

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



Syntéza potenciálních inhibitorů cholinesteráz

Bakalářská práce

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

Hradec Králové 2019

Quynh Anh Vu

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat všem lidem, díky kterým mohla tato bakalářská práce vzniknout, a to především mému vedoucímu práce, PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za trpělivé a důkladné vedení mé práce, dále odbornému “supervizorovi” Mgr. Václavu Pflégrovi za jeho cenné praktické rady a paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., z Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice za změření biologické aktivity.

Abstrakt

Tématem bakalářské práce je syntéza nových inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy a jejich potenciální inhibiční efekt vůči oběma enzymům. Všechny připravené molekuly obsahují strukturní motiv propargylaminu, který se vyskytuje v léčivech centrálního nervového systému a jehož deriváty jsou také v současné době zkoumány v léčbě neurodegenerativních chorob včetně Alzheimerovy choroby.

Teoretická část pojednává o Alzheimerově nemoci a její současné léčbě se zaměřením na cholinergní hypotézu a inhibitory cholinesteráz. Experimentální část se pak zabývá přípravou a hodnocením potenciálních inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Bylo připraveno celkem sedmnáct sloučenin (amidů a iminů odvozených převážně z derivátů kyseliny salicylové a kyseliny skořicové) v dostatečném výtěžku. Všechny byly zkoumány vůči cholinesterázám pomocí Ellmanovy metody. 5-Brom-*N*-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid a *N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamid vykazovaly nejnižší hodnoty IC_{50} pro acetylcholinesterázu (8,05 μ M a 23,16 μ M). Sloučenina 2,4-dibrom-6-[(prop-2-yn-1-yl)karbamoyl]fenyl-(*N*-ethyl-*N*-methyl)karbamát nejlépe inhibovala butyrylcholinesterázu (IC_{50} 26,09 μ M). Některé připravené sloučeniny byly účinnější než standard rivastigmin.

Klíčová slova

Acetylcholinesteráza; Alzheimerova choroba; butyrylcholinesteráza; Ellmanova metoda; enzymová inhibice; inhibitory cholinesteráz; *in vitro* aktivita; kyselina skořicová; propargylamin; salicylamidy

Abstract

This bachelor thesis deals with the synthesis of novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors as potential inhibitors of both cholinesterases. All the prepared molecules contain propargylamine structural motif, i.e., a proved scaffold for drugs targeting central nervous system. Some of its derivatives are currently investigated for the treatment of neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease.

The theoretical part summarizes facts about the Alzheimer's disease and its current treatment focused on cholinergic hypothesis and inhibitors of cholinesterases. The experimental part reports the synthesis and evaluation of potential inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Seventeen compounds were synthesized in satisfactory yields, predominantly amides and imines of salicylic and cinnamic acid derivatives. All of them were investigated for their activities against both cholinesterases using Ellman's method. 5-Bromo-*N*-(prop-2-yn-1-yl)salicylamide and *N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamide showed the lowest IC₅₀ values for acetylcholinesterase (8.05 and 23.16 μM, respectively). 2,4-Dibromo-6-[(prop-2-yn-1-yl)carbonyl]phenyl (*N*-ethyl-*N*-methyl)carbamate showed the best inhibition of butyrylcholinesterase (IC₅₀ = 26.09 μM). Several of the prepared compounds were more active than a clinically used drug rivastigmine.

Keywords

Acetylcholinesterase; Alzheimer's disease; butyrylcholinesterase; cholinesterases inhibitors; cinnamic acid; Ellman's method; enzyme inhibition; *in vitro* activity; propargylamine; salicylamides

1 Obsah

| | |
|---|-----------|
| Abstrakt..... | 4 |
| Klíčová slova | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Keywords | 5 |
| 1 Obsah..... | 6 |
| 2 Seznam symbolů a zkratek..... | 8 |
| 3 Úvod..... | 10 |
| 4 Teoretická část..... | 11 |
| 4.1 Alzheimerova nemoc..... | 11 |
| 4.1.1 Základní charakteristika | 11 |
| 4.1.2 Výskyt v populaci | 11 |
| 4.1.3 Etiologie a patogeneze..... | 12 |
| 4.1.4 Stádia AD | 12 |
| 4.1.5 Léčba | 13 |
| 4.2 Acetylcholin | 14 |
| 4.2.1 Hydrolýza ACh..... | 15 |
| 4.3 Butyrylcholin..... | 16 |
| 4.4 AChE a BuChE | 16 |
| 4.5 MAO..... | 17 |
| 4.6 Používané inhibitory AChE | 18 |
| 4.6.1 Donepezil..... | 18 |
| 4.6.2 Galantamin..... | 19 |
| 4.6.3 Rivastigmin..... | 19 |
| 4.7 Výzkum nových potenciálních ChEI | 20 |
| 5 Cíl práce | 22 |
| 6 Praktická část | 23 |
| 6.1 Chemikálie a přístrojové vybavení..... | 23 |
| 6.2 Jednotlivé syntézy amidů | 25 |
| 6.3 Jednotlivé syntézy iminů (Schiffových bází) | 44 |
| 6.4 Syntéza karbamátu | 47 |
| 7 Biologické hodnocení | 49 |
| 7.1 Ellmanova metoda pro stanovení inhibice cholinesteráz | 49 |
| 7.2 Výsledky měření aktivity sloučenin Ellmanovou metodou | 50 |
| 8 Diskuze | 52 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 9 Závěr..... | 58 |
| 10 Literatura..... | 59 |

2 Seznam symbolů a zkratk

| | |
|------------------|--|
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesteráza |
| AChEI | inhibitory acetylcholinesterázy |
| AD | Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease) |
| AMK | aminokyseliny |
| BuCh | butyrylcholin |
| BuChE | butyrylcholinesteráza |
| CAT | cholinacetyltransferáza |
| CNS | centrální nervový systém |
| CoA | koenzym A |
| DCM | dichlormethan |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DTNB | 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) |
| EDC(HCl) | <i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid (jako hydrochlorid) |
| EtOAc | ethyl-acetát |
| HOBt | 1-hydroxybenzotriazol |
| IC ₅₀ | inhibiční koncentrace, která snižuje aktivitu enzymu na 50 % |
| IC _{hE} | inhibitory cholinesteráz |
| LSC | kapalinová adsorbční chromatografie |
| MAO | monoaminoxidáza |
| MeCN | acetonitril |
| MF | mobilní fáze |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PD | Parkinsonova nemoc (Parkinson's disease) |
| SF | stacionární fáze |
| SI | index selektivity |
| TEA | triethylamin |
| THF | tetrahydrofuran |

TLC

tenkovrstvá chromatografie

3 Úvod

AD (Alzheimerova nemoc) je nejčastějším typem demence objevující se především u starších osob nad 60 let. Nemoc je pojmenovaná po německém psychiatrovi a neuropatologovi Aloisi Alzheimerovi, který roku 1907 jako první popsal příznaky AD. Tehdy byla nazývána jako *dementia praecox*¹. [1] [2]

Jedná se o chronické neurodegenerativní onemocnění mozku vyznačující se postupným úbytkem nervových buněk. Následky jsou ztráta paměti (hlavně krátkodobé), kognitivní (poznávací) dysfunkce a v terminální fázi nastává až úplný úpadek osobnosti. Nemocný člověk není schopen vykonávat normální každodenní aktivity a je zcela odkázán na pomoc druhých. AD je nejen problémem zdravotnickým, ale i sociálním a ekonomickým. [1]

Cílem této bakalářské práce je syntéza různě modifikovaných sloučenin, které by vykazovaly schopnost inhibovat aktivitu enzymů acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE). Design sloučenin je obecně složený ze tří strukturních částí. První část je odvozená od salicylanilidu, jehož deriváty inhibují AChE a BuChE, druhá je odvozená od selegilinu a rasagilinu patřících do skupiny MAO inhibitorů a poslední část je odvozená od rivastigminu, léčiva majícího také inhibiční vliv na AChE a BuChE. Další sloučeniny jsou odvozené od derivátů kyseliny skořicové, které jsou také zkoumány proti AD.

¹ Předčasná demence

4 Teoretická část

4.1 Alzheimerova nemoc

4.1.1 Základní charakteristika

AD je až z padesáti procent primární příčinou demence. [4] Tato chronická a progresivní choroba se vyznačuje degenerativní ztrátou neuronů a klinicky postupným zánikem paměti (hlavně krátkodobé) doprovázeným neschopností nemocného samostatně fungovat a být soběstačný. [5] [11] Dochází i ke vzniku kognitivní dysfunkce, pro niž je typická apraxie (neschopnost provádět běžné účelné činnosti v životě), afázie (ztráta exprese a porozumění řeči), exekutivní dysfunkce (neschopnost realizovat a plánovat) a agnózie (neschopnost pojmenovávat a poznávat předměty). Deficit cholinergní aktivity přispívá k poklesu a poruše soustředěnosti, rychlosti, pozornosti i chování jedince. [11] [12] Uplynutím 6. decennia života se pravděpodobnost AD zvyšuje. Pokud nemoc přichází před 65. rokem, jedná se o autozomálně dominantní dědičnost (familiární typ dědičnosti). [5] Kromě věku hraje významnou roli ve výskytu AD i pohlaví, přičemž ženy mají větší šanci vzniku demence. [9]

4.1.2 Výskyt v populaci

V zemích s vysokými příjmy má pouze 50 % lidí z celkového počtu nemocných demencí, kteří již překročili 65. rok svého života, diagnostikovanou nějakou formu demence. Naopak v zemích s nižší nebo průměrnou ekonomickou úrovní je zjištěno méně než 10 % případů. Lidé žijící s demencí mají špatný přístup ke kvalitní zdravotní péči a mnoho z nich ani z pečujících osob o nemoci neví. K roku 2015 bylo zaznamenáno zhruba 46,8 milionů lidí ve světě trpících demencí a k roku 2050 se tento počet pravděpodobně zvýší až na 131,5 milionů. Vzhledem k tomu, že populace lidí ve světě stárne a lidé se dožívají mnohem vyššího věku než v minulosti, bude se každým rokem množství nemocných zvyšovat. Státy s nejvíce rostoucí dlouhověkostí jsou Čína, Indie, její sousedé z jižní Asie a západní Pacifik. [13] V roce 2014 žilo v České republice necelých 153 000 osob s demencí a z 50-70 % se jednalo o AD. Porovnáním mezinárodního výskytu je diagnostikováno v České republice méně případů demence oproti Evropě. V Evropě trpí AD zhruba 6 milionů pacientů. [9] [12]

4.1.3 Etiologie a patogeneze

Proč AD vzniká, není zcela objasněné. Předpokládá se, že jde zřejmě o multifaktoriální kombinaci více vlivů. Mezi faktory, které zvyšují riziko vzniku AD, patří věk (čím starší je jedinec, tím se riziko zvyšuje), dědičnost, dlouhodobá deprese a stres, úraz mozku, špatná životospráva, toxické látky z externího prostředí. [10] Při histopatologickém pohledu dochází k nadměrné produkci a hromadění extracelulárního proteinu β -amyloidu (senilní plaky) a intracelulárního τ -proteinu (neurofibrilární klubka) v cholinergních neuronech v centrální nervové soustavě (CNS). Přítomnost amyloidózy lze dokázat reakcí s jodem (Lugolův roztok) v prostředí kyseliny sírové, kdy přítomnost amyloidu dokazuje modré zbarvení. [7] [15] V důsledku jejich akumulace dochází k degradaci neuronů (hlavně ve frontálním, temporálním a parietálním laloku) a postižení celého cholinergního systému. Pokud dojde k poškození cholinergních neuronů, naruší se produkce signálních přenašečů (neuromediátorů) neboli neurotransmiterů, a to vede ke zhoršení přenosu signálů mezi jednotlivými nervovými vlákny. [4] [10] Při narušení správné funkce acetylcholinových drah v mozku dochází právě ke vzniku AD a obecně demencí. Mozek osob s AD má také sníženou aktivitu enzymu cholinacetyltransferázy (CAT), který je zodpovědný za syntézu acetylcholinu (ACh), a naopak zvýšenou aktivitu AChE a BuChE. [11]

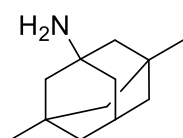
4.1.4 Stádia AD

Existují tři stádia odvozená od progresu a míry závažnosti AD. První stádium je charakterizováno začínající a mírnou demencí. Pacienti jsou ještě stále soběstační a žijí samostatným životem. Sice je zde projev mírné demence, ale při snaze jak ze strany pacienta, tak i pomoci a podpory ze strany rodiny se dá stále žít kvalitní život. Je ale potřeba nemoc včas diagnostikovat a vytvořit příslušná opatření, jak z hlediska medikamentózního, tak i psychologického. Druhé stádium se projevuje již pokročilou demencí. Dochází k prohlubování poruch kognitivních funkcí. Pacienti musejí být více pod dohledem, buď rodinným, nebo profesionální pečovatelské asistence. Těžká demence patří do třetího stádia, kde se zhoršuje progresivní syndrom demence. Pacienti nejsou schopni sami v životě fungovat. Problémy mají s polykáním, hybností, hygienou, porozuměním a tvorbou řeči. Jsou dezorientovaní, zapomínají svoje bydliště a často se dostávají do nebezpečných situací. [1] [5]

4.1.5 Léčba

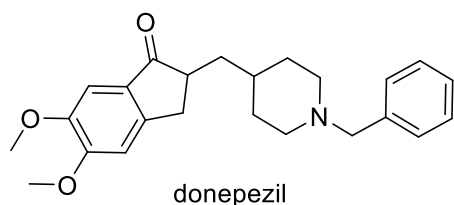
Kromě psychologické podpory a rehabilitace hraje významnou roli v léčbě AD samozřejmě i farmakoterapeutická léčba. Demenci nelze vyléčit, ale lze její příznaky zpomalit a zmírnit. [20]

Pilířem léčby je v současné době je zvýšení cholinergní aktivity pomocí inhibitorů cholinesteráz (IChE), které inhibují AChE, enzym odbourávající ACh v synapsích, čímž se zmnoží počet molekul ACh a dojde tak k symptomatickému zlepšení. Podává se také non-cholinergní léčivo memantin (Obrázek 1), které má vliv na glutamátergí systém. Tento systém hraje významnou roli při excitaci neuronů v CNS. [16] Pro podávání IChE je důležité, aby byl jejich efekt bezpečný, aby měly okamžitý a dlouhodobý účinek a aby byly dobře snášeny pacienty. Přestože používané IChE jsou z hlediska působení jednou skupinou léčiv, mechanismus účinku, strukturu a vedlejší účinky mají v některých případech poněkud odlišné. Existují totiž variabilní typy IChE s různými specifickými inhibičními účinky vůči AChE i BuChE. Důležitá je i specifická afinita pro AChE kvůli jejím odlišným izoformám, selektivita v různých částech mozku a samozřejmě jejich farmakokinetický a farmakodynamický charakter. Například donepezil (Obrázek 2) a galantamin (Obrázek 3) inhibují selektivně AChE, kdežto takrin (Obrázek 4) a rivastigmin (Obrázek 5) inhibují AChE i BuChE (duální inhibitory). Takrin byl prvním používaným inhibitorem AChE, ale pro jeho škodlivost (hepatotoxicita) byl z trhu eliminován. [11] [17] Dále se výzkum léčby AD soustředí na podání přímých cholinomimetik, což je skupina léčiv, mající schopnost napodobit účinek ACh přímou interakcí s ACh receptory jako jejich agonisté. [6]



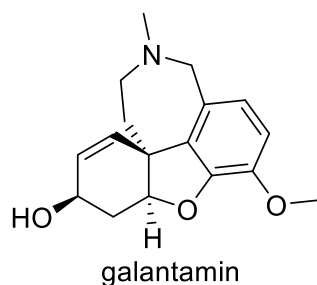
memantin

Obrázek 1

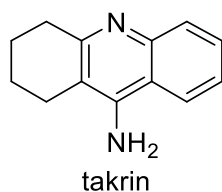


donepezil

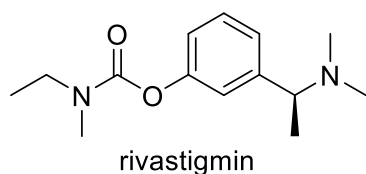
Obrázek 2



Obrázek 3



Obrázek 4



Obrázek 5

4.2 Acetylcholin

Nejvýznamnějšími neurotransmitery v CNS jsou acetylcholin, aminokyseliny (AMK) glycin a kyselina glutamová, katecholaminy dopamin, serotonin, noradrenalin a adrenalin. ACh umožňuje přenos nervových vzruchů v centrální i periferní části nervové soustavy, je jedním z nejdůležitějších neurotransmiterů, protože je ho největší množství ve vegetativním systému a v somatickém systému je jediným přenašečem. [14] [18]

Prvním objeveným neurotransmiterem byl právě ACh. Je zodpovědný za přenos nervových vzruchů v cholinergních synapsích. [20] ACh je syntetizován v presynaptické části motorického a vegetativního neuronu reakcí zbytku kyseliny octové z acetyl-CoA (z mitochondrií) s cholinem. Aby se reakce mohla uskutečnit, je potřeba přítomnost enzymu CAT. CAT se nachází pouze v cholinergních neuronech. Výsledným produktem reakce je ACh (Schéma 1), který se přesouvá tzv. axonálním tokem a hromadí se ve vezikulách o průměru 40 nm. Po proběhnutí akčního potenciálu se vezikuly naplněné ACh dostávají do synaptické mezery exocytózou a v synaptické štěrbině pak mohou interagovat s receptory na postsynaptických neuronech. [3] [14]

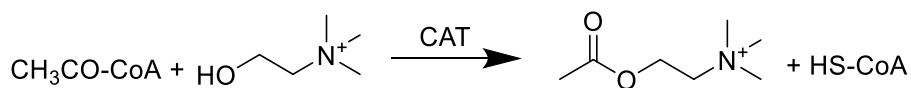


Schéma 1. Syntéza ACh

Transport signálu mezi jednotlivými neurony se uskutečňuje v synapsích. Synapse se skládá z presynaptické membrány jednoho nervového vlákna (donor), synaptické štěrbině a postsynaptické membrány druhého neuronu (akceptor). Synaptická štěrbině je široká přibližně 10 nm. [3] [8]

V presynaptické prostoru se nacházejí synaptické vezikuly, které obsahují neuromediátory důležité pro vznik nervového vzruchu. Vezikuly se difuzně pohybují a jsou ohraničené fosfolipidovým obalem. Úlohou fosfolipidového obalu je eliminace předčasné a neefektivní aktivace neurotransmiteru. Jakmile je presynaptické zakončení depolarizováno díky akčnímu potenciálu, dochází k otevření Ca^{2+} iontových kanálů, které jsou řízené napětím. To umožní přesun vápenatých iontů ze synaptické štěrbině do cytosolu presynaptického prostoru, čímž podpoří vylití ACh z vezikul do synaptické mezery. ACh se následně váže na své specifické receptory. Existují dva základní typy ACh receptorů – nikotinové a muskarinové, které mají svoje další podtypy. Po navázání dvou molekul ACh na receptor dochází ke změně jeho konformace, a to umožní vniknutí sodných kationtů do postsynaptického prostoru. Poté dojde k depolarizaci membrány a vzniku a dalšímu šíření nového akčního potenciálu. [3] [8]

4.2.1 Hydrolýza ACh

ACh se po splnění své funkce rozštěpí hydrolytickou reakcí za přítomnosti enzymu AChE na acetát a cholin (Schéma 2). AChE, jako všechny ostatní enzymy kromě ribozymů, je bílkovinného charakteru. Její molekulová relativní hmotnost je zhruba 320 000 a je ve vysoké koncentraci přítomná právě v cholinergních synapsích. U motorických neuronů je aktivita AChE vyšší než u sensorických nervových buněk. Po hydrolýze je cholin aktivně vycytáván a recyklován v presynaptickém nervovém zakončení. [6] [8] [20]

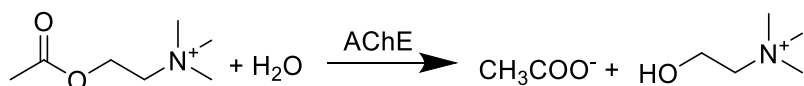


Schéma 2. Degradace ACh

4.3 Butyrylcholin

Jedná se o syntetický produkt a v lidském těle se nevyskytuje přirozeně. Má velmi podobný účinek a funkci jako ACh – neurotransmitter, který se váže na stejné receptory jako ACh. BuCh se používá v metodě sloužící k rozlišení AChE a BuChE. [19] [20] Molekula BuCh je sice hydrolyzována jak AChE, tak i BuChE, ale BuChE je v případě BuCh mnohem aktivnější než AChE. To vede k účinnější a rychlejší hydrolyze BuCh za vzniku produktů, a to zbytku kyseliny máselné (butyrátu) a cholinu (Schéma 3). Tyto sloučeniny nejsou ale vhodné pro elektrochemická ani spektrofotometrická měření, proto se k reakci používá modifikovaný analog BuCh, což je butyrylthiocholin, který se v přítomnosti BuChE rozštěpí na zbytek kyseliny máselné a thiocholin. Thiocholin lze detekovat spektrofotometricky s pomocí Ellmanova činidla (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina)) za vzniku výsledného žlutého produktu (5-thio-2-nitrobenzoát) nebo elektrochemicky (potenciometricky) hexakvanoželeznatanem draselno-železitým, známý i jako berlínská nebo pruská modř, který dokáže katalyzovat oxidační reakci sloučenin, které obsahují thiolovou skupinu, za vzniku disulfidů. [32] [33]

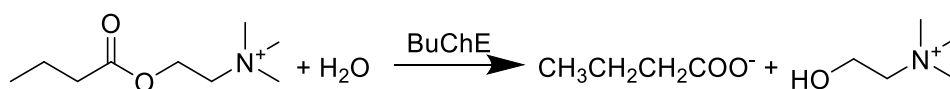


Schéma 3. Degradace BuCh

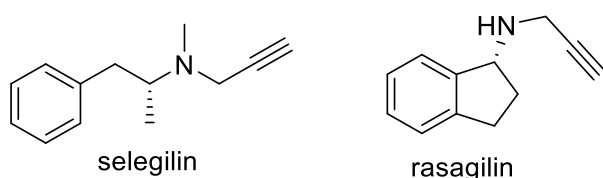
4.4 AChE a BuChE

Jde o enzymy, které jsou schopné hydrolyzovat molekulu ACh. Molekulárně jsou si AChE a BuChE z 65 % podobné. Mají společnou sekvenci AMK, ale každý enzym je kódovaný odlišným genem umístěným na jiném lidském chromozomu, AChE na chromozomu 7 a BuChE na chromozomu 3. AChE je klíčovým enzymem při hydrolyze ACh, kdežto BuChE (známá i jako pseudocholinesteráza, plazmatická cholinesteráza nebo acylcholin acylhydroláza) hraje v hydrolyze ACh pouze vedlejší, podpůrnou roli. Její fyziologická úloha není zcela objasněná. Osoby trpící AD mají zvýšenou aktivitu enzymů AChE i BuChE, což vede ke vzniku deficitu celého cholinergního systému. S progresí AD roste aktivita BuChE. [11] [20]

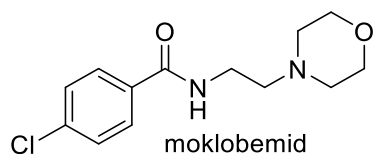
4.5 MAO

Monoaminoxidázy jsou skupina enzymů, jejíž funkcí je deaminační odbourávání neuromediátorů, jako jsou katecholaminy, mezi něž patří nonadrenalin, adrenalin a dopamin, dále tyramin, serotonin, melatonin a obecně sloučeniny, které obsahují aminovou skupinu. [34] MAO se nachází ve dvou typech (MAO-A a MAO-B). Každá izoforma má jinou distribuci v buňkách a tkáních a odlišnou selektivitu k substrátům a inhibitorům MAO. Aktivita MAO-B je poměrně vysoká, což způsobuje větší produkci volných radikálů v mozku, jednoho z faktorů přispívajících ke vzniku AD i Parkinsonovy choroby (PD). V současné době se používají k léčbě PD ireverzibilní selektivní inhibitory MAO-B selegilin a rasagilin (Obrázek 6), které obsahují propargylaminový strukturální fragment. Inhibicí MAO-B klesá degradace mj. dopaminu, jehož úbytek v určitých částech mozku vede k projevům PD. Inhibitory MAO-A se používají především jako antidepresiva, v současnosti zejména reverzibilní inhibitor moklobemid (Obrázek 7). [8] [17]

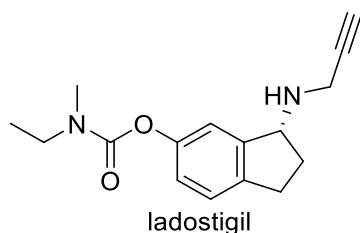
Vědci vytvořili deriváty léčiv selegilinu a rasagilinu (Obrázek 6) a tyto sloučeniny, např. ladostigil (Obrázek 8), byly identifikovány jako duální inhibitory MAO a AChE. To vede k diskuzím ohledně možného použití těchto derivátů při léčbě AD. Byly také syntetizovány hybridy takrin-selegilinu a z výsledků testování vyplývá, že fungují jako multifunkční inhibitory AChE, MAO-A a MAO-B, což by mohlo být terapeuticky výhodné. [8] [17]



Obrázek 6



Obrázek 7



Obrázek 8

4.6 Používané inhibitory AChE

ACh nelze přímo podávat do organismu tak, aby účinkoval rovnou na synapsích, proto se farmakoterapie zaměřuje na inhibitory degradace ACh. Tato léčiva mají inhibiční AChE (a ev. též BuChE) schopnost zvyšovat množství neuromediátoru, prodlužovat účinek ACh a tím mají pozitivní vliv na kognitivní funkce, mohou snad také zpomalovat progresi AD, ať už od lehkého počínajícího stádia demence až po středně těžké stádium. Aktuálně se používají reverzibilní inhibitory AChE působící přímo v CNS. IChE se dělí do dvou základních typů podle jejich mechanismus účinku, a to na ireverzibilní a reverzibilní. [4] [6]

Do skupin reverzibilních léčiv patří donepezil, rivastigmin a galantamin. Jejich schopnost inhibice je dána díky různým funkčním skupinám – karbamátové, kvarterní amoniové skupině nebo terciárnímu aminu. Mezi ireverzibilní inhibitory se řadí především organofosfátové sloučeniny. [17] [20] Obecně se karbamátové inhibitory cholinesteráz a sloučeniny s karbamátovou funkční skupinou používají i jako pesticidy, biologické zbraně nebo pro jiné medicínské účely. [24] [27]

4.6.1 Donepezil

Donepezil (Obrázek 2) patří do skupiny selektivních a nekompetitivních reverzibilních inhibitorů AChE působících v CNS. Jedná se o derivát piperidinu. Je prokázáno, že donepezil má pozitivní vliv na kognitivní funkce a zamezuje ukládání amyloidových plaků v mozku. V České republice je k dostání na trhu v podobě tablet. Ve většině případů je dobře snášen pacienty, velice dobře prochází hematoencefalickou bariérou (jako všechny ostatní centrální inhibitory) a ze všech AChEI má nejdelší biologický poločas (zhruba 70 hodin). V játrech je následně donepezil metabolizován cytochromem P450 na různé metabolity. V ČR je povolena nejvyšší dávka 10 mg na den a užívá se perorálně. Překročení doporučeného množství a vedlejší

účinky léčiva se projevují průjemem, nauzeou, anorexií, bolestí břicha nebo bradykardií. [4] [12] [20]

4.6.2 Galantamin

Léčivo-alkaloid (Obrázek 3) je reverzibilní, kompetitivní a selektivní AChEI, který je prodáván v České republice pod názvem Galantamin Mylan®. Je možné ho získat z přírodních zdrojů z některých sněženek a narcisů, konkrétně například z *Galanthus woronowii*. Pro farmakoterapeutické účely je produkován synteticky. Kromě schopnosti inhibovat enzym AChE funguje i jako allosterický modulátor nikotinových cholinergních receptorů (pre- i postsynaptických), čímž zlepšuje jejich funkci v přítomnosti ACh. Výsledkem je zlepšení transmise signálu, kognitivních funkcí a zmírnění různých psychických problémů, takže se používá i v terapii dalších přidružených psychických poruch. Galantamin je dostupný v tabletách a je podáván perorálně. Dávkování je postupně titrováno (stejně jako u předchozích léčiv kromě donepezilu), kdy maximální denní dávka činí až 24 mg. Vedlejší účinky jsou podobné jako u předchozích AChEI. Stejně jako donepezil je metabolizován v játrech cytochromem P450, konkrétně enzymy CYP2D6 a CYP3A4, a jeho biologický poločas je 6-8 hodin. [12] [20] [23]

4.6.3 Rivastigmin

Karbamátový pseudoireverzibilní inhibitor (Obrázek 5) účinkující hlavně v hipokampu a neokortexu, což jsou oblasti v mozku nejvíce zasažené u pacientů s AD. Na trhu je prodáván mj. pod názvem Exelon®. Léčivo sice inhibuje enzym AChE po dobu nejméně 12 hodin, ale molekula rivastigminu (resp. její část) se váže na enzym pouze 30-60 minut, a proto je označován jako pseudoireverzibilní inhibitor. Blokuje aktivitu AChE navázáním se na aktivní místo (esteratická část) molekuly AChE, kdy dochází ke karbamoylaci hydroxylové skupiny serinu, a přednostně inhibuje G1 izoformu AChE. Dokáže inhibovat i aktivitu BuChE (duální a neselektivní inhibitor). Oproti donepezilu je metabolizován samotnými esterázami (AChE a BuChE) a jeho biologický poločas jsou 2 hodiny. Léčivo je užíváno buď perorálně v tabletách, nebo pomocí transdermálních náplastí. Aktuální literatura uvádí právě tento alternativní způsob užívání rivastigminu, který minimalizuje vedlejší účinky léčiva. Včasnou diagnostikou a správným užíváním léčiva se u pacientů zlepšily nejen kognitivní funkce, ale i schopnost fungovat v každodenních životních aktivitách a koncentrace. Maximální dávka je

12 mg denně. Bohužel i v tomto případě jsou přítomny vedlejší účinky, které souvisí hlavně s gastrointestinálními problémy, tak jako u všech ostatních používaných IChE. [12] [20] [21] [22] [25]

4.7 Výzkum nových potenciálních ChEI

Jsou stále publikovány odborné články o výzkumu a objevech dalších sloučenin, které mají schopnost inhibovat AChE a/nebo BuChE. Část z nich vykazuje dokonce vyšší biologickou inhibiční aktivitu a lipofilnější charakter než některá aktuálně používaná léčiva (rivastigmin a galantamin). [11] [17] [27] [28] [29]

Momentálně jsou předmětem zájmu mimo jiné nové deriváty takrinu a 7-methoxytakrinu, které by si zachovaly svůj klinický efekt a zároveň nebyly především hepatotoxické. Léčba se zaměřuje také na histopatologický β -amyloid. Zkouší se efekt monoklonálních protilátek proti β -amyloidu a inhibiční aktivita vůči β -sekretázám. Jsou vyvíjeny a zkoumány další duální inhibitory AChE a MAO, vakcinace proti τ -proteinu, sloučeniny mající efekt na nikotinové a serotoninové receptory jako přímí agonisté atd. [17]

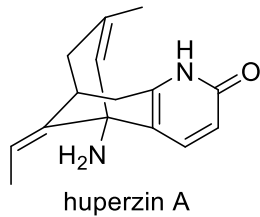
Přítomnost karbamátové skupiny u *N,N*-disubstituovaných (thio)karbamátů salicylanilidů hraje významnou roli v inhibici AChE a BuChE, lze ji proto považovat za základní fragment pro přípravu různě modifikovaných analogických sloučenin. Modifikace spočívá například v různé substituci halogeny na anilinovém cyklu nebo v salicylové části. Například přítomnost chloru na C-4 anilinového kruhu vykazuje větší inhibiční aktivitu než isomerní chlor na C-3. Předpokládá se na základě molekulového dockingu, že *N,N*-difenyl karbamáty působí jako nekovalentní inhibitory cholinesteráz, přičemž přítomnost aromatických kruhů je nezbytná pro interakci s enzymem. Existuje i řada dalších interakcí, ale tato je efektivnější oproti alifatickým substituentům. [27] [28] [29]

Je zajímavé, že nově vytvořené sloučeniny na bázi salicylanilidu s karbamoylovou, fosfátovou a thiofosfátovou skupinou mají kromě schopnosti inhibice AChE a BuChE i antimikrobiální účinek vůči rodu *Mycobacterium*, konkrétně vůči *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii*. [27] [28] [29]

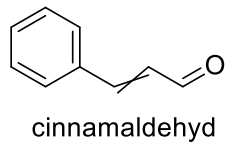
Existují také články týkající se přípravy a hodnocení tzv. dualistických kognitiv, a to spojením dvou bioaktivních molekul (léčiv) dohromady v jedné struktuře. Jde například o spojení rivastigminu a rasagilinu (ladostigil; Obrázek 8) nebo huperzinu A (Obrázek 9) a takrinu

(hipuriny). [26]

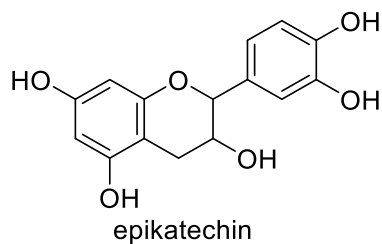
Dále byly studovány také výtažky ze skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylanicum*), které inhibují shlukování τ -proteinu v mozku, a dokonce dokážou disociovat tyto patologické spletence vyskytující se u osob trpících AD. Výsledky poukazují na pozitivní účinek, konkrétně díky sloučeninám cinnamaldehydu (Obrázek 10) a epikatechinu (Obrázek 11) získaných právě ze skořice. [30] [31]



Obrázek 9



Obrázek 10

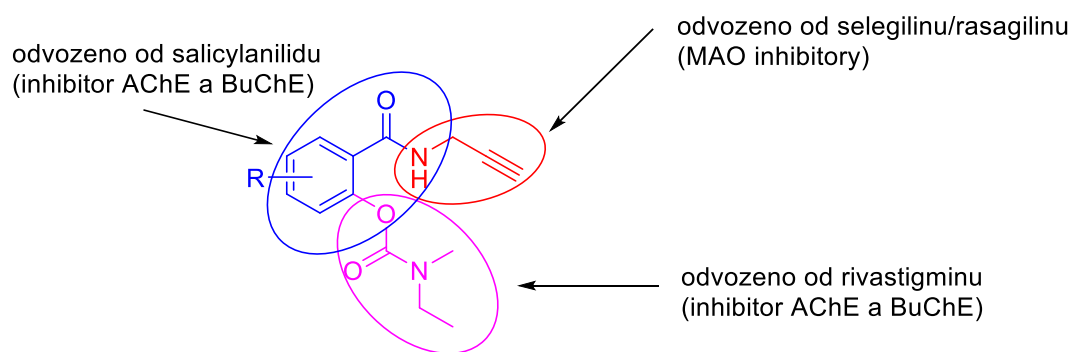


Obrázek 11

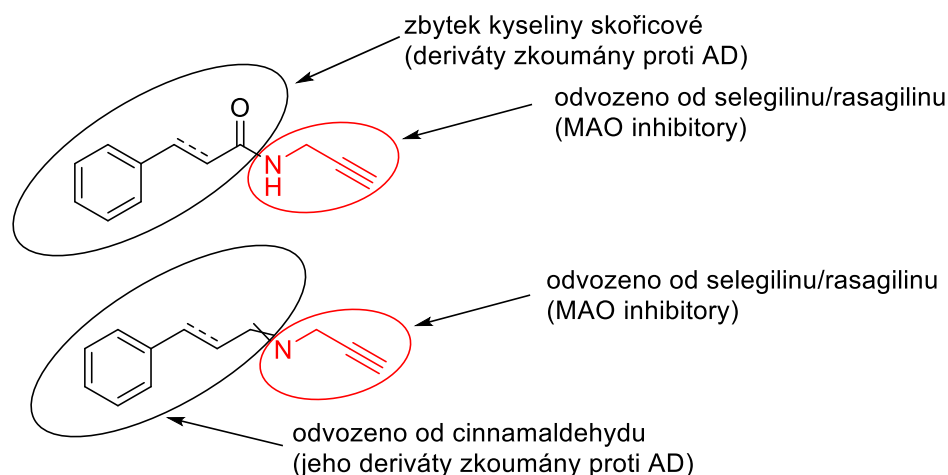
5 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je sumarizovat základní fakta o AD (výskyt, průběh onemocnění a zejména její aktuální léčba), související biochemickou teorii (zejména neuromediátor ACh, enzymy AChE a BuChE) a k tématu práce relevantního aktuálního výzkumu nových potenciálních IChE.

Cílem praktické části je příprava a charakterizace nových potenciálních inhibitorů cholinesteráz a MAO-B na bázi sloučenin propargylaminu a salicylové/skořicové kyseliny a jejich derivátů (Obrázek 12, Obrázek 13), hodnocení jejich biologické aktivity a nalezení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou. Cílové sloučeniny vychází z několika částí. Nejdůležitějším fragmentem je propargylamin, který je přítomen ve všech připravených sloučeninách a je odvozený od léčiv selegilinu a rasagilinu, další část je odvozená od salicylanilidu a karbamátový fragment je odvozený od léčiva rivastigminu. Další sloučeniny mají ve své struktuře deriváty kyseliny skořicové.



Obrázek 12



Obrázek 13

6 Praktická část

6.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Německo), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění.

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), detekce byla prováděna UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) 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) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístroji Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA). Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6), aceton (aceton- d_6) nebo chloroform (CDCl_3). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla (u DMSO- d_6 při $\delta = 39,5$ ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Automatic Microanalyser CHNS-O CE Instrument (FISONS EA 1110, Milán, Itálie) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

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

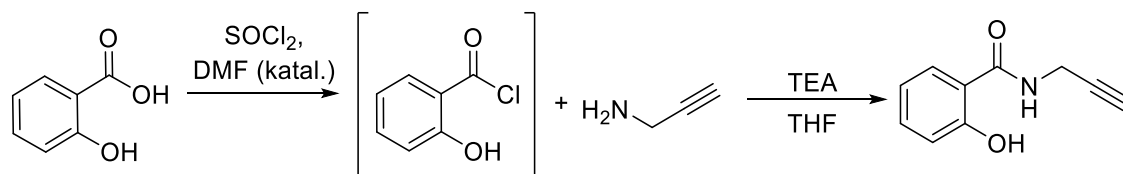
Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány

pomocí programu ChemDraw Ultra 17.1 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). V tomto programu byly také vypočteny hodnoty $\log P$ připravených sloučenin, tj. hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda.

6.2 Jednotlivé syntézy amidů

N-(Prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A₁]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

414,4 mg (0,003 mol) kyseliny salicylové bylo rozpuštěno v 5 ml SOCl₂ (baňka se směsí byla chlazená ledem) a poté byly přidány 3 kapky DMF. Poté bylo chlazení přerušeno a reakční směs se ponechala reagovat 3 h za stálého míchání za laboratorní teploty a potom byla odpařena dosucha. Surový acylchlorid byl rozpuštěn v 6 ml suchého THF a velmi pomalu bylo najednou přidáno 192,1 μl (0,003 mol) propargylaminu a ve dvou podílech 557,3 μl (0,006 mol) TEA rozpuštěného v 6 ml suchého THF. Směs se ponechala reagovat přibližně 24 h při laboratorní teplotě za stálého míchání, následně byla odpařena na rotační vakuové odparce a pomocí destilované vody a EtOAc byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána 0,1 M HCl, 5 % NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄ přibližně po 30 min. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl přiveden ke krystalizaci přidáním směsi toluen/EtOAc v poměru 5:1 (V/V). Směs se ponechala krystalizovat 24 h při +4 °C, posléze byla zfiltrována.

Syntéza byla opakována celkem pětkrát a až při čtvrté (96,0 mg) a páté (90,0 mg) syntéze byl získán produkt v dostatečném množství a čistotě. Další výtěžek (84,0 mg) byl získán při syntéze 2-(prop-2-yn-1-ylkarbamoyl)fenyl-acetátu [A₈] jako vedlejší produkt při purifikaci přes LSC (hydrolyza).

Sumární vzorec: C₁₀H₉NO₂

M_r: 175,19

Výtěžek: 96,0 mg (18 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 12.02 (1H, s, OH), 7.42 (1H, dt, *J* = 8.6, 1.6 Hz, H₄), 7.38 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, H₆), 7.01 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, H₃), 6.87 (1H, dt, *J* = 8.6, 1.6 Hz, H₅),

6.48 (1H, s, NH), 4.26 (2H, ddd, $J = 5.3, 2.7, 0.7$ Hz, CH₂), 2.33 (1H, td, $J = 2.6, 0.6$ Hz, ≡C-H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 169.65, 161.54, 134.60, 125.42, 118.79, 118.70, 113.69, 78.75, 72.36, 29.44.

IČ [cm⁻¹]: 636, 663, 723, 753, 787, 866, 1151, 1251, 1333, 1354, 1380, 1496, 1545 (C=C_{ar}), 1592, 1642 (C=O), 2123 (C≡C), 3264 (N-H), 3393 (O-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00, nalezeno: C, 68.61; H, 5.05; N, 8.15

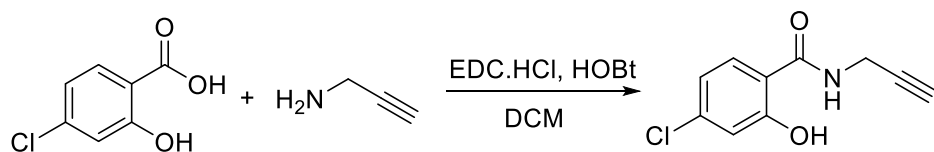
R_f (toluen/EtOAc 4:1): 0,36

T_t [°C]: 101-103,6 (97-99 [38])

LogP: 1,0

4-Chlor-N-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A₂]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

172,6 mg (0,001 mol) kyseliny 4-chlorsalicylové bylo rozpuštěno v 8 ml DCM, poté bylo přidáno 64,0 μl (0,001 mol) propargylaminu a 148,6 mg (0,0011 mol) HOBT. Reakční směs byla ochlazená směsí ledu a vody na 0 °C, poté bylo přidáno 230,0 mg (0,0012 mol) EDC.HCl. Směs se ponechala míchat za chlazení po dobu 2 h, posléze bylo chlazení odstraněno a směs se ponechala míchat při laboratorní teplotě přes noc. Druhý den byla směs odpařena na odparce do sucha, následně byla vytřepána 5 % NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Následně se směs ponechala sušit 30 min bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Produkt byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel, MF: toluen/EtOAc; 4:1 V/V).

Sumární vzorec: C₁₀H₈ClNO₂

M_r: 209,02

Výtěžek: 110,7 mg (53 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.52 (1H, s, OH), 9.16 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, NH), 7.86 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H₆), 7.00 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H₃), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H₅), 4.08 (2H, dd, *J* = 5.5, 2.6 Hz, CH₂), 3.16 (1H, t, *J* = 2.5 Hz, ≡C-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167.50, 160.36, 137.93, 130.12, 119.26, 117.15, 114.81, 80.78, 73.47, 28.58.

IČ [cm⁻¹]: 628, 689, 764, 829, 853 (C-Cl), 909, 1090, 1158, 1234, 1292, 1370, 1419, 1455, 1490, 1534 (C=C_{ar}), 1604 (C=O), 3091 (C-H_{ar}), 3272 (N-H), 3363 (O-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 57.30; H, 3.85; N, 6.68, nalezeno: C, 57.50; H, 3.98; N, 6.49

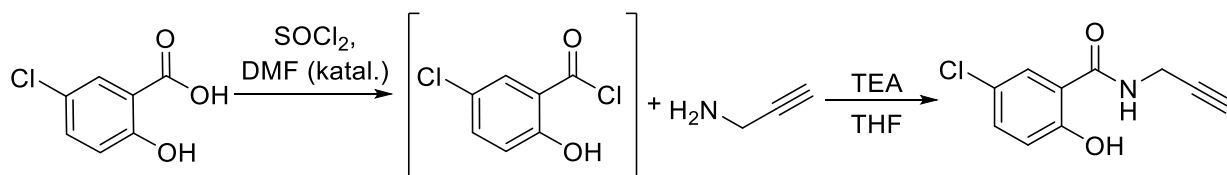
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,48

T_t [°C]: 147-148

LogP: 1,56

5-Chlor-*N*-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A3]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

517,7 mg (0,003 mol) kyseliny 5-chlorsalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 5 ml SOCl_2 (baňka se směsí byla chlazená ledem) a poté byly přidány 3 kapky DMF. Reakční směs se ponechala po přerušení chlazení reagovat 3 h za stálého míchání za laboratorní teploty a potom byla odpařena dosucha. Surový acylchlorid byl rozpuštěn v 6 ml suchého THF a velmi pomalu bylo najednou přidáno 192,1 μl (0,003 mol) propargylaminu a ve dvou podílech 557,3 μl (0,006 mol) TEA rozpuštěného v 6 ml suchého THF. Směs se ponechala reagovat přibližně 24 h při laboratorní teplotě za stálého míchání, následně byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce a pomocí destilované vody a EtOAc byla přenesena do dělicí nálevky, kde byla postupně vytřepána roztoky 0,1 M HCl, 5 % NaHCO_3 a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodným Na_2SO_4 přibližně 30 min. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl přiveden ke krystalizaci přidáním směsi toluenu/EtOAc v poměru 4:1 (V/V). Směs se ponechala krystalizovat 24 h při +4 °C, posléze byla zfiltrována. Syntéza byla opakována celkem pětkrát a až při poslední syntéze byl získán produkt v dostatečném množství a čistotě.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNO}_2$

Mr: 209,50

Výtěžek: 341,2 mg (54 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.23 (1H, s, OH), 9.19 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.91 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H6), 7.44 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, H4), 6.96 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H3), 4.09 (2H, dd, $J = 5.5, 2.5$ Hz, CH_2), 3.17 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv\text{C}-\text{H}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167.25, 158.50, 133.88, 128.17, 122.98, 119.75, 117.41, 80.97, 73.82, 28.95.

IČ [cm⁻¹]: 649, 674, 703, 763, 837 (C-Cl), 1116, 1228, 1289, 1299, 1370, 1417, 1482, 1551 (C=C_{ar}), 1574, 1603, 1625 (C=O), 3067 (C-H_{Ar}), 3282 (N-H), 3345 (O-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 57.30; H, 3.85; N, 6.68, nalezeno: C, 57.18; H, 3.79; N, 6.80

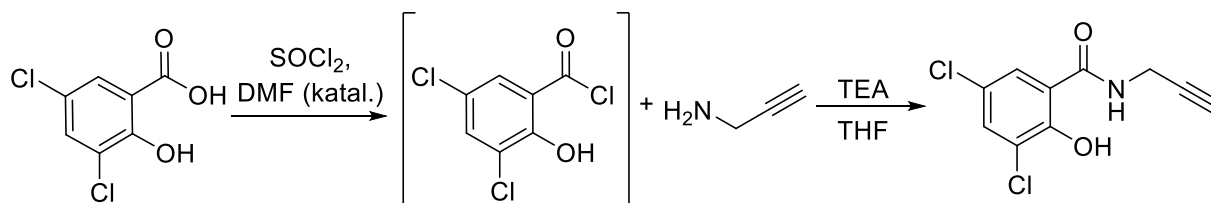
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,52

T_t [°C]: 166-168

LogP: 1,56

3,5-Dichlor-*N*-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A4]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

207,0 mg (0,001 mol) 3,5-dichlorsalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 5 ml SOCl_2 (baňka se směsí byla chlazená ledem) a následně byly přidány 3 kapky DMF. Reakční směs se ponechala po přerušení chlazení reagovat 3 h a potom byla odpařena do sucha na vakuové odparce. Surový acylchlorid byl rozpuštěn v 6 ml suchého THF a velmi pomalu bylo přidáno najednou 64,0 μl (0,001 mol) propargylaminu a ve dvou podílech 185,8 μl (0,002 mol) TEA rozpuštěného v 6 ml suchého THF. Směs se ponechala reagovat za stálého míchání přibližně 24 h při laboratorní teplotě. Směs byla odpařena do sucha na vakuové odparce a pomocí destilované vody a EtOAc byla přenesena do dělicí nálevky a postupně byla vytřepána roztoky 0,1 M HCl, 5 % NaHCO_3 a nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva se ponechala vysušit stáním nad bezvodým Na_2SO_4 přibližně 30 min. Sušidlo bylo odfiltrováno a filtrát byl přiveden ke krystalizaci přidávkem *n*-hexanu. Směs se ponechala krystalizovat 24 h při +4 °C, posléze byla zfiltrována. Syntéza byla opakována celkem pětkrát a až při poslední syntéze byl získán produkt v dostatečném množství a čistotě.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_2$

M_r : 242, 99

Výtěžek: 122,1 mg (50 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.52 (1H, s, OH), 9.19 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.05 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H6), 7.97 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H4), 3.94 (2H, dd, $J = 5.5, 2.5$ Hz, CH_2), 3.02 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv\text{C}-\text{H}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.66, 154.62, 142.93, 135.72, 131.82, 129.17, 128.17, 80.31, 73.38, 28.78.

IČ [cm⁻¹]: 649, 674, 689, 709, 742, 780, 808 (C-Cl), 872 (C-Cl), 1074, 1139, 1154, 1233, 1292, 1313, 1375, 1420, 1448, 1543 (C=C_{ar}), 1636 (C=O), 1701, 3083 (C-H_{ar}), 3286 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 49.21; H, 2.89; N, 5.74, nalezeno: C, 49.34; H, 2.92; N, 5.87

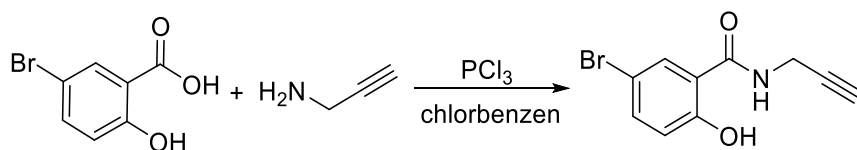
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,41

T_t [°C]: 177-185

LogP: 2,12

5-Brom-N-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A5]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

651,0 mg (0,003 mol) 5-bromsalicylové kyseliny bylo suspendováno ve 25 ml chlorbenzenu, následně bylo přidáno najednou 192,1 μ l (0,003 mol) propargylaminu a 130,9 μ l (0,0015 mol) PCl_3 . Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla 8 h. Poté byla směs ještě za horka zfiltrována a po vychladnutí se ponechala 24 h krystalizovat při -20°C . Vzniklé krystaly byly zfiltrovány.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrNO}_2$

M_r : 254,08

Výtěžek: 648,0 mg (100 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 12.26 (1H, s, OH), 9.19 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.03 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H6), 7.55 (1H, dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, H4), 6.90 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H3), 4.09 (2H, dd, $J = 5.5, 2.6$ Hz, CH_2), 3.17 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv\text{C-H}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.94, 158.65, 136.39, 130.76, 119.89, 117.64, 110.11, 80.67, 73.53, 28.68.

IČ [cm^{-1}]: 630, 649, 677 (C-Br), 702, 828, 1056, 1111, 1232, 1297, 1376, 1411, 1425, 1489, 1563 (C=C_{ar}), 1599, 1621 (C=O), 3018 (C-H_{ar}), 3287 (N-H), 3325 (O-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 47.27; H, 3.17; N, 5.51, nalezeno: C, 47.31; H, 3.04; N, 5.40

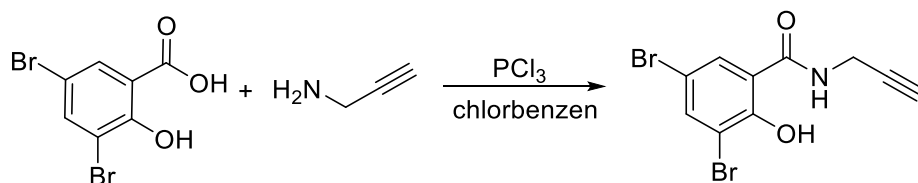
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,5

T_t [$^\circ\text{C}$]: 165-167

LogP: 1,83

3,5-Dibrom-N-(prop-2-yn-1-yl)salicylamid [A6]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

890,0 mg (0,003 mol) 3,5-dibromsalicylové kyseliny bylo suspendováno ve 25 ml chlorbenzenu, následně bylo přidáno najednou 192,1 μ l (0,003 mol) propargylaminu a 87,2 μ l (0,001 mol) PCl_3 . Reakční směs byla ponechána za stálého míchání 8 h při teplotě varu rozpouštědla. Poté byla směs ještě za horka zfiltrována a zahuštěna odpařením přibližně jedné třetiny objemu směsi na vakuové odparce a byla ponechána krystalizovat při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do druhého dne. Vzniklé krystaly byly zfiltrovány.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Br}_2\text{NO}_2$

M_r : 332,80

Výtěžek: 998,4 mg (100 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 13.55 (1H, s, OH), 9.62 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.14 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H6), 7.97 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H4), 4.10 (2H, dd, $J = 5.4, 2.5$ Hz, CH_2), 3.23 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv\text{C-H}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 168.11, 157.13, 138.89, 129.29, 128.54, 116.54, 108.35, 80.01, 73.97, 28.89.

IČ [cm^{-1}]: 615, 654 (C-Br), 666 (C-Br), 714, 728, 785, 873, 1139, 1777, 1232, 1252, 1317, 1442, 1533 (C= C_{ar}), 1585, 1629 (C=O), 3072 (C- H_{ar}), 3284 (N-H), 3348 (O-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 36.07; H, 2.12; N, 4.21, nalezeno: C, 36.01; H, 2.24; N, 4.40

R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,55

T_t [$^\circ\text{C}$]: 122-124

LogP: 2,66

5-Bromosalicylát prop-2-yn-1-ylamonia [A7]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

217,0 mg (0,001 mol) 5-bromosalicylové kyseliny bylo rozpuštěno v 10 ml EtOAc. Po rozpuštění směsi bylo přidáno 64,0 μ l (0,001 mol) propargylaminu. Reakční směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě 24 h. Směs byla druhý den zahuštěna na rotační vakuové odparce a byla ponechána krystalizovat 24 h při -20 °C. Vzniklé krystaly byly zfiltrvány.

Sumární vzorec: $C_{10}H_9BrNO_3$

M_r : 272,10

Výtěžek: 110,0 mg (40 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.39 (3H, s, NH_3), 7.73 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H6), 7.28 (1H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, H4), 6.62 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H3), 3.78-3.75 (2H, m, CH_2), 3.55 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv C-H$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.40, 162.15, 134.15, 132.18, 122.25, 118.57, 107.15, 77.92, 77.31, 28.49.

IČ [cm^{-1}]: 628, 637, 686 (C-Br), 699, 810, 822, 892, 1215, 1243, 1286, 1339, 1362, 1417, 1468, 1557, 1562 (C=C_{ar}), 1588, 1602, 2992, 3060 (C-H_{ar}), 3296 (N-H), 3321 (O-H)

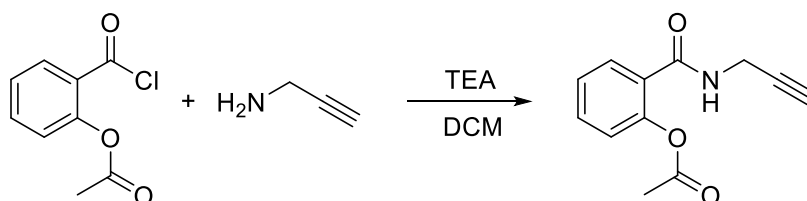
Elementární analýza: vypočteno: C, 44.12; H, 3.71; N, 5.15, nalezeno: C, 44.31; H, 3.89; N, 5.07

R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,25

T_t [$^{\circ}C$]: 169-170

2-(Prop-2-yn-1-ylkarbamoyl)fenyl-acetát [A₈]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

Nejprve bylo rozpuštěno v 10 ml DCM 627,0 μ l (0,0045 mol) TEA a 244,0 μ l (0,0035 mol) propargylaminu. Poté bylo přidáno 595,8 mg (0,003 mol) chloridu kyseliny acetylsalicylové. Směs se ponechala míchat přes noc za laboratorní teploty. Druhý den byla směs odpařena na odparce do sucha a převrstvena EtOAc. Vzniklý precipitát (chlorid triethylamonia) byl zfiltrován. Filtrát s obsaženým cílovým produktem a vedlejšími produkty byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel, MF: toluen/EtOAc v poměru 4:1 (V/V) s přidavkem 209,0 μ l (0,001 mol) TEA kvůli zachování bazického prostředí). Byl získán jednak *N*-propargylsalicylamid [A₁] s výtěžkem 84,0 mg a jednak plánovaný 2-(prop-2-yn-1-ylkarbamoyl)fenyl-acetát. U obou získaných sloučenin byla určena jejich struktura. Syntéza byla opakována celkem dvakrát a až při druhé syntéze byl získán produkt (s přidavkem TEA při LSC).

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁NO₃

M_r: 217,22

Výtěžek: 210,0 mg (32 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.69 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, NH), 7.56 (1H, dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, H₃), 7.52 (1H, tdd, *J* = 7.5, 1.7, 0.9 Hz, H₅), 7.33 (1H, tt, *J* = 7.5, 0.9 Hz, H₄), 7.18 (1H, ddd, *J* = 8.0, 1.1, 0.6 Hz, H₆), 3.98 (2H, ddd, *J* = 5.7, 2.5, 0.7 Hz, CH₂), 3.12 (1H, td, *J* = 2.5, 0.7 Hz, \equiv C-H), 2.23 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 169.02, 165.00, 148.20, 131.66, 129.15, 128.89, 126.03, 123.51, 81.26, 73.01, 28.47, 20.92.

IČ [cm⁻¹]: 646, 670, 742, 787, 907, 1101, 1160, 1179, 1240, 1304, 1367, 1484, , 1531 (C=C_{ar}), 1609, 1636 (C=O amid), 1769 (C=O ester), 1813, 2117 (C \equiv C), 3233, 3310 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 66.35; H, 5.10; N, 6.45, nalezeno: C, 66.39; H, 5.20; N, 6.29

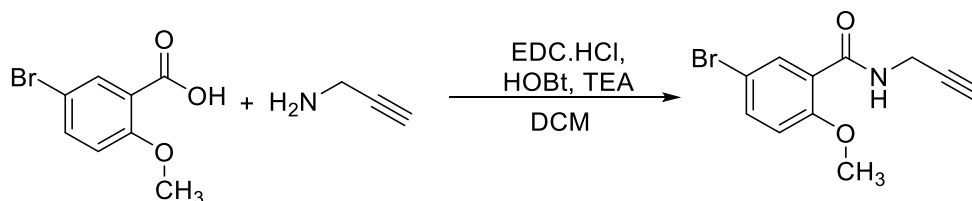
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,39

T_t [°C]: 88-90 (91-92 [39])

LogP: 0,98

5-Brom-2-methoxy-*N*-(prop-2-yn-1-yl)benzamid [A9]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

231,0 mg (0,001 mol) kyseliny 5-brom-2-methoxybenzoové bylo rozpuštěno v 8 ml DCM, poté bylo přidáno najednou 64,0 μ l (0,001 mol) propargylaminu, 209,0 μ l (0,0015 mol) TEA a 146,8 mg (0,0011 mol) HOBt. Reakční byla zchlazena směsí ledu a vody, poté bylo přidáno 230,0 mg (0,0012 mol) EDC.HCl. Směs se ponechala míchat 2 h za chlazení ledem, posléze bylo chlazení odstraněno a směs se ponechala míchat přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla směs odpařena na vakuové odparce do sucha, rozpuštěna v DCM a vytřepána postupně pomocí roztoků 0,1 M HCl, 5 % NaHCO₃ a nasyceným vodným roztokem NaCl. Směs byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ (30 min) a následně bylo sušidlo odfiltrováno. Následně byla směs zahuštěna na vakuové odparce a ponechala se krystalizovat při -20 °C do druhého dne. Krystaly byly následně zfiltrovány.

Sumární vzorec: C₁₁H₁₀BrNO₂

M_r: 267,90

Výtěžek: 267,9 mg (100 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.60 (1H, t, J = 5.7 Hz, NH), 7.80 (1H, dd, J = 2.6, 0.6 Hz, H6), 7.64 (1H, ddd, J = 8.9, 2.7, 0.7 Hz, H4), 7.13 (1H, d, J = 8.8 Hz, H3), 4.04 (2H, ddd, J = 5.6, 2.5, 0.6 Hz, CH₂), 3.87 (3H, s, CH₃), 3.10 (1H, td, J = 2.5, 0.7 Hz, \equiv C-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.51, 156.49, 134.95, 132.67, 124.65, 114.86, 112.04, 81.35, 72.97, 56.45, 28.83.

IČ [cm⁻¹]: 613, 636 (C-Br), 681, 828, 1018, 1100, 1182, 1241, 1276, 1293, 1381, 1463, 1479, 1560, 1642 (C=O), 3287, 3368 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 49.28; H, 3.76; N, 5.22, nalezeno: C, 49.39; H, 3.85; N, 5.11

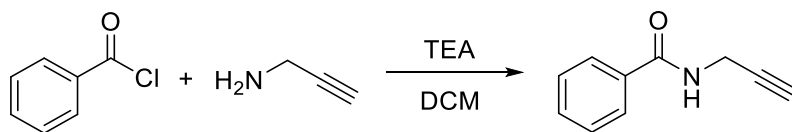
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,54

T_t [°C]: 217-220

Log*P*: 2,09

N-(Prop-2-yn-1-yl)benzamid [A10]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

Nejprve bylo smíseno 64,0 μl (0,001 mol) propargylaminu s 8 ml DCM a 209,0 μl (0,0015 mol) TEA, následně bylo přidáno 174,0 μl (0,0015 mol) benzoylchloridu. Reakční směs se ponechala míchat přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla směs odpařena do sucha na rotační vakuové odparce, pomocí EtOAc a vody přenesena do dělicí nálevky a vytřepána postupně roztoky 5 % NaHCO_3 , 0,1 M HCl a nasyceným vodným roztokem NaCl. Směs se ponechala 30 min vysušit bezvodým Na_2SO_4 a poté bylo sušidlo zfiltrováno. Směs byla odpařena do sucha na vakuové odparce, rozpuštěna v malém množství EtOAc a po přidání *n*-hexanu se ponechala krystalizovat při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Vzniklé krystaly byly zfiltrovány.

Sumární vzorec: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}$

M_r : 159,20

Výtěžek: 155,0 mg (97 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.92 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, NH), 7.87-7.84 (2H, m, H2, H6), 7.55-7.44 (3H, H3, H4, H5), 4.05 (2H, dd, $J = 5.6, 2.5$ Hz, CH_2), 3.11 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, $\equiv\text{C}-\text{H}$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 166.08, 133.98, 131.60, 128.52, 127.42, 81.51, 72.97, 28.65.

IČ [cm^{-1}]: 629, 662, 689, 716, 805, 914, 986, 1048, 1263, 1310, 1347, 1490, 1541 ($\text{C}=\text{C}_{\text{ar}}$), 1578, 1603, 1640 ($\text{C}=\text{O}$), 3060 ($\text{C}-\text{H}_{\text{ar}}$), 3291 (NH)

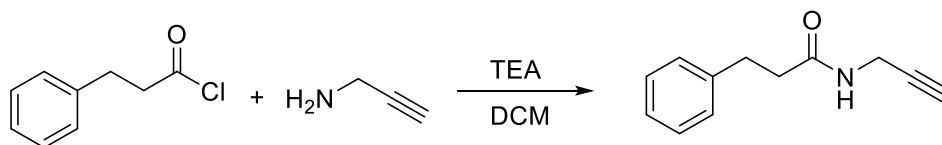
Elementární analýza: vypočteno: C, 75.45; H, 5.70; N, 8.80, nalezeno: C, 75.58; H, 5.94; N, 8.74

R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,48

T_t [$^\circ\text{C}$]: 95-98 (103-105 [40])

LogP: 1,39

3-Fenyl-N-(prop-2-yn-1-yl)propanamid [A11]

Reakční schéma:**Pracovní postup:**

64,0 μl (0,001 mol) propargylaminu a 209,0 μl (0,0015 mol) TEA bylo rozpuštěno v 8 ml DCM. Po úplném rozpuštění směsí bylo přidáno 222,8 μl (0,0015 mol) hydrocinnamoyl chloridu. Směs se ponechala míchat přes noc do druhého dne za laboratorní teploty. Následující den byla směs odpařena na vakuové odparce a poté byla převrstvena EtOAc. Vzniklý precipitát (chlorid triethylamonia) byl odfiltrován, filtrát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a po přidání *n*-hexanu se směs ponechala krystalizovat 12 h při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzniklé krystaly byly druhý den zfiltrovány.

Sumární vzorec: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}$

M_r : 187,24

Výtěžek: 97,0 mg (52 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.28 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, NH), 7.29-7.26 (2H, m, H3, H5), 7.20-7.14 (3H, m, H2, H4, H6), 3.84 (2H, ddd, $J = 5.5, 2.5, 0.8$ Hz, N- CH_2), 3.09 (1H, td, $J = 2.5, 0.8$ Hz, $\equiv\text{C}-\text{H}$), 2.80 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, CH_2-Ar), 2.39 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, CH_2-CO).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 171.24, 141.39, 128.44, 128.36, 126.05, 81.39, 73.05, 36.87, 31.07, 27.93.

IČ [cm^{-1}]: 654, 678, 701, 749, 780, 937, 1028, 1089, 1236, 1306, 1365, 1432, 1495, 1522 ($\text{C}=\text{C}_{\text{ar}}$), 1642 ($\text{C}=\text{O}$), 2908, 2932, 3029, 3062 ($\text{C}-\text{H}_{\text{ar}}$), 3277 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 76.98; H, 7.00; N, 7.48, nalezeno: C, 76.84; H 7.10; N, 7.37

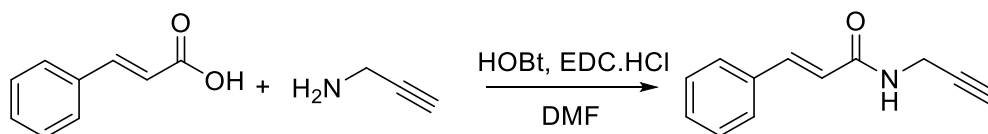
R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,25

T_t [$^{\circ}\text{C}$]: 65-66 (69 [41])

LogP: 1,75

N-(Prop-2-yn-1-yl)cinnamamid [A12]

Reakční směs:



Pracovní postup:

148,2 mg (0,001 mol) kyseliny skořicové bylo rozpuštěno v 8 ml DMF, poté bylo přidáno najednou 64,0 μ l (0,001 mol) propargylaminu a 146,8 mg (0,0011 mol) HOBt. Reakční směs byla zchlazena směsí ledu a vody, poté bylo přidáno 230,0 mg (0,0012 mol) EDC.HCl. Směs se ponechala míchat 2 h za chlazení ledem, posléze bylo odstraněno chlazení a směs se ponechala míchat přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byla směs odpařena do sucha a vytřepána postupně za pomoci DCM a roztoků 0,1 M HCl, 5 % NaHCO₃ a nasyceného vodného roztoku NaCl. Směs byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ (30 min) a poté bylo sušidlo odfiltrováno. Následně byla směs zahuštěna na vakuové odparce a po přidání směsi EtOAc/toluen v poměru 4:1 (V/V) se ponechala krystalizovat při -20 °C do druhého dne. Krystaly byly poté zfiltrvány.

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁NO

M_r: 185,23

Výtěžek: 125,2 mg (68 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.54 (1H, t, J = 5.6 Hz, NH), 7.58-7.54 (2H, m, H₂, H₆), 7.46 (1H, d, J = 15.8 Hz, =CH-Ph), 7.43-7.35 (3H, m, H₃, H₄, H₅), 6.63 (1H, d, J = 15.8 Hz, =CH-CO) 3.99 (2H, ddd, J = 5.5, 2.5, 0.8 Hz, CH₂), 3.14 (1H, td, J = 2.5, 0.8 Hz, \equiv C-H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 164.85, 139.54, 134.91, 129.76, 129.12, 127.76, 121.63, 81.21, 73.33, 28.20.

IČ [cm⁻¹]: 676, 711, 740, 762, 864, 975, 1039, 1224, 1252, 1330, 1363, 1420, 1449, 1553 (C=C_{ar}), 1587, 1610 (C=C), 1652 (C=O), 2117 (C \equiv C), 3068 (C-H_{ar}), 3219 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 77.81; H, 5.99; N, 7.56, nalezeno: C, 77.80; H 5.76; N, 7.67

R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,56

T_t [°C]: 106-107 (107-108 [42])

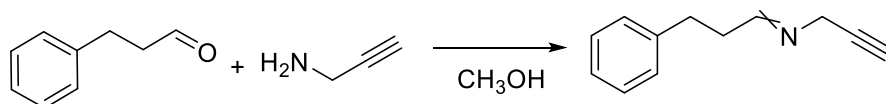
LogP: 1,73

6.3 Jednotlivé syntézy iminů (Schiffových bazí)

(E)-3-Fenyl-N-(prop-2-yn-1-yl)propan-1-imin [I_{1a}]

(Z)-3-Fenyl-N-(prop-2-yn-1-yl)propan-1-imin [I_{1b}]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

Do 5 ml methanolu bylo postupně přidáno 144,8 µl (0,0011 mol) hydrocinnamaldehydu (3-fenylpropanal) a 64,0 µl (0,001 mol) propargylaminu. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za teploty varu rozpouštědla po dobu 3 h, následně byla míchána přes noc za laboratorní teploty. Reakční směs byla purifikována pomocí LSC (SF: silikagel, MF: toluen/EtOAc v poměru 1:4 (V/V) z důvodu lepší separace izomerů při LSC). Jako produkt byly získány dvě viskózní hnědé olejovité kapaliny (jedná se o izomery). Syntéza se opakovala celkem dvakrát a až při druhém pokusu byly získány produkt.

Sumární vzorec: C₁₂H₁₃N

M_r: 171,24

Výtěžek (izomer I_{1a}): 62,0 mg (36 %)

Výtěžek (izomer I_{1b}): 55,0 mg (32 %)

Vzhled: hnědé viskózní kapaliny

NMR

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.13 (5H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 6.65 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, CH=N), 3.63 (s, 2H), 2.83-2.75 (5H, m, CH₂-Ar, CH₂-C≡, ≡C-H) [I_{1a}].

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 165.55, 140.36, 128.53, 128.24, 126.02, 81.02, 73.94, 34.34, 30.96, 29.56 [I_{1a}].

IČ [cm⁻¹]: 650, 699, 732, 908, 1029, 1116, 1181, 1453, 1497, 1659 (C=N), 2928 (C-H), 3025 (C-H_{ar}), 3297 [I_{1a}]

Elementární analýza: vypočteno: C, 84.17; H, 7.65; N, 8.18, nalezeno: C, 84.01; H 7.74; N, 8.33 [I_{1a}]

R_f (izomer I_{1a}) (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,57

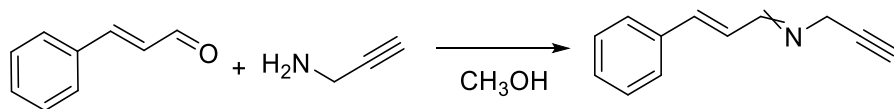
R_f (izomer I_{1b}) (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,78

LogP: 2,36

(1*E*,2*E*)-3-Fenyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)prop-2-en-1-imin [I2a]

(1*Z*,2*E*)-3-Fenyl-*N*-(prop-2-yn-1-yl)prop-2-en-1-imin [I2b]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

Do 5 ml methanolu bylo postupně přidáno 138,5 μ l (0,0011 mol) cinnamaldehydu a 64,0 μ l (0,001 mol) propargylaminu. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za teploty varu rozpouštědla po dobu 3 h, následně se ponechala směs míchala přes noc za laboratorní teploty. Směs byla purifikována pomocí LSC (SF: silikagel, MF: toluen/EtOAc v poměru 1:4 (V/V) z důvodu lepší separace isomerů při LSC). Produkty jsou dvě viskózní hnědé olejovité kapaliny (jedná se o izomery). Syntézy se opakovaly celkem dvakrát a až při druhém pokusu byl získán produkt.

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁N

M_r: 169,23

Výtěžek (izomer I2a): 74,0 mg (44 %)

Výtěžek (izomer I2b): 46,5 mg (28 %)

Vzhled: hnědé viskózní kapaliny

NMR

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (1H, dt, J = 8.4, 1.8 Hz, CH=N), 7.59-7.55 (2H, m, H₂, H₆), 7.48-7.30 (5H, m, H₃, H₄, H₅, CH₂-Ar), 6.85 (1H, dd, J = 16.0 Hz, 8.4 Hz, CH=N), 4.44 (2H, t, J = 2.2 Hz, CH₂), 2.52 (1H, d, J = 2.5 Hz, 1H) [I2a].

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 163.54, 141.31, 135.64, 129.39, 128.48, 127.05, 81.41, 73.21, 32.34 [I2a].

IČ [cm⁻¹]: 645, 652, 685, 698, 750, 968, 1450, 1494, 1673 (C=N), 3027 (C-H_{ar}), 3294 [I2a]

Elementární analýza: vypočteno: C, 85.17; H, 6.55; N, 8.28, nalezeno: C, 85.30; H 6.77; N, 8.39 [I2a]

R_f (izomer I2a) (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,56

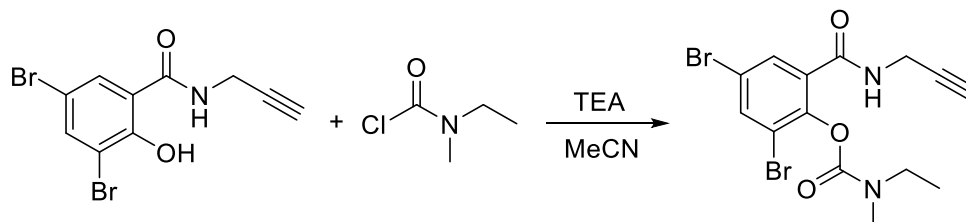
R_f (izomer I2b) (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,70

LogP: 2,34

6.4 Syntéza karbamátu

2,4-Dibrom-6-[(prop-2-yn-1-yl)karbamoyl]fenyl-(*N*-ethyl-*N*-methyl)karbamát [K1]

Reakční schéma:



Pracovní postup:

334,0 mg (0,001 mol) prekurzoru 3,5-dibrom-*N*-propargylsalicylamidu [A₆] bylo rozpuštěno v 10 ml suchého MeCN a za intenzivního míchání bylo přidáno 209,0 μl (0,0015 mol) TEA. Směs byla ponechána míchat až do vzniku homogenního roztoku při laboratorní teplotě a poté bylo najednou přidáno 408,0 μl (0,003 mol) *N*-ethyl-*N*-methylkarbamoylchloridu a reakční směs se ponechala míchat 6 h pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla a poté byla dále míchána 2 dny za laboratorní teploty. Směs byla následně odpařena na rotační vakuové odparce, převrstvena EtOAc a ponechala se krystalizovat při +4 °C. Precipitát (vzniklá sůl) byl odfiltrován a filtrát obsahující produkt byl purifikován pomocí LSC (SF: silikagel MF: toluen/EtOAc v poměru 4:1 V/V). Následně byl produkt rozpuštěný v mobilní fázi odpařen na rotační vakuové odparce, byl přidán EtOAc a následně *n*-hexan a reakční směs byla ponechána při -20 °C krystalizovat do druhého dne. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₄Br₂N₂O₃

M_r: 417,80

Výtěžek: 180,9 mg (43 %)

Vzhled: bílé krystaly

NMR

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H₆), 7.77 a 7.74 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H₄), 6.97 a 6.86 (1H, s, NH), 4.17 (2H, dd, *J* = 5.3, 2.6 Hz, N-CH₂-C≡), 3.55 a 3.45 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, N-CH₂), 3.16 a 3.05 (3H, s, N-CH₃), 2.24 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, ≡C-H), 1.31 a 1.24 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂-CH₃) (poměr ploch pod křivkou peaků je 1:1).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 163.64 a 163.62, 153.30 a 153.14, 145.09 a 144.92, 137.37, 133.05 a 132.93, 131.93 a 131.76, 119.55, 119.13 a 119.06, 78.85 a 78.83, 71.72 a 71.67, 44.73 a 44.53, 34.64 a 34.24, 29.65 a 29.58, 13.21 a 12.39.

IČ [cm^{-1}]: 633 (C-Br), 649 (C-Br), 714, 742, 1146, 1170, 1230, 1304, 1386, 1404, 1427, 1540 ($\text{C}=\text{C}_{\text{ar}}$), 1661 ($\text{C}=\text{O}$ amid), 1703 ($\text{C}=\text{O}$ ester), 1223, 2936 (C-H), 3240, 3296 (N-H)

Elementární analýza: vypočteno: C, 40.22; H, 3.38; N, 6.70, nalezeno: C, 40.35; H 3.19; N, 6.84

R_f (toluen/EtOAc; 4:1 V/V): 0,35

T_t [$^{\circ}\text{C}$]: 107,8-108

LogP: 3,12

7 Biologické hodnocení

7.1 Ellmanova metoda pro stanovení inhibice cholinesteráz

Prostřednictvím Ellmanovy metody lze stanovit hodnoty aktivity enzymů AChE a BuChE. Jedná se o velmi senzitivní metodu, která je založená na spektrofotometrickém, resp. kolorimetrickém měření. K měření se používá AChE získaná z erytrocytů (obvykle při měření biologické aktivity *in vivo*) nebo z paúhoře elektrického (při měření *in vitro*). Druhý enzym byl použitý k měření inhibičního potenciálu námi připravených sloučenin. Existují i další způsoby, kterými lze detekovat aktivitu AChE a BuChE, resp. účinnost jejich inhibitorů, mezi něž patří např. elektrometrické (měření elektrické vodivosti a permitivity), elektrochemické (polarografie, voltametrie, potenciometrie), titrační (měření změny pH s použitím indikátoru), radiometrické, fluorimetrické a enzymové metody. Avšak uvedené metody se běžně nepoužívají, jelikož jsou velmi náročné na přípravu a v rutinní praxi tedy nevýhodné. [32]

Hydrolýzou molekuly příslušného thiocholinu (AChE selektivně hydrolyzuje acetylthiocholin a BuChE selektivně štěpí butyrylthiocholin) vzniknou příslušné zbytky kyselin a thiocholin. Díky přítomnosti -SH skupiny ve vzniklém thiocholinu reaguje thiocholin s Ellmanovým činidlem, což je 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB), a výsledným produktem této reakce je 5-sulfanyl-2-nitrobenzoátový aniont, který se chová jako chromofor. Aniont je detekován spektrofotometrem s nastavenou vlnovou délkou 412 nm. [33] [35]

Ačkoli u Ellmanovy metody převažují pozitivita, jako jsou rychlost, finanční nenáročnost a jednoduchost, má ale i své nevýhody především při měření biologické aktivity v klinické praxi *in vivo* v plné krvi, například ve vojenských nemocnicích. Absorpční maximum chromoforu je při 412 nm, ale při stejné vlnové délce absorbuje i přítomný hemoglobin. Aby se odstranila tato možnost chyby, před měřením se krev hodně naředí. [35]

K získání hodnot biologických aktivit (IC_{50}) našich sloučenin byla použita Ellmanova metoda *in vitro*, a to díky paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., která pracuje na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice na Katedře biologických a biochemických věd. Použitá AChE byla získána z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*), BuChE z koňského séra (Sigma-Aldrich/Merck).

Hodnota IC_{50} je definována jako schopnost sloučeniny inhibovat aktivitu enzymu o 50 % (tj. aktivita enzymu klesne na polovinu), tato hodnota se vyjadřuje v koncentraci inhibitoru. Účinnost lze vyjádřit i jako záporný dekadický logaritmus molární koncentrace inhibitoru, která

docílí 50 % inhibici enzymu ($pI_{50} = -\log IC_{50}$). [37]

Sloučeniny, které se používají při měření, jsou Ellmanovo činidlo (DTNB), fosfátový pufr (pH 7,4), acetylthiocholin, enzymy (AChE, BuChE) a příslušné připravené potenciální inhibitory. Při stanovení IC_{50} se měří nejdříve „blank“ neboli slepý roztok, který obsahuje činidlo, pufr a AChE, dále roztok bez inhibitoru obsahující činidlo, pufr, AChE a acetylthiocholin a poslední měřený roztok obsahuje vše, co bylo přítomno v předchozím roztoku včetně inhibitoru (naše produkty). Jakmile se přidá enzym, proběhne okamžitě reakce a měří se absorbance v závislosti na čase (70 s). [36]

Zjištěné výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1.

7.2 Výsledky měření aktivity sloučenin Ellmanovou metodou

Tabulka 1 Hodnoty IC_{50} a SI sloučenin vůči AChE a BuChE

| Kód sloučeniny | IC_{50} AChE [μ M] | IC_{50} BuChE [μ M] | SI | Název sloučeniny |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|--------------|---|
| A ₁ | 74,31±2,04 | 153,38±7,83 | 2,06 | <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₂ | 107,60±4,62 | 494,17±2,31 | 4,59 | 4-chlor- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₃ | 80,52±3,47 | 170,21±12,58 | 2,11 | 5-chlor- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₄ | 79,73±1,35 | 154,76±6,3 | 1,94 | 3,5-dichlor- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₅ | 8,052±3,70 | 99,77±9,40 | 12,39 | 5-brom- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₆ | 102,42±5,19 | 162,56±2,29 | 1,59 | 3,5-dibrom- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)salicylamid |
| A ₇ | 78,91±0,98 | 160,29±14,75 | 2,03 | 5-bromosalicylát prop-2-yn-1-ylamonia |
| A ₈ | 163,04±2,26 | 287,86±15,56 | 1,77 | 2-(prop-2-yn-1-ylkarbamoyl)fenyl-acetát |
| A ₉ | 130,00±2,31 | 226,54±21,29 | 1,74 | 5-brom-2-methoxy- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)benzamid |
| A ₁₀ | 23,16±0,39 | 98,73±4,63 | 4,26 | <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)benzamid |
| A ₁₁ | 71,79±0,25 | 115,36±0,87 | 1,61 | 3-fenyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)propanamid |
| A ₁₂ | 62,36±0,24 | 100,94±9,80 | 1,62 | <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)cinnamamid |
| I _{1a} | 211,78±1,35 | 33,44±2,57 | 0,17 | (<i>E</i>)-3-fenyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)propan-1-imin |
| I _{1b} | 199,45±3,62 | 32,74±0,23 | 0,16 | (<i>Z</i>)-3-fenyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)propan-1-imin |
| I _{2a} | 72,48±2,73 | 161,13±1,83 | 2,22 | (1 <i>E</i> ,2 <i>E</i>)-3-fenyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)prop-2-en-1-imin |
| I _{2b} | 247,96±23,84 | 98,98±8,41 | 0,40 | (1 <i>Z</i> ,2 <i>E</i>)-3-fenyl- <i>N</i> -(prop-2-yn-1-yl)prop-2-en-1-imin |

| | | | | |
|----------------------|------------|-------------------|------|--|
| K₁ | 86,50±3,65 | 25,10±0,31 | 0,29 | 2,4-dibrom-6-[(prop-2-yn-1-yl)karbamoyl]fenyl-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -methyl)karbamát |
| Rivastigmin | 56,10±1,41 | 38,40±1,97 | 0,68 | [(<i>S</i>)-1-(dimethylamino)ethyl]fenyl-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -methyl)karbamát |

8 Diskuze

Celkový počet všech připravených sloučenin je sedmnáct, z nichž čtyři sloučeniny (dvojice **I1a** a **I1b**, **I2a** a **I2b**) jsou vzájemné stereoizomery, z původně plánovaných dvanácti sloučenin (**A1-A3**; **A5**, **A7**, **A8**, **A10**, **A11**, **A12**, **I1a**, **I2a**, **K1**). Dvanáct (**A2-A7**, **A9**, **I1a**, **I1b**, **I2a**, **I2b**, **K1**) molekul z toho je originálních. Další sloučeniny byly připraveny operativně na základě výsledků průběžného biologického hodnocení. Všechny sloučeniny obsahují vždy propargylaminovou část odvozenou od léčiv selegilinu a rasagilinu.

Deset sloučenin (**A1-A9**; **K1**) obsahuje základní strukturu odvozenou od kyseliny salicylové, která byla různými způsoby modifikována. Kromě tvorby *N*-propargylamidů se jednalo jednak o tvorbu esteru, resp. karbamátu (**A8**, **K1**), *O*-methylace (**A9**) a zavedení jednoho či dvou atomů halogenu (**A2-A7**, **A9**, **K1**).

Jedním z problémů byla syntéza pilotních amidů (**A1-A4**), kdy reakce probíhaly s malými výtěžky. K přípravě amidů byly proto zkoušeny a využity tři metody: 1) reakce příslušného surového acyl chloridu připraveného v prvním reakčním kroku pomocí chloridu thionylu s propargylaminem v přítomnosti terciární báze (triethylamin, TEA); 2) *in situ* reakce chloridu kyseliny vytvořeného pomocí PCl_3 s propargylaminem; 3) reakcí volné kyseliny s aminem v přítomnosti karbodiimidu a hydroxybenzotriazolu. Nejlepšími metody byla druhá a třetí metoda, přičemž se získal nejvyšší výtěžek a reakce probíhaly hladce bez komplikací. Syntézy prováděné první metodou probíhaly nejhůře a prodělaly řadu neúspěchů. Výtěžky první metody byly v rozmezí 35-54 %, druhé vždy 100 % a poslední metody byly v rozmezí 53-100 %. Neosvědčila se ani reakce kyseliny salicylové a propargylaminu v pyridinu za přítomnosti PCl_3 (opakováno dvakrát), neúspěšné byly i pokusy o mikrovlnnou syntézu. Při nasazení reakční směsi (kyselina, amin, PCl_3 , jako rozpouštědlo chlorbenzen) do mikrovlnného reaktoru nedošlo i přes zvýšení teploty a prodloužení doby reakce k úplnému rozpuštění všech sloučenin, tudíž ani k reakci. Sloučenina **A2** tak po mnoha neúspěšných pokusech s modifikací reakčních podmínek nakonec musela být připravena EDC couplingem.

Dalším problémem byla purifikace sloučenin. Sloučenina **A8** (ester) byla hydrolyticky labilní v kyselém prostředí. U některých sloučenin (**A1-A4**, **A8**, a níže diskutované sloučeniny **I1a**, **I1b**, **I2a**, **I2b**, **K1**) se nedalo indukovanou krystalizací EtOAc s *n*-hexanem (či jinými rozpouštědly) ani následnou rekrystalizací získat zcela čistý produkt. Nakonec nejlepším řešením byla purifikace prostřednictvím LSC. Při LSC čištění sloučeniny **A8** byl použit TEA jakou součást mobilní fáze pro zachování bazického prostředí. I přes značné ztráty (jednak adsorpcí na sloupci, jednak parciální hydrolyzou v případě esteru **A8** a karbamátu **K1**) získané produkty

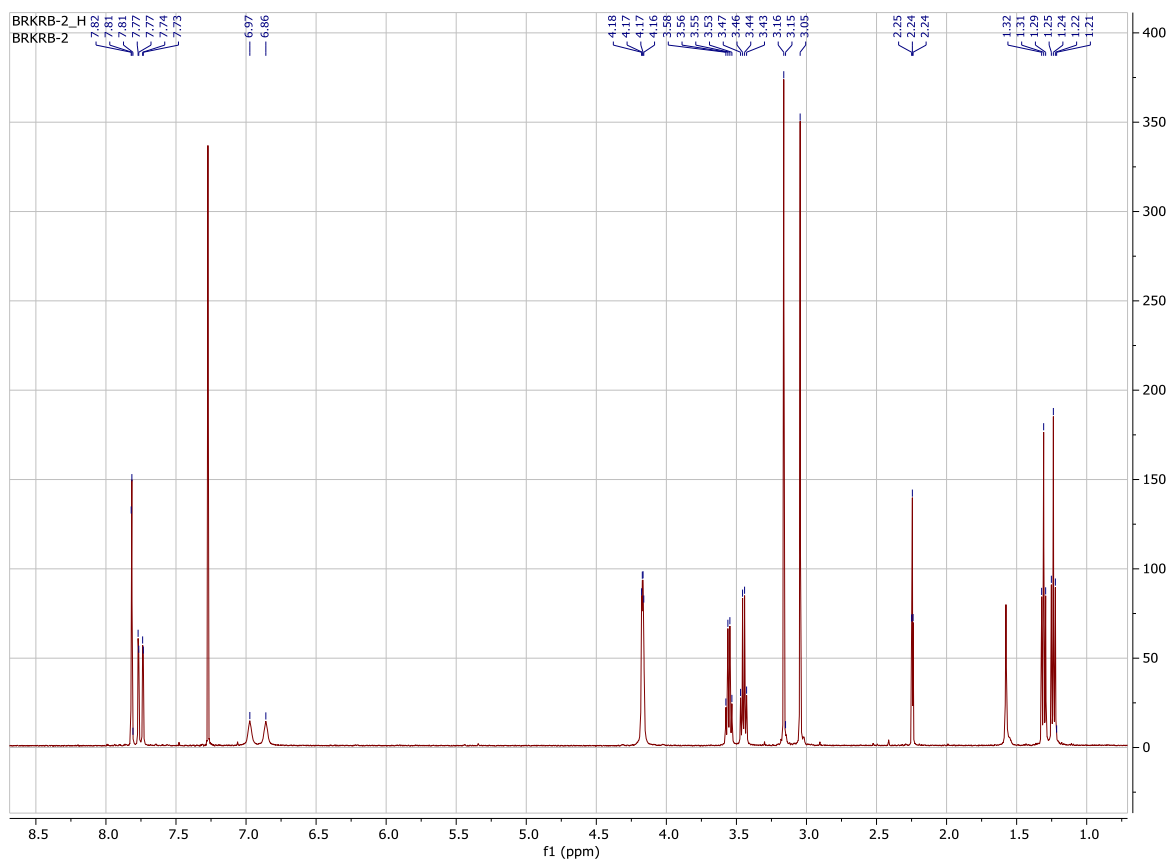
byly pokaždé získány ve velmi vysoké čistotě.

Problémy se vyskytly také při přípravě Schiffových bazí (iminy **I**_{1a}, **I**_{1b}, **I**_{2a} a **I**_{2b}), jelikož jsme předpokládali, že produkty budou krystalické. Avšak po několika neúspěšných indukovaných krystalizacích a rekrystalizací jsme vyvodili, že se o pevné látky jednat nebude. Také jsme zjistili, že při reakci vznikají geometrické izomery na iminové vazbě (*E* a *Z*). Při TLC jsme se domnívali, že druhá, menší skvrna je vedlejší produkt, nicméně po úspěšné separaci obou produktů (LSC) jsme spektrálními metodami (především NMR) zjistili, že se jedná o izomery. V přehledu připravených sloučenin jsou popsány spektry vždy termodynamicky stálejší *E*-izomery, které se podařilo získat čisté, kdežto *Z*-izomery měly obecně menší čistotu. I přesto byly biologicky testovány.

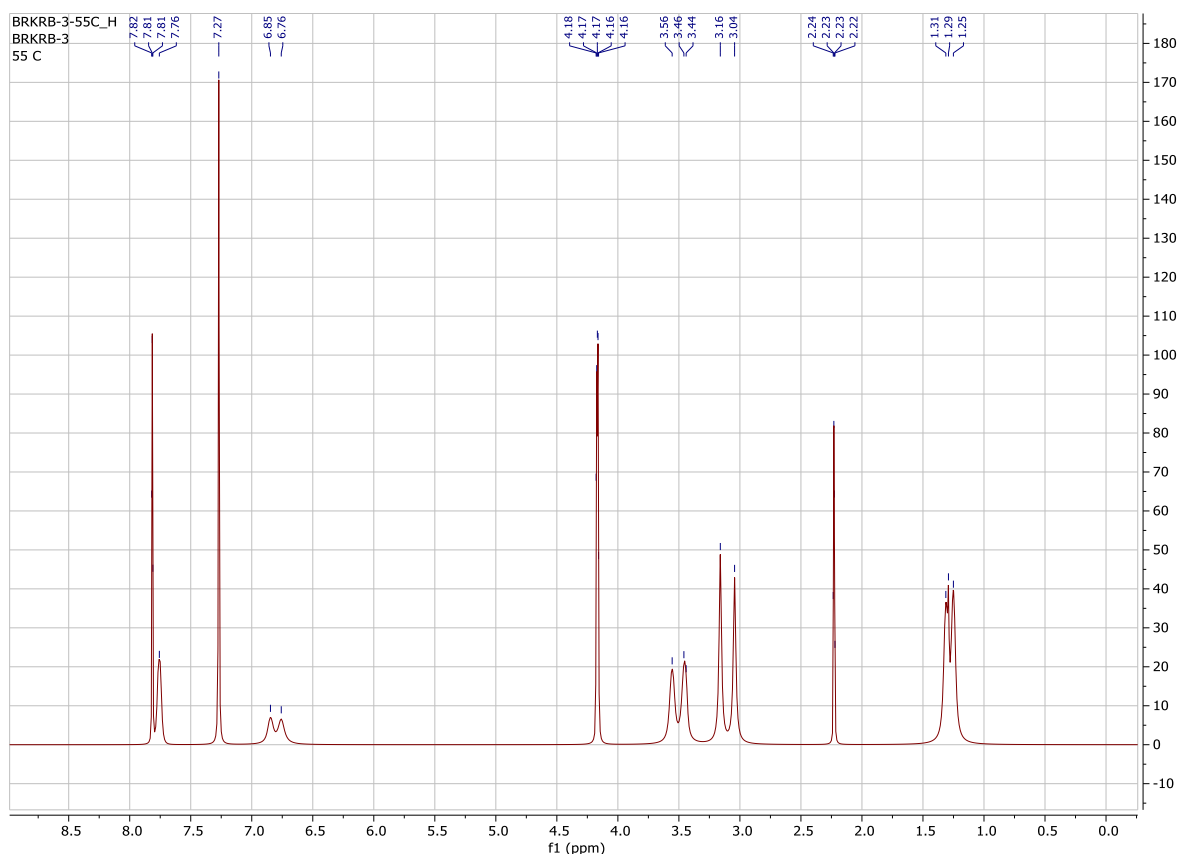
Vybraný *N*-propargylsalicylamid (bromovaný amid **A**₆) byl reakcí s *N*-ethyl-*N*-methylkarbamoylchloridem v přítomnosti TEA převeden na příslušný karbamát (**K**₁) s 43% výtěžkem.

V NMR spektrech (*N*-ethyl-*N*-methyl)karbamátu **K**₁ (ilustrativní ¹H NMR spektrum derivátu **K**₁ změřené v CDCl₃ při 25 °C je na Obrázku 14) jsme zaznamenali zdvojené signály alkyků na karbamátovém dusíku způsobené omezenou rotací karbamátové CO-N vazby, která má částečně charakter dvojně vazby. [43] Ve spektrech byly ale zřetelné navíc i zdvojené signály další vodíků (N-H, vodík na C4), poměry ploch pod křivkou peaků odpovídají přibližně 1:1. Na spektru téhož derivátu v CDCl₃ změřeném při teplotě 55 °C (Obrázek 15) dochází ke splývání původně zdvojených signálů (N-H, *N*-alkyly) nebo již splynuly (H4). Pokud bylo ke měření spekter použito rozpouštědlo vytvářející vodíkové můstky (deuterovaný aceton), byly zdvojené pouze signály podle očekávání odpovídající metylu a ethylu, ne však N-H ani C-H vodíkům. Proto se i přes zdvojené některé signály v CDCl₃ spektru jedná o jednu sloučeninu vyskytující se za laboratorní teploty ve dvou isomerech. Ty se od sebe energií příliš neliší (zahřátím roztoku isomerie mizí, ochlazením se opět objevuje; rovnovážný poměr odpovídá zhruba 1:1) a jsou stabilizovány vodíkovými můstky.

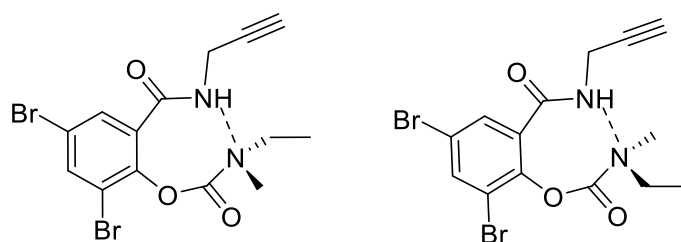
Na základě analogie s přechozími pracemi [44] [45] se domníváme, že se pravděpodobně jedná o dva konformační izomery (konformery). Předpokládáme, že dochází ke tvorbě vodíkového můstku mezi karbamátovým a amidovým dusíkem, čímž se uzavírá pseudocyklický útvar substituovaný na karbamátovém dusíku dvěma různými malými alkyly. Ty mohou být orientovány dvěma odlišnými směry (Obrázek 16). Dodáním energie (zahřátí) dojde k zániku vodíkového můstku, je umožněna volná rotace, a proto vymizí i zdvojené signály, stejně jako v případě použití rozpouštědla schopného vytvářet vodíkové můstky v roli akceptoru.



Obrázek 14 ^1H NMR spektrum sloučeniny K_1 (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C)



Obrázek 15 ^1H NMR spektrum sloučeniny K_1 (500 MHz, CDCl_3 , 55 °C)



Obrázek 16 Navržené konformery K_1

Šest (**A11**, **A12**, **I1a**, **I1b**, **I2a**, **I2b**) sloučenin má strukturu odvozenou od derivátů kyseliny skořicové (kyselina skořicová a její aldehyd, jejich dihydrogenovaná analoga), jedna sloučenina (**A10**) je odvozená od kyseliny benzoové. Sloučenina **A11** vznikla reakcí hydrocinnamoylchloridu s propargylaminem za přítomnosti TEA s 52% výtěžkem, sloučenina **A12** vznikla EDC couplingem s 68% výtěžkem a Schiffovy baze (iminy **I1a**, **I1b**, **I2a**, **I2b**) vznikly reakcí příslušných aldehydů s propargylaminem s výtěžky 68-71 %. Tyto syntézy (kromě sloučeniny **A12**) se musely opakovat z důvodu komplikované purifikace a nečistoty produktů. Sloučenina **A10** vznikla reakcí chloridu kyseliny benzoové s propargylaminem za přítomnosti TEA, tato reakce proběhla bez komplikací s 97% výtěžkem.

Pomocí Ellmanovy metody byly získány hodnoty biologické aktivity, tj. inhibiční schopnost

daných sloučenin vůči enzymům AChE a BuChE. Nejlepší hodnoty IC_{50} vůči AChE vykazovaly dvě sloučeniny: **A5** (8,052 μ M) a **A10** (23,16 μ M), což jsou mnohem lepší hodnoty než v případě léčiva rivastigminu (56,1 μ M).

Předpokládali jsme, že sloučenina obsahující *O*-karbamátovou funkční skupinou (**K1**, BuChE 25,1 μ M) bude vykazovat nejlepší inhibiční účinek vůči AChE a BuChE, ale měřením bylo zjištěno, že vystupňované účinnosti bylo dosaženo pouze vůči druhému enzymu; jedná se v souladu s předpoklady o její neúčinnější inhibitor. Hodnota IC_{50} vůči BuChE léčiva rivastigminu je 38,4 μ M. Vůči AChE tedy karbamoylace aktivitu nijak podstatně nezlepšuje.

Je zajímavé, že jedna dvojice izomerů (sloučeniny **I2a**, **I2b**) vykazovala odlišnou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. Tyto sloučeniny (**I2a** vůči AChE 72,48 μ M, BuChE 161,13 μ M, **I2b** vůči AChE 247,96 μ M, BuChE 98,98 μ M) s odlišnou geometrickou izomerií na dvojně vazbě měly odlišné hodnoty IC_{50} . U dvojice izomerů **I1a** a **I1b** lze říci, že získané aktivity pro oba enzymy byly prakticky identické, a vykazovaly dobrý inhibiční účinek vůči BuChE (32,7-33,4 μ M).

Překvapením byla i zjištěná hodnota IC_{50} soli **A7** vůči AChE (78,91 μ M).

Dalším zajímavým poznatkem je fakt, že poloha, počet a druh substituujícího halogenu na salicylovém jádře podstatně ovlivňuje hodnoty IC_{50} vůči AChE. Sloučenina **A3** (vůči AChE 80,52 μ M) s chlorem na C-5 má lepší hodnotu IC_{50} než v případě chloru na C-4 **A2** (vůči AChE 107,6 μ M). Sloučenina **A5**, která vyazuje nejlepší inhibiční účinek vůči AChE v celé sérii, má na svém aromatickém jádře jeden brom na C-5, avšak sloučenina **A6** (vůči AChE 102,42 μ M, vůči BuChE 162,56 μ M), která je substituovaná dvěma atomy bromu, a to na C-3 a C-5, má více než desetinásobně menší biologickou aktivitu vůči AChE a takřka o polovinu nižší inhibiční účinek vůči BuChE. V každém případě je pro inhibici obou ChE výhodná substituce salicylového jádra halogenem v poloze 5. V případě monosubstituce je výhodnější brom, ale u 3,5-disubstituce vede k lepším aktivitám chlor.

Amidová vazba se ukázala být lepší než iontová (**A5** vs. **A7**). Acetylce i methylce salicylového hydroxyly vedou k poklesu aktivity (**A1** AChE 74,31 μ M vs. **A8** AChE 163,04 μ M); **A5** AChE 8,05 μ M vs. **A9** pro AChE 130,00 μ M), což ukazuje na důležitost tohoto strukturního motivu salicylových derivátů. Délka spojovacího alifatického řetězce hraje také významnou roli, kratší řetězec vykazuje lepší inhibiční účinek vůči AChE i BuChE (**A10**, AChE 23,16 μ M, BuChE 98,73 μ M vs. **A11**, AChE 91,97 μ M, BuChE 115,36 μ M) a **A12** (AChE 62,36 μ M, BuChE 100,94 μ M). Větší množství dvojných vazeb vykazují lepší inhibiční účinek vůči AChE (**I2a** vs. **I1a** a **I1b**). Vůči BuChE je toto pravidlo dvojných vazeb naopak (**I1a** a **I1b** vs **I2a** a

I_{2b}). Většina amidů má lepší inhibiční účinek na AChE než BuChE. Sloučenina **I_{2a}** jako jediný imin má s amidy srovnatelnou účinnost vůči AChE.

Podle hodnot IC_{50} našich připravených sloučenin lze obecně konstatovat, že pokud sloučenina vykazuje značně dobrou inhibiční aktivitu vůči AChE, tak k BuChE nikoli a naopak.

Index selektivity je definován jako selektivitu inhibitorů vůči AChE. Vypočítá se jako poměr IC_{50} BuChE/ IC_{50} AChE. Pokud je hodnota SI sloučeniny nad 10, vykazuje selektivitu pro AChE, hodnota pod 0,1 značí selektivitu pro BuChE. V našem případě pouze jedna sloučenina **A₅** vykazuje (s hodnotou SI 12,39) selektivitu vůči AChE. Ostatní sloučeniny mají hodnoty pod 10 a žádná sloučenina nevykazuje selektivitu pro BuChE. Sloučeniny **I_{1a}** (SI 0,17) a **I_{1b}** (SI 0,16) měly hodnoty nejbliže k hodnotě 0,1 značící selektivitu pro BuChE.

9 Závěr

Byly připraveny všechny sloučeniny, které byly naplánovány. Reakční postupy byly sice v průběhu jejich přípravy pozměněny kvůli ne zcela uspokojivým iniciálním výtěžkům, avšak cílové produkty byly získány v dostatečném množství pro všechna potřebná měření (NMR, IČ, teplota tání, elementární analýza, IC_{50}) i jako prekurzor pro syntézu karbamátů v dalším kroku. Všechny připravené deriváty byly také biologicky otestovány a na základě výsledků byly stanoveny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. Některé sloučeniny mají slibnou *in vitro* aktivitu vůči cholinesterázám.

Vzhledem k přítomnosti propargylaminového fragmentu je v plánu i testování jako potenciálních inhibitorů MAO-B.

10 Literatura

1. HOLMEROVÁ, Iva, Michaela BAUMANOVÁ a Božena JURAŠKOVÁ. Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia*, **2014**, 2014(6), 474-478.
2. Alois Alzheimer. *Biography.com* [online]. **2014** [cit. 2018-08-03]. Dostupné z: <https://www.biography.com/people/alois-alzheimer-21216461>
3. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Praha: Karolinum, **2004**. ISBN 8024608502.
4. SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Triton, **2010**. ISBN 9788073874247.
5. MAČÁK, Jiří a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. Praha: Grada, **2004**. ISBN 8024707853.
6. KATZUNG, G. Bertram ed. *Základní & klinická farmakologie*. Jinočany: H & H, **1995**. Lange Medical Book. ISBN 8085787350.
7. KALOUSOVÁ, Marta. *Patobiochemie ve schématech*. Praha: Grada, **2006**. ISBN 8024715228.
8. MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. Praha: H & H, **1998**. Lange Medical Book. ISBN 8085787385.
9. *Zpráva o stavu demence*. Praha: Česká alzheimerovská společnost, **2016**. ISBN 9788086541501.
10. HOLMEROVÁ, Iva, Eva JAROLÍMOVÁ a Helena NOVÁKOVÁ. *Alzheimerova choroba v rodině*. [online] Praha: Pfizer, **2004** [cit. 2018-08-04]. Dostupné z: <https://www.pfizer.cz/sites/g/files/g10034146/f/201606/Alzheimerova-nemoc-v-rodine-2008.pdf>
11. BRUNOVSKÝ, Martin. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, **2007**, 2007(2), 112-117.
12. VALIŠ, Martin, Filip CAISBERGER a Libor ŠIMŮNEK. Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia*, **2014**, 2014(6), 396-399.
13. PRINCE, Martin, Adelina COMAS-HERRERA a Martin KNAPP. World Alzheimer report 2016. *Alzheimer's Disease International* [online]. London: Alzheimer's Disease International, **2016** [cit. 2018-08-04]. Dostupné z: <https://www.alz.co.uk/>
14. DEUTCH, Ariel. Neurotransmitters. *Fundamental Neuroscience*, **2013**(6), 117-138.
15. ATERMAN, Kurt. A Historical Note on the Iodine-Sulphuric Acid Reaction of Amyloid. *Histochemistry*, **1976**, 49(2), 131-143.
16. KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, **2011**. ISBN 9788024730684.

17. HROUDOVÁ, Jana. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*, **2017**, 13(2E), 3-10.
18. VYSKOČIL, František. Acetylcholin hodný a zlý. *Vesmír*, **2009**, 88(153), 153-154.
19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=17233, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/17233> [cit. 2018-08-10].
20. ČOLOVIĆ, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIĆ a Tamara D. LAZAREVIĆ-PAŠTI. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, **2013**, 11(3), 315–335.
21. DÓCI, Ivan, Aneta BEDNÁŘOVÁ a Jana VANČÍKOVÁ. Rivastigmin v léčbě demencie pri Alzheimerovej chorobe-prehľad aktuálnej odbornej literatúry. *PSYCHIATRIA-PSYCHOTERAPIA-PSYCHOSOMATIKA*, **2013**, 20(4), 16-19.
22. JIRÁK, Roman a Kateřina VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia*, **2003**, 13(6), 372-378.
23. JIRÁK, Roman. Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí. *Česká a slovenská psychiatrie*, **2015**, 111(3), 127-132.
24. POHANKA, Miroslav. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the the Faculty of Medicine of Palacký University*, **2011**, 155(3), 219-220.
25. NAGAENDRAN, Kandiah, Ming-Chyi PAI a Vorapun SENANARONG. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular demetia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*, **2017**, 2017(12), 697-707.
26. PATOČKA, Jiří, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. Ladostigil-další snaha o dualistické kognitivum. *Psychiatrie*, **2013**, 17(2), 71-73.
27. KRÁTKÝ, Martin, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína VORČÁKOVÁ, Jarmila VINŠOVÁ a Markéta ŠVARCOVÁ. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules*, **2016**, 21(2), 291.
28. IMRAMOVSKY, Ales, Sarka STEPANKOVA, Jan VANCO, Karel PAUK, Juana MONREAL-FERRIZ, Jarmila VINSOVA a Josef JAMPILEK. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Salicylanilide *N*-Alkylcarbamates and Their Molecular Docking. *Molecules*, **2012**, 17(9), 10142-10158.
29. VINŠOVÁ, Jarmila, Martin KRÁTKÝ, Markéta KOMLÓOVÁ, Echchukattula DADAPEER, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Katarína VORČÁKOVÁ a Jiřina STOLAŘÍKOVÁ.

Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterase Inhibition. *Molecules*, **2014**, 19(6), 7152-7168.

30. GEORGE, Roshni C., John LEW a Donald J. GRAVES. Interaction of Cinnamaldehyde and Epicatechin with Tau: Implications of Beneficial Effects in Modulating Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2013**, 36(1), 21-40.

31. PETERSON, Dylan W., Roshni C. GEORGE, Francesca SCARAMOZZINO, Nichole E. LAPOINTE, Richard A. ANDERSON, Donald J. GRAVES a John LEW. Cinnamon Extract Inhibits Tau Aggregation Associated with Alzheimer's Disease In Vitro. *Journal of Alzheimer's Disease*, **2009**, 17(3), 585-597.

32. CINTI, Stefano, Clarissa MINOTTI, Danila MOSCONE, Giuseppe PALLESCHI a Fabiana ARDUINI. Fully integrated ready-to-use paper-based electrochemical biosensor to detect nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*, **2017**, 93(1), 46-51.

33. JOŃCA, Joanna, Monika ŻUK, Bartosz WASĄG, Anna JANASZAK-JASIECKA, Krzysztof LEWANDOWSKI, Bartosz WIELGOMAS, Krzysztof WALERON, Jacek JASIECKI a Kent VRANA. New Insights into Butyrylcholinesterase Activity Assay: Serum Dilution Factor as a Crucial Parameter. *PLOS ONE*, **2015**, 10(10), 0139480.

34. OREL, Miroslav. *Psychopatologie: nauka o nemocech duše*. Praha: Grada, **2016**. Psyché. ISBN 978-80-247-5516-8.

35. ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, Kamil KUČA, Daniel JUN a Jiří BAJGAR. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků. *Chemické listy*, **2010**, 104(1), 46-50.

36. ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Stanovení aktivity AChE ELM: Protokol k laboratorním praktikám z biochemie*. Fakulta chemicko-technologická v Pardubicích [cit. 2018-12-04].

37. ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka. *Stanovení IC₅₀: Protokol k laboratorním praktikám z biochemie*. Fakulta chemicko-technologická v Pardubicích [cit. 2018-12-04].

38. FREEDMAN, Jules a Edward W. HUBER. An unusual oxazole formation. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1990**, 27(2), 343-346.

39. POH, Jian-Siang, Szabolcs MAKAI, Timo VON KEUTZ, Duc N. TRAN, Claudio BATTILOCCHIO, Patrick PASAU a Steven V. LEY. Rapid Asymmetric Synthesis of Disubstituted Allenes by Coupling of Flow-Generated Diazo Compounds and Propargylated Amines. *Angewandte Chemie International Edition*, **2017**, 56(7), 1864-1868.

40. KRASAVIN, Mikhail, Alexei LUKIN, Tatiana VEDEKHINA, Olga MANICHEVA, Marine DOGONADZE, Tatiana VINOGRADOVA, Natalia ZABOLOTNYKH, Elizaveta

ROGACHEVA, Liudmila KRAEVA a Piotr YABLONSKY. Conjugation of a 5-nitrofuranyl moiety to aminoalkylimidazoles produces non-toxic nitrofurans that are efficacious in vitro and in vivo against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, 157, 1115-1126.

41. HASSAN, Sidra, Roxanne TSCHERSICH a Thomas J.J. MÜLLER. Three-component chemoenzymatic synthesis of amide ligated 1,2,3-triazoles. *Tetrahedron Letters*, **2013**, 54(35), 4641-4644.

42. RAJAGOPAL, Basker, Ying-Yu CHEN, Chun-Chi CHEN, Xuan-Yu LIU, Huei-Ren WANG a Po-Chiao LIN. Cu(I)-Catalyzed Synthesis of Dihydropyrimidin-4-ones toward the Preparation of β - and β 3 -Amino Acid Analogues. *Journal of Organic Chemistry*, **2014**, 79(3), 1254-1264.

43. SMITH, Bradley D., DeeAnne M. GOODENOUGH-LASHUA, Carlisle J.E. D'SOUZA, Kieran J. NORTON, Leslie M. SCHMIDT a James C. TUNG. Substituent effects on the barrier to carbamate C–N rotation. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45(13), 2747-2749.

44. VAN EST-STAMMER, R. a J. B. F. N. ENGBERTS. Hindered internal rotation in carbamates: An NMR study of the conformations of alkyl and aryl N-(alkylsulfonylmethyl)-N-methylcarbamates and aryl N-(arylsulfonylmethyl)-N-methylcarbamates. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **1971**, 90(12), 1307-1319.

45. JAKLOVÁ, Karolína. Syntéza a charakterizace inhibitorů cholinesteras na bázi hydroxybenzoových kyselin. [online] Ústí nad Labem, **2018**. Diplomová práce. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Martin Krátký, Ph.D. Dostupné z: <https://theses.cz/id/w7py55/DP.K.Jaklova.pdf>