

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

**Příprava karbamátů *R*-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)
propan-1-aminu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči enzymům**

Bc. Marta Hylská

Diplomová práce

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Marta Hylská**
Osobní číslo: **C20451**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Příprava karbamátů *R*-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-aminu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči enzymům**
Téma práce anglicky: **Synthesis Of *R*-(1-(6-fluorobenzothiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) Amine Carbamates And Determination Their Inhibition Activities To Enzymes**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracovat poznatky o přípravě karbamátů a jejich aplikacích v medicíně.
2. Zpracovat poznatky o benzthiazolových inhibitech cholinesteráz.
3. Zpracovat poznatky o cholinesterázách a jejich inhibitech, včetně jejich využití v medicíně.

Experimentální část:

1. Vyvinout metodu přípravy karbamátů *R*-(1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)aminu a touto metodou připravit řadu vybraných karbamátů.
2. Připravené sloučeniny charakterizovat dostupnými experimentálními metodami.
3. Spektrofotometricky stanovit aktivitu acetylcholinesterázy a hodnoty IC_{50} připravených karbamátů.
4. Stanovit hodnotu rozdělovacího koeficientu připravených karbamátů v systému n-oktanol/voda.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlášení

Práci s názvem Příprava karbamátů *R*-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-aminu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči enzymům 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 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 1.5.2023

Bc. Marta Hylská v. r.

Poděkování

Mé poděkování patří především vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Vladimíru Pejchalovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a ochotu, jež mi v průběhu zpracování práce věnovali. Chtěla bych také poděkovat svému manželovi, rodině a přátelům za podporu během psaní této diplomové práce i během celého studia.

ANOTACE

Tématem této diplomové práce je Příprava karbamátů *R*-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-aminu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči enzymům. Teoretická část je zaměřena na znalosti inhibitorů cholinesteráz, konkrétně karbamáty a benzthiazoly, jako jsou jejich struktura, syntéza či funkce v organismu. Dále se teoretická část práce věnuje obecnému charakteru cholinesteráz, jejich struktuře a biologické funkci. V další části je poté sepsáno několik obecných znalostí o inhibitorych cholinesteráz, o typech inhibice a jejich principech.

Experimentální část diplomové práce poté zahrnuje 2 části – syntetickou a biologickou. Syntetická část spočívá v přípravě a syntéze celkem 10 karbamátů. Kapitola obsahuje postupy a schémata přípravy výchozí látky i syntéz jednotlivých karbamátů. Dále obsahuje jejich hodnoty z NMR spektrometru spolu s bodem tání. Biologická část se zaměřuje na měření inhibičních vlastností karbamátů vůči cholinesterázám (acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze). Konkrétně se zde stanovuje enzymatická aktivita cholinesteráz, IC_{50} neboli 50% inhibiční koncentrace a kinetické parametry, na jejichž základě lze určit typ inhibice. Na závěr je uvedena kapitola se všemi výsledky společně s diskuzí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karbamáty, benzthiazoly, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, aktivita cholinesteráz, IC_{50} , typ inhibice, rozdělovací koeficient

TITLE

Synthesis of *R*-1-(6-fluorobenzothiazol-2-yl)-3-(methylthio)propylamine carbamates and determination their inhibition activities to enzymes

ANNOTATION

The topic of this thesis is the preparation of *R*-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-amine carbamates and the determination of their inhibitory activities against enzymes. The theoretical part is focused on knowledge of cholinesterase inhibitors, specifically carbamates and benzthiazoles, such as their structure, synthesis and function in the body. Furthermore, the theoretical part of the work is devoted to the general character of cholinesterases, their structure and biological function. In the following part, some general knowledge about cholinesterase inhibitors, types of inhibition and their principles is written out.

The experimental part of the thesis includes two parts – synthetic and biological. The synthetic part consists in the preparation and synthesis of a total of 10 carbamates. The chapter contains procedures and schemes for the preparation of the starting material and the synthesis of individual carbamates. It also contains their values from the NMR spectrometer along with the melting point. The biological part focuses on measuring of inhibitory properties of carbamates against cholinesterases (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase). Specifically, cholinesterase enzymatic activity, IC_{50} or 50% inhibitory concentration and kinetic parameters are determined here, on the basis of which the type of inhibition can be determined. At the end, there is a chapter with all the results together with a discussion.

KEYWORDS

Carbamates, benzthiazoles, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibitors of cholinesterases, activity of cholinesterase, IC_{50} , type of inhibition, partition coefficient

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM SCHÉMAT	13
SEZNAM TABULEK	14
SEZNAM GRAFŮ	15
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	16
ÚVOD	18
TEORETICKÁ ČÁST	19
1 Karbamáty	19
1.1 Charakteristika a struktura	19
1.2 Biologická funkce	20
1.3 Syntéza	21
2 Benzthiazoly	23
2.1 Základní údaje	23
2.2 Struktura a příprava	24
2.3 Využití	27
2.3.1 Antibakteriální účinky	28
2.3.2 Protinádorové účinky	28
2.3.3 Antidiabetické účinky	28
2.4 Inhibitory s benzthiazolovým kruhem	28
2.4.1 Na bázi močoviny	28
2.4.2 Se zabudovanou aminokyselinou	30
2.4.3 Karbamáty	31
3 Cholinesterázy	34
3.1 Charakteristika	34
3.2 Aktivní místo cholinesteráz	34
3.3 Úloha v organismu	35

3.4	Acetylcholin	36
3.5	Acetylcholinesteráza	38
3.6	Butyrylcholinesteráza	39
4	Inhibitory cholinesteráz	41
4.1	Dělení inhibitorů cholinesteráz dle kinetického působení	41
4.1.1	Kompetitivní typ inhibice	41
4.1.2	Nekompetitivní typ inhibice	42
4.1.3	Akompetitivní typ inhibice	42
4.1.4	Smíšený typ inhibice	43
4.2	Dělení inhibitorů cholinesteráz dle způsobu účinku	43
4.2.1	Reverzibilní inhibitory	43
4.2.2	Ireverzibilní inhibitory	44
4.2.3	Pseudoreverzibilní inhibitory	44
4.3	Klinické využití cholinesterázových inhibitorů	44
4.3.1	Donepezil	45
4.3.2	Galantamin	46
4.3.3	Rivastigmin	46
4.3.4	Takrin	47
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
5	Syntetická (chemická) část	48
5.1	Komerčně dostupná chemická činidla	48
5.2	Charakteristika výchozích sloučenin	50
5.2.1	6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	50
5.3	Syntéza výchozích sloučenin	51
5.3.1	Syntéza 2-amino-5-fluorfenylthiolátu draselného	51
5.3.2	Syntéza (<i>R</i>)-4-(2-(methylthio)ethyl)oxazolidine-2,5-dionu	52

5.3.3	(1 <i>R</i>)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochloridu	53
5.4	Syntéza karbamátů	54
5.4.1	Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát.....	54
5.4.2	Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	55
5.4.3	Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	56
5.4.4	Isobutyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	57
5.4.5	2-chlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát.	58
5.4.6	2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	59
5.4.7	2,2,2-trifluorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	60
5.4.8	Benzyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát.....	61
5.4.9	4-chlorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	62
5.4.10	4-fluorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát	63
5.5	Metody charakterizace	64
5.5.1	Bod tání	64
5.5.2	NMR spektroskopie.....	64
5.5.3	Elementární analýza	64
5.6	Charakterizace výchozích látek	65
5.6.1	(1 <i>R</i>)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	65
5.7	Charakterizace připravených karbamátů.....	66
5.7.1	Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát.....	66
5.7.2	Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	67
5.7.3	Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	68
5.7.4	Isobutyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	69
5.7.5	2-chlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát..	70

5.7.6	2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio) propyl) karbamát	71
5.7.7	2,2,2-trifluorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	72
5.7.8	Benzyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát	73
5.7.9	4-Chlorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát	74
5.7.10	4-fluorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát	75
6	Biologická část	76
6.1	Přístroje a pomůcky	76
6.2	Látky, roztoky a chemikálie	76
6.3	Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz	78
6.4	Stanovení IC ₅₀ testovaných karbamátů a standardu	81
6.5	Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice	84
6.6	Stanovení rozdělovacího koeficientu <i>n</i> -oktanol/voda	87
	VÝSLEDKY	89
7	Stanovení enzymové aktivity acetylcholinesterázy	89
8	Stanovení IC ₅₀ testovaných inhibitorů (karbamátů) a standardu rivastigminu	91
9	Stanovení kinetických parametrů neinhibované a inhibované reakce a určení <i>K_i</i> testovaného inhibitoru	94
10	Stanovení rozdělovacího koeficientu	97
	DISKUZE	98
11	Syntetická část	98
11.1	Syntéza (1 <i>R</i>)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl) propan -1-amin hydrochloridu	98
11.2	Syntéza vybraných karbamátů	99
12	Biologická část	100
	ZÁVĚR	102
	POUŽITÁ LITURATURA	103

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Strukturní vzorec karbamátu.....	19
Obrázek č. 2: Strukturní vzorec O-thiokarbamátu (1) a S-thiokarbamátu (2)	20
Obrázek č. 3: Strukturní vzorec benzthiazolu	23
Obrázek č. 4: ¹ H NMR spektrum benzthiazolu	23
Obrázek č. 5: Hmotnostní spektrum benzthiazolu	24
Obrázek č. 6: Strukturní vzorec thioflavinu T (1) a S (2)	27
Obrázek č. 7: Struktura 1-(3-chlor-4-methylfenyl)-3-[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močoviny	29
Obrázek č. 8: Struktura 1-[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočoviny	30
Obrázek č. 9: Struktura ethyl-(<i>S</i>)-1-[(<i>R</i>)-1-(6-fluorbenzo[<i>d</i>]thiazol)ethylkarbamoyl] butylkarbamátu	31
Obrázek č. 10: Isobutyl-(<i>S</i>)-1-[(<i>R</i>)-1-(6-fluorbenzo[<i>d</i>]thiazol)ethylkarbamoyl] butylkarbamát	31
Obrázek č. 11: Ethyl [(1 <i>R</i>)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát.....	33
Obrázek č. 12: 2,2,2-Trichloroethyl [(1 <i>R</i>)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl] karbamát.....	33
Obrázek č. 13: Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy	35
Obrázek č. 14: Strukturní vzorec acetylcholinu	36
Obrázek č. 15: Schéma cholinergního nervového vzruchu.....	37
Obrázek č. 16: Struktura acetylcholinesterázy	38
Obrázek č. 17: Struktura butyrylcholinesterázy	40
Obrázek č. 18: Strukturní vzorec donepezilu	46
Obrázek č. 19: Strukturní vzorec galantaminu	46
Obrázek č. 20: Strukturní vzorec rivastigminu	47
Obrázek č. 21: Strukturní vzorec takrinu	47

SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma č. 1: Syntéza karbamátu reakcí aminu a alkylchlorformiátu	21
Schéma č. 2: Syntéza izokyanátu z aminu a COCl ₂	21
Schéma č. 3: Tvorba karbamátu reakcí alkoholu a izokyanátu	21
Schéma č. 4: Syntéza karbamátu reakcí aminu a oxidu uhličitého	22
Schéma č. 5: Curtiův přesmyk	22
Schéma č. 6: Syntéza benzthiazolu z aldehydů	25
Schéma č. 7: Syntéza benzthiazolu z karboxylových kyselin.....	25
Schéma č. 8: Syntéza benzthiazolů substituovaných aminoskupinou v poloze 2.....	25
Schéma č. 9: Příprava 2-amino-5-fluorothiofenolátu draselného	26
Schéma č. 10: Příprava D-alanin-N-karboxyanhydridu.....	26
Schéma č. 11: Syntéza (<i>R</i>)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin p-toluensulfonátu.....	27
Schéma č. 12: Tvorba benzthiazolových karbamátů na bázi močoviny	29
Schéma č. 13: Tvorba benzthiazolových karbamátů obsahujících aminokyselinu.....	30
Schéma č. 14: Příprava výchozí sloučeniny	32
Schéma č. 15: Tvorba karbamátů.....	32
Schéma č. 16: Přeměna acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou	39
Schéma č. 17: Kompetitivní inhibice.....	42
Schéma č. 18: Nekompetitivní inhibice	42
Schéma č. 19: Akompetitivní inhibice.....	43
Schéma č. 20: Princip Ellmanovy metody	78

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Nejvýznamnější inhibitory cholinesteráz	45
Tabulka č. 2: Přehled stanovovaných karbamátů.....	49
Tabulka č. 3: Příprava fosfátového pufru.....	76
Tabulka č. 4: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení aktivity enzymu	79
Tabulka č. 5: Příprava vzorku obsahující enzym pro stanovení aktivity enzymu.....	79
Tabulka č. 6: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení IC ₅₀	81
Tabulka č. 7: Příprava vzorku bez karbamátu pro stanovení IC ₅₀	82
Tabulka č. 8: Příprava vzorku s karbamátem pro stanovení IC ₅₀	82
Tabulka č. 9: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení typu inhibice	85
Tabulka č. 10: Příprava vzorku bez inhibitoru pro stanovení typu inhibice	85
Tabulka č. 11: Příprava vzorku s karbamátem pro stanovení typu inhibice	86
Tabulka č. 12: Poměry inhibované a neinhibované reakce u daných koncentrací inhibitoru.	92
Tabulka č. 13: Tabulka výsledků IC ₅₀ jednotlivých karbamátů se směrodatnou odchylkou a indexem selektivity	93
Tabulka č. 14: Výsledky logP a tPSA	97

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Stanovení enzymové aktivity ACHE – závislost absorbance na čase.....	89
Graf č. 2: Stanovení IC_{50} – závislost poměrů rychlostí inhibované a neinhibované reakce na koncentraci karbamátu (č. 3)	92
Graf č. 3: Závislost převrácených hodnot rychlosti neinhibované rychlosti a koncentrace BTCH.....	95
Graf č. 4: Závislost převrácených hodnot rychlosti inhibované reakce a koncentrace BTCH.....	96

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACH	Acetylcholin
ACHE	Acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ATCH	Acetylcholin jodid
BCH	Butyrylcholin
BCHE	Butyrylcholinesteráza
BTCH	Butyrylcholin jodid
CAS	Centrální anionické místo
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CNS	Centrální nervový systém
CHAT	Cholinacetyltransferáza
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
DHB	Dihydroxybenzoová kyselina
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová = Ellmanovo činidlo
FA	4-hydroxy-3-metoxyskořicová kyselina
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GIT	Gastrointestinální trakt
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human immunodeficiency viruses)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)

NMR	Nukleární magnetická rezonance
NS	Nervový systém
PAS	Periferní aniontové místo
PBS	Fosfátový pufr
PPM	Díl z milionu (Parts per million)
PSA	Polární povrchová plocha
PTS	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
SI	Index selektivity
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoroctová kyselina
TMS	Tetramethylsilan

ÚVOD

Karbamáty jsou estery odvozené od kyseliny karbamové. Součástí jejich struktury je standardně kyslík, ale mohou obsahovat i síru. V tom případě by se jednalo o thiokarbamáty. Karbamáty jsou současně využívány jako agrochemikálie, plastické hmoty či jako textilní přípravky. Mnoho studií se v posledních letech zabývá využitím karbamátů jako aktivních farmak pro neurodegenerativní onemocnění, hlavně na Alzheimerovu chorobu. Jejich úkol spočívá v inhibici acetylcholinesterázy, a tím i ve zpomalení průběhu nemoci. Karbamáty vykazují mnohem nižší toxicitu než organofosfáty. Navíc na rozdíl od nich působí jako reverzibilní inhibitory, což znamená, že se na enzym neváží natrvalo kovalentní vazbou.

Benzthiazoly jsou aromatické heterobicyklické látky, jež mají ve své struktuře dusík a síru. Dusík je umístěn v poloze 3 a síra v poloze 1. Benzthiazolové deriváty jsou hojně využívané v komerčních produktech, ale jsou také součástí přírody jako například luciferin. Benzthiazoly jsou využívány jako nosiče léčiv či jako barviva (thioflavin). Je prokázáno, že sloučeniny s benzthiazolovým kruhem mají velmi pozitivní účinky na organismus, a to zejména antibakteriální, antidiabetický, protinádorový a další. Jako farmaceuticky aktivní léčiva jsou nejdůležitější právě benzthiazoly substituované v poloze 2.

Cholinesterázy spadají do skupiny serinových hydroláz. Rozlišujeme 2 typy cholinesteráz, a to acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Acetylcholinesteráza je pro organismus velmi důležitá, jelikož jejich hlavní funkce spočívá v hydrolýze acetylcholinu na cholin a acetát, a tím ukončují nervový vzruch. Butyrylcholinesteráza nemá žádnou důležitou roli v organismu na rozdíl od acetylcholinesterázy, plní spíše funkci podpůrnou. Dodnes však nebyla objasněna její přesná funkce v těle.

V současné době je kladen velký důraz na rozvoj metod a tvorbu nových inhibitorů vůči cholinesterázám, které by pomohly v léčbě Alzheimerovy choroby. Úkolem těchto studií je syntéza nových sloučenin jako léčiv, které by byli více účinné a nezpůsobovali by takové nežádoucí účinky, jako je tomu u dnes používaných léků na AD. Přesně to je také cílem této diplomové práce, a to konkrétně vývoj metody syntézy nových inhibitorů (karbamátů) cholinesteráz a stanovení jejich inhibiční účinnosti vůči těmto enzymům.

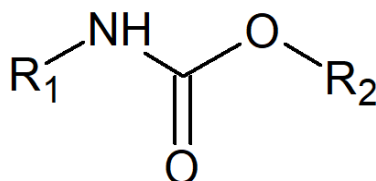
TEORETICKÁ ČÁST

1 Karbamáty

1.1 Charakteristika a struktura

Karbamáty jsou organické sloučeniny mající sumární vzorec CH_2NO_2 . Strukturální vzorec karbamátu je poté znázorněn na obrázku č. 1. Obecně se jedná o estery odvozené od karbamové kyseliny, jejíž sumární vzorec je NH_2COOH . Kyselina karbamová je látkou velmi nestálou, jelikož je značně rychle dekarboxylována na amin a oxid uhličitý. Avšak karbamáty samy o sobě jsou velmi stabilní. Estery karbamové kyseliny jsou též označovány jako uretany. Polymery, obsahující opakující se jednotky karbamátů, se poté označují jako polyuretany. Karbamáty se většinou vyskytují v kapalném nebo krystalickém stavu a tvoří pevné vodíkové můstky mezi vazbami $\text{NH}\dots\text{O}-\text{C}$ a $\text{NH}\dots\text{O}=\text{C}$. Molekulární hmotnost karbamátu je 60,032. Karbamáty ať už cyklické nebo necyklické, mající navázaný vodík na dusíku, jsou řazeny do skupiny velmi slabých N-kyselin. [1-5]

Karbamáty mají typické trojvazné uskupení $-\text{O}-\text{CO}-\text{N}-$, které je planárního charakteru, přičemž vazby $\text{C}-\text{O}$ a $\text{C}-\text{N}$ mají profil částečných dvojných vazeb. Součástí struktury karbamátu může být buď kyslík či síra. V případě, kdy je součástí struktury síra, mluvíme o tzv. thiokarbamátech. Celkem existují dvě izomerní formy thiokarbamátů: (1) O-thiokarbamát se sumárním vzorcem $\text{ROC}(=\text{S})\text{NR}_2$ a (2) S-thiokarbamát se sumárním vzorcem $\text{RSC}(=\text{O})\text{NR}_2$. Strukturální vzorce obou typů thiokarbamátů jsou zobrazeny na obrázku č. 2. Písmena R_1 a R_2 jsou pak většinou organické či alkylové substituenty nebo to může být i vodík. R_2 je obvykle organický substituent nebo se může jednat i o kov. [3] [5]



Obrázek č. 1: Strukturální vzorec karbamátu

farmakologicky aktivní látky. Například derivát karbamátu fysostigmin je používán při léčbě Myastenia gravis, kdy snižuje rychlost hydrolýzy acetylcholinu, čímž zvyšuje jeho hladinu a zlepšuje přenos nervových impulsů. Dalším příkladem je pyridostigmin, který zabraňuje nevratné vazbě organofosfátů na acetylcholinesterázu nebo třeba rivastigmin, který je velmi využíván při léčbě Alzheimerovy choroby. [9-14]

1.3 Syntéza

Karbamáty se nejčastěji syntetizují za pomoci reakce aminu a alkylchlorformiátu. Tato reakce je podrobně i se strukturními vzorci popsána ve schématu č. 1. [1]

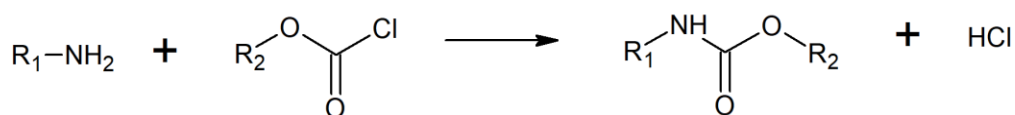


Schéma č. 1: Syntéza karbamátu reakcí aminu a alkylchlorformiátu

Další typ tvorby karbamátu je reakce izokyanátu s alkoholem (viz schéma č. 3). Izokyanát je nejčastěji tvořen reakcí aminu a chloridu karbonylu $COCl_2$ neboli fosgenu. Tato reakce je znázorněna na schématu č. 2., na kterém můžeme též vidět, že v každé dílčí reakci je odštěpena jedna molekula chlorovodíku. [1] [15]

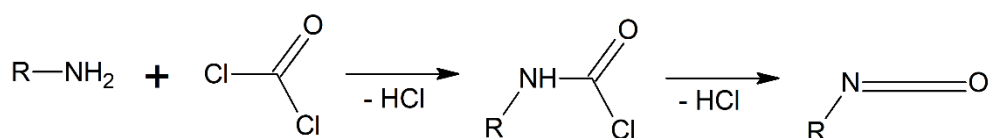


Schéma č. 2: Syntéza izokyanátu z aminu a $COCl_2$

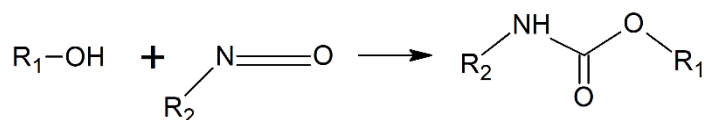


Schéma č. 3: Tvorba karbamátu reakcí alkoholu a izokyanátu

Nejméně významná tvorba karbamátu vychází z reakce aminu a oxidu uhličitého CO_2 . Vzniklý karbamátový aniont spolu s elektrofilem následně reagují za vzniku výsledného

karbamátu. Oxid uhličitý je v této reakci velice cenným a obnovitelným zdrojem, jak z hlediska ekonomiky, tak ekologie. Celá tato reakce je znázorněna na schématu č. 4. [16] [17]

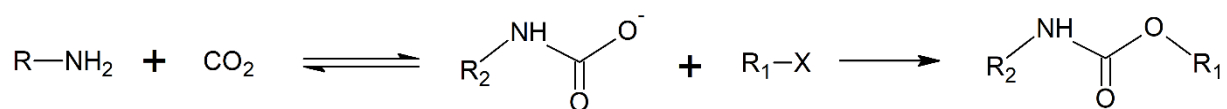


Schéma č. 4: Syntéza karbamátu reakcí aminu a oxidu uhličitého

Karbamáty lze syntetizovat i tzv. Curtiovým přesmykem, což je tepelný rozklad acylazidu. Meziprodukt tohoto rozkladu poté reaguje s alkoholem za vzniku výsledného karbamátu (viz schéma č. 5). [18]

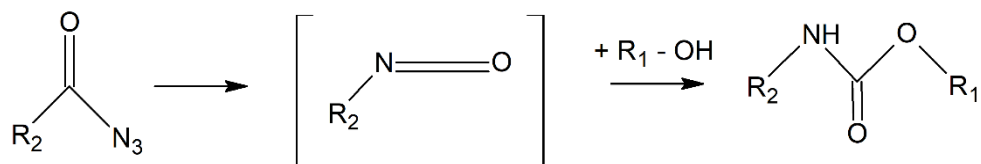
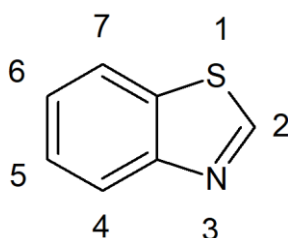


Schéma č. 5: Curtiův přesmyk

2 Benzthiazoly

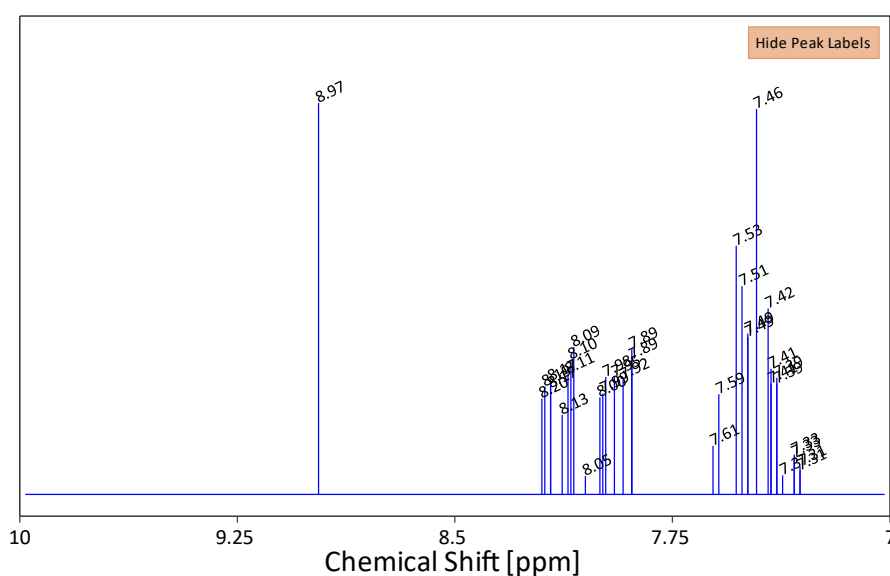
2.1 Základní údaje

Benzthiazol (benzothiazol) je aromatická heterobicyklická látka obsahující ve své struktuře síru v poloze 1 a dusík v poloze 3 (viz obrázek č. 3). Z tohoto hlediska jsou někdy označovány jako 1,3-benzthiazoly. [19] [20]

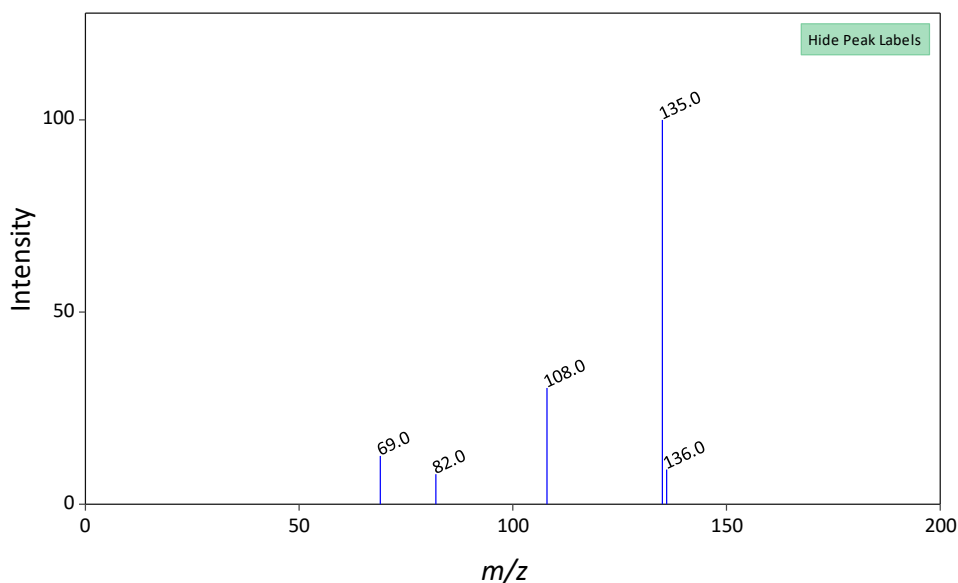


Obrázek č. 3: Strukturální vzorec benzthiazolu

Je to fúzní produkt mezi benzenem a thiazolem. Jedná se o bezbarvou slabě viskózní kapalinu mající chinolinový, gumový zápach. Sumární vzorec benzthiazolu je C_7H_5NS . Molekulární hmotnost této sloučeniny je 135,19. Jedná se o sloučeninu dobře rozpustnou v etheru, acetonu a slabě i ve vodě. Při zahřátí nad bod varu, který je 227–228 °C, se látka rozkládá a vypouští velmi toxické výpary sulfidů. V UV oblasti má benzthiazol maximální absorpci při 250, 284 a 296 nm. Na následujících dvou obrázcích (obrázek č. 4 a 5) můžeme vidět benzthiazol stanovený 1H NMR spektrometrem a za pomoci GC-hmotnostního spektrometru. [21]



Obrázek č. 4: 1H NMR spektrum benzthiazolu [21]



Obrázek č. 5: Hmotnostní spektrum benzthiazolu [21]

Samotné benzthiazoly nejsou používané právě v širokém spektru, ale jejich deriváty ano. Využívají se hojně v komerčních produktech nebo jsou součástí přírody (např. luciferin u světlušek, psidium guajava, produkt *Saccharomyces cerevisiae* a mnoho dalších). Benzthiazol má též svou funkci v rostlinném metabolitu. Je také využíván jako xenobiotikum, ale je to též kontaminant životního prostředí. [22] [23]

2.2 Struktura a příprava

Benzthiazoly jsou složené z pětičlenného 1,3-thiazolového kruhu napojeného na benzenový kruh. Devět atomů bicyklu a na ně připojené substituenty jsou koplanární, což znamená, že leží ve stejné rovině. [24]

Benzthiazoly mohou být připraveny několika způsoby. Jedním z nich je kondenzace 2-aminothiofenolu spolu s aromatickým aldehydem, karboxylovou kyselinou či derivátem karboxylových kyselin. Reakce může probíhat v kyselém nebo zásaditém prostředí. Výstupem této kondenzace je pak tzv. Schiffova báze, ze které pomocí dehydrogenázy a cyklizace vzniká 2-substituovaný benzthiazol. Reakce 2-aminothiofenolu s aldehydem probíhá v prostředí nitrobenzenu. Zároveň je ozářena mikrovlnným zářením zhruba po dobu 8 minut. Výťažky benzthiazolu se u tohoto typu syntézy pohybují v rozmezí 61–78 % dle použitého aldehydu. Schéma této reakce je znázorněno na schématu č. 6. [20] [25] [26]

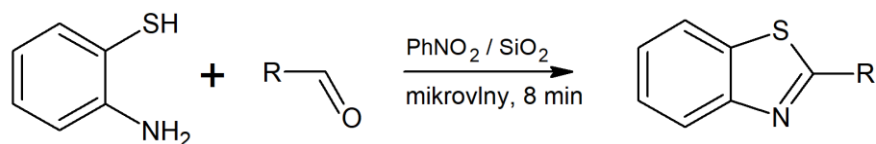


Schéma č. 6: Syntéza benzthiazolu z aldehydů

Další možností přípravy benzthiazolů je příprava z karboxylových kyselin. 2-aminothiofenol spolu se směsí oxidu fosforečného P_2O_5 a metansulfonové kyseliny CH_3SO_3H (v poměru 1:10) reaguje s karboxylovou kyselinou za vzniku právě benzthiazolu. Celá směs je zahřívána na teplotu 70 až 95 °C po dobu asi 10 hodin. Výtěžek této reakce je celkem slušný – například pro ethanovou kyselinu činí 93 %. Schéma (č. 7) této reakce je znázorněno níže. [20] [26] [27]

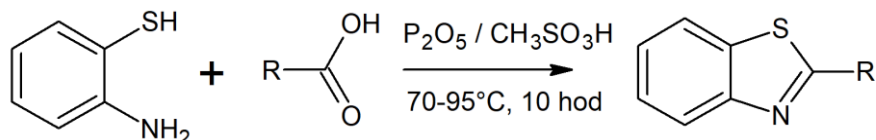


Schéma č. 7: Syntéza benzthiazolu z karboxylových kyselin

Další možností je reakce anilinu s thiokyanatanem a bromu v prostředí ledové kyseliny octové. Tato směs je následně krystalizována za horka a zalkalizována pomocí roztoku amoniaku NH_3 (viz schéma č. 8). Tato reakce se využívá u benzthiazolů, které jsou substituované aminoskupinou v poloze 2. [26] [28] [39]

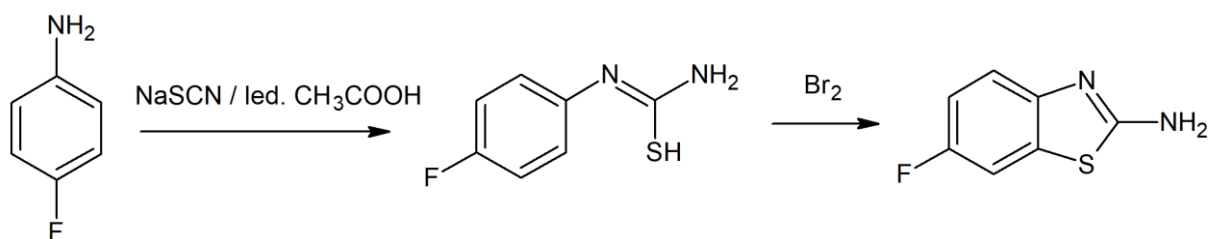


Schéma č. 8: Syntéza benzthiazolů substituovaných aminoskupinou v poloze 2

Z benzthiazolů, které jsou substituované v poloze 2, vychází syntéza chirálních benzthiazolů, která se skládá celkem ze 3 kroků. Prvním krokem je reakce 6-fluoro-1,3-benzthiazol-2-aminu (produktu předchozí reakce) spolu s roztokem hydroxidu draselného

KOH. Produktem této reakce je 2-amino-5-fluorothiofenolát draselný. Celá tato syntéza je znázorněna na schématu č. 9. [26] [29] [39]

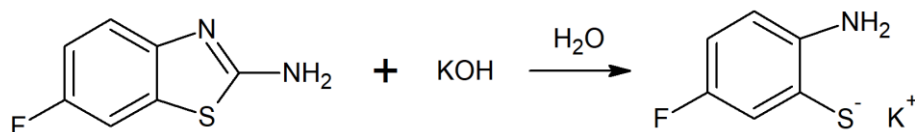


Schéma č. 9: Příprava 2-amino-5-fluorothiofenolátu draselného

Následuje mezikrok, který spočívá v reakci D-alaninu s fosgenem v prostředí tetrahydrofuranu (THF) za vzniku D-alanin-N-karboxyanhydridu. Tento produkt je poté využit v dalším kroku syntézy chirálních benzthiazolů tak, že reaguje s roztokem 2-amino-5-fluorothiofenolátu draselného za vzniku (*R*)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin hydrochloridu (viz schéma č. 10). [26] [29] [30] [39]

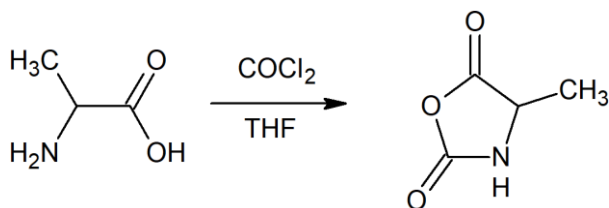


Schéma č. 10: Příprava D-alanin-N-karboxyanhydridu

Třetím a posledním krokem syntézy je reakce předem připraveného hydrochloridu spolu s kyselinou *p*-toluensulfonovou. Výsledkem je (*R*)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin *p*-toluensulfonát, který je následně zfiltrován. Ve finále získáme bílý prášek, který má celkem 81% výtěžnost. Celá reakce je znázorněna na schématu č. 11. [26] [29] [30] [39]

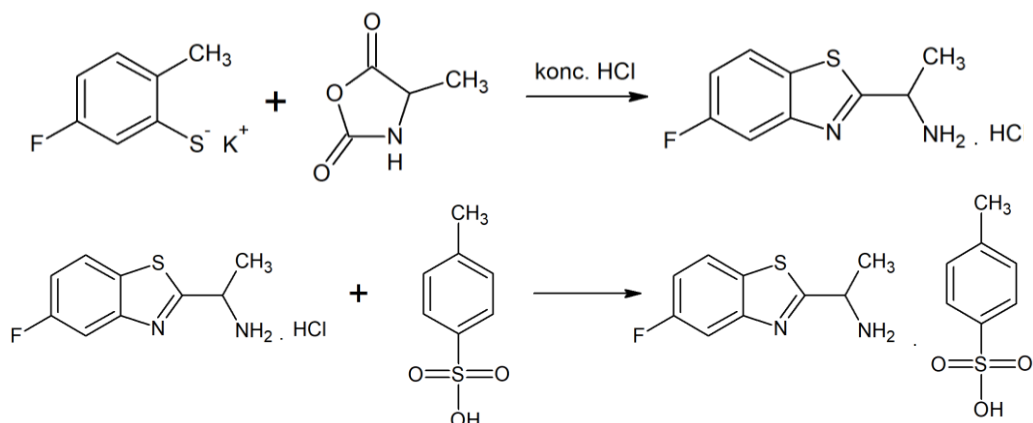
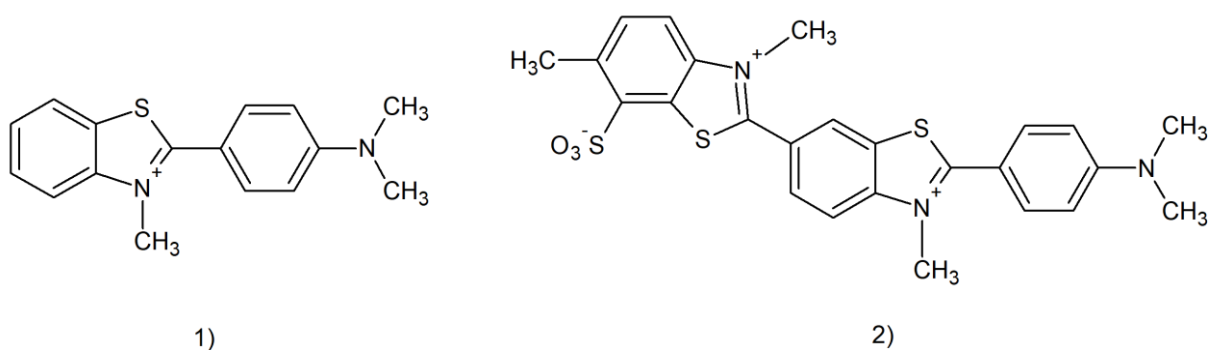


Schéma č. 11: Syntéza (*R*)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin *p*-toluensulfonátu

2.3 Využití

Pro svoji bezpečnost a netoxičnost jsou benzthiazoly hojně používané jako léčiva, respektive jako jejich nosiče (například riluzol a pramipexol). Benzthiazolový blok a na něj navázané substituenty mají totiž vliv na chemické i biologické vlastnosti léčiv, konkrétně na jejich lipofilitu, polaritu či rozpustnost. Benzthiazoly mají mnoho pozitivních účinků jako jsou antibakteriální, protinádorové, antidiabetické, antifungální a mnoho dalších. Většina farmakologicky aktivních benzthiazolů je substituovaná právě na poloze 2. [19] [20] [26]

Dalším odvětvím, ve kterém se benzthiazoly hodně využívají, jsou barviva, jejichž typickým příkladem je třeba thioflavin (viz obrázek č. 6 níže). [31]



Obrázek č. 6: Strukturální vzorec thioflavinu T (1) a S (2)

2.3.1 Antibakteriální účinky

Cílem antibakteriálního a antimykotického výzkumu bylo stanovení sloučenin, které by se využily proti rezistentním bakteriím a houbám. Existuje celá řada derivátů s benzthiazolovým kruhem, které vykazují velmi dobré antibakteriální účinky vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Příkladem takovýchto derivátů jsou například fenylacetoamidy či benzoamidy mající velmi dobré účinky proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* či *Bacillus subtilis*. [30] [32-34] [39]

2.3.2 Protinádorové účinky

Řada benzthiazolových derivátů byla syntetizována a testována se u nich aktivita antiproliferace na buňky HepG2 a MCF-7. Většina těchto sloučenin vykazovala inhibiční účinky na růst buněk. Ve studiích a pokusech bylo zjištěno, že velmi silné protinádorové účinky má například sloučenina 2(3,4-dimetoxy)-5-fluorbenzthiazol. [32] [35] [36] [39]

2.3.3 Antidiabetické účinky

Mezi účinnými léčivy při léčbě diabetu jsou benzthiazolové deriváty N-(6-substituovaných-1,3-benzthiazol-2-yl)benzensulfonamidy. [32] [37]

2.4 Inhibitory s benzthiazolovým kruhem

2.4.1 Na bázi močoviny

V minulosti bylo provedeno mnoho studií s cílem najít vhodné inhibitory s benzthiazolovým kruhem na bázi močoviny, a to pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, hlavně na Alzheimerovu chorobu. Během této studie byla nejprve provedena tvorba chirálních benzthiazolových močoviny, a to pomocí reakce chirálního (*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethanaminu ve formě *p*-toluensulfonové soli (PTS) spolu se substituovanými fenylisokyanáty v prostředí toluenu, jak je zobrazeno na schématu č. 12. [29] [38] [39]

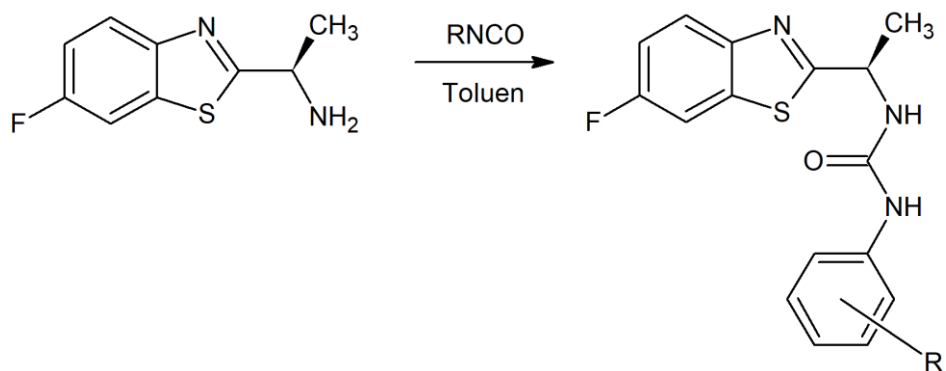
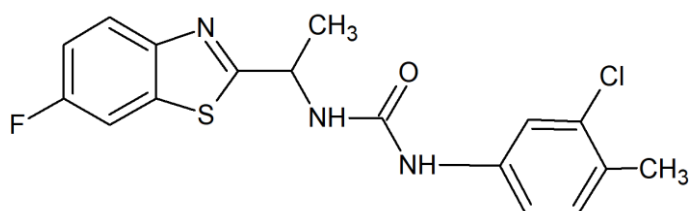


Schéma č. 12: Tvorba benzthiazolových karbamátů na bázi močoviny

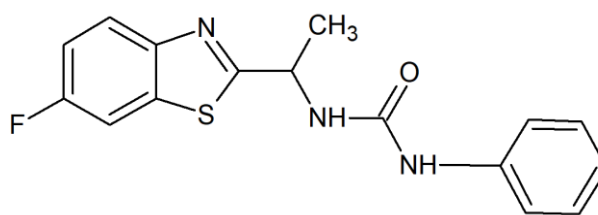
Výtěžek těchto močovinných derivátů se pohyboval mezi 84 až 88 %. U syntetizovaných derivátů močoviny (celkem 10) bylo poté provedeno měření jejich inhibičních účinků na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Měření bylo provedeno spektrofotometricky, a to pomocí Ellmanovy metody (popis viz níže). Míra inhibiční aktivity syntetizovaných inhibitorů byla stanovena pomocí hodnot IC_{50} , kdy hodnoty IC_{50} vůči butyrylcholinesteráze (BCHE) byly nižší než vůči ACHE. To je způsobeno rozlišnou strukturou aktivních míst obou cholinesteráz. BCHE má prostornější aktivní místo, čímž umožňuje vazbu větších molekul. [29] [38] [39]

Nejlepší inhibiční účinky (hodnota IC_{50}) vůči ACHE měla sloučenina 1-(3-chlor-4-methylfenyl)-3-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]močovina, jejíž hodnota IC_{50} byla 15,2 $\mu\text{mol/l}$ a její struktura je znázorněná na obrázku č. 7. Nejlepší hodnota IC_{50} vůči BCHE byla u sloučeniny 1-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočovina a to 3,65 $\mu\text{mol/l}$ (struktura viz obrázek č. 8). [29] [38] [39]



IC_{50} 15,2 $\mu\text{mol/l}$ – ACHE

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



IC₅₀ 3,65 μmol/l – BCHE

Obrázek č. 8: Struktura 1-[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-fenylmočoviny

2.4.2 Se zabudovanou aminokyselinou

Další významnou studií inhibitorů cholinesteráz byla studie, při níž se syntetizovalo cca 23 nových sloučenin na bázi benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou. Syntéza těchto sloučenin byla tvořena 3 kroky. Prvním krokem byla reakce L-norvalinu (L-valinu) ve formě sodné soli s danými alkylchlorformiáty, jejímž produktem byl vznik karbamátů sodných solí obou aminokyselin. V druhém kroku tyto karbamáty reagovaly spolu s isobutylchlorformiátem, a to za vzniku isobutylacylkarbonátu (meziprodukt). Posledním krokem byla reakce právě isobutylacylkarbonátu s (*R*)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)aminem, ve formě PTS soli, za vzniku finálních produktů. Tato třístupňová syntéza je účinná u řady aminokyselin i chlorformiátů. Schéma celé syntézy je znázorněna na schématu č. 13. [26] [38] [40] [48]

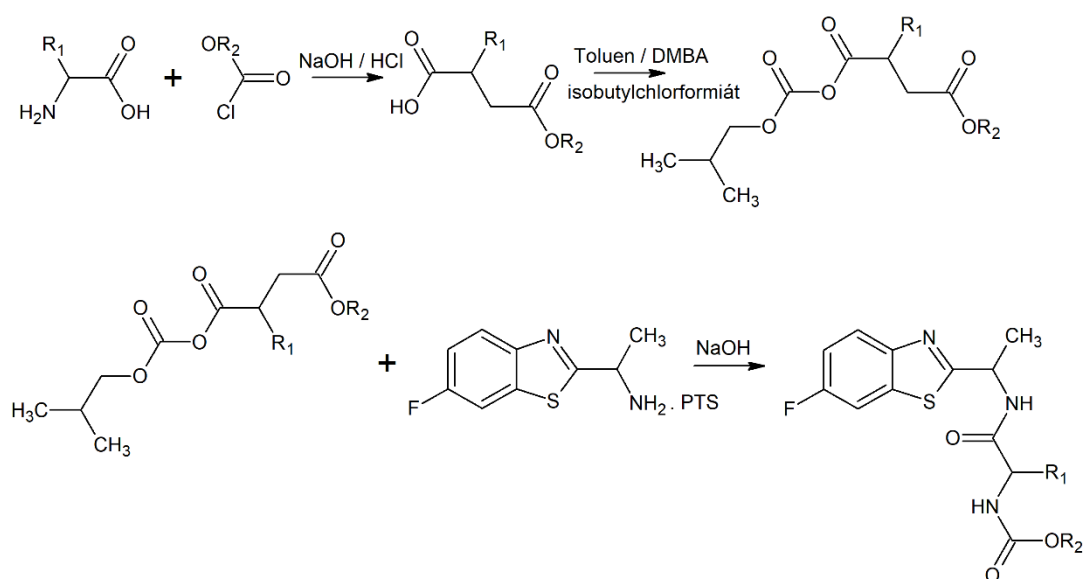
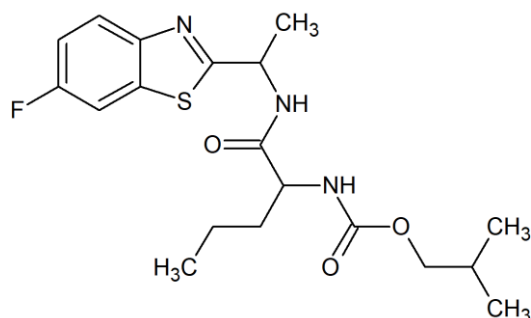


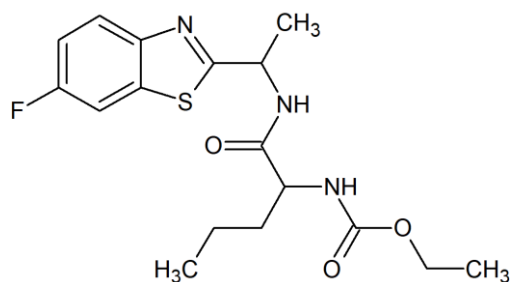
Schéma č. 13: Tvorba benzthiazolových karbamátů obsahujících aminokyselinu

Následně byla opět stanovena hodnota IC_{50} vůči cholinesterázám (ACHE i BCHE) a tyto hodnoty byly poté porovnány se standardními inhibitory (rivastigmin a galantamin). Nejlepší IC_{50} o hodnotě 20,22 $\mu\text{mol/l}$ vůči ACHE byla stanovena u sloučeniny zobrazené na obrázku č. 9 a IC_{50} vůči BCHE byla nejlepší u sloučeniny na obrázku č. 10 (o hodnotě 14,10 $\mu\text{mol/l}$). [38] [40] [48]



IC_{50} 20,22 $\mu\text{mol/l}$ – ACHE

Obrázek č. 9: Struktura ethyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol)ethylkarbamoyl]butylkarbamátu



IC_{50} 14,10 $\mu\text{mol/l}$ – BCHE

Obrázek č. 10: Isobutyl-(S)-1-[(R)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol)ethylkarbamoyl]butylkarbamát

2.4.3 Karbamáty

V roce 2016 vyšla další studie, při níž bylo syntetizováno 16 nových derivátů (*R*)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol-2-yl)ethanaminu jako inhibitorů cholinesteráz (ACHE, BCHE). Tyto sloučeniny byly doloženy pomocí infračervené spektrometrie, NMR spektrometrie a hmotnostní spektrometrie. Jejich čistota byla poté ověřena pomocí elementární analýzy. [39] [41] [48]

U nově syntetizovaných inhibitorů byla následně stanovena inhibiční aktivita vůči enzymům ACHE a BCHE. Výsledky studie byly velmi pozitivní, jelikož inhibiční aktivita těchto karbamátů byla vyšší než aktivita standardního inhibitoru rivastigminu. Studie také prokázala, že vztah mezi strukturou a aktivitou mají jistý význam ve vazbě inhibitoru. Z toho vyplývá, že sloučeniny, které obsahovaly halogenové substituenty, měly slabší inhibiční aktivitu, než je tomu u standardu – rivastigminu, jelikož se vázaly v místě PAS, tedy periferně. Na druhou stranu sloučeniny s lineárním alifatickým řetězcem měly inhibiční aktivitu oproti rivastigminu mnohonásobně silnější, protože se vázaly na enzym v místě CAS, které se nachází ve středu enzymu. [39] [41]

Jako výchozí sloučenina byl zde použit (*R*)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol-2-yl)ethanamin. Ten byl připraven jako *p*-toluensulfonátová sůl (viz schéma č. 14). Samotná syntéza substituovaných 6-fluorbenzo[d]thiazolkarbamátů byla provedena podle schématu č. 15. Sloučeniny byly syntetizovány v prostředí toluenu, kdy se (*R*)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol-2-yl)ethanamin uvolnil z PTS a následně reagoval s alkylchlorformiátem za vzniku požadovaných karbamátů. Reakce proběhla v reakční směsi vodného roztoku NaOH. Výtěžky jednotlivých karbamátů byly ochlazeny roztokem toluenu a tím byly vysráženy. Výsledné výtěžky nově syntetizovaných inhibitorů se pohybovaly kolem 80-90 %. [39] [41] [48]

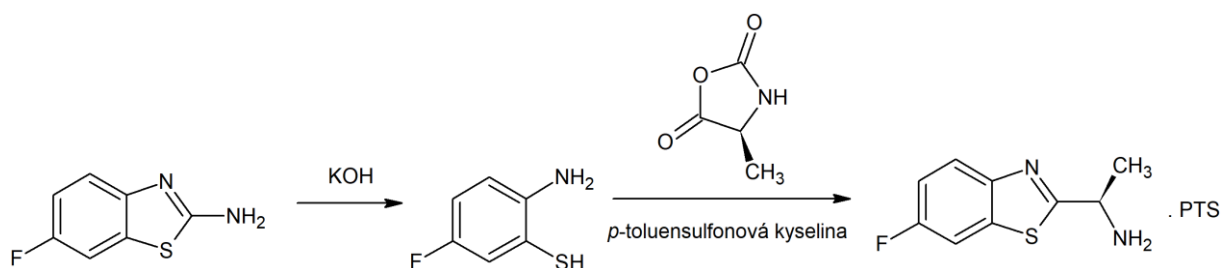


Schéma č. 14: Příprava výchozí sloučeniny

(*R*)-1-(6-fluorbenzo[d]thiazol-2-yl)ethanaminu

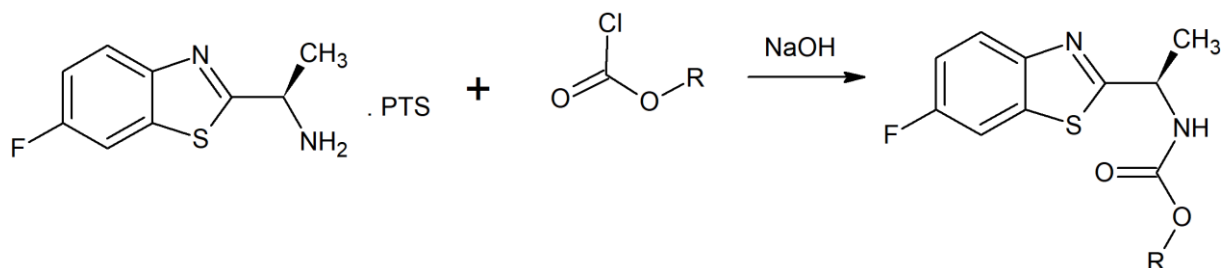
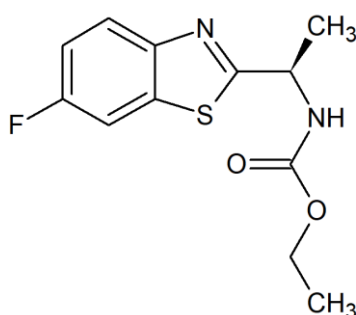


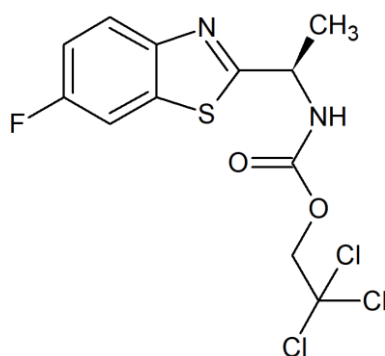
Schéma č. 15: Tvorba karbamátů

Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze vykazovaly karbamáty ethyl[(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát ($IC_{50}=6,06 \mu\text{mol/l}$) viz obrázek č. 11, 2-chloro-2,2-difluoroethyl [(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát ($IC_{50}=8,14 \mu\text{mol/l}$), a 2,2,3,3-tetrafluoropropyl [(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát ($IC_{50}=6,75 \mu\text{mol/l}$). U inhibice BCHE byly výsledky zhruba srovnatelné jak u inhibice syntetizovanými karbamáty, tak u inhibice rivastigminem. Pouze jedna sloučenina měla nižší hodnotu IC_{50} , což znamená vyšší účinnost inhibice než rivastigmin. Byla to sloučenina 2,2,2-trichloroethyl [(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát ($IC_{50}=8,31 \mu\text{mol/l}$). Jeho strukturní vzorec zobrazen na obrázku č. 12. [39] [41] [61]



$IC_{50}=6,06 \mu\text{mol/l}$ – ACHE

Obrázek č. 11: Ethyl [(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát



$IC_{50}=8,31 \mu\text{mol/l}$ – BCHE

Obrázek č. 12: 2,2,2-Trichloroethyl [(1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]karbamát

Ze všech výsledků studie je tedy patrné, že tyto nově syntetizované karbamáty mají slibný potenciál a mohly by být použity v praxi pro tvorbu léčiv na Alzheimerovu chorobu. [39] [41]

3 Cholinesterázy

3.1 Charakteristika

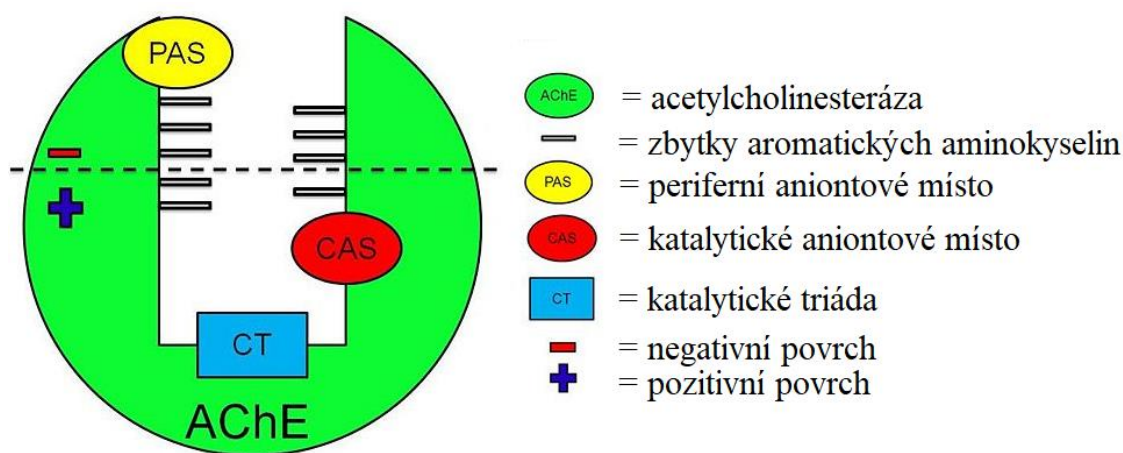
Z pohledu chemického patří cholinesterázy do rodiny serinových hydroláz, které katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu (ACH) či butyrylcholinu (BCH). Cholinesterázy lze tedy rozdělit na dva typy, a to na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu dle toho, který typ hydrolýzy katalyzují. Obě formy se vyskytují u všech živočichů a mají podobné strukturní i katalytické vlastnosti. Liší se však svou buněčnou i mimobuněčnou distribucí a substrátovou specifikou. Aktivita cholinesteráz je inhibována organofosfáty a karbamáty. Acetylcholinesteráza je schopná hydrolyzovat pouze acetylcholin na rozdíl od butyrylcholinesterázy, která je schopná hydrolyzovat i butyrylcholin a další látky jako jsou například propionylcholin, sukcinylcholin, aspirin, kokain, heroin, fenylacetát a mnoho dalších. Úlohou cholinesteráz je štěpení neurotransmiteru na cholin a acetát neboli kyselinu octovou (v synaptické štěrbině), čímž ukončují nervový vzruch. Cholinergní neuron se tak vrací z aktivovaného stavu do stádia uvolnění (relaxace). Reakce hydrolýzy je znázorněna na schématu č. 16 (viz níže). Neurotransmitter acetylcholin byl prvně objeven anglickým farmakologem Henrym Hallett Dalem v roce 1914 a v roce 1926 ho německý farmakolog Otto Loewi označil za neurotransmitter. [14] [42-48]

3.2 Aktivní místo cholinesteráz

Aktivní centrum enzymu se nachází v hydrofobní kavitě, kde dochází k rozpadu acetylcholinu (stejně tak jako u butyrylcholinesterázy). Aktivní místo cholinesteráz se skládá z několika částí, jež jsou periferní anionické místo, aromatické hrdlo a samotné katalytické centrum, obsahující esterové a anionické místo. Tyto podjednotky odpovídají katalytickému mechanismu a znázorňují kapsu pro vazbu cholinu. Celou strukturu aktivního centra cholinesterázy můžeme vidět na obrázku č. 13 (konkrétně enzymu ACHE). [49] [50]

Esterové místo se skládá z aminokyselin serinu, histidinu a glutamové kyseliny (sekvence Ser-His-Glu) a jeho úlohou je samotná hydrolýza esterové vazby acetylcholinu za vzniku acetátu a cholinu. Sekvence aminokyselin Ser-His-Glu neboli katalytická triáda je typická pro všechny cholinesterázy a přispívá k udržení acetylcholinu v aktivním místě enzymu. K rozpoznání a navázání substrátu do aktivního místa enzymu pomáhá karboxylová skupina. Aniontové místo enzymu je nenabitě a lipofilní a je složeno z aminokyselin tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Aniontové místo má za úkol vazbu cholinové části

acetylcholinu, konkrétně kvarterního dusíku na acetylcholinu, a je zodpovědné za jeho správnou orientaci. Oxanionová podjednotka má poté za úkol interakci s atomy kyslíku nacházejících se v acetylcholinu. Kromě těchto podjednotek obsahuje aktivní centrum též jedno nebo více periferních aniontových míst (PAS), které slouží k navázání acetylcholinu působících jako nekompetitivní inhibitory. PAS se nacházejí na povrchu enzymu a skládají se z aminokyselin Tyr70, Tyr121 a Trp279. Na PAS se acetylcholin naváže pomocí svého kvarterního dusíku, avšak do PAS se mohou navázat též jiné substituenty jako jsou například léčiva či toxiny. [49] [51-56]



Obrázek č. 13: Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy [53]

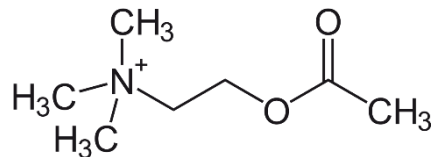
3.3 Úloha v organismu

Jak již bylo řečeno, acetylcholin se nachází v kulovitých synaptických váčkách. Z těchto váčků se během podráždění neuronu uvolní acetylcholin, a to pomocí exocytózy. Acetylcholin koriguje uvolnění dalších neurotransmiterů. Má například vliv na sekreci glutamátu, dopaminu a glycinu. Acetylcholin jako neurotransmiter má vliv na dva druhy receptorů na membráně, a to nikotinový a muskarinový receptor. Nikotinový receptor má za úkol přenos signálu mezi motorickým nervem a vláknem svalu. Konkrétně je jeho funkcí přenos impulzu mezi nervem a svalem, depolarizace sarkolemy v důsledku otevření kanálů pro sodíkové ionty Na^+ . Muskarinový receptor umožňuje funkce parasympatické části autonomního nervového systému (NS). Jeho úkolem je snížení srdeční frekvence, podpůrná činnost žláz s exo a endo sekrecí a vliv stahu svaloviny. Celkem máme 5 typů muskarinového receptoru, některé z nich mají excitační účinek a některé naopak inhibiční. [56] [57]

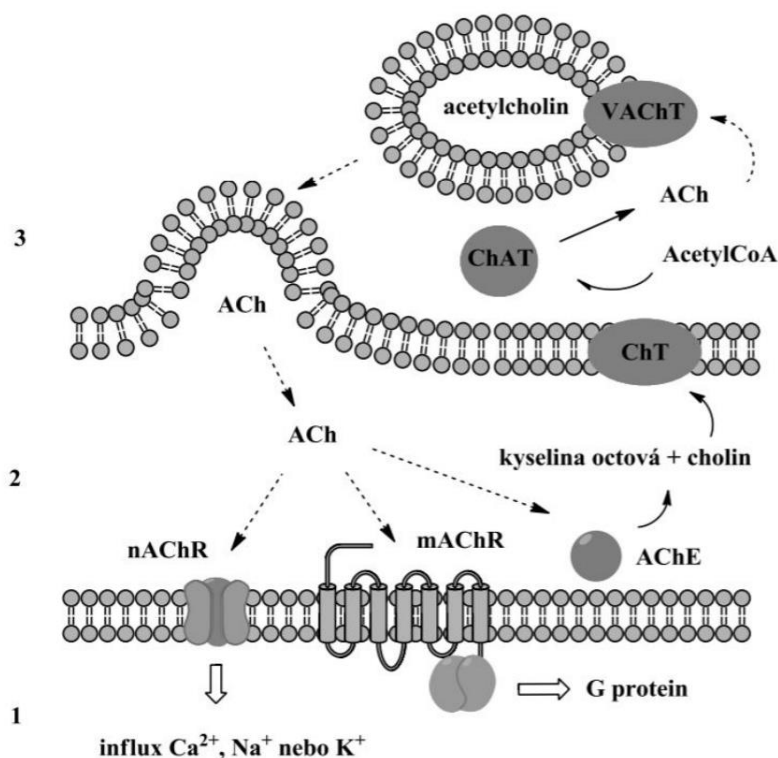
3.4 Acetylcholin

Jak již bylo zmíněno, jedná se o neurotransmitter, který má za úkol přenos nervových vzruchů, a to jak v centrálním nervovém systému (CNS), tak i ve vegetativním nervovém systému a na nervosvalových plotýnkách. Též se tento neurotransmitter účastní na podpoře pozornosti, učení, bdělosti atd. Strukturní vzorec acetylcholinu můžeme vidět na obrázku č. 14. [50] [58]

Acetylcholin vzniká v cytoplazmě neuronů. Ty vychytávají cholin a za pomoci cholinacetyltransferázy (CHAT) a acetyl-CoA z něj vzniká acetylcholin. Acetylcholin je poté skladován ve vezikulech a čeká na uvolnění. Ve vezikulech může být uloženo až 10 tisíc molekul ACH. K uvolnění dochází za pomoci nervové stimulace, která nastane v důsledku zvýšení koncentrace vápenatých iontů a změnou akčního potenciálu. Uvolněním acetylcholinu z vezikul dojde ke spojení s presynaptickou membránou a proniknutí acetylcholinu do štěrbin synapse. V tomto místě se následně váže na postsynaptický receptor. Schéma cholinergního přenosu nervového vzruchu je znázorněno na obrázku č. 15. [50] [58-61]



Obrázek č. 14: Strukturní vzorec acetylcholinu



Obrázek č. 15: Schéma cholinergního nervového vzruchu [62]

Jak již bylo řečeno, acetylcholin se může vázat celkem na dva typy receptorů a tím ovlivnit cílovou buňku. Tyto dva typy receptorů jsou: muskarinový cholinergní receptor nebo nikotinový receptor. [59] [61]

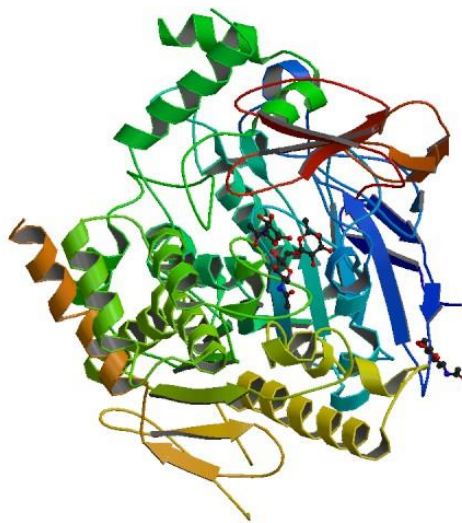
Muskarinový cholinergní receptor se skládá z glykoproteinového řetězce, jež 7× prochází membránou. Na jednom konci receptoru je spojený s G-proteinem a na druhém konci (N-konci) je navázaná signální molekula. Tento receptor můžeme rozdělit na několik podtypů (M₁ až M₅), jež mají různou stavbu. Celkově jich existuje 5, ale ne všechny mají jasnou funkci. Podtypy M₁, M₂, M₃ nalezneme v mozku, kde mají svou úlohu v ukládání paměti, vnímání bolesti či v učení. Muskurinový receptor je metabotropní typ receptoru, což znamená, že musí dojít nejprve k chemické reakci, aby se kanál receptoru otevřel. To má za následek delší dobu latence, ale též delší dobu účinku. [59] [61] [63]

Můžeme říct, že nikotinové receptory jsou takovými ionotropními kationtovými kanály. Jedná se o glykoproteiny složené z 5 podjednotek. Rozeznáváme 2 typy nikotinových receptorů – muskulární (přítomné na nervosvalových ploténkách) a neuronální (přítomné na postsynaptické membráně a ve vegetativních gangliích). [61] [63]

3.5 Acetylcholinesteráza

Z výše uvedených informací víme, že acetylcholinesteráza patří mezi serinové hydrolázy, které se nachází převážně na neuromuskulárních spojeních a cholinergních mozkových synapsích. Jak již bylo řečeno, hlavní biologickou funkcí acetylcholinesterázy je ukončení přenosu vzruchu na cholinergních synapsích, a to pomocí hydrolýzy neurotransmiteru acetylcholinu na dva produkty: acetát a cholin. ACHE má velmi vysokou katalytickou aktivitu a je velmi specifická pro serinovou hydrolázu. Hydrolýza acetylcholinu je velmi rychlá. Jedna molekula acetylcholinesterázy je totiž schopna degradovat zhruba 25 tisíc molekul acetylcholinu za 1 sekundu. [48] [61] [64-67]

Molekula acetylcholinesterázy je elipsoidního tvaru. Monomer enzymu je alfa/beta protein, který obsahuje dvanáctivláknový centrální beta list obklopený 14 alfa šroubovicemi. Alfa řetězec je nositelem aktivního místa enzymu, které se nachází na globulární katalytické podjednotce. Typickým rysem struktury tohoto enzymu je hluboká a úzká rokle, pronikající do poloviny enzymu. 3D struktura acetylcholinesterázy je znázorněná na obrázku č. 16. [52] [68] [69]



Obrázek č. 16: Struktura acetylcholinesterázy [70]

Acetylcholinesteráza se nachází v nervové, svalové, centrální, periferní tkáni a v motorických, senzorických, cholinergních i necholinergních vláknech. Její aktivita je vyšší u motorických neuronů než u senzorických. ACHE se též nachází na membránách erytrocytů. Strukturně se acetylcholinesteráza vyskytuje ve více formách (G1 monomer, G2 dimer, G4

tetramer). Tyto formy se liší ve svém oligomerním uspořádání a způsobem připojení k buněčnému povrchu. Jejich katalytické vlastnosti jsou ale velmi podobné. U člověka a u všech savců má ACHE vyskytující se v mozku převážně tetramerní strukturu G4. Vyskytují se zde též monomerní formy G1, ale oproti tetramerní struktuře jsou ve velmi nízkém počtu. Acetylcholinesteráza je zodpovědná především za rozklad neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, jak je možné vidět na schématu č. 16. Tato reakce je velmi důležitá pro vrácení cholinergního neuronu zpět do klidového stavu po jeho aktivaci. [52] [68]

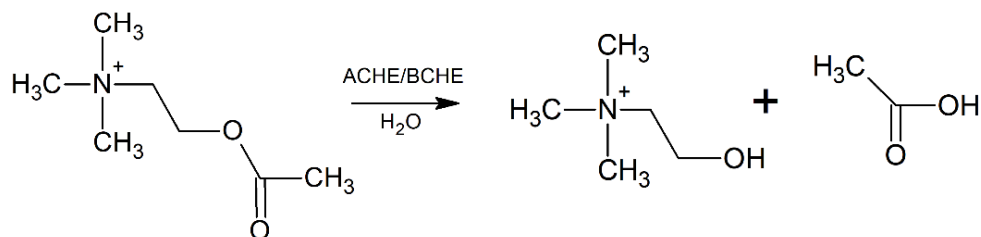
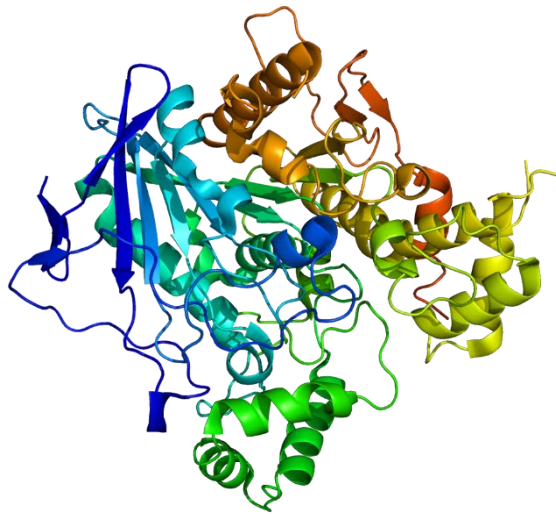


Schéma č. 16: Přeměna acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou

3.6 Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza je známá též jako pseudocholinesteráza či plazmatická cholinesteráza. Tento enzym je tvořen v ribozomech jaterních buněk, odkud je poté vyplaven do krevního řečiště. Proto se jí říká plazmatická cholinesteráza. BCHE se nachází na mnoha místech organismu (převážně játra, poté plazma, gliové buňky centrálního nervového systému atd.). Příkladem, kde se ale butyrylcholinesteráza nevyskytuje, jsou erytrocyty. Butyrylcholinesteráza se skládá ze čtyř totožných podjednotek a každá z těchto podjednotek je tvořena 9 řetězci sacharidů a 574 aminokyselinami. Její struktura je znázorněna na obrázku č. 17. Stejně jako u ACHE je součástí jejího aktivního místa aminokyselina serin. Aktivní místo BCHE obsahuje ale navíc tzv. acylovou kapsu, do níž se zabudovává acylová skupina substrátu. Dále aktivní místo obsahuje ještě aniontové místo tvořené tryptofanem. Butyrylcholinesteráza disponuje v porovnání s ACHE se širším aktivním místem, což jí umožňuje vazbu větších substrátů (např. kokain, organofosfáty, succinylcholin a mnoho dalších). Na rozdíl od ACHE je butyrylcholinesteráza schopná štěpit butyrylcholin, a to rychleji než acetylcholin. V nervovém systému tento enzym nemá žádnou důležitou roli, jako je tomu u acetylcholinesterázy. Zaujímá zde pouze pomocnou funkci. Z velké části její funkce spočívá v regulaci proliferace buněk a v podpůrné funkci při růstu neuritů ve stádiu embrya. Butyrylcholinesteráza je taktéž ukazatel (marker) poškození parenchymu jater. Pokud jsou játra

znatelně poškozená, je její aktivita v séru snížena. Studie však prokázaly, že úplná absence BCHE v organismu by u jedince nezpůsobila žádnou patologii. [13] [51] [71-76]



Obrázek č. 17: Struktura butyrylcholinesterázy [113]

4 Inhibitory cholinesteráz

Mezi inhibitory cholinesteráz můžeme zařadit celou škálu chemických látek, jež jsou schopné inhibovat (blokovat) hydrolytickou aktivitu cholinesteráz. Inhibice právě tohoto enzymu je hlavním úkolem například léků na Alzheimerovu chorobu, řady insekticidů a nervových plynů. Některé inhibitory jsou schopné blokovat pouze acetylcholinesterázu a některé mají schopnost inhibovat i butyrylcholinesterázu. Inhibitory acetylcholinesterázy inhibují tento enzym v rozkladu acetylcholinu. Tím zvyšují úroveň i trvání účinku neurotransmiteru. Inhibitory cholinesteráz jsou dobře snášeny organismem a jsou způsobilé pro přechod přes hematoencefalickou bariéru. To znamená, že působí přímo uvnitř mozku nikoliv na periferní formy ACHE. Nejznámějšími cholinesterázovými inhibitory jsou organofosfáty, karbamáty, fascikulín či fyzostigmin. Hlavní úlohou těchto inhibitorů je reverzibilní či ireverzibilní inhibice ACHE. Acetylcholinesterázové inhibitory se naváží na ACHE, čímž blokují hydrolyzu acetylcholinu a přispívají tak ke zvyšování jeho hladiny ve štěrbině synapse, která je tak potřebná pro nervový přenos. [77-81]

4.1 Dělení inhibitorů cholinesteráz dle kinetického působení

Dle kinetiky inhibovaných reakcí lze rozlišit 4 typy inhibice: kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšenou. [59] [81]

4.1.1 Kompetitivní typ inhibice

Při kompetitivní nebo také soutěživé či konkurenční inhibici je molekula inhibitoru velmi podobná se substrátem a může s ním soutěžit o aktivní vazebné místo na enzymu. Vysoká koncentrace inhibitoru zapříčiní úplné vytěsnění substrátu, a tudíž bude reakce plně blokována. Vysoká koncentrace substrátu naopak způsobí vytěsnění inhibitoru. Soutěž popisuje Guldberg-Waagův zákon a názorné schéma (č. 17) můžeme vidět viz níže. Pokud se na tento typ inhibice podíváme z pohledu parametrů rovnice Michaelis-Mentenové, tak hodnota Michaelisovy konstanty K_m bude klesat a maximální rychlost V_{max} bude na druhou stranu relativně konstantní. [56] [59] [61] [82-85]

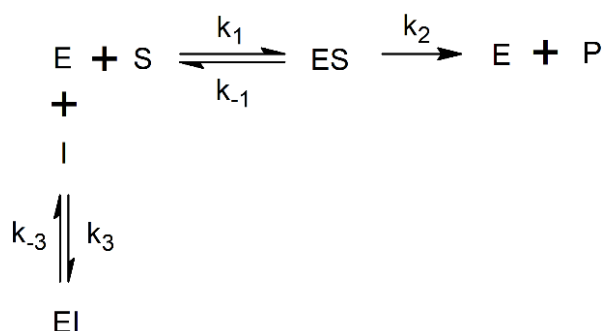


Schéma č. 17: Kompetitivní inhibice

4.1.2 Nekompetitivní typ inhibice

Principem tohoto typu inhibice je tzv. allosterický efekt. Inhibitor se v tomto případě váže mimo aktivní místo enzymu, způsobí tak konformační změny enzymu a tím ho inaktivuje. Nemá tedy vliv na vazbu substrát-enzym. Má však vliv na snížení rychlosti přeměny substrátu, a tím i rychlosti reakce samotné. V tomto případě nelze inhibici zabránit pomocí zvýšení koncentrace substrátu. Nekompetitivní (nesoutěživá, nekonkurenční) inhibice patří mezi nejčastější typ inhibice a jeho schéma (č. 18) je znázorněno níže. U tohoto typu inhibice zůstává Michaelisova konstanta K_m konstantní, ale rychlost V_{max} klesá. [56] [59] [61] [84-86]

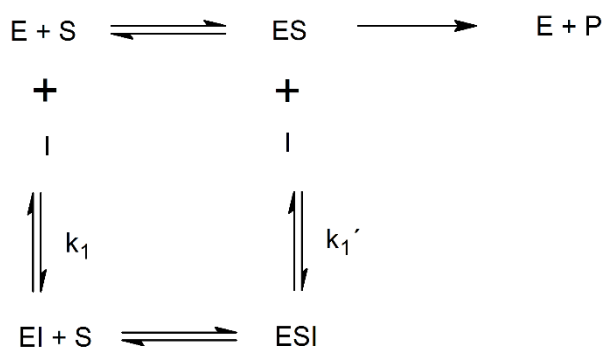


Schéma č. 18: Nekompetitivní inhibice

4.1.3 Akompetitivní typ inhibice

Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže jen na komplex substrát-enzym, ale se samotným enzymem není schopný se navázat. Tento typ inhibice má za cíl znemožnit změnu substrátu na výsledný produkt. Akompetitivní inhibice je znázorněna na schématu č. 19. V tomto případě poměr Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti K_m/V_{max} klesá v konstantních intervalech, zůstává tedy konstantní. [56] [59] [61] [85-87]

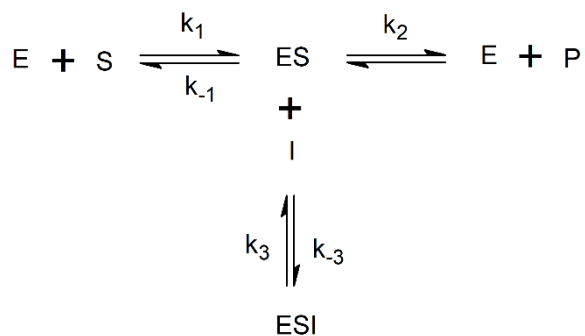


Schéma č. 19: Akompetitivní inhibice

4.1.4 Smíšený typ inhibice

Poslední typem inhibice je inhibice smíšená, při níž dochází k negativnímu vlivu na afinitu enzymu vůči substrátu, což vede ke snížení rychlosti přeměny substrátu na produkt. Vzhledem ke komplikovanosti tohoto typu inhibice zde nebudu uvádět schéma reakce. [59] [86]

4.2 Dělení inhibitorů cholinesteráz dle způsobu účinku

Dle způsobu účinku můžeme inhibitory cholinesteráz rozdělit na 3 hlavní skupiny: reverzibilní, ireverzibilní a pseudoreverzibilní. Reverzibilní inhibitory jsou většinou využity pro terapeutickou aplikaci, kdežto ireverzibilní inhibitory mají toxické účinky na organismus. [80] [87] [88]

4.2.1 Reverzibilní inhibitory

Mezi reverzibilní inhibitory lze zařadit například donepezil či takrin. Tyto inhibitory se váží pomocí slabých nekovalentních vazeb na enzym v blízkosti jeho aktivního centra. Účinky působení těchto inhibitorů jsou okamžité, avšak jejich vazba na enzym není trvalá, trvá pouze několik minut. Po uvolnění inhibitoru se cholinesteráza opět aktivuje. Dle vlivu inhibitorů na Michaelisovu konstantu a na maximální reakční rychlost V_{max} lze tento typ inhibitorů dělit ještě na kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní (vysvětleno viz výše). [80] [87] [89-91]

4.2.2 Ireverzibilní inhibitory

Ireverzibilní inhibitory, někdy též nazývány jako enzymové inaktivátory, jsou skupina organofosfátových sloučenin. Tyto látky způsobují fosforylaci a fosfonylaci serinové OH skupiny v esterovém místě aktivního centra cholinesterázy. Fosforylace patří mezi ireverzibilní děje, což znamená, že ACHE inhibuje natrvalo během několika hodin či dnů. Při tomto typu inhibice se tedy vytváří komplex inhibitor-enzym, který je pevně spojený kovalentní vazbou. Jedná se tedy o děj nevratný. Fosforylovaný enzym je poté defosforylován či dealkylován. Výsledkem defosforylace je spontánní reaktivace enzymu, avšak výsledkem dealkylace je nevratné poškození enzymu. [80] [89-91]

4.2.3 Pseudoreverzibilní inhibitory

Pseudoreverzibilní inhibitory se na enzym váží kovalentní vazbou, nicméně tato vazba se po nějaké době rozbije a enzym je znovu aktivní. Celý tento proces trvá pouze několik hodin. Příkladem pseudoreverzibilního inhibitoru je například rivastigmin nebo další karbamáty. [89]

4.3 Klinické využití cholinesterázových inhibitorů

Inhibitory cholinesteráz jsou v dnešní době čím dál tím více diskutovány a zkoumány, a to zejména pro své uplatnění ve farmakochemickém průmyslu – vývoj léčiv. V poslední době se jejich schopnosti využívá především na léčbu neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Myastenie gravis či jiný typ demence. Pro tyto účely je jich využíváno právě díky schopnosti prodlužovat účinek acetylcholinu, a navíc nejsou nijak toxické pro játra či nervy, nejsou karcinogenní, mutagenní, teratogenní či dráždivé jako některé typy farmak. Jako nejlepší léčiva se zatím osvědčily některé benzthiazoly a piperaziny. Během studií se prokázalo, že pacienti s Alzheimerovou chorobou mají poruchu cholinergní neurotransmise. Tím, že těmto pacientům podáme cholinesterázové inhibitory, docílíme toho, že hladina synaptického ACH stoupne, a tím se zmírní progresse příznaků AD a dojde též ke zlepšení celkového stavu pacienta. Právě díky studiím, je již účinnost inhibitorů cholinesteráz prokázána a je převedena do praxe. [43] [88] [92] [93]

První volbou při léčbě Alzheimerovy choroby je donepezil, galantamin či rivastigmin. Přes jejich zjevnou účinnost, mají stále značné nedostatky, a těmi jsou vedlejší účinky (pocit nevolnosti, průjem, zvracení atd.). Z tohoto důvodu vědci stále zkoumají a hledají látku,

kteřá by byla pro léčbu AD účinná, a zároveň způsobovala co nejméně vedlejších účinků. I přesto, že jsou už nějaké léky na Alzheimerovu chorobu objeveny a prozkoumány, jedná se o léky schopné průběh nemoci pouze zpomalit nikoliv zcela zastavit. [93-96]

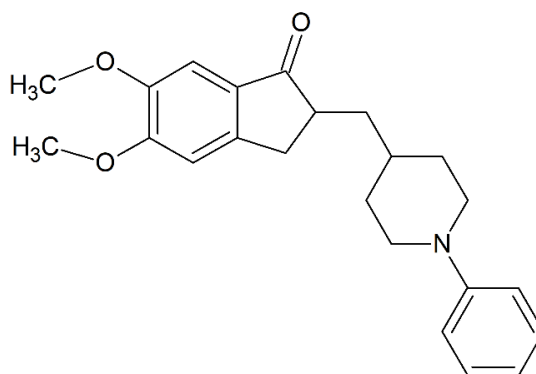
V následující tabulce č. 1 jsou uvedena nejznámější léčiva – inhibitory cholinesteráz, které se v dnešní době nejvíce využívají.

Tabulka č. 1: Nejvýznamnější inhibitory cholinesteráz [39] [45] [80] [87]

Inhibitor	Skupina	Co inhibují	Typ inhibice	Eliminace
DONEPEZIL	piperidin	ACHE	Reverzibilní	játra
GALANTAMIN	alkaloid (terciární)	ACHE	Reverzibilní	játra, ledviny
RIVASTIGMIN	karbamát	ACHE, BCHE	pseudoreverzibilní	ledviny
TAKRIN	akridin	ACHE, BCHE	Reverzibilní	játra

4.3.1 Donepezil

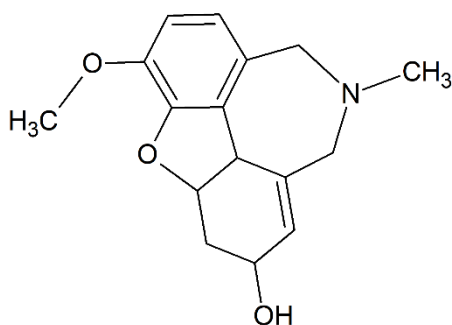
Jak je již z výše uvedené tabulky vidět, jedná se o inhibitor reverzibilní patřící do skupiny piperidinů. Jeho systematický název je 2(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on a jeho strukturní vzorec můžeme vidět na obrázku č. 18. Donepezil je převážně inhibitor acetylcholinesterázy, zanedbatelně však inhibuje též butyrylcholinesterázu. Tento typ inhibitoru, jak již bylo zmíněno, je používán jako jeden z inhibitorů první volby, avšak má nežádoucí účinky na lidský organismus jako je zvracení, pocit nevolnosti či průjem. Na rozdíl od takrinu, ale není toxický vůči játrům. [39] [45] [84] [87] [93] [97-99]



Obrázek č. 18: Strukturní vzorec donepezilu

4.3.2 Galantamin

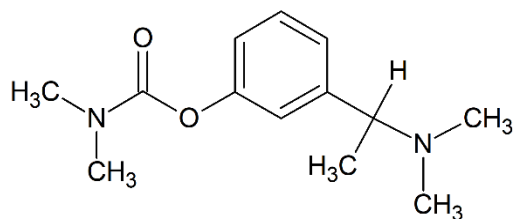
Galantamin neboli systematicky (4a*S*,6*R*,8a*S*)-3-methoxy-11-methyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4a*H*-[1]-benzofuro-[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol, řadíme mezi terciární alkaloidy. Stejně jako u donepezilu se jedná o reverzibilní inhibitor cholinesteráz. V tomto případě ale galantamin plnohodnotně inhibuje jak ACHE, tak BCHE. K acetylcholinesteráze je ale mnohem specifitější, takže je považován převážně za inhibitor ACHE. Studie u galantaminu prokázaly velice pozitivní výsledky a jeho nežádoucí účinky jsou velmi mírné. Jeho strukturní vzorec je zobrazen na obrázku č. 19. [45] [50] [97] [100]



Obrázek č. 19: Strukturní vzorec galantaminu

4.3.3 Rivastigmin

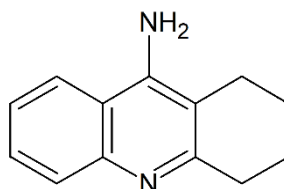
Tento pseudoreverzibilní inhibitor můžeme zařadit do skupiny karbamátů. Systematický název rivastigminu je [3-[(1*S*)-1-(dimethylamino)ethyl]fenyl]-*N*-ethyl-*N*-methylkarbamát a jeho strukturní vzorec je znázorněn na obrázku č. 20. Rivastigmin stejně jako galantamin inhibuje oba typy cholinesteráz (ACHE i BCHE). Mezi jeho nežádoucí účinky můžeme řadit střevní potíže, jako je tomu i u ostatních inhibitorů. [39] [45] [101] [102]



Obrázek č. 20: Strukturální vzorec rivastigminu

4.3.4 Takrin

Tento inhibitor spadá do skupiny akridinů a jedná se o reverzibilní inhibitor cholinesteráz. Systematický vzorec takrinu je 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (struktura viz obrázek č. 21). Tento inhibitor byl objeven již v roce 1945 a jako jeden z prvních byl využit při léčbě Alzheimerovy choroby. Mnoho studií ale prokázalo, že inhibiční účinky takrinu nemají takový vliv jako ostatní léčiva (např. galantamin). Dokonce jisté studie prokázaly, že někteří pacienti s AD na takrin vůbec nereagovali. Na druhou stranu ale vědci zjistili, že inhibitor takrin v podání s lecitinem zlepšuje zdravotní stav pacientů s AD. Značnou nevýhodou takrinu je ale jeho toxicita na játra, proto se od něj ustupuje a využívají se spíše jiné typy inhibitorů. [39] [103-107]



Obrázek č. 21: Strukturální vzorec takrinu

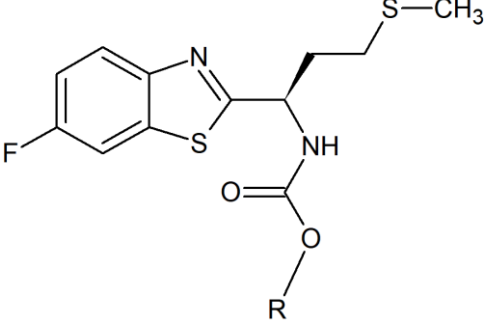
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Syntetická (chemická) část

5.1 Komerčně dostupná chemická činidla

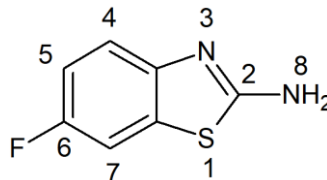
- Butylchlorformiát 98% (Sigma-Aldrich)
- Destilovaná voda
- Ethylchlorformiát 97% (Sigma-Aldrich)
- Fosgen (Sigma-Aldrich)
- D-Methionin 98 % (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid draselný 48% (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný 10% (Sigma-Aldrich)
- Isobutylchlorformiát 98% (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková 36,5% (Sigma-Aldrich)
- Methylchlorformiát 99% (Sigma-Aldrich)
- N-hexan 95% (Sigma-Aldrich)
- isobutylchlorformiát 98% (Sigma-Aldrich)
- Tetrahydrofuran \geq 99% (Sigma-Aldrich)
- Toluen p.a. (Sigma-Aldrich)
- Triethylamin \geq 99% (Sigma-Aldrich)
- 2-chlorethylchlorformiát 97% (Sigma-Aldrich)
- 2,2,2-trichlorethylchlorformiát 98% (Sigma-Aldrich)
- 2,2,2-trifluorethylchlorformiát 98% (Sigma-Aldrich)
- Benzylchloroformiát stabilizovaný pro syntézu (Sigma-Aldrich)
- 4-chlorfenylchloroformiát 98 % (TCI)
- 4-fluorfenylchloroformiát 98 % (Sigma-Aldrich)

Tabulka č. 2: Přehled stanovovaných karbamátů

Karbamát	R	Obecná struktura
1	- CH ₃	
2	- CH ₂ CH ₃	
3	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	
4	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ (iso)	
5	- CH ₂ CH ₂ Cl	
6	- CH ₂ Cl ₃	
7	- CH ₂ F ₃	
8	- CH ₂ C ₆ H ₅	
9	- C ₆ H ₄ Cl	
10	- C ₆ H ₄ F	

5.2 Charakteristika výchozích sloučenin

5.2.1 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin



6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin byl připraven na pracovišti ÚOCHT. Před použitím byla u látky provedena NMR spektrometrie.

Vzhled: Nažloutlá pevná látka

Bod tání: 182–184 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7,67 (1H, dd, ⁴J = 2,6 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,68 (2H, s, NH₂H8); 7,45 (1H, dd, ³J = 8,7 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,6 Hz, H4); 7,23 (1H, dt, ⁴J = 2,4 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5).

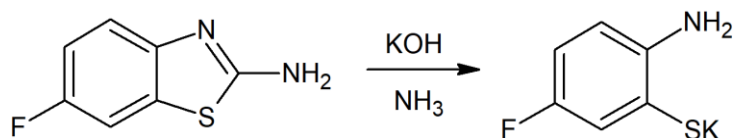
¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 165,3 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 2,2 Hz); 156,4 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 235,3 Hz); 148,8; 131,6 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 117,1 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 8,6 Hz); 113,2 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 23,6 Hz); 107,3 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 26,9 Hz).

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -122,4.

5.3 Syntéza výchozích sloučenin

5.3.1 Syntéza 2-amino-5-fluorfenylthiolátu draselného

Reakční schéma:



Násada:

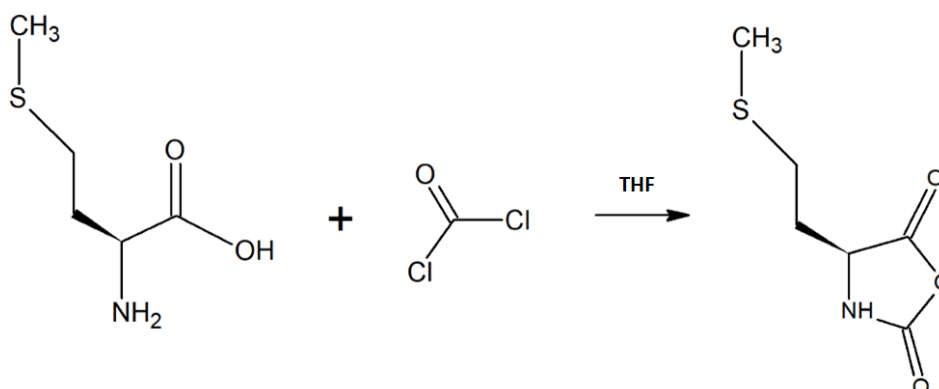
KOH 48%	43,2 g (0,37 mol)
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	12,0 g (0,07135 mol)

Pracovní postup:

Do tříhrdlé zadusíkové baňky o objemu 100 ml bylo předloženo 43,2 g 48% KOH a 12 g 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu. Reakční směs byla v inertní atmosféře 5 hodin refluxována za teploty 110–115 °C. Následně byla směs zchlazena na 50 °C. Po přidání 30 ml toluenu byla směs 30 minut míchána a dalších 30 minut ponechána v klidu. Po oddělení toluenové vrstvy byl produkt ve formě vodného roztoku použit do následující reakce. Tímto postupem bylo připraveno 55 g vodného roztoku K⁺ soli.

5.3.2 Syntéza (*R*)-4-(2-(methylthio)ethyl)oxazolidine-2,5-dionu

Reakční schéma:



Násada:

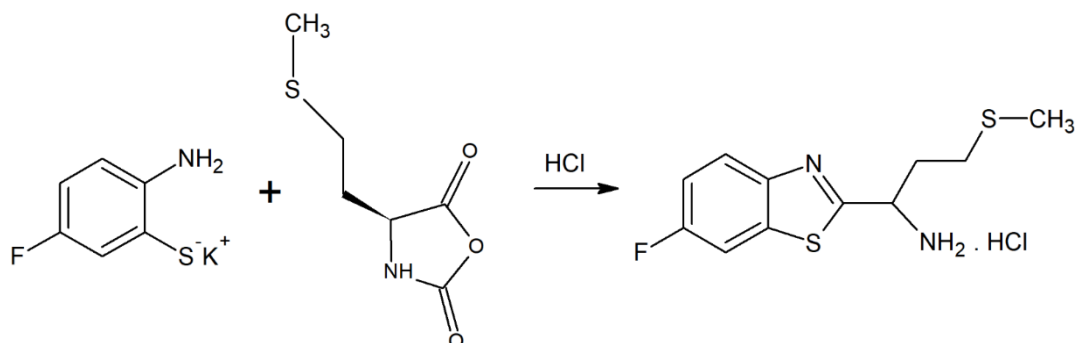
D-Methionin	15 g (0,1 mol)
THF	150 ml
fosgen	30 g (0,3 mol)

Pracovní postup:

Do reaktoru o objemu 0,25 l bylo předloženo 15 g D-methioninu a 150 ml suchého tetrahydrofuranu (THF). Takto připravená směs byla při laboratorní teplotě 10 minut míchána. Následně bylo do reakční směsi postupně nadávkováno 30 g fosgenu a vzniklá suspenze byla postupně vyhřáta na 40°C. Při teplotě 40–42 °C byla směs míchána, dokud se všechen D-methionin nerozpustil. Z reakční směsi bylo poté při teplotě do 40 °C a za sníženého tlaku oddestilováno 130 ml THF. Do destilačního zbytku bylo přidáno 150 ml hexanu. Získaný vykrystalizovaný produkt byl zfiltrován a promyt 20 ml hexanu. Touto reakcí bylo připraveno 15,8 g produktu, což je 90% výtěžek.

5.3.3 (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochloridu

Reakční schéma:



Násada:

konc. HCl	45,5 g
voda	53,0 g
K ⁺ sůl	55,0 g
D-meth-NCA	12,4 g (0,071)
THF	26,0 g

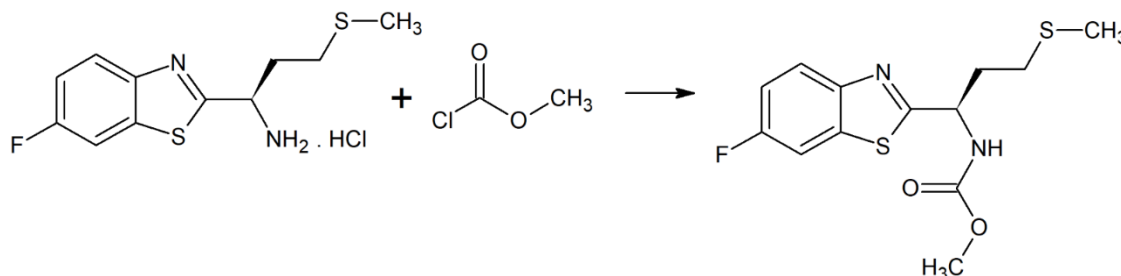
Pracovní postup:

Do reaktoru o objemu 0,5 l bylo předloženo 45,5 g konc. HCl a 53 ml vody. Do ochlazené směsi bylo nadávkováno 55 g vodného roztoku K⁺ soli, aniž by teplota přesáhla 5 °C. Následně bylo do reakční směsi přidáno 26 g THF a 12,4 g D-meth-(NCA). Dále byla reakční směs vyhřáta na teplotu 50 °C a při této teplotě byla míchána 4 hodiny. Po ochlazení na 20 °C byl výsledný produkt zfiltrován a promyt 2x 20 ml toluenu. Produkt byl vysušen na vzduchu. Touto reakcí bylo připraveno 18,3 g. (88% výtěžek).

5.4 Syntéza karbamátů

5.4.1 Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

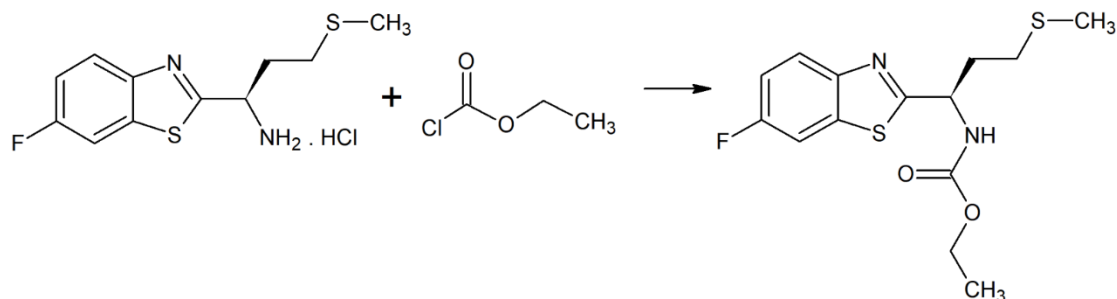
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
Methylchlorformiát	239 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Do baňky o objemu 250 ml bylo předloženo 1 g (3,4 mmol) (1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochloridu a 50 ml toluenu. Následně bylo do reakční směsi přidáno 239 μ l methylchlorformiátu a 20 ml vody. V reakční směsi byla následně přidávkem 10% roztoku NaOH upravena hodnota pH na 12–13. Reakční směs byla dále 24 hodin míchána. Po 24 hodinách byla reakční směs zahřáta na teplotu 80 °C a při této teplotě byla oddělena horní organická vrstva. Po oddělení organické vrstvy a následném ochlazení na teplotu 5–10 °C byl vykrytalizovaný produkt izolován filtrací. Izolovaný produkt byl sušen na vzduchu. Bylo připraveno 0,9 g (84% výtěžek) produktu.

5.4.2 Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

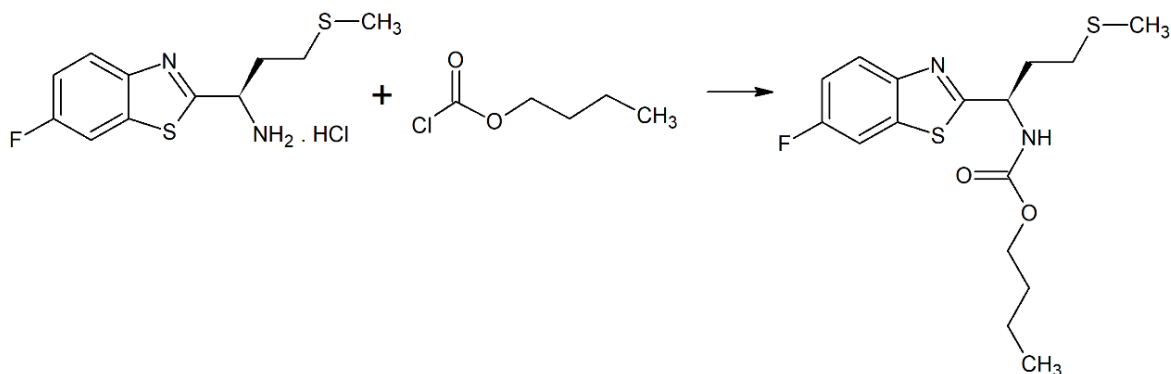
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
Ethylchlorformiát	362 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 0,93 g (83% výtěžek) produktu.

5.4.3 Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

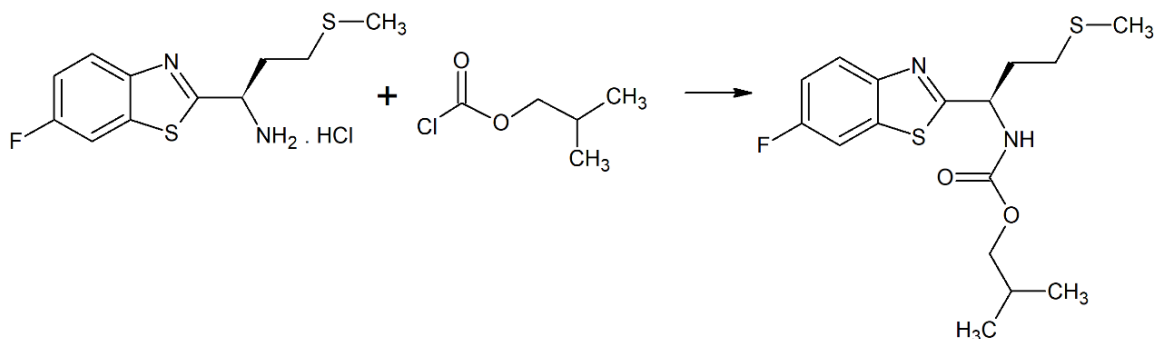
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
Butylchlorformiát	483 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 0,95 g (78% výtěžek) produktu.

5.4.4 Isobutyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

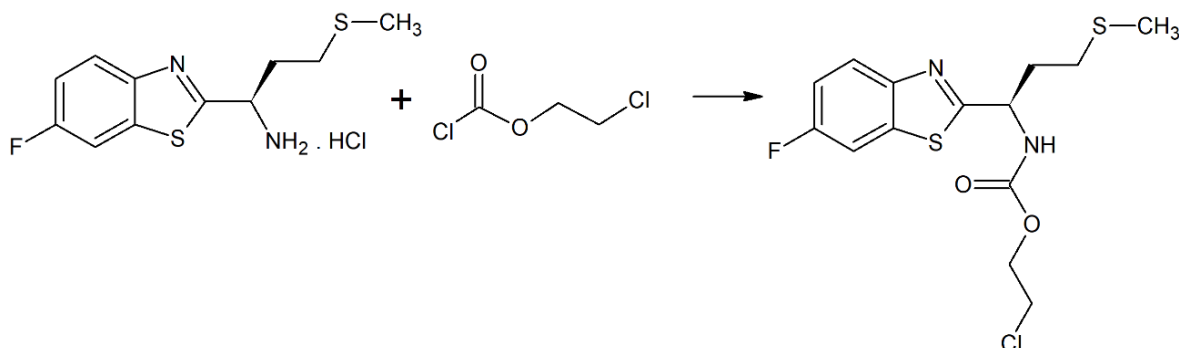
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
Isobutylchlorformiát	492 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 0,87 g (72% výtěžek) produktu.

5.4.5 2-chlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

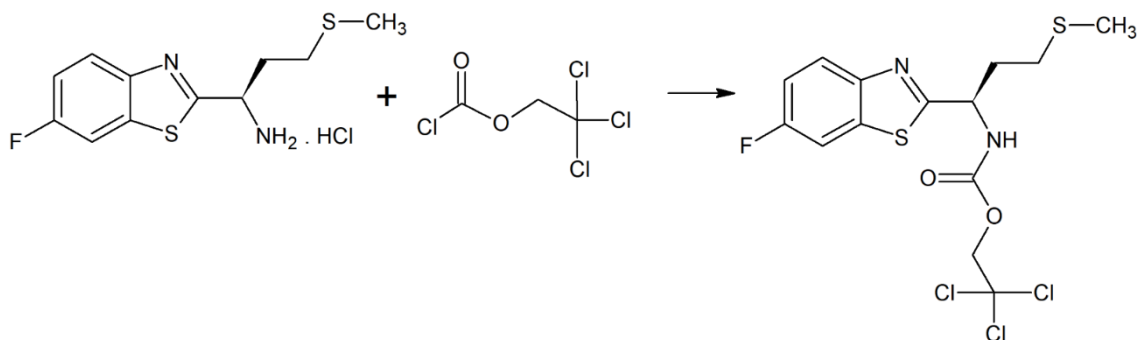
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
2-chlorethyltylchlorformiát	392 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1 g (82% výtěžek) produktu.

5.4.6 2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

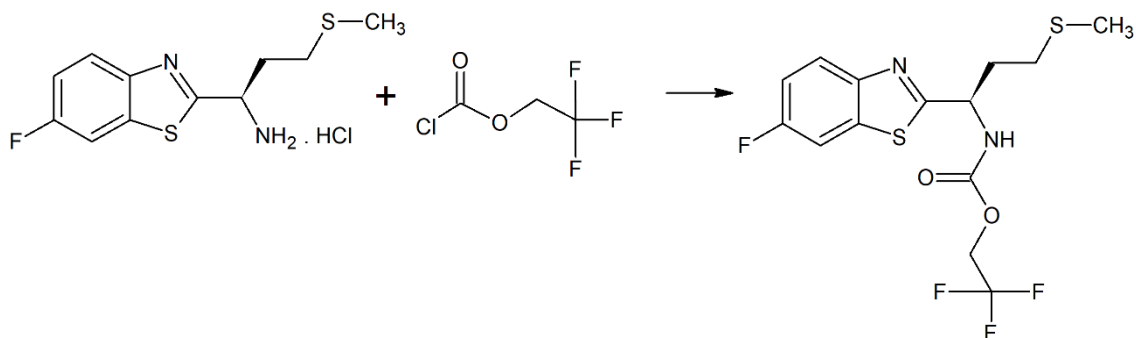
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
2,2,2-trichlorethylchloroformiát	523 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1,2 g (84% výtěžek) produktu.

5.4.7 2,2,2-trifluorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

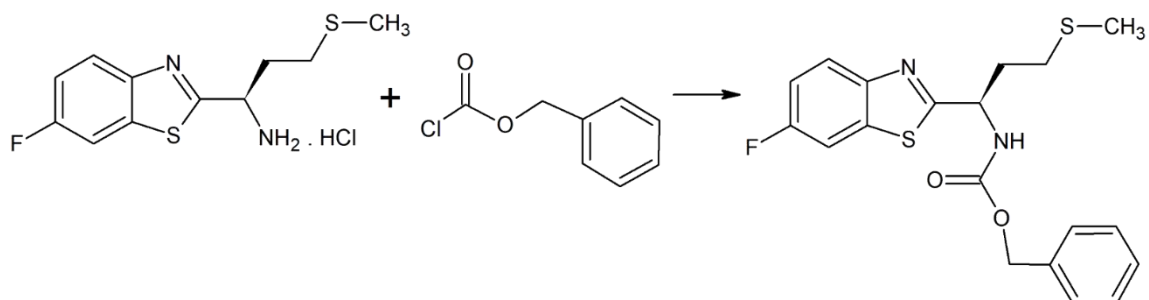
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
2,2,2-trifluorethylchloroformiát	467 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1 g (77% výtěžek) produktu.

5.4.8 Benzyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

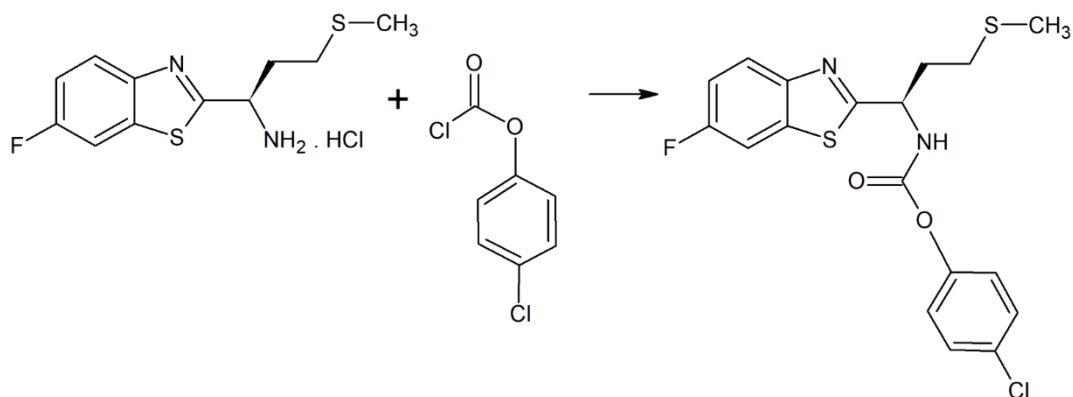
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
Benzylchlorformiát	540 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1,1 g (83% výtěžek) produktu.

5.4.9 4-chlorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

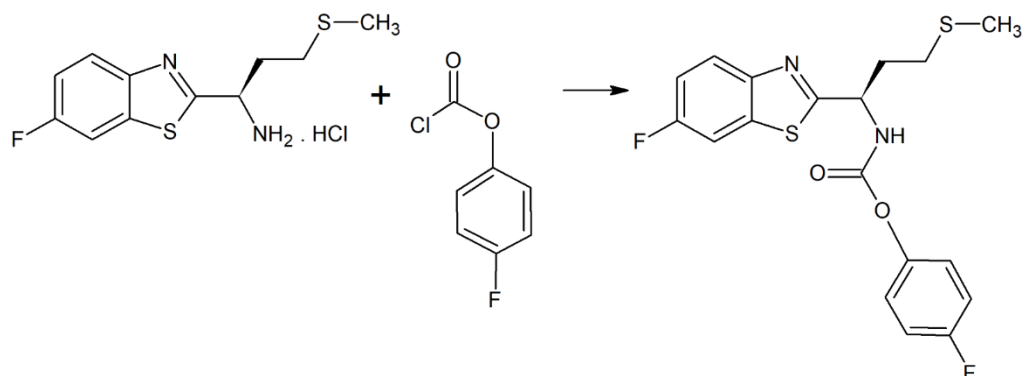
(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
4-chlorfenylchlorformiát	532 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1,1 g (79% výtěžek) produktu.

5.4.10 4-fluorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát

Reakční schéma:



Násada:

(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid	1 g (3,4 mmol)
4-fluorfenylchlorformiát	500 μ l (3,8 mmol)
NaOH	0,3 g (7,5 mmol)
Toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Pracovní postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Bylo připraveno 1 g (74,5% výtěžek) produktu.

5.5 Metody charakterizace

5.5.1 Bod tání

Připravené látky byly charakterizovány bodem tání na bodotávku Büchi Melting Point B-540. Bodotávek disponuje zvětšovací sklem, přes které je možné sledovat celý proces tání, a LCD displejem pro zaznamenání průběhu tání.

5.5.2 NMR spektroskopie

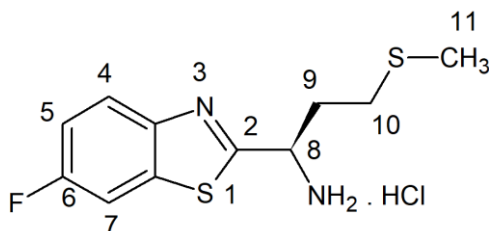
NMR spektra byla změřena pomocí přístroje Bruker Avance 400 MHz s Fourierovou transformací. Veškerá NMR spektra byla měřena v deuteriochloroformu a hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K. Při měření byla aplikována 5 milimetrová širokopásmová laditelná sonda. Při měření ^1H spekter byla použita frekvence 400,13 MHz, pro ^{13}C spektra byla použita frekvence 100,62 MHz a pro ^{19}F spektra byla použita frekvence 376,46 MHz. Hodnoty ^1H a ^{13}C chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ($\delta(^1\text{H}) = 7,25$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 77,0$ ppm (CDCl_3), ($\delta(^1\text{H}) = 2,5$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 39,5$ ppm (DMSO) a přepočteny do δ -stupnice.

5.5.3 Elementární analýza

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

5.6 Charakterizace výchozích látek

5.6.1 (1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 81%

Bod tání: 178–180 °C

$[\alpha]_D^{25} = -15,4$ ($c = 1$, methanol)

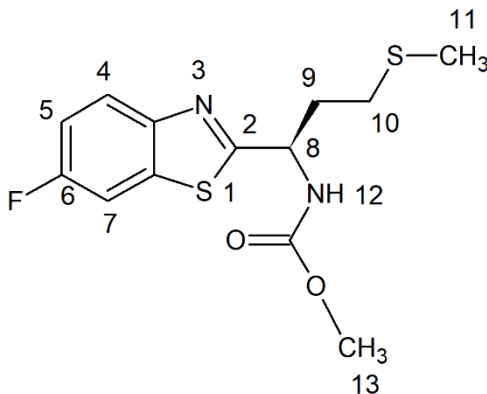
^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6): δ 9,18 (3H, s, NH_3^+); 8,12 (1H, dd, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,7$ Hz, H7); 8,08 (1H, dd, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,45 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 4,94 (1H, t, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 6,8$ Hz, H8); 2,53 (2H, m, H9); 2,34 (2H, m, H10); 2,05 (3H, s, H11).

^{13}C NMR (100.62 MHz, DMSO- d_6): δ 167,1 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 159,9 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 243,7$ Hz); 148,7; 136,2 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 12,2$ Hz); 124,2 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 115,3 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 109,0 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,4$ Hz); 50,9; 32,8; 28,5; 14,3.

^{19}F NMR (376.46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -115,2$.

5.7 Charakterizace připravených karbamátů

5.7.1 Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 84 %

B.t. = 96–97 °C

$[\alpha]_D^{25} = +54,8$ ($c = 1$, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8,21$ (1H, d, $J = 7,9$ Hz, NH-CO); 7,98 (1H, dd, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H7); 7,36 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 5,05 (1H, m, H8); 3,60 (3H, s, H13); 2,59 (2H, m, H10); 2,25 (1H, m, H9); 2,10 (1H, m, H9); 2,07 (3H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 175,5$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 156,6; 149,8; 135,5 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,4$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,3$ Hz); 52,7; 51,8; 33,4; 29,6; 14,6.

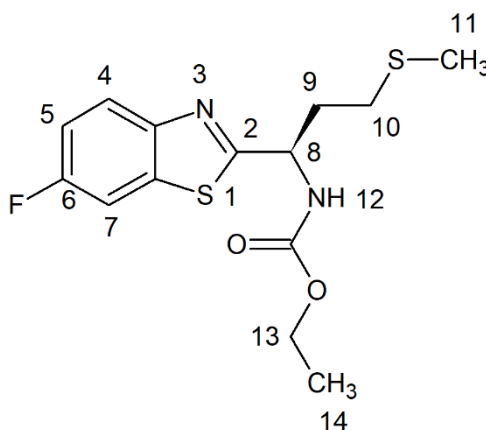
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ($M_r = 314,39$)

Vypočteno: C(49,66 %), H(4,81 %), N(8,91 %), S(20,39 %).

Stanoveno: C(49,94 %), H(4,79 %), N(8,79 %), S(20,58 %).

5.7.2 Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 83 %

B.t. = 87–88 °C

$[\alpha]_D^{25} = +63,2$ (c = 1, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8,18$ (1H, d, $J = 7,9$ Hz, NH-CO); 7,98 (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,8$ Hz, H4); 7,96 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,9$ Hz, H7); 7,36 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 5,05 (1H, m, H8); 4,03 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, H13); 2,59 (2H, m, H10); 2,23 (1H, m, H9); 2,10 (1H, m, H9); 2,07 (3H, s, H11); 1,19 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H13).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 175,8$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,5$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 156,2; 149,8; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,3$ Hz); 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,6$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 60,3; 52,6; 33,4; 29,7; 14,6.

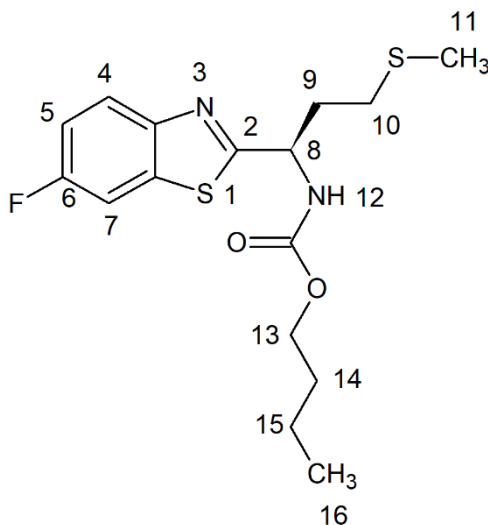
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ($M_r = 328,42$)

Vypočteno: C(51,20 %), H(5,22 %), N(8,53 %), S(19,52 %).

Stanoveno: C(51,44 %), H(5,18 %), N(8,42 %), S(19,20 %)

5.7.3 Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 78 %

B.t. = 61–63 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 68,1$ (c = 1, aceton)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,119$ (1H, d, $J = 7,8$ Hz, NH-CO); 7,98 (2H, m, H4,H7); 7,36 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,5$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 8,9$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,9$ Hz, H5); 5,05 (1H, m, H8); 4,00 (2H, m, H13); 2,59 (2H, m, H10); 2,23 (1H, m, H9); 2,12 (1H, m, H9); 2,07 (3H, s, H11); 1,55 (2H, m, H14); 1,33 (2H, m, H15); 0,89 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, H16).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 175,7$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,4$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 156,3; 149,8; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,5$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 64,0; 52,6; 33,4; 30,7; 29,6; 18,6; 14,6; 13,6.

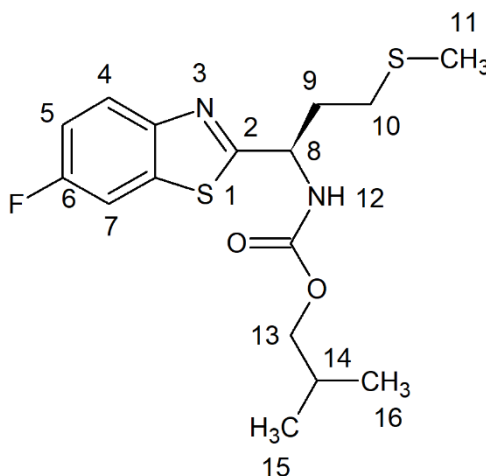
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: C₁₆H₂₁FN₂O₂S₂ (M_r = 356,47)

Vypočteno: C(53,91 %), H(5,94 %), N(7,86 %), S(17,99 %).

Stanoveno: C(53,46 %), H(6,06 %), N(7,47 %), S(18,35 %)

5.7.4 Isobutyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 72 %

B.t. = 65–67 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 66,8$ (c = 1, aceton)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 8,20$ (1H, d, $J = 7,9$ Hz, NH-CO); $7,98$ (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); $7,96$ (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H7); $7,36$ (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); $5,05$ (1H, m, H8); $3,80$ (2H, m, H13); $2,59$ (2H, m, H9); $2,24$ (1H, m, H10); $2,13$ (1H, m, H10); $2,07$ (3H, s, H11); $1,86$ (1H, m, H14); $0,89$ (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H15).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 175,8$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); $159,5$ (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,0$ Hz); $156,3$; $149,8$; $135,6$ (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,5$ Hz); $123,7$ (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); $114,6$ (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); $108,6$ (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,3$ Hz); $70,2$; $52,6$; $33,4$; $29,7$; $27,7$; $18,8$; $14,6$.

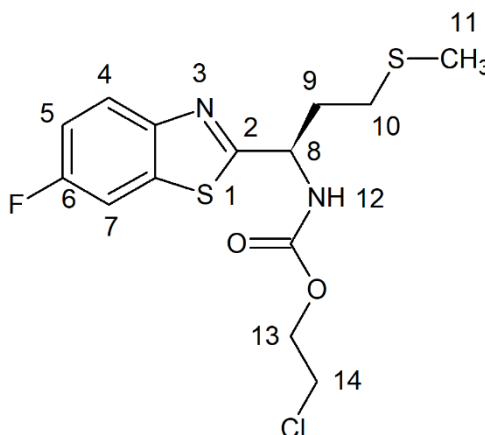
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: C₁₆H₂₁FN₂O₂S₂ (M_r = 328,42)

Vypočteno: C(53,91 %), H(5,94 %), N(7,86 %), S(17,99 %).

Stanoveno: C(54,19 %), H(5,84 %), N(7,75 %), S(17,75 %)

5.7.5 2-chlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 82 %

B.t. = 84–85 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 51,7$ (c = 1, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,42 (1H, d, J = 7,9 Hz, NH-CO); 7,98 (2H, m, H4,H7); 7,36 (1H, dt, 4J (^1H , ^1H) = 2,6 Hz, 3J (^1H , ^1H) = 9,0 Hz, 3J (^{19}F , ^1H) = 9,0 Hz, H5); 5,07 (1H, m, H8); 4,28 (2H, t, 3J (^1H , ^1H) = 5,2 Hz H14); 3,82 (2H, t, 3J (^1H , ^1H) = 5,2 Hz H13); 2,60 (2H, m, H9); 2,26 (1H, m, H10); 2,13 (1H, m, H10); 2,08 (3H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 175,3 (d, 4J (^{19}F , ^{13}C) = 3,0 Hz); 159,5 (d, 1J (^{19}F , ^{13}C) = 242,0 Hz); 155,7; 149,8; 135,6 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 11,5 Hz); 123,7 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 9,8 Hz); 114,6 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C) = 24,8 Hz); 108,5 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C)) = 27,2 Hz); 64,4; 52,7; 43,0; 33,3; 29,6; 14,6.

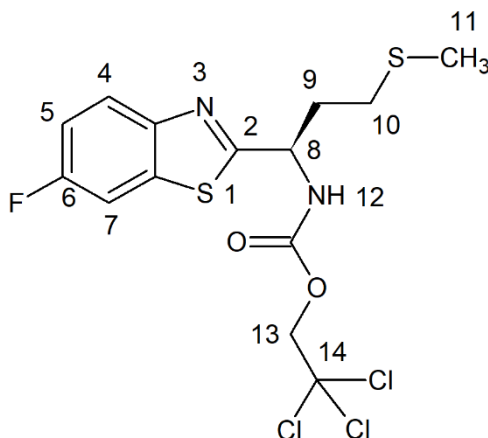
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,5.

Elementární analýza: C₁₄H₁₆ClFN₂O₂S₂ (M_r = 362,86)

Vypočteno: C(46,34 %), H(4,44 %), N(7,72 %), S(17,67 %).

Stanoveno: C(46,58 %), H(4,39 %), N(7,63 %), S(17,35 %)

5.7.6 2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio) propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 84 %

B.t. = 63–65 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 82,8$ (c = 1, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,82 (1H, d, J = 7,9 Hz, NH-CO); 7,99 (2H, m, H4,H7); 7,36 (1H, dt, 4J (^1H , ^1H) = 2,6 Hz, 3J (^1H , ^1H) = 8,9 Hz, 3J (^{19}F , ^1H) = 8,9 Hz, H5); 5,11 (1H, m, H8); 4,91 (2H, d, 2J (^1H , ^1H) = 12,6 Hz, H13); 4,83 (2H, d, 2J (^1H , ^1H) = 12,6 Hz, H13); 2,61 (2H, m, H9); 2,26 (1H, m, H10); 2,17 (1H, m, H10); 2,07 (3H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174,8 (d, 4J (^{19}F , ^{13}C) = 3,3 Hz); 159,5 (d, 1J (^{19}F , ^{13}C) = 242,0 Hz); 154,6; 149,8; 135,6 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 11,6 Hz); 123,7 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 9,7 Hz); 114,7 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C) = 24,7 Hz); 108,6 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C) = 27,0 Hz); 96,1; 52,7; 33,3; 29,6; 14,6.

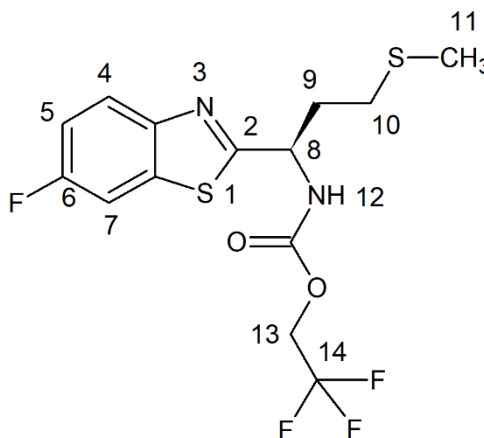
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,5.

Elementární analýza: C₁₄H₁₄Cl₃FN₂O₂S₂ (M_r = 431,75)

Vypočteno: C(38,95 %), H(3,27 %), N(6,49 %), S(14,85 %).

Stanoveno: C(38,69 %), H(3,20 %), N(6,77 %), S(15,03 %)

5.7.7 2,2,2-trifluorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 77 %

B.t. = 96–98 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 80,8$ (c = 1, aceton)

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,75 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, NH-CO); 7,99 (2H, m, H4,H7); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* (H, H) = 2,6 Hz, ³*J* (H, H) = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, H) = 9,0 Hz, H5); 5,10 (1H, m, H8); 4,72 (2H, m, H13); 2,60 (2H, m, H9); 2,26 (1H, m, H10); 2,13 (1H, m, H10); 2,07 (3H, s, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174,5 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,0 Hz); 154,4; 149,6; 135,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 123,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,8 Hz); 123,6 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 279,1 Hz); 114,5 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 108,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C)) = 27,1 Hz); 60,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 34,9 Hz); 52,9; 33,3; 29,5; 14,5.

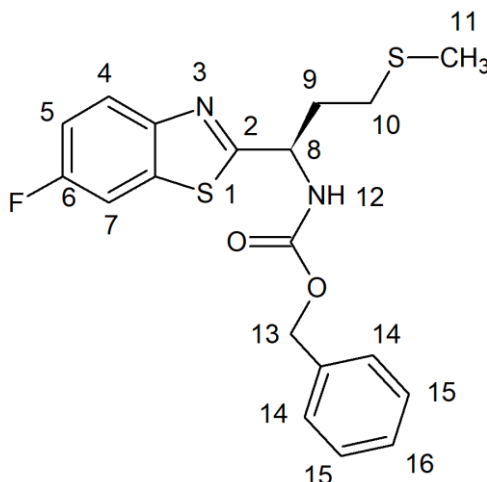
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -116,5.

Elementární analýza: C₁₄H₁₄F₄N₂O₂S₂ (M_r = 382,39)

Vypočteno: C(43,97 %), H(3,69 %), N(7,33 %), S(16,77 %).

Stanoveno: C(44,20 %), H(3,74 %), N(7,15 %), S(16,46 %)

5.7.8 Benzyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 83 %

B.t. = 89–91 °C

$[\alpha]_D^{25} = +77,2$ (c = 1, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8,38$ (1H, d, $J = 7,9$ Hz, NH-CO); 8,00 (2H, m, H4,H7); 7,39 – 7,22 (6H, m, H5, H14, H15, H16); 5,11 (3H, m, H8, H13); 2,67 (2H, m, H9); 2,32 (1H, m, H10); 2,22 (1H, m, H10); 2,10 (3H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,5$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,2$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,0$ Hz); 156,1; 149,8; 136,8; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 128,4; 127,9; 127,7; 123,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,8$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 65,8; 52,8; 33,5; 29,6; 14,6.

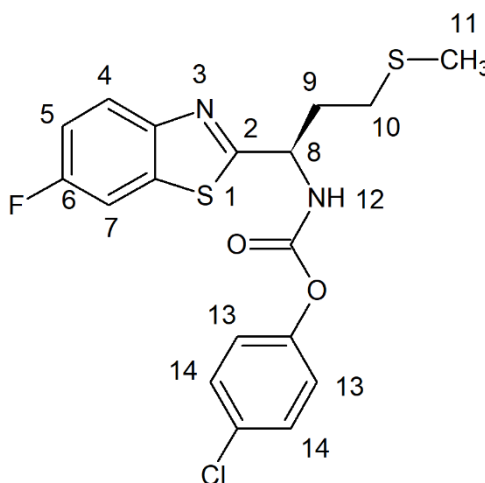
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: C₁₉H₁₉FN₂O₂S₂ (M_r = 390,49)

Vypočteno: C(58,44 %), H(4,90 %), N(7,17 %), S(16,42 %).

Stanoveno: C(58,80 %), H(4,83 %), N(7,09 %), S(16,69 %)

5.7.9 4-Chlorfenyl (1(-6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 79 %

B.t. = 108–110 °C

$[\alpha]_D^{25} = + 76,9$ (c = 1, aceton)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8,91$ (1H, d, $J = 7,8$ Hz, NH-CO); 8,00 (2H, m, H4,H7); 7,45 (2H, d, 3J (^1H , ^1H) = 8,4 Hz, H14); 7,36 (1H, dt, 4J (^1H , ^1H) = 2,6 Hz, 3J (^1H , ^1H) = 8,9 Hz, 3J (^{19}F , ^1H) = 8,9 Hz, H5); 7,19 (2H, d, 3J (^1H , ^1H) = 8,4 Hz, H13); 5,14 (1H, m, H8); 2,67 (2H, m, H9); 2,32 (1H, m, H10); 2,22 (1H, m, H10); 2,10 (3H, s, H11).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 174,4$ (d, 4J (^{19}F , ^{13}C) = 3,0 Hz); 159,5 (d, 1J (^{19}F , ^{13}C) = 242,0 Hz); 154,0; 149,7; 149,6; 135,6 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 11,9 Hz); 129,3; 129,2; 123,8 (d, 3J (^{19}F , ^{13}C) = 9,8 Hz); 123,4; 114,7 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C) = 24,7 Hz); 108,6 (d, 2J (^{19}F , ^{13}C)) = 27,0 Hz); 52,9; 33,3; 29,6; 14,6.

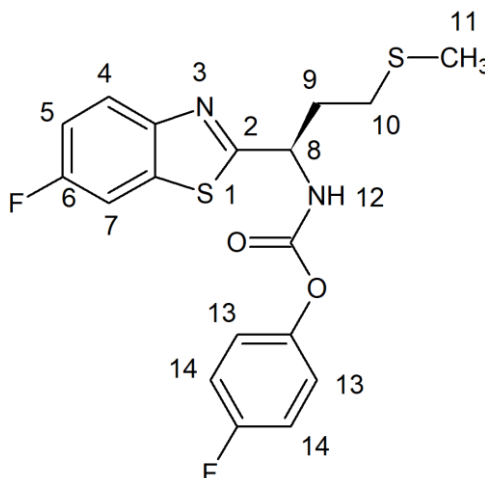
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,5$.

Elementární analýza: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClFN}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ($M_r = 410,91$)

Vypočteno: C(52,61 %), H(3,92 %), N(6,82 %), S(15,60 %).

Stanoveno: C(52,97 %), H(3,84 %), N(6,63 %), S(15,83 %)

5.7.10 4-fluorfenyl (1(-6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát



Vzhled: Bílá pevná látka.

Výtěžek = 74,5 %

B.t. = 125–127 °C

$[\alpha]_D^{25} = +79,2$ (c = 1, aceton)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): δ = 8,90 (1H, d, J = 8,0 Hz, NH-CO); 8,01 (2H, m, H4,H7); 7,39 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 7,25 – 7,17 (4H, m, H13, H14); 5,13 (1H, m, H8); 2,67 (2H, m, H9); 2,32 (1H, m, H10); 2,22 (1H, m, H10); 2,11 (3H, s, H11).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): δ = 174,7 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,4$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,0$ Hz); 159,2 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 241,0$ Hz); 154,4; 149,7; 146,9 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 2,8$ Hz); 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 123,9 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,1$ Hz); 123,5 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,1$ Hz); 116,0 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 23,0$ Hz); 114,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 52,9; 33,3; 29,6; 14,6.

^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): δ = -116,5; -109,3

Elementární analýza: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ ($M_r = 394,45$)

Vypočteno: C(54,81 %), H(4,09 %), N(7,10 %), S(16,26 %).

Stanoveno: C(55,11 %), H(3,96 %), N(6,97 %), S(16,53 %)

6 Biologická část

6.1 Přístroje a pomůcky

- UV/VIS spektrometr (Agilent 8453)
- Software UV/VIS (ChemStation)
- Plastové kyvety s tloušťkou 1 cm
- Pipety (Eppendorf a Sartorius)
- Špičky
- Kádinky, odměrné baňky
- Vortex
- Centrifuga (Eppendorf 5804/5804)

6.2 Látky, roztoky a chemikálie

- **Fosfátový pufr (PBS)**

Fosfátový pufr o molární koncentraci 0,1 mol/l a hodnotě pH 7,4 byl připraven podle následující tabulky č. 3 a takto připravený byl uchováván v lednici.

Tabulka č. 3: Příprava fosfátového pufru

Příprava fosfátového pufru	
Chlorid sodný (NaCl)	4 g
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	0,1 g
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O)	1,45 g
Chlorid draselný (KCl)	0,1 g
Redestilovaná voda	500 ml

* vše od firmy Penta

- **Ellmanovo činidlo (DTNB)** (Sigma-Aldrich)

DTNB, produkt kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové, byl navážen a rozpuštěn ve vodě, tak aby jeho molární koncentrace byla $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

- **Acetylthiocholin jodid (ATCH)** (Sigma-Aldrich)

Acetylthiocholin jodid byl stejně jako Ellmanovo činidlo navážen a rozpuštěn ve vodě na požadovanou molární koncentraci 0,1 mol/l.

- **Butyrylcholin jodid (BTCH)** (Sigma-Aldrich)

Butyrylcholin jodid byl připraven stejně jako ATCH.

- **Acetylcholinesteráza** (Sigma-Aldrich)

V PBS o molární koncentraci 0,1 mol/l a o pH 7,4 bylo rozpuštěno 10 mg acetylcholinesterázy z elektrického úhoře. Preparát této ACHE byl uchováván v umělohmotných zkumavkách při teplotě $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Butyrylcholinesteráza** (Sigma-Aldrich)

Butyrylcholinesteráza z koňského séra byla připravena stejně jako ACHE, a to rozpuštěním 10 mg BCHE v 0,1 M PBS o pH 7,4. Preparát butyrylcholinesterázy byl též uchováván v umělohmotných zkumavkách při teplotě $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Dimethylsulfoxid (DMSO)** (Penta)

- **Deionizovaná voda**

- **Inhibitorový standard – rivastigmin** (Sigma-Aldrich)

Rivastigmin byl rozpuštěn ve vodě tak, aby jeho koncentrace byla $1 \cdot 10^{-3}\text{ mol/l}$

- **Karbamáty**

Předem připravené karbamáty byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu tak, aby odpovídaly požadované molární koncentraci 0,01 mol/l.

6.3 Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz

Spíše, než samotná koncentrace nás při zkoumání enzymu zajímá aktivita enzymu. Ta je definována jako rychlost, jíž enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt za danou časovou jednotku. Jde o specifickou, citlivou a přesnou metodu, pokud zvolíme správnou koncentraci substrátu a metodu stanovení rychlosti. Mezi nejvíce používané metody, kterými lze stanovit aktivitu nebo inhibici cholinesteráz jsou metody spektrofotometrické. Nepochybně nejvíce používanou fotometrickou metodou je tzv. Ellmanova metoda. Můžeme říct, že se jedná o zlatý standard mezi metodami. Princip této metody je schematicky znázorněný na obrázku č. 20. Ellmanova metoda využívá umělé substráty esterů thiocholinu – acetylcholinjodidu či butyrylcholinjodidu. Acetylcholinesteráza, popřípadě butyrylcholinesteráza hydrolyzuje právě tento ATCH/BTCH za vzniku thiocholinu. Ten reaguje s DTNB za vzniku žlutě zbarveného TNB. Následně je intenzita žluté barvy měřena při 412 nm. Tato intenzita je přímo úměrná aktivitě enzymu. Jednoduchost, přesnost, nízké náklady či kontinuální zvyšování hustoty barvy v čase jsou značnými výhodami Ellmanovy metody. Dalším plusem je snadná adaptivnost pro automatické měření, což vede k rychlému zpracování velkého množství vzorků. [48] [55] [61] [81] [108-111]

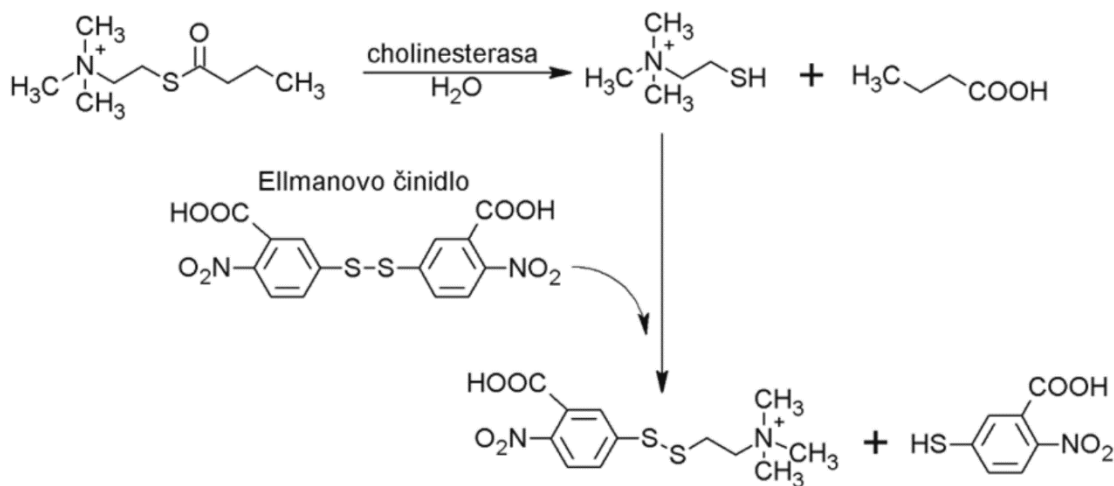


Schéma č. 20: Princip Ellmanovy metody [112]

Pracovní postup

V prvním kroku byla proměřena absorbance srovnávacího vzorku pro odečtení pozadí (blank), který byl připraven napipetováním 1192 μl 0,1 mol/l PBS o pH 7,4, 800 μl $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l

DTNB a 8 μl 0,1 mol/l ATCH či BTCH do měrné kyvety o délce 1 cm a objemu 3,5 ml (jak je zobrazeno v následující tabulce č. 4):

Tabulka č. 4: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení aktivity enzymu

Příprava srovnávacího roztoku	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	1192 μl
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	800 μl
ATCH/BTCH (0,1 M)	8 μl

Poté bylo provedeno samotné měření aktivity enzymu. Do měrné kyvety bylo napipetováno 1184 μl 0,1 mol/l fosfátového pufru o pH 7,4, 800 μl DTNB o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, 8 μl 0,1 mol/l ATCH nebo BTCH a 8 μl enzymu ACHE či BCHE (viz tabulka č. 5 níže):

Tabulka č. 5: Příprava vzorku obsahující enzym pro stanovení aktivity enzymu

Příprava vzorku s enzymem	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	1184 μl
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	800 μl
ATCH/BTCH (0,1 M)	8 μl
ACHE/BCHE	8 μl

Přídavkem enzymu ACHE nebo BCHE byla reakce odstartována. Proto je velmi důležité pipetovat enzym až jako poslední, aby nedošlo ke zkresleným výsledkům v důsledku předčasné reakce enzymu a substrátu. Celkový objem reakční směsi byl 2000 μl . Absorbance reakční směsi byla měřena pomocí spektrofotometru s diodovým polem (Hewlett-Packard 8453, USA) při vlnové délce 412 nm po dobu 70 sekund, a to v třísekundových intervalech. Do bodového grafu byla poté vynesena závislost absorbance A na čase t . Jednotlivé body byly proloženy regresní přímkou a z rovnice regrese byla vypočtena hodnota y . Za hodnotu x byla dosazena hodnota 60, což znamená $t = 60$ sekund. Vyplývá to z definice jednotky enzymové aktivity. Aktivita enzymu byla následně vypočtena dle následující rovnice:

$$\text{Aktivita enzymu (U)} = y \times 17,67$$

Výsledek byl vyjádřen v jednotkách U . Tato jednotka je definována jako množství enzymu, jež katalyzuje přeměnu 1 μmol substrátu za minutu při standardních podmínkách (nasycení enzymu substrátem, daná teplota a pH). [48] [59] [61] [111]

Hodnota y byla poté vynásobena hodnotou 17,67. Toto číslo vyjadřuje tzv. přepočítávací faktor, v němž je zahrnut molární absorpční koeficient ε (14150 mol/l/cm), dále délka kyvety l (1 cm), celkový objem směsi reakce V_{celk} (2000 μl) a nakonec objem přídatku enzymu V_{enzym} (8 μl).

Takto bylo měření provedeno celkem 3 \times a výsledné hodnoty jednotlivých měření byly poté zprůměrovány. Od této průměrné hodnoty aktivity enzymu se následně odvíjelo množství enzymu ve směsi reakce pro další stanovení a to tak, aby aktivita v konečné reakční směsi byla 0,2 U. Aktuální aktivita enzymu byla stanovena vždy ráno před začátkem samotného měření.

6.4 Stanovení IC_{50} testovaných karbamátů a standardu

IC_{50} představuje koncentraci inhibitoru, při níž dojde, za daných reakčních podmínek, k poklesu aktivity enzymu na polovinu, tzn. na 50 %. Inhibitor je tím účinnější, čím menší je tato hodnota IC_{50} . Hodnota tohoto indexu tedy vypovídá o inhibiční síle inhibitoru a používá se k porovnání účinnosti inhibitoru. Vzorec pro výpočet indexu se udává ve tvaru záporného logaritmu pI_{50} a je znázorněný viz níže. [13] [59] [61]

$$pI_{50} = -\log IC_{50}$$

Ke stanovení IC_{50} lze použít též závislost poměru rychlostí inhibované (v_0) a neinhibované (v_i) hydrolýzy na koncentraci inhibitoru $[I]$ tedy v_0/v_i vs. $[I]$. Tato závislost je přímková s úsekem rovným 1 a platí pro všechny typy enzymových inhibovaných reakcí. Teoreticky tedy stačí pro odhad průběhu závislosti pouze jeden stanovený poměr v_0/v_i pro určitou koncentraci inhibitoru $[I]$. Z takovéto přímky lze pomocí rovnice regrese, kde za hodnotu v_0/v_i dosadíme hodnotu 2, stanovit IC_{50} . [13] [59] [111]

Pracovní postup

Pro stanovení hodnoty IC_{50} byla použita opět Ellmanova metoda. V prvním kroku byl proměřen srovnávací roztok pro odečtení pozadí, který byl připraven napipetováním 1520 μ l 0,1 mol/l PBS o pH 7,4, 400 μ l $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l DTNB a 80 μ l 0,001 mol/l ATCH či BTCH do měrné kyvety (jak je zobrazeno v následující tabulce č. 6):

Tabulka č. 6: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení IC_{50}

Příprava srovnávacího roztoku	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	1520 μ l
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μ l
ATCH/BTCH (0,001 M)	80 μ l

V druhém kroku bylo provedeno měření neinhibované reakce. Do měrné kyvety bylo v tomto případě napipetováno 400 μ l $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l DTNB a 80 μ l 0,001 mol/l ATCH či BTCH. Množství enzymu bylo odvozeno od aktuální aktivity daného enzymu tak, aby celému objemu reakční směs odpovídala enzymová aktivita 0,2 U. Množství pufru PBS bylo poté dopočítáno

do celkového objemu směsi, což je 2000 μl . Složení této reakční směsi je znázorněno v následující tabulce č. 7:

Tabulka č. 7: Příprava vzorku bez karbamátu pro stanovení IC_{50}

Příprava vzorku bez inhibitoru	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	$x \mu\text{l}$
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μl
ATCH/BTCH (0,001 M)	80 μl
ACHE/BCHE	$y \mu\text{l}$

Přidávkem enzymu ACHE/BCHE byla reakce odstartována a poté byla měřena absorbance A při 412 nm, a to po dobu 70 sekund v třisekundových intervalech. Celkem bylo měření provedeno 2 \times . Nakonec byla dle následujícího vztahu vypočtena rychlost neinhibované reakce.

$$v_0(\text{s}^{-1}) = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

V dalším kroku bylo provedeno měření inhibované reakce. V tomto případě bylo do měrné kyvety napipetováno 400 μl $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l DTNB a 80 μl 0,001 mol/l ATCH či BTCH. Dále byly zvoleny 4 koncentrace karbamátu a to tak, aby celková koncentrace inhibitoru ve směsi reakce byla v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ až $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Množství inhibitoru ve směsi bylo tedy 2, 5, 7 nebo 10 μl . Množství enzymu y bylo odvozeno od aktuální enzymové aktivity a množství μl PBS pufru bylo dopočteno do celkového objemu reakční směsi 2000 μl (viz tabulka č. 8):

Tabulka č. 8: Příprava vzorku s karbamátem pro stanovení IC_{50}

Příprava vzorku s inhibítorem	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	$x \mu\text{l}$
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μl
ATCH/BTCH (0,001 M)	80 μl
ACHE/BCHE	$y \mu\text{l}$
Karbamát (inhibitor)	$z \mu\text{l}$

Měření bylo provedeno vždy 2× pro každou koncentraci inhibitoru (karbamátu), a to při 412 nm po dobu 70 sekund v 3sekundových intervalech. Absorbance A byla měřena pomocí spektrofotometru s diodovým polem modelu Hewlett-Packard 8453, USA. Ze získaných hodnot absorbance byla vypočtena rychlost inhibované reakce pomocí následujícího vztahu:

$$v_i(s^{-1}) = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Na závěr byly vypočítány poměry rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i . Z těchto poměrů a z molárních koncentrací karbamátu $[I]$ byl poté vytvořen bodový graf. Jednotlivé body byly proloženy regresní přímkou. Následně byla z rovnice regrese zjištěna hodnota IC_{50} neboli koncentrace, která je potřebná pro pokles aktivity enzymu na 50 %. Tento výpočet byl stanoven pomocí dosazení 2 za y , jak to vyplývá z definice IC_{50} . Hodnoty byly vypočteny u každého měření a pak byly zprůměrovány.

6.5 Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice

Bezesporu jeden z nejvíce používaných modelů enzymové kinetiky je model Michaelis-Mentenové. Je to matematické vyjádření vztahu koncentrace substrátu a počáteční rychlosti reakce a lze jej vyjádřit touto rovnicí: [59] [61]

$$v \text{ (s}^{-1}\text{)} = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_m určuje míru afinity enzymu k substrátu a je úměrná koncentraci substrátu, jež je nutná při dané koncentraci enzymu k dosažení poloviny maximální rychlosti V_{max} . Michaelisova konstanta se vyjadřuje v mol na litr a její rozmezí je většinou od 10^{-1} mol/l do 10^{-6} mol/l. Rychlost V_{max} je maximální rychlost reakce, což znamená, že enzym je zcela nasycen substrátem a nemůže již vzniknout další enzym-substrát komplex. K_m a V_{max} mají hyperbolický průběh křivky, a proto je jejich určení komplikované. Z tohoto důvodu využíváme postup linearizace dat. Nejpoužívanější postup je transformace dat dle Lineweavera a Burka, kdy získáme lineární závislost z převrácených hodnot rychlosti reakce a koncentrace substrátu viz níže uvedený vztah. [59] [61]

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

V praxi to znamená, že naměřené hodnoty vyneseme do grafu závislosti $1/v$ na $1/[S]$ a proložíme tuto závislost přímkou regrese. Tato přímka protíná osu x v bodě $-1/K_m$ a osu y v bodě $1/V_{max}$. Směrnice této přímky poté odpovídá poměru K_m a V_{max} (K_m/V_{max}) a lze z ní vypočítat kinetické parametry. Ze získaných kinetických hodnot a charakteru Lineweaver-Burkova grafu lze stanovit typ inhibice, a to pomocí porovnání hodnot K_m a V_{max} inhibované a neinhibované reakce. Inhibiční konstanta určuje koncentraci inhibitoru, při níž dochází k 50% inhibici enzymu. Tato konstanta neuvádí informace o účinnosti inhibitoru, jako je tomu u IC_{50} , ale uvádí nám informace o afinitě inhibitoru k enzymu. Čím je hodnota inhibiční konstanty nižší, tím je tato afinita k enzymu vyšší. Konstantu K_i získáme ze závislosti převrácené hodnoty rychlosti reakce $1/v$ a koncentrace inhibitoru $[I]$ pomocí alespoň 2 koncentrací substrátu. Tato závislost je vynesena do grafu a proložena regresními přímkami. Průsečík těchto přímek poté vypovídá o typu inhibice a ze souřadnic tohoto průsečíku můžeme též získat hodnotu K_i . U kompetitivní inhibice má průsečík souřadnice $(-K_i; 1/V_{max})$ a u nekompetitivní $(-K_i; 0)$. U akompetitivní inhibice se inhibiční konstanta K_i bohužel nedá zjistit, jelikož jsou přímky rovnoběžné a neprotínají se. [59] [61]

Pracovní postup

Pro stanovení typu inhibice byla využita opět Ellmanova metoda. Na rozdíl od stanovení IC_{50} se zde měnila jak koncentrace inhibitoru, tak koncentrace substrátu. Prvním krokem byla příprava srovnávacího roztoku pro odečtení pozadí, a to napipetováním těchto roztoků do měrné kyvety (viz tabulka č. 9).

Tabulka č. 9: Příprava srovnávacího roztoku pro stanovení typu inhibice

Příprava srovnávacího vzorku	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	$x \mu\text{l}$
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μl
ATCH/BTCH (0,001 M)	$y \mu\text{l}$

Množství substrátu BTCH či ATCH bylo 40, 80, 120 nebo 160 μl . Množství pufru PBS bylo vždy dopočítáno, aby celkový objem reakční směsi byl 2000 μl .

Dalším krokem bylo stanovení neinhibované reakce. Do kyvety byly napipetovány tyto roztoky (viz tabulka č. 10):

Tabulka č. 10: Příprava vzorku bez inhibitoru pro stanovení typu inhibice

Příprava vzorku bez inhibitoru	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	$x \mu\text{l}$
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μl
ATCH/BTCH (0,001 M)	$y \mu\text{l}$
ACHE/BCHE (enzym)	$z \mu\text{l}$

Množství substrátu BTCH či ATCH bylo 40, 80, 120 nebo 160 μl . Množství enzymu BCHE či ACHE bylo odvozeno z aktuální aktivity enzymu (8 μl) a množství pufru bylo zase dopočítáno do celkového množství reakční směsi 2000 μl . Reakce byla spuštěna přidáním enzymu ke zbylým roztokům. Neinhibovaná reakce se tímto způsobem proměřila vždy $2\times$, a to při vlnové délce 412 nm po dobu 70 sekund.

Posledním krokem bylo stanovení inhibované reakce. Do měrné kyvety se napipetovaly tyto roztoky (viz tabulka č. 11):

Tabulka č. 11: Příprava vzorku s karbamátem pro stanovení typu inhibice

Příprava vzorku s inhibítorem	
PBS (0,1 M; pH 7,4)	$x \mu\text{l}$
DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M)	400 μl
ATCh/BTCh (0,001 M)	$y \mu\text{l}$
ACHE/BCHE (enzym)	$z \mu\text{l}$
Karbamát (inhibitor)	$w \mu\text{l}$

Množství substrátu bylo opět 40, 80, 120 či 160 μl a množství enzymu se odvíjelo od aktuální aktivity enzymu (8 μl). Množství karbamátu (inhibitoru) bylo 2, 5, 7 nebo 10 μl a množství pufru PBS bylo přidáno tak, aby celkový objem reakční směsi byl 2000 μl .

Přídavkem enzymu byla zahájena reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm, a to po dobu 70 sekund. Každá koncentrace inhibitoru byla proměřena minimálně 2 \times . Poté byly vypočteny rychlosti jednotlivých reakcí – inhibovaných a neinhibovaných. Z převrácených hodnot rychlostí a koncentrací byl sestaven bodový graf závislosti $1/v$ na $1/S$ a jednotlivé body byly proloženy regresními přímkami. Nakonec byly z rovnice regrese a z linearizované rovnice Michaelis-Mentenové (viz výše) vypočteny kinetické parametry, a to inhibiční konstanta K_i a maximální rychlost V_{max} . Na závěr porovnáním neinhibované a inhibované reakce byl stanoven typ inhibice.

6.6 Stanovení rozdělovacího koeficientu *n*-oktanol/voda

Rozdělovací koeficient je bezrozměrná veličina a je popisován jako poměr rovnovážných koncentrací analytu v prostředí o dvou omezeně mísitelných fázích. Jednou fází je většinou voda a druhou *n*-oktanol. Rozdělovací koeficient je důležitý pro stanovení míry distribuce léčiv v organismu. Léky mající hydrofobní charakter a vysoký rozdělovací koeficient jsou dodávány do oblastí lipidové dvojvrstvy, a naopak léky s hydrofilním charakterem do krevního řečiště. Koeficient lze vypočítat dle následujícího vzorce.

$$P = \frac{C_o}{C_w}$$

C_o určuje koncentraci látky v *n*-oktanolu a C_w určuje koncentraci látky ve vodě. [14] [110-113]

Nejčastěji se rozdělovací koeficient charakterizuje jako logaritmus $\log P$. Tato hodnota P je závislá na vnějších podmínkách jako je například teplota, pH, iontová síla a mnoho dalších. Proto je velmi důležité vztahovat výsledky k daným experimentálním podmínkám. [14] [110-113]

Koeficient tedy určuje vztah mezi lipofilitou a hydrofilitou. Je-li hodnota rozdělovacího koeficientu nižší než 1, znamená to, že je látka více rozpustná ve vodě (je hydrofilní). Pokud je naopak koeficient vyšší než 1, je látka více rozpustná v tucích (je hydrofobní). Rozdělovací koeficient podává též informace o propustnosti látek skrz buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru. Je to velmi důležitý faktor pro nová léčiva Alzheimerovy choroby, jelikož je důležité, aby léky byly schopné procházet membránami a působily tak na správných místech uvnitř mozku. Aby látka snadno prostupovala skrz membrány a bariéry musí dle Lipinského splňovat tato pravidla: [14] [110-113]

- $M_r \leq 500$
- Méně než 5 donorů H-vazeb
- Méně než 10 akceptorů H-vazeb
- $\log P \leq 5$

Spolu s rozdělovacím koeficientem byly také stanoveny hodnoty *tPSA* neboli topologické polární povrchové plochy, která vypovídají o schopnosti tvořit H-vazby. Stanovení počtu těchto vodíkových vazeb je důležité pro určení míry absorpce do střevní sliznici a propustnosti skrz membrány a bariéry. Hodnota *tPSA* se vyjadřuje v jednotkách Å², kdy 1 Å je rovno 10⁻¹⁰ m.

Látky, které mají tuto hodnotu *tPSA* nižší než 70 \AA^2 mají schopnost větší propustnosti skrz hematoencefalickou bariéru. [14] [110-113]

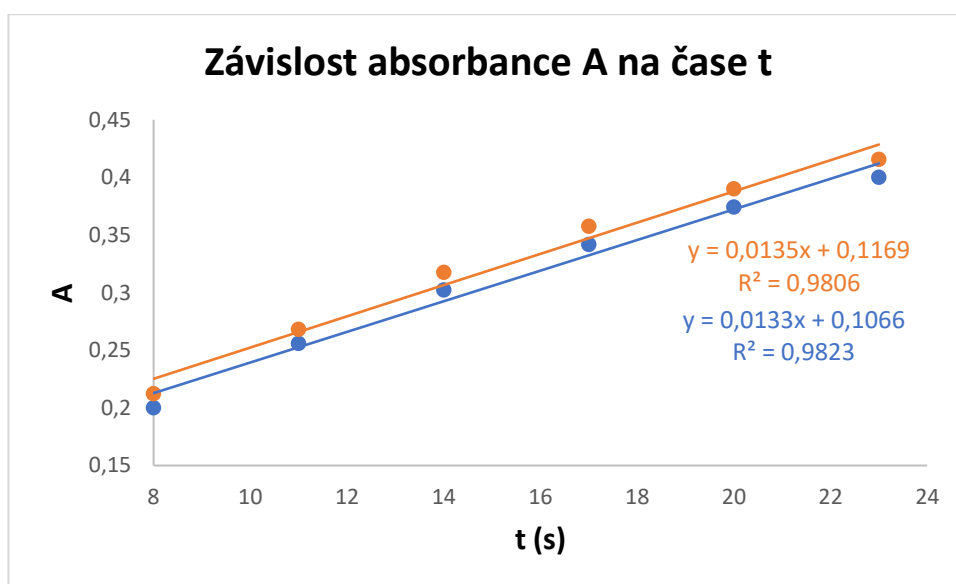
Pracovní postup

Hodnoty rozdělovacího koeficientu, konkrétně *logP* a *tPSA* testovaných karbamátů, byly vypočteny pomocí programu ChemDraw Ultra 12.0.

VÝSLEDKY

7 Stanovení enzymové aktivity acetylcholinesterázy

Aktivita enzymu ACHE byla změřena vždy 3×, a to ráno před každým měřením. Z experimentálních hodnot absorbance A času t byla vytvořena závislost A na t . Příklad závislosti je uvedený na grafu č. 1. Závislost byla proložena lineární spojnicí trendu a byla zjištěna rovnice lineární regrese. Na závěr byla pomocí rovnice regrese a přepočítávacího faktoru zjištěna aktuální aktivita enzymu ACHE za časový úsek 60 sekund. Příklad výpočtu je znázorněn níže. Naměřené hodnoty byly následně zprůměrovány, a tím se stanovila aktuální aktivita enzymu ACHE, která byla 16,38 U. Poté bylo vypočteno množství enzymu, které bylo potřeba napipetovat, aby jeho aktivita byla 0,2 U. To bylo potřeba pro další měření, konkrétně pro stanovení IC_{50} či kinetických parametrů enzymu a následně pro určení typu inhibice. Příklad výpočtu množství enzymu je znázorněn viz níže.



Graf č. 1: Stanovení enzymové aktivity ACHE – závislost absorbance na čase

Výpočet aktivity ACHE:

$$x = t = 60 \text{ s}$$

$$y = 0,0135x + 0,1169$$

$$y = 0,0135 \times 60 + 0,1169$$

$$y = 0,81 + 0,1169 = \mathbf{0,9269}$$

$$\overline{AE}_{ACHE} = y \times 17,67$$

$$\overline{AE}_{ACHE} = 0,9269 \times 17,67 = \mathbf{16,38 U}$$

Výpočet množství enzymu, aby byla aktivita ACHE v roztoku 0,2 U:

$$V_{RS} = 2 \text{ ml}$$

$$V_{ACHE} = \frac{0,2}{\overline{AE}_{ACHE}} \times V_{RS}$$

$$V_{ACHE} = \frac{0,2}{16,38} \times 2 = 0,02442 \text{ ml} = \mathbf{24,42 \mu l}$$

8 Stanovení IC_{50} testovaných inhibitorů (karbamátů) a standardu rivastigminu

Nejprve byl alespoň 2× proměřen vzorek bez inhibitoru (karbamátu). Z tohoto měření byla potom vypočtena rychlost neinhibované reakce. Příklad výpočtu rychlosti neinhibované reakce je zobrazen viz níže:

$$v_0 = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$
$$v_0 = \frac{0,40015793 - 0,20012426}{23 - 8} = \frac{0,20003367}{15} = \mathbf{0,0133\ s^{-1}}$$

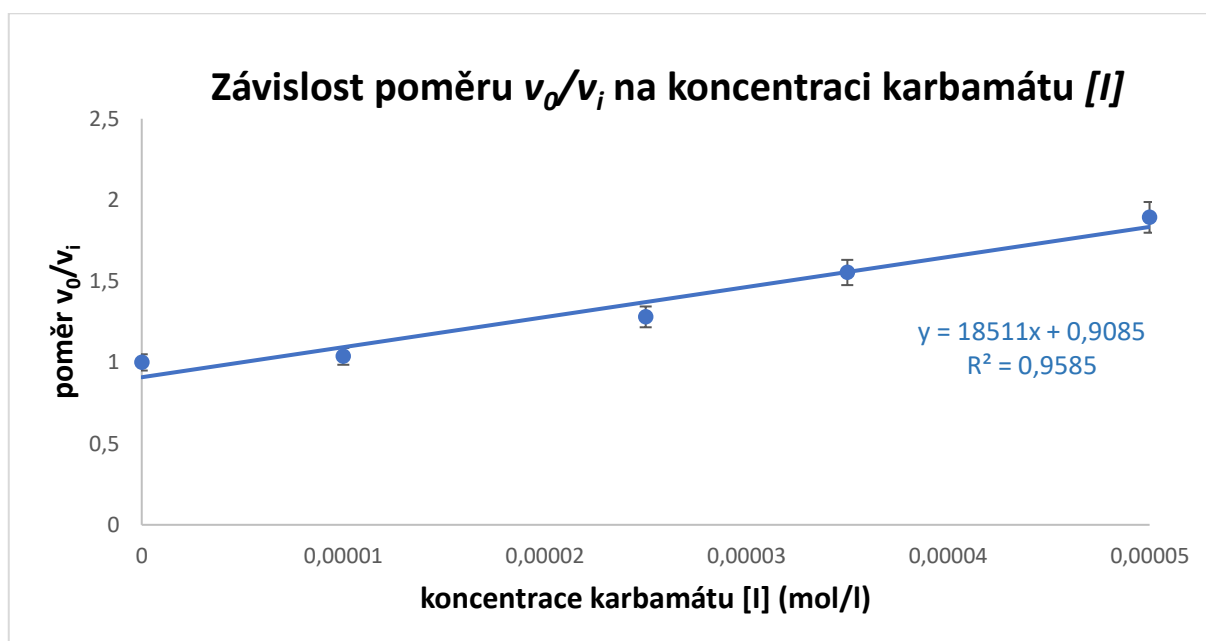
Výsledné rychlosti byly nakonec zprůměrovány a byla stanovena celková rychlost neinhibované reakce v_0 . Následně byla měřena inhibovaná reakce (vzorek s inhibitorem – karbamátem). U každého karbamátu byly zvoleny 4 koncentrace a to tak, aby celková koncentrace inhibitoru ve směsi reakce byla v rozmezí koncentrací $5 \cdot 10^{-6}$ až $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Množství inhibitoru ve směsi bylo tedy 2, 5, 7 či 10 μ l. Měření se provedlo 2× u každé koncentrace karbamátu. Následně byly spočteny rychlosti inhibovaných reakcí. Příklad výpočtu inhibované rychlosti u karbamátu č. 3 je zobrazen viz níže.

$$v_i = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$
$$v_i = \frac{0,37009 - 0,17345}{23 - 8} = \frac{0,19664}{15} = \mathbf{0,0131\ s^{-1}}$$

Následně byly vypočteny poměry rychlostí inhibované a neinhibované reakce v_0/v_i a sestrojeny závislosti těchto poměrů v_0/v_i a molární koncentrace $[I]$ viz tabulka č. 12. Závislosti byly poté proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice regrese. Příklad této závislosti u karbamátu č. 3 je zobrazen na grafu č. 2.

Tabulka č. 12: Poměry inhibované a neinhibované reakce u daných koncentrací inhibitoru

c [I]	v_0/v_i A	v_0/v_i B	Průměr
0	1	1	1
$1,00 \cdot 10^{-5}$	1,03	1,049	1,04
$2,50 \cdot 10^{-5}$	1,25	1,31	1,28
$3,50 \cdot 10^{-5}$	1,54	1,56	1,55
$5,00 \cdot 10^{-5}$	1,88	1,90	1,89



Graf č. 2: Stanovení IC_{50} – závislost poměrů rychlostí inhibované a neinhibované reakce na koncentraci karbamátu (č. 3)

Z těchto přímek, z jejich rovnice regrese, byla poté stanovena hodnota IC_{50} jednotlivých karbamátů. Příklad výpočtu, konkrétně hodnotu IC_{50} karbamátu (inhibitoru) č. 3, je znázorněný viz níže.

$$y = 18330x + 0,9006$$

$$y = 2$$

(vychází z definice IC_{50})

$$2 = 18330x + 0,9006$$

$$x = 0,00005998 \text{ mol/l} = \mathbf{59,98 \mu\text{mol/l}}$$

Hodnoty IC₅₀ jednotlivých karbamátů a standardu byly zprůměrovány a celkový výsledek byl vyjádřen jako hodnota se směrodatnou odchylkou. Hodnoty IC₅₀ jednotlivých karbamátů a standardu rivastigminu jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Tabulka výsledků IC₅₀ jednotlivých karbamátů se směrodatnou odchylkou a indexem selektivity

Karbamát	ACHE – IC ₅₀ [μM]	BCHE – IC ₅₀ [μM]	SI*
1	112,05±2,96	196,21±2,57	1,75
2	99,47±1,53	168,15±4,02	1,69
3	58,97±1,01	39,17±0,71	0,66
4	77,14±2,60	49,43±0,72	0,64
5	80,61±3,01	143,28±3,12	1,78
6	81,10±0,90	37,61±1,24	0,46
7	76,29±1,53	213,77±4,49	2,81
8	113,57±3,51	95,58±4,83	0,84
9	99,59±4,86	117,39±2,11	1,18
10	72,16±1,76	56,92±0,78	0,79
RIV	56.10±1.41	38.40±1.97	0,68

*SI – index selektivity (poměr IC₅₀ BCHE / IC₅₀ ACHE)

9 Stanovení kinetických parametrů neinhibované a inhibované reakce a určení K_i testovaného inhibitoru

Prvním krokem bylo stanovení kinetických parametrů BCHE neinhibované reakce u substrátu BTCH. Z experimentálních dat závislosti absorbance A na čase t byly zjištěny rychlosti neinhibované reakce a byly stanoveny jejich převrácené hodnoty $1/v_0$. Hodnoty rychlostí byly poté zprůměrovány. Následně byly stanoveny kinetické parametry této neinhibované reakce. Příklad výpočtu viz níže. Na grafu č. 3 poté můžeme vidět lineární závislost $1/v$ a $1/[S]$ u neinhibované reakce, kde v představuje rychlost reakce a $[S]$ koncentraci substrátu ve srovnávacím roztoku.

Výpočet kinetických parametrů K_m a V_m neinhibované reakce u substrátu BTCH:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = 0,0024x + 30,38$$

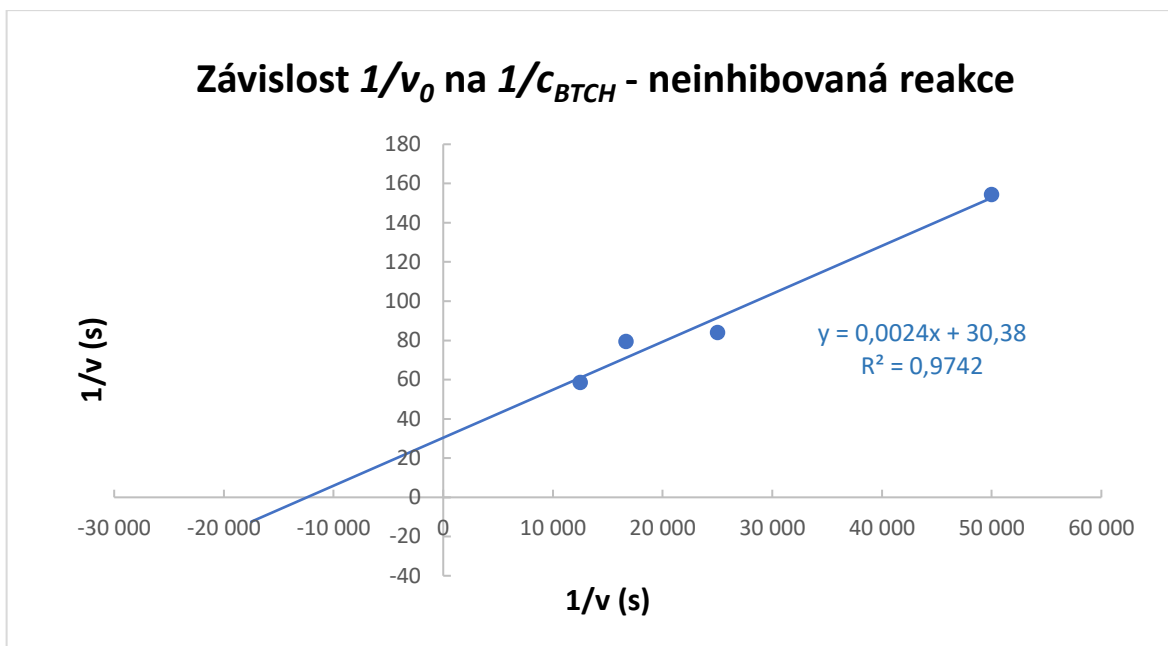
$$\frac{1}{v} = 0,0024 \times \frac{1}{[S]} + 30,38$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 30,38$$

$$V_{max} = \frac{1}{30,38} = 0,03292 \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0,0024$$

$$K_m = 0,0024 \times V_{max} = 0,0024 \times 0,03292 = 0,000079 \text{ M} = 7,9 \times 10^{-5} \text{ M}$$



Graf č. 3: Závislost převrácených hodnot rychlosti neinhibované rychlosti a koncentrace BTCH

Poté byly stanoveny i kinetické parametry inhibované reakce s inhibitorem BCHE č. 6. Substrát pro BCHE byl použit BTCH. Z naměřených hodnot byly stanoveny rychlosti inhibovaných reakcí a následně byly vypočteny jejich převrácené hodnoty $1/v_i$. Tyto hodnoty byly též zprůměrovány jako u neinhibované reakce. Poté byla sestavena závislost $1/v_i$ vs. $1/[S]$ (viz níže na grafu č. 4)

Výpočet kinetických parametrů K_m a V_m inhibované reakce u substrátu BTCH:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$y = 0,0078x + 7,6438$$

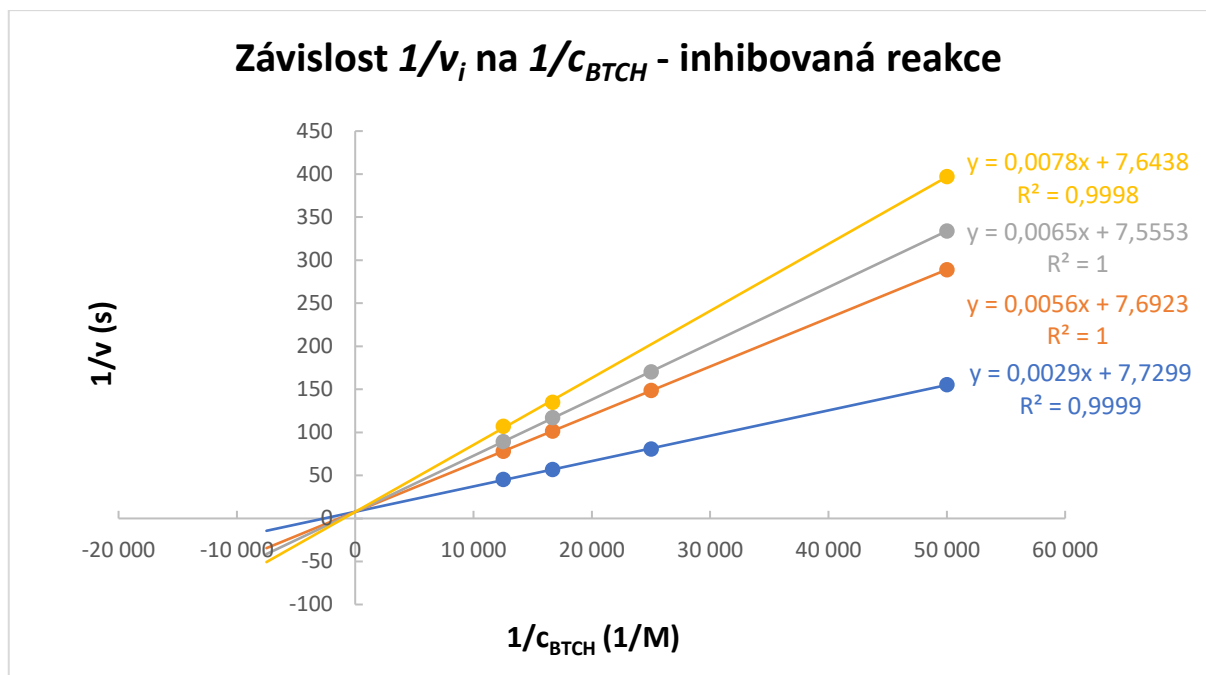
$$\frac{1}{v} = 0,0078 \times \frac{1}{[S]} + 7,6438$$

$$\frac{1}{V_{max}} = 7,6438$$

$$V_{max} = \frac{1}{7,6438} = 0,1308 \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0,0078$$

$$K_m = 0,0078 \times V_{max} = 0,0078 \times 0,1308 = 0,00102 \text{ M} = 1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$$



Graf č. 4: Závislost převrácených hodnot rychlosti inhibované reakce a koncentrace BTCH

Na závěr porovnáním neinhibované a inhibované reakce byl stanoven typ inhibice. Hodnotu K_i lze stanovit pomocí průsečíku přímek lineární regrese a ze souřadnic tohoto průsečíku. Jak již bylo řečeno u kompetitivní inhibice má průsečík souřadnice $(-K_i; 1/V_{max})$ a u nekompetitivní inhibice $(-K_i; 0)$. Jak můžeme vidět z grafu přímky se protínají na ose y a z tohoto lze určit, že se jedná o inhibici kompetitivní.

10 Stanovení rozdělovacího koeficientu

Jak již bylo řečeno, hodnota rozdělovacího koeficientu $\log P$ a hodnota $tPSA$ byly vypočteny pomocí programu ChemDraw Ultra 12.0. Následující tabulka (č. 14) znázorňuje výsledky jednotlivých karbamátů a standardního inhibitoru rivastigminu.

Tabulka č. 14: Výsledky $\log P$ a $tPSA$

	MW	ClogP	tPSA
1	314,39	2,65	50,69
2	328,42	3,18	50,96
3	356,47	4,24	50,96
4	356,47	4,11	50,96
5	362,86	3,24	50,96
6	431,75	4,96	50,96
7	382,39	3,44	50,96
8	390,49	3,36	50,96
9	410,49	4,71	50,96
10	394,45	4,24	50,96
RIV	250,34	2,10	32,78

Všechny stanovované karbamáty mají hodnoty vyšší než 1, což značí, že mají vyšší lipofilitu. Všechny karbamáty též splňují Lipovského pravidlo a to, aby $\log P$ bylo rovno nebo méně než 5. Nejvyšší hodnoty $\log P$ mají karbamáty č. 9 (4-chlorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát) a 10 (4-fluorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát), a proto budou dobře propustné skrz membrány a bariéry. Díky tomu mají tyto sloučeniny velký potenciál být zavedeny do praxe a stát se používanými léky na AD. Naopak nejnižší hodnoty $\log P$ mají karbamáty č. 1 (Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát) a 2 (Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát).

Co se týče hodnoty $tPSA$, všechny inhibitory mají stejnou hodnotu a to 50,96 Å², což je méně než 70 Å². Znamená to tedy, že budou dobře procházet skrz buněčné membrány a také budou dobře vstřebávány v gastrointestinálním traktu (GIT).

DISKUZE

11 Syntetická část

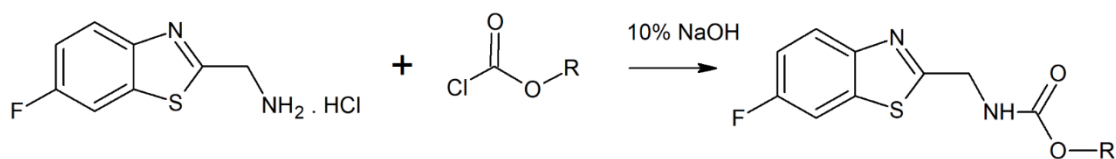
V rámci diplomové práce byla provedena syntéza karbamátů vycházející z (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochloridu. Všechny připravené karbamáty byly charakterizovány bodem tání a NMR spektroskopii. Čistota látek byla ověřena elementární analýzou.

Následně byla u připravených karbamátů stanovena inhibiční aktivita proti ACHE, BCHE a lipofilita.

11.1 Syntéza (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan 1-amin hydrochloridu

Výchozí sloučenina (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochlorid byla připravena třístupňovou syntézou. V prvním reakčním kroku reagoval 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin s 48 % KOH za vzniku 2-amino-5-fluorobenzthiolátu draselného. V dalším reakčním stupni reagoval plynný fosgen s D-methioninem v THF za vzniku (*R*)-4-(2-(methylthio)ethyl)oxazolidine-2,5-dionu. V závěrečném reakčním stupni byl nejprve 2-amino-5-fluorobenzthiolát draselný reakcí s HCl převeden na 2-amino-5-fluorobenzthiol, který dále reagoval s (*R*)-4-(2-(methylthio)ethyl)oxazolidine-2,5-dionem za vzniku výsledného produktu (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl)propan-1-amin hydrochloridu. Po ochlazení reakční směsi se produkt vyloučil ve formě HCl soli. Výsledný produkt byl zfiltrován a promyt toluenem, čímž byly z produktu odstraněny oxidační produkty na bázi disulfidu. Tato sloučenina byla připravena s 88% výtěžkem.

11.2 Syntéza vybraných karbamátů



Vybrané karbamáty byly syntetizovány reakcí (1*R*)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-3-(methylsulfanyl) propan-1-aminu s příslušným alkylchloroformiátem. Výchozí amin byl do reakce použit ve formě stabilní hydrochloridové soli. Amin byl ze soli uvolněn reakcí s 10% vodným roztokem NaOH. Vzniklý amin okamžitě reagoval s příslušným alkylchloroformiátem. Reakce probíhala v heterogenním prostředí toluen–voda za laboratorní teploty. Z reakční směsi byla následně oddělena vodná vrstva, která obsahovala anorganické nečistoty včetně reakcí vzniklého NaCl. Z oddělené organické vrstvy bylo destilací za sníženého tlaku (50–52 °C/ 40–50 mbar) oddestilováno cca 30 ml toluenu. Následným ochlazením roztoku byl produkt izolován krystalizací a následnou filtrací. Izolovaný produkt byl sušen na vzduchu. Výtěžky připravených karbamátů se pohybovaly v rozmezí 76–86 %.

12 Biologická část

V praxi se účinnost inhibitorů určuje dle hodnoty IC_{50} neboli 50% inhibiční koncentrace. Jedná se o hodnotu, při níž dojde ke snížení enzymové aktivity na polovinu (na 50 %). V překladu to tedy znamená, že čím menší je hodnota IC_{50} , tím je účinnost inhibitoru větší. Hodnota 50% inhibiční koncentrace byla stanovena u 2 enzymů – acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Nejúčinnější ze všech testovaných karbamátů vůči acetylcholinesteráze byl inhibitor č. 3 (Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát), jehož hodnota IC_{50} byla $58,9 \pm 1,01 \mu\text{M}$. Tento inhibitor je i přesto méně účinný než standardní inhibitor rivastigmin, který má hodnotu IC_{50} $56,10 \pm 1,41 \mu\text{M}$. Ostatní karbamáty prokázaly horší inhibiční aktivitu ve srovnání s rivastigminem. Inhibitor č. 3 se tedy nejvíce přiblížil standardu.

Nejlepší inhibiční účinky vůči butyrylcholinesteráze měl naopak inhibitor č. 6 (2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát), jehož hodnota IC_{50} byla $37,61 \pm 1,24 \mu\text{M}$. To je nepatrně nižší hodnota než u rivastigminu, který měl IC_{50} $38,40 \pm 1,97 \mu\text{M}$. To znamená, že v tomto případě vykazuje lepší výsledky inhibitor č. 6 nikoliv rivastigmin. Ostatní inhibitory měly hodnotu IC_{50} horší než standard. Avšak dalším karbamátem, který se hodně přiblížil rivastigminu byl inhibitor č. 3 (Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát) a 4 (Isobutyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát). Karbamát č. 3 měl inhibiční hodnotu $39,17 \pm 0,71 \mu\text{M}$ a karbamát č. 4 hodnotu $49,43 \pm 0,72 \mu\text{M}$. Kdybychom měli výsledky porovnat podle indexu selektivity (SI), neboli poměru $IC_{50} \text{ BCHE} / IC_{50} \text{ ACHE}$, nejlepší výsledky by jevíly karbamáty č. 6, 4 a 3. Jejich SI je totiž nižší než index selektivity rivastigminu, který je 0,68. Z toho, co bylo zatím řečeno je jasné, že inhibiční účinky testovaných karbamátů jsou vyšší při inhibici butyrylcholinesterázy než acetylcholinesterázy. Ze studií ale víme, že aby byla terapie Alzheimerovy nemoci úspěšná, musí být inhibitor účinný na oba typy cholinesteráz. Z našeho experimentu tedy vyplývá, že ani jeden z testovaných karbamátů tuto podmínku nesplňuje. Jediný inhibitor č. 3 (Butyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát) se této podmínce trochu blíží. V praxi se používají v současné době tyto látky: rivastigmin, donepezil a galantamin. Z těchto 3 je nejvíce účinný donepezil, poté následuje galantamin a na posledním místě je rivastigmin. Velmi účinný byl též takrin, ale jak již bylo řečeno, jeho negativní vedlejší účinky na játra mu znemožnily ho používat v praxi. Na druhou stranu je ale využíván pro syntézu nových sloučenin a pro vývoj účinných a netoxických léčiv na AD.

Dalším úkolem bylo určit typ inhibice, který se získá z kinetických parametrů inhibované a neinhibované reakce. Mezi tyto parametry patří Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlost V_{max} . Typ inhibice byl stanovován pouze u butyrylcholinesterázy. Pro určení parametrů byl vybrán karbamát č. 6 (2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát). Z hodnot K_m a V_{max} můžeme usoudit, že se jedná o kompetitivní typ inhibice. Michaelisova konstanta K_m vzrůstající koncentrací inhibitoru klesá a maximální rychlost V_{max} je na druhou stranu relativně konstantní. Pokud by se jednalo o akompetitivní inhibici hodnoty maximální rychlosti a Michaelisovy konstanty by klesaly ve stejném poměru. Když se však podíváme na poměry K_m/V_{max} u jednotlivých koncentrací inhibitoru, tak je patrné, že se tak neděje. Na druhou stranu, kdyby se jednalo o smíšenou inhibici, hodnoty maximální rychlosti by výrazně klesly, ale naopak Michaelisova konstanta by klesala mírněji. Kompetitivní inhibici též potvrzuje grafické znázornění na grafu č. 4. Typickým znakem kompetitivní inhibice je totiž to, že se regresní přímky protínají na ose y , což na grafu můžeme vidět. Kdyby se jednalo o akompetitivní inhibici, přímky by byly rovnoběžné a u nekompetitivní inhibice by se přímky protínaly na ose x . Kdyby se jednalo o inhibici smíšeného typu, přímky by se protínaly v 2. či 3. kvadrantu grafu. Ani jeden z těchto případů to ale není. Závěrem lze tedy říct, že inhibitor č. 6, 2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát, působí inhibici vůči BCHE kompetitivní povahy.

Jak již bylo řečeno, rozdělovací koeficient vyjadřuje propustnost inhibitorů skrz buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru. Toto je velmi důležité pro léčiva na Alzheimerovu chorobu, jelikož musí být dostatečně lipofilní, aby mohla správně působit v mozku. Kladné hodnoty $\log P$ značí o lipofilitě, a naopak záporné $\log P$ značí o hydrofilitě látek. Avšak záporné hodnoty neměl ani jeden z testovaných karbamátů. Velký potenciál pro léčbu AD by tedy mohly mít karbamáty č. 9 (4-chlorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát) a 10 (4-fluorfenyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamát), které měly nejvyšší hodnoty $\log P$. Na druhou stranu nejnižší hodnoty měly karbamáty č. 1 (Methyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio) propyl) karbamát) a 2 (Ethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl)karbamát).

Z výše uvedených informací víme, že $tPSA$ charakterizuje jak lipofilitu, hydrofilitu tak i absorpci látek v gastrointestinálním traktu (GIT). V tomto případě je mezní hodnotou 70 \AA^2 , což znamená, že pokud mají látky hodnotu nižší než těchto 70 \AA^2 , vypovídá to o jejich dobré propustnosti skrz membrány. Tuto podmínku splňují všechny testované karbamáty, z čehož vyplývá, že jsou lipofilní a že jsou dobře vstřebávány střevní sliznicí.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalézt vhodné postupy syntézy nových karbamátových inhibitorů cholinesteráz z výchozí látky 1*R*-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-aminu a stanovení jejich inhibiční aktivity vůči těmto enzymům. Na základě teoretických znalostí byl sestaven postup syntézy a dle tohoto postupu bylo syntetizováno celkem 10 nových karbamátových inhibitorů vycházejících z 1*R*-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propan-1-aminu. Výtěžky připravených karbamátů se pohybovaly v rozmezí 76–86 %, navíc syntéza byla provedena technologicky aplikovatelným postupem. Takto připravené karbamáty byly charakterizovány NMR spektrometrií a bodem tání. Nakonec byla jejich čistota ověřena elementární analýzou. U všech karbamátů byla poté za pomoci Ellmanovy metody stanovena hodnota IC_{50} , jež charakterizuje inhibiční aktivitu karbamátu vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Naměřené hodnoty IC_{50} byly porovnány s hodnotami IC_{50} standardního inhibitoru (Rivastigminu). Největší inhibiční účinky na ACHE měl inhibitor č. 3. U BCHE to byl inhibitor č. 6. Ani jeden karbamát kromě 2,2,2-trichlorethyl (1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)-3-(methylthio)propyl) karbamátu neměl vyšší inhibiční účinky (neměl nižší IC_{50}) než Rivastigmin. Hodnoty IC_{50} se pouze blížily hodnotě IC_{50} standardu. Z toho je zřejmé, že v dnešní době používané inhibitory jsou více účinné než ty nové, které byly testovány. Z tohoto důvodu by nejspíš nebyly využity v praxi, ale lze konstatovat, že slibný potenciál určitě mají. Je ale nutné dále pracovat na objevování nových postupů a vzniku nových sloučenin, které by tyto inhibiční účinky splňovaly, a které by neměly škodlivý účinek na organismus, jako tomu je u dnes používaných léčiv na AD a další neurodegenerativní onemocnění.

POUŽITÁ LITURATURA

- [1] STREITWIESER, Andrew, Clayton H. HEATHCOCK a Edward M. KOSOWER. *Introduction to organic chemistry*. 4th ed. New York: Macmillan, 1992. ISBN 0-02-418170-6.
- [2] SUN, H. Ab initio characterizations of molecular structures, conformation energies, and hydrogen-bonding properties for polyurethane hard segments. *Macromolecules* [online]. 1993, **26**(22), 5924-5936 [cit. 2023-02-05]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00074a014
- [3] MINDL, Jaromír. Struktura a reaktivita karbamátů. *Chemické listy* [online]. 1999, **94**(3), 175-180 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/03-PDF/175-180.pdf>
- [4] Carbamate. In: *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. 2005 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamate>
- [5] Carbamate. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-03-16]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbamate>
- [6] GUPTA, Ramesh C. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* [online]. Cambridge, Massachusetts, United States: Academic Press, 2015 [cit. 2023-04-02]. ISBN 9780128004944. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=MXKDBAAAQBAJ&pg=PA338&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [7] ELLISON, D. *Handbook of chemical and biological warfare agents*. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 978-0-8493-1434-6.
- [8] GUANGCHENG, Liu a Jonathan A. ELLMAN. General Solid-Phase Synthesis Strategy for the Preparation of 2-Pyrrolidinemethanol Ligands. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1995, **60**(24), 7712–7713 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00129a002>

- [9] ANDERSEN, J. B., A. ENGELAND, J. F. OWE a N. E. GILHUS. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *European Journal of Neurology* [online]. 2010, **17**(12), 1445-1450 [cit. 2023-03-16]. ISSN 13515101. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03089.x
- [10] HERKERT, N.M., H. THIERMANN a F. WOREK. In vitro kinetic interactions of pyridostigmine, physostigmine and soman with erythrocyte and muscle acetylcholinesterase from different species. *Toxicology Letters* [online]. 2011, **206**(1), 41-46 [cit. 2023-03-16]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2011.03.004
- [11] FUKUTO, T R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* [online]. 1990, **87**, 245-254 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.9087245
- [12] METCALF, Robert L. Insect Control. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. 2000 [cit. 2023-04-02]. Dostupné z: doi:10.1002/14356007.a14_263
- [13] VOTOČKOVÁ, Kristýna. *Využití indoxylacetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [14] ŠIMKOVÁ, Barbora. *Využití 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [15] OZAKI, Shoichiro. Recent advances in isocyanate chemistry. *Chemical reviews* [online]. 1972, **72**(5), 457-496 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr60279a002>
- [16] YOSHIDA, Masaaki, Namiko HARA a Sanae OKUYAMA. Catalytic production of urethanes from amines and alkyl halides in supercritical carbon dioxide. *Chemical Communications* [online]. 2000, **2**, 151-152 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2000/cc/a908819i>

- [17] ABLA, Mahmut, Jun-Chul CHOI a Toshiyasu SAKAKURA. Halogen-free process for the conversion of carbon dioxide to urethanes by homogeneous catalysis. *Chemical Communications* [online]. 2001, (21), 2238-2239 [cit. 2023-02-05]. ISSN 13597345. Dostupné z: doi:10.1039/b106201h
- [18] ERHARDT, Paul W. Curtius conversion of acids to amines under neutral conditions via an anthrylmethyl carbamate. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1979, **44**(5), 883-884 [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo01319a059>
- [19] KAMAL, Ahmed, Mohammed Ali Hussaini SYED a Shaheer Malik MOHAMMED. Therapeutic potential of benzothiazoles: a patent review (2010 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2014, **25**(3), 335-349 [cit. 2023-02-10]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2014.999764
- [20] FACCHINETTI, Victor, Raisa da R. REIS, Claudia R. B. GOMES a Thatyana R. A. VASCONCELOS. ChemInform Abstract: Chemistry and Biological Activities of 1,3-Benzothiazoles. *ChemInform* [online]. 2012, **43**(16), - [cit. 2023-02-10]. ISSN 09317597. Dostupné z: doi:10.1002/chin.201216263
- [21] Benzothiazole. In: *PubChem* [online]. National Library of Medicine, 2005 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzothiazole>
- [22] GUNAWARDANA, Geewananda P., Shigeo KOHMOTO a Neal S. BURREN. New cytotoxic acridine alkaloids from two deep water marine sponges of the family. *Tetrahedron Letters* [online]. 1989, **30**(33), 4359-4362 [cit. 2023-04-10]. ISSN 00404039. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-4039(00)99360-2
- [23] GUNAWARDANA, Geewananda P., Shigeo KOHMOTO, Sarath P. GUNASEKERA, Oliver J. MCCONNELL a Frank E. KOEHN. Dercitine, a new biologically active acridine alkaloid from a deep water marine sponge, Dercitus sp. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1988, **110**(14), 4856-4858 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00222a071
- [24] GILCHRIST, T. L. *Heterocyclic chemistry*. 2. Longman, 1992. ISBN 0582064201.

- [25] BEN-ALLOUM, Abdelkrim, Salem BAKKAS a Mohamed SOUFIAOUI. Nouvelle Voie de Synthèse des 2-arylbenthiazoles transfert d'électrons active par micro-ondes. *Tetrahedron Letters* [online]. 1997, **38**(36), 6395-6396 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403997014901>
- [26] ODEHNALOVÁ, Hana. *Příprava nových chirálních sulfonamidů obsahujících benzthiazolový blok*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [27] BOGER, Dale L. A convenient preparation of 2-substituted benzothiazoles. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1978, **43**(11), 2296-2297 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00405a050>
- [28] PATEL, Nayan, P. YADAV a J.S. CHAUHAN. 2-Amino-N-(7-substituted Benzo[d]thiazol-2-yl) benzamide: synthesis and characterization of novel antibacterial compounds. *Der Pharmacia Lettre* [online]. 2011, **3**(1), 208-213 [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282736733_2-Amino-N-7-substituted_Benzo_d_thiazol-2yl_benzamide_Synthesis_and_characterization_of_novel_antibacterial_compounds
- [29] PEJCHAL, Vladimír, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ a Pavel DRABINA. 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* [online]. 2011, **48**(1), 57-62 [cit. 2023-02-10]. ISSN 0022152X. Dostupné z: doi:10.1002/jhet.502
- [30] ODEHNALOVÁ, Hana. *Syntéza biologicky aktivních sulfamoylbenzamidů s benzthiazolovým blokem*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [31] LE BOZEC, Lucille a Christopher J. MOODY. Naturally Occurring Nitrogen–Sulfur Compounds. The Benzothiazole Alkaloids. *Australian Journal of Chemistry* [online]. 2009, **62**(7) [cit. 2023-03-16]. ISSN 0004-9425. Dostupné z: doi:10.1071/CH09126

- [32] ALI, Ruhi a Nadeem SIDDIQUI. Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. *Journal of Chemistry* [online]. 2013, **2013**(3), 1-12 [cit. 2023-03-22]. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2013/345198
- [33] ASUNDARIA, S. T. a K. C. PATEL. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of thiazole, benzothiazole and pyrimidine derivatives bearing sydnone moieties. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2012, **45**(12), 725-731 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0091-150X. Dostupné z: doi:10.1007/s11094-012-0712-5
- [34] SONI, Balram, Mahendra Singh RANAWAT, Rambabu SHARMA, Anil BHANDARI a Sanjay SHARMA. Synthesis and evaluation of some new benzothiazole derivatives as potential antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **45**(7), 2938-2942 [cit. 2023-03-22]. ISSN 02235234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.019
- [35] JIN, Linhong, Baoan SONG, Guoping ZHANG, Ruiqing XU, Sumei ZHANG, Xingwen GAO, Deyu HU a Song YANG. Synthesis, X-ray crystallographic analysis, and antitumor activity of N-(benzothiazole-2-yl)-1-(fluorophenyl)-O,O-dialkyl- α -aminophosphonates. *Bioorg Med Chem Lett* . [online]. 2006, **16**(6), 1537-1543 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.041
- [36] CAPUTO, Rosanna, Maria Luisa CALABRÒ, Nicola MICALE, Aaron D. SCHIMMER, Moshin ALI, Maria ZAPPALÀ a Silvana GRASSO. Synthesis of benzothiazole derivatives and their biological evaluation as anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2012, 2644–2651 [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00044-011-9789-8>
- [37] MORENO-DÍAZ, Hermenegilda, Rafael VILLALOBOS-MOLINA, Rolffy ORTIZ-ANDRADE et al. Antidiabetic activity of N-(6-substituted-1,3-benzothiazol-2-yl)benzenesulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett* . [online]. 2008, **18**(9), 2871-2877 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2008.03.086
- [38] WURMOVÁ, Dana. *Syntéza sulfonamidových inhibitorů cholinesteráz obsahujících benzthiazolový blok*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.

- [39] GALGAŇÁKOVÁ, Ingrid. *Syntéza a charakterizace anticholinerních karbamátů obsahujících benzthiazolový blok*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [40] IMRAMOVSKÝ, Aleš, Vladimír PEJCHAL, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ et al. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6-fluorobenzo[d]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic and medicinal chemistry* [online]. 2013, **21**(7), 1735-1748 [cit. 2023-02-10]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2013.01.052
- [41] PEJCHAL, Vladimír, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Marcela PEJCHALOVÁ et al. Synthesis, structural characterization, 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 & Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **24**(7), 1560-1572 [cit. 2023-04-20]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2016.02.033
- [42] PATOČKA, J., A. STRUNECKÁ a D. ŘÍHOVÁ. Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy nemoci. *Českoslov. fyziol.* 2001, **50**, 4-10.
- [43] RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica* [online]. 2003, **54**(2), 183-189 [cit. 2023-03-15]. ISSN 0236-5383. Dostupné z: doi:10.1556/ABiol.54.2003.2.7
- [44] CHACKO, L. W. a Jean A. CERF. Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section. *Journal of Anatomy* [online]. 1960, **94**(1), 74-81 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1244416/>
- [45] BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. pro praxi* [online]. 2007, **2**, 112-117 [cit. 2023-03-15]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2007/02/12.pdf>

- [46] RAJESH KANNAN, Rajaretinam a Samuel Gnana PRAKASH VINCENT. Rapid neurobehavioural analysis based on the effects of an acetylcholinesterase inhibitor from *Tephrosia purpurea* in Zebrafish. *Annals of Neurosciences* [online]. 2012, **19**(1), 8-13 [cit. 2023-03-15]. ISSN 09727531. Dostupné z: doi:10.5214/ans.0972.7531.180403
- [47] SEJKOROVÁ, Karolína. *Využití dithionikotinové kyseliny jako chromogenu pro spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [48] DUŠKOVÁ, Zuzana. *Syntéza a charakterizace biologicky aktivních karbamátů na bázi 6-fluor-1,3-benzthiazolylalkylaminů*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [49] PAVLIŠ, Oto a Miroslav POHANKA. Rozdělení inhibitorů cholinesteras. *Zpravodaj vojenského zdravotnictví*. 2013, **23**(1), 32-36. ISSN 1805-7985.
- [50] SVOBODOVÁ, Barbora. *Takrin-benzothiazolové deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2021. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [51] POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2013, **114**(12), 726-734 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1336-0345. Dostupné z: doi:10.4149/BLL_2013_153
- [52] POHANKA, Miroslav. CHOLINESTERASES, A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. *Biomedical Papers* [online]. 2011, **155**(3), 219-223 [cit. 2023-03-01]. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2011.036
- [53] ACHEAMPONG, Mary G., Daviana E. DUEÑO, Bobby K. GLOVER et al. Acetylcholinesterase: Substrate traffic and inhibition. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2012, **40**(2), 144-144 [cit. 2023-03-01]. ISSN 14708175. Dostupné z: doi:10.1002/bmb.20604
- [54] POHANKA, Miroslav. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2012, **22**(8), 871-886 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2012.701620

- [55] MACHOVCOVÁ, Petra. *Využití biosensorů pro sledování účinnosti inhibitorů cholinesteras*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2013. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [56] HEJNAR, Ondřej. *Studium kinetiky a mechanismu inhibice cholinesteras inhibitory na bázi benzothiazolů*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [57] AMBLER, Zdeněk. Neurofyzologie a elektrodiagnostika nervosvalového přenosu. *Neurologie pro praxi* / [online]. 2010, **11**(2), 81-84 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2010/02/03.pdf>
- [58] H. FERREIRA-VIEIRA, Talita, Isabella M. GUIMARAES, Flavia R. SILVA a Fabiola M. RIBEIRO. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology* [online]. 2016, **14**(1), 101-115 [cit. 2023-04-01]. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X13666150716165726
- [59] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [60] VON BOHLEN UND HALBACH, O. a R. DERMIETZEL. *Neurotransmitters and neuromodulators : handbook of receptors and biological effects*; . 2. Wiley -Blackwell, 2006. ISBN 978-3527313075.
- [61] *Inhibice cholinesteráz vybranými sulfonamidy*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [62] POHANKA, Miroslav. Biosenzory založené na cholinesterasach. *Chemické listy* [online]. 2013, **107**, 121-125 [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_121-125.pdf
- [63] PICCIOTTO, Marina R., Michael J. HIGLEY a Yann S. MINEUR. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* [online]. 2012, **76**(1), 116-129 [cit. 2023-03-20]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2012.08.036

- [64] SILMAN, Israel a Joel L SUSSMAN. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2005, **5**(3), 293-302 [cit. 2023-03-20]. ISSN 14714892. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2005.01.014
- [65] LOCKRIDGE, O. a D.M. QUINN. Esterases. *Comprehensive Toxicology* [online]. Elsevier, 2010, 243-273 [cit. 2023-03-10]. ISBN 9780080468846. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00414-0
- [66] SOREQ, Hermona a Shlomo SEIDMAN. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2001, **2**(4), 294-302 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/35067589
- [67] CHATONNET, A a O LOCKRIDGE. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* [online]. 1989, **260**(3), 625-634 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2600625
- [68] DVIR, Hay, Israel SILMAN, Michal HAREL, Terrone L. ROSENBERRY a Joel L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2010, **187**(1-3), 10-22 [cit. 2023-03-23]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042
- [69] DVIR, Hay, Israel SILMAN, Michal HAREL, Terrone L. ROSENBERRY a Joel L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2010, **187**(1-3), 10-22 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042
- [70] Acetylcholinesterase. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>
- [71] ENGLISH, Brett A. a Andrew A. WEBSTER. Acetylcholinesterase and its Inhibitors. In: *Primer on the Autonomic Nervous System* [online]. Elsevier, 2012, s. 631-633 [cit. 2023-04-07]. ISBN 9780123865250. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386525-0.00132-3

- [72] COLOVIC, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIC, Tamara D. LAZAREVIC-PASTI, Aleksandra M. BONDZIC a Vesna M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315-335 [cit. 2023-04-10]. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [73] SUSSMAN, Joel L., Michal HAREL, Felix FROLOW, Christian OEFNER, Adrian GOLDMAN, Lilly TOKER a Israel SILMAN. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* [online]. 1991, **253**(5022), 872-879 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1678899
- [74] LOCKRIDGE, Oksana. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, **148**, 34-46 [cit. 2023-04-11]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- [75] FANG, Lei, Yongmei PAN, Jennifer L. MUZYKA a Chang-Guo ZHAN. Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, **115**(27), 8797-8805 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp112030p
- [76] DARVESH, Sultan, David A. HOPKINS a Changiz GEULA. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2003, **4**(2), 131-138 [cit. 2023-04-11]. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn1035
- [77] PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: important enzymes of human body. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)* [online]. 2004, **47**(4), 215–228 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://actamedica.lfhk.cuni.cz/media/pdf/18059694.2018.95.pdf>
- [78] JIRÁK, Roman. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* [online]. 2002, **2**, 55–58 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2002/02/11.pdf>

- [79] ANDERSEN, J. B., A. ENGELAND, J. F. OWE a N. E. GILHUS. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *European Journal of Neurology* [online]. 2010, **17**(12), 1445-1450 [cit. 2023-04-08]. ISSN 13515101. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03089.x
- [80] KOVÁŘOVÁ, Markéta. *Studium kinetiky inhibice cholinesteras*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [81] FOLCOVÁ, Veronika. *Biosenzory založené na cholinesteráze*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [82] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 4. Jinočany: H+H (H&H), 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [83] AUGUSTINSSON, K.-B. a B. HOLMSTEDT. Determination of Cholinesterase in Blood Samples Dried on Filter-Paper and Its Practical Application. *Scand J Clin Lab Invest* . [online]. 1965, **17**(6), 573-583 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0036-5513. Dostupné z: doi:10.1080/00365516509083366
- [84] DORŇÁKOVÁ, Dagmar. *Stanovení aktivity cholinesteráz v krvi s využitím dithiodipyridinu jako chromogenu*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [85] PROCHÁZKOVÁ, Klára. *Inhibice cholinesteras karbamátovými inhibitory*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [86] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [87] SEJPKOVÁ, Tereza. *Studium inhibitorů cholinesteras*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [88] THOMPSON, P. A., D. E. WRIGHT, C. E. COUNSELL a J. ZAJICEK. Statistical analysis, trial design and duration in Alzheimer's disease clinical trials: a review. *International Psychogeriatrics* [online]. 2012, **24**(5), 689-697 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1041-6102. Dostupné z: doi:10.1017/S1041610211001116

- [89] CAMPS, Pelayo a Diego MUNOZ-TORRERO. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimers Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2002, **2**(1), 11-25 [cit. 2023-04-05]. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/1389557023406638
- [90] JANN, Michael W., Kara L. SHIRLEY a Gary W. SMALL. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2002, **41**(10), 719-739 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200241100-00003
- [91] BRANDEJSOVÁ, Martina. *Příprava thiomocovin R-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl) ethana- minu a stanovení jejich inhibičních aktivit vůči enzymům*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [92] LOY, Clement a Lon SCHNEIDER. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. 2009, **2009**(1) [cit. 2023-03-20]. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD001747.pub3
- [93] TRINH, Nhi-Ha, Jennifer HOBLYN, Subhanjoy MOHANTY a Kristine YAFFE. Efficacy of Cholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neuropsychiatric Symptoms and Functional Impairment in Alzheimer Disease. *JAMA* [online]. 2003, **289**(2) [cit. 2023-03-20]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.289.2.210
- [94] SHAH, Shailaja a William E REICHMAN. Treatment of Alzheimer's disease across the spectrum of severity. *Clinical Interventions in Aging* [online]. 2006, **1**(2), 131-142 [cit. 2023-03-20]. ISSN 1176-9092. Dostupné z: doi:10.2147/ciia.2006.1.2.131
- [95] BATEMAN, Randall J, Paul S AISEN, Bart DE STROOPER et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* [online]. 2010, **3**(1) [cit. 2023-03-21]. ISSN 1758-9193. Dostupné z: doi:10.1186/alzrt59

- [96] CHEN, Yao, Zong-liang LIU, Ting-ming FU, Wei LI, Xiao-li XU a Hao-peng SUN. Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors with small core structures through shape-based virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* . [online]. 2015, **25**(17), 3442-3446 [cit. 2023-03-21]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2015.07.026
- [97] SCOTT, Lesley J. a Karen L. GOA. Galantamine. *Drugs* [online]. 2000, **60**(5), 1095-1122 [cit. 2023-02-23]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200060050-00008
- [98] BRYSON, Harriet M. a Paul BENFIELD. Donepezil. *Drugs and Aging* [online]. 1997, **10**(3), 234-239 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.2165/00002512-199710030-00007>
- [99] BRITAIN, Harry. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology Volume 37* [online]. 1. USA: Academic press, 2012 [cit. 2023-02-23]. ISBN 9780123977564. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/profiles-of-drug-substances-excipients-and-related-methodology/brittain/978-0-12-397220-0>
- [100] HARVEY, Alan L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacol Ther.* [online]. 1995, **68**(1), 113-128 [cit. 2023-03-20]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/0163-7258(95)02002-0
- [101] BAR-ON, P., C. B. MILLARD, M. HAREL, H. DVIR, A. ENZ, J. L. SUSSMAN a I. SILMAN. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry* [online]. 2002, **41**(11), 3555-3564 [cit. 2023-02-28]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi020016x
- [102] JIRÁK, R. a K. VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia* [online]. 2003, **13**, 372-378 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/lekove-profilu/rivastigminum-864/>
- [103] GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research* [online]. 2004, **50**(4), 433-440 [cit. 2023-02-24]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2003.11.017

- [104] FREEMAN, Shirley E. a R.M. DAWSON. Tacrine: A pharmacological review. *Progress in Neurobiology* [online]. 1991, **36**(4), 257-277 [cit. 2023-02-24]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0082(91)90002-I
- [105] QIZILBASH, Nawab, Jacqueline BIRKS, Jess LÓPEZ ARRIETA, Sarah LEWINGTON a Samuel SZETO. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. [cit. 2023-02-24]. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD000202
- [106] SUMMERS, W., G.M. MARSH, J.O. VIESSELMAN a K. CANDELORA. Use of THA in treatment of Alzheimer-like dementia: pilot study in twelve patients. *Biologická psychiatrie* [online]. 1981, **16**(2), 145-153 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/15972582_Use_of_THA_in_treatment_of_Alzheimer-like_dementia_Pilot_study_in_twelve_patients
- [107] WATKINS, P.B., H.J. ZIMMERMAN, M.J. KNAPP, S.I. GRACON a K.W. LEWIS. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* [online]. 1994, **271**(13), 992-8 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8139084/>
- [108] ELLMAN, George L., K.Diane COURTNEY, Valentino ANDRES a Robert M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1961, **7**(2), 88-95 [cit. 2023-03-23]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- [109] HOLAS, Ondrej, Kamil MUSILEK, Miroslav POHANKA a Kamil KUCA. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2012, **7**(12), 1207-1223 [cit. 2023-03-24]. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2012.729037
- [110] MIAO, Yuqing, Nongyue HE a Jun-Jie ZHU. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews* [online]. 2010, **110**(9), 5216-5234 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr900214c

- [111] *Stanovení kinetických parametrů acetylcholinesterázy*. Studentská 95, 532 10 Pardubice II, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [112] ZEMAN, J., D. VETCHÝ, A. FRANC a V. PITSCHMANN. Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. *Chemické listy* [online]. 2018, **112**(7), 434-439 [cit. 2023-03-24]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Jiri-Zeman-2/publication/326317122_Metody_imobilizace_enzymu_a_jejich_vyuziti_pro_optickou_kolorimetrickou_detekci_inhibitoru_cholinesteras/links/5b45a0bba6fdcc66191721ab/Metody-imobilizace-enzymu-a-jejich-vyuziti-pro-optickou-kolorimetrickou-detekci-inhibitoru-cholinesteras.pdf
- [113] Butyrylcholinesterase. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Butyrylcholinesterase>
- [114] SPEIGHT, James G. Sorption, Dilution, and Dissolution. *Reaction Mechanisms in Environmental Engineering* [online]. Elsevier, 2018, 165-201 [cit. 2023-04-20]. ISBN 9780128044223. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804422-3.00005-5
- [115] ERTL, Peter, Bernhard ROHDE a Paul SELZER. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2000, **43**(20), 3714-3717 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm000942e