

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



Syntéza a hodnocení potenciálních antifungálních sloučenin

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2024

Jana Straková

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Poděkování:

Tímto bych ráda upřímně poděkovala všem lidem, díky kterým mohla tato diplomová práce vzniknout. Srdečné poděkování patří mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za jeho pomoc, ochotu, cenné rady a trpělivé vedení práce. Dále paní Idě Dufkové za změření antimikrobiální aktivity a paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., za změření enzymatické aktivity.

Práce byla podpořená 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

Mykotická systémová infekce je často velmi závažná, ať už kvůli imunodeficienci pacientů, vedlejším nežádoucím účinkům dostupných antimykotik či klinické nebo lékové rezistenci. Důraz by měl být proto kladen na včasné určení správné diagnózy, vhodné indikace současných léčiv a především vývoj nových antimykotik (ATM).

Základ všech syntetizovaných sloučenin tvoří molekula kyseliny itakonové (IA), respektive anhydrid IA. Výchozí molekula byla zvolena na základě širokého spektra biologických aktivit, mezi něž patří i antibakteriální a antifungální aktivita. Cílem bylo vytvoření deseti monoamidů pomocí jedнокrokové syntézy anhydridu IA s příslušným chlorovaným anilinem. Tyto monoamidy pak byl cyklizovány za vzniku deseti imidů. Výtěžky reakcí za vzniku monoamidů byly až na dvě odchylky (24 % a 31 %) vysoké a pohybovaly se nad 80 %. Výtěžky reakcí za vzniku imidů byly nižší, pohybovaly se v rozsahu 29 – 86 %.

Antimikrobiální aktivita byla otestována pomocí mikrodiluční bujónové metody u všech imidů a většiny monoamidů. Všechny látky byly neúčinné na gram-negativní bakterie, velmi nízkou aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím projevily látky 1-(2,4,6-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion, 1-(2,6-dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion a 1-(3,4,5-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion. Inhibiční aktivita vůči acetyl- a butyrylcholinesteráze byla otestována u všech sloučenin, avšak výsledkem byly poměrně vysoké hodnoty IC_{50} (nejnižší naměřená hodnota 67,76 μM). Nejvyšší aktivitu projevily testované látky v inhibici hub. Nejlepší naměřené hodnoty MIC (7,81 $\mu mol/l$) vykazovaly látky 1-(2,4,6-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion a 1-(3,4,5-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion proti kmenu *Trichophyton interdigitale*. Všechny měřené biologické a biochemické aktivity závisely jak na počtu atomů chloru v molekule, tak na pozici těchto atomů (nelze říci, že by s rostoucím počtem atomů chloru aktivita vždy rostla, ani že sloučenina s navázaným chlorem v určité poloze byla vždy aktivní).

Klíčová slova

Antimikrobní aktivita, antimykotická rezistence, antimykotika, inhibice cholinesteráz, kyselina itakonová, mykózy.

Abstract

Mycotic systemic infection is often very severe, whether due to patient immunodeficiency, the side effects of available antifungal agents, or clinical or drug resistance. Emphasis should therefore be placed on the timely determination of the correct diagnosis, appropriate indications of current drugs, and especially the development of new antifungal agents (ATM).

The core of all synthesized compounds is the molecule of itaconic acid (IA) or its anhydride. The starting molecule was chosen based on its broad spectrum of biological activities, including antibacterial and antifungal activities. The aim was to create ten monoamides using a one-step synthesis of IA anhydride with the appropriate chlorinated aniline. These monoamides were then cyclized to form ten imides. The yields of the reactions to form the monoamides were high, with two exceptions (24% and 31%), and were generally above 80%. The yields of the reactions to form the imides were lower, ranging from 29% to 86%.

The antimicrobial activity was tested using the broth microdilution method for all imides and most monoamides. All compounds were ineffective against gram-negative bacteria, and very low activity against gram-positive bacteria was shown by the compounds 1-(2,4,6-trichlorophenyl)-3-methylene-2,5-pyrrolidinedione, 1-(2,6-dichlorophenyl)-3-methylene-2,5-pyrrolidinedione, and 1-(3,4,5-trichlorophenyl)-3-methylene-2,5-pyrrolidinedione. Inhibitory activity against acetyl- and butyrylcholinesterase was tested for all compounds, but the results showed relatively high IC_{50} values (the lowest measured concentration was 67.76 μ M). The tested compounds exhibited the highest activity in inhibiting fungi. The best measured MIC values (7.81 μ mol/L) were shown by the compounds 1-(2,4,6-trichlorophenyl)-3-methylene-2,5-pyrrolidinedione and 1-(3,4,5-trichlorophenyl)-3-methylene-2,5-pyrrolidinedione against the strain *Trichophyton interdigitale*. All measured biological and biochemical activities depended on both the number of chlorine atoms in the molecule and the position of these atoms (it cannot be said that activity always increased with the growing number of chlorine atoms, nor that a compound with chlorine attached in a certain position was always active).

Keywords

Antimicrobial activity, antifungal agents, antifungal resistance, cholinesterase inhibition, itaconic acid, mycoses

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk | 9 |
| 1 Úvod | 12 |
| 2 Teoretická část | 13 |
| 2.1 Onemocnění vyvolané mykotickými organismy | 13 |
| 2.1.1 Mykotoxikózy | 13 |
| 2.1.2 Mykoalergie | 13 |
| 2.1.3 Mykózy | 13 |
| 2.2 Antimykotika | 16 |
| 2.2.1 Polyeny | 17 |
| 2.2.2 Azoly | 19 |
| 2.2.3 Echinokandiny | 24 |
| 2.2.4 Pyrimidiny | 25 |
| 2.2.5 Allylaminy | 25 |
| 2.2.6 Ostatní lokální ATM | 26 |
| 2.3 Rezistence na ATM | 27 |
| 2.3.1 Rezistence na azolová ATM | 27 |
| 2.3.2 Rezistence na polyeny | 29 |
| 2.3.3 Rezistence na echinokandiny | 29 |
| 2.3.4 Rezistence na flucitosin | 30 |
| 2.4 Kyselina itakonová a její deriváty | 31 |
| 3 Cíl práce | 33 |
| 4 Experimentální část | 34 |
| 4.1 Syntéza a charakterizace nových antimykotik | 34 |
| 4.2 Příprava cílových sloučenin | 36 |
| 4.2.1 Příprava monoamidů | 36 |
| 4.2.2 Příprava imidů cyklizací monoamidů | 47 |
| 4.3 Biologické testování | 58 |
| 4.3.1 Hodnocení antifungální aktivity | 58 |
| 4.3.2 Hodnocení antibakteriální aktivity | 58 |
| 4.4 Biochemické testování | 60 |
| 4.4.1 Hodnocení inhibiční aktivity | 60 |
| 5 Výsledky a diskuse | 61 |
| 5.1 Chemie | 61 |

| | | |
|-------|---------------------------------|----|
| 5.2 | Biologie..... | 62 |
| 5.2.1 | Antifungální aktivita..... | 62 |
| 5.2.2 | Antibakteriální aktivita | 65 |
| 5.3 | Biochemie | 67 |
| 6 | Závěr | 69 |
| 7 | Seznam obrázků | 70 |
| 8 | Seznam tabulek | 70 |
| 9 | Seznam použité literatury | 71 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-------|--|
| ABC | ATP-binding cassette |
| AC | <i>Absidia corymbifera</i> |
| Ac | acetyl |
| AChE | acetylcholinesteráza |
| ACI | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| AF | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| AFla | <i>Aspergillus flavus</i> |
| AIDS | syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome) |
| AmB | amfotericin B |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATCh | acetylthiocholin |
| ATM | antimykotika |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BChE | butyrylcholinesteráza |
| BTCh | butyrylthiocholin |
| CA | <i>Candida albicans</i> |
| CAMHB | kationtově upravený Müller-Hintonův bujón (cation-adjusted Mueller-Hinton broth) |
| CCM | Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) |
| CFU | jednotka tvořící kolonie (colony forming unit) |
| CK | <i>Candida krusei</i> |

| | |
|--------|--|
| CP | <i>Candida parapsilosis</i> |
| CT | <i>Candida tropicalis</i> |
| DCM | dichlormethan |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DSM | Německá sbírka mikroorganismů (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) |
| DTNB | 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina |
| EC | <i>Escherichia coli</i> |
| EF | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| EMA | Evropská agentura pro léčivé přípravky |
| EtOAc | ethyl-acetát |
| EUCAST | Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) |
| FLU | flukonazol |
| FT-IR | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared spectroscopy) |
| HIV | virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus) |
| IA | kyselina itakonová (itaconic acid) |
| IFI | invazivní mykotická infekce (invasive fungal infections) |
| KP | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace (minimal inhibitory concentration) |
| MRSA | methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| PA | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

| | |
|------|---|
| PIP | piperacilin |
| PKC | proteinkináza C |
| THF | tetrahydrofuran |
| Tol | toluen |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species) |
| SA | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SE | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| SÚKL | Státní úřad pro kontrolu léčiv |
| TI | <i>Trichophyton interdigitale</i> |

1 Úvod

Mykotická (houbová) onemocnění mohou být způsobena jak makroskopickými, tak i mikroskopickými houbami – kvasinkami a plísněmi. U makroskopických hub se nejčastěji jedná o otravy jedovatými druhy plodnic, či mykotoxikózy způsobenými toxiny z těchto hub. Tato diplomová práce je ale zaměřena především na mikroskopické houby.

Obligátními patogeny z řad mikroskopických hub jsou pro člověka pouze dermatofyty a dimorfní houby nacházející se v tropických oblastech. Z toho lze odvodit, že většina mykotických mikroorganismů, které se přirozeně vyskytuje kolem nás, má nízkou patogenitu, která u zdravých jedinců nestačí k vyvolání infekce. U oslabených jedinců, jejichž incidence neustále roste, však mohou vyvolat závažné, život ohrožující mykózy.

Léčiva užívaná k léčbě mykóz se nazývají antimykotika (ATM). Houby jako eukaryotní organismy mají mnohem více společného s člověkem než s bakteriemi. U mykotických organismů se tak oproti bakteriím hůře hledají cíle, na niž by léčiva působila, aniž by ohrozila lidské buňky, a proto je jejich vývoj velice složitý. K tomu všemu ve světě roste rezistence na stávající ATM, ať už kvůli špatně stanovené diagnóze, špatné léčbě, kvůli neuváženému užívání těchto léčiv jako prevenci před propuknutím nemoci nebo nepřiměřenému používání některých ATM (např. azolů) v zemědělství. S rezistencí pak souvisí i používání léčiv druhé linie, které často nesou i vyšší míru toxicity pro pacienta, a prodloužená doba pobytu v nemocnici, jenž zvyšuje riziko další nozokomiální nákazy.

Omezený počet ATM, jejich časté nežádoucí účinky a rostoucí rezistence představují už nyní obrovský globální problém. Proto je nezbytné neustále pracovat na výzkumu nových ATM, která by ideálně měla menší toxicitu a byla by tak vhodnější pro léčbu oslabených pacientů.

2 Teoretická část

2.1 Onemocnění vyvolané mykotickými organismy

Jak již bylo řečeno v kap. 1, pouze malá část hub se označuje za primární patogeny. Ovšem nesmíme zapomínat, že i mykotické organismy s relativně nízkou patogenitou dokáží u oslabeného jedince vyvolat závažná onemocnění. [1] Onemocnění způsobená mykotickými organismy obecně dělíme do čtyř skupin: otravy způsobené požitím plodnic vyšších hub, mykotoxikózy, mykoalergie a mykózy. [2]

2.1.1 Mykotoxikózy

Tato onemocnění jsou způsobena metabolickými produkty hub neboli mykotoxiny. Mykotoxiny mohou být produkovány jak vyššími houbami s plodnicemi (makromycetami), tak i mikromycetami. [3], [4] Plísně, které mohou uvolňovat toxické metabolity, napadají potraviny jako jsou obiloviny, ořechy, sušené ovoce, koření, kávová zrna. Většina mykotoxinů je chemicky stabilních, a proto přežívá při zpracování potravin. Jako příklad lze uvést rod *Aspergillus* uvolňující karcinogenní alkaloidy aflatoxin a ochratoxin A, který je uvolňován i plísněmi z rodu *Penicillium*. [2], [5]

2.1.2 Mykoalergie

Mykoalergie je vyvolána přímým vstupem infekce, tedy inhalací fungálních spór. Její příznaky se nijak neliší od alergií vyvolaných jinými alergickými podmínkami. Pacient jeví známky alergické rhinitidy, alveolitidy či astmatu. [1], [4] Většina mykoalergií je způsobena rodem *Aspergillus*. [3], [6]

2.1.3 Mykózy

Tato onemocnění jsou vyvolána pouze mikroskopickými houbami a rozlišujeme tři typy: povrchové, podkožní a systémové. Povrchové mykózy se šíří přímým kontaktem dvou osob nebo člověka se zvířetem (např. kočkou nebo psem) a postihují kůži (mykózy označované jako dermatomykózy), nehty (onychomykózy), vlasy (trichomykózy) a sliznice (např. pochvy či úst). [1], [7] Nejčastějšími původci kožních infekcí jsou dermatofyty (vláknité houby z rodů *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*) a kvasinky (například *Candida*

albicans). [6], [7] Onychomykózu mohou vyvolat dermatofyty a *Candidae*. Za infekce vlasů jsou zodpovědné zejména *Trichosporon spp* či v tropech a subtropích běžná *Piedraia hortae*. [2]

Podkožní mykózy se šíří přes kožní bariéru zejména v případě jejího porušení. Jedná se o chronické, sporadicky se vyskytující infekce v tropickém a subtropickém podnebí. [1], [8] Příkladem podkožní mykózy je chromoblastomykóza (způsobena nejčastěji *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea monopora* nebo *Cladophialophora carrionii*) a obtížně diagnostikovatelná mukormykóza (dříve nazývaná zygomykóza) vyvolána mukormycetami (např. *Basidiobolus sp.*). [2], [8], [9]

Systémové neboli orgánové či hluboké mykózy řadíme mezi klinicky velmi závažné infekce postihující vnitřní orgány. [1] Mykózy jsou způsobeny jak primárně patogenními druhy dimorfních hub (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*), tak i mikromycetami s nízkou patogenitou, které vyvolávají oportunní nákazy u jedinců s oslabenou obranyschopností. [2] Mezi původci oportunních mykóz nalezneme vláknité formy mikromycet, které v těle rostou extracelulárně (např. *Aspergillus*), i kvasinkovité formy (např. *Candida*). Kvasinkovité formy přežívají pohlceny v neutrofilech a makrofázích a následně se v nich i množí. Některé druhy (např. *Cryptococcus neoformans*) se proti fagocytóze brání pomocí polysacharidového pouzdra. [1], [2]




















2.1.3.1 Invazivní mykotické infekce

U pacientů s významnou primární či sekundární poruchou imunity se mohou rozvinout závažné komplikace v podobě oportunních mykóz – tzv. invazivních mykotických infekcí (IFI). [10] Nejčastěji zkomplikují léčbu pacientům s chronickým onemocněním plic, prodělanou tuberkulózou, HIV, rakovinou, diabetem mellitem. Ohroženi jsou také kriticky nemocní pacienti na jednotce intenzivní péče, pacienti podstupující transplantace, invazivní zákroky, užívající širokospektrá antibiotika nebo imunosupresiva. Nová data ukazují, že riziko oportunní mykotické infekce hrozí i pacientům s onemocněním jater, ledvin nebo pacientům trpícím onemocněním Covid-19. [11]

Přestože se epidemiologie houbových chorob za posledních několik desetiletí výrazně změnila, hlavními houbovými patogeny odpovědnými za většinu případů závažných mykotických onemocnění zůstávají *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.*

a zygomycety. [6], [10] Mezi další původce vzácných, ale velmi těžko léčitelných IFI patří např. *Fusarium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Histoplasma*, *Coccidioides* a *Pneumocystis*. [1], [10]

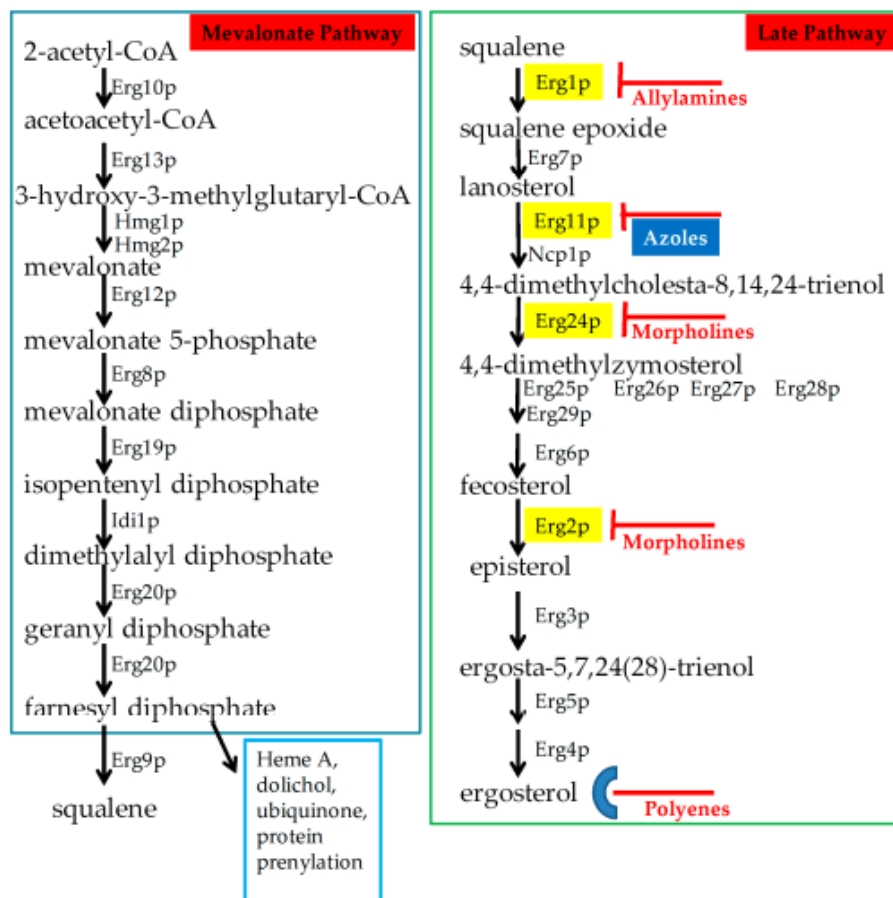
Nebezpečnost výše jmenovaných kmenů zvyšuje navíc rezistence na běžně používaná ATM. Odstrašujícím příkladem se stává kvasinka *Candida auris*, těžko diagnostikovatelný multirezistentní kmen zvyšující morbiditu i mortalitu pacientů. Světová zdravotnická organizace (WHO) poukazuje na problém nebezpečnosti mykotických mikroorganismů a jejich rostoucí rezistence, i proto vznikl seznam závažných patogenů (obr. 1) Nebezpečnost patogenů je posuzována hlavně podle rezistence daných kmenů. Dalšími důležitými kritérii je úmrť na infekce způsobených danými patogeny, složitost léčby, dostupnost diagnostiky, roční incidence a komplikace a následky infekce. [11]

| Critical group | High group | Medium group |
|---|---|--|
|  <i>Cryptococcus neoformans</i> |  <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>) |  <i>Scedosporium</i> spp. |
|  <i>Candida auris</i> |  <i>Histoplasma</i> spp. |  <i>Lomentospora prolificans</i> |
|  <i>Aspergillus fumigatus</i> |  Eumycetoma causative agents |  <i>Coccidioides</i> spp. |
|  <i>Candida albicans</i> |  Mucorales |  <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>) |
| |  <i>Fusarium</i> spp. |  <i>Cryptococcus gattii</i> |
| |  <i>Candida tropicalis</i> |  <i>Talaromyces marneffeii</i> |
| |  <i>Candida parapsilosis</i> |  <i>Pneumocystis jirovecii</i> |
| | |  <i>Paracoccidioides</i> spp. |

Obr. 1 Seznam závažných patogenů podle WHO, Převzato z:[11]

2.2 Antimykotika

Antimikrobiálních látek využívaných na léčbu bakteriálních infekcí není mnoho, ale klinicky využitelných antifungálních sloučenin je ještě méně. Velký vliv na to má úzký evoluční vztah mezi těmito eukaryotními patogeny a jejich lidskými hostiteli. Kvůli této evoluční podobnosti je omezeno množství cílů, na které mohou ATM terapeuticky působit, aniž by ohrozily buňky a struktury hostitele. [1], [12] Jejich cílem jsou především odlišnosti v buněčné membráně, tedy syntéza a funkce ergosterolu (obr. 2). Ergosterol je hlavní steroidní látka v membránách hub, podobně jako cholesterol v membráně vyšších živočichů. Dalšími cíli pro ATM jsou buněčná stěna anebo zastavení proteosyntézy a syntézy nukleových kyselin v mykotické buňce. [13] S evoluční podobností souvisí i časté nežádoucí účinky ATM. Další omezení představuje úzké spektrum aktivity, rozpustnost, stabilita a absorpce těchto léčiv. Stále větším problémem v klinické praxi pak je vzrůstající rezistence hub. [1], [14]



Obr. 3 Cíle ATM v syntéze ergosterolu, Převzato z: [15]

ATM lze rozdělit dle cílového místa působení na lokální a systémové. [1] Podobně jako u antibiotik můžeme ATM dále rozlišit dle účinku na fungicidní a fungistatické. Fungistatické sloučeniny pouze zastavují další růst hub, fungicidní usmrcují mykotického původce. [13] Podle chemické struktury se dělí na polyeny, azoly, echinokandiny, pyrimidiny, allylaminy, morfoliny a ostatní (např. griseofulvin). [11], [12], [14]

2.2.1 Polyeny

Polyeny jsou historicky nejstarší skupina látek využívaná v terapii mykotických infekcí. I přes svou značnou nefrotoxicitu jsou tyto fungicidní látky využívány v léčbě systémových i lokálních mykóz, a to především díky širokému spektru aktivity a nízké frekvenci vzniku rezistentních patogenů. K léčbě mykóz se využívá glykosylovaných sloučenin, především kvůli jejich lepšímu poměru aktivita/toxicita než u neglykosylovaných polyenů. [3], [16]

Mechanismus účinku spočívá ve vytváření komplexů mezi polyeny a ergosterolem. Selektivní toxicita polyenů je zajištěna vyšší afinitou polyenů k ergosterolu než k cholesterolu. [1], [16] Vazbou mezi ergosterolem a polyenovým ATM se vytvoří hydrofilní kanál, kterým unikají životně důležité buněčné složky, především K^+ a Na^+ , což nakonec způsobuje buněčnou smrt. [16]

Do této skupiny řadíme mnoho látek, z nichž nejdůležitější pro léčbu lidských mykotických infekcí jsou amfotericin B (AmB), nystatin a natamycin. [17]

2.2.1.1 Amfotericin B

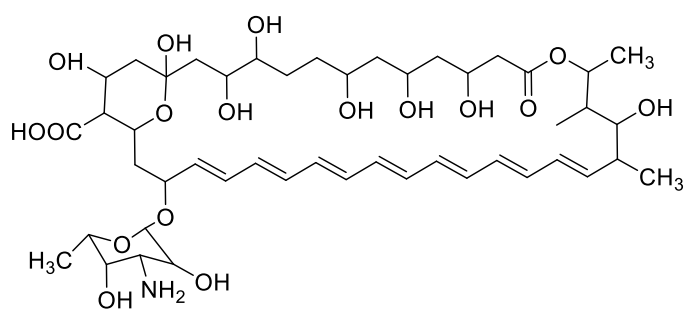
Jedním z nejstarších a neúčinnějších ATM užívaným pro léčbu systémových mykóz je AmB. Toto ATM je zároveň jediné ze skupiny polyenů, které je schválené pro léčbu systémových mykóz. [16] Poprvé byl izolován v roce 1959 z kmene *Streptomyces nodosus* a má nejen antifungální, ale i antiparazitární účinky. Je užíván v terapii blastomykóz, kandidóz, mukormykóz a na léčbu onemocnění způsobených kryptokoky. [18], [19] Variabilní citlivost či rezistenci proti této látce vykazuje *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Scedosporium prolificans* a některé kmeny z rodu *Candida* – např. *Candida lusitanae* a *Candida rugosa*. [19]

AmB má velkou molekulu, která je ve výsledku lipofilní povahy. Rozpustnost ve vodě zajišťuje její vazba na deoxycholát. Mimo vazby na ergosterol ještě indukuje tvorbu

kyslíkových radikálů (ROS), které peroxidují membránové lipidy. Ty pak přispívají ke zničení buněk. [13]

Nežádoucí účinky AmB dělíme na časně a pozdní. Časně nežádoucí účinky připomínají podání nekompatibilního transfuzního přípravku (horečka, zvracení, bolest hlavy, třesavka, bronchospasmus, hypotenze) a léčí se antipyretikem, popřípadě hydrokortisonem. Mezi pozdní nežádoucí účinky řadíme selhání ledvin, které je možné zmírnit vydatnou hydratací a správným doplňováním draslíku. [13], [18]

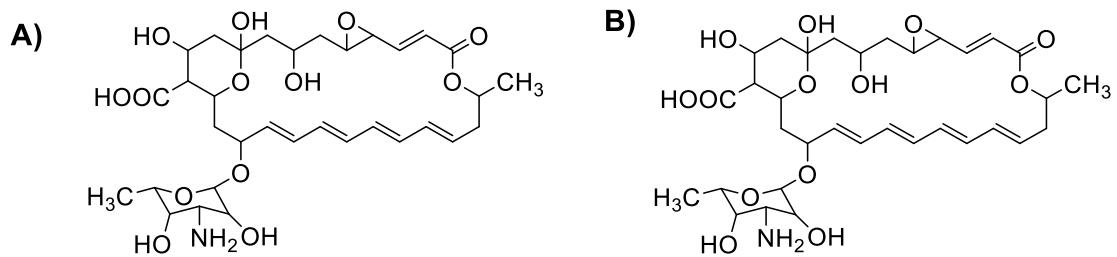
Za účelem zmírnění závažných nefrotoxických vedlejších účinků byla vyvinuta molekula AmB navázaná na lipidový nosič. Takto vznikl lipozomální AmB (neboli Ambisom) dále pak lipidový komplex AmB (Abelcet) a koloidní disperze AmB (Amphocil). [19], [20] Cílem takto navázaných AmB je snížit množství volného léčiva v krvi pod minimální toxické koncentrace a co nejúčinněji dopravit léčivo na místo potřeby. [16]



Obr. 4 Vzorec amfotericinu B

2.2.1.2 Nystatin

Nystatin se připravuje fermentací z kultury *Streptomyces noursei* a je používán jako lokální lék proti slizničním a kožním kandidózám. [13], [21] Resorpce z GIT, stejně jako přechod molekuly přes sliznice, prakticky vůbec neprobíhá, proto je bezpečné i perorální podání tohoto ATM či lokální použití v těhotenství a při kojení. Významný fungicidní efekt projevuje i proti rodům *Rhodotorula*, *Trichosporon* a *Aspergillus*. [21]



Obr. 5 Vzorec A) nystatinu, B) natamycinu

2.2.1.3 Natamycin

Natamycin neboli pimaricin je látka užívaná jak v očním lékařství při léčbě plísňové keratitidy, tak i při léčbě vaginálních mykóz. [16], [22] V potravinářství je využíván při ošetření sýrů a sušeného masa proti růstu plísní. [23] Poprvé byl izolován z kmene *Streptomyces natalensis* a spolu s kmenem *Streptomyces gilvosporeus* jsou využívány při průmyslové výrobě natamycinu. [22]

Podle nedávných studie by mechanismus účinku natamycinu mohl být odlišný od účinku ostatních polyenů. Výsledky této studie naznačují, že základem antifungální aktivity by mohla být interakce a interference tohoto léčiva s kapalnou fází membrány bohatou na steroly. [23]

2.2.2 Azoly

Tato nejrozsáhlejší skupina ATM je využívána v terapii lokálních i systémových mykóz. Jejich účinek je fungistatický, s výjimkou vysokých koncentrací, kdy mohou být také fungicidní. [24] Roku 1958 byl představen první azol – chlormidazol, kterým započal velký rozvoj této skupiny. Klasifikova můžeme azoly do více jak tří generací. Látky napříč generacemi se liší strukturou, bezpečností, farmakokinetikou a spektrem účinku. [25] Mezi nežádoucí účinky azolů se řadí alergie, hepatotoxicita a GIT obtíže u perorálně podávaných léčiv. Vzhledem k tomu, že se azoly využívané pro systémovou terapii metabolizují prostřednictvím cytochromu P450 (hlavně izoenzymy Cyp3A4 a Cyp2C9), je nutné myslet i na interakci s řadou jiných souběžně podávaných léčiv, jako jsou např. antiretrovirotika, imunosupresiva, warfarin, deriváty sulfonylurey atd. [26], [27]

Hlavní dělení těchto ATM ale rozděluje azoly podle počtu dusíků v pětičlenném kruhu na dvě skupiny – triazoly a imidazoly. [13], [28] Triazoly, sloužící k léčbě systémových

onemocnění, mají v hlavním kruhu tři atomy dusíku a projevují silnější afinitu k mykotickému cytochromu P450 než k lidskému. Narozdíl od imidazolů, jenž obsahují pouze dva heterocyklické atomy dusíku. [17], [28]

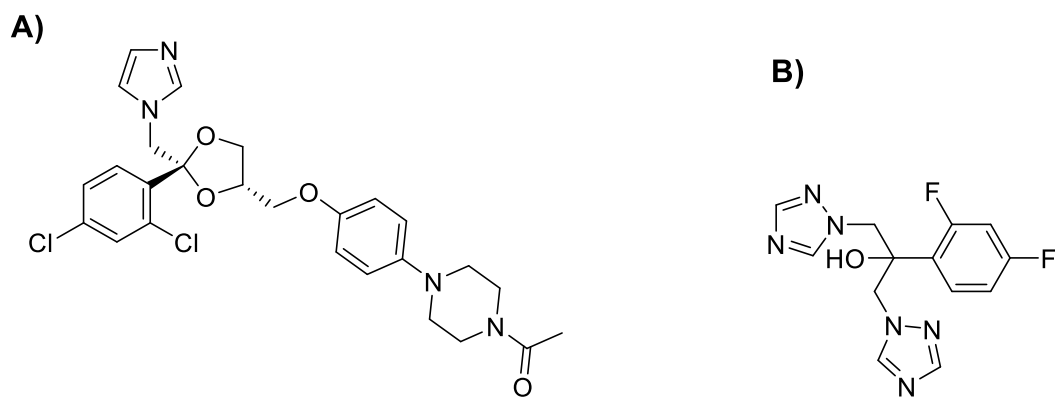
Mechanismus účinku azolových ATM spočívá v inhibici enzymu lanosterol 14- α -demethylasy, čímž způsobí zastavení biosyntetické dráhy ergosterolu. [1], [12], [13] Enzym lanosterol 14- α -demethyláza závisí na cytochromu P450 a je označován jako Erg11p v kvasinkách a Cyp51 v plísních (enzymy jsou kódované geny *ERG11* u kvasinek a *CYP51* u plísní). [12], [29] Inhibicí této dráhy se naruší produkce ergosterolu a funkci inhibovaného enzymu převzou jiné enzymy (např. u *Candida spp.* jsou to Erg6p, Erg25p, Erg26p, Erg27p a Erg3p), které způsobí akumulaci toxických methylovaných sterolů. [15], [25] Kromě toho jsou azoly také zodpovědné za zvyšování hladin ROS, které pak společně s toxickými produkty narušují stabilitu membrány a brání růstu mikroskopických hub. [15]

Léčiva registrovaná na Státním úřadu pro kontrolu léčiv (SÚKL) obsahují následující triazoly: flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol a isavukonazol. [25] Z imidazolů SÚKL registruje léčiva s obsahem mikonazolu, ketokonazolu, klotrimazolu, ekonazolu, bifonazolu, fentikonazolu a flutrimazolu. [13], [24], [25]

2.2.2.1 Imidazoly

Imidazoly byly prvními zástupci azolových ATM, přesněji to byl klotrimazol, mikonazol a ekonazol, objevené v 60. a 70. letech 20. století. [25], [27] Tyto tři ATM sloučeniny jsou také někdy označovány za první generaci azolových preparátů. [25] Použití imidazolů je až na výjimku, kterou je ketokonazol, omezeno pouze na povrchové mykózy. [27]

Ketokonazol byl prvním perorálním antimykotikem na bázi imidazolu se širokospektrálním účinkem. [26] Toto ATM druhé generace bylo až do roku 1990 upřednostňováno před AmB v léčbě systémových mykóz, které neohrožují život pacienta. [25] Jedním z hlavních vedlejších účinků ketokonazolu je hepatotoxicita způsobená inhibicí cytochromu P450. Dalšími převažujícími problémy jsou: ovlivnění syntézy steroidních hormonů (následkem bývala gynekomastie, oligospermie a impotence), biologická dostupnost a farmakokinetické interakce. Tyto vedlejší účinky nakonec vedly k vyřazení ketokonazolu ze seznamu léků schválených k léčbě systémových mykóz. [13], [25]



Obr. 6 Vzorce A) ketokonazolu, B) flukonazolu

2.2.2.2 Flukonazol

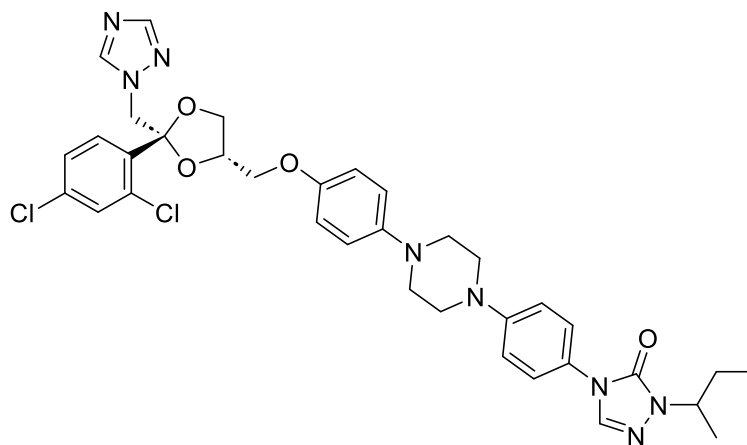
Azolové ATM druhé generace pro léčbu lokálních i systémových mykóz má hydrofilní povahu a velmi dobře se vstřebává v gastrointestinálním traktu. [13], [25], [28] Jeho absorpce není příliš ovlivněna příjmem potravy a jaterní metabolizace je minimální. Flukonazol je vylučován ledvinami, a proto by dávkování u pacientů s onemocněním ledvin mělo být sníženo. [28], [30]

Flukonazol se indikuje jako lék první volby při léčbě slizničních a invazivních kandidóz (především pokud původcem je *Candida albicans*), dále pak při kryptokokové meningitidě, kokcidioidomykóze a při léčbě onemocnění způsobenými dermatofyty. [10], [19], [30] Jako lokální léčivá látka je užíván v případě neúčinnosti jiných preparátů určených pro lokální léčbu. [30] Primárně rezistentní proti léčbě flukonazolem jsou aspergily a kmen *Candida krusei*, sekundárně rezistentní se stává *Candida glabrata*. [19], [25], [30] Často je flukonazol používán jako profylaxe u pacientů s výraznou imunodeficiencí (např. s HIV). [19], [30]

2.2.2.3 Itrakonazol

Itrakonazol, taktéž patřící do druhé generace, je jednou z nejlipofilnějších struktur azolů. [13], [25], [28] Pro zlepšení rozpustnosti v souvislosti s biologickou dostupností je nutné při intravenózním aplikaci itrakonazolu přidávat společně s ním cyklodextrin, který se ale projevuje vysokou nefrotoxicitou. [25] Na rozdíl od flukonazolu je absorpce itrakonazolu ovlivněna přijímanou potravou, rozsáhle se metabolizuje v játrech a eliminace ledvinami je variabilní. [28] Projevuje ale vyšší aktivitu proti některým „non-albicans“ kmenům kandid,

dermatofytům a aspergilům. [19] Rezistentní na tento azol jsou *Zygomycetes* a *Fusarium spp.* [10] Itrakonazol byl v systémové terapii překonán bezpečnějšími triazolami s lepšími farmakologickými vlastnostmi – např. vorikonazolem. Ojedinělé použití nachází jako lék druhé volby v infekcích vyvolaných rezistentními kmeny *Candida spp.* k flukonazolu. [19]

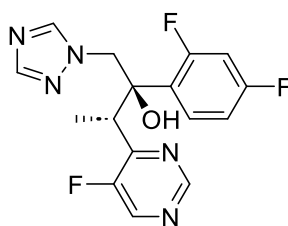


Obr. 7 Vzorec itrakonazolu

2.2.2.4 Vorikonazol

ATM patřící do třetí generace je podobně jako itrakonazol velice lipofilní a při intravenózní aplikaci se podává společně s cyklodextrinem. [25], [28] Rozsáhle se metabolizuje v játrech, eliminace probíhá převážně ledvinami. [28] Působí fungistaticky na *Cryptococcus spp.* a *Candida spp.*, kde je lékem volby v případě, když neznáme citlivost kmene způsobujícího infekci. [10] Vorikonazol je lékem první volby proti invazivní aspergilóze, přičemž jeho účinek je cidní. [13], [27] Fungicidně působí při vyšších dávkách také na vláknité houby *Fusarium spp.* a *Penicillium spp.* [10], [19] Léčba infekcí vyvolaných *Scedosporium prolificans*, rezistentní vůči AmB, je založena na kombinaci vorikonazolu s terbinafinem. [10]

Vorikonazolem indukovaná periostitida je vzácná, ale čím dál častěji se vyskytující diagnóza související s léčbou vorikonazolem. Je známá u transplantovaných pacientů, užívající imunosupresiva současně s antimykotickou léčbou, ale ohroženi jsou i netransplantovaní pacienti, kteří toto azolové ATM užívají dlouhodobě. [31], [32]

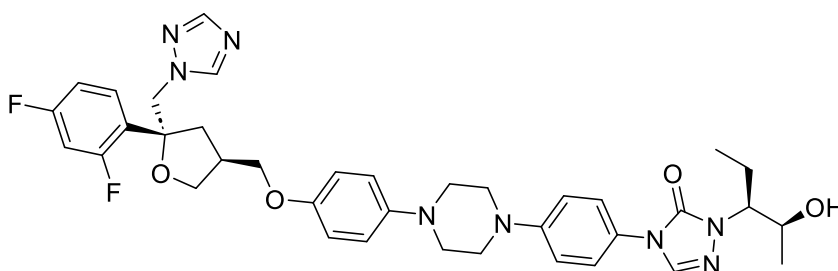


Obr. 8 Vzorec vorikonazolu

2.2.2.5 Posakonazol

Posakonazol, další azol třetí generace, je nutné stejně jako vorikonazol a itrakonazol podávat společně s cykloextrinem. [15], [28] Míra vstřebání tohoto léčiva je závislá na skladbě přijímané potravy, např. zvýšenou absorpci posakonazolu pozorujeme při vysokém množství tuků a ovlivňují ji i kyselé nealkoholické nápoje. Stejně jako itrakonazol se posakonazol rozsáhle metabolizuje v játrech a eliminace ledvinami je variabilní. [28]

Posakonazol vykazuje podobnou širokospektrou aktivitu jako vorikonazol a působí, jako jediný z azolů, i proti zygomycetám, u nichž je společně s AmB lékem volby. [10], [33] *In vitro* aktivitu prokazuje i vůči kmenům rezistentním na flukonazol a itrakonazol. [33] Vzhledem k dostupnosti pouze perorální formy tohoto léčiva a jeho absorpce vázané na složení potravy, je vhodné monitorování hladin léčiva u významně imunosuprimovaných pacientů. [19] Hlavní využití spočívá jako profylaxe infekcí způsobených *Candida spp.* a *Aspergillus spp.* u pacientů s febrilní neutropenií. [19], [33] Lékové interakce jsou méně významné než u vorikonazolu. [10]



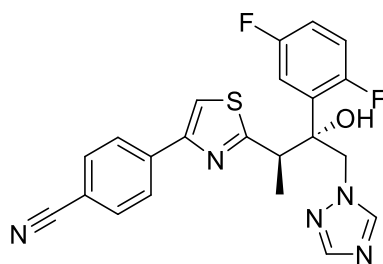
Obr. 9 Vzorec posakonazolu

2.2.2.6 Isavukonazol

Isavukonazol představuje poměrně nové širokospektré ATM třetí generace, které má prokázanou účinnost proti *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, mukormycetám a některým endemickým houbám. [25], [34] Fungicidní efekt prokazuje proti vláknitým

houbám, podobně jako vorikonazol. Indikuje se kléčbě jak invazivní aspergilózy, tak i mukormykózy u pacientů, kteří nemohou užívat AmB. [34], [35]

Isavukonazol je dostupný ve formě isavukonazolium-sulfátu, hydrofilního prekurzoru, který se po kvantitativní konverzi plazmatickými esterázami stává účinnou látkou. [34], [35] Má vysokou biologickou dostupnost, která není ovlivněna přijímanou potravou, a dlouhý poločas eliminace. Metabolizace probíhá opět v játrech přes cytochrom P450, ale oproti ostatním systémovým azolům je zapojen menší počet izoenzymů (neovlivňuje podjednotky Cyp2C9 a Cyp2C19). [34]



Obr. 10 Vzorec isavukonazolu

2.2.3 Echinokandiny

Echinokandiny jsou zatím nejnovější skupina ATM určená pro léčbu výhradně systémových onemocnění. Byla schválena Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA) v roce 2002. [36] Léčiva z této skupiny prokazují fungicidní účinek proti *Candida spp.* (výjimku tvoří kmen *Candida parapsilosis*, který má vůči echinokandinům omezenou *in vitro* aktivitu, projevuje se jako variabilní klinická účinnost) a fungistatický účinek vůči aspergilům, sacharomycetám, histoplazmám a částečně i proti *Pneumocystis jirovecii*. [13], [19] Primárně rezistentní proti nim jsou zygomycety, *Mucorales*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Rhizopus* a *Trichosporon*. Primární rezistence může být způsobena skladbou buněčné stěny, která místo β -(1,3)-D-glukanu obsahuje především β -(1,6)-D-glukan. Biotransformace léčiv probíhá v játrech, interakce s jinými léčivy je však minimální. [19], [27], [37]

Mechanismus účinku je založený na inhibici enzymu β -(1,3)-D-glukansyntázy, čímž se přerušuje syntéza β -(1,3)-D-glukanu. [1] Tento glukan je důležitý pro udržení integrity buněčné stěny hub, takže blokování jeho biosyntézy vede ke strukturálním abnormalitám buněčné stěny a následkem pak je inhibice růstu nebo smrt v důsledku nerovnováhy osmotického tlaku. β -(1,3)-D-glukan se v živočišných buňkách nenachází, takže jeho syntéza je vhodným

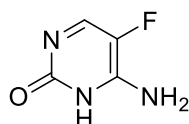
cílem pro antimykotika s minimálními vedlejšími účinky (oproti azolům či polyenům). [1], [36] Na druhé straně jsou echinokandiny dostupné pouze pro intravenózní aplikaci, takže jejich aplikace je možná pouze v nemocničním prostředí. Velkou nevýhodou je také embryotoxicita. [36]

Echinokandiny jsou cyklická lipopeptidová ATM odvozená od echinokandinu B, pneumokandinu B₀ a látky FR901379, které jsou přirozeně produkované vláknitými houbami. [27], [36] V současné době jsou tři léčivé látky schválené pro klinickou léčbu: kaspofungin (odvozený od pneumokandinu B₀), anidulafungin (polosyntetický derivát echinokandinu B) a mikafungin (odvozený od FR901379). [36]

2.2.4 Pyrimidiny

Tuto skupinu reprezentuje pouze jediný zástupce a tím je flucytosin neboli 5-fluorocytosin. V těle je metabolizován pomocí enzymu cytosindeaminázy na aktivní formu 5-fluorouracil. [13], [15] Enzym cytosindeamináza se u lidí nenachází, účinek je tedy specifický na mikroskopické houby a léčivo je bezpečné s minimálními nežádoucími účinky (při vysokých dávkách se objevuje hematotoxicita). [13], [38]

Flucytosin je látka využívaná k léčbě systémových onemocnění. Mechanismus účinku spočívá v narušení proteosyntézy. [15] Také se může stát, že po přeměně na jiný derivát inhibuje místo syntézy proteinů syntézu DNA. Působí na kmeny *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* a na některé kmeny z rodu *Aspergillus* (hlavně na *Aspergillus fumigatus*). Vzhledem ke snadnému vzniku rezistence je doporučeno jej podávat společně s jiným ATM, např. AmB (čímž je možné snížit dávku AmB a tím i jeho toxicitu). [1], [13], [19]



Obr. 11 Vzorec flucytosinu

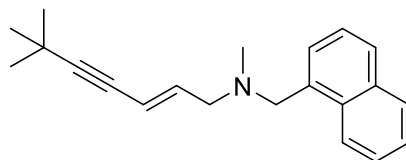
2.2.5 Allylaminy

Allylaminy se stejně jako azoly zaměřují na inhibici biosyntézy ergosterolu. [10], [13] Narušují funkci skvalenperoxidázy (u kvasinek *Candida spp.* značenou Erg1p), čímž dochází k akumulaci skvalenu, který pak narušuje vlastnosti membrány. [13], [15] Jejich účinek je

fungicidní. [3] Mezi zástupce této skupiny řadíme systémově podávanou látku terbinafin a naftifin, který je určený pouze pro léčbu lokálního onemocnění. [13], [15], [27]

2.2.5.1 Terbinafin

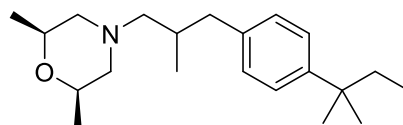
Systémově podávaný terbinafin je indikován pro léčbu superficiálních mykóz (především onychomykóz při postižení více jak 25 % nehtové ploténky) způsobených dermatofyty a je podáván řadu týdnů. [13], [27] Účinný je také proti kvasinkám, plísním a dimorfním houbám. [3] Mezi nežádoucími účinky léčiva patří alergie, dyspepsie, dysgeusie, neutropenie až pancytopenie vyžadující přerušení léčby. Vzácně se může projevit jaterní toxicita, Stevens-Johnsonův syndrom a systémový lupus erythematoses. [13], [27]



Obr. 12 Vzorec terbinafinu

2.2.6 Ostatní lokální ATM

Morfoliny jsou skupina ATM podávaných pouze lokálně. Zástupcem je např. amorolfin. Spektrum účinku zahrnuje kvasinky, dermatofyty, dimorfní houby a bakterie aktinomycety. [27] Mechanismus účinku spočívá v narušení závěrečné fáze syntézy ergosterolu. [13], [15]



Obr. 13 Vzorec amorolfinu

Dalšími ATM pro léčbu lokálních mykóz jsou Whitfieldova mast (kombinace kyseliny benzoové a salicylové), tolnaftát, tolciklát, ciklopirox, haloprogin a v mnoha indikacích dnes již překonaný griseofulvin (podávaný systémově, *in vivo* účinný pouze proti kožním patogenním houbám). [1], [27]

2.3 Rezistence na ATM

Antimykotická rezistence je definována jako schopnost mikroorganismů růst v přítomnosti ATM. [39] Rezistenci na ATM mohou mít organismy vrozenou (= primární) nebo získanou (= sekundární). Primární rezistence je dána genetickou vlastností organismu, např. chybění cílové struktury nebo zvýšená efluxní aktivita. Příkladem primární rezistence jsou flukonazol rezistentní kmeny *Aspergillus spp.*, *Candida krusei* a většina izolátů *Candida auris*. [14], [39]

Získaná rezistence je schopnost organismu vyvinout si mechanismy, které ho chrání před pro něj toxickými látkami. [3], [14], [39] Vzniká kvůli nepřiměřenému užívání ATM v zemědělství či jejich nadměrnému profylaktickému používání v klinické medicíně. [12] Příkladem sekundární rezistence jsou kmeny *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* a jejich necitlivost k flukonazolu. [3] Bylo identifikováno mnoho adaptačních mechanismů antimykotické rezistence, včetně změny nebo nadměrné exprese lékových cílů, upregulace multilékových transportérů, aktivace stresových reakcí atd. [12]

Klinická rezistence je dalším nebezpečným faktorem, proč selhává nastavená terapie, ačkoliv byla předtím v laboratoři potvrzena *in vitro* citlivost kmene. U většiny pacientů s invazivními mykózami dochází k selhání léčby právě z tohoto důvodu. Klinická rezistence může být způsobena hned několika faktory: nesprávná diagnóza, příliš velký stav imunosuprese pacienta, zahájení léčby ATM až při velké zátěži pacienta mykotickým mikroorganismem, lékové interakce, místo infekce atd. [37]

2.3.1 Rezistence na azolová ATM

Azoly jsou jednou z nejběžněji používaných skupin ATM. Houbové mikroorganismy mají celkem čtyři hlavní mechanismy, jak se vyhnout účinku ATM: mutace cílového místa, nadměrná exprese cílového místa, zvýšený eflux léčiva a změna dráhy biosyntézy ergosterolu neboli reakce buňky na stres. [14], [40]

2.3.1.1 Mutace cílového místa

Jedním z nejčastějších mechanismů azolové rezistence je mutace genu *ERG11*. Bodová mutace v tomto genu vede často ke změně vazebného místa, a tím způsobuje

sníženou afinitu či úplnou neschopnost vázat léčivo. [12], [14] Těchto mutací bylo detekováno dohromady více než 80 a jejich koexistence ve stejném genu má aditivními účinky. [14], [37], [41]

Aspergillus fumigatus, který získal rezistenci vlivem použití azolů v životním prostředí (např. použitím azolů jako zemědělských fungicidů), se specificky projevuje tandemovou repeticí v promotorové oblasti genu *CYP51*. [39], [42] Vzhledem k tomu, že rezistentní kmeny mohou v přírodě přetrvávat, mohou být vnímaví jedinci infikováni také těmito kmeny. [42]

2.3.1.2 Nadměrná exprese cílového místa

Některé izoláty hub se sníženou citlivostí na azoly, např. *Candida albicans*, *Candida glabrata* a *Candida auris* mají vyšší intracelulární koncentrace enzymu Erg11p než kmeny citlivé na azoly. [15], [37] Toho je dosaženo pomocí mutacemi v transkripčním faktoru *Upc2* regulujícím expresi *ERG11*. [40] Běžné terapeutické koncentrace již nestačí k inhibici syntézy ergosterolů. Nadměrné exprese lze dosáhnout amplifikací genu, zvýšenou rychlostí transkripce nebo sníženou degradací genového produktu. [37]

2.3.1.3 Zvýšený eflux

Nadměrná exprese genů kódujících membránové efluxní pumpy způsobí větší vypuzování léčiva ven z buňky, čímž sníží jeho intracelulární koncentraci, a to má za následek velmi malé množství léčiva v místě účinku. U hub se na odstraňování azolů z cytoplazmy podílejí dva různé efluxní systémy: ATP-binding cassette (ABC) a Major facilitator superfamily (MFS). [12], [14], [37] Nadměrná exprese genů z rodiny ABC může podporovat rezistenci *Cryptococcus neoformans* na flukonazol. U *Aspergillus spp.* byla nadměrná exprese genů pro ABC i MFS transportéry rozpoznána jako mechanismus rezistence zejména na itrakonazol a zdá se, že zvýšení exprese genů pro ABC transportéry je hlavním mechanismem rezistence u dermatofytů. [14]

2.3.1.4 Změna dráhy biosyntézy ergosterolu

S azolovou rezistencí jsou spojeny také mutace *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* a *ERG24*, které se taky uplatňují v biosyntéze ergosterolu u rodu *Candida*. [14], [15] *Aspergillus fumigatus* rezistenci projevuje prostřednictvím přítomností sterol-regulačního element vazebného proteinu SrbA a mutacemi v alele *Yap1* (zvyšuje tak odolnost proti oxidačnímu stresu

v buňce). Mutacemi v genech se mykotický mikroorganismus vyrovnává s buněčným stresem vyvolaným ATM. [40]

Mutace genu *ERG3* zabraňují produkci toxických methylovaných sterolů (zejména 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diolu) vznikajících při zástavě biosyntézy ergosterolu za pomoci azolů. Tento diol vzniká z 14 α -methylfekosterolu. [15], [37], [41] Pokud mutace způsobí inhibici enzymu, zastaví se přeměna na diol a nastane akumulace alternativních sterolů, které ale zachovávají funkčnost membrány. Tímto mechanismem vzniká zkřížená rezistence na azoly a polyeny. [12], [14]

U *Cryptococcus neoformans* byl popsán mechanismus nazývaný se heterorezistence. K tomuto jevu dochází, když jediná buňka dává vzniknout potomstvu s heterogenními fenotypy rezistence, které je pak vysoce rezistentní vůči azolům. Rezistentní subpopulace se mohou postupně adaptovat na zvyšující se koncentrace azolů. Tento mechanismus rezistence nesouvisí s předchozí expozicí léčivu, není ovlivněn pH ani osmolaritou. Ovlivňuje ho pouze teplota. [40]

2.3.2 Rezistence na polyeny

Rezistence na polyeny je považována stále ještě za vzácnou, ale čím dál častěji se objevují zprávy o zvýšení MIC u kmenů *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus fumigatus*. [39], [41] Mechanismem rezistence jsou nejčastěji mutace *Erg3p*, *Erg6p* nebo *Erg2p*, které snižují množství ergosterolu v membráně. Membrána pak obsahuje jiné steroly, jako např. 14 α -methylfekosterol, který nesnižuje funkčnost membrány, ale polyenová ATM se na něj navázat nemohou a mykotická buňka je tak před nimi chráněna (jak bylo zmíněno v kap. 2.3.1.4). [15], [37] Rezistence na AmB (např. u *Aspergillus spp.*) může být také zprostředkována zvýšenou aktivitou katalázy se snižující se náchylností k oxidačnímu poškození. Na rezistenci u kvasinky *Cryptococcus neoformans* byl potvrzen vliv defektní $\Delta 8-7$ -izomerázy, a to především u pacientů s onemocněním AIDS. K vyšší rezistenci této kvasinky také přispěla tvorba biofilmu. [40]

2.3.3 Rezistence na echinokandiny

Enzym β -(1,3)-D-glukansyntáza, který je cílem inhibice echinokandinů, je kódován podjednotkami *Fks1*, *Fks2* a *Fks3*. [36], [37] Zatímco bodové mutace v genu *Fks1* jsou u rodu

Candida a kmenu *Aspergillus fumigatus* spojeny se sekundární rezistencí, mutace *Fks2* byly izolovány jako příčina rezistence pouze u kmenu *Candida glabrata* (exprese *Fks2* je zde závislá na kalcineurinu, a proto rezistence vyvolaná *Fks2* může být zvrácena podáním inhibitorů kalcineurinu). [12], [15], [36], [37] Podjednotka *Fks3* ovlivňuje aktivitu enzymu slaběji ve srovnání s ostatními podjednotkami, a proto má na rozvoj lékové rezistence pouze zanedbatelný vliv. [36]

U echinokandinů je pozorován jev, kdy jsou rody *Candida* a *Aspergillus* schopny růst v přítomnosti velmi vysokých koncentrací léčiva, výrazně překračujících hodnoty MIC. Tento paradoxní účinek růstu hub při velmi vysokých koncentracích echinokandinů se označuje jako „orlí efekt“. [36], [37] Předpokládá se, že tento účinek je způsoben v důsledku stimulace kalcineurinových drah a zvýšením syntézy chitinu k udržení integrity buněčné stěny. Další hypotézou je nadprodukce polysacharidů, které mohou doplňovat deficit β -(1,3)-D-glukanu v buněčné stěně.

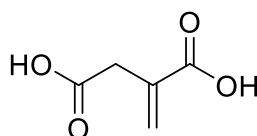
Houby mají ještě další adaptační mechanismy, které můžou za specifických podmínek vyvolat rezistenci na echinokandiny. Příkladem je proteinkináza C (PKC), která je řízena podjednotkou β -(1,3)-D-glukansyntázy, jež vnímá signály nestability buněčné stěny. PKC řídí aktivitu dalších proteinů odpovědných za udržování integrity houbové buňky za pomoci syntézy kompenzační buněčné stěny, která se skládá především z chitinu. Zvýšené hladiny syntézy chitinu v reakci na echinokandiny mohou být také řízeny mimo jiné i kalcineurinovými cestami. Kalcineurin v konečné fázi pak indukuje expresi *Fks2*. [12], [36]

2.3.4 Rezistence na flucytosin

Flucytosin je do buňky importován cytosinpermeázou, poté je deaminován enzymem cytosindeaminázou a převeden pomocí fosforibosyltransferázy na 5-fluorouracil-monofosfát. Inaktivace kteréhokoliv z těchto zapojených enzymů způsobuje rezistenci. [15], [37]

2.4 Kyselina itakonová a její deriváty

Kyselina itakonová je biosynteticky odvozená nenasycená dikarboxylová kyselina, která prokazuje významnou antimikrobiální, imunomodulační, antioxidační a protizánětlivou aktivitu. [43], [44] Díky dvěma karboxylovým skupinám a vinylidenové skupině má tato kyselina snadno polymerovatelnou chemickou strukturu. [44], [45] Je syntetizována především houbami, čehož je využíváno při průmyslové výrobě v biorafinériích. *Aspergillus terreus* a *Ustilago maydis* jsou původními producenty IA a mají specializovaný genový klastr pro její biosyntézu. [44], [46]



Obr. 14 Vzorec kyseliny itakonové

IA je také důležitým meziproduktem vznikajícím ve vedlejších reakcích spjatých s citrátovým cyklem, který probíhá v savčích makrofázích. Zásadním krokem v biosyntéze IA je dekarboxylace cis-akonitátu produkovaného dehydratací citrátu. [43] Předpokládá se, že mechanismus účinku IA a jejích derivátů je založen na vazbě vinylidenové skupiny IA na sulfanylovou skupinu proteinů v mikrobiálních buňkách, čímž jsou tyto proteiny inaktivovány. [46] Dále se předpokládá inhibice methylisocitrát lyázy v 2-methylcitrátovém cyklu nebo isocitrátlyázy v glyoxylátové cestě. [45], [46] Kromě toho IA podporuje pentózofosfátovou dráhu k produkci ROS, čímž zvyšuje antimikrobiální a protizánětlivou aktivitu. [47]

Deriváty IA s fluoroanilinem, pyridinem, indolem a chinolinem byly popsány jako potenciální antiproliferativní a/nebo antivirové sloučeniny. Modifikací polymerované IA bylo dosaženo antibakteriální aktivity s nízkou hematotoxicitou a amidy odvozené od IA vykazovaly antifungální aktivitu. [45] Dobrá antimikrobiální (hlavně antifungální) aktivita byla prokázána u anhydridu IA a antimykotická aktivita byla potvrzena také u dříve připraveného imidu 1-(4-chlorfenyl)-3-methylidenpyrrolidin-2,5-dionu. [48], [49]

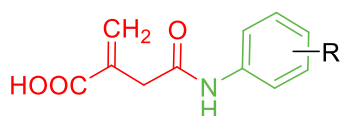
Tato diplomová práce tedy vychází z antimikrobiální aktivity IA, respektive anhydridu IA a jeho derivátů, a zaměřuje se na syntézu, biologické a biochemické hodnocení dalších potenciálně antimikrobiálních amidů a imidů odvozených z IA.

3 Cíl práce

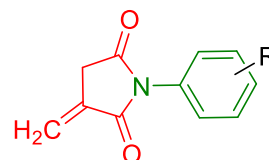
Cílem této diplomové práce je shrnout obecné informace o ATM (především o ATM určených k léčbě systémových onemocnění), které se používají nebo do nedávna ještě používaly v klinické terapii a o globální rezistenci, která pomáhá mykotickým mikroorganismům snižovat účinnost těchto ATM. Dále jsou zde uvedeny základní informace o IA, molekule s prokázanou biologickou aktivitou.

Experimentální část se zaměřuje na syntézu dvaceti nových sloučenin na bázi derivátů IA. Monoamidy (obr. 14) jsou připraveny syntézou z anhydridu IA a chlorovaných anilinů. Anhydrid IA je zvolen na základě dříve popsané antimikrobiální aktivity. Zvolené chlorované aniliny mají různý počet atomů chloru navázaných na různých pozicích benzenového jádra, aby se na výsledných sloučeninách dal pozorovat význam počtu a pozice atomů chloru. Monoamidy jsou pak cyklizací převedeny na imidy (obr. 15). Přítomnost chloru je z důvodu zvýšení lipofility připravených sloučenin i proto, že se na základě našich přechozích prací osvědčila přítomnost halogenu ve struktuře antimikrobních látek. [50]

Všechny nasyntetizované sloučeniny budou charakterizovány, bude ověřena jejich čistota a otestována jak jejich biologická aktivita proti patogenním houbám a bakteriím, tak z důvodu zjištění selektivity účinku na mikroby také jejich inhibiční aktivita vůči cholinesterázám.



Obr. 15 Design cílových monoamidů



Obr. 16 Design cílových imidů

4 Experimentální část

4.1 Syntéza a charakterizace nových antimykotik

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

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla nejprve pro všechny látky použita soustava toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 v/v , avšak pro téměř nulové retenční faktory byla u látek z řady amidů nahrazena soustavou dichlormethan:methanol 97:3 v/v s přídatkem malého množství 98% kyseliny octové. U imidů byla používána původní mobilní fáze. 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).

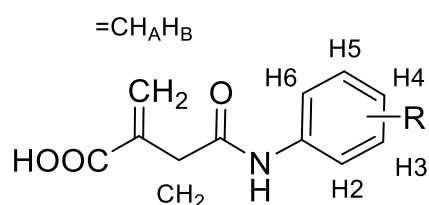
NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- D_6) a aceton (aceton- D_6). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (DMSO- D_6 při $\delta = 39,5$ ppm, aceton- D_6 při $\delta = 29,84$ a 206,26 ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla

vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Jednotlivé vodíky v připravovaných sloučeninách byly pro jednoznačnost interpretace NMR spekter očíslovány (Obr. 16).

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

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

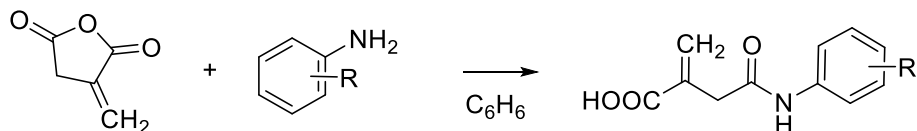
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.



Obr. 17 Číslování vodíků pro interpretaci NMR spekter

4.2 Příprava cílových sloučenin

4.2.1 Příprava monoamidů



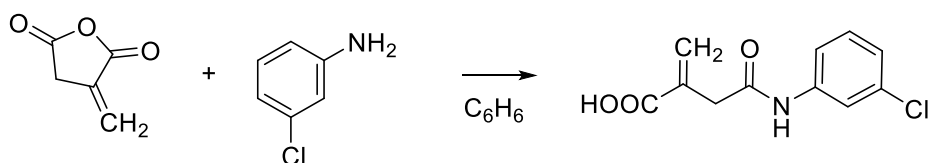
Obr. 18 Reakční schéma přípravy monoamidů

Obecný pracovní postup:

0,0011 mol anhydridu IA (123,3 mg) bylo rozpuštěno za stálého míchání v 15 ml horkého benzenu, posléze bylo přidáno po částech 0,001 mol příslušného chloranilinu. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za zvýšené teploty do přijatelné konverze (1 hodina až 48 hod) – indikace pomocí TLC. Vzniklá suspenze byla ještě za horka zfiltrována, pevný podíl byl promyt malým množstvím benzenu a vysušen.

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

4-[(3-Chlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-1) [51]



| | |
|--------------------------------|---|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₁₀ ClNO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 239,66 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 97 % |
| Teplota tání: | 156,2 – 157,0 °C |
| R _f : | 0,22 |

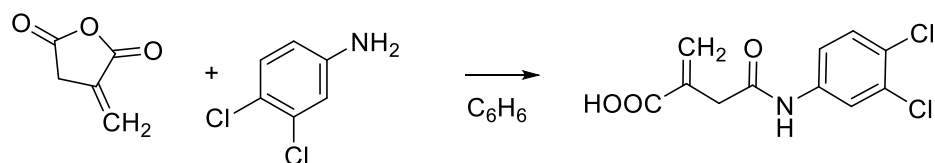
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.51 (1H, bs, COOH), 10.19 (1H, s, NH), 7.80 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H2), 7.42 (1H, ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, H4), 7.32 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, H5), 7.08 (1H, ddd, *J* = 8.1, 2.1, 1.0 Hz, H6), 6.18 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 5.75 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 3.36 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 168.91, 167.53, 140.67, 135.54, 133.06, 130.42, 127.77, 122.74, 118.39, 117.29, 37.78.

IR [cm⁻¹]: 3090, 2925, 1780, 1718, 1662, 1576, 1446, 1434, 1413, 1369, 1267, 1233, 1201, 1141, 1108, 1098, 968, 919, 855, 805, 757, 715, 671, 657, 647, 620.

Elementární analýza: teorie: C 55.13, H 4.21, N 5.84; nalezeno: C 55.03, H 4.15, N 5.72.

4-[(3,4-Dichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-2)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 274,10 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 83 % |
| Teplota tání: | 153,5 – 154,0 °C (lit. 157 – 158,5 °C) [45] |
| R _f : | 0,19 |

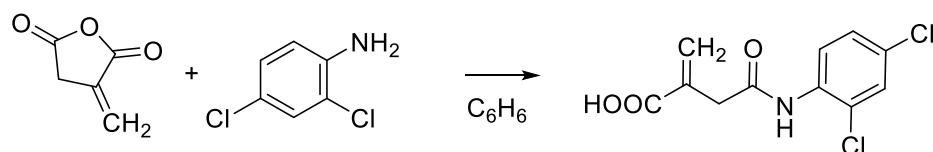
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.53 (1H, bs, COOH), 10.30 (1H, s, NH), 7.97 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H₂), 7.54 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H₅), 7.46 (1H, dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, H₆), 6.18 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 5.75 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 3.35 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 169.06, 167.49, 139.30, 135.40, 130.97, 130.66, 127.90, 124.44, 120.11, 118.97, 37.38.

IR [cm⁻¹]: 3088, 2988, 1780, 1717, 1688, 1661, 1643, 1576, 1533, 1509, 1473, 1445, 1434, 1413, 1370, 1329, 1308, 1290, 1267, 1228, 1201, 1165, 1141, 1107, 1098, 1032, 1008, 967, 943, 918, 855, 823, 890, 757, 712, 671, 656, 646, 620.

Elementární analýza: teorie: C 48.20, H 3.31, N 5.11; nalezeno: C 48.24, H 3.26, N 5.20.

4-[(2,4-Dichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-3)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 274,10 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 98 % |
| Teplota tání: | 154,5 – 155,5 °C |
| R _f : | 0,33 |

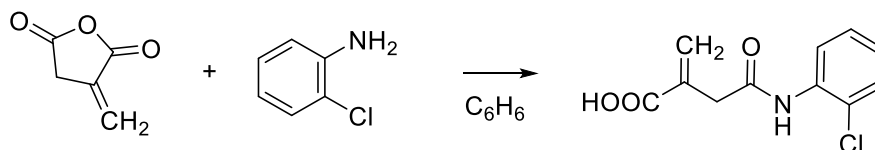
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.56 (1H, bs, COOH), 9.59 (1H, s, NH), 7.77 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 6H), 7.64 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H₃), 7.40 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, H₅), 6.18 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.78 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.42 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 169.02, 167.58, 135.61, 134.16, 129.04, 128.87, 127.72, 127.52, 126.77, 126.58, 37.34.

IR [cm⁻¹]: 3279, 3015, 2897, 2639, 1681, 1668, 1632, 1579, 1518, 1475, 1460, 1398, 1384, 1350, 1321, 1287, 1246, 1234, 1184, 1149, 1102, 1058, 970, 927, 868, 823, 787, 744, 672, 658, 626, 617.

Elementární analýza: teorie: C 48.20, H 3.31, N 5.11; nalezeno: C 48.15, H 3.17, N 5.06.

4-[(2-Chlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-4)



| | |
|--------------------------------|---|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₁₀ ClNO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 239,66 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 99 % |
| Teplota tání: | 142,8 – 144,0 °C |
| R _f : | 0,30 |

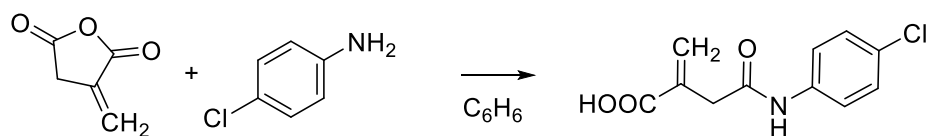
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.55 (1H, bs, COOH), 9.49 (1H, s, NH), 7.74 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, H3), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H6), 7.31 (1H, td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, H5), 7.17 (1H, td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, H4), 6.18 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.78 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.42 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 168.82, 167.62, 135.73, 135.36, 134.95, 129.43, 127.60, 127.38, 126.01, 125.62, 37.33.

IR [cm⁻¹]: 3278, 2988, 2900, 2630, 1748, 1649, 1659, 1633, 1589, 1538, 1475, 1444, 1390, 1346, 1320, 1288, 1228, 1196, 1162, 1130, 1060, 1034, 966, 957, 936, 855, 826, 778, 748, 713, 693, 643, 628, 610.

Elementární analýza: teorie: C 55.13, H 4.21, N 5.84; nalezeno: C 55.10, H 4.15, N 5.90.

4-[(4-Chlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-5)



| | |
|--------------------------------|---|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₁₀ ClNO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 239,66 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 95 % |
| Teplota tání: | 173,0 – 174,5 °C (lit. 191 – 193 °C) [52] |
| R _f : | 0,15 |

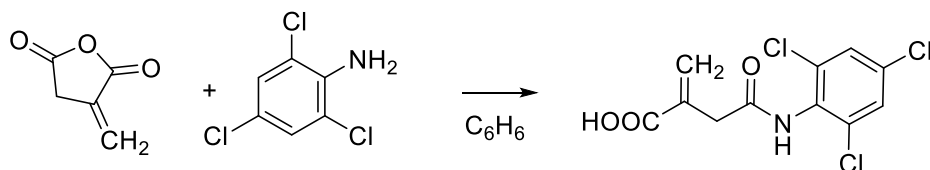
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.48 (1H, bs, COOH), 10.12 (1H, s, NH), 7.62 – 7.58 (2H, m, H₃, H₅), 7.35 – 7.33 (2H, m, H₂, H₆), 6.17 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 5.74 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, =CH_AH_B), 3.38 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 168.62, 167.53, 138.20, 135.62, 128.59, 127.67, 121.37, 120.45, 37.32.

IR [cm⁻¹]: 3290, 3016, 2919, 2632, 1681, 1653, 1630, 1597, 1523, 1493, 1440, 1396, 1349, 1322, 1285, 1230, 1197, 1166, 1093, 1014, 979, 955, 942, 911, 861, 849, 825, 814, 774, 736, 710, 683, 656, 627, 614.

Elementární analýza: teorie: C 55.13, H 4.21, N 5.84; nalezeno: C 55.08, H 4.35, N 5.89.

4-[(2,4,6-Trichlorofenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-6)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ Cl ₃ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 308,54 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 31 % |
| Teplota tání: | 184,2 – 186,1 °C |
| R _f : | 0,24 |

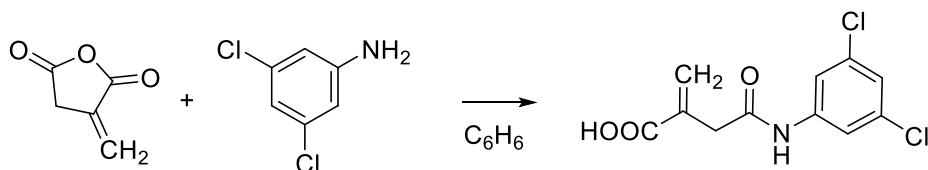
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.42 (1H, bs, COOH), 9.92 (1H, s, NH), 7.74 (2H, s, H3, H5), 6.18 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.79 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.38 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆): δ 168.46, 167.43, 135.45, 134.53, 132.50, 132.28, 128.24, 127.63, 37.36.

IR [cm⁻¹]: 3222, 3008, 2861, 2632, 1694, 1659, 1633, 1559, 1520, 1450, 1398, 1383, 1369, 1352, 1324, 1267, 1245, 1217, 1188, 1167, 1144, 1078, 986, 966, 939, 919, 877, 867, 851, 821, 800, 757, 727, 702, 672, 648, 638, 628, 615.

Elementární analýza: teorie: C 42.82, H 2.61, N 4.54; nalezeno: C 42.85, H 2.60, N 4.67.

4-[(3,5-Dichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-7) [53]



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 274,10 |
| Popis: | fialová krystalická látka |
| Výtěžek: | 99 % |
| Teplota tání: | 171,9 – 173,0 °C |
| R _f : | 0,17 |

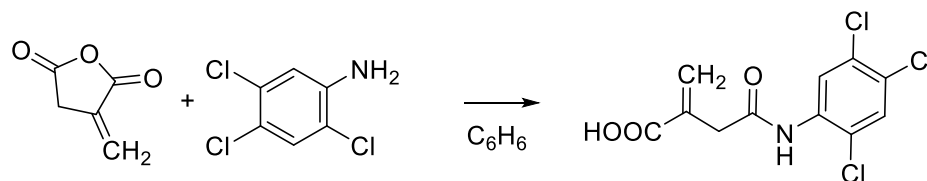
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.52 (1H, bs, COOH), 10.35 (1H, s, NH), 7.64 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, H₂, H₆), 7.25 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, H₄), 6.19 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.76 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.36 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 169.28, 167.44, 141.48, 135.26, 134.08, 127.99, 122.27, 117.01, 37.33.

IR [cm⁻¹]: 3326, 3162, 3125, 2889, 2617, 1678, 1671, 1628, 1606, 1585, 1537, 1448, 1437, 1408, 1359, 1320, 1302, 1265, 1223, 1147, 1113, 1093, 1056, 991, 977, 958, 923, 910, 858, 844, 835, 820, 812, 787, 726, 691, 671, 647, 633, 627.

Elementární analýza: teorie: C 48.20, H 3.31, N 5.11; nalezeno: C 48.29, H 3.20, N 5.16.

4-[(2,4,5-Trichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-8)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ Cl ₃ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 308,54 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 82 % |
| Teplota tání: | 172,0 – 172,7 °C |
| R _f : | 0,29 |

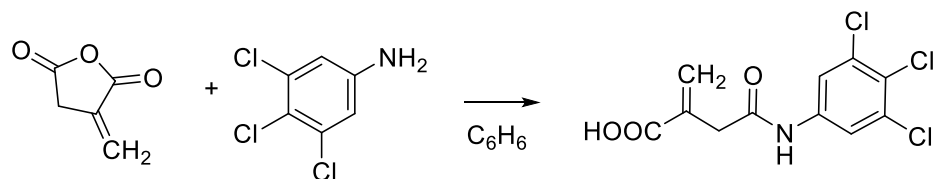
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.58 (1H, bs, COOH), 9.72 (1H, s, NH), 8.09 (1H, s, H₃), 7.89 (1H, s, H₆), 6.19 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.78 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.46 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 169.41, 167.54, 135.42, 135.10, 130.51, 129.77, 127.87, 126.86, 125.42, 124.63, 37.34.

IR [cm⁻¹]: 2996, 2626, 1686, 1661, 1631, 1573, 1506, 1455, 1399, 1364, 1326, 1308, 1231, 1197, 1167, 1131, 1078, 971, 964, 943, 924, 878, 796, 705, 685, 625, 608, 604.

Elementární analýza: teorie: C 42.82, H 2.61, N 4.54; nalezeno: C 42.80, H 2.72, N 4.60.

4-[(3,4,5-Trichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-9)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ Cl ₃ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 308,54 |
| Popis: | šedivě-bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 91 % |
| Teplota tání: | 180,3 – 181,6 °C |
| R _f : | 0,17 |

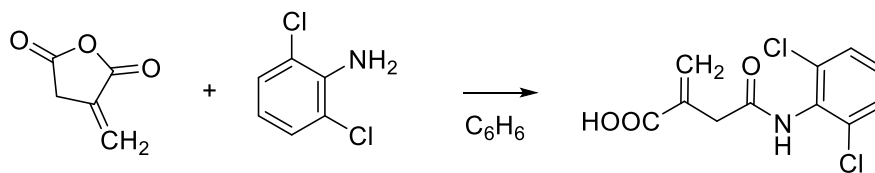
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.54 (1H, bs, COOH), 10.42 (1H, s, NH), 7.84 (2H, s, H₂, H₆), 6.19 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.77 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.36 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 169.40, 167.42, 139.19, 135.16, 132.85, 128.09, 123.10, 118.89, 37.32.

IR [cm⁻¹]: 3319, 3180, 3111, 2973, 2901, 2626, 1673, 1629, 1583, 1525, 1437, 1395, 1376, 1354, 1324, 1294, 1223, 1192, 1146, 1066, 977, 958, 920, 889, 877, 859, 846, 818, 789, 688, 674, 646, 629, 613.

Elementární analýza: teorie: C 42.82, H 2.61, N 4.54; nalezeno: C 42.85, H 2.72, N 4.60.

4-[(2,6-Dichlorfenyl)amino]-2-methylen-4-oxobutanová kyselina (JST-10)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₃ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 274,10 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 24 % |
| Teplota tání: | 173,9 – 175,5 °C |
| R _f : | 0,22 |

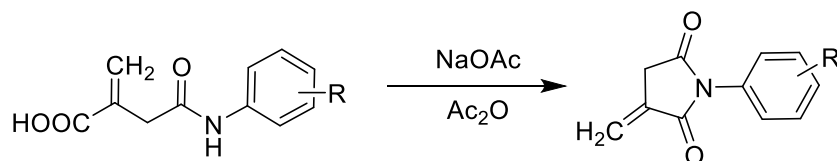
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆): δ 12.42 (1H, bs, COOH), 9.82 (1H, s, NH), 7.48 (2H, d, *J* = 8.1 Hz, H₃, H₅), 7.29 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, H₄), 6.15 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 5.76 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, =CH_AH_B), 3.33 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆): δ 168.29, 167.43, 135.54, 133.74, 133.05, 129.05, 128.44, 127.39, 37.33.

IR [cm⁻¹]: 3231, 3025, 2900, 2629, 1697, 1658, 1632, 1571, 1528, 1489, 1453, 1436, 1398, 1350, 1326, 1271, 1247, 1216, 1168, 1148, 1105, 989, 958, 920, 865, 840, 788, 770, 727, 710, 632, 604.

Elementární analýza: teorie: C 48.20, H 3.31, N 5.11; nalezeno: C 48.21, H 3.21, N 5.15.

4.2.2 Příprava imidů cyklizací monoamidů



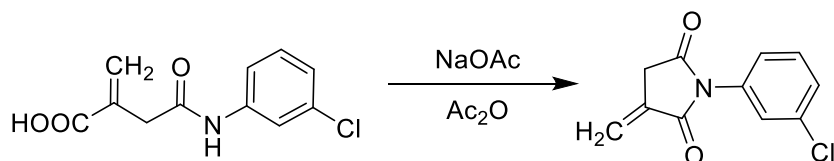
Obr. 19 Reakční schéma cyklizace na imidy

Obecný pracovní postup:

0,001 mol připraveného itakonamidu bylo spolu s 0,0015 mol bezvodého octanu sodného rozpuštěno v 10 ml acetanhydridu a zahříváno pod zpětným chladičem do přijatelné konverze (indikace pomocí TLC; po dobu 2-3 hodin). Reakční směs byla následně nalitá do směsi vody a ledu, a byla ponechána míchat na magnetické míchačce do rozpuštění ledu. Protože ani v jediném případě nedošlo k vysrážení pevného produktu, byla tato směs přenesena do dělicí nálevky a extrahovala se 3×15 ml dichlormetanu (DCM). Spojené organické vrstvy byly dále extrahovány 2× nasyceným roztokem chloridu sodného a následně vysušeny stáním nad síranem sodným. Po odfiltrování Na₂SO₄ byla organická fáze odpařena dosucha. Následně byl produkt krystalizován ve směsi THF/*n*-hexan, vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny proudem vzduchu.

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

1-(3-Chlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-1-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ ClNO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 221,64 |
| Popis: | světle žlutá krystalická látka |
| Výtěžek: | 67 % |
| Teplota tání: | 90,9 – 91,9 °C (lit. 132,5 – 134 °C) [54] |
| R _f : | 0,33 |

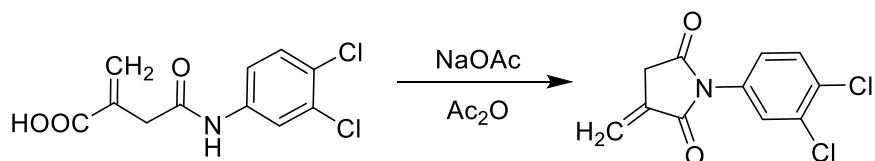
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.55 – 7.51 (1H, m, H₂), 7.50 – 7.48 (1H, m, H₄), 7.47 – 7.44 (1H, m, H₅), 7.40 – 7.37 (1H, m, H₆), 6.29 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.77 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.55 (2H, t, *J* = 2.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Aceton-D₆): δ 173.51, 169.14, 135.67, 135.34, 134.53, 131.16, 129.10, 127.90, 126.49, 120.71, 34.76.

IR [cm⁻¹]: 2970, 1778, 1708, 1662, 1622, 1595, 1581, 1506, 1478, 1456, 1436, 1410, 1383, 1269, 1238, 1192, 1171, 1149, 1095, 1079, 1003, 965, 943, 911, 871, 812, 785, 753, 720, 710, 684, 675, 667, 660, 643, 632, 618.

Elementární analýza: teorie: C 59.61, H 3.64, N 6.32; nalezeno: C 59.60, H 3.65, N 6.25.

1-(3,4-Dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-2-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₇ Cl ₂ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 256,08 |
| Popis: | slonovinová krystalická látka |
| Výtěžek: | 69 % |
| Teplota tání: | 126,1 – 127,1 °C (lit. 125 °C) [55] |
| R _f : | 0,51 |

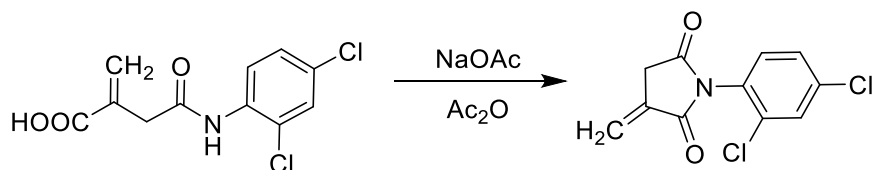
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.72 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H₆), 7.67 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H₂), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, H₅), 6.30 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, =CH_AH_B), 5.78 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.56 (2H, t, *J* = 2.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Aceton-D₆): δ 173.41, 168.99, 135.52, 133.78, 132.74, 131.64, 129.71, 127.88, 126.82, 120.97, 34.76.

IR [cm⁻¹]: 3088, 1778, 1709, 1665, 1595, 1572, 1479, 1450, 1399, 1385, 1268, 1232, 1195, 1169, 1156, 1143, 1127, 1114, 1029, 1005, 955, 947, 928, 910, 876, 857, 828, 804, 778, 696, 681, 652, 630, 610.

Elementární analýza: teorie: C 51.59, H 2.76, N 5.47; nalezeno: C 51.74, H 2.70, N 5.53.

1-(2,4-Dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-3-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₇ Cl ₂ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 256,08 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 62 % |
| Teplota tání: | 120,0 – 121,8 °C (lit. 124,5 – 125,5 °C) [54] |
| R _f : | 0,47 |

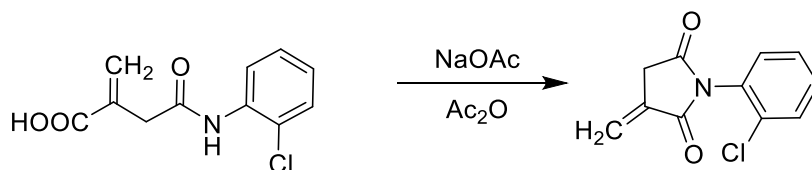
¹H NMR (600 MHz, Aceton-*D*₆) δ 7.70 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H₃), 7.52 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, H₅), 7.45 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H₆), 6.28 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, =CH_AH_B), 5.78 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.60 (2H, t, *J* = 2.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Aceton-*D*₆): δ 172.85, 168.54, 136.37, 135.50, 134.33, 132.74, 131.02, 130.69, 129.23, 121.39, 34.92.

IR [cm⁻¹]: 3078, 1782, 1716, 1664, 1588, 1565, 1486, 1437, 1404, 1393, 1378, 1265, 1235, 1200, 1144, 1100, 1063, 1002, 966, 931, 896, 878, 851, 827, 809, 794, 712, 684, 660, 643, 624.

Elementární analýza: teorie: C 51.59, H 2.76, N 5.47; nalezeno: C 51.51, H 2.80, N 5.41.

1-(2-Chlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-4-IM)



Oproti obecnému postupu byla krystalizace vyvolána přidavkem směsi rozpouštědel diethylether-hexan.

| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ ClNO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 221,64 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 42 % |
| Teplota tání: | 97,0 – 97,5 °C (lit. 132,5 – 134 °C) [54] |
| R _f : | 0,43 |

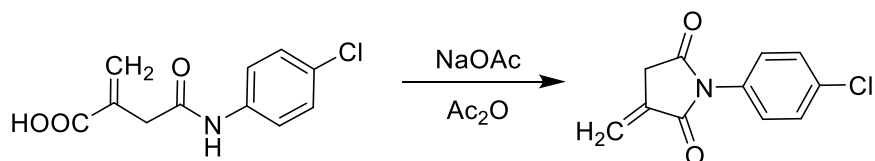
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.60 (1H, dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, H₃), 7.51 – 7.44 (2H, m, H₄, H₅), 7.41 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, H₆), 6.28 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, =CH_AH_B), 5.77 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.67 – 3.53 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Aceton-D₆): δ 172.97, 168.71, 135.64, 133.18, 132.03, 131.78, 131.57, 130.92, 128.89, 121.09, 34.87.

IR [cm⁻¹]: 3067, 1776, 1710, 1662, 1485, 1448, 1435, 1409, 1385, 1264, 1238, 1222, 1199, 1172, 1149, 1125, 1062, 1045, 1031, 1002, 965, 951, 929, 896, 871, 811, 755, 728, 714, 673, 659, 636, 612.

Elementární analýza: teorie: C 59.61, H 3.64, N 6.32; nalezeno: 59.62, H 3.69, N 6.40.

1-(4-Chlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-5-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₈ ClNO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 221,64 |
| Popis: | světle žlutá krystalická látka |
| Výtěžek: | 42 % |
| Teplota tání: | 129,3 – 130,6 °C (lit. 130,5 – 131 °C) [54] |
| R _f : | 0,4 |

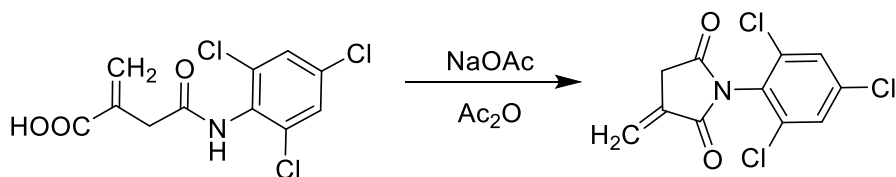
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.56 – 7.50 (2H, m, H₃, H₅), 7.45 – 7.40 (2H, m, H₂, H₆), 6.28 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.76 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, =CH_AH_B), 3.55 (2H, t, *J* = 2.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, Aceton-D₆): δ 173.59, 169.22, 135.72, 134.21, 132.79, 129.78, 129.49, 120.56, 34.73.

IR [cm⁻¹]: 3097, 1776, 1707, 1667, 1494, 1405, 1394, 1386, 1302, 1269, 1238, 1198, 1158, 1147, 1101, 1090, 1016, 1005, 967, 934, 889, 826, 809, 739, 708, 671, 661, 646, 624.

Elementární analýza: teorie: C 59.61, H 3.64, N 6.32; nalezeno: C 59.69, H 3.65, N 6.34.

1-(2,4,6-Trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-6-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₆ Cl ₃ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 290,52 |
| Popis: | světle oranžová krystalická látka |
| Výtěžek: | 79 % |
| Teplota tání: | 124,6 – 126,0 °C |
| R _f : | 0,67 |

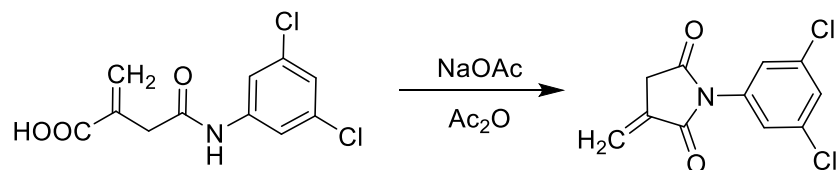
¹H NMR (600 MHz, Aceton-*D*₆): δ 7.77 (2H, s, H₃, H₅), 6.39 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.91 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, =CH_AH_B), 3.77 (2H, t, *J* = 2.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (600 MHz, Aceton-*D*₆): δ 171.98, 167.65, 137.24, 136.11, 134.78, 129.77, 129.16, 122.75, 34.84.

IR [cm⁻¹]: 3080, 2927, 1787, 1721, 1662, 1633, 1572, 1556, 1514, 1474, 1405, 1383, 1369, 1265, 1232, 1209, 1179, 1143, 1122, 1106, 1082, 1000, 962, 931, 899, 875, 859, 816, 808, 733, 717, 700, 671, 660, 624.

Elementární analýza: teorie: C 45.48, H 2.08, N 4.82; nalezeno: C 45.40, H 2.00, N 4.86.

1-(3,5-Dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-7-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₇ Cl ₂ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 256,08 |
| Popis: | hnědá krystalická látka |
| Výtěžek: | 61 % |
| Teplota tání: | 136,7 – 137,5 °C (lit. 142 – 143 °C) [54] |
| R _f : | 0,55 |

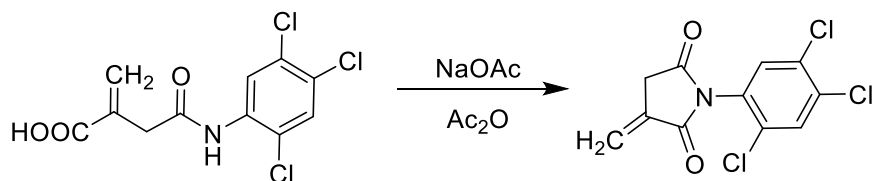
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.56 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, H5), 7.49 (2H, d, *J* = 1.9 Hz, H2, H6), 6.31 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.79 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, =CH_AH_B), 3.57 (2H, t, *J* = 2.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 173.29, 168.86, 136.16, 135.47, 128.85, 126.61, 125.33, 121.19, 34.77.

IR [cm⁻¹]: 3090, 2922, 1780, 1718, 1661, 1576, 1446, 1434, 1413, 1369, 1267, 1201, 1141, 1115, 1107, 1098, 968, 919, 855, 805, 757, 715, 671, 656, 647, 620.

Elementární analýza: teorie: C 51.59, H 2.76, N 5.47; nalezeno: C 51.50, H 2.70, N 5.43.

1-(2,4,5-Trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-8-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₆ Cl ₃ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 290,52 |
| Popis: | Světle hnědá krystalická látka |
| Výtěžek: | 86 % |
| Teplota tání: | 98,3 – 99,8 °C |
| R _f : | 0,57 |

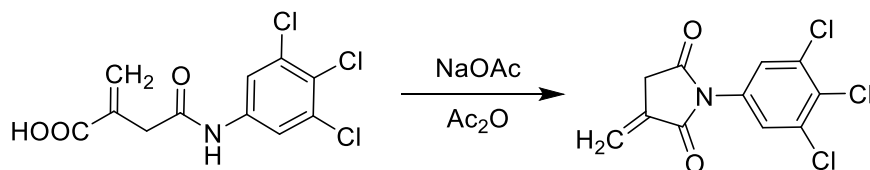
¹H NMR (600 MHz, Aceton-*D*₆): δ 7.93 (1H, s, H₃), 7.75 (1H, s, H₆), 6.33 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, =CH_AH_B), 5.83 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.72 – 3.57 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (600 MHz, Aceton-*D*₆): δ 172.63, 168.28, 135.31, 134.76, 132.89, 132.80, 132.25, 132.10, 131.89, 121.77, 34.94.

IR [cm⁻¹]: 3100, 2925, 1775, 1719, 1665, 1471, 1396, 1389, 1337, 1264, 1230, 1203, 1168, 1140, 1130, 1086, 1008, 958, 916, 887, 820, 805, 700, 688, 663, 643, 609.

Elementární analýza: teorie: C 45.48, H 2.08, N 4.82; nalezeno: C 45.50, H 2.10, N 4.91.

1-(3,4,5-Trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-9-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₆ Cl ₃ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 290,52 |
| Popis: | běžová krystalická látka |
| Výtěžek: | 31 % |
| Teplota tání: | 146,4 – 147,8 °C |
| R _f : | 0,51 |

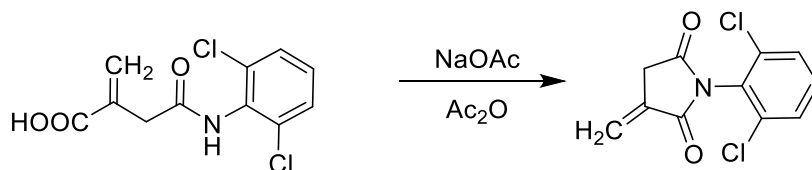
¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.69 (2H, s, H₂, H₆), 6.32 (1H, t, J = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.81 (1H, t, J = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.57 (2H, t, J = 2.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 173.20, 168.73, 135.25, 134.48, 128.83, 128.24, 126.93, 121.37, 34.74.

IR [cm⁻¹]: 3080, 1770, 1717, 1682, 1659, 1639, 1588, 1557, 1488, 1440, 1410, 1398, 1386, 1373, 1261, 1234, 1202, 1174, 1155, 1137, 1103, 1048, 1036, 969, 888, 870, 819, 808, 780, 762, 746, 732, 691, 652, 634, 610.

Elementární analýza: teorie: C 45.48, H 2.08, N 4.82; nalezeno: C 45.41, H 2.03, N 4.91.

1-(2,6-Dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion (JST-10-IM)



| | |
|--------------------------------|--|
| Sumární vzorec: | C ₁₁ H ₇ Cl ₂ NO ₂ |
| Relativní molekulová hmotnost: | 256,08 |
| Popis: | bílá krystalická látka |
| Výtěžek: | 29 % |
| Teplota tání: | 183,1 – 184,5 °C (lit. 179 – 179,5 °C) [54] |
| R _f : | 0,67 |

¹H NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 7.66 – 7.63 (2H, m, H₃, H₅), 7.60 – 7.56 (1H, m, H₄), 6.38 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, =CH_AH_B), 5.89 (1H, t, *J* = 2.2 Hz, =CH_AH_B), 3.75 (2H, t, *J* = 2.4 Hz, CH₂).

¹³C NMR (600 MHz, Aceton-D₆): δ 172.09, 167.80, 135.29, 134.93, 132.87, 130.02, 129.78, 122.40, 34.80.

IR [cm⁻¹]: 3087, 2922, 1780, 1717, 1698, 1681, 1664, 1647, 1569, 1508, 1466, 1440, 1405, 1367, 1264, 1234, 1204, 1176, 1146, 1104, 1001, 980, 961, 933, 893, 859, 808, 782, 726, 714, 658, 648, 632, 619.

Elementární analýza: teorie: C 51.59, H 2.76, N 5.47; nalezeno: C 51.66, H 2.90, N 5.50.

4.3 Biologické testování

4.3.1 Hodnocení antifungální aktivity

In vitro antifungální aktivita byla otestována vůči osmi kmenům patogenních mykotických mikroorganismům, z nichž čtyři jsou kvasinky: *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 jsou vláknité houby: *Aspergillus fumigatus* (AF) ATCC 204305, *Aspergillus flavus* (AFla) CCM 8363305, *Absidia corymbifera* (AC) CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* (TI) ATCC 9533, CCM 8377.

Ke stanovení antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardů EUCAST v médiu RPMI 1640 s glutaminem a 2% glukózou (KlinLab, Praha, Česká republika) pufrovaném 0,165M 3-morfolinpropan-1-sulfonovou kyselinou (Merck, Darmstadt, Německo) na pH 7,0. Finální velikost inokula byla $0,5-2 \times 10^5$ CFU/ml. Velikost inokula byla zkontrolována pomocí Bürkerovy komůrky. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby finální koncentrace byly v rozmezí 0,49-500 $\mu\text{mol/l}$. Výsledná koncentrace DMSO byla 1 % (v/v) a nijak neovlivnila růst patogenů. MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 ± 2 °C, pouze v případě *Trichophyton interdigitale* byly výsledky odečteny po 72 a 120 hod. [50]

Hodnoty MIC znamenající úplnou inhibici růstu hub byly stanoveny vizuálně. Triazolové antimykotikum flukonazol (FLU) bylo použito jako referenční látka. V jeho případě MIC znamená IC_{50} , tj. koncentraci, která způsobila 50% růstovou inhibici ve srovnání s kontrolou bez léčiva. [56]

Antifungální aktivita byla stanovena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové paní Idou Dufkovou.

4.3.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

In vitro antibakteriální aktivita byla stanovena na čtyřech kmenech Gram-pozitivních bakterií: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (SA) ATC 29213, CCM 223, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA) ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* (SE) ATCC 12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* (EF) ATCC 29212, CCM 4224;

a čtyřech kmenech Gram-negativních bakterií: *Escherichia coli* (EC) ATCC 25922, CCM 3954, *Klebsiella pneumoniae* (KP) ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* (ACI) ATCC 19606, DSM 30007, a *Pseudomonas aeruginosa* (PA) ATCC 27853, CCM 3955.

Ke stanovení antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách podle standardu EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti) v Müller-Hintonově bujónu č. 2 (CAMHB). Velikost inokula byla 0,5 podle McFarlandovy stupnice ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 (± 0.2). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO tak, aby finální koncentrace byly v rozmezí 0,49-500 $\mu\text{mol/l}$. Výsledná koncentrace DMSO byla 1 % (v/v) a nijak neovlivnila růst patogenů. Hodnoty MIC (znamající úplnou inhibici viditelného růstu bakterií) byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře při 35 ± 2 °C. [57]

MIC je definována jako minimálně 95% redukce růstu bakterií ve srovnání s kontrolou. Inhibice růstu byla stanovena vizuální metodou, případně pomocí indikátoru Alamar Blue. Jako referenční léčivo pro srovnání bylo zvoleno beta-laktamové antibiotikum piperacilin (PIP). [58]

Antibakteriální aktivita byla stanovena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové paní Idou Dufkovou.

4.4 Biochemické testování

4.4.1 Hodnocení inhibiční aktivity

Pro stanovení inhibiční aktivity sloučenin na cholinesterázy, vyjádřené jako IC_{50} (koncentrace, která způsobí pokles aktivity enzymu na 50 %), byla použita spektrofotometrická Ellmanova metoda, založená na kvantifikaci obsahu sulfanylových skupin nebo disulfidových můstků. Princip metody je založený na měření rychlosti vzniku thiocholinu, který vzniká jako produkt hydrolýzy acetylthiocholinu (ATCh) nebo butyrylthiocholinu (BTCh) příslušnou AChE či BChE ve vodném prostředí. Thiocholin následně reaguje s 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou kyselinou) (DTNB), tzv. Ellmanovým činidlem. Výsledný 5-thio-2-nitrobenzoát, žlutý produkt reakce, je detekovatelný při vlnové délce 412 nm. [59], [60]

Všechny reakce měly výsledný objem 2000 μ l a obsahovaly ATCh (nebo BTCh) v koncentraci 40 μ M, DTNB v koncentraci 100 μ M a enzymová aktivita reakční směsi byla 0,2 U/ml. Sloučeniny byly po rozpuštění v DMSO (finální koncentrace DMSO v reakční směsi byla 0,2 %) zředěny deionizovanou vodou (vodivost 3 μ S, dodavatel zařízení BKG Water Treatment, Hradec Králové, Česká republika). Pro všechny testované sloučeniny a standard rivastigmin bylo použito osm různých koncentrací inhibitoru a testování každé sloučeniny bylo prováděno ve třech vyhotoveních. [59], [60], [61]

Z průměrné hodnoty měření reakčních rychlostí (v_0 – neinhibovaná reakce, v_i – inhibovaná reakce) byl sestrojen graf závislosti poměru rychlosti neinhibované a inhibované hydrolýzy (v_0/v_i) na koncentraci inhibitoru $[I]$. Z takto získané přímky, procházející body (1;0) a ($v_0/v_i; [I]$), lze odečíst pro $v_0/v_i = 2$ hodnotu IC_{50} . [61]

Použitá acetylcholinesteráza byla původem z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus* L.) a butyrylcholinesteráza pocházela z koňského séra (oboje Merck, Darmstadt, Německo). [59]

Všechna měření byla provedena Mgr. Šárkou Štěpánkovou, Ph.D., na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Chemie

Cílem diplomové práce byla syntéza dvaceti sloučenin vycházejících z anhydridu IA. Prvním krokem byla syntéza deseti monoamidů z anhydridu IA a příslušného chloranilinu, druhým krokem pak byla cykлизace vytvořených monoamidů za vzniku imidů. Celkem jedenáct z těchto sloučenin bylo již dříve publikováno a u sedmi sloučenin (JST-2, JST-5, JST-1-IM, JST-2-IM, JST-3-IM, JST-4-IM, JST-5-IM) byla testována jejich biologická aktivita. Charakterizace zbylých devíti sloučenin je popsána poprvé.

Všechny monoamidy byly připraveny dle pilotní reakce s minimálními nečistotami, k jejichž odstranění stačilo po zfiltrování látek promytí benzenem. U osmi monoamidů (JST-1, JST-2, JST-3, JST-4, JST-5, JST-7, JST-8, JST-9) proběhla konverze během 12 hodin míchání pod zpětných chladičem, zbylé dvě (JST-6 a JST-10) bylo nutné ponechat míchat pod zpětným chladičem po dobu 48 hodin, aby cílená konverze proběhla (u látky JST-6 při nedostatečné době refluxu vznikala volná IA). Výtěžky reakcí, při kterých vznikaly monoamidy, se pohybovaly v rozmezí 24-99 %. Nejvyšších výtěžků (99 %) bylo dosaženo u sloučenin s kódy JST-4 a JST-7, naopak nejnižší výtěžky patřily sloučeninám s kódy JST-6 a JST-10. Nízký výtěžek by mohl být mimo jiné ovlivněn i pozicí atomů chloru v pozicích 2,6 na benzenovém jádře (sterické bránění).

Pro zacyklení monoamidů bylo vyzkoušeno hned několik postupů, jenž vycházely z odborné literatury. Mezi naše neúspěšné postupy přípravy imidů patřily:

1. Monoamid (1 ekv.) byl rozpuštěn v *N,N*-dimethylformamidu a za stálého míchání byl přidán hydroxybenzotriazol hydrát (1,1 ekv.) s triethylaminem (3 ekv.). Po zchlazení reakční směsi v ledové lázni byl přidán 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (1,5 ekv.). Po 15 minutách byla ledová lázeň odstraněna a reakční směs ponechána míchat za laboratorní teploty. V reakční směsi vznikly krystaly, jež byly podle rozpustnosti a po kontrole za pomoci TLC a NMR identifikovány jako triethylamoniová sůl kyseliny. [62]
2. Monoamid (1 ekv.) byl rozpuštěn v dimethylformamidu a za stálého míchání byl přidán hydroxybenzotriazol hydrát (1,1 ekv.). Reakční směs byla zchlazena

v ledové lázni a poté byl přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (1,5 ekv.). [63] Po 15 minutách byla ledová lázeň odstraněna a reakční směs ponechána míchat za laboratorní teploty (konverze průběžně kontrolována za pomoci TLC). Po zfiltrování vzniklé močoviny byla přidána destilovaná voda, směs přenesena do dělicí nálevky a extrahována třikrát DCM. Spojené organické vrstvy dále extrahovány 2× nasyceným roztokem chloridu sodného a následně vysušeny stáním nad síranem sodným. Po odfiltrování Na₂SO₄ byla organická fáze odpařena dosucha, rekrytalizace proběhla ze směsi EtOAc s hexanem. Tato metoda byla ale nespolehlivá. Pokud vznikla cílová sloučenina, měla pouze nízký výtěžek s vysokou mírou znečištění.

Všechny imidy byly připraveny dle konečného obecného postupu. Pilotní reakce byla upravena pouze u látky JST-4-IM, která nekrytalizovala v soustavě THF/*n*-hexan, proto byla použita o trochu méně polární směs rozpouštědel diethylether/*n*-hexan. Výtěžky konečné cyklizace na imidy byly nižší než reakcí za vzniku monoamidů, pohybovaly se v rozmezí 29-86 %. Nejvyšší výtěžek z imidů 86 % byl v případě přípravy trichlorovaného derivátu s kódem JST-8-IM.

5.2 Biologie

U většiny syntetizovaných sloučenin byla otestována antifungální a antibakteriální aktivita pomocí mikrodiluční bujónové metody. Sloučeniny JST-9 a JST-10 nebyly testovány kvůli nerozpustnosti v DMSO. Výsledky biologického testování jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tabulka 1 a Tabulka 2).

5.2.1 Antifungální aktivita

V Tabulce 1 můžeme vidět antifungální aktivitu nově syntetizovaných sloučenin. Monoamidy (JST-1 – JST-8) vůči naprosté většině testovaných kmenů neprojeví aktivitu. Výjimku tvořila pouze látka JST-6 u kmenů *Candida krusei* a *Candida parapsilosis* po 24 hodinách inkubace, avšak koncentrace potřebná pro inhibici je příliš vysoká a při delší inkubaci již tato látka růst neinhibovala.

Antifungální aktivitu ale projeví všechny cyklické imidy (JST-1-IM – JST-10-IM). Velmi dobrou aktivitu prokázaly syntetizované imidy proti plísni *Trichophyton interdigitale*, což

můžeme vidět porovnáním MIC hodnot látek s referenčním látkou. Většina látek (JST-1-IM, JST-5-IM, JST-6-IM, JST-7-IM, JST-8-IM, JST-9-IM, JST-10-IM) projevila aktivitu při nižší koncentraci ($\leq 31,25 \mu\text{mol/l}$) než srovnávací ATM flukonazol ($52,2 \mu\text{mol/l}$).

Nejvyšší antifungální aktivitu ($7,81 \mu\text{mol/l}$) projevily trichlorované deriváty JST-6-IM (chlor navázan v polohách 2, 4, 6 na benzenovém jádře) a JST-9-IM (chlor v polohách 3, 4, 5). Dobrou inhibici všech testovaných vláknitých hub projevila látka JST-7-IM, která obsahuje dva atomy chloru navázané v pozici 3 a 5. Obecně nejlepší aktivitu vůči kvasinkám (hlavně kmenům *Candida albicans*, *Candida tropicalis* a *Candida krusei*) projevila látka JST-8-IM (2,4,5-trichlor derivát).

Pokud porovnáme výsledky monochlorovaných sloučenin (JST-1-IM, JST-4-IM, JST-5-IM), zjistíme nejlepší antifungální aktivitu a největší spektrum účinku u derivátu JST-5-IM, který má chlor navázaný na benzenovém jádře v pozici 4. Tři ze čtyř dichlorovaných molekul (JST-2-IM, JST-3-IM, JST-7-IM) prokazují, až na některé výjimky, vyšší aktivitu proti mykotickým kmenům než látky s jedním atomem chlóru. Látka JST-7-IM s chlorem na pozicích 3, 5 jeví větší aktivitu vůči vláknitým kmenům hub, kdežto pozice chloru 3, 4 u látky JST-2-IM účinněji inhibuje růst kvasinek *Candida albicans* a *Candida krusei*. 2,6-Dichlorovaná sloučenina JST-10-IM má však obecně menší aktivitu i oproti některým monochlorovaným derivátům. Trichlorované deriváty (JST-6-IM, JST-8-IM a JST-9-IM) prokázaly inhibici *Trichophyton interdigitale* i za velmi nízkých koncentrací, avšak u jiných testovaných kmenů měli podobnou či horší aktivitu než ostatní testované látky.

Vzhledem k výsledkům testování lze konstatovat, že antifungální aktivita imidů je závislá na počtu atomů chloru a na jejich poloze v molekule, avšak rostoucí počet atomů chloru nemá přímo úměrný vliv na aktivitu, a ani samotná jednotlivá pozice na benzenovém jádře není jediným rozhodujícím faktorem aktivity dané sloučeniny.

| KMEN (KÓD) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l) | | | | | | |
|---------------|-------|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|--------|
| | | JST-1 – JST-5, JST-7, JST-8 | JST-6 | JST-1-IM | JST-2-IM | JST-3-IM | JST-4-IM | - |
| CA | 24 h | >500 | >500 | 125 | 31,25 | 62,5 | 250 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 250 | 62,5 | 250 | 500 | - |
| CK | 24 h | >500 | 500 | 62,5 | 31,25 | 31,25 | 62,5 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 125 | 31,25 | 62,5 | 125 | - |
| CP | 24 h | >500 | 500 | 250 | 125 | 250 | 500 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 500 | 500 | 500 | >500 | - |
| CT | 24 h | >500 | >500 | 250 | 62,5 | 31,25 | 500 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 250 | 125 | 125 | 500 | - |
| AF | 24 h | >500 | >500 | 125 | 125 | 125 | 250 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 500 | 500 | 500 | 500 | - |
| AFla | 24 h | >500 | >500 | 250 | 62,5 | 125 | 500 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 500 | 250 | 500 | >500 | - |
| AC | 24 h | >500 | >500 | 125 | 125 | 125 | 125 | - |
| | 48 h | >500 | >500 | 500 | 500 | 500 | 500 | - |
| TI | 72 h | >500 | >500 | 15,62 | 31,25 | 15,62 | 31,25 | - |
| | 120 h | >500 | >500 | 31,25 | 62,5 | 62,5 | 62,5 | - |
| KMEN (KÓD) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (μmol/l) | | | | | | |
| | | JST-5-IM | JST-6-IM | JST-7-IM | JST-8-IM | JST-9-IM | JST-10-IM | FLU |
| CA | 24 h | 125 | 62,5 | 62,5 | 31,25 | 31,25 | 125 | 6,5 |
| | 48 h | 125 | 125 | 125 | 31,25 | 125 | 250 | 6,5 |
| CK | 24 h | 31,25 | 125 | 62,5 | 31,25 | 62,5 | 62,5 | >104,5 |
| | 48 h | 62,5 | 500 | 125 | 62,5 | 125 | 125 | >104,5 |
| CP | 24 h | 125 | 250 | 62,5 | 125 | 125 | 250 | 3,3 |
| | 48 h | 125 | 500 | 125 | 250 | >125 | 500 | 3,3 |
| CT | 24 h | 250 | 125 | 62,5 | 62,5 | 31,25 | 125 | 6,5 |
| | 48 h | 500 | 500 | 125 | 62,5 | 125 | 500 | 6,5 |
| AF | 24 h | 125 | 125 | 31,25 | 125 | 125 | 250 | >104,5 |
| | 48 h | 500 | 500 | 125 | 500 | >125 | 500 | >104,5 |
| AFla | 24 h | 125 | 125 | 31,25 | 125 | 125 | 500 | >104,5 |
| | 48 h | 125 | 500 | 125 | 500 | >125 | >500 | >104,5 |
| AC | 24 h | 31,25 | 31,25 | 31,25 | 125 | 31,25 | 125 | >104,5 |
| | 48 h | 62,5 | 125 | 125 | 500 | 125 | 500 | >104,5 |
| TI | 72 h | 31,25 | 7,81 | 15,62 | 15,62 | 7,81 | 15,62 | 52,2 |
| | 120 h | 31,25 | 15,62 | 31,25 | 15,62 | 15,62 | 31,25 | 52,2 |

Tabulka 1 Výsledky antifungální aktivity

5.2.2 Antibakteriální aktivita

Výsledky antibakteriální aktivity můžeme vidět v Tabulce 2. Kromě tří imidů (JST-6-IM, JST-9-IM a JST-10-IM) nebyla většina testovaných sloučenin aktivní proti testovaným bakteriím v rozsahu použitých koncentrací. Proti gram-negativním bakteriím neprojevila žádná z testovaných sloučenin inhibiční aktivitu.

| KMEN (KÓD) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ($\mu\text{mol/l}$) | | | | |
|---------------|------|--|----------|----------|-----------|--------|
| | | JST-1 – JST-8, JST-1-IM – JST-5-IM, JST-7-IM, JST-8-IM | JST-6-IM | JST-9-IM | JST-10-IM | PIP |
| SA | 24 h | >500 | 500 | >125 | 500 | 3,7 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| MRSA | 24 h | >500 | 500 | >125 | 250 | 29,6 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| SE | 24 h | >500 | 250 | 125 | 125 | 0,23 |
| | 48 h | >500 | 500 | >125 | 500 | |
| EF | 24 h | >500 | 500 | >125 | 500 | 3,7 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| EC | 24 h | >500 | >500 | >125 | >500 | 7,41 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| KP | 24 h | >500 | >500 | >125 | >500 | >59,31 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| ACI | 24 h | >500 | >500 | >125 | >500 | 59,31 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |
| PA | 24 h | >500 | >500 | >125 | >500 | 29,66 |
| | 48 h | >500 | >500 | >125 | >500 | |

Tabulka 2 Výsledky antibakteriální aktivity

Trichlorovaný imid JST-6-IM a dichlorovaný derivát JST-10-IM, které projevily aktivitu proti všem testovaným gram-pozitivním kmenům, obsahují na benzenovém jádře chlor navázaný v polohách 2, 6. Trichlorovaný derivát JST-9-IM, který projevil aktivitu pouze proti *Staphylococcus epidermidis*, má polohy 2 a 6 volné, ale obsahuje chlor v polohách 3, 4, 5. Z výsledků je patrné, že pro antibakteriální aktivitu je důležitý zacyklený pyrrolidin, dvojice poloh 2, 6 benzenového jádra a počet atomů chloru v molekule, neboť všechny monoamidy, imidy s jedním atomem chloru a dichlorované imidy, které nemají obě polohy 2, 6 benzenového jádra obsazené atomy chloru, nejsou aktivní. Trichlorovaná molekula JST-8-IM obsahující chlor v poloze 2, 4, 5 (ale ne 6) antibakteriální aktivitu taktéž neprojevila, z čehož

můžeme usuzovat, že u trichlorovaných imidů je pro aktivitu důležité mít obě polohy 2,6 buďto volné, anebo naopak obsazené atomy chloru. Nejlepší aktivity dosáhly látky JST-9-IM a JST-10-IM (125 $\mu\text{mol/l}$) při inhibici kmene *Staphylococcus epidermidis*, avšak i tyto nejaktivnější látky mají hodnotu MIC oproti srovnávacímu ATB piperacilinu výrazně vyšší a lze tedy tvrdit, že antibakteriální aktivita těchto imidů je velice nízká.

5.3 Biochemie

AChE je klíčová serinová hydroláza s hlavní katalytickou funkcí v nervosvalových spojích a cholinergních mozkových synapsích, kde štěpí estery cholinu, především neuromediátor acetylcholin. Tato reakce je nezbytná pro přenos nervového vzruchu. [59], [64] BChE je strukturálně podobný AChE, ale substituce několika aminokyselinových zbytků zapříčinila menší specifitu enzymu a rozšířila jeho katalytický účinek na hydrolýzu např. sukcinylcholinu, benzoylcholinu, neurotoxických peptidů a jiných toxinů či exogenních butyrylcholinu a propionylcholinu. [59], [64], [65] BChE lze nalézt v patologických strukturách, jako jsou senilní plaky a neurofibrilární klubka typická pro Alzheimerovu chorobu. [64] Terapeutická inhibice cholinesteráz se využívá u nemocí, jako je například již zmíněná Alzheimerova choroba, pro potřebu zvýšení funkčnosti cholinergního systému. [64] Předpokládá se, že se BChE také účastní patologické progresy, a proto je léčba založená na inhibici obou enzymů aplikována s cílem zvýšit účinnost terapie. [59]

U všech syntetizovaných sloučenin byla otestována inhibiční aktivita na AChE a BChE pomocí Ellmanovy metody. Ze závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce byl sestaven graf, z kterého byla odečtena hodnota IC_{50} . Výsledné hodnoty IC_{50} testovaných sloučenin a standardu rivastigminu jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 3).

Při hodnocení IC_{50} je třeba mít na mysli, že zamýšlený účinek nově syntetizovaných sloučenin vycházel z biologické aktivity IA a jejích derivátů, proto byla očekávána primárně antimikrobiální (především antifungální) aktivita. Toto hodnocení pak bylo zvoleno s ohledem na zjištění celkového profilu biologické aktivity připravených derivátů a také proto, že deriváty IA jsou známé inhibitory několika enzymů. [45]

Z výsledků v Tabulce 3 můžeme vyčíst, že u většiny syntetizovaných sloučenin byla inhibiční aktivita prokázána, avšak často byla velice nízká. Nejaktivnějším derivátem pro inhibici BChE byl dichlorovaný imid JST-2-IM ($67,76 \mu\text{M}$), obsahující chlor v polohách 3, 4. Nejnižší IC_{50} pro inhibici AChE vykazoval dichlorovaný imid JST-3-IM ($88,87 \mu\text{M}$) s chlorem navázaným v polohách 2, 4. V inhibiční aktivitě amidů a imidů nejsou významné rozdíly.

Poloha a počet chlorů ve sloučenině má opět komplexní vliv na aktivitu, tzn. nelze obecně říci, že sloučeniny s větším počtem atomů chloru vykazují lepší účinnost než

monochlorované a naopak, ani že sloučenina s chlorem navázaným na benzenovém jádře v určité poloze bude mít vždy vyšší aktivitu než ostatní deriváty, které v této poloze atom chloru navázaný nemají. Koncentrace derivátů IA, která je potřebná k 50% inhibici cholinesteráz, vždy přesahuje IC₅₀ rivastigminu.

| Testovaná látka | AChE (IC ₅₀ μM) | BChE (IC ₅₀ μM) |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| JST-1 | 150,90±5,47 | 185,27±8,14 |
| JST-2 | 176,38±7,39 | 106,15±6,82 |
| JST-3 | 168,50±7,00 | 132,45±9,26 |
| JST-4 | 127,64±6,73 | 350,89±7,95 |
| JST-5 | 119,85±5,15 | 97,21±7,02 |
| JST-6 | 130,69±6,77 | 130,57±1,30 |
| JST-7 | 138,47±3,94 | 70,87±3,45 |
| JST-8 | 136,65±3,49 | 237,85±9,10 |
| JST-9 | 137,27±7,51 | >500 |
| JST-10 | 136,09±4,45 | 149,20±2,47 |
| JST-1-IM | 167,99±10,69 | 106,27±5,19 |
| JST-2-IM | 105,94±4,24 | 67,76±4,19 |
| JST-3-IM | 88,87±5,75 | >500 |
| JST-4-IM | 139,20±7,23 | >500 |
| JST-5-IM | 131,28±6,39 | 219,02±15,83 |
| JST-6-IM | 151,43±4,15 | 276,58±5,50 |
| JST-7-IM | 176,93±9,16 | 140,50±11,47 |
| JST-8-IM | 148,39±6,19 | 211,73±17,34 |
| JST-9-IM | 93,03±4,71 | 107,85±7,45 |
| JST-10-IM | 145,59±7,28 | 373,91±17,44 |
| rivastigmin | 56,10±1,41 | 38,40±1,97 |

Tabulka 3 Výsledky inhibiční aktivity sloučenin

6 Závěr

Mykotické mikroorganismy vyvolávají velice nebezpečné systémové mykózy, které ohrožují především pacienty se sníženou obranyschopností. Léčba těchto onemocnění je proto často velmi náročná, a to i vzhledem k toxicitě antifungálních sloučenin. Vyrůstající rezistence mikroskopických hub na dostupná ATM tuto léčbu ještě více ztěžuje, a proto je důležitý vývoj nových, méně toxických ATM.

V rámci této diplomové práce bylo syntetizováno dvacet sloučenin, na jejichž přípravu byl využit anhydrid IA. Deset monoamidů bylo připraveno syntézou samotného anhydridu IA s příslušným mono-, di- nebo trichlorovaným anilinem. Dalších deset sloučenin vzniklo zacyklením těchto nasyntetizovaných monoamidů. Na výsledných sloučeninách byl pozorován vztah mezi biologickou aktivitou, počtem a polohou atomů chloru. Čistota a výtěžek připravených sloučenin byly dostačující pro testování antimikrobiální aktivity i pro měření enzymatické inhibiční aktivity na AChE a BChE.

Připravené sloučeniny byly syntetizované s očekáváním dobré antifungální aktivity, kterou nakonec projevily hlavně cyklické imidy. Nejlepší antifungální účinky byly naměřeny u dvou ze tří trichlorovaných derivátů: 1-(2,4,6-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dionu a 1-(3,4,5-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dionu. Inhibiční účinky všech syntetizovaných sloučenin na AChE a BChE byly relativně nízké, podobně jako antibakteriální aktivita sloučenin 1-(2,4,6-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion, 1-(2,6-dichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion, 1-(3,4,5-trichlorfenyl)-3-methylenpyrrolidin-2,5-dion proti gram-pozitivním kmenům. Naprostá většina testovaných látek antibakteriální aktivitu neprokázala.

Podařilo se tak připravit selektivní antifungální sloučeniny. V plánu jsou testování cytotoxicity a detailnější charakterizace jejich antifungálního účinku.

7 Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obr. 1 Seznam závažných patogenů podle WHO, Převzato z:[11]..... | 15 |
| Obr. 2 Cíle ATM v syntéze ergosterolu, Převzato z:[15]..... | 16 |
| Obr. 3 Vzorec amfotericinu B | 18 |
| Obr. 4 Vzorec A) nystatinu, B) natamycinu | 19 |
| Obr. 5 Vzorce A) ketokonazolu, B) flukonazolu..... | 21 |
| Obr. 6 Vzorec itrakonazolu | 22 |
| Obr. 7 Vzorec vorikonazolu | 23 |
| Obr. 8 Vzorec posakonazolu..... | 23 |
| Obr. 9 Vzorec isavukonazolu | 24 |
| Obr. 10 Vzorec flucytosinu | 25 |
| Obr. 11 Vzorec terbinafinu | 26 |
| Obr. 12 Vzorec amorolfinu | 26 |
| Obr. 13 Vzorec kyseliny itakonové | 31 |
| Obr. 14 Design cílových monoamidů | 33 |
| Obr. 15 Design cílových imidů | 33 |
| Obr. 16 Číslování vodíků pro interpretaci NMR spekter | 35 |
| Obr. 17 Reakční schéma přípravy monoamidů | 36 |
| Obr. 18 Reakční schéma cyklizace na imidy | 47 |

8 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Výsledky antifungální aktivity | 64 |
| Tabulka 2 Výsledky antibakteriální aktivity..... | 65 |
| Tabulka 3 Výsledky inhibiční aktivity sloučenin | 68 |

9 Seznam použité literatury

- [1] R. V. Goering et al., *Mimsova lékařská mikrobiologie*, 5. vydání., Praha: Triton, 2016.
- [2] K. Konečná, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, „Uvod-do-mykologie-patogenni-krasinky-a-vlaknitye-houby-2023-2024“, [cit. 2024-03-01].
- [3] K. Comová, „In vitro screening nových, potenciálně antimykotický účinných sloučenin II“, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2019.
- [4] M. Votava et al., *Lékařská mikrobiologie speciální*, 1. vydání., Brno: Neptun, 2003.
- [5] „Mycotoxins“ [online], 2023, World Health Organization, [cit. 2024-03-01]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
- [6] F. Bongomin et al., „Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision“, *J Fungi*, vol. 3, no. 4, pp. 57, Oct. 2017, doi: 10.3390/jof3040057.
- [7] B. Voxová, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, „Kožní mykózy“, [cit. 2024-03-01].
- [8] „Chromoblastomycosis“ [online]., 2023, World Health Organization, [cit. 2024-03-01]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chromoblastomycosis>.
- [9] O. A. Cornely et al., „Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium“, *Lancet Infect Dis*, vol. 19, no. 12, pp. 405–421, 2019, doi: 10.1016/S1473-3099(19)30312-3.
- [10] P. Sedláček, „Terapie invazivních mykotických infekcí u imunosuprimovaných pacientů“, *Onkol*, no. 3, s. 186–190, 2008.
- [11] H. Sati et al., „WHO fungal priority pathogens list to guide research development and public health“ [online], Nov. 2022, [cit. 2024-03-01], ISBN: 978-92-4-006024-1. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>.
- [12] N. M. Revie et al., „Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact“, *Curr Opin Microbiol*, no. 45, pp. 70–76, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005.
- [13] H. Rozsypal, *Základy infekčního lékařství*, 2. upravené vydání, Praha: Karolinum, Univerzita Karlova, 2023, ISBN: 978-80-246-5443-0.
- [14] A. M. Fuentesfria et al., „Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance“, *Lett Appl Microbiol*, vol. 66, no. 1, pp. 2–13, Jan. 2018, doi: 10.1111/lam.12820.
- [15] S. Bhattacharya et al., „Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance“, *Antibiotics*, vol. 9, no. 6, pp. 312, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9060312.

- [16] S. Zotchev, „Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy", *Curr Med Chem*, vol. 10, no. 3, pp. 211–223, Feb. 2003, doi: 10.2174/0929867033368448.
- [17] J. Lochmannová, *Praktické využití antibiotik ve vnitřním lékařství*. Praha: Karolinum, 2008, ISBN: 978-80-246-1550-9.
- [18] A. Lemke, A. F. Kiderlen a O. Kayser, „Amphotericin B", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 68, no. 2, pp. 151–162, Aug. 2005, doi: 10.1007/s00253-005-1955-9.
- [19] V. Jindrák, D. Hedlová a P. Urbášková, *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*, 1. vydání, Praha: Mladá fronta, 2014.
- [20] S. de Marie, „Liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B.", *Leukemia*, vol. 10 Suppl 2, 1996.
- [21] Z. Sklenář, „Nystatin – nově dostupné léčivo pro magistraliter přípravu", *Cesk Dermatol*, vol. 4, pp. 209–214, 2010.
- [22] M. Mascarenhas, P. Chaudhari a S. A. Lewis, „Natamycin Ocular Delivery: Challenges and Advancements in Ocular Therapeutics", *Adv Ther*, vol. 40, no. 8, pp. 3332–3359, Aug. 2023, doi: 10.1007/s12325-023-02541-x.
- [23] V. Akkerman et al., „Natamycin interferes with ergosterol-dependent lipid phases in model membranes", *BBA Advances*, vol. 4, pp. 100-102, 2023, doi: 10.1016/j.bbadv.2023.100102.
- [24] D. Khanna a S. Bharti, „Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review", *Core Evid*, Sep. 2014, doi: 10.2147/CE.S49629.
- [25] M. Shafiei, L. Peyton et al., „History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action", *Bioorg Chem*, vol. 104, s. 104-240, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104240.
- [26] A. Ahmadi, E. Mohammadnejadi et al., „Current Status and Structure Activity Relationship of Privileged Azoles as Antifungal Agents (2016–2020)", *Int J Antimicrob Agents*, vol. 59, no. 3, pp. 106-518, March 2022, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106518.
- [27] P. Horák, „Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů", *Interní medicína pro praxi*, no. 4, s. 171–175, 2011.
- [28] L. C. Nocua-Báez, P. Uribe-Jerez et al., „Azoles de antes y ahora: una revisión", *Revista chilena de infectología*, vol. 37, no. 3, pp. 219–230, 2020, doi: 10.4067/s0716-10182020000300219.
- [29] N. Berila a J. Šubík, „Oportúnne patogénna kvasinka *Candida glabrata* a jej mechanizmy rezistencie voči antimykotikám (súborný referát)", *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, vol. 2, pp. 67–79, 2010.

- [30] „Souhrn údajů o přípravku". Státní úřad pro kontrolu léčiv, [Online], [cit. 2024-04-24]. Dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0230369.
- [31] J. D. Reber, G. A. McKenzie a S. M. Broski, „Voriconazole-induced periostitis: beyond post-transplant patients", *Skeletal Radiol*, vol. 45, no. 6, pp. 839–842, 2016, doi: 10.1007/s00256-016-2365-z.
- [32] A. J. Guarascio, N. Bhanot a Z. Min, „Voriconazole-associated periostitis: Pathophysiology, risk factors, clinical manifestations, diagnosis, and management", *World J Transplant*, vol. 11, no. 9, pp. 356–371, Sep. 2021, doi: 10.5500/wjt.v11.i9.356.
- [33] G. M. Keating, „Posaconazole", *Drugs*, vol. 65, no. 11, pp. 1553–1567, 2005, doi: 10.2165/00003495-200565110-00007.
- [34] J. Haber a N. Mallátová, „Isavukonazol (Cresemba): nový triazol pro léčbu invazivní aspergilózy a mukormykózy", [Online]. [cit. 2024-04-25], Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/tema/antiinfektiva/detail/isavukonazol-cresemba-novy-triazol-pro-lecibu-invazivni-aspergilozy-a-mukormykozy-121073>
- [35] „Souhrn údajů o přípravku". Státní úřad pro kontrolu léčiv, [Online], [cit. 2024-04-25], Dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0211000
- [36] M. Szymański, S. Chmielewska et al., „Echinocandins – structure, mechanism of action and use in antifungal therapy", *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 37, no. 1, pp. 876–894, Dec. 2022, doi: 10.1080/14756366.2022.2050224.
- [37] Z. A. Kanafani a J. R. Perfect, „Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact", *Clinic Infect Dis*, vol. 46, no. 1, pp. 120–128, Jan. 2008, doi: 10.1086/524071.
- [38] L. S. M. Siger a D. W. Denning, „Flucytosine and its clinical usage", *Ther Adv Infect Dis*, vol. 10, Jan. 2023, doi: 10.1177/20499361231161387.
- [39] M. C. Fisher et al., „Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health", *Nat Rev Microbiol*, vol. 20, no. 9, s. 557–571, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41579-022-00720-1.
- [40] R. S. Shapiro, N. Robbins a L. E. Cowen, „Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease", *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 75, no. 2, pp. 213–267, 2011, doi: 10.1128/MMBR.00045-10.
- [41] T. C. White, K. A. Marr a R. A. Bowden, „Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance", *Clin Microbiol Rev*, vol. 11, no. 2, pp. 382–402, April 1998, doi: 10.1128/CMR.11.2.382.
- [42] Ö. Doğan, D. Gülmez a S. Arıkan Akdağlı, „Klinik ve Çevresel Örneklerden Elde Edilen *Aspergillus fumigatus* İzolatlarında Azol Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi", *Mikrobiyol Bul*, vol. 54, no. 2, pp. 291–305, April 2020, doi: 10.5578/mb.69024.

- [43] J. Lin, J. Ren et al., „The Emerging Application of Itaconate: Promising Molecular Targets and Therapeutic Opportunities", *Front Chem*, vol. 9, May 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.669308.
- [44] D. Gopaliya, V. Kumar a S. K. Khare, „Recent advances in itaconic acid production from microbial cell factories", *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 36, pp. 102-130, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.bcab.2021.102130.
- [45] M. Krátký, E. Novotná et al., „Substituted *N*-phenylitaconamides as inhibitors of mycobacteria and mycobacterial isocitrate lyase", *Eur J Pharm Sci*, vol. 176, pp. 106-252, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106252.
- [46] M. Sano, T. Tanaka et al., „Itaconic acid derivatives: structure, function, biosynthesis, and perspectives", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 21, pp. 9041–9051, Nov. 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10908-1.
- [47] X. Zhu, Y. Guo et al., „Itaconic acid exerts anti-inflammatory and antibacterial effects via promoting pentose phosphate pathway to produce ROS", *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-97352-x.
- [48] C. Deoghare, S. Balaji et al., „Antimicrobial and anticancer activities of copolymers of tri-*O*-acetyl-*D*-glucal and itaconic anhydride", *J Serbian Chem Societ*, vol. 87, no. 5, pp. 629–640, 2022, doi: 10.2298/JSC210828108D.
- [49] P. S. Nayak, B. Narayana et al., „Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of imides, pyridazines, and imidazoles derived from itaconic anhydride for potential antioxidant and antimicrobial activities", *J Taibah University Sci*, vol. 10, no. 6, pp. 823–838, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jtusci.2014.09.005.
- [50] M. Krátký a J. Vinšová, „Antifungal Activity of Salicylanilides and Their Esters with 4-(Trifluoromethyl)benzoic Acid", *Molecules*, roč. 17, č. 8, s. 9426–9442, srp. 2012, doi: 10.3390/molecules17089426.
- [51] X. Ren et al., „Asymmetric Alkoxy- and Hydroxy-Carbonylations of Functionalized Alkenes Assisted by β -Carbonyl Groups", *Angew Chem Int Ed*, vol. 60, no. 32, pp. 17693–17700, srp. 2021, doi: 10.1002/anie.202105977.
- [52] J. A. Riddell a B. Von Schmeling, „Method of controlling fungi and algae with *n*-phenyl-itaconimides", US3098002A, 1963
- [53] A. Disdier, G. Borrod a S. Trinh. 2-Methylenesuccinamic acid compounds as plant growth regulants. United States, United STATES Patent US19810231721, 1981.
- [54] A. Fujinami, T. Ozaki et al., „Studies on Biological Activity of Cyclic Imide Compounds Part II", *Agric Biol Chem*, vol. 36, no. 2, pp. 318–323, 1972, doi: 10.1271/bbb1961.36.318.
- [55] M. Veverka a E. Kral'ovičová, „Synthesis and biological activity of some derivatives related to 2-methylenebutanedioic acid", *Collect Czechoslov Chem Commun*, vol. 54, no. 10, pp. 2731–2737, 1989, doi: 10.1135/cccc19892731.

- [56] M. Krátký, K. Konečná et al., „Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents", *Eur J Pharm Sci*, vol. 159, p. 105732, April 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105732.
- [57] M. Krátký et al., „Sulfonamide-salicylaldehyde imines active against methicillin- and trimethoprim/sulfonamide-resistant Staphylococci", *Future Med Chem*, vol. 13, no. 22, pp. 1945–1962, lis. 2021, doi: 10.4155/fmc-2021-0169.
- [58] M. Krátký et al., „Improving the antimicrobial activity of old antibacterial drug mafenide: Schiff bases and their bioactivity targeting resistant pathogens", *Future Med Chem*, vol. 15, no. 3, pp. 255–274, Feb. 2023, doi: 10.4155/fmc-2022-0259.
- [59] V. Pflégr, Š. Štěpánková et al., „5-Aryl-1,3,4-oxadiazol-2-amines decorated with long alkyl and their analogues: synthesis, acetyl- and butyrylcholinesterase inhibition and docking study", *Pharm*, vol. 15, no. 4, pp. 400, March 2022, doi: 10.3390/ph15040400.
- [60] Š. Štěpánková, Fakulta chemicko-technologická UPCE, „Inhibice enzymů", [cit. 2024-04-27].
- [61] Š. Štěpánková, Fakulta chemicko-technologická UPCE, „Stanovení IC₅₀", [cit. 2024-04-27].
- [62] S. Gaynor et al., „Probing the dimensions of semi-rigid inner functionalised U-shaped bis-porphyrin cavities", *Org Biomol Chem*, vol. 4, pp. 2253–2266, 2006.
- [63] W. Flitsch a P. Russkamp, „Studien zur Synthese der Mitomycine, 1. Synthese des Mitozan-Gerüsts durch intramolekulare Kondensation und Reformatskij-Reaktion", *Liebigs Ann Chem*, vol. 1985, no. 7, pp. 1398–1412, July 1985, doi: 10.1002/jlac.198519850711.
- [64] A. Šimková, „Syntéza a hodnocení potenciálních biologicky aktivních derivátů a analog rhodaninu", diplomová práce, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2023.
- [65] D. De Boer, N. Nguyen et al., „A Comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation", *Biomolecules*, vol. 11, no. 4, pp. 580, April. 2021, doi: 10.3390/biom11040580.