

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**Syntéza a hodnocení potenciálních antimikrobiálních
sloučenin**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Jana Sýkorová

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 11. 5. 2022

Poděkování

Tímto bych chtěla srdečně poděkovat všem lidem, díky kterým mohla tato bakalářská práce vzniknout. Především mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za jeho pomoc, ochotu, cenné rady a trpělivé vedení práce. Dále paní Idě Dufkové za změření antifungální a antibakteriální aktivity, za názornou ukázkou a možnost být přítomna při některých měřeních biologických aktivit.

Studie byla podpořena projektem Grantové agentury České republiky č. 20-19638Y.

Abstrakt

Antibiotická rezistence představuje globální problém a ke zmírnění následků by měl přispět mimo jiné i vývoj nových léčiv. Všechny nově připravené sloučeniny vychází z molekuly 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu, v některých syntézách byl jako výchozí sloučenina použit jeho derivát sulfamethazin. Výchozí molekula byla zvolena na základě antimikrobní aktivity derivátů 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu. Cílem tří jednokrokových syntéz byla příprava jednotlivých sulfonamidů reakcí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu s příslušným sulfonylchloridem. Ostatních deset také jednokrokových reakcí vedlo k přípravě Schiffových bazí, které vycházejí většinou z derivátů salicylaldehydu a benzaldehydů. Byly použity různé metody, výtěžky se pohybovaly v rozmezí od 13 % do 48 % u sulfonamidů a od 13 % až po 96 % u Schiffových bazí. U všech třinácti sloučenin byla otestována antibakteriální (proti vybraným G^+ i G^- kmenům) a antifungální aktivita pomocí mikrodiluční bujónové metody. Obecně byly látky neúčinné na G^- bakterie, naopak největší aktivitu (tj. nejnižší hodnoty minimální inhibiční koncentrace, MIC) projevily při testování proti houbám. Sulfonamidy byly neúčinné. Nejnižší MIC u hub ($3,9 \mu\text{mol/l}$) i bakterií ($15,62 \mu\text{mol/l}$) dosáhl 2-[[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)imino]methyl]-4,6-dijodfenol. Mezi nadějně antifungální látky, které měly dostatečně nízké MIC, patří například i 4-[(3,5-dibrom-2-hydroxybenzyliden)amino]-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid či 4-chlor-2-[[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)imino]methyl]-6-jodfenol. Výchozí molekula (sulfamethazin nebo 4,6-dimethylpyrimidin-2-amin) pro antifungální aktivitu nehrála zásadní roli, malý rozdíl můžeme vidět na hodnotách MIC při testování těchto látek proti některým G^+ kmenům, kdy jsou sloučeniny s výchozí molekulou sulfamethazinem účinnější. Výhodnou pro antifungální aktivitu se také zdá být přítomnost jodu ve sloučenině, navíc s rostoucím počtem atomů jodu klesá hodnota MIC.

Abstract

Antibiotic resistance is a global problem and the development of new drugs, among other approaches, should contribute to mitigating the consequences. All newly prepared compounds are based on the 4,6-dimethylpyrimidine-2-amine, in some syntheses its derivative sulfamethazine was used as a starting compound. The starting molecule was chosen based on the antimicrobial activity of 4,6-dimethylpyrimidine-2-amine derivatives. The aim of three one-step syntheses was to prepare sulfonamides from 4,6-dimethylpyrimidine-2-amine and corresponding sulfonyl chlorides. Other ten also one-step reactions led to the preparation of Schiff bases, which are mostly based on salicylaldehyde and benzaldehyde derivatives. Different methods were used, yields ranged from 13 % to 48 % for sulfonamides and from 13 % to 96 % for Schiff bases. All thirteen compounds were tested for antibacterial (against selected G^+ and G^- strains) and antifungal activity using the microdilution broth method. In general, the compounds were ineffective against G^- bacteria and, on the other hand, showed the greatest activity (i.e., lowest minimum inhibitory concentrations, MIC) against fungi. Sulfonamides were ineffective. The lowest MICs for both fungi ($3.9 \mu\text{mol l}^{-1}$) and bacteria ($15.62 \mu\text{mol l}^{-1}$) were found for 2-[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]-4,6-diiodophenol. Promising antifungal substances that had sufficiently low MICs include 4-[(3,5-dibromo-2-hydroxybenzylidene)amino]-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide and 4-chloro-2-[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]-6-iodophenol. The parent molecules, sulfamethazine and 4,6-dimethylpyrimidine-2-amine, have no influence on antifungal action; a small difference was found for MIC values when testing these compounds against some G^+ strains, where sulfamethazine derivatives were more effective. The presence of iodine in the compound also appears to be advantageous for antifungal activity, and the MIC value decreases with increasing number of iodine atoms.

Obsah

1	Seznam použitých zkratk.....	8
2	Úvod.....	10
3	Teoretická část.....	11
3.1	Antibiotická rezistence.....	11
3.1.1	Přirozená a získaná rezistence bakterií.....	11
3.1.1.1	Fenotypová rezistence.....	12
3.1.1.2	Genotypová rezistence.....	12
3.1.1.2.1	Horizontální přenos.....	12
3.1.1.2.1.1	Konjugace.....	13
3.1.1.2.1.2	Transformace.....	13
3.1.1.2.1.3	Transdukce.....	13
3.1.1.2.1.4	Transpozice.....	13
3.1.2	Mechanismy rezistence.....	14
3.1.2.1	Změna cílové struktury.....	14
3.1.2.1.1	Ochrana vazebného místa pro ATB.....	15
3.1.2.1.2	Bodová mutace cílového místa.....	15
3.1.2.1.3	Enzymatická změna cílového místa.....	16
3.1.2.1.4	Kompletní nahrazení cílové struktury.....	16
3.1.2.2	Degradace nebo modifikace ATB.....	17
3.1.2.2.1	β-laktamázy.....	17
3.1.2.3	Aktivní eflux.....	19
3.1.2.4	Zhoršená propustnost membrány.....	19
3.1.3	Šíření antibiotické rezistence a ATB politika.....	20
3.2	Deriváty 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu jako antimikrobní látky.....	21
4	Cíl práce.....	23
5	Experimentální část.....	24

5.1	Chemické syntézy a charakteristika	24
5.2	Příprava cílových sloučenin	26
5.2.1	Příprava sulfonamidů	26
5.2.2	Příprava Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu	30
5.2.3	Příprava Schiffových bazí sulfamethazinu	37
5.3	Biologické hodnocení	46
5.3.1	Hodnocení antibakteriální aktivity	46
5.3.2	Hodnocení antifungální aktivity	46
6	Výsledky a diskuse	48
6.1	Chemie	48
6.2	Biologie	49
7	Závěr	53
8	Seznam obrázků	54
9	Seznam tabulek	54
10	Seznam použité literatury	55

1 Seznam použitých zkratek

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
ATB	antibiotika
ATCC	American Type Culture Collection (Americká sbírka typových kultur)
CA	<i>Candida albicans</i>
CAMHB	cation-adjusted Mueller-Hinton broth (kationtově upravený Müller-Hintonův bujón)
CFU	colony forming unit
CK	<i>Candida krusei</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Německá sbírka mikroorganismů)
EC	<i>Escherichia coli</i>
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESBL	extended spectrum β -laktamases (širokospektré β -laktamázy)
EtOAc	ethyl-acetát

EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti)
FLU	flukonazol
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
IR	infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie)
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MGE	mobile genetic elements (mobilní genetické elementy)
MIC	minimal inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	penicillin binding proteins (penicilin-vázající proteiny)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
Tol	toluen
TLC	thin-layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
THF	tetrahydrofuran

2 Úvod

Antimikrobní sloučeniny jsou látky účinkující proti mikrobům. Můžeme je dělit hned podle několika kritérií. Např. podle etiologie je rozdělujeme na antibiotika (ATB) bojující proti bakteriím, antivirotika zaměřená proti virům, antimykotika bojující s houbami, antiprotozoika určená proti prvokům a anthelmintika proti červům.

Objev ATB znamenal velký přelom v léčbě infekčních onemocnění. A právě díky jejich blahodárným účinkům v léčbě nemocí se začala předepisovat možná častěji, než bylo potřeba. Kvůli neznalosti rizik takovéto léčby si s vývojem ATB začaly i bakterie rozvíjet způsoby, jak se těmto léčivům bránit, a začala se rozvíjet rezistence bakterií na ATB neboli tzv. antibiotická rezistence.

Dnes představuje antibiotická rezistence velký problém pro celosvětové zdravotnictví. Tak jako kdysi objevení ATB zachránilo nespočet životů, kvůli antibiotické rezistenci by mohla mortalita na bakteriální onemocnění opět vést žebříček úmrtnosti podle příčiny úmrtí, a proto je žádoucí neustále vyvíjet stále nová léčiva a dělat vše pro alespoň zpomalení šíření antibiotické rezistence.

3 Teoretická část

3.1 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je obecně popsána jako schopnost bakterií přežít v dané koncentraci ATB [1]. Tuto schopnost mají bakterie částečně vrozenou (označované také jako přirozená rezistence bakterií) a částečně získanou, a to jak vlivem nadužívání (hlavně širokospektrých) ATB, tak i vlivem účinnosti ATB na citlivé místo v buňce, čemuž se bakterie snaží bránit [2]. Tímto citlivým místem bakterie může být například syntéza či funkce buněčné stěny, funkce buněčné membrány, řízení syntézy bílkovin anebo syntéza nukleových kyselin uvnitř bakterie [3]. A právě obrana před ATB byla hlavní příčinou, proč bakterie získaly tzv. rezistom. Rezistom je množina genů rozdílného charakteru, které chrání bakterii před danými ATB [2].

3.1.1 Přirozená a získaná rezistence bakterií

Přirozená neboli primární rezistence je vrozená a je dána strukturou buňky určitého druhu bakterií [2]. Přirozeně rezistentní buňce může chybět cílová struktura, na kterou ATB cílí (například rezistence mykoplazem, které nemají buněčnou stěnu, na β -laktamová ATB, jejichž mechanismem účinku je zasažení do syntézy buněčné stěny) [4], nebo například může přirozeně produkovat enzymy, které inaktivují dané ATB (produkce enzymů β -laktamázy, které štěpí β -laktamová ATB). Tento typ rezistence lze předvídat pomocí bližšího určení druhu bakterie a lze se jí vyhnout nasazením ATB se spektrem účinku, na který je daný druh přirozeně citlivý [1], [2].

Získaná neboli sekundární rezistence je daleko nepředvídatelnější a nebezpečnější než primární. Znamená změnu původně citlivé bakterie na částečně či úplně rezistentní a citlivost je pak nutné určit mikrobiologickým vyšetřením. Částečná rezistence je závislá na koncentraci ATB a může způsobit, že původně baktericidní účinek způsobí nyní pouze inhibici růstu [4], [5]. Získanou rezistenci můžeme rozdělit ještě na dva podtypy – fenotypovou a genotypovou rezistenci [1].

3.1.1.1 Fenotypová rezistence

Tento typ rezistence není dědičný a nepojí se se změnou genetické informace, na rozdíl od genotypové rezistence. Při fenotypové rezistenci se bakterie brání tím, že se zbavuje ATB aktivním efluxem (vypuzování ATB z buňky) či uzavírá poriny. Dalším příkladem fenotypové rezistence je tzv. bakteriální perzistence [1]. Jako perzistenci označujeme odolnost na ATB pouze několika bakteriálních buněk v rámci citlivé populace. Na vzniku perzistence se podílí hlavně růstová fáze buňky a vliv prostředí, ve kterém se mikroorganismus nachází [6].

3.1.1.2 Genotypová rezistence

Při genotypové rezistenci se mění genetická výbava bakterie vlivem vnitřní mutace (tento vliv je také někdy označován jako zdroj endogenní rezistence) či přijetím genetické informace zvenčí (způsobuje exogenní rezistenci). Vnitřní mutace může být spontánní anebo indukovaná. Indukovaná mutace je navozena UV zářením či mutageny. Tato změna se týká především genetické informace uložené v nukleoidu bakterie a zařazujeme ji také pod tzv. chromozomální mutace [5]. Nejčastějším způsobem změny genetické informace je ovšem její přijetí zvnějšku, a to ve formě kruhového plazmidu, který nese informaci pro rezistenci [1].

Geny pro rezistenci si bakterie nepředávají pouze vertikálně mezi generacemi, čemuž dopomáhá tzv. selekční tlak, ale i vzájemně v rámci jedné generace, tedy horizontálně [3]. K selekčnímu tlaku dochází zejména při užívání širokospektrých ATB, kdy citlivé populace zahynou, ale rezistentní kmeny přežijí a mohou se dále množit, aniž by je další kmeny omezovaly [5].

3.1.1.2.1 Horizontální přenos

Horizontální přenos je mechanismus založený na převzetí genetického materiálu rekombinačními procesy. Je hnací silou evoluce bakterií a často odpovědný za vývoj rezistence k ATB [7]. Mezi genetický materiál, který takto buňky přenášejí, zařazujeme plazmid nebo transpozon, a mechanismus, kterým informaci předávají, jako konjugace, transformace, transdukce a transpozice [4], [8]. Tyto mechanismy také označujeme jako extrachromozomální rezistence [5].

3.1.1.2.1.1 Konjugace

Konjugace je proces, při kterém přechází plazmidy s geny pro rezistenci, tzv. R-plazmidy, k příjemci pomocí proteinového vlákna, které se mezi dárce a příjemcem vytvoří při vzájemném kontaktu. Přenos pomocí proteinového vlákna, také nazývaného pillus, je považován za hlavní způsob přenos u rezistence mezi mikroby a je jakýmsi sexuálním spojením, při kterém ale nesplývají pohlavní buňky [5], [8]. Tento typ je nejčastěji využíván bakteriemi v nemocničním prostředí [7].

3.1.1.2.1.2 Transformace

Transformace znamená přenos cizorodé deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do buňky z okolí. Přenos probíhá bez přímého kontaktu mezi dárce a příjemcem, ale je pro něj nutná exprese určitých membránových markerů na povrch bakteriální buňky [8].

3.1.1.2.1.3 Transdukce

Přenos genů pomocí bakteriofágu nazýváme transdukce. Bakteriofág je virus, který napadá bakterie. Při infekci může dojít k zabalení bakteriální DNA do kapsidy bakteriofága. Následně se kapsida s bakteriální DNA naváže na buňku příjemce a může infikovat jeho DNA. Transdukce proběhne, pouze pokud je DNA z kapsidy nakombinována do genomu buňky příjemce [9].

3.1.1.2.1.4 Transpozice

Transpozice je přemístění genetické informace z plazmidu do nukleoidu, čímž jsou umožněny další, tentokrát vertikální přenosy. Možný je také přenos z nukleoidové DNA do podoby plazmidu. K těmto přenosům dochází za pomoci dvou mechanismů. Prvním mechanismem je tzv. „cut and paste“, kdy dojde k vyříznutí dané sekvence genu a vložení na jiné místo genomu. Druhým mechanismem je tzv. „copy and paste“ mechanismus, kdy dojde pouze k replikaci dané sekvence a tato zreplikovaná sekvence je poté vložena na jiné místo genomu. Tyto sekvence nazýváme transpozony a jsou schopny vyvolat změny genové exprese či mutace [5], [8].

3.1.2 Mechanismy rezistence

Bakteriální buňky si evolucí vytvořily různé mechanismy, jakými se mohou bránit proti účinku ATB. Tato obrana je hlavním příkladem adaptace a vrcholem evoluce bakterií. Je popsáno několik základních mechanismů rezistence a bakterie je využívají buď samostatně, nebo je kombinují, čímž se stávají rezistentnějšími [5], [7]. Na druhé straně se ukazuje, že některé druhy bakterií preferují některé mechanismy odporu před ostatními. Například u G^- bakterií je rezistence proti ATB na bázi β -laktamů zapříčiněna produkcí β -laktamáz, u G^+ se ovšem v daleko větší míře uplatňuje rezistence pomocí změny cílové struktury. Rozdíl v mechanismu rezistence G^- a G^+ bakterií je pravděpodobně dán jinou stavbou membrány [7].

K inhibici bakteriálního růstu musí ATB nejprve projít buněčnou membránou, některá ATB se musí uvnitř bakterie aktivovat a všechna musí dosáhnout cíle v koncentraci dostatečně vysoké, aby mohla působit. Všechny tyto kroky jsou pro účinek ATB důležité, a proto právě proti těmto krokům vyvíjí bakterie mechanismy na jejich zastavení a tím zneutralizování toxického účinku ATB na bakterii. Například modifikace cíle mohou bakterie dosáhnout hned několika mechanismy, a to mutací cílového místa, náhradou cíle, enzymatickou modifikací cíle nebo jeho ochranou. Snížení koncentrací ATB lze dosáhnout buď zabráněním vstupu ATB, nebo jejich vypuzováním efluxními pumpami ven z buňky. Tyto mechanismy nemění strukturu samotného antibiotika. Existují však mechanismy, které takové změny způsobují, například mutace v enzymu, který původně měl aktivovat proléčivo antibiotika, nebo přítomnost enzymů inaktivujících antibiotika [10].

Aby bylo možné klasifikovat mechanismy antibiotické rezistence, rozdělují se podle biochemických cest podílejících se na rezistenci na čtyři základní skupiny [9]. Jsou to mechanismy, které pomáhají změnit cílovou strukturu, degradují či modifikují ATB bakteriálními enzymy, aktivním efluxem vypuzují ATB ven z buňky a v neposlední řadě zhoršují propustnost membrány pro ATB [11].

3.1.2.1 Změna cílové struktury

Běžnou strategií bakterií je vyhnout se působení ATB zásahem do cílové struktury, na niž se ATB váže. Jeden ze způsobů, jak se lze vyhnout účinku ATB, je

ochrana cílové molekuly, při níž je stericky bráněno navázání ATB na vazebné místo v buňce. Další možností je modifikace cílového místa genovou mutací, enzymatickou modifikací či kompletním nahrazením dané cílové struktury. Těmito mechanismy se bakterie snaží snížit afinitu ATB k cílovému místu [5], [7].

3.1.2.1.1 Ochrana vazebného místa pro ATB

Ačkoliv byly v bakteriálním chromozomu objeveny některé genetické determinanty, které kódují proteiny zapojené do ochrany cílové struktury ATB, většinu klinicky významných genů zapojených do tohoto mechanismu rezistence nesou mobilní genetické elementy (MGE) [7]. Některé z těchto elementů, mezi něž řadíme například bakteriální plazmid, fág, genomové ostrovy nebo integrované konjugativní prvky, má navíc schopnost se reverzibilně či ireverzibilně vložit do chromozomu a způsobit tak intrachromozomálně kódovanou rezistenci [12].

Jedním z klasických příkladů tohoto mechanismu jsou determinanty rezistence na tetracyklin označované jako geny *tet*. Tyto geny působí jako homology elongačních faktorů používaných při syntéze proteinů, které jsou pak schopné vytěsnit ATB tetracyklin z vazebného místa na bakteriálním ribozomu. Kromě toho se také po navázání proteinu změní ribozomální konformace, která zabrání opětovnému navázání tetracyklinu [2], [7].

3.1.2.1.2 Bodová mutace cílového místa

Bodová mutace v genech kódující cílové místo je jedna ze třech možností, jak mohou bakterie modifikovat cílovou strukturu pro ATB. Tento mechanismus je typický například pro rezistenci na ATB rifampicin. Účinek rifampicinu spočívá v navázání léčiva na enzym, který katalyzuje přepis genetické informace z DNA do ribonukleové kyseliny (RNA), tedy enzym DNA-dependentní RNA polymerázu, čímž přeruší transkripci. Pokud ovšem dojde k bodové mutaci v molekule polymerázy, která zapříčiní výměnu aminokyselin v této molekule, dojde ke snížení afinity ATB k jeho cíli, a tedy k rezistenci na toto léčivo, ačkoliv aktivita polymerázy zůstane zachována a transkripce bude moci pokračovat [7]. Mechanismem bodové mutace cílového místa se bakterie mohou bránit nejen proti účinku rifampicinu, ale i např. proti syntetickým bakteriostatickým antibiotikům oxazolidinonům, konkrétněji proti linezolidu, a fluorochinolonům [3], [7].

3.1.2.1.3 Enzymatická změna cílového místa

Další možností je enzymatická modifikace cílového místa, která se nejvíce uplatňuje při rezistenci vůči makrolidům. Dochází k methylaci adeninového zbytku v 23S rRNA ribozomální podjednotky 50S, což způsobí narušení vazby ATB na cílové místo v ribozomu. Methylace je katalyzována enzymy, které jsou kódované geny *erm* (erytromycin ribosomal methylation). Mnohé z těchto genů se nachází v MGE a ovlivňují G^+ , G^- , aerobní i anaerobní bakterie. Pokud se tyto geny exprimují, vzniká zkřížená rezistence na makrolidy a linkosamidy, neboť obě skupiny ATB mají vazebná místa v 23S rRNA ribozomu [7], [13].

3.1.2.1.4 Kompletní nahrazení cílové struktury

Této modifikace dosáhnou bakterie při vyvinutí či nahrazení cíle. Nový cíl má podobnou biochemickou funkci jako původní, ale není inhibován daným ATB. Nejvýznamnějším příkladem je rezistence na β -laktamová ATB v důsledku získání exogenních proteinů vázajících penicilin (PBP). Tyto proteiny jsou na rozdíl od původních PBP rezistentní na vliv některých β -laktamových ATB. Tento mechanismus rezistence lze pozorovat u některých kmenů *Staphylococcus aureus* (SA), označovaných jako methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus hirae* či *Streptococcus pneumoniae* [10], [11], [14].

PBP jsou přirozeně se vyskytující peptidy zodpovídající za transpeptidaci a transglykosylaci peptidoglykanových jednotek vystupujících z cytoplazmy bakterií. Bakterie mohou mít hned několik druhů PBP. Při antimikrobním účinku β -laktamových ATB se molekula léčiva naváže na PBP a zapříčiní inhibici daného cíle, následkem čehož dochází k narušení syntézy buněčné stěny a lýze buněk [7], [14].

SA se proti tomuto účinku brání získáním tzv. *mecA* genu, který kóduje syntézu PBP2a. Tato varianta PBP nedokáže zcela nahradit ostatní druhy PBP, protože neplní funkci transglykosylázy. Proto bakterie potřebuje i jiné nativní PBP, které budou aktivní a které budou zajišťovat plnohodnotnou syntézu buněčné stěny. Získání *mecA* tedy nezpůsobí změnu v expresi nativních PBP, pouze ji doplní o novou variantu PBP2a, která bude mít nízkou afinitu ke všem β -laktamům a způsobí tak ochranu bakterie před antimikrobním působením daných ATB [14].

3.1.2.2 Degradace nebo modifikace ATB

Bakteriálních enzymů, které degradují či modifikují ATB, je mnoho a podle tříd enzymů je dělíme na dvě velké skupiny [15]. První velkou skupinou jsou transferázy, mezi něž řadíme acetyltransferázu, adenosyltransferázu, fosforyltransferázu, thioltransferázu, ADP-ribosyltransferázu a glykosyltransferázu. Tyto enzymy se uplatňují v rezistenci na různá ATB, například acetyltransferáza má vliv na rezistenci vůči chloramfenikolu, thioltransferáza může v některých případech způsobit rezistenci na fosfomycin a glykosyltransferáza či fosforyltransferáza se mohou uplatňovat v rezistenci bakterií na makrolidy či rifamyciny. Nejvýznamnější vliv však mají transferázy na rezistenci při léčbě aminoglykosidy [3], [15]. Transferázy působí přímo v cytoplasmě bakterie a jejich účinek spočívá v připojení části molekuly na dané ATB, čímž ho inaktivují [2].

Druhou skupinou jsou hydrolázy, které štěpí hydrolyticky citlivé chemické vazby v molekule ATB. Do této skupiny řadíme esterázy, které jsou spojené s rezistencí na makrolidy, epoxidázy, které inaktivují epoxidové ATB fosfomycin otevřením reaktivního epoxidového kruhu, a v neposlední řadě β -laktamázy [15].

3.1.2.2.1 β -laktamázy

Enzymy štěpící β -laktamový kruh β -laktamových ATB nazýváme β -laktamázy [2]. Rozeznáváme více jak 200 různých druhů těchto enzymů, které s různou afinitou i rychlostí štěpí různé skupiny β -laktamových ATB [5]. Název jednotlivých β -laktamáz byl odvozen podle skupiny ATB, které štěpí nejrychleji, např. oxacilinázy štěpící oxacilin, cefalosporinázy štěpící cefalosporiny atd. [3].

Spektrum účinku u β -laktamáz je různý. Některé enzymy jsou specifické a účinkují pouze na určité ATB, jiné mají široké spektrum účinku a bakterie se kvůli jejich produkci stává rezistentní na více skupin β -laktamových ATB [3]. Mezi β -laktamázy s širokým spektrem účinku řadíme například tzv. ESBL (neboli β -laktamázy s širokým spektrem účinku), které se objevily až v 70. letech 20. století a které štěpí molekulu nejen penicilinů, ale i cefalosporinů všech generací a monobaktamů, takže hrozí, že pro léčbu vážné infekce už nebude žádné účinné ATB [2].

V současnosti se používají dvě hlavní klasifikační schémata, podle kterých rozdělujeme všechny β -laktamázy. Amblerova klasifikace rozděluje β -laktamázy na odlišné molekulární třídy A, B, C a D podle jejich aminokyselinové sekvence a Bushové-Jacoby-Medeirosovo funkční klasifikační schéma, které rozděluje β -laktamázy podle hydrolyzy substrátu a podle jejich reakce na různé inhibitory na čtyři skupiny a několik hlavních podskupin [16].

Tři skupiny ze čtyř podle Bushové-Jacoby-Medeirosova schématu obsahují serinové β -laktamázy (podobně jako skupiny A, C a D Amblerovy klasifikace), zatímco poslední skupina obsahuje metalo- β -laktamázy (skupina B) [15], [16].

Rozlišení jednotlivých serinových β -laktamáz mezi skupinami pak mimo jiné závisí na různé míře ovlivnění daných β -laktamáz inhibitorem kyselinou klavulanovou [15]. Klasické inhibitory β -laktamáz jsou obecně molekuly příbuzné β -laktamům mající podobnou specifickou strukturu, ale omezenou antibiotickou účinností. Mezi inhibitory řadíme kromě kyseliny klavulanové také sulbaktam nebo tazobaktam. Pokud podáme inhibitory společně s penicilinovými ATB, ATB je chráněno před β -laktamázami a bakterie rezistentní za pomoci tohoto mechanismu se stává citlivou [2].

Podle Amblerovy klasifikace rozlišujeme tedy čtyři třídy. Třída A je nejobsáhlejší ze serinových β -laktamáz a zahrnuje penicilinázy, ESBL a ostatní do jiných skupin nezařaditelné β -laktamázy. Skupina B jako jediná obsahuje metalo- β -laktamázy a nachází se zde tedy karbapenemázy, do skupiny C řadíme β -laktamázy typu AmpC, které udělují rezistenci hlavně proti většině cefalosporinům a cefamycinům, a skupina D obsahuje enzymy typu OXA. OXA enzymy byly tradičně klasifikovány jako oxacilin-hydrolyzující β -laktamázy, dnes mezi tyto enzymy řadíme širokou skupinu enzymů vykazující variabilitu ve svých substrátech. β -laktamázy z jednotlivých tříd mohou účinně štěpit i jiné substráty, např. AmpC štěpí v malé míře i molekuly penicilinů a monobaktamů, proto není zařazení jednoduché [16].

Rezistence navozená pomocí produkce β -laktamáz je využívána G^+ i G^- bakteriemi, avšak G^- bakterie tento mechanismus využívají daleko častěji. Oproti G^+ bakteriím, které musí po degradaci molekuly ATB vypustit degradační produkty

do okolí, mají G^- bakterie výhodu v podobě periplazmatického prostoru, kam míří degradační produkty molekuly ATB [3], [5].

3.1.2.3 Aktivní eflux

Dalším z mechanismů antibiotické rezistence je aktivní vypuzování ATB efluxními pumpami. ATB se pak nedostává ke své cílové struktuře uvnitř bakterie a přestává být pro bakterii toxickým [3]. První zprávy o efluxních systémech pocházejí z druhé poloviny 20. století a mezi nimi je i popis aktivního pumpování tetracyklinu z cytoplazmy střevní bakterie *Escherichia coli* (EC). Dnes je systém efluxních pump jako základ rezistence popsán u mnoha G^+ i G^- bakterií [7], [17]. Mezi ATB ztrácející svou účinnost kvůli tomuto mechanismu rezistence bakterií pak řadíme například tetracykliny, chinolony, makrolidová ATB či aminoglykosidy [3], [17].

Efluxní systémy mohou být buď substrátově specifické, takže exportují z buňky pouze konkrétní molekulu ATB, nebo širokospektrální, kdy exportují z buňky strukturálně odlišné molekuly ATB [17]. Geny kódující efluxní systémy mohou být umístěny v MGE nebo v chromozomu, což vysvětluje i inherentní rezistenci některých bakteriálních druhů vůči konkrétnímu ATB [7].

3.1.2.4 Zhoršená propustnost membrány

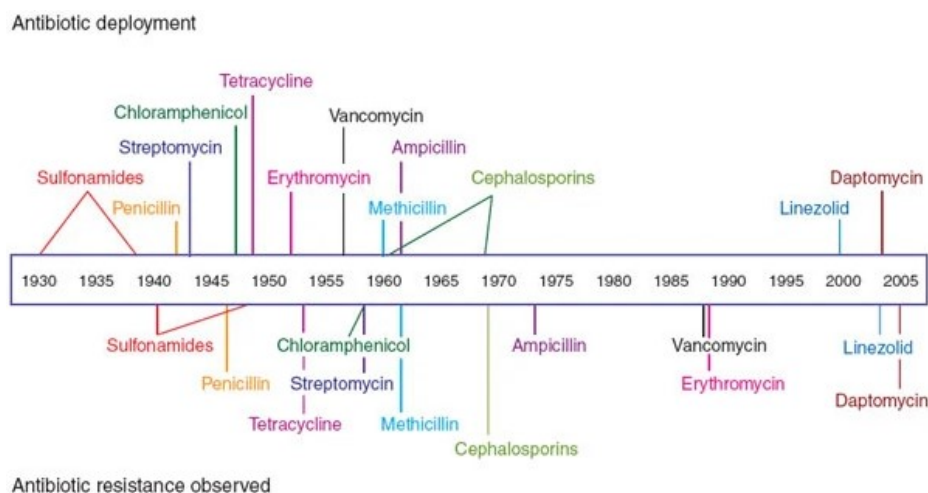
S ohledem na stavbu buněčné stěny mají G^- bakterie výhodu před G^+ , protože kromě vnitřní cytoplazmatické membrány a vrstvy peptidoglykanu obsahují také vnější membránu, která dokáže zabránit v průniku menším toxickým látkám [17]. Příkladem takové látky, která dokáže proniknout do buňky G^+ , ale neprojde přes vnější membránu G^- patogenů, je glykopeptidové ATB vankomycin [7].

Pro regulaci propustnosti membrány využívají bakterie svoje vnější systémy cytoplazmatické membrány, především vnější membránu, proto je tento mechanismus rezistence důležitý především pro G^- bakterie. Teoreticky by bakterie mohla měnit i fluiditu membrány, čímž by se přímo úměrně měnila i propustnost. Ovšem jejím snížením by nesnížila pouze propustnost, ale zároveň by změnila i strukturu a aktivitu některých membránových struktur, proto tento systém bakterie nevyužívají [17].

Vhodnějšími systémy, kterými lze regulovat permeabilitu vnější membrány, jsou poriny, hydrofilní kanály, kterými do buňky proudí voda a v ní rozpuštěné malé molekuly [17], [18]. Klasickými příklady porinem zprostředkované rezistence jsou tři hlavní poriny produkované *E. coli* (OmpF, OmpC a PhoE) a porin OprD produkovaný *Pseudomonas aeruginosa* (PA) [7]. Příčinou rezistence může být početní či funkční změna porinů [18]. Samotné snížení propustnosti zajistí bakterii pouze malou ochranu proti tetracyklinům či fluorochinolonům, a proto se často tento mechanismus pojí s jiným mechanismem rezistence, například se zvýšenou aktivitou efluxních pump, a zajistí tím tak bakterii vysokou úroveň rezistence například proti karbapenemům [7], [18].

3.1.3 Šíření antibiotické rezistence a ATB politika

Vývoj ATB rezistence koreluje s vývojem a zavedením ATB do praxe (Obr. 1) [19]. Například penicilin byl poprvé objeven v roce 1929 a na lidech použit v roce 1941. V roce 1940 byl vydán článek o schopnosti EC inaktivovat penicilin za pomoci přirozené produkce penicilináz a šíření rezistence pak bylo doloženo již v roce 1942, kdy byly objeveny rezistentní kmeny SA u hospitalizovaných pacientů. Během následujících pěti let se penicilin-rezistentní kmeny SA rozšířily z nemocnic do komunity [20].



Obr. 1 Zavedení jednotlivých ATB do praxe a počátek přenosu rezistence na daná ATB

Převzato z: A. E. Clatworthy, E. Pierson, and D. T. Hung, "Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy," *Nature Chemical Biology*, vol. 3, no. 9, Sep. 2007, doi: 10.1038/nchembio.2007.24.

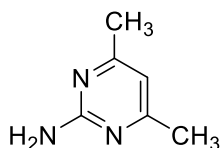
Antibiotická rezistence je v dnešním světě velký problém. Vzniká kombinací mnoha příčin: svévolným užíváním ATB, nedodrženým dávkováním, preskripcí širokospektrých ATB zvyšujících selekční tlak, přítomností ATB v krmivech, čímž se dostávají do zemědělských produktů a vytvářejí sub-inhibiční koncentrace, uvolňováním ATB do okolí v důsledku špatné likvidace léčivých přípravků či nekontrolovaným prodejem ATB bez lékařského předpisu v některých zemích [5]. Dochází tak k vývinu i multirezistentních kmenů, které jsou rezistentní minimálně ke třem nepříbuzným ATB. Počet těchto kmenů v současnosti strmě roste, a proto se začíná mluvit o počátku postantibiotické éry [3].

Prohlubování ATB rezistenci je úzce spjato s epidemiologickou situací, která se na různých kontinentech a v různých zemích liší, a proto je nezbytné, aby si každá země formulovala vlastní zásady antibiotické politiky, kterými alespoň zpomalí vývoj rezistence [21, 22]. Mezi tyto zásady patří využívání potenciálu v minulosti již používaných léčiv, cílené a kontrolované využití současných léčiv a v neposlední řadě vývoj nových antibiotik [21]. I přes všechny snahy odborníků se však nedaří rezistentní mikroby eliminovat, a proto Světová zdravotnická organizace deklarovala ATB rezistenci jako globální problém. To dokazují i předpovědi odborníků, kteří odhadují, že v roce 2050 by mohly rezistentní kmeny bakterií zabít až 100 miliónů lidí [5].

3.2 Deriváty 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu jako antimikrobní látky

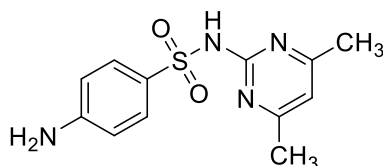
Jednou ze struktur, která se často vyskytuje v antimikrobních látkách, je 4,6-dimethylpyrimidin-2-amin (Obr. 2). Biologická aktivita jeho derivátů byla potvrzena hned na několika řadách sloučenin, u nichž byl 4,6-dimethylpyrimidin-2-amin výchozí látkou pro tvorbu Schiffových bazí [22]–[26]. K jejich přípravě byly použity substituované benzaldehydy, resp. salicylaldehydy, například 5-bromsalicylaldehyd [25], 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd [26] nebo 5-nitrosalicylaldehyd [22]. Většina bazí byla poté využita jako ligand pro tvorbu komplexů s kationty přechodných prvků, nejčastěji Cu^{2+} a Zn^{2+} , dále pak s Ni^{2+} a Co^{3+} , čímž se látky staly lipofilnějšími, tedy lépe prostupnými přes biologické membrány [22], [24]–[26].

Biologická aktivita proti G^+ , G^- i houbám byla otestována pro samotné ligandy i jejich komplexy [22], [24]–[26]. Při porovnání aktivit pak byl zpravidla účinnější komplex, a to právě díky větší lipofilitě. Aktivita komplexů byla srovnatelná s běžně používanými antibiotiky či antimykotiky, např. tetracyklinem a flukonazolem (FLU) [25], [26].



Obr. 2 Vzorec 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu

Sulfamethazin (Obr. 3), někdy také nazývaný jako sulfadimidin, také obsahuje ve své struktuře 4,6-dimethylpyrimidin-2-amin. Tento derivát se svou strukturou zařazuje do skupiny 4-aminobenzensulfonamidů s antimikrobními účinky a podobně jako jiné monosubstituované a disubstituované sulfonamidy (např. sulfadiazin, sulfamerazin či sulfamethoxydiazin) se používá při léčbě některých akutních bakteriálních infekcí, např. meningitidy, a to zejména u pacientů alergických na peniciliny [27]. Používá se zejména v rozvojových zemích. Jeho Schiffovy baze vykázaly také antimikrobní účinky [28], [29].



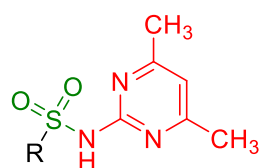
Obr. 3 Vzorec sulfamethazinu

4 Cíl práce

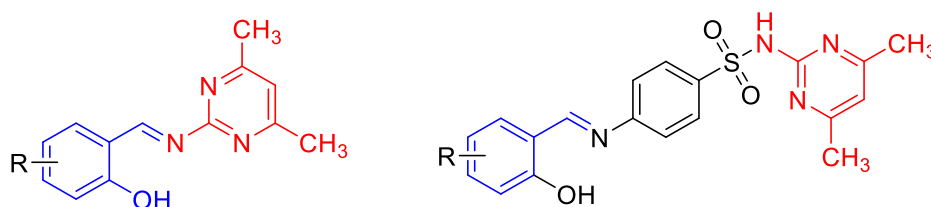
Cílem bakalářské práce je shrnout problematiku antibiotické rezistence, popsat způsob šíření, její mechanismy a snahu odborníků rezistentní kmeny eliminovat.

V praktické části se pak práce věnuje syntéze třinácti nových sloučenin vycházejících z 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu či jeho derivátu sulfamethazinu. Ve třech případech je cílem vytvořit sulfonamidy (Obr. 4), a to reakcí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu s příslušnými sulfonylchloridy. U deseti reakcí pak probíhá reakce výchozí molekuly s deriváty benzaldehydů za vzniku Schiffových bazí (Obr. 5). Benzaldehydy jsou vybrány tak, aby na cílových molekulách mohl být zkoumán vliv volné hydroxylové skupiny a různých druhů a počtu atomů halogenů na antimikrobní účinnost. Studována je také odlišnost mezi Schiffovými bázemi odvozenými od 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu a jeho sulfonamidovým derivátem sulfamethazinem. 4,6-Dimethylpyrimidin-2-amin i příslušné aldehydy byly vybrány na základě dříve popsané antimikrobní aktivity jejich či jim podobných derivátů a očekáváme tedy u nich biologickou aktivitu.

Všechny připravené sloučeniny budou charakterizovány, bude ověřena jejich čistota a otestována jejich biologická aktivita vůči bakteriím a patogenním houbám.



Obr. 4 Design cílových sulfonamidů



Obr. 5 Design cílových Schiffových bazí

5 Experimentální část

5.1 Chemické syntézy a charakteristika

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Merck (Darmstadt, Německo), VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění, pouze *n*-hexan byl purifikován destilací.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla nejprve použita soustava ethyl-acetát/hexan 4:1 (v/v), avšak pro velmi nízké retenční faktory byla nahrazena soustavou toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 (v/v). U některých látek byla chromatografická destička vyvinuta ještě podruhé, tentokrát v soustavě dichlormethan/methanol/hexan v poměru 4:1:1 (v/v). Detekce byla prováděna UV lampou (UV Lamp 4, Camag, Muttenz, Švýcarsko) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře v přístroji Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švýcarsko) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

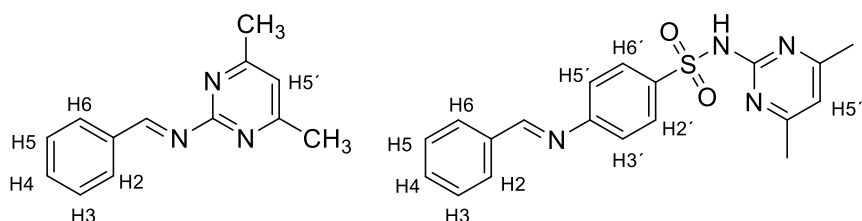
NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc., a PharmDr. Janou Křoustkovou, Ph.D. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}D_6$), chloroform (CDCl_3) a tetrahydrofuran ($\text{THF-}D_8$). Hodnoty chemického

posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (DMSO- D_6 při $\delta = 39,5$ ppm, $CDCl_3$ 77,9 ppm, THF- D_8 při $\delta = 25,31$ a 67,21 ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Jednotlivé vodíky v připravovaných sloučeninách byly pro jednoznačnost interpretace NMR spekter očíslovány (Obr. 6).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Vypočtené i změřené hodnoty jsou udány v procentech.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

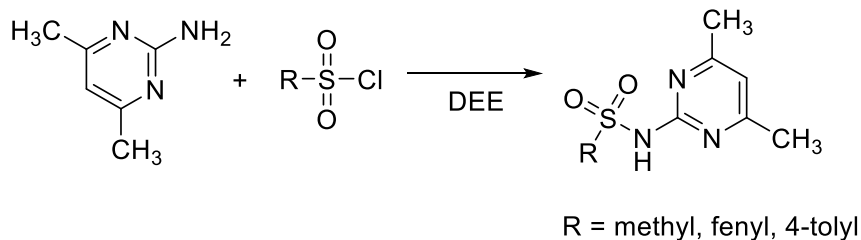
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie a teploty tání a elementární analýzy.



Obr. 6 Číslování vodíků pro interpretaci NMR spekter

5.2 Příprava cílových sloučenin

5.2.1 Příprava sulfonamidů



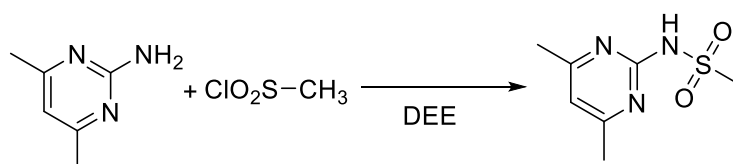
Obr. 7 Reakční schéma přípravy sulfonamidů ze sulfonylchloridů

Obecný pracovní postup:

0,001 mol 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (123,2 mg) bylo rozpuštěno v 10 ml diethyletheru (DEE), zchlazeno pomocí ledové lázně a následně bylo postupně přidáno 1,3 ekvivalentu příslušného sulfonylchloridu. Po 15 minutách bylo chlazení odstraněno a reakční směs byla míchána po dobu 12 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla zahušťena na vakuové odparce ke krystalizaci a ponechána krystalizovat 24 hodin při -20 °C. Vzniklé krystaly byly odsáty a vysušeny.

Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

N-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)methansulfonamid (JS-1) [30]



Sumární vzorec:	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ S
Relativní molekulová hmotnost:	201,24
Popis:	Hnědé krystaly
Výtěžek:	48 %
Teplota tání:	244 °C (taje za rozkladu)
R _f :	0,09 (EtOAc/hexan 4:1)

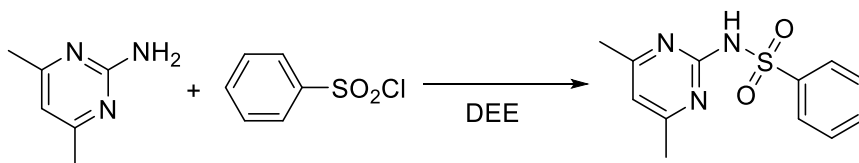
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 11.23 (s, 1H, SO₂NH), 6.74 (s, 1H, H5), 2.99 (s, 3H, CH₃), 2.27 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 168.74, 164.90, 117.96, 43.11, 22.70.

IR [cm⁻¹]: 3275 (N-H), 3102, 1699, 1661, 1633, 1334, 1225, 1152, 1034, 952, 769, 661, 627, 613, 607.

Elementární analýza: teorie: C 41.78, H 5.51, N 20.88; nalezeno: C 41.81, H 5.48, N 20.89.

N-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid (JS-2)



Sumární vzorec:	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂ S
Relativní molekulová hmotnost:	263,32
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	13 %
Teplota tání:	187-188,8 °C (lit. 168-170 °C) [31]
R _f :	0,02 (Tol/EtOAc 4:1)

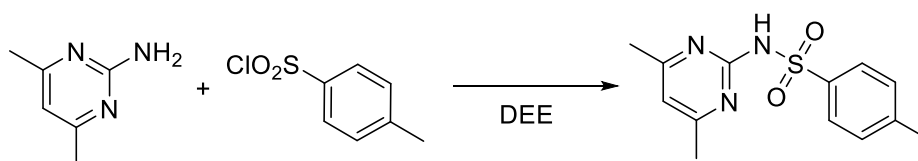
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.51 (s, 1H, SO₂NH), 7.60-7.53 (m, 3H, H₂, H₄, H₆), 7.49 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H₃, H₅), 6.66 (s, 1H, H_{5'}), 2.38 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.70, 156.28, 139.74, 133.03, 128.64, 128.20, 115.02, 23.42.

IR [cm⁻¹]: 3324 (N-H), 3152, 2701, 1670, 1626, 1530, 1464, 1453, 1444, 1413, 1326, 1215, 1186, 1170, 1154, 1126, 1032, 1015, 999, 929, 903, 793, 760, 750, 728, 694, 663, 607.

Elementární analýza: teorie: C 54.74, H 4.98, N 15.96; nalezeno: C 54.70, H 5.00, N 15.94.

***N*-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)-4-methylbenzensulfonamid (JS-3)**



Pracovní postup byl modifikován následovně. 0,001 mol 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (123,2 mg) bylo rozpuštěno v 15 ml DEE, ochlazené pomocí ledové lázně a následně bylo postupně přidáno 1,3 ekvivalentu 4-methylbenzensulfonyl chloridu. Po 15 minutách bylo chlazení odstraněno a reakční směs byla míchána po dobu 12 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla zahuštěna na rotační vakuové odparce. Reakční směs poté byla naředěna dichlormethanem (DCM) a zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a přenesena do dělicí nálevky. Organická fáze byla oddělena a vodná fáze se ještě třikrát extrahovala pomocí DCM. Organické extrakty se spojily, vysušily stáním nad Na₂SO₄, po filtraci bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Směs rozpuštěna v MeOH a ponechána krystalizovat 24 hodin při -20 °C. Vzniklé krystaly byly odsáty a vysušeny.

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
Relativní molekulová hmotnost:	277,34
Popis:	bílá krystalická látka
Výtěžek:	23 %
Teplota tání:	141-144 °C (lit. 187-189 °C) [32]
R _f :	0,82 (Tol/EtOAc 4:1)

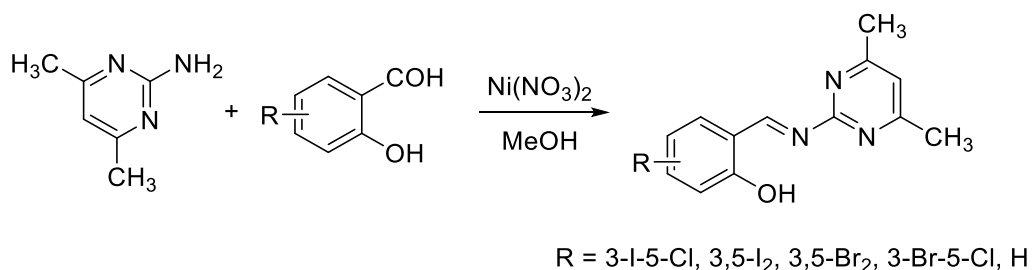
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.42 (s, 1H, SO₂NH), 7.70 – 7.67 (m, 2H, H2, H6), 7.44 – 7.40 (m, 2H, H3, H5), 6.71 (s, 1H, H5'), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.65, 164.97, 141.70, 141.12, 129.35, 125.68, 115.25, 23.10, 21.01.

IR [cm⁻¹]: 3412, 3308 (N-H), 3194, 3012, 2923, 1660, 1622, 1595, 1567, 1464, 1390, 1229, 1159, 1121, 1029, 1007, 953, 815, 793, 681, 633.

Elementární analýza: teorie: C 56.30, H 5.45, N 15.15; nalezeno: C 56.34, H 5.48, N 15.16.

5.2.2 Příprava Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu



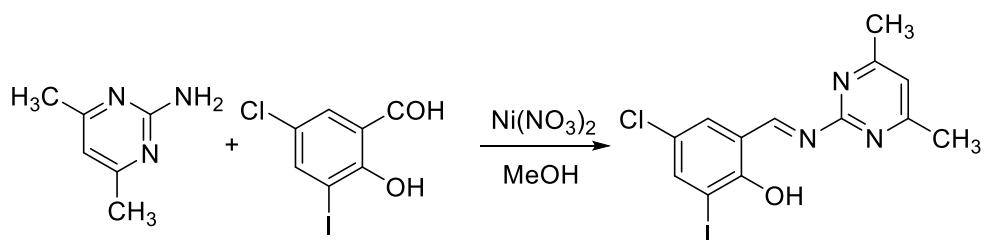
Obr. 8 Reakční schéma přípravy Schiffových bazí z 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu

Obecný pracovní postup:

0,001 mol 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (123,2 mg) bylo rozpuštěno v 7 ml MeOH, za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (0,0011 mol) příslušného salicylaldehydu a následně katalytické množství hexahydrátu dusičnanu nikelnatého (5 mol. %; 14,5 mg). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Vzniklý precipitát byl zfiltrován, promyt malým množstvím methanolu a vysušen.

Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

4-Chlor-2-[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl}-6-jodfenol (JS-4)



Sumární vzorec:	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClIN}_3\text{O}$
Relativní molekulová hmotnost:	387,61
Popis:	oranžová krystalická látka
Výtěžek:	39 %
Teplota tání:	217 °C (taje za rozkladu)
R _f :	0,73 (Tol/EtOAc 4:1)

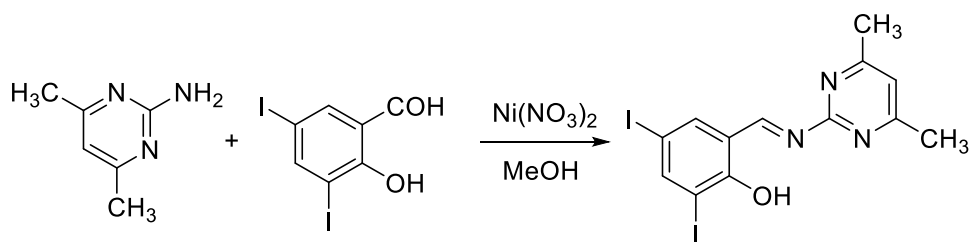
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, THF) δ 14.78 (s, 1H, OH), 9.34 (s, 1H, CH=N), 7.88 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H6), 7.60 (s, 1H, H3), 7.03 (s, 1H, H5'), 2.45 (s, 6H, CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, THF) δ 168.83, 164.77, 163.75, 161.16, 143.11, 132.71, 122.83, 117.96, 117.58, 88.55, 22.77.

IR [cm^{-1}]: 2924, 1607, 1593, 1527, 1423, 1370, 1341, 1323, 1293, 1207, 1159, 1135, 1055, 859, 844, 768, 743, 647, 640, 614.

Elementární analýza: teorie: C 40.28, H 2.86, N 10.84; nalezeno: C 40.32, H 2.84, N 10.80.

2-[[[4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]-4,6-dijodfenol (JS-5)



Sumární vzorec:	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}$
Relativní molekulová hmotnost:	479,06
Popis:	tmavě oranžová krystalická látka
Výtěžek:	82 %
Teplota tání:	205,3 °C (taje za rozkladu)
R_f :	0,53 (Tol/EtOAc 4:1)

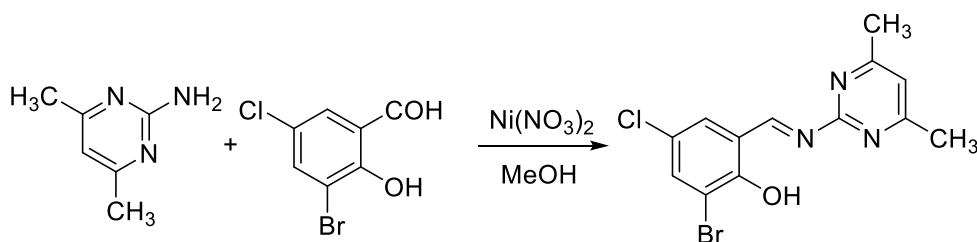
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, THF) δ 9.40 (s, 1H, CH=N), 8.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 7.97 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H3), 7.10 (s, 1H, H5'), 2.49 (s, 6H, CH₃).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, THF) δ 168.77, 164.69, 164.49, 160.87, 150.71, 142.32, 119.28, 117.96, 89.74, 78.10, 22.75.

IR [cm^{-1}]: 3383, 3182, 1603, 1593, 1528, 1425, 1368, 1340, 1324, 1292, 1282, 1214, 1155, 1136, 1057, 1032, 863, 817, 744, 706, 665, 640, 608.

Elementární analýza: teorie: C 32.59, H 2.31, N 8.77; nalezeno: C 32.62, H 2.34, N 8.79.

2-Brom-4-chlor-2-[[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]fenol (JS-10)



Sumární vzorec:	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrClN}_3\text{O}$
Relativní molekulová hmotnost:	340,61
Popis:	tmavě oranžová krystalická látka
Výtěžek:	50 %
Teplota tání:	180,5 °C (taje za rozkladu)
R_f :	0,82 (Tol/EtOAc 4:1)

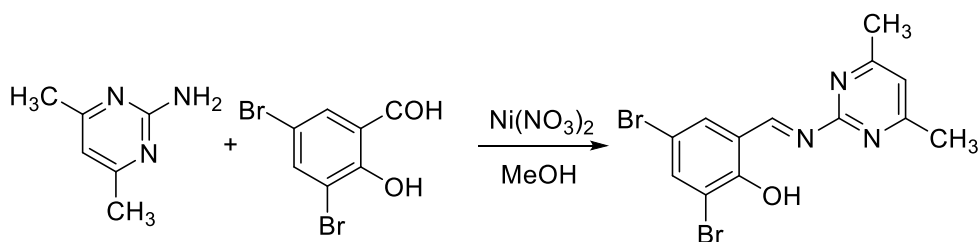
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, THF) δ 14.64 (s, 1H, OH), 9.46 (s, 1H, CH=N), 7.88 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H6), 7.68 (s, 1H, H3), 7.06 (s, 1H, H5'), 2.42 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, THF) δ 168.80, 165.12, 161.12, 160.57, 136.14, 131.34, 130.04, 122.33, 120.51, 115.43, 22.79.

IR [cm^{-1}]: 3398, 3191, 3062, 1625, 1591, 1533, 1432, 1404, 1388, 1315, 1203, 1134, 1038, 854, 829, 797, 749, 707, 646, 620.

Elementární analýza: teorie: C 45.84, H 3.26, N 12.34; nalezeno: C 45.84, H 3.29, N 12.33.

2,4-Dibrom-2-[[[4,6-dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]fenol (JS-11)



Sumární vzorec:	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}$
Relativní molekulová hmotnost:	385,06
Popis:	tmavě oranžová krystalická látka
Výtěžek:	70 %
Teplota tání:	217 °C (taje za rozkladu)
R_f :	0,84 (Tol/EtOAc 4:1)

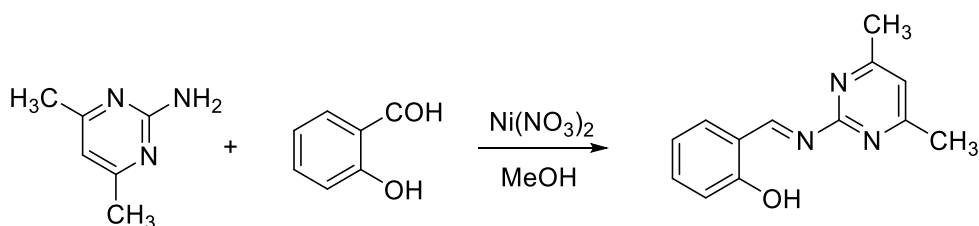
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 14.94 (s, 1H, OH), 9.46 (s, 1H, CH=N), 8.01 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H6), 7.94 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H3), 7.13 (s, 1H, H5'), 2.21 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 168.65, 164.98, 160.97, 161.07, 138.00, 131.11, 122.06, 120.97, 116.48, 115.66, 23.13.

IR [cm^{-1}]: 3055, 1624, 1600, 1531, 1494, 1427, 1371, 1315, 1203, 1158, 1133, 1031, 887, 852, 826, 759, 689, 648, 634, 612.

Elementární analýza: teorie: C 40.55, H 2.88, N 10.91; nalezeno: C 40.55, H 2.91, N 10.90.

2-[[[4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl]imino]methyl]fenol (JS-12)



Při použití obecného postupu se většina vzniklého precipitátu rozpustila při promývání v methanolu, proto byl tento methanolvý roztok na vakuové odparce odpařen do sucha. Odparek byl suspendován v nadbytku demineralizované vody pro odstranění Ni(NO₃)₂, postupně se ale rozpustil, proto byla reakční směs opět odpařena do sucha. Odparek byl suspendován v DEE, následně byla suspenze zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno do sucha.

Vzhledem k nízkému výtěžku byla příprava opakována s využitím jiného postupu (metoda 2). 0,002 mol 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (246,4 mg) bylo rozpuštěno v 7 ml MeOH, za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 0,003 mol salicylaldehydu a následně katalytické množství 4-toluensulfonové kyseliny (jako monohydrát; 10 mol. %; 38,0 mg). Reakční směs byla míchána za teploty varu rozpouštědla po dobu 24 hodin. Poté ponechána zchladnout při laboratorní teplotě a nechána krystalizovat přes noc při teplotě -20°C. Vzniklý precipitát byl zfiltrován a vysušen.

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O
Relativní molekulová hmotnost:	227,27
Popis:	žlutá krystalická látka
Výtěžek metoda 1:	38 %
Výtěžek metoda 2:	23 %
Teplota tání:	219,3 °C (taje za rozkladu)
R _f :	0,02 (Tol/EtOAc 4:1); 0,55 (Tol/EtOAc 4:1, následně v DCM/MeOH/hexan 4:1:1)

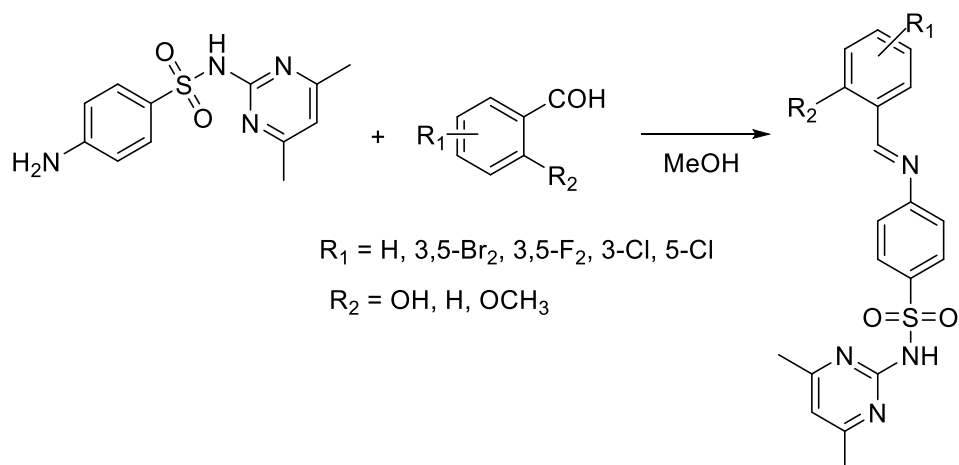
¹H NMR (600 MHz, THF) δ 7.49 (s, 1H, CH=N), 7.41 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H, H6), 7.13 (ddd, $J = 8.6, 7.1, 1.6$ Hz, 1H, H4), 6.87 (td, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H, H5), 6.75 (td, $J = 8.6, 1.2$ Hz, 1H, H3), 6.53 (s, 1H, H5'), 2.29 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, THF) δ 168.06, 163.47, 158.06, 152.39, 130.33, 128.86, 120.78, 120.67, 116.66, 111.91, 24.85.

IR [cm⁻¹]: 3310, 3182, 2792, 1642, 1595, 1529, 1464, 1454, 1413, 1366, 1326, 1181, 1154, 1129, 1034, 1009, 928, 903, 793, 759, 749, 729, 664, 621.

Elementární analýza: teorie: C 68.70, H 5.77, N 18.49; nalezeno: C 68.68, H 5.74, N 18.48.

5.2.3 Příprava Schiffových bazí sulfamethazinu



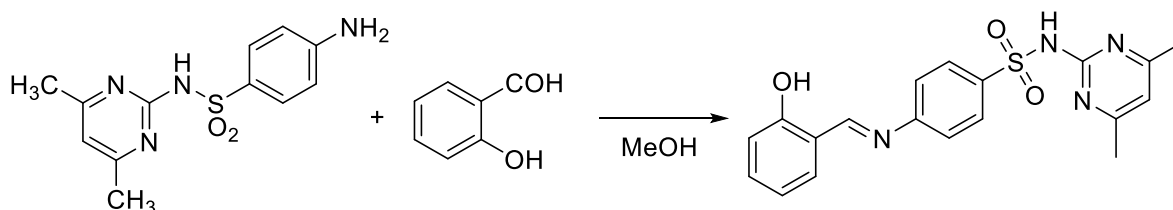
Obr. 9 Reakční schéma přípravy Schiffových bazí sulfamethazinu

Obecný pracovní postup:

0,001 mol sulfamethazinu (278,3 mg) bylo rozpuštěno v 10 ml horkého MeOH a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (0,0011 mol) příslušného benzaldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout volně na vzduchu a následně ponechána 24 hodin míchat při laboratorní teplotě. Vzniklý precipitát byl zfiltrován, promyt malým množstvím methanolu, vysušen a krystalizován v případě potřeby z methanolu.

Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

***N*-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)-4-[(2-hydroxybenzyliden)amino]benzensulfonamid
(JS-6)**



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	382,44
Popis:	světle žluté krystaly
Výtěžek:	96 %
Teplota tání:	161-164 °C (lit. 174 °C) [33]
R _f :	0,13 (Tol/EtOAc 4:1)

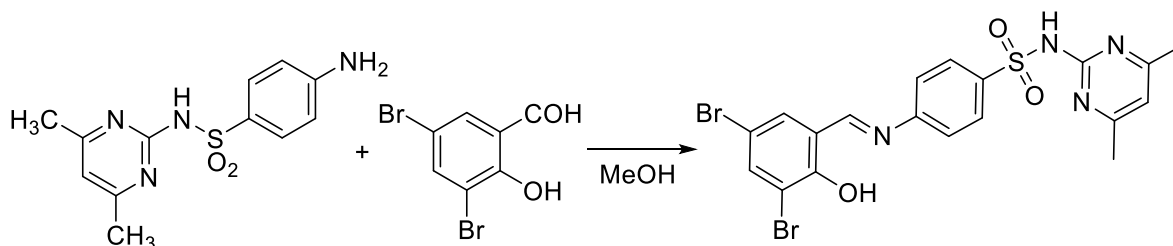
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.54 (s, 1H, OH), 11.76 (s, 1H, SO₂NH), 8.93 (s, 1H, CH=N), 8.03 – 7.99 (m, 2H, H2', H6'), 7.65 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H6), 7.51 – 7.47 (m, 2H, H3', H5'), 7.42 – 7.39 (m, 1H, H4), 6.97 – 6.93 (m, 2H, H3, H5), 6.72 (s, 1H, H5''), 2.23 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 165.67, 160.81, 156.63, 152.30, 134.48, 133.10, 130.73, 130.05, 129.73, 121.81, 119.89, 119.86, 117.25, 112.37, 23.39.

IR [cm⁻¹]: 3061, 1618, 1591, 1569, 1559, 1375, 1269, 1156, 1150, 1086, 869, 856, 842, 758, 638, 631, 623, 619, 602.

Elementární analýza: teorie: C 59.67, H 4.74, N 14.65; nalezeno: C 59.63, H 4.75, N 14.67.

4-[(3,5-Dibrom-2-hydroxybenzyliden)amino]-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid (JS-7)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₁₆ Br ₂ N ₄ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	540,23
Popis:	zářivě oranžová krystalická látka
Výtěžek:	72 %
Teplota tání:	205,3-205,7 °C (lit. 203 °C) [34]
R _f :	0,90 (DCM/MeOH/hexan 4:1:1)

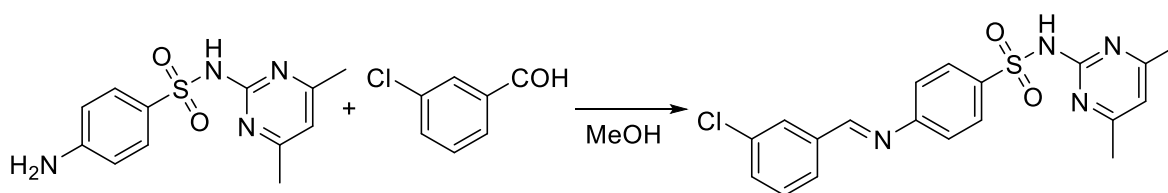
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 14.03 (s, 1H, OH), 11.87 (s, 1H, SO₂NH), 8.97 (s, 1H, CH=N), 8.05 – 8.02 (m, 2H, H2', H6'), 7.93 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H6), 7.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H3), 7.58 – 7.55 (m, 2H, H3', H5'), 6.72 (s, 1H, H5''), 2.22 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 164.86, 157.56, 156.54, 150.03, 138.54, 135.13, 130.09, 122.10, 122.05, 121.44, 112.08, 110.30, 106.68, 23.35.

IR [cm⁻¹]: 3177, 1598, 1583, 1551, 1442, 1347, 1322, 1165, 1151, 1088, 1074, 975, 879, 865, 858, 644, 787, 690, 642, 628.

Elementární analýza: teorie: C 42.24, H 2.92, N 10.37; nalezeno: C 42.25, H 2.90, N 10.40.

4-[(3-Chlorbenzyliden)amino]-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid (JS-8)



Tato Schiffova base byla připravena dle obecného postupu s odlišností při krystalizaci, kdy byla reakční směs ponechána krystalizovat při teplotě -20°C . Krystaly vzniklé při krystalizaci při -20°C za laboratorní teploty během filtrace roztály, proto byly smyty do matečného louhu. Ten byl odpařen do sucha a odparek následně suspendován ve směsi MeOH s DEE. K precipitaci produktu však nedošlo, proto byl roztok opět odpařen do sucha. Vzniklá olejovitá látka byla pomocí THF přenesena do vialky a rozpouštědlo bylo odpařeno a látka byla uchována při -20°C .

Sumární vzorec:	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$
Relativní molekulová hmotnost:	400,88
Popis:	světle žlutá „semisolid“ látka
Výtěžek:	92 %
Teplota tání:	---
R _f :	0,11 (Tol/EtOAc 4:1)

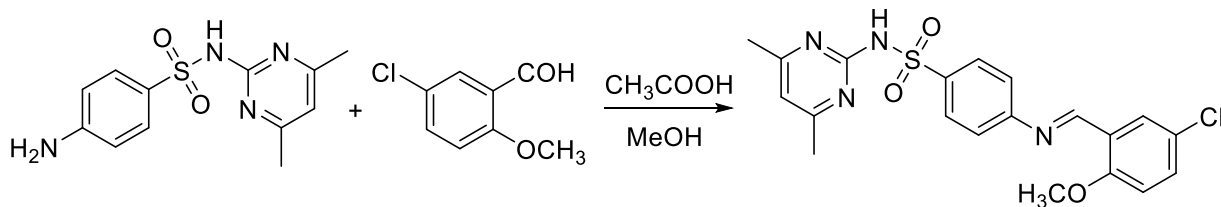
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 11.71 (s, 1H, SO_2NH), 8.60 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.03 – 7.99 (m, 2H, $\text{H}2'$, $\text{H}6'$), 7.94 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $\text{H}2$), 7.87 – 7.83 (m, 1H, $\text{H}6$), 7.61 – 7.57 (m, 2H, $\text{H}3'$, $\text{H}5'$), 7.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, $\text{H}5$), 7.36 – 7.33 (m, 1H, $\text{H}4$), 6.70 (s, 1H, $\text{H}5''$), 2.22 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 169.83, 167.46, 155.83, 146.18, 138.58, 136.53, 131.31, 130.83, 128.11, 127.18, 126.92, 121.32, 120.47, 112.37, 25.66.

IR [cm^{-1}]: 3371, 3076, 1595, 1553, 1434, 1347, 1318, 1152, 1082, 977, 863, 830, 788, 681, 632, 617.

Elementární analýza: teorie: C 56.93, H 4.27, N 13.98; nalezeno: C 56.93, H 4.30, N 14.01.

4-[(5-Chlor-2-methoxybenzyliden)amino]-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid (JS-9)



Sloučenina byla připravena podle obecného postupu s rozdílem ve využití kyseliny octové jako katalyzátoru a odlišnou izolací a purifikací. K reakční směsi 0,001 mol sulfamethazinu (278,3 mg) rozpuštěném v 10 ml horkého MeOH a 0,0011 mol 5-chlor-2-methoxybenzaldehydu (187,7 mg) byly přidány 2 kapky kyseliny octové. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout volně na vzduchu, následně ponechána 24 hodin míchat při laboratorní teplotě a dále krystalizovat při teplotě -20°C. Reakční směs byla poté odpařena do sucha a odparek byl následně třikrát promyt DEE. Zbytek byl suspendován v 0,1M HCl a suspenze byla ponechána stát při laboratorní teplotě 24 hodin. Poté byla směs zfiltrována a výsledné krystaly byly vysušeny.

Sumární vzorec:	C ₂₀ H ₁₉ ClN ₄ O ₃ S
Relativní molekulová hmotnost:	430,91
Popis:	tmavě žlutá krystalická látka
Výtěžek:	13 %
Teplota tání:	163,2-163,5 °C
R _f :	0,04 (Tol/EtOAc 4:1); 0,49 (Tol/EtOAc 4:1, následně v DCM/MeOH/hexan 4:1:1)

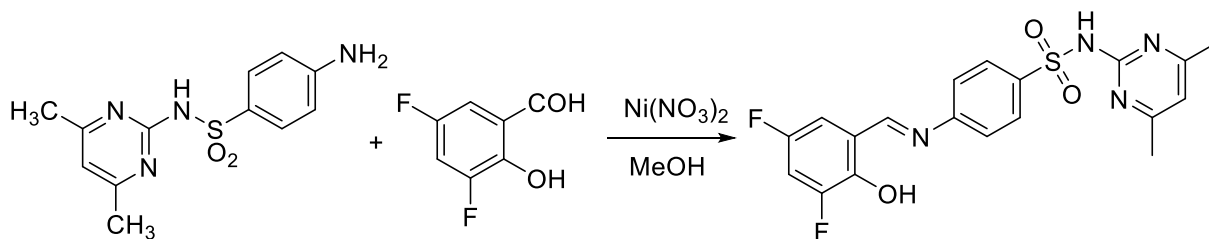
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 11.80 (s, 1H, SO₂NH), 8.88 (s, 1H, CH=N), 7.82 – 7.75 (m, 3H, H₆, H₂′, H₆′), 7.72 – 7.68 (m, 2H, H₃′, H₅′), 7.52 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H, H₄), 7.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H₃), 6.74 (s, 1H, H₅′′), 3.85 (s, 3H, CH₃), 2.25 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, THF) δ 167.40, 166.93, 157.39, 155.51, 152.89, 132.22, 130.84, 130.44, 127.78, 125.59, 120.11, 113.16, 111.90, 55.18, 22.65.

IR [cm⁻¹]: 3376, 1594, 1553, 1486, 1434, 1345, 1313, 1151, 1090, 862, 827, 788, 674, 637.

Elementární analýza: teorie: C 55.75, H 4.44, N 13.00; nalezeno: C 55.74, H 4.47, N 12.98.

4-[(3,5-Difluor-2-hydroxybenzyliden)amino]-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzensulfonamid (JS-13)



Sloučenina byla připravena analogicky jako Schiffovy baze 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu. 0,001 mol sulfamethazinu (278,3 mg) bylo rozpuštěno po zahřátí v 10 ml MeOH, za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (0,0011 mol; 173,9 mg) 3,5-difluorsalicylaldehydu a následně katalytické množství hexahydrátu dusičnanu nikelnatého (5 mol. %; 14,5 mg). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Vzniklý precipitát byl zfiltrován, promyt malým množstvím methanolu a vysušen.

Sumární vzorec:	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$
Relativní molekulová hmotnost:	418,42
Popis:	oranžová krystalická látka
Výtěžek:	72 %
Teplota tání:	209-210 °C
R _f :	0,04 (Tol/EtOAc 4:1); 0,58 (Tol/EtOAc 4:1, následně v DCM/MeOH/hexan 4:1:1)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 12.53 (s, 1H, OH), 11.86 (s, 1H, SO_2NH), 8.93 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8.05 – 8.01 (m, 2H, H_2' , H_6'), 7.52 – 7.45 (m, 3H, H_6 , H_3' , H_5'), 7.38 (ddd, $J = 8.8, 3.2, 1.7$ Hz, 1H, H_4), 6.71 (s, 1H, H_5''), 2.22 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) δ 167.85, 163.85, 156.59, 154.10 (d, $J = 237.4, 11.0$ Hz), 151.66, 150.97 (dd, $J = 245.8, 12.2$ Hz), 145.64 (d, $J = 13.1$ Hz), 139.81, 130.06, 121.88, 121.50 (dd, $J = 9.0, 4.6$ Hz), 112.78 (dd, $J = 23.6, 3.6$ Hz), 109.40 – 108.98 (m, 2C), 23.28.

IR [cm⁻¹]: 3078, 2999, 2879, 1627, 1589, 1472, 1435, 1385, 1297, 1260, 1139, 1121, 1078, 992, 964, 851, 833, 776, 694, 649, 614.

Elementární analýza: teorie: C 54.54, H 3.85, N 13.39; nalezeno: C 54.57, H 3.87, N 13.42.

5.3 Biologické hodnocení

5.3.1 Hodnocení antibakteriální aktivity

In vitro antibakteriální aktivita byla stanovena vůči čtyřem kmenům G⁺ a čtyřem kmenům G⁻ bakterií: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATC 29213, CCM 223, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* (SE) ATCC 12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212, CCM 4224; *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954, *Klebsiella pneumoniae* (KP) ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* (ACI) ATCC 19606, DSM 30007, a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955.

Ke stanovení antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardu EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) v Müller-Hintonově bujónu č. 2 (CAMHB). Velikost inokula byla 0.5 podle McFarlandovy stupnice (1.5×10^8 CFU/ml), pH bylo upraveno na hodnotu 7.0 (± 0.2). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby finální koncentrace byly v rozmezí 0,49-500 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty MIC (znamenající úplnou inhibici viditelného růstu bakterií) byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 ± 2 °C [29].

MIC je definována jako minimálně 95% redukce růstu bakterií ve srovnání s kontrolou. Inhibice růstu byla stanovena vizuální metodou, případně pomocí indikátoru Alamar Blue. Jako referenční léčivo pro srovnání byl zvolen výchozí sulfonamid sulfamethazin.

Antibakteriální aktivita byla stanovena pod vedením paní Idy Dufkové na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.3.2 Hodnocení antifungální aktivity

In vitro antifungální aktivita byla testována na osmi kmenech patogenních hub, z nichž čtyři byly kmeny kvasinek: *Candida albicans* (CA) ATCC 24433, CCM 8320,

Candida tropicalis (CT) ATCC 750, CCM 8264156, *Candida krusei* (CK) ATCC 6258, CCM 8271, *Candida parapsilosis* (CP) ATCC 22019, CCM 8260; a čtyři kmeny vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* (AF) ATCC 204305, *Aspergillus flavus* (AFla) CCM 8363305, *Absidia corymbifera* (AC) CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* (TI) ATCC 9533, CCM 8377.

Ke stanovení antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardů EUCAST v médiu RPMI 1640 s glutaminem a 2% glukózou (KlinLab, Praha, Česká republika) pufovaném 0,165M 3-morfolinpropan-1-sulfonovou kyselinou (Merck, Darmstadt, Německo) na pH 7,0. Finální velikost inokula byla $0,5-2 \times 10^5$ CFU/ml. Velikost inokula byla zkontrolována pomocí Bürkerovy komůrky. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby finální koncentrace byly v rozmezí 0,49-500 $\mu\text{mol/l}$. MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 ± 2 °C, pouze v případě *Trichophyton interdigitale* byly výsledky odečteny po 72 a 120 hod [35].

Hodnoty MIC znamenající úplnou inhibici růstu hub byly stanoveny vizuálně, případně pomocí indikátoru Alamar Blue. Triazolové antimykotikum FLU bylo použito jako referenční látka. V jeho případě MIC znamená IC_{50} , tj. koncentraci, které způsobila 50% růstovou inhibici ve srovnání s kontrolou bez léčiva [36].

Antifungální aktivita byla stanovena pod vedením paní Idy Dufkové na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

6 Výsledky a diskuse

6.1 Chemie

Cílem bakalářské práce byla syntéza a antimikrobní zhodnocení třinácti sloučenin vycházejících z 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu, z nichž pět látek (JS-1, JS-2, JS-3, JS-6, JS-7) již bylo dříve popsáno, ale nebyla u nich zkoumána antimikrobní aktivita, a osm sloučenin (JS-4, JS-5, JS-8, JS-9, JS-10, JS-11, JS-12, JS-13) bylo originálních. Jako výchozí látka byla zvolena buď samotná molekula 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu, která nemá antimikrobní aktivitu, anebo sulfamethazin, který jeví velmi nízkou aktivitu v inhibici bakteriálních kmenů SA a MRSA (500 $\mu\text{mol/l}$) [28].

Jednokrokovými reakcemi byly postupně připraveny tři sulfonamidy (JS-1, JS-2, JS-3) a deset Schiffových bazí (JS-4, JS-5, JS-6, JS-7, JS-8, JS-9, JS-10, JS-11, JS-12, JS-13). Syntéza sulfonamidů s kódem JS-1 a JS-2 probíhala bez úprav podle pilotní metody. Příprava sulfonamidu s kódem JS-3 se odlišovala od pilotní reakce, a to především ve fázi přidání DCM a zředění HCl k reakční směsi, převedení produktu z vodné fáze do organické fáze a následné izolace z organické fáze. Všechny reakce pro přípravu sulfonamidů proběhly s výtěžky mezi 13-48 % a vzniklé krystaly byly dostatečně čisté.

Výtěžky Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidinu-2-aminu (JS-4, JS-5, JS-10, JS-11, JS-12) se pohybovaly v rozmezí 38-82 % a produkty vznikaly s dostatečnou čistotou pro antimikrobní testy. Pracovní postup musel být upravován u látky s kódem JS-12, kdy byla většina vzniklého precipitátu se rozpustila při promývání MeOH a byla tak „spláchnuta“ do filtrátu. Filtrát byl tedy odpařen do sucha a pro odstranění $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ byl odparek suspendován v nadbytku demineralizované H_2O . Produkt se opět rozpustil, a proto byla reakční směs opět odpařena do sucha, suspendována v DEE, zfiltrována a filtrát odpařen do sucha. Pro nízký výtěžek byla reakce zopakována s využitím druhé (dvojnásobné množství reaktantů, jiný katalyzátor a vzniklý precipitát nebyl promýván MeOH), avšak výtěžek byl ještě o 15 % nižší. Upravena byla také syntéza látky s kódem JS-5, kdy byl nejprve využit pracovní postup s kyselinou octovou jako kyselým katalyzátorem. Tímto postupem jsme však získali jen velmi malý výtěžek

(4 %), způsobený nejspíše špatnou volbou katalyzátoru, proto byla syntéza zopakována, tentokrát podle obecného postupu s využitím hexahydrátu dusičnanu nikelnatého jako katalyzátoru [37].

Nejvyšší výtěžky (72–96 %) s dostatečnou čistotou vzniklých sloučenin byly obecně zaznamenány při syntézách bazí sulfamethazinu se salicylaldehydy u látek s kódem JS-6, JS-7 a JS-13, kdy výtěžek 96 % u JS-6 byl nejvyšším z připravovaných látek. Při přípravě látky JS-13 byl využit katalyzátor, hexahydrát dusičnanu nikelnatého, avšak velikost výtěžku dosahovala průměru.

Výtěžky z reakcí benzaldehydů bez volné hydroxylové skupiny byly 92 % a 13 % a při reakcích musela být upravována izolace a purifikace výsledných látek (JS-8, JS-9). Výsledné sloučeniny totiž tvořily krystaly při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, avšak při laboratorní teplotě krystaly tály. Po předchozích pokusech byla JS-8 izolována opařením rozpouštědla a krystalizována opět při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, čímž vznikla pevná látka. Jedná se tedy o polotuhou, „semisolid“ konzistenci. Schiffova baze JS-9 se lišila již v pracovním postupu, kdy do reakční směsi byly přidány 2 kapky kyseliny octové pro katalýzu reakce. Pro izolaci produktu JS-9 byla reakční směs odpařena do sucha, odparek promýván postupně třikrát DEE a 0,1M HCl, ale získaný produkt byl silně znečištěn aldehydem (podle TLC zhruba ze 20 %), a proto byly rekrystalizován z MeOH. Kyselina octová jako katalyzátor opět nepřinesla očekávaný výsledek a výtěžek 13 % byl jedním z nejnižších ze všech připravených sloučenin a nejnižší z připravených Schiffových bazí.

6.2 Biologie

U všech nově nasyntetizovaných látek byla pomocí mikrodiluční bujónové metody otestována antibakteriální a antifungální aktivita. Výsledky antimikrobního testování můžeme vidět v následujících tabulkách (Tabulka 1 a Tabulka 2).

Z výsledků je patrné, že antibakteriální aktivitu (Tabulka 1) vykazovaly jen některé látky (JS-4, JS-5, JS-7, JS-10, JS-11), a to hlavně vůči G^+ bakteriím, zejména stafylokokům. Nejvyšší antibakteriální aktivitu ($\geq 15,6\text{ }\mu\text{mol/l}$) z připravených látek projevil diiodovaný derivát JS-5. Vysokou antibakteriální aktivitu (od $31,3\text{ }\mu\text{mol/l}$) také prokázaly deriváty vzniklé reakcí 3,5-dibromsalicylaldehydu (JS-7, JS-11). Účinné byly i iminy získané ze salicylaldehydu disubstituovaného různými atomy halogenu, pokud

alespoň jeden z nich byl jod (JS-4) či brom (JS-10). V těchto sloučeninách pak vyšší antibakteriální aktivitu projevila látka s přítomností jodu (JS-4).

Námi připravené sulfonamidy, tedy látky pod kódy JS-1, JS-2 a JS-3, antibakteriální aktivitu neprojevily. Necitlivé byly bakterie také vůči látkám JS-6 a JS-12, kdy v molekule salicylaldehydu nebyl navázán žádný atom halogenu, Schiffovým bazím bez volné hydroxylové skupiny, tedy látkám JS-8 (bez přítomnosti hydroxylové skupiny) a JS-9 (hydroxylová skupina zablokována methylem), a vůči difluorované molekule JS-13. Lze také porovnat aktivitu Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (JS-11 a JS-12) s odpovídajícími deriváty sulfamethazinu (JS-7 a JS-6), které vznikly reakcí se stejným salicylaldehydem. U látek JS-6 a JS-12 byl k reakci využit salicylaldehyd a jak již bylo zmíněno dříve, bakterie jsou vůči těmto látkám bez přítomnosti halogenu necitlivé. Mezi látkami vzniklými reakcí 3,5-dibromsalicylaldehydu (JS-7 a JS-11) je určitá odlišnost, kdy látka s výchozí molekulou sulfamethazinu (JS-7) jeví vyšší antibakteriální účinnost. Při porovnání antibakteriální aktivity nově připravených sloučenin s výchozími sloučeninami (neaktivním 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminem a velice málo aktivním sulfamethazinem) byly účinnější pouze Schiffovy baze, které ve své struktuře obsahovaly atomy halogenů jodu či bromu a volnou hydroxylovou skupinu.

KMEN (KÓD)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol/l)					
		sulfonamidy, JS-6, JS-8, JS-9, JS-12, JS-13	JS-4	JS-5	JS-7	JS-10	JS-11
SA	24 h	>500	125	15,62	31,25	125	31,25
	48 h	>500	125	62,5	62,5	250	62,5
MRSA	24 h	>500	125	31,25	125	500	500
	48 h	>500	125	62,5	125	500	500
SE	24 h	>500	125	31,25	62,5	125	250
	48 h	>500	125	125	250	250	500
EF	24 h	>500	>125	125	250	>500	>500
	48 h	>500	>125	250	500	>500	>500
EC	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>125	>250	500	>500	>500
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
PA	24 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500
	48 h	>500	>125	>250	>500	>500	>500

Tabulka 1 Výsledky antibakteriální aktivity

Obecně látky vykazovaly vyšší antifungální aktivitu (Tabulka 2) než antibakteriální. Nejvíce citlivé byly kvasinky a plíseň *Trichophyton interdigitale*. Nejvyšší antifungální aktivitu (3,9 μmol/l) projevila opět diiodovaná molekula JS-5. V porovnání s antibakteriální aktivitou zde o nižší hodnotě MIC rozhodoval spíše typ přítomného atomu halogenu. Druhou nejvyšší aktivitu (15,6 μmol/l) tak projevila sloučenina s atomem jodu (JS-4). Jako antifungální látky také lze označit molekuly s alespoň jedním atomem bromu (JS-7, JS-10, JS-11), kdy počet atomů tohoto halogenu ve sloučenině je téměř nezávislý na velikosti hodnoty MIC (pouze malý benefit vykazuje přítomnost dvou atomů bromu u sloučenin JS-7 a JS-11, a to ve srovnání s náhradou jedno z nich chlorem u látky JS-10). Velmi nízkou antifungální účinnost projevila i difluorovaná sloučenina (JS-13; MIC ≥125 μmol/l). Podobně jako při antibakteriálních testech, sulfonamidy (JS-1, JS-2, JS-3) a Schiffovy baze bez volné

hydroxylové skupiny (JS-8, JS-9) či bez přítomnosti halogenu v molekule (JS-6, JS-12) antifungální aktivitu neprojevily. V tabulce můžeme opět porovnat hodnoty MIC Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu (JS-11 a JS-12) s odpovídajícími Schiffovými bazemi sulfamethazinu (JS-7 a JS-6). Při antifungálních testech pozorujeme ještě menší vliv výchozího derivátu 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu na její aktivitu, avšak stále je sloučenina sulfamethazinu JS-7 u některých patogenních hub účinnější než odpovídající Schiffova base 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu JS-11. Při srovnání aktivit sloučenin s antimykotikem FLU je jejich antifungální účinek proti některým druhům patogenních hub (např. proti CK či TI) dokonce vyšší.

KMEN (KÓD)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l)								
		sulfonamidy, JS-8, JS-12	JS-6, JS-9	JS-4	JS-5	JS-7	JS-10	JS-11	JS-13	FLU
CA	24 h	>500	>125	15,62	3,9	31,25	31,25	31,25	500	6,5
	48 h	>500	>125	15,62	7,81	31,25	62,5	31,25	500	6,5
CK	24 h	>500	>125	31,25	15,62	62,5	62,5	62,5	500	>104,5
	48 h	>500	>125	31,25	31,25	62,5	125	62,5	>500	>104,5
CP	24 h	>500	>125	31,25	15,62	62,5	125	62,5	500	3,3
	48 h	>500	>125	62,5	31,25	62,5	125	125	500	3,3
CT	24 h	>500	>125	31,25	7,81	62,5	125	62,5	500	6,5
	48 h	>500	>125	62,5	15,62	62,5	125	62,5	>500	6,5
AF	24 h	>500	>125	125	31,25	250	500	125	500	>104,5
	48 h	>500	>125	125	125	250	500	>125	500	>104,5
AFla	24 h	>500	>125	>125	62,5	500	500	>125	>500	>104,5
	48 h	>500	>125	>125	250	500	500	>125	>500	>104,5
AC	24 h	>500	>125	>125	250	500	500	>125	>500	>104,5
	48 h	>500	>125	>125	>250	500	500	>125	>500	>104,5
TI	72 h	>500	>125	15,62	7,81	31,25	31,25	15,62	125	52,2
	120 h	>500	>125	15,62	15,62	31,25	62,5	31,25	125	52,2

Tabulka 2 Výsledky antifungální aktivity

7 Závěr

Antibiotická rezistence je globální problém, který se neustále prohlubuje, a to nejen kvůli mnoha mechanismům rezistence, které bakteriím pomáhají přežít. Jedním z příslibů částečné zvládnutí situace je vývoj stále nových léčiv, na které jsou mikroby citlivé.

V rámci této práce bylo připraveno celkem třináct sloučenin odvozených od 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu. Tři z těchto syntéz vedly ke vzniku sulfonamidů a zbylých deset se zaměřilo na reakci 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu či sulfamethazinu s chlorovanými benzaldehydy, salicylaldehydem či 3,5-dihalogenovanými salicylaldehydy. Tyto reakce vedly ke vzniku Schiffových bazí. Vybrané aldehydy byly zvoleny na základě předchozí antimikrobní aktivity a kombinovány tak, aby bylo možné studovat důležitost volné hydroxylové skupiny a různých typů halogenů pro antimikrobní aktivitu. Všechny sloučeniny byly připraveny v dostatečném výtěžku i čistotě pro antibakteriální a antifungální testy.

Antimikrobní účinnost z připravených sloučenin projevily pouze Schiffovy baze s volnou hydroxylovou skupinou a přítomným halogenem (především jodem či bromem) ve své struktuře. Tyto Schiffovy baze byly porovnány s antimikrobní aktivitou výchozích molekul, kdy připravené sloučeniny obecně projevily vyšší aktivitu. Aktivita Schiffových bazí 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu v porovnání s analogickými Schiffovými bazemi sulfamethazinu, které vznikly reakcí se stejným derivátem salicylaldehydu, je podobná, avšak na inhibici některých mikrobů účinkuje lépe výsledný derivát sulfamethazinu.

8 Seznam obrázků

Obr. 1 Zavedení jednotlivých ATB do praxe a počátek přenosu rezistence na daná ATB	20
Obr. 2 Vzorec 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu.....	22
Obr. 3 Vzorec sulfamethazinu.....	22
Obr. 4 Design cílových sulfonamidů	23
Obr. 5 Design cílových Schiffových bazí.....	23
Obr. 6 Číslování vodíků pro interpretaci NMR spekter.....	25
Obr. 7 Reakční schéma přípravy sulfonamidů ze sulfonylchloridů.....	26
Obr. 8 Reakční schéma přípravy Schiffových bazí z 4,6-dimethylpyrimidin-2-aminu	30
Obr. 9 Reakční schéma přípravy Schiffových bazí sulfamethazinu	37

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 Výsledky antibakteriální aktivity	51
Tabulka 2 Výsledky antifungální aktivity	52

10 Seznam použité literatury

- [1] E. Krejčí, "Vzrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie," *Medicína pro praxi*, vol. 17, no. 1, pp. 8–12, 2020.
- [2] Schindler, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.*
- [3] Hurych, Jakub a Roman Štícha. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.*
- [4] M. Kolář, D. Rejman, and J. Bardoň, *Zásady antibiotické léčby*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. doi: 10.5507/lf.20.24457406.
- [5] O. Jand'ourek, "Prednaska-4-Rezistence-k-ATB-2020-2021-s-komentari [online]. Hradec Králové, 2021 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KBLV/?path=mikrobiologie%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky&page=2>," Mar. 13, 2021. <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KBLV/?path=mikrobiologie%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky&page=2> (accessed Nov. 30, 2021).
- [6] Melter, Oto. *Bakteriální perzistence vůči antibiotikům. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2021. ISBN 978-80-246-4918-4.*
- [7] J. M. Munita and C. A. Arias, "Mechanisms of Antibiotic Resistance," *Microbiology Spectrum*, vol. 4, pp. 481–511, no. 2, Mar. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [8] V. Benco and P. Šíma, "Antibiotická rezistence a význam horizontálního přenosu genetické informace.," *Praktický lékař*, vol. 98, no. 5, pp. 195–199, 2018.
- [9] N. A. Lerminiaux and A. D. S. Cameron, "Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 65, no. 1, pp. 34–44, Jan. 2019, doi: 10.1139/cjm-2018-0275.

- [10] J. L. Martinez, "General principles of antibiotic resistance in bacteria," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 11, pp. 33–39, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001.
- [11] A. H. Holmes *et al.*, "Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance," *The Lancet*, vol. 387, no. 10014, pp. 176–187, Jan. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- [12] M. Brown-Jaque, W. Calero-Cáceres, and M. Muniesa, "Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements," *Plasmid*, vol. 79, pp. 1–7, May 2015, doi: 10.1016/j.plasmid.2015.01.001.
- [13] R. Leclercq, "Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 34, no. 4, pp. 482–492, Feb. 2002, doi: 10.1086/324626.
- [14] A. Zapun, C. Contreras-Martel, and T. Vernet, "Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2, pp. 361–385, Mar. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.
- [15] G. Wright, "Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 10, pp. 1451–1470, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002.
- [16] K. Bush and P. A. Bradford, "Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, no. 5, pp. 295–306, May 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0159-8.
- [17] G. Cox and G. D. Wright, "Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 303, no. 6–7, pp. 287–292, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- [18] A. H. Delcour, "Outer membrane permeability and antibiotic resistance," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, vol. 1794, no. 5, pp. 808–816, May 2009, doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

- [19] A. E. Clatworthy, E. Pierson, and D. T. Hung, "Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy," *Nature Chemical Biology*, vol. 3, no. 9, Sep. 2007, doi: 10.1038/nchembio.2007.24.
- [20] M. Lobanovska and G. Pilla, "Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?," *Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 90, no. 1, pp. 135–145, 2017.
- [21] O. Nyč, "Novinky a trendy v antibiotické léčbě," *Interní medicína pro praxi*, vol. 19, no. 3, pp. 142–144, Jul. 2017, doi: 10.36290/int.2017.050.
- [22] N. Revathi, M. Sankarganesh, J. Rajesh, and J. D. Raja, "Biologically Active Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) Complexes of Pyrimidine Derivative Schiff Base: DNA Binding, Antioxidant, Antibacterial and In Vitro Anticancer Studies," *Journal of Fluorescence*, vol. 27, no. 5, pp. 1801–1814, Sep. 2017, doi: 10.1007/s10895-017-2118-y.
- [23] A. Iqbal, H. L. Siddiqui, C. M. Ashraf, M. H. Bukhari, and C. M. Akram, "Synthesis, Spectroscopic and Cytotoxic Studies of Biologically Active New Schiff Bases Derived from *p*-Nitrobenzaldehyde," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 55, no. 7, pp. 1070–1072, 2007, doi: 10.1248/cpb.55.1070.
- [24] H. Abu Ali and B. Jabali, "Synthesis, characterization and biological activity of novel complexes of zinc(II) diclofenac with nitrogen based ligands," *Polyhedron*, vol. 107, pp. 97–106, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.poly.2016.01.010.
- [25] M. T. Basha, R. M. Alghanmi, M. R. Shehata, and L. H. Abdel-Rahman, "Synthesis, structural characterization, DFT calculations, biological investigation, molecular docking and DNA binding of Co(II), Ni(II) and Cu(II) nanosized Schiff base complexes bearing pyrimidine moiety," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1183, pp. 298–312, May 2019, doi: 10.1016/j.molstruc.2019.02.001.
- [26] P. A. Jose, M. Sankarganesh, J. D. Raja, and G. S. Senthilkumar, "Synthesis of methoxy substituted pyrimidine derivative imine stabilized copper nanoparticles in organic phase and its biological evaluation," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 305, p. 112821, May 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.112821.

- [27] V. Sharma, N. Chitranshi, and A. K. Agarwal, "Significance and Biological Importance of Pyrimidine in the Microbial World," *International Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 2014, pp. 1–31, Mar. 2014, doi: 10.1155/2014/202784.
- [28] M. Krátký, J. Vinšová, M. Volková, V. Buchta, F. Trejtnar, and J. Stolaříková, "Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 50, pp. 433–440, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.01.060.
- [29] M. Krátký *et al.*, "Sulfonamide-salicylaldehyde imines active against methicillin- and trimethoprim/sulfonamide-resistant *Staphylococci*," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 22, pp. 1945–1962, Nov. 2021, doi: 10.4155/fmc-2021-0169.
- [30] D. Achard *et al.*, "Pharmaceutical compositions containing azetidine derivatives, novel azetidine derivatives and their preparation," US20010798452 20010302, 2002
- [31] S. Mukhopadhyay and S. Batra, "Direct Transformation of Arylamines to Aryl Halides via Sodium Nitrite and *N*-Halosuccinimide," *Chemistry – A European Journal*, vol. 24, no. 55, pp. 14622–14626, Oct. 2018, doi: 10.1002/chem.201803347.
- [32] A. N. Dobonravov, V. L. Dubina, and N. V. Svistun, "SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ISOMERIC *N*-ARYLSULFONYL-*N*-NITROGUANIDINES," *Journal of Organic Chemistry USSR*, vol. 25, no. 3.1, pp. 480–483, 1989.
- [33] C. G. Butler and P. H. B. Ingle, "The Reaction of Aromatic Aldehydes with Pharmaceutical Amino Compounds. Part I," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 6, no. 1, pp. 806–815, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.2042-7158.1954.tb11019.x.
- [34] T. Tsukamoto and K. Yuhi, "Studies on Halogenosalicylaldehyde. I," *YAKUGAKU ZASSHI*, vol. 78, no. 7, pp. 706–709, 1958, doi: 10.1248/yakushi1947.78.7_706.

- [35] M. Krátký and J. Vinšová, "Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid," *Molecules*, vol. 17, no. 8, pp. 9426–9442, Aug. 2012, doi: 10.3390/molecules17089426.
- [36] M. Krátký, K. Konečná, K. Brokešová, J. Maixnerová, F. Trejtnar, J. Vinšová, "Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 159, p. 105732, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105732.
- [37] A. Mobinikhaledi, N. Forughifar, and M. Kalhor, "An efficient synthesis of Schiff bases containing benzimidazole moiety catalyzed by transition metal nitrates," *Turkish Journal of Chemistry*, vol. 34, pp. 367–373, 2010.