

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**Příprava a studium potenciálních antimikrobních
sloučenin**

Diplomová práce

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

Konzultant diplomové práce: Mgr. Enikő Šikorová

Hradec Králové 2024

Bc. Anežka Pokorná

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 6. 4. 2024

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali při tvorbě diplomové práce. A to mému vedoucímu diplomové práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za důkladné vedení a rady během psaní diplomové práce. Dále mé konzultantce, Mgr. Enikő Šikorové, za cenné rady při praktické části syntézy v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli s měřením biologických aktivit, a to paní Idě Dufkové, paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. a panu PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D.

Tato práce byla podpořena z prostředků projektů Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NW24-05-00549.

Abstrakt

Jednou z možností, jak zmírnit celosvětový problém antibiotické rezistence, je mimo jiné i syntéza a vývoj nových antimikrobních látek. Všechny látky připravené v rámci této práce vychází z molekuly 4-amino-1-benzylpiperidinu nebo jeho izomeru 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu. Výchozí molekula byla zvolena na základě aktivity zjištěné v předešlých pracích. Pomocí třinácti jednokrokových syntéz byly připraveny iminy, a to reakcí výchozí molekuly aminu s příslušným aldehydem. Dvě další syntézy vedly ke vzniku amidů reakcí výchozí molekuly s příslušnou salicylovou kyselinou. Výtěžky reakcí se pohybovaly u iminů v rozmezí 26-97 % a u amidů byly výtěžky 25 a 39 %. Všechny látky byly připraveny v dostatečném množství a čistotě potřebné pro stanovení biologické aktivity.

U všech patnácti sloučenin byla testována antibakteriální aktivita proti klinicky významným Gram-pozitivním i Gram-negativním kmenům. Dále byly otestovány na jejich antifungální aktivitu, antimykobakteriální aktivitu a byla testována i jejich schopnost inhibovat enzymy acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Z výsledků testování je patrné, že amidy byly antimikrobně neúčinné, ale některé iminy vykazovaly velmi dobré výsledky. Obecně byly látky více aktivní proti patogenním houbám, ale diiodované a dichlorované iminy vykazovaly i dobrou aktivitu vůči Gram-pozitivním kmenům bakterií. Nejnižší MIC (minimální inhibiční koncentrace) u bakterií (15,62 $\mu\text{mol/l}$) i hub (1,95 $\mu\text{mol/l}$) vykazoval (*E*)-2,4-dijod-6-({[4-(piperidin-1-ylmethyl)fenyl]imino}methyl)fenol.

Největší selektivitu k enzymu acetylcholinesteráza vykazoval (*E*)-2,4-dichlor-6-({[4-(piperidin-1-ylmethyl)fenyl]imino}methyl)fenol ($\text{IC}_{50} = 0,60 \mu\text{mol/l}$ a $\text{SI} = 0,06$) a (*E*)-1-(3-nitrofenyl)-*N*-{[4-(piperidin-1-yl)methyl]fenyl}methanimin ($\text{IC}_{50} = 0,23 \mu\text{mol/l}$ a $\text{SI} = 0,02$). SI značí index selektivity, určen výpočtem AChE/BChE . Nejvíce selektivní k butyrylcholinesteráze z připravených sloučenin byl (*E*)-2-({[1-benzylpiperidin-4-yl]imino}methyl)-4,6-dijodfenol ($\text{IC}_{50} = 18,33 \mu\text{mol/l}$ a $\text{SI} = 1,33$).

Klíčová slova

Antimikrobní léčiva, 4-amino-1-benzylpiperidin, enzymová inhibice, cholinesterázy, methicilin-rezistentní stafylokoky, nové sloučeniny, rezistence, salicylová kyselina, syntéza

Abstract

One of the ways to alleviate the global problem of antibiotic resistance is, among other things, the synthesis and development of new antimicrobials. All compounds prepared in this work are based on the molecule 4-amino-1-benzylpiperidine or its isomer 4-(piperidin-1-ylmethyl)aniline. The parent molecule was chosen on the basis of its previously reported activity. Thirteen imines were prepared using one-step synthesis by reacting the starting amine with the corresponding aldehyde. Two additional syntheses led to the amides by reaction of the starting molecule with the corresponding salicylic acid. The yields of the reactions ranged from 26 to 97 % for the imines and were 25 and 39 % for the amides. All compounds were prepared in sufficient quantity and purity to determine biological activity.

All fifteen compounds were tested for their antibacterial activity against clinically relevant Gram-positive and Gram-negative strains. They were further tested for their antifungal activity, antimycobacterial activity, and their ability to inhibit the enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase was also tested. The results of the evaluation showed that the amides were ineffective against microbes, but some imines showed excellent results. In general, the compounds were more active against pathogenic fungi, but the diiodinated and dichlorinated imines also showed a good activity against Gram-positive bacterial strains. The lowest MIC (minimum inhibitory concentration) for both bacteria (15.62 $\mu\text{mol/L}$) and fungi (1.95 $\mu\text{mol/L}$) was found for (*E*)-2,4-diiodo-6-[[4-(piperidine-1-ylmethyl)phenyl]imino]methylphenol.

(*E*)-2,4-Dichloro-6-[[4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]imino]methylphenol (IC₅₀ = 0.60 $\mu\text{mol/L}$ and SI = 0.06) and (*E*)-1-(3-nitrophenyl)-N-[[4-(piperidin-1-yl)methyl]phenyl]methanimine (IC₅₀ = 0.23 $\mu\text{mol/L}$ and SI = 0.02) showed the highest selectivity for the enzyme acetylcholine esterase. SI denotes selectivity index, determined by AChE/BChE calculation. The best selectivity to butyrylcholinesterase among the prepared compounds showed (*E*)-2-[[1-benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl-4,6-diodophenol (IC₅₀ = 18.33 $\mu\text{mol/L}$ and SI = 1.33).

Key words

4-amino-1-benzylpiperidine, antimicrobials, cholinesterase, enzyme inhibition, methicillin-resistant staphylococci, new compounds, resistance, salicylic acid, synthesis

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	10
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1. KLASIFIKACE ANTIBIOTIK	13
2.1.1. Účinek v závislosti na koncentraci	13
2.1.1.1. Mikrobicidní antibiotika	13
2.1.1.2. Mikrobistatická antibiotika	13
2.1.2. Šíře spektra	14
2.1.2.1. Širokospektrá ATB	14
2.1.2.2. Úzkospektrá ATB	14
2.1.3. Dle původu	14
2.1.3.1. Přírodní ATB	14
2.1.3.2. Semisyntetická ATB	15
2.1.3.3. Syntetická ATB	15
2.2. MECHANISMUS ÚČINKU ANTIBIOTIK	16
2.2.1. Inhibice syntézy buněčné stěny.....	16
2.2.2. Inhibice syntézy bílkovin	16
2.2.3. Inhibice syntézy nukleových kyselin.....	17
2.2.4. Porušení buněčné membrány	18
2.3. ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	19
2.3.1. Vertikální přenos.....	19
2.3.2. Horizontální přenos.....	20
2.3.2.1. Transformace	20
2.3.2.2. Transdukce	21
2.3.2.3. Konjugace.....	22
2.3.3. Mechanismy antibiotické rezistence.....	23
2.3.3.1. Zvýšený aktivní eflux	23
2.3.3.2. Blokace vstupu ATB.....	23
2.3.3.3. Modifikace cílové struktury	23
2.3.3.4. Produkce enzymů	24
2.3.3.5. Nadprodukce cílového místa a substrátu	24
2.4. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA – VYŠETŘENÍ CITLIVOSTI ATB.....	25
2.4.1. Diskový difúzní test	25
2.4.2. Bujónový mikrodiluční test	26
2.4.3. E-test	26
2.4.4. Automatizace vyšetření	26
3 CÍL PRÁCE	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1. OBECNÉ POSTUPY	28
4.2. PŘÍPRAVA CÍLOVÝCH SLOUČENIN	30
4.2.1. Příprava iminů.....	30
4.2.1.1. Příprava izomerů od iminu AP2 a AP3	39
4.2.2. Příprava iminů heterocyklických aldehydů	41
4.2.3. Příprava iminů z nitrobenzaldehydů	44
4.2.3.1 Příprava izomeru od iminu AP10	46
4.2.4. Příprava amidů	47
4.3. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ.....	50
4.3.1. Antibakteriální aktivita	50
4.3.2. Antifungální aktivita	50
4.3.3. Antimykobakteriální aktivita	51

4.3.4. <i>Inhibice cholinesteráz</i>	52
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	53
5.1. CHEMIE	53
5.2. BIOLOGIE	54
5.2.1. <i>Antimikrobní aktivita</i>	54
5.2.2. <i>Inhibice cholinesteráz</i>	59
6 ZÁVĚR	60
7 SEZNAM OBRÁZKŮ	61
8 SEZNAM TABULEK	61
9 POUŽITÁ LITERATURA	62

Seznam symbolů a zkratk

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AChE	acetylcholinesteráza
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
ATB	antibiotika
BChE	butyrylcholinesteráza
BS	buněčná stěna
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	colony forming units
CK	<i>Candida krusei</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CLP	cyklické lipopeptidy
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina)
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLU	flukonazol
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
INH	isoniazid
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PBS	phosphate buffered saline
PIP	piperacillin
QS	quorum-sensing
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TLC	thin layer chromatography
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

1 ÚVOD

Antimikrobní látky jsou jedním z největších objevů medicíny 20. století. S jejich rozvojem přišlo veliké zlepšení v délce života. Před jejich objevem i běžná infekce mnohdy představovala smrt.

Využívají se jak v terapii, tak k profylaxi nejrůznějších infekcí, a to jak ve zdravotnictví, tak veterinární medicíně. Jejich aplikace zahrnuje všechny známé způsoby – parenterální, perorální, topická, systémová i lokální. Jejich účinek může být mikrobistatický, nicméně ve většině případů je snaha o mikrobicidní efekt.

Dle jejich etiologie je můžeme klasifikovat na antivirotika zaměřená na léčbu infekcí vyvolaných viry, antiprotozoika jako preparáty proti prvokům, anthelmintika namířená proti červům, antimykotika používaná na houbové nákazy a v neposlední řadě antibiotika (ATB), využívaná v léčbě bakteriálních infekcí.

Nejpočetnější skupinu představují právě antibiotika. Na výzkum a vývoj nových preparátů je brán velký zřetel, neboť nedlouho po objevu ATB si bakterie vlivem nad používání ATB vyvinuly rezistenci. Dnes je otázka rezistence celosvětovým problémem a hrozí, že důvod úmrtí na infekce bude znovu v pomyslném předu. Proto je neustálý vývoj nových antimikrobiálních léčiv nezbytně nutný.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Klasifikace antibiotik

Antimikrobiální preparáty můžeme dělit podle několika kritérií pro snazší výběr konečného vhodného přípravku. Typicky se dělí podle svého účinku v závislosti na koncentraci. Rozlišujeme jejich pokrytí kmenu, které jsou vůči nim citlivá. A jedno z nejdůležitějších dělení je podle jejich mechanismu účinku. Na základě těchto kritérií lze co nejlépe zvolit vhodný přípravek pro konkrétní infekci.

2.1.1. Účinek v závislosti na koncentraci

Antibiotika můžeme rozdělit na mikrobicidní a mikrobistatická.

2.1.1.1. Mikrobicidní antibiotika

Mají schopnost usmrctvat mikroby a jejich dávka se určuje s pomocí hodnoty minimální baktericidní koncentrace (MBC). Tato hodnota se laboratorní diagnostikou určuje s pomocí mikrotitrační destičky, kdy máme koncentrační řadu daného ATB. Přesné určení hodnoty viz kapitola 2.4.2. [1] Za mikrobicidní ATB považujeme taková, jejichž MBC je maximálně 4× minimální inhibiční koncentrace (MIC). Tedy i mikrobicidní ATB, pokud je použito v nízké koncentraci, má vlastnosti pouze mikrobistatické. [2] Mezi ATB s mikrobicidním efektem se řadí na příklad chinolony, peniciliny, cefalosporiny, aminoglykosidy a další [3].

2.1.1.2. Mikrobistatická antibiotika

Zastavují růst daného mikroba nebo ho pouze zpomalují. Koncentrace ATB se vyjadřuje hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC představuje nižší koncentraci ATB než MBC [4]. Do této skupiny ATB patří tetracykliny, makrolidy, linkosamidy, chloramfenikol a další [1].

2.1.2. Šíře spektra

Na základě šíře spektra působení ATB je můžeme dělit na ATB s úzkým spektrem účinku a ATB s širokým spektrem účinku.

2.1.2.1. Širokospektrá ATB

Mohou být lékem první volby v rámci empirické terapie. Jsou použitelná proti většině kmenů způsobujících danou infekci. Nicméně se nedoporučuje jejich používání z důvodu většího rizika ATB rezistence [4], [5]. Svým širokým účinkem negativně ovlivňují mikrobiom, který je po jejich použití mnohonásobně více ovlivněn a představují větší zátěž pro organismus. Jsou spojeny s více nežádoucími účinky, častým problémem mohou být zažívací problémy z důvodu nerovnováhy mikrobiomu a celkové oslabení organismu [1]. Zástupci širokospektrých ATB jsou na příklad tetracykliny, chloramfenikol nebo makrolidy [4].

2.1.2.2. Úzkospektrá ATB

Volí se v rámci racionální terapie. S pomocí laboratorní diagnostiky určíme původce dané infekce a na základě výsledku volíme ATB pro daný kmen mikroba. K úzkospektrým ATB je citlivých vždy jen pár desítek kmenů. Mají menší dopad na mikrobiotu lidského těla a též i na antibiotickou rezistenci [4], [5]. Do této skupiny můžeme zařadit glykopeptidy nebo například penicilin G [6].

2.1.3. Dle původu

2.1.3.1. Přírodní ATB

Jedná se o nejstarší skupinu získanou z přírodních zdrojů, jako jsou houby a některé mikroby, které produkují ATB [7]. Nejznámější přírodní zdroj je *Penicillium chrysogenum*. Tato plíseň je zdrojem ATB penicilinu [8]. Kromě plísní jsou zdrojem ATB i mikroby. Příkladem mohou být eubakterie, termofilní *Paenibacillus polymyxa* izolovaný z horkých pramenů je zdrojem ATB fusaricidinu B. Toto ATB vykazuje antituberkulózní

účinky [7]. Kromě eubakterií mohou být zdrojem i Gram-pozitivní bakterie. Příkladem můžeme uvést rod *Streptomyces*. Svým tvarem může připomínat vláknitou houbu. Nejzajímavější vlastností streptomycet je schopnost produkovat bioaktivní sekundární metabolity, jako jsou antimykotika, antivirotika, cytostatika, antihypertenziva, imunosupresiva a zejména antibiotika. Produkce většiny antibiotik je druhově specifická a tyto sekundární metabolity jsou pro druhy rodu *Streptomyces* důležité, aby mohly konkurovat jiným mikroorganismům, které s nimi přicházejí do styku, a to i v rámci stejného druhu. Příkladem takového antibiotika je streptorubin B [9].

2.1.3.2. Semisyntetická ATB

S použitím přírodních ATB se objevily i některé problémy. Jednalo se o cenu, nižší účinnost, než byla potřeba, potřeba častého opakování dávky a v neposlední řadě i některé závažné nežádoucí účinky jako porucha krvetvorby, hluchota a další. V návaznosti na tyto problémy byla snaha o poznání struktury již používaných přírodních ATB. Tato struktura pak sloužila jako předloha pro syntézu, ve snaze produkovat původní přírodní ATB za levnější náklady chemickou syntézou. Kromě syntézy stejné molekuly ATB jako její přírodní předloha, byla snaha i syntetizovat modifikovanou původní molekuly, aby nová struktura poskytovala výhodnější vlastnosti ATB, a hlavně o vyšší účinnost [10].

Již v roce 1960 jako odpověď na vzrůstající stafylokokovou rezistenci byly semisynteticky vyrobeny protistafylokokové peniciliny – oxacilin a další [10].

2.1.3.3. Syntetická ATB

Jsou získávány plně chemickou syntézou a nemají svoji přírodní předlohu. Rozvoj syntetických ATB se pojí s prudkým rozvojem rezistence. Rychlá potřeba nových a účinných derivátů je zjevná. Strategií je modifikace již zavedených ATB o nové substituenty ve snaze o získání výhodnějších vlastností. V dnešní době jsou syntetická ATB nejčastější, důvodem pro to je rychlost a cena výroby, spolu s možností modifikace struktury ATB [2].

2.2. Mechanismus účinku antibiotik

2.2.1. Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna (BS) představuje výhodný buněčný cíl pro ATB, neboť obsahuje peptidoglykan, typický pro bakteriální buňku. Umožňuje tak ATB selektivní působení na bakteriální buňky bez poškození buněk lidského organismu. Přímé rozrušení struktury peptidoglykanu je možné pouze enzymatickou aktivitou. Protože molekula ATB musí být malá, aby dobře pronikala buněčnými strukturami, nemůže mít enzymatickou aktivitu, a tak mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy BS [4]. Příkladem skupin ATB s tímto mechanismem jsou β -laktamová antibiotika, glykopeptidy, monobaktamy, karbapenemy, bacitracin a další [4].

Do rodiny β -laktamových antibiotik patří peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a další, které interferují v posledním kroku biosyntézy peptidoglykanu. Struktura peptidoglykanu je síťovitá a poskytuje Gram-pozitivním bakteriím ochranu [11]. ATB se váže na penicillin-binding proteins (PBP), jako na své cílové struktury s vysokou afinitou. PBP jsou transpeptidázy, které spojují postranní peptidové řetězce, mají takzvaný crosslink efekt a díky nim dochází k zesíťování peptidoglykanu. Peptidové řetězce mají na svém konci strukturu D-alanin-D-alanin, na který se váží právě transpeptidázy. ATB tuto koncovou strukturu peptidového řetězce napodobují, čímž se enzymy naváží na ně místo na peptidové řetězce a nedojde k finálnímu kroku biosyntézy peptidoglykanu, tj. k jeho zesíťování [12].

2.2.2. Inhibice syntézy bílkovin

Antibiotika s tímto mechanismem cílí na translační ribonukleoproteinový aparát jako na svůj buněčný cíl. Nejčastěji je to jedno ze tří klíčových ribozomálních míst – A místo na 30S, centrum peptidyltransferázy na 50S a výstupní tunel na 50S podjednotce [13].

Na A místo 30S podjednotky ribosomu se váží typicky aminoglykosidy. Tato vazba má za následek, že molekula ATB zde fyzicky překáží v párování jednotlivých tripletů mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) s jejich antikodony na tRNA (transferová ribonukleová kyselina). Tímto se poruší čtení informace a dojde k produkci nesprávných

bílkovin a přerušení syntézy proteinů tím, že způsobí předčasné uvolnění ribozomu z mRNA [2]. Další zástupci ATB působící na 30S podjednotku jsou tetracykliny, pleuromutiliny nebo spektinomycin [4]. S podjednotkou 50S typicky interagují makrolidy, diterpeny, linkosamidy nebo amfenikoly [2].

2.2.3. Inhibice syntézy nukleových kyselin

Některá antibiotika působící na nukleové kyseliny můžeme označit jako inhibitory topoizomeráz. Topoizomerázy jsou všudypřítomné a nezbytné enzymy v mnohobuněčných organismech. Podílí se na mnoha procesech spojených s DNA (deoxyribonukleová kyselina) včetně replikace DNA, transkripce, kondenzace a dekonenzace chromozomů a pravděpodobně i rekombinace DNA. Mají aktivitu relaxace DNA nezbytné k odstranění torzních napětí spojených s těmito procesy, ale umožňují i sbalení DNA, což umožňuje, že se velká molekula jako DNA prostorově vejde do buňky [14], [15].

Topoizomerázy dělíme na dvě třídy. Topoizomerázy I mají schopnost přerušení jednoho z vláken dvoušroubovice a umožní tak zavinutí nebo rozvinutí o jednu otáčku DNA. Topoizomerázy II umožňují přerušit obě vlákna dvoušroubovice a umožňují otočit molekulu DNA o jednu otáčku. Mnohonásobným opakováním tohoto procesu tak dávají vzniknout superšroubovici [4].

Mezi inhibitory topoizomeráz patří chinolonová ATB. Tato ATB mají vysokou afinitu pouze k bakteriálním topoizomerázám a s lidskými téměř neinteragují. Příkladem těchto inhibitorů jsou fluorochinolony. Ty interagují s bakteriálními topoizomerázami typu II. Váží se reverzibilně na komplex DNA s topoizomerázou. Po přerušení obou vláken se ATB naváže mezi molekulu DNA a aktivním centrem enzymu. Dochází k navázání vždy dvou molekul ATB na každý z vzniklých konců vlákna čili 4 molekuly celkem blokují v aktivním centru činnost topoizomerázy [16]. Tímto mechanismem zůstane molekula DNA v rozrušeném stavu a enzym se rozpadne na podjednotky a ztrácí svou funkci. Molekula DNA je působením fluorochinolonů rozrušena na několika místech a tyto mnohočetné zlomy v molekule DNA jsou pro bakteriální buňku letální [16].

2.2.4. Porušení buněčné membrány

Buněčnou membránou bakterií rozumíme lipidovou dvojvrstvu, která se nachází pod buněčnou stěnou. Bakterii slouží dvojí základní funkcí, jednak zajišťuje funkci bariéry a ochrany před únikem látek z bakteriální buňky. Druhá funkce spočívá v zajištění buněčného dýchání, membrána je místem lokalizace enzymů dýchacího řetězce [2].

Tato ATB se vážou přímo na bakteriální membránu a způsobují rychlou depolarizaci bakteriálního membránového potenciálu [17].

Příkladem ATB s tímto účinkem jsou cyklické lipopeptidy (CLP). Jedná se o slibnou skupinu přírodních produktů s antibiotickými vlastnostmi. Tyto látky jsou produkovány různými kmeny druhů *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* a *Enterobacter* [18]. CLP jsou amfifilní molekuly složené z dlouhého řetězce mastné kyseliny navázaného na krátký oligopeptid, který tvoří makrocyclickou kruhovou strukturu [19].

Konkrétním ATB této skupiny je daptomycin. Jedná se o produkt *Streptomyces roseosporus* [4]. Účinek je závislý na přítomnosti Ca^{2+} . Část peptidová sestává z 13 aminokyselin a ocas z desetiuhlíkaté mastné kyseliny. Mechanismus účinku spočívá v navázání několika molekul daptomycinu spolu s Ca^{2+} do lipidové dvojvrstvy svými hydrofobními ocasy z mastné kyseliny. Již navázané molekuly se poté vzájemně spojí a vytvoří v membráně póry, kterými z bakteriální buňky unikají ionty především H^+ a K^+ . Tento děj způsobí depolarizaci buněčné membrány a usmrcení buňky [20]. Využívá se k léčbě komplikovaných kožních infekcí a také k léčbě infekcí měkkých tkání. Je účinný na Gram-pozitivní bakterie včetně rezistentních kmenů jako je methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* [21].

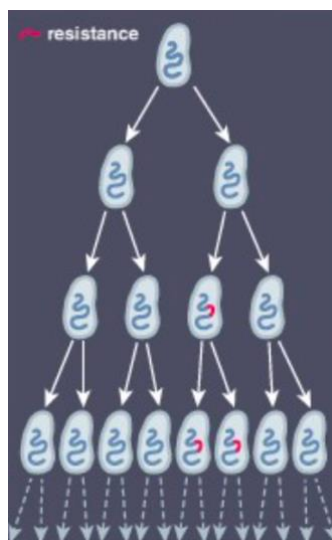
Obecně ATB, jejichž mechanismus účinku spočívá v rozrušení buněčné membrány, se využívají v boji proti aerobním bakteriím [4].

2.3. Antibiotická rezistence

Jedním z hlavních celosvětových problémů, co se zdravotnictví týče, je rezistence vůči ATB. Téměř na všechna klinicky používaná ATB se objevuje rezistence. Dala by se považovat za pandemii, která zasáhla celý svět. Situace vyžaduje vývoj nových molekul jako alternativu k dosavadní terapii patogenů, kteří se stali rezistentními vůči ATB. Kromě vývoje nových molekul je také třeba správně porozumět mechanismům antibiotické rezistence, aby se tak co možná nejlépe zabránilo rychlému šíření genů rezistentních vůči ATB a zvýšenému výskytu špatně zvladatelných infekcí. Podle způsobu přenosu genů nesoucí informaci o rezistenci rozlišujeme přenos na vertikální a horizontální [22].

2.3.1. Vertikální přenos

Vertikální přenos nastává při procesu replikace, kdy původní mateřská buňka předá svůj genetický obsah dceřině buňce a tím i geny pro rezistenci (viz obr. 1.1.). Jedná se o možnou akumulaci chyb při procesu dělení, kdy některé z těchto změn mohou vést k rezistenci [23].



Obr. 1.1. Vertikální přenos rezistence

[1] FOUNOU, Luria Leslie, Raspail Carrel FOUNOU a Sabia Yusuf ESSACK. *Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. Frontiers in Microbiology. 2016, (7). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>*

2.3.2. Horizontální přenos

Druhým způsobem je přenos horizontální, ten představuje vysoké riziko pro rychlý a nekontrolovatelný rozvoj ATB rezistence [24]. Geny nesoucí informaci o rezistenci jsou předávány z jednoho mikroba na druhého, a to prostřednictvím plazmidu. Plazmid je krátký úsek kružnicové DNA, který nese doplňkové geny, nejsou nezbytně nutné pro přežití bakterie, ale poskytují jí adaptační výhodu a může nést právě informaci o bakteriální rezistenci [25]. V rámci horizontálního přenosu rozlišujeme tři způsoby – transformace, transdukce a konjugace [24].

2.3.2.1. Transformace

Jedná se o první objevený mechanismus horizontálního přenosu. Transformace do značné míry závisí na příjmu a začlenění exogenní holé DNA z prostředí do genomů kompetentních přijímajících organismů (viz obr. 1.2.). Genetický materiál je trvale začleněn do bakteriálního chromozomu homologní rekombinací.

Na rozdíl od konjugace a transdukce závisí transformace pouze na přijímající bakterii, která exprimuje kompetiční aparát. Regulace kompetence je založena na několika konzervovaných genech indukujících kompetenci a systémech quorum-sensing (QS), které se podílejí na příjmu exogenní DNA a integraci do chromozomu [26].



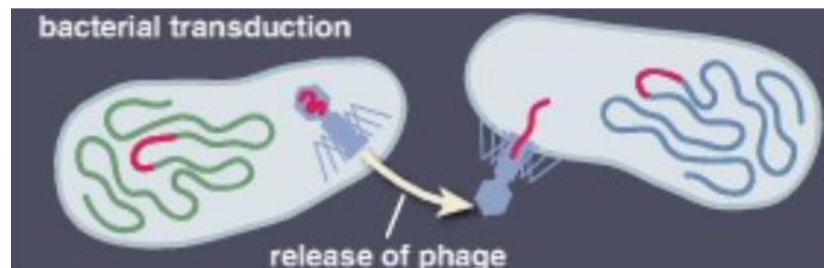
Obr. 1.2. Horizontální přenos rezistence – transformace

[1] FOUNOU, Luria Leslie, Raspail Carrel FOUNOU a Sabia Yusuf ESSACK. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2016, (7). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>

2.3.2.2. Transdukce

Transdukce je bakteriofágy zprostředkovaný přenos DNA do bakteriálních buněk (viz obr. 1.3.). Bakteriofágy (fágy) jsou viry, které infikují bakterie. Protože jsou přirozenými nepřáteli bakterií, vyskytují se prakticky všude v přírodním prostředí. Kromě toho mají fágy ve srovnání s bakteriemi delší perzistenci a v podmínkách prostředí nejsou snadno rozložitelné. Snášejí kyseliny, alkalické podmínky nebo vysoké teploty a nelze je zcela zlikvidovat UV zářením nebo chlorováním. Dlouhodobá koevoluce fágů a bakterií v přírodě vedla ke složitým a rozmanitým interakcím mezi bakteriemi a fágy a k mutualistickým adaptacím [27].

Fágy jsou neživé biologické entity, které využívají replikační mechanismus hostitele k produkci dalších fágů. Fágy zprostředkovaná transdukce je zahájena po připojení fága a vstříknutí fágové DNA do bakteriální cytoplazmy. Lytické (virulentní) fágy začínají přímo s reprodukcí, zatímco lyzogenní (mírné) fágy mohou nejprve integrovat svůj genom do chromozomu hostitele (profág), než je zahájen lytický cyklus. Bakteriální DNA vnesená fágy musí být buď integrována homologní rekombinací do hostitelského chromozomu, nebo udržována jako samoreplikující se plazmid [26].

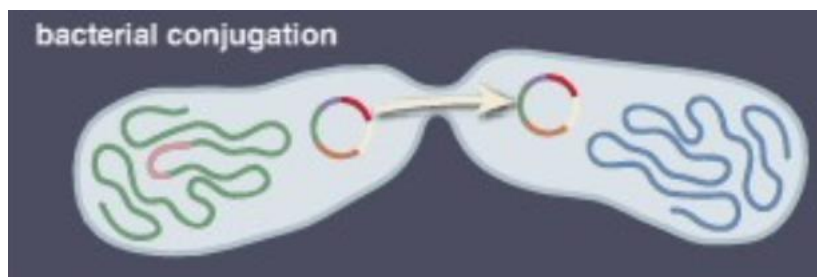


Obr. 1.3. Horizontální přenos rezistence – transdukce

[1] FOUNOU, Luria Leslie, Raspail Carrel FOUNOU a Sabia Yusuf ESSACK. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2016, (7). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>

2.3.2.3. Konjugace

Konjugace je hlavním mechanismem, který usnadňuje adaptaci bakterií tím, že umožňuje genetickou výměnu mezi jednotlivými buňkami. Na rozdíl od transdukce a transformace je konjugace založena na přímém kontaktu mezi buňkami a vytvoření párové struktury mezi donorovou a akceptorovou buňkou (viz obr. 1.4.), který je u Gram-pozitivních bakterií zprostředkován adheziny a u Gram-negativních bakterií konjugativními pili, protože tyto dvě skupiny bakterií se zásadně liší strukturou buněčné stěny [1], [26]. Multiproteinový komplex se rozprostírá přes buněčný obal a zprostředkovává jednosměrný přenos DNA z dárcovské buňky do přijímající. Proces konjugace je zprostředkován konjugačními plazmidy [26].



Obr. 1.4. Horizontální přenos rezistence – konjugace

[1] FOUNOU, Luria Leslie, Raspail Carrel FOUNOU a Sabia Yusuf ESSACK. *Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. Frontiers in Microbiology*. 2016, (7). Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>

2.3.3. Mechanismy antibiotické rezistence

2.3.3.1. Zvýšený aktivní eflux

Prvním způsobem, jak se bakteriální buňka brání působení molekul ATB, je jejich snížená akumulace v cytoplazmatickém prostoru buňky. Využívá k tomu transmembránové pumpy, které aktivně odčerpávají molekuly ATB ven z buňky čili proti koncentračnímu gradientu. Takový proces je energeticky závislý, k odstranění každé molekuly ATB je třeba energie, nejčastěji v podobě ATP. Zvýšený eflux pouze snižuje aktivitu ATB, ale zcela ji neinhibuje. Díky potřebě energie a časové náročnosti procesu, ne všechny molekuly podléhají odčerpání. Ty molekuly, které se do buňky dostanou, se mohou navázat na své cílové struktury a inhibovat bakteriální růst [4].

2.3.3.2. Blokace vstupu ATB

Dalším způsobem je schopnost bakterie tvořit nepropustné bariéry. Některé bakterie tvořící pouzdro mohou díky náboji daného pouzdra odpuzovat molekuly ATB aminoglykosidů. Roste-li bakterie v biofilmu, může vrstva hlenu bránit průchodu ATB do buněk [4].

Účinnou bariérou je i zevní membrána u Gram-negativních bakterií, důležitou roli mají poriny, přes tyto kanálky se do bakteriální buňky dostávají hydrofilní molekuly ATB. Vstup přes poriny může být omezen několika způsoby. Bakterie může jednoduše omezit množství příslušného porinu, který slouží k transportu konkrétního ATB. Může pozměnit propustnost porinu změnou náboje v porinu nebo jeho zúžení, což větším molekulám ATB neumožní průchod [28].

2.3.3.3. Modifikace cílové struktury

Účinek ATB spočívá v jeho afinitě ke konkrétní cílové struktuře, například ribozomální podjednotce. Pokud bakteriální buňka tuto cílovou strukturu pozmění, afinita může zeslábnout až úplně vymizet a ATB není schopno již inhibovat bakteriální růst. Příkladem mohou být MRSA kmeny, rezistentní vůči β -laktamovým antibiotikům. Správně fungující β -laktamová antibiotika se váží na PBP, ale MRSA kmeny ovšem získaly

gen *mecA*. Tento mutantní gen kóduje nový PBP2a, který má již velice nízkou afinitu k drtivé většině β -laktamových antibiotik [29].

2.3.3.4. Produkce enzymů

Dalším možným mechanismem je tvorba enzymů, které inhibují funkci ATB. Tento způsob je u patogenních mikrobů velmi rozšířen, jedná se o velmi efektivní způsob rezistence, jediná molekula enzymu může inhibovat větší počet molekul ATB [4].

Příkladem může být enzym β -laktamáza, která hydrolyzuje strukturu β -laktamových ATB a způsobuje tak jejich rozklad. Tento rezistentní mechanismus byl překonán ATB methicilinem, oxacilinem a dalšími. MRSA kmeny mohou produkovat i jiné enzymy modifikující strukturu ATB, a to na příklad pomocí acetylace nebo fosforylace, čímž enzymy připojí postranní řetězec k molekule ATB, například aminoglykosidů. Po změně prostorové konformace se již léčivo není schopno navázat se na svou cílovou strukturu v bakteriální buňce [30].

2.3.3.5. Nadprodukce cílového místa a substrátu

Některé mikroorganismy mohou nadprodukovat cílové místo zásahu ATB. Takovým příkladem je rezistence na sulfonamidy, které inhibují klíčové enzymy v biochemické dráze metabolismu kyseliny tetrahydrolistové. Prostřednictvím nadprodukce molekul enzymu, na které se vyváže inhibitor, bakterie zabrání vazbě inhibitoru na klíčové enzymy její biochemické dráhy [31]. V případě rezistence na sulfonamidy bakterie nadprodukuje enzym dihydropteorát syntázu [32].

2.4. Laboratorní diagnostika – vyšetření citlivosti ATB

Důvodem vyšetření citlivosti ATB je výběr co nejvhodnějšího ATB pro terapii infekce konkrétním mikrobem. Hledáme takové ATB, vůči kterému je mikrob způsobující dané onemocnění citlivý. Je snaha o výběr co nejvíce specifického ATB. Za pomoci laboratorní diagnostiky jsme schopni zamezit nadužívání širokospektrých ATB a tím přispět k potlačení vzniku antibiotické rezistence. Vyšetření citlivosti slouží nejen k výběru vhodného ATB, ale i ke stanovení správného dávkování [3].

Vyšetřovací metody můžeme rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Mezi kvalitativní metody patří diskový difúzní test a rozlišuje mikroby pouze na citlivé nebo rezistentní k vyšetřovanému ATB. Kvantitativní metody nás informují o hodnotě MIC a jsou tak vhodnějšími metodami v diagnostice, neboť díky nim na mikroby nepůsobí tak velký selekční tlak, a můžeme tím potlačit vznik rezistence [3].

2.4.1 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test řadíme mezi kvalitativní testy. Provádí se na Müller-Hintonově agaru, což je půda využívaná právě pro testy citlivosti ATB jak pro bakterie, tak houby. Na Petriho misku je naočkována kolonie vyšetřovaného mikroba. Dále se na jednu Petriho misku klade pět až šest disků napuštěných základními ATB, které jsou dodávány schválenými výrobci [3].

Vyhodnocení se provádí pomocí měření průměru inhibičních zón v milimetrech, po 18 až 24 hodinách inkubace. Naměřené hodnoty jsou porovnávány s takzvanými breakpointy na mezinárodních stránkách European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, viz odkaz 1, kapitola 9 Použitá literatura). Pro každého mikroba EUCAST aktualizuje tabulku s breakpointy a slouží jako standardizace testu a zajišťuje tak jeho porovnatelnost v rámci různých laboratoří. Dle průměru zóny rozlišujeme mikroby na citlivé, dané ATB je tedy k terapii vhodné, a rezistentní, kdy je dané ATB k terapii nevhodné [34].

2.4.2. Bujónový mikrodiluční test

Bujónový mikrodiluční test spadá pod kvantitativní metody, s jeho pomocí určujeme MIC, jedná se o nejnižší koncentraci ATB, které je schopno vyvolat inhibici růstu daného mikroba. Provádí se v uspořádání 96-jamkové mikrotitrační destičky. Každá jamka obsahuje bujon s konkrétní koncentrací ATB. Většinou je pro každé ATB osm koncentrací a kolem čtvrté jamky pozorujeme MIC [35]. Do každé jamky očkujeme suspenzi mikroba o standardní koncentraci 10^8 bakterií v 1 ml fyziologického roztoku, suspenze o denzitě 0,5 stupnice McFarlanda [3], [36].

Vyhodnocení testu je vizuální, kdy se hodnotí zákal jamek. První nezakalená jamka je označena jako MIC. Jedná se o první jamku, kde ATB inhibovalo kompletně růst bakterií [35].

2.4.3. E-test

Dalším kvantitativním testem je takzvaný E-test. Jedná se gradientovou difúzní metodu. Na Petriho misku s Müller-Hintonovou půdou je naočkována kolonie vyšetřované bakterie. Na půdu se klade kalibrovaný proužek, který nese gradient koncentrace jednoho ATB. Petriho miska se nechá 18 až 24 hodin inkubovat. Po inkubaci se na půdě vytvoří inhibiční zóna, která má tvar kapky, se snižující se koncentrací ATB se zóna zužuje. Tam kde inhibiční zóna protne stupnici, odečítáme MIC. Jedná se o velmi přesnou metodu stanovení citlivosti k ATB [33].

2.4.4. Automatizace vyšetření

Pro úsporu času i personálu můžeme předchozí testy automatizovat. Jedná se o modifikace ve vyhodnocování, kdy na místo vizuální kontroly personálem použijeme přístrojové vybavení. Při vyhodnocení inhibičních zón v případě diskového difúzního testu můžeme použít digitální posuvné měřidlo, které změří průměr zóny v milimetrech a uloží tato data do počítače. Automatizovat můžeme i stanovení MIC u kvantitativních metod, kdy při vyhodnocení MIC v mikrotitrační destičce spektrofotometricky stanovujeme zákal v jednotlivých jamkách [37].

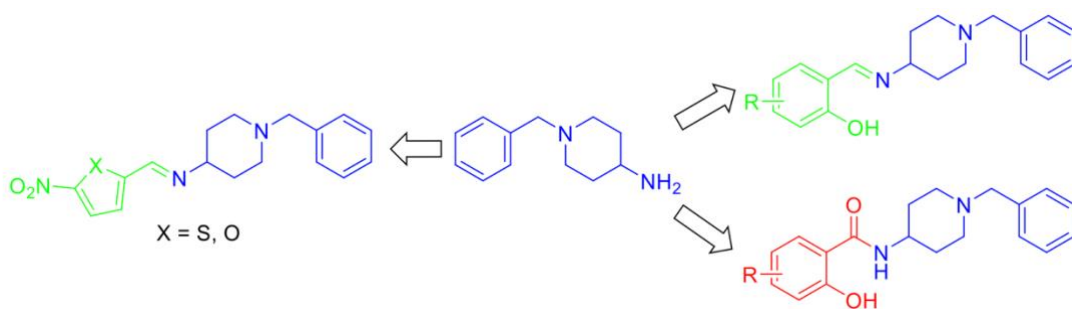
3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je představit antimikrobiální látky jakožto nezastupitelné přípravky v medicíně a spolu s nimi představit problematiku bakteriální rezistence.

V praktické části diplomové práce je představena syntéza patnácti nových sloučenin vycházejících z 4-amino-1-benzylpiperidinu. Cílem bylo vytvořit iminy a amidy, které by byly účinné na rezistentní kmeny bakterií a patogenních hub, případně měly i další biologickou aktivitu.

Syntéza látek byla provedena podle designu cílových molekul, viz Obr. 2.1. Všechny tyto nově připravené látky budou charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f . Dále bude ověřena jejich čistota a následně změřena jejich biologická aktivita pro vybrané kmeny bakterií a patogenních hub.

Design cílových molekul byl zvolen na základě referencí o aktivitě salicylových sloučenin [38] a také na základě výsledků nitrofuranových sloučenin [39]. Sloučeniny odvozené od benzylpiperidinu byly také představeny jako potenciální anticholinesterázové sloučeniny, možné potenciální látky proti Alzheimerově chorobě [40].



Obr. 2.1. Design cílových molekul

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Obecné postupy

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 hexan byl purifikován destilací.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC – thin layer chromatography). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 (Merck, Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 (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).

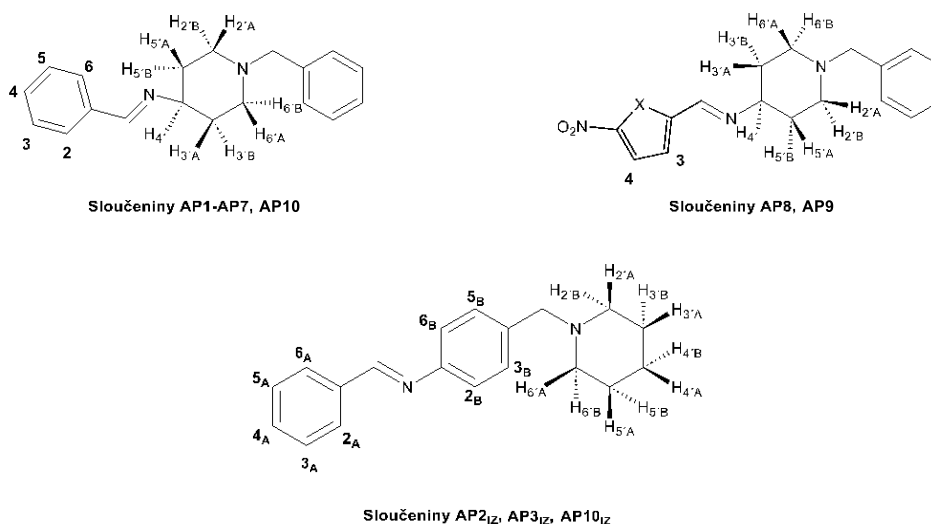
NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$) a chloroform (CDCl_3). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy nepřímo k tetramethylsilanu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla ($\text{DMSO-}d_6$ při $\delta = 39.5$ ppm, CDCl_3 při $\delta = 77.0$ ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research,

Santiago de Compostela, Španělsko). Principy číslování připravených sloučenin jsou uvedeny na obr. Principy číslování připravených sloučenin jsou uvedeny na obr.3.1.

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). V tomto programu byly také vypočteny hodnoty log*P* připravených sloučenin, tj. hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu oktán-1-ol/voda.

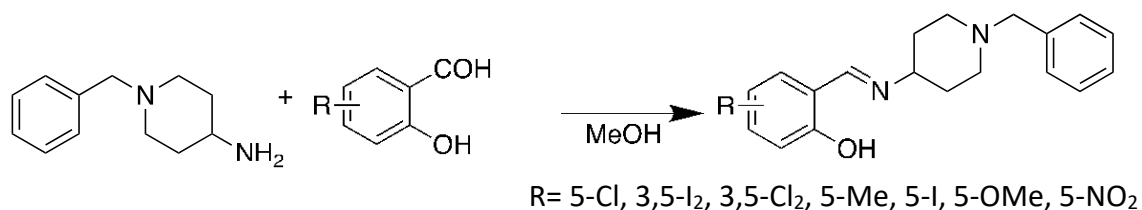
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.



Obr. 3.1. Princip číslování sloučenin

4.2. Příprava cílových sloučenin

4.2.1. Příprava iminů

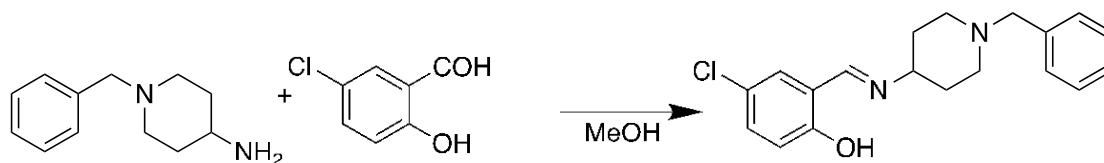


Obr. 3.2. Reakční schéma – příprava iminů ze salicylaldehydů

Pracovní postup obecně:

0,001 mol 4-amino-1-benzylpiperidinu (190,3 mg; 204 μ l) bylo rozpuštěno v 8 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu příslušného salicylaldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout za míchání stáním volně na vzduchu a následně ponechána 12 hod při laboratorní teplotě. Poté byla krystalizována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Získaný precipitát byl promyt hexanem a krystaly byly vysušeny. Připravená sloučenina byla charakterizována pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

(E)-2-[[[(1-Benzylpiperidin-4-yl)imino]methyl]-4-chlorfenol (AP1)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	328,84
Popis:	žluté krystaly skelného vzhledu
Výtěžek:	63 %
Teplota tání:	118,6 °C
R _f :	0,22 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.75 (1H, s, OH), 8.58 (1H, s, N=CH), 7.53 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H₆), 7.35 – 7.29 (5H, m, H₄, CH₂-Ph), 7.28 – 7.20 (1H, m, CH₂-Ph), 6.89 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H₃), 3.48 (2H, s, CH₂-Ph), 3.39 – 3.34 (1H, m, H₄'), 2.79 – 2.72 (2H, m, H₂'A, H₆'A), 2.18 – 2.10 (2H, m, H₂'B, H₆'B), 1.81 – 1.75 (2H, m, H₃'A, H₅'A), 1.68 – 1.60 (2H, m, H₃'B, H₅'B).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.31, 159.92, 138.70, 132.09, 130.72, 128.92, 128.34, 127.04, 121.87, 119.83, 118.76, 64.01, 62.36, 51.23, 33.13.

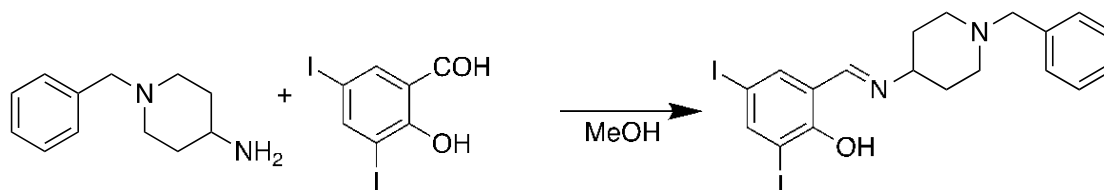
IR (ATR): 3034, 2941, 2916, 2853, 2805, 2760, 1634, 1609, 1569, 1479, 1454, 1380, 1366, 1346, 1273, 1213, 1188, 1141, 1106, 1068, 1019, 981, 930, 839, 794, 776, 743, 724, 698, 617 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 69.40; H, 6.44; N, 8.52

nalezeno C, 69.48; H, 6.40; N, 8.47

(E)-2-[[[(1-Benzylpiperidin-4-yl)imino]methyl]-4,6-dijodfenol (AP2)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ I ₂ N ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	546,19
Popis:	oranžové krystaly
Výtěžek:	55 %
Teplota tání:	101,4 °C
R _f :	0,13 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.96 (1H, s, OH), 8.48 (1H, s, N=CH), 7.98 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H6), 7.68 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H4), 7.32 – 7.26 (4H, m, CH₂-Ph), 7.23 – 7.20 (1H, m, CH₂-Ph), 3.55 – 3.48 (1H, m, H4'), 3.46 (2H, s, CH₂-Ph), 2.75 – 2.70 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.16 – 2.10 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.88 – 1.81 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.69 – 1.60 (2H, m, H3'B, H5'B).

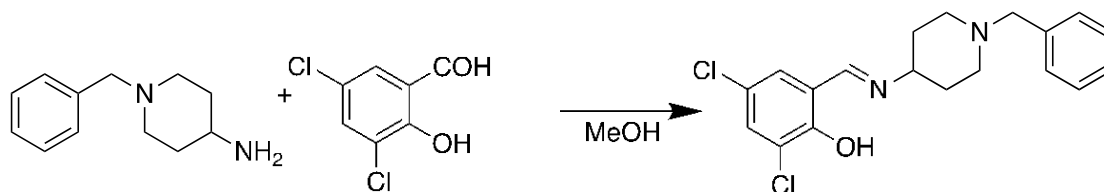
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.09, 164.02, 149.05, 141.33, 138.92, 129.31, 128.71, 127.44, 118.43, 93.56, 76.58, 62.53, 60.62, 51.42, 32.71.

IR (ATR): 3058, 2932, 2799, 2763, 1617, 1589, 1543, 1506, 1467, 1438, 1368, 1346, 1291, 1283, 1246, 1198, 1155, 1123, 1066, 1015, 996, 961, 904, 857, 785, 738, 670, 658 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 41.78; H, 3.69; N, 5.13
nalezeno C, 41.64; H, 3.60; N, 5.08

(E)-2-[[1-Benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl}-4,6-dichlorfenol (AP3)



Látka AP3 byla připravena dle obecného postupu s modifikací při krystalizaci. Po 1 hodině při -20 °C nevznikl precipitát. Proto byl roztok odpařen a vzniklá olejovitá látka byla pomocí malého množství ethyl-acetátu přenesena do vialky a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku.

Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	363,28
Popis:	žlutá olejovitá látka
Výtěžek:	97 %
Teplota tání:	---
R _f :	0,22 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.93 (1H, s, OH), 8.60 (1H, s, N=CH), 7.55 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H6), 7.42 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H4), 7.31 – 7.27 (4H, m, CH₂-Ph), 7.24 – 7.20 (1H, m, CH₂-Ph), 3.57 – 3.54 (1H, m, H4'), 3.48 (2H, s, CH₂-Ph), 2.76 – 2.71 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.18 – 2.10 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.89 – 1.81 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.69 – 1.61 (2H, m, H3'B, H5'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.29, 162.07, 138.75, 132.99, 130.68, 129.35, 128.71, 127.49, 124.20, 118.74, 118.15, 62.49, 51.34, 32.69, 25.66.

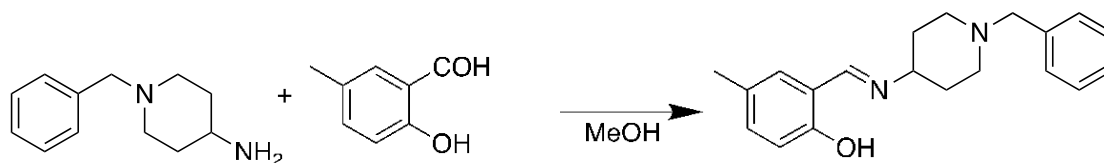
IR (ATR): 3027, 2941, 2804, 2762, 1632, 1494, 1453, 1381, 1366, 1347, 1291, 1248, 1214, 1181, 1142, 1119, 1070, 979, 866, 854, 793, 741, 699, 618 cm⁻¹.

Elementární analýza:

nalezeno C, 62.82; H, 5.55; N, 7.71

výpočtem C, 62.97; H, 5.34; N, 7.86

(E)-2-[[[1-Benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl]-4-methylfenol (AP4)



Sumární vzorec:	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	308,43
Popis:	jemné žluté krystaly
Výtěžek:	26 %
Teplota tání:	106,2 °C
R _f :	0,22 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.25 (1H, s, OH), 8.49 (1H, s, N=CH), 7.29 – 7.27 (4H, m, CH₂-Ph), 7.22 – 7.19 (1H, m, CH₂-Ph), 7.17 (2H, d, *J* = 2.2 Hz, H₆), 7.09 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, H₄), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, H₃), 3.45 (2H, s, CH₂-Ph), 3.31 (1H, překryv se signálem H₂O, H₄'), 2.76 – 2.70 (2H, m, H₂'A, H₆'A), 2.20 (3H, s, CH₃), 2.14 – 2.07 (2H, m, H₂'B, H₆'B), 1.78 – 1.70 (2H, m, H₃'A, H₅'A), 1.64 – 1.57 (2H, m, H₃'B, H₅'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.52, 158.83, 139.09, 133.38, 131.99, 129.27, 128.68, 127.53, 127.38, 118.90, 116.72, 64.63, 62.76, 51.66, 33.71, 20.45.

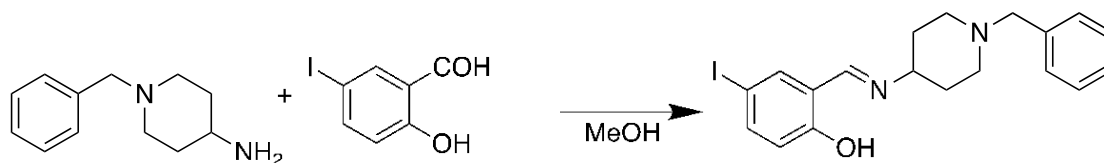
IR (ATR): 3033, 2939, 2918, 2806, 2762, 1634, 1583, 1490, 1448, 1386, 1367, 1345, 1276, 1224, 1162, 1140, 1073, 1022, 980, 945, 831, 796, 773, 739, 697, 604 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočtem C, 77.89; H, 7.84; N, 9.08

nalezeno C, 77.74; H, 7.69; N, 9.19

(E)-2-[[1-Benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl}-4-jodfenol (AP5)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₁ IN ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	420,30
Popis:	žluté krystaly pískovitého vzhledu
Výtěžek:	61 %
Teplota tání:	149,8 °C
R _f :	0,20 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.76 (1H, s, OH), 8.53 (1H, s, N=CH), 7.74 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H6), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, H4), 7.31 – 7.25 (4H, m, CH₂-Ph), 7.22 – 7.19 (1H, m, CH₂-Ph), 6.68 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H3), 3.45 (2H, s, CH₂-Ph), 3.33 (1H, překryv se signálem H₂O, H4'), 2.75 – 2.70 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.14 – 2.08 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.79 – 1.72 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.64 – 1.57 (2H, m, H3'B, H5'B).

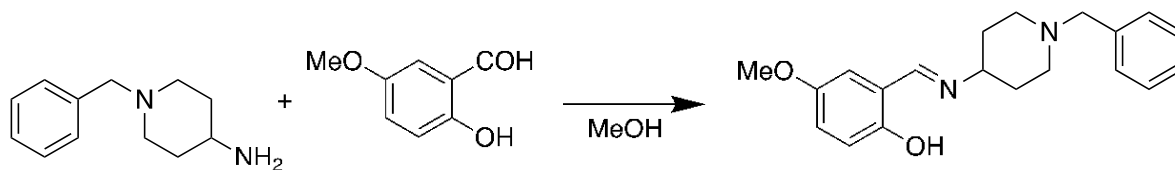
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.58, 161.36, 140.86, 139.96, 139.05, 129.28, 128.69, 127.40, 121.51, 120.01, 80.00, 64.20, 62.71, 51.58, 33.48.

IR (ATR): 2949, 2922, 2800, 2759, 1629, 1601, 1566, 1474, 1447, 1381, 1342, 1277, 1252, 1186, 1140, 1076, 1064, 1022, 969, 928, 875, 824, 796, 776, 743, 619, 613 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočtem C, 54.30; H, 5.04; N, 6.67
nalezeno C, 54.47; H, 5.21; N, 6.60

(E)-2-[[1-Benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl}-4-methoxyfenol (AP6)



Sumární vzorec:	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	324, 42
Popis:	žluté krystaly pískovitého vzhledu
Výtěžek:	30 %
Teplota tání:	121,2 °C
R _f :	0,10 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.92 (1H, s, OH), 8.52 (1H, s, N=CH), 7.33 – 7.24 (4H, m, CH₂-Ph), 7.23 – 7.19 (1H, m, CH₂-Ph), 6.99 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H₆), 6.91 (1H, dd, *J* = 8.9, 3.1 Hz, H₄), 6.77 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H₃), 3.67 (3H, s, OCH₃), 3.45 (2H, s, CH₂-Ph), 3.33 (1H, překryv se signálem H₂O, H₄'), 2.76 – 2.71 (2H, m, H₂'A, H₆'A), 2.15 – 2.08 (2H, m, H₂'B, H₆'B), 1.77 – 1.71 (2H, m, H₃'A, H₅'A), 1.65 – 1.57 (2H, m, H₃'B, H₅'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.35, 154.96, 152.06, 139.09, 129.27, 128.69, 127.38, 119.63, 119.01, 117.63, 115.51, 64.73, 62.75, 56.08, 51.64, 33.68.

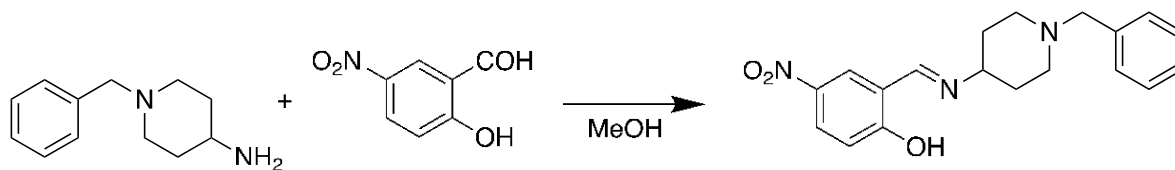
IR (ATR): 3024, 2937, 2797, 2753, 1634, 1586, 1490, 1470, 1454, 1384, 1330, 1270, 1219, 1162, 1141, 1074, 1040, 1019, 982, 921, 840, 787, 740, 699 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočtem C, 74.05; H, 7.46; N, 8.63

nalezeno C, 74.24; H, 7.27; N, 8.69

(E)-2-[[[1-Benzylpiperidin-4-yl]imino]methyl]-4-nitrofenol (AP7)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	339,40
Popis:	šupinovité oranžové krystaly
Výtěžek:	63 %
Teplota tání:	159,5 °C
R _f :	0,11 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.65 (1H, s, OH), 8.79 (1H, s, N=CH), 8.41 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H6), 8.03 (1H, dd, *J* = 9.6, 3.1 Hz, H4), 7.32 – 7.26 (4H, m, CH₂-Ph), 7.24 – 7.19 (1H, m, CH₂-Ph), 6.65 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H3), 3.66 – 3.59 (1H, m, H4'), 3.47 (2H, s, CH₂-Ph), 2.77 – 2.72 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.17 – 2.10 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.94 – 1.88 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.72 – 1.65 (2H, m, H3'B, H5'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 176.48, 165.76, 138.80, 135.24, 132.20, 129.53, 129.32, 128.72, 127.49, 122.40, 114.75, 62.40, 59.37, 51.34, 32.17.

IR (ATR): 2953, 2809, 2766, 1651, 1611, 1546, 1444, 1413, 1367, 1318, 1287, 1232, 1182, 1098, 1029, 793, 748, 735, 701, 632, 615 cm⁻¹.

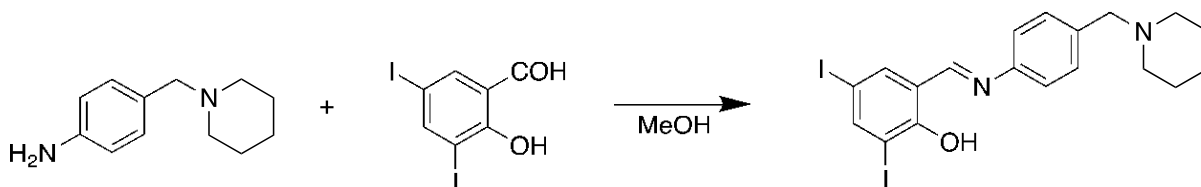
Elementární analýza:

výpočtem C, 67.24; H, 6.24; N, 12.38

nalezeno C, 67.12; H, 6.13; N, 12.30

4.2.1.1. Příprava izomerů od iminu AP2 a AP3

(E)-2,4-Dijod-6-({[4-(piperidin-1-ylmethyl)fenyl]imino}methyl)fenol (AP2_{1z})



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ I ₂ N ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	546,19
Popis:	oranžová krystalická látka
Výtěžek:	67 %
Teplota tání:	139 °C
R _f :	0,12 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.66 (1H, s, OH), 8.87 (1H, s, N=CH), 8.09 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H_{6A}), 7.93 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H_{4A}), 7.42 – 7.37 (2H, m, H_{3B}, H_{5B}), 7.37 – 7.34 (2H, m, H_{2B}, H_{6B}), 3.42 (2H, s, CH₂-Ph), 2.31 – 2.28 (4H, m, H_{2'A}, H_{2'B}, H_{6'A}, H_{6'B}), 1.48 – 1.43 (4H, m, H_{3'A}, H_{3'B}, H_{5'A}, H_{5'B}), 1.38 – 1.33 (2H, m, H_{4'A}, H_{4'B}).

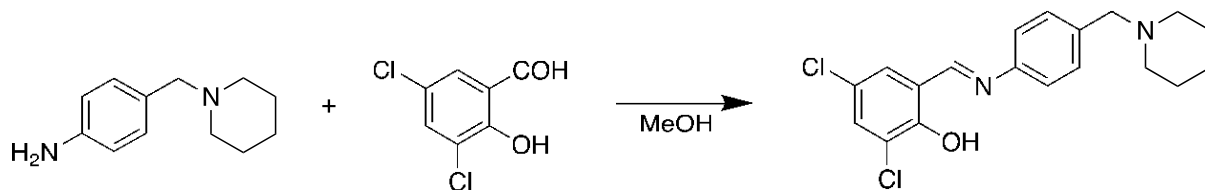
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.87, 161.00, 148.72, 145.08, 141.39, 138.98, 130.44, 121.80, 121.17, 89.16, 81.24, 62.73, 54.38, 26.06, 24.48.

IR (ATR): 3057, 2931, 2849, 2798, 2761, 1616, 1589, 1542, 1506, 1437, 1368, 1291, 1198, 1154, 1123, 1102, 1066, 1038, 995, 961, 865, 856, 846, 785, 738, 657 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 41.78; H, 3.69; N, 5.13
nalezeno C, 41.86; H, 3.61; N, 5.26

(E)-2,4-Dichlor-6-([4-(piperidin-1-ylmethyl)fenyl]imino)methyl)fenol (AP3₁₂)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O
Relativní molekulová hmotnost:	363,28
Popis:	cihlově červená krystalická látka
Výtěžek:	48 %
Teplota tání:	148,5 °C
R _f :	0,17 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.26 (1H, s, OH), 9.00 (1H, s, N=CH), 7.73 – 7.65 (2H, m, H₄, H₆), 7.44 – 7.40 (2H, m, H_{3B}, H_{5B}), 7.40 – 7.37 (2H, m, H_{2B}, H_{6B}), 3.50 (2H, s, CH₂-Ph), 2.40 – 2.33 (4H, m, H_{2'A}, H_{2'B}, H_{6'A}, H_{6'B}), 1.51 – 1.45 (4H, m, H_{3'A}, H_{3'B}, H_{5'A}, H_{5'B}), 1.39 – 1.33 (2H, m, H_{4'A}, H_{4'B}).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.34, 156.68, 145.42, 138.50, 132.80, 131.13, 130.69, 122.40, 122.27, 121.86, 120.97, 62.45, 54.23, 25.83, 24.29.

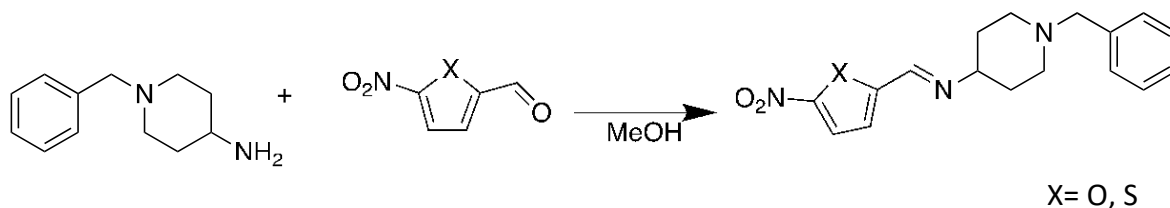
IR (ATR): 2939, 2918, 2799, 2758, 1618, 1599, 1566, 1506, 1455, 1433, 1369, 1353, 1320, 1295, 1201, 1181, 1155, 1107, 1015, 898, 852, 810, 780, 681, 602 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 62.82; H, 5.55; N, 7.71

nalezeno C, 62.98; H, 5.39; N, 7.61

4.2.2. Příprava iminů heterocyklických aldehydů

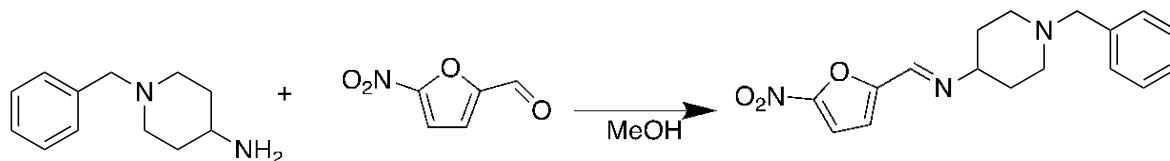


Obr. 3.3. Reakční schéma – příprava heterocyklických iminů odvozených od 4-amino-1-benzylpiperidinu

Pracovní postup:

0,001 mol 4-amino-1-benzylpiperidinu (190,3 mg; 204 μ l) bylo rozpuštěno v 8 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1 ekvivalent příslušného aldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout za míchání stáním volně na vzduchu a následně ponechána 12 hod při laboratorní teplotě. Poté byla krystalizována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. K precipitaci však nedošlo, proto byl roztok odpařen a vzniklá olejovitá látka byla pomocí malého množství ethyl-acetátu přenesena do vialky a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1-(5-nitrofuran-2-yl)methanimin (AP8)



Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	313,36
Popis:	tmavě hnědá olejovitá látka
Výtěžek:	93 %
Teplota tání:	---
R _f :	0,15 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.31 (1H, s, N=CH), 7.71 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H4), 7.31 – 7.27 (4H, m, CH₂-Ph), 7.25 – 7.19 (1H, m, CH₂-Ph), 7.19 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H3), 3.48 (2H, s, CH₂-Ph), 3.35 – 3.25 (1H, m, H4'), 2.85 – 2.79 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.11 – 2.04 (2H, m, 2H, m, H2'B, H6'B), 1.68 – 1.62 (4H, m, H3'A, H3'B, H5'A, H5'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.01, 152.53, 148.84, 138.70, 129.41, 128.70, 127.48, 116.60, 114.50, 67.40, 62.58, 51.77, 33.36.

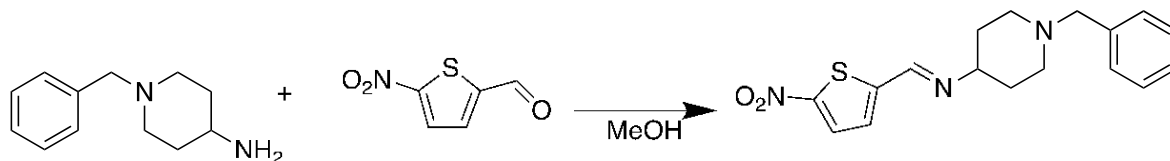
IR (ATR): 3109, 2936, 2822, 1638, 1529, 1489, 1453, 1398, 1351, 1310, 1255, 1142, 1031, 975, 826, 810, 797, 740, 702 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 65.16; H, 6.11; N, 13.41

nalezeno C, 65.24; H, 6.19; N, 13.47

(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1-(5-nitrothiofen-2-yl)methanimin (AP9)



Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₂ S
Relativní molekulová hmotnost:	329,42
Popis:	černá olejovitá látka
Výtěžek:	97 %
Teplota tání:	---
R _f :	0,10 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.56 (1H, s, N=CH), 8.12 – 8.10 (1H, m, H₄), 7.54 – 7.51 (1H, m, H₃), 7.33 – 7.29 (4H, m, CH₂-Ph), 7.26 – 7.22 (1H, m, CH₂-Ph), 3.48 (2H, s, CH₂-Ph), 3.34 (1H, překryv se signálem H₂O, H₄'), 2.85 – 2.78 (2H, m, H₂'A, H₆'A), 2.11 – 2.03 (2H, m, H₂'B, H₆'B), 1.70 – 1.61 (4H, m, H₃'A, H₃'B, H₅'A, H₅'B).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.29, 151.86, 149.08, 138.70, 130.42, 130.23, 128.94, 128.34, 127.04, 65.97, 62.36, 51.45, 33.09.

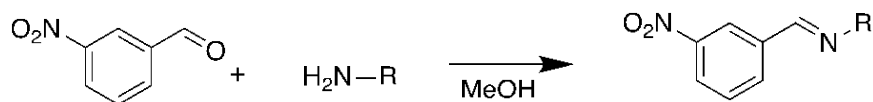
IR (ATR): 3091, 2948, 2803, 2762, 1628, 1565, 1496, 1439, 1341, 1312, 1206, 1121, 1063, 1023, 976, 836, 816, 808, 792, 732, 702, 630 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 61.98; H, 5.81; N, 12.76

nalezeno C, 61.81; H, 5.74; N, 12.63

4.2.3. Příprava iminů z nitrobenzaldehydů

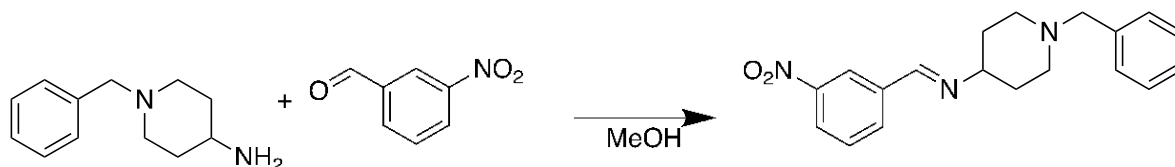


Obr. 3.4. Reakční schéma – příprava iminů z benzaldehydů

Pracovní postup:

0,001 mol 4-amino-1-benzylpiperidinu (190,3 mg; 204 μ l) bylo rozpuštěno v 8 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu příslušného nitrovaného benzaldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a zahřívána za teploty varu rozpouštědla 3 hodiny, pak ponechána zchladnout za míchání stáním volně na vzduchu a následně ponechána 12 hod při laboratorní teplotě. Poté byla krystalizována při teplotě -20 °C po dobu 1 hodiny. Získaný precipitát byl promyt hexanem a krystaly byly vysušeny. Připravená sloučenina byla charakterizována pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-1-(3-nitrofenyl)methanimin (AP10)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	323,40
Popis:	bílá krystalická látka
Výtěžek:	51 %
Teplota tání:	91,8 °C
R _f :	0,10 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): 8.51 (1H, s, N=CH), 8.50 – 8.48 (1H, m, H₂), 8.26 – 8.23 (1H, m, H₆), 8.13 – 8.10 (1H, m, H₄), 7.72 – 7.68 (1H, m, H₅), 7.31 – 7.26 (4H, m, CH₂-Ph), 7.24 – 7.18 (1H, m, CH₂-Ph), 3.46 (2H, s, CH₂-Ph), 3.32 (1H, překryv se signálem H₂O, H₄'), 2.84 – 2.78 (2H, m, H₂'A, H₆'A), 2.10 – 2.02 (2H, m, H₂'B, H₆'B), 1.72 – 1.61 (4H, m, H₃'A, H₅'A, H₃'B, H₅'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.01, 148.66, 139.13, 138.32, 134.61, 130.87, 129.29, 128.68, 127.36, 125.44, 122.32, 66.93, 62.78, 51.94, 33.70.

IR (ATR): 2962, 2798, 2759, 1644, 1526, 1494, 1451, 1355, 1316, 1168, 1137, 1103, 1073, 1058, 1010, 928, 901, 824, 791, 733, 673 cm⁻¹.

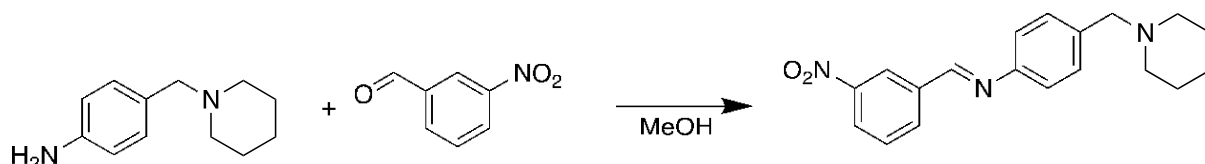
Elementární analýza:

výpočetem C, 70.57; H, 6.55; N, 12.99

nalezeno C, 70.69; H, 6.45; N, 12.91

4.2.3.1 Příprava izomeru od iminu AP10

(E)-1-(3-Nitrofenyl)-N-[[4-(piperidin-1-yl)methyl]fenyl]methanimin (AP10_{iz})



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	323,40
Popis:	hnědá krystalická látka
Výtěžek:	52 %
Teplota tání:	83,9 °C
R _f :	0,13 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.79 (1H, s, N=CH), 8.70 – 8.68 (1H, m, H_{2A}), 8.35 – 8.31 (2H, m, H_{4A}, H_{6A}), 7.80 – 7.75 (1H, m, H_{5A}), 7.31 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H_{3B}, H_{5B}), 7.26 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H_{2B}, H_{6B}), 3.40 (2H, s, CH₂-Ph), 2.31 – 2.27 (4H, m, H_{2'A}, H_{2'B}, H_{6'A}, H_{6'B}), 1.49 – 1.42 (4H, m, H_{3'A}, H_{3'B}, H_{5'A}, H_{5'B}), 1.38 – 1.30 (2H, m, H_{4'A}, H_{4'B}).

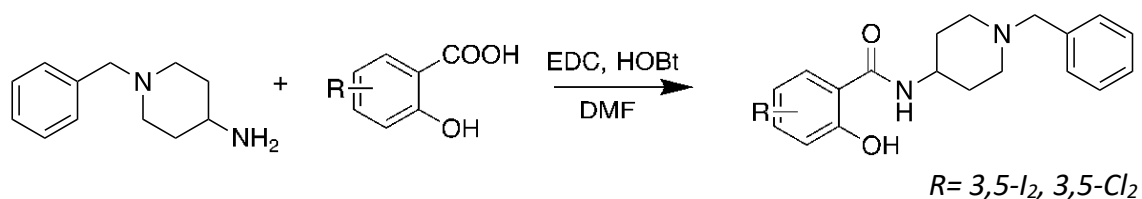
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 158.77, 149.70, 148.76, 138.21, 135.07, 131.04, 130.16, 126.08, 124.58, 123.18, 121.57, 62.89, 54.41, 26.10, 24.55.

IR (ATR): 3069, 2929, 2881, 2760, 1702, 1691, 1614, 1524, 1470, 1446, 1350, 1322, 1201, 1102, 1086, 1077, 995, 936, 866, 846, 784, 730, 676, 648 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 70.57; H, 6.55; N, 12.99
nalezeno C, 70.65; H, 6.67; N, 12.86

4.2.4. Příprava amidů

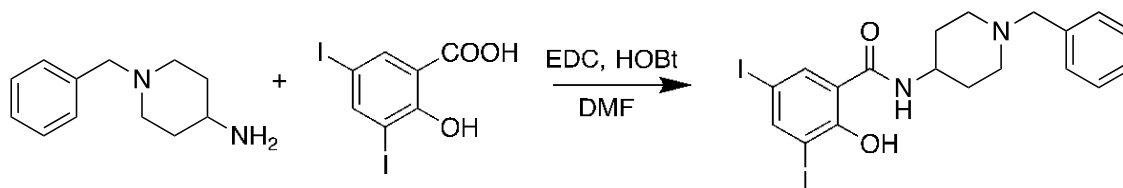


Obr. 3.5. Reakční schéma – příprava amidů ze salicylových kyselin

Pracovní postup:

1 mmol příslušné kyseliny salicylové byl rozpuštěn v 20 ml DMF, baňka byla ochlazená externě ledem na 0 °C. Byl přidán 1 mmol 4-amino-1-benzylpiperidinu (190,3 mg; 204 μ l), 1 ekvivalent 1-hydroxybenzotriazolu (HOBT monohydrát) a 1,3 ekvivalentu ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC; 249 mg). Reakční směs byla po 24 h míchání za laboratorní teploty odpařena do sucha, pomocí dichlormethanu a vody přenesena do dělicí nálevky a vytřepána solankou. Organická fáze byla vysušena stáním nad síranem sodným. Filtrát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce ke krystalizaci. Výsledné látky krystalizovaly ze soustavy ethyl-acetát/hexan. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot R_f .

(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-2-hydroxy-3,5-dijodbenzamid (AP11)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ I ₂ N ₂ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	562,19
Popis:	bílá krystalická látka
Výtěžek:	25 %
Teplota tání:	150 °C
R _f :	0,13 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.78 (1H, s, OH), 9.44 (1H, bs, CONH), 8.15 (1H, s, H6), 8.03 (1H, s, H4), 7.39 – 7.26 (5H, m, CH₂-Ph), 3.87 – 3.78 (1H, m, H4'), 3.70 (2H, s, CH₂-Ph), 2.98 – 2.93 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.41 – 2.26 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.86 – 1.80 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.66 – 1.57 (2H, m, H3'B, H5'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.73, 157.47, 149.28, 147.37, 138.60, 136.28, 130.05, 128.94, 128.28, 122.04, 117.48, 61.55, 52.00, 46.79, 30.70.

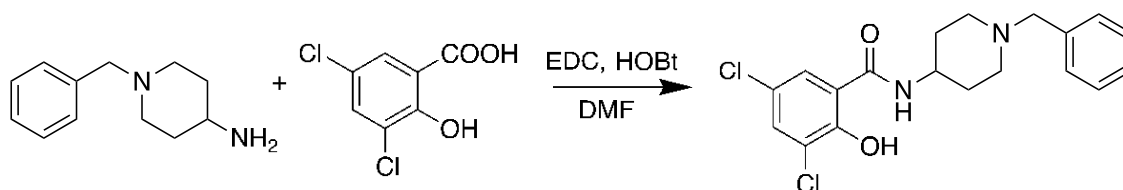
IR (ATR): 3237, 2973, 1627, 1594, 1556, 1531, 1440, 1395, 1312, 1223, 1167, 1080, 1040, 945, 915, 887, 746, 695, 660, 630 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 41.78; H, 3.69; N, 5.13

nalezeno C, 41.89; H, 3.75; N, 5.21

(E)-N-(1-Benzylpiperidin-4-yl)-3,5-dichlor-2-hydroxybenzamid (AP12)



Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	379,28
Popis:	oranžová krystalická látka
Výtěžek:	39 %
Teplota tání:	232 °C
R _f :	0,10 (toluen/ethyl-acetát 4:1)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.45 (1H, s, OH), 9.75 (1H, bs, CONH), 7.88 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H6), 7.54 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H4), 7.36 – 7.22 (5H, m, CH₂-Ph), 3.86 – 3.77 (1H, m, H4'), 3.66 (2H, s, CH₂-Ph), 2.97 – 2.88 (2H, m, H2'A, H6'A), 2.34 – 2.27 (2H, m, H2'B, H6'B), 1.85 – 1.80 (2H, m, H3'A, H5'A), 1.64 – 1.55 (2H, m, H3'B, H5'B).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.67, 158.57, 136.69, 134.95, 132.69, 129.95, 128.88, 128.16, 126.70, 123.78, 117.88, 61.71, 51.99, 46.63, 30.87.

IR (ATR): 2970, 1639, 1580, 1543, 1450, 1440, 1390, 1375, 1306, 1278, 1206, 1143, 1079, 1043, 959, 947, 872, 790, 759, 745, 698, 648, 605 cm⁻¹.

Elementární analýza:

výpočetem C, 62.82; H, 5.55; N, 7.71

nalezeno C, 62.91; H, 5.47; N, 7.63

4.3. Biologické hodnocení

4.3.1. Antibakteriální aktivita

U připravených látek byla hodnocena antibakteriální aktivita, ta byla stanovena proti osmi klinicky významným kmenům. Jednalo se o čtyři Gram-pozitivní kmeny: *Staphylococcus aureus* (SA), subsp. *aureus* ATCC 29213, CCM 4223, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), subsp. *aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* (SE), ATCC 12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* (EF), ATCC 29212, CCM 4224. A dále čtyři Gram-negativní kmeny: *Escherichia coli* (EC), ATCC 25922, CCM 2954, *Klebsiella pneumoniae* (KP), ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* (ACI), ATCC 19606, DSM 30007, *Pseudomonas aeruginosa* (PA), ATCC 27853, CCM 3955.

Antibakteriální aktivita byla stanovena pomocí mikrodiluční bujonové metody v destičkách dle standardu EUCAST. Každá jamka v mikrodiluční destičce obsahovala 200 μ l media a 10 μ l suspenze inokula. Jako medium byl použit Mueller Hintonův bujon č.2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulum odpovídalo velikosti 0,5 dle stupnice McFarlanda ($1,5 \times 10^8$ CFU (colony forming units)/ml). Inkubace proběhla za následujících podmínek, teplota inkubace byla $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$, délka inkubace byla 24-48 h, inkubace byla statická, ve tmě a při humidní atmosféře. Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO a její výsledná koncentrace byla 0,49-500 μ mol/l. Po inkubaci testovaných látek s osmi klinicky významnými kmeny byl proveden odečet MIC (μ mol/l) [41]. Jako standard byl použit piperacillin (PIP).

Hodnota MIC odpovídá 95 % inhibovaných bakterií [42]. Hodnota inhibovaného růstu bakterií byla stanovena vizuálně, popřípadě za pomoci barevného indikátoru AlamarBlue. Všechny hodnoty antibakteriální aktivity stanovila paní Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

4.3.2. Antifungální aktivita

U připravených látek byla dále sledována jejich antifungální aktivita. Opět bylo vybráno osm klinicky významných kmenů, tentokrát patogenních hub. Jednalo se o čtyři 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 opět použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách dle standardů EUCAST, každá jamka s obsahem 200 μ l média a 10 μ l suspenze inokula. Jako médium byl použit agar RPMI 1640 s glutamanem a 2 % glukózou a pH bylo upraveno na 7,0 za požití pufru 3-(*N*-morfolino)propansulfonové kyseliny o koncentraci 0,165 mol. Výsledné inokulum mělo velikost $0,5-2 \times 10^5$ CFU/ml. Podmínky inkubace byly nastaveny na délku 24-48 h (v případě TI 5-7 dní), teplota inkubace byla 35 ± 2 °C (v případě TI 25-28 °C), inkubace probíhala staticky, ve tmě a při humidní atmosféře [38]. Jako standard byl použit flukonazol (FLU).

Po inkubaci syntetizovaných látek s osmi klinicky významnými kmeny patogenních hub byly odečteny hodnoty MIC, tedy hodnota minimálně 95% inhibice růstu [42]. Hodnoty MIC byly odečteny vizuálně. Hodnoty MIC pro antifungální aktivitu stanovila paní Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

4.3.3. Antimykobakteriální aktivita

Aktivita proti mykobakteriím byla stanovena za pomoci pěti kmenům mykobakterií, a to konkrétně *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycolicibacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra.

Metoda pro stanovení aktivity byla použita opět mikrodiluční bujónová metoda na 96-jamkové mikrotitrační destičce. V každé jamce bylo kultivační médium, kterým byl Middlebrook agar 7H9 s 0,4 % glycerolu a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC. Suspenze inokula byla upravena na hodnotu 0,1 dle stupnice McFarlanda. Příprava vzorků jednotlivých sloučenin probíhala následovně, nejprve byly vzorky rozpuštěny v DMSO a následně byl přidán Middlebrookův bujón, konečná koncentrace testovaných sloučenin odpovídala 0,25-500 μ g/ml. Jako standard byl použit isoniazid (INH).

Podmínky inkubace byly definovány při 37 °C, statická inkubace ve tmě. Čas inkubace se pro jednotlivé kmeny lišil. *M. smegmatis* 48 hodin, *M. aurum* 72 hodin, *M.*

tuberculosis 120 hodin, po této době inkubace bylo do všech jamek destičky přidáno barvivo, připravené rozpuštěním sodné soli resazurinu v deionizované vodě a 10 % vodného roztoku Tween 80. Mikrotitrační destička byla inkubována po dobu 2,5 hod s tímto barvivem, sloužící k detekci MIC. MIC byla po uplynulé době inkubace odečtena vizuálně na základě změny barvy jamek. Růžově zbarvená jamka značí neaktivní sloučeninu, modré zbarvení jamky znamená aktivní sloučeninu [43].

Antimykobakteriální aktivitu stanovil dr. Ondřej Jandourek z Katedry biologických a lékařských věd.

4.3.4. Inhibice cholinesteráz

Látky byly dále otestovány, zda vykazují anticholinesterázovou aktivitu. U nově syntetizovaných látek byla stanovena hodnota IC_{50} . Tato hodnota udává koncentraci látky, která inhibuje enzym cholinesterázu z padesáti procent, tedy způsobí pokles její aktivity na polovinu.

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla připravena reakční směs o celkovém objemu 2 ml. Obsahovala 0,8 ml fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4. Dále 0,4 ml Ellmanova činidla (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina), DTNB) o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M. Směs obsahovala 0,08 ml roztoku acetyl- či butyrylthiocholinu o koncentraci 0,001 M. V reakční směsi byla dále odpovídající cholinesteráza o aktivitě 0,2 U.

Metoda pro stanovení IC_{50} byla použita spektrofotometrická Ellmanova metoda. Princip metody spočívá v kvantifikaci -SH nebo -S-S- skupin. Při reakci vzniká hydrolýzou acetylthiocholinu (butyrylthiocholinu) vlivem příslušné cholinesterázy thiocholin. Ten dále reaguje s Ellmanovým činidlem za vzniku žlutého produktu 5-thio-2-nitrobenzoátu, který je následně detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412nm.

Metoda byla provedena ve zkumavkách. Do každé zkumavky se kromě výše definované reakční směsi napipetoval inhibitor, který byl pomocí deionizované vody zředěn na různé koncentrace. Jako standard byl použit rivastigmin. Kromě stanovení hodnoty IC_{50} pro enzym acetylcholinesterázu (AChE) byla hodnota stanovena i pro enzym butyrylcholinesterázu (BChE) [44].

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Chemie

Cílem diplomové práce byla syntéza patnácti nových sloučenin odvozených od 4-amino-1-benzylpiperidinu nebo jeho izomeru 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu. Jejich design vycházel z předchozích prací.

Pomocí jednokrokových reakcí bylo připraveno devět iminů ze salicylaldehydů (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7, AP2_{IZ}, AP3_{IZ}), dále byly připraveny dva iminy z heterocyklických aldehydů (AP8 a AP9) a dva iminy z 3-nitrobenzaldehydu, přičemž první imin vycházel z 4-amino-1-benzylpiperidinu (AP10) a druhý byl připraven z jeho izomeru 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu (AP10_{IZ}). Dále byly připraveny dva amidy ze salicylových kyselin (AP11 a AP12).

Syntéza iminů s kódem AP1, AP2, AP4, AP5, AP6, AP7, AP2_{IZ} a AP3_{IZ} probíhala dle pilotní metody bez dalších úprav. Syntéza iminu s kódem AP3 se od pilotní metody lišila ve fázi krystalizace, kdy nedošlo ke vzniku precipitátu, a tak byla reakční směs odpařena a vzniklá olejovitá látka byla přenesena za pomoci ethyl-acetátu do vialky. Všechny reakce na přípravu iminů proběhly s výtěžkem produktu 26-97 % a výsledné krystaly produktů byly dostatečně čisté. Nejmenší výtěžky byly u AP4 (26 %) a u AP6 (30 %). Důvodem by mohl být substituent na použitém salicylaldehydu, u AP4 methyl a v případě AP6 methoxy skupina. Patrně způsobeno lepší rozpustností v rozpouštědle (alkohol), což vedlo k menšímu množství vykrystalizované sloučeniny.

Syntéza amidů AP11 a AP12 probíhala podle pilotní reakce. Reakce na přípravu amidů proběhly s výtěžky mezi 25 a 39 %. Výsledné krystaly obou amidů se podařilo připravit v dostatečné čistotě potřebné pro možné stanovení antimikrobiálních aktivit i enzymové inhibice.

Nevyšší hodnoty výtěžků (93 a 97 %) byly pozorovány u iminů vycházejících z heterocyklických aldehydů s kódem AP8 a AP9, obě látky byly olejovitého charakteru. Výtěžek 97 % u látky AP9 byl nejvyšším ze všech připravených látek, stejný byl ještě u látky s kódem AP3.

5.2. Biologie

5.2.1. Antimikrobní aktivita

Všechny připravené látky byly podrobeny stanovení antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivity, a to za pomoci mikrodiluční bujónové metody v mikrotitrační destičce. Výsledky testování antimikrobiální aktivity můžeme vidět v následujících tabulkách antibakteriální aktivity (viz *Tabulka 1 a Tabulka 2*), antifungální aktivity (viz *Tabulka 3 a Tabulka 4*) a antimykobakteriální aktivity (viz *Tabulka 5*). Kromě antimikrobiálního testování byly všechny látky otestovány na schopnost inhibice AChE a BChE, výsledky této aktivity viz níže *Tabulka 6*.

Z výsledků můžeme vidět, že antibakteriální aktivitu mají pouze některé nově připravené látky (AP2, AP3, AP6, AP7), přičemž aktivitu vykazují hlavně vůči Gram-pozitivním stafylokokům. Nejvyšší antibakteriální aktivita ($\geq 15,62 \mu\text{mol/l}$) se projevila u derivátu thiofenového aldehydu AP9. Vysokou antibakteriální aktivitu projevili i 3,5-dijodovaný imin AP2 a derivát 5-nitrofuranu AP8, oba se stejnou aktivitou MIC ($\geq 62,5 \mu\text{mol/l}$). Účinné, i když méně, jsou i salicylaldehydové iminy AP6 s 5-methoxy skupinou (MIC od $125 \mu\text{mol/l}$) a AP3, což je 3,5-dichlorovaný derivát ($\geq 250 \mu\text{mol/l}$). Iminy odvozené od heterocyklických karbaldehydů byly též jako skoro jediné účinné i vůči Gram-negativním patogenům s výjimkou PA, ale v porovnání s Gram-pozitivními kmeny při vyšších koncentracích (MIC od $125 \mu\text{mol/l}$).

Nově nasyntetizované amidy antibakteriální aktivitu spíše nevykazovaly. Amid AP12 je aktivní pouze pro SA a MRSA ($500 \mu\text{mol/l}$).

		KMEN (kód)	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	
MIC/IC95 [μmol/l]	SA	24 h	>125	62,5	250	>125	>250	125	
		48 h	>125	62,5	250	>125	>250	250	
	MRSA	24 h	>125	125	500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	125	500	>125	>250	>500	
	SE	24 h	>125	62,5	250	>125	>250	125	
		48 h	>125	62,5	250	>125	>250	125	
	EF	24 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
	EC	24 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
	KP	24 h	>125	>125	500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	>125	500	>125	>250	>500	
	ACI	24 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
	PA	24 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
		48 h	>125	>125	>500	>125	>250	>500	
			KMEN (kód)	AP7	AP8	AP9	AP11	AP12	PIP
	SA	24 h	500	125	15,62	>500	500	3,7	
		48 h	>500	500	62,5	>500	500	3,7	
	MRSA	24 h	250	250	31,25	>500	500	29,6	
		48 h	>500	>500	125	>500	>500	29,6	
	SE	24 h	500	62,5	31,25	>500	500	0,23	
		48 h	>500	125	125	>500	>500	0,23	
	EF	24 h	>500	500	125	>500	>500	3,7	
		48 h	>500	>500	500	>500	>500	3,7	
	EC	24 h	>500	500	125	>500	>500	7,41	
		48 h	>500	>500	500	>500	>500	7,41	
	KP	24 h	>500	250	125	>500	>500	>59,31	
48 h		>500	500	500	>500	>500	>59,31		
ACI	24 h	>500	250	125	>500	>500	59,31		
	48 h	>500	500	500	>500	>500	59,31		
PA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	29,66		
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	29,66		

Tabulka 1 Výsledky antimikrobiální aktivity

Na základě těchto výsledků byly od nejaktivnějších iminů připraveny izomery, s použitím izomerního aminu, 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu a příslušné kyseliny. Byly to izomery od aktivních dihalogenových iminů AP2 a AP3 a dále byly připraveny dva

iminy odvozené od nitrobenzaldehydů (AP10 a AP10_{iz}), neboť nitroskupina vykazovala příznivý vliv na antibakteriální aktivitu (viz AP7, AP8 a AP9).

Výsledky testování antibakteriální aktivity u těchto iminů byly velmi povzbudivé, oba izomery AP2_{iz} a AP3_{iz} vykazovaly lepší výsledky než původní molekula AP2. AP2_{iz} projevil nejlepší antibakteriální aktivitu ze všech připravených látek (15,62 μmol/l) a jsou vůči němu citlivé všechny testované kmeny kromě *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky jsou shrnuty v tabulce níže (Tabulka 2).

MIC/IC ₉₅ [μmol/l]	KMEN (kód)		AP2 _{iz}	AP3 _{iz}	AP10	AP10 _{iz}
		SA	24 h	31,25	125	>500
48 h			125	>125	>500	>500
MRSA		24 h	31,25	>125	>500	>500
		48 h	62,5	>125	>500	>500
SE		24 h	15,62	125	>500	>500
		48 h	62,5	>125	>500	>500
EF		24 h	125	>125	>500	>500
		48 h	125	>125	>500	>500
EC		24 h	125	>125	>500	>500
		48 h	250	>125	>500	>500
KP		24 h	125	>125	>500	>500
		48 h	250	>125	>500	>500
ACI		24 h	125	>125	>500	>500
		48 h	250	>125	>500	>500
PA		24 h	>250	>125	>500	>500
		48 h	>250	>125	>500	>500

Tabulka 2 Výsledky antimikrobiální aktivity

Připravené látky vykazovaly mírně vyšší antimykotickou aktivitu nežli antibakteriální (viz Tabulka 1 a 3). Vysokou citlivost vykazovaly kvasinky a *Trichophyton interdigitale*.

Nejvyšší antifungální aktivitu (MIC/IC₉₅ od 15,62 μmol/l) jsme pozorovali u diiodovaného iminu AP2. Pro srovnání imin s jedním atomem jodu AP5 vykazoval nižší antifungální aktivitu (MIC/IC₉₅ od 125 μmol/l). Druhá významná antifungální aktivita (MIC/IC₉₅ od 62,5 μmol/l) byla pozorována u dichlorovaného iminu AP3, kdežto monochlorovaný imin nevykazoval žádnou antifungální aktivitu. Dobrou antifungální aktivitu vykazovaly i iminy AP7, AP8 a zcela nejlepší byl AP9 (viz Tabulka 3).

	KMEN (kód)	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	
MIC/IC95 [μmol/l]	CA 24 h	>125	15,62	62,5	>125	125	>500	
	48 h	>125	31,25	62,5	>125	250	>500	
	CK 24 h	>125	15,62	125	>125	125	>500	
	48 h	>125	62,5	125	>125	>250	>500	
	CP 24 h	>125	15,62	125	>125	125	>500	
	48 h	>125	62,5	250	>125	>250	>500	
	CT 24 h	>125	15,62	125	>125	>250	>500	
	48 h	>125	15,62	250	>125	>250	>500	
	AF 24 h	>125	250	250	>125	>250	>500	
	48 h	>125	500	500	>125	>250	>500	
	AFla 24 h	>125	500	500	>125	>250	>500	
	48 h	>125	500	>500	>125	>250	>500	
	AC 24 h	>125	>500	>500	>125	>250	>500	
	48 h	>125	>500	>500	>125	>250	>500	
	TI 24 h	>125	31,35	250	>125	>250	>500	
	48 h	>125	31,25	250	>125	>250	>500	
		KMEN (kód)	AP7	AP8	AP9	AP11	AP12	FLU
	CA 24 h	500	500	62,5	>125	>500	3,3	
	48 h	500	500	62,5	>125	>500	ND	
	CK 24 h	500	125	31,25	>125	>500	>104,5	
	48 h	500	250	62,5	>125	>500	ND	
	CP 24 h	>500	500	62,5	>125	>500	6,5	
	48 h	>500	500	125	>125	>500	ND	
	CT 24 h	500	500	62,5	>125	>500	13,1	
48 h	>500	500	125	>125	>500	ND		
AF 24 h	500	500	250	>125	>500	>104,5		
48 h	>500	500	500	>125	>500	>104,5		
AFla 24 h	>500	>500	250	>125	>500	>104,5		
48 h	>500	>500	500	>125	>500	>104,5		
AC 24 h	500	>500	500	>125	>500	>104,5		
48 h	500	>500	500	>125	>500	>104,5		
TI 24 h	250	500	250	>125	>500	52,2		
48 h	250	500	500	>125	>500	52,2		

Tabulka 3 Výsledky antifungální aktivity

Z devíti připravených iminů se nejvíce aktivní jevíly AP2 a AP3, z toho důvody byly připraveny izomery AP2_{iz} a AP3_{iz} od původních látek AP2 a AP3.

Výsledky izomerů byly opět velmi dobré. Vůbec nejvyšší aktivitu ze všech připravených látek vykazoval AP2_{iz} (MIC od 1,95 μmol/l), zároveň byl účinný vůči všem

testovaným kmenům. AP3_{iz} vykazoval podobné výsledky v aktivitě jako původní látka AP3 (MIC ≥62,5 μmol/l), (viz *Tabulka 4*).

MIC/IC ₉₅ [μmol/l]	KMEN (kód)		AP2 _{iz}	AP3 _{iz}	AP10	AP10 _{iz}
	CA	24 h	1,95	62,5	>500	>500
		48 h	3,9	62,5	>500	>500
	CK	24 h	7,81	62,5	>500	>500
		48 h	15,62	125	>500	>500
	CP	24 h	31,25	125	>500	>500
		48 h	62,5	125	>500	>500
	CT	24 h	7,81	125	>500	>500
		48 h	15,62	125	>500	>500
	AF	24 h	125	125	>500	>500
48 h		250	>125	>500	>500	
AFla	24 h	125	>125	>500	>500	
	48 h	250	>125	>500	>500	
AC	24 h	250	>125	>500	>500	
	48 h	>250	>125	>500	>500	
TI	5 dní	7,81	125	>500	>500	
	7 dní	15,62	125	>500	>500	

Tabulka 4 Výsledky antifungální aktivity

Všechny připravené látky byly hodnoceny i na antimykobakteriální aktivitu. Všechny připravené iminy vykazovaly aktivitu. Nejvíce aktivní (MIC/IC₉₅ od 3,125 μg/ml) byl imin AP9. Druhá nejvyšší aktivita byla pozorována u AP3_{iz} (15, 625 μg/ml). Vysoká aktivita byla pozorována u iminů AP2 a AP3 (od 31,25 μg/ml). Ale i další iminy vykazovaly vyhovující aktivitu (62,5 μg/ml), a to konkrétně AP1, AP5 a AP6 (viz *Tabulka 5*). Amidy vykazovaly nižší aktivitu, amid AP11 je prakticky neaktivní.

MIC [μg/ml]	KMEN (kód)	AP1	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8
	<i>M. smeg.</i>	250	125	125	>500	125	>500	250	125
	<i>M. aurum</i>	125	62,5	62,5	>500	125	125	125	62,5
	<i>M. avium</i>	250	62,5	125	250	250	>500	125	125
	<i>M.kansasii</i>	62,5	31,25	31,25	125	62,5	62,5	31,5	7,81
	<i>M. tbc_{H37Ra}</i>	125	62,5	62,5	500	250	250	125	7,81
	KMEN (kód)	AP9	AP2 _{iz}	AP3 _{iz}	AP10	AP10 _{iz}	AP11	AP12	INH
	<i>M. smeg.</i>	31,25	250	124	>500	250	>500	125	7,81
	<i>M. aurum</i>	31,25	125	62,5	62,5	62,5	500	125	3,91
	<i>M. avium</i>	15,625	62,5	62,5	125	125	>500	125	1000
<i>M.kansasii</i>	3,125	31,25	15,625	31,25	125	125	31,25	6,25	
<i>M. tbc_{H37Ra}</i>	7,81	62,5	62,5	250	125	>500	250	0,25	

Tabulka 5 Výsledky antimykobakteriální aktivity

5.2.2. Inhibice cholinesteráz

Všechny nově syntetizované látky byly také hodnoceny na inhibici enzymů AChE a BChE. Aktivita je vyjádřena pomocí hodnot IC_{50} . Všechny připravené látky jsou aktivními inhibitory cholinesteráz. Dále byl výpočtem IC_{50} pro AChE/BChE určen index selektivity (SI), který určuje míru výlučnosti inhibice jednotlivých cholinesteráz. Hodnota pod 0,1 značí selektivitu k AChE, hodnoty nad 10 k BChE. Hodnoty mezi těmito hranicemi značí neselektivní inhibici. Selektivními látkami k enzymu acetylcholinesteráza se ukázaly být 3,5-dichlorovaný imin AP3_{iz} (SI = 0,06) a nitrovaný imin AP10_{iz} (SI = 0,02). 3,5-Dijodovaný imin AP2 naopak vykazuje jako jediný preferenční inhibici butyrylcholinesterázy, ale i zde se stále jedná o neselektivní inhibici (SI = 1,33). Kromě tohoto diiodovaného iminu AP2 jsou tedy všechny připravené sloučeniny silnější inhibitory AChE než BChE.

IC_{50} [μ mol]		AChE [μ mol/l]	BChE [μ mol/l]	SI (IC_{50} AChE/ IC_{50} BChE)
	AP1	7,56±0,40	15,17±0,07	0,50
AP2	24,40±0,98	18,33±0,32	1,33	
AP3	12,94±0,73	25,80±0,73	0,50	
AP4	16,62±0,42	18,58±0,56	0,89	
AP5	12,07±0,43	18,92±0,49	0,63	
AP6	3,81±0,09	19,16±1,06	0,20	
AP7	4,90±0,12	41,57±1,98	0,11	
AP8	7,12±0,32	22,28±0,26	0,32	
AP9	2,91±0,03	19,15±0,16	0,15	
AP10	4,38±0,08	25,50±1,32	0,17	
AP2 _{iz}	1,62±0,02	7,00±0,39	0,23	
AP3 _{iz}	0,60±0,003	9,22±0,43	0,06	
AP10 _{iz}	0,23±0,03	9,90±0,04	0,02	
AP11	5,63±0,16	52,38±0,71	0,11	
AP12	13,84±0,29	34,83±0,34	0,40	
Rivastigmin	56,10±1,41	38,40±1,97	1,46	

Tabulka 6 Výsledky inhibice cholinesterázy

6 ZÁVĚR

Nutnost syntézy nových antimikrobních látek je z důvodu rychle se rozvíjející antibiotické rezistence klíčová. Vedle dodržování antibiotické politiky a racionální terapie je syntéza a vývoj nových léčiv hlavním přístupem pro boj s touto rezistencí.

V rámci této diplomové práce bylo připraveno a hodnoceno celkem patnáct sloučenin odvozených od 4-amino-1-benzylpiperidinu nebo jeho izomeru 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu. Syntéza vedla ke vzniku třinácti iminů a dvou amidů. Do reakce byly voleny různě substituované aldehydy, které byly voleny na základě v předchozích pracích zjištěné antimikrobiální aktivity. Substituenty byly voleny tak, aby bylo možné porovnávat antimikrobiální aktivitu nových sloučenin na základě právě těchto substituentů. Všechny nově připravené látky byly syntetizovány v dostatečném výtěžku a jejich čistota dosahovala standardu nutného pro testování antimikrobiální aktivity.

Antimikrobní vlastnosti vykazovaly pouze iminy, a to hlavně dijodované, dichlorované a s nitro skupinou, také ty odvozené od 5-nitrothiofen/furan-2-karbaldehydu. Na základě tohoto zjištění byla následně připravena druhá sada sloučenin se stejně substituovanými aldehydy, ale s použitím izomeru výchozího aminu, a to 4-(piperidin-1-ylmethyl)anilinu. Tyto izomery původních iminů vykazovaly ještě lepší antimikrobní vlastnosti.

Při testování aktivity k enzymům AChE a BChE jsme došli k zjištění, že selektivními iminy k AChE jsou 3,5-dichlorovaný imin AP3_{IZ} a nitrovaný imin AP10_{IZ}. Více selektivním pro BChE se ukázal být 3,5-dijodovaný imin AP2.

Na základě zjištění výsledků testování antimikrobní aktivity, budou dalšími kroky stanovení mechanismu účinku jednotlivých antimikrobních látek, které vykazovaly pozitivní výsledky, stanovení aktivity vůči rezistentním klinickým izolátům, a dále stanovení jejich toxicity na lidské buněčné lince.

U selektivních inhibitorů AChE a BChE se další zkoumání bude upírat k zjištění reverzibility a typu inhibice AChE a BChE.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.1. Vertikální přenos rezistence	19
Obr. 1.2. Horizontální přenos rezistence – transformace	20
Obr. 1.3. Horizontální přenos rezistence – transdukce	21
Obr. 1.4. Horizontální přenos rezistence – konjugace	22
Obr. 2.1. Design cílových molekul	27
Obr. 3.1. Princip číslování sloučenin	29
Obr. 3.2. Reakční schéma – příprava iminů ze salicylaldehydů	30
Obr. 3.3 Reakční schéma – příprava iminů odvozených od 4-amino-1-benzylpiperidinu	41
Obr. 3.4. Reakční schéma – příprava iminů z benzaldehydů	44
Obr. 3.5. Reakční schéma-příprava amidů ze salicylových kyselin	47

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výsledky antimikrobiální aktivity	55
Tabulka 2 Výsledky antimikrobiální aktivity	56
Tabulka 3 Výsledky antifungální aktivity	57
Tabulka 4 Výsledky antifungální aktivity	58
Tabulka 5 Výsledky antimykobakteriální aktivity	58
Tabulka 6 Výsledky inhibice acetylcholin esterázy	59

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] M. Votava, *Klinická mikrobiologie*, Masarykova univ. Brno, 2014.
- [2] P. Murrey, *Medical Microbiology, 8th edition*, Elsevier. Philadelphia, 2016.
- [3] M. Bednář, V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček, and J. Vávra, *Lékařská mikrobiologie. bakteriologie, virologie, parazitologie*, Marvil. Praha, 1996.
- [4] J. Beneš, *Antibiotika. Systematika, vlastnosti, použití*, Grada. Praha, 2018.
- [5] 'Antibiotická rezistence', státní zdravotní ústav. Accessed: Jun. 26, 2023. [Online]. Available: <https://www.antibiotickarezistence.cz/jak-antibiotika-funguji/>
- [6] 'SUKL'. Accessed: Oct. 10, 2023. [Online]. Available: <https://www.sukl.cz/vseobecne-informace-2>
- [7] G. Mahajan and L. Balachandran, 'Sources of antibiotics: Hot springs', *Biochem Pharmacol*, vol. 134, pp. 35–41, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.021.
- [8] 'Penicillium chrygenum', VŠCHT. Accessed: Jun. 26, 2023. [Online]. Available: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/penchr.htm>
- [9] R. E. de L. Procópio, I. Reis da Silva, M. K. Martins, J. Lúcio de Azevedo, and J. Magali de Araújo, 'Antibiotics produced by Streptomyces', *The Brazil J Inf Diseases*, vol. 16, no. 5, pp. 466–471, 2012, Accessed: Jun. 26, 2023. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- [10] J. Havlík, 'Současné možnosti „starších“ antibiotik v terapeutické praxi', *Klin farmakol*, vol. 17, pp. 183–185, 2003, Accessed: Jun. 26, 2023. [Online]. Available: https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200303-0012_Soucasne_moznosti_-starsich-_antibiotik_v_terapeticke_praxi.php
- [11] J. Marie Frère, 'Mechanism of action of β -lactam antibiotics at the molecular level', *Biochem Pharmacol*, vol. 26, no. 23, pp. 2203–2210, 1977, doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(77\)90280-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(77)90280-5).

- [12] L. Moreira Lima, B. Nascimento Monteiro da Silva, G. Barbosa, and E. Barreiro, 'β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective', *Eur J Med Chem*, vol. 15, no. 208, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.
- [13] L. McCoy, Y. Xie, and Y. Tor, 'Antibiotics that target protein synthesis', *WIREs RNA*, vol. 2, no. 2, pp. 167–320, 2010, doi: 10.1002/wrna.60.
- [14] P. Pourquier and Y. Pommier, 'Topoisomerase I-mediated DNA damage', *Adv Cancer Res*, vol. 80, pp. 189–216, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(01\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(01)80016-6).
- [15] F. You and C. Gao, 'Topoisomerase Inhibitors and Targeted Delivery in Cancer Therapy', *Curr Topics in Med Chem*, vol. 19, no. 9, pp. 713–7229, 2019, doi: 10.2174/1568026619666190401112948.
- [16] D. Hooper and G. Jacoby, 'Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance', *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 6, no. 9, Sep. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a025320.
- [17] S. Straus and R. Hancock, 'Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1758, no. 9, pp. 1215–1223, Sep. 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.009>.
- [18] H. Zhou, B. Cong, Y. Tian, Y. He, and H. Yang, 'Characterization of novel cyclic lipopeptides produced by *Bacillus* sp. SY27F', *Process Biochem*, vol. 83, pp. 206–213, Aug. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.015>.
- [19] T. Schneider, A. Müller, H. Miess, and H. Gross, 'Cyclic lipopeptides as antibacterial agents – Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions', *Int J Med Microbiol*, vol. 304, no. 1, pp. 37–43, Jan. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.009>.
- [20] I. Kotsogianni, T. Wood, F. Alexander, S. Cochrane, and N. Martin, 'Binding Studies Reveal Phospholipid Specificity and Its Role in the Calcium-Dependent Mechanism of Action of Daptomycin', *ACS Infect Dis*, vol. 7, no. 9, pp. 2612–2619, Sep. 2021, doi: DOI10.1021/acsinfecdis.1c00316.

- [21] R. Özaras and F. Tabak, 'Daptomycin', *Klimik J*, vol. 23, no. 2, pp. 35–38, Jul. 2019, doi: 10.5152/kd.2010.12.
- [22] S. Bhardwaj *et al.*, 'Antibiotics and Antibiotic Resistance - Flipsides of the Same Coin', *Curr Pharm Des*, vol. 28, no. 28, pp. 2312–2329, 2022, doi: 10.2174/1381612828666220608120238.
- [23] Patangia. Dharti, A. Ryan, E. Dempsey, C. Stanton, and P. Ross, 'Vertical transfer of antibiotics and antibiotic resistant strains across the mother/baby axis', *Trends Microbiol*, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.tim.2021.05.006.
- [24] R. McInnes, G. McCallum, L. Lamberte, and W. Schaik, 'Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome', *Curr Opin Microbiol*, vol. 53, pp. 35–43, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.mib.2020.02.002.
- [25] A. San Millan, 'Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context', *Trends Microbiol*, vol. 26, no. 12, Jul. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>.
- [26] C. Michaelis and E. Grohmann, 'Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms', *Antibiotics*, vol. 12, no. 2, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12020328.
- [27] J. Liu *et al.*, 'Bacteriophage-Resistant Mutant of *Enterococcus faecalis* Is Impaired in Biofilm Formation', *Front Microbiol*, vol. 13, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.913023.
- [28] A. Delcour, 'Outer membrane permeability and antibiotic resistance', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Prot Proteomics*, vol. 1794, no. 5, pp. 808–816, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>.
- [29] J. Blair, M. Webber, A. Baylay, D. Ogbolu, and L. Piddock, 'Molecular mechanisms of antibiotic resistance', *Nature Rev Microbiol*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2015, doi: 10.1038/nrmicro3380.
- [30] J. Schindler, *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*, Grada. Praha, 2010.
- [31] J. Thiede *et al.*, 'Targeting intracellular p-aminobenzoic acid production potentiates the anti-tubercular action of antifolates', *Sci Rep*, vol. 6, no. 38083, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep38083.

- [32] J. Munita and C. Arias, 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 2, Apr. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [33] H. Žemličková, *Praktikum lékařské mikrobiologie*, Karolinum. Praha, 2019.
- [34] 'EUCAST'. Accessed: Jun. 20, 2023. [Online]. Available: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria
- [35] M. Votava, *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*, Neptun. Brno, 2010.
- [36] 'Inovace VOV'. Accessed: Jun. 20, 2023. [Online]. Available: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/183/page28.html>
- [37] Š. Bursová, M. Dušková, L. Necedová, R. Karpíšková, and P. Myšková, *Mikrobiologické laboratorní metody*, VFU Brno. Brno, 2014.
- [38] 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: <https://doi.org/10.3390/molecules17089426>.
- [39] E. Rogacheva *et al.*, '5-Nitrofurantoin-Tagged Oxazolyl Pyrazolopiperidines: Synthesis and Activity against ESKAPE Pathog', *Molecules*, vol. 28, no. 18, p. 6491, Sep. 2023, doi: 10.3390/molecules28186491.
- [40] M. Shidore *et al.*, 'Benzylpiperidine-Linked Diarylthiazoles as Potential Anti-Alzheimer's Agents: Synthesis and Biological Evaluation', *J Med Chem*, vol. 59, no. 12, pp. 5823–5846, Jun. 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00426.
- [41] M. Krátký *et al.*, 'Insight into the Antibacterial Action of Iodinated Imine, an Analogue of Rafoxanide: a Comprehensive Study of Its Antistaphylococcal Activity', *Microbiol Spectr*, vol. 11, no. 3, Apr. 2023, doi: 10.1128/spectrum.03064-22.
- [42] 'Příručka mikrobiologie pro bakaláře 3. LF UK'. Accessed: Nov. 10, 2023. [Online]. Available: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/mikrobiologie-nova/Prukaz-primy/Prukaz-kultivacni/Antibiotika/Dilucni-metoda>

- [43] M. Krátký *et al.*, 'Improving the antimicrobial activity of old antibacterial drug mafenide: Schiff bases and their bioactivity targeting resistant pathogens', *Futur Med Chem*, vol. 15, no. 3, pp. 255–274, Feb. 2023, doi: <https://doi.org/10.4155/fmc-2022-0259>.
- [44] N.-H. Hounbedji *et al.*, 'Novel Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase Derived from Benzohydrazides: Synthesis, Evaluation and Docking Study', *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 2, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/ph16020172>.

Odkaz 1.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf

Zdroje obrázků

[1] FOUNOU, Luria Leslie, Raspail Carrel FOUNOU a Sabia Yusuf ESSACK. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2016, (7). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>