (C)	0,125 (C)	2 (R)
OFX [b]	1 (C)	> 16 (R)	16 (R)	2 (C)	0,5 (C)	8 (R)	8 (R)

[a] *Výsledky jsou vyjádřené jako MIC_{99} (μM) po 14 a 21 dnech inkubace a 14 dnech inkubace anti-TB léčiv.*[b] *AMI, amikacin; CFZ, clofazimin; GEN, gentamicin; OFX, ofloxacin; STR, streptomycin; R = rezistentní; C = citlivé*

Ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu FNHK byla stanovena antibakteriální aktivita, mikrosomální stabilita, solubilita a cytotoxicita těchto látek. Tyto purinové deriváty byly testovány na panelu gram pozitivních i gram negativních bakterií (*Staphylococcus aureus* subsp. aureus, methicilin-rezistentní *S. aureus* subsp. aureus, *S. epidermidis*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL negativní, *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*). Z výsledků uvedené v naší studii (Příloha 1) je patrné, že tyto deriváty byly proti těmto osmi bakteriálním kmenům zcela neúčinné, čímž se potvrdila vysoká selektivita těchto derivátů k *Mtb*.

Cytotoxický profil nejúčinnějších derivátů byl zkoumán v modelu buněk lidského hepatocelulárního karcinomu HepG2. Tyto buňky představují nejčastější buněčnou linií, na které se ověřuje cytotoxicita (přesněji antiproliferativní účinnost; pro účely předložené práce je používán termín cytotoxicita bez ohledu na typ buněk a metodu stanovení) potenciálních antituberkulotika v řadě publikovaných prací. Hodnoty IC_{50}(HepG2) umožňují porovnat cytotoxický profil našich sloučenin s těmi již publikovanými.[74–77]. Mimo hodnot IC_{50} byl u každého derivátu rovněž vypočítán index selektivity (SI), který je poměrem IC_{50}(HepG2) a

hodnot MIC_{99}(*Mtb*-H_{37}Rv). Většina nejúčinnějších derivátů v této studii má nižší cytotoxicitu vůči HepG2 s ohledem dosažených hodnot MIC_{99}(*Mtb*-H_{37}Rv) (IC_{50}(HepG2) > 30,75 μM). Nejméně cytotoxickými deriváty v celé sérii byly výchozí purin-6-on **10** (IC_{50}(HepG2) > 125 μM, SI > 31,25) a derivát **61** s primární amino skupinou v poloze 6- (**61**: IC_{50}(HepG2) > 125 μM, SI > 125). Nízkou cytotoxicitu vykazovaly i deriváty s ethylamino (**53**: IC_{50}(HepG2) = 63,88 μM, SI = 63,88) a ethoxy (**72**: IC_{50}(HepG2) = 43,45 μM, SI = 43,5) skupinou.

Stěžejní bylo i stanovení rozpustnosti ve vodě, a to z důvodu možné *in vivo* aplikace. Purin-6-ony vykazovaly výrazně nižší rozpustnost ve vodě než deriváty obsahující amino a alkoxy skupinu v poloze 6-. Purin-6-on **10** vykazoval přibližně pětkrát vyšší rozpustnost ve vodě (**10**: solubilita = 46,9 μM) než derivát s piperidinem (**29**: solubilita 8,4 μM) nebo thiomorfolinem (**32**: solubilita = 9,3 μM). Mezi nejúčinnějšími sloučeninami dosáhl derivát **53** přibližně třikrát vyšší rozpustnosti ve vodě (**53**: solubilita 150,4 μM) než purin-6-on **10**. Deriváty **61** a **72** dosáhly rovněž vyšší rozpustnosti ve vodě (**61**: solubilita ve vodě = 97,7 μM; **72**: solubilita ve vodě = 81,3 μM) než derivát **10**.

U stanovení mikrosomální stability na lidských jaterních mikrosomech posloužily verapamil a diazepam jako standardy. Zatímco prvně uvedené léčivo patří mezi zástupce rychle se metabolizující, diazepam je vysoce metabolicky stabilní. Tento experiment posloužil k určení rychlosti první fáze biotransformace. Nejstabilnějším derivátem z nově testovaných sloučenin byl purin-6-on **10**, který vykázal přibližně desetkrát vyšší stabilitu než verapamil. Naproti tomu nejnižší mikrosomální stabilitu vykázal purin-6-on **32** s thiomorfolinem v poloze 2-, a to pravděpodobně kvůli oxidaci síry thiomorfolinu.[78] Sloučeniny s nejvyšší anti-TB aktivitou **53**, **61** a **72** lze zařadit svými hodnotami clearance na průměr hodnot dosažených verapamilem a diazepamem.[70]

Mechanismus účinku byl určen dvěma experimentálními metodami, a to ve spolupráci s Dr. Rubenem Hartkoornem z Pasteurova institutu a prof. Katarinou Mikušovou z Univerzity Komenského v Bratislavě. Na Pasteurově institutu se týmu Dr. Hartkoorna podařilo izolovat rezistentní kmeny *Mtb* ke sloučenině **10**. Tři z těchto rezistentních kmenů (MIC_{99} > 128 μM) byly podrobeny genové sekvenaci. Dva z těchto kmenů vykazovaly mutace v genu *dprE1* (Rv3790: t1103c-> L368P) a rovněž mutace v *Rv1356c* (t103 g-> W35G). Třetí rezistentní kmen vykazoval mutaci rovněž v *dprE1* (Rv3790:g661 -> E221Q). Tyto mutace jsou známé z literatury i pro jiné nekovalentní inhibitory DprE1.[79–81]

Prof. Mikušová využila při ověření biologického cíle faktu, že inhibice mykobakteriálního DprE1 vede k akumulaci specifických mykobakteriálních lipidů trehalózo dimykolátů a trehalózo monomykolátů v mykobakterii. Na základě metody radioaktivního značení využívající [^{14}C]-acetát při růstu *Mtb* bylo zjištěno, že deriváty (**10**, **53** a **72**) vykazují stejný efekt na kumulaci mykobakteriálních lipidů jako standard BTZ-043, což je kovalentní inhibitor DprE1 v druhé fázi klinického testování. Na závěr byla provedena i molekulově modelovací studie pro objasnění interakcí derivátů **10** a **53** s enzymem DprE1. Pro tuto studii byl použit kokrystal DprE1 (PDB ID: 4P8N) s nekovalentním inhibitorem na bázi 2-karboxychinoxalinu QN118. Tento enzym-ligand komplex byl vybrán na základě strukturní podobnosti QN118 s derivátem **10**.[82]

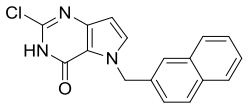
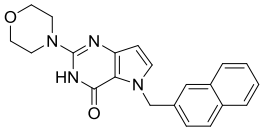
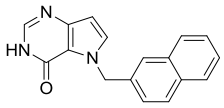
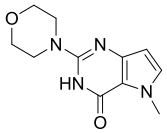
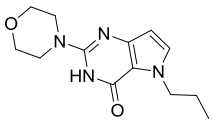
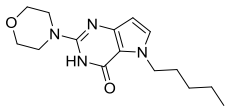
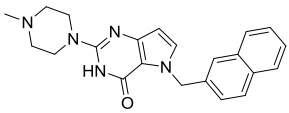
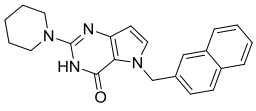
U derivátu **53** byla plánována farmakokinetika *in vivo*, která by poskytla určující informace o vhodnosti pro navazující *in vivo* studie na myším modelu TB. Avšak solubilita derivátu **53** ve vodě byla nedostatečná pro stanovení farmakokinetického profilu. Z tohoto důvodu došlo k navázání spolupráce s prof. Hrubým z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, který již dříve se svým týmem připravil nanoformulaci rifampicinu. Ta byla následně otestována v *in vivo* modelu na myších infikovaných TB v Odboru biologické ochrany v Těchoníně.[83] Obdobná nanoformulace s vyšší solubilitou ve vodě byla připravena i pro derivát **53**. Farmakokinetické stanovení na myším modelu však ukázalo, že koncentrace **53** v plasmě byla nízká, a tudíž tento derivát nebyl vhodným kandidátem pro testování *in vivo* na myším modelu TB. Celý projekt tak byl ukončen bez dalšího *in vivo* testování. Tato kapitola se stala podkladem pro experimentální vědeckou práci autora (Příloha 1) a pro národní patentovou přihlášku, která byla přijata a byl udělen tuzemský patent (Příloha 3).

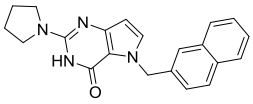
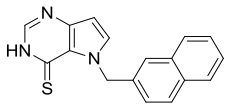
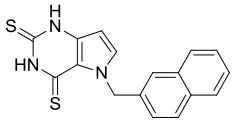
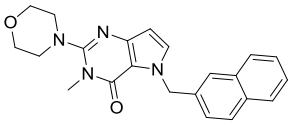
Antituberkulotika na bázi pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů

Pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinová antituberkulotika byla rozvíjena v návaznosti na purinovou sérii sloučenin s cílem zjednodušit syntézu cílových molekul. Hlavním úskalím při syntéze purinových antituberkulotik se ukázal zejména první alkylační stupeň 2,6-dichlorpurinu, který poskytuje směs dvou isomerů 7- a 9-. Všechny účinné sloučeniny byly isomery 7-, které jsou pouze minoritním produktem této reakce s výtěžkem nepřekračujícím 23 %.

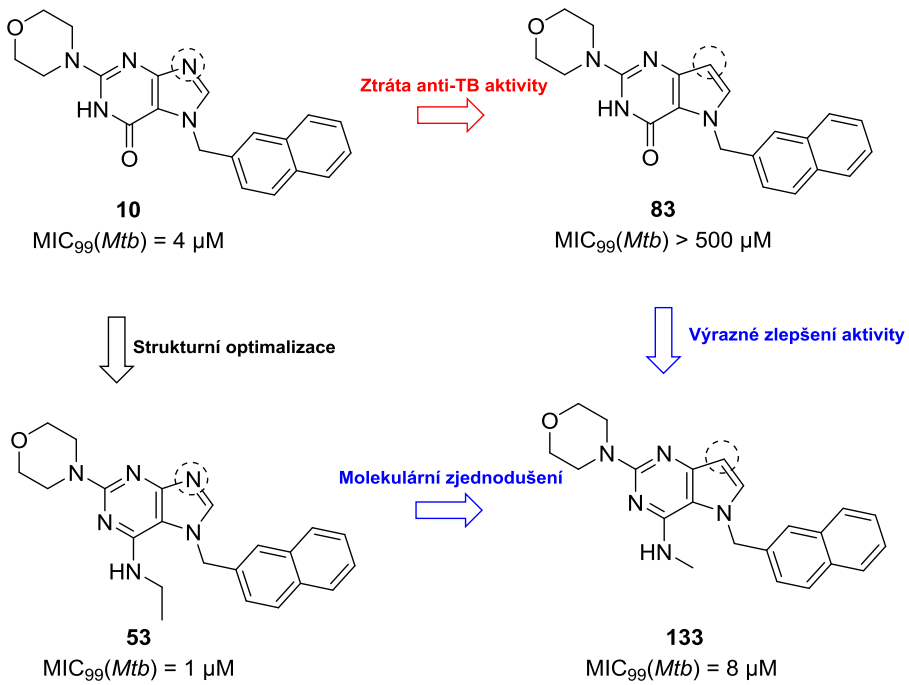
Strukturním zjednodušením tak bylo získáno celkem 12 sloučenin na bázi 3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-onů. Tyto deriváty se lišily substitucí v polohách 2-, 4- a 5-. Všechny uvedené sloučeniny však byly zcela neúčinné proti všem testovaným tuberkulózním kmenům (*Mtb*, *M. avium* a *M. kansasiii;* Tabulka 4).

Tabulka 4. *Sloučeniny* ***82-96*** *a jejich antimykobakteriální aktivitu proti Mtb, M. avium a M. kansasii vyjádřená jako* MIC_{99} *(μM) po 7 (v případě M. kansasii), 14 nebo 21 dnech inkubace.*

Sloučenina	Struktura	*Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. avium* MIC_{99} (μM) 14/21 dní	*M. kansasii* MIC_{99} (μM) 7/14/21 dní
82		125/250	>500/>500	250/250/250
83		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
99		250/250	>500/>500	>500/>500/>500
100		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
101		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
102		>500/>500	>500/>500	500/>500/>500
103		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
104		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

105		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
106		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
107		>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
109		64/125	>250/>250	>250/>250/>250

V souladu s výsledky z purinové série antituberkulotik lze považovat za klíčovou přítomnost dusíku v poloze 9- základního skeletu pro zachování anti-TB aktivity. V případě nové série došlo k výraznému zlepšení anti-TB aktivity až po zavedení methylamino skupiny do polohy 4- u derivátu **133** (MIC_{99}(Mtb-H_{37}Rv) = 8 µM), který se stal předlohovou strukturou pro navazující sérii sloučenin strukturně příbuzným 9-deazapurinům (Obr. 9).



Obr. 9 *Design nových pyrrolo[3,2-d]pyrimidinů odvozených od purinových derivátů* ***10*** *a* ***53****.*

Syntéza nových derivátů pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů

Při syntéze nových 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinových derivátů byly použity stejné syntetické přístupy jako v předchozí studii zabývající se purinovými deriváty. Některé reakční kroky se lišily pouze reakční dobou, teplotou a přídavkem kosolventu, zpravidla dioxanu s ohledem limitující solubility intermediátů. Příprava derivátů **81** a **89-94** vychází z komerčně dostupného prekurzoru 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu **80**, který byl alkylován 2-(brommethyl)naftalenem **21a**, 2-(brommethyl)-6-fluornaftalenem **21b**, 2-(brommethyl)chinolinem **21c**, methyljodidem **85**, *n*-propylbromidem **86**, *n*-pentylbromidem **87** a 1-(brommethyl)naftalen **88** v přítomnosti uhličitanu draselného v DMF (Schéma 5). Derivát **95** byl připraven alkylací 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu **84** s 2-(brommethyl)naftalenem **21a** v přítomnosti uhličitanu draselného v DMF. Deriváty **81** a **89-95** byly klíčovými meziprodukty pro další syntetické kroky a byly izolovány ve výtěžcích 78-90 %. 3*H*,4*H*,5*H*-Pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-ony **82** a **96-99** byly připraveny hydrolýzou derivátů **81** a **89-95** v přítomnosti 2M NaOH a dioxanu jakožto kosolventu, který zlepšil solubilitu intermediátů **81** a **89-95** ve vodě. Deriváty **82** a **96-99** byly připraveny ve výtěžcích 69-92 %. Finální produkty **83** a **100-102** byly syntetizovány v mikrovlnném reaktoru z meziproduktů **82** a **96-98**. Chlor v poloze 2- meziproduktů **82** a **96-98** byl nahrazen morfolinem nukleofilní aromatickou substitucí. Reakce probíhala v dioxanu s malým přídavkem vody a reakční teplota byla zvýšena na 180 °C (pozn. analogická reakce u purin-6-onů probíhala v *terc*-butanolu při 110 °C). Deriváty **103-105**, obsahující ve struktuře jiné sekundární cyklické aminy (thiomorfolin, *N*-methylpiperazin, piperidin, pyrrolidin), byly připraveny stejným způsobem jako deriváty **83** a **100-102**. Nově tak byly připraveny sloučeniny **83** a **100-105** ve výtěžcích 33-81 % v posledním kroku. Sirný derivát **106** byl připraven podle literatury reakcí derivátu **95** s přebytkem thiomočoviny v ethanolu za varu.[73] Dithionový derivát **107** byl připraven stejným způsobem jako derivát **106**, ale jako výchozí látka byl použit derivát **81**. Oba sirné deriváty **106** a **107** byly připraveny ve výtěžcích 93-94 %.

Meziprodukt **82** byl alkylován na dusíku N3 methyljodidem v suchém DMF za použití hydridu sodného jako báze.[72] Tato alkylace poskytla derivát **108** ve výtěžku 56 %. Finální produkt **109** byl připraven stejným způsobem jako deriváty **83** a **100-102** ve výtěžku 64 %.

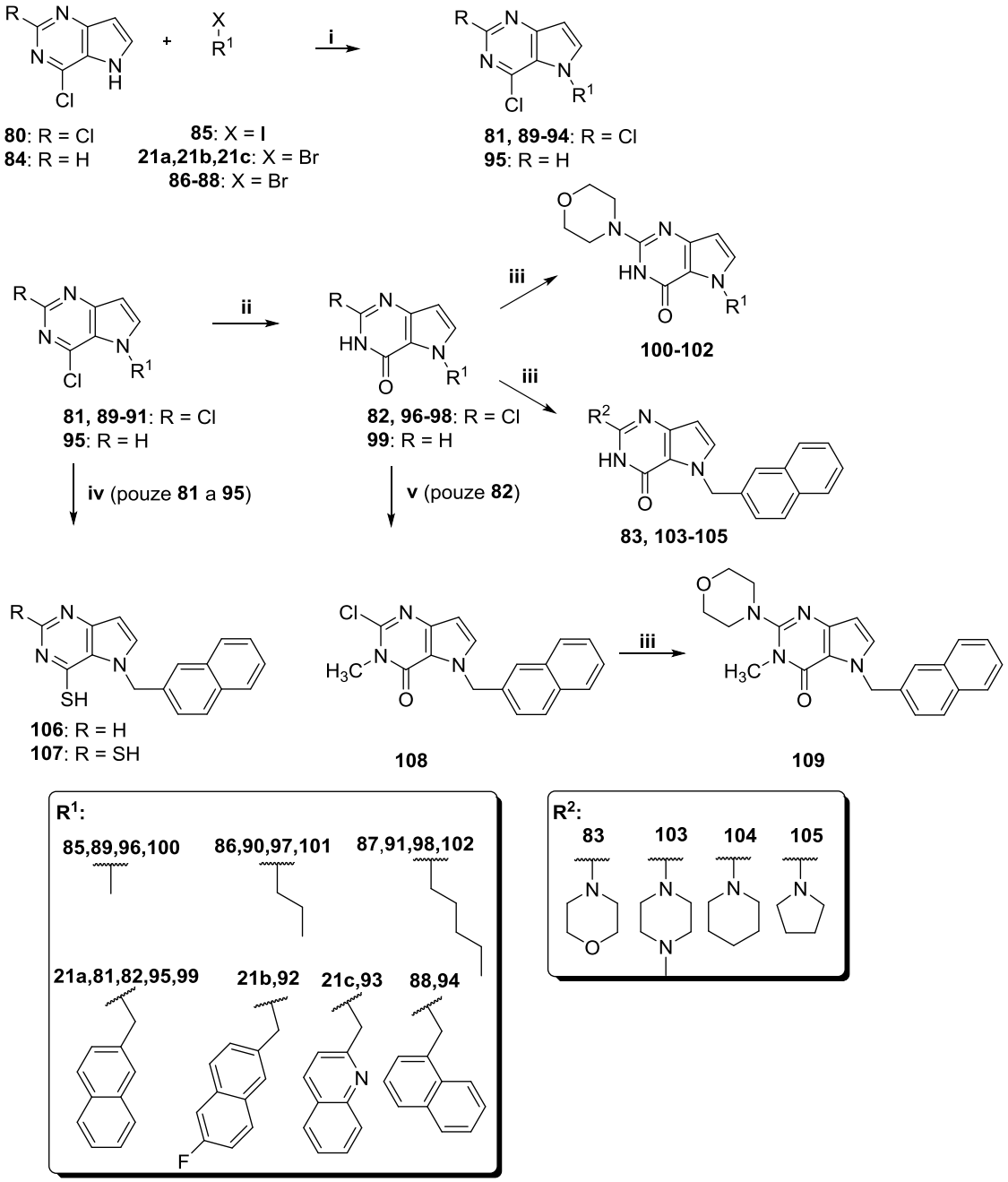


Schéma 5. *Syntéza 5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidinů* ***83***, ***100-105*** *a* ***109***.[a] *Reakční podmínky: (i)* K_2CO_3, *DMF, 24 h, 25 °C, 78-90 %; (ii) 2M NaOH/dioxan, 100 °C, 2 h, 69-92 %; (iii) MW, amin, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 33-81 %; (iv) thiomočovina, EtOH, 78 °C, 24 h, 93-94 %; (v)* K_2CO_3, *methyl jodid, DMF, 12 h, 25 °C, 56 %.*

Při přípravě 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-aminů byl použit stejný syntetický přístup jako v případě purin-4-aminových derivátů. Intermediáty **81** a **92-95** byly podrobeny nukleofilní aromatické substituci, při níž byl chlor v poloze 4- selektivně nahrazen příslušným aminem. Tato reakce byla provedena v acetonitrilu při 45 °C s přebytkem aminu a poskytla deriváty **110-113** a **117-131** ve výtěžku 36-94 %. Závěrečný syntetický krok přípravy derivátů **114-116** a **132-145** byl proveden v mikrovlnném reaktoru při teplotě 180 °C s přebytkem aminu v roztoku

dioxanu s vodou. Při této nukleofilní aromatické substituci byl chlor v poloze 2- nahrazen sekundárním cyklickým aminem. Deriváty **114-116** a **132-145** byly získány ve 42-74% výtěžcích.

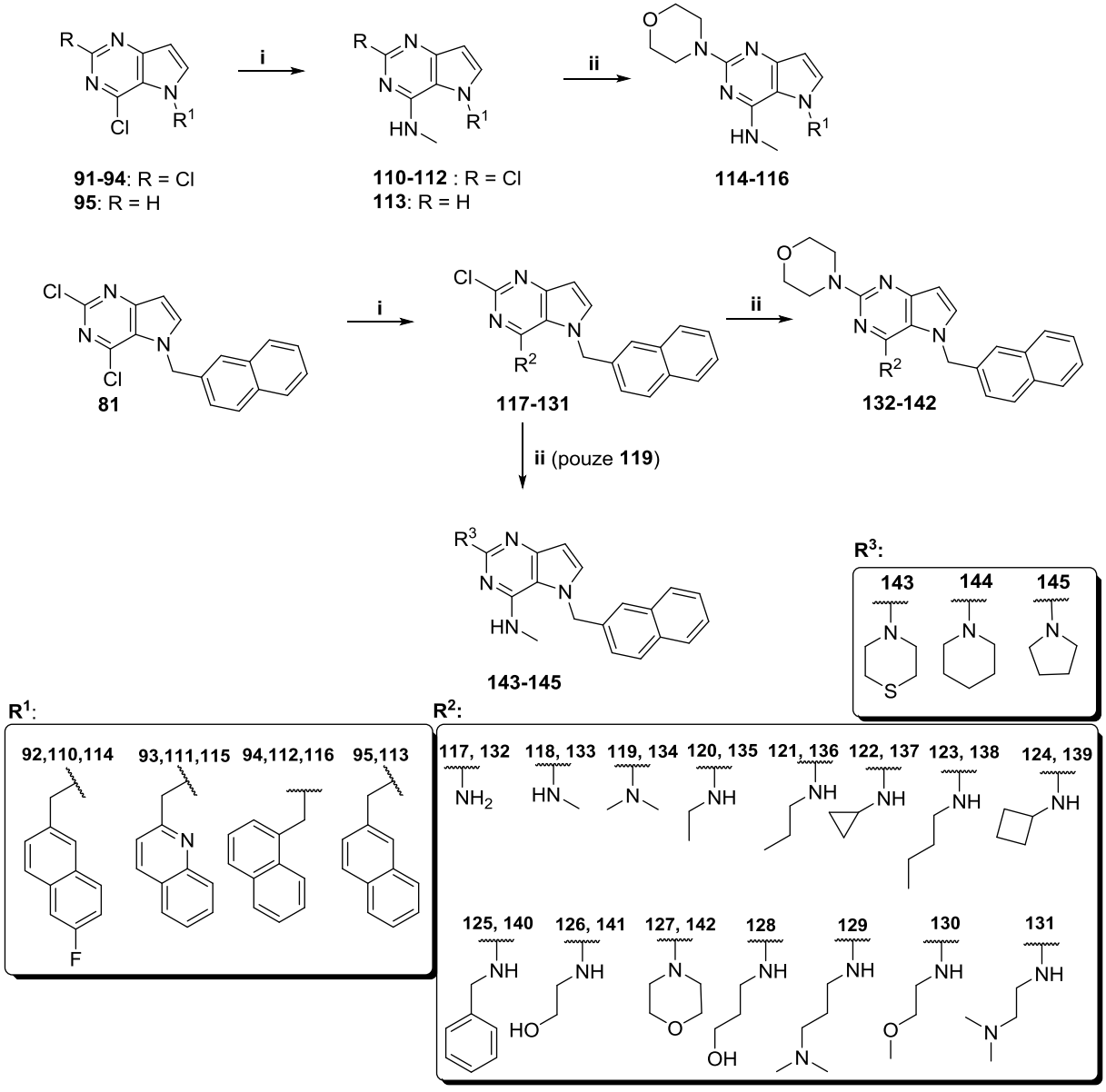


Schéma 6. *Syntéza 5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidinů* ***114-116*** *a* ***132-145****.*[a] *Reakční podmínky: (i) příslušný amin, CH_3CN, 24 h, 45 °C, 36-94 %; (ii) příslušný amin, MW, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 42-74 %.*

4-Alkoxy deriváty **147-149** byly připraveny podle stejného syntetického přístupu jako 6-alkoxypuriny. Nejprve byl derivát **83** převeden reakcí s $POCl_3$ na 4-chlor-derivát **146** ve výtěžku 43 %. Derivát **146** následně reagoval v THF s příslušným alkoxidem sodným za vzniku finálních 4-alkoxy derivátů **147-149** ve výtěžku 46-84 %. Sloučeniny **151-156** byly připraveny stejnými syntetickými postupy popsanými výše, a to ve výtěžcích 49-72 %.

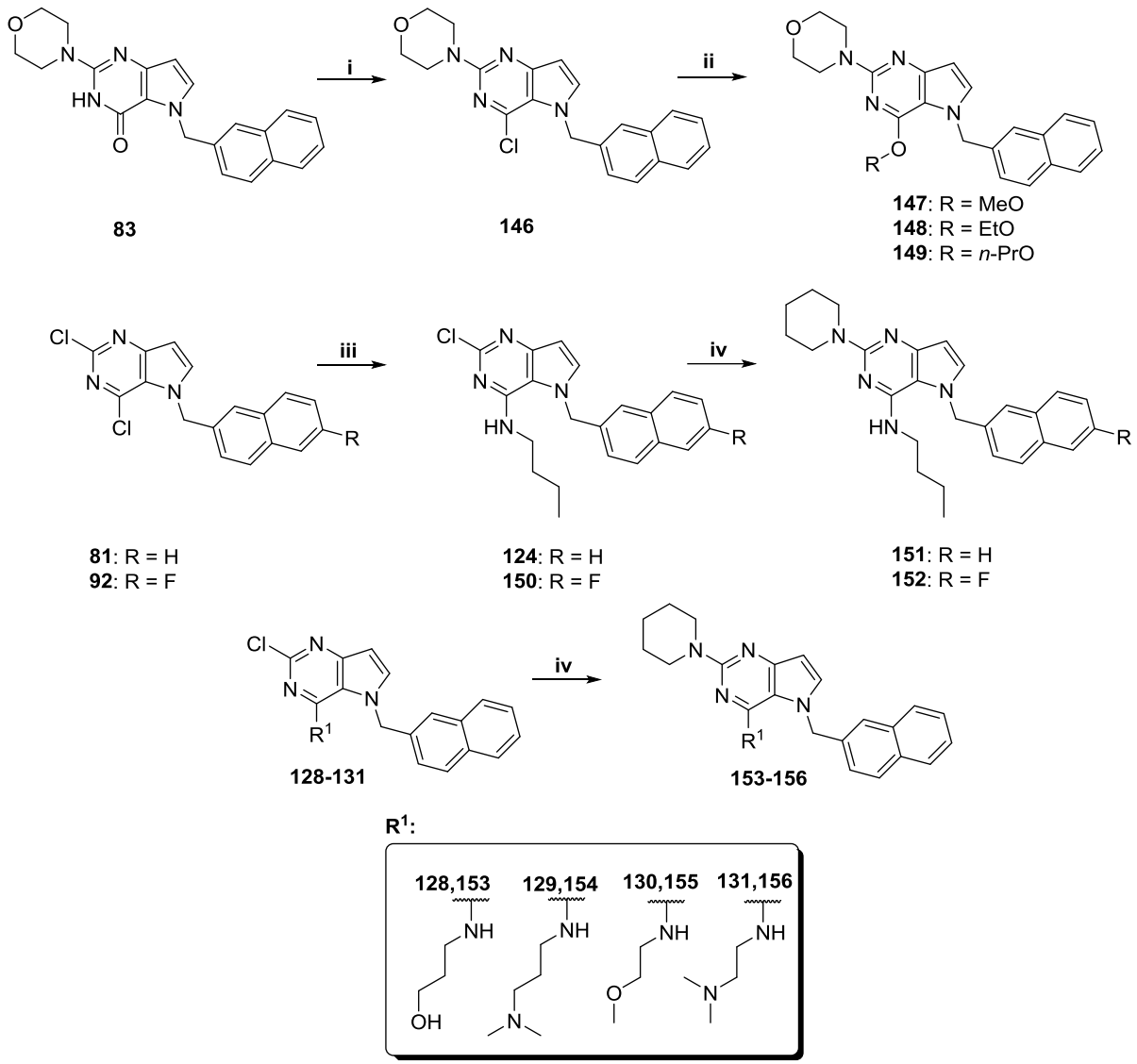


Schéma 7. *Syntéza 5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidinů* ***147-149*** *a* ***151-156****.*[a] *Reakční podmínky: (i) $POCl_3$, 0 °C-135 °C, 3 h, 43 %; (ii) alkoxid sodný, THF, 25 °C, 2 h, 46-84 %; (iii) n-butylamin, CH_3CN, 24 h, 45 °C, 87-92 %; (iv) piperidin, MW, dioxan/voda, 180 °C, 150 W, 3 h, 49-72 %.*

In vitro anti-TB aktivita pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů

Výsledy antimykobakteriálních aktivit pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinových derivátů jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Isosterní záměna atomu dusíku u purinové série za methylenové uskupení pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinových sloučenin vedla ke zcela odlišným vztahům mezi strukturou a účinkem. Toto strukturní zjednodušení rovněž ovlivnilo mikrosomální stabilitu, solubilitu i cytotoxicitu cílových látek.

Všechny deriváty na bázi pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-onu a pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-thionu **82-83**, **99-108** a **109** (Tabulka 4) byly zcela neúčinné jak proti *Mtb* (všechny deriváty: MIC_{99}(*Mtb*) > 64 μM), tak i proti netuberkulózním mykobakteriím (MIC_{99}(*M. avium*, M. *kansasii* > 250 μM). Ke zlepšení anti-TB aktivity nedošlo ani po nahrazení morfolinu v poloze

2- základního skeletu za jiné sekundární aminy (thiomorfolin, *N*-methylpiperazin, pyrrolidin a *N*,*N*-dimethylamin). Mimo substituce aminy byly připraveny i deriváty obsahující v této poloze chlor (**82**) a nebo nesoucí pouze atom vodíku (**99**). Obě sloučeniny byly však zcela neúčinné (**82**: MIC_{99}(*Mtb*) = 125 μM; **99**: MIC_{99}(*Mtb*) = 250 μM). Anti-TB aktivitu nevykazoval ani derivát **109** s methylovaným dusíkem *N*1 (**109**: MIC_{99}(*Mtb*) = 64 μM) ani deriváty, v jejichž struktuře byl naftalen-2-ylmethyl v poloze 5- nahrazen za methyl (**100**: MIC_{99}(*Mtb*) = 64 μM), *n*-propyl (**101**: MIC_{99}(*Mtb*) = 64 μM) a *n*-pentyl (**102**: MIC_{99}(*Mtb*) = 64 μM). Až zavedení methylaminu (**133**; MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM) a vyšších alkylaminů (sloučeniny **138-140**) do polohy 4- vedlo k nárůstu anti-TB aktivity.

Další strukturní modifikace byly provedeny zejména v polohách 2-, 4- a 5- s cílem zvýšit anti-TB aktivitu. Ve struktuře byla vždy provedena pouze jedna změna, aby bylo možné přisoudit změnu v anti-TB aktivitě provedené strukturní modifikaci a aby bylo současně vyloučeno, že se nejedná o synergismus, aditivní anebo naopak antagonistický efekt dvou strukturních obměn najednou.

Za současného fixování methylaminu v poloze 4- byly provedeny obměny v poloze 2-. Zde byly zavedeny pouze sekundární cyklické aminy, které v purinové sérii měly nejvýznamnější vliv na anti-TB aktivitu. Nejvýraznějšího navýšení anti-TB aktivity bylo dosaženo zavedením piperidinu. Tento piperidinový derivát **144** měl čtyřikrát vyšší anti-TB aktivitu (**144**, MIC_{99}(*Mtb*) = 2 μM) než derivát **133** s morfolinem.

Další strukturní modifikace byly provedeny v poloze 5-. Z výsledků (Tabulka 5) je patrné, že stejně jako v purinové sérii, tak i v pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinové sérii vedlo zavedení chinolin-2-ylmethylu (**115**, MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM) ke snížení anti-TB akivity. Aktivita byla zachována po zavedení 6-fluornaftalen-2-ylmethylu (**114**, MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM) a naftalen-1-ylmethylu (**116**, MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM). Tyto strukturně-aktivitní aspekty jsou v kontrastu s purinovou sérií, kde zavedení naftalen-1-ylmethylu vedlo ke zcela neúčinnému derivátu (Tabulka 2, **11**: MIC_{99}(*Mtb*) > 500 μM). Z těchto výsledků lze usoudit na větší strukturní variabilitu polohy 5- pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinové série oproti fixní substituci naftalen-2-ylmethylem polohy 7- purinové série.

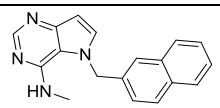
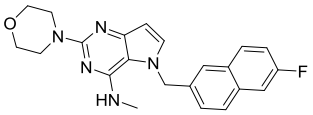
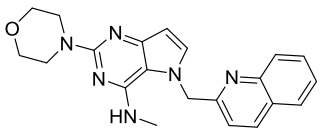
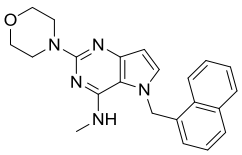
Nejvíce strukturně modifikovanou byla poloha 4- se zachováním morfolinu v poloze 2- a naftalen-2-ylmethylu v poloze 5-. Do polohy 4- byly zavedeny primární a sekundární aminy a také alkoxy skupiny. Zavedení alkoxy skupin se na rozdíl od purinové série ukázalo jako nevýhodné z pohledu anti-TB aktivity. Derivát s methoxy skupinou vykázal poloviční anti-TB aktivitu (**147**: MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM), sloučenina s ethoxy substitucí vedla k dalšímu poklesu

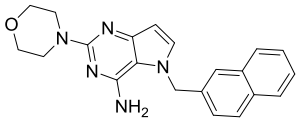
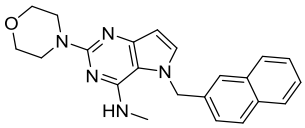
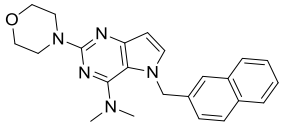
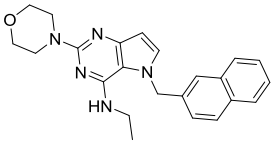
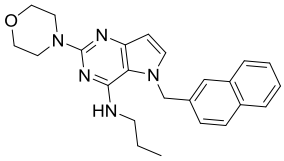
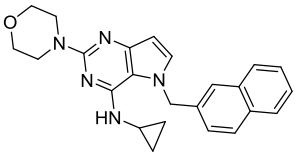
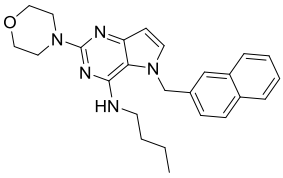
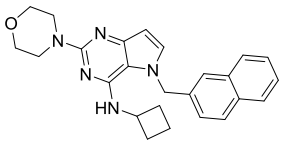
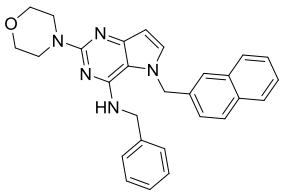
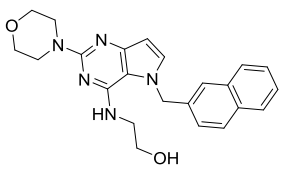
aktivity (**148**: MIC_{99}(*Mtb*) = 32 μM) a derivát **149** s propyloxy substitucí byl naprosto neúčinný (**149**: MIC_{99}(*Mtb*) > 250 μM). Naproti tomu obdobná substituce u purinové série měla za následek nárůst anti-TB aktivity (ethoxy substituce; sloučenina **72**: MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM).

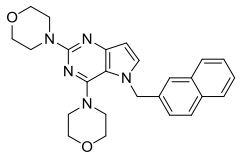
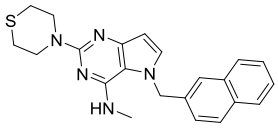
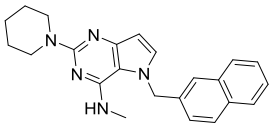
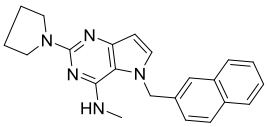
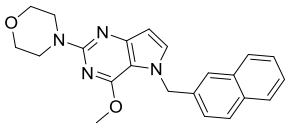
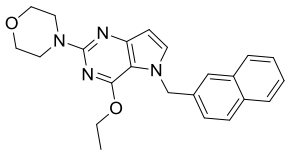
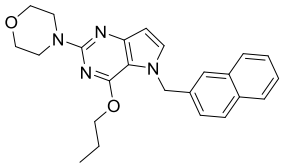
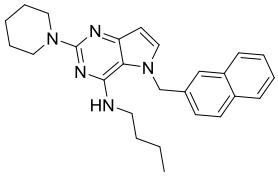
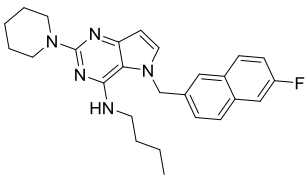
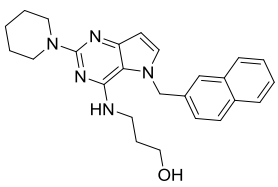
Deriváty obsahující v poloze 4- amino skupiny ze skupiny primárních akylaminů vykázaly výrazný nárůst aktivity, zatímco zavedení sekundárních aminů jako dimethylamin (**134**: MIC_{99}(*Mtb*) = 64 μM) a morfolin (**142**: MIC_{99}(*Mtb*) = 32 μM) vedlo ke ztrátě účinnosti. Deriváty s primární amino skupinou **132**, propylaminem (**136**), ethylaminem (**135**), cyklopropylaminem (**137**) a ethanolaminem (**141**) vykazovaly prakticky identickou anti-TB aktivitu (MIC_{99}(*Mtb*) = 8 – 16 μM) jako derivát s methylamino skupinou **133**.

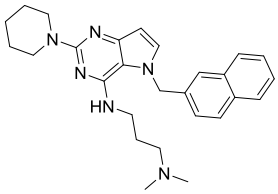
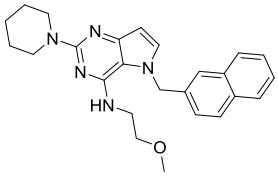
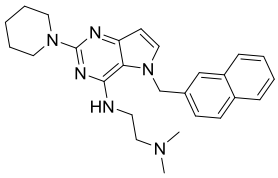
Zavedení alkylaminu se čtyřmi uhlíky (cyklobutyl a *n*-butyl) vedlo ke zlepšení anti-TB aktivity. Derivát **138** s *n*-butylaminem vykazoval osmkrát lepší anti-TB aktivitu (**138**: MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM) a derivát s cyklobutylaminem vykazoval čtyřnásobné zvýšení anti-TB aktivity (**139**: MIC_{99}(*Mtb*) = 2 μM) oproti derivátu **133** (**133**: MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM). Vysokou anti-TB aktivitu vykázal i derivát s benzylamino skupinou **140** v poloze 4- (**140**: MIC_{99}(*Mtb*) = 2 μM).

Tabulka 5. *Sloučeniny **113-116**, **132-149** a **151-156** a jejich antimykobakteriální aktivitu proti Mtb, M. avium a M. kansasii vyjádřená jako MIC_{99} (μM) po 7 (v případě M. kansasii), 14 nebo 21 dnech inkubace.*

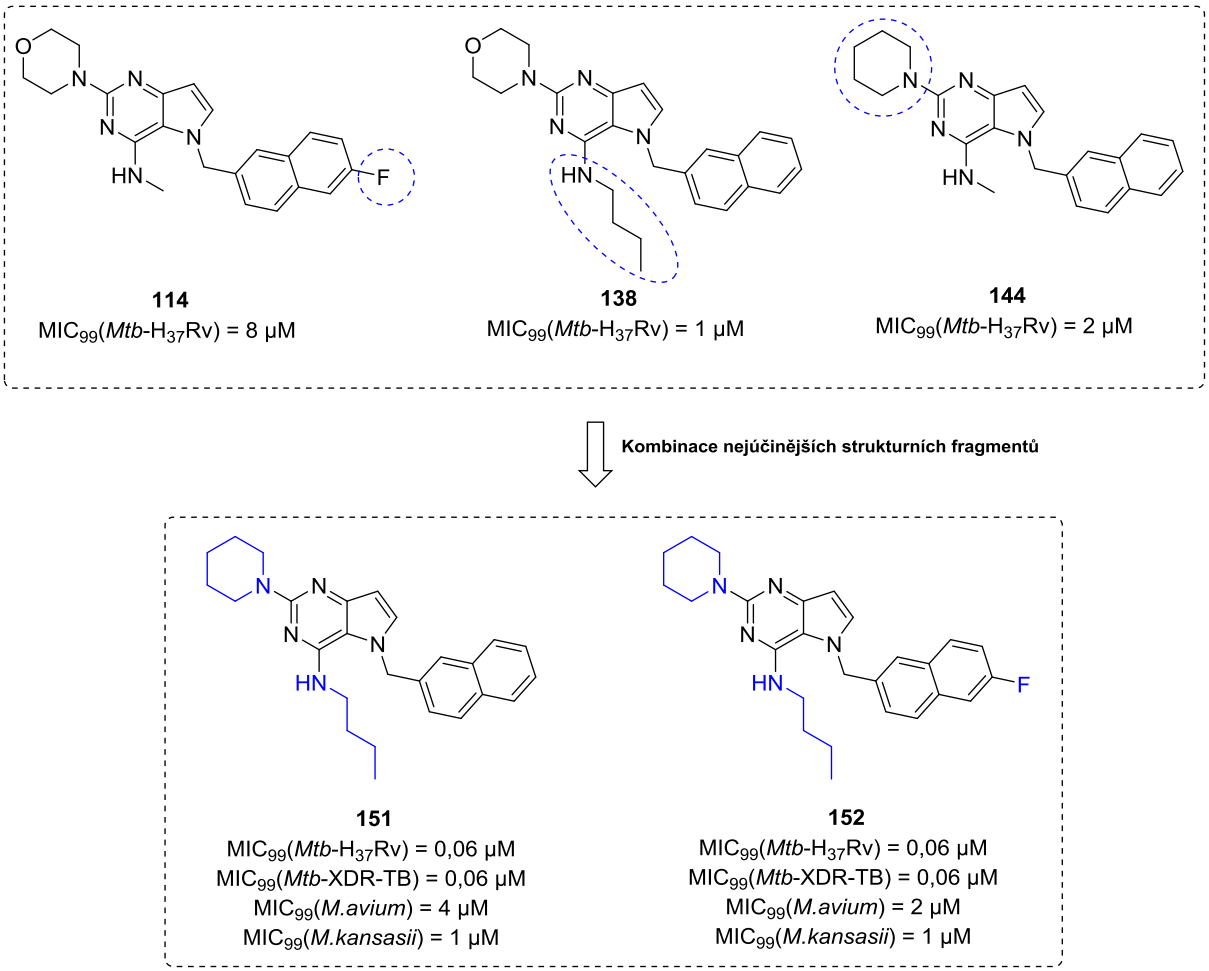
Sloučenina	**Struktura**	***Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM) 14/21 dní**	***M. avium* MIC_{99} (μM) 14/21 dní**	***M. kansasii* MIC_{99} (μM) 7/14/21 dní**
113		125/125	500/500	125/250/250
114		8/16	32/64	16/32/32
115		16/32	64/64	32/32/64
116		16/16	64/64	32/64/64

132		8/16	125/125	32/64/64
133		8/16	64/125	8/16/32
134		64/64	125/125	32/64/125
135		16/16	32/64	16/32/32
136		8/8	32/64	16/32/32
137		16/16	64/64	16/32/32
138		1/2	8/8	2/4/4
139		2/4	16/16	8/8/8
140		2/4	16/16	8/8/8
141		16/16	250/250	32/64/64

142		32/64	>500/>500	64/64/125
143		4/8	32/64	16/16/16
144		2/4	16/32	4/8/8
145		4/8	64/64	8/8/16
147		16/32	250/500	125/250/250
148		32/32	64/64	32/64/64
149		>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
151		0,06/0,06	4/4	1/1/2
152		0,06/0,06	2/4	1/2/2
153		8/16	>32/>32	16/16/16

154		16/16	>32/>32	8/8/16
155		8/8	32/32	4/8/8
156		8/8	32/32	4/8/8

V další fázi došlo ke zkombinování takových strukturních fragmentů, které přispívaly ke zvýšené anti-TB aktivitě (Obr. 10). Tímto přístupem byly připraveny sloučeniny **151** a **152**, s piperidinem v poloze 2- a *n*-butylaminem v poloze 4-. Deriváty se lišily pouze substitucí v poloze 5- naftalenového cyklu. Pro sloučeninu **151** byl zachován naftalen-2-ylmethyl, druhý derivát **152** obsahoval 6-fluornaftalen-2-ylmethylovou skupinu.



Obr. 10 *Kombinace strukturních fragmentů vedoucí k vysoce účinným derivátům* ***151*** *a* ***152****.*

Oba deriváty **151** a **152** vykázaly nejvyšší dosaženou aktivitu napříč oběma sériemi proti *Mtb* (**151**, **152**: MIC_{99}(*Mtb*) = 0,06 µM), ale také proti netuberkulózním mykobakteriím *M. avium* (**151**: MIC_{99}(*M.avium*) = 4 µM; **152**: MIC_{99}(*M.avium*) = 2 µM) a *M. kansasii* (**151**: MIC_{99}(*M.kanasii*) = 1 µM; **152**: MIC_{99}(*M.kansasii*) = 1 µM). Navíc si oba tyto deriváty zachovaly vysokou anti-TB aktivitu i proti XDR-TB kmenům (Tabulka 6; **151**, **152**: MIC_{99}(XDR-TB) = 0,06 µM). Mimo **151** a **152** derivátů byly na testování proti XDR-TB kmenům poslány rovněž sloučeniny, které dosáhly anti-TB aktivity alespoň 4 µM (MIC_{99}(*Mtb*) ≤ 4 µM).

Z výsledků je patrné, že oproti purinovým derivátům žádný z testovaných pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů (**138**, **140**, **143**, **144** a **145**) nezaznamenal propad anti-TB účinnosti pod 4 µM (Tabulka 6).

Tabulka 6. *In vitro antimykobakteriální aktivita nejúčinnějších pyrrolo[3,2-d]pyrimidinových derivátů* ***139***, ***141*** *a* ***144-146*** *a anti-TB léčiv proti klinicky izolovaným kmenům MDR/XDR-TB.*[a,b]

	***Mtb* (kmeny MDR/XDR)**		
Sloučenina	PRAHA 131	9449/2007	8666/2010
138	4/8	4/4	8/8
139	4/8	4/8	4/8
140	4/4	4/4	4/4
143	4/8	4/8	4/8
144	4/4	4/4	4/4
145	4/8	4/8	4/8
151	0,06/0,06	0,06/0,06	0,06/0,06
152	0,06/0,06	0,06/0,06	0,06/0,06
INH	16 (R)	64 (R)	32 (R)
EMB [b]	32 (R)	8 (C)	16 (R)
RIF	>8 (R)	>8 (R)	>8 (R)
STR [b]	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
AMI [b]	>32 (R)	0,5 (C)	2 (C)
GEN [b]	>8 (R)	1 (C)	2 (C)
CFZ [b]	0,25 (C)	0,125 (C)	2 (R)
OFX [b]	16 (R)	2 (C)	8 (R)

[a] *Výsledky jsou vyjádřené jako MIC_{99} (μM) po 14 a 21 dnech inkubace a 14 dnech inkubace anti-TB léčiv.*[b] *AMI, amikacin; CFZ, clofazimin; GEN, gentamicin; OFX, ofloxacin; STR, streptomycin; R = rezistentní; C = citlivé*

Antibakteriální aktivita pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů

Nejlépe hodnocené anti-TB sloučeniny ze skupiny pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů byly testovány na antibakteriální aktivitu vůči osmi bakteriálním kmenům (*Staphylococcus aureus* subsp. aureus, methicilin-rezistentní *S. aureus* subsp. aureus, *S. epidermidis*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL negativní, *Klebsiella pneumoniae* ESBL pozitivní, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*).

Tyto sloučeniny byly zcela neúčinné (Tabulka 7) proti panelu gram negativních bakterií (MIC > 62,5 μM). Naopak deriváty vykazovaly vysokou aktivitu proti gram pozitivním bakteriím,

kam spadá i *Mtb*.[84] Sloučeniny **140**, **144**, **151** a **152** vykazovaly nejvyšší antibakteriální aktivitu proti citlivému kmenu *S.aureus* a methicilin rezistentnímu *S. aureus*.

Identická aktivita se projevila u derivátů **140** a **144** proti lékově citlivému *S. aureus* (oba: MIC = 7,81 μM) a methicilin-rezistentnímu *S.aureus* (oba: MIC(MRSA) = 7,81 μM) po 24hodinové a 48hodinové inkubaci. Oba deriváty se však lišily v efektu působení proti těmto dvěma kmenům, kdy pouze sloučenina **144** prokázala baktericidní účinnost proti těmto dvěma kmenům (**144**: MBC(*S.aureus*) = 7,81 μM; MBC(MRSA) = 19,53 μM).

Nejvyšší antibakteriální aktivitu v celé sérii vykázal derivát **152** proti všem gram pozitivním bakteriím (**152**: MIC_{99} (*S. epidermis*, *S. aureus*, MRSA *S. aureus*, VRE *E. faecium*) = 1.95 μM). Pokles baktericidního efektu byl zaznamenán vůči lékově citlivému *S.aureus* (MBC = 10,42 μM) než derivát **144** (**144**: MBC = 7,81 μM). Naopak baktericidní efekt sloučeniny **152** byl srovnatelný s molekulou **144** proti *S. epidermis* **144** (**144, 152**: MBC = 11,72 μM). Derivát **152** disponuje nejvyšší baktericidní účinností proti MRSA *S. aureus* (**152**: MBC = 7,16 μM) a VRE *E. faecium* (**152**: MBC = 9,12 μM).

Derivát **151** byl rovněž vysoce účinný proti gram pozitivním bakteriím (MIC_{99}(*S. aureus*) = 1,95 μM; MIC_{99}(MRSA *S. aureus*) = 3,26 μM; MIC_{99}(*S. epidermis*) = 2,6 μM; MIC_{99}(VRE E. *faecium*) = 1,95 μM). Současně tato látka dosáhla nejvyššího baktericidního efektu proti *S. epidermis* (MBC(S. epidermis) = 5,86 μM) napříč testovanými sloučeninami. Derivát **151** si zachoval vysokou baktericidní aktivitu i proti dalším G+ bakteriím (**151**: MBC(*S. aureus*) = 10,42 μM; MBC(MRSA *S. aureus*) = 16,93 μM; MBC(VRE *E. faecium*) = 11,72 μM).

Antibakteriální aktivita těchto derivátů tak značně rozšiřuje možnou aplikaci této skupiny sloučenin.

***Tabulka** 7 In vitro antibakteriální aktivita pyrrolo[3,2-d]pyrimidinů **139-141**, **144-145** a **151-152** proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím.*

		MIC (μM); 24 h inkubace **MIC (μM); 48 h inkubace** **MBC (μM); 48 h inkubace**							
		139	**140**	**141**	**143**	**144**	**145**	**151**	**152**
G +	*Staphylococcus aureus* (CCM 4516)	15,63 15,63 46,88	7,81 7,81 >125	15,63 15,63 31,25	15,63 15,63 46,88	**7,81** **7,81** **7,81**	23,44 23,44 62,50	**1,95** **2,60** **10,42**	**1,95** **3,91** **10,42**
	Methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus	15,63 23,44 78,13	7,81 7,81 >125	15,63 15,63 39,07	15,63 15,63 23,44	**7,81** **7,81** **19,53**	15,63 23,44 39,07	**3,26** **3,26** **16,93**	**1,95** **1,95** **7,16**
	S. epidermidis klinický izolát C1936	15,63 39,07 39,07	7,81 7,81 >125	15,63 15,63 46,88	15,63 15,63 23,44	**7,81** **7,81** **11,72**	15,63 15,63 46,88	**2,60** **2,60** **5,86**	**1,95** **1,95** **11,72**
	E. faecium VRE klinický izolát S2484	31,25 31,25 125	7,81 7,81 >125	15,63 31,25 125	31,25 46,88 78,13	15,63 39,07 78,13	23,44 23,44 31,25	**3,91** **3,91** **11,72**	**1,95** **6,51** **9,12**
		MIC (μmol/L); 24 h inkubace							
G -	*Escherichia coli* K12, CCM 7929	>125	>125	> 125	> 125	62,5	>125	>125	>125
	Escherichia coli klinický izolát A1235	>125	>125	>125	>125	125	125	>125	>125
	Klebsiella pneumoniae ESBL+ – klinický izolát C1914	>125	>125	> 125	> 125	>125	>125	>125	>125
	Pseudomonas aeruginosa *Multirezistentní kmen* klinický izolát A1245	>125	>125	> 125	> 125	>125	>125	> 125	> 125

Mikrosomální stabilita derivátů **151** a **152**

Stanovení solubility předcházelo experimentálnímu ověření mikrosomální stability. Rozpustnost ve vodě byla stanovena pouze pro antimykobakteriálně nejúčinnější sloučeniny **151** a **152** (Tabulka 8). Deriváty **151** a **152** sice vykazují vyšší solubilitu ve vodě (**151**: solubilita = 60,37 μM; **152**: solubilita = 83,62 μM) než předlohový purinový derivát **10** (solubilita = 46,9 μM), ale současně nižší než nejúčinnější purinový derivát **53** (solubilita = 150,4 μM).

Pro stanovení mikrosomální stability byly použity HLM a jako standardy byly použity léčiva s vysokou (verapamil) a nízkou mírou (diazepam) metabolizace. Jednotlivé sloučeniny byly inkubovány s HLM po dobu 45 minut. Diazepam se vyznačuje nízkou metabolizací (CL_{int} = 0,8 μL/min/mg) a dlouhým biologickým poločasem ($T_{1/2}$ = 1730 min), naproti tomu verapamil vykazoval vysokou metabolizaci (CL_{int} = 71,27 μL/min/mg) a krátký biologický poločas ($T_{1/2}$ = 19,47 min).[85] Deriváty **151** (CL_{int} = 20,62 μL/min/mg, $T_{1/2}$ = 67,28 min) a **152** (CL_{int} = 31,23 μL/min/mg, $T_{1/2}$ = 44,42 min) dosahovaly hodnot blížících se více metabolické stabilitě verapamilu. Z výsledků stanovení lze dále usoudit, že tato skupina látek se metabolizuje podstatně rychleji než purinová antituberkulotika **10** a **53**. Paralelně byl proveden i experiment plasmatické stability pro deriváty **151** a **152**, které shodně jako purinové sloučeniny **53** a **10** vykázaly vysokou stabilitu v plasmě i po dvou hodinách inkubace.

Tabulka 8 *Rozpustnost ve vodě (5% roztok DMSO/voda), mikrosomální stabilita vyjádřená jako mikrosomální poločas ($T_{1/2}$) a clearance, stabilita v plasmě. Diazepam a verapamil byly zahrnuty jako referenční léčiva s nízkou a vysokou mírou metabolizace.*

Sloučenina	Rozpustnost ve vodě [μM]	HLM $T_{1/2}$ (min)	CL_{int} (μL/min/mg)	Stabilita v plasmě (%)[b]
diazepam	*neurčeno*	1730	0,8 (2,6)[a]	*neurčeno*
verapamil	*neurčeno*	19,47	71,27 (138,7)[a]	*neurčeno*
10	46,9	110,0[c]	12,6[c]	96,60
53	150,4	51,3[c]	27,0[c]	95,50
151	60,37	67,28	20,62	96,41
152	83,62	44,42	31,23	97,73

*[a] Hodnoty v závorkách počítány z publikovaných dat[85]; [b] procento nemetabolizované sloučeniny po 120 minutách inkubace; [c] Hodnoty jsou převzaté z experimentálního článku (Příloha I). Přímé srovnání dosažených hodnot clearance a mikrosomomální stability mezi purinovými (**10** a **53**) a deazapurinovými sloučeninami (***151*** a ***152***) nelze aplikovat z důvodu rozdílnosti v aktivitě použitých mikrosomů.*

Cytotoxicita

Cytotoxicita derivátů **151** a **152** byla stanovena jako hodnoty IC_{50} po 24 hodinách inkubace derivátů **151** a **152** s buňkami hepatocelulárního karcinomu HepG2 (Tabulka 9). Obě látky **151** (IC_{50}(HepG2) = 3,36 μM) a **152** (IC_{50}(HepG2) = 3,56 μM) vykazují přibližně 18× vyšší cytotoxicitu než **53** (IC_{50}(HepG2) = 63,9 μM) a přibližně 35× vyšší cytotoxicitu než **10** (IC_{50}(HepG2) > 125 μM). Vysoká cytotoxicita pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů je mírně vyvážena vysokým indexem selektivity, v tomto případě počítaným jako poměr hodnot IC_{50} HepG2 vůči testovaným MIC hodnotám (**151**: SI = 56; **152**: SI = 59). Vedle HepG2 buněčné linie byly testovány oba deriváty na buněčné linii CHO-K1, která byla izolovaná z vaječníku dospělé samice čínského křečka. Obě látky dosahují téměř shodných hodnot IC_{50} (**151**: IC_{50}(CHO-K1) = 12,44 μM; **152**: IC_{50}(CHO-K1) = 12,42 μM), přičemž byla zaznamenána přibližně třikrát nižší cytotoxicita v porovnání s hodnotami dosaženými v rámci testování na HepG2 buněčné linii.

Tabulka 9 *Cytotoxicita derivátů **151** a **152***

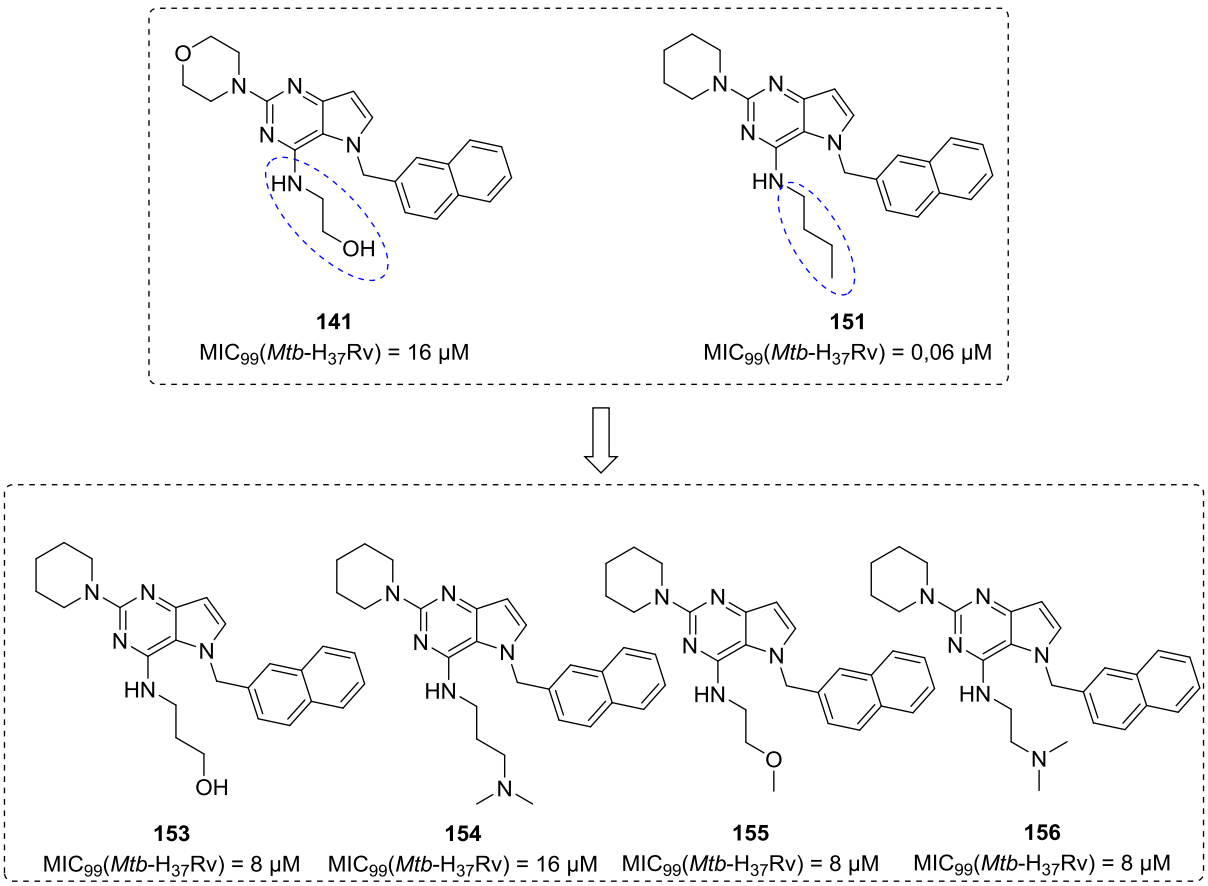
Sloučenina	**HepG2 IC_{50} ± SD (μM)**[a]	***Mtb* $H_{37}Rv$ MIC_{99} (μM)**	**SI**[b]	**CHO-K1 IC_{50} ± SD (μM)**
151	3,36±0,09	0,06	56	12,44±0,35
152	3,56±0,21	0,06	59	12,42±1,04
10	>125	4	>31	*nezměřeno*
53	63,9±4,8	1	63,9	*nezměřeno*

[a] *IC_{50} určeno po 24 h inkubace;* [b] *index selektivity (SI) je počítán jako poměr mezi HepG2 IC_{50} a hodnotami MIC_{99}(Mtb)*

Z důvodu vysoké cytotoxicity derivátů **151** a **152** proti HepG2 buněčným liniím a zároveň limitující solubilitě, byly provedeny poslední strukturní obměny v poloze 4- (Obr. 11), kam byly zavedeny polární funkční skupiny (deriváty **153-156**). Charakter polárních funkčních skupin byl volen tak, aby mohly být převedeny na příslušné soli nebo dále konvertovány na proléčiva s výhledem navazujících *in vivo* experimentů.

Všechny tyto nové deriváty s polárními funkčními skupinami zaznamenaly pokles v aktivitě (Tabulka 5, **153, 155, 156**: MIC_{99}(*Mtb*) = 8 μM; **154**: MIC_{99}(*Mtb*) = 16 μM), proto bylo od navazujících experimentů odstoupeno. V současné době nicméně probíhají experimenty na

stanovení mechanismu účinku u nejvíce perspektivních sloučenin ze série pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů (**151** a **152**).



Obr. 11 *Strukturní obměny vedoucí k navýšení polarity u pyrrolo[3,2-d]pyrimidinové série.*

Z důvodu dlouhodobého podávání anti-TB léčiv je předmětem navazujícího výzkumu stanovení kardiotoxicity sloučenin **151** a **152** prostřednictvím vlivu na hERG receptor (human ether-à-go-go related gene). Dále je studována inhibice isoforem cytochromů CYP450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4). Kancerogenita a mutagenita bude výstupem AMES testu.[86]

Závěr

Celá práce shrnuje výsledky studia nových, strukturně unikátních antituberkulotik odvozených od purinového derivátu **10**, která byla identifikována screeningem farmaceutické firmy Eli Lilly. V sérii purinových antituberkulotik byl prostudován a definován SAR díky četným strukturním modifikacím na skupině 57 látek. Na základě těchto obměn byly identifikovány tři deriváty s nejvyšší anti-TB aktivitou (**53**, **61** a **72**: MIC_{99}(*Mtb*) = 1 μM). U nich byla dále potvrzena jejich vysoká selektivita k *Mtb* a zároveň akceptovatelná cytotoxicita vůči HepG2

buněčným liniím (s ohledem dosažených hodnot MIC). Dále byla u vybraných kandidátů stanovena rozpustnost ve vodě a *in vitro* stabilita v plasmě a mikrosomech.

Mechanismus účinku byl stanoven ve spolupráci se zahraničními pracovišti pomocí genové sekvenace rezistentních kmenů *Mtb* k derivátu **10** a pomocí metody využívající radioaktivně značeného [C^{14}]-acetátu jako metabolického substrátu podaného mykobakteriím. Obě metody potvrdily, že látka **10** je nekovalentním inhibitorem enzymu DprE1. S využitím molekulově modelovací studie jsme rovněž naznačili vazebné interakce nejúčinnějších derivátů se samotným enzymem. Tato část práce se stala podkladem pro publikovaný experimentální článek (Příloha 1) a patentovou přihlášku, na základě které byl udělen tuzemský patent (Příloha 3).

Navazujícím projektem bylo studium antituberkulotik na bázi pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů odvozených od purinového derivátu **10**. I pro tuto skupinu látek se podařilo definovat SAR a těchto poznatků bylo využito při přípravě nejúčinnějších derivátů **151** (MIC_{99}(*Mtb*) = 0,06 μM) a **152** (MIC_{99}(*Mtb*) = 0,06 μM), v jejichž struktuře byly zkombinovány fragmenty, které vykazovaly největší vliv na anti-TB aktivitu u předlohových látek. Oproti purinovým derivátům si tyto sloučeniny zachovaly vysokou anti-TB aktivitu i proti XDR-TB kmenům.

Selektivita účinku k *Mtb* byla u těchto látek výrazně snížena; významné antibakteriální aktivity bylo dosaženo rovněž proti gram pozitivním bakteriím. Vystupňována byla i cytotoxicita vůči HepG2 buněčné linii, řadově nižší cytotoxicita se projevila vůči CHO-K1 buněčné linii. Vybrané pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinové sloučeniny dále vykázaly nižší mikrosomální stabilitu a solubilitu ve vodě. V nejbližší době bude experimentálně stanoven mechanismus účinku, vliv na jednotlivé isoformy cytochromu CYP450 (1A2, 2C9, 2D6, 3A4), ovlivnění hERG a bude prozkoumána možná mutagenita a kancerogenita s využitím AMES testu. Tato práce se stala podkladem pro patentovou přihlášku (Substituovaný 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin a jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. PV/1430/CZ), která byla zaslána na Úřad průmyslového vlastnictví. Po dokončení všech zbývajících biologických testů bude sepsána experimentální práce.

Na tyto dvě uvedené série sloučenin v současné době navazujeme projektem antituberkulotik druhé generace na bázi substituovaných pyrimidinů. Tyto deriváty byly rovněž strukturně odvozeny od purinového derivátu **10** aplikací metody "scaffold hopping". V této sérii bylo doposud připraveno přes 120 nových pyrimidinových derivátů. Dva z těchto derivátů vykazují velmi vysokou selektivitu k netuberkulózním mykobakteriím *M. kansasii* (MIC_{99}(*M.kansasii*) = 0,25 μM), přičemž vůči *Mtb* jsou prakticky neúčinné (MIC_{99}(*Mtb*) > 64 μM). Jednoduchými

strukturními obměnami byly připraveny dva deriváty, které mají inverzní účinnost, a které se tak významněji profilují proti *Mtb* (MIC_{99}(*M.kansasii*) > 64 μM; MIC_{99}(*Mtb*) = 2 μM). Přítomnost dvou bazických dusíků ve struktuře těchto látek dává možnost převedení na příslušnou sůl. Tato vlastnost se pozitivně odráží ve vodné solubilitě; ta je přibližně desetkrát vyšší než pro derivát **10**. Vykazují i šestkrát vyšší mikrosomální stabilitu než v této práci uvedený nejstabilnější purinový derivát **10** a 12× vyšší stabilitu než jeden z nejúčinnějších pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů **151**. V současné době je ověřován mechanismu účinku a potenciální kardiotoxicita těchto látek. K dispozici je farmakokinetický profil *in vivo*. Koncentrace této látky v krvi byla po perorálním podání myši dostatečně vysoká, a proto bude přistoupeno k *in vivo* farmakodynamickým experimentům.

Experimentální část

Všechny nově připravené sloučeniny byly charakterizovány ^{1}H a ^{13}C NMR a HPLC-HRMS experimenty. NMR spektra byla měřena při laboratorní teplotě na přístroji Varian VNMR S500 pracujícím při 500 MHz (^{1}H) a 126 MHz (^{13}C) nebo Jeol JNM-ECZ600R pracujícím při 600 MHz (^{1}H) a 151 MHz (^{13}C). ^{1}H NMR spektra byla pro roztoky látek v $CDCl_3$ kalibrována na residuální signál $CHCl_3$ (δ 7,26 ppm) a pro roztoky látek v DMSO-d_6 kalibrována na residuální signál DMSO (δ 2,52 ppm). ^{13}C NMR spektra byla kalibrována na středový signál multipletu rozpouštědla (δ 77,16 ppm v $CDCl_3$; δ 39,52 ppm v DMSO-d_6). ^{13}C NMR spektra byla měřena metodou s protonovým dekaplingem. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením (HRMS) a čistota látek byly získány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Byly použity přístroje Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fischer Scientific; Germering, Německo) a hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus Orbitrap se softwarem Thermo Xcalibur, verze 4.3.73.11.; (Thermo Fischer Scientific; Brémy, Německo). Hmotnostní spektra byla získána s rozlišením 140000 v rozsahu 105-800 m/z v režimu pozitivních iontů. Ionizace byla provedena pomocí vyhřívaného elektrosprejového zdroje. Pro kapalinovou chromatografii byla použita kolona s reverzní fází Kinetex EVO C18 (2,1×50 mm, 1,7 μm, Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA). Jako mobilní fáze byla použita ultračistá voda typu ASTM i (odpor 18,2 MΩ·cm při 25 °C) připravena na přístroji Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (Thermo Fischer Scientific, Brémy, Německo) s 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí (LC-MS grade, Sigma Aldrich, Steinheim, Německo). Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril (MS, VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie) s 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí. Dělení probíhalo gradientovou metodou v dané koloně temperované na 27 °C. Čistota sloučenin byla ověřena pomocí LC-MS s využitím UV detekce (254 nm). Vzorky byly rozpuštěny ve směsi

DMSO/MeOH 50/50 (v/v), nastřikován byl 1 μl. Chemikálie byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Alfa Aesar, Fluorochem nebo Penta a používány bez dalšího čistění. Flash chromatografie byla prováděna na přístroji puriFlash® 5.050 a puriFlash® 5.125 na kolonách naplněných silikagelem. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na aluminiových destičkách potažených silikagelem SiO_2 s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 366 nm). Body tání byly stanoveny v otevřených kapilárách na přístroji Büchi B-540. Vybrané reakce probíhaly v mikrovlnném reaktoru A CEM Explorer SP 12 S.

Stanovení *in vitro* antimykobakteriální a antibakteriální aktivity

Stanovení *in vitro* antimykobakteriální aktivity bylo stanoveno na Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě a stanovení *in vitro* antibakteriální aktivity bylo stanoveno v Centru biomedicínského výzkumu FNHK. Přesné laboratorní protokoly jsou uvedeny v literatuře 70 – viz Příloha I.[70]

Stanovení cytotoxicity, solubility, mikrosomální stability a stability v lidské plasmě

Všechny tyto experimenty byly provedeny na Centru biomedicínského výzkumu FNHK a všechny laboratorní protokoly jsou uvedeny v literatuře 70 – viz Příloha 1.[70]

In silico výpočetní metody

Všechny výpočetní metody byly provedeny ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu FNHK a Vojenské lékařské fakulty, Univerzity obrany. Postup je uveden rovněž v literatuře 70 – viz Příloha 1.[70]

Syntéza a charakterizace sloučenin

Syntéza purinových derivátů

Příprava všech purinových derivátů a jejich charakterizace je popsána v publikované experimentální práci (Příloha 1).

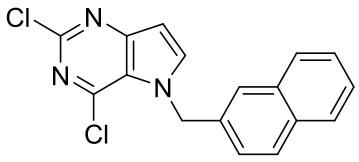
Syntéza pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinů

Obecná příprava 1:

Suspenze 2,4-dichlor-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin **80** (1 g; 5,29 mmol), K_2CO_3 (0,88 g, 6,35 mmol) byla míchána v 10 ml DMF při laboratorní teplotě. Po 30 minutách bylo přidáno alkylační činidlo **21a-21c** nebo **85-88** (5,82 mmol) do reakční směsi a ta byla míchána přes noc. Do reakční směsi bylo nalito 100 ml destilované vody a suspenze byla extrahovaná 3×50 ml dichlormethanu (DCM). Organická fáze byla posléze vysušena síranem sodným, zfiltrovaná a

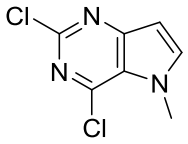
rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce (RVO). Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie, kdy mobilní fází byl petrolether a EtOAc v poměru 1:1.

2,4-Dichlor-5-[(naftalen-2-yl)methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (81)



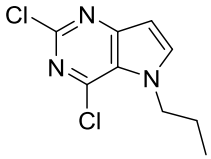
Sloučenina **81** byla připravena podle Obecné přípravy 1. 2-(Brommethyl)naftalen **21a** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 86 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 109-112 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,89 – 7,82 (m, 2H), 7,78 – 7,73 (m, 1H), 7,59 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,52 – 7,49 (m, 2H), 7,44 (bs, 1H), 7,23 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 3,2, 0,6 Hz, 1H), 5,84 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 154,39, 150,54, 143,01, 138,79, 133,62, 133,22, 132,95, 129,14, 127,80, 127,73, 126,73, 126,55, 125,60, 124,09, 123,08, 102,96, 52,43 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 328,0402 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{12}Cl_2N_3]^+$ 328,0403).

2,4-Dichlor-5-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (89)



Sloučenina **89** byla připravena podle Obecné přípravy 1. Methyl jodid **85** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 68 % (bílá krystalická látka); teplota tání 159-161 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,46 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,62 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 4,14 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 153,98, 150,24, 143,13, 139,31, 123,29, 102,02, 36,71 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 201,9937 (vypočteno pro: $[C_7H_6Cl_2N_3]^+$ 201,9933).

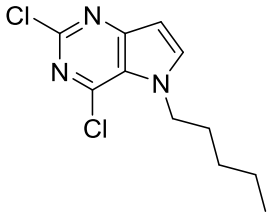
2,4-Dichlor-5-propyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (90)



Sloučenina **90** byla připravena podle Obecné přípravy 1. *n*-Propyl bromid **86** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 72 % (bílá krystalická látka); teplota tání 69-71 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,53 (d, *J* =

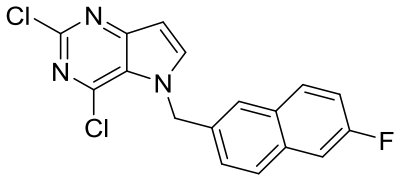
3,1 Hz, 1H), 6,65 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,47 – 4,30 (m, 2H), 1,98 – 1,78 (m, 2H), 0,96 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 154,62, 150,48, 143,06, 139,05, 122,97, 102,39, 51,18, 25,69, 11,20 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 230,0246 (vypočteno pro: $[C_9H_{10}Cl_2N_3]^+$ 230,0246).

2,4-Dichlor-5-pentyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (91)



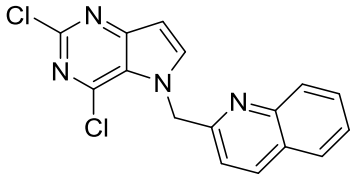
Sloučenina **91** byla připravena podle Obecné přípravy 1. *n*-Pentyl bromid **87** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 86 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,15 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 6,41 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 4,40 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,94 – 1,79 (m, 2H), 1,42 – 1,24 (m, 4H), 0,90 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 155,65, 145,55, 138,71, 131,82, 115,25, 102,94, 49,21, 31,53, 28,52, 22,20, 13,92 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 258,0559 (vypočteno pro: $[C_{11}H_{14}Cl_2N_3]^+$ 258,0559).

2,4-Dichlor-5-(6-fluornaftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (92)



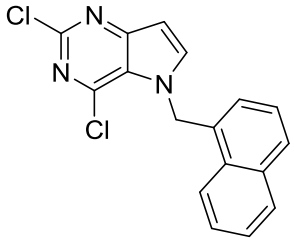
Sloučenina **92** byla připravena podle Obecné přípravy 1. 2-(Brommethyl)-6-fluornaftalen **21b** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 88 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 106-108 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,80 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,75 (dd, *J* = 9,1, 5,5 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,46 (dd, *J* = 9,6, 2,6 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,30 (dd, *J* = 8,7, 2,6 Hz, 1H), 7,28 – 7,26 (m, 1H), 6,76 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,85 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 161,16 (d, $^1J_{C-F}$ = 247,4 Hz), 154,63, 150,84, 143,23, 138,96, 133,95 (d, $^3J_{C-F}$ = 9,4 Hz), 133,83, 133,27 (d, $^4J_{C-F}$ = 2,5 Hz), 130,45 (d, $^3J_{C-F}$ = 8,7 Hz), 128,70 (d, $^4J_{C-F}$ = 5,5 Hz), 125,73, 125,35, 123,27, 117,38 (d, $^2J_{C-F}$ = 25,3 Hz), 111,12 (d, $^2J_{C-F}$ = 20,4 Hz), 103,27, 52,48 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 346,0301 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{11}N_3Cl_2F]^+$ 346,0309).

2-[(2,4-Dichlor-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-5-yl)methyl]chinolin (93)



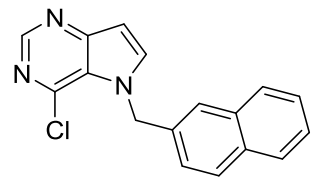
Sloučenina **93** byla připravena podle Obecné přípravy 1. 2-(Brommethyl)chinolin **21c** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 82 % (bílá krystalická látka); teplota tání 104-106 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,12 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,97 (dt, *J* = 8,6, 1,0 Hz, 1H), 7,79 (dd, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 1H), 7,74 – 7,69 (m, 2H), 7,58 – 7,50 (m, 1H), 6,99 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,75 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,94 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 155,93, 154,68, 150,72, 147,91, 143,11, 139,70, 137,86, 130,36, 129,32, 127,80, 127,51, 127,11, 123,38, 118,19, 103,28, 54,42 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 329,0357 (vypočteno pro: 329,0355 $[C_{16}H_{11}N_4Cl_2]^+$).

2,4-Dichlor-5-(naftalen-1-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (94)



Sloučenina **94** byla připravena podle Obecné přípravy 1. 1-(Brommethyl)naftalen **88** byl použit jako alkylační činidlo. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 82 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 116-118 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,95 – 7,92 (m, 1H), 7,87 (dd, *J* = 8,9, 3,5 Hz, 2H), 7,60 – 7,53 (m, 2H), 7,42 – 7,36 (m, 2H), 6,81 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,67 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 6,14 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 154,55, 150,78, 143,39, 138,68, 133,91, 131,45, 130,46, 129,49, 129,29, 127,36, 126,58, 125,66, 125,23, 123,41, 122,26, 102,95, 50,61 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 328,0403 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{12}N_3Cl_2]^+$ 328,0403).

4-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin (95)

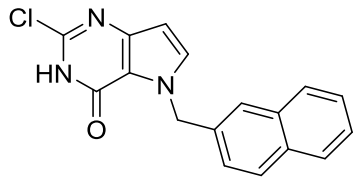


Suspenze 4-chlor-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu **84** (1 g; 5,29 mmol), K_2CO_3 (0,88 g, 6,35 mmol) v 10 ml DMF byla míchaná při laboratorní teplotě. Po 30 minutách byl přidán do reakční směsi 2-(brommethyl)naftalen **21a** (5,82 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Do reakční směsi bylo nalito 100 ml destilované vody a suspenze byla extrahovaná 3×50 ml DCM. Organická fáze byla posléze vysušena síranem sodným, zfiltrovaná a rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce (RVO) a produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie, kdy mobilní fází byl petrolether a EtOAc v poměru 1:1. Výtěžek 87 % (bílá krystalická látka); teplota tání 163-165 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,74 (s, 1H), 7,84 – 7,80 (m, 2H), 7,75 – 7,71 (m, 1H), 7,54 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,50 – 7,45 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,24 (dd, *J* = 8,5, 1,6 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 3,2 Hz 1H), 5,86 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 152,83, 150,32, 142,61, 137,36, 134,48, 133,54, 133,21, 129,31, 128,11, 128,03, 126,94, 126,73, 125,86, 124,53, 124,34, 103,58, 52,59 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 294,0794 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{13}N_3Cl]^+$ 294,0793).

Obecná příprava 2:

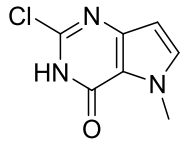
Intermediáty **81**, **89-91** (0,76 mmol) byly rozpuštěny v dioxanu (5 ml). K roztoku bylo přidáno 5 ml 2N roztoku NaOH a směs byla zahřáta na 100 °C. Po dvou hodinách byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 3-4 pomocí roztoku 2N HCl. Vyloučená pevná látka byla zfiltrována, promyta vodou (3×15 ml), diethyletherem (15 ml) a vysušena.

2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (81)



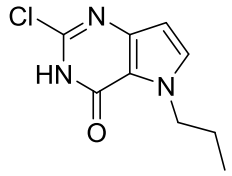
Sloučenina **81** byla připravena podle Obecné přípravy 2. Výtěžek 72 % (bílá krystalická látka); teplota tání 234-236 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12,89 (s, 1H), 7,90 – 7,79 (m, 3H), 7,70 (s, 1H), 7,64 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 7,51 – 7,45 (m, 2H), 7,42 – 7,39 (m, 1H), 6,39 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 5,75 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 154,72, 144,67, 139,16, 136,14, 132,97, 132,49, 132,42, 128,45, 127,90, 127,73, 126,55, 126,27, 125,94, 125,56, 115,53, 103,01, 51,15 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 310,0740 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{13}ClN_3O]^+$ 310,0742).

2-Chlor-5-methyl-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (96)



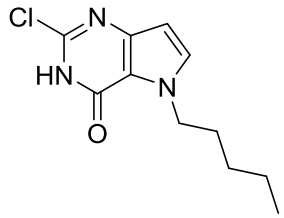
Sloučenina **96** byla připravena podle Obecné přípravy 2. Výtěžek 69 % (bílá krystalická látka); teplota tání 116-118 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,04 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 6,64 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 4,07 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 153,59, 148,60, 142,48, 141,91, 122,91, 100,93, 36,42 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 184,0272 (vypočteno pro: $[C_7H_6ClN_3O]^+$ 184,0272).

2-Chlor-5-(*n*-propyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (97)



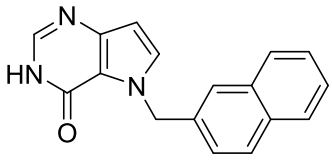
Sloučenina **97** byla připravena podle Obecné přípravy 2. Výtěžek 74 % (bílá krystalická látka); teplota tání 223 °C-rozklad. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,15 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,70 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 4,41 (t, 2H), 1,79 (sext, 2H), 0,84 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 153,98, 148,65, 142,04, 141,39, 122,20, 101,24, 49,96, 24,97, 10,71 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 212,0589 (vypočteno pro: $[C_9H_{11}ClN_3O]^+$ 212,0585).

2-Chlor-5-(*n*-pentyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (98)



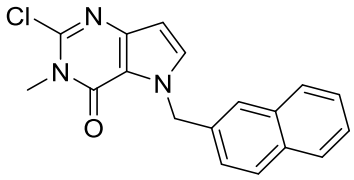
Sloučenina **98** byla připravena podle Obecné přípravy 2. Výtěžek 92 % (bílá krystalická látka); teplota tání 181-183 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 8,13 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 6,68 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 4,43 (t, 2H), 1,75 (sext, J = 14,8, 7,4 Hz, 2H), 1,33 – 1,15 (m, 4H), 0,81 (t, J = 7,1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 153,97, 148,64, 141,97, 141,29, 122,12, 101,27, 48,51, 31,36, 28,09, 21,80, 13,93 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 240,0904 (vypočteno pro: $[C_{11}H_{15}ClN_3O]^+$ 240,0898).

5-(Naftalen-2-ylmethyl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (99)



4-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin **95** (0,762 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml dioxanu. K tomuto roztoku bylo přidáno 5 ml 2N NaOH a směs byla ohřáta na 100 °C. Po dvou hodinách byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 3-4 pomocí roztoku 2N HCl. Vyloučená pevná látka byla zfiltrována, promyta vodou (3×15 ml), diethyletherem (15 ml) a vysušena. Výtěžek 76 % (bílá krystalická látka); teplota tání 202 °C-rozklad. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 7,90 – 7,87 (m, 2H), 7,86 – 7,83 (m, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,73 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 7,62 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,53 – 7,48 (m, 2H), 7,44 (dd, J = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 6,43 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,81 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 154,21, 145,11, 142,11, 136,34, 132,81, 132,28, 131,28, 128,21, 127,69, 127,54, 126,34, 126,03, 125,73, 125,47, 116,86, 102,95, 51,03 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 276,1129 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{14}N_3O]^+$ 276,1131). HPLC čistota: 99 %.

2-Chlor-3-methyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (108)

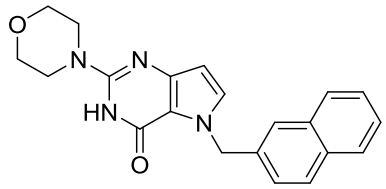


K roztoku 2-chlor-5-[(naftalen-2-yl)methyl]-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-onu **82** (1,29 mmol) v 8 ml suchého DMF bylo přidáno 0,18 g K_2CO_3 a 0,1 ml methyl jodidu (1,6 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Následně bylo k reakční směsi přilito 20 ml vody a vzniklá suspenze byla extrahována 3×15 ml DCM. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 4:1). Výtěžek 56 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 191 °C-rozklad. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,79 (s, 3H), 7,62 (s, 1H), 7,50 – 7,45 (m, 2H), 7,35 (dd, J = 4,6, 2,3 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,41 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,80 (s, 2H), 3,73 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 155,22, 143,57, 142,13, 135,19, 133,62, 133,21, 131,84, 129,03, 128,20, 128,00, 126,66, 126,59, 126,48, 125,53, 115,91, 103,62, 52,22, 33,02 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 324,0893 (vypočteno pro: $[C_{18}H_{15}N_3ClO]^+$ 324,0898).

Obecná příprava 3

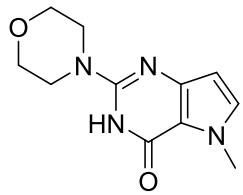
Do zkumavky bylo vloženo 0,43 mmol intermediátu **82** a **96-98**, 1,5 ml příslušného aminu a bylo do ní přilito 5 ml dioxanu a 1 ml vody. Reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru při 180 °C, 150 W, 300 psi a trvala 3 hodiny. Po ukončení reakce byl roztok ze zkumavky přelit do 50 ml baňky a odpařen do sucha. Produkt byl čištěn flash chromatografií.

2-(Morfolin-4-yl)-5-(naftalen-2-ylmethyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (83)



Sloučenina **83** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 81 % (bílá krystalická látka); teplota tání 246-248 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10,98 (br, 1H), 7,88 – 7,79 (m, 3H), 7,69 (s, 1H), 7,47 (dd, J = 6,1, 2,2 Hz, 2H), 7,44 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 7,40 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1H), 6,12 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,67 (s, 2H), 3,66 – 3,60 (m, 4H), 3,41 – 3,36 (m, J = 10,8, 6,2 Hz, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 155,31, 151,26, 146,52, 136,78, 132,96, 132,41, 131,66, 128,26, 127,81, 127,69, 126,45, 126,11, 125,76, 125,62, 112,41, 101,65, 65,85, 50,95, 46,54 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 361,1661 (vypočteno pro: $[C_{21}H_{21}N_4O_2]^+$ 361,1659). HPLC čistota: 99 %.

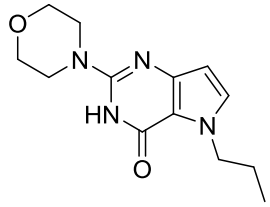
2-(Morfolin-4-yl)-5-(methyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (100)



Sloučenina **100** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 43 % (bílá krystalická látka); teplota tání 184 °C-rozklad. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10,95 (br, 1H), 7,19 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,02 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,66 – 3,62 (m, 4H), 3,37 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-

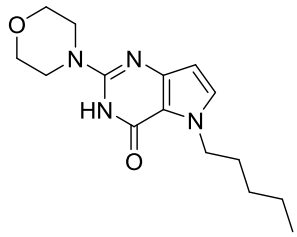
d_6) δ 155,51, 151,20, 146,06, 132,21, 113,00, 100,65, 65,90, 46,69, 35,40. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 235,1191 (vypočteno pro: $[C_{11}H_{15}N_4O_2]^+$ 235,1190). HPLC čistota: 99 %.

2-(Morfolin-4-yl)-5-(*n*-propyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (101)



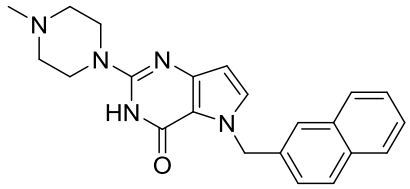
Sloučenina **101** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 33 % (bílá krystalická látka); teplota tání 231-233 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 11,50 (br, 1H), 7,03 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 6,21 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 4,27 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,91 – 3,78 (m, 4H), 3,66 – 3,62 (m, 4H), 1,85 (sext, J = 14,3, 7,2 Hz, 2H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 156,61, 150,89, 147,78, 131,72, 112,32, 101,00, 66,60, 50,42, 46,51, 24,89, 10,97 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 263,1510 (vypočteno pro: $[C_{13}H_{19}N_4O_2]^+$ 263,1503). HPLC čistota: 99 %.

2-(Morfolin-4-yl)-5-(*n*-pentyl)-3*H*,4*H*,5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (102)



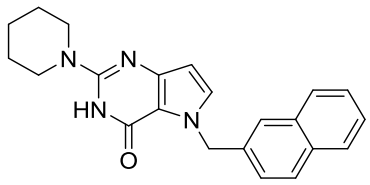
Sloučenina **102** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 40 % (bílá krystalická látka); teplota tání 169-171 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 11,51 (br, 1H), 7,03 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 6,21 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 4,30 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,89 – 3,75 (m, 4H), 3,69 – 3,57 (m, 4H), 1,90 – 1,75 (m, 2H), 1,43 – 1,15 (m, 4H), 0,88 (t, J = 7,2 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 156,61, 150,88, 147,76, 131,63, 112,27, 101,00, 66,60, 48,82, 46,51, 31,36, 28,59, 22,34, 13,96 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 291,1824 (vypočteno pro: $[C_{15}H_{23}N_4O_2]^+$ 291,1816). HPLC čistota: 98 %.

2-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-(naftalen-2-ylmethyl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (103)



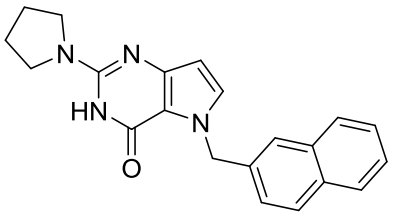
Sloučenina **103** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 63 % (bílá krystalická látka); teplota tání 249-251 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10,98 (s, 1H), 7,90 – 7,85 (m, 2H), 7,85 – 7,81 (m, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 2H), 7,46 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 7,42 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1H), 6,13 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,69 (s, 2H), 3,46 – 3,40 (m, 4H), 2,39 – 2,32 (m, 4H), 2,19 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 155,23, 151,03, 146,58, 136,69, 132,82, 132,27, 131,51, 128,14, 127,68, 127,57, 126,33, 125,98, 125,62, 125,50, 112,08, 101,43, 54,14, 50,80, 45,84, 45,69 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 374,1961 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{24}N_5O]^+$ 374,1975). HPLC čistota: 99 %.

5-(Naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (104)



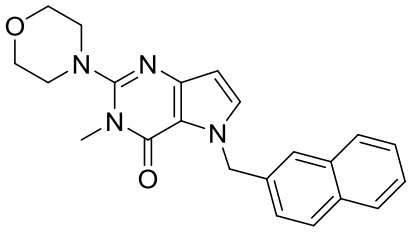
Sloučenina **104** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 74 % (bílá krystalická látka); teplota tání 225-227 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10,86 – 10,80 (s, 1H), 7,90 – 7,85 (m, 2H), 7,85 – 7,82 (m, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 1H), 7,45 – 7,42 (m, 2H), 6,11 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 5,68 (s, 2H), 3,46 – 3,40 (m, 4H), 1,57 – 1,48 (m, 6H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 155,85, 151,50, 147,42, 137,22, 133,35, 132,79, 131,89, 128,62, 128,18, 128,07, 126,82, 126,47, 126,18, 126,05, 112,38, 101,82, 51,29, 46,97, 25,50, 24,54 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 359,1858 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{23}N_4O]^+$ 359,1866). HPLC čistota: 99 %.

5-(Naftalen-2-ylmethyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (105)



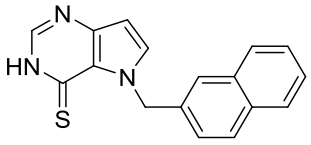
Sloučenina **105** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (DCM/MeOH, 30:70). Výtěžek 51 % (bílá krystalická látka); teplota tání 237-240 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 10,20 (s, 1H), 7,86 – 7,70 (m, 3H), 7,55 (s, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 2H), 7,33 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 6,26 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 5,73 (s, 2H), 3,69 – 3,13 (m, 4H), 2,56 – 1,30 (m, 4H) ppm, ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 156,29, 149,25, 136,14, 133,51, 132,91, 131,60, 128,59, 127,97, 127,78, 126,38, 126,07, 125,66, 125,14, 111,98, 101,68, 51,88, 46,99, 25,50. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 156,29, 149,25, 136,14, 133,51, 132,91, 131,60, 128,59, 127,97, 127,78, 126,38, 126,07, 125,66, 125,14, 111,98, 101,68, 51,88, 46,99, 25,50 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 345,1706 (vypočteno pro: $[C_{21}H_{21}N_4O]^+$ 345,1710). HPLC čistota: 98 %.

1-Methyl-2-morfolino-5-(naftalen-2-ylmethyl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-on (109)



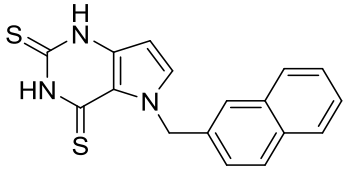
Sloučenina **109** byla připravena podle Obecné přípravy 3. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE/EtOAc, 1:1). Výtěžek 64 % (bílá krystalická látka); teplota tání 145-147 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,81 – 7,75 (m, 3H), 7,63 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 7,47 – 7,42 (m, 2H), 7,36 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 5,79 (s, 2H), 3,89 – 3,82 (m, 4H), 3,59 (s, 3H), 3,20 – 3,09 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 156,59, 154,18, 143,85, 135,66, 133,49, 133,00, 131,06, 128,69, 128,04, 127,81, 126,35, 126,34, 126,14, 125,54, 114,90, 102,76, 66,67, 51,96, 50,57, 31,68 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 375,1813 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{23}N_4O_2]^+$ 375,1816). HPLC čistota: 97 %.

5-(Naftalen-2-ylmethyl)-3,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-thion (106)



K roztoku 4-chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidinu **95** (0,34 mmol) v 10 mL of EtOH bylo přidáno 75 mg (1 mmol) thiomočoviny a následně byla reakční směs zahřáta k bodu varu ethanolu. Po dvou hodinách byla reakční směs ochlazena a vyloučený pevný podíl byl zfiltrován, promyt 10 ml EtOH a vysušen. Výtěžek 94 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 248-251 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13,35 (s, 1H), 8,05 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,90 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 7,90 – 7,85 (m, 2H), 7,84 – 7,79 (m, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,51 – 7,47 (m, 2H), 7,41 (dd, J = 8,5, 1,7 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,41 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 168,25, 142,17, 141,93, 136,90, 136,75, 132,79, 132,17, 128,12, 127,64, 127,51, 126,67, 126,27, 125,93, 125,37, 125,27, 102,80, 50,65 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 292,0904 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{14}N_3S]^+$ 292,0903). HPLC čistota: 97 %.

5-(Naftalen-2-ylmethyl)-1,5-dihydro-2*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2,4(3*H*)-dithion (107)

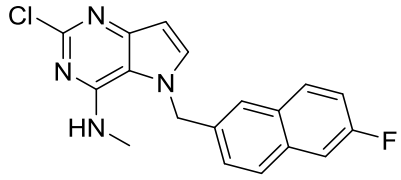


K roztoku 2,4-dichlor-5-[(naftalen-2-yl)methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin **82** (0,34 mmol) v 10 mL of EtOH bylo přidáno 75 mg (1 mmol) thiomočoviny a následně byla reakční směs zahřáta k bodu varu ethanolu. Po dvou hodinách byla reakční směs ochlazena a vyloučený pevný podíl byl zfiltrován, promyt 10 ml EtOH a vysušen. Výtěžek 93 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 286 °C-rozklad. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,26 (s, 1H), 12,87 (s, 1H), 7,90 – 7,86 (m, 2H), 7,86 – 7,82 (m, 1H), 7,75 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,51 – 7,47 (m, 2H), 7,35 (dd, J = 8,5, 1,7 Hz, 1H), 6,19 (s, 2H), 6,10 (d, J = 2,9 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173,04, 169,04, 137,24, 136,33, 132,79, 132,71, 132,17, 128,11, 127,67, 127,50, 126,27, 125,94, 125,05, 125,00, 123,05, 94,50, 50,43 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 324,0619 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{14}N_3S_2]^+$ 324,0624), HPLC čistota 95 %.

Obecná příprava 4

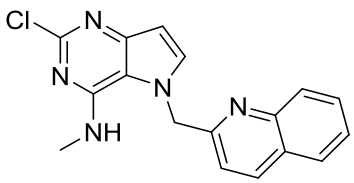
Roztok intermediátu **81** nebo **91-95** (0,36 mmol) a 5 ekvivalentů příslušného aminu (2,1 mmol) byl míchán při 45 °C 24 hodin v acetonitrilu (15 ml). Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po úplném zreagování výchozí látky byl odpařen acetonitril a k odparku bylo nalito 10 ml destilované vody a celá reakční směs byla extrahována 3×10 ml DCM. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie.

2-Chlor-5-(6-fluornaftalen-2-ylmethyl)-*N*-methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (110)



Sloučenina **110** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 86 % (bílá krystalická látka); teplota tání 150-152 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,77 (dd, *J* = 9,0, 5,5 Hz, 1H), 7,49 (dd, *J* = 9,6, 2,5 Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,33 (td, *J* = 8,7, 2,6 Hz, 1H), 7,28 – 7,23 (m, 2H), 6,57 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,59 (s, 2H), 4,72 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 2,83 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H) ppm.^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 161,27 (d, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 248,0 Hz), 152,78, 151,70, 151,13, 134,13 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 9,4 Hz), 133,73, 133,39 (d, $^{4}J_{C\text{-}F}$ = 2,7 Hz), 130,53, 130,53 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 9,1 Hz), 129,36 (d, $^{4}J_{C\text{-}F}$ = 5,3 Hz), 124,77, 124,28, 117,76 (d, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 25,3 Hz), 114,13, 111,27 (d, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 20,6 Hz), 102,56, 53,23, 28,31 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 341,0958 (vypočteno pro: $C_{18}H_{15}N_4ClF$ $[341,0964]^+$).

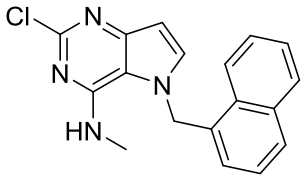
2-Chlor-*N*-methyl-5-(chinolin-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (111)



Sloučenina **111** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 92 % (bílá krystalická látka);

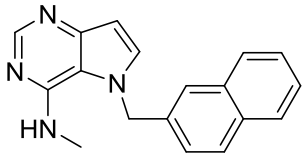
teplota tání 154-156 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,60 – 8,52 (m, 1H), 8,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,02 (dd, *J* = 8,5, 1.0 Hz, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,1, 1,4 Hz, 1H), 7,83 – 7,76 (m, 1H), 7,63 – 7,56 (m, 1H), 7,45 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,28 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,44 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,55 (s, 2H), 3,17 (d, *J* = 4,6 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 156,31, 152,95, 152,55, 150,68, 147,13, 138,94, 131,93, 130,95, 128,71, 128,05, 127,94, 127,80, 120,49, 114,93, 102,79, 55,61, 28,03 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 324,1009 (vypočteno pro: $C_{17}H_{15}ClN_5$ $[324,1010]^+$).

2-Chlor-*N*-methyl-5-(naftalen-1-ylmethyl)-*5H*- pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (112)



Sloučenina **112** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 88 % (bílá krystalická látka); teplota tání 165-167 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,95 (dd, *J* = 7,9; 1,7 Hz, 1H), 7,93 – 7,91 (m, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,65 – 7,56 (m, 2H), 7,37 (dd, *J* = 8,3, 7,1 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J* = 7,0, 1,3 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,85 (s, 2H), 4,60 (q, *J* = 4,9 Hz, 1H), 2,76 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,69, 151,77, 150,93, 133,85, 133,47, 131,64, 129,76, 129,52, 129,45, 127,54, 126,79, 125,97, 124,18, 121,75, 114,38, 102,51, 50,82, 28,27 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 323,10556 (vypočteno pro: $[C_{18}H_{16}ClN_4]^+$ 323,1058).

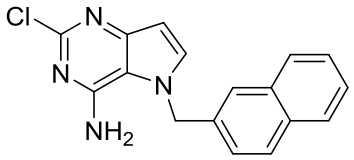
***N*-Methyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (113)**



Sloučenina **113** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 92 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8,44 (s, 1H), 7,87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7,85 – 7,83 (m, 1H), 7,75 – 7,71 (m, 1H), 7,53 – 7,48 (m, 2H), 7,44 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 6,61 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,59 (d, *J* = 1,2 Hz, 2H), 4,66 (q, *J* = 5,0 Hz, 1H), 2,81 (d, *J* = 4,9 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 151,42, 150,86, 149,22, 134,55, 133,56, 133,26, 132,69, 129,82, 128,02, 127,98, 127,10, 126,85, 124,80, 123,37, 115,64,

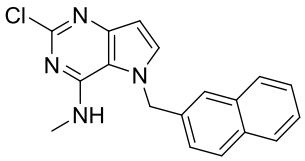
102,67, 53,27, 28,05 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 289,1444 (vypočteno pro: $[C_{18}H_{17}N_4]^+$ 289,1448). HPLC čistota: 99 %.

2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (117)



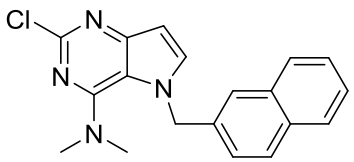
Sloučenina **117** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 92 % (bílá krystalická látka); teplota tání 142-144 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,88 – 7,84 (m, 2H), 7,80 – 7,77 (m, 1H), 7,75 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,52 – 7,45 (m, 3H), 7,17 (dd, J = 8,6, 1,8 Hz, 1H), 7,09 (s, 2H), 6,42 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,78 (s, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 151,83, 151,26, 151,12, 136,16, 135,44, 132,80, 132,33, 128,43, 127,74, 127,65, 126,54, 126,19, 124,72, 124,57, 112,73, 101,23, 51,42 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 309,0890 (vypočteno pro: $[C_{17}H_{14}N_4Cl]^+$ 309,0902).

2-Chlor-*N*-methyl-5-[(naftalen-2-yl)methyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (118)



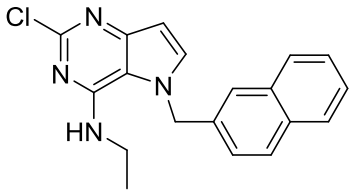
Sloučenina **118** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 83 % (bílá krystalická látka); teplota tání 174-177 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,91 – 7,83 (m, 2H), 7,77 – 7,74 (m, 1H), 7,56 – 7,49 (m, 2H), 7,44 (s, 1H), 7,24 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 8,5, 1,7 Hz, 1H), 6,51 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,80 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 2,79 (d, J = 4,8 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 152,54, 151,56, 150,90, 133,90, 133,57, 133,38, 133,16, 129,82, 127,87, 127.86, 127,07, 126,84, 124,68, 123,12, 114,03, 102,20, 53,21, 28,08 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 323,1061 (vypočteno pro: $[C_{18}H_{16}N_4Cl]^+$ 323,1058).

2-Chlor-*N,N*-dimethyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (119)



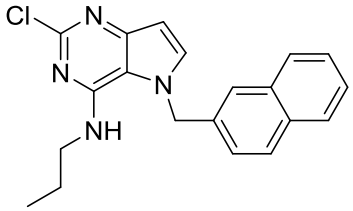
Sloučenina **119** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc: MeOH, 95:5). Výtěžek 52 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 – 7,81 (m, 1H), 7,81 – 7,76 (m, 2H), 7,53 (s, 1H), 7,52 – 7,48 (m, 2H), 7,31 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,60 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,58 (s, 2H), 3,06 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 156,54, 153,65, 151,49, 135,46, 134,58, 133,33, 132,97, 129,14, 127,95, 127,89, 126,80, 126,56, 125,95, 124,60, 117,95, 104,31, 51,99, 41,87 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 337,1215 (vypočteno pro: $[C_{19}H_{18}N_4Cl]^+$ 337,1215).

2-Chlor-*N*-ethyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (120)



Sloučenina **120** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc: MeOH, 95:5). Výtěžek 76 % (bílá krystalická látka); teplota tání 176-178 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 – 7,80 (m, 2H), 7,73 – 7,70 (m, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,23 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,14 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 5,51 (s, 2H), 4,70 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H), 3,18 (qd, *J* = 7,3, 5,0 Hz, 2H), 0,70 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,72, 151,18, 151,02, 134,18, 133,86, 133,48, 133,32, 130,06, 128,01, 127,93, 127,30, 127,04, 125,05, 123,28, 113,94, 102,19, 53,58, 35,94, 14,13 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 337,1202 (vypočteno pro: $[C_{19}H_{18}N_4Cl]^+$ 337,1215).

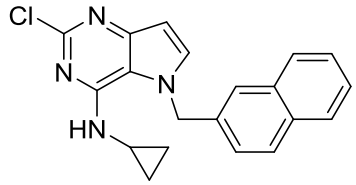
2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-*N*-propyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (121)



Sloučenina **121** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 79 % (bílá krystalická látka); teplota tání 189-191 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,90 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,88 – 7,85 (m, 1H), 7,78 – 7,74 (m, 1H), 7,56 – 7,52 (m, 2H), 7,49 (s, 1H), 7,30 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 6,54 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,59 (d, *J* = 1,1 Hz, 2H), 4,68 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 3,25 – 3,17 (m, 2H), 1,13 (h, *J* = 7,4 Hz, 2H), 0,50 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 152,61, 151,06, 151,03, 134,04, 133,77, 133,40, 133,22, 130,00, 127,90, 127,82,

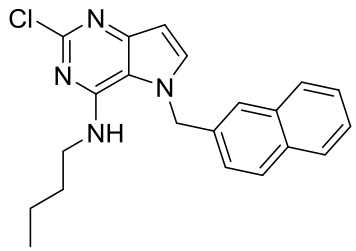
127,20, 126,94, 124,79, 123,06, 113,80, 102,09, 53,45, 42,65, 22,04, 10,98 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 351,1360 (vypočteno pro: $C_{20}H_{20}N_4Cl$ $[351,1371]^+$).

2-Chlor-*N*-cyklopropyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (122)



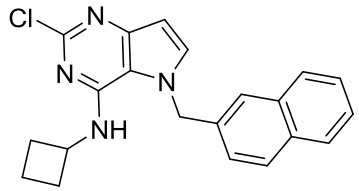
Sloučenina **122** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 84 % (bílá krystalická látka); teplota tání 187-189 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ 7,89 – 7,87 (m, 2H), 7,85 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,82 – 7,79 (m, 1H), 7,78 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,53 – 7,48 (m, 3H), 7,09 (dd, J = 8,5, 1,7 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,45 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,81 (s, 2H), 2,80 (tq, J = 6,9, 3,7 Hz, 1H), 0,66 – 0,58 (m, 2H), 0,20 – 0,16 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6) δ 151,67, 151,11, 150,64, 135,82, 135,28, 132,65, 132,24, 128,41, 127,57, 127,52, 126,52, 126,14, 124,90, 124,34, 113,40, 101,05, 51,66, 23,67, 6,42 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 349,1161 (vypočteno pro: $C_{20}H_{18}N_4Cl$ $[349,1215]^+$).

***N*-Butyl-2-chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (123)**



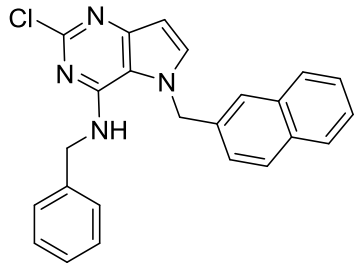
Sloučenina **123** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 87 % (bílá krystalická látka); teplota tání 177-179 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,88 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,87 – 7,83 (m, 1H), 7,77 – 7,72 (m, 1H), 7,54 – 7,51 (m, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,27 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,63 (t, J = 5,1 Hz, 1H), 3,26 – 3,17 (m, 2H), 1,07 – 0,98 (m, 2H), 0,81 – 0,72 (m, 2H), 0,52 (t, J = 7,3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,79, 151,21, 151,18, 134,16, 133,86, 133,57, 133,38, 130,10, 128,01, 127,95, 127,32, 127,04, 124,88, 123,13, 113,97, 102,24, 53,56, 40,70, 31,02, 19,71, 13,54 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 365,1466 (vypočteno pro: $C_{21}H_{22}N_4Cl$ $[365,1528]^+$).

2-Chlor-*N*-cyklobutyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (124)



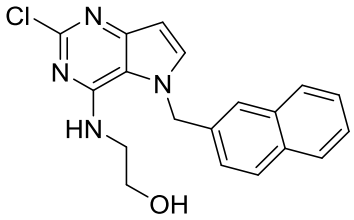
Sloučenina **124** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 79 % (bílá krystalická látka); teplota tání 145-147 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,92 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,89 – 7,85 (m, 1H), 7,80 – 7,76 (m, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,55 – 7,52 (m, 2H), 7,29 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 6,51 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,86 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 4,43 – 4,34 (m, 1H), 2,14 – 2,04 (m, 2H), 1,52 – 1,41 (m, 1H), 1,32 – 1,23 (m, 1H), 1,15 – 1,05 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,79, 151,56, 150,09, 134,29, 134,04, 133,52, 133,39, 130,22, 128,05, 127,89, 127,44, 127,15, 125,28, 123,36, 113,85, 102,21, 53,74, 45,69, 311,2, 14,90 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 363,1370 (vypočteno pro: $C_{21}H_{20}N_4Cl$ $[363,1371]^+$).

***N*-Benzyl-2-chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (125)**



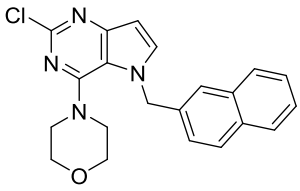
Sloučenina **125** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 82 % (bílá krystalická látka); teplota tání 168-170 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,80 (m, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,60 – 7,58 (m, 1H), 7,55 – 7,48 (m, 2H), 7,31 – 7,28 (m, 2H), 7,09 (tt, *J* = 7,3, 1,3 Hz, 1H), 7,01 (dd, *J* = 8,5, 1.9 Hz, 1H), 6,95 – 6,89 (m, 2H), 6,70 – 6,66 (m, 2H), 6,55 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,54 – 5,50 (m, 2H), 4,92 (t, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,40 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,67, 151,49, 150,62, 137,33, 134,08, 133,88, 133,45, 133,29, 130,02, 128,50, 128,12, 127,94, 127,69, 127,47, 127,10, 126,92, 124,74, 122,94, 113,85, 102,26, 53,49, 45,33 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 399,1355 (vypočteno pro: $C_{24}H_{20}N_4Cl$ $[399,1371]^+$).

2-(-2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)ethan-1-ol (126)



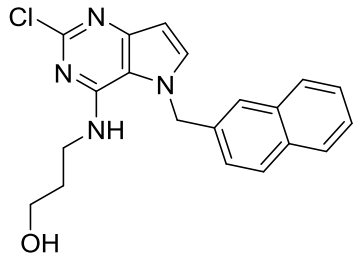
Sloučenina **126** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc: MeOH, 95:5). Výtěžek 72 % (bílá krystalicka látka); teplota tání 151-152 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,90 – 7,82 (m, 4H), 7,76 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,53 – 7,48 (m, 2H), 7,24 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,96 – 6,93 (m, 1H), 6,43 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,82 (s, 2H), 4,89 – 4,83 (m, 1H), 3,47 – 3,45 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 151,08, 150,74, 150,56, 135,64, 134,98, 132,83, 132,39, 128,50, 127,82, 127,65, 126,55, 126,27, 125,41, 124,89, 112,99, 101,37, 59,16, 51,86, 42,84 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 353,1151 (vypočteno pro: $C_{19}H_{18}N_4ClO$ $[353,1164]^+$).

4-{2-Chlor-5-(naftalen-2-yl)methyl-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl}morfolin (127)



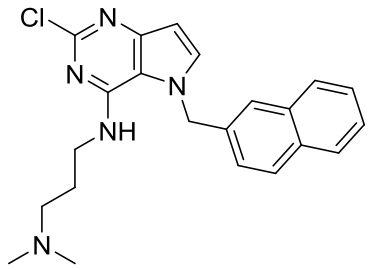
Sloučenina **127** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 79 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 168-170 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,79 (m, 2H), 7,78 – 7,74 (m, 1H), 7,54 – 7,48 (m, 3H), 7,38 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 5,62 (s, 2H), 3,88 – 3,77 (m, 4H), 3,49 – 3,23 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 155,59, 154,12, 151,55, 136,15, 134,34, 133,36, 133,02, 129,30, 127,94, 127,92, 126,93, 126,67, 125,65, 124,21, 118,30, 104,34, 66,49, 51,59, 50,66 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 379,1319 (vypočteno pro: $C_{21}H_{20}ClN_4O$ $[379,1320]^+$).

3-{[2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]amino}propan-1-ol (128)



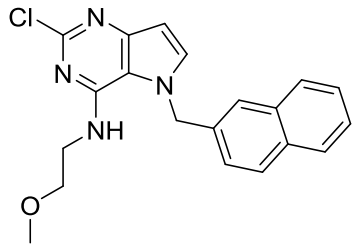
Sloučenina **128** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 84 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,88 – 7,79 (m, 2H), 7,76 – 7,68 (m, 1H), 7,54 – 7,47 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,24 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,15 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,50 (dd, *J* = 3,1, 1,0 Hz, 1H), 5,57 (s, 2H), 5,35 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 3,43 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,36 – 3,22 (m, 2H), 1,42 – 1,33 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,41, 151,33, 151,08, 134,12, 133,99, 133,46, 133,22, 129,79, 127,96, 127,94, 127,25, 127,01, 124,98, 123,42, 113,54, 102,40, 59,68, 53,45, 38,29, 31,85 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 367,1265 (vypočteno pro: $C_{20}H_{20}ClN_4O$ $[367,1320]^+$).

***N*^{1}-[2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]-*N*^{3},*N*^{3}-dimethylpropan-1,3-diamin (129)**



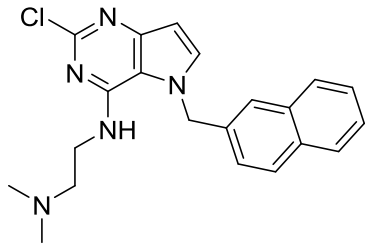
Sloučenina **129** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 78 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 – 7,81 (m, 2H), 7,77 – 7,73 (m, 1H), 7,52 – 7,48 (m, 2H), 7,46 – 7,43 (m, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 7,13 – 7,08 (m, 2H), 6,47 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,57 (s, 2H), 3,62 – 3,54 (m, 2H), 2,35 – 2,24 (m, 2H), 2,04 (s, 6H), 1,68 – 1,59 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,63, 151,13, 150,75, 134,31, 133,49, 133,19, 132,80, 129,43, 128,02, 127,93, 126,99, 126,77, 125,59, 124,24, 114,20, 102,75, 59,21, 52,61, 45,42, 41,88, 24,90 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 394,1797 (vypočteno pro: $C_{22}H_{25}ClN_5$ $[394,1793]^+$).

2-Chlor-*N*-(2-methoxyethyl)-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (130)



Sloučenina **130** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 87 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,80 (m, 2H), 7,76 – 7,71 (m, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 2H), 7,44 (dt, *J* = 1,9, 1,0 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,15 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 6,52 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,56 (d, *J* = 1,1 Hz, 2H), 5,21 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 3,48 (m, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,88 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,55, 151,23, 150,94, 133,94, 133,90, 133,53, 133,29, 129,61, 128,06, 127,91, 126,99, 126,79, 124,83, 123,29, 113,95, 102,22, 70,41, 58,35, 53,41, 40,39 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 367,1259 (vypočteno pro: $C_{20}H_{20}ClN_4O$ $[367,1320]^+$).

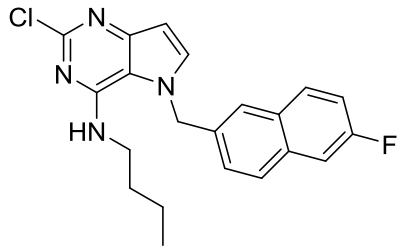
***N*^{1}-[2-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]-*N*^{2},*N*^{2}-dimethylethan-1,2-diamin (131)**



Sloučenina **131** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 72 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,82 (dd, *J* = 8,9, 2,9 Hz, 2H), 7,73 – 7,67 (m, 1H), 7,52 – 7,44 (m, 2H), 7,35 – 7,32 (m, 1H), 7,25 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,53 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,78 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 5,59 (d, *J* = 1,2 Hz, 2H), 3,33 (td, *J* = 5,8, 4,3 Hz, 2H), 2,23 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 1,85 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 152,72, 151,10, 150,89, 134,24, 133,57, 133,52, 133,20, 129,21, 128,03, 127,85, 126,86, 126,63, 124,46,

123,30, 113,97, 102,31, 56,82, 53,28, 44,59, 38,10 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 380,1636 (vypočteno pro: $C_{21}H_{23}ClN_5$ $[380,1636]^+$).

_N_-Butyl-2-chlor-5-(6-fluornaftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (150)

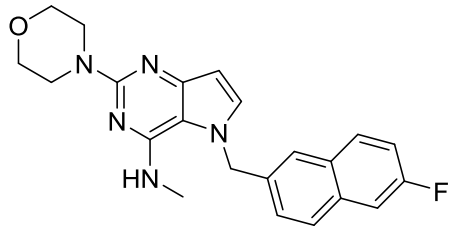


Sloučenina **150** se připravuje podle obecné přípravy 4. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze EtOAc:MeOH, 95:5). Výtěžek 92 % (bílá krystalická látka); teplota tání 184-186 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,78 – 7,72 (m, 1H), 7,50 – 7,46 (m, 2H), 7,34 – 7,30 (m, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,23 (dd, J = 8,7, 1,8 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,61 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 3,28 – 3,19 (m, 2H), 1,09 – 1,01 (m, 2H), 0,86 – 0,71 (m, 2H), 0,56 (t, J = 7,3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 161,22 (d, $^1J_{C\text{-}F}$ = 248,1 Hz), 152,76, 151,18, 151,08, 134,12 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ = 9,8 Hz), 133,80, 133,54 (d, $^4J_{C\text{-}F}$ = 3,7 Hz), 130,50, 130,38 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ = 9,4 Hz), 129,33 (d, $^4J_{C\text{-}F}$ = 6,2 Hz), 124,80, 124,19, 117,70 (d, $^2J_{C\text{-}F}$ = 26,0 Hz), 113,86, 111,16 (d, $^2J_{C\text{-}F}$ = 21,0 Hz), 102,27, 53,32, 40,63, 31,00, 19,65, 13,52 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 383,1380 (vypočteno pro: $C_{21}H_{21}N_4ClF$ $[383,1433]^+$).

Obecná příprava 5

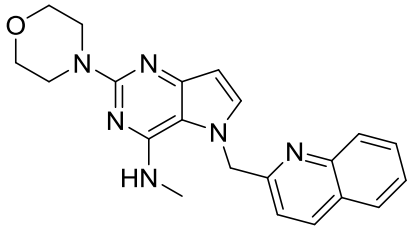
Do zkumavky bylo vloženo 0,43 mmol intermediátu **110-112**, **117-131** nebo **150**, 1,5 ml příslušného aminu a bylo do ní přilito 5 ml dioxanu a 1 ml vody. Reakce byla provedena v mikrovlnném reaktoru při 180 °C, 150 W, 300 psi a trvala 3 hodiny. Po ukončení reakce byl roztok ze zkumavky přelit do 50 ml baňky a odpařen do sucha. Produkt byl čištěn flash chromatografií.

5-(6-Fluornaftalen-2-ylmethyl)-_N_-methyl-2-morfolin-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (114)



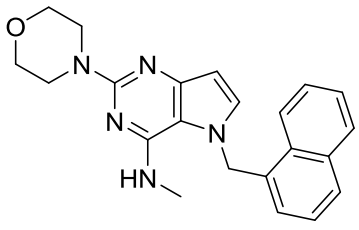
Sloučenina **114** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 46 % (bílá krystalická látka); teplota tání 149-151 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,73 – 7,67 (m, 1H), 7,44 (dd, *J* = 9,7, 2,6 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 7,09 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,47 (s, 2H), 4,40 (q, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,79 – 3,76 (m, 4H), 3,75 – 3,72 (m, 4H), 2,75 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 161,05 (d, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 247,4 Hz), 158,53, 151,36, 151,04, 134,38 (d, $^{4}J_{C\text{-}F}$ = 2,8 Hz), 133,92 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 9,3 Hz), 132,33, 130,53, 130,44 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 9,0 Hz), 128,89 (d, $^{4}J_{C\text{-}F}$ = 5,4 Hz), 124,64, 124,50, 117,36 (d, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 25,4 Hz), 111,11, 111,09 (d, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 20,6 Hz), 67,26, 53,04, 45,54, 27,81 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 392,1873 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{23}N_5FO]^+$ 392,1881). HPLC čistota: 98 %.

_N_-Methyl-2-morfolin-5-(chinolin-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (115)



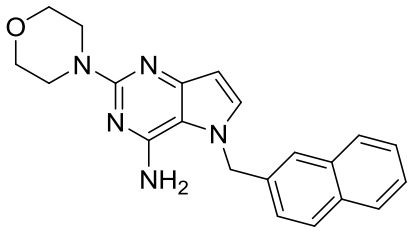
Sloučenina **115** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 51 % (bílá krystalická látka); teplota tání 80-82 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,16 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,04 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,79 – 7,75 (m, 1H), 7,58 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,16 – 7,13 (m, 1H), 6,31 – 6,28 (m, 1H), 5,50 (s, 2H), 3,78 – 3,74 (m, 4H), 3,73 – 3,69 (m, 4H), 3,08 – 3,02 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 158,56, 157,15, 151,57, 150,90, 147,05, 138,51, 130,71, 130,60, 128,77, 127,95, 127,74, 127,45, 120,37, 111,64, 101,28, 67,29, 55,77, 45,60, 27,68 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 375,1930 (vypočteno pro: 375,1928 $[C_{21}H_{22}N_6O]^+$). HPLC čistota: 96 %.

_N_-Methyl-2-morfolin-5-(naftalen-1-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (116)



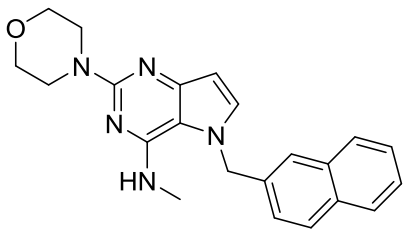
Sloučenina **116** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 72 % (bílá krystalická látka); teplota tání 79-81 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,94 (td, *J* = 8,2, 1,5 Hz, 2H), 7,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,65 – 7,54 (m, 2H), 7,38 – 7,30 (m, 1H), 7,01 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,80 (dd, *J* = 7,1, 1,3 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,78 (s, 1H), 4,27 (q, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,80 – 3,78 (m, 4H), 3,78 – 3,75 (m, 4H), 2,73 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,55, 151,24, 151,15, 133,74, 132,57, 132,11, 129,84, 129,32, 129,01, 127,21, 126,52, 125,99, 124,08, 121,88, 111,47, 101,12, 67,29, 50,67, 45,59, 27,82 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 374,1970 (vypočteno pro: 374,1975$[C_{22}H_{24}N_5O]^+$). HPLC čistota: 99 %.

2-Morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (132)



Sloučenina **132** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 42 % (bílá krystalická látka); teplota tání 74-76 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,87 – 7,81 (m, 2H), 7,73 – 7,70 (m, 1H), 7,51 – 7,48 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,23 – 7,16 (m, 2H), 6,40 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,54 (s, 2H), 4,38 (s, 2H), 3,78 – 3,73 (m, 4H), 3,73 – 3,67 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 158,54, 150,36, 135,16, 133,78, 133,55, 133,19, 129,69, 128,02, 127,93, 127,00, 126,71, 124,54, 123,37, 110,98, 100,78, 67,22, 53,10, 45,47 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 360,1825 (vypočteno pro: 360,1819 $[C_{21}H_{22}N_5O]^+$). HPLC čistota: 98 %.

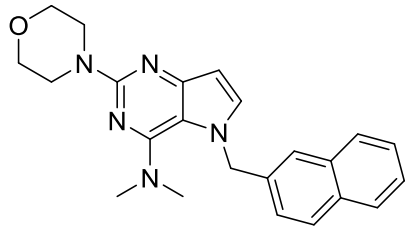
***N*-methyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (133)**



Sloučenina **133** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 58 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 165-167 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7,88 – 7,81 (m, 2H), 7,76 – 7,70 (m, 1H), 7,54

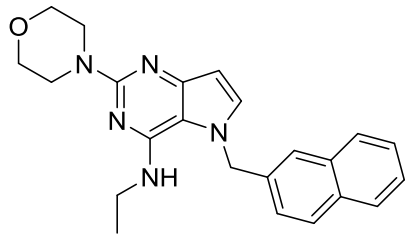
– 7,46 (m, 2H), 7,43 (s, 1H), 7,20 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,51 (s, 2H), 4,42 (q, J = 4,8 Hz, 1H), 3,79 (t, J = 5,0, 4,5 Hz, 4H), 3,75 (t, J = 5,0, 4.5 Hz, 4H), 2.74 (d, J = 4,8 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 158,3, 151,0, 150,9, 134,9, 133,3, 132,9, 132,1, 129,2, 127,8, 127,7, 126,6, 126,4, 124,5, 123,4, 111,0, 100,6, 67,0, 52,8, 45,4, 27,5 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 374,1964 (vypočteno pro: 374,1975 $[C_{22}H_{24}N_5O]^+$). HPLC čistota: 98 %.

_N,N_-Dimethyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (134)



Sloučenina **134** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 51 % (bílá krystalická látka); teplota tání 94-96 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,80 – 7,71 (m, 3H), 7,50 (s, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,12 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 7,10 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,42 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,47 (s, 2H), 3,83 – 3,80 (m, 4H), 3,80 – 3,77 (m, 4H), 2,98 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 157,97, 156,14, 153,70, 135,65, 134,23, 133,39, 132,90, 128,76, 127,98, 127,85, 126,54, 126,25, 125,87, 124,97, 114,72, 103,12, 67,27, 51,86, 45,65, 41,59 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 388,2130 (vypočteno pro: 388,2132 $[C_{23}H_{26}N_5O]^+$). HPLC čistota: 98 %.

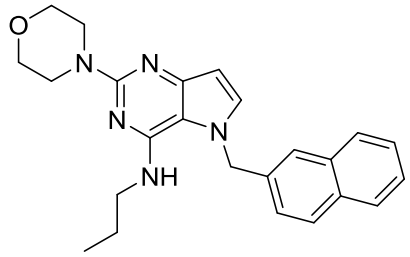
_N_-Ethyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (135)



Sloučenina **135** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 51 % (bílá krystalická látka); teplota tání 151-153 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,81 (m, 2H), 7,74 – 7,70 (m, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,19 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,0 Hz,

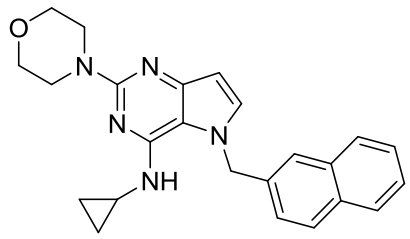
1H), 5,49 (s, 2H), 4,35 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 3,78 – 3,75 (m, 4H), 3,74 – 3,69 (m, 4H), 3,25 – 3,16 (m, 2H), 0,76 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,57, 151,52, 150,45, 135,13, 133,55, 133,23, 132,48, 129,68, 127,95, 127,02, 126,71, 124,94, 123,53, 111,01, 100,83, 67,27, 53,44, 45,56, 35,52, 14,42 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 388,2129 (vypočteno pro: $[C_{23}H_{26}N_5O]^+$ 388,2123). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Propyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (136)



Sloučenina **136** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 44 % (bílá krystalická látka); teplota tání 146-148 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,89 – 7,83 (m, 2H), 7,77 – 7,71 (m, 1H), 7,54 – 7,50 (m, 2H), 7,49 (s, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, iperi1H), 7,15 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,40 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,51 (s, 2H), 4,43 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,82 – 3,77 (m, 4H), 3,76 – 3,71 (m, 4H), 3,24 – 3,09 (m, 2H), 1,23 – 1,12 (m, 2H), 0,52 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 158,55, 151,43, 150,51, 135,06, 133,54, 133,20, 132,45, 129,67, 127,91, 127,90, 126,98, 126,67, 124,77, 123,38, 110,93, 100,77, 67,26, 53,39, 45,53, 42,40, 22,32, 11,22 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 402,2294 (vypočteno pro: 402,2288 $[C_{24}H_{28}N_5O]^+$). HPLC čistota: 99 %.

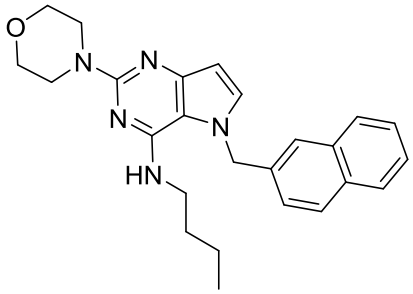
_N_-Cyklopropyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (137)



Sloučenina **137** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 46 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 152-154 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,91 – 7,84 (m, 2H), 7,79 – 7,73 (m, 1H), 7,57 – 7,51 (m, 2H), 7,47 (s, 1H), 7,19 (dd, *J* = 8,6, 1,8 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,40 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,48 (s, 2H), 4,63 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 3,82 – 3,79 (m, 4H), 3,79 – 3,76 (m, 4H),

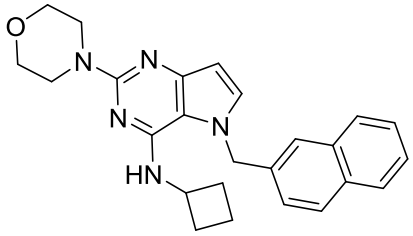
2,68 – 2,62 (m, 1H), 0,57 – 0,46 (m, 2H), -0,02 – -0,04 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 158,46, 151,10, 134,93, 133,38, 133,07, 132,56, 129,61, 127,92, 127,87, 127,82, 126,98, 126,67, 124,75, 123,34, 111,00, 100,67, 67,18, 53,31, 45,41, 23,45, 6,81 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 400,2139 (vypočteno pro: $[C_{24}H_{26}N_5O]^+$ 400,2132), HPLC čistota: 95 %.

_N_-Butyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (138)



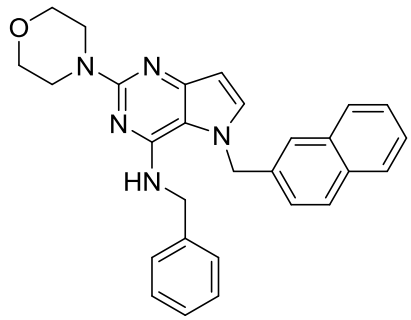
Sloučenina **138** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 61 % (bílá krystalická látka); teplota tání 146-148 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,84 (m, 1H), 7,84 – 7,82 (m, 1H), 7,74 – 7,70 (m, 1H), 7,52 – 7,48 (m, 2H), 7,47 (s, 1H), 7,18 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,49 (s, 2H), 4,37 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,79 – 3,75 (m, 4H), 3,74 – 3,68 (m, 4H), 3,24 – 3,13 (m, 2H), 1,12 – 1,02 (m, 2H), 0,84 – 0,74 (m, 2H), 0,53 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,59, 151,51, 150,55, 135,10, 133,61, 133,27, 132,47, 129,70, 127,96, 127,92, 127,01, 126,69, 124,78, 123,38, 110,99, 100,82, 67,27, 53,41, 45,57, 40,25, 31,22, 19,82, 13,60 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 416,2433 (vypočteno pro: 416,2445 $[C_{25}H_{30}N_5O]^+$). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Cyklobutyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (139)



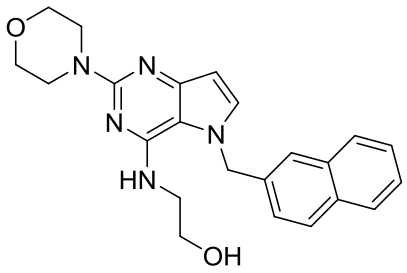
Sloučenina **139** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 68 % (bílá krystalická látka); teplota tání 171-173 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,87 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,86 – 7,83 (m, 1H), 7,77 – 7,73 (m, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,53 – 7,49 (m, 2H), 7,21 (dd, *J* = 8,6, 1,9 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,50 (s, 2H), 4,56 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,29 (h, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,78 – 3,75 (m, 4H), 3,72 – 3,68 (m, 4H), 2,10 – 2,02 (m, 2H), 1,55 – 1,43 (m, 1H), 1,37 – 1,28 (m, 1H), 1,21 – 1,12 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,54, 151,81, 149,50, 135,21, 133,55, 133,26, 132,66, 129,79, 127,97, 127,89, 127,10, 126,78, 125,14, 123,61, 110,86, 100,76, 67,26, 53,54, 45,94, 45,51, 31,12, 15,14 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 414,2278 (vypočteno pro: 414,2288 $[C_{25}H_{28}N_5O]^+$). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Benzyl-2-morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (140)



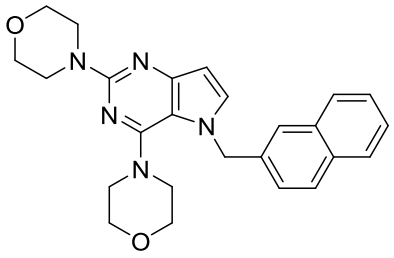
Sloučenina **140** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 76 % (bílá krystalická látka); teplota tání 170 °C-rozklad. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,80 (m, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,63 – 7,59 (m, 1H), 7,50 (dtd, *J* = 13,2, 6,9, 3,5 Hz, 2H), 7,33 (s, 1H), 7,15 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 7,08 – 7,04 (m, 2H), 6,93 – 6,89 (m, 2H), 6,71 – 6,67 (m, 2H), 6,39 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,46 (s, 2H), 4,72 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,39 (d, *J* = 5,4 Hz, 2H), 3,77 – 3,74 (m, 4H), 3,73 – 3,69 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,49, 151,85, 150,03, 138,67, 134,92, 133,55, 133,23, 132,77, 129,68, 128,35, 128,13, 127,91, 127,39, 127,08, 126,89, 126,65, 124,72, 123,28, 110,84, 100,81, 67,22, 53,40, 45,54, 44,85 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 450,2278 (vypočteno pro: 450,2288 $[C_{28}H_{28}N_5O]^+$). HPLC čistota: 99 %.

2-{[2-Morfolin-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]amin}ethan-1-ol (141)



Sloučenina **141** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 51 % (bílá krystalická látka); teplota tání 64-66 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,80 (m, 2H), 7,75 – 7,71 (m, 1H), 7,52 – 7,47 (m, 3H), 7,18 (dd, *J* = 8,5, 1,9 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,50 (s, 2H), 4,94 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,77 – 3,72 (m, 4H), 3,71 – 3,65 (m, 4H), 3,50 – 3,45 (m, 2H), 3,41 – 3,33 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 158,20, 151,76, 150,85, 134,79, 133,46, 133,23, 133,15, 129,60, 127,94, 127,93, 127,05, 126,77, 124,87, 123,52, 110,70, 100,88, 67,16, 63,21, 53,44, 45,50, 43,49 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 404,2085 (vypočteno pro: 404,2081 $[C_{23}H_{26}N_5O_2]^+$). HPLC čistota: 99 %.

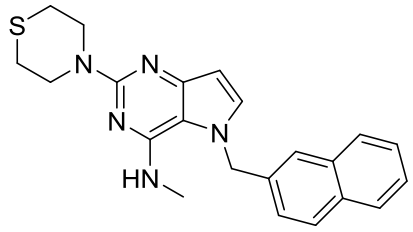
4-[2-(Morfolin-4-yl)-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]morfolin (142)



Sloučenina **142** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 82 % (žlutá krystalická látka); teplota tání 127-129 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 7,85 – 7,77 (m, 3H), 7,68 (dd, *J* = 3,2, 0,5 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,50 – 7,43 (m, 2H), 7,19 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,28 (dd, *J* = 3,1, 0,5 Hz, 1H), 5,46 (s, 2H), 3,79 (t, 4H), 3,66 – 3,61 (m, 4H), 3,58 – 3,55 (t, 4H), 3,24 (t, *J* = 4,6 Hz, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ 157,23, 154,77, 154,35, 136,25, 136,19, 132,84, 132,35, 128,26, 127,81, 127,66, 126,49, 126,16, 125,67, 125,17, 113,66, 101,98, 66,26, 65,95,

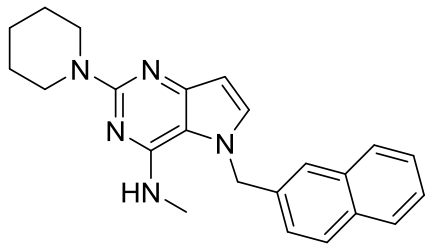
50,15, 45,03 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 430,2221 (vypočteno pro: $[C_{25}H_{28}N_5O_2]^+$ 430,2238). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Methyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-thiomorfolin-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (143)



Sloučenina **143** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 68 % (bílá krystalická látka); teplota tání 175-177 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,88 – 7,81 (m, 2H), 7,77 – 7,71 (m, 1H), 7,54 – 7,47 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 5,49 (s, 2H), 4,40 (q, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,13 (dd, *J* = 6,4, 3,5 Hz, 4H), 2,73 (d, *J* = 4,7 Hz, 3H), 2,67 (dd, *J* = 6,2, 3,8 Hz, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 157,7, 151,5, 151,1, 135,0, 133,6, 133,2, 132,3, 129,6, 128,0, 127,9, 127,0, 126,7, 124,7, 123,5, 110,8, 100,8, 53,2, 47,2, 27,9, 27,1 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 390,1745 (vypočteno pro: $[C_{24}H_{28}N_5O]^+$ 390,1747). HPLC čistota: 97 %.

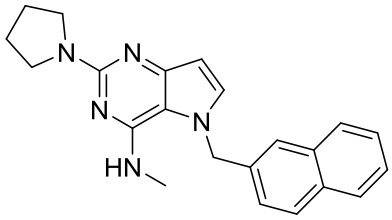
_N_-Methyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (144)



Sloučenina **144** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 64 % (bílá krystalická látka); teplota tání 138-140 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,73 – 7,69 (m, 1H), 7,51 – 7,46 (m, 2H), 7,42 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,18 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 5,45 (s, 2H), 4,37 (q, *J* = 4,9 Hz, 1H), 3,77 – 3,66 (m, 4H), 2,75 (d, *J* = 4,8 Hz, 3H), 1,61 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,78, 151,62, 151,04, 135,23, 133,56, 133,15, 132,00, 129,47, 128,02, 127,89, 126,85, 126,56, 124,66, 123,53,

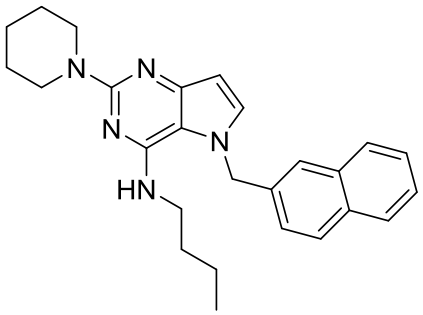
110,81, 100,86, 53,13, 45,85, 27,77, 26,09, 25,21 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 372,21872 (vypočteno pro: $[C_{23}H_{26}N_5]^+$ 372,2183). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Methyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(pyrrolidin-1-yl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (145)



Sloučenina **145** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 50 % (bílá krystalická látka); teplota tání 132-134 °C. Produkt byl čištěn flash chromatografií (mobilní fáze EtOAc:PE 1:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,74 – 7,68 (m, 1H), 7,51 – 7,45 (m, 2H), 7,44 – 7,39 (m, 1H), 7,18 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,46 (d, J = 1,2 Hz, 2H), 4,38 (q, J = 4,9 Hz, 1H), 3,64 – 3,56 (m, 4H), 2,75 (d, J = 4,7 Hz, 3H), 1,99 – 1,87 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 157,4, 151,7, 151,1, 135,3, 133,5, 133,1, 131,8, 129,5, 128,0, 127,9, 126,8, 126,5, 124,6, 123,5, 110,6, 100,6, 53,1, 46,9, 27,7, 25,8 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 358,2030 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{24}N_5]^+$ 358,2026). HPLC čistota: 97 %.

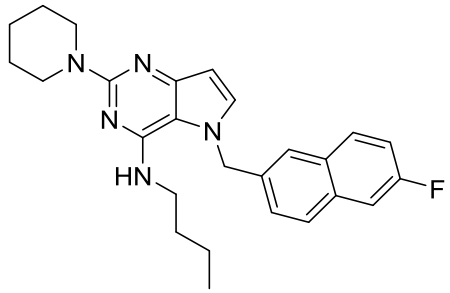
_N_-Butyl-5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (151)



Sloučenina **151** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 72 % (bílá krystalická látka); teplota tání 132-134 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,88 – 7,81 (m, 2H), 7,76 – 7,71 (m, 1H), 7,53 – 7,48 (m, 3H), 7,20 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,38 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 1,2 Hz, 2H), 4,32 (t, J = 5,3 Hz, 1H), 3,76 – 3,70 (m, 4H), 3,29 – 3,15 (m,

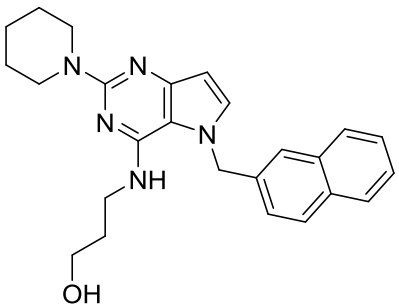
2H), 1,62 (s, 6H), 1,13 – 1,04 (m, 2H), 0,86 – 0,77 (m, 2H), 0,56 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,85, 151,82, 150,53, 135,32, 133,64, 133,26, 132,14, 129,62, 128,00, 127,92, 126,95, 126,63, 124,81, 123,49, 110,62, 100,78, 53,39, 45,90, 40,24, 31,30, 26,10, 25,27, 19,86, 13,65 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 414,2642 (vypočteno pro: $[C_{26}H_{32}N_5]^+$ 414,2652). HPLC čistota: 99 %.

_N_-Butyl-5-(6-fluornaftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-amin (152)



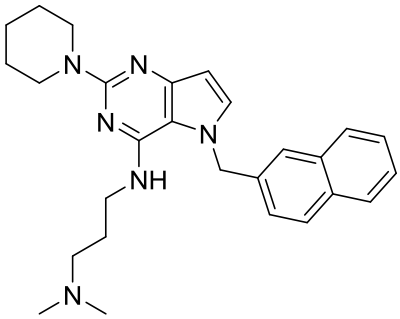
Sloučenina **152** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 67 % (bílá krystalická látka); teplota tání 142-144 °C. ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,80 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 7,73 (dd, J = 9,0, 5,5 Hz, 1H), 7,49 – 7,44 (m, 2H), 7,31 – 7,26 (m, 2H), 7,24 (dd, J = 8,6, 1,7 Hz, 1H), 7,09 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 6,37 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 5,48 (s, 2H), 4,28 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 3,74 (s, 4H), 3,24 (q, J = 6,5 Hz, 2H), 1,62 (s, 6H), 1,14 – 1,06 (m, 2H), 0,87 – 0,77 (m, 2H), 0,57 (t, J = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 161,09 (d, $^1J_{C\text{-}F}$ = 247,1 Hz), 158,81, 151,79, 150,49, 134,72 (d, $^4J_{C\text{-}F}$ = 3,7 Hz), 133,99 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ = 10,0 Hz), 132,12, 130,62, 130,43 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ = 9,6 Hz), 128,92 (d, $^4J_{C\text{-}F}$ = 6,4 Hz), 124,79, 124,57, 117,37 (d, $^2J_{C\text{-}F}$ = 25,7 Hz), 111,08 (d, $^2J_{C\text{-}F}$ = 21,1 Hz), 110,52, 100,87, 53,20, 45,89, 40,22, 31,32, 26,10, 25,25, 19,84, 13,66 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 432,2548 (vypočteno pro: $[C_{26}H_{31}N_5F]^+$ 432,2558). HPLC čistota: 97 %.

3-{[5-(Naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5_H_-pyrrolo[3,2-_d_]pyrimidin-4-yl]amino}propan-1-ol (153)



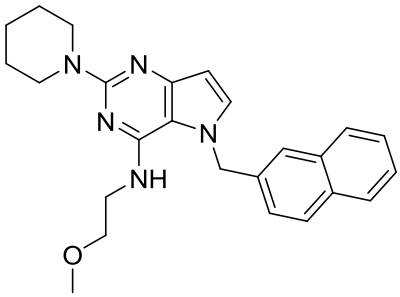
Sloučenina **153** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 62 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,90 – 7,82 (m, 2H), 7,78 – 7,71 (m, 1H), 7,54 – 7,49 (m, 2H), 7,48 – 7,43 (m, 1H), 7,18 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,38 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 4,58 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 3,70 (s, 4H), 3,48 – 3,41 (m, 2H), 3,06 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 1,62 (s, 6H), 1,19 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,49, 152,07, 150,81, 135,19, 133,52, 133,15, 132,87, 129,60, 127,93, 127,90, 127,07, 126,77, 124,80, 123,52, 109,92, 100,89, 58,39, 53,49, 45,93, 36,24, 32,44, 26,09, 25,12 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 416,2439 (vypočteno pro: $[C_{25}H_{30}N_5O]^+$ 416,2445). HPLC čistota: 95 %.

N^1,N^1-dimethyl-N^3-[5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)propan-1,3-diamin (154)



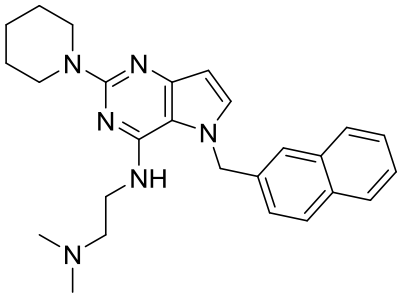
Sloučenina **154** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 49 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,78 (m, 2H), 7,74 – 7,70 (m, 1H), 7,48 – 7,45 (m, 2H), 7,44 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,33 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H), 5,74 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 3,73 (s, 4H), 3,45 – 3,33 (m, 2H), 2,11 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,98 (s, 6H), 1,61 (s, 6H), 1,52 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,75, 151,46, 150,42, 135,42, 133,52, 133,07, 131,58, 129,17, 127,98, 127,84, 126,73, 126,41, 125,03, 124,03, 110,77, 101,11, 58,63, 52,73, 45,88, 45,41, 40,55, 26,07, 25,21 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 443,2919 (vypočteno pro: $[C_{27}H_{35}N_6]^+$ 443,2918). HPLC čistota: 99 %.

***N*-(2-Methoxyethyl)-5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin (155)**



Sloučenina **155** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 71 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85 – 7,79 (m, 2H), 7,75 – 7,70 (m, 1H), 7,49 – 7,44 (m, 3H), 7,18 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,09 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,37 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,49 (d, *J* = 1,2 Hz, 2H), 4,82 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,71 (t, *J* = 4,2 Hz, 4H), 3,46 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,21 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 2,89 (s, 3H), 1,60 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 158,58, 150,25, 135,08, 133,58, 133,16, 132,25, 129,21, 128,04, 127,82, 126,67, 126,40, 124,76, 123,60, 110,56, 100,71, 70,91, 58,29, 53,26, 45,87, 40,01, 26,02, 25,16 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 416,2443 (vypočteno pro: $[C_{25}H_{30}N_5O]^+$ 416,2445). HPLC čistota: 95 %.

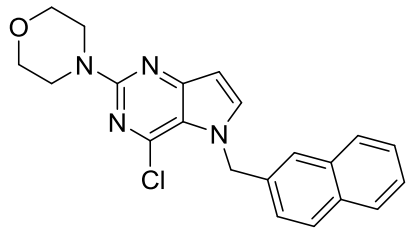
***N*^{1},*N*^{1}-dimethyl-*N*^{2}-[5-(naftalen-2-ylmethyl)-2-(piperidin-1-yl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl)ethan-1,2-diamin (156)**



Sloučenina **156** se připravuje podle obecné přípravy 5. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 56 % (žlutá olejovitá látka). ^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,76 (m, 2H), 7,71 – 7,66 (m, 1H), 7,48 – 7,43 (m, 2H), 7,39 – 7,36 (m, 1H), 7,14 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,07 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,36 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,50 (d, *J* = 1,2 Hz, 2H), 5,25 (t, *J* = 4,6 Hz, 1H), 3,73 (s, 4H), 3,30 (td, *J* = 5,9, 4,6 Hz, 2H), 2,18 (dd, *J* = 6,8, 5,1 Hz, 2H), 1,84 (s, 6H), 1,60 (d, *J* = 3,0 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 159,12, 151,78, 150,70, 135,59, 133,79, 133,32, 132,13, 129,10, 128,26, 127,99, 126,77, 126,49, 124,73, 123,87, 110,84, 101,00, 57,63, 53,43, 46,08, 44,97, 38,12, 26,33, 25,45

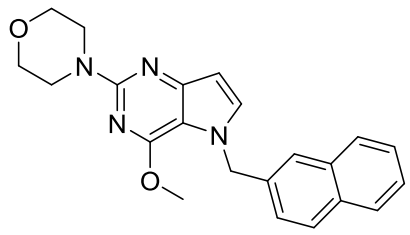
ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 429,2763 (vypočteno pro: $[C_{26}H_{33}N_6]^+$ 429,2761). HPLC čistota: 99 %.

4-[4-Chlor-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl]morfolin (146)



Do 25 ml baňky umístěné v ledové lázni bylo vloženo 0,11 mmol derivátu **83**. Do baňky byly přikapány 2 ml $POCl_3$ a následně byla celá reakční směs zahřáta na 135 °C. Po dvou hodinách zahřívání při 135 °C byla reakční směs ochlazena v ledové lázni, postupně k ní byl přisypán led a přilit vodný roztok amoniaku. Tento vodný roztok byl extrahován 3 × 20 ml DCM. Organická fáze byla oddělena, vysušena bezvodým Na_2SO_4, zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (mobilní fáze PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 43 % (bílá krystalická látka); teplota tání 136-137 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,86 – 7,79 (m, 2H), 7,75 – 7,70 (m, 1H), 7,52 – 7,44 (m, 2H), 7,42 – 7,37 (m, 2H), 7,22 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 6,62 – 6,57 (m, 1H), 5,73 (s, 2H), 3,87 – 3,83 (m, 4H), 3,82 – 3,79 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 137,94, 136,92, 134,72, 133,35, 132,94, 128,96, 127,91, 127,82, 126,67, 126,41, 125,27, 124,24, 119,00, 100,64, 66,87, 52,35, 45,52 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 379,1266 (vypočteno pro: $[C_{21}H_{20}N_4ClOCl]^+$ 379,1320).

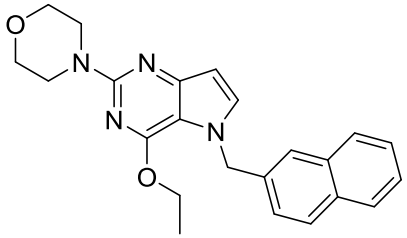
4-[4-Methoxy-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl]morfolin (147)



Do 25 ml baňky bylo vloženo 0,078 mmol intermediátu **146** a 8 ml suchého THF. Ke vzniklému roztoku bylo přikapáno 0,8 ml roztoku 25% methoxidu sodného v methanolu. Roztok byl posléze míchán při laboratorní teplotě. Po dvou hodinách bylo k reakční směsi přilito 0,5 ml vody. Roztok odpařen do sucha a produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 90 % (bílá krystalická látka); teplota tání 138-140 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,71 (m, 3H), 7,49 – 7,43 (m, 3H), 7,24 (dd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 6,43 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,56 (s, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,87 – 3,76 (m, 8H)

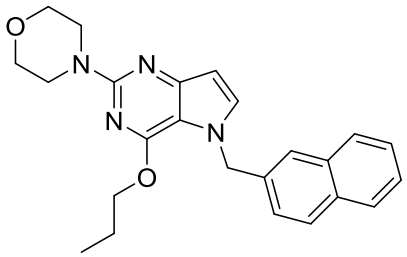
ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 157,63, 156,69, 152,50, 135,77, 133,27, 132,73, 132,62, 128,47, 127,81, 127,68, 126,33, 126,03, 125,45, 124,79, 110,91, 100,91, 67,02, 52,93, 52,60, 45,48 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 375,1811 (vypočteno pro: $[C_{22}H_{23}N_4O_2]^+$ 375,1816). HPLC čistota: 96 %.

4-[4-Ethoxy-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl]morfolin (148)



Do 25 ml baňky bylo vloženo 0,16 mmol intermediátu **146** a 8 ml suchého THF. Ke vzniklému roztoku byl přikapán 1 ml roztoku 21% ethoxidu sodného v methanolu. Roztok byl posléze míchán při laboratorní teplotě. Po dvou hodinách bylo k reakční směsi přilito 0,5 ml vody. Roztok odpařen do sucha a produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie (PE:EtOAc, 1:1). Výtěžek 54 % (bílá krystalická látka); teplota tání 154-155 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 – 7,80 (m, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,76 – 7,72 (m, 1H), 7,50 – 7,43 (m, 3H), 7,25 (dd, *J* = 8,4, 1,8 Hz, 1H), 7,19 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,41 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,46 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,84 – 3,79 (m, 4H), 3,79 – 3,75 (m, 4H), 1,33 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 157,76, 156,48, 152,59, 135,98, 133,35, 132,82, 132,73, 128,52, 127,87, 127,78, 126,41, 126,08, 125,50, 124,82, 110,89, 100,84, 67,12, 61,69, 52,82, 45,56, 14,59 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 389,1967 (vypočteno pro: $[C_{23}H_{25}N_4O_2]^+$ 389,1972), HPLC čistota: 95 %.

4-[4-Propoxy-5-(naftalen-2-ylmethyl)-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-2-yl]morfolin (149)



Ve 25ml baňce byl suspendován derivát **146** v 7 ml 0,5 M roztoku propoxidu sodného v *n*-propanolu (0,12 g sodíku bylo přidáno k 10 ml *n*-propanolu pod argonem a směs byla míchána, dokud nebyl sodík zcela rozpuštěn). Vzniklý roztok byl míchán 3 hodiny při 50 °C. Reakce

byla monitorována pomocí TLC a po dokončení reakce byl roztok odpařen do sucha. K odparku bylo přidáno 10 ml vody a reakční směs byla extrahována 3 × 10 mL dichlormethanu. Organická fáze byla posléze vysušena síranem sodným, zfiltrovaná a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce (RVO). Produkt byl čištěn s využitím flash chromatografie, kdy mobilní fází byl petrolether a EtOAc v poměru 1:1. Výtěžek 46 % (bílá krystalická látka); teplota tání 162-164 °C. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,82 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,76 – 7,71 (m, 1H), 7,50 – 7,46 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,24 (dd, *J* = 8,6, 1,8 Hz, 1H), 7,19 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 6,43 – 6,40 (m, 1H), 5,60 (s, 2H), 4,36 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,84 – 3,80 (m, 4H), 3,79 – 3,76 (m, 4H), 1,78 – 1,65 (m, 2H), 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 156,62, 135,89, 133,30, 132,75, 132,65, 128,50, 127,80, 127,70, 126,35, 126,01, 125,26, 124,63, 110,86, 100,83, 67,38, 67,05, 52,72, 45,50, 22,21, 10,68 ppm. HRMS: m/z $[M+H]^+$ 403,2128 (vypočteno pro: $[C_{24}H_{27}N_4O_2]^+$ 403,2129). HPLC čistota: 95 %.

Seznam publikovaných prací

Původní vědecké práce

Vědecké práce zahrnuty do disertační práce

Příloha 1

Finger, V.; Kucera, T.; Kafkova, R.; Muckova, L.; Dolezal, R.; Kubes, J.; Novak, M.; Prchal, L.; Lakatos, L.; Andrs, M.; Hympanova, M.; Marek, J.; Kufa, M.; Spiwok, V.; Soukup, O.; Mezeiova, E.; Janousek, J.; Nevosadova, L.; Benkova, M.; Kitson, R. R. A.; Kratky, M.; Bősze, S.; Mikusova, K.; Hartkoorn, R.; Roh, J.; Korabecny, J. 2,6-Disubstituted 7-(Naphthalen-2-ylmethyl)-7*H*-Purines as a New Class of Potent Antitubercular Agents Inhibiting DprE1. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *258*, 115611. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115611.

IF_{2022} = 6,7 (Q1), AIS = 0,965 (Q1)

Podíl autora: Design nových struktur a návrh jejich syntézy. Syntéza a purifikace všech sloučenin, sumarizace a vyhodnocení dat, sepsání vědecké práce. Finální revize článku.

Příloha 2

Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Castagnolo, D.; Roh, J.; Korabecny, J. Pyrimidine Derivatives with Antitubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *246*, 114946. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114946.

IF_{2022} = 6,7 (Q1), AIS = 0,965 (Q1)

Podíl autora: Provedení kompletní rešerše. Selekce vhodných článků pro review a vytvoření struktury celého review. Sepsání celého review, vytvoření schémat a obrázků včetně grafického abstraktu. Finální revize článku.

Seznam ostatních vědeckých prací

Kocúrik, M.; Bartáček, J.; Drabina, P.; Váňa, J.; Svoboda, J.; Husáková, L.; **Finger, V**.; Hympánová, M.; Sedlák, M. Immobilization of Trifluoromethyl-Substituted Pyridine-Oxazoline Ligand and Its Application in Asymmetric Continuous Flow Synthesis of Benzosultams. *J. Org. Chem.* **2023**. https://doi.org/10.1021/acs.joc.3c01671.

IF_{2022} = 3,6 (Q1), AIS = 0,683 (Q1)

Podíl autora: Konzultace při řešení syntetických problémů. Finální revize článku.

Pidany, F.; Kroustkova, J.; Al Mamun, A.; Suchankova, D.; Brazzolotto, X.; Nachon, F.; Chantegreil, F.; Dolezal, R.; Pulkrabkova, L.; Muckova, L.; Hrabinova, M.; **Finger, V.**; Kufa, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Jenco, J.; Kunes, J.; Novakova, L.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors Related to Amaryllidaceae Alkaloids - Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *252*, 115301.

IF_{2022} = 6,7 (Q1), AIS = 0,965 (Q1)

Podíl autora: Design nových struktur a návrh jejich syntézy. Konzultace při řešení syntetických problémů. Finální revize článku.

Opravil, J.; Pejchal, J.; **Finger, V.**; Korabecny, J.; Rozsypal, T.; Hrabinova, M.; Muckova, L.; Hepnarova, V.; Konecny, J.; Soukup, O.; Jun, D. A-Agents, Misleadingly Known as "Novichoks": A Narrative Review. *Arch. Toxicol.* **2023**, *97* (10), 2587–2607. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03571-8.

IF_{2022} = 6,1 (Q1), AIS = 1,009 (Q1)

Podíl autora: Zpracování syntetických postupů syntézy látek ze série A. Návrh alternativní syntézy těchto látek. Tvorba a úprava schémat. Finální revize článku.

Svobodova, B.; Pulkrabkova, L.; Panek, D.; Misiachna, A.; Kolcheva, M.; Andrys, R.; Handl, J.; Capek, J.; Nyvltova, P.; Rousar, T.; Prchal, L.; Hepnarova, V.; Hrabinova, M.; Muckova, L.; Tosnerova, D.; Karabanovich, G.; **Finger, V.**; Soukup, O.; Horak, M.; Korabecny, J. Structure-Guided Design of *N*-Methylpropargylamino-Quinazoline Derivatives as Multipotent Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (11), 9124. https://doi.org/10.3390/ijms24119124.

IF_{2022} = 5,6 (Q1/Q2), AIS = 1,030 (Q2)

Podíl autora: Design nových struktur a návrh jejich syntézy. Konzultace při řešení syntetických problémů. Finální revize článku.

Konecny, J.; Misiachna, A.; Hrabinova, M.; Pulkrabkova, L.; Benkova, M.; Prchal, L.; Kucera, T.; Kobrlova, T.; **Finger, V.**; Kolcheva, M.; Kortus, S.; Jun, D.; Valko, M.; Horak, M.; Soukup, O.; Korabecny, J. Pursuing the Complexity of Alzheimer's Disease: Discovery of Fluoren-9-Amines as Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors and *N*-Methyl-*d*-Aspartate Receptor Antagonists. *Biomolecules* **2020**, *11* (1), 3. https://doi.org/10.3390/biom11010003.

IF_{2020} = 4,879 (Q2); AIS = 0,972 (Q2)

Podíl autora: Design nových struktur a návrh jejich syntézy. Konzultace při řešení syntetických problémů. Finální revize článku.

Patenty

Příloha 3

Vladimír Finger, Martin Kufa, Ondřej Soukup, Koráběčný Jan, Jaroslav Roh. CZ 309884: Substituovaný purin, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Uděleno 30.11. 2023. Schválen Úřadem průmyslového vlastnictví dne 30.11.2023.

Procentuální podíl na duševním vlastnictví: 25 %.

Patentové přihlášky

Vladimír Finger, Jaroslav Roh, Jan Korábečný. PV2023-456: Substituovaný 5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin a jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Podáno na Úřad průmyslového vlastnictví 23.11. 2023. Probíhá průzkum na ÚPV. V současné době je v řízení.

Procentuální podíl na duševním vlastnictví: 80 %.

Účast na konferencích

Zahraniční

Jan Korábečný, Vladimír Finger, Martin Kufa, Jaroslav Roh. 2,6-Disubstituted 7-(naphthalen-2-ylmethyl)-7*H*-purines as a new class of potent antitubercular agents inhibiting DprE1. ACSMEDI-EFMC Medicinal Chemistry Frontiers 2023 – Joint Symposium on Medicinal Chemistry. Boston, USA.

Vladimir Finger, Martin Kufa, Jan Korábečný, Jaroslav Roh. Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity. XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2022). Nice, Francie. (Posterové sdělení)

Domácí

Vladimir Finger, Martin Kufa, Jan Korábečný, Jaroslav Roh. Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity. *56th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2022. (Posterové sdělení)

Vladimír Finger, Jan Korábečný, Jaroslav Roh. Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity. In: 13th Postgraduate and Postdoc Conference. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2022, BPC20 (Session 1 – Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry). (Přednáška)

Vladimir Finger, Martin Kufa, Jan Korábečný, Jaroslav Roh. Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity. *55th Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry*. Liblice 2021. (Posterové sdělení)

Vladimír Finger, Jan Korábečný, Jaroslav Roh. Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity. In: 12th Postgraduate and Postdoc Conference. Hradec Králové: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 2022, BPC2 (Session 1 – Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry). (Přednáška)

Reference

(1) [The etiology of tuberculosis by Dr. Robert Koch. From the Berliner Klinische Wochenschrift, Volume 19 (1882)]. *Zentralblatt Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 1 Abt Orig. Med. Mikrobiol. Infekt. Parasitol. Int. J. Microbiol. Hyg. Med. Microbiol. Infect.* **1982**, *251* (3), 287–296.

(2) Dowdy, D. W.; Azman, A. S.; Kendall, E. A.; Mathema, B. Transforming the Fight against Tuberculosis: Targeting Catalysts of Transmission. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2014**, *59* (8), 1123–1129. https://doi.org/10.1093/cid/ciu506.

(3) Churchyard, G.; Kim, P.; Shah, N. S.; Rustomjee, R.; Gandhi, N.; Mathema, B.; Dowdy, D.; Kasmar, A.; Cardenas, V. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216* (suppl_6), S629–S635. https://doi.org/10.1093/infdis/jix362.

(4) *Global Tuberculosis Report 2022*. https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022 (accessed 2023-06-29).

(5) Su, Y.; Garcia Baena, I.; Harle, A. C.; Crosby, S. W.; Micah, A. E.; Siroka, A.; Sahu, M.; Tsakalos, G.; Murray, C. J. L.; Floyd, K.; Dieleman, J. L. Tracking Total Spending on Tuberculosis by Source and Function in 135 Low-Income and Middle-Income Countries, 2000–17: A Financial Modelling Study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20* (8), 929–942. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30124-9.

(6) *2.3 Drug-resistant TB*. https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden/2-3-drug-resistant-tb (accessed 2023-10-17).

(7) *WHO operational handbook on tuberculosis: module 4: treatment: drug-susceptible tuberculosis treatment*. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240050761 (accessed 2023-10-17).

(8) Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Castagnolo, D.; Roh, J.; Korabecny, J. Pyrimidine Derivatives with Antitubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *246*, 114946. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114946.

(9) *WHO | WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment*. WHO. http://www.who.int/tb/publications/2019/consolidated-guidelines-drug-resistant-TB-treatment/en/ (accessed 2020-08-15).

(10) Mahajan, R. Bedaquiline: First FDA-Approved Tuberculosis Drug in 40 Years. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2013**, *3* (1), 1–2. https://doi.org/10.4103/2229-516X.112228.

(11) Ryan, N. J.; Lo, J. H. Delamanid: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74* (9), 1041–1045. https://doi.org/10.1007/s40265-014-0241-5.

(12) Keam, S. J. Pretomanid: First Approval. *Drugs* **2019**, *79* (16), 1797–1803. https://doi.org/10.1007/s40265-019-01207-9.

(13) Hoffmann, H.; Kohl, T. A.; Hofmann-Thiel, S.; Merker, M.; Beckert, P.; Jaton, K.; Nedialkova, L.; Sahalchyk, E.; Rothe, T.; Keller, P. M.; Niemann, S. Delamanid and Bedaquiline Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Ancestral Beijing Genotype Causing Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in a Tibetan Refugee. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193* (3), 337–340. https://doi.org/10.1164/rccm.201502-0372LE.

(14) Mallick, J. S.; Nair, P.; Abbew, E. T.; Van Deun, A.; Decroo, T. Acquired Bedaquiline Resistance during the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis: A Systematic Review. *JAC-Antimicrob. Resist.* **2022**, *4* (2), dlac029. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac029.

(15) Koehler, N.; Andres, S.; Merker, M.; Dreyer, V.; John, A.; Kuhns, M.; Krieger, D.; Choong, E.; Verougstraete, N.; Zur Wiesch, P. A.; Wicha, S. G.; König, C.; Kalsdorf, B.; Sanchez Carballo, P. M.; Schaub, D.; Werngren, J.; Schön, T.; Peloquin, C. A.; Schönfeld, N.; Verstraete, A. G.; Decosterd, L. A.; Aarnoutse, R.; Niemann, S.; Maurer, F. P.; Lange, C. Pretomanid-Resistant Tuberculosis. *J. Infect.* **2023**, *86* (5), 520–524. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.01.039.

(16) Haagsma, A. C.; Abdillahi-Ibrahim, R.; Wagner, M. J.; Krab, K.; Vergauwen, K.; Guillemont, J.; Andries, K.; Lill, H.; Koul, A.; Bald, D. Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (3), 1290–1292. https://doi.org/10.1128/AAC.01393-08.

(17) Berney, M.; Cook, G. M. Unique Flexibility in Energy Metabolism Allows Mycobacteria to Combat Starvation and Hypoxia. *PloS One* **2010**, *5* (1), e8614. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008614.
(18) Reichmuth, M. L.; Hömke, R.; Zürcher, K.; Sander, P.; Avihingsanon, A.; Collantes, J.; Loiseau, C.; Borrell, S.; Reinhard, M.; Wilkinson, R. J.; Yotebieng, M.; Fenner, L.; Böttger, E. C.; Gagneux, S.; Egger, M.; Keller, P. M. Natural Polymorphisms in Mycobacterium Tuberculosis Conferring Resistance to Delamanid in Drug-Naive Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (11). https://doi.org/10.1128/AAC.00513-20.
(19) Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E. PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science* **2008**, *322* (5906), 1392–1395. https://doi.org/10.1126/science.1164571.
(20) Lee, S. F. K.; Laughon, B. E.; McHugh, T. D.; Lipman, M. New Drugs to Treat Difficult Tuberculous and Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2019**, *25* (3), 271–280. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000570.
(21) Abrahams, K. A.; Batt, S. M.; Gurcha, S. S.; Veerapen, N.; Bashiri, G.; Besra, G. S. DprE2 Is a Molecular Target of the Anti-Tubercular Nitroimidazole Compounds Pretomanid and Delamanid. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 3828. https://doi.org/10.1038/s41467-023-39300-z.
(22) Grzelak, E. M.; Choules, M. P.; Gao, W.; Cai, G.; Wan, B.; Wang, Y.; McAlpine, J. B.; Cheng, J.; Jin, Y.; Lee, H.; Suh, J.-W.; Pauli, G. F.; Franzblau, S. G.; Jaki, B. U.; Cho, S. Strategies in Anti-Mycobacterium Tuberculosis Drug Discovery Based on Phenotypic Screening. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2019**, *72* (10), 719–728. https://doi.org/10.1038/s41429-019-0205-9.
(23) Manjunatha, U. H.; Smith, P. W. Perspective: Challenges and Opportunities in TB Drug Discovery from Phenotypic Screening. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (16), 5087–5097. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.031.
(24) Machado, D.; Girardini, M.; Viveiros, M.; Pieroni, M. Challenging the Drug-Likeness Dogma for New Drug Discovery in Tuberculosis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01367.
(25) Zuniga, E. S.; Early, J.; Parish, T. The Future for Early-Stage Tuberculosis Drug Discovery. *Future Microbiol.* **2015**, *10* (2), 217–229. https://doi.org/10.2217/fmb.14.125.
(26) Degiacomi, G.; Belardinelli, J. M.; Pasca, M. R.; De Rossi, E.; Riccardi, G.; Chiarelli, L. R. Promiscuous Targets for Antitubercular Drug Discovery: The Paradigm of DprE1 and MmpL3. *Appl. Sci.* **2020**, *10* (2), 623. https://doi.org/10.3390/app10020623.
(27) Singh, S.; Nimmagadda, A.; Su, M.; Wang, M.; Teng, P.; Cai, J. Lipidated α/α-AA Heterogeneous Peptides as Antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 398–405. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.006.
(28) Borsari, C.; Ferrari, S.; Venturelli, A.; Costi, M. P. Target-Based Approaches for the Discovery of New Antimycobacterial Drugs. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (3), 576–584. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.014.
(29) Lechartier, B.; Rybniker, J.; Zumla, A.; Cole, S. T. Tuberculosis Drug Discovery in the Post-Post-Genomic Era. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6* (2), 158–168. https://doi.org/10.1002/emmm.201201772.
(30) Huszár, S.; Chibale, K.; Singh, V. The Quest for the Holy Grail: New Antitubercular Chemical Entities, Targets and Strategies. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (4), 772–780. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.02.003.
(31) Johnson, E. O.; LaVerriere, E.; Office, E.; Stanley, M.; Meyer, E.; Kawate, T.; Gomez, J. E.; Audette, R. E.; Bandyopadhyay, N.; Betancourt, N.; Delano, K.; Da Silva, I.; Davis, J.; Gallo, C.; Gardner, M.; Golas, A. J.; Guinn, K. M.; Kennedy, S.; Korn, R.; McConnell, J. A.; Moss, C. E.; Murphy, K. C.; Nietupski, R. M.; Papavinasasundaram, K. G.; Pinkham, J. T.; Pino, P. A.; Proulx, M. K.; Ruecker, N.; Song, N.; Thompson, M.; Trujillo, C.; Wakabayashi, S.; Wallach, J. B.; Watson, C.; Ioerger, T. R.; Lander, E. S.; Hubbard, B. K.; Serrano-Wu, M. H.; Ehrt, S.; Fitzgerald, M.; Rubin, E. J.; Sassetti, C. M.; Schnappinger, D.; Hung, D. T. Large-Scale Chemical–genetics Yields New M. Tuberculosis Inhibitor Classes. *Nature* **2019**, *571* (7763), 72–78. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1315-z.
(32) Ginsberg, A. M.; Spigelman, M. Challenges in Tuberculosis Drug Research and Development. *Nat. Med.* **2007**, *13* (3), 290–294. https://doi.org/10.1038/nm0307-290.

(33) Zumla, A. I.; Gillespie, S. H.; Hoelscher, M.; Philips, P. P. J.; Cole, S. T.; Abubakar, I.; McHugh, T. D.; Schito, M.; Maeurer, M.; Nunn, A. J. New Antituberculosis Drugs, Regimens, and Adjunct Therapies: Needs, Advances, and Future Prospects. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14* (4), 327–340. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70328-1.
(34) *Pipeline | Working Group for New TB Drugs*. https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical (accessed 2023-10-31).
(35) Guieu, B.; Jourdan, J.-P.; Dreneau, A.; Willand, N.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Desirable Drug-Drug Interactions or When a Matter of Concern Becomes a Renewed Therapeutic Strategy. *Drug Discov. Today* **2021**, *26* (2), 315–328. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.026.
(36) Li, X.; Hernandez, V.; Rock, F. L.; Choi, W.; Mak, Y. S. L.; Mohan, M.; Mao, W.; Zhou, Y.; Easom, E. E.; Plattner, J. J.; Zou, W.; Pérez-Herrán, E.; Giordano, I.; Mendoza-Losana, A.; Alemparte, C.; Rullas, J.; Angulo-Barturen, I.; Crouch, S.; Ortega, F.; Barros, D.; Alley, M. R. K. Discovery of a Potent and Specific M. Tuberculosis Leucyl-TRNA Synthetase Inhibitor: (S)-3-(Aminomethyl)-4-Chloro-7-(2-Hydroxyethoxy)Benzo[c][1,2]Oxaborol-1(3H)-Ol (GSK656). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (19), 8011–8026. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00631.
(37) Palencia, A.; Li, X.; Bu, W.; Choi, W.; Ding, C. Z.; Easom, E. E.; Feng, L.; Hernandez, V.; Houston, P.; Liu, L.; Meewan, M.; Mohan, M.; Rock, F. L.; Sexton, H.; Zhang, S.; Zhou, Y.; Wan, B.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Woolhiser, L.; Gruppo, V.; Lenaerts, A. J.; O'Malley, T.; Parish, T.; Cooper, C. B.; Waters, M. G.; Ma, Z.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J. C.; Rullas, J.; Angulo-Barturen, I.; Pérez-Herrán, E.; Mendoza, A.; Barros, D.; Cusack, S.; Plattner, J. J.; Alley, M. R. K. Discovery of Novel Oral Protein Synthesis Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis That Target Leucyl-TRNA Synthetase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (10), 6271–6280. https://doi.org/10.1128/AAC.01339-16.
(38) *Next-Generation Diarylquinolines Improve Sterilizing Activity of Regimens with Pretomanid and the Novel Oxazolidinone TBI-223 in a Mouse Tuberculosis Model - PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36920217/ (accessed 2023-10-31).
(39) Shaw, K. J.; Barbachyn, M. R. The Oxazolidinones: Past, Present, and Future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1241*, 48–70. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06330.x.
(40) Locher, C. P.; Jones, S. M.; Hanzelka, B. L.; Perola, E.; Shoen, C. M.; Cynamon, M. H.; Ngwane, A. H.; Wiid, I. J.; van Helden, P. D.; Betoudji, F.; Nuermberger, E. L.; Thomson, J. A. A Novel Inhibitor of Gyrase B Is a Potent Drug Candidate for Treatment of Tuberculosis and Nontuberculosis Mycobacterial Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (3), 1455–1465. https://doi.org/10.1128/AAC.04347-14.
(41) Neres, J.; Pojer, F.; Molteni, E.; Chiarelli, L. R.; Dhar, N.; Boy-Röttger, S.; Buroni, S.; Fullam, E.; Degiacomi, G.; Lucarelli, A. P.; Read, R. J.; Zanoni, G.; Edmondson, D. E.; De Rossi, E.; Pasca, M. R.; McKinney, J. D.; Dyson, P. J.; Riccardi, G.; Mattevi, A.; Cole, S. T.; Binda, C. Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of Mycobacterium Tuberculosis. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (150), 150ra121-150ra121. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004395.
(42) Hariguchi, N.; Chen, X.; Hayashi, Y.; Kawano, Y.; Fujiwara, M.; Matsuba, M.; Shimizu, H.; Ohba, Y.; Nakamura, I.; Kitamoto, R.; Shinohara, T.; Uematsu, Y.; Ishikawa, S.; Itotani, M.; Haraguchi, Y.; Takemura, I.; Matsumoto, M. OPC-167832, a Novel Carbostyril Derivative with Potent Antituberculosis Activity as a DprE1 Inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (6). https://doi.org/10.1128/AAC.02020-19.
(43) Beites, T.; O'Brien, K.; Tiwari, D.; Engelhart, C. A.; Walters, S.; Andrews, J.; Yang, H.-J.; Sutphen, M. L.; Weiner, D. M.; Dayao, E. K.; Zimmerman, M.; Prideaux, B.; Desai, P. V.; Masquelin, T.; Via, L. E.; Dartois, V.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E.; Ehrt, S.; Schnappinger, D. Plasticity of the Mycobacterium Tuberculosis Respiratory Chain and Its Impact on Tuberculosis Drug Development. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4970. https://doi.org/10.1038/s41467-019-12956-2.
(44) Shirude, P. S.; Shandil, R.; Sadler, C.; Naik, M.; Hosagrahara, V.; Hameed, S.; Shinde, V.; Bathula, C.; Humnabadkar, V.; Kumar, N.; Reddy, J.; Panduga, V.; Sharma, S.; Ambady, A.; Hegde, N.; Whiteaker, J.; McLaughlin, R. E.; Gardner, H.; Madhavapeddi, P.; Ramachandran, V.; Kaur, P.; Narayan, A.; Guptha, S.; Awasthy, D.; Narayan, C.; Mahadevaswamy, J.; Vishwas, K.; Ahuja, V.; Srivastava, A.; Prabhakar, K.; Bharath, S.; Kale, R.; Ramaiah, M.; Choudhury, N. R.; Sambandamurthy, V. K.; Solapure, S.; Iyer, P. S.; Narayanan, S.; Chatterji, M. Azaindoles: Noncovalent DprE1 Inhibitors from Scaffold Morphing Efforts, Kill Mycobacterium

Tuberculosis and Are Efficacious *in Vivo*. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (23), 9701–9708. https://doi.org/10.1021/jm401382v.
(45) Yanofsky, D. J.; Di Trani, J. M.; Król, S.; Abdelaziz, R.; Bueler, S. A.; Imming, P.; Brzezinski, P.; Rubinstein, J. L. Structure of Mycobacterial CIII2CIV2 Respiratory Supercomplex Bound to the Tuberculosis Drug Candidate Telacebec (Q203). *eLife* **2021**, *10*. https://doi.org/10.7554/eLife.71959.
(46) Yao, R.; Wang, B.; Fu, L.; Li, L.; You, K.; Li, Y.-G.; Lu, Y. Sudapyridine (WX-081), a Novel Compound against Mycobacterium Tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10* (1), e0247721. https://doi.org/10.1128/spectrum.02477-21.
(47) Li, W.; Upadhyay, A.; Fontes, F. L.; North, E. J.; Wang, Y.; Crans, D. C.; Grzegorzewicz, A. E.; Jones, V.; Franzblau, S. G.; Lee, R. E.; Crick, D. C.; Jackson, M. Novel Insights into the Mechanism of Inhibition of MmpL3, a Target of Multiple Pharmacophores in Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (11), 6413–6423. https://doi.org/10.1128/AAC.03229-14.
(48) Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I. SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (4), 1797–1809. https://doi.org/10.1128/AAC.05708-11.
(49) Chikhale, R.; Menghani, S.; Babu, R.; Bansode, R.; Bhargavi, G.; Karodia, N.; Rajasekharan, M. V.; Paradkar, A.; Khedekar, P. Development of Selective DprE1 Inhibitors: Design, Synthesis, Crystal Structure and Antitubercular Activity of Benzothiazolylpyrimidine-5-Carboxamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 30–46. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.011.
(50) Chikhale, R. V.; Barmade, M. A.; Murumkar, P. R.; Yadav, M. R. Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (19), 8563–8593. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00281.
(51) Trefzer, C.; Škovierová, H.; Buroni, S.; Bobovská, A.; Nenci, S.; Molteni, E.; Pojer, F.; Pasca, M. R.; Makarov, V.; Cole, S. T.; Riccardi, G.; Mikušová, K.; Johnsson, K. Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl-β-d-Ribofuranose 2′-Oxidase DprE1. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (2), 912–915. https://doi.org/10.1021/ja211042r.
(52) Makarov, V.; Manina, G.; Mikusova, K.; Mollmann, U.; Ryabova, O.; Saint-Joanis, B.; Dhar, N.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; Lucarelli, A. P.; Milano, A.; De Rossi, E.; Belanova, M.; Bobovska, A.; Dianiskova, P.; Kordulakova, J.; Sala, C.; Fullam, E.; Schneider, P.; McKinney, J. D.; Brodin, P.; Christophe, T.; Waddell, S.; Butcher, P.; Albrethsen, J.; Rosenkrands, I.; Brosch, R.; Nandi, V.; Bharath, S.; Gaonkar, S.; Shandil, R. K.; Balasubramanian, V.; Balganesh, T.; Tyagi, S.; Grosset, J.; Riccardi, G.; Cole, S. T. Benzothiazinones Kill Mycobacterium Tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* **2009**, *324* (5928), 801–804. https://doi.org/10.1126/science.1171583.
(53) Makarov, V.; Lechartier, B.; Zhang, M.; Neres, J.; Sar, A. M.; Raadsen, S. A.; Hartkoorn, R. C.; Ryabova, O. B.; Vocat, A.; Decosterd, L. A.; Widmer, N.; Buclin, T.; Bitter, W.; Andries, K.; Pojer, F.; Dyson, P. J.; Cole, S. T. Towards a New Combination Therapy for Tuberculosis with next Generation Benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6* (3), 372–383. https://doi.org/10.1002/emmm.201303575.
(54) Traub, W.; Sussman, J. L. Adenine-Guanine Base Pairing in Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10* (8), 2701–2708. https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2701.
(55) Ashihara, H.; Sano, H.; Crozier, A. Caffeine and Related Purine Alkaloids: Biosynthesis, Catabolism, Function and Genetic Engineering. *Phytochemistry* **2008**, *69* (4), 841–856. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029.
(56) Dunn, J.; Grider, M. H. Physiology, Adenosine Triphosphate. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
(57) Abdool Karim, Q.; Abdool Karim, S. S.; Frohlich, J. A.; Grobler, A. C.; Baxter, C.; Mansoor, L. E.; Kharsany, A. B. M.; Sibeko, S.; Mlisana, K. P.; Omar, Z.; Gengiah, T. N.; Maarschalk, S.; Arulappan, N.; Mlotshwa, M.; Morris, L.; Taylor, D.; on behalf of the CAPRISA 004 Trial Group. Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science* **2010**, *329* (5996), 1168–1174. https://doi.org/10.1126/science.1193748.

(58) Gruzdev, D. A.; Musiyak, V. V.; Levit, G. L.; Krasnov, V. P.; Charushin, V. N. Purine Derivatives with Antituberculosis Activity. *Russ. Chem. Rev.* **2018**, *87* (6), 604. https://doi.org/10.1070/RCR4772.
(59) Gundersen, L.-L.; Nissen-Meyer, J.; Spilsberg, B. Synthesis and Antimycobacterial Activity of 6-Arylpurines: The Requirements for the N-9 Substituent in Active Antimycobacterial Purines. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (6), 1383–1386. https://doi.org/10.1021/jm0110284.
(60) Bakkestuen, A. K.; Gundersen, L.-L.; Utenova, B. T. Synthesis, Biological Activity, and SAR of Antimycobacterial 9-Aryl-, 9-Arylsulfonyl-, and 9-Benzyl-6-(2-Furyl)Purines. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (7), 2710–2723. https://doi.org/10.1021/jm0408924.
(61) Bakkestuen, A. K.; Gundersen, L.-L.; Langli, G.; Liu, F.; Nolsøe, J. M. J. 9-Benzylpurines with Inhibitory Activity against Mycobacterium Tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (11), 1207–1210. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00188-8.
(62) Brændvang, M.; Gundersen, L.-L. Synthesis, Biological Activity, and SAR of Antimycobacterial 2- and 8-Substituted 6-(2-Furyl)-9-(p-Methoxybenzyl)Purines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (22), 7144–7165. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.034.
(63) Pathak, A. K.; Pathak, V.; Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. Antimycobacterial Agents. 1. Thio Analogues of Purine. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (1), 273–276. https://doi.org/10.1021/jm030389b.
(64) Pathak, A. K.; Pathak, V.; Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. 6-Oxo and 6-Thio Purine Analogs as Antimycobacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (7), 1685–1695. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.054.
(65) Mangalindan, G.; Talaue, M.; Cruz, L.; Franzblau, S.; Adams, L.; Richardson, A.; Ireland, C.; Concepcion, G. Agelasine F from a Philippine *Agelas* Sp. Sponge Exhibits *in Vitro* Antituberculosis Activity. *Planta Med.* **2000**, *66* (04), 364–365. https://doi.org/10.1055/s-2000-8554.
(66) Wu, H.; Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Agelasine-E and -F, Novel Monocyclic Diterpenoids with 9-Methyladeninium Unit Possessing Inhibitory Effects on Na,K-ATPase Isolated from the Okinawan Sea Sponge Hoshino. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* (34), 3719–3722. https://doi.org/10.1016/0040-4039(84)80114-8.
(67) Roggen, H.; Charnock, C.; Burman, R.; Felth, J.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Gundersen, L.-L. Antimicrobial and Antineoplastic Activities of Agelasine Analogs Modified in the Purine 2-Position. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2011**, *344* (1), 50–55. https://doi.org/10.1002/ardp.201000148.
(68) Voynikov, Y.; Valcheva, V.; Momekov, G.; Peikov, P.; Stavrakov, G. Theophylline-7-Acetic Acid Derivatives with Amino Acids as Anti-Tuberculosis Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (14), 3043–3045. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.026.
(69) Andrs, M.; Pospisilova, M.; Seifrtova, M.; Havelek, R.; Tichy, A.; Vejrychova, K.; Polednikova, M.; Gorecki, L.; Jun, D.; Korabecny, J.; Rezacova, M. Purin-6-One and Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidin-4-One Derivatives as Potentiating Agents of Doxorubicin Cytotoxicity. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (17), 2029–2038. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0086.
(70) Finger, V.; Kucera, T.; Kafkova, R.; Muckova, L.; Dolezal, R.; Kubes, J.; Novak, M.; Prchal, L.; Lakatos, L.; Andrs, M.; Hympanova, M.; Marek, J.; Kufa, M.; Spiwok, V.; Soukup, O.; Mezeiova, E.; Janousek, J.; Nevosadova, L.; Benkova, M.; Kitson, R. R. A.; Kratky, M.; Bősze, S.; Mikusova, K.; Hartkoorn, R.; Roh, J.; Korabecny, J. 2,6-Disubstituted 7-(Naphthalen-2-Ylmethyl)-7H-Purines as a New Class of Potent Antitubercular Agents Inhibiting DprE1. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *258*, 115611. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115611.
(71) Andrs, M.; Pospisilova, M.; Seifrtova, M.; Havelek, R.; Tichy, A.; Vejrychova, K.; Polednikova, M.; Gorecki, L.; Jun, D.; Korabecny, J.; Rezacova, M. Purin-6-One and Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidin-4-One Derivatives as Potentiating Agents of Doxorubicin Cytotoxicity. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (17), 2029–2038. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0086.
(72) Vincent, S. P.; Mioskowski, C.; Lebean, L. Regioselective N1-Alkylation of Guanosine Derivatives Protected at N 2 by an N,N-Dialkyl Amidine Group. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18* (9), 2127–2139. https://doi.org/10.1080/07328319908044869.
(73) Abe, Y. S.; Sasaki, S. The Adduct Formation between the Thioguanine-Polyamine Ligands and DNA with the AP Site under UVA Irradiated and Non-Irradiated Conditions. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (24), 115160. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115160.

(74) Borthwick, J. A.; Alemparte, C.; Wall, I.; Whitehurst, B. C.; Argyrou, A.; Burley, G.; de Dios-Anton, P.; Guijarro, L.; Monteiro, M. C.; Ortega, F.; Suckling, C. J.; Pichel, J. C.; Cacho, M.; Young, R. J. Mycobacterium Tuberculosis Decaprenylphosphoryl-β-d-Ribose Oxidase Inhibitors: Expeditious Reconstruction of Suboptimal Hits into a Series with Potent in Vivo Activity. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (5), 2557–2576. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01561.

(75) Oh, S.; Park, Y.; Engelhart, C. A.; Wallach, J. B.; Schnappinger, D.; Arora, K.; Manikkam, M.; Gac, B.; Wang, H.; Murgolo, N.; Olsen, D. B.; Goodwin, M.; Sutphin, M.; Weiner, D. M.; Via, L. E.; Boshoff, H. I. M.; Barry, C. E. Discovery and Structure–Activity-Relationship Study of N-Alkyl-5-Hydroxypyrimidinone Carboxamides as Novel Antitubercular Agents Targeting Decaprenylphosphoryl-β-d-Ribose 2′-Oxidase. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 9952–9965. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00883.

(76) Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-Oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2362–2380. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00608.

(77) Karabanovich, G.; Dušek, J.; Savková, K.; Pavliš, O.; Pávková, I.; Korábečný, J.; Kučera, T.; Kočová Vlčková, H.; Huszár, S.; Konyariková, Z.; Konečná, K.; Jand'ourek, O.; Stolaříková, J.; Korduláková, J.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrophenyl-Containing 1,2,4-Triazoles and Their Trifluoromethyl Analogues as Highly Efficient Antitubercular Agents Inhibiting Decaprenylphosphoryl-β-d-Ribofuranose 2'-Oxidase. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (17), 8115–8139. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00912.

(78) Combourieu, B.; Besse, P.; Sancelme, M.; Godin, J.-P.; Monteil, A.; Veschambre, H.; Delort, A.-M. Common Degradative Pathways of Morpholine, Thiomorpholine, and Piperidine by Mycobacterium Aurum MO1: Evidence from 1H-Nuclear Magnetic Resonance and Ionspray Mass Spectrometry Performed Directly on the Incubation Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66* (8), 3187–3193.

(79) Balabon, O.; Pitta, E.; Rogacki, M. K.; Meiler, E.; Casanueva, R.; Guijarro, L.; Huss, S.; Lopez-Roman, E. M.; Santos-Villarejo, Á.; Augustyns, K.; Ballell, L.; Aguirre, D. B.; Bates, R. H.; Cunningham, F.; Cacho, M.; Van der Veken, P. Optimization of Hydantoins as Potent Antimycobacterial Decaprenylphosphoryl-β-d-Ribose Oxidase (DprE1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (10), 5367–5386. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00107.

(80) Batt, S. M.; Cacho Izquierdo, M.; Castro Pichel, J.; Stubbs, C. J.; Vela-Glez Del Peral, L.; Pérez-Herrán, E.; Dhar, N.; Mouzon, B.; Rees, M.; Hutchinson, J. P.; Young, R. J.; McKinney, J. D.; Barros Aguirre, D.; Ballell, L.; Besra, G. S.; Argyrou, A. Whole Cell Target Engagement Identifies Novel Inhibitors of *Mycobacterium Tuberculosis* Decaprenylphosphoryl-β- D -Ribose Oxidase. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (12), 615–626. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00065.

(81) Neres, J.; Hartkoorn, R. C.; Chiarelli, L. R.; Gadupudi, R.; Pasca, M. R.; Mori, G.; Venturelli, A.; Savina, S.; Makarov, V.; Kolly, G. S.; Molteni, E.; Binda, C.; Dhar, N.; Ferrari, S.; Brodin, P.; Delorme, V.; Landry, V.; de Jesus Lopes Ribeiro, A. L.; Farina, D.; Saxena, P.; Pojer, F.; Carta, A.; Luciani, R.; Porta, A.; Zanoni, G.; De Rossi, E.; Costi, M. P.; Riccardi, G.; Cole, S. T. 2-Carboxyquinoxalines Kill Mycobacterium Tuberculosis through Noncovalent Inhibition of DprE1. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (3), 705–714. https://doi.org/10.1021/cb5007163.

(82) Bank, R. P. D. *RCSB PDB - 4P8N: Crystal structure of M. tuberculosis DprE1 in complex with the non-covalent inhibitor QN118*. https://www.rcsb.org/structure/4p8n (accessed 2023-12-06).

(83) Trousil, J.; Pavliš, O.; Kubíčková, P.; Škorič, M.; Marešová, V.; Pavlova, E.; Knudsen, K. D.; Dai, Y.-S.; Zimmerman, M.; Dartois, V.; Fang, J.-Y.; Hrubý, M. Antitubercular Nanocarrier Monotherapy: Study of In Vivo Efficacy and Pharmacokinetics for Rifampicin. *J. Controlled Release* **2020**, *321*, 312–323. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.026.

(84) Cook, G. M.; Berney, M.; Gebhard, S.; Heinemann, M.; Cox, R. A.; Danilchanka, O.; Niederweis, M. Physiology of Mycobacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **2009**, *55*, 81–319. https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7.

(85) Obach, R. S. Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs from Hepatic Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of in Vitro Half-Life Approach and Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **1999**, *27* (11), 1350–1359.
(86) Vijay, U.; Gupta, S.; Mathur, P.; Suravajhala, P.; Bhatnagar, P. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-Protoc.* **2018**, *8* (6), e2763. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2763.

Příloha 1

Finger, V.; Kucera, T.; Kafkova, R.; Muckova, L.; Dolezal, R.; Kubes, J.; Novak, M.; Prchal, L.; Lakatos, L.; Andrs, M.; Hympanova, M.; Marek, J.; Kufa, M.; Spiwok, V.; Soukup, O.; Mezeiova, E.; Janousek, J.; Nevosadova, L.; Benkova, M.; Kitson, R. R. A.; Kratky, M.; Bősze, S.; Mikusova, K.; Hartkoorn, R.; Roh, J.; Korabecny, J. 2,6-Disubstituted 7-(Naphthalen-2-ylmethyl)-7*H*-Purines as a New Class of Potent Antitubercular Agents Inhibiting DprE1. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *258*, 115611. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115611.

Příloha 2

Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Castagnolo, D.; Roh, J.; Korabecny, J. Pyrimidine Derivatives with Antitubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *246*, 114946. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114946.

Příloha 3

Vladimír Finger, Martin Kufa, Ondřej Soukup, Koráběčný Jan, Jaroslav Roh. CZ 309884: Substituovaný purin, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Uděleno 30.11. 2023. Schválen Úřadem průmyslového vlastnictví dne 30.11.2023.