

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko – technologická

Katedra biologických a biochemických věd

**DERIVÁTY *N*-BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ
A JEJICH INHIBICE CHOLINERGNÍCH ENZYMŮ**

Bc. Barbora Hamáková

Diplomová práce

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
Faculty of Chemical Technology
Department of Biological and Biochemical Sciences

**DERIVATES OF *N*-BENZYL-2-
HYDROXYBENZAMIDES AND THEIR
INHIBITION OF CHOLINERGIC ENZYMES**

Bc. Barbora Hamáková

Thesis

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Hamáková**
Osobní číslo: **C10911**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Deriváty N-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich inhibice cholinergních enzymů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Na základě literární rešerše shrnout možnosti syntézy N-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich popsané biologické vlastnosti.
2. Stručně popsat význam tzv. cholinergních enzymů pro lidský organismus včetně jejich inhibice.

Praktická část:

1. Provést syntézu vybraných substitučních derivátů N-benzyl-2-hydroxybenzamidů v množství a čistotě dostačujícího pro in vitro testování biologické aktivity.
2. Charakterizovat připravené látky (bod tání, Retenčním faktorem R_f pro dvě různé soustavy, Nukleární magnetickou rezonancí, Infračervenou spektroskopií, elementární analýzou, a dle možností hmotnostní spektrometrií).
3. U známých látek porovnat jejich charakteristiky s literaturou.
Porovnat schopnosti výchozích N-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich derivátů (estery, karbamáty, benzoxaziny) inhibovat acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu.

Rozsah grafických prací: **max. 10 tabulek, max. 10 obráz**

Rozsah pracovní zprávy: **50 stran**


Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:


Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 4. 2012

Barbora Hamáková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu práce, Ing. Alešovi Imramovskému, Ph.D., za jeho ochotu, trpělivost a odborné vedení při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Šárce Štěpánkové Ph.D. za ochotu, trpělivost a konzultace ohledně biochemické části diplomové práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a trpělivost při studiu.

SOUHRN

Bylo syntetizováno 16 derivátů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, z nichž 12 látek je originálních. Připravené deriváty byly charakterizovány bodem tání a NMR analýzou, čistota látek byla ověřena elementární analýzou.

Deriváty byly testované na inhibici cholinergních enzymů, acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Vypočítané hodnoty IC_{50} ukazují, že deriváty mají průměrnou inhibiční aktivitu.

Klíčová slova: *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidy, Alzheimerova choroba, inhibice cholinesteras, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa

SUMMARY

16 derivatives of *N*-benzyl-2-hydroxybenzamides were synthesized, 12 of which are original compounds. Prepared derivatives were characterized by melting points and NMR analysis, purity of compounds was verified with elementary analysis.

Derivates were tested for inhibition of cholinergic enzymes, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. The calculated values of IC_{50} indicate that derivatives have an average inhibitory effectiveness.

Key words: *N*-benzyl-2-hydroxybenzamides, Alzheimer's disease, inhibitors of cholinesterases, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(AcO) ₂ O	Anhydrid kyseliny octové
Ac ₂ O	Anhydrid kyseliny octové
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
ACN	Acetonitril
AcOH	Kyselina octová
AD	Alzheimerova choroba
AEP	Aktivita enzymového preparátu
ACH	Acetylcholin
ACHE	Acetylcholinesterasa
ACHEI	Acetylcholinesterasový inhibitor
Ala	Alanin
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanová kyselina
APLP1	Název homologu amyloidního prekurzorového proteinu
APLP2	Název homologu amyloidního prekurzorového proteinu
APP	Amyloidní prekurzorové proteiny
ATCH	Acetylthiocholin jodidu
Aβ	Amyloidní beta plaky
BCH	Butyrylcholin
BCHE	Butyrylcholinesterasa
CAS	katalytické anionické místo
CICOOEt	Ethyl chloroformiát
DCI	<i>N,N'</i> -Dicyklohexylkarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNTB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EP	Enzymový preparát
Et ₃ N	Triethylamin
FDA	Úřad pro potraviny a léčiva
GAG	Glykosaminoglykan

Glu	Kyselina glutamová
Gly	Glycin
His	Histidin
HOBt	1-hydrobenzotriazol
CHE	Cholinesterasa
CHEI	Cholinesterasovy inhibitor
CHN	Elementární analýza
INH	Isoniazid
MAO	Monoaminové oxidasy
MAPT	Tau protein asociovaný s mikrotubuly
MCI	Mírná kognitivní choroba
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MTC	Methylthionium chlorid
MW	Mikrovlnná syntéza
NFT	Neurofibrilární spleti
NMDA	<i>N</i> -methyl D-aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
RVO	Rotační vakuová odparka
Ser	Serin
TEA	Triethylamin
TCH	Thiocholin
TLC	Tenkovrstvá kapalinová chromatografie
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin

OBSAH

1.	ÚVOD.....	15
2.	TEORETICKÁ ČÁST – N-BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDY	16
2.1.	SYNTÉZA <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ	16
2.1.1.	Možnosti syntézy <i>N</i> -benzyl-2-hydroxybenzamidů	16
2.1.1.1.	Vysokoteplotní syntézy bez použití rozpouštědel.....	16
2.1.1.2.	Přímá termální metoda syntézy	17
2.1.1.3.	Klasické metody syntézy	18
2.1.1.4.	Obměna klasické syntézy využívající reakce chloridu kyseliny.....	19
2.1.1.5.	Metoda využívající reakce acyl chloridu	20
2.1.1.6.	Mikrovltná syntéza <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	20
2.1.2.	Možnosti syntézy <i>O</i> -derivátů <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	21
2.1.2.1.	<i>O</i> -acetyly <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	21
2.1.2.2.	<i>O</i> -benzoxaziny <i>N</i> -benzylbenzamidů	21
2.1.2.3.	<i>O</i> -karbamáty <i>N</i> -benzylbenzamidů	23
2.1.2.4.	<i>O</i> -estery <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	23
2.2.	TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY <i>N</i> -BENZYL BENZAMIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ	24
2.2.1.	Antifungální aktivita <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	24
2.2.2.	Antimykobakteriální aktivita <i>N</i> -benzylbenzamidů	25
2.2.2.1.	<i>N</i> -benzylbenzamidů	25
2.2.2.2.	Benzoxaziny <i>N</i> -benzylbenzamidů.....	27
2.2.3.	Antiproliferativní aktivita a cytotoxicita.....	30
3.	TEORETICKÁ ČÁST – CHOLINESTERASY	31
3.1.	ACETYLCHOLIN.....	31
3.1.1.	Cholinergní receptory	32
3.2.	CHOLINESTERASY	32
3.2.1.	Acetylcholinestrasa	33
3.2.2.	Butyrylcholinestrasa.....	34
3.2.3.	Rozdíly mezi cholinesterasami	34
3.2.4.	Shodné vlastnosti cholinesteras	35
3.2.5.	Struktura cholinesteras.....	35

3.2.5.1.	Aktivní místo	35
3.2.5.2.	Rozdíly v aktivním místě ACHE a BCHE.....	37
3.2.6.	Elektrostatická charakteristika	37
3.3.	ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	37
3.3.1.	Patofyziologie Alzheimerovy choroby	37
3.3.2.	Mírná kognitivní choroba	40
3.3.3.	Léčba Alzheimerovy choroby.....	40
3.3.3.1.	Cholinesterasové inhibitory	40
3.3.3.2.	Klasifikace CHEI	42
3.3.3.2.1.	Reverzibilní inhibitory	42
3.3.3.2.2.	Pseudoireverzibilní inhibitory.....	43
3.3.3.2.3.	Ireverzibilní inhibitory	43
3.3.4.	Další možná léčba AD	43
3.3.4.1.	Ladostigil	43
3.3.4.2.	AMPA kinasy.....	44
3.3.4.3.	Ginkgo biloba.....	44
3.3.4.4.	Anti-amyloidní léčba	44
3.3.4.5.	Anti-tau léčba.....	44
3.3.5.	Účinek léčby	45
4.	CÍL	46
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – SYNTÉZA <i>N</i>-BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ.....	47
5.1.	SYNTÉZA <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ	48
5.1.1.	Syntéza <i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamidů.....	49
5.1.2.	Syntéza 5-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamidů.....	50
5.1.3.	Syntéza 5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4-methoxybenzyl)benzamidů.....	51
5.1.4.	Syntéza 5-chlor- <i>N</i> -(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamidů	53
5.2.	SYNTÉZA ACETYLŮ <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ	55
5.2.1.	Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetátu.....	56
5.2.2.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu.....	58
5.2.3.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu.....	60
5.2.4.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu	62
5.3.	SYNTÉZA BENZOXAZINU <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ	64

5.3.1.	Syntéza 3-benzyl-6-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4-(3 <i>H</i>)-dionu	65
5.3.2.	Syntéza 6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionu	66
5.3.3.	Syntéza 6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionu.	67
5.3.4.	Syntéza 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionu	68
5.4.	SYNTÉZA KARBAMÁTŮ <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ	69
5.4.1.	Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamátu.....	70
5.4.2.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamátu	72
5.4.3.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamátu.	74
5.4.4.	Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamátu.....	76
5.5.	SYNTÉZA ESTERŮ <i>N</i> -BENZYL-2-HYDROXYBENZAMIDŮ	78
5.5.1.	Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát.....	79
5.5.2.	Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu	81
5.5.3.	Syntéza benzyl 1-((2-(4-methoxybenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu	83
5.5.4.	Syntéza benzyl 1-((2-(4-fluorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu	85
5.6.	OSTATNÍ LÁTKY POUŽITÉ NA TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY	87
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – INHIBICE CHOLINESTERAS	88
6.1.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	88
6.2.	METODY STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMOVÉHO PREPARÁTU	88
6.2.1.	Ellmanova metoda	88
6.2.1.1.	Přístroje	88
6.2.1.2.	Stanovení aktivity enzymového preparátu	89
6.2.1.2.1.	Pracovní postup.....	89
6.3.	STANOVENÍ IC ₅₀	89
6.3.1.	Přístroje	89
6.3.2.	Pracovní postup.....	89
6.4.	VÝSLEDKY	90
6.4.1.	Stanovení aktuální aktivity enzymového preparátu	90
6.4.2.	Stanovení indexu IC ₅₀	91
7.	DISKUZE.....	93

7.1.1.	Acetylcholinesterasa	93
7.1.2.	Butyrylcholinesterasa.....	94
8.	ZÁVĚR.....	96
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	97

1. ÚVOD

N-benzyl-2-hydroxybenzamidy patří mezi látky se širokým spektrem biologických aktivit. Jejich deriváty jsou testované na antimykobakteriální, antimykotickou a antifungální aktivitu. Především kvůli jejich širokému spektru biologických aktivit se tato práce zaměřila na nalezení jiné oblasti účinnosti derivátů.

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčina demence u starších osob. Patofyziologie onemocnění je komplexní. Především se jedná o úbytek cholinergních neuronů, který vede ke snížení aktivity cholin-acetyltransferasy. Snížená aktivita cholin-acetyltransferasy má za důsledek snížení syntézy acetylcholinu (ACH) a zvýšené zpětné vychytávání cholinu.

Prozatím nejúčinnější léčba je pomocí cholinesterasových inhibitorů (CHEI). CHEI je skupina chemicky odlišných látek, které mají odlišný typ inhibičního účinku.

2. Teoretická část – *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidy

2.1. Syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich derivátů

N-benzyl-2-hydroxybenzamidy patří mezi látky se širokým spektrem biologických aktivit. Z biologických vlastností je možné jmenovat antimykobakteriální aktivitu proti atypickým kmenům jako jsou např. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, neméně významnou potenciální oblastí aplikace těchto látek je jejich využití proti fungálním patogenům. Kromě antimikrobiální aktivity mohou tyto látky vykazovat inhibici některých enzymů, což opět rozšiřuje možnost jejich využití. Studium biologických vlastností různě substituovaných *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich kyslíkatých derivátů je jednou z možností ke zmapování této perspektivní skupiny látek.

2.1.1. Možnosti syntézy *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

2.1.1.1. Vysokoteplotní syntézy bez použití rozpouštědel

První syntéza, kterou lze přistupovat k syntéze *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, byla popsána již v roce 1966. K vybrané kyselině salicylové (3 ekvivalenty) a aminu (3 ekvivalenty) je přikapáno vhodné činidlo, které převede kyselinu salicylovou na příslušný chlorid. V případě použití PCl_3 jako činidla je použit k reakci 1 ekvivalent. Reakce je prováděna při teplotě $180\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu uvolňování kyseliny chlorovodíkové. Produkt je izolován vodným roztokem uhličitanu sodného. Metoda syntézy je označována jako metoda A, je uvedena na **Schématu 1**.¹

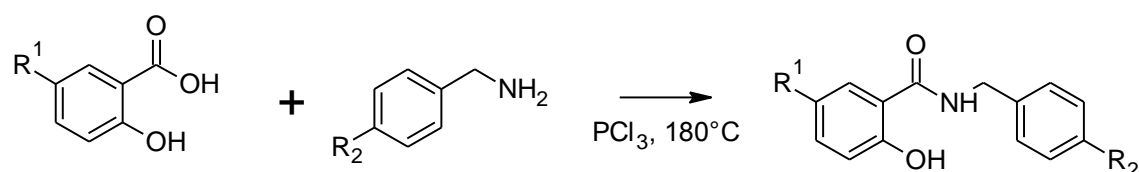


Schéma 1: Metoda A syntézy *N*-benzylbenzamidů

Syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů může také vycházet z reakce funkčního derivátu, např. fenylsalicylátu, se zvoleným aminem (poměr 1:1). Reakce probíhá po dobu 2 hodin při teplotě $180\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$. Produkt je izolován zředěným ethanolem. Využitím 1,2,4-trichlorbenzenu jako rozpouštědla byl připraven *N*-(4chlorbenzyl)-

salicylamid. Metoda syntézy je označovaná jako metoda B. Reakční schéma je naznačeno na **Schématu 2**.

Použité substituce a obvyklé výtěžky obou metod jsou shrnuty v **Tabulce 1**. Struktura látek byla potvrzena pomocí NMR analýzy.¹

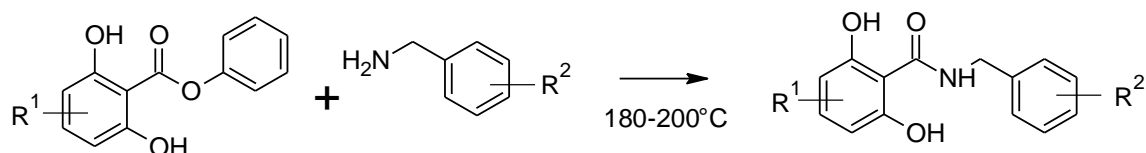


Schéma 2: Metoda B přípravy *N*-benzylbenzamidů

Tabulka 1: Obvyklé výtěžky metod A i B a body tání látek.¹

Substituenty		Použitá	Výtěžek	Bod tání
R ¹	R ²	metoda	(%)	(°C)
H	Br	A	78	154-156
H	Cl	A	74	145-146
H	I	A	54	134-135
H	NO ₂	A	87	221-223
4-Cl	Br	A	35	158-159
4-Cl	Cl	B	63	156-158
4-Cl	H	B	86	133-134
4-Cl	I	A	70	161-162
3,4-Cl ₂	Br	A	67	160-161
3,4-Cl ₂	Cl	A	73	154-156
3,4-Cl ₂	H	A	62	136-137
3,4-Cl ₂	I	A	50	174-175

2.1.1.2. Přímá termální metoda syntézy

Metoda z roku 1982 popisuje jinou formu syntézy. Směs 4-methylbenzoové kyseliny a benzylaminu v 50 ml *o*-xylenu je zahřívána pod refluxem po dobu 7,5 hodin. Rozpouštědlo je oddestilováno a ke zbylé směsi je přidána studená voda. Vzniklé nečistoty jsou odfiltrovány. Produkt při filtrování je promyt studenou vodou, studeným

vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a znovu vodou. Krystalizace je provedena z ethanolu.²

2.1.1.3. Klasické metody syntézy

Klasická metoda syntézy je založena na jedнокrokové reakci vybrané kyseliny salicylové, která po převedení na funkční derivát *in situ* reaguje se zvoleným benzylaminem. Nejčastěji je kyselina převedena na svůj chlorid pomocí vhodného činidla. Reakční komponenty se smísí za laboratorní teploty, vlastní reakce je prováděna za refluxu rozpouštědla, jakým může být například chlorbenzen. Molární poměr reaktantů je 1:1. V případě, že se jako činidlo k vlastní reakci použije PCl₃, jeho molární poměr k reaktantům je poloviční. Izolace produktu je prováděna po vakuovém odpaření rozpouštědla jednoduchou krystalizací z acetonu eventuálně ze směsi ethanol-voda. Postup syntézy je popsán ve **Schématu 3**. Výtěžky se pohybují v rozmezí 49-95 %. Použité substituenty včetně dosažených výtěžků a bodů tání jednotlivých výsledných produktů jsou shrnuty v **Tabulce 2 a 3**.^{3,4}

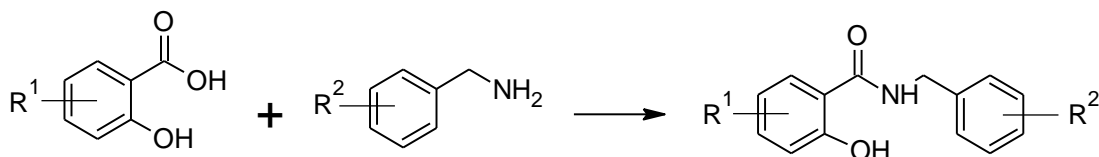
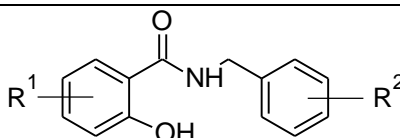


Schéma 3: Klasická syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů^{3,4}

Tabulka 2: Obvyklé výtěžky klasické metody syntézy *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů.³

Substituenty			Substituenty		
R ¹	R ²	Výtěžek (%)	R ¹	R ²	Výtěžek (%)
5-Br	3-Br	51	4-CH ₃	4-Cl	89
5-Br	4-Br	49	4-CH ₃	3-NO ₂	84
4-Cl	4-Br	75	4-OCH ₃	3-Cl	77
4-CH ₃	H	76	4-CH ₃	4-Cl	92
4-CH ₃	4-CH ₃	81			

Tabulka 3: Body tání a vlnočet absorpčních pásů vznikající amidické funkční skupiny *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů syntetizovaných klasickou metodou.^{3,4}



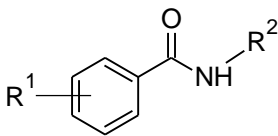
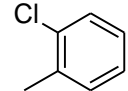
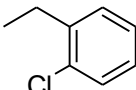
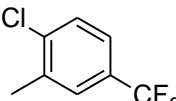
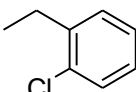
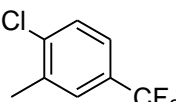
Substituenty		Teplota tání (°C)	$\nu_{C=O}(cm^{-1})$
R ¹	R ²		
4-CH ₃	H	105-107	1644
4-CH ₃	4-CH ₃	141-143	1642
4-CH ₃	4-Cl	162-163	1641
4-OCH ₃	3-Cl	105-107	1636
4-CH ₃	4-Cl	97-99	1643 ³
H	4-H	130-132 / 134-136	1592
H	3-CH ₃	94-95,5	1591
H	4-CH ₃	112-114	1591
H	4-OCH ₃	95-97	1592
H	4-F	116-118	1588
H	3-Cl	97-99	1591
H	4-Cl	132-133/133-134	1592
H	3,4-Cl ₂	132-134/136-137	1592 ⁴

Dalšími možnými substitucemi na benzenových jádrech *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů mohou být následující kombinace: R¹ = 3-H, 4-H, 5-H, 3-Cl, 4-Cl, 5-Cl, 3-MeO, 4-MeO, 5-Me a 5-MeO; R² = 3-H, 4-H, 3-Cl, 4-Cl, 4-F, 4-Me, 4-MeO.⁸

2.1.1.4. Obměna klasické syntézy využívající reakce chloridu kyseliny

Principiálně shodnou metodou přípravy substituovaných *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů je reakce chloridu kyseliny se zvoleným anilinem. Reakce je prováděna tak, že roztok chloridu kyseliny v suchém acetonu je přikapán do roztoku benzylaminu v pyridinu za laboratorní teploty. Reakční směs je poté míchaná 1 hodinu při laboratorní teplotě a výsledný surový produkt se získá nalitím reakční směsi na led. Surový anilid se následně krystaluje ze směsi ethanol-voda. Nevýhodou této metody je nutnost předchozí přípravy a izolace odpovídajícího chloridu kyseliny. Obvyklé výtěžky reakce včetně dosud popsaných substitucí jsou shrnuty v **Tabulce 4**.⁵

Tabulka 4: Obvyklé výtěžky a body tání látek⁵

			
R ¹	Substituenty R ²	Výtěžek (%)	Bod tání (°C)
4-NO ₂		75	165-167
4-NO ₂		78	178
4-NO ₂		79	182
4-NH ₂		85	137
4-NH ₂		80	151

2.1.1.5. Metoda využívající reakce acyl chloridu

Salicylová kyselina v thionyl chloridu je zahřívána pod refluxem po dobu 2 hodin. Přebytek činidla je oddestilován a ke směsi je za chladu přidán benzen. Během 30 minut ke směsi je přidána směs benzylaminu v triethylaminu. Reakční směs je ponechána 18 hodin bez míchání. Benzen je odpařen ve vakuu a vzniklý produkt je krystalizován z ethanolu.²

2.1.1.6. Mikrovlnná syntéza *N*-benzylbenzamidů

K syntéze *N*-salicylanilidů lze přistupovat nejmodernější metodou využívající mikrovlnného reaktoru, čímž lze dosáhnout výrazně kratší reakční doby. Princip této metody je stejný jako u klasické syntézy. Pomocí PCl₃ je substituovaná kyselina převedena na chlorid a v následujícím kroku reaguje vzniklý chlorid s benzylaminem. Výtěžek reakce je okolo 90 %. Tento postup lze aplikovat také při syntéze *N*-benzylbenzamidů.⁶

2.1.2. Možnosti syntézy *O*-derivátů *N*-benzylbenzamidů

Kyslíkaté deriváty *N*-salicylanilidů poskytují zajímavé výsledky v oblasti antibakteriálních testů a antifungálních testů. Z tohoto důvodu se přistoupilo k syntéze derivátů *N*-benzylbenzamidů. Některé deriváty již byly dříve popsány.

Kyslíkaté deriváty mají oproti výchozím látkám lepší fyzikálně chemické vlastnosti, např. lepší rozpustnost. Jejich syntéza je klasickým přístupem k přípravě nízkomolekulárních proléčiv, případně se využívá možnost odstranění nežádoucích vlastností látek.

2.1.2.1. *O*-acetyly *N*-benzylbenzamidů

Syntéza acetylů *N*-benzylbenzamidů nebyla doposud v literatuře popsána, lze však aplikovat postupy syntézy pro *O*-acetyly *N*-salicylanilidů. Metoda A vycházela ze substituovaného salicylanilidu (**Schéma 4**), metoda B ze substituovaného fenolátu (**Schéma 5**). Výtěžky obou metod se pohybovaly v rozmezí 25-72 %. U obou výchozích látek byly použity elektronakceptorní substituenty.⁷

Aplikace těchto postupů na *N*-benzylbenzamidy, postupy syntéz a následně i aktivita derivátů bude popsána v experimentální části.

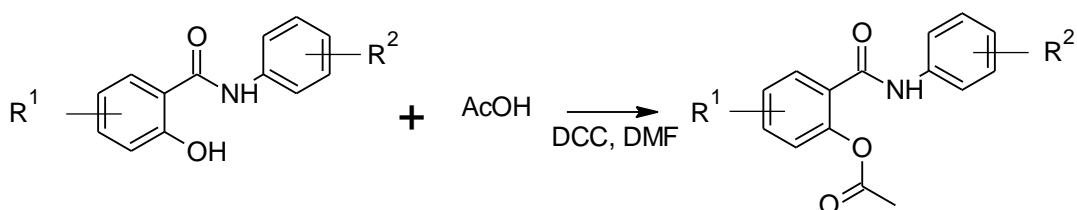


Schéma 4: Metoda A - reakční schéma přípravy acetylů *N*-salicylanilidů⁷

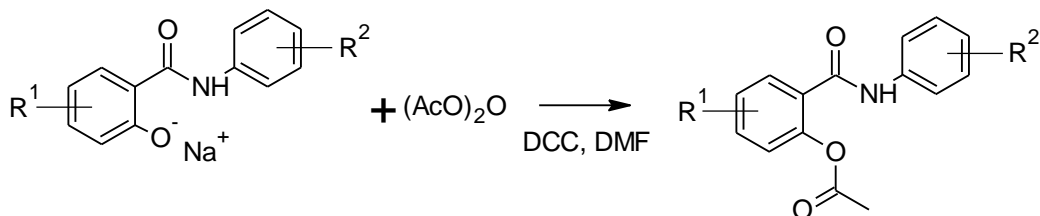


Schéma 5: Metoda B – Reakční schéma acetylů *N*-salicylanilidů⁷

2.1.2.2. *O*-benzoxaziny *N*-benzylbenzamidů

Příprava benzoxazinů *N*-benzylbenzamidů byla již v literatuře popsána. Reakce substituovaného *N*-benzylsalicylamidu s ethyl chloroformiátem ve vhodném

rozpouštědlo probíhá v ledové lázni. Poté je směs zahřívána ve vodní lázni po dobu 1 hodiny a následně je nalita do 5% roztoku hydroxidu sodného. Po 24 hodinách je produkt zfiltrován, a je z něj vytvořena suspenze v 5% roztoku hydroxidu sodného, znovu zfiltrován a krystalizován z ethanolu (výtěžek 39-70%). Jako rozpouštědlo lze užít pyridin. Reakční schéma je naznačeno na **Schématu 6**, využití substituentů benzoxazinů jsou shrnuty v **Tabulce 5**.⁸

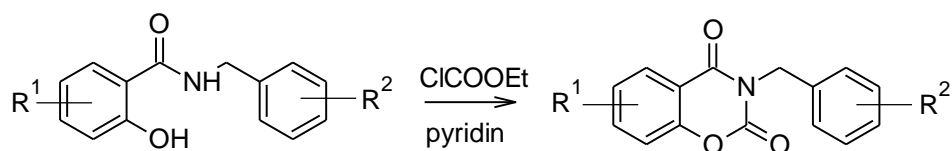


Schéma 6: Reakční schéma benzoxazinu⁸

Tabulka 5: Možné substituenty na benzenových jádrech benzoxazinu.⁸

Substituenty		
	R ₁	R ₂
	H	7-OCH ₃
	6-Br	6-NO ₂
	6-Cl	7-Cl
	6,8-Cl ₂	8-OCH ₃
	6-CH ₃	6-OCH ₃
	6,8-Br ₂	4-OCH ₃
		H
		4-Cl
		4-CH ₃
		4-F
		3,4-Cl ₂
		4-OCH ₃

K syntéze benzoxazinů by bylo možné přistupovat pomocí následující syntézy. 2-(3-fenylkarbamoylamino)benzoová kyselina a acetanhydrid jsou zahřívány pod refluxem po dobu 6 hodin. Vzniklý produkt je krystalizován z ethanolu (**Schéma 7**). Výtěžek reakce byl 63%. Produkt byl charakterizován bodem tání, 200°C.⁹

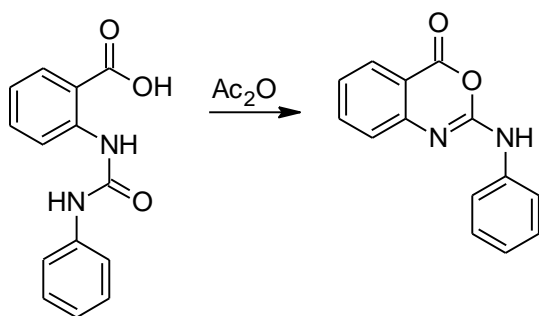
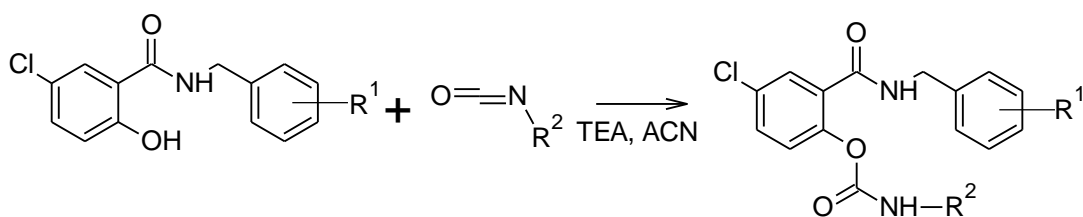


Schéma 7: Reakční schéma syntézy 2-anilinobenzoxazinonu⁹

2.1.2.3. *O*-karbamáty *N*-benzylbenzamidů

Syntéza karbamátů s aromatickým substituentem nebyla v literatuře popsána. Je možné vycházet ze syntézy popsané pro přípravu alifatických karbamátů *N*-salicylanilidů. Tyto postupy se pokusíme aplikovat i na přípravu karbamátů s alifatickým koncem.

Substituovaný salicylanilid (3-Cl, 3,4-diCl, 4-Cl) byl rozpuštěn v acetonitrilu (ACN). K roztoku byl přidán 1 ekvivalent triethylaminu (TEA) a odpovídající isokyanát. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 35-80 %. Postup reakce je naznačen ve **Schématu 8**.¹⁰



R²: ethyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, oktyl, undecyl

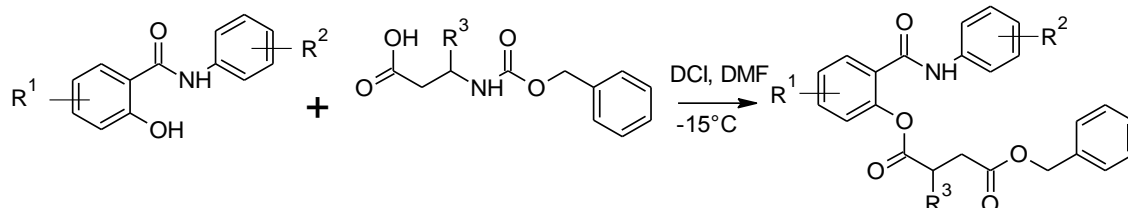
Schéma 8: Reakční schéma syntézy karbamátů *N*-salicylanilidů¹⁰

2.1.2.4. *O*-estery *N*-benzylbenzamidů

Syntéza esterů *N*-benzylbenzamidů nebyla v literatuře popsána, je možné použít postup pro syntézu *N*-salicylanilidů.⁶

Chráněná aminokyselina *N*-benzyloxykarbonylem a substituovaný salicylanilid (především s elektronakceptorními substituenty) v suchém *N,N'*-dimethylformamidu (DMF) jsou zchlazeny na teplotu -10°C. Ve třech dávkách během 1 hodiny je přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCI). Následně je směs míchána při stejné teplotě po dobu 3 hodin a skladována při 4°C 20 hodin. Precipitát, *N,N'*-dicyklohexylmočovina, je

odfiltrovaná a rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce (RVO) za sníženého tlaku. Surový produkt je krystalizován ze směsi ethylacetát/hexan. Výťažky reakcí se pohybují v rozmezí 36-62 %. Reakční schéma je zobrazeno na **Schématu 9**.⁶



R³: (R)-CH-(CH₃)₂, (S)-CH₂-C₆H₅

Schéma 9: Reakční schéma syntézy esterů *N*-salicylanilidů⁶

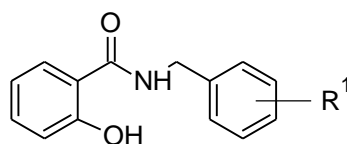
2.2. Testování biologické aktivity *N*-benzylbenzamidů a jejich derivátů

Některé sloučeniny *N*-benzylbenzamidů byly testovány na antimikrobiální, antimykobakteriální, antimykotickou, antifungální a antiproliferativní aktivitu. Výsledky provedených testů budou popsány v následujících kapitolách.

2.2.1. Antifungální aktivita *N*-benzylbenzamidů

Antifungální aktivita vybraných derivátů byla provedena na kmenech *Candida Albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon beigelii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, *Trichophyton mentagrophytes* 445. Ke kontrole kvality byly využity jako standardy antibiotika amfotericin B a flukonazol. Všechny testované deriváty i amfotericin B byly rozpuštěny ve 100% dimethylsulfoxidu (DMSO), ve sterilní destilované vodě byl rozpuštěn flukonazol. Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 1 % celkového složení vzorku. Testované koncentrace vybraných derivátů se pohybovaly v rozmezích 500 – 0,98 μmol/l. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena vizuálně jako nejmenší koncentrace, která způsobí 80% inhibici růstu daných fungálních kmenů. Výsledky provedeného antifungálního testování jsou uspořádány dle substituce na benzylovém zbytku v **Tabulce 6**.¹¹

Antifungální aktivita byla testována i v rámci jiných studií. Opět byla aktivita posuzována podle minimální inhibiční koncentrace (MIC, μmol/l). Bylo dosaženo podobných výsledků.¹²

Tabulka 6: Výsledky antifungálních testů¹¹

R ¹	MIC (μmol/l)							
	Ca	Ct	Ck	Cg	Tb	Af	Ac	Tm
-	357,9	409,1	386,4	454,6	420,5	340,9	346,6	116,5
	62,5-500	250-500	125-500	250-500	125-500	62,5-500	62,5-500	31,25-250
4'-Cl	352,3	380,7	380,7	454,6	380,7	343,8	301	77,4
	62,5-500	62,5-500	62,5-500	250-500	62,5-500	31,25-500	62,5-500	7,81-500
4'-Me	412,5	400	450	450	437,5	387,5	375	104,7
	125-500	250-500	250-500	250-500	125-500	125-500	125-500	15,63-500
4'-F	454,6	454,6	454,6	454,6	454,6	392,1	403,4	184,4
	250-500	250-500	250-500	250-500	250-500	62,5-500	62,5-500	15,63-500
3',4'-Cl ₂	420,5	380,7	500	426,1	437,5	403,4	377,8	239,2
	62,5-500	62,5-500	500	62,5-500	62,5-500	62,5-500	31,25-500	1,95-500
4'-MeO	431,8	500	500	477,3	477,3	500	397,7	144,9
	250-500	500	500	250-500	250-500	500	125-500	31,25-500

Ca - *C.albicans* ATCC 44859, Ct - *C.tropicalis* 156, Ck - *C.krusei* E28, Cg - *C.glabrata* 20/1, Tb - *T.beigelii* 1188, Af - *A.fumigatus* 231, Ac - *A.corymbifera* 272, Tm - *T.mentagrophytes* 445

2.2.2. Antimykobakteriální aktivita *N*-benzylbenzamidů

2.2.2.1. *N*-benzylbenzamidy

Antimykobakteriální *in vitro* aktivita byla stanovována proti kmenům *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88, *Mycobacterium kansasii* 6509/96. Všechny kmeny kromě kmenu *Mycobacterium kansasii* 6509/96 byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) a Českého institutu národního zdraví v Praze. Byla určena minimální inhibiční koncentrace (MIC, μmol/l). Při stanovování MIC byl použit jako standard kvality isoniazid (INH). Výsledky testování jsou uvedeny v **Tabulce 7**. Kromě *N*-benzylbenzamidů byly testovány *N*-benzylsalicylthioamidy, jejichž výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 8**. U *N*-benzylsalicylthioamidů se prokázala výrazně vyšší antimykobakteriální aktivita než u *N*-benzylbenzamidů.⁴

Testování proběhlo pomocí kvantitativní mikrometody.¹³

Tabulka 7: Antimykobakteriální aktivita *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů.⁴

Substituenty		MIC(μmol/l)							
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80		<i>M. kansasii</i> 6509/96	
R ¹	R ²	14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d
5-Br	3-Br	32	32	32	32	32	62.5	32	32
5-Br	4-Br	16	32	16	32	32	32	32	32
4-Cl	4-Br	16	32	32	32	32	32	32	32
4-CH ₃	H	62.5	125	62.5	125	125	125	125	125
4-CH ₃	4-CH ₃	125	500	62.5	250	250	500	250	500
4-CH ₃	4-Cl	62.5	125	62.5	125	125	250	250	250
4-OCH ₃	3-Cl	125	125	62.5	62.5	62.5	125	62.5	125
4-CH ₃	H	62.5	125	62.5	62.5	62.5	125	62.5	125
4-CH ₃	4-Cl	16	32	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
Isoniazid		1	1	>250	>250	>250	>250	4	4

Tabulka 8: Antimykobakteriální aktivita *N*-benzylsalicylthioamidů⁴

Substituenty		MIC(μmol/l)							
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My		<i>M. avium</i> My		<i>M. kansasii</i> My		<i>M. kansasii</i>	
		331/88		330/88		235/80		6509/96	
		14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d
H	3-CF ₃	0,5	1	0,5	1	2	2	2	2
5-Br	3-Br	1	2	8	8	8	8	8	8
5-Br	4-Br	1	2	4	4	8	16	4	4
4-Cl	4-Br	1	2	2	4	8	16	4	8
4-CH ₃	H	0,5	1	1	2	2	2	1	2
4-CH ₃	4-CH ₃	0,125	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	1
4-CH ₃	4-Cl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1
4-OCH ₃	3-Cl	0,5	1	1	2	2	2	1	1
4-CH ₃	4-Cl	2	4	1	1	2	2	2	4
Isoniazid		1	1	>250	>250	>250	>250	4	4

Vědecká skupina vedená panem Waisserem prováděla další studie týkající se antimykobakteriální aktivity substituovaných *N*-benzylsalicylamidů.¹⁴

2.2.2.2. Benzoxaziny *N*-benzylbenzamidů

Benzoxaziny byly testovány proti mykobakteriálním kmenům *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a *M. avium* CNCTC My 330/88, které byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), a proti klinicky izolovanému kmenu *Mycobacterium kansasii* 6509/96. Pro srovnávání aktivit byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC, μmol/l). Látky byly rozpuštěny v DMSO. Výsledky testování jsou uvedeny v **Tabulce 9**.⁸

Tabulka 9: Antimykobakteriální aktivita benzoxazinů.⁸

Substituenty		MIC (μmol/l)		
R ¹	R ²	Inkubace 21 dní		
		<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
H	H	62,5	62,5	62,5
6-Cl	H	62,5	62,5	125
6-CH ₃	H	62,5	62,5	125
7-Cl	H	62,5	a	a
H	4-Cl	32	a	125
6-Cl	4-Cl	32	a	a
H	4-CH ₃	62,5	a	a
H	4-F	125	250	250
6-Br	4-F	62,5	a	a
6-Cl	4-F	32	62,5	125
7-Cl	4-F	62,5	125	125
H	3,4-Cl ₂	32	62,5	62,5
6-Cl	3,4-Cl ₂	32	62,5	62,5
6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	125	125	125
H	4-OCH ₃	a	a	250
7-Cl	4-OCH ₃	125	a	a
	INH	250	250	4

a...hodnota MIC nemohla být určena kvůli nerozpustnosti

Další studie se také zabývala testováním derivátů benzoxazinů a thiobenzoxazinů proti mykobakteriálním kmenům. *In vitro* aktivita byla testována proti *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 330/88 a *M. kansasii* 6509/96. Stanovovala se minimální inhibiční koncentrace (MIC). Všechny kmeny byly získány z České národní kolekce typových kultur (CNCTC) kromě *M. kansasii* 6509/96, který byl izolován z lidského vzorku. Výsledky testování pro benzoxaziny jsou shrnuty v **Tabulce 10**, v **Tabulce 11** jsou uvedeny výsledky pro thiobenzoxaziny a dithiobenzoxaziny se stejnými substituenty jako u benzoxazinů.¹⁵

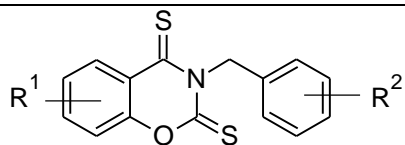
Tabulka 10: Antimykobakteriální aktivita benzoxazinů.¹⁵

Substituenty		MIC (μmol/l) inkubační doba 14d/21d			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
H	H	32/32	32/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
6-Cl	H	62,5/125	32/62,5	32/62,5	125/125
6-CH ₃	H	32/62,5	32/62,5	62,5/62,5	62,5/125
H	3,4-Cl ₂	32/32	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5
6-Cl	3,4-Cl ₂	16/16	16/32	62,5/62,5	62,5/62,5
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8
Rifampicin		0,25/0,5	16/65	0,25/0,25	0,125/0,25

Tabulka 11: Antimykobakteriální aktivita thiobenzoxazinů a dithiobenzoxazinů.¹⁵

Substituenty		MIC (μmol/l) inkubační doba 14d/21d			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
H	H	1/2	8/8	4/8	4/8
6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
6-Cl	H	1/2	4/8	8/8	4/4
6-CH ₃	H	1/1	2/2	1/2	1/2
6-Cl	4-F	1/1	4/4	4/8	4/4
6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	2/2	4/4	16/16	16/16
H	3,4-Cl ₂	1/1	1/1	2/4	2/4
6-Br	3,4-Cl ₂	2/4	8/8	16/16	16/16
6-Cl	3,4-Cl ₂	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5

Tabulka 11: Antimykobakteriální aktivita thiobenzoxazinů a dithiobenzoazinů¹⁵ – pokračování



H	H	1/1	1/1	2/2	1/2
6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
6-Cl	4-F	1/2	8/16	8/16	8/16
6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
H	3,4-Cl ₂	1/2	0,5/0,5	4/4	4/4
6-Br	3,4-Cl ₂	4/8	16/16	16/32	16/32
6-Cl	3,4-Cl ₂	4/8	16/32	32/32	32/32
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8
Rifampicin		0,25/0,5	16/65	0,25/0,25	0,125/0,25

2.2.3. Antiproliferativní aktivita a cytotoxicita

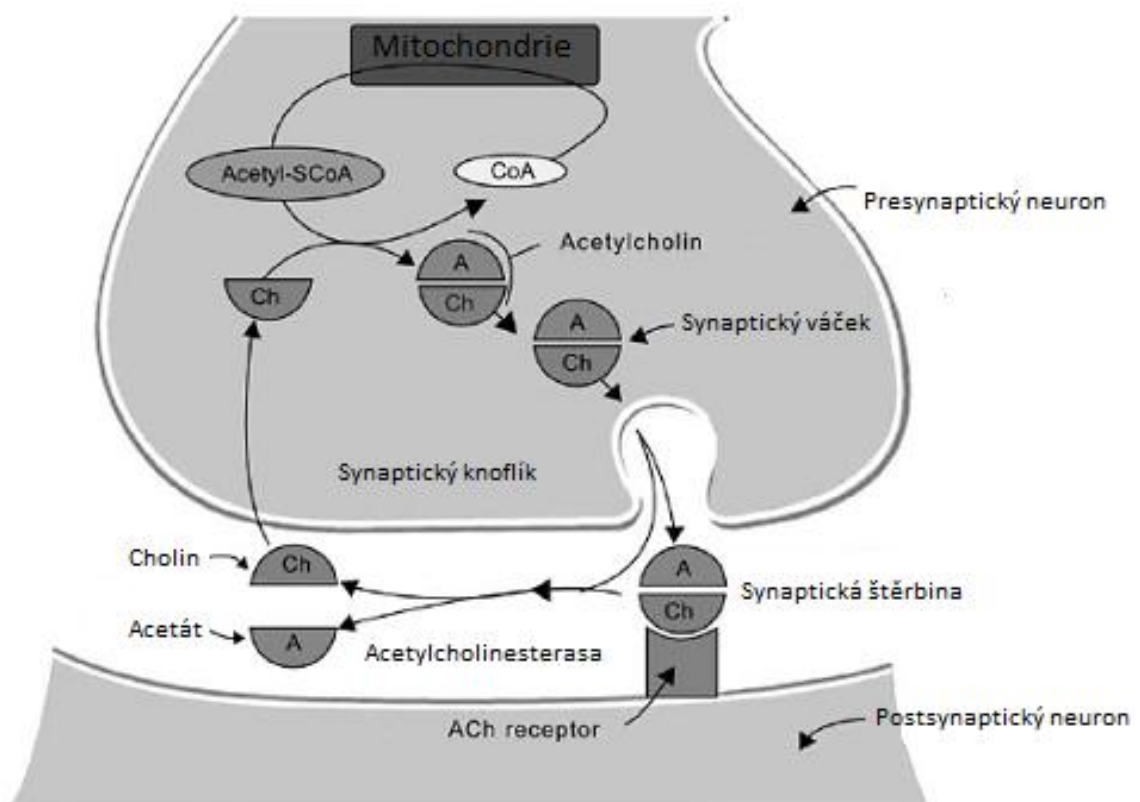
Antiproliferativní aktivita byla popsána pro *N*-benzylsalicylthioamidy.⁴

Z derivátů byla antiproliferativní aktivita a cytotoxicita testována u benzoxazinů. Na testování antiproliferativní aktivity byly použity buňky HUVEC (ATCC CRL-1730, endoteliální buňky pupečnickové žíly) a K-562 (DSM ACC 10, nesmrtelné myeloidní leukemické buňky). Na testování cytotoxicity buňky HeLa (ATCC CRL-1730, buňky rakoviny děložního čípku). K testování antiproliferativní aktivity byly látky rozpuštěny v DMSO. Pro porovnání aktivit byly stanoveny hodnoty GI₅₀ (50% inhibice buněčného růstu) a CC₅₀ (koncentrace látky protínající křivku odpovědi na dávku ve výši 50% linie, ve srovnání s neléčenou kontrolou).¹⁵

3. Teoretická část – Cholinesterasy

3.1. Acetylcholin

Acetylcholin (ACH) je esenciální neurotransmitter v centrálním a periferním nervovém systému, který se vyvíjí v časně fylogenetické fázi.¹⁶ ACH je syntetizován v presynaptických neuronech enzymem, cholinacetyl-transferasou, z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). ACH je uvolňován exocytózou do synaptické štěrby. Reverzibilní vazba ACH na ACH receptory postsynaptických neuronů iniciuje signál a neurotransmise pokračuje. Nenvázaný ACH je zachycen acetylcholinesterasou (ACHE), hydrolyzován a cholin je vrácen presynaptickým neuronům k opětovnému použití (**Obr. 1**). Hydrolýza ACH má za důsledek ukončení přenosového impulsu cholinergních synapsí.^{17,18} Všechny cholinergní inervace lidské mozkové kůry thalamu vychází z vnějších cholinergních zdrojů.¹⁹



Obr. 1: Syntéza a hydrolýza ACH (přeloženo z anglické literatury)¹⁷

3.1.1. Cholinergní receptory

Existují dva typy cholinergních receptorů, muskarinové a nikotinové.

Cholinergní neurotransmise je zprostředkována dvěma rodinami cholinergních receptorů v mozku a na periférii, G-protein muskarinové rodiny a ligand iontového kanálu nikotinové rodiny. Hlavní část muskarinových receptorů je lokalizována postsynapticky a pouze malá část jsou presynaptické autoreceptory cholinergních buněk (10-20 %). Nikotinový receptor byl nalezen ve svalu, skládá se z 5 transmembránových proteinů 4 odlišných typů podjednotek ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$).²⁰

Tři typy muskarinových receptorů byly identifikovány farmakologicky a pět typů na základě molekulárních studií. Dva hlavní nikotinové receptory byly identifikovány v CNS pomocí α -bungarotoxinu a neurálního bungarotoxinu.¹⁹

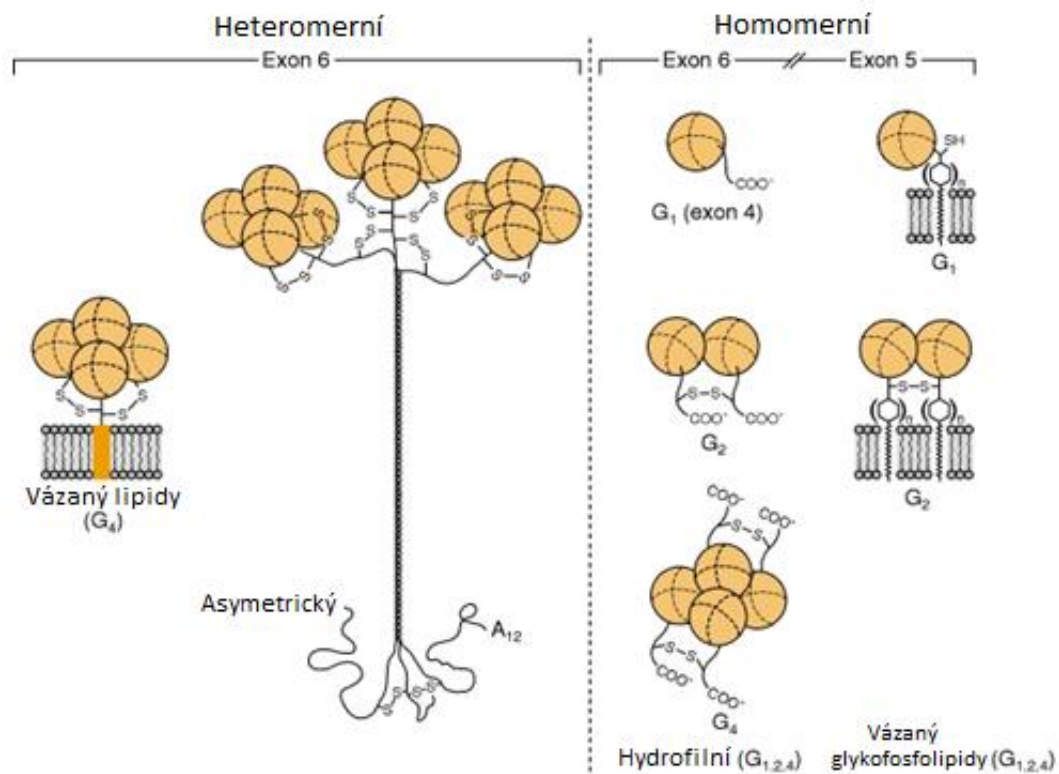
3.2. Cholinesterasy

Cholinesterasy (CHE) představují skupinu esterasy, které hydrolyzují estery cholinu rychleji než ostatní estery. Rychlosti hydrolýzy jsou porovnávány v optimálních a kontrolovaných podmínkách. CHE primárně eliminují ACH. K eliminaci dojde během milisekundy po uvolnění CHE z cholinergních synapsí.

Tato skupina má vysokou senzitivitu k látkám obsahujícím pozitivně nabitou skupinu (amonnou, fosforitou, sulfonovou, atd.) organofosfátových inhibitorů a karbamátů. Jedna z hlavních charakteristik vlastností cholinesterasy je senzitivita enzymů k nízkým koncentracím eserinových karbamátů.²¹

Existence CHE byla předpokládána už v roce 1914, ale prokázána byla až v roce 1926.¹⁷ U obratlovců jsou dva typy cholinesteras – acetylcholinesterasa (ACHE) a butyrylcholinesterasa (BCHE).^{17,18}

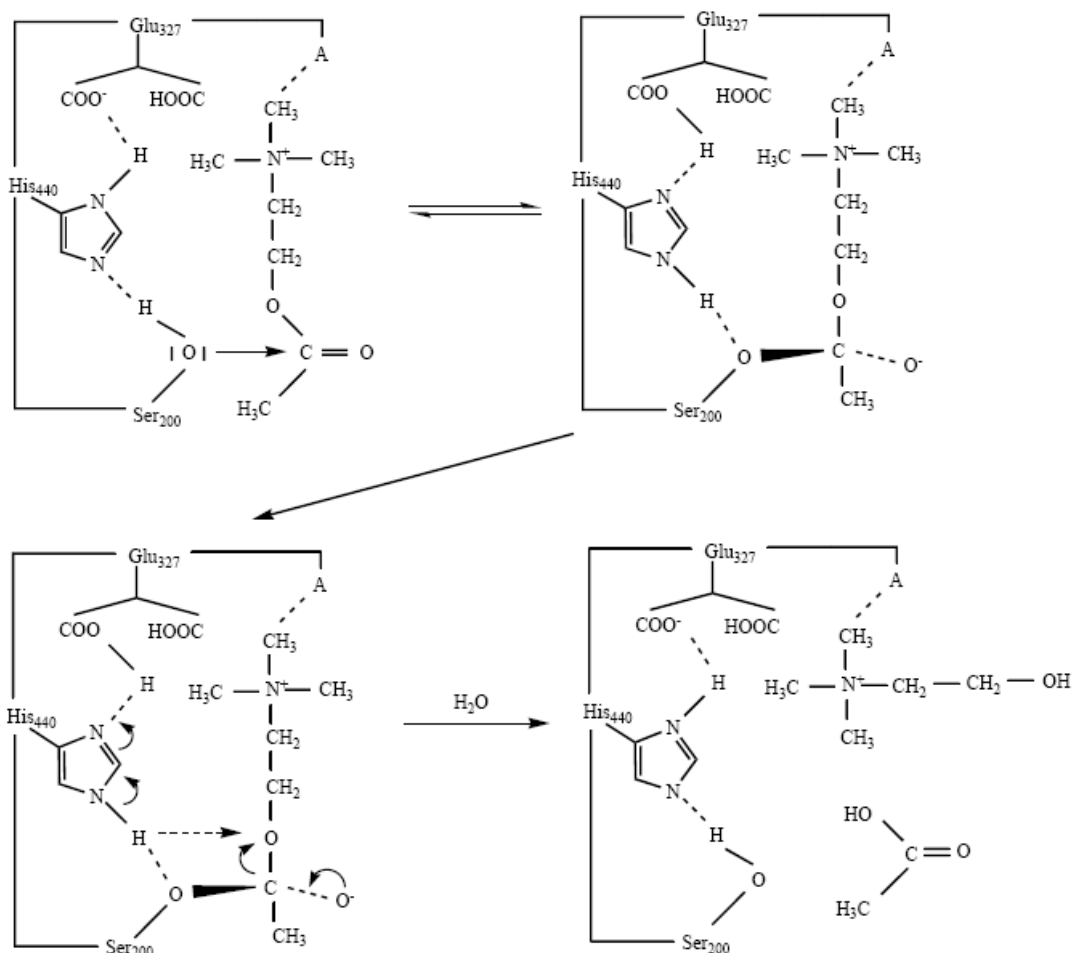
ACHE i BCHE jsou syntetizovány v mnoha molekulárních formách. Molekulární formy mohou být tvořeny monomery (G1), dimery (G2) a tetramery (G4) katalytických podjednotek (**Obr. 2**), stejně jako asymetrickými molekulami s jedním, dvěma nebo třemi tetramery spojené se třemi stočenými vlákny kolagenu.²⁰



Obr. 2: Homomerní a heteromerní struktura cholinesteras (přeloženo z anglické literatury)²²

3.2.1. Acetylcholinestrasa

Acetylcholinestrasa (E.C. 3.1.1.7) je klíčovou látkou cholinergních synapsí v mozku a neuromuskulárních spojení.¹⁷ Dalšími názvy ACHE jsou: systematický název – acetylhydrolasa acetylcholinu, jiné názvy – pravá cholinesterasa, cholin esterasa I, cholinesterasa, acetylthiocholinesterasa, acetylcholin hydrolasa, acetyl- β -methylcholinesterasa; AcChoIE.²¹ ACHE katalyzuje hydrolýzu ACh s vysokou rychlostí. Mechanismus hydrolýzy je znázorněn na **Obr. 3**.¹⁷ Aktivita tohoto enzymu je nezbytná pro normální cholinergní přenos a neuromuskulární funkci.²³ Poprvé byla vysoká koncentrace ACHE pozorovaná v roce 1937 v neuromuskulárních spojení a v elektrických orgánech elektrického úhoře.¹⁷



Obř. 3: Mechanismus hydrolyzy ACH v katalyckém mĚstĚ ACHE¹⁷

3.2.2. Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa (E.C. 3.1.1.8) je znĚmĚ jako pseudocholinesterasa, nespecifickĚ esterasa nebo jednoduchĚ cholinesterasa.¹⁷ Dalřimi nĚzvy BCHE jsou: systematickĚ nĚzev – acylhydrolasa acetylcholinu, jinĚ nĚzvy – benzoylcholinesterasa, propionylcholinesterasa, anticholinesterasa, BtChoEas.²¹ BCHE je přĚtomna v bazĚlnĚm přĚdnĚm mozku a takĚ v hippokampu. MultipolĚrnĚ BCHE – pozitivnĚi neurony se nachĚzĚ ve vřech podjĚdrech amygdaly, stejnĚ tak jako ve vĚtřinĚ thalamickĚch jader.²⁰

3.2.3. RozdĚly mezi cholinesterasami

PrimĚrnĚ jsou cholinesterasy rozdĚlnĚ v substrĚtovĚ specifitĚ: ACHE hydrolyzuje acetylcholin rychleji neř jinĚ cholinovĚ estery a je mĚnĚ aktivnĚi na butyrylcholin (BCH). BCHE dobře hydrolyzuje BCH i ACH. BCH nenĚ fyziologickĚ substrĚt v lidskĚm mozku, pouřĚvĚ se tedy jako substrĚt k rozliřenĚi cholinesteras.

BCHE je přítomna v séru a v gliových buňkách, ACHE v neuronech, membránách erytrocytů a svalech. Další vlastností, která se využívá k odlišení CHE, je větší substrátová specifita ACHE než BCHE. BCHE vykazuje substrátovou aktivitu při přebytku substrátu.

Přítomnost ACHE mimo cholinergní synapse a existence sesterské BCHE, jejíž funkce není dosud přesně známá, naznačuje, že cholinesterasy mohou být zapojeny i do jiných funkcí než je hydrolyza ACH. Hypotéza ohledně dalších katalytických funkcí, př. proteolytická aktivita a zpracování neuropeptidů, byla řešena různými autory.¹⁷

Gen pro ACHE je lokalizován na chromozomu 7q23^{19,24}, pro BCHE na chromozomu 3q26.²⁴

3.2.4. Shodné vlastnosti cholinesteras

Obě CHE patří do rodiny α/β hydrolasových proteinů. Společným charakteristickým rysem je β -list, který nese katalytické nástroje proteinů a který je obklopen α -helixy, a smyčky, jímž je připisována úloha vazby specifických elementů, substrátů.²⁵ Do této skupiny dále patří neutrální lipasy a peptidasy, které se liší od CHE absencí některého zbytku v katalytické triádě.²⁴

3.2.5. Struktura cholinesteras

3.2.5.1. Aktivní místo

První 3D struktura ACHE byla popsána v roce 1991, kdy byla studována struktura ACHE u *Torpedo californica* (TcAChE).²⁴ Neočekávaným objevem pro takto rychlý enzym bylo umístění aktivního místa. Aktivní místo je lokalizováno na spodní části 20Å hluboké a úzké (8Å široká v lemu, 3Å na spodním okraji) prohlubně^{17,18,23,21,25,24}, která je lemovaná aromatickými zbytky. Tyto aromatické zbytky tvoří cca 70 % povrchu prohlubně, a společně s Trp84 a Phe330 jsou nazývány katalytickým anionickým místem (CAS). Katalytické anionické místo je součástí periferního anionického místa, které navíc obsahuje Tyr70, Tyr121 a Trp279 (**Obr. 4**). Díky překvapivé poloze aktivního místa je ACHE téměř celá obklopena proteinem, což umožňuje větší interakci enzym/substrát.²⁵

Aktivní místo je hydrofobní a prohlubeň penetruje více než polovinu povrchu enzymu.^{17,18,23}

Aktivní místo se skládá z aminokyselin Ser200, Glu327 a His440.^{18,21} Takovéto uskupení se nazývá katalytická triáda.²¹ Složením z těchto aminokyselin se úzce podobá chymotrypsinu a ostatním serinovým proteasám, jedná se o zrcadlové obrazy.¹⁸

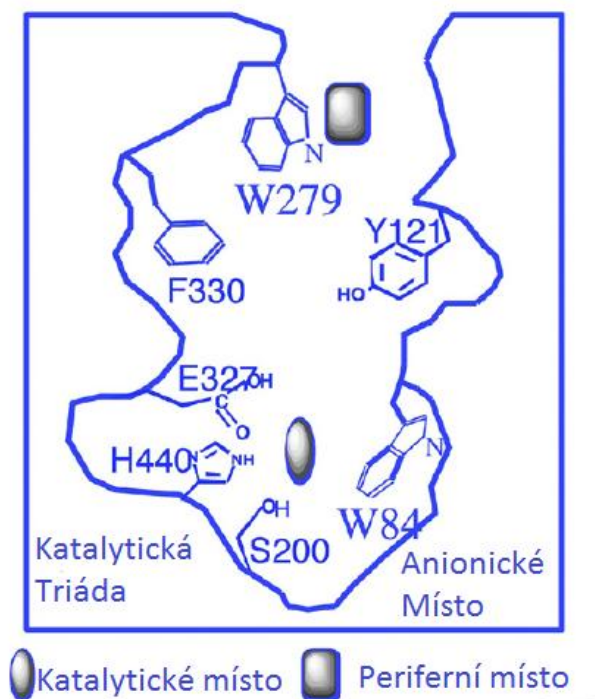
Aktivní centrum ACHE se skládá z pěti hlavních vazebných míst:

- oxyanionová díra, která stabilizuje vazbu acetylové skupiny¹⁷ a je tvořena Gly118, Gly119 a Ala201²¹
- esteratické místo, které se skládá z katalytické triády Ser-His-Glu
- anionické vazebné místo, kde se váže kvartérní amoniová část ACH a různá aktivní místa ligandu
- aktivní místo selektivně vázající aromáty, které je důležité pro vazbu arylových substrátů¹⁷
- acyl vázající místo pro vazbu acetylové skupiny ACH^{17,23}

Kromě těchto pěti částí aktivního místa má ACHE také periferní anionické místo, které může vázat takrin a podobné látky.¹⁷

Ligandy jsou selektivně vázány buď na acyl vázající místo, nebo na periferní místo.²³

Prohlubeň aktivního místa má alternativní cesty pro vstup substrátů, což bylo dokázáno krystalografickou studií.²⁴



Obr. 4: Struktura aktivního místa (přeloženo z anglické literatury)²⁵

3.2.5.2. Rozdíly v aktivním místě ACHE a BCHE

Mezi aktivním místem ACHE a BCHE je několik rozdílů. U ACHE je vazba substrátu uskutečněna dvěma molekulami fenylalaninu, jejichž aromatické zbytky vyčnívají do prohlubně. BCHE má namísto fenylalaninu dvě malé molekuly aminokyselin, jako je valin a leucin.^{17, 21} Rozdíl v aminokyselinách vytváří větší prostor v nejhlubším místě aktivního centra BCHE a umožňují vazbu větších molekul substrátu a inhibitorů BCHE.¹⁷

3.2.6. Elektrostatická charakteristika

Aromatický povrch prohlubně aktivního místa může sloužit jako slabá afinitní kolona, kde substrát může přeskočit nebo sklouznout do aktivního místa pomocí postupných π -interakcí. CHE mají asymetrické rozdělení náboje, což způsobuje velký dipól moment orientovaný přibližně podél osy prohlubně aktivního místa.²⁴ Dipól moment může sloužit k přilákání pozitivně nabitých substrátů ACHE do aktivního místa.²⁵

3.3. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní mozková choroba s charakteristickými a patologickými rysy, s individuálními variacemi s ohledem na věk a druh kognitivního poškození.¹⁷ AD je nejběžnější forma demence u starších osob charakterizovaná ztrátou paměti, poškozením uvažování, rozhodování a řeči.^{17,26} Prevalence se zvyšuje se stárnutím obyvatelstva.²⁷

Jedinci s AD vykazují úpadek funkce v oblasti duševního zdraví, což způsobuje neschopnost vykonávat běžné denní aktivity. Existují důkazy o tom, že nemoc může postihnout i osoby ve věku 40 let. Bohužel není známa příčina onemocnění.²⁷

3.3.1. Patofyziologie Alzheimerovy choroby

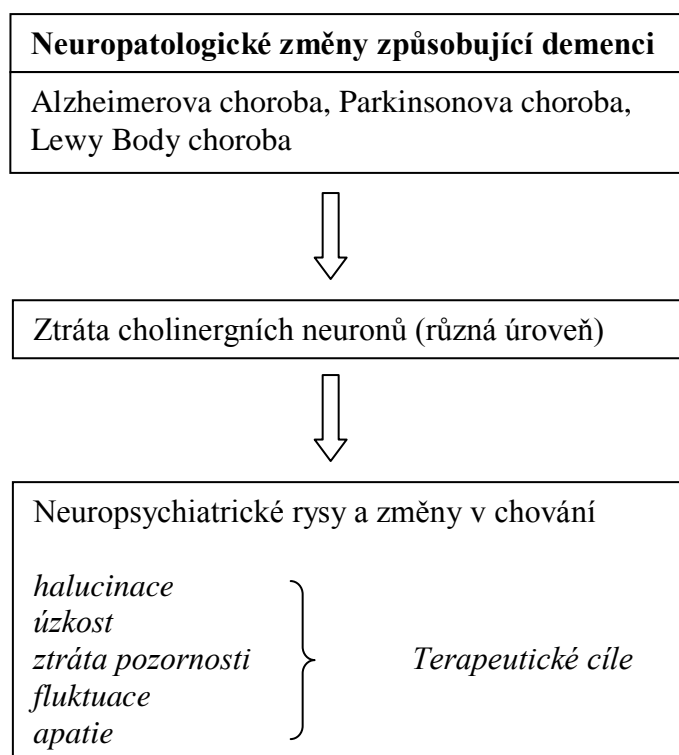
Patofyziologie je komplexní.¹⁷ Za jedny z prvních a stěžejních událostí u AD je považována degenerace a ztráta trofické podpory cholinergních neuronů bazálního předního mozku včetně degenerace jejich široké projekce.¹⁶

První hypotézou vzniku AD je cholinergní hypotéza charakterizována selektivním úmrtím nervových buněk, přítomností extracelulárních amyloidních usazenin v jádře neuritických plaků a tvořením interneurálních neurofibrilárních spleť v mozku. Spleti vznikly akumulací abnormálních látek neurálního cytoskeletu agregací

vláken šroubovic. Produkce a usazování β -amyloidu je kritickým momentem v patogenezi AD. Deficity jsou spojovány z neurochemického hlediska s dramatickou ztrátou kortikální projekce cholinergních neuronů a snížení presynaptických markerů cholinergního systému, zejména v místech mozku spojených s pamětí a učením.¹⁷ V posmrtných studiích je neprůkazné zapojení cholinergního systému v počátečních fázích AD.¹⁶

Současná definice AD vyžaduje klinicky diagnostikovanou demenci, to je pokles dvou kognitivních domén způsobující zhoršení sociálního a pracovního fungování.²⁸

U AD je velmi dobře zdokumentován cholinergní deficit. Je zde výrazný úbytek neuronů v jádrech bazálního předního mozku, který obvykle přesahuje 75 % celkové neuronální populace. Ve zbývajících neuronech bazálních jader jsou bohaté neurofibrilární spleti. Úbytek cholinergních neuronů vede ke snížení aktivity cholin-acetyltransferasy o 80-90 % v hippocampu a o 40-75 % v parietální kůře a frontálních konvexech. Normální hodnoty jsou ve středním mozku, thalamu, hypothalamu a mozečku.¹⁹ Cholinergní hypotéza je graficky znázorněna na **Obr. 5**.²⁹



Obr. 5: Diagram cholinergní hypotézy²⁹

Amyloidová hypotéza popisuje charakteristický znak AD, extracelulární amyloidní beta ($A\beta$) plaky. Produkce $A\beta$, která je rozhodujícím krokem patogeneze AD,

je výsledkem rozkladu velkých peptidů zvaných amyloidní prekurzorové proteiny (APP), které jsou nadprodukovány při AD.

APP tvoří vysoce rozpustná a proteolyticky odolná vlákna známá jako senilní plaky. Lidský APP gen byl prvně identifikován v roce 1987. APP, membránový protein typu I, má dva homology, APLP1 a APLP2. Štěpením APP vznikají dva štěpy, jeden v extracelulární oblasti (β -sekretový štěpy) a druhý v transmembránových regionech (γ -sekretové štěpy). Štěpy jsou nezbytné k uvolnění $A\beta$ z prekurzorového proteinu.

APP je lokalizován na chromozomu 21, a poskytuje bezprostřední spojení s trisomií 21 (Downův syndrom). Jednalo se o první mutaci, která byla ukázaná jako zdůvodnění dědičných forem familiární AD, kde byly identifikovány APP geny poskytující důkaz, že APP hraje centrální roli v patogenezi AD. Jen APP, ne jeho homology APLP1 a APLP2, zahrnují sekvence kódující $A\beta$ domény.³⁰

Intracelulární neurofibrilární spleti (NFT) jsou další možnou příčinou vzniku AD. NFT jsou tvořeny tau proteinem. U zdravých lidí je tau protein součástí mikrotubulů, které patří k interní podpoře struktur pro transport výživy, vezikul, mitochondrií a chromozomů v buňce. Mikrotubuly stabilizují rostoucí axony nezbytné pro vývoj a růst neuritů. U AD je tau protein abnormálně hyperfosforylován a tvoří nerozpustná vlákna.

Tau protein je relativně hojný v neuronech, ale vyskytuje se ve všech jaderných buňkách. Jeho fyziologická funkce je vázání mikrotubulů a stabilizace mikrotubulů určených k polymeraci.

Tau protein kóduje gen (MAPT – microtubule associated protein tau) skládající se z 16 exonů. Může se vyskytovat v šesti izoformách.

U AD bylo jasně prokázáno, že tau patologie se objeví později než $A\beta$ depozice.³⁰

Další z hypotéz patofyziologie AD vychází z poklesu počtu nikotinových receptorů, kdežto muskarinové klesají, nemění svou koncentraci nebo stoupají. Je to dáno tím, že hlavní část muskarinových receptorů je lokalizována postsynapticky a pouze malá část jsou presynaptické autoreceptory cholinergních buněk (10-20 %).

V patogenezi AD hraje důležitou roli také mitochondrie. Jedná se o poškození třech klíčových enzymů dýchacího řetězce, a to komplexu I, III a IV. Také byl detekován pokles degradace mitochondrií autofágy.²⁶

3.3.2. Mírná kognitivní choroba

Mohlo by být více efektivní začít léčbu již v raných stádiích onemocnění. Donald Petersen popsal kritéria pro diagnózu MCI: zhoršená paměť; potvrzení zhoršení osobou, která osobu s AD zná dobře; zhoršení paměti ve srovnání s jinou osobou stejného věku a vzdělání; zachovány obecné kognitivní funkce; neporušené činnosti v každodenním životě a nepřítomnost demence.

U tohoto stádia se testovala léčba donepezilem. Donepezil způsobil výrazné zlepšení v kognitivní funkci během 24 týdnů.²⁷

3.3.3. Léčba Alzheimerovy choroby

V současné době jsou schváleny dvě skupiny léků pro léčbu AD, cholinesterasové inhibitory (CHEI) pro mírně až středně těžkou AD a memantin, který je antagonistický pro *N*-methyl D-aspartát (NMDA) receptory, pro středně těžkou až těžkou AD.²⁸ Vzniklo mnoho léků (50-60), které jsou podrobeny klinickému testování a mají být užity k symptomatické a paliativní léčbě.¹⁷

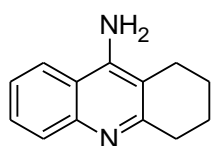
Kombinace léků působících na různé stupně neurotoxické kaskády může nabídnout nový směr léčení AD a jiných neurodegenerativních onemocnění. Vznikla nová strategie, která má vytvořit chemické látky působící na více cílů. Chemické látky musí být účinné a bezpečné. Nová strategie, multicílový ligand (MTDL), je založena na kombinaci dvou a více farmak působících na rozdílné cíle.²⁶

3.3.3.1. Cholinesterasové inhibitory

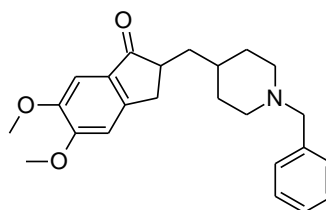
První známý CHEI byl fysostigmin, hlavní alkaloid nalezený v semenech rostliny *Physostigma venenosum*.¹⁷ CHEI mají dlouhou historii, v roce 1980 byl fysostigmin aplikován orálně a intravenózně. Účinek fysostigminu byl příliš krátký a měl časté cholinergní vedlejší účinky. Historický průlom v léčbě AD byl v polovině 90. let 20. století, kdy byl použit jiný lék – takrin. Mezi nejčastější CHEI patří donepezil, rivastigmin a galantamin. Všechny CHEI mají vedlejší účinky: nevolnost, zvracení, křeče v břiše, nechutenství a ztráta hmotnosti, nespavost, myopatie, duševní deprese a jiné.^{20,31} CHEI jsou první nejrozvinutější skupinou léků umožňující léčbu AD.¹⁷ Léčba je založena na znovuoobnovení cholinergní rovnováhy.²⁰

Existuje pět léků schválených Úřadem pro potraviny a léčiva (Food and drug Administration, FDA), který kontroluje symptomy a pomalou progresi AD. Čtyři, zvané CHEI, takrin (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmin (Exelon®) a galantamin

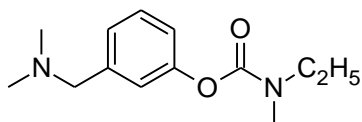
(Razadyne®, dříve Reminyl®), zpomalují metabolismus odbouráváním acetylcholinu, důležité chemické látky zajišťující mezibuněčnou komunikaci. Tyto léky utváří větší počet látek, které jsou k dispozici pro komunikaci mezi buňkami. CHEI způsobují pomalou progresi kognitivního poškození, což může být účinné pro pacienty s AD. Tyto čtyři léky jsou schválené pro léčbu mírných až středních příznaků AD. Pátý lék, memantin (NAMEDA®), je schválen pro léčbu středně těžké až těžké AD. NAMEDA® je středně afinitní, nekompetitivní antagonist pro NMDA receptory (receptory pro glutamát) a jak se zdá, chrání mozkové nervové buňky proti nadbytku glutamátu, chemickému poslu, který se ve velké míře uvolňuje do mozkových buněk zasažených AD. Vykazuje podobné efekty jako CHEI u středně těžké AD.¹⁷ Vzorce používaných léků jsou znázorněny na **Obr. 6**.¹⁷



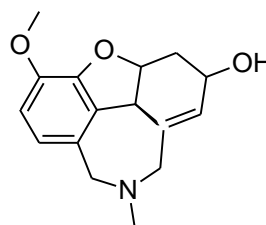
Takrin



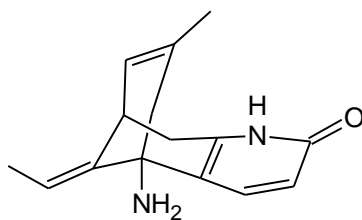
Donepezil



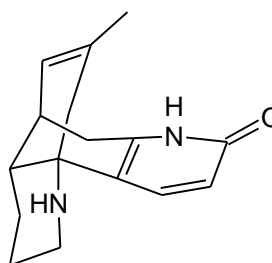
Rivastigmin



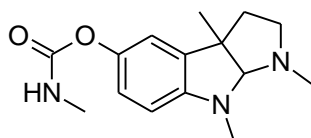
Galantamin



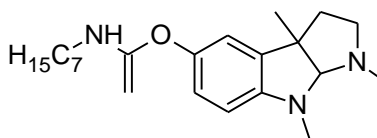
Huperzine A



Huperzine B

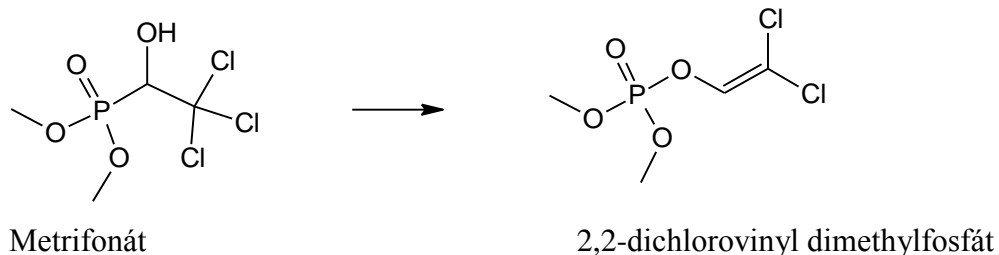


Fysostigmin



Eptastigmin

Obr. 6: Přehled CHEI využívaných v medicíně¹⁷



Obr. 6: Přehled CHEI využívaných v medicíně¹⁷ - pokračování

3.3.3.2. Klasifikace CHEI

CHEI mohou být klasifikovány dle chemické struktury na piperidinové deriváty (donepezil), karbamáty (rivastigmin, fysostigmin, eptastigmin), alkaloidy (galantamin, huperzine), akridiny (takrin), organofosfáty (metrifonát)^{17, 19} a dle typu a průběhu účinku, zda jsou inhibitory reverzibilní nebo ireverzibilní. Termodynamicky jsou všechny reakce ireverzibilní.¹⁷

CHEI se váží rozdílnou vazbou. Takrin, velnakin, donepezil a huperzin jsou vysoce afinitní, nekovalentní inhibitory, metrifonát se spojuje se substrátem ireverzibilní kovalentní vazbou. Mohou mít i jiné vlastnosti z hlediska kinetiky. Takrin a velnakin jsou nekompetitivní inhibitory, donepezil nekompetitivní i kompetitivní, galantamin kompetitivní inhibitor a s časem se stává nekompetitivní.

Galantamin je acetylcholinesterasový inhibitor (ACHEI) a alosterický modulátor nikotinových cholinergních receptorů.

Takrin a velnakin mají hepatotoxické účinky, eptastigmin tvoří neutropenie.¹⁹

Dále mohou být rozděleny dle afinity k BCHE (galantamin a donepezil inhibují pouze ACHE, kdežto rivastigmin ACHE a BCHE), senzitivě nikotinových receptorů, klasických farmakokinetických a farmakodynamických parametrů.¹⁷

3.3.3.2.1. Reverzibilní inhibitory

Patří sem např. takrin a donepezil, které interagují s enzymem blízko katalytického centra bez produkce kovalentního komplexu. Váží se k enzymu pomocí slabých vazeb, které se tvoří rychle, ale jsou křehké. Inhibují velmi krátkou dobu (jen v řádu minut).¹⁷

3.3.3.2.2. Pseudoireverzibilní inhibitory

Pseudoireverzibilní inhibitory se váží k enzymu kovalentně. Kovalentní vazba je pomalu rozbita a enzym se znovu stává dostupným. Patří sem karbamáty, které tvoří karbamoylový komplex se serinovými zbytky katalytické triády ACHE. Prototypem je fysostigmin, dále do této skupiny patří eptastigmin, quilostigmin, fenserin, tolserin. Všechny látky byly testovány na anticholinesterasovou aktivitu. Jen rivastigmin je schválen FDA pro léčbu AD.¹⁷ Rivastigmin (ExelonTM) je karbamát objevený jako léčivo na AD paní Weinstock.²⁵

Fysostigmin byl první CHEI.¹⁷ Čistý alkaloid byl také izolován z kalabarských bobů v roce 1864 a později byl pojmenován jako fysostigmin. Boby způsobily kontrakci zorniček, proto byly nejdříve používány k léčbě zeleného zákalu. V několika zemích se fysostigmin dále k této léčbě používá. Jeho efektivní antidotum je atropin.

Neostigmin byl poprvé použit k léčbě gastrointestinální atonie nebo atonie močového měchýře. Později bylo zjištěno, že je možné jej využít k léčbě zeleného zákalu a *myasthenia gravis*. Pyridostigmin, jiný karbamátový CHEI, je také používán na léčbu *myasthenia gravis* a jako preventivní prostředek na ochranu proti potenciální nervové expozici organofosfátů. *Myasthenia gravis*, neuromuskulární autoimunitní onemocnění, byla úspěšně léčena neostigminem a pyridostigminem.³²

3.3.3.2.3. Ireverzibilní inhibitory

Ireverzibilní inhibitory jsou známé jako enzymové inaktivátory. Tato třída zahrnuje organofosfáty, jejichž inhibiční efekt je založený na fosforylaci nebo fosfonylaci serinové hydroxylové skupiny esteratického místa aktivního místa enzymu. Fosforylovaný enzym podléhá dvěma reakcím: spontánní reaktivaci a dealkylaci. Defosforylace je pomalejší než dekarbamoylace. Ireverzibilní inhibitory většinou reagují s enzymy za vzniku pevné kovalentní vazby. Reakce ukazuje časovou závislost, stupeň inhibice vzrůstá v čase. Tělo musí syntetizovat nové, náhradní enzymy, aby byla zajištěna farmakologická funkce.¹⁷

3.3.4. Další možná léčba AD

3.3.4.1. Ladostigil

Ladostigil byl vytvořen sloučením struktur rivastigminu (acetylcholinesterasový inhibitor, ACHEI) a rasagilinu (selektivní inhibitor monoaminové oxidasy, MAO-B).

Díky tomuto složení ladostigil vykazuje schopnost inhibovat obě cholinesterasy (ACHE a BCHE) a mozkovou monoaminovou oxidasu (MAO-A a MAO-B). Inhibitory MAO jsou potenciálními antidepresivy, zvyšují koncentraci dopaminu, noradrenalinu a serotoninu v CNS. Lagostigil má také další účinky na nervový systém. Například chrání buňky před oxidativním stresem. Lagostigil má předpoklad stát se lékem na AD.²⁶

3.3.4.2. AMPA kinasy

AMPA (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanová kyselina) kinasy tvoří novou skupinu léků, které by mohly změnit a posílit poznání pomocí jejich působení na glutamát jako na excitační neurotransmiter. Léky působící na AMPA a NMDA receptory zlepšují poznání a paměťové mechanismy.²⁸

3.3.4.3. *Ginkgo biloba*

Léčba tímto přírodním preparátem je známá. *Ginkgo biloba* je bezpečná a zdá se, že stabilizuje a zlepšuje kognitivní a sociální fungování jedince s demencí.²⁸

3.3.4.4. Anti-amyloidní léčba

Anti-amyloidní léčba způsobuje kompletní odstranění amyloidních plaků z mozku. Léčba zahrnuje monoklonální protilátky proti A β . Další možné způsoby jsou imunoglobuliny a imunizace kratšími fragmenty A β , která může obejít komplikace meningoencefalitidy.²⁸

Nejvíce studované léčivo byl tramiprosat (AlzhemedTM), které patří mezi glykosaminoglykanová (GAG) emetika vázající se k rozpustným A β . GAG emetika soutěží o GAG-vazebné místo, čímž blokuje fibrilární struktury a redukci rozpustných A β . Dalším léčivem byl kolostrin, polypeptid bohatý na prolin odvozený od ovčího kolostra (O-CLN; ReGen terapeutika), který inhibuje A β hromadění a neurotoxicitu v buňkách, a tím zlepšuje kognitivní funkci. Scyllo-inositol (AZD103) je látka stabilizující oligomerní agregáty A β a inhibují toxicitu A β .³⁰

3.3.4.5. Anti-tau léčba

K léčbě je možné použít například methylthionium chlorid (MTC, tauRx Therapeutics, RemberTM). MTC interferuje s agregáty tau proteinu. K blokaci agregátu tau proteinu je důležitá inhibice kinas, které jsou zodpovědné za hyperfosforylaci tau proteinu.³⁰

3.3.5. Účinek léčby

Příznivé účinky ACHEI na emoce a chování jsou pravděpodobně zprostředkovány cholinergními vlivy na limbický a paralimbický systém. Pacienti vykazující podstatné kognitivní zlepšení mají obvykle současně probíhající behaviorální odpovědi, ale chování a kognitivní odpovědi mohou být od sebe odděleny.¹⁹

Terapie je zaměřena na zlepšení symptomů – paměť, rozpoznávání, nálada a chování.¹⁷

Doposud používané léky nejsou očekávaným zázrakem v léčbě, ale též nejsou zcela bez účinku. CHEI působí na některé pacienty, na některé nikoliv. Skutečnost, že se běžně mnoho jiných léků používá v jiných oborech medicíny, může být začátkem řešení.²⁹

4. CÍL

Cílem diplomové práce bylo syntetizovat *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidy a jejich deriváty v požadované čistotě, charakterizovat látky teplotou tání a nukleární magnetickou rezonancí (NMR), potvrdit čistotu látek elementární analýzou (CHN).

U látek byla následně testována jejich inhibiční aktivita proti cholinesterasám, acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase, charakterizována hodnotou IC₅₀.

5. Experimentální část – Syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich derivátů

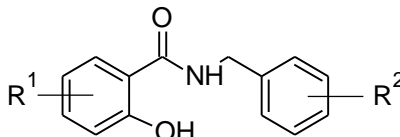
Použitá rozpouštědla, činidla a jiné chemikálie, které byly k syntézám použity, byly od výrobců Sigma-Aldrich, Merck, AcrosOrganics a Lach-Ner CZ. Všechna komerční rozpouštědla byla použita bez další úpravy. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na chromatografickém papíře povrchově upraveném 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo). TLC byla prováděna ve dvou soustavách, s₁ toluen:ethylacetát 4:1 a s₂ dichlormethan:metanol 9:1. Vizualizace byla uskutečňována pomocí UV záření (254 nm). Body tání byly stanoveny na přístroji Melting Point B-545 (Buchi, Německo). NMR spektra byly měřeny v dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆) při laboratorní teplotě na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz (Karlsruhe, Bruker, Německo, 400 MHz pro ¹H, 100 MHz pro ¹³C). Chemické posuny protonu v DMSO-*d*₆ souvisí se středem multipletu rozpouštědla ($\delta=2,50$). ¹³C-NMR spektra byla měřena pomocí APT pulzních sekvencí. Chemické posuny uhlíku se vztahují ke středu multipletu rozpouštědla ($\delta=39,5$ v DMSO-*d*₆). Chemické posuny pro systémy AB byly vypočteny jako vážený průměr vážených pozic linie podle intenzity píků.

Názvy struktur kromě esterů byly vygenerovány v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs, Advanced Chemistry Development, Inc., verze 12.01), názvy esterů byly generované v programu ChemDraw Ultra 8.0. Následně byly názvy přeloženy do českého jazyka.

5.1. Syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

Syntéza *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů byla prováděna dle postupů popsanych v literatuře^{3,4,6}, popřípadě modifikovaným postupem. Literární postupy jsou diskutovány v odstavcích 1.1.1.3 a 1.1.1.6.

Přehled 1: Přehled připravených *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, jejich teplot tání a skutečných výtěžků v porovnání s literárními zdroji¹⁴



Substituenty		Metoda syntézy	Teplota tání (°C)	Teplota tání		Výtěžek reakce (%)
R ¹	R ²			v literatuře (°C)	Výtěžek reakce (%)	
5-Cl	H	Mikrovlnná	144,5-146,4	144-145	46,12	63
5-Cl	4-Cl	Mikrovlnná	154,3-156,6	154-155	45,75	58
5-Cl	4-OCH ₃	Modifikace klasické	124,4 – 129,7	134-136	55,65	63
5-Cl	4-F	Modifikace klasické	152,8-155,5	155-157	48,48	61

5.1.1. Syntéza *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamidu

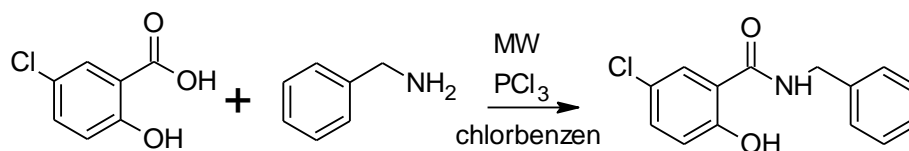


Schéma 10: Syntéza *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamidu

Přehled 2: Navážky reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látky	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlorsalicylová kyselina	172,57	0,0405	6,99	-	-
Benzylamin	107,15	0,0405	4,34	4,27	0,983
Chlorid fosforitý	137,33	0,0405	5,56	3,5	1,574
Chlorbenzen	-	-	-	300	-
<i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid (<i>BH001</i>)	261,70	0,0405	10,59*	-	-

* Teoretický výtěžek

K syntéze byla využita metoda mikrovlnné syntézy. Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 2**. 5-chlorsalicylová kyselina a benzylamin byly smíchány ve 300 ml chlorbenzenu. Chlorid fosforitý (PCl₃) byl přidán k suspenzi bezprostředně před reakcí v mikrovlnném reaktoru. Reakční směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru, kde reakce probíhala po dobu 20 minut za konstantního výkonu (400 W). Horká reakční směs byla přelita do Erlenmeyerovy baňky. Po vychladnutí směsi byla vzniklá sraženina odfiltrována. Z matečného louhu bylo rozpouštědlo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky (RVO) a vzniklý surový produkt byl spojen s prvním podílem a krystalizován z ethanolu (**Schéma 10**). Výtěžek reakce byl 4,88 g (46,1 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 144,5-146,4 °C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.¹⁴

CHN pro (C₁₄H₁₂ClNO₂, 261,7 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 65,34 %, H 5,12 %, N 5,08 %

naměřené hodnoty: C 65,64±0,10 %, H 4,86±0,08 %, N 5,40±0,05 %

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,69 a R_{fs2}=0,72.

5.1.2. Syntéza 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamidu

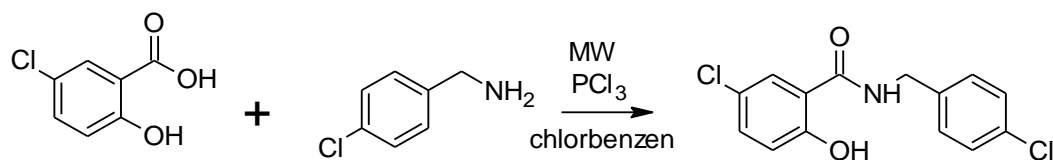


Schéma 11: Syntéza 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamidu

Přehled 3: Navážky reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlorsalicylová kyselina	172,57	0,0405	6,99	-	-
4-chlorbenzylamin	141,60	0,0405	5,73	4,9	1,164
Chlorid fosforitý / thionyl chlorid	137,33 /	0,0405 /	5,56 /	3,5 /	1,574 /
	118,97	0,0405	4,818	2,94	1,638
5-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid (<i>BHA002,15</i>)	296,15	0,0405	11,99*	-	-

* Teoretický výtěžek

K syntéze byla využita metoda mikrovlnné syntézy. Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 3**. 5-chlorsalicylová kyselina a 4-chlorbenzylamin byly smíchány ve 300 ml chlorbenzenu. PCl₃ (případně thionyl chlorid) byl přidán do suspenze bezprostředně před reakcí v mikrovlnném reaktoru. Reakční směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru, kde reakce probíhala po dobu 20 minut při konstantním výkonu (400 W). Po vychladnutí směsi byla vzniklá sraženina odfiltrována. Z matečného louhu bylo rozpouštědlo odpařeno pomocí RVO a vzniklý surový produkt byl spojen s prvním podílem a krystalizován z ethanolu (**Schéma 11**). Výtěžek reakce byl 45,8 %.

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 154,3-156,6°C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.¹⁴

CHN pro (C₁₄H₁₁Cl₂NO₂, 296,15 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 56,78 % H 3,74 % N 4,73 %

naměřené hodnoty: C 56,90±0,10 % H 3,92±0,09 % N 4,98±0,06 %

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,63 a R_{fs2}=0,83.

5.1.3. Syntéza 5-chlor-2-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)benzamidu

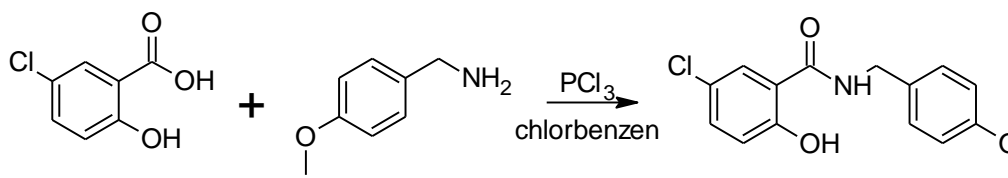


Schéma 12: Syntéza 5-chlor-2-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)benzamidu

Přehled 4: Navážky reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlorsalicylová kyselina	172,57	0,02	3,45	-	-
4-methoxybenzylamin	137,18	0,02	2,59	2,6	1,164
Chlorid fosforitý	137,33	0,01	1,37	0,87	1,574
5-chlor-2-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)benzamid (BHA028,32)	291,73	0,02	5,84*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky jsou shrnuty v **Přehledu 4**. Substituovaná kyselina salicylová byla smíchána se 100 ml chlorbenzenu. Do směsi byl přidán PCl₃. Směs byla zahřívána za stálého míchání pod refluxem po dobu 20 minut. Ke vzniklému chloridu kyseliny byl přikapán 4-methoxybenzylamin, který byl smíchán s chlorbenzenem. Reakční směs byla zahřívána do vymizení výchozí kyseliny salicylové. Horká reakční směs byla zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO. Krystalizace surového produktu z ethanolu nebyla úspěšná, proto se produkt rozpustil v ethylacetátu a směs byla vyextrahována pomocí 5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Ethylacetát byl vysušen bezvodým síranem sodným a byl odpařen pomocí RVO (**Schéma 12**). Produkt byl krystalizován z ethylacetátu/hexanu. Výtěžek reakce byl 3,25 g (55,7 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 124,4-129,7°C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.¹⁴

CHN pro (C₁₅H₁₄ClNO₃, 291,73 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 61,76 % H 4,84 % N 4,80 %

naměřené hodnoty: C 61,49±0,15 % H 4,92±0,14 % N 5,12±0,10 %

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,64 a R_{fs2}=0,75.

5.1.4. Syntéza 5-chlor-*N*-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamidů

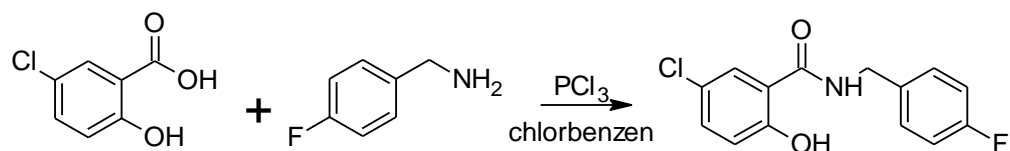


Schéma 13: Syntéza 5-chlor-*N*-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamidů

Přehled 5: Navážky reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlorsalicylová kyselina	172,57	0,02	3,45	-	-
4-fluorbenzylamin	125,14	0,02	2,50	2,29	1,095
Chlorid fosforitý	137,33	0,01	1,37	0,87	1,574
5-chlor- <i>N</i> -(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid (<i>BHA033</i>)	279,69	0,02	5,59*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky jsou shrnuty v **Přehledu 5**. Substituovaná kyselina salicylová byla smíchána se 100 ml chlorbenzenu. Do směsi byl přidán PCl₃. Reakční směs byla zahřívána pod refluxem po dobu 20 minut. Ke vzniklému chloridu byla přikapána směs 4-fluorbenzylaminu v chlorbenzenu. Reakční směs byla zahřívána do vymizení výchozí kyseliny salicylové. Horká reakční směs byla zfiltrována a chlorbenzen byl odpařen pomocí RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu a směs byla vyextrahována pomocí vodných roztoků: nasycený roztok chloridu sodného (10 ml), 5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného (10 ml), 10% kyselinou chlorovodíkovou (10 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (10 ml). Ethylacetát byl vysušen bezvodým síranem sodným a byl odpařen pomocí RVO. Surový produkt byl krystalizován z ethylacetátu/hexanu (**Schéma 13**). Výtěžek reakce byl 2,71 g (48,5 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 152,8-155,5°C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.¹⁴

CHN pro (C₁₄H₁₁ClFNO₂, 279,69 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 60,12 % H 3,95 % N 5,01 %

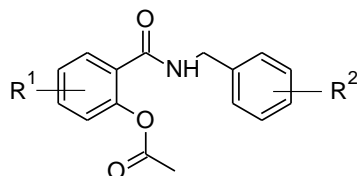
naměřené hodnoty: C 59,31±0,11 % H 4,43±0,05 % N 5,31±0,04 %

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,70 a R_{fs2}=0,78.

5.2. Syntéza acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

Syntéza acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů byla prováděna modifikovaným způsobem syntézy (metoda A) pro alifatické *N*-salicylanilidy popsáním v literatuře. Postup je diskutovaný v odstavci 1.1.2.1.⁷

Přehled 6: Přehled připravených acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, jejich teplot tání a skutečných výtěžků.



Substituenty		Teplota tání (°C)	Výtěžek reakce (%)
R ¹	R ²		
5-Cl	H	133,5 – 135,2	22,9
5-Cl	4-Cl	148 - 150	23,8
5-Cl	4-OCH ₃	120 – 122	50,0
5-Cl	4-F	149,4 – 151,6	52,8

5.2.1. Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetátu

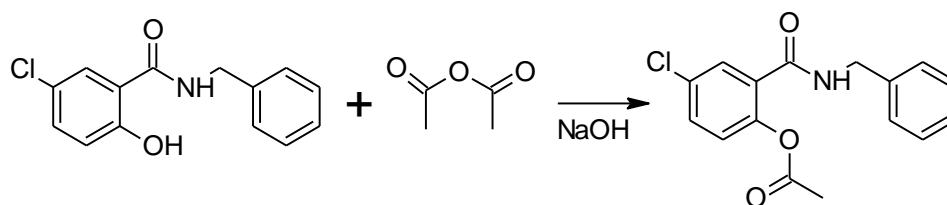


Schéma 14: Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetátu

Přehled 7: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
N-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid	261,05	0,0025	0,65	-	-
Anhydrid kyseliny octové	102,09	0,0028	2,81	2,6	1,08
Hydroxid sodný	40	0,0025	1,0	-	-
2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetát (BH002)	303,74	0,0025	0,76*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 7**. N-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn v 80 ml roztoku hydroxidu sodného a destilované vody. Reakční směs byla následně vychlazena v ledové lázni. Ke směsi byl přidán anhydrid kyseliny octové. Směs byla při dané teplotě míchána po dobu 30 minut. Surový produkt byl zfiltrován, promyt destilovanou vodou a usušen ve vakuu při laboratorní teplotě. Usušený produkt byl opakovaně krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 14**). Výtěžek reakce byl 0,174 mg (22,9%).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 133,5-135,2 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 9.0 (1H, t, $J=6.1$ Hz, NH), 7.69-7.63 (2H, m, 2xAr-H), 7.39-7.29 (6H, m, 6xAr-H), 4.45 (2H, d, $J=6.0$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.17 (3H, s, $-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 164.62, 147.49, 139.80, 131.65, 130.59, 129.95, 128.92, 127.92, 127.50, 126.0, 43.16, 40.78, 40.55, 40.36, 40.15, 39.96, 39.75, 39.54, 21.24.

CHN pro (C₁₆H₁₄ClNO₃, 303,74 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 63,27 %, H 4,65 %, N 4,61 %

naměřené hodnoty: C 62,99±0,12 %, H 4,91±0,08 %, N 4,88±0,10 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,39 a R_{fs2}=0,76.

5.2.2. Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

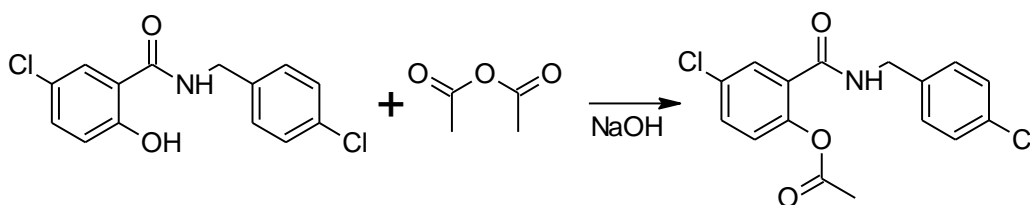


Schéma 15: Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

Přehled 8: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-N-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	296,15	0,0025	0,74	-	-
Anhydrid kyseliny octové	102,09	0,0028	2,81	2,6	1,08
Hydroxid sodný	40	0,0025	1,0	-	-
4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát (<i>BHA003</i>)	338,19	0,0025	0,845*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 8**. 5-chlor-N-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn v 80 ml roztoku hydroxidu sodného a destilované vody. Reakční směs byla následně vychlazena v ledové lázni. Ke směsi byl přidán anhydrid kyseliny octové. Směs byla při dané teplotě míchána po dobu 30 minut. Surový produkt byl zfiltrován, promyt destilovanou vodou a usušen ve vakuu při laboratorní teplotě. Usušený produkt byl opakovaně krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 15**). Výtěžek reakce byl 0,201 mg (23,8%).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 148-150 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 9.01 (1H, t, $J=5.9$ Hz, NH), 7.65 (1H, d, $J=2.5$ Hz, Ar- H), 7.59 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.3$ Hz, Ar- H), 7.40 (2H, m, AA', BB', 2xAr- H), 7.34 (2H, m, AA', BB', 2xAr- H), 7.25 (1H, d, $J=8.6$ Hz, Ar- H), 4.39 (2H, d, $J=5.9$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.14 (3H, s, $-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 168.7, 163.9, 146.7, 138.12, 131.3, 131.0, 130.7, 129.8, 129.1, 128.5, 128.2, 125.3, 41.8, 20.6.

CHN pro ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$, 338,19 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 56,82 %, H 3,87 %, N 4,14 %

naměřené hodnoty: C $56,62 \pm 0,14$ %, H $4,04 \pm 0,12$ %, N $4,39 \pm 0,05$ %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,38$ a $R_{f2}=0,76$.

5.2.3. Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

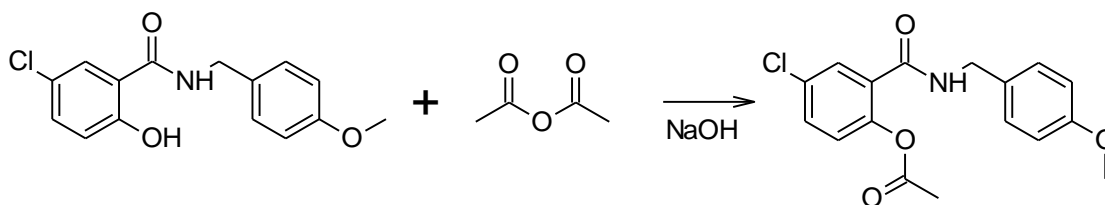


Schéma 16: Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

Přehled 9: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4-methoxybenzyl)benzamid	291,73	0,00075	0,22	-	-
Anhydrid kyseliny octové	102,09	0,0083	0,84	0,78	1,08
Hydroxid sodný	40	0,0075	0,30	-	-
4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetát (<i>BHA029</i>)	333,77	0,00075	0,25*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 9**. 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-methoxybenzyl)benzamid byl rozpuštěn ve 12 ml roztoku hydroxidu sodného a destilované vody. Reakční směs byla následně vychlazená v ledové lázni. Ke směsi byl přidán anhydrid kyseliny octové. Směs byla při dané teplotě míchána po dobu 30 minut. Surový produkt byl zfiltrován, promyt destilovanou vodou a usušen ve vakuu při laboratorní teplotě. Usušený produkt byl opakovaně krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 16**). Výtěžek reakce byl 0,125 mg (50,0 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 120-122 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 8.90 (1H, t, $J=6.2$ Hz, NH), 7.61 (1H, d, $J=2.5$ Hz, Ar- H), 7.59 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar- H), 7.24 (2H, m, AA', BB', 2xAr- H), 6.90 (2H, m, AA', BB', 2xAr- H), 7.25 (1H, d, $J=8.6$ Hz, Ar- H), 4.32 (2H, d, $J=6.1$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.73 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.12 (3H, s, $-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 168.67, 163.71, 158.22, 146.71, 131.17, 131.03, 130.96, 130.86, 129.8, 128.32, 127.92, 113.91, 55.02, 41.9, 40.09, 39.88, 39.67, 39.46, 39.25, 39.04, 38.84.

CHN pro (C₁₇H₁₆ClNO₄, 333,77 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 61,18 %, H 4,83 %, N 4,20 %

naměřené hodnoty: C 61,02±0,10 %, H 5,05±0,11 %, N 4,12±0,09 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,38 a R_{fs2}=0,76.

5.2.4. Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

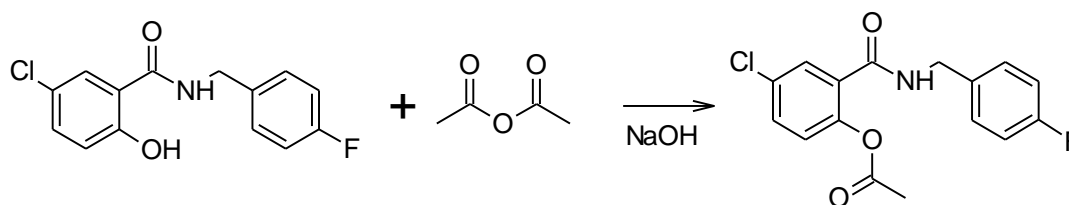


Schéma 17: Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetátu

Přehled 10: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-N-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	279,69	0,00079	0,22	-	-
Anhydrid kyseliny octové	102,09	0,0087	0,88	0,82	1,08
Hydroxid sodný	40	0,0079	0,32	-	-
4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát (BHA027)	321,73	0,00079	0,25*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 10**. 5-chlor-N-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn ve 24 ml roztoku hydroxidu sodného a destilované vody. Reakční směs byla následně vychlazená v ledové lázni. Ke směsi byl přidán anhydrid kyseliny octové. Směs byla při dané teplotě míchána po dobu 30 minut. Surový produkt byl zfiltrován, promyt destilovanou vodou a usušen ve vakuu při laboratorní teplotě. Usušený produkt byl opakovaně krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 17**). Výtěžek reakce byl 0,132 mg (52,8 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 149,4-151,6 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 8.97 (1H, t, $J=6.0$ Hz, NH), 7.64 (1H, d, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.59 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.36 (2H, m, AA', BB', 2xAr-H), 7.25 (1H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 7.16 (2H, m, AA', BB', 2xAr-H), 4.38 (2H, d, $J=5.7$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.13 (3H, s, $-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 168.65, 163.9, 162.39, 159.98, 146.73, 135.28, 135.25, 130.94, 130.82, 129.83, 129.36, 129.29, 129.21, 128.47, 125.29, 41.79, 39.9, 39.69, 39.48, 39.27, 39.06, 20.55.

CHN pro ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClFNO}_3$, 321,73 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 59,73 %, H 4,07 %, N 4,35 %

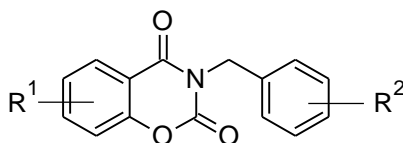
naměřené hodnoty: C $59,41 \pm 0,16$ %, H $4,31 \pm 0,12$ %, N $4,57 \pm 0,11$ %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,44$ a $R_{f2}=0,73$.

5.3. Syntéza benzoxazinu *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

Benzoxaziny *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů byly připraveny modifikací postupu popsaného v literatuře.⁸ Postup byl diskutován v odstavci 1.1.2.2.

Přehled 11: Přehled připravených acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, jejich teplot tání a skutečných výtěžků v porovnání s literárními zdroji.⁸



Substituenty		Teplota tání	Teplota tání	Výtěžek reakce	Výtěžek reakce
R ¹	R ²	(°C)	v literatuře (°C)	(%)	v literatuře (%)
5-Cl	H	148,0-151,5	144-146	40,3	62
5-Cl	4-Cl	200,0-202,6	198-199	65,3	49
5-Cl	4-OCH ₃	163,9-165,5	155-161	60,0	55
5-Cl	4-F	165,5-167,3	163-165	71,3	65

5.3.1. Syntéza 3-benzyl-6-chlor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionu

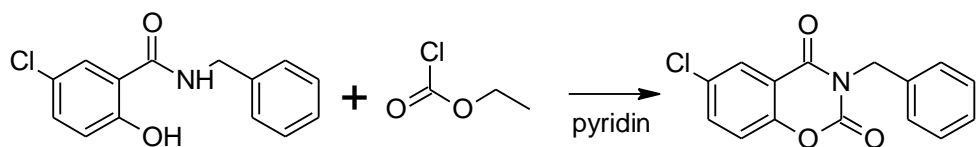


Schéma 18: Syntéza 3-benzyl-6-chlor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionu

Přehled 12: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
<i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid	261,06	0,003	0,8	-	-
Ethylchloroformiát	108,52	0,003	0,33	0,29	1,135
3-benzyl-6-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4-(3 <i>H</i>)-dion (<i>BHA022</i>)	287,70	0,003	0,86*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 12**. *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn ve 20 ml pyridinu. Reakční směs byla zchlazena a byl přikapán ethylchloroformiát. Směs byla míchaná a zahřívána pod refluxem po dobu 2 hodin. Následně byla reakční směs zneutralizovaná 5% kyselinou chlorovodíkovou (pH 7,0). Produkt byl zfiltrován a usušen ve vakuu při 50°C (**Schéma 18**). Výtěžek reakce byl 0,348 g (40,3%).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 148,0-151,5 °C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.⁸

CHN pro (C₁₅H₁₀ClNO₃, 287,70 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 62,62 %, H 3,50 %, N 4,87 %

naměřené hodnoty: C 62,84±0,06 %, H 3,87±0,05 %, N 4,98±0,04 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,74 a R_{fs2}=0,15.

5.3.2. Syntéza 6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

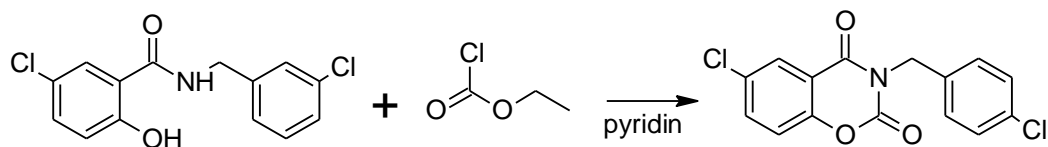


Schéma 19: Syntéza 6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Přehled 13: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	296,15	0,005	1,48	-	-
Ethylchloroformiát	108,52	0,006	0,65	0,57	1,135
6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion (<i>BHA021</i>)	322,14	0,005	1,61*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 13**. 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn ve 20 ml pyridinu. Reakční směs byla zchlazena a byl přikapán ethylchloroformiát. Směs byla míchaná a zahřívána pod refluxem po dobu 2 hodin. Následně byla směs zneutralizovaná 5% kyselinou chlorovodíkovou (pH 7,0). Produkt byl zfiltrován a usušen ve vakuu při 50°C (**Schéma 19**). Výtěžek reakce byl 1,05 g (65,3 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 200,0-202,6 °C.

^1H a ^{13}C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.⁸

CHN pro ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3$, 322,14g/mol) :

teoretické hodnoty: C 55,93 %, H 2,82 %, N 4,35 %

naměřené hodnoty: C 56,19±0,08 %, H 3,96±0,07 %, N 4,57±0,06 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,71$ a $R_{f2}=0,83$.

5.3.3. Syntéza 6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

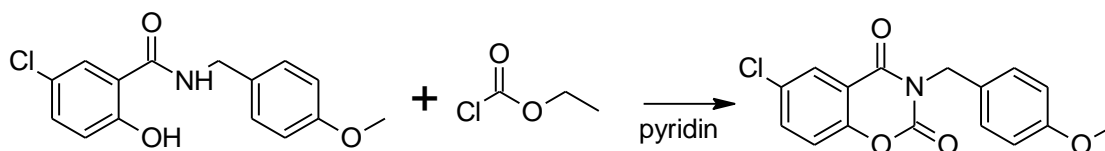


Schéma 20: Syntéza 6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Přehled 14: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4-methoxybenzyl)benzamid	291,73	0,00126	0,368	-	-
Ethylchloroformiát	108,52	0,00126	0,137	0,155	1,135
6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion (<i>BHA035</i>)	317,72	0,00126	0,40*		

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 14**. 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-methoxybenzyl)benzamid byl rozpuštěn ve 20 ml pyridinu. Reakční směs byla zchlazena a byl přikapán ethylchloroformiát. Směs byla míchaná a zahřívána pod refluxem po dobu 2 hodin. Následně byla směs zneutralizovaná 5% kyselinou chlorovodíkovou (pH 7,0). Produkt byl zfiltrován a usušen ve vakuu při 50°C (**Schéma 20**). Výtěžek reakce byl 0,24 g (60,0 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 163,9-165,5 °C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.⁸

CHN pro (C₁₆H₁₂ClNO₄, 317,72 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 60,48 %, H 3,81 %, N 4,41 %

naměřené hodnoty: C 60,71±0,06 %, H 3,74±0,10 %, N 4,37±0,09 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,71 a R_{fs2}=0,85.

5.3.4. Syntéza 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu

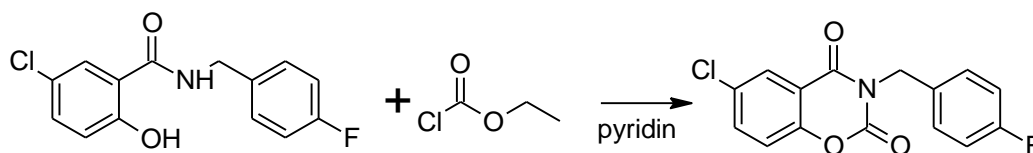


Schéma 21: Syntéza 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu

Přehled 15: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-N-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	276,69	0,00132	0,369	-	-
Ethylchloroformiát	108,52	0,00132	0,143	0,162	1,135
6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (BHA034)	305,69	0,00132	0,40*		

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 15**. 5-chlor-N-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl rozpuštěn ve 20 ml pyridinu. Reakční směs byla zchlazena a byl přikapán ethylchloroformiát. Směs byla míchaná a zahřívána pod refluxem po dobu 2 hodin. Následně byla směs zneutralizovaná 5% kyselinou chlorovodíkovou (pH 7,0). Produkt byl zfiltrován a usušen ve vakuu při 50°C (**Schéma 21**). Výtěžek reakce byl 0,285 g (71,3 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 165,5-167,3 °C.

¹H a ¹³C NMR analýza byla ve shodě s literaturou.⁸

CHN pro (C₁₅H₉ClFNO₃, 305,69 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 58,94 %, H 2,97 %, N 4,58 %

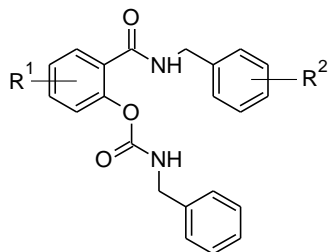
naměřené hodnoty: C 58,96±0,12 %, H 2,96±0,10 %, N 4,54±0,07 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. R_{fs1}=0,70 a R_{fs2}=0,85.

5.4. Syntéza karbamátů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

Syntéza karbamátů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů nebyla v literatuře popsána. K syntéze lze tedy přistupovat modifikací postupu pro alifatické karbamáty salicylanilidů.¹⁰ Postup byl diskutován v odstavci 1.1.2.3.

Přehled 16: Přehled připravených acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, jejich teplot tání a skutečných výtěžků.



Substituenty		Teplota tání (°C)	Výtěžek reakce (%)
R ¹	R ²		
5-Cl	H	158,5 – 160,6	45,6
5-Cl	4-Cl	157,1 – 159,1	44,3
5-Cl	4-OCH ₃	160,3 – 160,9	76,9
5-Cl	4-F	165,8 – 168,5	77,0

5.4.1. Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamátu

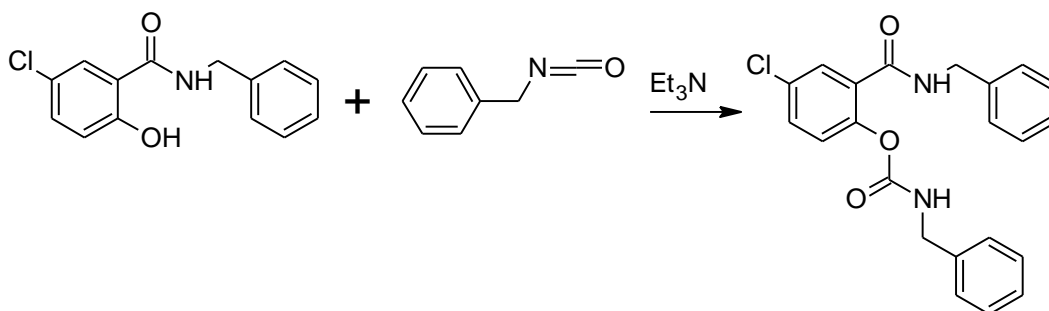


Schéma 22: Syntéza 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamátu

Přehled 17: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
<i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid	261,06	0,001	0,261	-	-
Benzylisokyanát	133,14	0,001	0,133	0,12	1,078
Triethylamin (Et ₃ N)	101,19	0,001	0,010	0,13	0,78
2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamát (<i>BHA019</i>)	394,85	0,001	0,395*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 17**. *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid byl převeden na sůl pomocí triethylaminu (Et₃N) v 10 ml acetonitrilu. Reakce probíhala po dobu 20 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla směs zchlazena v ledové lázni a ve dvou stejných dávkách byl přidán benzylchloroformiát. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Vzniklý produkt byl zfiltrován a sušen ve vakuu při laboratorní teplotě (**Schéma 22**). Výtěžek reakce byl 0,180 g (45,6 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 158,5-160,6 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 353 K): δ 8.83 (1H, t, $J=5.4$ Hz, NH), 8.37 (1H, t, $J=6.1$ Hz, NH), 7.63 (1H, d, $J=2.3$ Hz, Ar-H), 7.55 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.7$ Hz, Ar-H), 7.34-7.24 (12H, m, 12xAr-H), 4.43 (1H, d, $J=5.8$ Hz, -CH₂-), 4.27 (2H, d, $J=5.8$ Hz, -CH₂-).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 164.17, 153.97, 147.35, 139.08, 138.9, 131.24, 130.68, 129.06, 128.47, 128.25, 128.22, 127.35, 126.89, 126.69, 125.45, 44.0, 42.48, 39.66, 39.45, 39.25.,

CHN pro ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_3$, 394,85 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 66,92 %, H 4,85 %, N 7,09 %

naměřené hodnoty: C $67,31 \pm 0,08$ %, H $3,93 \pm 0,05$ %, N $7,18 \pm 0,09$ %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,30$ a $R_{f2}=0,68$.

5.4.2. Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamátu

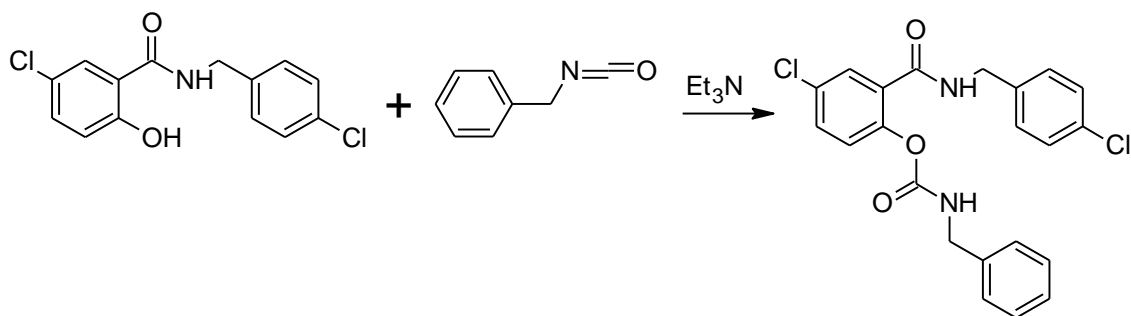


Schéma 23: Syntéza 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamátu

Přehled 18: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	296,15	0,001	0,296	-	-
Benzylisokyanát	133,14	0,001	0,133	0,12	1,078
Triethylamin (Et ₃ N)	101,19	0,001	0,010	0,13	0,78
4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát (<i>BHA020</i>)	429,3	0,001	0,429*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 18**. 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl převeden na sůl pomocí Et₃N v 10 ml acetonitrilu. Reakce probíhala po dobu 20 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla směs zchlazena v ledové lázni a ve dvou stejných dávkách byl přidán benzylchloroformiát. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Vzniklý produkt byl zfiltrován a sušen ve vakuu při laboratorní teplotě (**Schéma 23**). Výtěžek reakce byl 0,19 g (44,3 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 157,1-159,1 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 353 K): δ 8.86 (1H, t, $J=6.4$ Hz, NH), 8.34 (1H, t, $J=6.4$ Hz, NH), 7.60 (1H, d, $J=2.4$ Hz, Ar-H), 7.55 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.34-7.24 (11H, m, 11xAr-H), 4.38 (1H, d, $J=5.9$ Hz, -CH₂-), 4.27 (2H, d, $J=6.1$ Hz, -CH₂-).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K) V průběhu měření došlo k rozkladu látky v kyvetě. Z tohoto důvodu nemohla být interpretace spektra provedena.

CHN pro ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$, 429,30 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 61,55 %, H 4,23 %, N 6,53 %

naměřené hodnoty: C $62,03 \pm 0,10$ %, H $3,98 \pm 0,09$ %, N $6,62 \pm 0,05$ %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,39$ a $r_{f2}=0,75$.

5.4.3. Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamátu

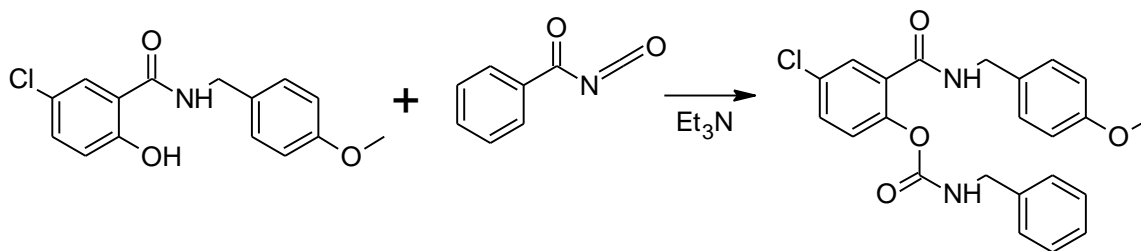


Schéma 24: Syntéza 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamátu

Přehled 19: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-2-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)benzamid	291,73	0,001	0,291	-	-
Benzylisokyanát	133,14	0,001	0,1331	0,12	1,078
Triethylamin (Et ₃ N)	101,19	0,001	0,0101	0,13	0,78
4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamát (<i>BHA031</i>)	425,85	0,001	0,425*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 19**. 5-chlor-2-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)benzamid byl převeden na sůl pomocí Et₃N v 10 ml acetonitrilu. Reakce probíhala po dobu 20 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla směs zchlazena v ledové lázni a ve dvou stejných dávkách byl přidán benzyلكhloroformiát. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Vzniklý produkt byl zfiltrován a sušen ve vakuu při laboratorní teplotě (**Schéma 24**). Výtěžek reakce byl 0,327 g (76,9 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 160,3-160,9 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 353 K): δ 8.74 (1H, t, $J=5.9$ Hz, NH), 8.34 (1H, t, $J=6.11$ Hz, NH), 7.58 (1H, d, $J=2.55$ Hz, Ar-H), 7.54 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.33 (4H, m, 4xAr-H), 7.27-7.22 (4H, m, 4xAr-H), 6.90 (2H, d, $J=8.5$ Hz, -CH₂-), 4.33 (2H, d, $J=6.0$ Hz, -CH₂-), 4.25 (2H, d, $J=6.0$ Hz, -CH₂-).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 163.91, 158.12, 153.89, 147.19, 138.98, 131.31, 130.60, 129.01, 128.45, 128.24, 128.02, 126.87, 127.02, 126.87, 125.43, 113.59, 54.98, 43.97, 41.92, 40.09, 39.88, 39.67, 39.46, 39.25, 39.04.

CHN pro ($\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_4$, 424,88 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 65,02 %, H 4,98 %, N 6,59 %

naměřené hodnoty: C $65,20 \pm 0,20$ %, H $5,11 \pm 0,07$ %, N $6,69 \pm 0,04$ %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,28$ a $r_{f2}=0,63$.

5.4.4. Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamátu

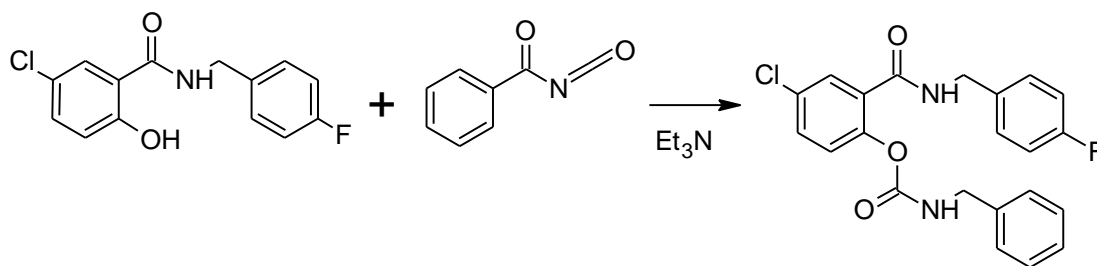


Schéma 25: Syntéza 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamátu

Přehled 20: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor- <i>N</i> -(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	279,69	0,001	0,279	-	-
Benzylisokyanát	133,14	0,001	0,1331	0,14	1,078
Triethylamin (Et ₃ N)	101,19	0,001	0,0101	0,079	0,78
4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzyلكarbamát (<i>BHA038</i>)	425,85	0,001	0,425*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 20**. 5-chlor-*N*-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid byl převeden na sůl pomocí Et₃N v 10 ml acetonitrilu. Reakce probíhala po dobu 20 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě. Poté byla směs zchlazena v ledové lázni a ve dvou stejných dávkách byl přidán benzylochloformiát. Reakční směs byla míchána po dobu 1 hodiny. Vzniklý produkt byl zfiltrován a sušen ve vakuu při laboratorní teplotě (**Schéma 25**). Výtěžek reakce byl 0,318 g (77 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 157,1-159,1 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 353 K): δ 8.86 (1H, t, $J=6.4$ Hz, NH), 8.35 (1H, t, $J=6.1$ Hz, NH), 7.62 (1H, d, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.55 (1H, dd, $J=8.7$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar-H), 7.37-7.32 (6H, m, 6xAr-H), 7.26 (2H, m, 2xAr-H), 7.10 (2H, m, 2xAr-H), 4.40 (1H, d, $J=5.9$ Hz, -CH₂-), 4.26 (2H, d, $J=5.9$ Hz, -CH₂-).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 165.13, 162.31, 159.90, 153.88, 147.2, 138.98, 135.25, 135.22, 131.24, 130.68, 129.09, 129.05, 129.0, 128.42, 128.23, 127.04, 126.88, 125.4, 114.99, 144.78, 43.98, 41.78, 40.09, 39.88, 39.67, 39.46, 39.25, 39.04, 38.84.

CHN pro ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClFN}_2\text{O}_3$, 412,84 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 64,00 %, H 4,39 %, N 6,79 %

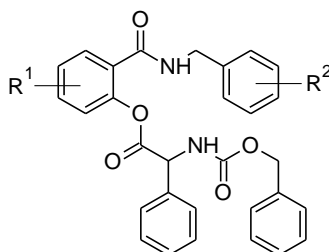
naměřené hodnoty: C 62,79 \pm 0,18 %, H 4,30 \pm 0,12 %, N 6,69 \pm 0,16 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,34$ a $R_{f2}=0,60$.

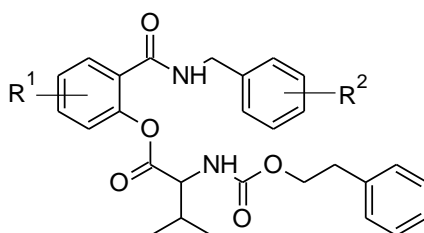
5.5. Syntéza esterů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů

K syntéze esterů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů lze přistupovat dvěma způsoby. Oba způsoby vychází z modifikace literárního postupu syntézy pro estery základních aminokyselin a 2-hydroxy-*N*-benzamidů.⁶ Postup syntézy byl diskutován v odstavci 1.1.2.4.

Přehled 21: Přehled připravených acetylů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, jejich teplot tání a skutečných výtěžků.



Substituenty		Teplota tání (°C)	Výtěžek reakce (%)
R ¹	R ²		
5-Cl	4-Cl	145,4 – 147,3	35,5



Substituenty		Teplota tání (°C)	Výtěžek reakce (%)
R ¹	R ²		
5-Cl	4-Cl	145,8 - 148,2	18,9
5-Cl	4-OCH ₃	Látka nebyla vyizolovaná	Látka nebyla vyizolovaná
5-Cl	4-F	Látka nebyla vyizolovaná	Látka nebyla vyizolovaná

5.5.1. Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát

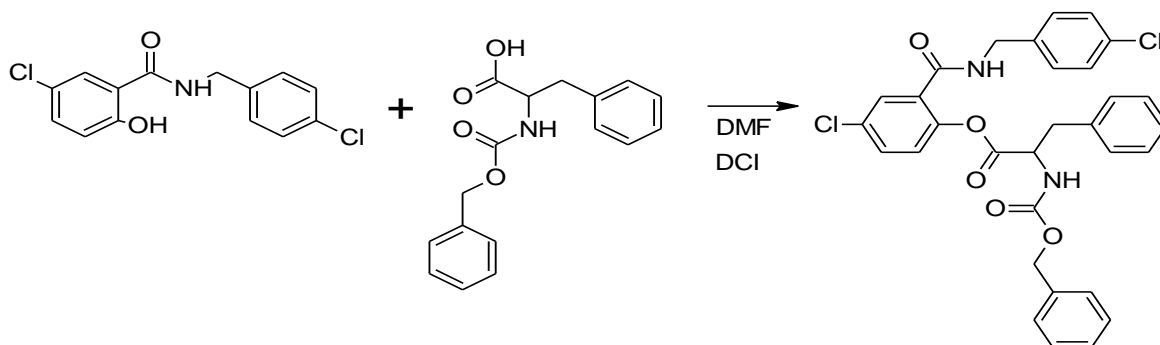


Schéma 26: Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamátu

Přehled 22: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
<i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid	296,15	0,005	1,48	-	-
<i>N</i> -karbobenzyloxy-L-fenylalanin	299,32	0,005	1,49	-	-
dicyklohexylkarbodiimid	206,33	0,0055	1,14	-	-
benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát (<i>BHA016</i>)	563,43	0,005	2,82*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 22**. *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid společně s *N*-karbobenzyloxy-L-fenylalaninem byly rozpuštěny v dimethylformamidu (DMF). Reakční směs byla vychlazena na -10°C . V průběhu 1 hodiny byl ve třech dávkách přidán dicyklohexylkarbodiimid (DCI). Reakční směs byla míchána po dobu 3 hodin při stejné teplotě. Směs ponechána při 4°C 20 hodin. DMF byl odpařen pomocí RVO, surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu a následně byl odfiltrován vedlejší produkt, dicyklohexylmočovina. Po filtraci bylo odpařeno malé množství ethylacetátu, ke zbylé směsi byl přidán hexan a produkt byl z této směsi

krystalizován. Po krystalizaci byl produkt zfiltrován a usušen (**Schéma 26**). Výtěžek reakce byl 1 g (35,5 %)

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 145,4-147,3 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 9.05 (1H, t, $J=6.1$ Hz, NH), 8.02 (1H, d, $J=8.1$ Hz, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}$), 7.69 (1H, d, $J=2.8$ Hz, Ar-H), 7.62 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=2.8$ Hz, Ar-H), 7.37-7.22 (14H, m, 14xAr-H), 7.14 (1H, d, $J=8.6$ Hz, Ar-H), 5.00 (2H, s, O- CH_2 -Ph), 4.47 (1H, m, $-\text{CH}-$), 4.39 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 3.20 (1H, dd, $J=14.2$ Hz, $J=3.8$ Hz, $-\text{CH}-\text{NH}$), 2.90 (1H, m, $-\text{CH}-$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 170.13, 163.8, 156.05, 146.38, 137.99, 137.33, 136.77, 131.35, 131.12, 130.79, 130.16, 129.22, 128.71, 128.04, 127.77, 127.38, 126.52, 125.02, 65.5, 55.54, 41.95, 40.08, 39.87, 39.66, 39.24, 39.04, 38.83, 24.42.

CHN pro ($\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{NO}_5$, 563,43 g/mol) :

teoretické hodnoty: C 65,58 %, H 4,77 %, N 5,10 %

naměřené hodnoty: C 64,05 \pm 0,12 %, H 5,13 \pm 0,07 %, N 5,49 \pm 0,09 %).

Pro TLC byl charakterizován retenční faktor. $R_{f1}=0,27$ a $R_{f2}=0,85$.

5.5.2. Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

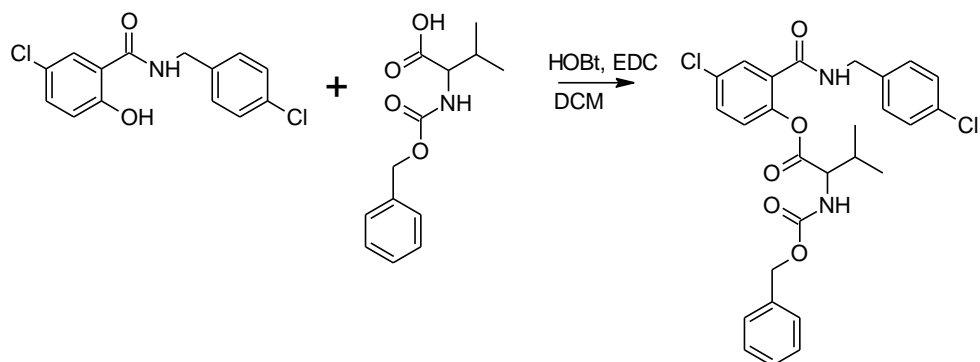


Schéma 27: Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

Přehled 23: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (ml)	ρ (kg/l)
5-chlor-N-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	296,15	0,0027	0,8	-	-
N-karbobenzyloxy-L-Valin	251,28	0,0027	0,71	-	-
1-hydrobenzotriazol (HOBt)	135,19	0,0031	0,42	-	-
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (EDC)	155,24	0,0027	0,42	0,529	0,877
benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát (<i>BHA023</i>)	577,45	0,0027	1,60*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 23**. 5-chlor-N-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid a 1-hydrobenzotriazol (HOBt) byly rozpuštěny v dichlormethanu (DCM). K reakční směsi byl přikapán 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC). Reakční směs reagovala za laboratorní teploty do vymizení výchozí látky, což bylo sledováno pomocí TLC. Následně byl proveden sled extrakcí: destilovanou vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanem sodným, 5% kyselinou citronovou, destilovanou vodou, roztokem chloridu sodného a destilovanou vodou. Rozpouštědlo

bylo vysušeno pomocí síranu sodného a odpařeno pomocí RVO. Surový produkt byl krystalizován z ethylacetátu / hexanu (**Schéma 27**). Výtěžek reakce byl 0,288 g (18 %).

Charakterizace produktu:

Bílá krystalická látka teploty tání: 145,8-148,2 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 353 K): δ 8.98 (1H, t, $J=6.0$ Hz, NH), 7.86 (1H, d, $J=7.9$ Hz, $-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}$), 7.62 (1H, d, $J=2.7$ Hz, Ar- H), 7.59 (1H, dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.6$ Hz, Ar- H), 7.39 (9H, m, $9\times\text{Ar}-H$), 7.12 (1H, d, $J=8.6$ Hz, Ar- H), 5.07 (2H, s, O- CH_2 -Ph), 4.35 (2H, m, $-\text{CH}_2-$), 4.16 (1H, m, $-\text{CH}-$), 2.16 (1H, m, $-\text{CH}-$), 0.92 (3H, d, $J=3.2$ Hz, $1.5-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 0.90 (3H, d, $J=3.2$ Hz, $\frac{1}{2}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 353 K): δ 170.02, 163.82, 156.50, 146.15, 137.98, 136.79, 131.33, 131.32, 130.87, 130.0, 129.14, 128.52, 128.32, 128.17, 127.86, 127.81, 124.98, 65.7, 59.71, 41.88, 40.08, 39.92, 39.87, 39.72, 39.66, 39.46, 39.25, 39.04, 38.83, 29.31, 19.01, 17.7.

CHN pro ($\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, 577,45 g/mol) :

teoretické hodnoty:	C 65,65 %,	H 5,31 %,	N 5,67 %
naměřené hodnoty:	C 60,81 \pm 0,09 %,	H 5,26 \pm 0,10 %,	N 5,83 \pm 0,07 %).

5.5.3. Syntéza benzyl 1-((2-(4-methoxybenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

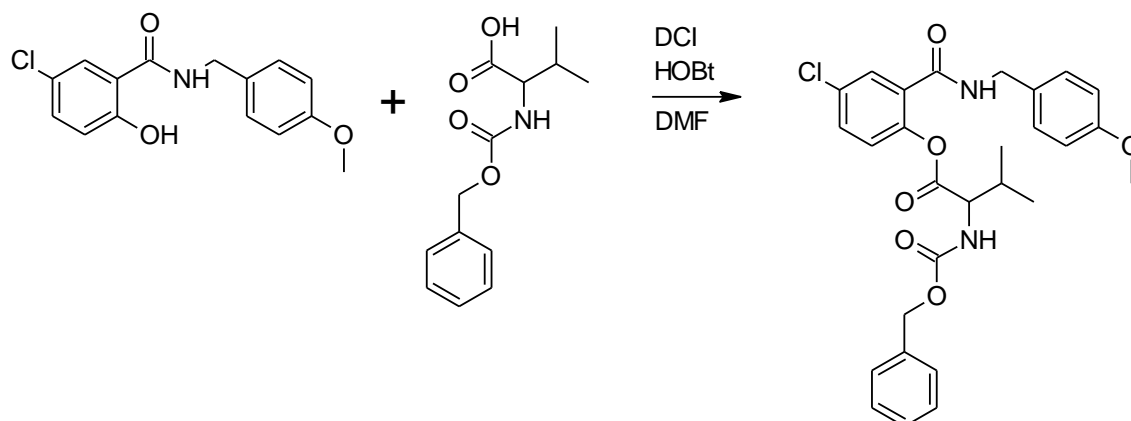


Schéma 28: Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorobenzylkarbamoyl)-4-methoxyfenoxy)-karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

Přehled 24: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (l)	ρ (kg/l)
5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4-methoxybenzyl)benzamid	291,73	0,002	0,583	-	-
<i>N</i> -karbobenzyl- <i>L</i> -valin	251,28	0,002	0,50	-	-
Dicyklohexylkarbodiimid (DCI)	206,33	0,0022	0,454	-	-
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (HOBt)	135,19	0,002	0,27	-	-
benzyl 1-((2-(4-chlorobenzylkarbamoyl)-4-methoxyfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát (<i>BHA036</i>)	524,99	0,002	1,08*	-	-

* Teoretický výtěžek

Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 24**. 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-methoxybenzyl)benzamid byl rozpuštěn v DCM. K roztoku byl přidán *N*-karbobenzyl-*L*-Valin, HOBt a DCI. Směs byla míchána do druhého dne. Poté byl odfiltrován vedlejší produkt, dicyklohexylmočovina. DCM byl odpařen a surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu, aby byl odstraněn vedlejší produkt. Vedlejší produkt byl zfiltrován a ethylacetát byl odpařen ve vakuu. Tento postup odstranění byl opakován, dokud vznikal vedlejší produkt. Surový produkt byl krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 28**).

Látku se i přes opakovanou krystalizaci nepodařilo získat v požadované čistotě. Dle TLC analýzy izolovaný produkt obsahoval vždy malé množství výchozí látky, NMR analýza dále odhalila přítomnost dicyklohexylkarbodimochoviny (vedlejšího produktu vznikajícího z činidla dicyklohexylkarbodiimidu).

5.5.4. Syntéza benzyl 1-((2-(4-fluorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

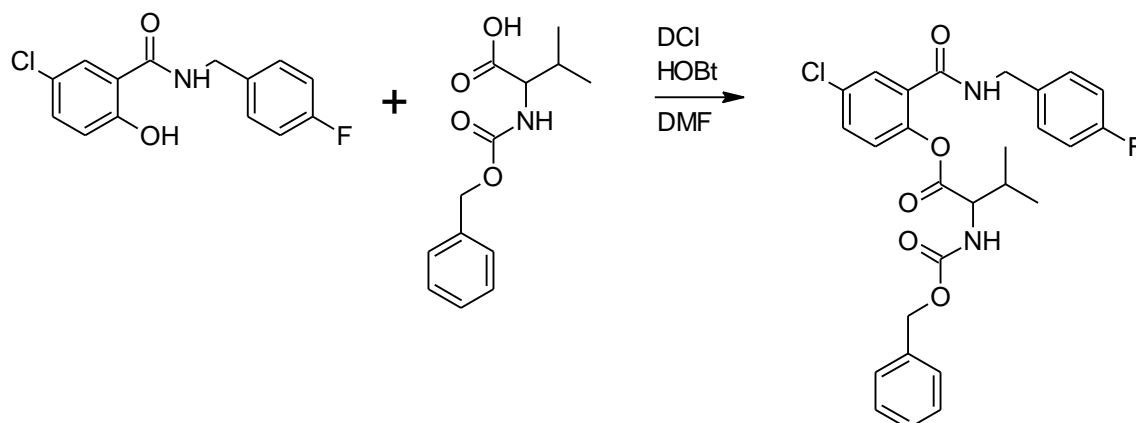


Schéma 29: Syntéza benzyl 1-((2-(4-chlorobenzylkarbamoyl)-4-fluorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátu

Přehled 25: Přehled navážek reakčních látek, jejich fyzikálně chemické parametry

Látka	MW	n(mol)	m (g)	V (l)	ρ (kg/l)
5-chlor- <i>N</i> -(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	279,69	0,002	0,559	-	-
<i>N</i> -karbobenzyloxy-L-valin	251,28	0,002	0,50	-	-
Dicyklohexylkarbodiimid (DCI)	206,33	0,0022	0,454	-	-
1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-karbodiimid (HOBt)	135,19	0,002	0,27	-	-
benzyl 1-((2-(4-chlorobenzylkarbamoyl)-4-fluorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát (<i>BHA037</i>)	512,96	0,002	1,030*	-	-

* Teoretický výtěžek

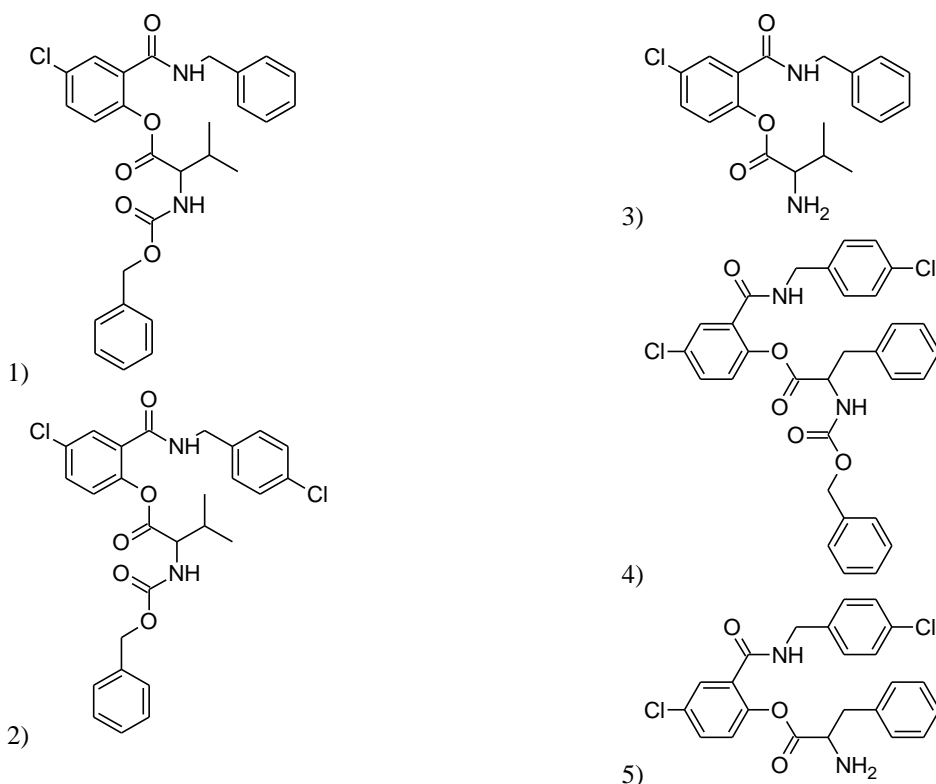
Použité navážky látek jsou shrnuty v **Přehledu 25**. 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-fluorbenzyl)benzamid byl rozpuštěn v DCM. K roztoku byl přidán *N*-karbobenzyloxy-L-Valin, HOBt a DCI. Směs byla míchána do druhého dne. Poté byl odfiltrován vedlejší produkt, dicyklohexylmočovina. DCM byl odpařen a surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu, aby byl odstraněn vedlejší produkt. Vedlejší produkt byl zfiltrován a ethylacetát byl odpařen ve vakuu. Tento postup odstranění byl opakován, dokud vznikal vedlejší produkt. Surový produkt byl krystalizován z ethylacetátu (**Schéma 29**).

Látku se i přes opakovanou krystalizaci nepodařilo získat v požadované čistotě. Dle TLC analýzy izolovaný produkt obsahoval vždy malé množství výchozí látky, NMR analýza dále odhalila přítomnost dicyklohexylkarbodimochoviny (vedlejšího produktu vznikajícího z činidla dicyklohexylkarbodiimidu).

5.6. Ostatní látky použité na testování inhibiční aktivity

Další látky, které byly použity k testování inhibice cholinergních enzymů, byly získány od Ing. Karla Pauka a od Ing. Aleše Imramovského, Ph.D.

K těmto látkám patří benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlor-fenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát (**Obr. 7, 1**), benzyl 1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát (**Obr. 7, 2**), 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-methylbutanoát (**Obr. 7, 3**), benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát (**Obr. 7, 4**) a 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl-2-amino-3-fenylpropanoát (**Obr. 7, 5**).



Obr. 7: Struktury látek:

- 1) benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlor-fenoxy)-karbonyl)-2-methylpropylkarbamát,
- 2) benzyl 1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlor-fenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát,
- 3) 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-methylbutanoát,
- 4) benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát,
- 5) 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl-2-amino-3-fenyl-propanoát.

6. Experimentální část – Inhibice cholinesteras

6.1. Použité chemikálie a roztoky

Acetylcholinesterasa (ACHE) z elektrického úhoře (Sigma-Aldrich Praha, ČR)

Butyrylcholinesterasa (BCHE) z plazmy koně (Sigma-Aldrich Praha, ČR)

Oba lyofilizované enzymy byly rozpuštěny v destilované vodě. Připravený roztok byl uchováván při teplotě -6°C .

Destilovaná voda

DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) (Sigma-Aldrich Praha, ČR)

$5 \cdot 10^{-4}$ M roztok byl použit pro stanovení aktivity enzymového preparátu a IC_{50} .

Acetylthiocholin jodid, p.a. (ATCH) (Sigma–Aldrich Praha, ČR)

10^{-3} M roztok byl použit pro stanovení IC_{50} .

0,1 M roztok byl použit pro stanovení katalytické aktivity daného enzymového preparátu.

Fosfátový pufr pH 8

Na přípravu 1 litru pufru bylo použito 22,705 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,455 g KH_2PO_4 (obě látky Lach-Ner Neratovice, ČR)

Dioxan (Lach-Ner Neratovice, ČR)

Rozpouštědlo pro testované látky

6.2. Metody stanovení aktivity enzymového preparátu

6.2.1. Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je fotometrická metoda používaná k určení cholinesterasové aktivity. Acetylthiocholin se působením enzymu štěpí na thiocholin (TCH) a acetát. TCH reaguje s 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovým iontem za vzniku žlutého aniontu 5-thio-2-nitro-benzoové kyseliny, který je měřen spektrofotometricky při 412 nm.³³ Tento princip měření je používán pro stanovení aktivity ACHE i BCHE.

6.2.1.1. Přístroje

K měření byl použit spektrofotometr s diodovým polem od společnosti Hewlett-Packard 8453, USA. Reakce probíhala ve skleněné kyvetě o objemu 4 ml s optickou dráhou o délce 1 cm. Reakční směs byla před vlastním měřením důkladně promíchána.

6.2.1.2. Stanovení aktivity enzymového preparátu

Aktivita enzymového preparátu (AEP) byla měřena stejným způsobem pro ACHE i BCHE. Po vytvoření reakční směsi byla měřena závislost absorbance (A), 412 nm, na čase (t). Směs byla měřena po dobu 70 sekund v 5-ti sekundových intervalech. Ze závislosti A na t byla vypočítaná hodnota y pro $x=60$ (vyplývá z definice 1 U). Aktuální aktivita připraveného enzymového preparátu se vypočítá jako hodnota y získaná z přímkové závislosti vynásobená hodnotou 17,67 ($\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Hodnota 17,67 zahrnuje celkový objem reakční směsi, 2 ml, molární absorpční koeficient $14\,150\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a objem enzymu 8 μl .

6.2.1.2.1. Pracovní postup

Do kyvety bylo napipetováno 800 μl fosfátového pufru pH 8, 800 μl 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) o koncentraci $5\cdot 10^{-4}\text{ M}$, 392 μl destilované vody a 8 μl ATCH o koncentraci 0,1 M. Tato reakční směs byla proměřena jako blank.

Po změření blanku byla připravena reakční směs s enzymovým preparátem, která byla proměřena třikrát. Do kyvety bylo napipetováno 800 μl fosfátového pufru pH 8, 800 μl DTNB o koncentraci $5\cdot 10^{-4}\text{ M}$, 384 μl destilované vody a 8 μl ATCH o koncentraci 0,1 M, přídatkem 8 μl enzymového preparátu (EP) byla reakce zahájena. Byla změřena závislost absorbance (A) na čase (t).

6.3. Stanovení IC_{50}

Stanovení IC_{50} bylo provedeno Ellmanovou metodou.

6.3.1. Přístroje

Přístrojové vybavení bylo stejné jako u Ellmanovy metody. Skleněná kyveta měla objem 4 ml a optickou dráhu 1 cm. Reakční směs byla důkladně promíchána.

6.3.2. Pracovní postup

Jako blank byl proměřen tento roztok, 800 μl fosfátového pufru pH 8, 400 μl DTNB o koncentraci $5\cdot 10^{-4}\text{ M}$, 80 μl ATCH o koncentraci 0,0001 M a $X\ \mu\text{l}$ EP dle aktuální aktivity. Reakční směs musí mít objem 2 ml, proto byl přidán i vypočítaný objem vody.

V další fázi byl třikrát proměřen vzorek bez inhibitoru. Vzorek byl připraven napipetováním 800 μl fosfátového pufru pH 8, 400 μl DTNB o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M, 80 μl ATCH o koncentraci 0,001 M, X μl EP dle aktuální aktivity a dopočítaný objem destilované vody. Reakční směs opět musela mít objem 2 ml.

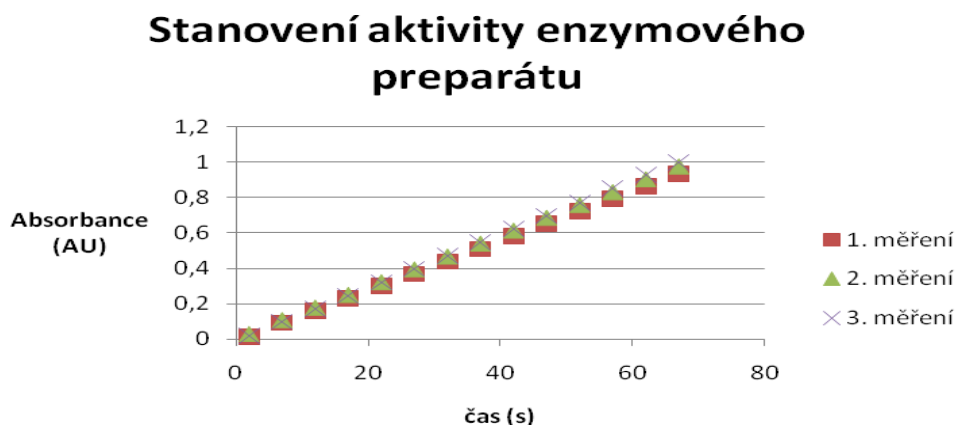
Původní roztok potenciálních inhibitorů měl koncentraci 10^{-2} M, proto musel být naředěn destilovanou vodou na koncentraci 10^{-3} M. Následně byla napipetována reakční směs z 800 μl fosfátového pufru pH 8, 400 μl DTNB o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M, 80 μl ATCH o koncentraci 0,001 M, X μl EP (dle aktuální aktivity), Y μl inhibitoru (pro měření se volily 4 různé koncentrace) a Z μl vody (dopočet do 2 ml). Takto připravený vzorek s inhibitorem byl proměřen dvakrát.

Ve všech případech byla změřena závislost A (412 nm) na t (5 sekundové intervaly po dobu 70 sekund), ze které byla vypočítaná reakční rychlost ($v = \Delta A / \Delta t$). Pomocí vypočítané rychlosti byl sestrojen graf v_0/v_i (v_0 je rychlost reakce bez inhibitoru, v_i je rychlost reakce s testovaným inhibitorem) na koncentraci (c, l), ze kterého byla získána regresní přímka lineární závislosti ($y = ax + b$) Z této rovnice byla vypočítaná hodnota x, za y byla dosazena hodnota 2, což vychází z definice IC_{50} . IC_{50} je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí pokles rychlosti inhibované reakce na polovinu oproti neinhibované reakci.

6.4. Výsledky

6.4.1. Stanovení aktuální aktivity enzymového preparátu

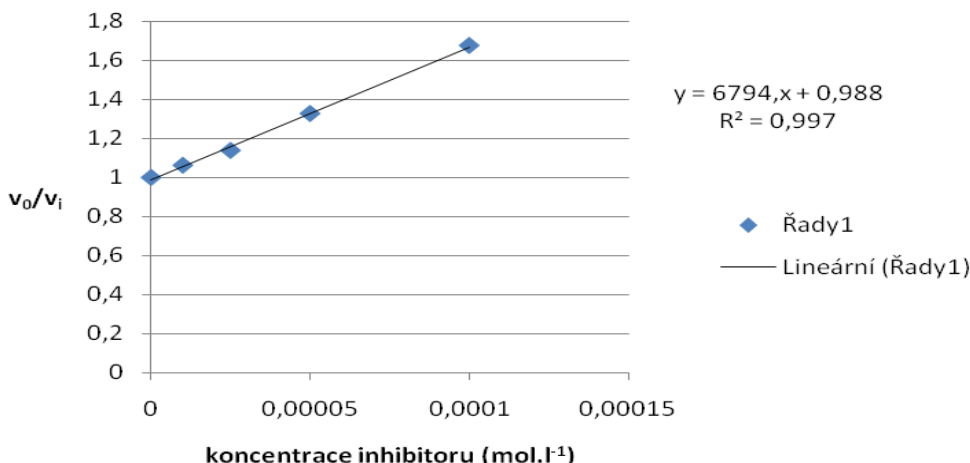
Před vlastním měřením reakční rychlosti je nutné změřit aktivitu používaného enzymu. Grafické znázornění je na **Obr. 8**.



Obr. 8: Grafický průběh stanovení EP

6.4.2. Stanovení indexu IC₅₀

Ke stanovení byla použita modifikovaná Ellmanova metoda. Průběh reakce je znázorněn na **Obr. 9**. Z grafické závislosti v_0/v_i na c byl vypočítán index IC₅₀. Indexy pro jednotlivé inhibitory a enzymy jsou shrnuty v **Tabulce 12 a 13**.



Obr. 9: Stanovení indexu IC₅₀ při inhibici BCHE 1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamátem

Tabulka 12: Stanovené indexy IC₅₀ syntetizovaných inhibitorů

Kód látky	Název látky	Průměrné hodnoty IC ₅₀ ACHE (mol.l ⁻¹)	Průměrné hodnoty IC ₅₀ BCHE (mol.l ⁻¹)
BH001	<i>N</i> -benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid	8,66.10 ⁻⁴	1,465.10 ⁻⁴
BHA015	5-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	6,44.10⁻⁴	6,42.10⁻⁵
BHA032	5-chlor-2-hydroxy- <i>N</i> -(4-methoxybenzyl)benzamid	1,38.10 ⁻³	1,17.10 ⁻⁴
BHA033	5-chlor- <i>N</i> -(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid	1,25.10 ⁻³	1,22.10 ⁻⁴
BH002	2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetát	4,9.10 ⁻⁴	1,25.10 ⁻⁴
BHA003	4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát	3,5.10 ⁻⁴	1,058.10 ⁻⁴
BHA029	4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetát	1,09.10 ⁻³	1,27.10 ⁻⁴
BHA027	4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát	2,91.10⁻⁴	8,43.10⁻⁵

Tabulka 12: Stanovené indexy IC₅₀ syntetizovaných inhibitorů - pokračování

Kód látky	Název látky	Průměrné hodnoty IC ₅₀	
		ACHE (mol.l ⁻¹)	BCHE (mol.l ⁻¹)
BHA022	3-benzyl-6-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4-(3 <i>H</i>)-dion	9,95.10 ⁻⁴	7,88.10⁻⁵
BHA021	6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion	1,04.10 ⁻³	2,33.10 ⁻⁴
BHA035	6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion	2,52.10 ⁻⁴	1,02.10 ⁻⁴
BHA034	6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion	1,69.10⁻⁴	1,07.10 ⁻⁴
BHA019	2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamát	2,55.10 ⁻⁴	9,5.10⁻⁵
BHA020	4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát	3,05.10 ⁻⁴	1,72.10 ⁻⁴
BHA031	4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát	2,29.10 ⁻⁴	1,07.10 ⁻⁴
BHA038	4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát	1,96.10⁻⁴	1,83.10 ⁻⁴

Tabulka 13: Stanovené indexy IC₅₀ získaných inhibitorů

Název látky	Průměrné hodnoty IC ₅₀	
	ACHE (mol.l ⁻¹)	BCHE (mol.l ⁻¹)
1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát	3,17.10 ⁻⁴	9,92.10⁻⁵
benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát	4,82.10 ⁻⁴	1,82.10 ⁻⁴
benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát	1,69.10⁻⁴	2,67.10 ⁻⁴
2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-fenylpropanoát	1,59.10 ⁻³	1,51.10 ⁻⁴
2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-methylbutanoát	1,20.10 ⁻³	1,41.10 ⁻⁴

7. DISKUZE

Výše uvedenými postupy bylo připraveno celkem 16 derivátů *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů, z toho bylo 12 látek nepopsaných v literatuře. Látky byly charakterizovány nukleární magnetickou rezonancí a bodem tání. Čistota látek byla ověřena tenkovrstvou kapalinovou chromatografií a elementární analýzou. Mezi připravené deriváty patří acetyly, benzoxaziny, karbamáty a estery *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů. Výchozí *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidy byly připraveny v dostatečné hmotnosti pro syntézu uvedených derivátů. Výtěžky byly obdobné literárním postupům. Všechny připravené deriváty kromě esterů byly syntetizované v požadované čistotě. Pro izolaci produktů byly použity klasické separační a čistící operace, jakými jsou např. extrakce, krystalizace nebo kolonová chromatografie. Izolace esterů aminokyselin a *N*-benzyl-2-hydroxybenzamidů se s využitím všech těchto metod nepodařila. Důvodem je jednak nízká stabilita produktů a jednak velmi podobné vlastnosti s výchozími látkami. Krystalizacemi, jsme nedosáhli požadované čistoty, i když požadovaný produkt v reakční směsi byl majoritní složkou (prokázáno NMR). Nepodařilo se nám z takto získaného produktu veškerý výchozí salicylanilid stejně tak i zbytky esterifikačního činidla dicyklohexylkarbodimochoviny. Tyto látky proto nebyly testovány na jejich biologickou aktivitu.

Připravené deriváty byly testovány na inhibiční aktivitu proti cholinergním enzymům – acetylcholinesterase (ACHE) a butyrylcholinesterase (BCHE). Aktivita všech látek vůči BCHE byla vyšší než vůči ACHE. Nejméně aktivními látkami pro ACHE jsou 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion a benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát, pro BCHE 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid.

K hodnocení inhibiční aktivity lze přistupovat více způsoby. Je možné ji hodnotit dle substituce na benzenových jádrech a dle jednotlivých skupin derivátů.

7.1.1. Acetylcholinesterasa

V případě hodnocení inhibiční aktivity vůči ACHE dle skupin, aktivita výchozích látek klesá v tomto pořadí 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid > *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid > 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-fluorbenzyl)-benzamid > 5-chlor-*N*-(4-methoxybenzyl)-2-hydroxybenzamid.

U acetylů je pořadí následující: 4-chlor-2-[(4-fluorobenzyl)karbamoyl]fenyl acetát > 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát > 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetát > 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetát.

Aktivita benzoxazinů se liší v reaktivitě acetylů v pořadí 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion > 6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion > 3-benzyl-6-chlor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dion > 6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion.

Inhibiční aktivita karbamátů klesá ve stejném pořadí jako u benzoxazinů.

U esterů byly testovány pouze estery valinu a fenylalaninu: benzyl 1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlor-fenoxy)-karbonyl)-2-methylpropylkarbamát a benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát a benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlor-fenoxy)-karbonyl)-2-methylpropylkarbamát včetně jejich ochráněných forem. Ochráněné estery mají nižší aktivitu než chráněné estery. Aktivita klesá v tomto pořadí 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-methylbutanoát > 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-fenylpropanoát. U chráněných esterů klesá aktivita v tomto pořadí, benzyl 1-((2-(4-chlorbenzyl-karbamoyl)4-chlorfenoxy)-karbonyl)-2-fenylethyl karbamát > 1-((2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát > benzyl 1-((2-(4-chlorbenzyl-karbamoyl)-4-chlor-fenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát.

7.1.2. Butyrylcholinesterasa

Pro hodnocení BCHE lze opět použít stejný princip jako pro ACHE.

Aktivita výchozích látek klesá v tomto pořadí 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid > 5-chlor-2-hydroxy-*N*-(4-methoxybenzyl)benzamid > 5-chlor-*N*-(4-fluorbenzyl)-2-hydroxybenzamid > *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxybenzamid.

U acetylů je lze inhibiční aktivitu látek vůči BCHE hodnotit zcela ve stejném pořadí jako u ACHE. 4-chlor-2-[(4-fluorobenzyl)karbamoyl]fenyl acetát > 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl acetát > 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl acetát > 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl acetát.

Aktivita benzoxazinů klesá v pořadí 3-benzyl-6-chlor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dion > 6-chlor-3-(4-methoxybenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion > 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion > 6-chlor-3-(4-chlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion.

Inhibiční aktivita karbamátů klesá v tomto pořadí 2-(benzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl benzylkarbamát > 4-chlor-2-[(4-methoxybenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát > 4-chlor-2-[(4-chlorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát > 4-chlor-2-[(4-fluorbenzyl)karbamoyl]fenyl benzylkarbamát.

Nejaktivnějším esterem je 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát. Odchráněné estery mají velmi podobnou aktivitu jak proti ACHE, tak proti BCHE. Aktivita odchráněných esterů klesá v pořadí: 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-methylbutanoát > 2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenyl 2-amino-3-fenylpropanoát. Aktivita chráněných esterů klesá v tomto pořadí 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát > benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-methylpropylkarbamát > benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát.

8. ZÁVĚR

N-benzyl-2-hydroxybenzamidy a jejich deriváty byly syntetizované v požadované čistotě. Mezi syntetizované deriváty patří acetáty, karbamáty, benzoxaziny a estery.

Všechny látky vykazují anticholinesterasovou aktivitu. Jejich aktivita je průměrná, tudíž se nedají považovat za potenciální léčiva. Obecně účinnost těchto látek je vyšší pro inhibici BCHE. Nejúčinnější látkou pro ACHE jsou 6-chlor-3-(4-fluorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin.2,4(3*H*)-dion a benzyl 1-((2-(4-chlorbenzylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethyl karbamát, pro BCHE 5-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-2-hydroxybenzamid. Ke zhodnocení účinnosti byla určena hodnota IC₅₀.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Paris, G.; Chambers, C. *N*-Aralkylsalicylamides. *New Compounds* **1966**, 971.
- ² Agwada, V. C. Potential Central Nervous System Active Agents. 1. Synthesis of Aromatic *N*-Benzyl Amides. *J. Chem. Eng. Data* **1982**, 27, 479-481
- ³ Waisser, K.; Peřina, M.; Boudová, I.; Kuneš, J.; Kaustová, J. Nová skupina potenciálních antituberkulotik: Antimykobakteriální *N*-benzylsalicylamidy. *Česká a slovenská farmacie* **2003**, 52 (6), 291–294.
- ⁴ Doležal, R.; Waisser, K.; Petrlíková, E.; Kuneš, J. *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculoitics. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2009**, 342, 113–119
- ⁵ Otevrel, J.; Mandelova, Z.; Pesko, M.; Guo, J.; Kralova, K.; Sersen, F. Investigating the Spectrum of Biological Activity of Ring-Substituted Salicylanilides and Carbamoylphenylcarbamates. *Molecules* **2012**, 15, 8122–8142.
- ⁶ Imramovský, A.; Vinšová, J.; Férriz, J. M.; Kuneš, J.; Pour, M. Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5007–5011.
- ⁷ Vinsova, J.; Imramovsky, A.; Buchta, V.; Ceckova, M.; Dolezal, M.; Staud, F.; Jampilek, J.; Kaustova, J. Salicylanilide Acetates: Synthesis and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2007**, 12, 1–12.
- ⁸ Waisser, K.; Peřina, M.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Kaustová, J. 3-benzyl-2*H*-1,3-(3*H*)-diones, a new group of antimycobacterial compounds against potentially pathogenic strains. *Il Farmaco* **2003**, 58, 1137-1149.
- ⁹ Abdel Fattah, M. E.; Abdel Gawad, I. I.; Mina, S. M. Synthesis and Antimicrobial Activity of Benzoxazinone Derivates. *Egypt. J. Chem.* **2006**, 49(5), 651-656.
- ¹⁰ Férriz, J. M.; Vávrová, K.; Kunc, F.; Imramovský, A.; Stolaříková, J.; Vavříková, E.; Vinšová, J. Salicylanilide carbamates: Antitubercular agents active against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 1054–1061.
- ¹¹ Kubanová, P.; Buchta, V.; Peřina, M.; Waisser, K.; Pour, M. Evaluation of in Vitro Antifungal Activity of *N*-Benzylsalicylamide Derivates. *Folia Microbiol.* **2003**, 48 (3), 346–350.
- ¹² Waisser, K.; Peřina, M.; Buchta, V.; Kubanová, P. Structure-antifungal Activity Relationships of Substituted *N*-benzylsalicylamides. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2003**, XXIX (XXX), 21–33.

-
- ¹³ Kaustová, J. Quantitative Micromethod for Drug Susceptibility Testing of Mycobacteria in Šula's Medium. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. **1997**, *3* (4), 115-117.
- ¹⁴ Waisser, K.; Peřina, M.; Klimešová, V.; Kaustová, J. On the relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted *N*-benzylsalicylamides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 1275, 1293.
- ¹⁵ Waisser, K.; Petrlíková, E.; Peřina, M.; Klimešová, V.; Kuneš, J.; Palát, K.; Kaustová, J.; Dahse, H.; Möllmann, U. A note to the biological activity of benzoxazine derivatives containing the thioxo group. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2719–2725.
- ¹⁶ Herholz, K. Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2008**, *35*, 825-829.
- ¹⁷ Štěpánková, Š.; Komers, K. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*, **2004**, *4*, 160-171.
- ¹⁸ Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rossenberry, T. L., Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, *Chemico-Biological Interaction*, **2010**, *187*, 10-22.
- ¹⁹ Cummings, J. L. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. *Am J Psychiatry*, **2000**, *157*, 4-15.
- ²⁰ Kása, P.; Rakonczay, Z.; Gulya, K. The Cholinergic System in Alzheimer's Disease. *Neurobiology*, **1997**, *52*, 511-535.
- ²¹ Moralev, S. N.; Rozengart, E. V. *Comparative Enzymology of Cholinesterases*, International University Line, **2007**, ISBN-10 0-9720774-2-1, 3-22.
- ²² Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers R.W.; et al.; editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, Acetylcholinesterase and the Termination of Acetylcholine Action*. Lippincott-Raven, **1999**. Staženo 5. 4. 2012, 23:14. Dostupné online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28076/>
- ²³ Rosenberry, T. L.; Johnson, J. L.; Cusack, B.; Thomas, J. L.; Eman, S.; Vankatasubban, K. S. Interactions between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase, *Chemico-Biological Interaction*, **2005**, *157-158*, 181-189.
- ²⁴ Dunitz, M. *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*, Martin Dunitz Ltd, **2000**, ISBN 1-85317-910-8.

-
- ²⁵ Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function?. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, *175*, 3-10.
- ²⁶ Bolognesi, M. L.; Matera, R.; Minarini, A.; Rosini, M.; Mechiorre, C. Alzheimer's disease: new approaches to drug discovery, *Chemical Biology*, **2009**, *13*, 303-308
- ²⁷ Sugimoto, H. The new approach in development of anti-Alzheimer's disease drugs via the cholinergic hypothesis, *Chemical-Biological Interactions*, **2008**
- ²⁸ Seow, D.; Gauthier, S. Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease, *Can J Psychiatry*, **2007**, *52*, 620-629.
- ²⁹ Lemstra, A. W.; Richard, E.; van Gool, W. A. Cholinesterase inhibitors in dementia: yes, no, or maybe?. *Age and Ageing*, **2007**, *36*, 625-627
- ³⁰ Galimberti, D.; Scarpini, E. Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol*, **2012**, *259*, 201-211
- ³¹ Kaduszkiewicz, H.; Zimmermann, T.; Beck-Bornholdt, H. P.; Van den Busshe, H. Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials, *BMJ*, **2005**, *331*, 321-327.
- ³² Pope, C.; Karanth, S.; Liu, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2005**, *19*, 433-446.
- ³³ Ellman G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Faetherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **1961**, *7*, 88-95.

Název práce	Deriváty <i>N</i> -benzyl-2-hydroxybenzamidů a jejich inhibice cholinergních enzymů
Autor práce	Bc. Barbora Hamáková
Obor	Analýza biologických materiálů
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	Ing. Aleš Imramovský Ph.D.
Anotace	Bylo připraveno 16 derivátů <i>N</i> -benzyl-2-hydroxybenzamidů, které byly následně testovány na inhibiční aktivitu vůči cholinesterasovým enzymům.
Klíčová slova	<i>N</i> -benzyl-2-hydroxybenzamidy - Alzheimerova choroba - inhibice cholinesteras – acetylcholinesterasa – butyrylcholinesterasa