UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie

Nové malé molekuly a peptidové nosiče jako nástroje boje proti infekcím – syntéza a hodnocení

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2024

Jiří Horčic

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svým školitelům, tedy doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., a Assoc. Prof. Szilvii Bősze, PhD., za vstřícný přístup a důkladné vedení. Zároveň bych chtěl poděkovat odbornému konzultantovi RNDr. Václavu Pflégrovi, Ph.D., za jeho cenné praktické rady a dalším kolegům ze spolupracujících pracovišť.

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

Infekční nemoci jsou hrozbou pro veřejné zdraví na celém světě. Tuberkulóza, s více než 10 miliony obětí ročně, je jednou z největších. To je dále zdůrazněno rostoucím výskytem kmenů odolných vůči dostupným léčivům. U některých kmenů byla popsána rezistence k několika antituberkulotikům 1. linie současně. K boji s touto epidemií a zastavení šíření odolných kmenů jsou nezbytná nová antituberkulózní léčiva.

Deriváty kyseliny salicylové vykazují řadu zajímavých biologických vlastností včetně antimikrobiálních účinků. Na základě dříve popsaných sloučenin jsme připravili řadu derivátů salicylamidu obsahujících *N*-monosubstituovaný karbamátovou skupinu. Ty byly testovány na antifungální a antibakteriální aktivitu a u několika z nich byla objevena výjimečná aktivita proti G+ bakteriím (MIC <0,1 μmol.l^{-1}).

Současně se práce věnuje syntéze nových peptidových nosičů pro další zvýšení účinnosti malých antituberkuloticky aktivních molekul. Kombinací dvou různých peptidových řetězců se schopností pronikat do buněk do jedné sekvence chceme vytvořit selektivní a vysoce účinný tandemový drug-delivery systém nejen pro nízkomolekulární léčiva.

Klíčová slova

Amidy, antibakteriální aktivita, antifungální aktivita, antituberkulotika, *in vitro* aktivita, karbamáty, kyselina salicylová, mykobakterie, peptidové nosiče,

Abstract

Infectious diseases are a looming threat to public health worldwide. Tuberculosis, with over 10 million casualties yearly, is one of the biggest. This is further stressed by the growing incidence of drug resistant strains. Mycobacteria resistant to multiple first line antituberculotics have been reported as well. Novel antitubercular drugs are necessary to combat this epidemic and stop the spread of drug-resistant strains.

Derivates of salicylic acid exhibit several interesting biological properties including antimicrobial effects. Based on previously described compounds, we prepared a series of salicylamide derivates containing *N*-monosubstituted carbamate scaffold. These were screened for antifungal and antibacterial activity and a few of them exhibited exceptional activity against G+ bacteria (MIC < 0.1 $\mu mol.l^{-1}$).

Concurrently we report the synthesis of a novel peptide carriers to further enhance the effectiveness of small antitubercular molecules. By combining two kinds of cell-penetrating peptides into one sequence we aim to create a selective and highly efficient delivery system for new small molecule (and other) drugs.

Key words

Amides, antibacterial activity, antifungal activity, antituberculotics, carbamates, *in vitro* activity, mycobacteria, peptide carriers, salicylic acid

Obsah

Seznam symbolů a zkratek ... 8
1. Úvod ... 10
2. Teoretická část ... 11
2.1. Peptidové nosiče v boji proti infekcím ... 11
2.1.1. Peptidové nosiče ... 11
2.1.2. Peptidové nosiče a monoklonální protilátky ... 11
2.1.3. Stavba PDC ... 11
2.1.4. Klíčové vlastnosti peptidových nosičů ... 15
2.1.5. Strukturní typy a modifikace peptidových nosičů ... 16
2.1.6. Možnosti uplatnění PDC v boji s infekčními onemocněními ... 18
2.2. Biologická aktivita salicylamidů a salicylanilidů ... 24
2.2.1. Salicylamid a salicylanilid ... 24
2.2.2. Biologické vlastnosti derivátů ... 25
3. Cíle práce ... 36
4. Experimentální část ... 38
4.1. Malé molekuly ... 38
4.1.1. Obecná část ... 38
4.1.2. Příprava a charakterizace sloučenin ... 40
Příprava **A6**, **A5** a **A4** ... 40
Příprava látek **A3** a **A2** ... 44
Příprava látky **B0** ... 47
Příprava látek **B6** a **B5** ... 49
Příprava látek **B4**, **B3** a **B2** ... 52
4.1.3. Biologická aktivita ... 56
4.2. Peptidové nosiče ... 59
4.2.1. Obecná část ... 59
4.2.2. Syntéza ... 59
5. Výsledky a diskuze ... 62
5.1. Chemická část ... 62
5.1.1. Malé molekuly ... 62
5.1.2. Peptidové nosiče ... 64
5.2. Biologická aktivita malých molekul ... 67
5.2.1. Výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity ... 67
5.2.2. Výsledky hodnocení antimykotické aktivity ... 68
5.2.3. Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity ... 69
5.3. Diskuse ... 70

6. Závěr 73
7. Přílohy 75
8. Seznam obrázků 82
9. Seznam tabulek 83
10. Zdroje 84

Seznam symbolů a zkratek

AC	*Absidia corymbifera*
DBU	1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
Ac	Acetyl
ACl	*Acinetobacter baumannii*
AChE	Acetylcholinesteráza
ATCC	American Type Culture Collection
AMK	Aminokyselina
ATB	Antibiotikum
AFla	*Aspergillus flavus*
AF	*Aspergillus fumigatus*
ATR	Attenuated total reflectance
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CA	*Candida albicans*
CK	*Candida krusei*
CP	*Candida parapsilosis*
CPP	Cell-penetrating peptides
CT	*Candida tropicalis*
CFU	Colony-forming unit
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur
gD	D glykoprotein
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP4	Dipeptidyl-peptidáza 4
DDS	Drug delivery system
EF	*Enterococcus faecalis*
EC	*Escherichia coli*
Et	Ethyl
FLU	Flukonazol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GIT	Gastrointestinální trakt
HSV-1	*Herpes simplex* virus 1
Hex	Hexyl
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
IgG	Imunoglobulin G
IR	Infračervená spektroskopie
INH	Isoniazid
Cf	Karboxyfluorescein
KBLV	Katedra biologických a lékařských věd

KP	*Klebsiella pneumoniae*
PDC	Konjugát peptid-léčivo
MRSA	Methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
Mtt	Methyltrityl
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MAB	Monoklonální protilátky
MDR	Multiléková rezistence
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
DIC	*N*,*N*′-Diisopropylkarbodiimid
DIEA	*N*,*N*-Diisopropylethylamin
ND	Nezjištěno
LMWH	Nízkomolekulární hepariny
NMP	*N*-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PIP	Piperacilin (sodná sůl)
PN	Peptidové nosiče
PEG	Polyethylenglykol
PA	*Pseudomonas aeruginosa*
RANKL	Receptor aktivátor NF-κB ligandu
R_f	Retenční faktor
SA	*Staphylococcus aureus*
SE	*Staphylococcus epidermidis*
TIS	Triisopropylsilan
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility
TFA	Trifluoroctová kyselina
TI	*Trichophyton interdigitale*

1. Úvod

Antibiotická rezistence je celosvětovým problémem. Přes velkou snahu národních i nadnárodních organizací se nedaří zamezit vzniku rezistence na dříve účinné látky a zastavit šíření rezistentních kmenů. Díky rozvoji rezistence se zužuje spektrum využitelných látek a je potřeba hledat nové možnosti. Velká pozornost je věnována hledání nových strukturních tříd antibiotik a obměnám známých struktur pro zlepšení vlastností a zvýšení účinnosti.

Peptidy jsou krátké řetězce aminokyselin (do 100 jednotek) a v medicíně mají nezastupitelnou roli zejména díky své biologické aktivitě, nízké toxicitě a biodegradovatelnosti. Hojně je také využíváno jejich drobných modifikací, protože peptidy jsou složené z jednoduchých stavebních komponentů. Peptidové nosiče (PN) jsou moderním typem drug-delivery systémů (DDS) s mnoha podstatnými výhodami odvozenými od peptidů. Využívají funkční flexibility a strukturní jednoduchosti peptidů k dosažení účinné a cílené léčby s optimálními parametry. Peptidové DDS lze také s výhodou využít ke zlepšení farmakologického profilu malých antimikrobně účinných molekul.[1]

2. Teoretická část

2.1. Peptidové nosiče v boji proti infekcím

2.1.1. Peptidové nosiče

Spojením léčiva s peptidovým nosičem vzniká proléčivo, jehož výsledné vlastnosti jsou zásadně ovlivněné peptidovou částí. To vede k úpravě farmakokinetiky a zacílení účinku. Tato proléčiva nazýváme konjugát peptid-léčivo (PDC) a jedná se o velice perspektivní nástroje v léčbě i diagnostice mnoha nemocí. PDC díky svým cenným vlastnostem, zejména v kombinaci s dalšími typy DDS, jako jsou například nanočástice, neustále prokazují své terapeutické benefity a široké uplatnění. Ukázaly se jako účinný nástroj v boji proti rakovině, zánětlivým onemocněním, infekcím i dalším onemocněním a jejich vývoj rychle postupuje kupředu.[2]

2.1.2. Peptidové nosiče a monoklonální protilátky

Peptidové nosiče sdílí mnoho charakteristik s monoklonálními protilátkami (MAB). To je dáno jejich chemickou strukturou, vlastnostmi i využitím. Zásadní rozdíl je v jejich hmotnosti. Zatímco peptidové nosiče se běžně pohybují v rozmezí od několika set Da do několika kDa, molekulová hmotnost monoklonálních protilátek se pohybuje nad 100 kDa. Z toho vyplývají zásadní rozdíly v jejich farmakokinetice i výrobě.

MAB nejsou díky své velikosti eliminovány přímo ledvinami, ale dochází k jejich metabolismu v játrech. To může vést k hepatotoxicitě, zvláště pokud byla protilátka spojena s vysoce cytotoxickým léčivem. Naopak PDC jsou primárně eliminovány glomerulární filtrací a mají oproti monoklonálním protilátkám kratší biologický poločas. PDC díky své velikosti dobře pronikají i do špatně prokrvených tkání, jako jsou třeba některé nádory a chrupavka. Navíc mají některé peptidy, nazývané cell-penetrating peptidy (CPP), schopnost pronikat přímo buněčnými membránami. PDC jsou také většinou příliš malé na to, aby vyvolaly odpověď imunitního systému. U MAB hrozí riziko bouřlivé imunitní reakce a vzniku alergie.[3]

Další výhodou PDC je jednodušší a levnější výroba a derivatizace. Struktura PDC je navíc jednoznačně definovaná, což usnadňuje analýzu a dávkování.[4]

2.1.3. Stavba PDC

PDC jsou tvořeny třemi složkami: cargo (neboli náklad), peptid a linker, který je spojuje. Schéma PDC je znázorněno níže (Obrázek 1). Vhodným spojením těchto součástí vznikne molekula s vysokým účinkem, selektivitou a požadovanou farmakokinetikou.

Pro správnou funkci peptidových nosičů je nezbytná jejich správná konformace. V některých případech může náklad interferovat s požadovanou konformací a snižovat tak účinnost nosiče. Tento problém lze vyřešit prodloužením vzdálenosti mezi nákladem a nosičem vložením další struktury, tzv. spacer. Spacerem může být krátký peptid nebo i jiná malá molekula, zpravidla umístěná mezi linkerem a peptidovou částí. Díky spaceru není narušena správná konformace peptidu a PDC může efektivně plnit svoji úlohu.

Obrázek 1: Schéma stavby PDC.

Cargo

Cargo je hlavním nosičem farmakologického účinku. Spojením s peptidem je farmakologický účinek zpravidla potlačen, ale po rozštěpení linkeru se zpět uvolňuje farmakologicky aktivní molekula.

Jako cargo můžou sloužit velmi různorodé struktury. Často jsou to malé molekuly různých účinků s nevhodnou farmakokinetikou, dále to mohou být i jiné peptidy a další biologické polymery, jako třeba nukleové kyseliny a proteiny. Mohou to být i různé nanočástice. Aby na cargo mohl být připojen peptidový nosič, je nutné, aby obsahoval vhodnou funkční skupinu k ukotvení PN nebo byl schopný PN vázat pomocí nekovalentních interakcí. Pokud cargo nemá vhodnou funkční skupinu a není tak možné linker ukotvit, je často možné připravit jeho derivát s podobnými vlastnostmi.[5]

Linker

Linker je část PDC kovalentně spojující peptidový nosič s malou molekulou nebo jinou částicí sloužící jako cargo. Výběr vhodného linkeru je klíčovým faktorem v designu PDC a má podstatný vliv na selektivitu a farmakokinetiku výsledného konjugátu. Vhodný linker musí být stabilní, aby nedošlo k předčasnému uvolnění aktivní molekuly v krevním oběhu nebo v zažívacím traktu (GIT), a zároveň musí v cíli umožňovat uvolnění farmako-dynamicky účinné částice.

Existuje několik typů linkerů, každý s unikátními vlastnostmi jako stabilita, štěpitelnost a délka. Linkery běžně charakterizujeme na neštěpitelné a štěpitelné. Ty dále dělíme na

štěpitelné chemicky nebo enzymaticky a podle konkrétního štěpícího stimulu. Příklady často používaných linkerů jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 1).

Linkery chemicky štěpitelné

Chemicky štěpitelné linkery jsou štěpeny specifickým prostředím v cílovém kompartmentu. Příkladem jsou pH senzitivní linkery, které jsou štěpeny kyselým prostředím například v lyzozomech nebo v zánětlivé tkáni. Mezi běžně využívané pH senzitivní linkery patří acetaly, hemiacetaly, iminy, hydraziny a hydrazony. Dalším typem chemicky štěpitelných linkerů jsou redox senzitivní linkery. Ty využívají několikanásobného zvýšení koncentrace glutathionu (GSH) v buňkách některých tumorů. Sem patří hlavně disulfidy a některé další funkční skupiny obsahující síru a selen. Vlivem redukčního působení GSH dojde k redukci vazby a uvolnění aktivní složky.[6]

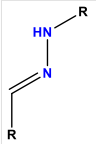
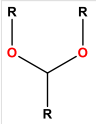
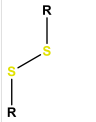
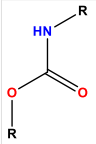
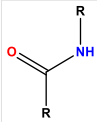
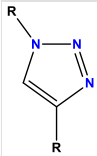
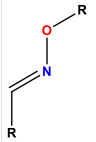
Linkery enzymaticky štěpitelné

Některé nemoci jsou spojené se zvýšenou expresí určitých enzymů, toho můžeme využít k selektivnímu cílení na poškozené tkáně. Linkery štěpitelné pomocí enzymů využívají specifických enzymů k uvolnění účinné látky z PDC. Enzymaticky štěpitelné linkery zahrnují estery, karbamáty a zejména amidové vazby v peptidech. Při designu štěpitelného peptidového linkeru je využíváno specificit peptidáz k určitým sekvencím aminokyselin. Příkladem je sekvence valin-citrulin, oblíbená v PDC cílených na nádory, která je specificky štěpená enzymem upregulovaným v některých nádorech, kathepsinem B.[5]

Linkery neštěpitelné

Neštěpitelné linkery jsou charakteristické svou vysokou stabilitou mimo cílový kompartment. V místě účinku dochází k oddělení peptidu od nákladu, ale nedochází ke štěpení vazby přímo v linkeru. Štěpí se jiné vazby, převážně amidové vazby v peptidu. Často využívanými linkery tohoto typu jsou oximy a také triazolový cyklus vytvořený pomocí „click chemistry“. Ten je izosterní k amidické vazbě, a navíc u některých antimikrobních PDC vykazoval synergistický efekt a snižoval MIC.[7,8]

Tabulka 1: Příklady struktur často používaných linkerů.

Struktura	Název funkční skupiny	Štěpitelnost
	Hydrazon	pH labilní
	Hemiacetal/acetal	pH labilní
	Disulfid	Redukovatelná
	Karbamát	Enzymaticky štěpená
	Amid	Enzymaticky štěpená
	Triazol	Neštěpitelná
	Oxim	Neštěpitelná

V některých případech není linker nutný a peptidový nosič se váže přímo na cargo pomocí elektrostatických interakcí nebo vodíkových vazeb. Toho je hojně využíváno u nukleových kyselin, které díky svému zápornému náboji ochotně vytvářejí komplexy s kationickými peptidy. Vazba pomocí elektrostatických interakcí se vytváří samovolně při mísení jednotlivých komponent a je ve srovnání s kovalentním ukotvením technicky jednodušší a rychlejší. Bohužel, obzvláště při využití jednoduchého mísení, často vzniká komplexní, obtížně definovatelná směs. K dosažení homogenity a charakterizaci je potom nutné využití mikrofluidních systémů. PDC vytvořené s využitím kovalentního linkeru

jsou naopak dobře definovatelné, ale bývá obecně potřeba navrhnout individuální postup přípravy pro každou skupinu konjugátů.[9]

Peptidová část

Peptidová část je zásadní složkou PDC a je z velké části odpovědná za jeho farmakokinetiku. Peptidy mohou zajišťovat selektivitu, průnik do cílové tkáně nebo zlepšení farmakokinetických i farmakodynamických parametrů (potenciace).

2.1.4. Klíčové vlastnosti peptidových nosičů

Stabilita

Častým problémem PDC je krátká doba, po kterou zůstávají v systémovém oběhu. Aby bylo dosaženo požadovaného účinku, je často nutné, aby látka v těle zůstala delší dobu a nebyla nutná opakovaná aplikace. Naopak u vysoce cytotoxických látek může rychlé vyloučení z těla snížit nežádoucí účinky.

Peptidová část PDC je hlavním místem, kde probíhá degradace. To je zapříčiněno velkým množstvím různých peptidáz v extracelulárním i intracelulárním prostoru. Endopeptidázy štěpí peptidový řetězec v místě uvnitř řetězce, zatímco exopeptidázy odštěpují aminokyseliny z N- nebo C-konce.

Odolnost vůči peptidázám můžeme zvýšit několika způsoby. Nejjednodušší možností je připravit peptid, který obsahuje atypickou kombinaci aminokyselin, která není většinou peptidáz rozpoznána. Tato metoda samozřejmě výrazně omezuje možný design peptidu a často není možné ji použít. Obzvlášť pokud má mít výsledný PDC nějakou specifickou vlastnost, jako třeba CPP. Mnohem flexibilnějším, a tedy i častěji využívaným způsobem zpomalení degradace je snížení přístupnosti peptidových vazeb. Běžně se můžeme setkat s nahrazováním aminokyselin jejich nefyziologickými analogy, třeba β- a D-AMK nebo AMK s objemnou postranní substitucí. Podobně substituce na amidové vazbě také zvyšuje stabilitu. Peptidy v konformaci α-helixu mají peptidovou kostru částečně skrytou postranními řetězci, takže modifikace, které podporují helicitu, zároveň zvyšují stabilitu. Cyklizací se peptid fixuje v určité konformaci a zároveň ztratí oba konce náchylné k exopeptidázám. Navíc jsou cyklické peptidy méně vylučovány glomerulární filtrací, což ve výsledku vede k podstatnému prodloužení biologického poločasu.

Díky své malé molekulové hmotnosti jsou PDC ve velké míře vylučovány ledvinami. Tomu lze zabránit zvýšením molekulové hmotnosti, například PEGylací. Dojde tak k překročení filtračního limitu glomerulů a zpomalení vylučování. Na glomerulární

filtraci má také vliv náboj částice. Díky zápornému náboji membrán jsou peptidy se záporným nábojem odpuzovány, a tedy filtrovány pomaleji. Přidávání náboje do molekuly však zásadně ovlivňuje její vlastnosti a chování a není tedy vhodné jako univerzální opatření ke snížení vylučování.

Lipofilita

Peptidy jsou ve své podstatě polární sloučeniny, ale v závislosti na přesném složení a konformaci se jejich vlastnosti podstatně liší. Lipofilita peptidů podstatně ovlivňuje jejich stabilitu a biodostupnost. U peptidů interagujících s membránami má hydrofobicita zásadní význam pro prostupnost membránami a schopnost tvorby pórů.[10] Některé peptidy s hydrofobní částí jsou schopny interagovat s dalšími amfifilními peptidy a vytvářet složitější struktury. Tohoto chování využívají self-assembly PDC (SAPDC).[1,11]

Lipofilitu lze v případě potřeby zvýšit acylací peptidu mastnou kyselinou nebo záměnou jedné nebo více aminokyselin v sekvenci za lipofilnější.

Konformace

Pro správnou funkci peptidu je naprosto nezbytné, aby peptidový řetězec zaujímal správnou konformaci. Nejčastěji se jedná o α-helix, který ale za určitých podmínek není stabilní a peptid preferuje jinou, neaktivní, konformaci. Obzvláště u peptidových sekvencí původem z větších peptidů a proteinů často nastává problém se stabilitou požadované konformace. Ta byla ve velké molekule podporována interakcemi s okolními regiony, ale v krátkém izolovaném peptidu k této stabilizaci nedochází a požadovaná konformace nemusí být preferovaná.[11,12]

2.1.5. Strukturní typy a modifikace peptidových nosičů

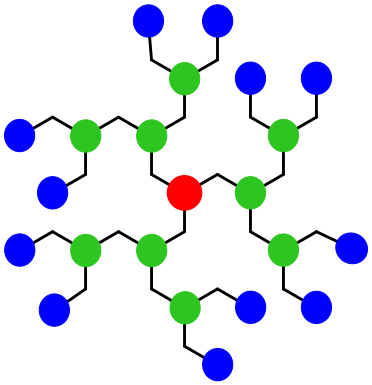
Peptidy tvořící supramolekulární struktury

Při výzkumu nových PDC byl pozorován nový, zprvu nežádoucí, fenomén. Při spojení hydrofobní malé molekuly s hydrofilním peptidovým nosičem vznikla celkově amfifilní molekula, která samovolně vytvářela složitější struktury. Tato vlastnost je nyní u některých PDC cíleně vytvářena s cílem zlepšení farmakokinetických parametrů. Často lze schopnost samovolného složení zakomponovat do peptidového nosiče s další vlastností, například CPP. Úpravami peptidového nosiče může být tato schopnost ovlivněna a pečlivým designem můžeme definovat výslednou strukturu a podmínky, v kterých vzniká. Příkladem jsou nanočástice, které prodlouží dobu, kterou PDC dokáží setrvat v krevním oběhu. Díky své velikosti nejsou nanočástice vylučovány glomerulární

filtrací a mohou pozvolně uvolňovat jednotlivé monomery PDC. SAPDC mohou vytvářet komplexní systémy spontánně, a fungovat tak jako vlastní léková forma, nebo až v určitém prostředí. Toho se dá využít k zacílení účinku na postiženou tkáň. Dá se takto například připravit PDC nesteroidních antiflogistik, který v místě zánětu, kde je zvýšená teplota a nízké pH, vytvoří hydrogel. Takto je docíleno dlouhého působení a zároveň snížení nežádoucích účinků.[1,4]

Dendritické peptidy

Dendritické polymery jsou tvořeny postupným prodlužováním a větvením řetězců vycházejících ze zárodečného jádra. Obrázek 2 zobrazuje příklad struktury dendrimeru. Dendritické peptidy mohou být tvořeny pouze aminokyselinami nebo mohou obsahovat i další složky. Díky své struktuře se vyznačují nízkou toxicitou, dobrou rozpustností a vysokou odolností k degradaci, a tedy i dlouhým poločasem.[13]



Obrázek 2: Příklad struktury dendrimeru.

Cyklické peptidy

Cyklizací peptidového nosiče lze v určitých případech zlepšit jeho vlastnosti. Cyklizací dojde k omezení rotace peptidového řetězce a stabilizaci aktivní konformace. Důsledkem toho je v případě cílených PN vyšší afinita k receptoru a selektivita a v případě CPP lepší prostupnost membránami. Cyklické peptidy jsou obvykle také rezistentnější k enzymatické degradaci a jsou pomaleji vylučovány renální filtrací než lineární analoga.[4,14]

Cyklizace se provádí spojením N- a C- konce nebo spojením postranních skupin řetězce. K tomu se často využívá disulfidová vazba. Alternativou je spojení dvou aminokyselin v řetězci pomocí alifatického řetězce. Tato možnost však zvyšuje riziko, že přidaný spojovací řetězec bude narušovat interakci s receptorem.[5]

Peptidy se schopností pronikat biologickými membránami

Peptidy obecně díky své vysoké polaritě špatně pronikají biologickými membránami. Některé jsou však schopné interagovat s membránami a skrze různé mechanizmy vstupovat do buněk. Tato skupina peptidů se nazývá cell-penetrating peptides (CPP).

První z této skupiny, Tat peptid, byl objeven při studiu schopnosti viru HIV pronikat do lidských buněk. Od té doby bylo popsáno velké množství CPP s původem virovým, bakteriálním, živočišným i rostlinným[15] nebo připravených synteticky.

Zásadní vlastností CPP je schopnost prostupovat biologickými membránami. Při navázání na další částici jsou CPP schopné zprostředkovat současně i její průchod. CPP jako peptidové nosiče jsou schopné přes membrány transportovat jak malé molekuly, tak i částice s mnohonásobně větší velikostí, jako třeba proteiny a nanočástice. Díky své malé velikosti umožňují CPP hluboký a efektivní průnik i do málo prokrvených tkání. Díky této jedinečné vlastnosti jsou CPP zajímavé pro celou řadu aplikací včetně léčby rakoviny a infekčních nemocí.[16]

Vlivem průchodu CPP přes membránu může dojít k narušení struktury membrány a toxickému efektu. To je často nežádoucí, ale v některých případech toho můžeme využít a zvýšit tak účinek například protinádorové léčby.[17]

Mechanizmy prostupu membránou jsou různé a komplexní a často málo objasněné. Primárně rozlišujeme mechanizmy podle spotřeby energie během procesu na energii nezávislé a na energii závislé. Některé CPP prostupují membránami pomocí vazby na receptor na povrchu a díky tomu můžeme účinek zacílit na určitý typ buněk. Kombinací s dalšími možnostmi cílení lze dosáhnout vysoké specifity účinku.[18,19]

2.1.6. Možnosti uplatnění PDC v boji s infekčními onemocněními

Infekce způsobené intracelulárními patogeny

Infekce intracelulárními patogeny jsou v současné době závažným rizikem. K nejvýznamnějším intracelulárním patogenům patří methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a zástupci rodů *Mycobacterium*, *Salmonella* a *Brucella*. Díky lokalizaci uvnitř buněk hostitele jsou tyto patogeny nepřístupné pro celou řadu jinak účinných antimikrobních látek. Ani léčba pomocí léčiv první volby však nebývá jednoduchá a někdy vyžaduje dlouhodobé podávání několika antibiotik najednou. U těchto patogenů je po terapii vysoké riziko relapsu a s tím související vznik rezistentních kmenů. Díky rozvoji rezistence se spektrum využitelných látek ještě zužuje

a je potřeba hledat nové možnosti. Potenciální řešení nabízí spojení antimikrobních látek, které samy o sobě nejsou schopné dostatečně procházet biologickými membránami, s peptidy se schopností membránami pronikat. Takto můžeme rozšířit spektrum například látek ze skupiny aminoglykosidů, které jinak díky své vysoké hydrofilitě obtížně prostupují membránami.[20]

Práce Horváti *et al.*[21] se zabývala otázkou mykobakteriálních infekcí. Tyto infekce jsou díky intracelulární lokalizaci patogenu obtížně léčitelné a často dochází k relapsu. Navíc rapidně narůstá rezistence k používaným antituberkulotikům a ostatním antibiotikům. Cílem bylo ověřit efektivnost využití peptidových nosičů v boji proti mykobakteriím. Připravili konjugáty isoniazidu (INH) s dvěma různými peptidovými nosiči. Prvním byla epitopová část imunodominantního proteinu *Mtb*., druhým pak derivát tuftsinu, krátkého přirozeného peptidu stimulujícího fagocytózu. Oba tyto peptidy se vážou na receptory na povrchu makrofágů a facilitují vstup konjugátu selektivně do cílených buněk. Aktivita konjugátů byla ověřena *in vitro* na *Mtb.* H_{37}Rv a prokázala tak využitelnost PDC v terapii tuberkulózy.

V navazujících pracích Baranyi *et al.*[22] a Horváth *et al.*[23] hodnotili tuftsinové deriváty konjugované s novými deriváty salicylové kyseliny. Připravili několik variací včetně modifikace peptidového nosiče pomocí mastných kyselin. Aktivita konjugátů byla hodnocena *in vitro* na *M. abscessus* a na citlivém a multilékově rezistentním kmenu *Mtb*. Aktivita konjugátů proti extracelulárně rostoucím mykobakteriím byla v průměru asi 10× nižší než u konjugovaných malých molekul, ale jejich potenciál se jasně ukázal při testování v modelu infikovaných makrofágů. Zatímco samotné salicylanilidy nebyly proti infikovaným buňkám účinné, většina konjugátů výrazně snížila počet CFU *Mtb*. Navíc byla omezena výrazná cytotoxicita výchozích látek. Konjugáty s jednou repeticí tuftsinového motivu se ukázaly jako nejvýhodnější jak z pohledu účinnosti, tak i nízké cytotoxicity. Deriváty obsahující zbytky mastných kyselin vykazovaly sice vysokou schopnost internalizace, ale zároveň i vysokou toxicitu.

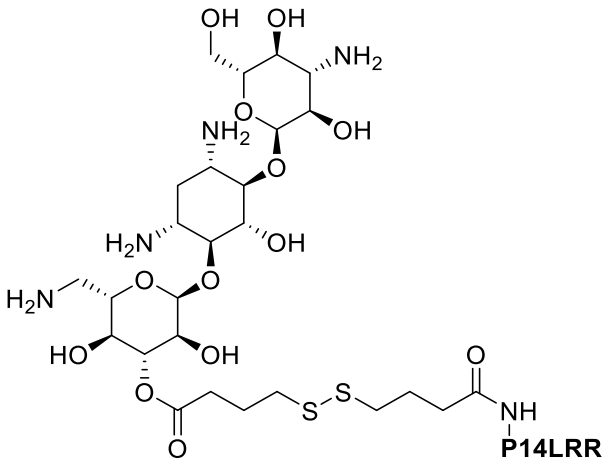
Bakteriofágy jsou v souvislosti s rozvojem antibiotické rezistence intenzivně zkoumány pro svoje baktericidní účinky. Bakteriofágy jsou vysoce specifické a minimálně tak narušují přirozený mikrobiom a jsou tedy perspektivní alternativou ke konvenční léčbě. Slabinou fágové terapie jsou intracelulární patogeny, protože fágy téměř nepronikají cytoplazmatickou membránou savčích buněk. Tímto problémem se zabývali Zhao *et al.*[24]

a upravili bakteriofág halz k expresi modifikovatelných proteinů na svém povrchu. Tyto proteiny nesly sekvence se schopností internalizace skrz eukaryotické membrány. Takto upravené fágy byly schopné pronikat do buněk infikovaných salmonelou v dostatečném množství, aby účinně ničily patogen a zároveň neprojevily žádné známky toxicity spojené s poškozením membrán.

Zlepšení vlastností používaných antibiotik

Problémem mnoha používaných i potenciálních protimikrobních léčiv je jejich rozpustnost. U ve vodě dobře rozpustných léčiv je problémem jejich nízká lipofilita, která způsobuje, že léčiva špatně prochází biologickými membránami. Proto je jejich využití omezené, a navíc mají při perorálním podání nízkou biodostupnost. Naopak léčiva špatně rozpustná ve vodě se kumulují v lipofilních prostředích, jako jsou třeba tuková tkáň a buněčné membrány. U vysoce lipofilních léčiv je tedy biodostupnost i průchod membránami také špatný. Přípravou vhodných proléčiv, například připojením peptidového nosiče, lze podstatně zlepšit prostupnost membránami i rozpustnost a podstatně tak rozšířit spektrum využití.

Příkladem je práce Brezden *et al.*[20] Ve své práci se zaměřili na kanamycin, antibiotikum ze třídy aminoglykosidů primárně účinné proti G- bakteriím. Jako peptidový nosič využili polyprolinový helikální peptid P14LRR. Ten současně kombinuje schopnost pronikat membránami a vlastní širokospektrý antibakteriální účinek. Pro spojení využili dva různé linkery odvozené od kyseliny sebakové. Výsledné konjugáty (struktura viz Obrázek 3) byly otestovány *in vitro* na bakteriálních kulturách a na buňkách linie J774A.1 infikovaných bakteriemi z rodů *Salmonella*, *Brucella*, *Shigella* a dvěma druhy rodu *Mycobacterium*. Následně bylo také provedeno hodnocení *in vivo* v modelu *Caenorhabditis elegans* infikovaném *S. enteritidis*. PDC obsahující redukovatelný disulfidový můstek se ukázal jako nejúčinnější na intracelulární bakterie a oproti druhému konjugátu a jednoduché směsi komponent výrazně snižoval populaci patogenů. Tento konjugát byl nejefektivnější i při experimentu *in vivo*, ale k zahubení většiny bakterií byla nutná koncentrace vyšší než 30 $\mu mol.l^{-1}$.



Obrázek 3: Struktura PDC připraveného Brezden *et al.*[20] Pomocí disulfidového linkeru došlo ke spojení kanamycinu s peptidem P14LRR.

Dalším příkladem je práce Diez-Torrubia *et al.*[25] zabývající se antivirotikem acyklovirem a možnostmi zvýšení jeho perorální biodostupnosti. Jeho proléčivo, valacyklovir, má perorální biodostupnost podstatně zvýšenou, avšak i ta se pohybuje kolem 50 %. Za účelem zvýšení rozpustnosti a biodostupnosti po perorálním podáním je proto spojili s krátkým peptidem VP nebo VPVP. Sekvence valin-prolin není v GIT štěpena proteinázami a odolává i kyselému prostředí, ale po absorpci do krevního oběhu je štěpena plazmatickou dipeptidyl-peptidázou 4 (DPP4) CD26. Takto připravená proléčiva prokázala vyšší perorální biodostupnost než samotné malé molekuly při zachování srovnatelné účinností.

Cílení antimikrobní léčby

Nespecifické působení antimikrobních léčiv je důvodem některých nežádoucích účinků a významně se podílí na rozvoji rezistentních kmenů. Navíc narušení přirozené mikroflóry antibiotiky může umožnit rozvoj dalšího onemocnění, jako třeba klostridiové kolitidy. Proto by schopnost cílit na patogeny přinesla zásadní zlepšení v léčbě infekcí.

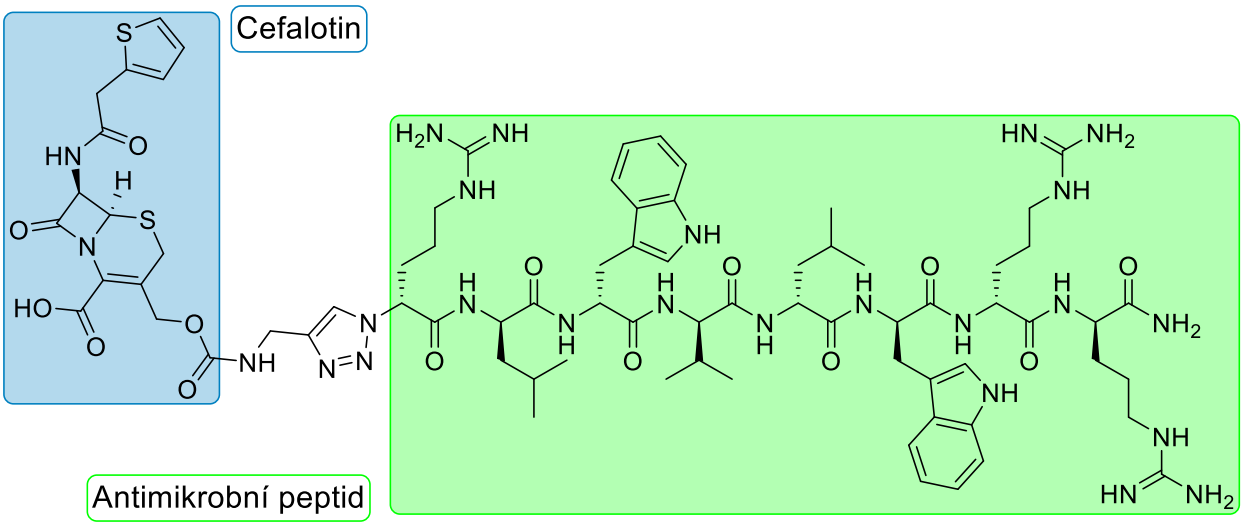
K vytvoření léčiv, které cíleně uvolňují protimikrobní látku v místě infekce, můžeme využít například některé peptidázy, které jsou specifické pro infekční agens. Příkladem jsou nanočástice připravené Insua *et al.*[26] tvořené antimikrobně působícím polyethyleniminem a krátkými peptidovými řetězci obsahujícími sekvenci štěpenou elastázou LasB. Peptidy vždy obsahovaly sekvenci GLA mezi několika kyselými AMK. Při kontaktu těchto záporně nabitých peptidů s kladně nabitým polyethyleniminem dojde k samovolné agregaci do nanočástic. Pokud dojde ke kontaktu těchto částic s LasB, budou peptidy

hydrolyzovány, nanočástice se rozpadnou a uvolní antimikrobní látku. Tyto polyiontové nanočástice prokázaly při následném testování svoji selektivitu a nízkou toxicitu.

Podobnou strategii zvolili Zuo *et al.*[27] Z rozvětveného kopolymeru methakrylátu a pentapeptidu WELQK připravili nanočástice obsahující stříbrné ionty. Sekvence WELQK je specificky štěpena proteázou SplB vylučovanou MRSA. Po naštěpení polymeru je stříbro uvolněno do okolí a účinně ničí bakterie. Tyto nanočástice zakomponoval tým vědců do náplasti, která byla se slibnými výsledky otestována na povrchové infekci způsobené MRSA.

Qi *et al.*[28] sestrojili polymer založený na chitosanové kostře. Na tuto kostru připojili peptid s antimikrobními vlastnostmi KLAK a enzymaticky štěpitelný peptid modifikovaný PEG. Tento polymer samovolně formoval nanočástice s ochranou vrstvou tvořenou PEG řetězci na povrchu. Cílený účinek zajišťovala peptidová sekvence obsahující motiv GPLGVRGC, který je štěpen gelatinázou tvořenou některými bakteriemi, například *S. aureus*. Po naštěpení enzymem dojde k uvolnění ochranných vrstev PEG. Následkem toho se nanočástice rozvolní a odhalí antimikrobně působící peptidy, které reagují s membránami přítomných patogenů.

Jiný přístup zvolili Desgranges *et al.*[29] Připravený konjugát cefalotinu, cefalosporinu 1. generace, využívá molekulu β-laktamu k zacílení účinku na bakterie produkující β-laktamázu a bakterie ničí pomocí kationického oktapeptidu s velkým množstvím lipofilních aminokyselin. Antimikrobní peptidy tohoto typu jsou charakteristické nízkou selektivitou a častými nežádoucími účinky. Tento konjugát (struktura viz Obrázek 4) využívá toho, že kladný náboj na N-konci peptidu je nezbytný pro antimikrobní účinek a připojením záporně nabitého cefalosporinu dojde k změně konformace a vyrušení celkového náboje molekuly. Karbamátová vazba byla využita jako linker a triazolový cyklus vytvořený s pomocí click chemie byl do struktury zaveden kvůli komplikované syntéze. Při kontaktu konjugátu s β-laktamázou dojde k rozštěpení β-laktamového cyklu a následná 1,4-eliminace poskytne peptid s N-koncem ve formě aminu. Tento konjugát tak cílí na bakterie produkující β-laktamázu, což je nejčastější forma rezistence u těchto patogenů a je zachována i u MDR bakterií. Konjugát byl testován *in vivo* na dvou kmenech MRSA a čtyřech kmenech *E. coli*, z nichž dva byly isogenické kvůli hodnocení vlivu exprese β-laktamázy. MIC dosahovaly hodnot v řádu jednotek $\mu mol.l^{-1}$ a oproti samotnému peptidu byly srovnatelné nebo vyšší. MIC konjugátu na isogenní *E. coli* exprimující β-laktamázu byla oproti neexprimujícímu kmenu poloviční.



Obrázek 4: Struktura PDC s triazolovým linkerem využívající β-laktamové antibiotikum k zaměření rezistentních bakterií.[29]

Infekce spojené s biofilmy

Bakteriální biofilmy jsou biologicky aktivní komunity tvořené buňkami a extracelulární hmotou. Vznikají na površích mimo, na, nebo i přímo v těle a mohou být tvořeny celou řadou bakterií a hub buď samostatně, nebo i současně. Biofilmy výrazně zvyšují odolnost bakterií vůči imunitnímu systému, antibiotické léčbě a dalším stresovým faktorům. V případ tuberkulózy se také podílejí na poškození plicní tkáně.[30]

Schopnost tvořit biofilm je významný faktor virulence. Infekce spojené s biofilmem jsou často chronické a odolné vůči léčbě antibiotiky. Bakterie součástí biofilmu mají až 1000× vyšší odolnost k ATB, z části díky obtížné penetraci léčiv přes extracelulární matrix. Bakteriální biofilmy jsou těsně spojeny s rozvojem rezistence a díky usnadněnému přenosu plazmidů i s šířením rezistence a vznikem multi- a kompletně rezistentních kmenů. V boji s bakteriálními biofilmy se v současné době využívá několika přístupů, mezi nimi jsou nanočástice, fotodynamická terapie a peptidové nosiče. Fotodynamická terapie se zvláště v kombinaci s peptidovými nosiči jeví jako perspektivní volba.[31]

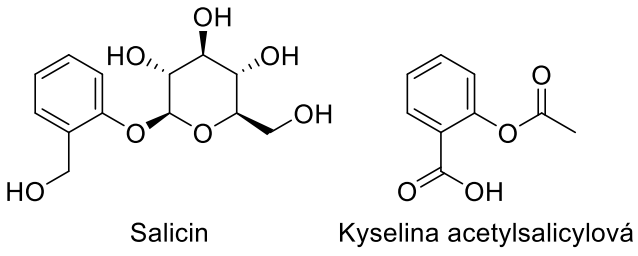
Han *et al.*[32] se ve své práci zabývali léčbou infekční keratitidy spojené s biofilmy. Konkrétně se zaměřili na *P. aeruginosa*, která je častým původcem rychle progredujících infekcí, a její schopnost tvořit biofilmy výrazně ztěžuje léčbu. Cílem bylo připravit nosič pro fotosenzitizující molekuly, který by umožnil dobrou penetraci do biofilmu a skrz membrány bakterií. Kationické CPP již dříve prokázaly svou schopnost pronikat biofilmy, problémem však byla jejich nízká specifita. Rozhodli se proto připravit nanočástice aktivované metaloproteinázou-9, enzymem hojně přítomným v prostředí biofilmu. Jako

cargo sloužil fotosenzitizér chlorin e6 konjugovaný s β-cyklodextrinem kvůli lepšímu prostupu membránami. GPLGVRG je sekvence štěpitelná metaloproteinázou-9, která spojuje další části peptidu. Po jejím rozštěpení dojde k oddělení koncové části tvořené zbytky kyseliny glutamové, která svým nábojem stabilizuje nanočástici a zabraňuje adhezi k membránám. Zbylá pozitivně nabitá část umožní penetraci nákladu do biofilmu k bakteriím. Účinnost byla ověřena *in vitro* na *P. aeruginosa* inkubací a následným ozářením. Takto bylo dosaženo zničení 99,9 % bakterií. Tyto nanočástice nečekaně vykazovaly i vlastní baktericidní účinek, kdy bez ozařování dokázaly zahubit 89,1 % bakterií. *In vitro* testy cytotoxicity na imortalizovaných epiteliálních buňkách rohovky při vysokých koncentracích ukázaly nízkou míru toxicity. Bez ozařování bylo 95 % buněk životaschopných a po ozařování 80 %.

2.2. Biologická aktivita salicylamidů a salicylanilidů

2.2.1. Salicylamid a salicylanilid

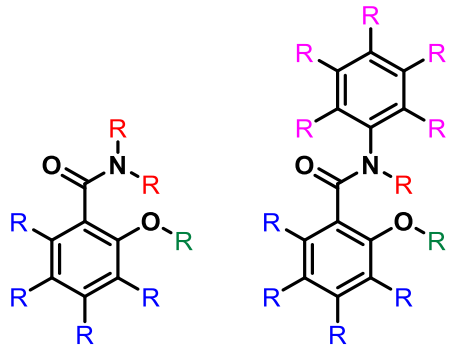
Salicylamid (2-hydroxybenzamid) a salicylanilid (*N*-fenyl-2-hydroxybenzamid) jsou dusíkaté deriváty kyseliny salicylové. Jméno této kyseliny je odvozeno od stromů rodu vrba (*Salix*), v jejichž kůře je obsažena. Kyselina salicylová má v medicíně dlouhou historii. Už 4000 let před naším letopočtem znali analgetické účinky vrbové kůry Sumerové. Po nich začali vrbové kůry využívat Egypťané a následovaly další kultury, až se z vrbové kůry stal rozšířený lék proti bolesti a horečce. V roce 1828 byla objevena aktivní složka, glykosid salicin (struktura viz Obrázek 5), a o 10 let později byla izolována samotná kyselina salicylová. Na konci 19. století byla v laboratořích firmy Bayer kyselina salicylová acetylována a dala tak vzniknout dnes nejužívanější účinné léčivé látce na světě, kyselině acetylsalicylové (struktura viz Obrázek 5).[33]



Obrázek 5: Struktura salicinu a kyseliny acetylsalicylové.

Kyselina acetylsalicylová je sice nejrozšířenějším v medicíně používaným salicylovým derivátem, ale zdaleka ne jediným. Mnoho účinných látek, registrovaných i v různých stupních vývoje obsahuje ve své struktuře skelet kyseliny 2-hydroxybenzoové. Zvláštní

pozornost si zasluhují zejména dusíkaté deriváty, které se vyznačují různorodými účinky a širokým potenciálním využitím. Konkrétně se v této práci budeme věnovat látkám, které ve své struktuře obsahují motiv 2-hydroxybenzamidu, se substitucí na amidovém dusíku, benzenovém jádře nebo hydroxylové skupině (modifikace salicylamidového skeletu zobrazuje Obrázek 6). Tyto látky mají celou řadu účinků na biologické systémy, které lze vhodnou úpravou jejich struktury podpořit.



Obrázek 6: Možné modifikace salicylamidové struktury, kterými se tato práce zabývá.

Salicylamid i salicylanilid jsou díky fenolové skupině slabé kyseliny. Jsou to ve vodě špatně rozpustné bílé krystalické látky s analgetickými a antipyretickými účinky.[34] Salicylamid se používal v některých volně prodejných přípravcích proti bolesti a v nedávné době byl objeven jeho antibakteriální efekt na rezistentní *Neisseria gonorrhoeae*.[35] Salicylanilid působí fungicidně a bývá používán k desinfekci.[36]

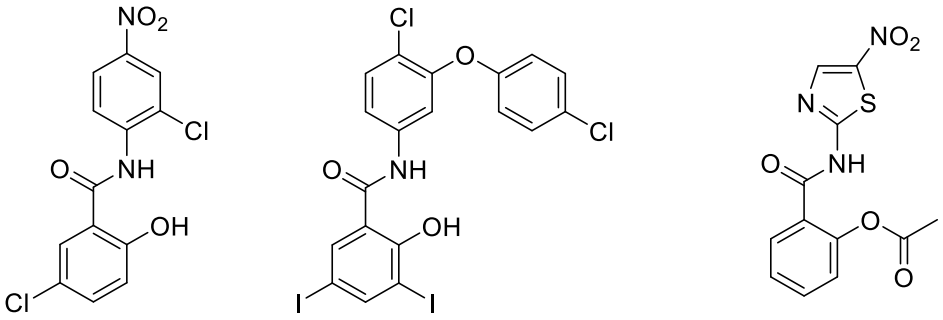
2.2.2. Biologické vlastnosti derivátů

Salicylamidové deriváty vykazují širokou škálu biologických aktivit. Kromě již zmíněných analgetických a protizánětlivých účinků se strukturními modifikacemi dají získat látky s jinými, často velmi žádanými účinky. Díky tomu jsou deriváty salicylamidu a jejich biologická aktivita objektem výzkumu na mnoha pracovištích po celém světě. Tyto sloučeniny jsou slibné jako zdroj nových terapeutik pro různá infekční onemocnění, rakovinu a další choroby.

Anthelmintika

Anthelmintika jsou látky, které působí proti parazitickým helmintům. Anthelmintické účinky derivátů salicylamidu jsou dobře známé. První anthelmintikum se strukturou salicylamidu, niklosamid (Obrázek 7), byl poprvé syntetizován v roce 1953 a dodnes figuruje na seznamu esenciálních léčiv WHO.[37] Dnes se ve veterinární a humánní medicíně používá několik dalších látek s touto strukturou. Jejich mechanizmus účinku je

komplexní a zahrnuje narušení několika funkcí parazita současně, zejména blokuje oxidativní fosforylaci. Dodnes však není mechanizmus účinku zcela objasněn.[37]



Obrázek 7: Struktura niklosamidu (vlevo), rafoxanidu (uprostřed) a nitazoxanidu (vpravo), anthelmintik s řadou dalších biologických aktivit.

V průběhu let byla u niklosamidu i dalších anthelmitických derivátů salicylamidu objevena řada dalších potenciálně užitečných vlastností. Působí na některé dráhy spojené s metabolickými onemocněními nebo rakovinou a mají široké antimikrobiální účinky. Zejména antivirotické působení je velmi potentní a niklosamid i nitazoxanid jsou navrženy a zkoumány k léčbě virových infekcí. Další účinky, hlavně působení na rakovinné bujení a ovlivňování pochodů v CNS, jsou předmětem intenzivního výzkumu.[37]

Protizánětlivé látky

Kromě základního salicylamidu a salicylanilidu vykazuje různý stupeň protizánětlivého účinku i celá řada jejich derivátů. U složitějších derivátů není protizánětlivá aktivita derivátů důkladně prostudována, nicméně protizánětlivá aktivita je známá u řady látek, zvláště halogenovaných.[38] Některé jednoduché deriváty, například ethenzamid (2-ethoxybenzamid), jsou stejně jako samotný salicylamid v některých zemích součástí volně prodejných přípravků. Látky se strukturou odvozenou od salicylové kyseliny působí na zánět primárně inhibicí syntézy prostaglandinů. Navíc působí některé salicylamidy protizánětlivě také díky vychytáváním volných radikálů.[34]

Antivirotika

Rozvoj virové rezistence a hrozba epidemií nových virů a nových mutací již známých virů vyžaduje vývoj nových širokospektrých antivirotik. Užitečnost mnohých současně užívaných antivirotik je navíc značně limitována jejich nežádoucími účinky. Některá salicylamidová anthelmintika jsou již používána pro svůj širokospektrý antivirotický účinek a další struktury se salicylamidovým motivem jsou intenzivně zkoumány s cílem objevit nové struktury a mechanizmy účinku.

Deriváty salicylamidů účinkují na viry několika různými mechanizmy a můžou tak účinně bojovat s širokým spektrem virových infekcí. Některé deriváty účinkují jen jediným mechanizmem, zatímco jiné jsou schopné efektivně bojovat s infekcemi různými typy virů a uplatňovat tak více mechanizmů účinku. Například nitazoxanid (Obrázek 7), anthelmintikum a současně širokospektré antivirotikum, působí na koronaviry, flaviviry, HBV, virus chřipky, RNA viry včetně HIV a další (Tabulka 2 obsahuje příklady citlivých kmenů s naměřenou aktivitou). Mezi známé mechanizmy účinku patří blokování intracelulárního pohybu virionů, blokace syntézy virových proteinů, inhibice uvolnění virionů z infikovaných buněk a narušení funkce hemagglutininu.[39]

Tabulka 2: Antivirotická aktivita nitazoxanidu na vybrané virové kmeny[39].

Virus	Čeleď	EC_{50} [μmol.l^{-1}]
SARS-CoV2	*Coronaviridae*	2,12
Dengue virus	*Flaviviridae*	0,55
HCV	*Flaviviridae*	0,21
ZIKV	*Flaviviridae*	1,48
HBV	*Hepadnaviridae*	0,12
Influenza H1N1 WSN	*Orthomyxoviridae*	1,60
Rotavirus	*Sedoreoviridae*	6,5
Chikungunya virus	*Togaviridae*	2,96

Niklosamid (Obrázek 7) má dobrou antivirotickou aktivitu, ale jeho farmakokinetické parametry nejsou ideální. Problémem je zejména špatná rozpustnost a s tím související nízká biodostupnost. Proto se design nových antiviroticky aktivních salicylamidů soustředí na zvýšení rozpustnosti a současně zachování aktivity. V tomto ohledu jsou úspěšné substituce atomů chloru za vodík, methoxy skupinu nebo brom. Současně je cílem nahradit nitro skupinu, která může vést k toxickým metabolitům.[40] Náhrada halogenem, trifluormethylem nebo fenylem vedla k zachování účinku, ale dalšímu snížení rozpustnosti. Acylací hydroxylové skupiny za vzniku proléčiva lze zlepšit vstřebávání. Náhrada anilidového kruhu aromatickým heterocyklem substituovaným elektron odtahujícími skupinami se také ukázala jako vhodná.[39]

Mnoho derivátů salicylamidu, zejména nitrothiazolylové deriváty, vykazují slibnou antivirotickou aktivitu. Bohužel byla většina testovaných salicylamidů také značně cytotoxická. I přesto zájem o vývoj nových antivirotik této struktury neutuchá a pokračují snahy o detailní popsání mechanizmů účinku a vytvoření velké knihovny sloučenin za účelem popsání vztahů mezi strukturou a aktivitou.

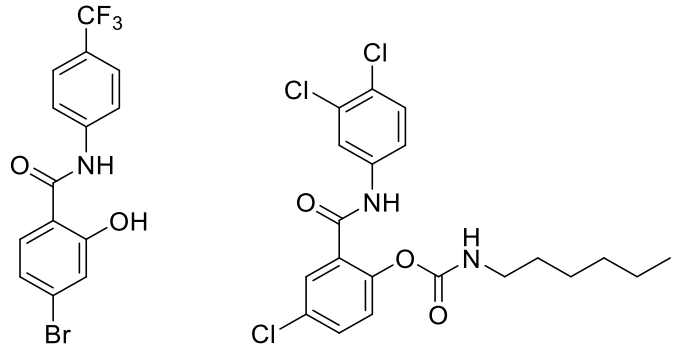
Antituberkulotika

Tuberkulóza je infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi, nejčastěji *Mtb*. Mykobakterie disponují několika vlastnostmi, které z nich činí velmi problematické a odolné patogeny. Zásadní je jejich silná buněčná stěna s obsahem mykolových kyselin, která jim poskytuje ochranu před vnějšími faktory. Mykobakterie jsou také schopné obcházet imunitní systém a můžou dlouhou dobu přežívat v dormantním stavu. Navíc se v posledních letech zvyšuje četnost rezistencí a výskyt rezistentních a multirezistentních kmenů *Mtb* v posledních letech je alarmující. Byly dokonce popsány i kmeny odolné vůči všem dostupným antituberkulotikům. V současnosti patří tuberkulóza mezi infekční onemocnění s nejvyšším počtem úmrtí a šíření rezistentních kmenů může počet obětí ještě dramaticky zvýšit. Deriváty salicylové kyseliny, zvláště amidy a anilidy jsou intenzivně zkoumány pro svou schopnost mykobakterie hubit.[23]

Salicylanilidy účinkují odlišným mechanizmem od jiných antituberkulotik a jsou tak účinné i na kmeny s širokým spektrem rezistencí. Kromě nejčastěji se vyskytujícího *Mtb* působí i na atypické kmeny jako jsou *M. avium* a *M. kansasii*.[23]

Kvůli stavbě buněčné stěny mykobakterií jsou preferovány látky s vysokou lipofilitou, které dobře pronikají vrstvou mykolových kyselin. Z velkého množství připravených salicylamidů mají nejvyšší účinek na mykobakterie salicylanilidy, které jsou na anilidovém i salicylovém jádře substituovány halogenem nebo obdobnou skupinou. Na salicylové části jsou preferovány pozice 4 a 5. Bohužel v mnoha případech je vynikající antimykobakteriální aktivita derivátů salicylanilidu zastíněna jejich vysokou cytotoxicitou.[22,23]

Například Ferriz *et al.*[41] připravili řadu derivátů s halogenem na každém benzenovém jádře a hydroxylovou skupinu přeměnili na karbamát s alifatickým řetězcem (viz Obrázek 8). Tyto sloučeniny měly, s MIC v řádu jednotek $\mu mol.l^{-1}$, všechny slibnou aktivitu. Vykazovaly však mírně cytotoxické účinky a neprokázaly tak dostatečnou selektivitu.

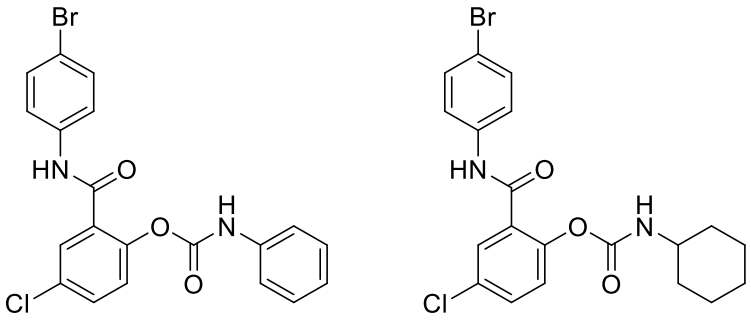


Obrázek 8: Příklady struktur aktivních proti mykobakteriím připravené Paraskevopoulos *et al.* (vlevo)[42] a Férriz *et al.* (vpravo).[41]

Antibakteriální aktivita

Infekční onemocnění bakteriálního původu představují rostoucí celosvětovou hrozbu. Díky nevhodnému a přílišnému užívání antimikrobních látek došlo k rozvoji mnoha rezistentních kmenů i kmenů se zkříženou rezistencí. Vysoký počet diabetiků, imunosuprimovaných a dalších pacientů náchylných k infekcím tento problém dále prohlubuje. Z tohoto důvodu je nutné hledat nové antimikrobní látky s inovativním mechanizmem účinku.

Deriváty salicylové kyseliny, zejména ty obsahující amidovou nebo karbamátovou funkční skupinu, jsou perspektivní skupinou látek v oblasti vývoje nových antibiotik.[43] Toto prokázali například Krátký *et al.*[44] přípravou a zhodnocením antimikrobní aktivity několika sérií benzamidových derivátů. Halogenované deriváty monosubstituované na karbamátovém i amidovém dusíku vykazovaly *in vitro* nejvyšší antibakteriální aktivitu (příklady nejúčinnějších látek na Obrázek 9). Účinné byly zejména na G+ bakterie včetně MRSA. Na G- bakterie byla aktivita obecně nižší.



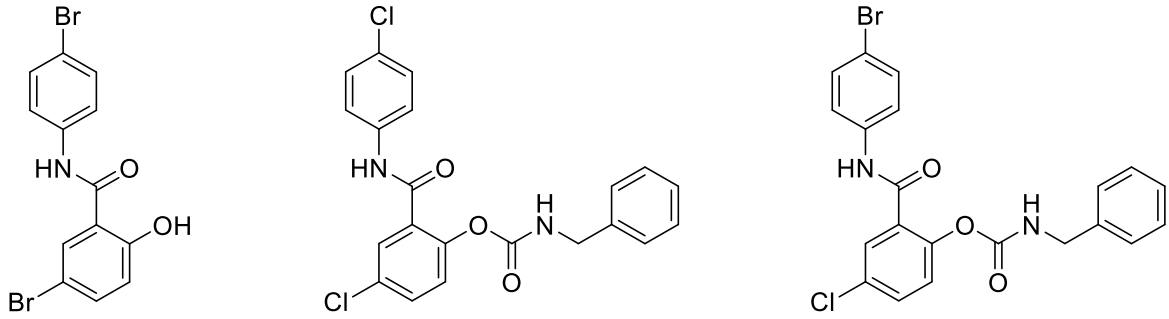
Obrázek 9: Příklady salicylamidových derivátů, připravených Krátký *et al.*,[44] s dobrým účinkem na testované G+ bakterie.

S. aureus je častým původcem závažných infekcí s rozvinutou rezistencí. Při screeningu FDA registrovaných léčiv na modelový organismus infikovaný MRSA v rámci

repurposingu známých léčiv byla objevena významná bakteriostatická aktivita niklosamidu (Obrázek 7), znovu potvrzující efektivitu salicylanilidových derivátů.[37]

Antimykotika

Také houbové infekce jsou díky rozvoji rezistence proti běžně užívaným antimykotikům rostoucím problémem světového zdravotnictví. U salicylanilidu a některých příbuzných látek byla popsána účinnost na houbové patogeny. Zvláště u polyhalogenovaných sloučenin je antifungální účinek výrazný. Příkladem takové sloučeniny je dibromsalan (Obrázek 10). Antimykotický efekt byl také popsán u salicylanilidových anthelmintik, jako třeba niklosamidu a rafoxanidu (Obrázek 7).[36] U řady nově připravených salicylamidových derivátů byla rovněž popsána účinnost proti některým patogenním houbám. Například Krátký *et al.*[45] popsali aktivitu série antimikrobiálních karbamátů dihalogenovaného salicylanilidu (Obrázek 10). Několik těchto sloučenin mělo na některé druhy patogenních hub účinek srovnatelný s běžně užívanými antimykotiky.

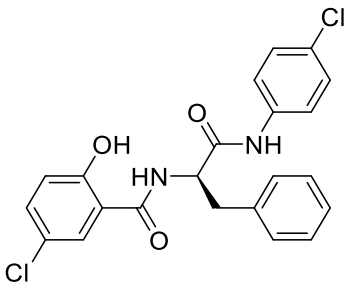


Obrázek 10: Struktury vybraných derivátů salicylamidu s antimykotickým působením. Struktura dibromsalanu (vlevo) a dihalogenovaných látek připravených Krátkým *et al.*[45]

Antineoplastika

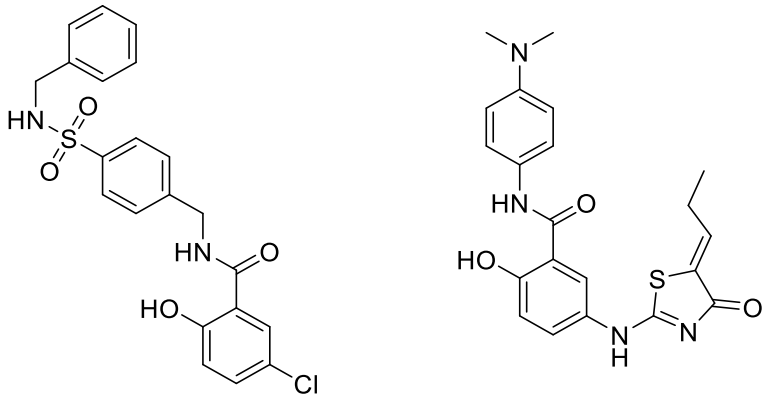
Rakovina je v moderním světě jedna z nejčastějších příčin smrti a podle předpovědí bude počet úmrtí dále stoupat.[46] Rakovina je souhrnné označení pro nemoci zapříčiněné nekontrolovaným dělením vlastních buněk. Existuje velké množství druhů rakoviny, každá s unikátními vlastnostmi a citlivostí k léčbě. Terapie rakoviny je navíc velmi často spojena s vážnými nežádoucími účinky. Tyto faktory činí léčbu náročnou pro pacienty i zdravotní systém a podtrhují nutnost hledání nových alternativ.

V roce 2006 popsali Imramovský *et al.*[47,48] přesmyk při reakci salicylanilidů s aminokyselinami. Při něm dojde přes sedmičlenný intermediát k přesmyku za včlenění aminokyseliny mezi salicylovou a anilidovou část a jejich spojení peptidovou vazbou. Takto byl připraven soubor derivátů salicylamidu, u kterých byla objevena značná antiproliferativní aktivita (Obrázek 11).



Obrázek 11: Příklad látky připravené pomocí popsaného přesmyku s antineoplastickými účinky.[47]

Následkem této publikace došlo k zvýšenému zájmu o salicylamidy ve vývoji léčiv na rakovinu a vzniku nových strukturních typů s tímto motivem. Příkladem jsou sulfonamidy[49] a thiazolidinony[50] (Obrázek 12). U anthelmintik niklosamidu a rafoxanidu (Obrázek 7) byla také popsána aktivita na celou řadu nádorových onemocnění.[37,51]



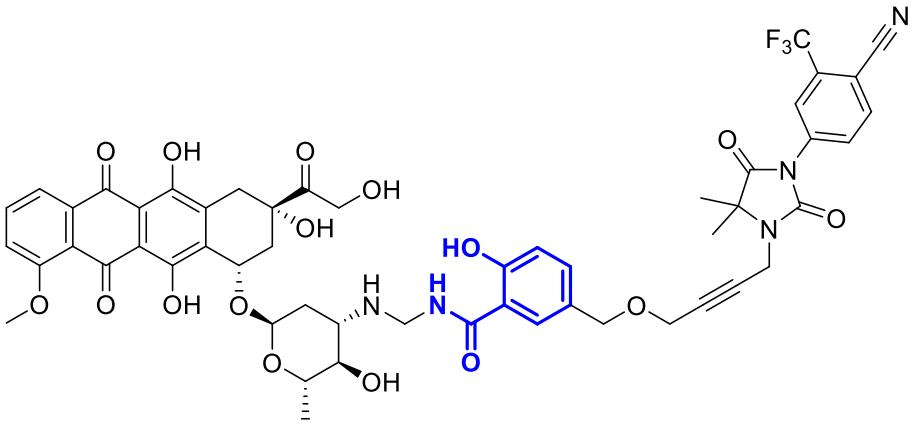
Obrázek 12: Struktury s protinádorovou aktivitou popsané Galal *et al.*[49] (vpravo) a Othman *et al.*[50] (vlevo). Tyto struktury kombinují salicylamidovou strukturu s dalším účinným motivem.

Jako nejúčinnější se ukazují deriváty se substitucí v poloze 5 salicylamidu, nejčastěji chlorem nebo i substituovanou aminoskupinou. Na amidovém dusíku je navázané benzenové jádro, buď přímo, nebo přes krátký můstek, které je substituované v poloze 4. Tam je preferována elektron odtahující skupina.[49]

U látek s motivem salicylamidu můžeme pozorovat několik mechanizmů působení, které se mohou v terapii rakoviny uplatnit. Například jde o narušení drah Wnt/β-catenin, mTOR a STAT3, které vedou k apoptóze a inhibice polymerace tubulinu.[37,52]

Jiné využití salicylamidových derivátů v boji s rakovinou popsali Cogan a Koch.[53] K léčbě rakoviny prostaty vytvořili konjugát doxorubicinu s androgenním antagonistou nilutamidem (Obrázek 13). Ke spojení využili právě salicylamid, který současně slouží jako spouštěč uvolňování cytostatika. Po navázání konjugátu na receptory androgenů dojde k hydrolýze vazeb a dojde k uvolnění derivátu doxorubicinu, který poškozuje DNA

buněk. Takto byla zvýšena účinnost doxorubicinu, který samostatně není příliš účinný na rakovinu prostaty, a zároveň byly omezeny nežádoucí účinky.



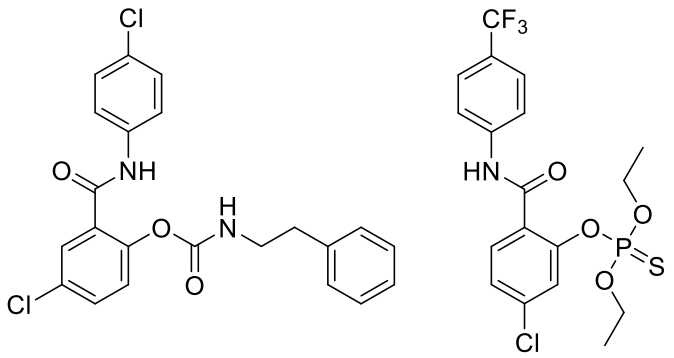
Obrázek 13: Struktura konjugátu doxorubicinu s antineoplastickým působením připraveného Cogan a Koch.[53] Modře zvýrazněn salicylamidový linker.

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění a nejčastější příčina demence. Dochází při ní k hromadění β-amyloidu, narušení homeostázy kovů a degeneraci cholinergních neuronů v CNS spojené se zánětem a následně k poruchám paměti a snížení dalších kognitivních funkcí. Snížená aktivita cholinergního systému je považována za zásadní a zaměřuje se na ni tedy většina léčebných postupů. Tam se uplatňují inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE), které úspěšně zvyšují hladinu acetylcholinu v CNS a zlepšují kognitivní funkce.

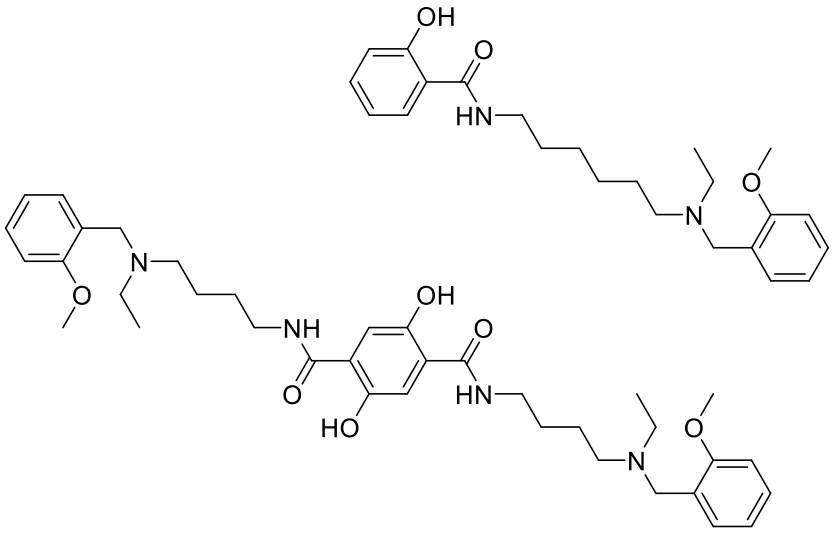
Deriváty salicylové kyseliny jsou zajímavé pro vývoj léčiv proti AD díky kombinaci účinků na několik faktorů podílejících se na patogenezi současně. Mají protizánětlivé účinky, které jsou spojeny s nižším rizikem AD, snižují oxidativní stres a vychytávají volné radikály a jsou to efektivní chelátory kovů. Samotná salicylová kyselina je také schopná omezeně inhibovat AChE a zavedením vhodných skupin lze tuto aktivitu výrazně posílit.

Krátký *et al.*[54,55] připravili několik typů derivátů salicylové kyseliny s inhibiční aktivitou na cholinesterázy. Strukturně se jednalo především mono- a disubstituované karbamáty nebo estery (thio)fosforečné kyseliny a salicylanilidů (Obrázek 14). Preferenční byly látky dihalogenované v poloze 5 salicylového jádra a současně i v *meta* nebo *para* poloze anilinu. Úspěšně připravili deriváty s různým stupněm selektivity k AChE a BuChE s aktivitou srovnatelnou nebo převyšující duální inhibitor AChE i BuChE používaný k léčbě AD, rivastigmin.



Obrázek 14: Příklady inhibitorů cholinesteráz obsahujících karbamátovou skupinu nebo ester kyseliny thiofosforečné.[54–56]

Song *et al.*[57] připravili sérii salicylamidů substituovaných na amidovém dusíku linkerem s délkou 3-6 uhlíků a následně dusíkem, který byl substituován dvěma zbytky nebo byl součástí cyklu. Některé z těchto látek (Obrázek 15) měly potentní inhibiční aktivitu na AChE a zároveň i chelatační, antioxidační a protizánětlivé účinky a potlačovaly agregaci β-amyloidu. V navazující práci[58] předchozí strukturu efektivně zdvojili a získali tak diamid kyseliny dihydroxyparaftalové.

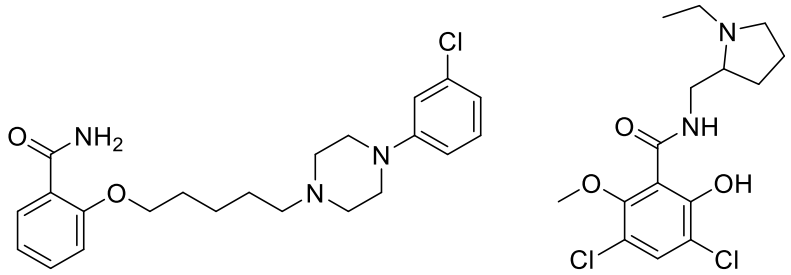


Obrázek 15: Struktury látek připravených Song *et al.*[57,58] s multimodálním účinkem na Alzheimerovu chorobu.

Účinky na CNS

Mnoho pacientů trpících psychickými poruchami nereaguje dostatečně na léčbu nebo ji netoleruje. Zmudzka *et al.*[59] popsali při pokusech na myších antidepresivní, anxiolytické a antipsychotické působení salicylamidových derivátů (Obrázek 16) a jejich účinky na paměť. Tyto deriváty ovlivňovaly serotoninové a dopaminové D_2 receptory.

Další derivát, rakloprid, je selektivním antagonistou D_2 receptorů a řadí se tak mezi typická antipsychotika.



Obrázek 16: Struktury látek působících na CNS obsahující strukturu salicylamidu. Látka připravená Żmudzka *et al.*[59] (vlevo) a rakloprid (vpravo)

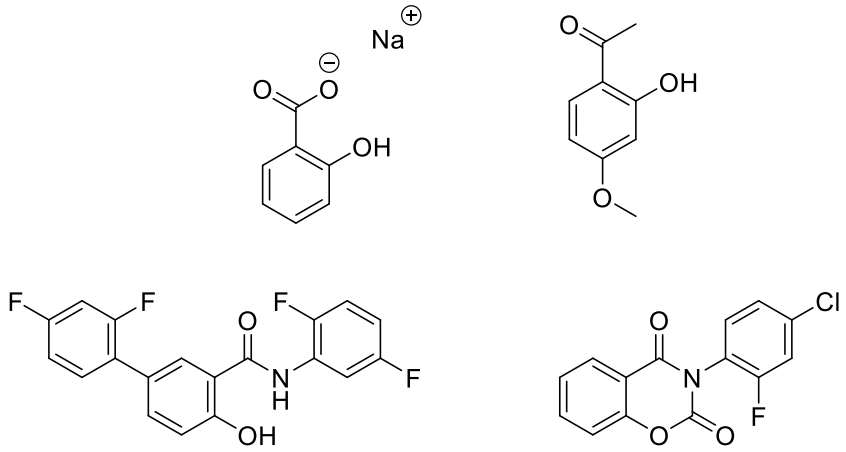
Ostatní

Kromě již zmíněných biologických aktivit byla u derivátů salicylamidu popsána celá řada dalších účinků. Ačkoliv jim zatím není věnována velká pozornost, mohou v budoucnu některé z nich najít zásadní využití.

Například Tao *et al.*[60] popsali pozitivní efekt niklosamidu na kontrolu glykémie u myší a demonstrovali tak možné uplatnění derivátů salicylamidu v léčbě diabetu. V nedávné době byla také popsána schopnost salicylamidových derivátů inhibovat pankreatickou lipázu a omezovat vstřebávání tuků z potravy. V porovnání s registrovaným orlistatem jsou salicylamidové deriváty potenciálně bezpečnější s nižším výskytem nežádoucích účinků při dlouhodobém používání.[61]

Při hledání vhodného antagonisty k neutralizaci LMWH narazili Kuziej *et al.*[62] na deriváty salicylamidu, které dokázaly vázat heparin a narušit tak jeho účinek. V *in vitro* i *in vivo* testech prokázaly tyto látky schopnost rušit účinky LMWH s několikanásobně vyšší účinností než protamin.

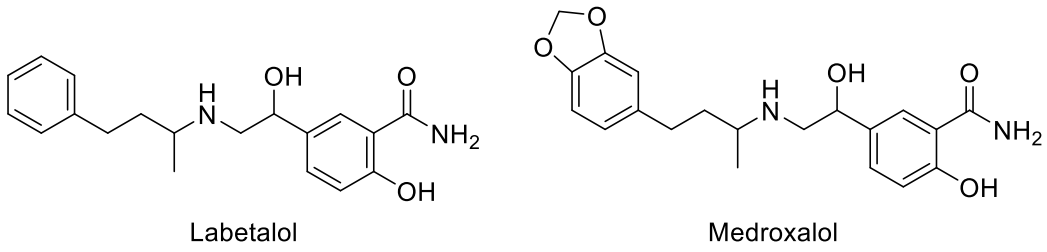
U některých přírodních látek příbuzných salicylové kyselině (Obrázek 17) byla objevena inhibiční aktivita na RANKL, který je zásadní pro aktivaci osteoklastů. Ve snaze získat nové látky snižující kostní resorpci bylo připraveno několik sérií látek se strukturou salicylanilidu, na kterých byly popsány základní strukturní motivy nutné pro účinek.[63,64]



Obrázek 17: Struktury inhibitorů aktivity osteoklastů. Nahoře přírodní látky: salicylát sodný a paeonol. Dole syntetické deriváty salicylanilidu s vysokou účinností.[63,64]

Dále byl v rámci drug-repurposingu objeven stimulující efekt oxyklozanidu, anthelmintika příbuzného niklosamidu, a dalších salicylamidů na obrannou schopnost rostlin.[65]

Strukturu salicylamidu obsahuje ve své molekule také několik léčiv ze skupiny β-blokátorů s parciální antagonistickou aktivitou i na α receptorech (Obrázek 18).

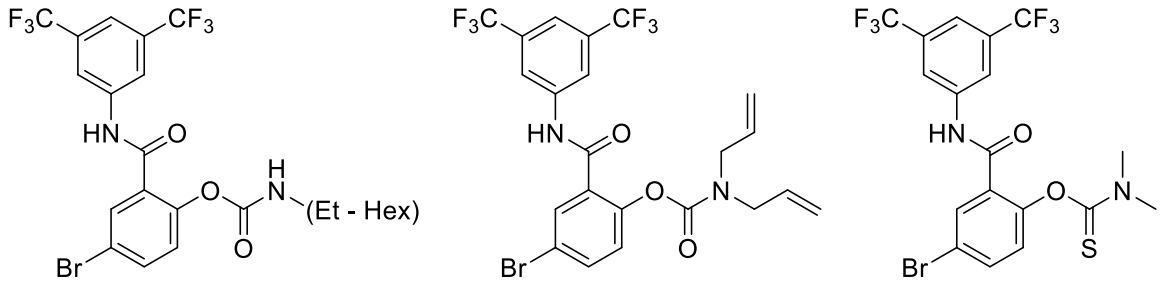


Labetalol Medroxalol

Obrázek 18: Molekuly α a β antagonistů obsahujících salicylamidovou část.

3. Cíle práce

Cílem práce na malých molekulách byla syntéza nových halogenovaných derivátů salicylamidu obsahujících karbamátovou funkční skupinu. Tyto látky strukturně vycházejí z *N*,*N*-disubstituovaných a *N*-monosubstituovaných karbamátů, které byly připraveny jako potenciální inhibitory AChE a BuChE (Obrázek 19).[66] U nich byla kromě inhibičního působení na cholinesterázy zjištěna i zatím nepublikovaná antimikrobní aktivita vůči G+ bakteriím. Zvláště u monosubstituovaných derivátů byla tato aktivita vysoká.



Obrázek 19: Struktury publikovaných inhibitorů cholinesteráz, u kterých byla zjištěna antimikrobní aktivita.[66]

Karbamáty budou připraveny reakcí isokyanátů s hydroxy skupinou derivátů salicylové kyseliny. U připravených látek bude zhodnocena antimikrobní aktivita a cytotoxicita a budou popsány vztahy mezi aktivitou a strukturou. Zejména bude sledován vliv přítomnosti druhého aromatického jádra.

Cílem práce na peptidových nosičích byla příprava tandemových peptidových nosičů obsahujících sekvence tuftsinu a fragmentu D glykoproteinu (gD) *herpes simplex* viru 1 (HSV-1). Tyto peptidové nosiče jsou navrženy pro připojení k vhodnému antituberkulotiku, čímž by zvýšily jeho účinnost na intracelulární patogeny.

Tuftsin je přirozený tetrapeptid vznikající štěpením Fc regionu IgG protilátek. Má imunostimulační účinky a je schopen procházet do buněk vazbou na neuropilinový receptor, který se nachází zejména na povrchu makrofágů.[22]

D glykoprotein patří do skupiny glykoproteinů, které umožňují HSV-1 vstupovat do hostitelské buňky. Váže se na receptor nectin-1, který je exprimován na povrchu řady buněk, a po navázání zprostředkuje vstup virionu do buňky. Předchozí studie odhalily fragment 228-243, který se zásadně podílí na internalizační schopnosti.[67]

Spojením těchto dvou peptidových sekvencí se schopností procházet biologickými membránami do jediného peptidu plánujeme získat peptidový nosič s vysokou schopností internalizace a zároveň i selektivitou k cíleným buňkám.

Peptidy budou připraveny na pevné fázi s využitím Fmoc/*t*-Bu strategie. Připravené peptidy budou značeny fluoroforem a budou u nich provedeny testy internalizace, intracelulární lokalizace a cytotoxicity.

4. Experimentální část

4.1. Malé molekuly

4.1.1. Obecná část

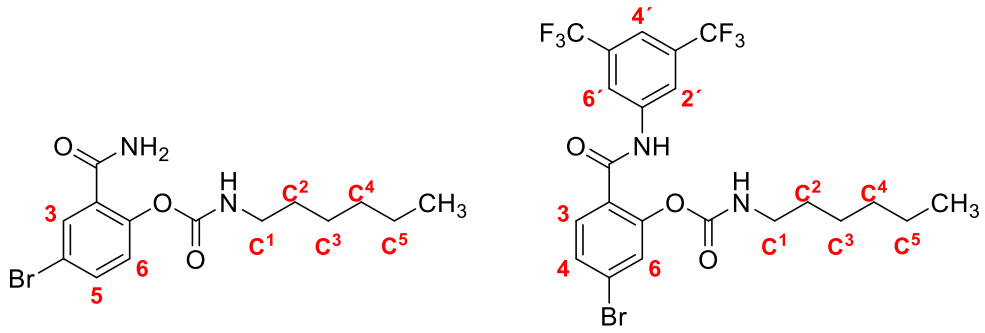
Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Merck (Darmstadt, Německo) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění, pouze *n*-hexan byl purifikován destilací.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 (v/v) nebo dichlormethan/methanol 4:0,3 (v/v), detekce byla prováděna UV lampou (UV Lamp 4, Camag, Muttenz, Švýcarsko) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

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

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Spojené státy americké) 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 ^{1}H a 126 MHz pro ^{13}C; Varian Comp., Palo Alto, Spojené státy americké) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^{1}H a 151 MHz pro ^{13}C; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO-d_6). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy nepřímo k tetramethylsilanu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (DMSO-d_6 při δ = 39,5 ppm). Interakční konstanta (*J*) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).



Obrázek 20: Číslování atomů použité při popisu NMR spekter.

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.

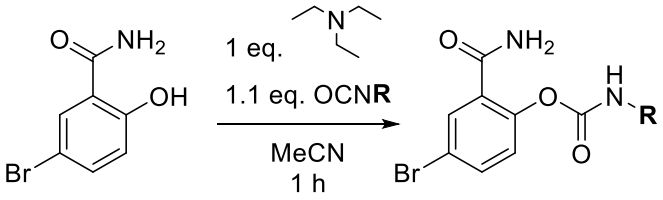
Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw 22.2 (CambridgeSoft, Cambridge, Massachusetts, Spojené státy americké).

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

4.1.2. Příprava a charakterizace sloučenin

Příprava **A6**, **A5** a **A4**

Hexyl-, pentyl- a butyl-karbamáty 5-bromsalicylamidu byly připraveny reakcí komerčně dostupného 5-bromsalicylamidu s příslušným isokyanátem.

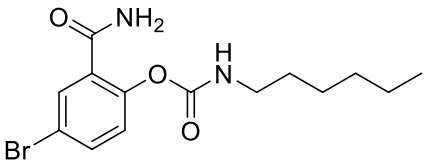


R=C_nH_{2n+1}, n=4–6

1 mmol (216 mg) 5-bromsalicylamidu byl navážen do vysušené baňky s kulatým dnem a zbaven zbytkové vlhkosti vakuem a proudem dusíku. Do baňky bylo přidáno 16 ml bezvodého acetonitrilu, poté byl přidán 1 ekvivalent (1 mmol, 101 mg, 139 µl) triethylaminu a směs míchána do rozpuštění. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 1,1 ekvivalentu (1,1 mmol) isokyanátu. Roztok byl zahřát na 70 °C a po 1 h byl ochlazen a vykrystalizovaný produkt získán vakuovou filtrací přes nuč. Následně byl produkt přečištěn rekrystalizací z ethyl-acetátu.

Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze: dichlormethan/methanol 4:0,3 (v/v)).

4-Brom-2-karbamoylfenyl-hexylkarbamát **[A6]**



Sumární vzorec	**$C_{14}H_{19}BrN_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	343,22
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	234–235 °C
Retenční faktor	0,69
Výtěžek	77 %

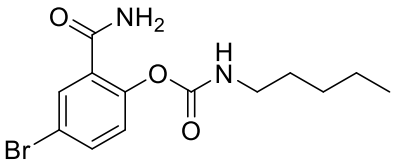
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 7.79 (t, J = 5.6 Hz, 1H, OCONH), 7.74 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H3), 7.63 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H5), 7.57 (s, 2H, $CONH_2$), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H6), 3.03 (td, J = 7.1, 5.7 Hz, 2H, C^1H_2), 1.48 – 1.41 (m, 2H, C^2H_2), 1.33 – 1.21 (m, 6H, C^3H_2, C^4H_2, C^5H_2), 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 165.74, 153.80, 148.19, 134.09, 132.07, 131.60, 126.36, 117.37, 41.00, 31.41, 29.58, 26.32, 22.50, 14.39.

IR: 3343, 3172, 2962, 2929, 2855, 1719, 1655, 1225, 865, 640 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 48.99; H, 5.58; N, 8.16 nalezeno: C, 48.94; H, 5.63; N, 8.19.

4-Brom-2-karbamoylfenyl-pentylkarbamát **[A5]**



Sumární vzorec	**$C_{13}H_{17}BrN_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	329,19
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	235–237 °C
Retenční faktor	0,64
Výtěžek	64 %

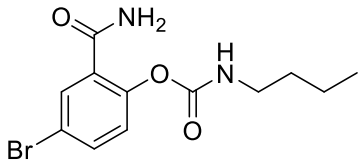
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 7.75 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OCONH), 7.71 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H3), 7.60 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H5), 7.54 (s, 2H, $CONH_2$), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H6), 2.99 (td, J = 7.1, 5.8 Hz, 2H, C^1H_2), 1.42 (p, J = 7.2 Hz, 2H, C^2H_2), 1.29 – 1.21 (m, 4H, C^3H_2, C^4H_2), 0.84 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.82, 153.87, 148.26, 134.15, 132.13, 131.69, 126.43, 117.44, 41.03, 29.36, 28.90, 22.33, 14.44.

IR: 3342, 3176, 2932, 1716, 1653, 1256, 1222, 672, 639 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 47.43; H, 5.21; N, 8.51 nalezeno: C, 47.40; H, 5.28; N, 8.50.

4-Brom-2-karbamoylfenyl-butylkarbamát **[A4]**



Sumární vzorec	**$C_{12}H_{15}BrN_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	315,17
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	232 °C–233 °C
Retenční faktor	0,61
Výtěžek	43 %

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 7.75 (t, J = 5.6 Hz, 1H, OCONH), 7.70 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H3), 7.60 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H, H5), 7.54 (s, 2H, $CONH_2$), 7.09 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H6), 3.01 (td, J = 7.0, 5.7 Hz, 2H, C^1H_2), 1.40 (p, J = 7.0 Hz, 2H, C^2H_2), 1.32 – 1.24 (m, 2H, C^3H_2), 0.85 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3).

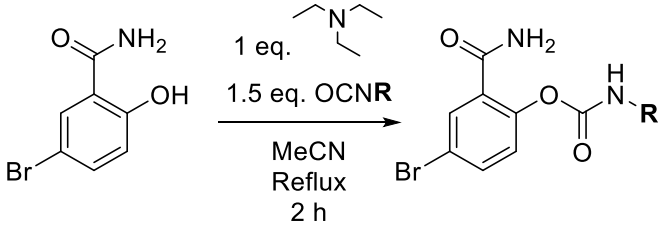
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.83, 153.89, 148.26, 134.16, 132.12, 131.71, 126.44, 117.45, 40.73, 31.80, 19.88, 14.18.

IR: 3336, 3180, 2960, 2933, 2873, 1715, 1653, 1411, 1253, 1220, 1091, 872, 781, 671, 637 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 45.73; H, 4.80; N, 8.89 nalezeno: C, 45.77; H, 4.82; N, 8.93.

Příprava látek **A3** a **A2**

Propyl- a ethyl-karbamáty 5-bromsalicylamidu byly připraveny analogicky k předchozím sloučeninám za upravených podmínek.

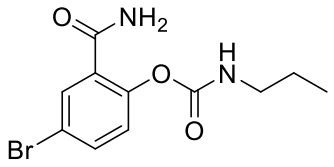


R=C_nH_{2n+1}, n=2–3

Do vysušené baňky s kulatým dnem bylo naváženo 2 mmol (432 mg) 5-bromsalicylamidu a zbytková vlhkost byla odstraněna pomocí vakua a proudem dusíku. Do baňky bylo přidáno 50 ml bezvodého acetonitrilu, přidán 1 ekvivalent (2 mmol, 202 mg, 278 µl) triethylaminu a směs byla míchána do rozpuštění. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 1,5 ekvivalentu (3 mmol) isokyanátu. Roztok byl zahříván pod zpětným chladičem a po dvou hodinách byl ochlazen a vykrystalizovaný produkt získán vakuovou filtrací přes nuč. Následně byl produkt přečištěn rekrystalizací z ethyl-acetátu.

Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze: dichlormethan/methanol 4:0,3 (v/v)).

4-brom-2-karbamoylfenyl-propylkarbamát **[A3]**



Sumární vzorec	**$C_{11}H_{13}BrN_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	301,14
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	237–238 °C
Retenční faktor	0,55
Výtěžek	46 %

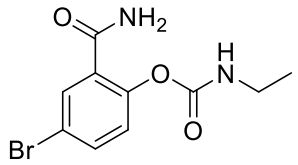
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 7.76 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OCONH), 7.70 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H3), 7.60 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H5), 7.54 (s, 1H, $CONH_2$), 7.10 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H6), 2.97 (q, J = 6.6 Hz, 2H, C^1H_2), 1.47 – 1.40 (m, 2H, C^2H_2), 0.84 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.85, 153.93, 148.26, 134.17, 132.12, 131.72, 126.44, 117.46, 42.84, 22.98, 11.74.

IR: 3339, 3178, 2962, 1716, 1655, 1630, 1412, 1257, 1222, 833, 672, 657, 639 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 43.87; H, 4.35; N, 9.30 nalezeno: C, 43.89; H, 4.30; N, 9.26.

4-brom-2-karbamoylfenyl-ethylkarbamát **[A2]**



Sumární vzorec	**$C_{10}H_{11}BrN_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	287,11
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	235–236 °C
Retenční faktor	0,50
Výtěžek	42 %

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 7.75 (t, J = 5.6 Hz, 1H, OCONH), 7.70 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H3), 7.60 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H5), 7.54 (s, 1H, CONHH), 7.53 (s, 1H, CONHH), 7.10 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H6), 3.08 – 3.00 (m, 2H, CH_2), 1.04 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

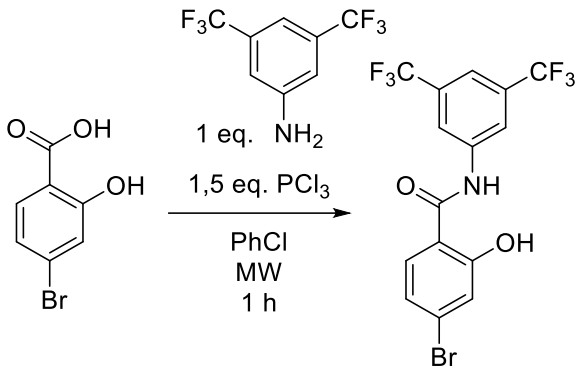
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.90, 153.74, 148.24, 134.15, 132.10, 131.78, 126.40, 117.45, 35.94, 15.35.

IR: 3344, 3181, 2984, 1716, 1651, 1625, 1533, 1480, 1411, 1253, 1222, 1097, 983, 838, 672, 629 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 41.83; H, 3.86; N, 9.76 nalezeno: C, 41.88; H, 3.89; N, 9.72.

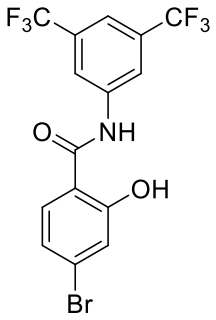
Příprava látky **B0**

3,5-Bis(trifluormethyl)anilid 4-bromsalicylové kyseliny byl připraven reakcí 4-bromsalicylové kyseliny s chloridem fosforitým a 3,5-bis(trifluormethyl)anilinem v mikrovlnném reaktoru.



20 mmol (4,34 g) 4-bromsalicylové kyseliny bylo naváženo do baňky s kulatým dnem a suspendováno ve 100 ml chlorbenzenu. Následně byl přidán 1 ekvivalent (20 mmol, 4,58 g, 3,12 ml) 3,5-bis(trifluormethyl)anilinu a nakonec 1,5 ekvivalentu (10 mmol, 1,37 g, 0,87 ml) chloridu fosforitého. Tato směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru (530 W) na 60 minut. Následně byla směs za horka zfiltrována a filtrát chlazen 1 hodinu při +8 °C. Vykrystalizovaný produkt byl získán filtrací a jeho čistota byla ověřena pomocí TLC (mobilní fáze: toluen/ethyl-acetát 4:1 (v/v)).

N-[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]-4-brom-2-hydroxybenzamid **[B0]**



Sumární vzorec	**$C_{15}H_8BrF_6NO_2$**
Relativní molekulová hmotnost	428,13
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	203–204 °C (v literatuře 218–219 °C)[68]
Retenční faktor	0,64
Výtěžek	88 %

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 11.61 (s, 1H, OH), 10.75 (s, 1H, CONH), 8.39 (s, 2H, H2′, H6′), 7.76 (s, 1H, H4′), 7.73 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.17 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H3), 7.13 (dd, J = 8.4, 1.9 Hz, 1H, H5).

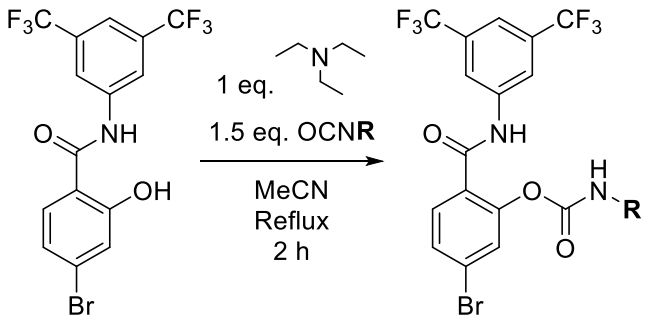
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 166.44, 158.66, 140.83, 131.73, 131.23 (q, J = 32.7 Hz), 126.89, 123.74 (q, J = 272.7 Hz), 122.88, 120.79 (q, J = 4.0 Hz), 120.19, 118.73, 117.24 (q, J = 4.0 Hz).

IR: 3316, 3168, 2988, 1643, 1602, 1564, 1381, 1275, 1184, 1130, 1112, 893, 682, 660 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 42.08; H, 1.88; N, 3.27 nalezeno: C, 42.18; H, 1.84; N, 3.29.

Příprava látek **B6** a **B5**

Hexyl- a pentyl- karbamáty salicylanilidu **B0** byly připraveny obdobným postupem jako karbamáty 5-bromsalicylamidu, tedy reakcí salicylanilidu s příslušným isokyanátem za teploty varu rozpouštědla v přítomnosti báze.

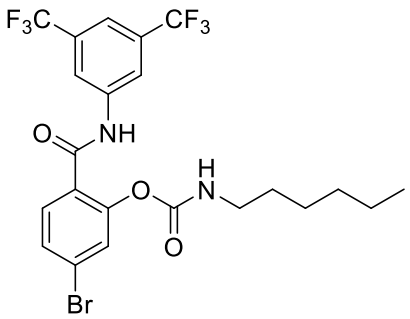


R=C_nH_{2n+1}, n=5–6

Do vysušené baňky s kulatým dnem bylo naváženo 2 mmol (856 mg) látky **B0** a zbytková vlhkost byla odstraněna pomocí vakua a proudu dusíku. Do baňky bylo přidáno 50 ml bezvodého acetonitrilu, přidán 1 ekvivalent (2 mmol, 202 mg, 278 μl) triethylaminu a směs míchána do rozpuštění. Po úplném rozpuštění bylo přidáno 1,5 ekvivalentu (3 mmol) isokyanátu. Roztok byl zahříván pod zpětným chladičem a po dvou hodinách byl ochlazen a vykrystalizovaný produkt získán vakuovou filtrací přes nuč.

Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze: toluen/ethyl-acetát 4:1, (v/v)).

2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-5-bromfenyl-hexylkarbamát **[B6]**



Sumární vzorec	**$C_{22}H_{21}BrF_6N_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	555,32
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	213–214 °C
Retenční faktor	0,84
Výtěžek	45 %

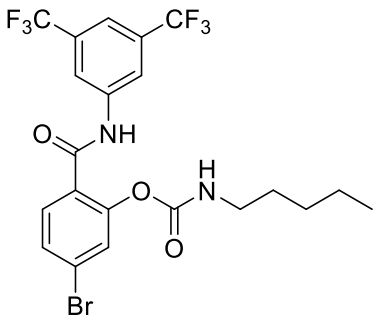
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 10.86 (s, 1H, CONH), 8.34 (s, 2H, H2′, H6′), 7.82 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, OCONH), 7.75 (s, 1H, H4′), 7.62 – 7.54 (m, 2H, H3, H4), 7.50 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H6), 2.90 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, C^{1}H$_2$), 1.27 – 1.18 (m, 4H, C^{2}H$_2$, C^{3}H$_2$), 1.12 – 1.02 (m, 4H, C^{4}H$_2$, C^{5}H$_2$), 0.72 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH$_3$).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 164.97, 153.84, 149.75, 141.47, 131.29 (q, *J* = 32.7 Hz), 130.92, 129.44, 128.65, 126.77, 124.47, 123.75 (q, *J* = 273.1 Hz), 119.88 (q, *J* = 3.8 Hz), 116.93 (q, *J* = 3.8 Hz), 40.89, 31.28, 29.49, 26.07, 22.34, 14.19.

IR: 3388, 3343, 2933, 1720, 1562, 1383, 1279, 1172, 1126, 905, 700, 683 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 47.58; H, 3.81; N, 5.04 nalezeno: C, 47.62; H, 3.80; N, 4.97

2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-5-bromfenyl-pentylkarbamát **[B5]**



Sumární vzorec	**$C_{21}H_{19}BrF_6N_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	541,29
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	128–130 °C
Retenční faktor	0,81
Výtěžek	51 %

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 10.86 (s, 1H, CONH), 8.34 (s, 2H, H2′, H6′), 7.82 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OCONH), 7.76 (s, 1H, H4′), 7.62 – 7.54 (m, 2H, H3, H4), 7.50 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H6), 2.90 (q, J = 6.5 Hz, 2H, C^1H_2), 1.33 – 1.15 (m, 6H, C^2H_2, C^3H_2, C^4H_2), 0.82 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

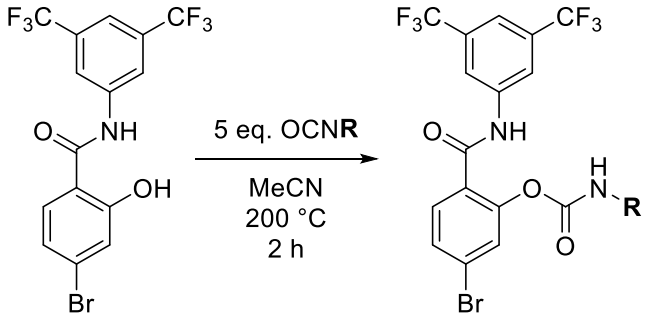
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 164.97, 153.83, 149.75, 141.45, 131.29 (q, J = 31.8 Hz), 130.91, 129.41, 128.65, 126.77, 124.44, 123.76 (q, J = 272.7 Hz), 119.89 (q, J = 3.8 Hz), 116.97 (q, J = 3.8 Hz), 39.72, 30.27, 29.15, 22.43, 14.47.

IR: 3386, 3333, 2955, 2934, 2862, 1719, 1618, 1591, 1562, 1474, 1383, 1278, 1181, 1172, 1127, 885, 734, 701, 624 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 46.60; H, 3.54; N, 5.18 nalezeno: C, 46.55; H, 3.50; N, 5.22.

Příprava látek **B4**, **B3** a **B2**

Butyl-, propyl- a ethyl- karbamáty salicylanilidu **B0** byly připraveny reakcí salicylanilidu B0 s příslušným isokyanátem v uzavřené tlakuvzdorné nádobě.

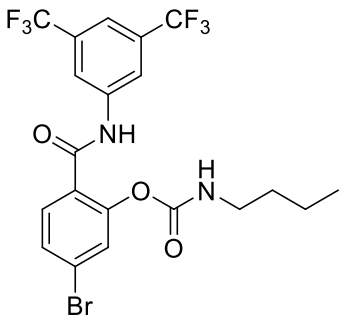


R=C_nH_{2n+1}, n=2–4

Do tlakuvzdorné nádobky o objemu 3 ml bylo naváženo 0,5 mmol (214 mg) látky **B0**, přidány 3 ml bezvodého acetonitrilu a směs důkladně zamíchána. Po rozpuštění bylo přidáno 5 ekvivalentů (2,5 mmol) isokyanátu, nádobka těsně uzavřena a zahřívána hodinu na 200 ºC. Po ochlazení byla reakční směs převedena do Erlenmeyerovy baňky a byla k ní za průběžného míchání postupně přidávána destilovaná voda, dokud vznikal bílý zákal. Následně byla směs chlazena hodinu při + 8 °C, vzniklý precipitát byl odfiltrován a produkt byl získán odpařením zbylého roztoku.

Čistota produktu byla ověřena pomocí TLC (mobilní fáze: toluen/ethyl-acetát 4:1 (v/v)).

2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-5-bromfenyl-butylkarbamát **[B4]**



Sumární vzorec	**$C_{20}H_{17}BrF_6N_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	527,26
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	166–167 °C
Retenční faktor	0,8
Výtěžek	33 %

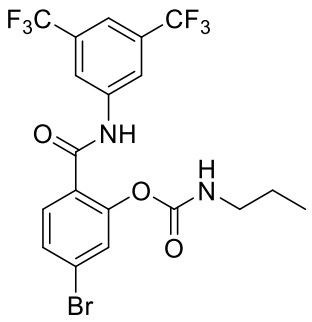
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 10.91 (s, 1H, CONH), 8.38 (d, J = 1.7 Hz, 2H, H2′, H6′), 7.86 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OCONH), 7.80 (s, 1H, H4′), 7.65 – 7.58 (m, 2H, H3, H4), 7.54 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H6), 2.94 (q, J = 6.6 Hz, 2H, C^1H_2), 1.28 – 1.22 (m, 2H, C^2H_2), 1.17 – 1.09 (m, 2H, C^3H_2), 0.68 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 164.65, 153.49, 149.42, 141.11, 130.94 (q, J = 32.7 Hz), 130.55, 129.07, 128.31, 126.40, 124.15, 123.41 (q, J = 272.8 Hz), 119.50 (q, J = 3.8 Hz), 116.63 (q, J = 3.8 Hz), 40.20, 31.34, 19.23, 13.47.

IR: 3330, 3239, 2967, 2936, 2878, 1719, 1690, 1652, 1596, 1570,1468, 1398, 1278, 1226, 1169, 1129, 1106, 878, 700, 682 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 45.56; H, 3.25; N, 5.31 nalezeno: C, 45.51; H, 3.29; N, 5.33.

2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-5-bromfenyl-propylkarbamát **[B3]**



Sumární vzorec	**$C_{19}H_{15}BrF_6N_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	513,23
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	208–210 °C
Retenční faktor	0,72
Výtěžek	26 %

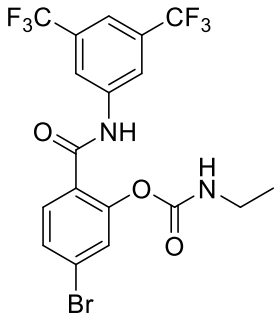
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 10.87 (s, 1H, CONH), 8.34 (d, J = 1.7 Hz, 2H, H2′, H6′), 7.84 (t, J = 5.9 Hz, 1H, OCONH), 7.78 (s, 1H, H4′), 7.62 – 7.55 (m, 2H, H3, H4), 7.51 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H6), 2.88 (q, J = 6.7 Hz, 2H, C^1H_2), 1.29 (q, J = 7.2 Hz, C^2H_2), 0.69 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.01, 153.84, 149.79, 141.43, 131.26 (q, J = 32.8 Hz), 130.84, 129.30, 128.59, 126.72, 124.47, 123.76 (q, J = 273.1 Hz), 119.93 (q, J = 3.8 Hz), 116.98 (q, J = 3.8 Hz), 42.71, 22.77, 11.34.

IR: 3388, 3336, 2917, 1717, 1682, 1557, 1382, 1284, 1222, 1173, 1125, 887, 700, 683, 625 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 44.46; H, 2.95; N, 5.46 nalezeno: C, 44.50; H, 3.01; N, 5.44.

2-{[3,5-Bis(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}-5-bromfenyl-ethylkarbamát **[B2]**



Sumární vzorec	**$C_{18}H_{13}BrF_6N_2O_3$**
Relativní molekulová hmotnost	499,21
Popis	Bílá krystalická látka
Teplota tání	216–217 °C
Retenční faktor	0,71
Výtěžek	38 %

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 10.87 (s, 1H, CONH), 8.34 (s, 2H, H2′, H6′), 7.83 (t, J = 5.7 Hz, 1H, OCONH), 7.77 (s, 1H, H4′), 7.62 – 7.54 (m, 2H, H3, H4), 7.52 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H6), 2.98 – 2.83 (m, 2H, CH_2), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO): δ 165.00, 153.64, 149.77, 141.41, 131.28 (q, J = 32.5 Hz), 130.87, 129.19, 128.57, 126.72, 124.47, 123.75 (q, J = 272.6 Hz), 119.96 (q, J = 3.8 Hz), 117.01 (q, J = 3.8 Hz), 35.86, 15.06.

IR: 3394, 3340, 1718, 1681, 1560, 1473, 1380, 1285, 1198, 1171, 1124, 885, 734, 666, 624 cm^{-1}.

EA: vypočteno: C, 43.31; H, 2.62; N, 5.61 nalezeno: C, 43.29; H, 2.69; N, 5.55.

4.1.3. Biologická aktivita

Hodnocení antibakteriální aktivity[69]

Připravené deriváty byly hodnoceny *in vitro* jako potenciální antibakteriální látky. Antibakteriální aktivita byla hodnocena proti čtyřem G+ a čtyřem G- klinicky významným kmenům. Konkrétně se jednalo o kmeny *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213, CCM (Czech Collection of Microorganisms) 4223, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, CCM 4224, *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, DSM 30007, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955. Tyto kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů nebo se jednalo o klinické izoláty z Ústavu klinické mikrobiologie (Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Česká republika). Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena podle EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) instrukcí (2006).[70]

Kultivace byla provedena v Mueller-Hintonově bujónu s upravenou koncentrací kationtů (CAMHB, M-H 2 Broth; Merck, Darmstadt, Německo). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (Merck, Darmstadt, Německo) a tím byly vytvořeny zásobní roztoky. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila růst bakterií. Do každého testu byly zahrnuty pozitivní (pouze mikroby) a negativní (kultivační médium a DMSO) kontroly a vnitřní standardy. Testování anti-mykobakteriální aktivity bylo provedeno paní Idou Dufkovou z KBLV.

Antibakteriální aktivita je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) po 24 a 48 hodinách statické inkubace v temné a zvlhčené atmosféře při 35±2 °C. Experimenty byly prováděny v duplikátech. Pro platnost výsledků nesmí být rozdíl v MIC stanovených ve dvou paralelních měřeních větší než jeden díl na stupnici měření. Stupnice pro stanovení MIC začala pro nejúčinnější sloučeniny od 0,001 $\mu mol.l^{-1}$, standardně však od 0,49 $\mu mol.l^{-1}$. Výsledky byly analyzovány vizuálně. Jako referenční sloučeniny bylo použito β-laktamové antibiotikum piperacilin.

Hodnocení antimykobakteriální aktivity[71]

Připravené deriváty byly hodnoceny in vitro jako potenciální antimykobakteriální látky. Testovanými kmeny byly *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 9431, H_{37}Ra ITM-M006710, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* ATCC 15769, Česká národní sbírka typových kultur (CNCTC) My 80/72 a *Mycolicibacterium aurum* ATCC 23366, DSM 43999.

Pro stanovení aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda s využitím 96jamkových mikrotitračních destiček. Kultivačním médiem byl bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie).

Mykobakteriální suspenze byly připraveny v bujónu Middlebrook 7H9. Výsledná hustota byla upravena na hodnotu 1,0 podle McFarlandovy stupnice a naředěna v poměru 1:10 s bujónem. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a následně byl přidán bujón Middlebrook, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 2000 μg/ml.

Jako standard pro stanovení aktivity byl použit INH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Konečné koncentrace byly dosaženy binárním ředěním a přidáním suspenze mykobakterií a byly nastaveny jako 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81, 6,25, 3,91, 3,125, 1,56 a 0,78 μg/ml. INH byl naředěn v rozmezí 500–3,91 μg/ml pro screening proti rychle rostoucím mykobakteriím a v rozmezí 1–0,0078 μg/ml pro screening proti *Mtb*. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst. Zahrnuty byly pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontroly růstu.

Destičky byly uzavřeny polyesterovým adhezivním filmem a inkubovány ve tmě při 37 °C bez míchání. Po 120 hodinách inkubace (po 72 hodinách pro *M. aurum*) byl přidán 0,01% roztok sodné soli resazurinu a destičky dále inkubovány. Po 24 hodinách (4 hodinách pro *M. aurum* a 18 hodin pro *Mtb*) od přidání barviva byla stanovena aktivita. Testování antimykobakteriální aktivity bylo provedeno PharmDr. Ondřejem Janďourkem, Ph.D., z KBLV.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnota byla odečtena na základě změny barvy skvrny (modrá barva – inhibice růstu; růžová barva – růst). Všechny experimenty byly provedeny duplicitně.

Hodnocení antifungální aktivity[69]

Připravené deriváty byly hodnoceny *in vitro* jako potenciální antimykotické látky. Antifungální aktivita byla hodnocena proti čtyřem kvasinkovým kmenům: *Candida albicans* ATCC 24433, CCM 8320, *Candida krusei* ATCC 6258, CCM 8271, *Candida parapsilosis* ATCC22019, CCM 8260, *Candida tropicalis* ATCC 750, CCM 8264 a čtyřem kmenům vláknitých hub: *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Absidia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, CCM 8377. Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena podle modifikovaných EUCAST instrukcí (EUCAST 7.3.1 a 9.3.1, 2017).[72,73]

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a zředěny dvojkovým ředěním RPMI-1640 médiem s L-glutaminem, doplněným 2 % glukózy (w/v) a pufrovány na pH 7 pomocí 3-(*N*-morfolin)propan-1-sulfonovou kyselinou (vše Merck, Darmstadt, Německo). Finální koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a bylo potvrzeno, že tato koncentrace neinhibuje růst hub. Statická inkubace probíhala v temné vlhčené atmosféře, při 35±2 °C po dobu 24 a 48 hodin (120 a 168 hodin při 25-28 °C pro *Trichophyton interdigitale*). Pozitivní kontroly byly tvořeny pouze testovanými houbami, zatímco negativní kontroly byly tvořeny médiem a DMSO. Zahrnuta byla také vnitřní kontrola kvality. Hodnocení MIC bylo provedeno vizuálně a stanovení byla vždy prováděna v duplikátech. Pro platnost výsledků nesmí být rozdíl hodnot MIC stanovený ze dvou paralelních měření větší než jeden díl na stupnici ředění. Stupnice pro stanovení MIC začala od 0,98 μmol.l^{-1}.

Jako referenční sloučenina sloužil flukonazol (FLU). Hodnoty MIC FLU znamenají IC_{50}, tj. koncentraci léčiva, která způsobuje 50% inhibici růstu oproti kontrole bez léčiva. Odečet byl proveden po 24 hodinách (kvasinky) nebo 48 hodinách (plísně) statické kultivace na mikrodilučních deskách při 35±2 °C ve zvlhčené atmosféře. Výsledky byly odečteny pomocí čtečky mikrodilučních destiček (SynergyTM HTX, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Spojené státy americké) při vlnové délce 530 nm. Testování antifungální aktivity bylo provedeno paní Idou Dufkovou z KBLV.

4.2. Peptidové nosiče

4.2.1. Obecná část

Chemikálie a rozpouštědla pro syntézu, isolaci a charakterizaci peptidů byly zakoupeny od firem Iris Biotech GmBH (Ředvice, Německo), Sigma-Aldrich (Budapešť, Maďarsko), VWR (VWR International, Debrecín, Maďarsko), Fluka (Charlotte, Severní Karolína, Spojené státy americké), Reanal Laboratory Chemicals (Budapešť, Maďarsko) a Spectrum-3D Kft. (Debrecín, Maďarsko).

Analytické RP-HPLC bylo provedeno na Exformma HPLC system (Wufeng Scientific Instruments, Šanghaj, Čína) při použití Agilent Zorbax SB-C18 sloupce (5 mm, 100 Å, 4,6 mm × 150 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, Spojené státy americké). K separaci byla použita gradientová eluce za použití 0,1% roztoku TFA ve vodě jako eluent A a 0,1% roztoku TFA ve směsi acetonitril/voda 4:1 (v/v) jako eluent B (0-5 min 0 % B, 5-15 min 0-60 % B, 15-25 min 60-100 % B, 25-29 min 100 % B). Analýza probíhala při laboratorní teplotě za průtoku 1 ml/min. Signál byl detekován při 220 nm.

Surové peptidy byly purifikovány za pomocí semipreparativní HPLC Phenomenex Jupiter Proteo C18 sloupec (10 mm, 90 Å, 10 × 250 mm) (Torrance, Kalifornie, Spojené státy americké). Analýza probíhala při laboratorní teplotě za průtoku 4 ml/min. Signál byl detekován při 220 nm. Byla použita gradientová eluce s lineárním gradientem za využití eluentů A a B shodných s analytickým HPLC.

Identita připravených a purifikovaných peptidů byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej v kladném módu (ESI+). K provedení byl použit Bruker Esquire 3000+ ion trap hmotnostní spektrometr (Brémy, Německo), operující v módu kontinuální injekce vzorku při průtoku 10 ml/min. Vzorky byly rozpuštěny ve směsi acetonitril/voda 1:1 (v/v) s obsahem 0,1 % octové kyseliny. Hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozsahu 50-1500 m/z.

4.2.2. Syntéza

Peptidy byly syntetizovány manuálně na pevné fázi za použití standardní strategie Fmoc/*t*-Bu na pryskyřici typu Rink Amid MBHA. Všechny připravené peptidy mají C-konec ve formě amidu a jsou acetylovány na N-konci. Kvůli studiím *in vitro* buněčné absorpce a intracelulární lokalizace byly připravené peptidy značené 5(6)-karboxy-fluoresceinem (Cf).

Odstranění chránící skupiny

K odstranění Fmoc z N-konce byl použit roztok 2 % DBU + 2 % piperidinu v DMF. Celkem byl tento roztok aplikován 4× a za občasného promíchání působil postupně 2, 2, 5 a 10 minut. Následně byla reakční nádoba 5× promyta DMF.

Coupling

Syntéza peptidového řetězce probíhala na Rink Amid MBHA pryskyřici. Nové peptidové vazby byly tvořeny reakcí *in situ* vznikajícího aktivního esteru s volnou aminoskupinou. Aktivní ester byl připraven rozpuštěním 3 ekvivalentů aminokyseliny opatřené vhodnými chránícími skupinami v NMP s následným přidáním nadbytku DIC a HOBt. Takto připravený roztok aktivního esteru byl přidán k pryskyřici a za občasného míchání reagoval 60 minut. K ověření průběhu byl proveden ninhydrinový (nebo isatinový) test a v případě potřeby byla reakční doba prodloužena nebo byl celý postup couplingu opakován.

Ninhydrinový test

Kvantitativní proběhnutí couplingu i odchránění N-konce bylo potvrzeno pomocí ninhydrinového testu. Ten prokazuje přítomnost volného primárního aminu. Několik částic pryskyřice bylo odebráno do zkumavky a po přidání kapky 0,1% vodného roztoku KCN, 1% vodného fenolu a roztoku ninhydrinu zahříváno 3 minuty při 80 ºC. Pokud se částice pryskyřice zbarvily tmavě modře, byla přítomna volná primární aminoskupina.

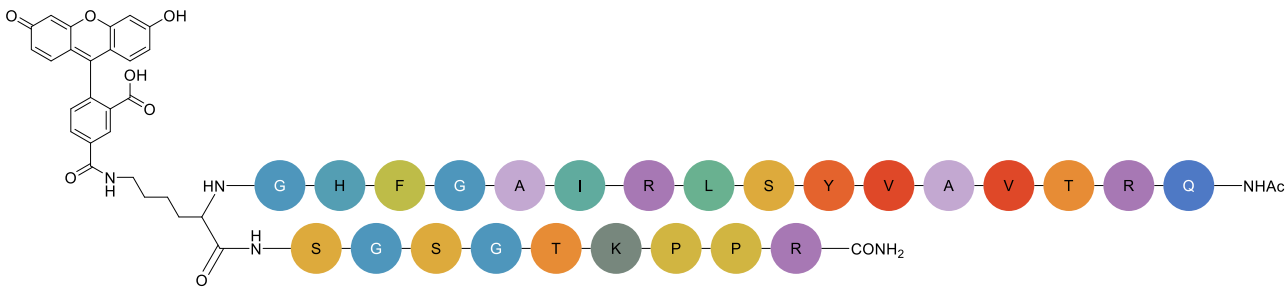
Pokud byla během couplingu připojována další aminokyselina na prolin na N-konci nebo byla odstraňována chránící skupina z prolinu, byl proveden místo ninhydrinového testu test isatinový. Ten prokazuje přítomnost volného sekundárního aminu. Několik částic pryskyřice bylo odebráno do zkumavky a po přidání několika kapek 0,02% roztoku isatinu zahříváno 3 minuty při 80 ºC. Pokud se částice pryskyřice zbarvily žlutooranžově, byl na N-konci přítomný prolin bez chránící skupiny.

Acetylace

Po odchránění N-konce poslední AMK ze sekvence pomocí 20% piperidinu v DMF byla volná aminoskupina acetylována směsí acetanhydrid/DIEA/DMF v poměru 1:1:2 (v/v/v) po dobu 30 min.

Značení karboxyfluoresceinem (Cf)

Připravené peptidy byly značeny na lysinu 17 (viz Obrázek 21) pomocí 5(6)-karboxy-fluoresceinu. Při syntéze základního řetězce byl proto v této poloze použit lysin s methyltritylovou (Mtt) chránící skupinou na ε-aminoskupině. Mtt byla selektivně odštěpena 2% roztokem TFA v DCM s následnou neutralizací 10 % DIEA v DMF.



Obrázek 21: Struktura peptidu (s lidskou verzí tuftsinu) s uvedenou polohou 5-Cf značení.

Navázání Cf probíhalo obdobně k připojování aminokyselin, tedy přes stadium aktivního esteru. Ve 2 ml NMP byly rozpuštěny 3 ekvivalenty Cf a po rozpuštění bylo přidáno ekvimolární množství DIC a HOBt. Tento roztok byl přidán k pryskyřici a za občasného promíchání reagoval 45 minut. Polymerizovaný karboxyfluorescein byl následně odstraněn působením roztoku 2 % DBU + 2 % piperidinu v DMF.

Izolace peptidu a analýza

K odstranění zbylých chránících skupin a odštěpení peptidu od pryskyřice byla použita směs TFA/TIS/H_2O v poměru 38:1:1 (v/v/v) na 90 minut. Roztok byl zfiltrován a následně z něj byly peptidy vysráženy přidáním studeného diethyletheru a odděleny centrifugací. Takto získaný surový peptid byl analyzován na analytickém HPLC a poté přečištěn pomocí semipreparativní HPLC. Získaný přečištěný peptid byl opět analyzován analytickým HPLC a následně byla potvrzena jeho identita pomocí MS.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Chemická část

5.1.1. Malé molekuly

Celkem bylo připraveno deset nových nízkomolekulárních sloučenin, pět *N*-alkyl monosubstituovaných karbamátů 5-bromsalicylamidu a pět *N*-alkyl monosubstituovaných karbamátů *N*-[3,5-bis(trifluormethyl)fenyl]-4-brom-2-hydroxybenzamidu, který byl rovněž připraven, ale byl již dříve publikován.[68]

Struktury nových karbamátů byly navrženy podle látek dříve připravených jako inhibitory cholinesteráz, u kterých byla objevena podstatná antimikrobní aktivita (struktury viz Obrázek 19).[66] Struktura látek série A obsahovala bromsalicylamidovou část bez substituce na amidovém dusíku, zatímco struktura látek série B nesla na dusíku amidu 3,5-bis(trifluormethyl)fenylovou substituci. Každá série látek obsahovala pět *N*-monosubstituovaných karbamátů s alifatickým řetězcem o délce 2–6 uhlíků. Zároveň se připravené série látek lišily i polohou bromu na salicylovém jádře. U série A se brom nacházel v poloze *para* vůči hydroxylové skupině a u série B v poloze *para* vůči karboxamidu.

Tyto série struktur byly navrženy za účelem zhodnocení vlivu délky alkylového řetězce a identifikace ideální velikosti substituentu a kvůli zhodnocení důležitosti *N*-substituce pro antimikrobní aktivitu.

Karbamáty byly připraveny reakcí příslušného isokyanátu s derivátem salicylamidu. Reakce probíhaly v acetonitrilu za nepřítomnosti vody a v případě látek A2–A6 a B5–B6 pod dusíkovou atmosférou. Příprava karbamátů s vyššími alkyly probíhala snadno, produkty byly jednoduše izolovatelné a bylo tak dosaženo dostatečně vysokých výtěžků. U karbamátů s kratšími alkyly neprobíhaly reakce v dostatečné míře a byla tak potřeba úprava podmínek. Pro sérii A (A3, A4) postačilo zvýšení teploty, reakčního množství a relativního množství isokyanátu. Pro karbamáty série B s kratším alkylem (B2–B4) bylo nutné další navýšení relativního množství isokyanátu i teploty. Kvůli teplotě varu použitých reaktantů a rozpouštědla byla reakční směs zahřívána v uzavřené tlakuvzdorné nádobce. Tyto produkty se na rozdíl od předchozích nevysrážely snížením teploty, ale zjistili jsme, že výchozí látku, která byla hlavní nečistotou produktu, bylo možné vysrážet a následně odstranit přidáním destilované vody a ochlazením s následnou filtrací. Reakce byly průběžně monitorovány pomocí TLC a připravené produkty byly v případě potřeby

přečištěny rekrystalizací z ethyl-acetátu. Čistota a identita finálních produktů byla ověřena pomocí NMR a EA. Připravené látky byly charakterizovány pomocí IR, R_f a teploty tání.

Výtěžky připravených karbamátů jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 3). Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 42–77 % pro přípravu látek série A a 26–51 % pro přípravu látek série B. 5-Bromsalicylamid (série A) poskytoval oproti *N*-[3,5-bis(trifluor-methyl)fenyl]-4-brom-2-hydroxybenzamidu (série B) vyšší výtěžky se všemi isokyanáty. To je pravděpodobně způsobeno sterickými vlivy objemné substituce 3,5-bis(trifluormethyl)fenylem na amidovém dusíku. To je dále podpořeno srovnáním výtěžků jednotlivých karbamátů. Reakce s hexylisokyanátem, tedy nejobjemnějším isokyanátem, poskytovala produkt série A s výtěžkem 77 % zatímco produkt série B s výtěžkem 45 %. Rozdíl výtěžků je tedy 32 %. Oproti tomu reakce s ethylisokyanátem, tedy nejméně objemným isokyanátem, poskytovala produkt série A s výtěžkem 42 % a produkt série B s výtěžkem 38 %. Zdá se tedy, že méně objemné isokyanáty reagovaly podobně dobře s oběma substráty, zatímco u objemných isokyanátů byla reaktivita vůči salicylanilidovému derivátu omezena sterickými vlivy.

Výtěžky reakcí se snižovaly současně se zkracujícím se alkylovým zbytkem. Proto byly 2 (3 pro sérii látek B) karbamáty s nejkratším alkylem připraveny za odlišných podmínek (primárně zvýšená teplota) od látek s vyšším alkylem stejné série.

Tabulka 3: Srovnání výtěžků připravených karbamátů.

	Série A	Série B
Hexylkarbamát	77 %	45 %
Pentylkarbamát	64 %	51 %
Butylkarbamát	43 %	33 %
Propylkarbamát	46 %	26 %
Ethylkarbamát	42 %	38 %

Při syntéze B0 bylo postupováno podle metodiky publikované Paraskevopoulos *et al.*[68] 4-Bromsalicylová kyselina byla suspendována v chlorbenzenu a po přidání 3,5-bis(trifluormethyl)anilinu a chloridu fosforitého umístěna do mikrovlnného reaktoru, kde byla ozařována 60 minut. Výsledná suspenze byla za horka zfiltrována a po ochlazení byl produkt získán filtrací. Dosaženo bylo výtěžku 88 % (v předlohové literatuře 47 %).

Za účelem zhodnocení vlivu délky alkylového řetězce a identifikace ideální velikosti substituentu byly připraveny karbamáty s délkou alifatického řetězce 2–6 uhlíků. Byly připraveny deriváty se substitucí na amidovém dusíku a s nesubstituovanou amidovou

skupinou kvůli zhodnocení důležitosti *N*-substituce pro antimikrobní aktivitu. Zároveň měly tyto deriváty rozdílnou polohu atomu bromu na skeletu kyseliny salicylové.

Pro plánované hodnocení antimikrobiální aktivity byly všechny sloučeniny získány v požadovaném množství i čistotě.

5.1.2. Peptidové nosiče

Práce na peptidových nosičích probíhala v rámci Research Group of Peptide Chemistry na Univerzitě Loránda Eötvöse v Budapešti pod vedením Assoc. Prof. Szilvie Bősze, Ph.D.

Tandemové peptidové sekvence byly připraveny pomocí strategie Fmoc/*t*-Bu. Syntéza peptidového řetězce probíhala na pryskyřici typu Rink Amid MBHA a postupovala od C-konce. Celkem byly připraveny a izolovány dva peptidy, každý o délce 26 AMK (Tabulka 4 přehledně zobrazuje stavbu připravených peptidů). Peptidy byly připraveny s C-koncem ve formě amidu a acetylované na N-konci. Zároveň byly značené na lysinu 17 pomocí Cf.

Tabulka 4: Aminokyselinová sekvence připravených peptidů. Žlutě označena část pocházející z gD HSV-1 a zeleně označena část obsahující sekvenci tuftsinu. Červeně zvýrazněný lysin 17 představuje místo značení Cf.

Pracovní název	Sekvence	Získané množství
P1	QRTVAVYSLRIAGFHG-K-SGSG-TKPPR	80 mg
P2	QRTVAVYSLRIAGFHG-K-SGSG-TKPKG	185 mg

Připravené peptidy kombinují sekvence dříve popsaných peptidů s internalizační schopností. Použitá sekvence HSV-1 gD fragmentu byla získána porovnáním internalizační schopnosti fragmentů gD, navržených na základě známé struktury proteinu. Vlastnosti identifikovaného fragmentu byly dále optimalizovány záměnou tryptofanu za fenylalanin a lysinu a za arginin.[67]

Druhou část peptidu tvoří tuftsin. Jde o fragment uvolňovaný při štěpení IgG protilátek se schopností internalizace do makrofágů. Zároveň má i imunostimulační účinky. Přirozeně se jedná o tetrapeptid, (lidský: TKPR, psí: TKPK) ale pentapeptidové deriváty (lidský: TKPPR, psí: TKPKG) mají jako peptidové nosiče vyšší účinnost a nižší cytotoxicitu.[23]

Pro spojení obou částí peptidu byl zvolen flexibilního serylglycylserylglycinový linker (SGSG) prodloužený na N-konci o lysin kvůli možnosti derivatizace.

K odštěpení chránící skupiny (Fmoc) z N-konce byl použit roztok 2 % DBU + 2 % piperidinu v DMF. Standardně byl tento roztok aplikován 4× a za občasného promíchání působil postupně 2, 2, 5 a 10 minut. K potvrzení úplného odchránění byl použit ninhydrinový (nebo isatinový) test. V případě nejednoznačného výsledku testu byl aplikován roztok DBU a piperidinu ještě jednou na 5–10 minut. Pro odstraňování Fmoc z aminokyselin připojených po argininu 10 byla dodatečné aplikace deprotekčního činidla nutná téměř pro každou aminokyselinu.

Připojování nových aminokyselin probíhalo reakcí volné aminoskupiny peptidu s aktivním esterem. Ten byl připraven reakcí aminokyseliny s DIC a HOBt v NMP. Roztok s aktivním esterem byl aplikován na pryskyřici a za občasného promíchání reagoval alespoň 60 minut. Pak byl zbylý roztok odsát a pryskyřice 5× promyta DMF. K ověření kompletního navázání nové aminokyselin byl proveden ninhydrinový (nebo isatinový) test. V případě nejednoznačného výsledku testu byl coupling opakován s délkou trvání 30–60 minut. Při couplingu argininu 10 nedošlo ke kompletní reakci a zbylé aminoskupiny byly acetylovány pomocí acetanhydridu, aby se neúčastnily dalších reakcí a vzniklé nečistoty byly jednoduše oddělitelné od produktu. Taktéž při připojování argininu 2 nebylo možné dosáhnout úplné konverze. Ani po couplingu a dvou opakováních s celkovou délkou trvání přes 5 hodin nebyl ninhydrinový test jednoznačně negativní. Zbylé volné aminokyseliny byly opět acetylovány acetanhydridem. Poslední aminokyselina, glutamin 1, byla připojena couplingem trvajícím 110 minut. Přestože reakce neproběhla dle ninhydrinového testu kompletně, nebyl zde již coupling opakován.

Podrobné záznamy ze syntézy peptidů jsou přiloženy v příloze (Příloha 1 a Příloha 2). Pro přípravu peptidu P1 bylo naváženo 255 mg pryskyřice (ekvivalentní 0,171 mmol) a připojen počáteční pentapeptid. Takto bylo získáno 371 mg materiálu, z něhož bylo odebráno 154 mg (ekvivalentní 0,071 mmol) a zbytek uložen pro další využití. Následně byl připojen zbytek sekvence. V tomto kroku bohužel došlo k podstatné ztrátě produktu kvůli nevhodné manipulaci. Výsledné množství bylo rozděleno na dvě části. 23 mg bylo uskladněno a zbylých 105 mg bylo zpracováno na finální produkt.

Pro přípravu peptidu P2 bylo naváženo 401 mg pryskyřice (ekvivalentní 0,269 mmol) a připojen počáteční pentapeptid. Takto bylo získáno 562 mg materiálu, z něhož bylo odebráno 153 mg (ekvivalentní 0,071 mmol) a zbytek uložen pro další účely. Následně byl připojen zbytek sekvence a výsledné množství bylo rozděleno na dvě části. 47 mg bylo uskladněno a zbylých 232 mg bylo zpracováno na finální produkt.

Koncová Fmoc skupina byla odstraněna 20% roztokem piperidinu v DMF a N-konec acetylován acetanhydridem. Následovalo značení Cf na lysinu 17. Mtt, chránící skupina na ε-aminoskupině, byla odstraněna působením 2% roztoku TFA v dichlormethanu. Následovala neutralizace a poté coupling Cf, který proběhl stejně jako coupling AMK, přes aktivní ester a s třemi ekvivalenty. Kvůli schopnosti Cf vázat se vícenásobně, bylo třeba přebytečný Cf odstranit. K tomu se běžně používá 20% roztok piperidinu, ale kvůli časové úspoře byl použit roztok 2 % DBU + 2 % piperidinu v DMF.

Peptid byl odštěpen od pryskyřice a zároveň zbaven zbylých chránících skupin směsí TFA, scavengeru TIS a vody. Peptid byl z roztoku vysrážen přidáním studeného diethyletheru a oddělen centrifugací. Zbytkové rozpouštědlo bylo odstraněno lyofilizací a takto získaný peptid byl analyzován HPLC (záznamy jsou dostupné v příloze, viz přílohy 3–6). HPLC analýza odhalila podstatné množství produktu s vícenásobným značením Cf, což znamená, že použité činidlo nebylo dostatečně účinné na kompletní odstranění vícenásobného Cf značení. Frakce obsahující peptid značený jedním ekvivalentem Cf byla izolována na preparativní HPLC a zbavena rozpouštědel. Identita připravených peptidů byla potvrzena pomocí MS (viz Příloha 7 a Příloha 8). Finální množství získaného peptidu je 80 mg pro P1 a 185 mg pro P2. Rozdíl ve výtěžcích je způsoben ztrátou části materiálu během manipulace a nesouvisí s použitými postupy.

5.2. Biologická aktivita malých molekul

5.2.1. Výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity

Výsledky měření MIC jsou uvedeny v tabulce, nejnižší hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Označení	MIC [μg.ml^{-1}]									
	INH	A6	A5	A4	A3	A2	B0	B6	B5	B4	B3	B2
M. aurum	3,91	31,25	62,5	62,5	125	125	3,9	**3,13**	6,25	3,91	3,91	3,91
M. avium	1000	62,5	125	125	250	250	**3,9**	**3,91**	7,81	**3,91**	**3,91**	**3,91**
M. kansasii	6,25	15,63	62,5	62,5	125	125	**1,6**	**1,56**	3,13	**1,56**	**1,56**	**1,56**
Mtb.	0,25	125	250	125	>500	>50	**1,6**	**1,56**	**1,56**	3,13	3,13	3,13

5.2.2. Výsledky hodnocení antimykotické aktivity

Výsledky měření MIC jsou uvedené v tabulce, nejnižší hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Označení		MIC [μmol.l^{-1}]									
		FLU	A6	A5	A4	A3	A2	B0	B6	B5	B4	B3	B2
C. albicans	24 h	3,3	>125	>125	>125	>125	500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	ND	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
C. krusei	24 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	ND	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
C. parapsilosis	24 h	6,5	>125	>125	>125	>125	500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	ND	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
C. tropicalis	24 h	13,1	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	ND	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
A. fumigatus	24 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
A. flavus	24 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
A. corymbifera	24 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
	48 h	>104,2	>125	>125	>125	>125	>500	-	>500	>500	>500	>125	>125
T. interdigitale	24 h	52,2	>125	>125	>125	>125	250	-	**31,25**	125	62,5	62,5	62,5
	48 h	52,2	>125	>125	>125	>125	500	-	**31,25**	125	62,5	62,5	62,5

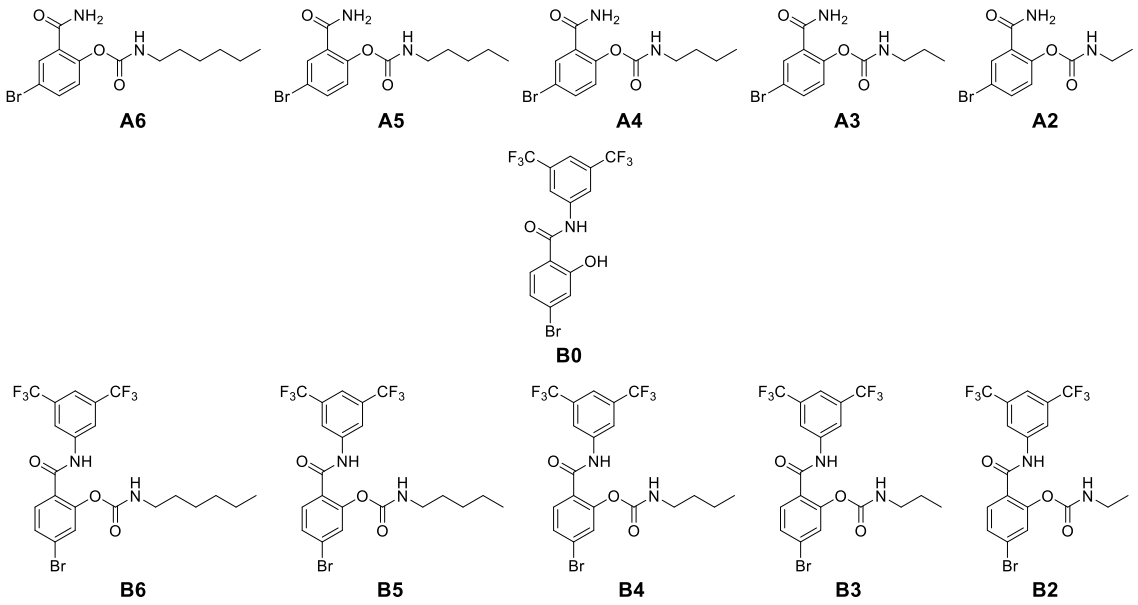
5.2.3. Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity

Výsledky měření MIC jsou uvedeny v tabulce, nejnižší hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Označení		MIC [μmol.l^{-1}]									
		PIP	A6	A5	A4	A3	A2	B0	B6	B5	B4	B3	B2
S. aureus	24 h	3,7	>500	>500	>500	>125	>500	-	**0,98**	3,9	**0,98**	3,9	**0,98**
	48 h	3,7	>500	>500	>500	>125	>500	-	3,9	7,81	**1,95**	3,9	**1,95**
MRSA	24 h	29,6	>500	>500	>500	>125	>500	-	0,98	1,95	**0,061**	**0,061**	0,244
	48 h	29,6	>500	>500	>500	>125	>500	-	1,95	7,81	0,122	**0,061**	0,244
S. epidermidis	24 h	0,23	>500	>500	>500	>125	>500	-	0,24	0,98	**0,002**	**0,002**	0,061
	48 h	0,23	>500	>500	>500	>125	>500	-	0,49	7,81	0,004	**0,002**	0,122
E. faecalis	24 h	3,7	>500	>500	>500	>125	>500	-	15,62	15,62	3,9	**1,95**	3,9
	48 h	3,7	>500	>500	>500	>125	>500	-	62,5	125	7,81	**3,9**	15,62
E. coli	24 h	7,41	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	7,41	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
K. pneumoniae	24 h	>59,31	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>59,31	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
A. baumannii	24 h	59,31	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	59,31	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
P. aeruginosa	24 h	29,66	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	29,66	>500	>500	>500	>125	>500	-	>500	>500	>500	>500	>500

5.3. Diskuse

Aktivita připravených sloučenin byla *in vitro* testována na 8 bakteriálních, 4 mykobakteriálních a 8 houbových kulturách.



Obrázek 22: Struktury a označení připravených látek.

Struktury látek s použitým označením jsou uvedeny výše (Obrázek 22). U látek ze série A (karbamáty 5-bromsalicylamidu) nebyla pozorována žádná významná antibakteriální ani antifungální aktivita. U mykobakterií byla zaznamenána mírná aktivita (nejnižší MIC 15,625 μg.ml^{-1}) u látek s delším alifatickým řetězcem (zejména A6 a A5). Nejvyšší citlivost vykazovalo *M. kansasii*, naopak *Mtb.* bylo nejodolnější (MIC ≥125 μg.ml^{-1})

U látek ze série B (salicylanilid B0 a jeho karbamáty) byla pozorována významná aktivita na mykobakterie, některé (G+) bakterie a jednoho zástupce hub.

U mykobakterií byly naměřené hodnoty MIC v rozmezí 1,56–7,81 μg.ml^{-1} pro všechny testované látky ze série B u všech kmenů. Aktivita látek se vzájemně lišila pouze minimálně, a to včetně látky B0 bez karbamátové skupiny. Nejlepší hodnoty MIC byly naměřeny u látky B0 (bez karbamátové skupiny) a B6 (hexylkarbamát). Naopak nejvyšší hodnoty MIC jsme zjistili u látky B5, ačkoli i ta vykazovala relativně nízké hodnoty (≤7,81 μg.ml^{-1}). Nejvyšší citlivost na tyto látky byla pozorována u *M. kansasii* a *Mtb*.

V porovnání s INH, který byl použit jako standard pro antimykobakteriální aktivitu, prokázaly nově připravené látky série B srovnatelný efekt na *M. aurum* a *M. kansasii*. Na testovaný kmen *Mtb* měly připravené látky s nejvyšší aktivitou oproti INH MIC o jeden

řád vyšší (0,25 proti 1,56 μg.ml^{-1}). Na *M. avium* nebyl INH účinný, ale u látek ze série B byla objevena aktivita a dosahovaly MIC v rozmezí 3,91–7,81 μg.ml^{-1}. Zároveň i u látky A6 byla naměřena slabá aktivita na *M. avium* (62,5 μg.ml^{-1}).

Z hub prokázal citlivost pouze dermatofyt *T. interdigitale*. Aktivní byly pouze karbamáty salicylanilidu (série B, MIC 31,25–125 μmol.l^{-1}). Z nich byla nejvyšší aktivita u sloučeniny B6, která je zároveň ze všech testovaných látek nejlipofilnější. Zdá se tedy, že účinnost na *T. interdigitale* alespoň částečně závisí na lipofilitě molekuly. Pouze látka B6 vykazovala MIC nižší než použitý standard, flukonazol (FLU). Ostatní látky série B měly změřenou aktivitu srovnatelnou. Látka B0 nebyla testována kvůli špatné rozpustnosti v testovacím médiu.

U bakterií byla zaznamenána aktivita látek ze série B zejména vůči G+ bakteriím. Vysoká citlivost byla pozorována u stafylokoků. Naopak G- bakterie byly zcela rezistentní.

U *S. epidermidis* byla MIC pro látky B3 a B4 v řádu jednotek nmol.l^{-1} (2 nmol.l^{-1} při kultivaci na 24 h). Tyto dvě látky a látka B2 dosáhly při hodnocení efektu vyššího, než použitá referenční látka, piperacilin (PIP).

B3 a B4 byly zároveň nejúčinnější i na MRSA, zde však už byla aktivita nižší. Látky série B překvapivě dosahovaly nižších hodnot MIC u MRSA než u citlivého kmene *S. aureus*. Všechny testované látky série B byly na MRSA podstatně účinnější než PIP. MIC nejúčinnějších látek byla oproti PIP téměř 500× nižší.

U *S. aureus* kolísala aktivita s délkou uhlíkatého řetězce. U látek s alkylem se sudým počtem uhlíků byla MIC asi 4× nižší než u látek s alkylem s lichým počtem uhlíků. Látky se sudým počtem uhlíků v alifatické části dosahovaly v porovnání s PIP nižších MIC, zatímco ostatní látky měly efekt podobný PIP.

Na *E. faecalis* byla nejúčinnější látka B3 s MIC v řádu jednotek μmol.l^{-1}. Tato látka měla MIC nižší než standard PIP a ostatní látky měly MIC srovnatelné nebo vyšší. Látka B0 nebyla testována kvůli špatné rozpustnosti. Látky série A neměly žádnou pozorovatelnou aktivitu.

Biologické hodnocení připravených peptidů momentálně probíhá a výsledky zatím nejsou dostupné. U připravených peptidů bude hodnocena cytotoxicita, schopnost internalizace a intracelulární lokalizace. Pokud dosáhnou slibných výsledků budou s vhodným

nízkomolekulárním léčivem připraveny PDC, které budou dále testovány. Primárně se jedná o hodnocení účinku na intracelulární patogeny a testování cytotoxicity.

6. Závěr

Celkem bylo připraveno a popsáno 10 nových derivátů salicylamidu obsahujících karbamátovou skupinu. Zároveň byla připravena látka B0, sloužící jako prekurzor látek ze série B, která již byla popsána a publikována.[42]

Látky byly rozděleny do dvou sérií. Série A obsahovala nesubstituovanou amidovou skupinu a brom na aromatickém jádře v poloze 5 salicylamidu. Série B měla amidovou skupinu substituovanou 3,5-bis(trifluoromethyl)fenylem a brom na aromatickém jádře v poloze 4 salicylamidu. Obě série obsahovaly pět *N*-monosubstituovaných karbamátů s nerozvětveným alkylem o délce 2–6 uhlíků.

Tyto látky byly navrženy za účelem popsání vlivu karbamátové skupiny s nerozvětveným alkylem na aktivitu proti vybraným patogenům, rozšíření knihovny popsaných antimikrobní působících salicylamidů a zhodnocení účinku 3,5-bis(trifluor-methyl)fenylové substituce na amidu, která v předchozích studiích prokázala slibnou aktivitu. Všechny sloučeniny byly připraveny v dostatečném množství a každá látka byla charakterizována pomocí spektrálních metod (NMR, IR), teploty tání, elementární analýzy a následně byla pomocí *in vitro* testů zhodnocena jejich aktivita proti mykobakteriím, bakteriím a patogenním houbám.

Připravené látky ze série B prokázaly dobrou aktivitu vůči mykobakteriím a také velmi dobrou účinnost na G+ bakterie. Nejvyšší účinnosti dosáhly látky B4 a B3 s MIC 2 nmol/l pro *S. epidermidis*. Z testovaných zástupců patogenních hub projevil citlivost *T. interdigitale*, na který působily nejlépe lipofilnější zástupci série B, zejména B6. Prokázali jsme, že přítomnost substituované anilidové skupiny podstatným způsobem zvyšuje antimikrobní aktivitu, kdy je nezbytná pro antifungální a antibakteriální aktivitu a podstatně zvyšuje účinnost vůči mykobakteriím.

Mechanismus účinku těchto nově popsaných látek bude dále zkoumán a za účelem optimalizace účinku budou připraveny další deriváty salicylamidových karbamátů. U vhodných derivátů budou po zhodnocení cytotoxicity zároveň připraveny konjugáty s peptidovými nosiči.

Zároveň byly připraveny i dvě peptidové sekvence, každá o délce 26 AMK, kombinující předchozí úspěšné PN, gD a tuftsin. Nově připravené peptidy budou dále testovány v rámci využití peptidových nosičů pro léčbu tuberkulózy. Zejména se jedná o hodnocení schopnosti internalizace a vliv na membrány eukaryotických buněk. V závislosti na

výsledcích budou připraveny PDC s vhodnou malou molekulou a provedena další sada testování.

7. Přílohy

	code	amino acid	M / g/mol	m / mg	coupling	washing 5xDMF	Ninhydrin test	re-coupling (if necessary)	date	cleavage	washing 5xDMF	Ninhydrin test
Initial pentapeptide	R	Fmoc-Arg(Pbf)	648,8	332,8	11:15-12:52	✓	-	N	28.6.2022	✓	✓	+
	P	Fmoc-Pro	337,4	173,1	10:43-11:43	✓	-	N	30.6.2022	✓	✓	+
	P	Fmoc-Pro	337,4	173,1	12:52-14:10	✓	-	N	1.7.2022	✓	✓	+
	K	Fmoc-Lys(Boc)	468,6	240,4	9:36-10:37	✓	-	N	4.7.2022	✓	✓	+
	T	Fmoc-Thr(tBu)	397,5	203,9	9:58-10:58	✓	-	N	11.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	10:33-11:33	✓	+	Y (13:23-14:23)	15.7.2022	✓ +5	✓	Blue liquid, grey particles
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	11:17-12:29	✓	-	N	20.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	13:53-14:56	✓	-	N	20.7.2022	✓	✓	+
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	10:32-11:35	✓	-	N	21.7.2022	✓	✓	+
	K(Mtt)	Fmoc-Lys(Mtt)	624,8	137,5	11:39-12:42	✓	+	Y (13:12-14:20) (DCM wash)	22.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	9:19-10:42	✓	Grey	Y (11:19-11:39)	25.7.2022	✓	✓	+
	H	Fmoc-His(Trt)	619,7	136,3	13:26-16:44	✓	-	N (DCM wash)	25.7.2022	✓ +5	✓	+
	F	Fmoc-Phe	387,4	85,2	9:46-12:24	✓	-	N	26.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	13:29-14:57	✓	-	N (DCM wash)	26.7.2022	✓ +5	✓	+
	A	Fmoc-Ala	311,3	68,5	9:49-11:20	✓	-	N	27.7.2022	✓	✓	+
	I	Fmoc-Ile	353,4	77,7	12:16-13:30	✓	-	N	27.7.2022	✓	✓	+
	R	Fmoc-Arg(Pbf)	648,8	332,8	14:42-17:29	✓	Blue tint	N (DCM wash)	27.7.2022			
	Acetylation 20 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8), washing								28.7.2022	✓ +10	✓	Brown
	L	Fmoc-Leu	353,4	77,7	10:39-12:44	✓	-	N	28.7.2022	✓ +5	✓	+
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	14:00-15:21	✓	-	N (DCM wash)	28.7.2022	✓ +5	✓	+
	Y	Fmoc-Tyr(tBu)	459,5	101,1	10:32-13:05	✓	-	N	1.8.2022	✓ +10	✓	+
	V	Fmoc-Val	339,4	74,7	14:23-15:16	✓	-	N (DCM wash)	1.8.2022	✓ +10	✓	+
	A	Fmoc-Ala	311,3	68,5	9:39-12:02	✓	-	N	2.8.2022	✓	✓	+
	V	Fmoc-Val	339,4	74,7	13:12-14:46	✓	-	N (DCM wash)	2.8.2022	✓ +10	✓	+
	T	Fmoc-Thr(tBu)	397,5	87,5	9:35-11:27	✓	-	N	3.8.2022	✓ +5	✓	+
	R	Fmoc-Arg(Pbf)	648,8	142,7	12:40-14:17	✓	+	Y (14:38-16:25 8:53-11:10 DCM wash)	3.+4.8.2022			
	Acetylation 30 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8), washing								4.8.2022	✓ +5	✓	Brown
	Q	Fmoc-Gln(Trt)	610,7	134,4	13:31-15:12	✓	+	Y (15:20-17:10 DCM wash)	4.8.2022			
23 mg	Fmoc cleavage (20% piperidine)								5.8.2022			
	Acetylation 20 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8)								8.8.2022			

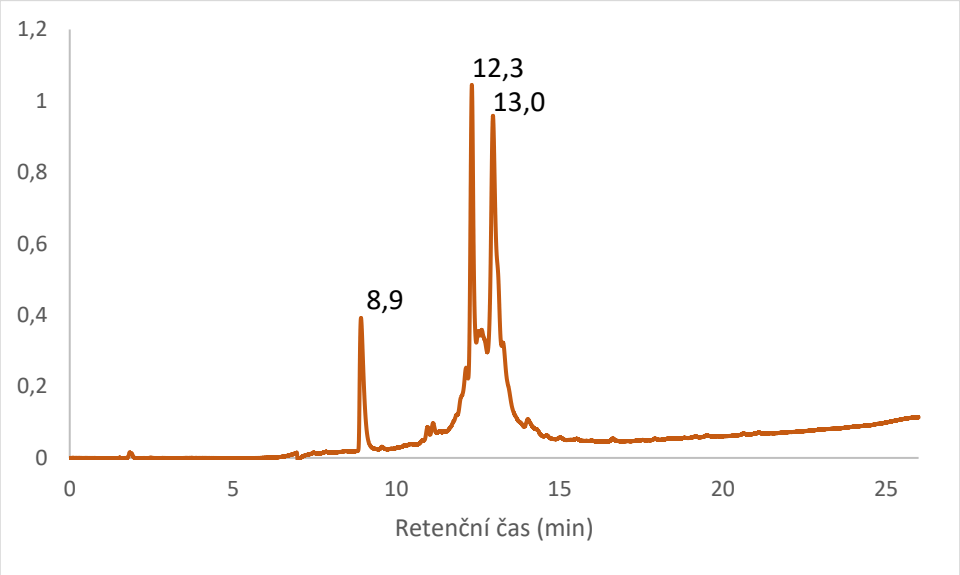
Mtt cleavage (2% TFA)	8.8.2022
Neutralization (10% DIEA)	8.8.2022
Carboxyfluorescein coupling (3,7mg Cf, 3mg HOBt, 3,1mg DIC)	9.8.2022
Extra Cf removal (2% DBU, 2% piperidin)	9.8.2022
Cleavage from resin (TFA:TIS:water 38:1:1)	10.8.2022
Filtering, precipitation (diethyl ether), centrifuging	10.8.2022
Analysis and purification (HPLC, MS)	10.8.2022

Příloha 1: Deník s detailním záznamem přípravy sekvence P1.

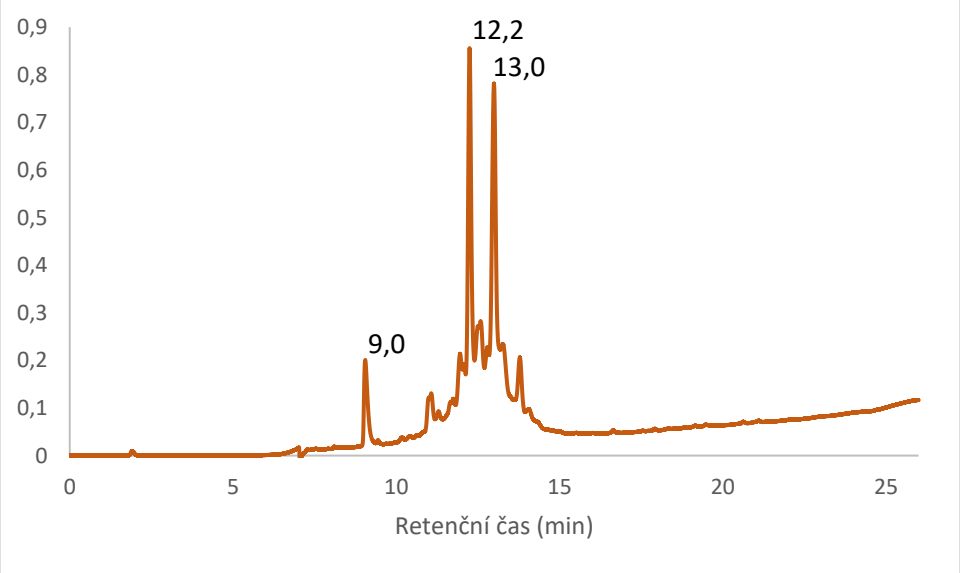
	code	amino acid	M / g/mol	m / mg	coupling	washing 5xDMF	Ninhydrin test	re-coupling (if necessary)	date	cleavage	washing	Ninhydrin test
Initial pentapeptide	G	Fmoc-Gly	297,3	240	10:28-13:12	✓	-	N	16.6.2022	+10 min	✓	+
	K	Fmoc-Lys(Boc)	468,6	378	14:37-15:37	✓	-	N	17.6.2022	✓ +5 min	✓	+
	P	Fmoc-Pro	337,4	286	9:06-10:06	✓	-	N	17.6.2022	✓	✓	+
	K	Fmoc-Lys(Boc)	468,6	378	10:57-11:57	✓	-	N	17.6.2022	✓	✓	+
	T	Fmoc-Thr(tBu)	397,5	320	13:05-14:05	✓	-	N	17.6.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	10:33-11:33	✓	+	Y (13:27-14:27)	15.7.2022	✓	✓	+
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	11:17-12:29	✓	-	N	20.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	13:53-14:56	✓	-	N	20.7.2022	✓	✓	+
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	10:32-11:35	✓	-	N	21.7.2022	✓	✓	+
	K(Mtt)	Fmoc-Lys(Mtt)	624,8	137,5	11:39-12:42	✓	-	N (DCM wash)	22.7.2022			
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	9:19-10:42	✓	Grey	Y (11:19-11:39)	25.7.2022	✓	✓	+
	H	Fmoc-His(Trt)	619,7	136,3	13:26-16:44	✓	-	N (DCM wash)	25.7.2022	✓ +5	✓	+
	F	Fmoc-Phe	387,4	85,2	9:46-12:24	✓	-	N	26.7.2022	✓	✓	+
	G	Fmoc-Gly	297,3	65,4	13:29-14:57	✓	-	N (DCM wash)	26.7.2022	✓ +5	✓	+
	A	Fmoc-Ala	311,3	68,5	9:49-11:20	✓	-	N	27.7.2022	✓	✓	+
	I	Fmoc-Ile	353,4	77,7	12:16-13:30	✓	-	N	27.7.2022	✓	✓	+
	R	Fmoc-Arg(Pbf)	648,8	332,8	14:42-17:29	✓	Blue tint	N (DCM wash)	27.7.2022			
	Acetylation 20 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8), washing								28.7.2022	✓ +10	✓	Brown
	L	Fmoc-Leu	353,4	77,7	10:39-12:44	✓	-	N	28.7.2022	✓	✓	+
	S	Fmoc-Ser(tBu)	383,4	84,3	14:00-15:21	✓	-	N (DCM wash)	28.7.2022			
	Y	Fmoc-Tyr(tBu)	459,5	101,1	10:32-13:05	✓	-	N	1.8.2022	✓ +5	✓	+
	V	Fmoc-Val	339,4	74,7	14:23-15:16	✓	-	N (DCM wash)	1.8.2022	✓ +5	✓	+
	A	Fmoc-Ala	311,3	68,5	9:39-12:02	✓	-	N	2.8.2022	✓ +5	✓	+
	V	Fmoc-Val	339,4	74,7	13:12-14:46	✓	-	N (DCM wash)	2.8.2022	✓ +10	✓	+
	T	Fmoc-Thr(tBu)	397,5	87,5	9:35-11:27	✓	-	N	3.8.2022	✓ +5	✓	+
	R	Fmoc-Arg(Pbf)	648,8	142,7	12:40-14:17	✓	+	Y (14:38-16:25 8:53-11:10 DCM wash)	3.+4.8.2022			
	Acetylation 30 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8), washing								4.8.2022	✓ +5	✓	Brown
	Q	Fmoc-Gln(Trt)	610,7	134,4	13:31-15:12	✓	+	Y (15:20-17:10 DCM wash)	4.8.2022			
47 mg	Fmoc cleavage (20% piperidine)								5.8.2022			
	Acetylation 20 minutes (Acetic anhydride:DIEA:DMF 1:1:8)								8.8.2022			
	Mtt cleavage (2% TFA)								8.8.2022			
	Neutralization (10% DIEA)								8.8.2022			
	Carboxyfluorescein coupling (7,5mg CF, 6mg HOBt, 6,2mg DIC)								9.8.2022			

Extra Cf removal (2% DBU, 2% piperidin)	9.8.2022
Cleavage from resin (TFA:TIS:water 38:1:1)	10.8.2022
Filtering, precipitation (diethyl ether), centrifuging	10.8.2022
Analysis and purification (HPLC, MS)	10.8.2022

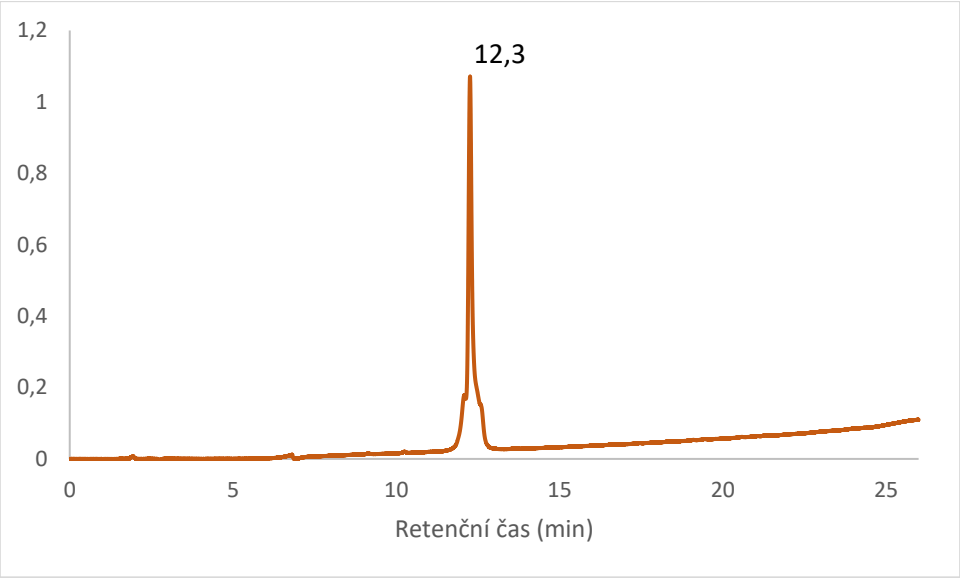
Příloha 2: Deník s detailním záznamem přípravy sekvence P2.



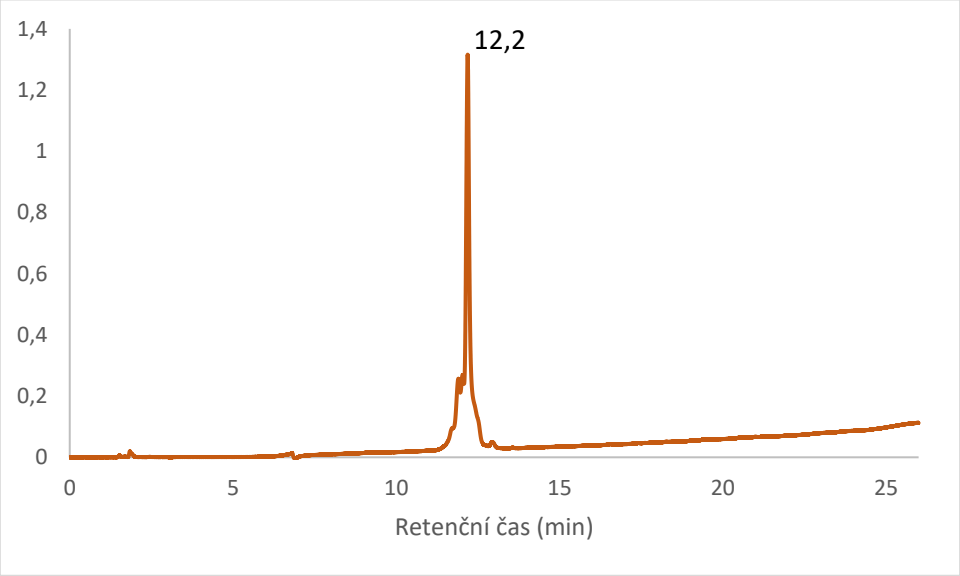
Příloha 3: Záznam z analýzy nepřečištěného peptidu P1 na analytickém HPLC. Frakce na 12,3 byla identifikována jako požadovaný produkt a izolována pomocí semipreparativní HPLC.



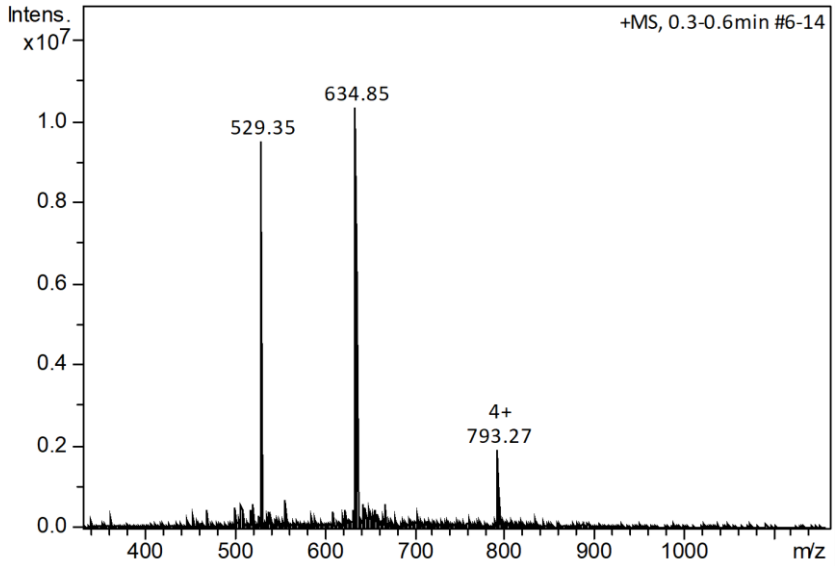
Příloha 4: Záznam z analýzy nepřečištěného peptidu P2 na analytickém HPLC. Frakce na 12,2 byla identifikována jako požadovaný produkt a izolována pomocí semipreparativní HPLC.



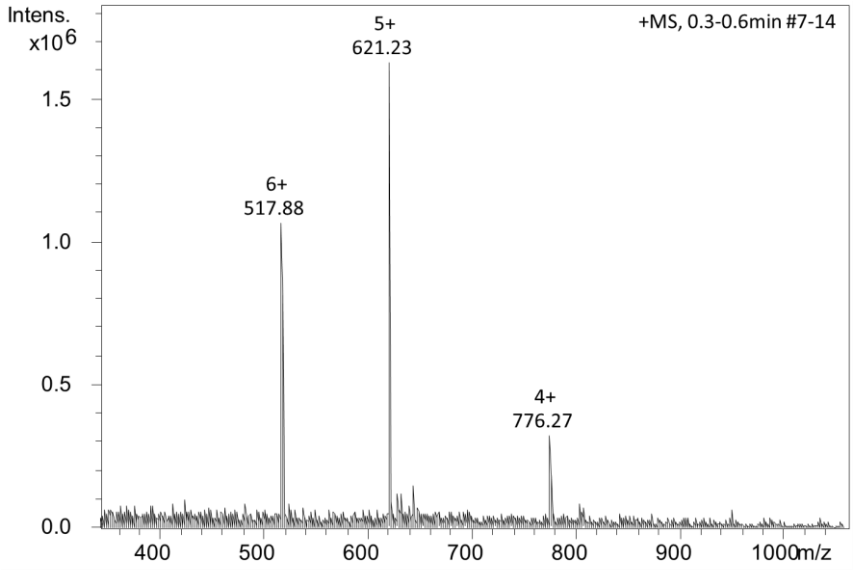
Příloha 5: Záznam z analytické HPLC z analýzy peptidu P1 přečištěného na semipreparativní HPLC.



Příloha 6: Záznam z analytické HPLC z analýzy peptidu P2 přečištěného na semipreparativní HPLC.



Příloha 7: MS záznam pořízený při analýze peptidu P1 za účelem ověření identity. Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej v kladném módu.



Příloha 8: MS záznam pořízený při analýze peptidu P2 za účelem ověření identity. Jako iontový zdroj sloužil elektrosprej v kladném módu.

8. Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma stavby PDC. 12
Obrázek 2: Příklad struktury dendrimeru. 17
Obrázek 3: Struktura PDC připraveného Brezden et al.[20] Pomocí disulfidového linkeru došlo ke spojení kanamycinu s peptidem P14LRR. 21
Obrázek 4: Struktura PDC s triazolovým linkerem využívající β-laktamové antibiotikum k zaměření rezistentních bakterií.[29] 23
Obrázek 5: Struktura salicinu a kyseliny acetylsalicylové. 24
Obrázek 6: Možné modifikace salicylamidové struktury, kterými se tato práce zabývá. 25
Obrázek 7: Struktura niklosamidu (vlevo), rafoxanidu (uprostřed) a nitazoxanidu (vpravo), anthelmintik s řadou dalších biologických aktivit. 26
Obrázek 8: Příklady struktur aktivních proti mykobakteriím připravené Paraskevopoulos et al. (vlevo)[42] a Férriz et al. (vpravo).[41] 29
Obrázek 9: Příklady salicylamidových derivátů, připravených Krátký et al.,[44] s dobrým účinkem na testované G+ bakterie. 29
Obrázek 10: Struktury vybraných derivátů salicylamidu s antimykotickým působením. Struktura dibromsalanu (vlevo) a dihalogenovaných látek připravených Krátkým et al.[45] 30
Obrázek 11: Příklad látky připravené pomocí popsaného přesmyku s antineoplastickými účinky.[47] 31
Obrázek 12: Struktury s protinádorovou aktivitou popsané Galal et al.[49] (vpravo) a Othman et al.[50] (vlevo). Tyto struktury kombinují salicylamidovou strukturu s dalším účinným motivem. . 31
Obrázek 13: Struktura konjugátu doxorubicinu s antineoplastickým působením připraveného Cogan a Koch.[53] Modře zvýrazněn salicylamidový linker. 32
Obrázek 14: Příklady inhibitorů cholinesteráz obsahujících karbamátovou skupinu nebo ester kyseliny thiofosforečné.[54–56] 33
Obrázek 15: Struktury látek připravených Song et al.[57,58] s multimodálním účinkem na Alzheimerovu chorobu. 33
Obrázek 16: Struktury látek působících na CNS obsahující strukturu salicylamidu. Látka připravená Żmudzka et al.[59] (vlevo) a rakloprid (vpravo) 34
Obrázek 17: Struktury inhibitorů aktivity osteoklastů. Nahoře přírodní látky: salicylát sodný a paeonol. Dole syntetické deriváty salicylanilidu s vysokou účinností.[63,64] 35
Obrázek 18: Molekuly α a β antagonistů obsahujících salicylamidovou část. 35
Obrázek 19: Struktury publikovaných inhibitorů cholinesteráz, u kterých byla zjištěna antimikrobní aktivita.[66] 36
Obrázek 20: Číslování atomů použité při popisu NMR spekter. 39
Obrázek 21: Struktura peptidu (s lidskou verzí tuftsinu) s uvedenou polohou 5-Cf značení. 61
Obrázek 22: Struktury a označení připravených látek. 70

9. Seznam tabulek

Tabulka 1: Příklady struktur často používaných linkerů..... 14
Tabulka 2: Antivirotická aktivita nitazoxanidu na vybrané virové kmeny[39]. 27
Tabulka 3: Srovnání výtěžků připravených karbamátů. 63
Tabulka 4: Aminokyselinová sekvence připravených peptidů. Žlutě označena část pocházející z gD HSV-1 a zeleně označena část obsahující sekvenci tuftsinu. Červeně zvýrazněný lysin 17 představuje místo značení Cf. 64

10. Zdroje

1. Wang, Y. *et al.* Peptide–Drug Conjugates as Effective Prodrug Strategies for Targeted Delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **110–111**, 112 (2017).

2. Rohira, H., Arora, A., Kaur, P. & Chugh, A. Peptide cargo administration: current state and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology 2023 107:10* **107**, 3153–3181 (2023).

3. Bumbaca, B., Li, Z. & Shah, D. K. Pharmacokinetics of protein and peptide conjugates. *Drug Metab Pharmacokinet* **34**, 42–54 (2019).

4. Gong, L. *et al.* Research advances in peptide–drug conjugates. *Acta Pharm Sin B* **13**, 3659–3677 (2023).

5. Fu, C. *et al.* Peptide–drug conjugates (PDCs): a novel trend of research and development on targeted therapy, hype or hope? *Acta Pharm Sin B* **13**, 498 (2023).

6. Tao, W. & He, Z. ROS-responsive drug delivery systems for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci* **13**, 101 (2018).

7. Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **8**, 1128–1137 (2003).

8. Ferreira, S. Z. *et al.* Synthesis of a New Peptide–Coumarin Conjugate: A Potential Agent against Cryptococcosis. *ACS Med Chem Lett* **6**, 271 (2015).

9. Kristensen, M., Birch, D. & Nielsen, H. M. Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).

10. Wang, J., Wu, D. & Shen, W. C. Structure-activity relationship of reversibly lipidized peptides: Studies of fatty acid-desmopressin conjugates. *Pharm Res* **19**, 609–614 (2002).

11. Schafmeister, C. E., Po, J. & Verdine, G. L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides [8]. *J Am Chem Soc* **122**, 5891–5892 (2000).

12. Klein, M. A. Stabilized Helical Peptides: A Strategy to Target Protein–Protein Interactions. *ACS Med Chem Lett* **5**, 838 (2014).

13. Falciani, C. *et al.* Design and In vitro Evaluation of Branched Peptide Conjugates: Turning Nonspecific Cytotoxic Drugs into Tumor-Selective Agents. *ChemMedChem* **5**, 567–574 (2010).

14. Vrettos, E. I., Mező, G. & Tzakos, A. G. On the design principles of peptide–drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **14**, 930 (2018).

15. Sebák, F. *et al.* Novel Lysine-Rich Delivery Peptides of Plant Origin ERD and Human S100: The Effect of Carboxyfluorescein Conjugation, Influence of Aromatic and Proline Residues, Cellular Internalization, and Penetration Ability. *ACS Omega* **6**, 34470–34484 (2021).

16. Hyun, S. *et al.* Oligomer Formation Propensities of Dimeric Bundle Peptides Correlate with Cell Penetration Abilities. *ACS Cent Sci* **4**, 885–893 (2018).

17. Vadevoo, S. M. P. *et al.* Peptides as multifunctional players in cancer therapy. *Experimental & Molecular Medicine 2023 55:6* **55**, 1099–1109 (2023).

18. Jerath, G., Goyal, R., Trivedi, V., Santhoshkumar, T. R. & Ramakrishnan, V. Syndiotactic peptides for targeted delivery. *Acta Biomater* **87**, 130–139 (2019).

19. Ruseska, I. & Zimmer, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein Journal of Nanotechnology 11:10* **11**, 101–123 (2020).

20. Brezden, A. *et al.* Dual Targeting of Intracellular Pathogenic Bacteria with a Cleavable Conjugate of Kanamycin and an Antibacterial Cell-Penetrating Peptide. *J Am Chem Soc* **138**, 10945–10949 (2016).

21. Horváti, K., Mezö, G., Szabó, N., Hudecz, F. & Bösze, S. Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid - Design, synthesis and antimycobacterial effect. *Journal of Peptide Science* **15**, 385–391 (2009).

22. Baranyai, Z. *et al.* In vitro biological evaluation of new antimycobacterial salicylanilide-tuftsin conjugates. *Eur J Med Chem* **133**, 152–173 (2017).

23. Borbála Horváth, L. *et al.* Host cell targeting of novel antimycobacterial 4-aminosalicylic acid derivatives with tuftsin carrier peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **174**, 111–130 (2022).

24. Zhao, M. *et al.* Engineered phage with cell-penetrating peptides for intracellular bacterial infections. *mSystems* **8**, (2023).

25. Diez-Torrubia, A. *et al.* Novel water-soluble prodrugs of acyclovir cleavable by the dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV/CD26) enzyme. *Eur J Med Chem* **70**, 456–468 (2013).

26. Insua, I. *et al.* Structural Determinants of the Stability of Enzyme-Responsive Polyion Complex Nanoparticles Targeting Pseudomonas aeruginosa's Elastase. *ChemNanoMat* **4**, 807–814 (2018).

27. Zuo, Y. M. *et al.* Enzyme-Responsive Ag Nanoparticle Assemblies in Targeting Antibacterial against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *ACS Appl Mater Interfaces* **12**, 4333–4342 (2020).

28. Qi, G.-B. *et al.* An "On-Site Transformation" Strategy for Treatment of Bacterial Infection. *Advanced Materials* **29**, 1703461 (2017).

29. Desgranges, S. *et al.* β-Lactam-host defence peptide conjugates as antibiotic prodrug candidates targeting resistant bacteria. *RSC Adv* **2**, 2480–2492 (2012).

30. BASARABA, R. J. & OJHA, A. K. Mycobacterial Biofilms: Revisiting Tuberculosis Bacilli in Extracellular Necrotizing Lesions. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).

31. Sharma, D., Misba, L. & Khan, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control* **8**, (2019).

32. Han, H. *et al.* Biofilm microenvironment activated supramolecular nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bacterial keratitis. *Journal of Controlled Release* **327**, 676–687 (2020).

33. Desborough, M. J. R. & Keeling, D. M. The aspirin story – from willow to wonder drug. *Br J Haematol* **177**, 674–683 (2017).

34. Borges, R. S. & Castle, S. L. The antioxidant properties of salicylate derivatives: A possible new mechanism of anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 4808–4811 (2015).

35. Alhashimi, M., Mayhoub, A. & Seleem, M. N. Repurposing salicylamide for combating multidrug-resistant neisseria gonorrhoeae. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, (2019).

36. Biersack, B. The Antifungal Potential of Niclosamide and Structurally Related Salicylanilides. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 5977* **25**, 5977 (2024).

37. Chen, W., Mook, R. A., Premont, R. T. & Wang, J. Niclosamide: Beyond an antihelminthic drug. *Cell Signal* **41**, 89 (2018).

38. Ienascu, I. M. C., Lupea, A. X., Hadaruga, D., Hadaruga, N. & Popescu, I. M. The antimicrobial acitvity and quantitative structure - Biological activity relationships evaluation of some novel 2-hydroxybenzamide derivatives. *Revista de Chimie* **59**, 247–250 (2008).

39. Xu, J. *et al.* Therapeutic potential of salicylamide derivatives for combating viral infections. *Med Res Rev* **43**, 897–931 (2023).

40. Nepali, K., Lee, H. Y. & Liou, J. P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J Med Chem* **62**, 2851–2893 (2019).

41. Férriz, J. M. *et al.* Salicylanilide carbamates: antitubercular agents active against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains. *Bioorg Med Chem* **18**, 1054–1061 (2010).

42. Paraskevopoulos, G. *et al.* Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem* **25**, 1524–1532 (2017).

43. Gonec, T. *et al.* Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 1-[(2-Substituted phenyl)carbamoyl]naphthalen-2-yl Carbamates. *Molecules* **21**, (2016).

44. Krátký, M. & Vinšová, J. Salicylanilide N-monosubstituted carbamates: Synthesis and in vitro antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem* **24**, 1322–1330 (2016).

45. Krátký, M. & Vinšová, J. Salicylanilide N-monosubstituted carbamates: Synthesis and in vitro antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem* **24**, 1322–1330 (2016).

46. Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.

47. Imramovský, A., Férriz, J. M., Pauk, K., Krátký, M. & Vinšová, J. Synthetic route for the preparation of 2-Hydroxy- N -[1-(2- hydroxyphenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamides. *J Comb Chem* **12**, 414–416 (2010).

48. Imramovský, A. *et al.* Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Lett* **47**, 5007–5011 (2006).

49. Galal, A. M. F., DiaaAtta, Abouelsayed, A., Ibrahim, M. A. & Hanna, A. G. Configuration and molecular structure of 5-chloro-N-(4-sulfamoylbenzyl) salicylamide derivatives. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **214**, 476–486 (2019).

50. Othman, S. A. *et al.* The design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of new 5-aminosalicylamide-4-thiazolinone hybrids as anticancer agents. *Arch Pharm (Weinheim)* **356**, 2300315 (2023).

51. Laudisi, F., Marônek, M., Di Grazia, A., Monteleone, G. & Stolfi, C. Repositioning of Anthelmintic Drugs for the Treatment of Cancers of the Digestive System. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 4957* **21**, 4957 (2020).

52. Galal, A. M. F., Soltan, M. M., Ahmed, E. R. & Hanna, A. G. Synthesis and biological evaluation of novel 5-chloro-N-(4-sulfamoylbenzyl) salicylamide derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Medchemcomm* **9**, 1511–1528 (2018).

53. Cogan, P. S. & Koch, T. H. Rational Design and Synthesis of Androgen Receptor-Targeted Nonsteroidal Anti-Androgen Ligands for the Tumor-Specific Delivery of a Doxorubicin-Formaldehyde Conjugate. *J Med Chem* **46**, 5258–5270 (2003).

54. Krátký, M. *et al.* 2-Hydroxy- N-phenylbenzamides and Their Esters Inhibit Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **9**, (2019).

55. Krátký, M., Štěpánková, Š., Vorčáková, K. & Vinšová, J. Investigation of salicylanilide and 4-chlorophenol-based N-monosubstituted carbamates as potential inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Bioorg Chem* **80**, 668–673 (2018).

56. Vinšová, J. *et al.* Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterase Inhibition. *Molecules* **19**, 7152 (2014).

57. Song, Q. *et al.* Discovery of novel 2,5-dihydroxyterephthalamide derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* **26**, 6115–6127 (2018).

58. Song, Q. *et al.* Novel salicylamide derivatives as potent multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Chem* **84**, 137–149 (2019).

59. Żmudzka, E. *et al.* Novel Multimodal Salicylamide Derivative with Antidepressant-like, Anxiolytic-like, Antipsychotic-like, and Anti-Amnesic Activity in Mice. *Pharmaceuticals (Basel)* **16**, (2023).

60. Tao, H., Zhang, Y., Zeng, X., Shulman, G. I. & Jin, S. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice. *Nat Med* **20**, 1263–1269 (2014).

61. Zhao, Y. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of salicylanilides as novel allosteric inhibitors of human pancreatic lipase. *Bioorg Med Chem* **91**, (2023).

62. Kuziej, J. *et al.* In vivo neutralization of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin by a novel salicylamide derivative. *Clin Appl Thromb Hemost* **16**, 377–386 (2010).

63. Chen, C. L. *et al.* Modified salicylanilide and 3-phenyl-2 H -benzo[e][1,3]oxazine-2,4(3 H)-dione derivatives as novel inhibitors of osteoclast differentiation and bone resorption. *J Med Chem* **57**, 8072–8085 (2014).

64. Lee, C. C. *et al.* Discovery of 5-(2',4'-difluorophenyl)-salicylanilides as new inhibitors of receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis. *Eur J Med Chem* **98**, 115–126 (2015).

65. Ma, Y. *et al.* Repurposing Salicylamides to Combat Phytopathogenic Bacteria and Induce Plant Defense Responses. *Chem Biodivers* **20**, (2023).

66. Krátký, M. *et al.* N-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]-5-bromo-2-hydroxybenzamide Analogues: Novel Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Curr Top Med Chem* **20**, 2094–2105 (2020).

67. Bősze, S. *et al.* Tailoring Uptake Efficacy of HSV-1 gD Derived Carrier Peptides. *Biomolecules* **10**, (2020).

68. Paraskevopoulos, G. *et al.* Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem* **25**, 1524–1532 (2017).

69. Krátký, M. *et al.* Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **159**, 105732 (2021).

70. Kahlmeter, G. *et al.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* **12**, 501–503 (2006).

71. Nawrot, D. E. *et al.* Antimycobacterial pyridine carboxamides: From design to in vivo activity. *Eur J Med Chem* **258**, 115617 (2023).

72. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing__definitive.pdf (Date accessed: 03/07/2024)*.

73. EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. *https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf (Date accessed: 03/07/2024)*.