

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Syntéza sulfonamidových inhibitorů cholinesteráz obsahujících
benzthiazolový blok**

Dana Wurmová

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dana Wurmová**
Osobní číslo: **C16054**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Syntéza sulfonamidových inhibitorů cholinesteráz
obsahujících benzthiazolový blok**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

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

1. Na základě literární rešerše shrnout popsané metody přípravy sulfonamidů obsahující benzthiazolový blok, jejich inhibiční aktivity vůči enzymům a metody jejich stanovení.
2. Navrhnout vhodné metody syntézy vybraných sulfonamidů a na jejich základě připravit vybrané deriváty.
3. Přípravené sloučeniny charakterizovat dostupnými analytickými metodami.
4. Výsledky zpracovat formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2021

Dana Wurmová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Vladimírovi Pejchalovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za jeho čas, cenné rady, všestrannou pomoc a vstřícnost při zpracování této práce. Za stanovení biologických aktivit připravených derivátů děkuji Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. ráda bych také poděkovala své rodině a blízkým přátelům za jejich podporu.

ANOTACE

Tématem této bakalářské práce je syntéza biologicky aktivních sulfonamidů obsahujících benzthiazolový blok. V teoretické části byly nalezeny vhodné postupy pro syntézu vybraných derivátů a jejich popsání inhibiční aktivita vůči enzymům.

V experimentální části bylo vhodnou metodou připraveno 9 nových dosud nepopsaných sulfonamidových derivátů. Připravené sloučeniny byly charakterizovány bodem tání, NMR spektrometrií a elementární analýzou. U připravených sulfonamidů bylo provedeno stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glycin, benzthiazol, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza

TITLE

Synthesis of sulfonamide inhibitors of cholinesterases containing a benzthiazole block

ANNOTATION

The topic of this bachelor thesis is the synthesis of biologically active sulfonamides containing benzthiazole block. In the theoretical part, suitable procedures for the synthesis of selected derivatives and their described inhibitory activity against enzymes were found.

In the experimental part, 9 new hitherto undescribed sulfonamide derivatives were prepared by a suitable method. The prepared compounds were characterized by melting point, NMR spectrometry and elemental analysis. The prepared sulfonamides were tested for inhibitory activity against AChE and BChE.

KEYWORDS

Glycine, benzothiazole, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM SCHÉMAT	10
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK.....	11
ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Sulfonamidy.....	13
1.1.1 Obecná charakteristika	13
1.1.2 Syntéza	13
1.2 Alzheimerova choroba.....	14
1.2.1 Léčba	15
1.3 Inhibitory cholinesterázy	15
1.3.1 Známé inhibitory cholinesterázy	15
1.3.2 Ellmanova metoda.....	17
1.3.3 Benzthiazoly.....	17
1.3.4 Benzthiazolový sulfonamidy.....	23
2 Experimentální část.....	25
2.1 Komerčně dostupná chemická činidla	25
2.2 Příprava výchozích sloučenin	26
2.2.1 Příprava výchozího 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu 26	
2.3 Syntéza sulfonamidů.....	29
2.3.1 Příprava <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamidu.....	29
2.3.2 Příprava <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu	30
2.3.3 Příprava 3-fluor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu.....	31
2.3.4 Příprava 3-fluor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzen sulfonamidu.....	32
2.3.5 Příprava 3-chlor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu	33
2.3.6 Příprava 3-chlor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzen sulfonamidu.....	34
2.3.7 Příprava 3,5-difluor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu.	35
2.3.8 Příprava 3,5-dichlor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu	36
2.3.9 Příprava 3,5-methyl- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu.	37

2.4	Metody charakterizace.....	38
2.4.1	Bod tání.....	38
2.4.2	NMR spektroskopie.....	38
2.4.3	Stanovení elementární analýzy.....	38
2.5	Charakteristika výchozích látek.....	39
2.5.1	2-amino-6-fluorbenzthiazol.....	39
2.5.2	1,3-oxazolidin-2,5-dion.....	40
2.5.3	1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid.....	41
2.6	Charakteristika připravených sloučenin.....	42
2.6.1	<i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid.....	42
2.6.2	3-fluor- <i>N</i> -((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	43
2.6.3	3-fluor- <i>N</i> -((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid.....	44
2.6.4	3-chlor- <i>N</i> -((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid.....	45
2.6.5	3-chlor- <i>N</i> -((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	46
2.6.6	<i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	47
2.6.7	3,5-difluor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	48
2.6.8	3,5-dichlor- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	49
2.6.9	3,5-dimethyl- <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid.....	50
3	Výsledky a diskuse.....	51
3.1	Syntéza.....	51
3.2	Stanovení inhibičních aktivit vůči enzymům.....	54
4	Závěr.....	59
5	Použitá literatura.....	60

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecný vzorec sulfonamidu	13
Obrázek 2: Molekula prontosilu.....	13
Obrázek 3: Molekula takrinu.....	15
Obrázek 4: Molekula rivastigminu.....	16
Obrázek 5: Molekula galanthaminu	16
Obrázek 6: Molekula donepezilu	16
Obrázek 7: 1-(3-chlor-4-methylfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močovina	18
Obrázek 8: 1-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočovina	19
Obrázek 9: 1-(4-chlorfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trion	20
Obrázek 10: 1-(4-isopropylfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trion	20
Obrázek 11: Isobutyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethylkarbamoyl]butyl-karbamát.....	22
Obrázek 12: Ethyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethylkarbamoyl]butylkarbamát.....	22
Obrázek 13: Ethyl [(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát	23
Obrázek 14: 2,2,2-trichlorethyl[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát.....	23
Obrázek 15: ¹ H NMR <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu.....	53
Obrázek 16: ¹³ C NMR <i>N</i> -((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu.....	54

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1: Syntéza primárním aminem s benzebnsulfonylchloridem.....	13
Schéma 2: Syntéza benzensulfonylfluoridu s 4-aminofenolem	14
Schéma 3: Syntéza sulfmethoxazolu.....	14
Schéma 4: Syntéza sulfadiazinu	14
Schéma 5: Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholin	17
Schéma 6: Vznik chromoforu a štěpení DTNB	17
Schéma 7: Syntéza biologicky aktivních močovín	18
Schéma 8: Syntéza biologicky aktivních trionů	19
Schéma 9: Syntéza biologicky aktivních karbamátů.....	21
Schéma 10: Syntéza další řady karbamátů	22
Schéma 11: Syntéza biologicky aktivních sulfonamidů	24
Schéma 12: Syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu.....	24
Schéma 13: Třístupňová syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu	51
Schéma 14: Syntéza benzthiazolových sulfonamidů	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: IC ₅₀ připravených nechirálních sulfonamidů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu.....	55
Tabulka 2: IC ₅₀ připravených nechirálních sulfonamidů vycházejících z (1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu.....	56

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Graf závislosti hodnot IC ₅₀ na substituentu pro AChE (viz tab. 1 a 2).....	57
Graf 2: Závislost hodnot IC ₅₀ na substituentu pro BChE (viz tab. 1 a 2).....	58

SEZNAM ZKRATEK

AChE	acetylcholinesteráza
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesteráza
BTCh	butyrylthiocholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
Gly-NCA	glycin <i>N</i> -karboxanhydrid; 1,3-oxazolidin-2,5-dion
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
LCD	displej z tekutých krystalů
NMR	nukleární magnetická rezonance
THF	tetrahydrofuran
TNB ⁻	5-merkapt-2-nitrobenový aniont
ÚOCHT	Ústav organické chemie a technologie

ÚVOD

Pro sulfonamidy je charakteristická skupina $-NHSO_2$ a jejich antimikrobiální účinky jsou známy od 30. let 20. století. Dnes jsou v medicíně běžně využívanými léčivy. Nejčastěji je nalezneme mezi antibiotiky.

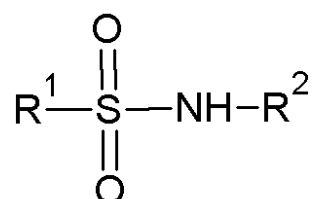
Pro benzthiazoly je typický heterocyklický systém a taktéž mají velké uplatnění, nejen v medicíně. Naleznout je lze např. mezi herbicidy. Co se medicíny týče, nalezneme je jako univerzální nosiče léčiv. Účinek sulfonamidů obsahujících benzthiazolový blok byl již zkoumán a cílem mé bakalářské práce je navázat na tento výzkum.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sulfonamidy

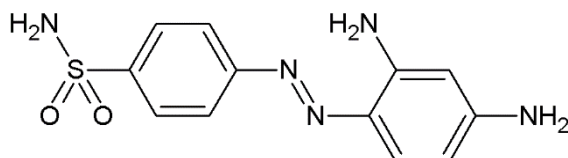
1.1.1 Obecná charakteristika

Sulfonamidy jakožto látky s obecným vzorcem $R_1SO_2NHR_2$ (obr. 1) jsou pevné látky krystalické povahy a jsou dobře rozpustné v hydroxidech díky jejich kyselé N-H vazbě.¹



Obrázek 1: Obecný vzorec sulfonamidu

Sulfonamidy jsou látky známé od počátku 20. století jako barviva. Jejich biologické účinky byly objeveny ve 30. letech 20. století, kdy byly zjištěny antimikrobiální účinky barviva známého pod názvem Prontosil (obr. 2). Za tento objev získal Gerhard Domagk Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.² Tato léčiva lze najít i pod názvem sulfa drogy. Mylně jsou označovány pouze za antibiotika. Dnes jsou již vyvíjeny i sulfonamidy s jinými než antibiotickými účinky. Ty jsou známé například u léčby diabetes nebo bolestí hlavy, ale také je můžeme nalézt u léčby rakovin.^{3,4}



Obrázek 2: Molekula prontosilu

1.1.2 Syntéza

Cest, jakými lze tyto látky připravit, je mnoho. Jednou ze základních syntéz sulfonamidů je reakce primárního aminu s benzensulfonylchloridem (Schéma 1).¹

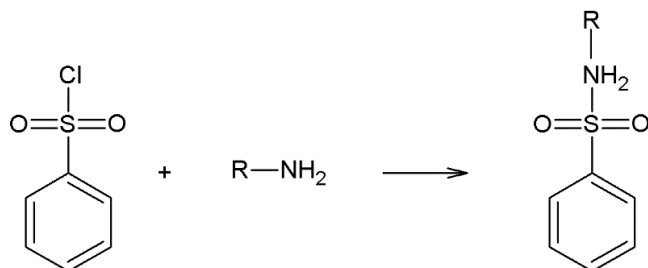


Schéma 1: Syntéza primárním aminem s benzensulfonylchloridem

Další možností je reakce benzensulfonylfluoridu s 4-aminofenolem. Produktem reakce je *N*-(4-hydroxyfenyl)benzensulfonamid (Schéma 2).⁵

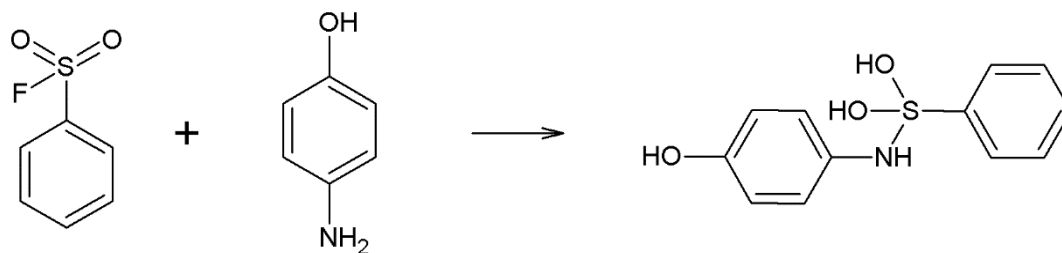


Schéma 2: Syntéza benzensulfonylfluoridu s 4-aminofenolem

Mezi konkrétní zástupce řadíme např. sulfamethoxazol. Ten lze připravit reakcí 5-metylisoxazol-3-ylaminu s 4-aminobenzensulfonyl chloridem s výtěžností 95 %. (Schéma 3)⁶ Jedná se o bakteriostatické antibiotikum, které se využívá převážně pro léčbu onemocnění močových cest. Kromě jiného efektivně působí proti *Escherichia coli* nebo *Streptococcus Staphylococcus aureus*.^{4,7}

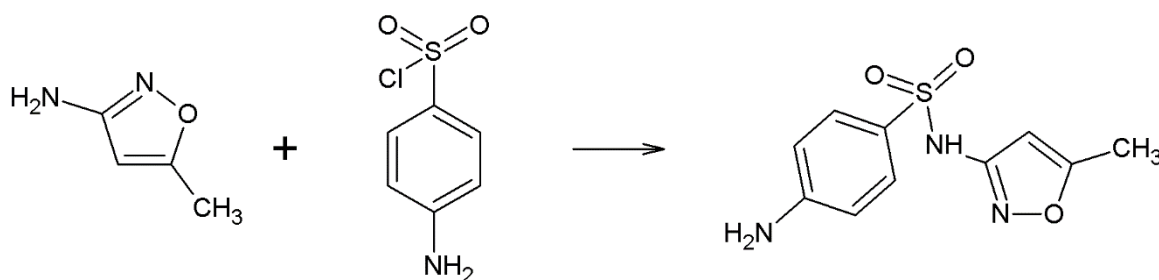


Schéma 3: Syntéza sulfmethoxazolu

Jako dalšího zástupce lze uvést sulfadiazin. Ten můžeme připravit reakcí malondialdehydu se sulfaguanidinem (Schéma 4). Výtěžek této rakce je 89 %.⁸ Jedná se o lék běžně užívaný při léčbě toxoplazmózy.⁹

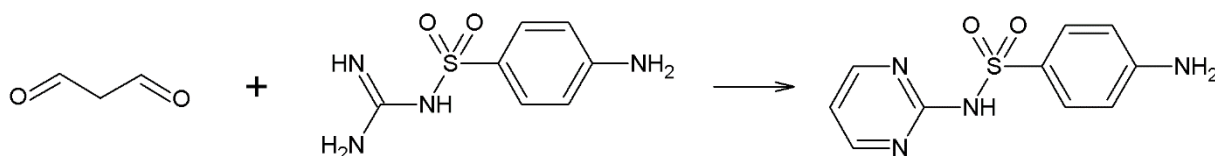


Schéma 4: Syntéza sulfadiazinu

1.2 Alzheimerova choroba

Jedná se o progresivní neurodegenerativní poruchu centrálního nervového systému, mezi jejíž symptomy patří kognitivní dysfunkce, psychiatrické příznaky nebo potíže s prováděním běžných aktivit, jako např. oblékání se.¹⁰ Předpokládá se, že za vznik choroby může tvorba peptidových vazeb, které mají neurotoxické účinky. Je zde také i spojitost mezi onemocněním

a nízkou hladinou neurotransmiterů, mezi které řadíme především acetylcholin. V nedávných studiích bylo zjištěno, že v mozku nemocného jedince jsou přítomny zvýšené hladiny kovů a oxidačního stresu.¹¹

1.2.1 Léčba

Základem léčby jsou inhibitory cholinesterázy, které u většiny lidí napomáhají ke zpomalení průběhu onemocnění a zmírnění symptomů. Takto fungující byla první generace léčiv Alzheimerovy choroby. Jedny z takto účinných látek jsou i látky na bázi sulfonamidu. Ty se využívají při inhibici tvorby fibril a oligomerů, ovlivňování aktivit cholinesteráz, a odstraňování volných radikálů. Jsou známy látky, které vykazovaly tyto účinky i najednou, takto fungující léčiva označujeme jako multitargetové terapeutika.^{10,11}

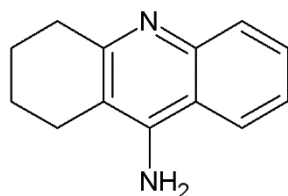
1.3 Inhibitory cholinesterázy

Snižují nadměrnou hydrolýzu neurotransmiterů. Známé inhibitory mají velké množství nežádoucích účinků (gastrointestinální porucha, hepatotoxicita, závratě aj.), proto je věnována velká pozornost výzkumu dalších inhibitorů, které by měly co nejmenší počet vedlejších účinků.¹²

1.3.1 Známé inhibitory cholinesterázy

Inhibitory cholinesteráz (ChEI) inhibují aktivitu hydrolytických cholinesteráz. Tyto inhibitory jsou využívány v léčbě Alzheimerovy choroby, kde oddalují progresi symptomů projevující se u Alzheimerovy choroby a jejich neurotoxický účinek je také běžně využíván mezi insekticidy.¹³ Inhibitory cholinesteráz zvyšují množství ACh, které je potřebné pro nervosvalový přenos, tzn. zabraňují rozkladu ACh v synaptické štěrbině.¹⁴

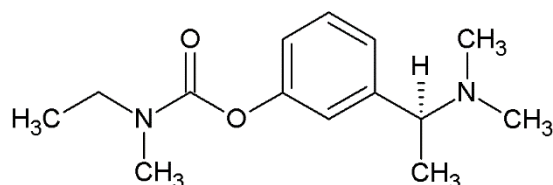
ChEI v závislosti na koncentraci blokují větší nebo menší podíl molekul cholinesteráz. Jejich schopnost je reverzibilně nebo ireverzibilně inhibovat aktivitu cholinesteráz.¹⁵ Reverzibilní inhibitory jsou sloučeniny obsahující kvartérní dusík a ireverzibilní inhibitory obsahují ve své struktuře estery kyseliny fosforečné. Reverzibilní inhibitory cholinesteráz zahrnují kompetitivní inhibitory (např. takrin, obr. 3), které blokují aktivní místo enzymu. Mezi nekompetitivní inhibitory navazující se na periferní anionické místo patří např. galantamin (obr. 5), který je řazen mezi neacylační reverzibilní inhibitory.^{12, 16}



Obrázek 3: Molekula takrinu

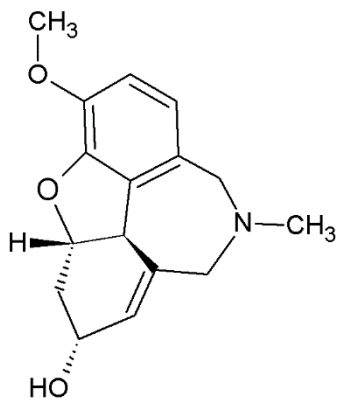
Od inhibitorů cholinesteráz se očekává, že budou dobře procházet přes hematoencefalickou bariéru, a tam budou specificky inhibovat mozkové, nikoliv periferní, formy acetylcholinesterázy.¹⁴

Mezi komerčně používaná léčiva patří například rivastigmin (obr. 4), který řadíme mezi acylační pseudo-reverzibilní karbamátové inhibitory.^{12, 16}



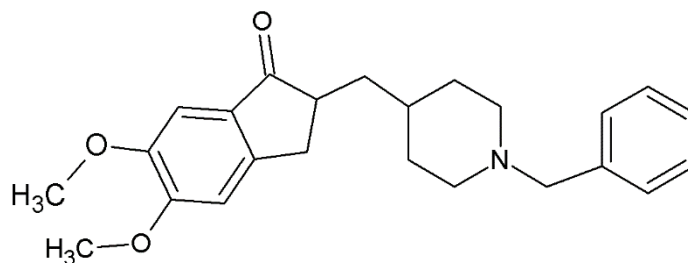
Obrázek 4: Molekula rivastigminu

Dalším hojně využívanou látkou je již zmiňovaný galanthamin. Galanthamin je řazen mezi neacylační reverzibilní inhibitory.^{12, 16}



Obrázek 5: Molekula galanthaminu

Posledním uvedeným zástupcem je donepezil (obr. 6), patřící mezi reverzibilní inhibitory.^{11, 15}



Obrázek 6: Molekula donepezilu

1.3.2 Stanovení aktivit cholinesteráz - Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je kolorimetrická metoda, která se využívá v běžné praxi pro stanovení aktivit cholinesteráz. Princip metody spočívá v hydrolyze thiocholinu, po které se uvolní daná kyselina a thiocholin (Schéma 5). Ten se detekuje pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Reakcí thiocholinu s DTNB dochází k uvolnění 5-merkapt-2-nitrobenzoového aniontu (TNB⁻) (Schéma 6). TNB⁻ se následně detekuje spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. Výsledná absorbance je úměrná skutečné koncentraci thiocholinu v reakční struktuře. Jedná se o rychlou a levnou variantu stanovení aktivit cholinesteráz.^{11,17}

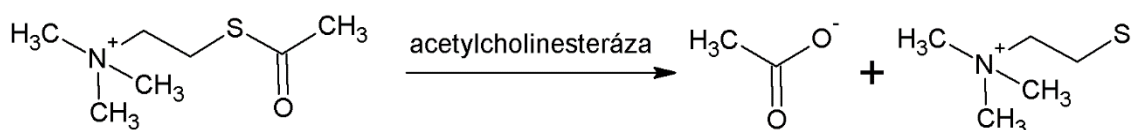


Schéma 6: Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholin

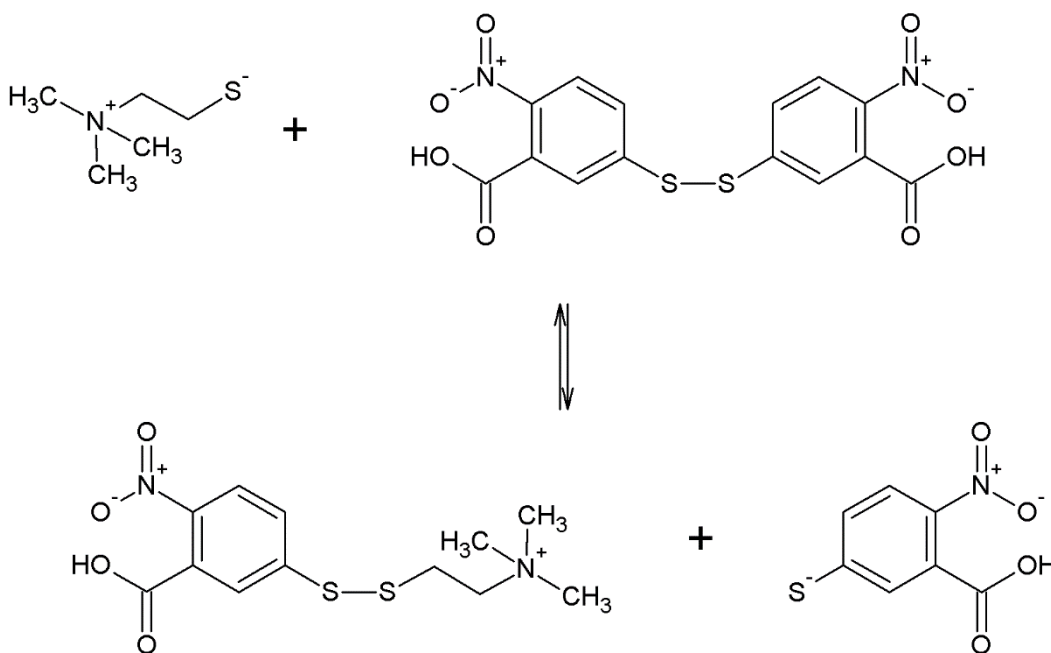


Schéma 5: Vznik chromoforu a štěpení DTNB

1.3.3 Benzthiazolové deriváty

Deriváty benzthiazolů se běžně využívají jako slimicidy, fungicidy či herbicidy, ale také jako inhibitory enzymů. V rámci výzkumu, především v syntetické a farmaceutické chemii, mají významné místo pro jejich farmakologické aktivity.¹⁸

1.3.3.1 Biologicky aktivní močoviny

V této oblasti byla provedena řada studií s cílem nalézt vhodné benzthiazolové inhibitory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy, které by našly uplatnění při léčbě Alzheimerovy choroby. V rámci tohoto výzkumu byla provedena syntéza chirálních benzthiazolových močovín. Tyto deriváty byly syntetizovány reakcí chirálního (*R*)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethanaminu se substituovanými fenyloksyanáty (Schéma 7). Byla připravena řada močovinných derivátů s výtěžkem v rozmezí 84-88 %.¹⁹

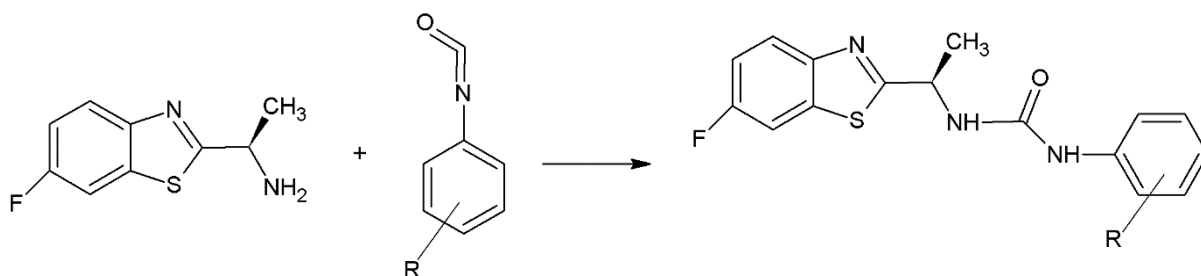
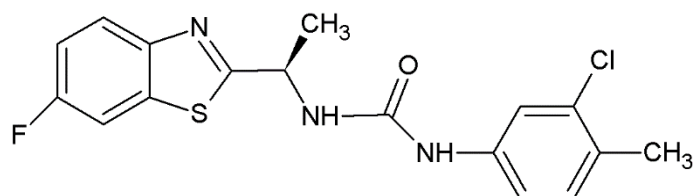


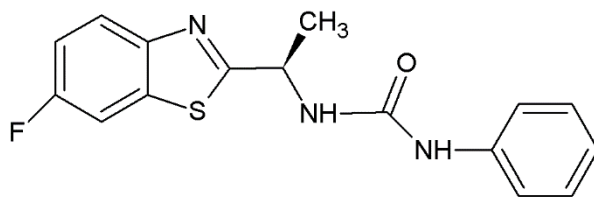
Schéma 7: Syntéza biologicky aktivních močovín

U nově syntetizovaných látek bylo provedeno testování inhibičních účinků vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze, jakožto možných farmak v rámci léčby Alzheimerovy choroby.¹⁹ Stanovení inhibiční aktivity bylo provedeno Ellmanovou metodou. Míra inhibiční aktivity daných inhibitorů byla provedena stanovením hodnot IC₅₀, což je množství látky potřebné k 50% inhibici enzymů. Byla testována řada 10 derivátů. U všech testovaných močovín byla prokázána inhibiční aktivita vůči AChE a BChE. Hodnoty IC₅₀ při testování inhibice vůči BChE měly nižší hodnoty než u testů na inhibiční aktivitu vůči AChE. To bylo vysvětleno rozdílem ve struktuře cholinesteráz, kdy BChE vytváří větší prostor v aktivním místě, a tím umožňuje větším molekulám se navázat.²⁰

Nejlepší hodnotu IC₅₀ na AChE vykazovala sloučenina 1-(3-chlor-4-methylfenyl)-3-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močovina (obr. 7) a to 15,2 μmol/l.¹⁷ Nejlepší výsledky IC₅₀ vůči BChE vykazovala látka 1-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočovina (obr. 8) s hodnotou 3,65 μmol/l.¹⁹



Obrázek 7: 1-(3-chlor-4-methylfenyl)-3-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močovina



Obrázek 8: 1-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočovina

1.3.3.2 Biologicky aktivní triony

V návaznosti na zkoumání biologicky aktivních močovín a jejich inhibičních vlastností bylo pokračováno ve výzkumu přípravy další řady derivátů. Byla připravena nová řada benzthiazolových trionových derivátů a to reakcí substituovaných 1-fenyl-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močovín s oxalylchloridem (Schéma 8). Výtěžek této syntézy činil 80 – 85 %.²¹

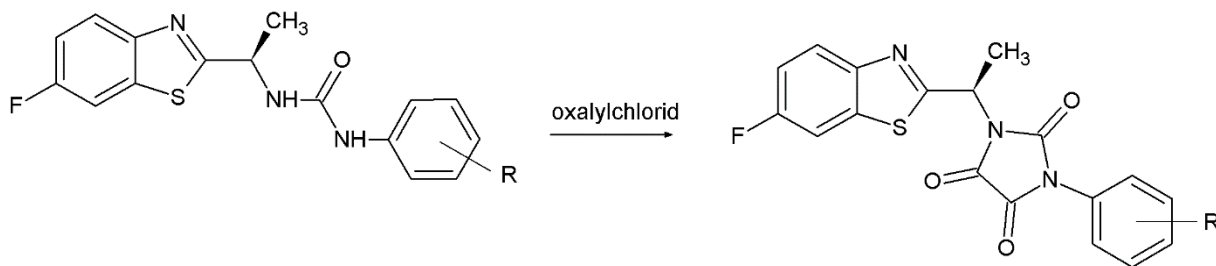
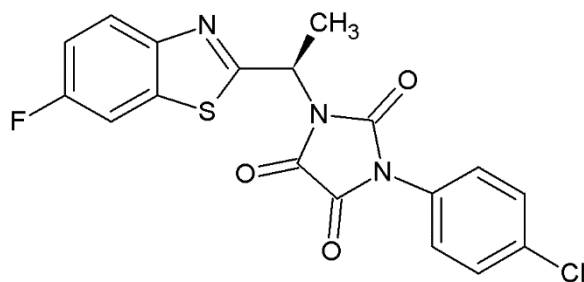


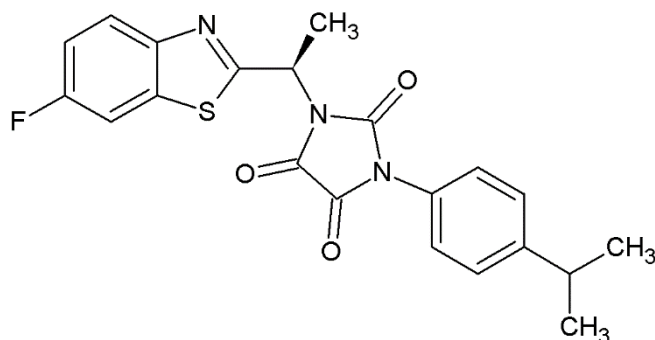
Schéma 8: Syntéza biologicky aktivních trionů

U takto připravených sloučenin byly opět stanoveny Ellmanovou metodou hodnoty IC_{50} . Nyní byly hodnoty porovnávány se standartními léčivy, které inhibují cholinesterázy - Galanthaminem a Rivastigminem. Hodnoty IC_{50} u AChE vykazovaly mnohonásobně nižší hodnotu než Rivastigmin ($IC_{50} = 501 \mu\text{mol/l}$), oproti tomu byly méně účinné než Galanthamin ($IC_{50} = 4 \mu\text{mol/l}$). Největší inhibiční aktivitu měla sloučenina 1-(4-chlorfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trion (Obr 9). ($IC_{50} = 13,8 \mu\text{mol/l}$). U stanovování inihibice vůči BChE prokazovala většina sloučenin opět větší aktivitu než Rivastigmin ($IC_{50} = 19,95 \mu\text{mol/l}$) a u látky 1-(4-isopropylfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trionu (obr. 10), která měla hodnotu IC_{50} nejnižší z 11 testovaných, a to $1,66 \mu\text{mol/l}$, byla inhibiční aktivita vyšší než u Galanthaminu ($IC_{50} = 7,96 \mu\text{mol/l}$).²¹ U těchto sloučenin byla dále také stanovena lipofilita, tedy rozpustnost v tucích. Ta je, v rámci farmakologie, důležitá kvůli transportu léčiva přes biologické membrány. Stanovoval se rozdělovací koeficient $\log K_{ow}$ (*n*-oktanol/voda). Rozdělovací koeficient $\log K_{ow}$ se využívá ke kvantitativnímu stanovení lipofility.²² Výsledky poukazovaly na možnost, že by připravené sloučeniny mohly překonat hamatoencefalické bariéry, a tím přímo inhibovat cholinesterázy v mozku.²³



$$IC_{50}(AChE) = 13,8 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 9: 1-(4-chlorofenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trion



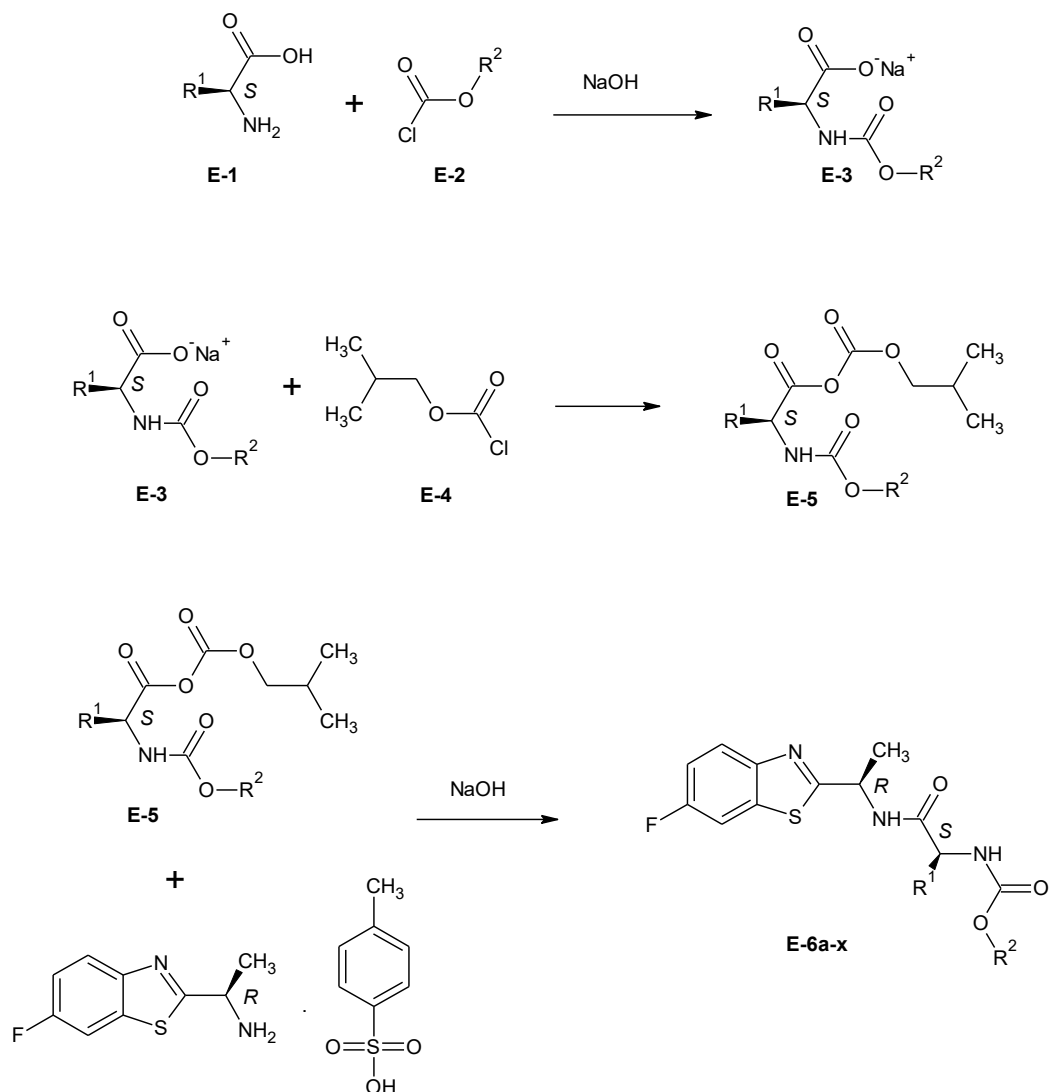
$$IC_{50}(BChE) = 1,66 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 10: 1-(4-isopropylfenyl)-3-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]imidazolidin-2,4,5-trion

V rámci SAR studie (structure-activity relationship) bylo zjištěno, že má-li látka ve své molekule para- a meta-substituované fenylové kruhy, napomáhá to k inhibici AChE, naproti tomu, BChE lépe inhibují sloučeniny obsahující pouze para-substituované fenylové kruhy. Taktéž se inhibiční aktivita zvyšuje, mají-li sloučeniny na fenylovém kruhu rozvětvené substituenty.²¹

1.3.3.3 Biologicky aktivní karbamáty

Dalším studiem, co se týče inhibitorů cholinesterázy, byly biologicky aktivní enantiomerní karbamáty, kde volba struktury produktů byla odvozena ze struktury komerčně využívaného biologicky aktivního přípravku Benthialicarb-isopropyl. Tato řada nových dosud nepopsaných sloučenin byla syntetizována třístupňovou syntézou, která je znázorněna ve schématu 9. Byly syntetizovány dvě řady sloučenin. V první je R¹ skupinou *n*-propyl, v druhé je v pozici R¹ isopropyl.²⁴

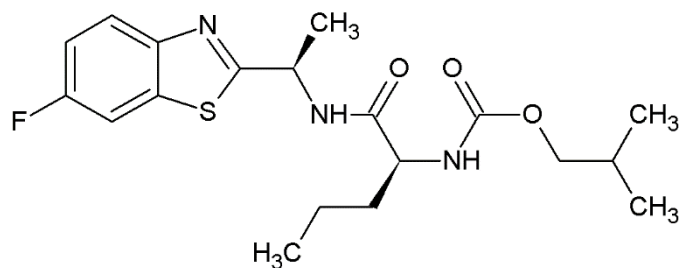


$R_1 = n\text{-propyl, isopropyl}$

$R_2 = -\text{CH}_3, -\text{C}_2\text{H}_5, -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3, -(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3, -\text{CH}(\text{CH}_3)_2, -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}, -\text{CH}_2\text{CCl}_3, -\text{CH}_2\text{CClF}_2, -\text{CH}_2\text{CF}_3, -\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CHF}_2, -\text{CH}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3.$

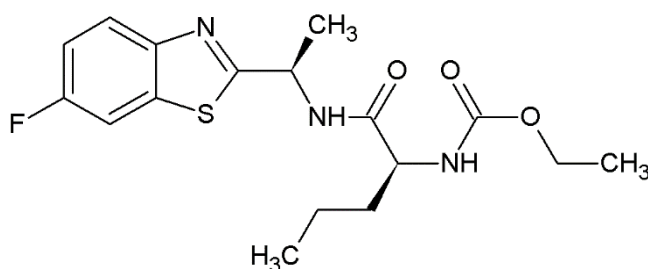
Schéma 9: Syntéza biologicky aktivních karbamátů

U těchto derivátů byla opět Ellmanovou metodou testována anticholinerní inhibiční aktivita, která byla porovnána s komerčními standardy Rivastigminem a Galanthaminem. Dle výsledků z testování celkem 23 sloučenin lze říci, že isobutyl-(*S*)-1- [(*R*)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethylkarbamoyl]butyl-karbamat ($\text{IC}_{50} = 20,22 \mu\text{mol/l}$) (obr. 11) byl dle testování nejúčinnější vůči AChE. Nejvíce účinný inhibitor BChE byla sloučenina ethyl-(*S*)-1-[(*R*)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethylkarbamoyl]butylkarbamamat ($\text{IC}_{50} = 14,1 \mu\text{mol/l}$) (obr. 12). Ideální lipofilita je, pro zajištění co největší inhibiční aktivity, v rozmezí 0,6 – 0,7.²⁴



$$IC_{50} (\text{AChE}) = 20,22 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 11: Isobutyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethyl]butylkarbamát



$$IC_{50} (\text{BChE}) = 14,1 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 12: Ethyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethyl]butylkarbamát

U těchto látek byla také stanovena lipofilita, přičemž vyšší lipofilitu vykazovaly sloučeniny s lineárním alkylovým substituentem, a také sloučeniny, které měly alkylový řetězec substituovaný chlorem a ne fluorem.²⁴

V další studii byla provedena syntéza chirálních karbamátů. Tyto karbamáty byly syntetizovány reakcí (R)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethanaminu s vybranými substituovanými alkylchloroformiáty (Schéma 10).²⁵

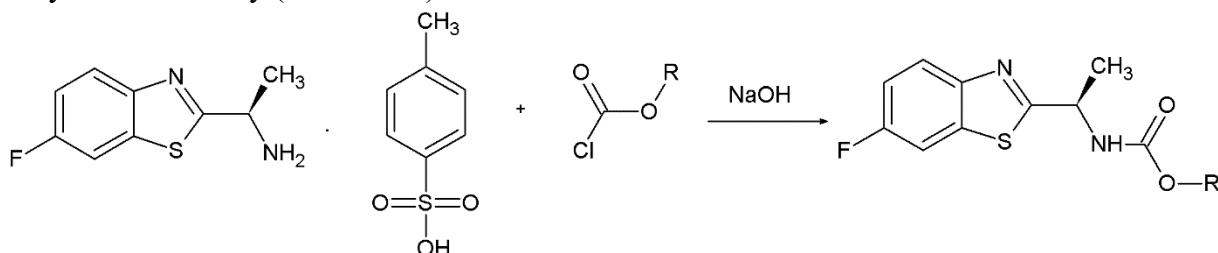
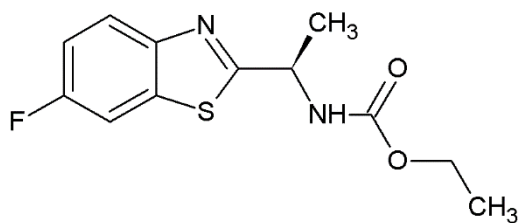


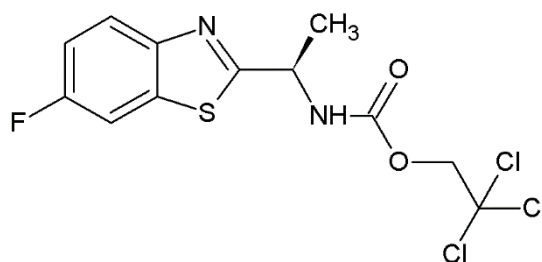
Schéma 10: Syntéza další řady karbamátů

Ellmanovou metodou byly opět u připravených karbamátů stanoveny hodnoty IC_{50} , ty byly porovnány s komerčně dostupným Rivastigminem, který je zástupcem klasických acylačních pseudo-reverzibilních karbamátových inhibitorů cholinesteráz. Nejlepších výsledků vůči AChE dosahovala sloučenina ethyl [(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát (obr. 13) ($IC_{50} = 6,06 \mu\text{mol/l}$). Co se týče BChE, lepších výsledků než Rivastigmin dosahovala pouze sloučenina 2,2,2-trichlorethyl[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát (obr. 14) ($IC_{50} = 8,31 \mu\text{mol/l}$).²⁵



$$IC_{50} (\text{AChE}) = 6,06 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 13: Ethyl [(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát



$$IC_{50} (\text{BChE}) = 8,31 \mu\text{mol/l}$$

Obrázek 14: 2,2,2-trichlorethyl[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamát

V rámci tohoto výzkumu bylo také stanoveno, že tyto látky poskytují tzv. pseudo-reverzibilní typ inhibice. Při ní dochází k vytěsnění acetylcholinu inhibitorem, který poté odbourávají cholinesterázy. Inhibitor se na enzym váže kovalentní vazbou, ta je následně ničena.¹⁵ Právě díky tomu se stane opět dostupným. Poločas rozpadu karbamoylovaných komplexů, které takto působí, je 20 – 60 min.²⁶

Během této studie bylo opět provedeno stanovení lipofilit, Z výsledků je patrné, že hodnota lipofility narůstá spolu s prodlužováním a rozvětčováním alifatického řetězce.

U čtyřech neúčinnějších derivátů bylo provedeno stanovení toxicity na lidské buňky s cílem stanovit potenciální škodlivé účinky testovaných sloučenin. Stanovení cytotoxicity bylo provedeno standartní metodou *in vitro* s použitím lidské jaterní buněčné linie HepG2 a xCELLigence RTCA DP systém byl použit pro real-time a časově závislá analýza buněčné reakce MCF7 buněk.²⁷

Všechny čtyři testované inhibitory vykazaly velmi nízké hodnoty cytotoxicity.²⁵

1.3.4 Benzthiazolový sulfonamidy

V roce 2017 byla provedena syntéza chirálních benzthiazolových sulfonamidů. Tyto deriváty byly syntetizovány reakcí chirálního (1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu se substituovanými benzensulfonylchloridy (Schéma 11).²⁸

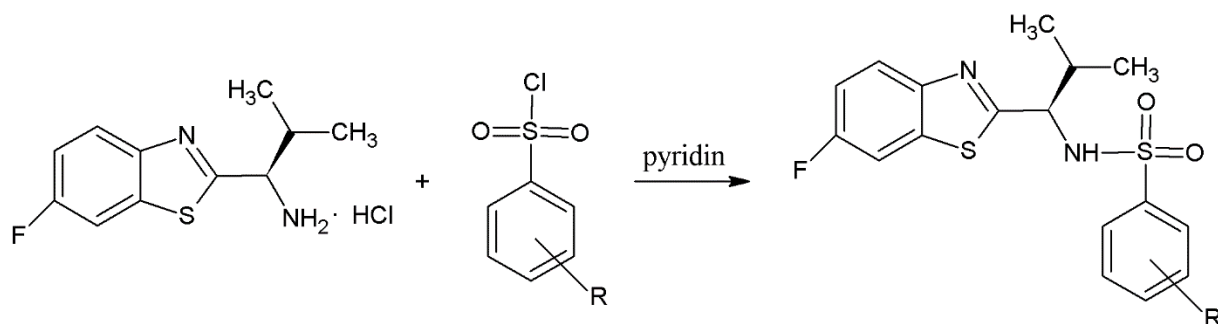


Schéma 11: Syntéza biologicky aktivních sulfonamidů

U připravených chirálních benzthiazolových sulfonamidů bylo Ellmanovou metodou provedeno stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE. U těchto derivátů bylo dosaženo slibných výsledků především u inhibice BChE, kde byla u sloučeniny *N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzensulfonamidu zjištěna hodnota $IC_{50} = 1,27 \mu\text{mol/l}$. Při stanovení inhibiční aktivity vůči AChE již nebylo dosaženo tak dobrých výsledků. Nejnižší hodnoty $IC_{50} = 39,17 \mu\text{mol/l}$ pro AChE vykazovala sloučenina 3,5-dichlor-*N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropyl]benzensulfonamid.²⁸

Vzhledem k těmto výsledkům, kde mohla být nižší inhibiční aktivita vůči AChE způsobena několika strukturálními rozdíly ve stavbě aktivního místa AChE a BChE, byla provedena syntéza méně objemných benzthiazolových sulfonamidů. Pro syntézu benzthiazolových sulfonamidů bude namísto (1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu použit 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin, tedy při syntéze výchozího aminu, který je syntetizován třístupňovou syntézou, bude namísto objemnějšího chirálního D-valinu použit glycin (Schéma 12).²⁹

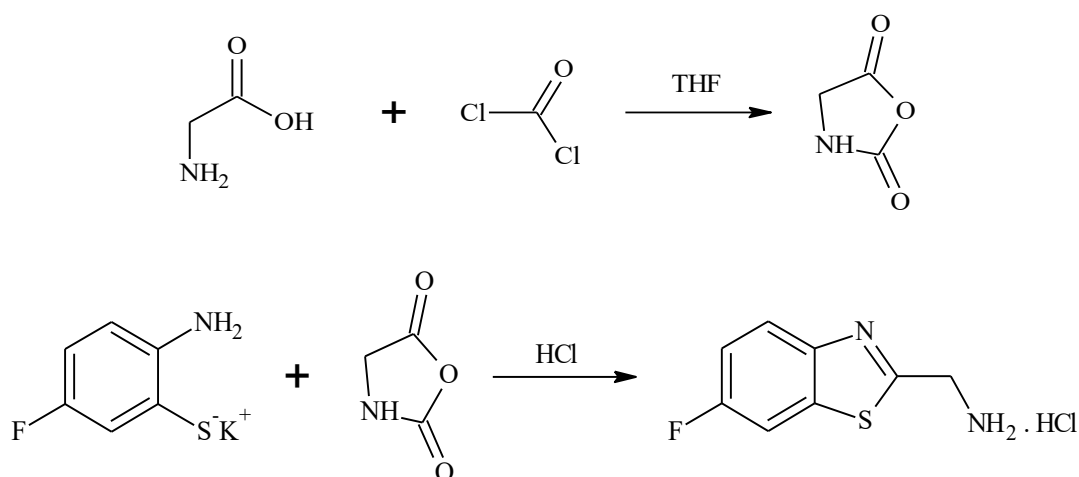


Schéma 12: Syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu

2 Experimentální část

2.1 Komerčně dostupná chemická činidla

Fosgen – Synthesia

Glycin p.a. – Lach-Ner

Toluen p.a. – Penta

n-Hexan 95% - Sigma - Aldrich

Kyselina chlorovodíková p.a. - Penta

Destilovaná voda

Pyridin p.a. – Penta

Benzensulfonylchlorid 99% - Fluorochem

4-toluensulfonylchlorid 97% - Fluorochem

3-fluorbenzensulfonylchlorid 99% - Fluorochem

3-fluor-4-methylbenzensulfonylchlorid 97% - Fluorochem

3,5-difluorbenzensulfonylchlorid 98% - Fluorochem

3-chlorbenzensulfonylchlorid 98% - Fluorochem

3-chlor-4-methylbenzensulfonylchlorid 98% - Fluorochem

3,5-dichlorbenzensulfonylchlorid 95 % Fluorochem

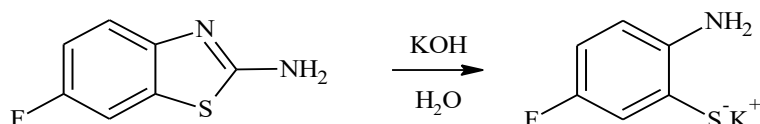
3,5-dimethylbenzensulfonylchlorid 97% - Fluorochem

2.2 Příprava výchozích sloučenin

2.2.1 Příprava výchozího 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

2.2.1.1 Příprava 2-amino-5-fluorthiofenolátu draselného

Reakční schéma:



Násada:

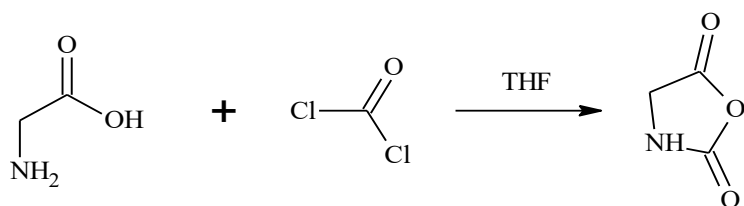
2-Amino-6-fluorbenzthiazol	12,0 g (0,0713 mol)
48% KOH	43,2 g (0,37 mol)
Toluen	30,0 ml

Pracovní postup:

Do 100 ml tříhrdlé baňky bylo předloženo 43,2 g 48% KOH a 12 g 2-amino-6-fluorbenzthiazolu a reakční směs byla postupně vyhřívána k varu a byla refluxována v inertní dusíkové atmosféře po dobu 5 hodin při teplotě 110 – 115 °C. Pak byla reakční směs ochlazená na teplotu 50 °C a do reakční směsi bylo přidáno 30 ml toluenu. Reakční směs byla 0,5 hodiny míchána a 0,5 hodiny byla ponechána v klidu. Vodná vrstva byla oddělena a použita do další reakce. Bylo připraveno 55 g vodného roztoku K⁺ soli.

2.2.1.2 Příprava 1,3-oxazolidin-2,5-dionu

Reakční schéma:



Násada:

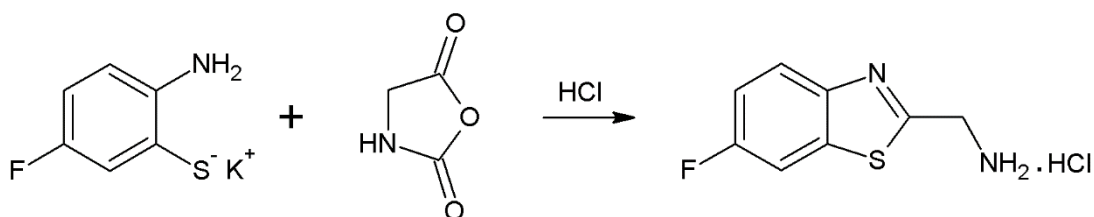
Glycin	12 g (0,16 mol)
THF	150 ml
Fosgen	30 g (0,3 mol)
Hexan	200 ml

Pracovní postup:

Do 250 ml tříhrdlé baňky bylo předloženo 12 g jemně nadrceného glycinu a 150 ml suchého THF. Do reakční směsi bylo za současného míchání postupně nadávkováno 30 g plynného fosgenu. Po nadávkování fosgenu byla reakční směs postupně vyhřáta na teplotu 40 °C. Reakční směs byla míchána při teplotě 40 – 42 °C, dokud se veškerý glycin nerozpustil. Poté byl z reakční směsi destilací za sníženého tlaku (45 – 50 °C/250 -10 mbar) oddestilován THF. Do destilačního zbytku bylo za stálého míchání postupně přidáno 150 ml hexanu. Vyloučený produkt byl odfiltrován a promyt 50 ml hexanu. Bylo získáno 14,2 g produktu (výtěžek 88 %).

2.2.1.3 Příprava 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

Reakční schéma:



Násada:

2-Amino-5-fluorthiofenolát draselný	55,0 g
Konc. HCl	45,5 g
Voda	53 ml
Gly-NCA	8 g (0,079 mol)
THF	26,0 g
Toluen	40 ml

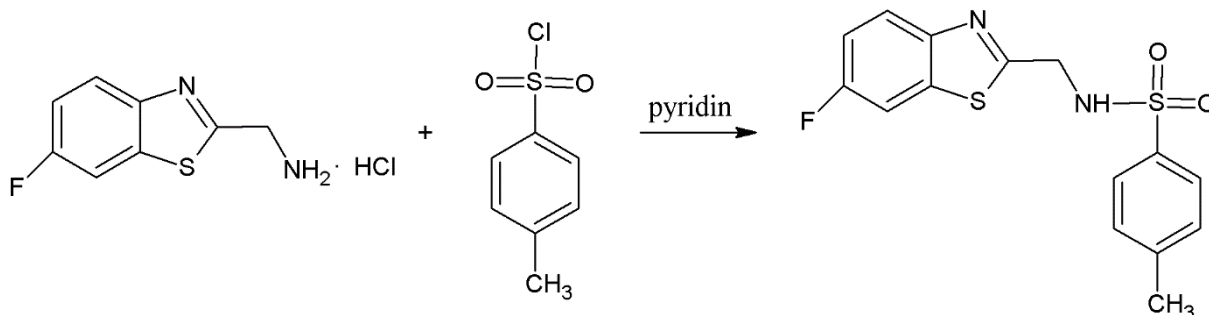
Pracovní postup:

Do z dusíkovaného 500 ml reaktoru bylo předloženo 45,5 g konc. HCl a 53 ml vody. Reakční směs byla ochlazena na teplotu 0 °C a do ní byl postupně nadávkován vodný roztok K⁺ soli tak, aby teplota nepřestoupila 5 °C. Do reakční směsi bylo potom přidáno 26 g THF (0 – 5 °C) a potom za stálého míchání přidáno 8 g Gly-NCA. Reakční směs byla následně vyhřáta na teplotu 50 °C a při této teplotě byla míchána 4 hodiny. Reakční směs byla následně ochlazena na teplotu 20 °C. Vyloučený produkt byl izolován filtrací a promyt 2x 20 ml toluenu. Produkt byl sušen na vzduchu. Bylo připraveno 13,2 g produktu (výtěžek 85 %).

2.3 Syntéza sulfonamidů

2.3.1 Příprava *N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

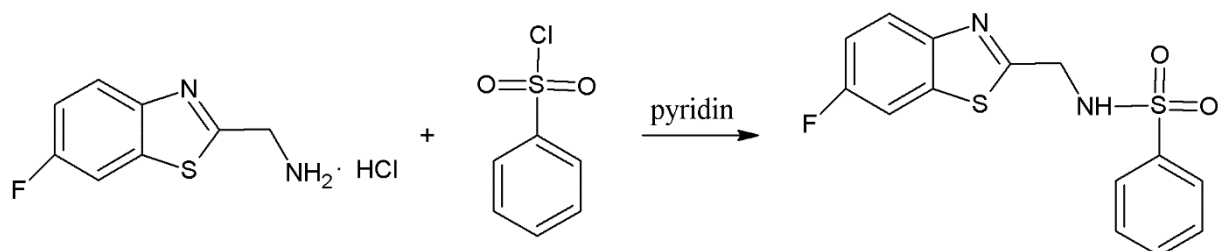
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
4-methylbenzensulfonylchlorid	1,1 g (0,06 mol)

Pracovní postup:

Do 50 ml baňky bylo předloženo 0,87 g (0,004 mol) 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochloridu, 20 ml pyridinu a 1,1 g (0,06 mol) 4-methylbenzensulfonylchloridu. Reakční směs byla posléze zahřáta na teplotu 70°C a takto míchána po dvě hodiny. Následně byla reakční směs ochlazená na teplotu 20°C a převedena do 100 ml baňky. Do reakční směsi bylo přidáno 20 ml 10% HCl a 60 ml toluenu. Takto byla míchána 30 min. Poté bylo míchání zastaveno a z reakční směsi byla oddělena organická vrstva. Z organické vrstvy bylo destilací za sníženého tlaku (50 °C/100 – 10 mbar) oddestilováno cca 30 ml toluenu. Z destilačního zbytku byl za pozvolného chladnutí vykryštalizován požadovaný produkt. Produkt byl izolován filtrací a byl dvakrát promyt 10ml *n*-hexanu. Sušen byl na vzduchu za laboratorní teploty. Bylo připraveno 1 g (74% výtěžek) produktu.

2.3.2 Příprava *N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

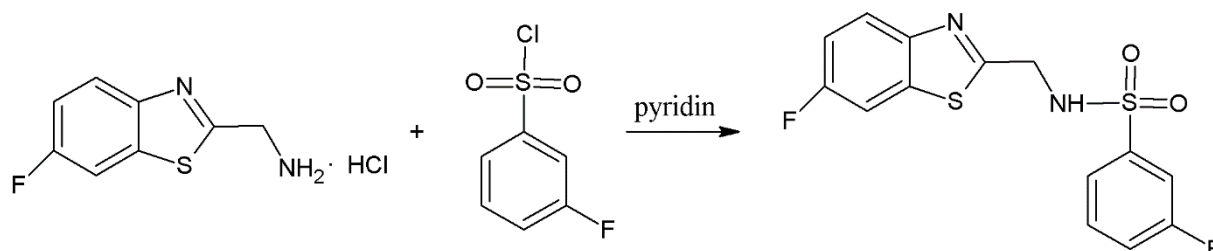
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
benzensulfonylchlorid	1,06 (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Byl připraven 1 g (78 % výtěžek) produktu.

2.3.3 Příprava 3-fluor-N-((6-fluorbenzothiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

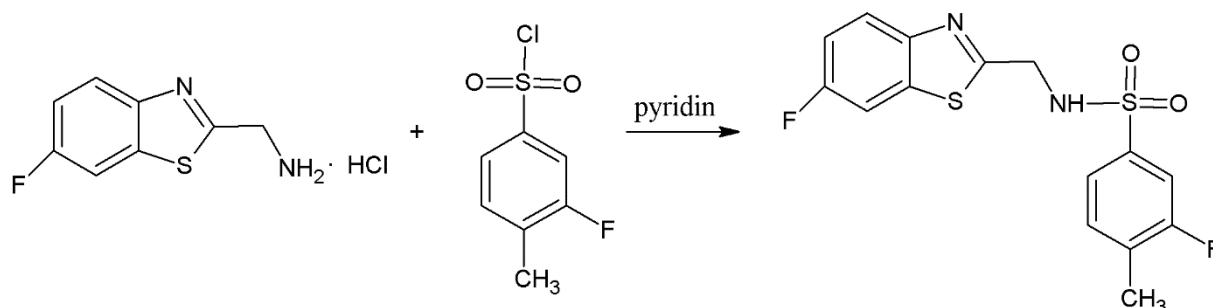
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3-fluorbenzensulfonylchlorid	1,16 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Bylo připraveno 1,1 g (81 % výtěžek) produktu.

2.3.4 Příprava 3-fluor-*N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzen sulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

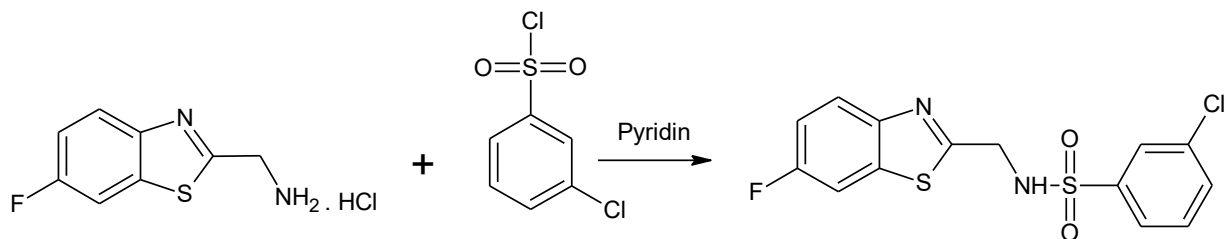
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3-fluor-4-methylbenzensulfonylchlorid	1,2 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Byl připraven 1 g (71 % výtěžek) produktu.

2.3.5 Příprava 3-chlor-*N*-((6-fluorbenzothiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

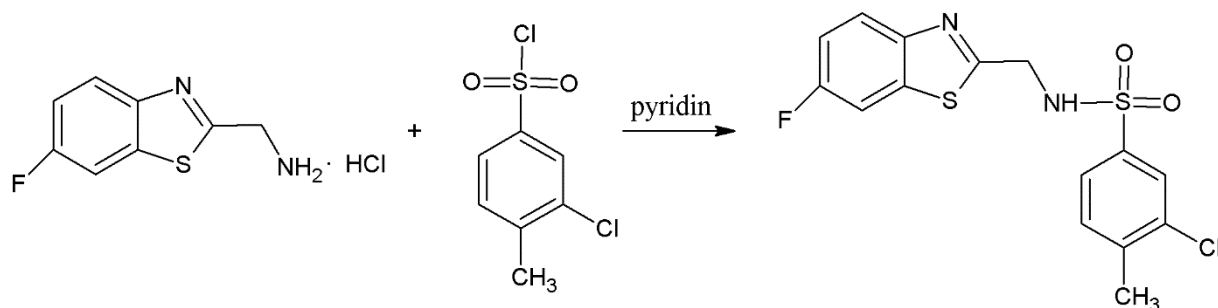
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3-chlorbenzensulfonylchlorid	1,3 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Bylo připraveno 1,1 g (77 % výtěžek) produktu.

2.3.6 Příprava 3-chlor-*N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzen sulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

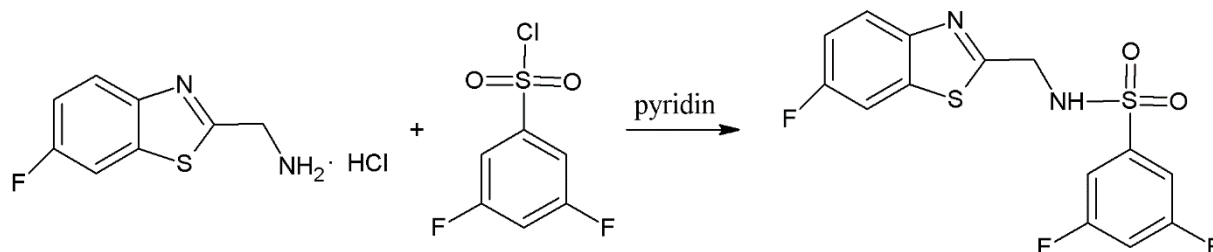
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3-chlor-4-methylbenzensulfonylchlorid	1,35 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Bylo připraveno 1,1 g (74 % výtěžek) produktu.

2.3.7 Příprava 3,5-difluor-*N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

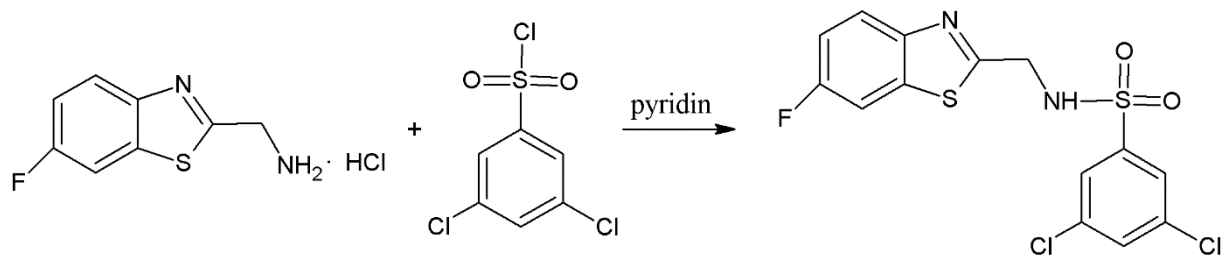
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminohydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3,5-difluorbenzensulfonylchlorid	1,27 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 2.3.1.. Bylo připraveno 0,9 g (63 % výtěžek) produktu.

2.3.8 Příprava 3,5-dichlor-*N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

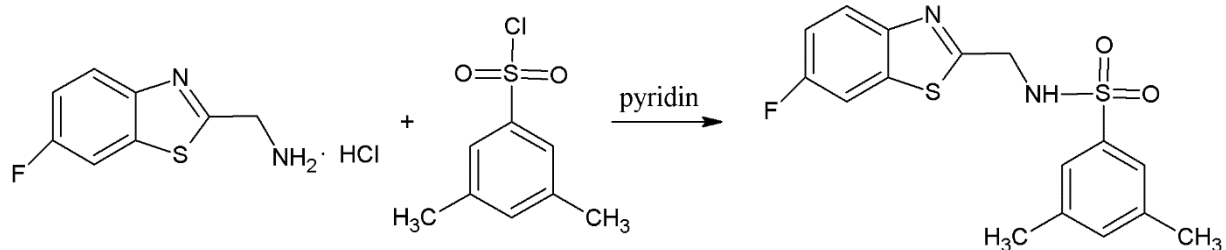
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminohydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3,5-dichlorbenzensulfonylchlorid	1,47 g (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáným v kapitole 2.3.1.. Bylo připraveno 1,1 g (70 % výtěžek) produktu.

2.3.9 Příprava 3,5-methyl-N-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzen sulfonamidu

Reakční schéma:



Násada:

1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-1-aminhydrochlorid	0,87 g (0,004 mol)
Pyridin	20 ml
3,5-dimethylbenzensulfonylchlorid	1,22 (0,006 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáným v kapitole 2.3.1.. Byl připraven 1 g (71 % výtěžek) produktu.

2.4 Metody charakterizace

2.4.1 Bod tání

Teplota tání byla stanovena na bodotávku Büchi Melting Point B-540, kde je možné sledovat proces tání skrz zvětšovací sklo a průběh reakce je viditelný na LCD displeji.

2.4.2 NMR spektroskopie

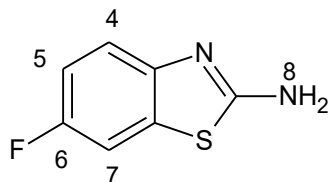
NMR spektra byla měřena v hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K na přístroji BrukerAvance 400 MHz v pulzním módu s Fourierovou transformací. Spektra byla měřena v 5-ti milimetrové širokopásmové laditelné sondě a frekvence použité při měření byly u ^1H spekter 400,13 MHz, pro ^{13}C spektra pak 100,62 MHz, a ^{19}F spektra 376,46 MHz. Všechna NMR spektra (^1H , ^{13}C a ^{19}F) byla měřena standardním způsobem. Hodnoty ^1H a ^{13}C chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ($\delta(^1\text{H}) = 2,5$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 39,5$ ppm (DMSO) a přepočteny do δ -stupnice.

2.4.3 Stanovení elementární analýzy

Elementární analýza byla provedena na přístroji FLASH 2000 CHNS Organic elemental analyser.

2.5 Charakteristika výchozích látek

2.5.1 2-amino-6-fluorbenzthiazol



Byl připraven na pracovišti ÚOCHT. Látka byla před použitím analyzována NMR spektrometrií.

Vzhled: Nažloutlá pevná látka

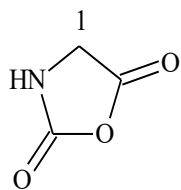
Bod tání: 183 – 185 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 7,57$ (1H, dd, $^4J = 2,5$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,8$ Hz, H7); 7,46 (2H, s, NH₂); 7,29 (1H, dd, $^3J = 8,7$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,03 (1H, dt, $^4J = 2,4$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,2$ Hz, H5).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 166,4$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 2,4$ Hz); 157,2 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 235,7$ Hz); 149,5; 131,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 11,5$ Hz); 118,1 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,6$ Hz); 112,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 23,6$ Hz); 107,8 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 27,0$ Hz).

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -122,4$

2.5.2 1,3-oxazolidin-2,5-dion



Vzhled: Bílá krystalická látka

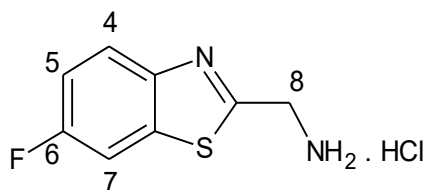
Výtěžek: 85 %

Bod tání: 88 – 89 °C (dekompozice)

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,83$ (1H, s, NH); 4,18 (2H, s, H1).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 169,5$; 153,1; 46,3.

2.5.3 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 88 %

Bod tání: 202 – 204 °C

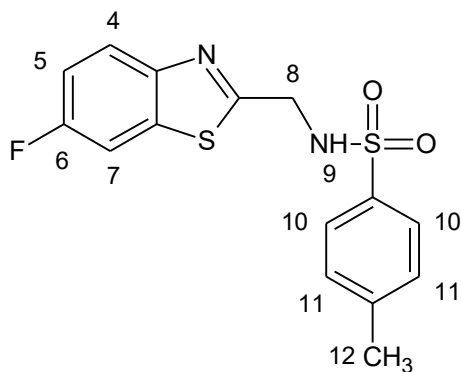
^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): δ = 9,04 (3H, s, NH_2); 8,09 (1H, dd, 4J = 2,7 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 8,8 Hz, H7); 8,05 (1H, dd, 3J = 9,0 Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 4,9 Hz, H4); 7,42 (1H, dt, 4J = 2,6 Hz, 3J = 9,0 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,0 Hz, H5); 4,55 (2H, s, H8).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): δ = 164,2 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 3,2 Hz); 159,8 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 243,0 Hz); 148,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 1,5 Hz); 136,5 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 12,0 Hz); 123,9 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 9,7 Hz); 115,1 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 24,9 Hz); 108,9 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 27,2 Hz); 40,1.

^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): δ = -115,5.

2.6 Charakteristika připravených sloučenin

2.6.1 *N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 74%

Bod tání: 140 - 141 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,70 (1H, t, ³*J* = 6,3 Hz, NH 9); 7,99 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,92 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,71 (2H, d, ³*J* = 8,3 Hz, H10); 7,38 (2H, d, ³*J* = 8,3 Hz, H11); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,39 (2H, d, ³*J* = 6,3 Hz, H8); 2,36 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,6 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,5 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,4 Hz); 143,1; 137,2; 136,1 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,6 Hz); 129,7; 126,6; 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,5 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,7 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 44,6; 21,0.

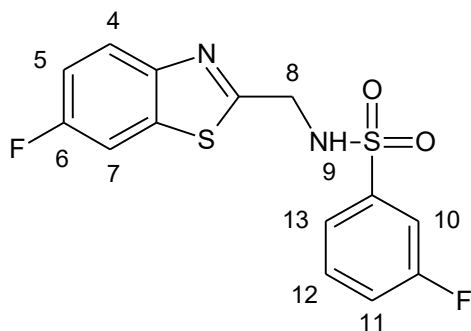
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,4

Elementární analýza: C₁₅H₁₃FN₂O₂S₂ (M_r = 336,40)

Vypočteno: C(53,56 %), H(3,90 %), N(8,33 %), S(19,06%)

Stanoveno: C(53,72 %), H(3,81 %), N(8,20 %), S(19,22 %)

2.6.2 3-fluor-N-((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 81 %

Bod tání: 132 - 134 °C

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): δ = 8,95 (1H, t, $^3J = 6,3$ Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,9$ Hz, H7); 7,91 (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,67 (1H, dt, $^4J = 1,5$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,0$ Hz, H10); 7,65 – 7,60 (2H, m, H12, H13); 7,49 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 8,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,0$ Hz, H11); 7,36 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 4,50 (2H, d, $^3J = 6,3$ Hz, H8).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): δ = 170,0 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 161,7 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 247,4$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 243,4$ Hz); 149,4 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,5$ Hz); 142,3 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 6,6$ Hz); 136,0 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 131,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 7,9$ Hz); 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,7$ Hz); 122,8 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 2,9$ Hz); 119,8 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 21,3$ Hz); 114,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 113,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,6$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,3$ Hz); 44,6.

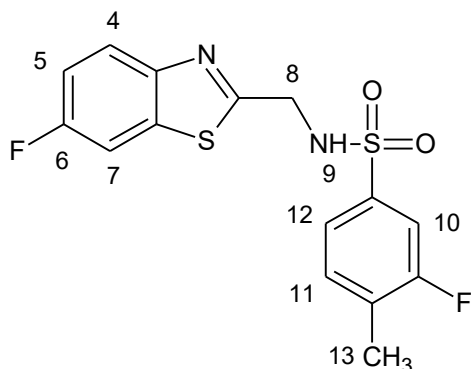
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): δ = -110,5; -116,3

Elementární analýza: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ($M_r = 340,36$)

Vypočteno: C(49,40 %), H(2,96 %), N(8,23 %), S(18,84%)

Stanoveno: C(49,57 %), H(3,07 %), N(8,05 %), S(18,68 %)

2.6.3 3-fluor-*N*-((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 71%

Bod tání: 156 - 158 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 8,85 (1H, t, ³*J* = 6,2 Hz, NH 9); 7,99 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,91 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 5,0 Hz, H4); 7,55 (2H, m, H10, H11); 7,47 (1H, t, ³*J* = 7,7 Hz, H11); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,46 (2H, d, ³*J* = 6,3 Hz, H8); 2,25 (3H, d, ⁴*J* = 1,4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ= 170,0 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,1 Hz); 160,0 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 246,9 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,4; 139,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 6,8 Hz); 136,0 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 132,5 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 4,9 Hz); 129,9 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 17,0 Hz); 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,7 Hz); 122,5 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 113,2 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 25,4 Hz); 108,4 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 44,6; 14,2.

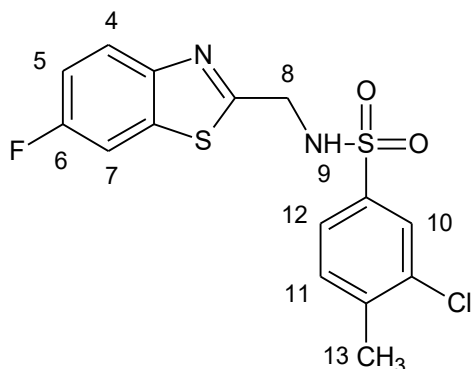
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ= -115,4; -116,4

Elementární analýza: C₁₅H₁₂F₂N₂O₂S₂ (M_r = 354,39)

Vypočteno: C(50,84 %), H(3,41 %), N(7,90 %), S(18,09%)

Stanoveno: C(50,65 %), H(3,30 %), N(8,05 %), S(18,27 %)

2.6.4 3-chlor-N-((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)-4-methylbenzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 74 %

Bod tání: 172 - 173 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,86 (1H, t, ³J = 6,3 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ⁴J = 2,7 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,90 (1H, dd, ³J = 8,9 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,76 (1H, d, ⁴J = 1,7 Hz, H10); 7,66 (1H, dd, ⁴J = 1,8 Hz, ³J = 7,9 Hz, H12); 7,51 (1H, d, ³J = 8,0 Hz, H11); 7,36 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,47 (2H, d, ³J = 6,3 Hz, H8); 2,33 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169,7 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,4 (d, ⁵J(¹⁹F, ¹³C) = 1,4 Hz); 140,7; 139,5; 136,0 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,7 Hz); 133,8; 131,9; 126,7; 125,2; 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,8 Hz); 114,5 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 108,4 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 44,5; 19,5.

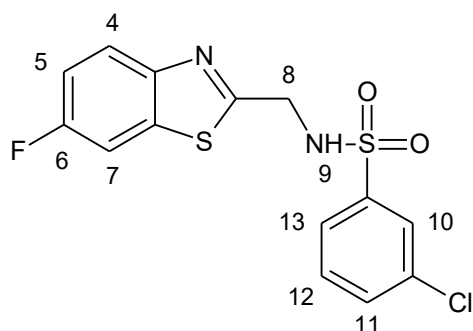
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,4

Elementární analýza: C₁₅H₁₂ClFN₂O₂S₂ (M_r = 370,84)

Vypočteno: C(48,58 %), H(3,26 %), N(7,55 %), S(17,29%)

Stanoveno: C(48,75 %), H(3,15 %), N(7,36 %), S(17,47 %)

2.6.5 3-chlor-N-((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 77 %

Bod tání: 126 - 128 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,94 (1H, t, ³J = 6,3 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,91 (1H, dd, ³J = 9,0 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,79 (2H, m, H10, H13); 7,67 (1H, td, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H11); 7,58 (1H, t, ³J = 8,1 Hz, H12); 7,36 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,0 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,51 (2H, d, ³J = 6,3 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169,7 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,2 Hz); 149,3 (d, ⁵J(¹⁹F, ¹³C) = 1,3 Hz); 142,2; 135,9 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 133,8; 132,5; 126,2; 125,2; 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,8 Hz); 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 108,4 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 44,5.

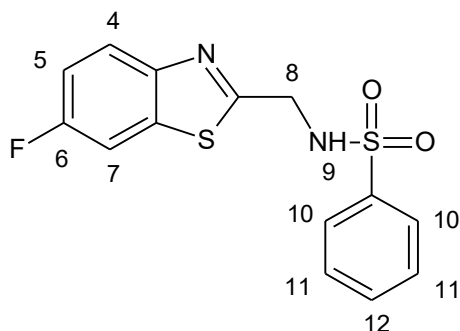
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,3

Elementární analýza: C₁₄H₁₀ClFN₂O₂S₂ (M_r = 356,81)

Vypočteno: C(47,13 %), H(2,82 %), N(7,85 %), S(17,97 %)

Stanoveno: C(46,99 %), H(2,91 %), N(7,99 %), S(17,79 %)

2.6.6 N-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 78 %

Bod tání: 134-136 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,81 (1H, t, ³*J* = 6,3 Hz, NH 9); 7,99 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,92 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,85 (2H, d, ³*J* = 7,2 Hz, H10); 7,66 – 7,56 (3H, m, H11, H12); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,42 (2H, d, ³*J* = 6,3 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,5 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,5 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,0 Hz); 149,5; 140,1; 136,0 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,6 Hz); 132,7; 129,3; 126,6; 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,4 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 44,6.

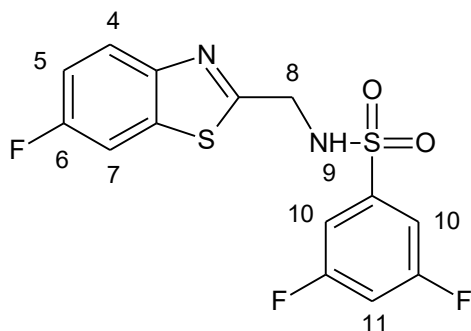
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,3

Elementární analýza: C₁₄H₁₁FN₂O₂S₂ (M_r = 322,37)

Vypočteno: C(52,16 %), H(3,44 %), N(8,69 %), S(19,89 %)

Stanoveno: C(52,00 %), H(4,36 %), N(8,87 %), S(19,71 %)

2.6.7 3,5-difluor-N-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 63 %

Bod tání: 150 - 152 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,01 (1H, t, ³J = 6,3 Hz, NH 9); 7,99 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,92 (1H, dd, ³J = 9,0 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,57 (1H, tt, ⁴J = 2,3 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H11); 7,50 (2H, m, H10); 7,36 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,0 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,56 (2H, d, ³J = 6,3 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169,6 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 162,2 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 251,2 Hz); 162,1 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 251,2 Hz); 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,0 Hz); 149,3; 143,7 (t, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 8,2 Hz); 136,0 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,7 Hz); 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,5 Hz); 114,7 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 110,4 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 28,2 Hz); 108,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,4 Hz); 108,4 (t, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 26,0 Hz); 44,5.

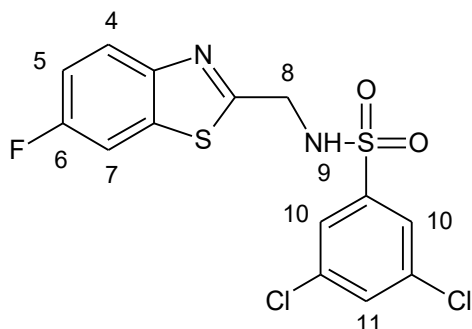
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -106,5; -116,2

Elementární analýza: C₁₄H₉F₃N₂O₂S₂ (M_r = 358,35)

Vypočteno: C(46,92 %), H(2,53 %), N(7,82 %), S(17,89%)

Stanoveno: C(47,11 %), H(2,43 %), N(7,65 %), S(18,05 %)

2.6.8 3,5-dichlor-*N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 70 %

Bod tání: 152 - 154 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,07 (1H, t, ³*J* = 6,3 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,90 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,84 (1H, t, ⁴*J* = 1,9 Hz, H11); 7,74 (2H, d, ⁴*J* = 1,8 Hz, H10); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,57 (2H, d, ³*J* = 6,3 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169,0 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,5 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,1 Hz); 149,3 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,5 Hz); 143,5; 136,0 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 134,9; 132,1; 125,2; 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,7 Hz); 114,5 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 44,4.

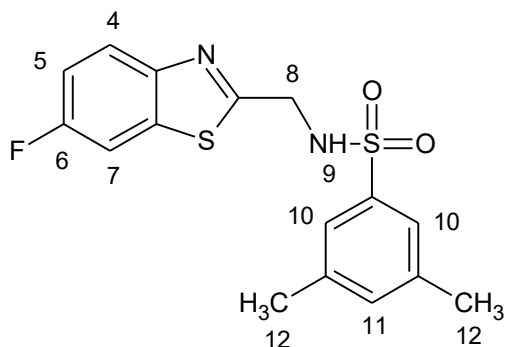
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,4

Elementární analýza: C₁₄H₉Cl₂FN₂O₂S₂ (M_r = 391,26)

Vypočteno: C(42,98 %), H(2,32 %), N(7,16 %), S(16,39%)

Stanoveno: C(42,80 %), H(3,25 %), N(7,35 %), S(16,57 %)

2.6.9 3,5-dimethyl-N-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 71 %

Bod tání: 127 - 129 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,67 (1H, t, ³J = 6,3 Hz, NH 9); 7,98 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,90 (1H, dd, ³J = 8,9 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,42 (2H, s, H10); 7,36 (1H, dt, ⁴J = 2,6 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 7,22 (1H, s, H11); 4,52 (2H, d, ³J = 6,3 Hz, H8); 2,29 (6H, s, CH₃).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170,4 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,0 Hz); 159,5 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,5 Hz); 149,4 (d, ⁵J(¹⁹F, ¹³C) = 1,5 Hz); 140,0; 138,7; 136,1 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,7 Hz); 133,9; 124,0; 123,7 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 114,6 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 108,5 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,2 Hz); 44,6; 20,7.

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,4

Elementární analýza: C₁₆H₁₅FN₂O₂S₂ (M_r = 350,43)

Vypočteno: C(54,84 %), H(4,31 %), N(7,99 %), S(18,30%)

Stanoveno: C(55,01 %), H(4,22 %), N(7,85 %), S(18,47 %)

3 Výsledky a diskuse

3.1 Syntéza

Cílem této bakalářské práce bylo připravit řadu nových benzthiazolových sulfonamidů, kde byl jako výchozí amin použit 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin. V první části bakalářské práce byla připravena výchozí látka 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid. Tato sloučenina byla připravena třístupňovou syntézou (Schéma 13). V prvním reakčním stupni reagoval 2-amino-6-fluorbenzthiazol s vodným roztokem hydroxidu draselného po dobu 5 hodin při teplotě 110 – 115 °C za vzniku 2-amino-5-fluorothiofenolátu draselného. Ve druhém reakčním stupni reagoval glycin s plynným fosgenem v THF za vzniku Gly-NCA. Ve třetím reakčním stupni byl nejprve 2-amino-5-fluorothiofenolát draselný převeden v prostředí kyseliny chlorovodíkové na 2-amino-5-fluorbenzthiazol hydrochlorid, a ten následně reagoval s pevným Gly-NCA za vzniku 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu. Vývoj syntézy této sloučeniny je popsán a diskutován v práci.²⁹

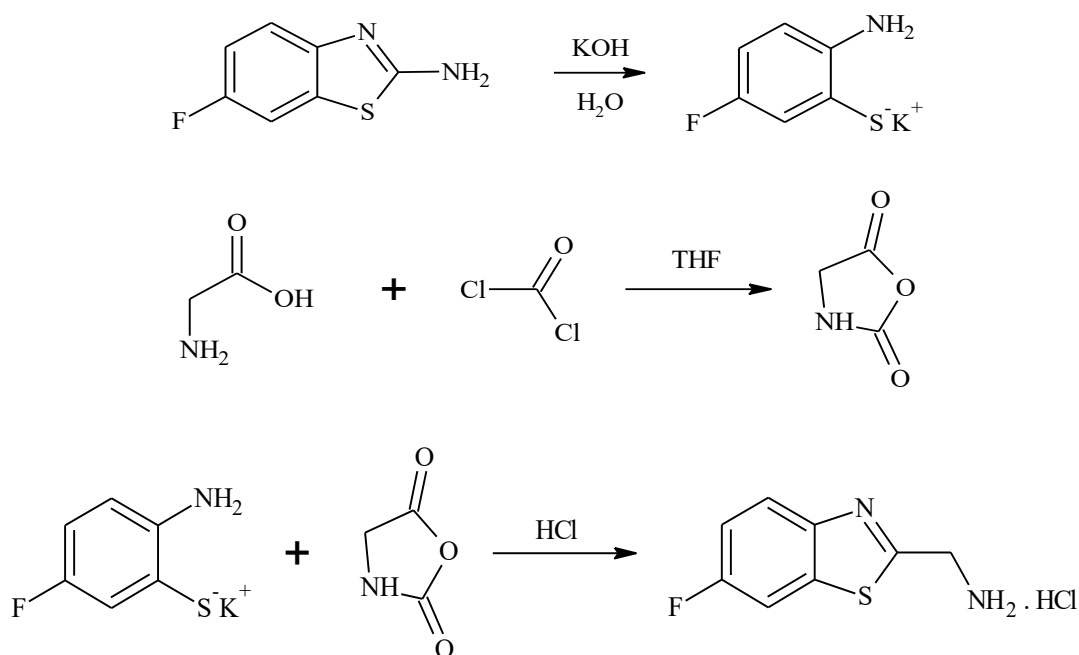
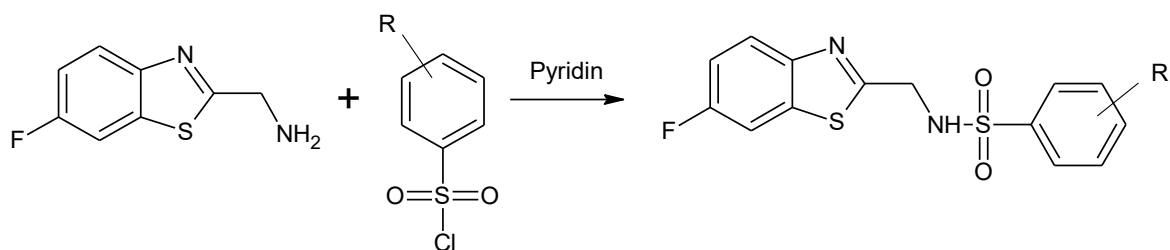


Schéma 13: Třístupňová syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

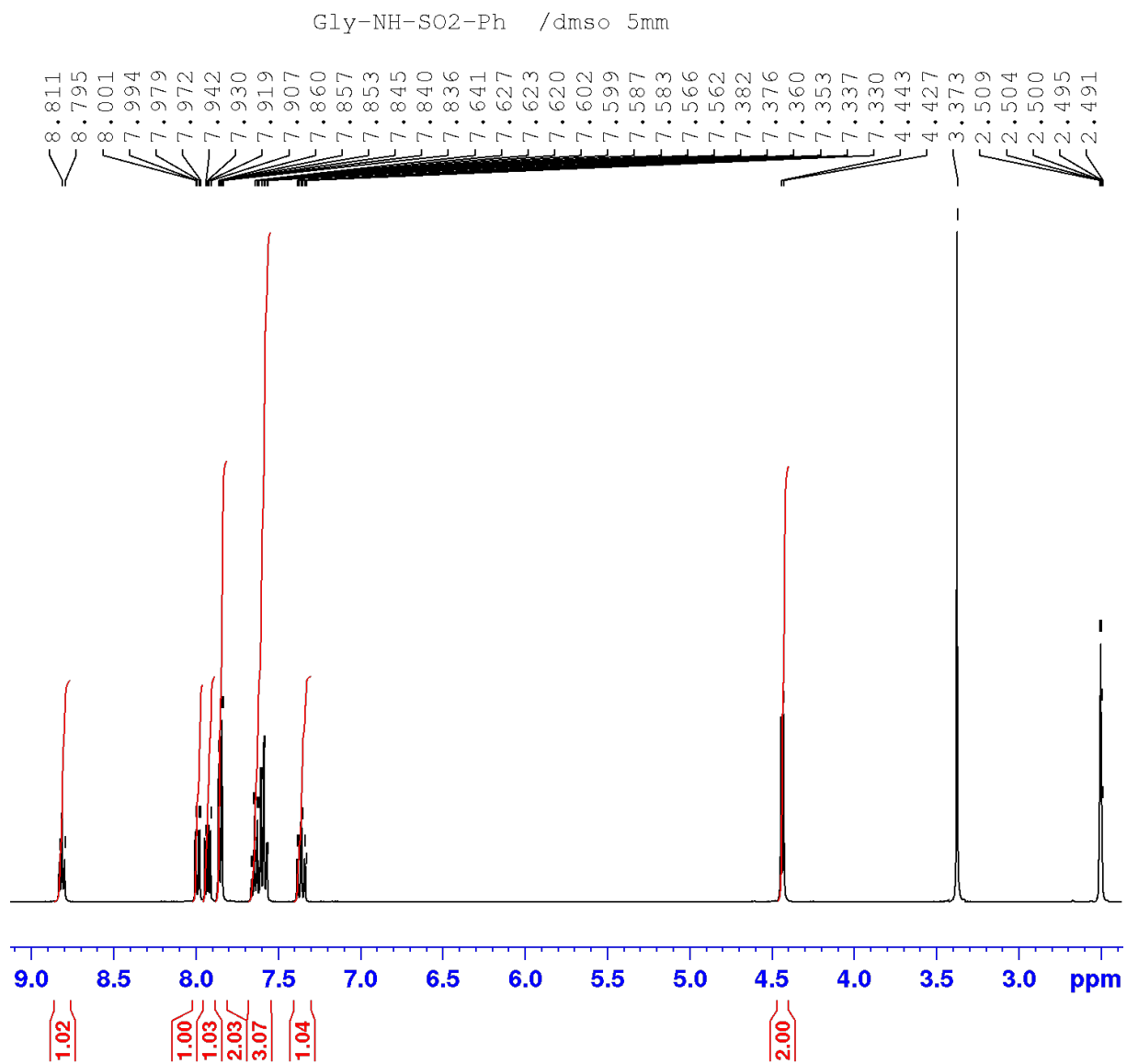
V další části byla provedena syntéza vybraných bezthiazolových sulfonamidů. Tyto sloučeniny byla syntetizovány reakcí 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu se substituovanými benzensulfonylchloridy (Schéma 14).



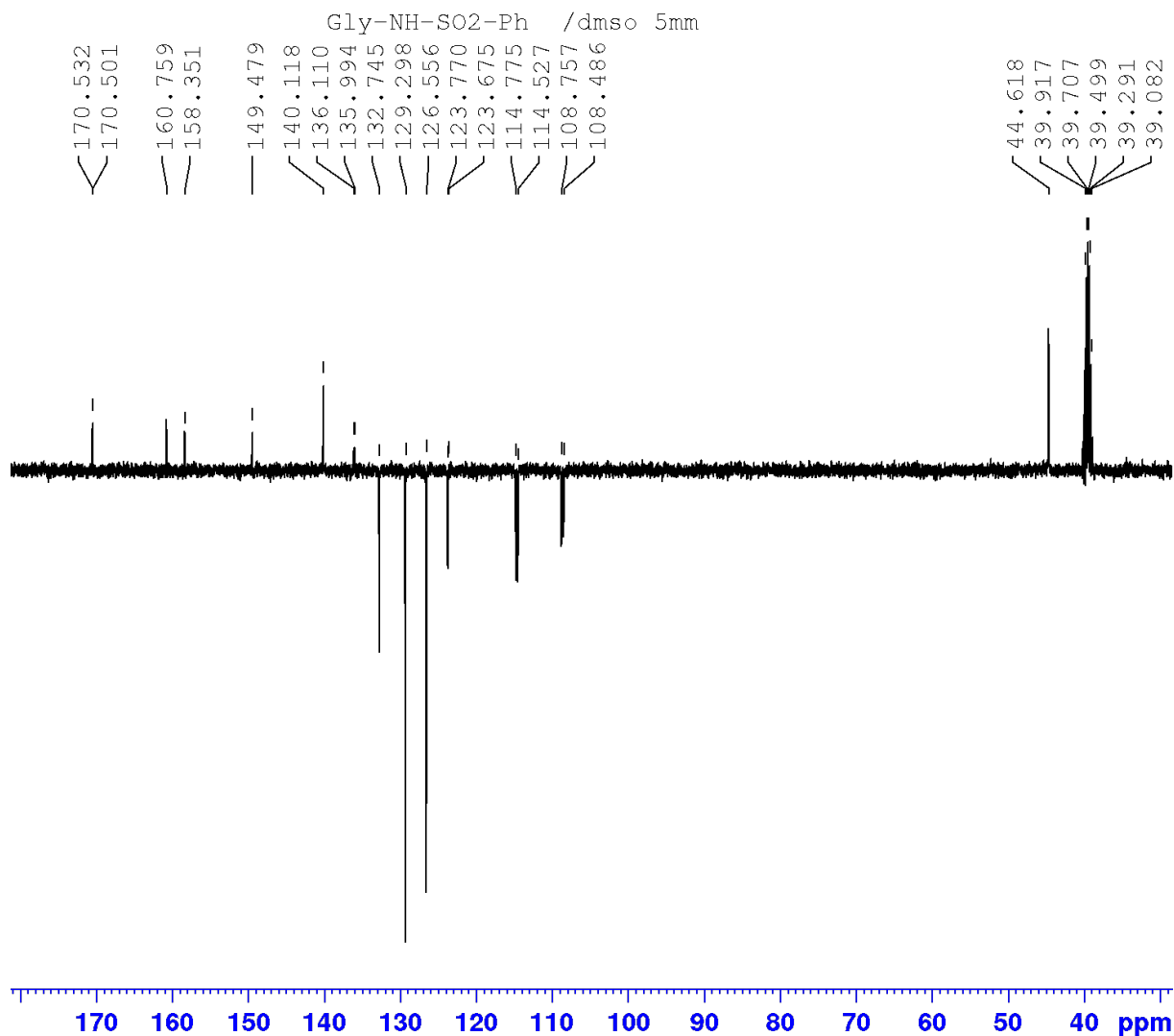
R= H, 4-CH₃, 3-F, 3-Cl, 3-F-4- CH₃, 3-Cl-4- CH₃, 3,5-F₂, 3,5-Cl₂, 3,5-(CH₃)₂

Schéma 14: Syntéza benzthiazolových sulfonamidů

Vlastní reakce probíhala v pyridinu. Výchozí 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin byl do reakce použit ve formě stabilní hydrochloridové soli. Z této soli byl amin uvolněn reakcí s pyridinem. Amin ve formě báze reagoval dále s příslušným sulfonylchloridem. Reakce probíhala při teplotě 70 °C. Reakcí vzniklý chlorovodík reagoval s pyridinem za vzniku hydrochloridové soli. Substituované benzensulfonylchloridy byly do reakce použity v 1,5 molárním nadbytku. Po ukončení reakce byl do reakční směsi nejprve přidán toluen a následně byl reakcí s 10 % kyselinou chlorovodíkovou převeden pyridin na ve vodě rozpustnou hydrochloridovou sůl. Z této reakční směsi byl následně produkt extrahován toluenem. Toluénová vrstva byla dále extrahována vodou. Z takto vyprané organické vrstvy byl dále destilací za sníženého tlaku (50 – 52 °C/100 – 10 mbar) odstraněn veškerý toluen a konečný produkt byl krystalizován z *n*-hexanu. Produkt byl izolován filtrací a byl sušen stáním na vzduchu. Touto metodou bylo dosaženo výtěžku 63–81 %. Připravené sulfonamidy byly charakterizovány pomocí bodu tání, NMR spektrometrie. Čistota produktů byla potvrzena elementární analýzou.



Obrázek 15: ¹H NMR *N*-((6-fluorbenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu

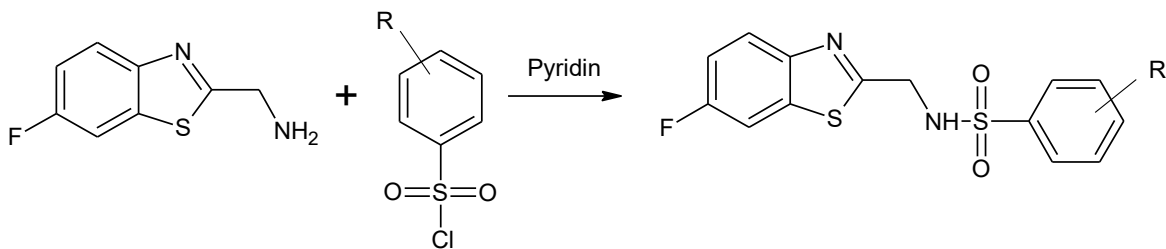


Obrázek 16: ¹³C NMR *N*-((6-fluorobenzthiazol-2-yl)methyl)benzensulfonamidu

3.2 Stanovení inhibičních aktivit vůči enzymům

U připravených sulfonamidů bylo provedeno testování inhibiční aktivity vůči enzymům acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BChE). Testování bylo provedeno na Katedře biochemie a biologických věd. Míra inhibiční aktivity daných inhibitorů byla provedena stanovením hodnot IC_{50} což je množství látky potřebné k 50%inhibici enzymů. Stanovení hodnot IC_{50} v této práci bylo provedeno Ellmanovou metodou. Princip této metody spočívá v hydrolýze esterů thiocholinu, kdy je pro měření aktivity AChE jako substrát využíván acetylthiocholin (ATCh) a u BChE je substrátem butyrylthiocholin (BTCh). Při hydrolýze dojde ke vzniku příslušné kyseliny a thiocholinu. Merkaptó SH- skupina thiocholinu je následně detekována pomocí 5,5-dithio bis(-2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB), přičemž během této reakce dojde k uvolnění 5-merkaptó-2-nitrobenzoátového aniontu (TNB^-). Ten je spektrofotometricky stanoven po přechodu na 2-nitro-5-thiobenzoovou kyselinu při vlnové délce 412 nm. Stanovená absorbance produktu je přímo úměrná aktivitě enzymu.^{12,13}

Tabulka 1: IC₅₀ připravených nechirálních sulfonamidů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu

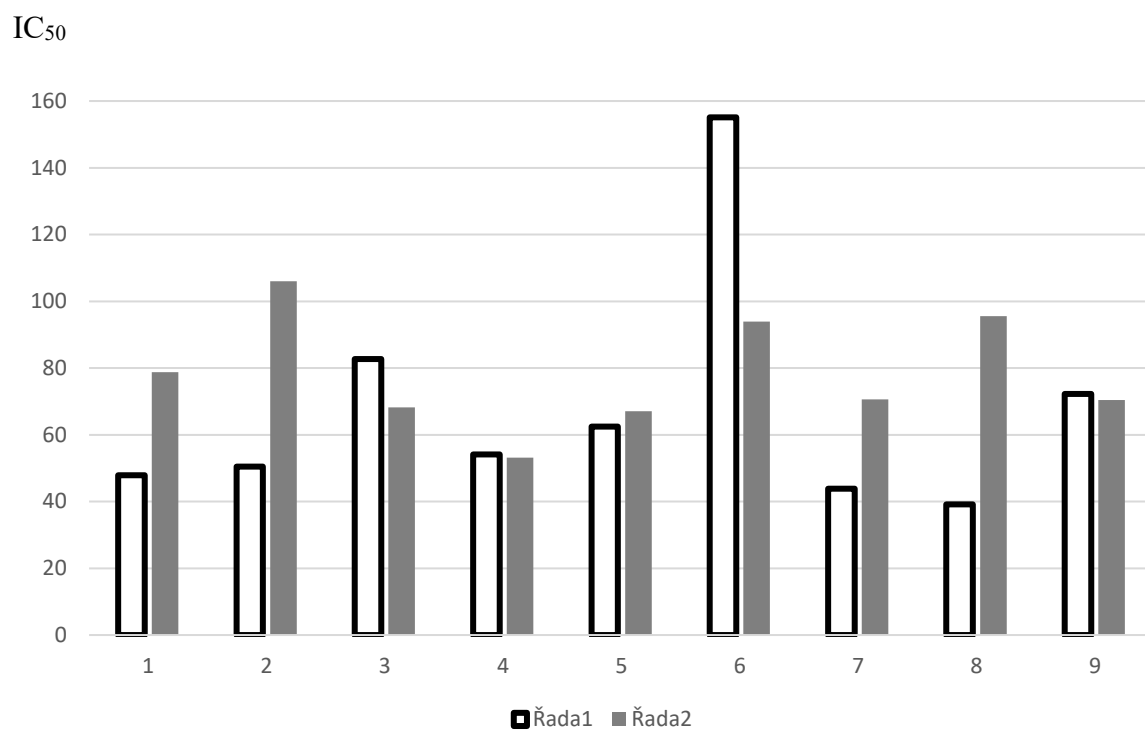
			
číslo	R	IC ₅₀ μM ACHE	IC ₅₀ μM BCHE
1	H	78,76±2,48	39,39±1,43
2	4-CH ₃	106,01±5,84	50,15±1,06
3	3-F	68,20±4,13	25,83±0,15
4	3-F-4-CH ₃	53,15±0,78	109,62±2,93
5	3,5-F ₂	67,09±1,77	73,18±3,05
6	3-Cl	93,92±1,83	164,98±6,54
7	3-Cl-4-CH ₃	70,58±1,95	110,62±4,53
8	3,5-Cl ₂	95,55±0,38	80,98±1,13
9	3,5(CH ₃) ₂	70,45±1,37	22,39±1,10

Stanovené hodnoty IC₅₀ byly porovnány s výsledky stanovení hodnot IC₅₀ u série chirálních benzthiazolových sulfonamidů, kde syntéza vycházela z (1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu.

Tabulka 2: IC₅₀ připravených chirálních sulfonamidů vycházejících z (1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu

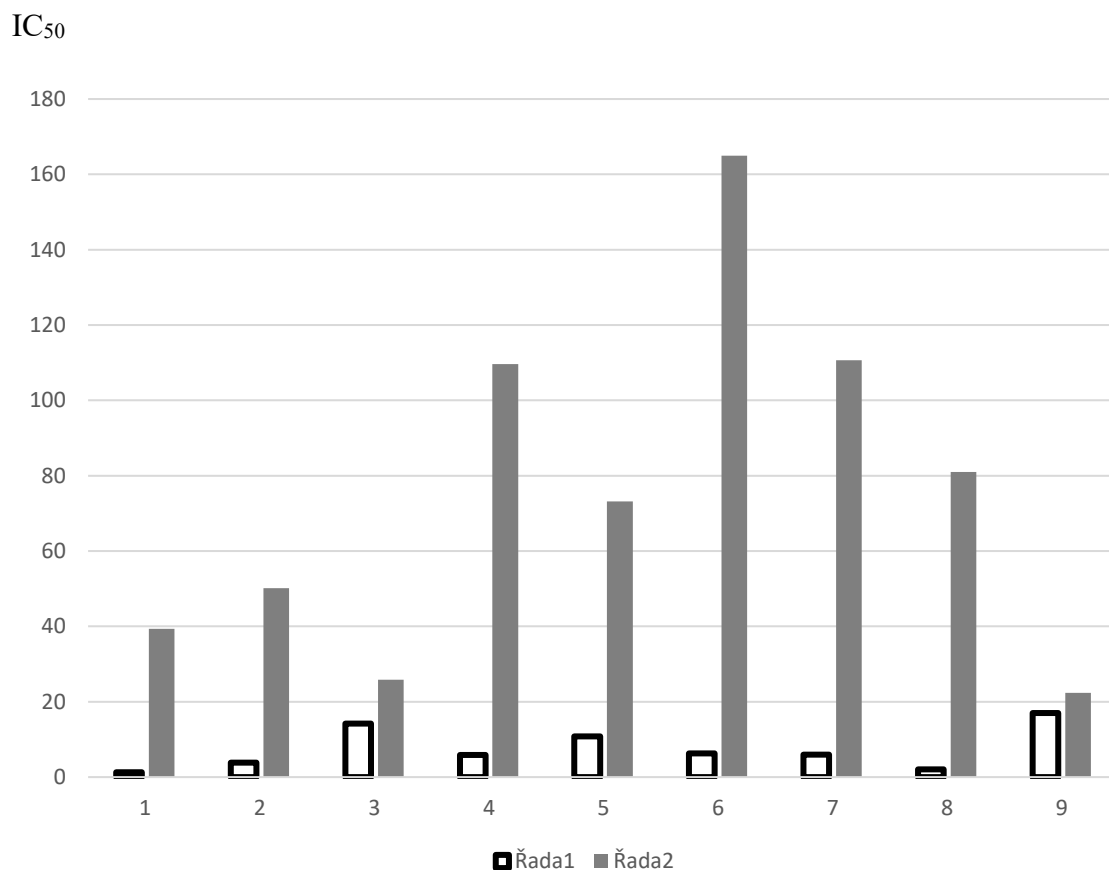
číslo	R	IC ₅₀ μM ACHE	IC ₅₀ μM BChE
1	H	47,89±1,31	1,27±0,16
2	4-CH ₃	50,51±0,46	3,80±0,17
3	3-F	82,69±0,83	14,18±0,10
4	3-F-4-CH ₃	54,12±1,77	5,89±0,01
5	3,5-F ₂	62,46±0,58	10,80±0,09
6	3-Cl	155,15±0,91	6,29±0,18
7	3-Cl-4-CH ₃	43,83±1,08	5,97±0,03
8	3,5-Cl ₂	39,17±1,32	2,06±0,16
9	3,5(CH ₃) ₂	72,19±0,0,27	17,04±0,36

Při stanovení hodnot inhibiční aktivity u sulfonamidů vycházejících z chirálního (1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu vůči BChE bylo dosaženo nižších hodnot IC₅₀ než u inhibice AChE (tab 2). To mohlo být způsobeno několika strukturálními rozdíly ve stavbě aktivního místa AChE a BChE. Na dně prohlubně aktivního místa AChE jsou dvě molekuly fenylalaninu, jejichž aromatická rezidua vyčnívají do prostoru prohlubně aktivního místa. Naproti tomu v BChE jsou tyto molekuly nahrazeny dvěma menšími aminokyselinami - valinem a leucinem. Tato konformační změna vytváří větší prostor v nejhlubší části prohlubně aktivního místa BChE a umožňuje interakci BChE s většími substráty a inhibitory.^{15,26} Na základě tohoto poznatku byla syntetizována řada sulfonamidů vycházející z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu s cílem zmenšit molekulu a tím dosáhnout nižších hodnot IC₅₀ u ihibice AChE a zachovat, případně snížit hodnoty IC₅₀ u ihibice BChE. Hodnoty IC₅₀ (tab. 1, 2) byly porovnány a jsou znázorněny v grafu 1 (inhibice AChE) a 2 (inhibice BChE).



Graf 1: Graf závislosti hodnot IC₅₀ na substituentu pro AChE (viz tab. 1 a 2)

Řada 1 D-Val (tab. 2), Řada 2 Gly (tab 1)



Graf 2: Závislost hodnot IC₅₀ na substituentu pro BChE (viz tab. 1 a 2)

Řada 1 D-Val (tab. 2), Řada 2 Gly (tab 1)

Z grafů 1 a 2 je patrné, že zmenšením velikosti molekuly, tj. volbou glycinu namísto D-valinu, při syntéze výchozího aminu sice došlo při stanovení inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze ve třech případech ke snížení hodnoty IC₅₀, ale zároveň byly stanoveny výrazně vyšší hodnoty IC₅₀ při inhibici butyrycholinesterázy.

4 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla připravena řada nových benzthiazolových sulfonamidů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminu. Připravené sloučeniny byly charakterizovány pomocí bodu tání, NMR spektrometrie. Čistota produktů byla potvrzena elementární analýzou.

Dále bylo u připravených sulfonamidů provedeno stanovení inhibiční aktivity vůči enzymům acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BChE). Míra inhibiční aktivity daných inhibitorů byla provedena stanovením hodnot IC_{50} , což je množství látky potřebné k 50%inhibici enzymů. Stanovení hodnot IC_{50} v této práci bylo provedeno Ellmanovou metodou. Stanovené hodnoty IC_{50} byly porovnány s výsledky stanovení hodnot IC_{50} u série již dříve připravených chirálních benzthiazolových sulfonamidů, kde syntéza vycházela z (1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-methylpropan-1-aminu. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že u připravených derivátů bylo sice ve třech případech dosaženo nižších hodnot IC_{50} při stanovení inhibice acetylcholinesterázy, ale zároveň bylo dosaženo výrazně vyšších hodnot IC_{50} při stanovení inhibiční aktivity u butyrylcholinesterázy.

5 Použitá literatura

1. KVÍTKOVÁ, L. *Základy chemie léčivých látek I*. Olomouc, 2012, 85-87.
2. WERMUTH, C. G. *Practice of Medicinal Chemistry – 1.2.3.2. Sulfonamides*. Elsevier. 2008, **3**, 17-18.
3. IGWE, C. N.; OKORO, U. C. Synthesis, Characterization, and Evaluation for Antibacterial and Antifungal Activities of N -Heteroaryl Substituted Benzene Sulphonamides. *Organic Chemistry International*. 2014, **2014**, 1-5.
4. BHANDARI, A. S.; RAO, Y. A.; CRAIG, D. C.; PASCALE, O.; SAY, K. T.; ZHANG, R. D.; TIAN, C. Contaminants of Emerging Environmental Concern – 5.2.3.1. Sulfamethazine. *American Society of Civil Engineers*. c2009, 147. ISBN: 978-0-1014-1.
5. MUKHERJEE, P.; WOROCH, C. P; CLEARY, L.; RUSZNAK, M.; FRANZESE, R. W.; REESE, M. R.; TUCKER, J. W.; HUMPHREY, J. M.; ETUK, S. M.; KWAN, S. C.; AM ENDE, C. W.; BALL, N. D. Sulfonamide Synthesis via Calciu Triflimide Activation of Sulfonyl Fluorides, *Organic Letters*, 2018, **20**(13), 3943-3947. DOI: 10.1021/acs.orglett.8b01520.
6. FAMING ZHUANLI SHENQING. Industrial preparation method of sulfamethoxazole from 3-amino-5-methylisoxazole and diphenyl urea sulfonyl chloride. Čína. Patent, CN 109053617.
7. KIM, S. H.; LIM, K. R.; LEE, H. et. al. Clinical effectiveness of oral antimicrobial therapy for acute pyelonephritis caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriales. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2020, **39**, 159-167.
8. FAMING ZHUANLI SHENQING. A synthetic method of sulfadiazine. Čína. Patent, CN 105254575.
9. ZHOU, Z.; LOPEZ, H. I. A. O.; PÉREZ, G. E.; BURGOS, L. M.; FARINA, J. M.; SALDARRIAGA, C.; LOPEZ-SANTI, R.; COTELLA, J. I.; PÉREZ, A. L. S.; BARANCHUK, A. Toxoplasmosis and the Heart. *Current Problems in Cardiology*, 2021, **46**(3), 100741
10. BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's Disease. *British Medical Journal*. 2009, **338**(7692), 467-471.
11. BAG, S.; TULSAN, R.; SOOD, A.; CHO, H.; REDJEB, H.; ZHOU, W.; LEVINE, H.; TÖRÖK, B.; TÖRÖK, M. Sulfonamides as multifunctional agents for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, **25**(3), 626-630.
12. IMRAMOVSKÝ, A.; PEJCHAL, V.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; VORČÁKOVÁ, K.; JAMPÍLEK, J.; VANČO, J.; ŠIMŮNEK, P.; KRÁLOVEC, K.; BRŮČKOVÁ, L.; MANDÍKOVÁ, J.; TREJTNAR, F. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[d]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, **21**(7), 1735-1748.
13. SEKAR, V.; PERUMAL, P.; GANDIMATHI, S.; JAYASEELAN, S.; RAJESH, V. Synthesis and anticancer evaluation of novel benzothiazole derivatives. *Asian Journal of Chemistry*. 2010, **22**(7), 5487.

14. JIRÁK, R. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2002, **2**, 101-105.
15. ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; KOMERS, K. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*. 2008, **4**, 160-171.
16. MIAO, Y.; HE, N.; ZHU, J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews*. 2010, **110**(9), 5216-5234.
17. ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J.; KUČA, K.; JUN, D.; BAJGAR, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. 2010, **104**, 46-50.
18. NOVÁKOVÁ, Z.; PEJCHAL, V.; FISCHER, J.; ČESLA, P. Chiral separation of benzothiazole derivatives of amino acids using capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*. 2016, **40**(3), 798-803
19. PEJCHAL, V.; ŠTĚPÁNKOVÁ Š.; DRABINA P. Synthesis of 1-[(1R)-1-(6-Fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-substituted Phenyl Ureas and Their Inhibition Activity to Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2011, **48**(1), 57-62.
20. VELLOM, D. C.; RADIC, Z.; PICKERING, N. A.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 1993, **32**(45), 12074-12084.
21. PEJCHAL, V.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; PADEĚLKOVÁ, Z.; IMRAMOVSKÝ A.; JAMPÍLEK J. Substituted Imidazolidine-2,4,5-triones: Synthesis and Inhibition of Cholinergic Enzymes. *Molecules*. 2011, **16**(9), 7565-7582.
22. SANGSTER, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 1989, **18**, 1111-1229.
23. DARVESH, S.; MCDONALD, R. S.; DARVESH K. V.; MATAIJA D.; CONRAD S.; GOMEZ G.; WALSH R.; MARTIN E. Selective reversible inhibition of human butyrylcholinesterase by aryl amide derivatives of phenothiazine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, **15**(19), 6367-6378.
24. IMRAMOVSKÝ, A.; GRUSOVÁ, L.; BENEŠ, L.; PEJCHAL, V.; SEDLÁK, M. Synthesis and characterization of pH-sensitive conjugate of isoniazid - methoxypoly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2012, **22**(18), 5952-5955.
25. PEJCHAL, V.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; PEJCHALOVÁ, M.; KRÁLOVEC, K.; HAVELEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, Z.; AJANI, H.; LO, R.; LEPŠÍK, M. Synthesis, structural characterisation, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2016, **24**(7), 1560-1572.
26. PATOČKA, J.; KUČA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica*. 2004, **47**(4), 215-228.
27. XING, J. Z.; ZHU, L.; JACKSON, J. A.; GABOS, S.; SUN, X. J.; WANG, X. B.; XU, X. Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, **18**, 154.

28. GALGAŇÁKOVÁ, I. *Příprava biologicky aktivních sulfonamidů obsahujících chirální benzthiazolový blok*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
29. ODEHNALOVÁ, H. *Syntéza biologicky aktivních sulfamoylbenzamidů s benzthiazolovým blokem*. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.