

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Příprava reaktivátorů cholinesteras
modifikovaných halogenovou substitucí 1**

Bakalářská práce

Autor: Andrea Košvancová
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání
Biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: RNDr. Alena Uhríková, Ph.D.

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne 30. 4. 2015

Andrea Košvancová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala RNDr. Aleně Uhríkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při laboratorní syntéze i při sepisování této práce. Bez jejího dohledu a vstřícnosti by tato práce nevznikla.

Anotace

Práce se bude zabývat přípravou kvarterních reaktivátorů cholinesteras modifikovaných halogenovými substituenty. V teoretické části se bude zabývat současným poznáním ve skupině reaktivátorů cholinesteras. V praktické části bude připravena série sloučenin lišící se spojovacím řetězcem mezi heteroaromatickými jádry, které budou obsahovat část molekuly modifikovanou halogenovými substituenty. Připravené sloučeniny budou charakterizovány pomocí standardních metod (^1H NMR, ^{13}C NMR).

Klíčová slova

Acetylcholinesteráza, organofosfáty, reaktivátor, léčba

Annotation

The thesis will be focused on the preparation of quaternary cholinesterase reactivators modified by halogen moiety. The theoretical part will cover the current knowledge in cholinesterase reactivators family. The experimental part will consist in the preparation of novel compounds. This compounds will differ in the connecting chain and the heteroaromatic rings modified by halogen moieties. The prepared compounds will be characterized by standard methods (^1H NMR, ^{13}C NMR).

Keywords

Acetylcholinesterase, organophosphate, reactivator, treatment

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	10
1.1 Acetylcholin.....	10
1.2 Acetylcholinové receptory	10
1.2.1 Nikotinové receptory	11
1.2.2 Muskarinové receptory.....	11
1.3 Acetylcholinesteráza	12
1.3.1 Struktura molekuly.....	12
1.3.2 Inhibice acetylcholinesterázy	13
1.4 Organofosfáty	14
1.4.1 Mechanismus účinku nervově paralytických organofosfátů	15
1.5 Léčba otravy organofosfáty.....	16
1.5.1 Parasympatolytika.....	16
1.5.2 Antikonvulziva	16
1.5.3 Reaktivátory acetylcholinesterázy	17
1.6 Vybrané reaktivátory acetylcholinesterázy využívané proti intoxikaci organofosfáty	18
1.6.1 Pralidoxim	18
1.6.2 Biskvarterní komerční reaktivátory.....	18
1.6.3 Ostatní reaktivátory testované proti otravě OPP	19
2 Cíle práce.....	23
3 Výsledky a diskuse.....	25
3.1 Diskuse	25
3.1.1 Příprava monosubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím oximové seskupení.....	25
3.1.2 Příprava disubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím oximové seskupení.....	27
3.1.3 Příprava monosubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím amidovou funkční skupinu	29
3.1.4 Příprava monokvartérních sloučenin	30
3.2 Obecná syntetická část	31
3.3 Připravené stavební syntony.....	32
3.4 Připravené monokvartérní sloučeniny.....	33
3.5 Připravené biskvartérní sloučeniny.....	34

4	Závěr.....	39
5	Použitá literatura.....	40

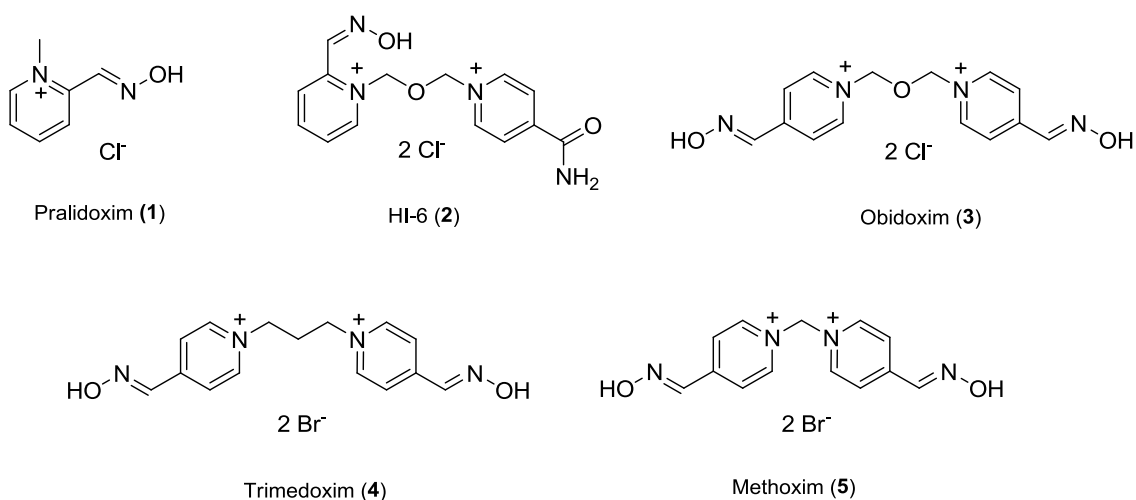
Seznam zkratk použitých v textu

AChE	acetylcholinesteráza
AcOH	kyselina octová
AV uzel	atrioventrikulární uzel
BuOH	butanol
cAMP	cyklický 3',5'- adenosinmonofosfát
CAT	cholinacetyltransferáza
CNS	centrální nervový systém
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
EtOAc	ethylacetát
Et ₂ O	diethyléter
EtOH	etanol
IP ₃	inozitoltrisfosfát
LDL ₀	letální smrtelná dávka
LT	laboratorní teplota
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MePOX	methylparaoxon
OPI	organofosfátový inhibitor
OPP	organofosfátový pesticid
PET	petrolether
POX	paraoxon

Úvod

Ačkoliv existuje mnoho přírodních a syntetických sloučenin, které inhibují enzym acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7), organofosfátové inhibitory (OPI) zůstávají jednou z nejnebezpečnějších a nejvíce zdraví škodlivých skupin sloučenin vyvinutých lidmi. Důvodem je kovalentně vázaná funkční skupina OPI na hydroxylovou funkční skupinu zbytku serinu uvnitř aktivní části enzymu. AChE tak není schopna rozštěpit neuromediátor acetylcholin [1] uvolněný při synaptickém přenosu [2], což má za následek trvalé aktivování muskarinových a nikotinových receptorů. Pokud není činnost AChE obnovena, dochází v organismu k centrální cholinergní krizi s periferními příznaky slzení, slinění či miózy [1]; smrt nastává v důsledku útlumu dechového centra a paralýzy dýchacích svalů [2].

Pro neutralizaci toxických účinků OPI jsou využívány různé léčby. Následná léčba zahrnuje oximové reaktivátory AChE v kombinaci s atropinem a diazepamem. Nejběžněji používané reaktivátory AChE jsou např. pralidoxim (1), HI-6 (2), obidoxim (3), trimedoxim (4) a methoxim (5) [1]. Tyto sloučeniny jsou schopny štěpit vazbu mezi OPI a AChE a jsou kauzální terapií při intoxikacích OPI [2].



Obrázek 1: Nejběžněji používané reaktivátory [1].

Mimo vojenské využití OPI, kdy sloužily jako nervově paralytické látky, existuje velká skupina sloučenin, které slouží jako organofosfátové pesticidy (OPP)

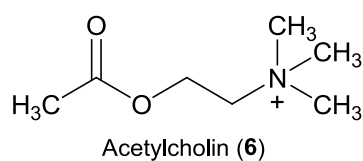
v zemědělství. Tudíž se intoxikace OPP stala velmi běžnou díky jejich celosvětovému používání. Navíc se OPP stávají prostředkem úmyslného či sebevražedného otrávení. Dohromady Světová zdravotnická organizace předpokládá 200 000 úmrtí ročně na otravu OPP [1].

Cílem této práce je příprava reaktivátorů cholinesteras modifikovaných halogenovou substitucí bromem.

1 Teoretická část

1.1 Acetylcholin

Acetylcholin (6, Obr. 2) je neurotransmitter, který odpovídá za přenos vzruchu v cholinergních synapsích [3]. Je tedy nejen transmitters na nervosvalové ploténce a v centrálním nervovém systému (CNS), ale i ve vegetativním nervovém systému, a to na všech pregangliových, parasymptických postgangliových a symptických postagnliových nervových zakončeních [4].



Obrázek 2: Acetylcholin (6) [5].

Syntéza acetylcholinu probíhá v cytoplasmě nervových zakončení [4]. Nezbytný acetylkoenzym A se tvoří v mitochondriích [3]. Jeho acetylová skupina je přenášena na cholin pomocí enzymu cholinacetyltransferázy (CAT), který je vytvářen v těle neuronu, odkud se axoplazmatickým transportem dostává do nervových zakončení. Cholin je získáván z extracelulární tekutiny pomocí nosiče; tím je limitována rychlost syntézy acetylcholinu [4]. Acetylcholin je koncentrován do vezikul o průměru kolem 40 nm [3].

Vlivem stoupajícího akčního potenciálu stoupne cytoplazmatická koncentrace vápenatých iontů [4], membrána vezikul s acetylcholinem splyne s presynaptickou membránou, acetylcholin se vylije do synaptické štěrby a váže se na receptory. Ty jsou dvojího druhu – nikotinové a muskarinové [3]. Jakmile acetylcholin splnil úlohu informačního posla, je nutné zajistit jeho hydrolýzu, protože nerozštěpený neurotransmitter brání opětovné repolarizaci. Za hydrolýzu zodpovídá acetylcholinesteráza [3].

1.2 Acetylcholinové receptory

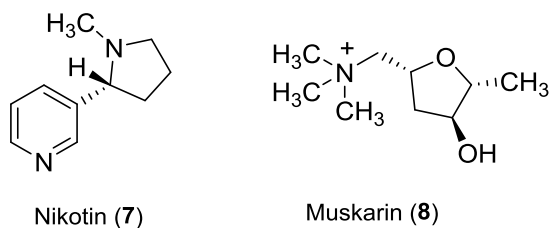
Existují dva hlavní typy receptorů pro acetylcholin. Jejich název vyplývá ze jmen alkaloidů, jež mají aktivující účinek pro tyto receptory [4] a jsou agonisty

acetylcholinu [5]. Jedná se tedy o nikotinové a muskarinové cholinergní receptory [4]. Oba acetylcholinové receptory mohou být blokovány, tlumeny nebo aktivovány různými endogenními a cizorodými látkami [3].

1.2.1 Nikotinové receptory

Nikotin (7, Obr. 3) je známým tabákovým alkaloidem [5].

Nikotinové receptory se nalézají v nervosvalové ploténce – svalový typ N_M , který umožňuje přenos signálu mezi buňkami svalu a nervu. Druhý typ nikotinových receptorů se vyskytuje v sympatických gangliích – nervový typ N_N , kde dochází k přenosu vzruchů mezi jednotlivými neurony [4]. Oba typy receptorů se skládají z pěti homogenních podjednotek, které se však liší dle typu receptoru, a mají dvě vazebná místa pro acetylcholin [3]. Oba typy se shodují v tom, že jsou současně cholinergními receptory a kationtovými kanály, tedy ionotropními receptory [4].



Obrázek 3: Nikotin (7) a Muskarin (8) [5].

Vazbou acetylcholinu se otevřou poměrně široké kanály pro Na^+ a K^+ , a to na velmi krátkou dobu (1 – 2 ms) [3]. Dochází k influxu (vtoku) Na^+ a Ca^{2+} do buňky [4], naopak k úniku K^+ z buňky [3]. Tím se depolarizuje postsynaptická membrána [3] a vzniká excitační postsynaptický potenciál, který jakmile překročí práh, vyvolá na postsynaptické části akční potenciál [4]. Jedná se o receptory velmi rychle reagující [3].

Výsledkem dráždění nikotinových receptorů v mozku je vyšší bdělost, naopak nižší dráždivost a agresivita. Ve svalech vyvolává dráždění nikotinových receptorů záškuby nebo jemný třes [5].

1.2.2 Muskarinové receptory

Název muskarinového receptoru je odvozen od muskarinu (8, Obr. 3). Jedná se o jed muchomůrky červené (*Amanita muscaria*) [5].

Stavba muskarinového receptoru je jiná než nikotinového. Tvoří jej bílkovinný řetězec, který se v meandrovitém uspořádání proplétá membránou neuronu, spolupracuje s G-proteiny a vytváří druhého posla (podle typu receptoru cAMP nebo IP₃), výsledkem je pak změna koncentrace Ca²⁺ [3] a pozdní excitační postsynaptický potenciál [4]. Z důvodu nepřímého ovlivnění synaptického přenosu skrze G-proteiny pracuje tento receptor pomaleji [4]. Je charakterizován dlouhou dobou latence (100 ms) a jeho účinek trvá 300 – 500 ms [3].

Existuje několik typů muskarinových receptorů. M₁ receptor se nalézá ve vegetativních gangliích, v CNS a v buňkách exokrinních žláz. Coby druhého posla v postgangliovém neuronu využívá IP₃, jenž způsobí influx Ca²⁺ a pozdní excitační postsynaptický potenciál. M₂ receptor vyskytující se v srdci vyvolává prostřednictvím G-proteinu otevření určitých K⁺-kanálů sinusového a AV-uzlu v srdeční síni a tím působí na srdce negativně chronotropně a dromotropně. M₃ se nachází na hladké svalovině, kde vazba acetylcholinu vyvolává prostřednictvím podobných reakcí jako u typu M₁ influx Ca²⁺ a tím kontrakci [4].

1.3 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7; AChE) je přirozeným enzymem v lidském těle pro degradaci acetylcholinu a terminaci neurotransmise [6]. Je umístěna v synaptické štěrbině v síťovině kolagenních vláken a glykosaminoglykanů [3], kde se na serinový zbytek v aktivním místě enzymu váže acetylcholin [1]. Produktem hydrolýzy je cholin, který se pak vrací do presynaptického neuronu, a acetylový zbytek, jenž s vodou reaguje za vzniku acetátu. Ten se případně nové syntézy acetylcholinu neúčastní, východiskem pro novou syntézu je vždy jen acetylkoenzym A [3]. AChE není substrátově zcela specifická, protože štěpí rovněž jiné estery cholinu, např. butyrylcholin [3].

1.3.1 Struktura molekuly

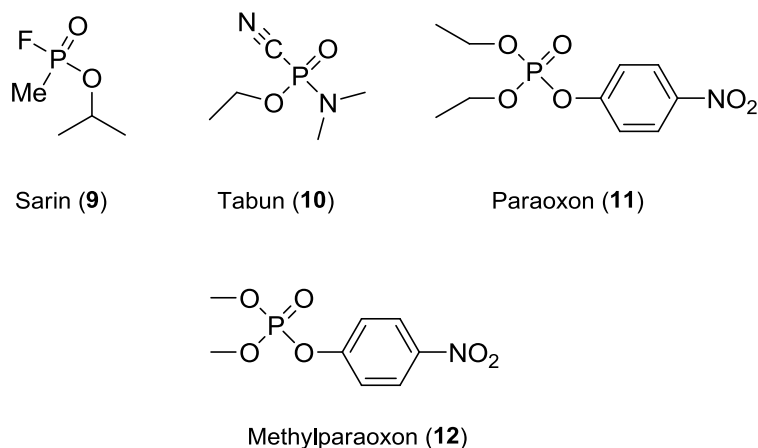
Monomer enzymu AChE je bílkovina skládající se z 537 aminokyselin. Základem struktury je 12 β-skládaných listů obklopených 14 α-helixy. Molekula proteinu je tvořena aromatickou štěrbinou, kde je lokalizováno aktivní místo, a vnějším anionickým místem stavbou odlišným od místa aktivního. Modelování vazby acetylcholinu na AChE naznačuje, že kvartérní amoniový iont acetylcholinu není

vázán k záporně nabitému anionickému místu, ale je přitahován aromatickými zbytky lemujícími aromatickou štěrbinu [7].

Aktivní místo AChE obsahuje dvě podjednotky. Anionická podjednotka je tvořena aminokyselinami fenylalaninem (Phe330 a Phe331) a tryptofanem (Trp84). Zbytek tryptofanu mění orientaci nabité části acetylcholinu, která následně vstupuje do aktivního centra, kde je schopna se vázat [7]. Esteratická podjednotka je právě místem, kam se váže kvartérní oblast acetylcholinu. Je tvořena katalytickou triádou složenou z aminokyselin. Složení aminokyselin je neobvyklé, protože místo kyseliny asparagové je zde společně se serinem (Ser200) a histidinem (His440) obsažena kyselina glutamová (Glu327). Díky této změně je triáda podobná jiným serinovým proteázám [7].

1.3.2 Inhibice acetylcholinesterázy

AChE může být inhibována mnoha přírodními nebo uměle připravenými sloučeninami. Mezi umělé inhibitory patří organofosfáty (OPI). Do této skupiny látek se zahrnují nervové činitele (např. sarin (**9**, Obr. 4), tabun (**10**, Obr. 4)), OPP (např. paraoxon (POX, **11**, Obr. 4), methylparaoxon (MePOX, **12**, Obr. 4)) nebo mimičtí činitele nezvratně tlumící aktivní místo AChE [6].



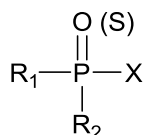
Obrázek 4: Vybrané organofosfátové inhibitory [6].

Nejprve dochází k vytvoření kovalentní vazby inhibitoru s enzymem, která již téměř nelze hydrolyzovat [3]. Následně mohou být inhibitory degradovány a koordinovány v rámci aktivního místa AChE, kde dochází k vzájemnému působení se zbytky aminokyselin fenylalaninu a histidinu [6]. Celkový vliv inhibitorů zapříčiní nezvratné tlumení činnosti AChE [6]. Společně s tím dochází ke zvýšení

koncentrace acetylcholinu na efektorech parasymptiku (muskarinové receptory), ve vegetativních gangliích (neuronální nikotinové receptory) a na nervosvalové ploténce (muskulární nikotinové receptory) [8]. Takováto konstantní stimulace acetylcholinem vede zprva k symptomům zapříčiněným muskarinovými (mióza, slinění, slzení) a následně nikotinovými receptory (svalová fascikulace). Následně vzniká cholinergní krize doprovázená centrálními nervovými symptomy, které vrcholí útlumem dýchacího centra v prodloužené míše [6] a paralýzou dýchacích svalů [2], což vede ke smrti organismu [6].

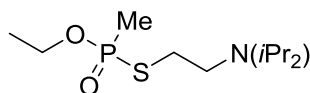
1.4 Organofosfáty

Organofosfáty jsou organické sloučeniny fosforu [2], přesněji deriváty kyselin fosfonové, fosforečné [5] nebo jejich thioanalogů majících menší toxické účinky [9]. Chemickou strukturu vystihuje obecný Schraderův vzorec pro organofosforové sloučeniny (Obr. 5), kde zbytky R₁ a R₂ jsou zpravidla vodík, alkyl, aryl, alkoxy, alkylthio a amino skupiny, X je většinou odstupující skupina jako halogen, kyano, alkylthio skupina nebo zbytek organické či anorganické kyseliny [9].



Obrázek 5: Schraderův vzorec kyseliny [9].

Zprvu byly vyvinuty jako insekticidy pro zemědělské účely. I zde mohou vyvolávat náhodné otravy, ale jejich následky se nevyrovnají extrémně toxickým nervově paralytickým jedům [3], které byly vyrobeny jako bojové látky (např. sarin (**9**, Obr. 4) a látky typu VX (**13**, Obr. 6)) [5].



VX (**13**)

Obrázek 6: Struktura inhibitoru AChE VX (**13**) [5].

Organofosfáty se vyznačují rychlým nástupem účinku [2]. Ke smrtelné otravě může dojít inhalací par, aerosolu nebo i prostupem neporušenou kůží. Například pro látku VX byla u člověka zaznamenána LD₀ 86 µg/kg při vstupu přes kůži [5].

Kromě negativního bojového využití mají sloučeniny stejné základní struktury využití v průmyslu jako změkčovadla, ve farmakologii a medicíně coby léčiva či v zemědělství jako již zmíněné insekticidy [2].

1.4.1 Mechanismus účinku nervově paralytických organofosfátů

Základním mechanismem účinku nervově paralytických organofosfátů je ovlivnění cholinergního nervového systému prostřednictvím inhibice účinku AChE [10]. Tyto sloučeniny se kovalentně napojují na hydroxylovou skupinu serinu v enzymové molekule, a to tak silnou vazbou, že by vydržela v těle i řadu týdnů [3]. Poté dochází k odštěpení odstupující skupiny, nejčastěji halogenu X, a výsledkem je fosforylovaný enzym, který je vcelku stabilní a jeho defosforylace je velmi pomalá. Dokonce probíhá pomaleji než syntéza enzymu *de novo* [10].

Příkladem je reakce AChE s fluorfosfonátem (Schéma 1), který patří k ireverzibilním inhibitorům. Opět dochází k vazbě na serinový hydroxyl v acetylcholinovém receptoru. Esterová funkční skupina ve vzniklém fosforylovaném serinu se poměrně snadno hydrolyzuje [5]. Tomuto ději se říká stárnutí enzymu (dealkylace) [6], která závisí na délce kontaktu enzymu s OPI a na jeho chemické struktuře [2]. Na aktivním místě enzymu tak zůstane navázán fosfonátový anion, který je vůči hydrolýze rezistentní [5]. Inhibovaná AChE se tak změnila do tzv. nereaktivovatelné formy [2].

Důsledkem inhibice AChE je nahromadění acetylcholinu na cholinergních receptorech a vznik akutní cholinergní krize (viz kap. 1.3.2) [2].

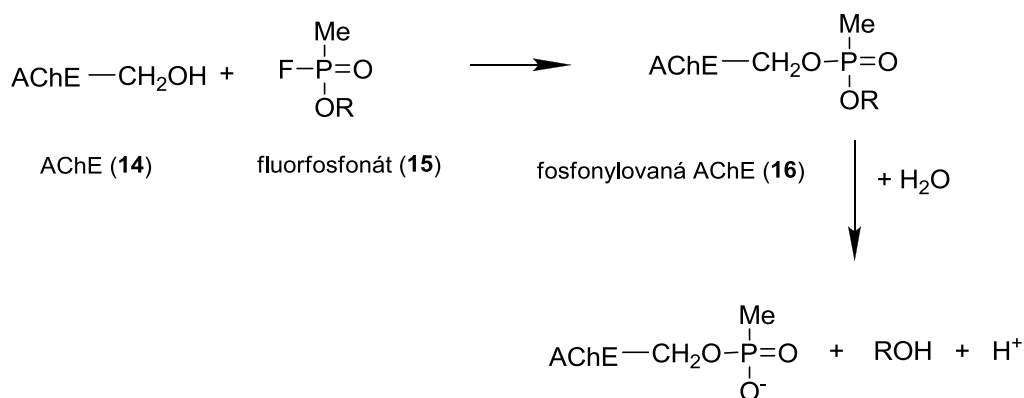


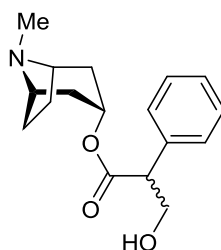
Schéma 1: Ireverzibilní inhibice AChE fluorfosfonáty [5].

1.5 Léčba otravy organofosfáty

Při léčbě intoxikace organofosfáty se využívají dvě různé strategie. První z nich předchází intoxikaci a využívá preventivních léků. Pro ochranu AChE před navázáním OPI se využívá reverzibilních inhibitorů (např. pyridostigmin, galanthamin) nebo oximových reaktivátorů AChE (např. **2**) [6]. Naopak léčba po vystavení se OPI zahrnuje parasympatolytika (např. atropin), oximové reaktivátory (např. **1, 2 a 4**) a antikonvulziva (např. diazepam) [1].

1.5.1 Parasympatolytika

Parasympatolytika zvaná též anticholinergika zabraňují nadměrné stimulaci cholinergních receptorů tím, že působí jako antagonisté acetylcholinu [11]. Svou vazbou znemožňují navázání uvolněného acetylcholinu na tyto receptory [2]. Parasympatolytičtí činitelé společně s antikonvulzivy jsou využívány coby léčba symptomatická [6]. Znamená to, že odstraňují pouze projevy otravy, nikoliv její příčiny [2]. Účinným parasympatolytikem, jež se podává při prvních příznacích otravy, je atropin (**17**, Obr. 7) [2].



Atropin (**17**)

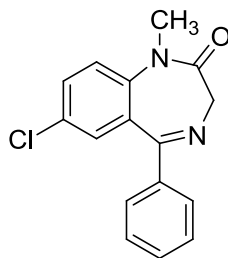
Obrázek 7: Atropin (**17**) [5].

Ve chvíli, kdy odezní první příznaky jako mydriáza, zčervenání kůže, tachykardie, je nutné podat lék s centrálním antimuskarinovým účinkem, např. benaktyzin [2].

1.5.2 Antikonvulziva

Do skupiny antikonvulziv patří benzodiazepiny, jejichž nejdůležitějším zástupcem je diazepam (**18**, Obr. 8). Účinkem diazepamu v CNS je omezení opakujícího se vzniku akčních potenciálů na postsynaptické membráně skrze hyperpolarizace membrán neuronů [11]. Ty jsou posléze méně citlivé vůči

acetylcholinem navozené depolarizaci. Projevem úspěšné terapie antikonvulzivy je zastavení klonálních křečí svaloviny [11].



Diazepam (18)

Obrázek 8: Diazepam (18) [12].

1.5.3 Reaktivátory acetylcholinesterázy

Zatímco předchozí dvě terapie byly léčbou symptomatickou, oximové reaktivátory AChE se pokoušejí přímo čelit příčinám intoxikace organofosfáty. Mechanismus této reaktivity spočívá ve schopnosti oximu rozštěpit vazbu organofosfátu na hydroxylové skupině serinu. Nukleofilní část oximu je orientována k aktivnímu místu enzymu; napadá jeho fosforylovanou část za vzniku fosforylovaného oximu. Coby hlavní produkt vzniká AChE, u níž dochází k obnově její vitální funkce [6].

Limitace využití oximů při léčbě otrav organofosfáty je v neschopnosti reaktivovat již „zestárlý“ enzym. Dalším negativem je fakt, že ani jeden oxim není schopen navázat různé organofosfátové zbytky. Proto struktura oximu určuje jeho schopnost obnovit funkci AChE v závislosti na typu organofosfátu, který ji tlumí [6].

Obvyklá léčba intoxikace OPI celosvětově využívá 5 komerčních sloučenin: pralidoxim, HI-6, obidoxim, trimedoxim a methoxim [1]. Nutno říci, že OPP inhibují aktivní složku AChE jinak než nervoví agenti [1]. Z toho důvodu jsou oximy **1** a **2** výbornou terapií pro otravu nervovými činidly, naopak jsou nedostateční při léčbě otrav OPP [6].

1.6 Vybrané reaktivátory acetylcholinesterázy využívané proti intoxikaci organofosfáty

1.6.1 Pralidoxim

Pralidoxim (**1**, Obr. 1) byl poprvé popsán Wilsonem a kol. v roce 1955. Jeho účinky v oblasti reaktivace AChE byly rychlejší než u hydroxylaminu, jež byla první látka schopná odštěpit organofosfátové zbytky tlumící AChE [1].

Ačkoliv byl pralidoxim první dostupnou oximovou sloučeninou pro léčbu intoxikace organofosfáty a je v současnosti nejčastěji používanou, je jeho schopnost reaktivace AChE po intoxikaci OPP spíše nízká. Kromě nízkého reaktivačního účinku je i značně omezené spektrum působení této látky. Pro zvýšení účinnosti je využívána léčebná kombinace látky **1** a atropinu, u které bylo zaznamenáno značné zvýšení aktivity AChE [1].

1.6.2 Biskvarterní komerční reaktivátory

Následně po vytvoření pralidoximu byly vyvinuty biskvarterní reaktivátory, primárně zaměřené na léčbu intoxikace nervovými činiteli. Avšak v posledním desetiletí se jejich potenciál v léčbě vystavení OPP stal středem zájmu kvůli rostoucí zemědělské produkci a teroristickým útokům [1].

Výzkum zkoumal vliv sloučenin HI-6 (**2**, Obr. 1), obidoximu (**3**, Obr. 1) a trimedoximu (**4**, Obr. 1) na AChE inhibovanou různými organofosfáty (nervovými činiteli či pesticidy). Zmíněné biskvarterní komerční reaktivátory byly shledány svými účinky při léčbě intoxikace OPP jako daleko efektivnější než **1** [1]. Oxim **2** byl dříve považován za reaktivátor s nejširším spektrem účinnosti při zásahu nervovými agenty. Nicméně tato sloučenina nedokáže reaktivovat AChE v případě zasažení tabunem (**10**, Obr. 4)[6]. Navíc bylo zjištěno, že v případě intoxikace OPP vykazuje malou nebo vůbec žádnou reaktivační schopnost [1]. Na druhou stranu sloučeniny **3** a **4** byly shledány jako nejlepší terapeutické sloučeniny při zasažení OPP. Zejména obidoxim je v kombinaci s atropinem a diazepamem díky pozitivním klinickým výsledkům preferovanou sloučeninou [1].

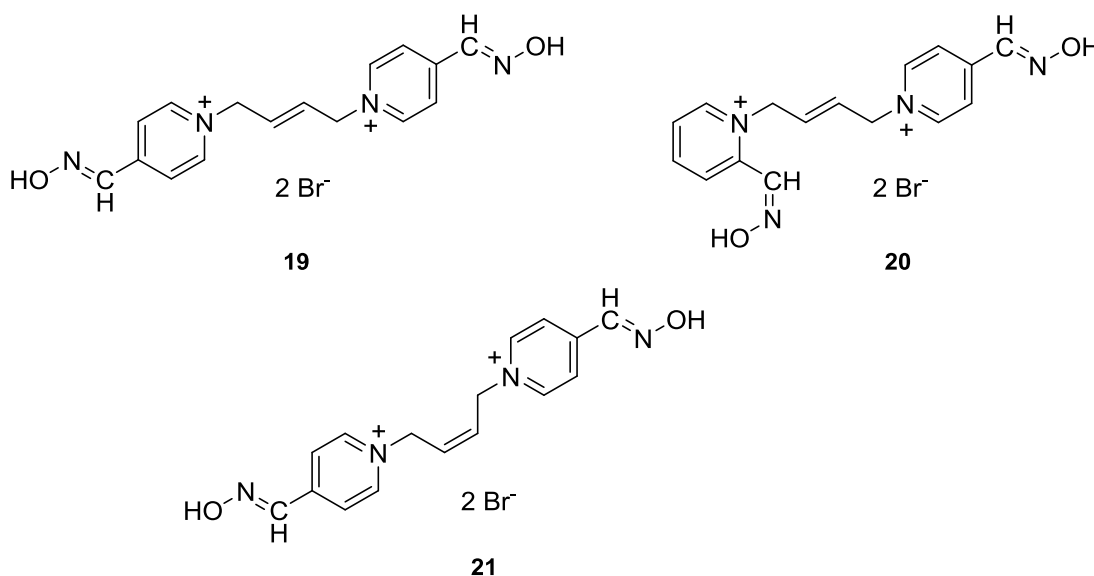
1.6.3 Ostatní reaktivátory testované proti otravě OPP

Mimo dobře známé komerčně používané sloučeniny (1-5) existuje nespočet vhodných reaktivátorů proti intoxikaci OPI, zejména OPP [1]. Dále budou zmíněny nově připravené látky, jež se od sebe liší počtem oximů. Konkrétně se jedná o bis-oxim bispiridinium a mono-oxim bispiridinium reaktivátory [5].

1.6.3.1 Bis-oxim bispiridinium reaktivátory

Mnohé pokusy byly provedeny skupinou Ilse Hagedorna. Testy ukázaly, že nejlepším reaktivátorem POX-inhibované AChE je obidoxim. Bylo připraveno mnoho analogů látek 3 a 4 s proměnlivou pozicí oximové části. Schopnost terapie všech těchto nových sloučenin proti POX-inhibici byla však shledána nižší v porovnání s účinností látky 3 [1].

Musílek a kol. připravili (E)-but-2-enem symetricky a nesymetricky propojené sloučeniny. Nové oximy byly testovány na AChE inhibované pesticidem chlorpyrifos-oxonem a jejich účinky byly porovnány s účinky látek 1-5. Oxim 19 (Obr. 9) vykázal reaktivaci porovnatelnou s látkami 3 a 4 [1].



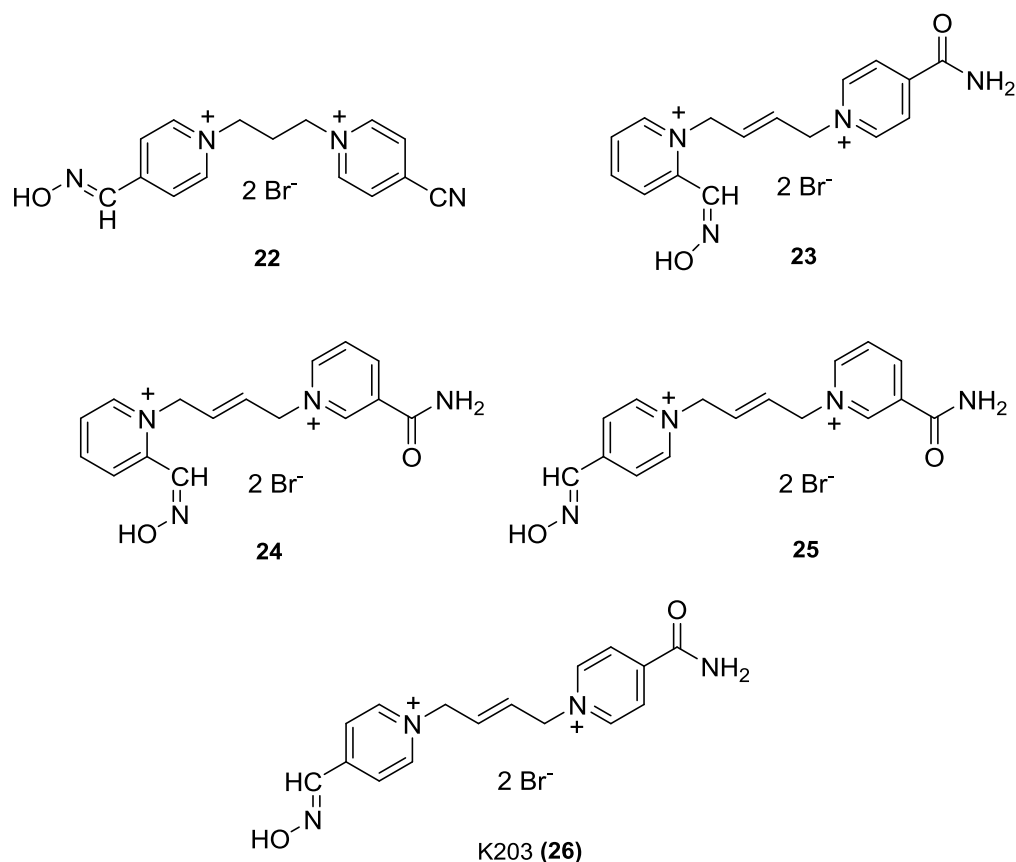
Obrázek 9: Reaktivátory připravené propojením (E)-but-2-enem (19, 20) a (Z)-but-2-enem (21) [1].

Oxim 20 (Obr. 9) je dokonce předčil ve vybraných podmínkách. Dále stejný autor a kol. změnili prostorovou orientaci na (Z)-but-2-en. Takto připravené látky byly testovány na POX-inhibované AChE a dále porovnávány s oximy 1-3 a 19.

Oxim **21** (Obr. 9) byl porovnatelný s **19** a vyšel s lepším účinkem jak sloučenina **3** [1].

1.6.3.2 Mono-oxim bispyridinium reaktivátory

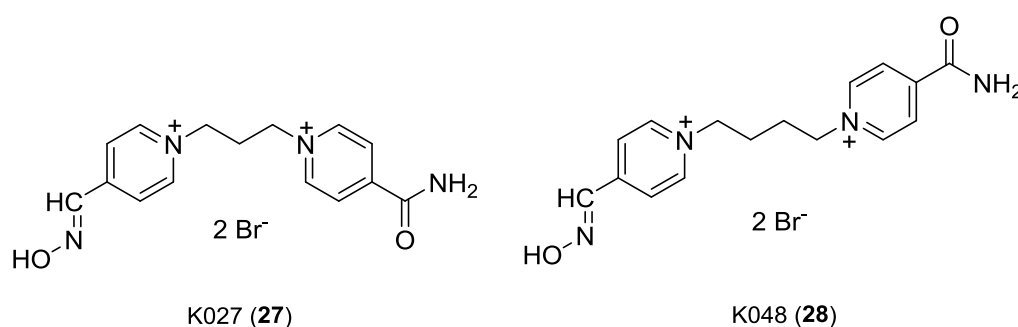
Se změnou z bis-oximových na mono-oximové sloučeniny připravili Musílek a kol. sérii oximů nesoucích kyanidový podíl. Testy probíhaly na POX-inhibované AChE a látky byly porovnávány s reaktivátory **1-3**. Pouze oxim **22** (Obr. 10) vykázal alespoň nějakou reaktivační schopnost, která však byla zanedbatelná v porovnání s **3** [1].



Obrázek 10: Vybrané mono-oximové reaktivátory [1].

Nicméně sloučeniny **23** (Obr. 10) a **24** (Obr. 10) ze skupiny sloučenin mono-oximů propojených (E)-but-2-enem s karbamoylovou skupinou vykazovaly v případě POX-inhibované AChE porovnatelné hodnoty jako sloučenina **3** a oxim **25** (Obr. 10) ji dokonce předčil. Nebylo překvapením, že oxim s označením K203 (**26**, Obr. 10) vykázal pouze průměrnou reaktivaci POX, ačkoliv je v současnosti považován za velmi slibnou sloučeninu proti otravě tabunem [1].

Kuča a kol. zveřejnili dva účinné reaktivátory proti tabunem inhibované AChE označené jako K027 (**27**, Obr. 11) a K048 (**28**, Obr. 11). Tyto mono-oximy s karbamoylovým zbytkem a alifatickým spojením byly dále testovány s rozdílnými OPP (POX a MePOX) v porovnání s komerčními látkami **1-3** a **5**. Při testování těchto dvou sloučenin na POX-inhibované AChE se látka K027 projevila jako mnohem kvalitnější sloučenina v porovnání s komerčními oximy. Co se týče inhibice AChE pomocí MePOX obě látky K027 i K048 vykázaly mnohem lepší ochranné schopnosti než oximy **1-3** a **5**. Navíc oxim K027 vykázal velmi nízkou toxicitu, tudíž nabízí i možnost vyššího dávkování [1].



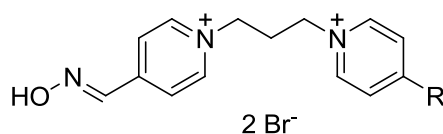
Obrázek 11: Mono-oximové reaktivátory K027 (**27**) a K048 (**28**) [1].

1.6.3.3 Nové reaktivátory syntetizované ze sloučenin K203 a K027

Nové reaktivátory AChE vzešly ze sloučenin K203 (**26**, Obr. 10) a K027 (**27**, Obr. 11). Povaha byspyridinium této molekuly zůstala konzistentní. Byla uchována i jedna polovina oximu v pozici 4, která je nezbytná pro reaktivaci. Stejně tak i prop-1,3-diyl vazba, která je ve sloučenině **27**, byla shledána jako nejslibnější pro reaktivaci AChE zasažené tabunem nebo OPI. Non-oxim pyridinium kruh byl substituován v pozici 4 různými hydrofilními (např. hydroxymetyl, karboxyl, nitril) nebo hydrofobními zbytky (např. metyl, *tert*-butyl, fenyl) [6].

Reaktivace AChE tlumené tabunem pomocí komerčních reaktivátorů byla již dříve shledána obtížnou. Užité sloučeniny **1**, **2** a **5** se ukázaly jako nevhodné, naopak sloučeniny **3** a **4** se považují za nejlepší reaktivátory mezi komerčně dostupnými sloučeninami. Dříve připravené oximy **26** a **27** disponují různými schopnostmi. Oxim **27** je chudším reaktivátorem v porovnání s látkou **26**. Nově připravené látky bohužel nedosahují výsledků oximu K203, proto je považován za významnou sloučeninu při léčbě otravy tabunem [6].

S ohledem na POX-inhibici AChE jsou komerční sloučeniny **1**, **2** a **5** neúčinné. Na druhou stranu sloučeniny **3** a **4** byly shledány jako dobré reaktivátory, v porovnání s nimi mají látky **26** a **27** srovnatelnou nebo nižší reaktivační schopnost. Pět nově připravených mono-oximů (**29**, **34**, **36**, **37** a **38**, Tab. 1) ukázalo různost reaktivačních schopností vůči POX-inhibici a bylo shledáno lepšími reaktivátory než komerčně dostupné sloučeniny **3** a **4**. Z uvedených sloučenin **37** prokazuje dvakrát větší schopnost reaktivace v porovnání se standardními sloučeninami **3** a **4**, což ji činí obzvláště zajímavou pro další testování [6].



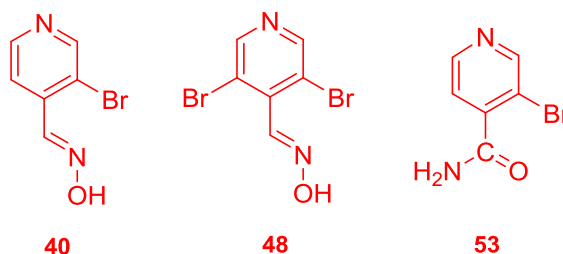
Látka	R	Látka	R
29	Me	34	COOH
30	<i>terc</i> -butyl	35	COOEt
31	fenyl	36	CN
32	CH ₂ OH	37	C(NH ₂)=NOH
33	COMe	38	3,4-CONH ₂

Tabulka 1: Struktura nově připravených mono-oxim reaktivátorů [6].

Pro MePOX-inhibovanou AChE vykázaly komerční sloučeniny **1**, **2** a **5** opět chudší reaktivační schopnost v porovnání s oximy **3** a **4**. Stejně tak reaktivační schopnost látek **26** a **27** se ukázala slibnou, ale v porovnání s **3** a **4** byly jejich účinky spíše nižší. Z nově připravených mono-oximů vykázala slibnou schopnost reaktivace opět sloučenina **37**. Stává se tedy kandidátem pro další testování a hodnocení [6].

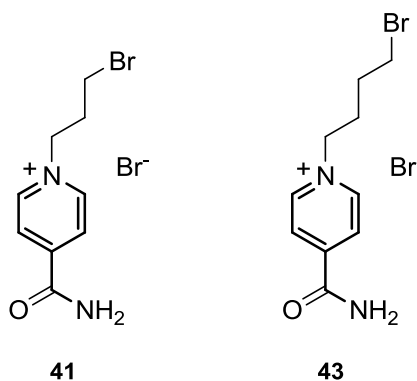
2 Cíle práce

Prvním důležitým cílem této práce byla příprava stavebních templátů – oximů **40** a **48** a amidu **53** (viz Obr. 12).



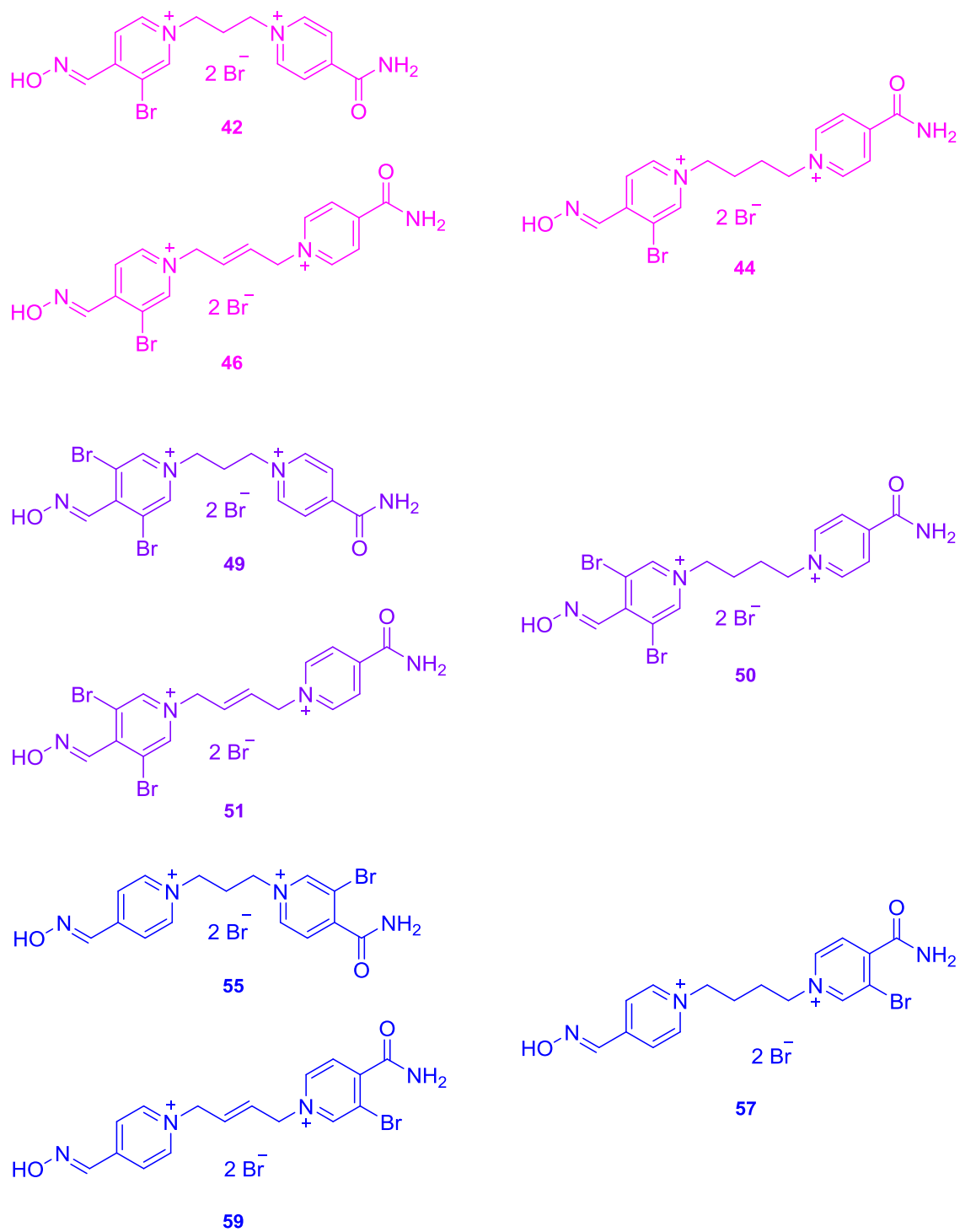
Obrázek 12: Stavební syntony **40**, **48** a **53**.

Druhým neméně důležitým výstupem této práce je příprava monokvartérních bromidů **41** a **43** (viz Obr. 13).



Obrázek 13: Monokvartérní bromidy **41** a **43**.

Posledním pro výzkum reaktivátorů nevýznamnějším cílem byla příprava nových sloučenin, které by vykazovaly aktivitu při reaktivaci AChE. Pro tyto sloučeniny se staly výchozími oximy **40** (reaktivátory **42**, **44**, **46**) a **48** (reaktivátory **49** – **51**) a amid **53** (reaktivátory **55**, **57** a **59**). Všechny připravené reaktivátory přehledně předkládá Obr. 14.



Obrázek 14: Plánované reaktivátory AChE 42, 44, 46, 49 - 51, 55, 57 a 59.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Diskuse

V této práci bylo navázáno na snahu syntetizovat nové účinné reaktivátory AChE, které by svými schopnostmi předčily komerčně dostupné reaktivátory **1 - 5**. Předlohou pro nově vznikající látky byly sloučeniny: **26**, **27** a **28** [6], jejichž pyridinový skelet byl substituován halogeny, v tomto případě bromem.

Celkem byly připraveny tři série po třech různých reaktivátorech AChE substituovaných bromem, kde se v rámci jednotlivých sérií připravené látky od sebe lišily spojovacím řetězcem, počtem a polohou bromových substituentů. Nejprve bylo třeba připravit stavební syntony za použití běžně dostupných komerčních sloučenin. Následně z nich byly syntetizovány biskvartérní reaktivátory AChE.

3.1.1 Příprava monosubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím oximové seskupení

Příprava stavebního templátu a všech konečných reaktivátorů monosubstituovaných bromem byla provedena dle schématu 2. Výchozí látkou byl aldehyd **39**, z něhož byl přidavkem hydroxylamin hydrochloridu a pyridinu v prostředí etanolu (90°C, 3 hodiny) připraven oxim **40**. Produkt byl izolován se 100% výtěžkem bez dalšího přečištění. Tato látka se stala výchozí pro 3 konečné reaktivátory **42**, **44** a **46**.

Další fází syntézy byla příprava látky **42** (Schéma 2), která vznikla společnou reakcí látek **40** s **41** v DMF při 60°C trvajícím 228 hodin. Reakční směs byla převrstvena acetonem. Detekcí TLC bylo zjištěno, že připravený produkt obsahuje nečistoty, proto byla nutná purifikace s využitím MeCN při 90°C po dobu 1 hodiny. Výtěžek reakce byl velmi malý (10%), z toho důvodu byla reakce opakována dle stejného postupu. Výsledek druhé reakce není znám, protože v době odevzdávání práce byla látka přečišťována.

S použitím shodných podmínek (DMF, 60°C) byla připravena látka **44** (Schéma 2), kde jako výchozí látky byly využity sloučeniny **40** a **43**. I v tomto případě reakce

probíhala po 228 hodin a reakční směs byla převrstvena acetonem. Opětovně bylo provedeno čištění získané směsi za použití MeCN (90°C, 1 hodina). Nakonec byl získán produkt s výtěžkem 27%.

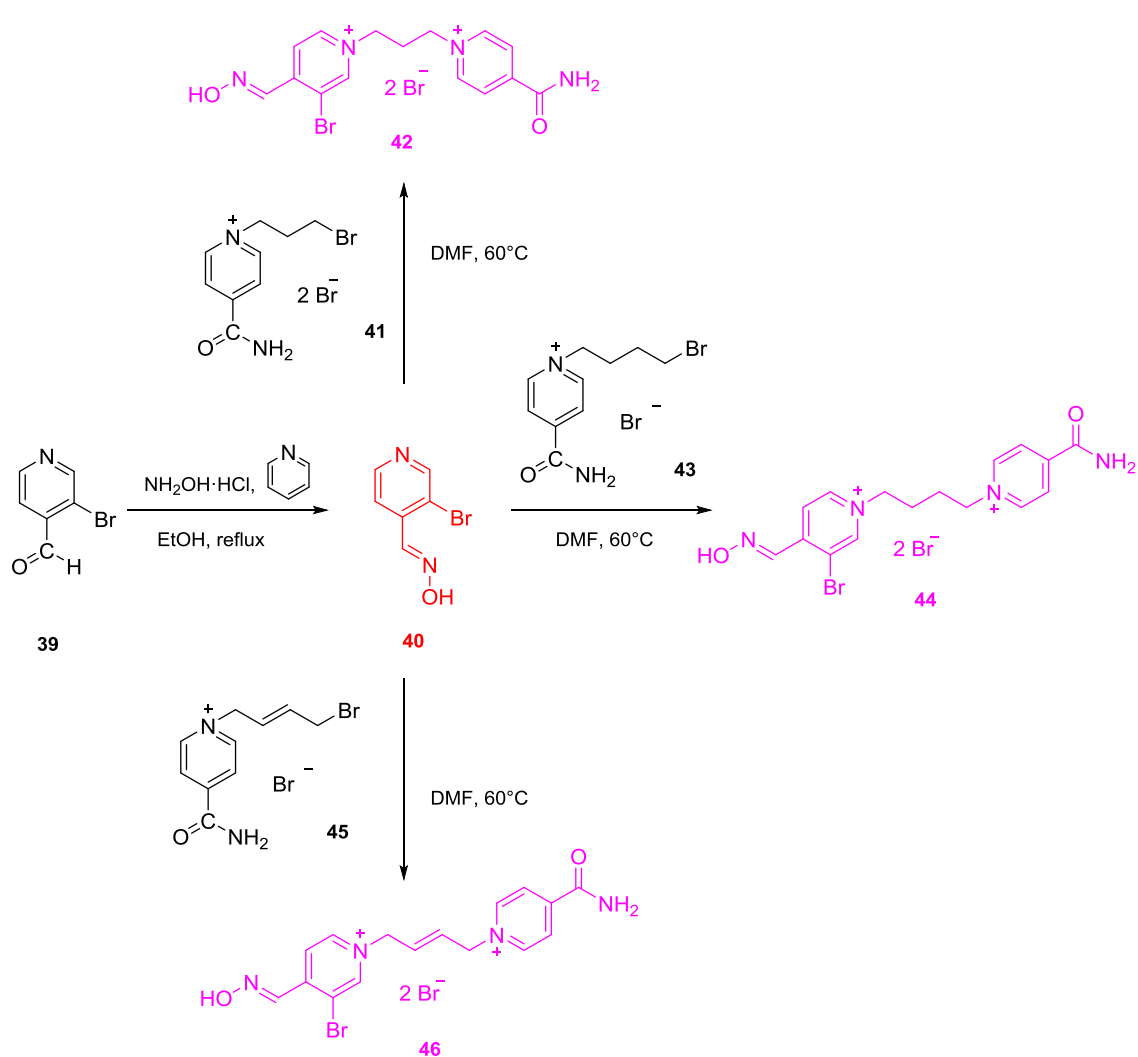


Schéma 2: Příprava reaktivátorů **42**, **44** a **46**.

Pro kompletnost první série byla realizována příprava produktu **46** (Schéma 2), při které byly použity stavební templáty **40** a **45**. Reakce opět probíhala v prostředí DMF (60°C). Tentokrát byl reakční čas výrazně zkrácen (42 hodin). Látka obsahovala stopy výchozích látek, z toho důvodu bylo potřebné přečištění stejným způsobem jako v předešlých reakcích. Produkt byl získaný v čisté krystalické formě s výtěžkem 54%.

3.1.2 Příprava disubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím oximové seskupení

Syntéza výchozího oximu **48** obsahujícího dva atomy bromu a konečných disubstituovaných reaktivátorů AChE **49-51** byla uskutečněna dle schématu 3.

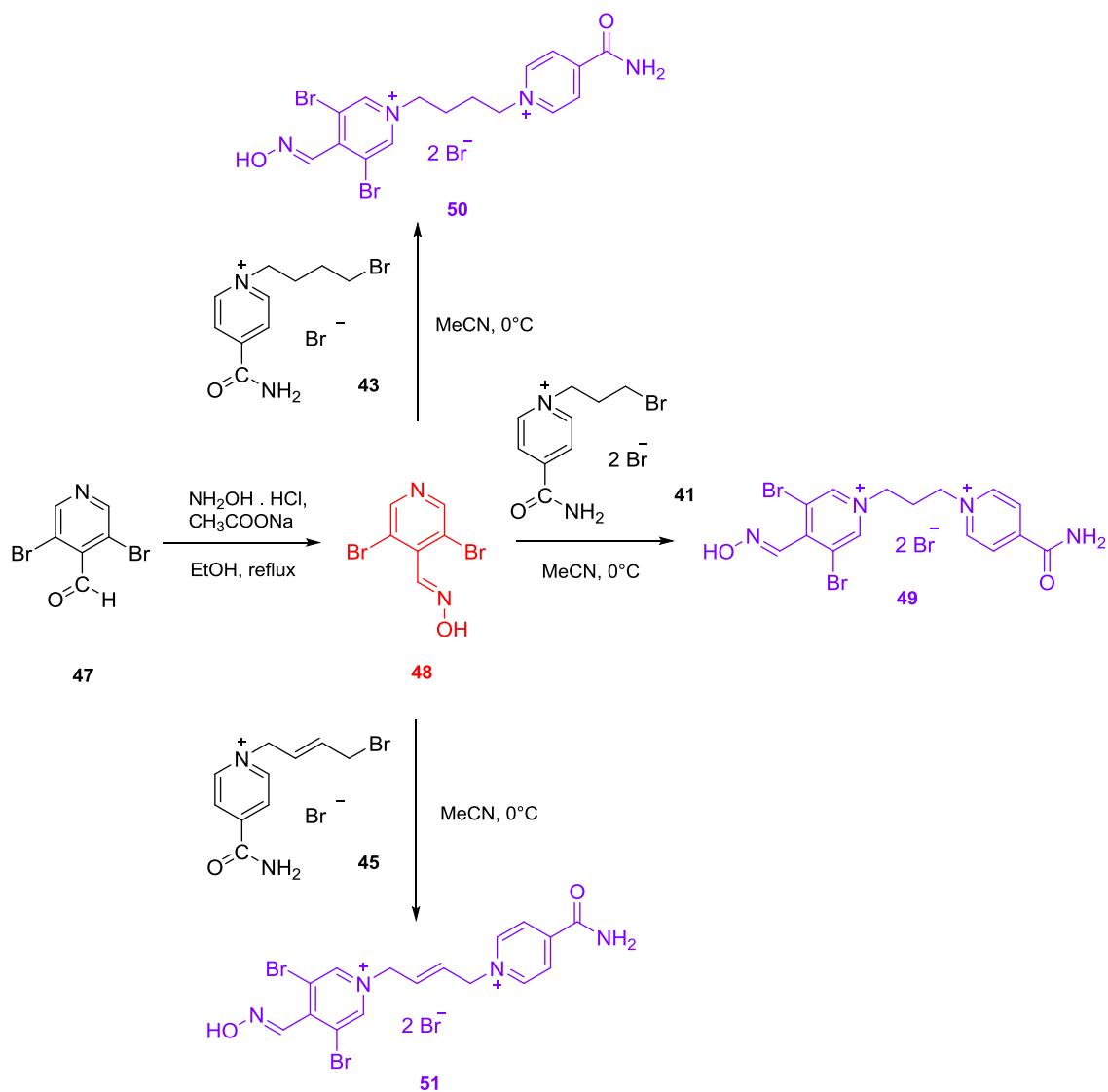


Schéma 3: Příprava reaktivátorů **49**, **50** a **51**.

I v této části syntézy bylo potřebné připravit oximový stavební synton **48** (Schéma 3), který nese dva atomy bromu v poloze 3, 5. Výchozí látkou zde byl komerčně dostupný aldehyd **47**, ze kterého byl oxim **48** připraven s využitím stejného postupu ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, pyridin, etanol, 90°C) jako při syntéze monosubstituovaného oximu **40**. Kupodivu byla reakce doprovázena nečekanými komplikacemi. Reakční čas se prodloužil na 4,5 hodiny, což nepředstavuje velký

problém. Komplikace nastaly až při přečišťování, kdy na kontrolním TLC byly viditelné dvě skvrny, které se nepatrně lišily v R_f faktoru. Z toho důvodu byla realizována sloupcová chromatografie (2x neúspěšně - špatně zvolený eluent a délka sloupce), která nevedla k získání čistého produktu. Až při třetím pokusu o přečištění skrze chromatografický sloupec došlo k oddělení obou složek směsi díky vhodně zvolené délce sloupce a mobilní fázi, čímž byl získán čistý produkt s výtěžkem 16,5%. Nízký výtěžek pro nás nebyl uspokojivým výsledkem, a proto byla reakce opakována. Při prvním opakování byl reakční čas výrazně prodloužen na 284 h, během kterých byl v nepravidelných intervalech přidáván $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ v 0,5 eq množství. Tento přídavek byl proveden celkem 4x. Získaná směs při TLC detekci taktéž vykazovala dvě skvrny, stejné jako v předchozím případě. Pro purifikaci směsi byla opět zvolena sloupcová chromatografie, která byla sice na první pokus úspěšná, ale byla časově velmi náročná v závislosti na délce zvoleného sloupce. Byl získán čistý produkt s 51% výtěžností. Při druhém opakování bylo záměrem snížit reakční čas prostřednictvím pravidelných přídávků $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ v 0,5 eq množství po 24 hodinách (opět celkem 4 přídavky) a taktéž se vyhnout zdlouhavé chromatografii. Bohužel dle TLC provedeného 24 hodin od posledního přídávku bylo zřejmé, že výchozí látka zcela nezreagovala a celkový reakční čas byl 203 hodin, tedy od posledního přídávku narostl o 80 hodin. Sice došlo ke zkrácení celkového času reakce, na druhou stranu bylo i tak zapotřebí přečištění směsi skrze dlouhou chromatografickou kolonu. Z důvodu zefektivnění a optimalizace dané syntézy byl v literatuře nalezen nový postup [14]. Byla realizována reakce, kde výchozí látkou byl zmíněný komerčně dostupný aldehyd **47**, který reagoval s $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ a octanem sodným v prostředí etanolu (90°C, 3 hodiny). Využitím tohoto reakčního postupu byl nejen znatelně zkrácen reakční čas, ale zároveň došlo k zjednodušení purifikace produktu (srážení s Et_2O a filtrace). Dalším kladem bylo navýšení výtěžku reakce na 82,4%.

V další části byly připraveny reaktivátory **49-51** (Schéma 3). Vzhledem k tomu, že první série látek probíhající v DMF byla doprovázena vznikem vedlejších produktů, bylo naším záměrem se tomuto faktu vyhnout, a proto byl reakčním prostředím zvolen MeCN. Vrust reakční doby nebyl nijak výrazný (± 2 dny), avšak čištění látek bylo jednodušší. Reaktivátor **49** byl připravený reakcí oximu **48** s

monokvarterní soli **41** v 16% výtěžku. Obdobným způsobem byl syntetizován produkt **50** (MeCN, 90°C, 276 hodin), kde jako výchozí látka byl použitý stejný oxim **48** a druhou částí byl bromid **43**. Výtěžnost této reakce byla 30%. Poslední částí této série byla příprava reaktivátoru **51** vzniklého reakcí oximu **48** se syntonem **45** (MeCN, 90°C, 24 hodin). Výtěžnost této reakce není potvrzena z důvodu přečišťování produktu.

3.1.3 Příprava monosubstituovaných biskvartérních reaktivátorů AChE s pyridinovým skeletem obsahujícím amidovou funkční skupinu

Syntéza výchozího amidu **53** obsahujícího atom bromu a konečných monosubstituovaných reaktivátorů AChE **55**, **57** a **59** byla uskutečněna dle schématu 4.

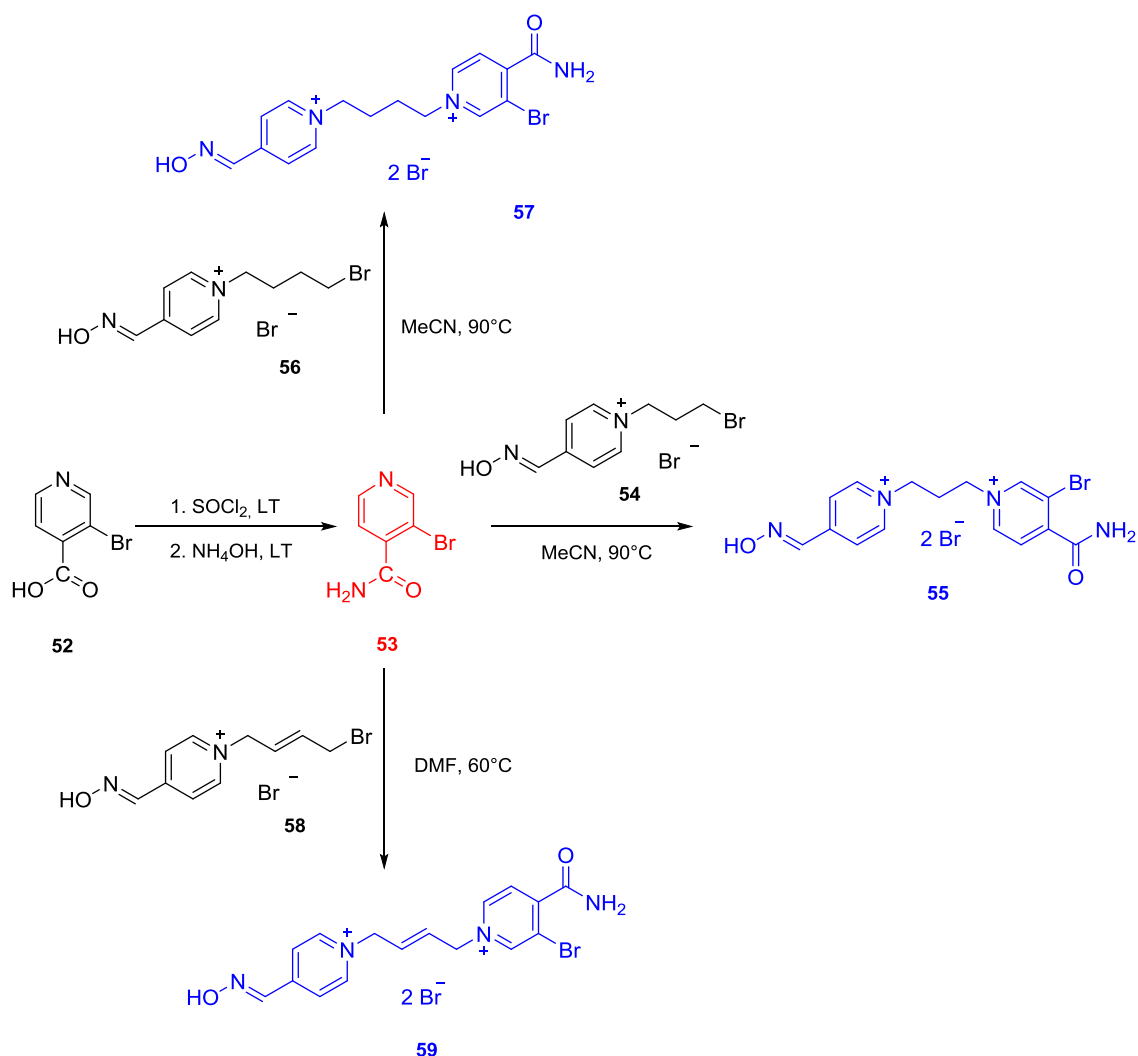


Schéma 4: Příprava reaktivátorů **55**, **57** a **59**.

V této části bylo nejprve třeba připravit monosubstituovaný amid **53** (Schéma 4) z komerčně dostupné kyseliny **52**. Po předešlých zkušenostech s touto syntézou v rámci spolupracující skupiny byl zvolen postup obsahující v prvním kroku reakci kyseliny **52** s thionylchloridem (LT, 3,5 hodiny) a v kroku druhém reakci s 28% roztokem hydroxidu amonného (LT, 40 minut). Byl získán čistý produkt s výtěžkem 31,2%. Nízký výtěžek byl zřejmě způsoben kyselou hydrolyzou amidu ve vodném prostředí. Z toho důvodu byla optimalizována druhá část přípravy, a to tak, že byla realizována v bezvodém prostředí zaváděním plynného amoniaku do reakční směsi (5 hodin), s výtěžkem 75%. Takto připravený amid byl dále použitý do reakcí s příslušnými oximy **54**, **56** a **58** za vzniku biskvarterních reaktivátorů **55**, **57** a **59**. Příslušné reakce běžely buď v DMF nebo v MeCN (viz Schéma 4). Výtěžky zmíněných reakcí nejsou známe, z důvodu probíhající purifikace.

Při přípravě produktů **42**, **44**, **46**, **49 - 50**, **55**, **57** a **59** byla k detekci průběhu reakcí použita TLC chromatografie (Cellulosa F), jako eluent byla využita fáze BuOH/H₂O/AcOH 5:1:2.

3.1.4 Příprava monokvarterních sloučenin

Pro syntézu konečných reaktivátorů AChE bylo důležité syntetizovat i monokvartérní bromidy **41** a **43** využitelné jako výchozí látky pro přípravu reaktivátorů **42**, **44**, **49** a **50**. Syntéza těchto sloučenin probíhala dle schématu 5.

Příprava obou solí vycházela z komerčně dostupného amidu **60**. Reakce amidu **60** s látkou **61** (aceton, 65°C, 47 hodin) dala za vznik reaktivátoru **41** (Schéma 5). Sloučenina **43** (Schéma 5) vznikla reakcí látek **60** a **62** (aceton, 65°C, 204 hodin). Oba produkty byly získány filtrací, přičemž látka **41** byla izolována čistá s výtěžkem 95%. V případě látky **43** byla nutná její purifikace z důvodu přítomnosti nečistot. K purifikaci bylo použito MeCN (90°C, 40 min). Takto přečištěná látka byla čistá s výtěžkem 90,9%.

Při přípravě produktů **41** a **43** byla k zjištění průběhu reakcí použita detekce pomocí TLC chromatografie (Aluminium oxide 60) s mobilní fází DCM/MeOH/NH₃ 9:1:2.

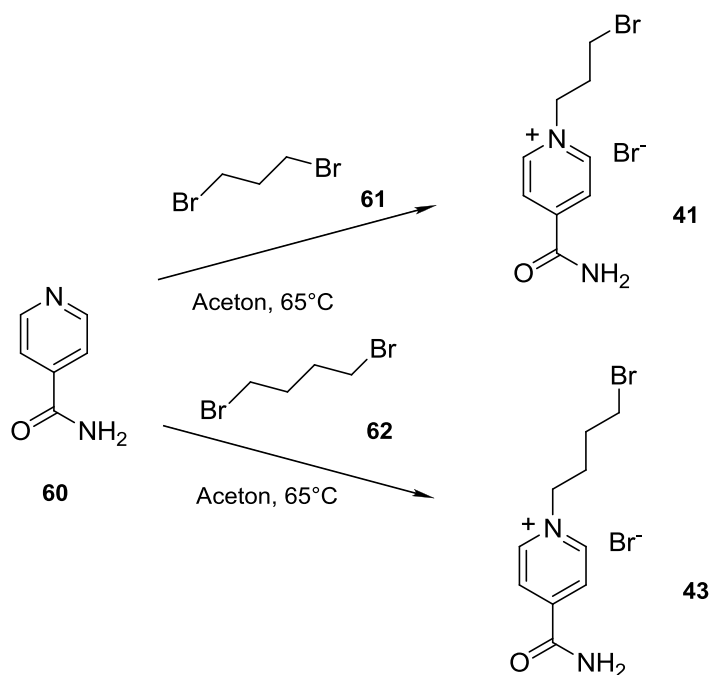


Schéma 5: Příprava monokvartérních sloučenin 41 a 43.

3.2 Obecná syntetická část

Použitá rozpouštědla a chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) a byly použity bez dalšího přečištění. Průběh reakcí byl zjišťován pomocí TLC desek (Silikagel 60 F₂₅₄, Cellulose F, Aluminium oxide 60) získaných od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Silikagel 60 (hrubost částic 230 – 400) pro sloupcovou chromatografii byl taktéž zakoupen u firmy Merck (Darmstadt, Německo). Teploty tání byly měřeny na bodotávku Büchi B-545 bez korekce.

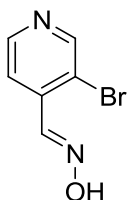
NMR spektra byla měřena na Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). U všech látek jsou chemické posuny pro ¹H i ¹³C spektra jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k signálu rozpouštědla. Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet) a m (multiplet).

Hmotnostní spektra byla získána elektrosprejovou ionizací (ESI MS) a selekcí iontů v iontové pasti LCQ FLEET. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu Xcalibur v 2.5.0 (vše Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Vzorek byl rozpuštěn v deionizované vodě (Goro, s.r.o., Prague, Czech

Republic) a kontinuálně vstříknut (8 $\mu\text{l}/\text{min}$) stříkačkou Hamilton do iontového zdroje.

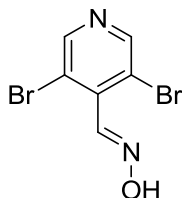
3.3 Připravené stavební syntony

3-bromoisonikotinaldehyd oxim (40)



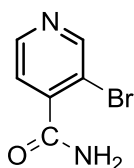
Výchozí látka **39** (2 g, 10.75 mmol) byla částečně rozpuštěna v pyridinu (1.7 ml, 21.50 mmol). Byl přidán hydroxylamin hydrochlorid (1.121 g, 16.13 mmol) a 20 ml etanolu. Reakční směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu 3 hodin. Po ukončení reakce byla ke směsi přidána destilovaná voda (50 ml) a celá směs byla extrahována ethylacetátem (2x100 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného, rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Získané bílé krystaly byly čisté. Výtěžek: 100%. Teplota tání: 189-191°C. $\text{C}_6\text{H}_5\text{BrN}_2\text{O}$. 201.02 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.28 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.53 (d, 1H, *J* = 5.05 Hz), 8.27 (s, 1H), 7.72 (d, 1H, *J* = 5.06 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 152.22, 148.41, 145.12, 139.12, 120.62, 120.01.

3,5-dibromoisonikotinaldehyd oxim (48)



Výchozí látka **47** (5 g, 18.77 mmol) byla částečně rozpuštěna v 50 ml etanolu. Následně byl přidán hydroxylamin hydrochlorid (1.967 g, 28.31 mmol) a octan sodný (2.322 g, 28.31 mmol). Směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu 3 hodin. Po ukončení míchání byla k reakční směsi přidána destilovaná voda (125 ml) a celý objem směsi byl extrahován ethylacetátem (3x150 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny bezvodým síranem sodným, rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Získaná látka byla přečištěna pomocí diethyletheru (100 ml). Nečistoty byly v diethyletheru rozpuštěny a nerozpuštěný produkt byl oddělen filtrací za sníženého tlaku. Získané bílé krystaly byly čisté. Výtěžek: 82%. Teplota tání: 204-206°C. $\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}$. 279,92 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.20 (s, 1H), 8.80 (s, 2H), 8.15 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 150.82, 145.24, 139.67, 120.75.

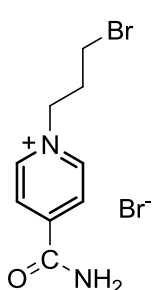
3-bromoisonikotinamid (53)



Výchozí látka **52** (1 g, 4.950 mmol) byla částečně rozpuštěna v thionylchloridu (9.5 ml, 128.7 mmol). Směs byla míchána 3,5 hodiny při laboratorní teplotě (LT). Po ukončení míchání byl thionylchlorid odpařen za sníženého tlaku. K vysušenému produktu bylo přidáno 10 ml 28% hydroxidu amonného. Reakční směs byla míchána 40 min při LT. Po ukončení míchání bylo ke směsi přidáno 200 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a celý objem byl extrahován ethylacetátem (3x150 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku vzduchu. Získaná bílá látka byla čistá. Výtěžek: 31%. Teplota tání: 163-165°C. C₆H₅BrN₂O. 201.02 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.78 (s, 1H), 8.60 (d, 1H, J = 4.81 Hz), 8.07 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.43 (d, 1H, J = 4.84 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 166.96, 151.59, 148.49, 145.93, 122.64, 116.73.

3.4 Připravené monokvarterní sloučeniny

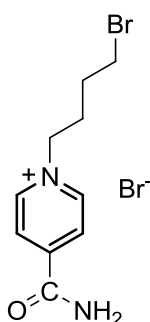
1-(3-bromopropyl)-4-karbamoylpyridinium bromid (41)



Výchozí látka **60** (5 g, 40.94 mmol) byla částečně rozpuštěna v 38 ml acetonu. Následně byla přidána sloučenina **61** (21 ml, 204.7 mmol). Směs byla míchána a refluxována při 65°C po dobu 47 hodin. Následně byla za horka přefiltrována a promyta acetonem (3x50ml). Získaný bílý krystalický produkt byl čistý. Výtěžek: 95%. Teplota tání: 182-184°C, (lit. 179-182°C) [13]. C₉H₁₂Br₂N₂O. 324.02 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.31 (d, 2H, J = 6.71 Hz), 8.71 (s, 1H), 8.47 (d, 2H, J = 6.63 Hz), 8.27 (s, 1H), 4.79 (t, 2H, J = 7.11 Hz), 3.59 (t, 2H, J = 6.62 Hz), 2.53 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.14, 148.14, 145.91, 125.79, 59.47, 32.94, 30.03.

1-(4-bromobutyl)-4-karbamoylpyridinium bromid (43)

Výchozí látka **60** (5 g, 40.94 mmol) byla částečně rozpuštěna v 38 ml acetonu. Poté byla přidána sloučenina **62** (24 ml, 204.7 ml). Směs byla míchána a refluxována při 65°C po dobu 204 hodin. Po ukončení refluxu byla směs zfiltrována za horka a

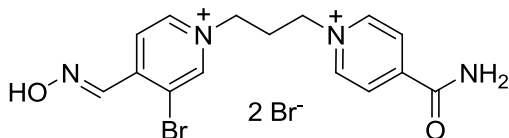


promyta acetonem (3x50 ml). Z důvodu nečistot byl produkt přečištěn povařením v MeCN (90°C, 40 minut). Získané bílé krystaly byly čisté. Výtěžek: 91%. Teplota tání: 159-161°C, (lit. 160-163°C)[13]. $C_{10}H_{14}Br_2N_2O$. 338.04 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.29 (d, 2H, J = 6.44 Hz), 8.68 (s, 1H), 8.46 (d, 2H, J = 6.62 Hz), 8.27 (s, 1H), 4.71 (t, 2H, J = 7.25 Hz), 3.57 (t, 2H, J = 6.63, Hz), 2.06 (m, 2H), 1.83 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):

δ (ppm) 163.21, 148.11, 145.61, 125.59, 33.83, 59.81, 29.32, 28.52.

3.5 Připravené biskvarterní sloučeniny

1-(3-bromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium) propan dibromid (42)

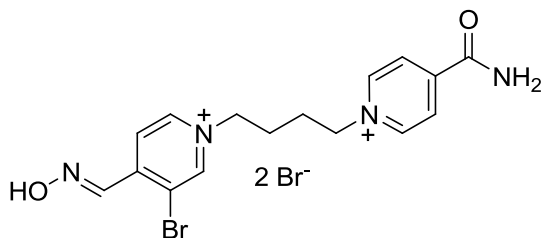


Výchozí látka **40** (0.3 g, 1.492 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml DMF. Poté byla přidána látka **41** (0.439 g, 1.357 mmol).

Reakční směs byla míchána a refluxována

při 60°C po dobu 228 hodin. Po ukončení míchání, došlo k ochlazení na LT, následně bylo k látce přidáno 80 ml acetonu a směs byla uložena do ledničky. Den poté byla směs přefiltrována za LT a promyta 50 ml acetonu. Z důvodu přítomnosti výchozích látek byla směs dvakrát přečištěna povařením v MeCN (20 ml a 10 ml) při 90°C po dobu jedné hodiny. V obou případech byla zfiltrována za horka a promyta horkým MeCN (2x40 ml). Získaný světle hnědý krystalický produkt byl čistý. Výtěžek: 10%. Teplota tání: 207-208°C. $C_{15}H_{17}Br_3N_4O_2$. 525.04 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.25 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.34 (d, 2H, J = 5.71 Hz), 9.06 (d, 1H, J = 6.12 Hz), 8.74 (s, 1H), 8.51 (d, 2H, J = 5.65 Hz), 8.42 (s, 1H), 8.39 (d, 1H, J = 6.25 Hz), 8.31 (s, 1H), 4.82 (t, 2H, J = 6.32 Hz, J = 6.32 Hz), 4.74 (t, 2H, J = 6.22 Hz, J = 6.22 Hz), 2.70 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.11, 148.18, 147.86, 147.36, 145.90, 145.90, 144.12, 143.19, 125.85, 125.85, 123.42, 121.03, 57.33, 56.96, 31.32.

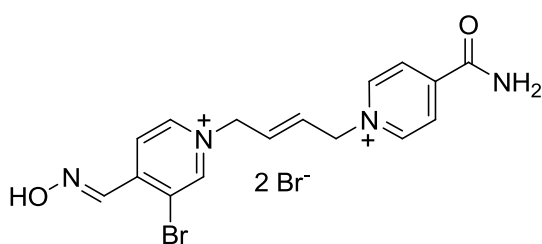
1-(3-bromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium)butan dibromid (44)



Výchozí látka **40** (0.3 g, 1.492 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml DMF. Následně byla přidána látka **43** (0.459 g, 1.357 mmol). Reakční směs byla míchána a refluxována při 60°C po dobu 228 hodin.

Po ukončení refluxu byla směs převrstvena 80 ml acetonu, uložena do ledničky. Den na to přefiltrována při LT a promyta 50 ml téhož rozpouštědla. Z důvodu znečištění produktu výchozími látkami byla směs refluxována při 90°C v 15 ml MeCN po dobu 1 hodiny. Poté byla směs zfiltrována za horka a promyta 40 ml horkého MeCN. Získaný světle hnědý krystalický produkt byl čistý. Výtěžek: 27%. Teplota tání: 223-225°C. C₁₆H₁₉Br₃N₄O₂. 539.07 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.22 (s, 1H), 9.62 (s 1, H), 9.33 (d, 2H, J = 6.13 Hz), 9.04 (d, 1H, J = 6.29 Hz), 8.72 (s, 1H), 8.48 (d, 1H, J = 6.09 Hz), 8.40 (s, 1H), 8.35 (d, 1H, J = 6.37 Hz), 8.29 (s, 1H), 4.75 (m, 2H), 4.67 (m, 2H), 2.0 (m, 5H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.14, 148.05, 145.70, 145.68, 145.65, 145.56, 142.80, 142.02, 131.28, 125.79, 123.34, 59.75, 59.52, 26.84, 26.68.

1-(3-bromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium)but-2-en dibromid (46)

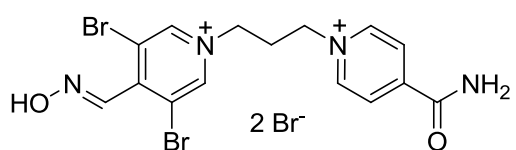


Výchozí látka **40** (0.3 g, 1.492 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml DMF. Následně byla přidána látka K164 (**45**, 0.455 g, 1.357 mmol). Reakční směs byla míchána a refluxována při 60°C po dobu 42 hodin.

Po ukončení refluxu byla směs převrstvena 85 ml acetonu a vložena do ledničky. Den na to byla přefiltrována a promyta 50 ml acetonu. Z důvodu přítomnosti výchozích látek bylo ke směsi přidáno 27 ml acetonitrilu (MeCN), vše bylo mícháno a refluxováno při 60°C po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut byla směs zfiltrována za horka a promyta 50 ml horkého MeCN. Získaný bílý krystalický produkt byl čistý. Výtěžek: 54%. Teplota tání: 214,5-216,5°C. C₁₆H₁₇Br₃N₄O₂.

537.05 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.25 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 9.29 (d, 2H, J = 6.78 Hz), 9.00 (d, 1H, J = 6.58 Hz), 8.76 (s, 1H), 8.50 (m, 2H), 8.42 (d, 1H, J = 11.47 Hz), 8.37 (d, 1H, J = 6.49 Hz), 8.30 (s, 1H), 6.25 (m, 2H), 5.44 (d, 2H, J = 5.45 Hz), 5.35 (d, 2H, J = 5.57 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.13, 148.39, 147.78, 147.51, 145.84, 145.84, 144.13, 143.06, 130.09, 129.96, 125.83, 125.83, 123.37, 120.91, 60.80, 60.34.

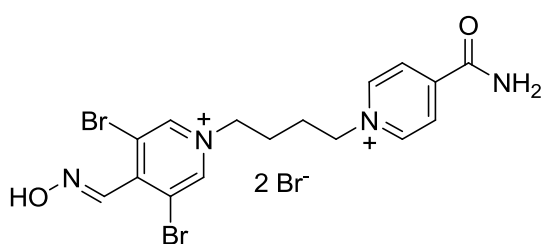
1-(3,5-dibromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium) propan dibromide (49)



Výchozí látka **48** (0.3 g, 1.072 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml MeCN. Poté byla přidána látka **41** (0.382 g, 1.179 mmol).

Reakční směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu 276 hodin. Po 276 hodinách bylo ke směsi přidáno 80 ml acetonu a byla vložena do ledničky. Den poté byla směs zfiltrována za LT a promyta 80 ml acetonu. Z důvodu přítomnosti výchozích látek byl produkt refluxován při 90°C ve 20 ml MeCN po dobu 2,5 hodiny. Následně byla směs zfiltrována za horka a promyta 60 ml horkého MeCN. Takto přečištěný produkt byl krystalický. Výtěžek: 30%. Teplota tání: 224-226°C. C₁₅H₁₆Br₄N₄O₂. 603.94 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.00 (s, 1H), 9.69 (s, 2H), 9.35 (d, 2H, J = 6.31 Hz), 8.74 (s, 1H), 8.52 (d, 2H, J = 6.29 Hz), 8.33 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 4.83 (t, 2H, J = 7.05 Hz, J = 7.05 Hz), 4.73 (t, 2H, J = 6.84 Hz, J = 6.84 Hz), 2.73 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.11, 148.17, 147.17, 146.34, 145.91, 144.78, 141.92, 125.84, 125.84, 122.08, 122.08, 57.26, 57.21, 31.16.

1-(3,5-dibromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium) butan dibromid (50)

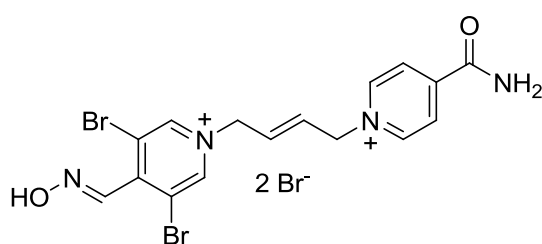


Výchozí látka **48** (0.3 g, 1.072 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml MeCN. Poté byla přidána látka **43** (0.399 g, 1.179 mmol). Reakční směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu

275 hodin. Po ukončení refluxu bylo ke směsi přidáno 80 ml acetonu a byla vložena

do ledničky. Den poté byla směs zfiltrována při LT a promyta 80 ml acetonu. Z důvodu stop výchozích látek byl produkt dvakrát refluxován v MeCN (15 a 10 ml) při 90°C v obou případech po dobu 2,5 hodiny. Pokaždé byla směs přefiltrována za horka a promyta 60 ml horkého MeCN. Po druhém přečištění byl získán čistý krystalický produkt. Výtěžek: 16%. Teplota tání: 220-223°C. C₁₆H₁₈Br₄N₄O₂. 617.96 g mol⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.97 (s, 1H), 9.68 (s, 2H), 9.33 (d, 2H, J = 5.76 Hz), 8.72 (s, 1H), 8.49 (d, 2H, J = 5.55 Hz), 8.33 (d, 2H), 4.75 (m, 2H), 4.65 (m, 2H), 2.03 (m, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 163.14, 148.04, 147.04, 146.12, 145.72, 145.72, 145.51, 144.77, 125.79, 125.79, 122.06, 121.84, 59.77, 59.66, 26.81, 26.60.

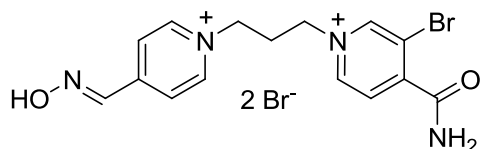
1-(3,5-dibromo-4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium) but-2-en dibromid (51)



Výchozí látka **48** (0.3 g, 1.072 mmol) byla částečně rozpuštěna v 10 ml MeCN. Následně byla přidána látka K164 (**45**, 0.396 g, 1.179 mmol). Směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu 24 hodin.

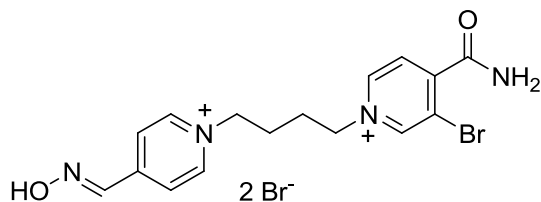
Po ukončení míchání bylo ke směsi přidáno 80 ml acetonu a vše bylo uloženo do ledničky. Den poté byla směs zfiltrována za LT. V látce byly přítomny nečistoty a v době odevzdávání této práce ještě nebyla zcela přečištěna. C₁₆H₁₆Br₄N₄O₂. 615.95 g mol⁻¹.

1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(3-bromo-4-karbamoylpyridinium) propan dibromid (55)



Výchozí látka **53** (0.3 g, 1.492 mmol) byla částečně rozpuštěna v 10 ml MeCN. Poté byla přidána látka K006 (**54**, 0.532 g, 1.642 mmol). Směs byla míchána a refluxována při 90°C po dobu 528 hodin. Po ukončení refluxu bylo přidáno ke směsi 80 ml acetonu a vše bylo uloženo do ledničky. V době odevzdávání této práce nebyla látka přefiltrována a přečištěna. C₁₅H₁₇Br₃N₄O₂. 365.23 g mol⁻¹.

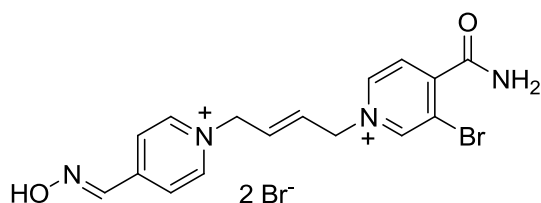
**1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(3-bromo-4-karbamoylpyridinium)
butan dibromid (57)**



Výchozí látka **53** (0.3 g, 1.492 mmol) byla částečně rozpuštěna v 10 ml MeCN. Posléze byla přidána látka K079 (**56**, 0.555 g, 1.642 mmol). Směs byla míchána

a refluxována při 90°C po dobu 336 hodin. Následně bylo přidáno 60 ml acetonu a směs byla uložena do chladničky. Druhý den byla směs zfiltrována za LT. V látce byly přítomny nečistoty a v době odevzdávání této práce ještě nebyla zcela přečištěna. C₁₆H₁₉Br₃N₄O₂. 379.26 g mol⁻¹.

**1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(3-bromo-4-karbamoylpyridinium)
but-2-en dibromid (59)**



Výchozí látka **53** (0.3 g, 1.492 mmol) byla zcela rozpuštěna v 10 ml DMF. Posléze byla přidána látka K102 (**58**, 0,552 g, 1.642 mmol). Směs byla míchána

a refluxována při 60°C po dobu 102 hodin. Následně byla směs převrstvena 60 ml acetonu a uložena do ledničky. V době odevzdávání této práce nebyla látka přefiltrována a přečištěna. C₁₆H₁₇Br₃N₄O₂. 377.24 g mol⁻¹.

4 Závěr

Překládaná práce se zabývala syntézou nových reaktivátorů AChE vycházejících ze struktur již dříve syntetizovaných sloučenin **26**, **27** a **28**, jejichž pyridinový skelet byl substituován halogeny, v tomto případě bromem.

Stanovené cíle byly splněny. Byly připraveny oximy **40**, **48** a amid **53** coby základní stavební kameny žádaných reaktivátorů. Za stejným účelem byly syntetizovány i monokvartení soli **41** a **43**. Byla úspěšně realizovaná syntéza všech třech sérií reaktivátorů, avšak pomocí analýzy NMR byly potvrzené struktury (**42**, **44**, **46**, **49** a **50**). Zbylé 4 látky (**51**, **55**, **57** a **59**) jsou v poslední fázi purifikace, po které bude jejich struktura taktéž potvrzena pomocí NMR.

Struktura připravených reaktivátorů byla potvrzena pomocí NMR spekter, stejně tak hodnotami teplot tání. Dále budou látky analyzované metodou ESI MS. V budoucnosti budou všechny zmíněné série syntetizovaných reaktivátorů otestovány na jejich biologickou aktivitu, zda svými biologickými schopnostmi budou schopné konkurovat dosud vytvořeným reaktivátorům.

5 Použitá literatura

- [1] MUSÍLEK K.; DOLEŽAL M.; GUN-MOORE F.; KUČA K. Design, evaluation and structure – Activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Medicinal Research Reviews*, **2011**, 31(4), p. 548-575.
- [2] BAJGAR J. Nervově paralytické látky. In Patočka et al.: Vojenská toxikologie. *Grada: Praha*, **2005**, p. 30-44. ISBN 80-247-0608-3.
- [3] LEDVINA M.; STOKLASOVÁ A.; CERMAN J. Biochemie nervových funkcí. In Biochemie pro studující medicíny II. díl. *Karolinum: Praha*, **2009**, p. 457-459. ISBN 978-80-246-1415-1.
- [4] SILBERNAGL S.; DESPOPULOS A. Atlas fyziologie člověka. *Grada: Praha*, **2004**, p. 50-90. ISBN 80-247-0630-X.
- [5] LINHART L. Látky ovlivňující přenos nervových vzruchů a mechanismy jejich působení. In Toxikologie Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky. *VŠCHT: Praha*, **2012**, p. 294-307. ISBN 978-80-7080-806-1.
- [6] MUSÍLEK K.; KOMLOOVÁ M.; HOLAS O.; HOROVÁ A.; POHANKA M.; GUNN-MOORE F.; DOHNAL V.; DOLEŽAL M.; KUČA K. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage – Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**, 19(2), p. 754-762.
- [7] SUSSMAN J. L.; HAREL M.; FROLOW F. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253(5022), p. 872-879.
- [8] LINCOVÁ D.; FARGHALI H. Látky ovlivňující periferní nervový systém. In Základní a aplikovaná farmakologie. *Galén: Praha*, **2007**, p. 59-120. ISBN 978-80-7262-373-0.

- [9] BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, 38, p. 151-216.
- [10] PATOČKA J.; KUČA K.; JUN D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Act. Med. HK.* **2004**, 47(4), p. 215-228.
- [11] VYSKOČIL F. Působení atropinu a diazepamu na savčí nervosvalové ploténce – model jejich ochranného působení při otravě bojovými a zemědělskými acetylcholinesterázami. *Československá fyziologie.* **2006**, 55(3), p. 111-114.
- [12] McMURRY, J., a kol. Organická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, **2007**. ISBN 978-80-7080-637-1.
- [13] KUČA K.; BIELAVSKY J.; CABAL J.; BIELAVSKÁ M. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 15(44), p. 3123-3125.
- [14] AUGUSTINE J. K.; KUMAR R.; BOMBRUN A.; MANDAL A. B. An efficient catalytic method for the Beckmann rearrangement of ketoximes to amides and aldoximes to nitriles mediated by propylphosphonic anhydride. *Tetrahedron Letters*, **2010**, 52(2011), p. 1074–1077.