

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Syntéza 5-substituovaných pyridinium-2-aldoximů
jako potenciálních reaktivátorů organofosfáty
inhibovaných cholinesteras**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Lukáš Fresser
Studijní program:	Chemie, N0531A130003
Studijní obor:	Chemie - spec. toxikologie a analýza škodlivin
Vedoucí práce:	RNDr. Dávid Maliňák, PhD.
Odborný konzultant:	Mgr. Eliška Prchalová



Zadání diplomové práce

Autor: Lukáš Fresser

Studium: S21CH011NP

Studijní program: N0531A130003 Chemie

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Název diplomové práce: **Syntéza 5-substituovaných pyridinium-2-aldoximů jako potenciálních reaktivátorů organofosfáty inhibovaných cholinesteras**

Název diplomové práce AJ: Synthesis of 5-substituted pyridinium-2-aldoximes as potential reactivators of organophosphates-inhibited cholinesterases

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity nových ale také komerčních molekul využívaných jako reaktivátory organofosforovými sloučeninami inhibovaných cholinesteras popsanych v odborné literatuře.
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností připravených meziproduktů i cílových molekul.
3. Sepsání diplomové práce.

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus

Zadávací pracoviště: Katedra chemie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

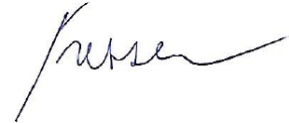
Oponent: RNDr. Miroslav Psočka, PhD.

Datum zadání závěrečné práce: 20.7.2021

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.“

V Hradci Králové dne 19. 7. 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fresser', written in a cursive style.

Bc. Lukáš Fresser

Poděkování:

Rád bych poděkoval RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD. a Mgr. Elišce Prchalové za odborný dohled při mé experimentální části a cenné rady při vypracovávání teoretické části mé diplomové práce. Zároveň bych chtěl poděkovat Ing. Janě Svobodové, Ph.D. a RNDr. Patrikovi Olekšákovi, PhD. za měření NMR spekter. Dále PharmDr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. za měření HRMS spekter. Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové (SV2112-2023) a byla podpořena projektem Grantové agentury České republiky (GA ČR 21-03000S).

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá syntézou 5-substituovaných pyridinium-2-aldoximů jako potenciálních reaktivátorů organofosfáty inhibovaných cholinesteras. Teoretická část je v úvodu zaměřena na stručný popis acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Následně je zmíněná inhibice cholinesteras organofosforovými sloučeninami a terapie otrav. V další části se zaměřuji na problematiku komerčně dostupných oximových reaktivátorů, kde se věnuji zejména pralidoximu. V závěru teoretické části se zabývám problematikou prostupu reaktivátorů přes hematoencefalickou bariéru. V praktické části je pak popsána příprava tří finálních produktů odvozených od struktury pralidoximu, který je substituován třemi různými amidovými substituenty. Finální produkty byly připraveny z lehkó dostupných výchozích látek po sedmi reakčních krocích. Struktura všech připravených látek byla ověřena pomocí NMR a HRMS analýz.

Klíčová slova

cholinesterasa, organofosfáty, reaktivátory, pralidoxim, hematoencefalická bariéra

Annotation

This diploma thesis deals with the synthesis of 5-substituted pyridinium-2-aldoximes as potential reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases. The theoretical part is at first focused on the brief description of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Next is mentioned inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds and therapy of poisoning. In the next part, I focus on the issue of commercially available oxime reactivators, where I mainly focus on pralidoxime. The final part of theoretical part deals with problem of blood-brain barrier penetration. The practical part describes the preparation of three final products derived from the structure of pralidoxime, which is substituted with three different amide substituents. The final products were prepared from readily available starting materials after seven reaction steps. The structure of all prepared substances was verified using NMR and HRMS analyses.

Keywords

cholinesterase, organophosphates, reactivators, pralidoxime, blood-brain barrier

Obsah

Úvod.....	10
1. Teoretická část.....	12
1.1. Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa	12
1.1.1. Struktura acetylcholinesterasy	12
1.1.2. Struktura butyrylcholinesterasy	14
1.2. Organofosfáty jako inhibitory cholinesteras.....	16
1.3. Terapie otrav organofosfáty	18
1.3.1. Oximové reaktivátory cholinesteras.....	20
1.3.1.1. <i>Faktory ovlivňující reaktivaci cholinesteras</i>	22
1.4. Pralidoxim.....	23
1.4.1. Syntéza pralidoximu.....	23
1.4.2. Deriváty a izomery pralidoximu	25
1.5. Metody zvýšení prostupu reaktivátorů do mozku.....	27
2. Design	32
3. Cíle práce.....	34
4. Výsledky a diskuse.....	36
5. Experimentální část.....	49
5.1. Příprava příslušného acylchloridu 49 jako výchozí látky pro syntézu nikotinamidů 53-55.....	50
5.2. Příprava příslušných nikotinamidů 53-55 jako výchozích látek pro syntézu monokvartérních solí 56-58	53
5.3. Příprava příslušných monokvartérních solí 56-58 jako výchozích látek pro syntézu cílových molekul 41-43	56
5.4. Příprava cílových molekul 41-43.....	58
6. Závěr.....	61
7. Použitá literatura.....	63

Seznam použitých zkratk v textu

2-PAM	Pralidoxim
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ACN	Acetonitril
A _d N	Nukleofilní adice
BChE	Butyrylcholinesterasa
CAS	Katalyticky aktivní místo
CNS	Centrální nervová soustava
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
ekv.	Ekvivalent
Et ₂ O	Diethylether
Et ₃ N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetát
FDA	Food and drug administration
HEB	Hematoencefalická bariéra
Hept	Heptan
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
hod	hodina
ChE	Cholinesterasa
IM	Intramuskulární
IV	Intravenózní

k_D	Disociační konstanta komplexu reaktivátor/fosfyl-AChE
k_R	Rychlostní konstanta reaktivace
l.t.	Laboratorní teplota
mAChR	Muskarinové acetylcholinové receptory
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
min	minuta
nAChR	Nikotinové acetylcholinové receptory
nBuOH	n-butanol
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPL	Nervově paralytické látky
NS	Nervová soustava
OP	Organofosfáty
PAS	Periferní anionické místo
Pgp	P-glykoprotein
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PNS	Periferní nervová soustava
POX	Paraoxon
PSL	Perspirace, salivace, lakrimace
SF	Stacionární fáze
S_{EAr}	Elektrofilní aromatická substituce
S_{NAc}	Nukleofilní acylová substituce
S_{NAr}	Elektrofilní aromatická substituce

S_N2	Bimolekulární nukleofilní substituce
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
T_t	Teplota tání

Úvod

Organofosfáty (OP) jsou synteticky připravené látky, konkrétně se jedná o velmi toxické sloučeniny fosforu. Jediný OP známý v přírodě je anatoxin-a(s), což je toxin produkovaný některými druhy sinic. Všechny ostatní toxické organofosfáty byly vynalezeny lidmi buď jako pesticidy, nebo jako nervově paralytické látky (NPL). Organofosfátové pesticidy jsou používány celosvětově ve velkém měřítku jako insekticidy zejména v USA, Jižní Americe a Asii. První vysoce toxické organofosfáty byly připraveny v Německu a Velké Británii těsně před druhou světovou válkou. Jejich rozsáhlý výzkum a vývoj byl zaznamenán v 50. a 60. letech minulého století [1, 2].

Obzvláště nebezpečnou podkategorií OP sloučenin jsou NPL. Obavy tyto sloučeniny vzbuzují zejména kvůli jejich vysoké akutní a chronické toxicitě. V novodobé historii bylo zaznamenáno hned několik zneužití NPL při vojenských konfliktech či teroristických útocích. Příkladem mohou být válka v Perském zálivu v letech 1990-1991 nebo použití sarinu v Sýrii roku 1995. Tyto konflikty vzbudily mezinárodní zájem o tyto nebezpečné látky, které mohou vážně poškodit zdraví a vést až ke smrti [3, 4]. V japonském městě Matsumoto došlo roku 1994 k teroristickému útoku za použití sarinu, kdy vlivem akutní intoxikace zahynulo sedm lidí [5]. V roce 1995 došlo v tokijském metru k dalšímu úmyslnému vypuštění sarinu v letální koncentraci, kde zemřelo na akutní intoxikaci jedenáct lidí [6]. V roce 2017 bylo použito VX při atentátu na Kim Čong-nama, který vlivem akutní intoxikace zemřel na mezinárodním letišti Kuala Lumpur [7]. V březnu 2018 se uskutečnil pokus o atentát na bývalého ruského agenta Sergeje Skripala a jeho dceru Yulii NPL typu Novichok [8]. O dva roky později byl uskutečněn další pokus o atentát na ruského opozičního politika Alexeje Navalného stejným typem látky [9].

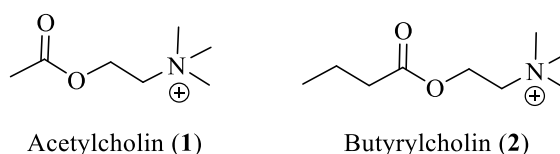
Riziko potenciálního použití NPL způsobuje velký zájem výzkumných skupin o vývoj účinnějších antidot proti těmto látkám. Problémem je, že neexistuje univerzální oximový reaktivátor účinný proti všem známým NPL. Další komplikací při zahájení terapie oximovými reaktivátory je jejich chemická struktura obsahující nabitý kvarterní dusík, komplikující průchod přes hematoencefalickou bariéru (HEB) [10]. V neposlední řadě, komerčně používané reaktivátory nejsou schopné reaktivovat „zestárlou“ formu enzymu [11].

Pralidoxim (2-PAM) je jedním z komerčně dostupných a používaných reaktivátorů OP inhibované acetylcholinesterasy (AChE). Jeho výhodou je přítomnost pouze jednoho kvarterního dusíku ve struktuře, což má za následek vyšší propustnost přes HEB oproti jeho biskvartérním reaktivátorům. V případě 2-PAM je to cca 10 %, na rozdíl od biskvartérních reaktivátorů s prostupem přes HEB přibližně z 3 % [12, 13]. Cílem této práce je syntéza 5-substituovaných derivátů 2-PAM, které by měly vykazovat vyšší reaktivační účinnosti inhibovaných cholinesteras (ChE), díky tvorbě nevazebných interakcí s aminokyselinovými rezidui v ChE.

1. Teoretická část

1.1. Acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa

U savců jsou známy dva typy ChE, a to acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE). ChE jsou enzymy, které hydrolyzují při optimálních podmínkách estery cholinu, jako je acetylcholin (ACh; **1**) a butyrylcholin (BCh; **2**) (Obrázek 1), s velkou účinností a efektivitou mnohem rychleji než jiné estery [14].



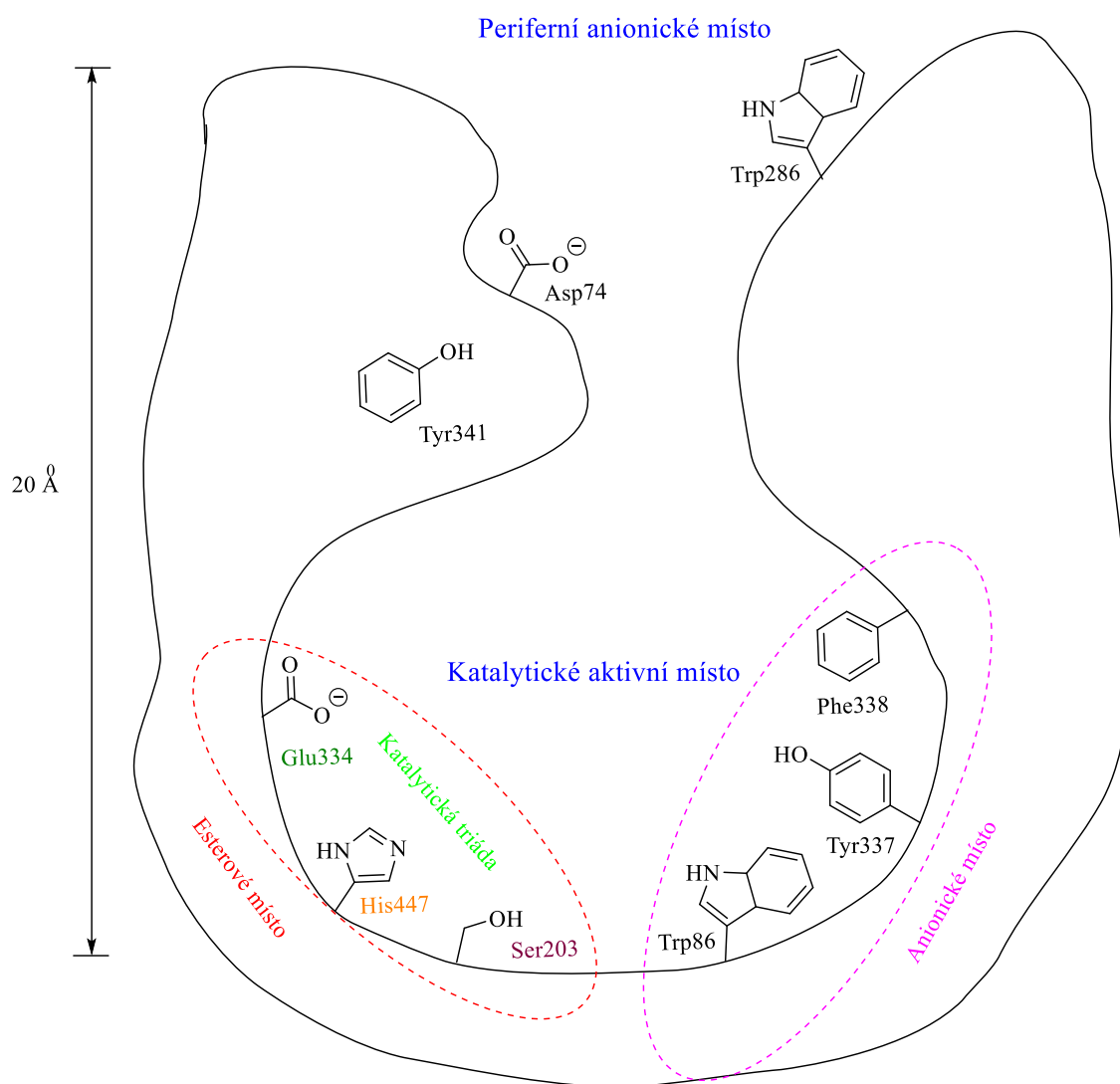
Obrázek 1: Struktury ACh (**1**) a BCh (**2**).

AChE a BChE se řadí mezi skupinu serinových hydroláz a proteáz. BChE, na rozdíl od AChE, působí hlavně v periferní nervové soustavě (PNS) a nachází se ve větší koncentraci v plazmě, játrech, slinivce břišní a některých částech CNS jako jsou neurony a gliové buňky [1, 14]. AChE je jedním z nejdůležitějších enzymů pro zachování správné funkce nervů, konkrétně slouží k terminaci nervových vzruchů v cholinergních synapsích pomocí rychlé hydrolyzy ACh. Tento neurotransmitter hraje důležitou roli zejména v CNS a PNS. V PNS má důležitou funkci zajištění neuromuskulárního přenosu a v CNS je důležitý pro paměť a učení [15, 16]. BChE nemá svoji funkci v organismu zatím plně objasněnou [1, 17]. Jak již bylo zmíněno ACh se po uvolnění rychle hydrolyzuje na cholin a kyselinu octovou. BChE vykazuje menší substrátovou specifitu pro ACh, zatímco AChE hydrolyzuje ACh již při nízkých koncentracích [14]. BChE disponuje schopností štěpit i estery jiných cholinů (např. succinylcholinu), ale i necholinové estery (např. kokain, kyselinu acetylsalicylovou nebo heroin) [1].

1.1.1. Struktura acetylcholinesterasy

AChE (UniProtKB-P22303, EC 3.1.1.7) má podobu elipsoidního tvaru s úzkou a hlubokou štěrbinou ohraničenou periferním anionickým místem (PAS). PAS se nachází v podstatě na povrchu AChE a je vzdálené přibližně 20 Å od samotného aktivního místa. V PAS lze nalézt především hydrofobní aromatická rezidua aminokyselin jako Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 a Tyr341 [18, 19]. Na dně štěrbiny je umístěno katalytické

aktivní místo (CAS). CAS se skládá ze dvou podjednotek anionické a esterové. Katalytická triáda esterového místa lidské AChE je tvořena aminokyselinami Ser203, His447 a Glu334. Jedná se zároveň i o místo, kde dochází k vlastní hydrolýze ACh. Anionické místo je pak tvořeno aminokyselinami Trp86, Tyr337 a Phe338, jehož rolí je správná orientace pozitivně nabitého substrátu pro vstup a následné navázání do aktivního místa (Obrázek 2) [1, 20, 21, 22].



Obrázek 2: Struktura lidské AChE (UniProtKB-P22303, EC 3.1.1.7).

V prvním kroku začíná mechanismus hydrolýzy ACh nukleofilním atakem hydroxylové skupiny Ser203 na elektrofilní atom esterového uhlíku ACh za účelem vytvoření dočasné kovalentní acylové vazby mezi enzymem a substrátem. Nukleofilní dusík His447 je protonizován molekulou vody za současného nukleofilního ataku vznikajícího hydroxidového aniontu na acetylovou skupinu Ser203. Tento nukleofilní

atak může být opět podpořen vytvořením dočasné vodíkové vazby mezi His447 a Glu334. Dále dochází k odštěpení kyseliny octové a obnovení aminokyselinového složení v esterovém místě (Schéma 1) [1].

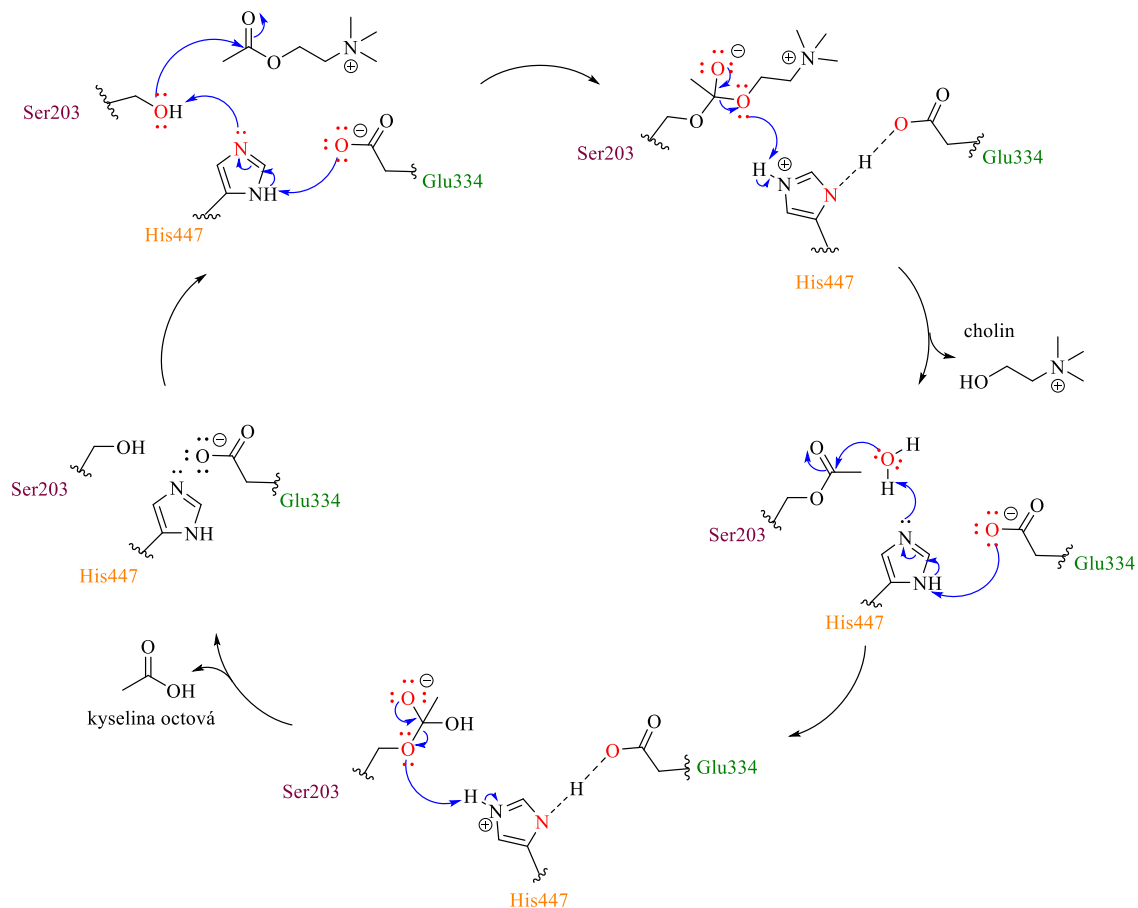
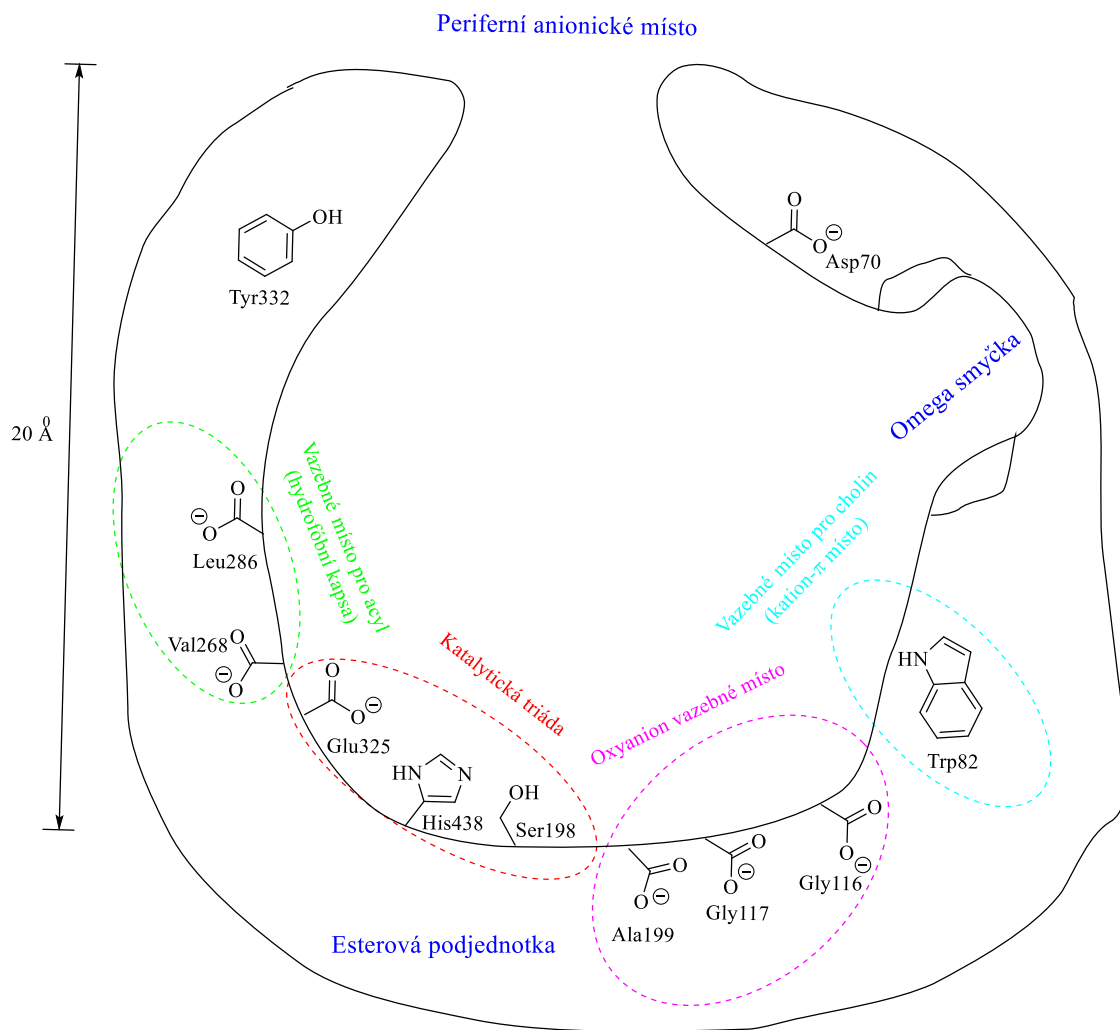


Schéma 1: Mechanismus hydrolyzy ACh.

1.1.2. Struktura butyrylcholinesterasy

Lidská BChE (UniProtKB-P06276, EC 3.1.1.8) je tetramer spojený proteinem bohatým na polyprolin, kdy každá z jeho čtyř podjednotek je tvořena z 574 aminokyselin [23]. Tak jako u AChE je jedním z hlavních strukturních prvků hluboká štěrbiná ohraničená aromatickými rezidui z PAS, na jejímž dně se nachází CAS obsahující katalytickou triádu složenou ze Ser198, Glu325 a His438 [24]. Každý monomer má 20 Å hlubokou a úzkou štěrbinu s aktivním místem obsahujícím 55 aminokyselin. V ústí štěrbině se nachází PAS, mj. s aminokyselinami Asp70 a Tyr332, které se podílí na počáteční vazbě s pozitivně nabitými substráty. Jestliže je kladně nabitý substrát navázán na enzym vytvořením komplexu s aromatickým kruhem Tyr332 za současné interakce substrátu s negativně nabitým Asp70, dojde ke změně konformace monomeru. Tato

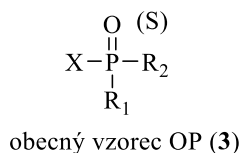
změna vyvolá přiblížení ramen enzymu a substrátu je umožněno proniknout dovnitř k Trp82 vazebného místa cholinu. Omega smyčka spojuje aminokyseliny Asp70 a Trp82. V blízkosti vazebného místa pro cholin, jež je tvořeno Trp82 se nachází tzv. oxyanion vazebné místo, které je tvořeno Gly116, Gly117 a Ala199. Funkcí oxyanion vazebného místa je rotace substrátu z vertikální do horizontální polohy tak, aby mohlo dojít k hydrolyze substrátu v aktivním místě pomocí Ser198 (Obrázek 3) [24, 25].



Obrázek 3: Struktura lidské BChE (UniProtKB – P06276, EC 3.1.1.8).

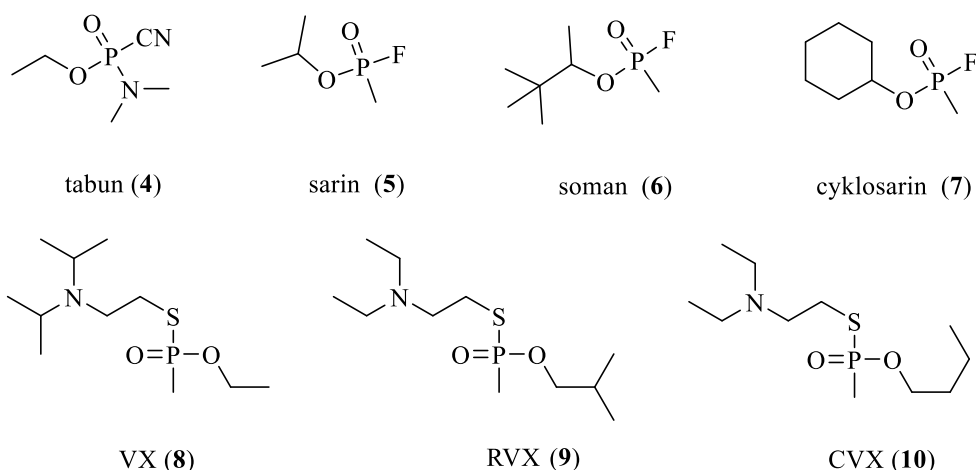
1.2. Organofosfáty jako inhibitory cholinesteras

OP jsou organické sloučeniny fosforu (3), které ve své struktuře mohou obsahovat buď kyslík nebo síru vázanou dvojnou vazbou k atomu fosforu. R₁ a R₂ jsou uhlovodíkové řetězce (např. alkyl, alkoxy) nebo amino skupina, které mají vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti OP. X je odstupující skupina v podobě halogenu, kyanidu či thioskupiny (Obrázek 4) [26, 27].



Obrázek 4: Obecný strukturní vzorec OP (3).

Mechanismem účinků působení OP, včetně podtřídy NPL (4-10) (Obrázek 5), je irreverzibilní inhibice AChE. Tato inhibice má za následek nahromadění ACh v nervových synapsích, kdy dochází k nadměrné stimulaci cholinergních receptorů, což vede ke vzniku tzv. cholinergní krize. Intoxikace již velmi malými dávkami OP mohou být fatální [28]. První příznaky otravy OP se obvykle objevují, jakmile aktivita AChE klesne pod 50 %. Závažné příznaky se objevují, pokud aktivita AChE klesne pod 10-20 %. Do této skupiny příznaku patří zvýšená perspirace, salivace, lakrimace (PSL syndrom) a výskyt křečí. Pokud aktivita AChE v CNS klesne pod 10 %, lze pozorovat miózu a paralýzu dýchacích svalů, což vede k respiračnímu selhání [29, 30, 31]. Mezi nejzávažnější symptomy, které mohou vést ke kómatu či dokonce smrti, patří deprese dechového centra v prodloužené míše s následnou zástavou dechu, dále ochrnutí bránice a mezižeberních svalů, bronchospasmus a nadměrná bronchiální sekrece [12, 32, 33].



Obrázek 5: Struktury NPL 4-10.

Pokud se molekula OP dostane do CAS, tak Ser203 nukleofilně atakuje atom fosforu a vytváří se kovalentní vazba mezi OP a Ser203 [24, 34]. Dochází ke vzniku tranzitního stavu, ze kterého odstoupí halogen v podobě aniontu a vzniká fosfylserin. Tato forma neaktivního fosforylovaného enzymu může sice podléhat spontánní hydrolyze, která je však extrémně pomalá. Řádově probíhá v rozmezí hodin až dnů v případě intoxikací V-látkami. Kompetitivní reakcí ke spontánní hydrolyze je intramolekulární reakce, která probíhá v mnohých případech rychleji a způsobuje nevratnou dealkylaci OP (tzv. stárnutí). Kyslíkový atom molekuly vody, která je vázána přes vodíkovou vazbu s Glu334, nukleofilně atakuje R₂ a dochází k odstoupení alkoholu R₂OH, což má za následek stabilizaci fosforylovaného komplexu AChE pomocí vodíkové vazby s protonizovaným histidinem katalytické triády [24, 34]. V důsledku toho se „zestárlý“ fosfyl-AChE konjugát již nehydrolyzuje a je odolný vůči reaktivaci oximovými reaktivátory (Schéma 2). Poločas stárnutí AChE je různý a závisí na typu použité NPL. Soman má dobu stárnutí přibližně 2-4 min, sarin 5 hod, tabun 46 hod a VX až okolo 48 hod [1, 12].

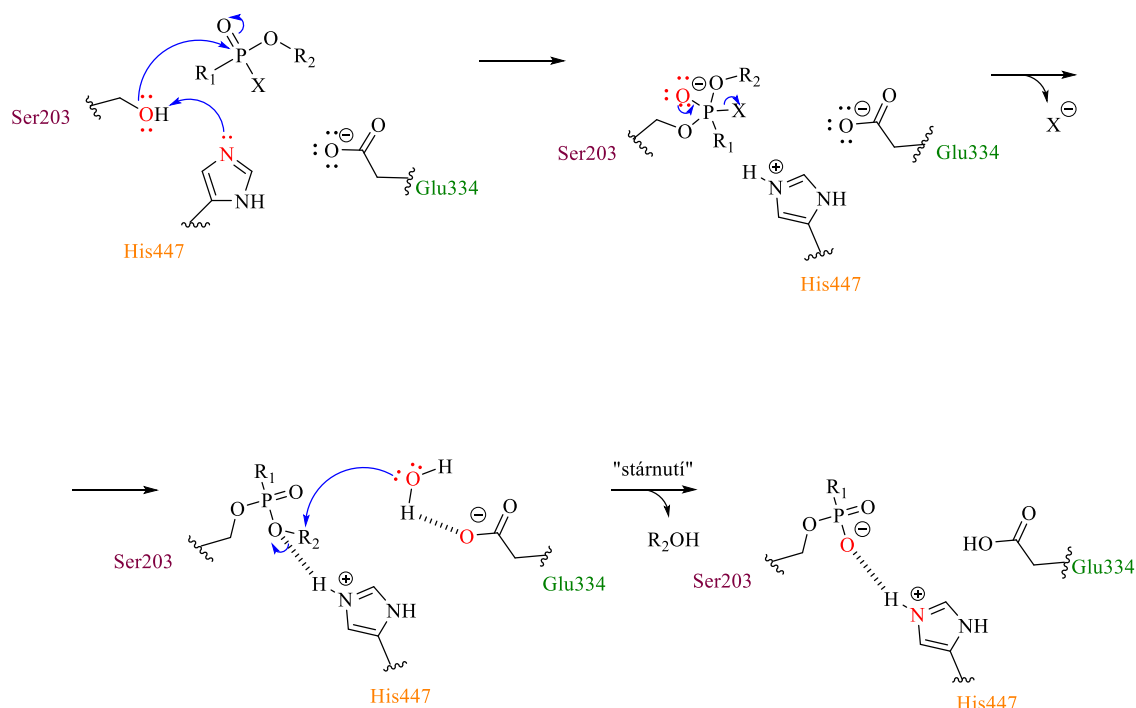
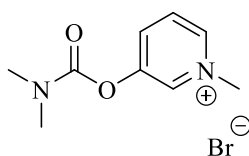


Schéma 2: Mechanismus inhibice AChE vlivem OP a proces stárnutí fosforylované AChE.

1.3. Terapie otrav organofosfáty

Pokud dojde ke kontaktu civilistů nebo vojenského personálu s NPL mohou o přežití intoxikovaného jedince rozhodovat minuty. U intoxikací OP lze volit mezi dvěma způsoby terapie [27].

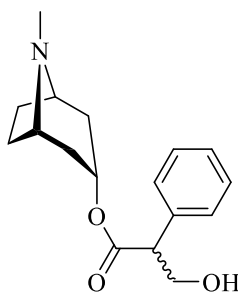
Prvním způsobem je profylaxe, která je vhodná např. pro zdravotníky a vojáky, kdy je zvýšený předpoklad rizika expozice těchto jedinců OP. Udržování aktivní AChE je základním požadavkem pro účinnou profylaxi. AChE může být chráněna pomocí reverzibilních inhibitorů AChE, které inhibují enzym pomocí slabých nevazebných molekulových interakcí, které rychle vznikají i zanikají a znemožňují inhibici irreverzibilními OP. Na rozdíl od irreverzibilních inhibitorů u nich lze obnovit normální enzymovou aktivitu AChE [35, 36]. Pyridostigmin bromid (**11**) (Obrázek 6) je jediný lék schválený Food and Drug Administration (FDA), který se využívá za účelem profylaxe intoxikací NPL [27].



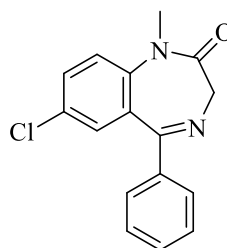
pyridostigmin bromid (**11**)

Obrázek 6: Struktura pyridostigmin bromidu (**11**).

Druhým způsobem je post-expoziční terapie, kdy je pro přežití postižených pacientů naprosto zásadní rychlost podání antidot. Nejúčinnějším způsobem pro rychlou klinickou léčbu otrav OP je intravenózní (IV) podání vhodného antidota. K nouzové léčbě intoxikovaných vojáků v terénu slouží tříkomorové autoinjektory pro rychlé intramuskulární (IM) antidotní podání. V těchto autoinjektorech je obsažen atropin (**12**) jako anticholinergikum, diazepam (**13**) jako antikonvulzivum (Obrázek 7) a komerční reaktivátor AChE. Problémem je, že i při okamžitém IM podání antidota vyžaduje tato forma podání k dosažení jeho terapeutických hladin v krevním oběhu 8 až 30 min [37].



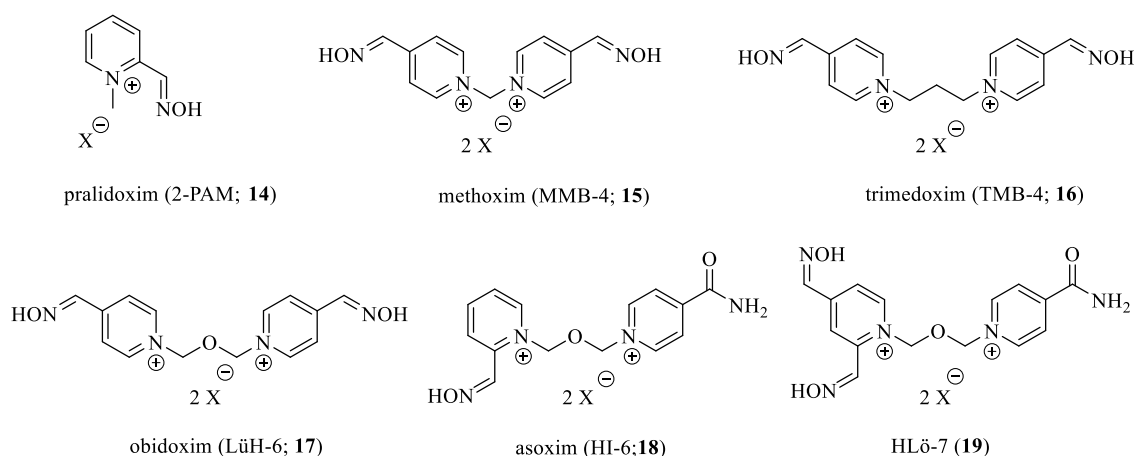
atropin (**12**)



diazepam (**13**)

Obrázek 7: Struktura atropinu (**12**) a diazepamu (**13**).

Kauzální léčbu pak zajišťují oximové reaktivátory (např. pralidoxim (2-PAM; **14**), methoxim (MMB-4; **15**), trimedoxim (TMB-4; **16**), obidoxim (LüH-6; **17**) a asoxim (HI-6; **18**) [35]. Slibným reaktivátorem ve vývoji je i látka označovaná jako HLö-7 (**19**) (Obrázek 8) [38].



Obrázek 8: Struktury reaktivátorů OP inhibované AChE **14-19**.

1.3.1. Oximové reaktivátory cholinesteras

Oximové reaktivátory jsou látky, které vykazují antidotní účinek vůči inhibované AChE při intoxikacích NPL. Komerčně dostupné reaktivátory jsou pyridiniové aldoximy s přítomností jednoho nebo dvou kvarterních dusíků, proto jsou to polární organické sloučeniny s nízkou lipofilitou. Rozlišujeme dva strukturální typy aldoximů dle počtu pyridiniového kruhů a kvarterních dusíků. Bylo zjištěno, že monokvarterní a biskvarterní aldoximy vykazují účinnou reaktivační schopnost vůči OP inhibované AChE. Biskvarterní aldoximy vykazují lepší reaktivační účinnost než monokvarterní aldoximy díky tomu, že druhý kvarterní dusík interaguje s PAS enzymu AChE, což zvyšuje vazebnou afinitu reaktivátoru v CAS [39].

Problémem komerčně používaných reaktivátorů při reaktivaci inhibované AChE je, že jsou ve srovnání s NPL trvale nabitě kvarterní sloučeniny, které ve velké míře neprostupují přes HEB. Tyto reaktivátory reaktivují účinněji spíše AChE na periférii než v CNS [40]. Například 2-PAM prochází přes HEB přibližně z 10 % po IV podané dávce [41]. Biskvarterní oximy prostupují přibližně z 1-3 % po IV podané dávce [22, 42].

Pro reaktivaci OP inhibované AChE je naprosto nezbytné, co nejrychlejší zahájení terapie před dealkylací OP [43]. Mechanismus reaktive OP inhibované AChE probíhá prostřednictvím dvoukrokové reakce. V prvním kroku je důležitá tvorba oximátového aniontu, který vzniká při fyziologickém pH. Oximátový aniont nukleofilně atakuje atom fosforu fosforylované AChE. Ve druhém kroku dochází k vyvázání komplexu mezi reaktivátorem a OP, který se nazývá fosfyloxim. Díky vyvázání toho komplexu dojde k reaktivaci AChE, která může opět degradovat ACh (Schéma 3) [22].

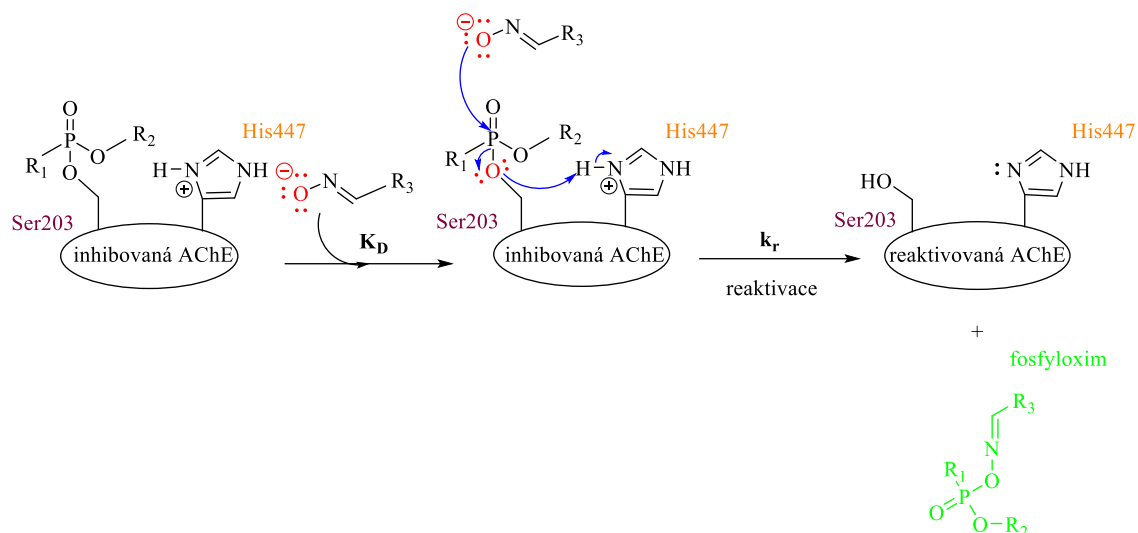


Schéma 3: Mechanismus reaktivace OP inhibované AChE.

Každý z komerčně dostupných reaktivátorů je vhodný pro reaktivaci AChE, která je inhibována jiným typem NPL. 2-PAM je velmi účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem nebo látkou VX, ale naopak byl méně účinný při jeho podání pacientům intoxikovaným somanem a tabunem [44]. Methoxim nevykazuje dobrou reaktivaci účinnost při intoxikacích tabunem, ale dobrou při intoxikacích cyklosarinem [45, 46]. Trimedoxim vykazuje v porovnání s obidoximem menší reaktivaci účinnost u intoxikací tabunem. Naopak dobrou reaktivaci účinnost vykazuje trimedoxim u intoxikací sarinem nebo látkou VX, ale špatnou proti intoxikaci somanem. Obidoxim je efektivní v terapii intoxikací tabunem, sarinem a látkou VX. Prvním komerčně dostupným reaktivátorem, který byl schopný reaktivovat somanem inhibovanou AChE je asoxim. Zároveň vykazuje dobrou reaktivaci účinnost u intoxikací sarinem a látkou VX. Nevýhodou tohoto reaktivátoru byla neschopnost reaktivovat inhibovanou AChE tabunem. Dalším velmi důležitým reaktivátorem je HLö-7, jelikož vykazuje dobrou účinnost reaktivace u intoxikací hlavními čtyřmi NPL jako je cyklosarin, tabun, sarin a soman [44]. V současné době není HLö-7 komerčně používán a je i nadále kvůli jeho nestabilitě ve vodných roztocích a nízké rozpustnosti ve vodě ve stádiu testování [38].

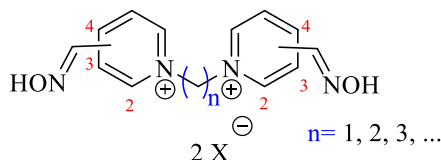
1.3.1.1. Faktory ovlivňující reaktivaci cholinesteras

Na základě prvních studií Wilsona v roce 1955 byla u reaktivátorů ChE zjištěna nezbytná přítomnost oximové skupiny a kvartérního dusíku v jejich struktuře pro reaktivační účinek [47].

Dále je velmi důležitá hodnota pK_a reaktivátoru, která právě určuje snadnost disociace oximové skupiny na oximátový anion, který v reaktivačním mechanismu hraje klíčovou roli. Čím nižší je hodnota pK_a , tím lépe se tvoří ionizovaná forma daného reaktivátoru. Optimální rozmezí se pohybuje mezi 7,00 – 8,35, kdy je přítomno alespoň 10 % oximátové formy reaktivátoru, která je potřebná pro dostačující reaktivační schopnost pro přežití organismu. Hodnoty pK_a pro standardní reaktivátory se pohybují od 7,04 pro HLö7 do 8,2 pro trimedoxim [48].

Dalšími faktory pro úspěšnou reaktivaci mohou být délka a rigidita linkeru mezi pyridiniovými kruhy u biskvartérních reaktivátorů a poloha oximových skupin (**20**) (Obrázek 9). Pokud do struktury reaktivátorů začleníme příliš rigidní řetězec, tak se výrazně snižuje efektivní schopnost reaktivace [45].

Jak již bylo zmíněno, tak účinnost reaktivace může ovlivňovat počet a poloha oximových skupin. Nejčastěji se oximová skupina u reaktivátorů vyskytuje v poloze C2 a C4, kde je reaktivační schopnost většinou více účinná ve srovnání s oximovou skupinou v pozici C3. V případě inhibice AChE cyklosarinem se ukázala vyšší reaktivační schopnost u reaktivátorů s oximovou skupinou na pozici C2. Pro inhibici OP pesticidy a tabunem je vhodnější pozice C4 a u inhibice sarinem a VX je nejvyšší účinnost v případě pozic C2 a C4 [45].

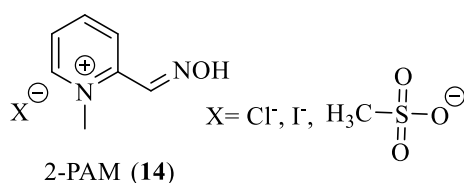


Obcená struktura pro biskvartérních reaktivátory (**20**)

Obrázek 9: Obcená struktura (**20**) pro biskvartérní reaktivátory lišících se délkou linkeru a polohou oximových skupin.

1.4. Pralidoxim

Pralidoxim (2-PAM; **14**; Obrázek 10) patří mezi nejznámější a dobře prozkoumané reaktivátory společně s obidoximem a asoximem. Již mnoho let se řadí mezi komerčně dostupné reaktivátory [49, 50]. Poprvé byl 2-PAM použit jako antidotum při intoxikaci parathionem roku 1956 v Japonsku, tedy po roce od jeho objevení [51]. V různých zemích se liší také forma soli, ve které je 2-PAM podáván (Obrázek 10). 2-PAM chlorid je dosud jediným léčivem, který schválila FDA v USA pro klinickou léčbu intoxikací NPL. Ve Velké Británii se používá převážně ve formě mesylátu [52, 53]. Chloridová sůl 2-PAM je převládající formou, díky své nízké molekulové hmotnosti, dobré rozpustnosti ve vodě a vysoké účinnosti reaktivace. Další formou podání 2-PAM může být jodid, kde je nutno dbát na správnou dávku, protože nadbytek jodidu může vést k toxicitě pro štítnou žlázu [50].



Obrázek 10: Obecný strukturní vzorec forem solí 2-PAM (**14**).

2-PAM se rovnoměrně distribuuje v krvi, přičemž u něj nebyla prokázána vazba na hemoglobin ani plazmatické bílkoviny. Maximální koncentrace 2-PAM je v krevní plazmě dosaženo po IM podání zhruba po 35 min. Eliminace 2-PAM probíhá zejména močí a stolicí. Proto je vhodné upravit dávku u pacientů se sníženou funkcí ledvin, protože jeho clearance se v tom případě výrazně snižuje. 2-PAM je relativně netoxický a případy jeho toxicity jsou velmi vzácné [52].

1.4.1. Syntéza pralidoximu

Od objevení 2-PAM roku 1955 britskými a americkými výzkumnými skupinami se soustředila pozornost na objevení a syntézu dalších oximových reaktivátorů zpočátku zaměřených hlavně vůči somanu, jelikož doba stárnutí somanem inhibované AChE je velmi krátká, přibližně 2-4 min. V poslední době se zájem soustředil zejména na vývoj reaktivátorů účinných proti širšímu spektru působení NPL [54]. Irwin B. Wilson nevycházel při návrhu struktury molekuly 2-PAM z analogu již existující

molekuly, ale místo toho ke svému návrhu struktury aplikoval teorii o působení AChE [55, 56].

Wilson a Ginsburg poprvé popsali dvoukrokovou syntézu 2-PAM jodidu (**14**) reakcí pyridin-2-karbaldehydu (**21**) s NH_2OH v kyselém prostředí za vzniku pyridin-2-aldoximu (**22**) s následnou methylací CH_3I za vzniku finálního produktu 2-PAM ve formě jodidové soli (Schéma 4) [47, 57].

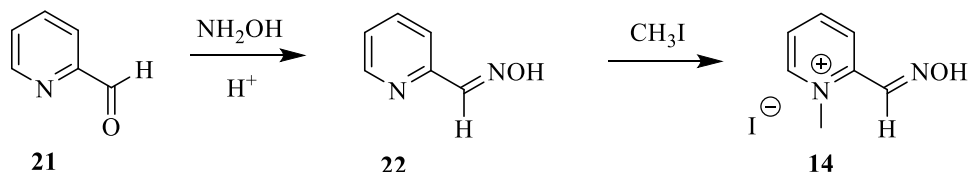


Schéma 4: Schéma syntézy 2-PAM jodidu (**14**).

V prvním kroku probíhá nukleofilní adice (A_dN), konkrétně adičně-eliminací mechanismus (Schéma 5). Nejprve volný elektronový pár atomu dusíku hydroxylaminu nukleofilně atakuje aldehydický uhlík látky **21** za tvorby tetraedrického intermediátu. Přenosem protonu z atomu dusíku na atom kyslíku hydroxylové skupiny vzniká hemiaminal jako neutrální meziprodukt. Po následné druhé protonizaci hydroxylové skupiny, v tomto případě kyselinou, dochází k migraci elektronů a ke vzniku dvojné vazby mezi atomem dusíku a kyslíkem za současné eliminace molekuly vody. Atom dusíku dále ztrácí kyselý atom vodíku a vzniká oximová skupina u produktu **22** [58].

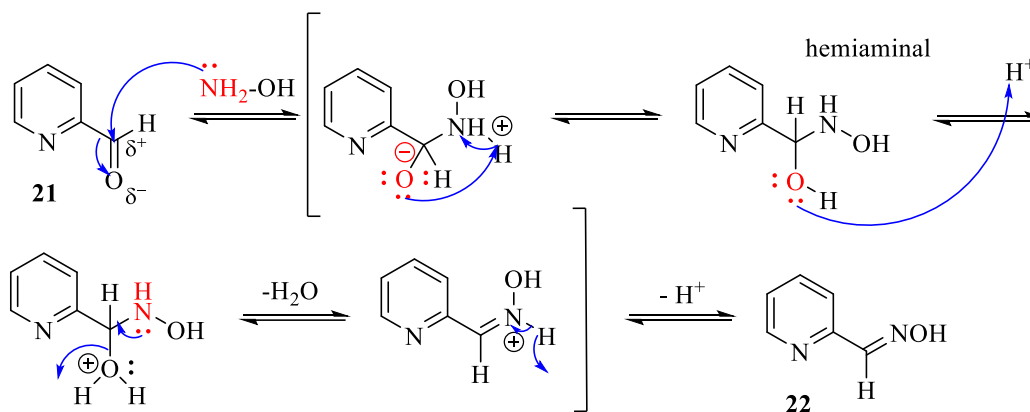


Schéma 5: Adičně-eliminací mechanismus vzniku oximu (**22**).

Ve druhém kroku dochází k methylaci atomu dusíku na pyridinovém kruhu mechanismem bimolekulární nukleofilní substituce ($\text{S}_\text{N}2$) s CH_3I . Volný elektronový pár atomu dusíku pyridinu látky **22** nukleofilně atakuje metylovou skupinu CH_3I , kde je

polarizovaná vazba směrem k atomu jódu a má tak parciální kladný náboj (δ^+). Nukleofil přistupuje k elektrofilnímu atomu uhlíku vždy z opačné strany vůči odstupující skupině. Pokud by nukleofil přistupoval ze stejné strany jako je odstupující skupina, docházelo by zde k silnému sterickému bránění, jelikož atom jódu je velmi objemný. Obecně jsou halogenmethany v S_N2 reakcích nejreaktivnějšími substráty, jelikož zde nedochází ke sterickému bránění a nukleofil tak může dobře přistupovat z opačné strany vůči odstupující skupině. Dále vzniká přechodový stav, kdy se vytváří částečná vazba mezi přistupujícím nukleofilem a atomem uhlíku CH_3I . Jodidový anion patří mezi slabé báze a bude dobře stabilizovat záporný náboj vznikající v přechodovém stavu. Po odstoupení jodidového aniontu dochází k vytvoření nové kovalentní vazby mezi nukleofilem a methylovou skupinou u finálního produktu **14** (Schéma 6) [58].

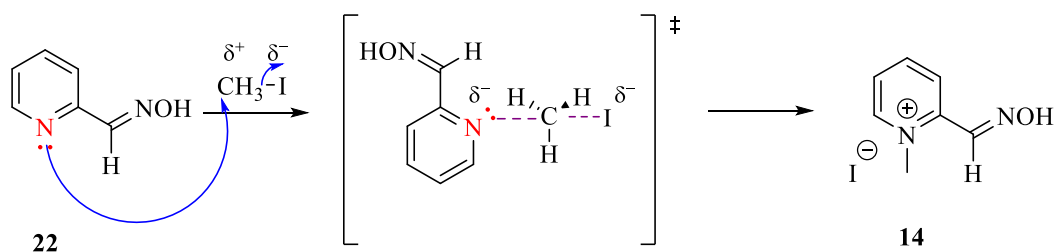
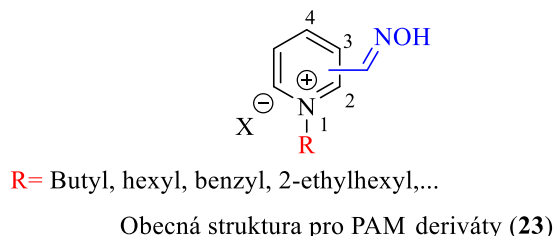


Schéma 6: S_N2 mechanismus methylace pyridin-2-aldoximu (**22**).

1.4.2. Deriváty a izomery pralidoximu

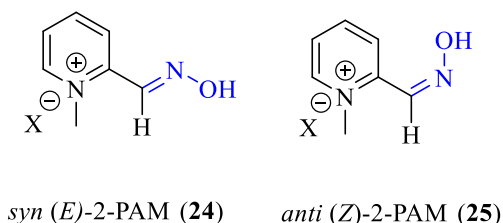
Deriváty odvozené od obecné struktury pralidoximu můžeme rozdělit dle polohy oximové skupiny na pyridiniovém jádře, dále podle N-alkylace postranního řetězce na atomu dusíku pyridinového jádra (**23**) (Obrázek 11). U intoxikací sarinem došlo při prodloužení postranního řetězce u derivátů 2-PAM ke snížení jejich reaktivační účinnosti. 4-PAM vykazuje mírné reaktivační účinky, kdy se reaktivační účinnost zvýšila s prodloužením postranního řetězce. Nejslabší reaktivační účinnost u intoxikací sarinem vykazují 3-PAM deriváty. Všechny alkybenzenové deriváty 2-PAM a některé alkybenzylové 4-PAM deriváty prokázaly velmi efektivní reaktivaci sarinem inhibované AChE. Studie prokázaly, že zavedení lineárního alkylového řetězce na pyridiniový dusík zvyšuje reaktivační účinnost v porovnání se zavedeným rozvětveným alkylovým řetězcem [13]. Avšak další provedená studie na krysách prokázala, že se zavedením alkylového řetězce na pyridiniový dusík zvyšuje toxicita v porovnání s běžným 2-PAM [59]. V současné době není mechanismus toxicity u těchto látek plně objasněn. V této souvislosti byla provedena jiná studie, podle které by za toxicitou mohla být inaktivace

mitochondriální oxidasy a tvorba reaktivních forem kyslíku. K určení přesného mechanismu toxicity těchto reaktivátorů je však nutný další výzkum [60].



Obrázek 11: Obecná struktura některých PAM derivátů (23).

Oximy se obecně vyskytují ve formě dvou geometrických izomerů *syn* (24) a *anti* (25) (Obrázek 12). Další možností pro vyjádření geometrické izomerie oximů je *E/Z* konfigurace. Vznik izomerů je dán omezenou rotací kolem rigidní dvojné vazby C=N. Tyto izomery mohou mít různé fyzikální a farmakologické vlastnosti [50, 61]. Izomer *anti* je nestabilní a rychle izomerizuje na *syn*-izomer. V roztoku se vytváří rovnováha obou izomerů s majoritním zastoupením *syn*-izomeru. *Syn*-izomer 2-PAM pravděpodobně vykazuje vyšší reaktivační aktivitu u sarinem inhibované AChE v porovnání s jeho *anti*-isomerem, jak již bylo dříve pozorováno u 4-PAM [62, 63].



Obrázek 12: Struktury *syn* (*E*)-2-PAM (24) a *anti* (*Z*)-2-PAM (25).

Oximy podléhají ve vodných roztocích v přítomnosti kyselého katalyzátoru protonizaci a následné izomerizaci. V případě protonizovaných oximů jsou nejvíce stabilní *anti* (*Z*) izomery. Vazba C=N v oximech je sama o sobě příliš rigidní a neumožňuje volnou rotaci kolem této vazby. Izomerizace oximů začíná protonací dusíku. Dále dochází k adici vody na dvojnou vazbu C=N protonizovaného oximu. Dusík je v porovnání s uhlíkem mnohem elektronegativnější a zvyšuje svou přítomností elektrofilitu sousedního uhlíku, na který se může navázat voda jako nukleofil. Po adici vody vzniká přechodový stav, který je však kvůli energeticky nestabilnímu kvarternímu

dusíku pouze dočasný. V tomto přechodovém stavu je již přítomna jednoduchá vazba, která umožňuje rotaci kolem vazby C-N. Nakonec dochází k eliminaci vody a stabilizaci molekuly odštěpením protonu z kvartérního dusíku (Schéma 7) [64].

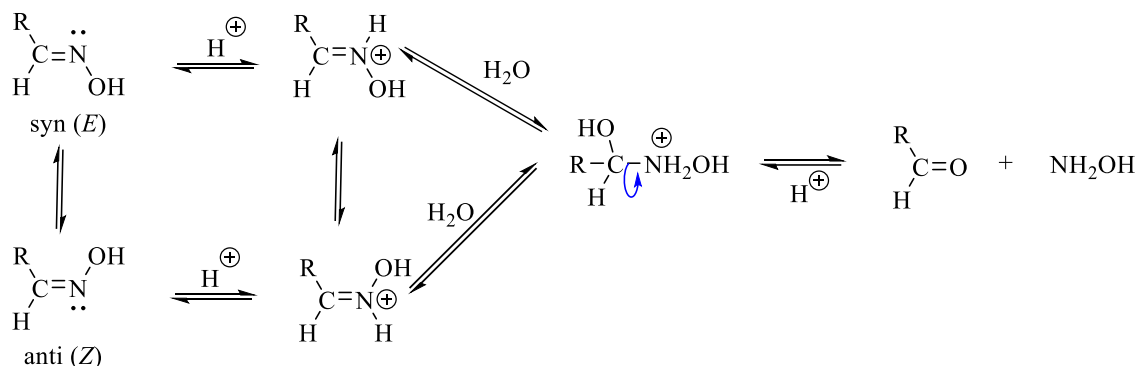
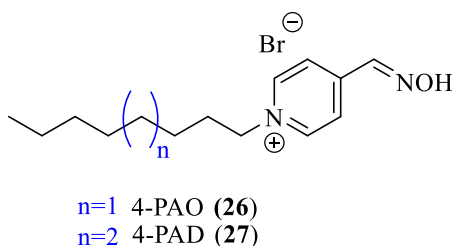


Schéma 7: Mechanismus izomerizace oximů ve vodných roztocích v přítomnosti kyseliny.

1.5. Metody zvýšení prostupu reaktivátorů do mozku

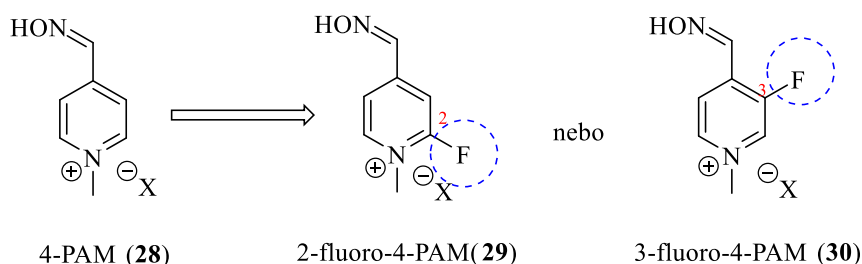
Pro zvýšení prostupnosti oximových reaktivátorů přes HEB lze uplatnit 4 základní přístupy [39].

Jako první je vývoj nových strukturních typů oximových reaktivátorů. Methoxim s krátkým spojovacím řetězcem mezi dvěma pyridiniovými kruhy má lepší prostupnost přes HEB oproti např. trimedoximu a obidoximu [39]. Výhodná je pro lepší vstup reaktivátoru do CNS oximová skupina v *para*-poloze [65]. V této souvislosti byly studovány monokvartérní analogy 4-PAM, kde byla methylová skupina substituována různými delšími alifatickými řetězci. Nově připravené sloučeniny byly pojmenovány jako 4-PAO (**26**) a 4-PAD (**27**) (Obrázek 13) [13, 59]. Substituce delšími alifatickými řetězci vedla v tomto případě k vyšší prostupnosti do CNS cca 30 %. Naopak reaktivační účinnost těchto reaktivátorů byla dvakrát nižší než u 2-PAM. Jejich potenciální využití je navíc omezeno jejich významnou toxicitou [59, 66, 67].



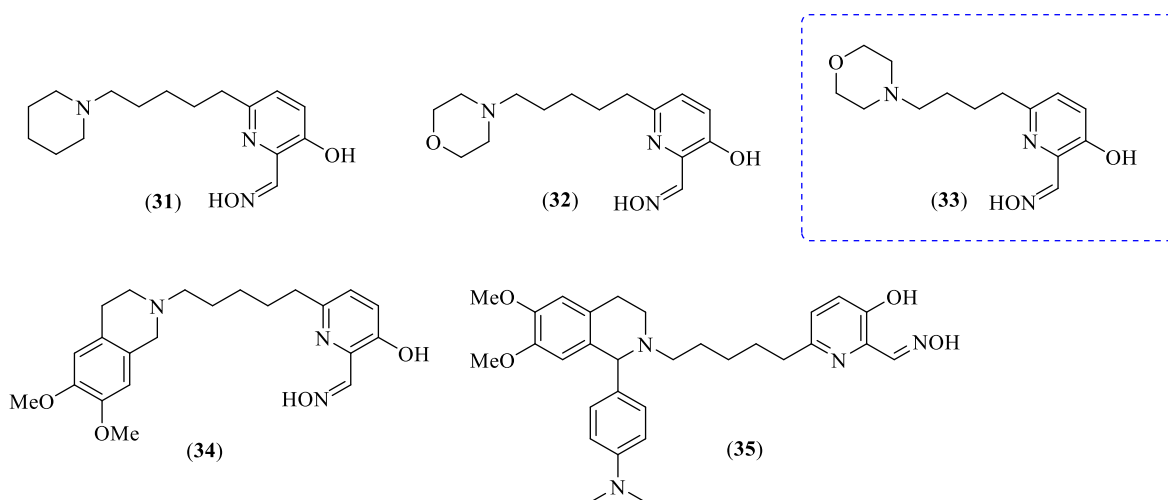
Obrázek 13: 4-PAM analogy (**26-27**) se zvýšenou prostupností do CNS.

Fluorace pyridiniového kruhu reaktivátorů umožnila zvýšení lipofility a vyšší prostupnost reaktivátorů přes HEB. Prostupnost těchto reaktivátorů byla mírně lepší oproti nehalogenovaným analogům 4-PAM (**28**), ale snížila se u nich rozpustnost ve vodě. Sloučeniny **29-30** byly také testovány na svou schopnost reaktivace paraoxonem (POX) inhibované AChE červených krvinek, ale nevykazovaly lepší výsledky než komerčně dostupné reaktivátory (Obrázek 14) [68].



Obrázek 14: Fluorované deriváty 4-PAM (**28-30**) se zvýšenou lipofilitou.

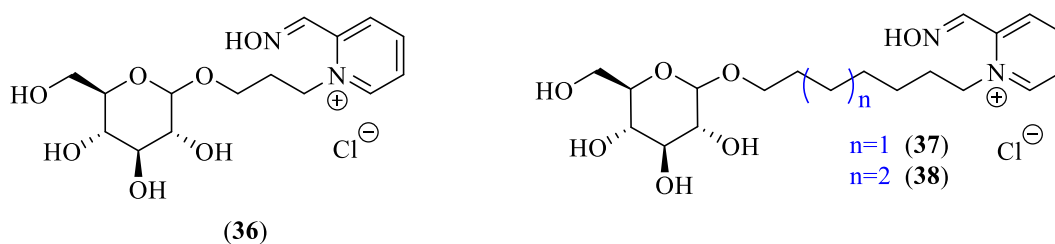
Další možností je vývoj nenabitých oximových reaktivátorů. Výsledky nedávné studie ukázaly, že pět nenabitých oximů (**31-35**) odvozených od struktury 3-hydroxy-pyridin-2-aldoximu mají ve srovnání s kvartérními oximy jako je asoxim, 2-PAM anebo obidoxim vyšší lipofilitu vedoucí k lepší prostupnosti přes HEB a zvýšení jejich biodostupnosti v CNS [69]. Z pěti oximů měly tři nízkou cytotoxicitu a mohly být použity pro další testování. Molekula **33** se ukázala být jako nejlepší nenabitý oxim v *in vivo* studiích, protože pronikala do mozku přibližně z 40 % (Obrázek 15). Nevýhodou molekuly **33** je rychlá eliminace z organismu. Tento problém by mohlo vyřešit perorální podání, díky dobrému průniku reaktivátoru přes biologické bariéry [70].



Obrázek 15: Nenabité oximy (**31-35**) testovány *in vivo*.

Druhou možností, která si získala pozornost v posledním desetiletí je konjugace reaktivátorů s glukózou [39]. Glukóza se fyziologicky váže na specifický transportér GLUT1 umístěný v HEB, který by mohl usnadnit prostup konjugátu oxim-glukóza přes HEB. V této souvislosti byly připraveny konjugáty 2-PAM se sacharidy. Ačkoli nebylo přímo prokázáno, že by byly transportovány přes GLUT1 transportér, vykazovaly vyšší biodostupnost v CNS ve srovnání s oximy bez sacharidové skupiny na základě snížení hypotermie vyvolané POX [71, 72]. Nový derivát 2-PAM s glukózou připojenou k poloze N1 přes sedmiuhlíkatý linker (**37**) (Obrázek 16) měl mírně lepší výsledky reaktivace ve srovnání s původní molekulou z předchozí studie. Výsledky molekulárního modelování ukázaly, že transport oximu konjugovaného s glukózou přes GLUT1 transportér je omezenější než transport samotné glukózy. Transportér GLUT1 tedy nemusí být optimální pro jeho přenos přes HEB [73].

V další studii byly připraveny analogy 2-PAM konjugované s glukózou za použití tříuhlíkatých (**36**) nebo sedmi – až osmiuhlíkatých linkerů (**37-38**). Předpokládalo se, že osmiuhlíkatý linker umožňuje glukóze interagovat se zbytky v PAS AChE a pomáhá se správnou orientací oximu uvnitř CAS. Nejúčinnějším analogem byl konjugát **38** s osmiuhlíkatým linkerem (Obrázek 16), u kterého bylo zjištěno, že má 80 % schopnost reaktivace pro lidskou AChE inhibované VX, ale pouze v poměru k schopnosti reaktivace 2-PAM, která byla nastavena na 100 % [71].

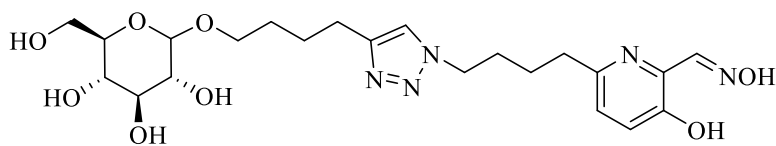


Struktury konjugátů 2-PAM-glukóza (**36 - 38**)

Obrázek 16: Struktury konjugátů 2-PAM-glukóza (**36-38**).

Nový typ oximů kombinuje dvě výše zmíněné přístupy pro zlepšení prostupnosti reaktivátorů přes HEB, tj. konjugaci se sacharidem a nenabitě oximy. Sloučenina **39** obsahuje triazolovou skupinu mezi glukosou a C6 pyridin-2-aldoximem. U triazolové skupiny se očekávalo, že zlepší vazbu k aktivnímu místu AChE prostřednictvím interakcí s aromatickými zbytky. Připravená sloučenina **39** (Obrázek 17) vykazovala nižší prostupnost přes HEB oproti 2-PAM, ale naopak vyšší prostupnost než asoxim. Výsledky

in vivo ukázaly, že oxim **39** má podobnou reaktivační účinnost jako asoxim u myši vystavených POX [74].



Konjugát glukózy vázaný na triazol (**39**)

Obrázek 17: Konjugát glukózy vázaný na triazol (**39**).

Inhibice P-glykoproteinu (Pgp), jakožto efluxního transportéru v HEB, byla považována za další možnost pro zvýšení prostupnosti reaktivátorů přes HEB. Tento myšlenka vychází z předpokladu, že některé oximové reaktivátory by mohly být substráty pro Pgp [75], to se ale nepotvrdilo ani u asoximu, natož u 2-PAM [76]. Na základě studie na krysách intoxikovaných somanem bylo prokázáno, že po profylaktické aplikaci nekompetitivního inhibitoru tarikvidaru vzrostla koncentrace asoximu v CNS dvojnásobně po jedné hodině a procento jedinců u kterého se projevovaly symptomy otravy bylo nižší. Je nutné zmínit, že krysám byl podán také atropin, na který může mít vliv inhibice Pgp [77, 78].

Pro zlepšení prostupnosti 2-PAM přes HEB byl dříve vývoj tohoto reaktivátoru směřován do podoby jeho proléčiva, tzv. pro-2-PAM (**40**). Tento dihydropyridinový derivát 2-PAM (**14**) měl zvýšit jeho biologickou dostupnost v CNS. Tato molekula proléčiva má vyšší lipofilitu a mohla by tedy lépe prostupovat přes HEB. V CNS by mělo dojít k oxidaci na funkční podobu reaktivátoru 2-PAM (**14**) (Schéma 8) [39, 79].

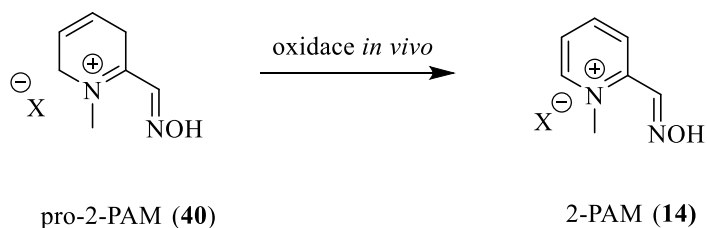


Schéma 8: *In vivo* oxidace pro-2-PAM (**40**).

Experimentálně bylo zjištěno, že u morčat vystavených působení sarinu nedošlo tak k velkému neurologickému poškození v případě léčby intoxikace pomocí pro-2-PAM (40). Mezi nevýhody proléčiva patří obtížná syntéza a značná nestabilita molekuly a s tím spojená autooxidace [39, 79]. Dále pro-2-PAM vykazoval slabou reaktivační účinnost u inhibované AChE sarinem a látkou VX v CNS i PNS. Záchvaty vyvolané sarinem a VX byl schopen blokovat pouze omezeně z 16-33 %. Dále byl neúčinný při reaktivaci AChE v CNS inhibované cyklosarinem. V krvi a srdeční tkáni byla reaktivační účinnost cyklosarinem inhibované AChE <15 %. Hlavní nevýhodou pro-2-PAM je tedy jeho neschopnost efektivní reaktivace inhibované AChE v CNS sarinem, VX a cyklosarinem [80].

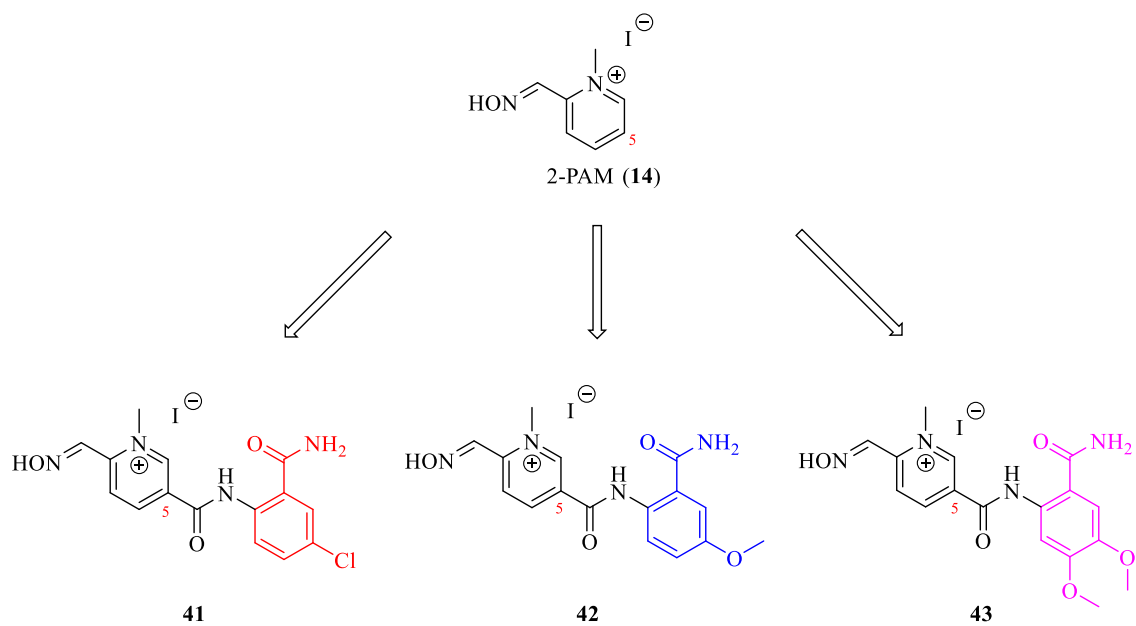
2. Design

Tato diplomová práce je zaměřena na syntézu nových potencionálních reaktivátorů AChE a BChE odvozených od struktury komerčně používaného monokvartérního reaktivátoru 2-PAM.

V této diplomové práci byly připraveny celkem tři nové deriváty 2-PAM substituované v poloze C5 různými aromatickými cykly přes amidickou vazbu. Design tří cílových struktur navazuje na dříve syntetizované deriváty ve spolupráci s Korea Research Institute of Chemical Technology. Virtuální screening ZINC databáze nejprve poskytl 258 struktur, které by mohly potenciálně reagovat se sarinem inhibovanou AChE a zároveň bylo u těchto molekul možné zavést oximovou skupinu do struktury. Dále bylo manuálně vybráno 12 monokvartérních struktur k syntéze.

Všechny vybrané struktury v molekulárním dockingu s lidskou rekombinantní AChE měly kation- π interakce a π - π stacking s Trp86 (Trp82 v BChE) zároveň tvořily vodíkové vazby mezi oximovou skupinou a Gly120 (Gly115 v BChE). V neposlední řadě přítomnost druhého aromatického cyklu napojeného přes amidickou vazbu substituovaného amidovou skupinou zlepšovala interakce v PAS.

Další předpoklad je, že navržené deriváty **41-43** (Obrázek 18) mohou mít schopnost tvořit vodíkové můstky s aminokyselinovými residui v ChE a v neposlední řadě mohou také tvořit třetí „pseudo“ cyklus, který by poskytoval více interakcí v CAS.



Obrázek 18: Struktury 2-PAM (**14**) a navržených cílových molekul **41-43**.

3. Cíle práce

Cílem práce je syntéza 5-substituovaných pyridinium-2-aldoximů jako potenciálních reaktivátorů OP inhibovaných ChE. První krok syntézy probíhá pomocí Kornblumovi oxidace a vychází z methyl 6-methylnikotínátu (**44**). V mezikroku bude syntetizována *p*-methoxybenzylová chránicí skupina (PMB; **46**), která bude použita do dalšího reakčního kroku. Ve druhém kroku bude docházet k nachránění aldehydické skupiny sloučeniny **45** za vzniku chráněného oximu mechanismem A_dN , konkrétně adičně – eliminačním mechanismem. Třetí krok bude probíhat pomocí nukleofilní acylové substituce (S_NAc), kdy dochází k bazické hydrolyze methylesteru **47**. Ve čtvrtém kroku dochází k přeměně karboxylové kyseliny **48** na acylchlorid **49** opět mechanismem S_NAc . Pátý krok zahrnuje aminolýzu za vzniku amidů na pyridinovém kruhu **53-55**. V dalším šestém kroku dochází k N-methylaci pyridinového dusíku pomocí S_N2 mechanismu za vzniku monokvartérních sloučenin **56-58**. V posledním sedmém kroku dochází k odchránění oximu za vzniku finálních produktů **41-43**. Nově připravené sloučeniny odvozené od struktury komerčně dostupného reaktivátoru 2-PAM se liší substitucí na amidovém substituentu v poloze C5 (Schéma 9).

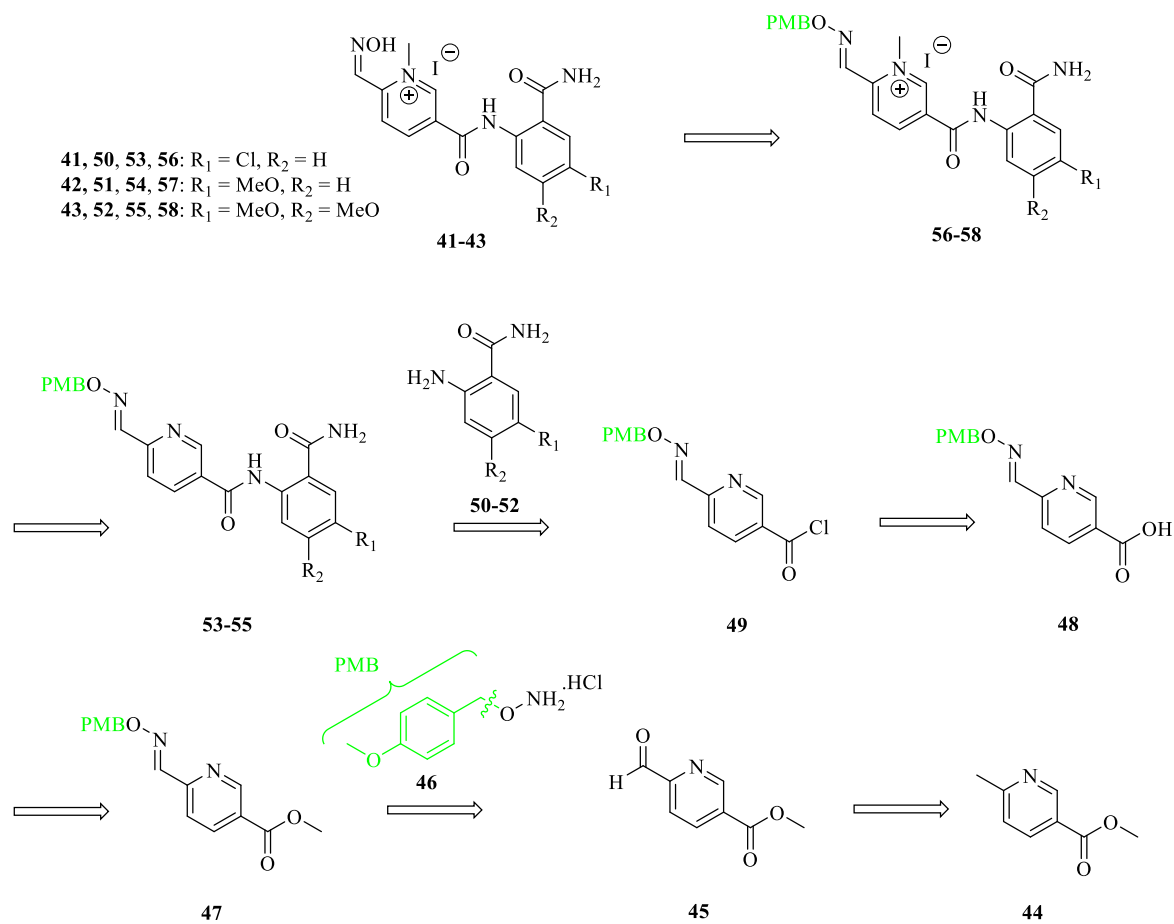


Schéma 9: Retrosynetická analýza reakčních kroků při přípravě finálních produktů **41-43**.

4. Výsledky a diskuse

V prvním kroku syntézy došlo k reakci výchozí látky methyl 6-methylnikotínátu (**44**) s jódem, trifluoroctovou kyselinou (TFA) a bezvodým dimethylsulfoxidem (DMSO) (Schéma 10). DMSO se v reakci uplatňuje nejen jako rozpouštědlo, ale rovněž se účastní reakčního mechanismu. Celá reakce probíhala pod inertní dusíkovou atmosférou. Produkt **45** byl separován pomocí extrakce, přečištěn sloupcovou chromatografií a izolován ve formě žluté pevné látky s výtěžností 63 %. Struktura produktu byla ověřena pomocí metod NMR a HRMS.

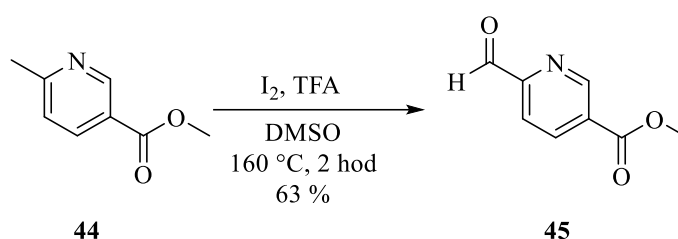


Schéma 10: Příprava produktu **45**.

Syntéza probíhá pomocí Kornblumovi oxidace v prostředí DMSO jako rozpouštědla. Nejprve dochází vlivem změny pH pomocí TFA k ustálení chemické rovnováhy enaminové izomerizace ve prospěch enamínu. Následuje jodace, kdy dvojná vazba enamínu nukleofilně atakuje atom jódu s parciálním kladným nábojem (δ^+), který má polarizovanou vazbu směrem k druhému atomu jódu a také dochází k obnovení pyridinového jádra. V dalším kroku dochází k S_N2 reakci, která začíná nukleofilním atakem kyslíkového atomu se záporným nábojem na elektrofilní atom uhlíku, který má polarizovanou vazbu směrem k atomu jódu s parciálním záporným nábojem. Dochází k vytvoření přechodového stavu, kdy se vytváří částečná vazba mezi přistupujícím nukleofilem a atomem uhlíku, za současného odstoupení jodidového aniontu. Po odstoupení jodidového aniontu vzniká nová kovalentní vazba mezi nukleofilem a elektrofilním atomem uhlíku. Následně dochází k odštěpení protonu z atomu uhlíku sousedícího s navázaným DMSO, což má za následek posun elektronů k elektronegativnímu atomu kyslíku. V důsledku posunu elektronů dochází ke vzniku karbonylu a odštěpení dimethylsulfidu (Schéma 11) [81].

Po uplynutí reakčního času byl k odstranění přebytečného jódu z reakční směsi použit 0,5 M roztok $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, který převádí jód na ve vodě dobře rozpustnou sůl NaI . Tato sůl byla z reakce následně jednoduše oddělena extrakcí do vodné fáze.

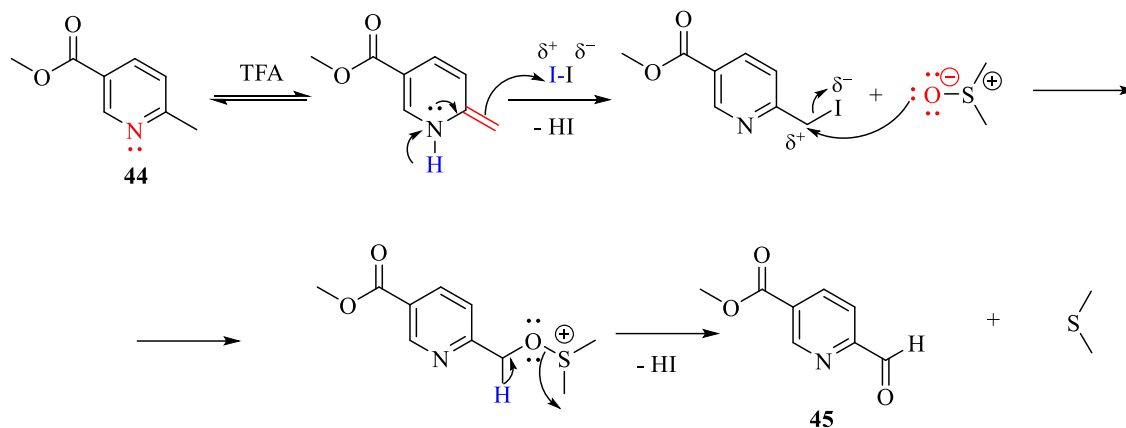


Schéma 11: Mechanismus Kornblumovi oxidace při přípravě sloučeniny **45**.

V mezikroku byla připravena chránicí skupina v podobě látky **46** reakcí výchozí látky *N*-*boc*-hydroxylaminu (**59**) s 4-methoxybenzylchloridem (**60**) (Schéma 12). Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý tetrahydrofuran (THF). Vše probíhalo pod inertní dusíkovou atmosférou. Reakční produkt byl izolován ve formě bílé pevné látky s výtěžností 73 % pomocí precipitace v diethyletheru (Et_2O). Struktura produktu byla ověřena pomocí metod NMR a HRMS.

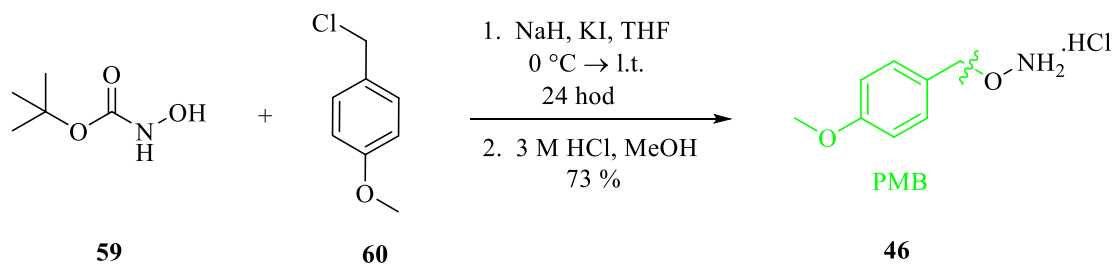


Schéma 12: Příprava produktu **46**.

V tomto kroku dochází k syntéze etheru pomocí $\text{S}_\text{N}2$ mechanismu. Alkoholy jsou obecně slabé kyseliny ($\text{pK}_\text{a} \sim 16$) a k vytržení jejich protonu je proto nutná silná báze, např. v podobě NaH . Nejprve hydridový anion vytrhává kyselý atom vodíku z atomu kyslíku za vzniku příslušného alkoxidového aniontu látky **59**, zároveň byla *in situ* převedena výchozí látka **60** s atomem chlóru vázaného v benzylové poloze pomocí $\text{S}_\text{N}2$ reakce na lépe odstupující skupinu v podobě atomu jódu (Schéma 13). Benzylové

deriváty reagují rychle S_N2 mechanismem, protože π-systém sousední dvojný vazby může stabilizovat přechodný stav konjugací. Orbital p v reakčním centru musí vytvořit dvě částečné vazby pouze se dvěma elektrony – je elektronově deficitní, a proto jakákoli další elektronová hustota, kterou může získat ze sousedního π-systému, stabilizuje přechodový stav a tím se zvýší rychlost reakce [82].

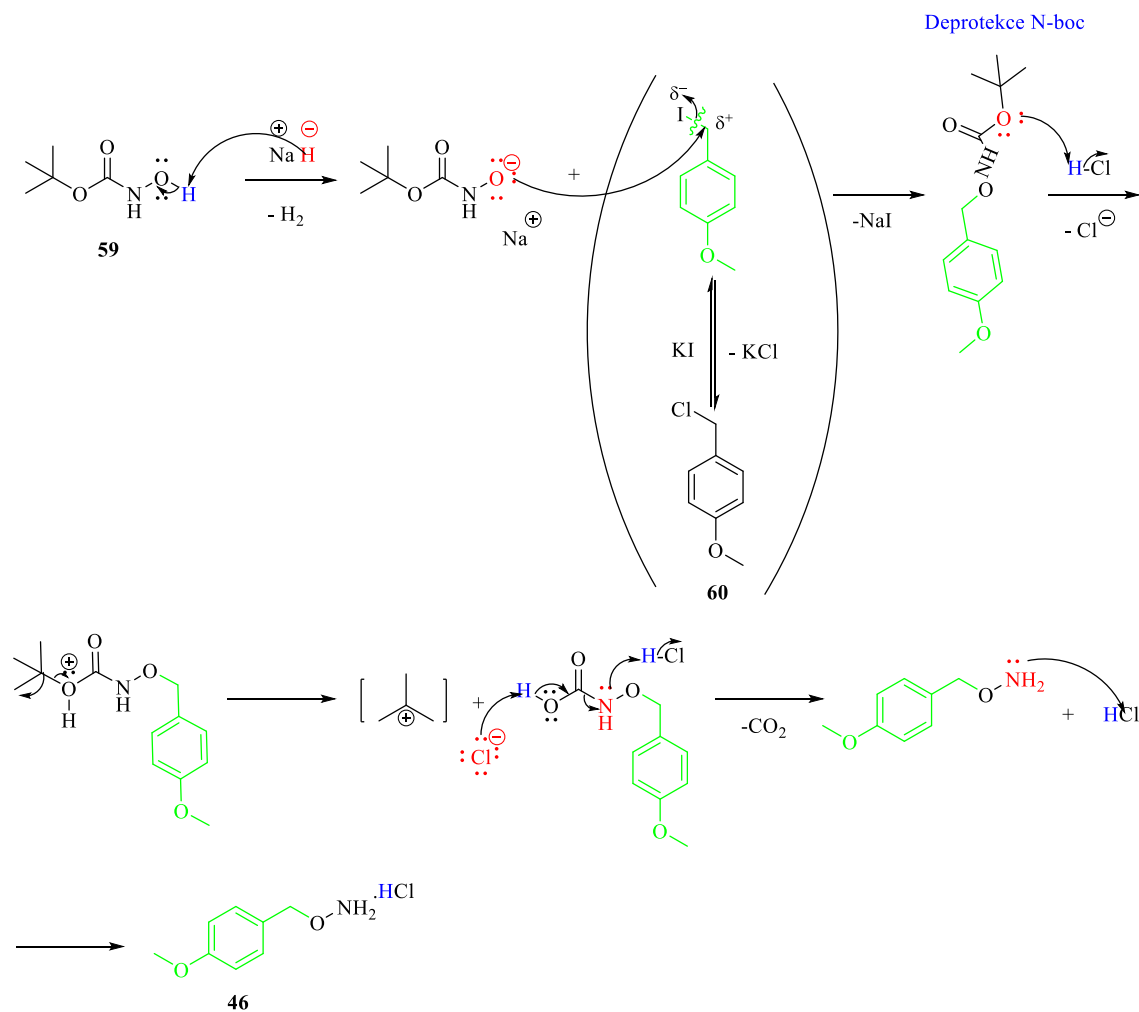


Schéma 13: Mechanismus přípravy produktu **46**.

Následně dochází k vytvoření přechodového stavu, kdy se vytváří částečná vazba mezi přistupujícím nukleofilem a atomem uhlíku, za současného odstoupení jodidového aniontu. Nukleofil přistupuje k atomu uhlíku z opačné strany vůči odstupující skupině. Jodidový anion patří mezi dobré odstupující skupiny, jelikož bude dobře stabilizovat záporný náboj v přechodovém stavu a je slabou bází. Po odstoupení jodidového aniontu vzniká nová kovalentní vazba mezi nukleofilem a elektrofilním atomem uhlíku benzyhalogenidu [58].

Nakonec došlo k odchránění chránicí *t*-butyloxykarbonylové skupiny (Boc) silnou kyselinou v podobě 3 M HCl v MeOH. Mechanismus deprotektce začíná protonizací karbamátového atomu kyslíku pomocí HCl. Následně dochází k přesunu elektronu na elektrondeficitní atom kyslíku za současného odstoupení *tert*-butylového kationtu za vzniku karbamové kyseliny. Chloridový anion vytrhává kyselý proton z kyseliny a elektrony migrují směrem k atomu dusíku, který se protonizuje HCl. Po dekarboxylaci karbamátové kyseliny byl získán amin, který vytváří sůl ve formě hydrochloridu se vznikající HCl u produktu **46** [83].

Chránění aminů bylo v tom případě důležité, protože by jinak docházelo k současné S_N2 reakci atomu dusíku aminu a elektrofilního atomu uhlíku benzyhalogenidu. V důsledku toho, že Boc je velmi objemná skupina, tak zde dochází k velkému sterickému bránění. Jako aprotické rozpouštědlo byl využit bezvodý THF, tudíž nebyla snížena reaktivita při S_N2 reakci v důsledku solvatace nukleofilu [58, 84].

Ve druhém kroku syntézy dochází k nachránění aldehydické skupiny látky **45** pomocí chránicí skupiny **46** ve formě hydrochloridové soli (Schéma 14). Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý pyridin, který v reakci slouží zároveň i jako báze k vychytávání hydrochloridu za uvolnění aktivované látky **46**. Vše probíhalo pod inertní dusíkovou atmosférou. Produkt **47** byl separován pomocí extrakce, přečištěn sloupcovou chromatografií a izolován ve formě bílé pevné látky s výtěžností 52 %. Struktura produktu byla ověřena pomocí metod NMR a HRMS.

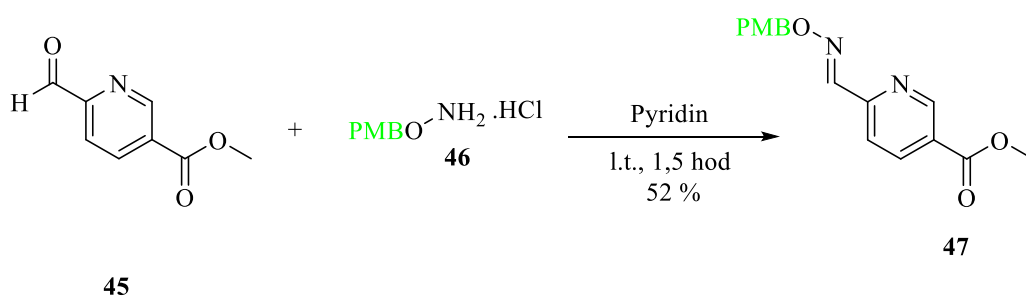


Schéma 14: Příprava produktu **47**.

Syntéza probíhá pomocí mechanismu A_dN, konkrétně adičně – eliminačním mechanismem. Nejprve volný elektronový pár atomu dusíku látky **46** nukleofilně atakuje karbonylový elektrofilní uhlík látky **45** s parciálním kladným nábojem (δ^+), díky odsunu elektronů směrem k atomu kyslíku, který má parciální záporný náboj (δ^-). Dochází ke vzniku tetraedrického intermediátu a ke vzniku nové vazby mezi atomem dusíku

a elektrofilním atomem uhlíku karbonylové sloučeniny. Následně je energeticky méně výhodný kvarterní dusík stabilizován vytržením protonu záporně nabitým kyslíkovým atomem, a nakonec dochází k eliminaci vody. Hydroxidový aniont je obecně řazen, díky své bazicitě, ke špatně odstupujícím skupinám, ale díky tvorbě velmi stabilní konjugované dvojné vazby v produktu **47** je jeho odstoupení umožněno i bez přítomnosti kyselého katalyzátoru (Schéma 15) [82].

Reakční čas syntézy byl zkrácen ze 3,5 hod na 1,5 hod z důvodu deprotektce aldehydické skupiny produktu **47** v průběhu reakce. Dále byla upravena chromatografická separace změnou stacionární fáze (SF) ze SiO₂ na Al₂O₃, jelikož retenční faktory produktu **47** a výchozí látky **45** jsou velmi blízké a při chromatografii na SiO₂ se nepodařilo tyto látky efektivně oddělit.

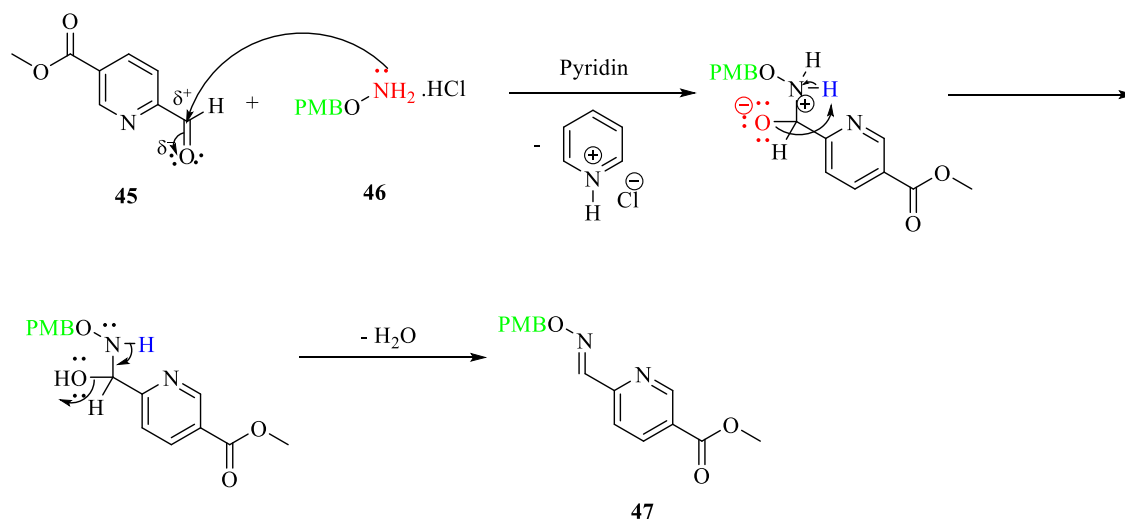


Schéma 15: Mechanismus A_dN při přípravě produktu **47**.

Ve třetím kroku syntézy dochází k bazické hydrolyze látky **47** za vzniku látky **48** (Schéma 16). Jako rozpouštědlo byl použit aceton. Produkt byl izolován pomocí precipitace ve formě bílé pevné látky s výtěžností 91 %. Struktura produktu byla ověřena pomocí metod NMR a HRMS.

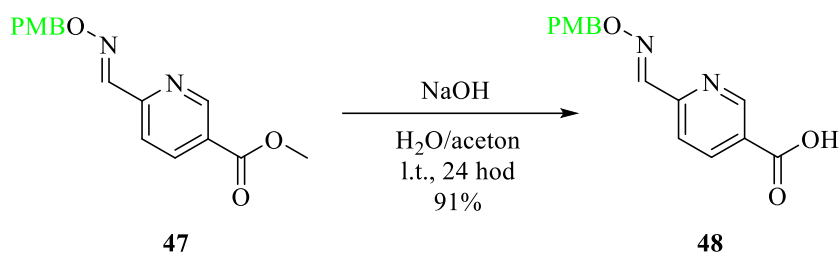


Schéma 16: Příprava produktu **48**.

Mechanismem bazické hydrolyzy esteru je $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$. Hydroxidový anion se po nukleofilnímu útoku váže na uhlík karbonylu, který má parciální kladný náboj (δ^+). Vzniká tetraedrický intermediát, kdy se vytváří nová vazba mezi nukleofilem a elektrofilním atomem uhlíku acylu, díky odsunu elektronů k elektronegativnějšímu atomu kyslíku. Při stabilizaci molekuly a obnovení karbonylové skupiny dochází k odstoupení methoxidového aniontu. Methoxidový anion odštěpuje kyselý atom vodíku z karboxylové kyseliny za vzniku karboxylátového aniontu a methanolu jako vedlejšího produktu. Vzniku karboxylové kyseliny bylo docíleno okyselením soli karboxylové kyseliny vodným roztokem minerální kyseliny (1 M HCl) za vzniku produktu **48** (Schéma 17) [58].

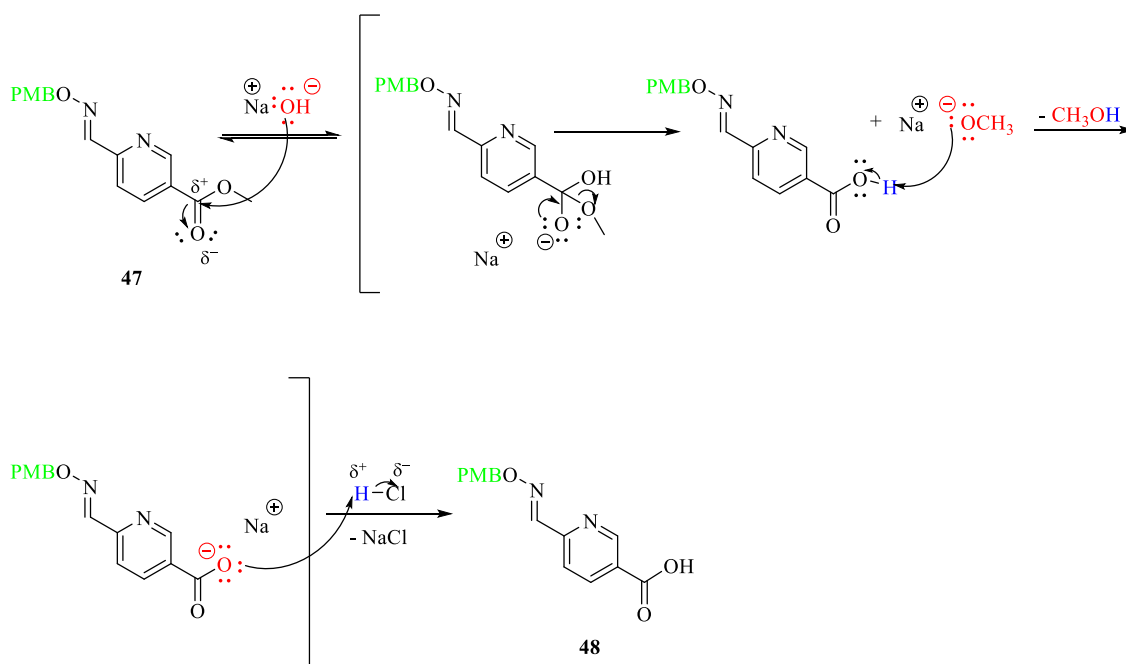


Schéma 17: Mechanismus $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$ přípravy produktu **48**.

Ve čtvrtém kroku syntézy dochází k přeměně výchozí látky v podobě karboxylové kyseliny **48** na její reaktivnější funkční derivát chlorid karboxylové kyseliny za vzniku látky **49** (Schéma 18). Rozpouštědlem i reakčním činidlem v této reakci je thionylchlorid

(61). Reakční směs byla po celý reakční čas pod dusíkovou inertní atmosférou, jelikož chloridy karboxylových kyselin a taktéž thionylchlorid jsou velmi reaktivní, což by mohlo vést k reakci se vzdušnou vlhkostí. Sloučenina byla izolována pomocí precipitace ve formě hnědé pevné látky a bez čištění byla použita v dalším reakčním kroku.

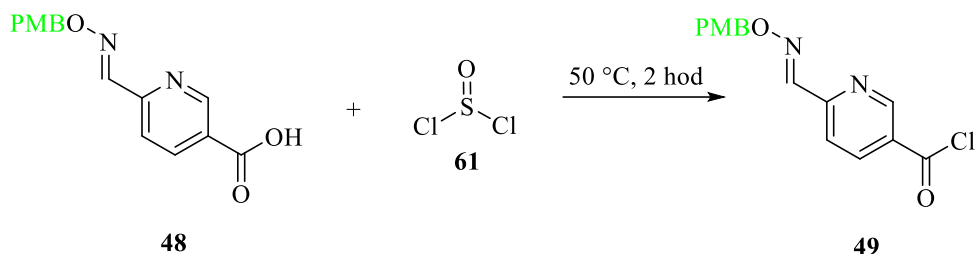


Schéma 18: Příprava produktu **49**.

Reakce probíhá mechanismem S_NAc . Nukleofilní karboxylový kyslík napadá atom síry thionyl chloridu (**61**) a vzniká intermediát **62** s dobře odstupujícím atomem chloru. Po odstoupení chloridového aniontu dojde ke vzniku druhého intermediátu **63**. Uvolněný chloridový anion napadá sp^2 hybridizovaný karboxylový uhlík a naváže se na molekulu **63** za vzniku meziprojektu **64**. Dále dojde k eliminaci SO_2 a aniontu chloridu, uvolněný aniont následně vytrhne proton z molekuly **65** a dojde k uvolnění HCl za vzniku látky **49** (Schéma 19) [82].

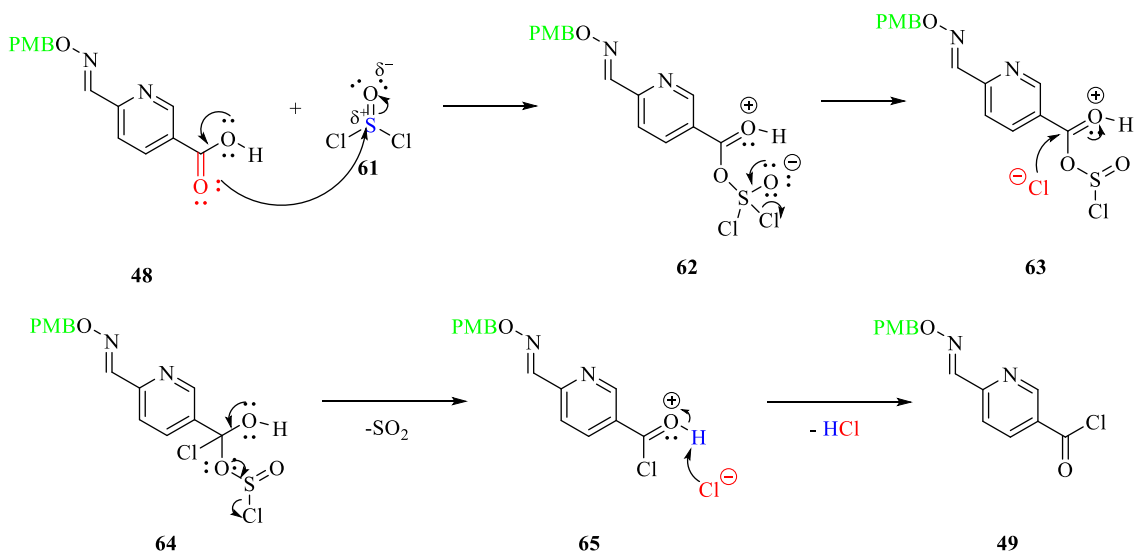


Schéma 19: Mechanismus S_NAc přípravy produktu **49**.

Tento krok byl proveden za účelem zvýšení výtěžnosti při tvorbě amidu v následujícím kroku. Aminolýzu z karboxylové kyseliny lze provést jen velmi obtížně, jelikož bazické aminy neutralizují kyselinu za vzniku karboxylátového aniontu. Z tohoto důvodu byl

proveden tento reakční krok, aby se přeměnila špatně odstupující hydroxylová skupina na dobře odstupující halogenid při následné S_NAc (aminolýza).

V pátém kroku syntézy reaguje výchozí látka **49** se třemi různými aminy **50-52** za vzniku látek **53-55** s nově vytvořenou amidovou skupinou v poloze C5 na pyridinovém skeletu (Schéma 20). Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý THF. Reakce probíhala pod inertní dusíkovou atmosférou. Produkty **53-55** byly izolovány ve formě světlé hnědých pevných látek s výtěžností 80–83 %. Struktury produktů byly ověřeny pomocí metod NMR a HRMS.

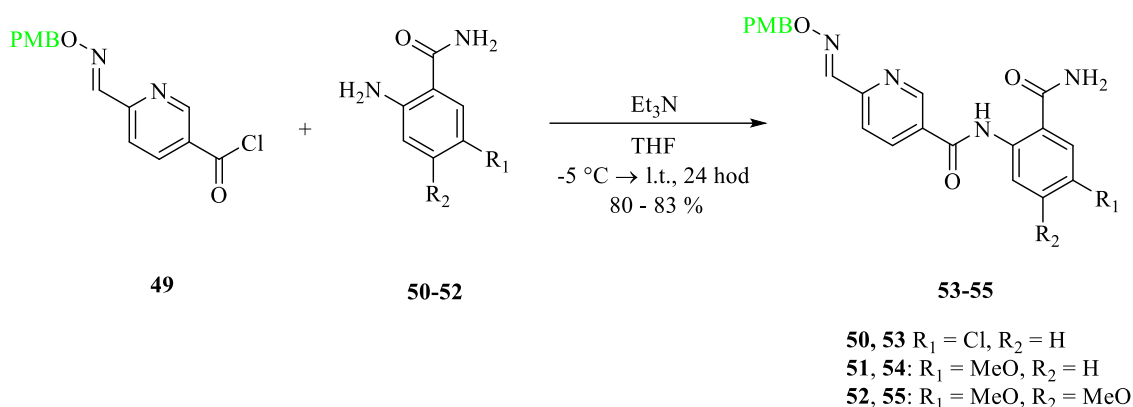


Schéma 20: Příprava produktů **53-55**.

Tento krok probíhá mechanismem S_NAc. Volný elektronový pár atomu dusíku na aminu nukleofilně atakuje elektrofilní karbonylový uhlík s parciálním kladným nábojem (δ^+). Následně dojde ke vzniku tetraedrického intermediátu, kdy se vytváří nová vazba mezi nukleofilem a elektrofilním atomem uhlíku acylu, díky odsunu elektronů k elektronegativnějšímu atomu kyslíku s parciálním záporným nábojem (δ^-). Odstoupením chloridového aniontu dochází ke stabilizaci molekuly vlivem obnovení karbonylové skupiny. Chloridový anion následně odštěpuje kyselý atom vodíku na energeticky nevýhodném kvartérním dusíku, což má za následek jeho stabilizaci a vznik produktů **53-55** (Schéma 21) [58].

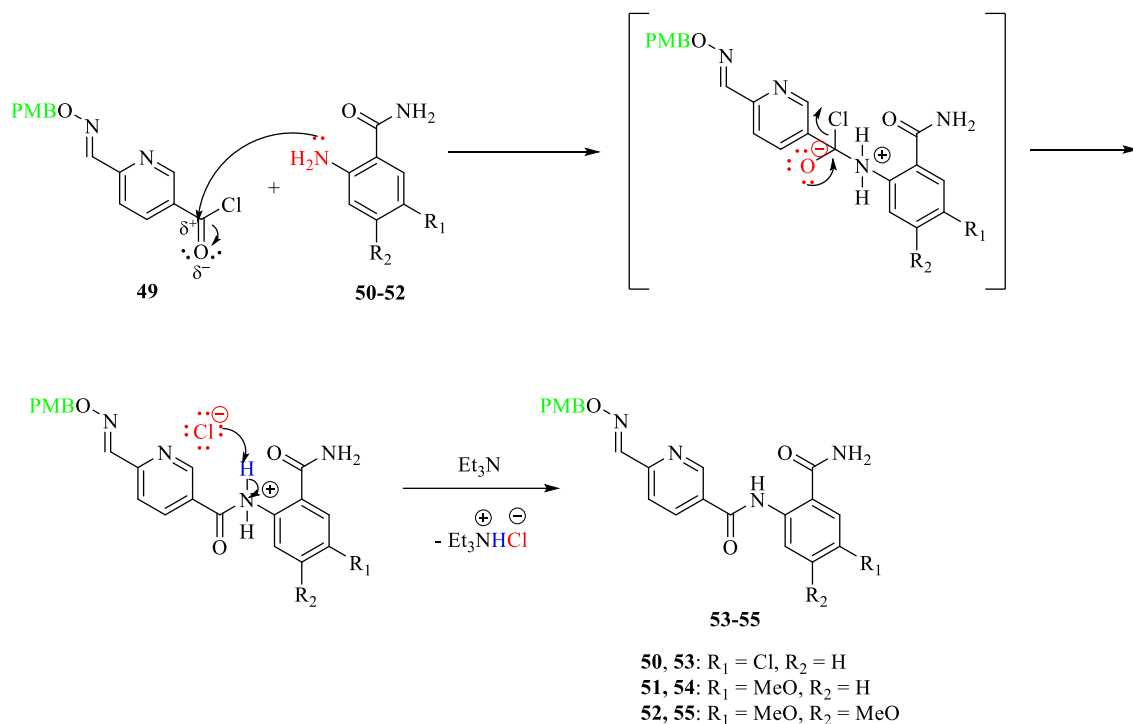


Schéma 21: Mechanismus S_NAc přípravy produktů **53–55**.

V šestém kroku syntézy došlo k N-methylaci látek **53-55** s CH_3I za vzniku monokvartérních látek **56-58** (Schéma 22). Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý acetonitril (ACN). Celá reakce probíhala pod inertní dusíkovou atmosférou. Produkty **56-58** byly izolovány pomocí precipitace v horkém THF ve formě oranžových pevných látek s výtěžností 26–76 %. Struktury produktů byly ověřeny pomocí metod NMR a HRMS.

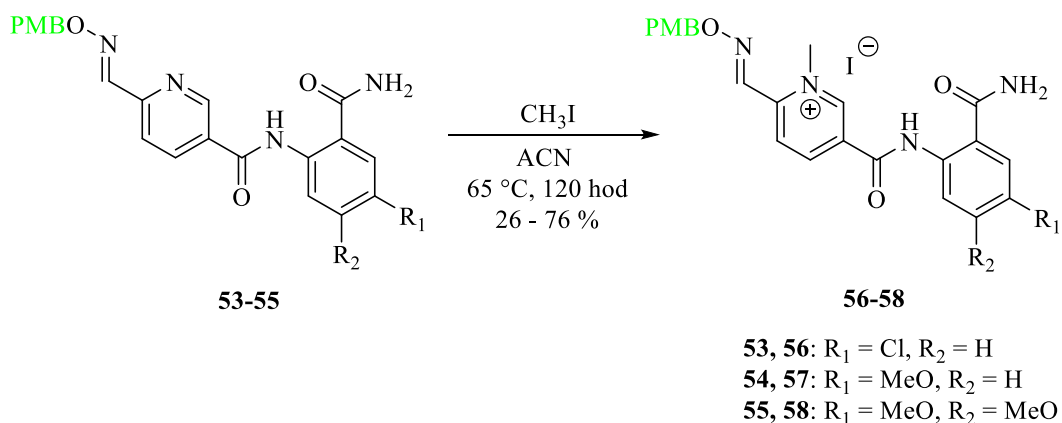


Schéma 22: Příprava produktů **56-58**.

Tento krok syntézy probíhá mechanismem S_N2. Nejprve dochází k nukleofilnímu útoku volného elektronového páru atomu dusíku pyridinu na elektrofilní metylovou skupinu jodmethanu, která má polarizovanou vazbu směrem k atomu jódu a uhlík tak má parciální kladný náboj (δ^+). Halogenmethany jsou v S_N2 reakcích nejreaktivnějšími substráty, které nebrání přístupu nukleofilu z opačné strany vůči odstupující skupině v porovnání s objemnějším substrátem, např. terciární alkyhalogenid. Dochází k vytvoření přechodového stavu, kdy se vytváří částečná vazba mezi přistupujícím nukleofilem a atomem uhlíku, za současného odstoupení jodidového aniontu. Jodidový anion patří mezi dobré odstupující skupiny, jelikož bude dobře stabilizovat záporný náboj v přechodovém stavu a je slabou bází. Po odstoupení jodidového aniontu vzniká nová kovalentní vazba mezi nukleofilem a metylovou skupinou (Schéma 23) [58].

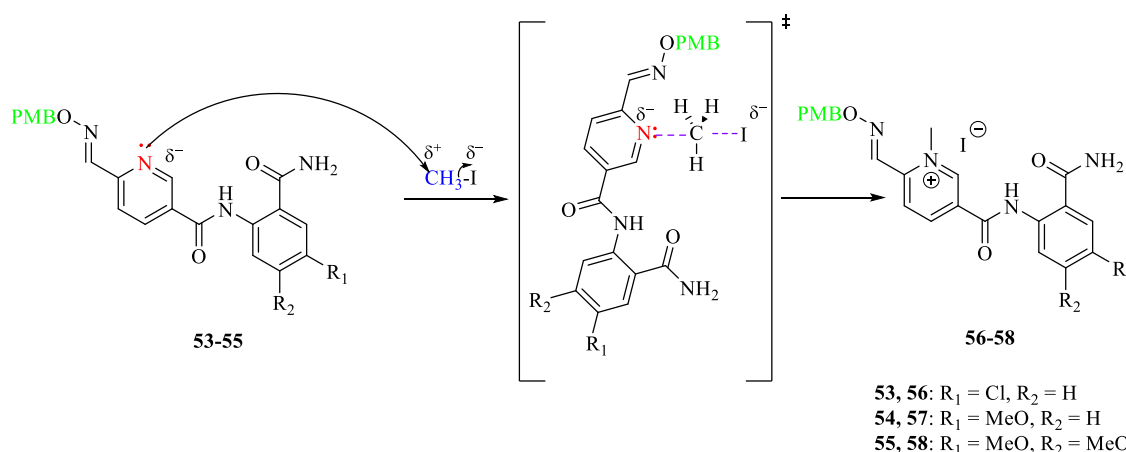


Schéma 23: Mechanismus S_N2 přípravy produktů **56-58**.

Precipitace pro získání čistých produktů probíhala v horkém THF při teplotě 65 °C, z důvodu lepší rozpustnosti nezreagovaných výchozích látek v porovnání s precipitací v jiných rozpouštědlech (Et₂O, aceton) při různých teplotách, kdy se nepodařilo oddělit produkt od výchozích látek.

V reakci je využit bezvodý ACN jako rozpouštědlo, protože nezpomaluje S_N2 reakci solvatací nukleofilu. Reakce byla provedena v uzavřené vysokotlaké nádobě, jelikož reakční směs byla zahřáta na teplotu 65 °C a CH₃I má bod varu 42 °C.

U produktu **58** byla vyšší výtěžnost 76 % v porovnání s ostatními produkty **56** a **57**. Pravděpodobně dvě methoxy skupiny výchozí látky **55** zvyšují nukleofilitu dusíku pyridinu svým kladným mezomerním efektem M⁺. Zvýšená elektronová hustota na dusíku by proto mohla zvýšit celkovou reaktivitu v S_N2 reakci.

V posledním sedmém kroku došlo k odchránění monokvartérních látek **56-58** za vzniku finálních produktů **41-43** (Schéma 24). Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý dichlormethan (DCM). Celá reakce probíhala pod inertní dusíkovou atmosférou. Finální produkty byly přečištěny sloupcovou chromatografií a izolovány ve formě žlutých pevných látek s výtěžností 17-42 %. Struktura produktů byla ověřena pomocí metod NMR a HRMS.

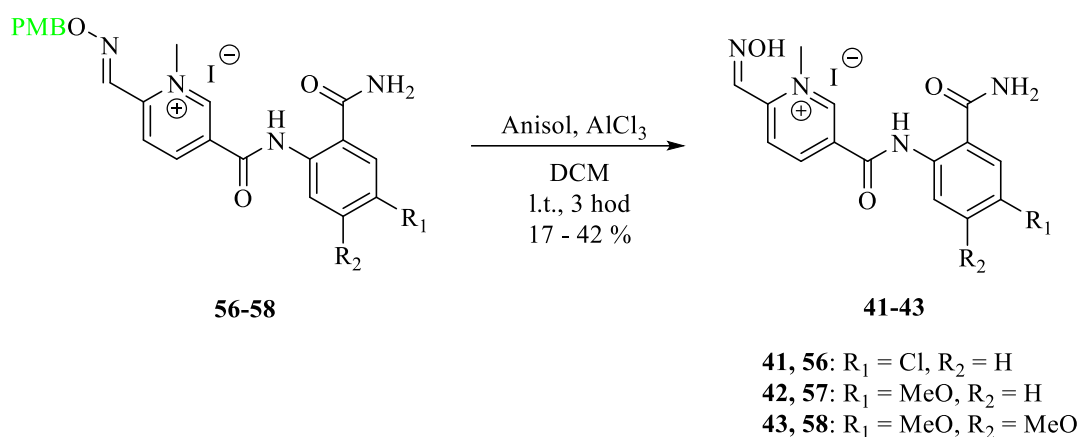


Schéma 24: Příprava finálních produktů **41-43**.

V posledním kroku došlo k nukleofilnímu útoku kyslíkového atomu na atom hliníku AlCl₃, který jako Lewisova kyselina obsahuje volný vazebný orbital, který je schopen přijímat elektrony. Následně dojde ke stabilizaci nestabilního kladně nabitého atomu kyslíku přesunem elektronů z *p*-methoxybenzylidene skupiny směrem k tomuto atomu. Vlivem přesunu elektronů dochází k odštěpení a následnému obnovení aromatického systému u *p*-methoxybenzylidene skupiny. Následuje elektrofilní aromatická substituce (S_EAr), kdy elektronový pár benzenového kruhu anisolu nukleofilně atakuje elektrofilní atom uhlíku za vzniku intermediárního karbokationtu. Chloridový anion vytrhává z intermediárního karbokationtu proton za obnovení aromatického systému. V posledním kroku nastává hydrolyza za vzniku finálních produktů **41-43** (Schéma 25) [85].

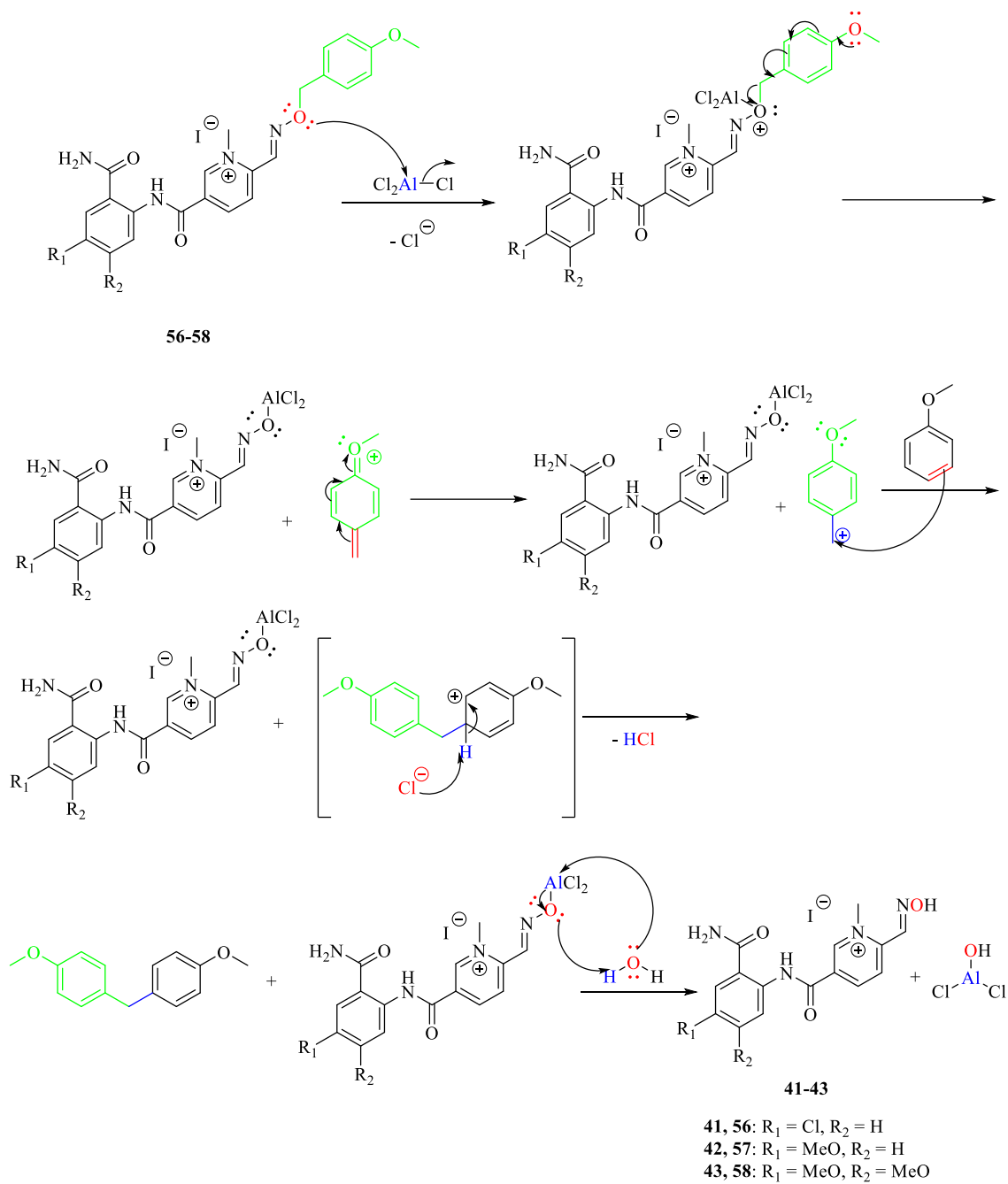


Schéma 25: Mechanismus přípravy finálních produktů **41-43**.

Přehled všech reakčních kroků je znázorněn na schématu 26. Celková výtěžnost syntézy po sedmi reakčních krocích byla 2-3 %.

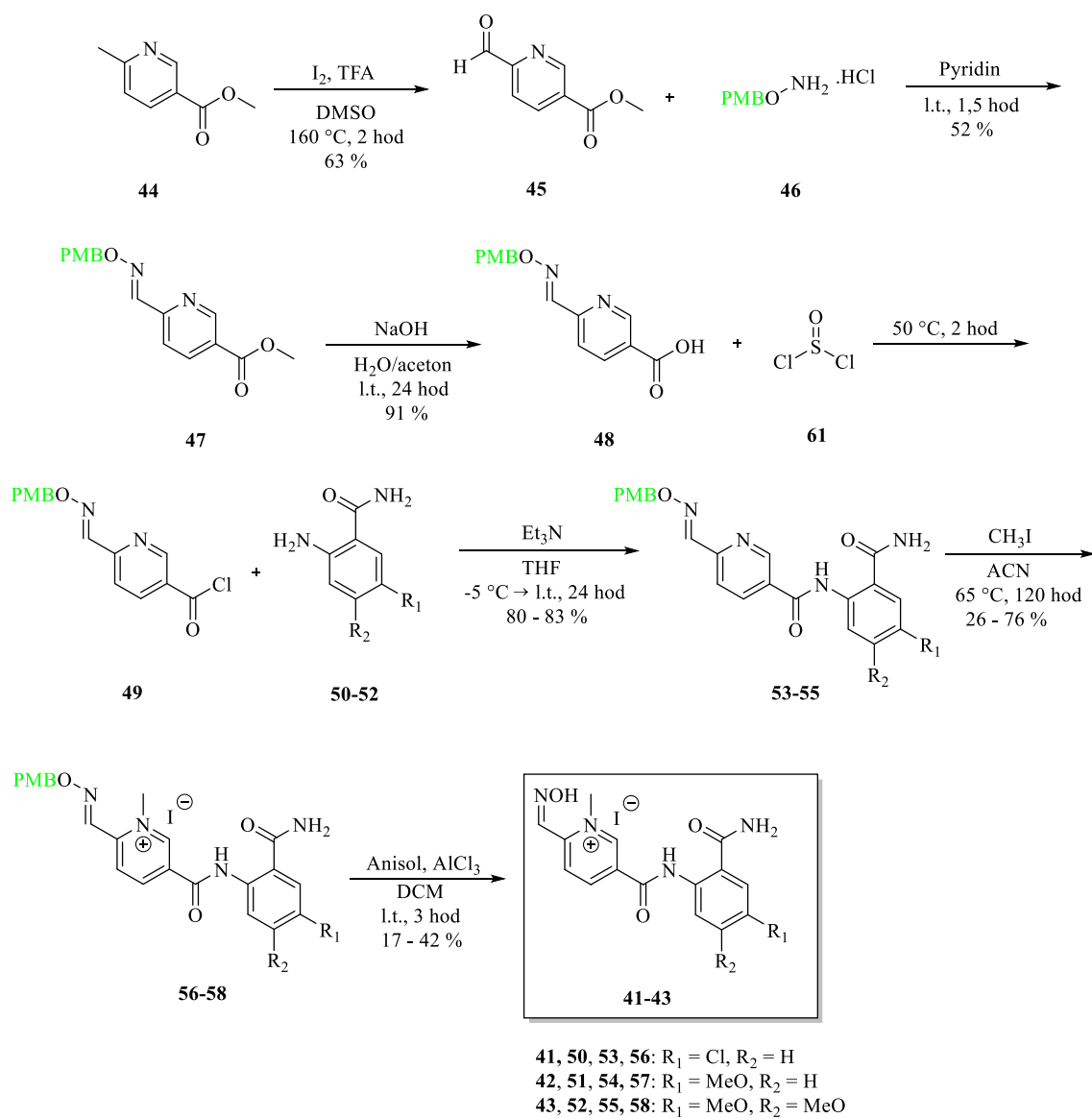


Schéma 26: Přehled všech reakčních kroků při přípravě finálních produktů **41-43**.

5. Experimentální část

Veškeré chemikálie, které byly v syntéze využity, byly zakoupeny od firmy Merck a Penta chemicals. Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie za použití TLC destiček Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Česká republika) a celulosových destiček (Merck Cellulose F) (Merck, Česká republika), jako mobilní fáze pro silikagelové destičky byly použity Hept/EtOAc v poměru 1/1, 2/1, 1/2, 1/4 a DCM/MeOH/NH₃ v poměru 9/1/2%. Pro celulosové destičky byla použita mobilní fáze nBuOH/H₂O/AcOH v poměru 5/2/1. Detekce TLC byla prováděna při vlnové délce $\lambda = 254$ nm pod UV lampou (CAMAG, VWR International, Česká republika). Pro sloupcovou chromatografii byly využity jako SF SiO₂, Al₂O₃ a celuloza. Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 (DonauLab, Česká republika) bez korekce.

Připravené sloučeniny byly analyzovány pomocí ¹H a ¹³C NMR spekter, které byly měřeny v deuterovaném dimethylsulfoxidu a deuterovaném chloroformu (DMSO-*d*₆, CDCl₃-*d*) při laboratorní teplotě na FT NMR spektrometru Avance NEO 500 MHz (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C) (Bruker, Německo). Chemické posuny (δ) jsou uvedeny v jednotkách ppm. V ¹H spektrech jsou chemické posuny vztaženy k centrálnímu signálu DMSO-*d*₆ ($\delta = 2,50$ ppm) a k centrálnímu signálu CDCl₃-*d* ($\delta = 7,26$ ppm), v ¹³C spektrech k centrálnímu signálu DMSO-*d*₆ ($\delta = 39,43$ ppm) a k centrálnímu signálu CDCl₃-*d* ($\delta = 77,00$ ppm). Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v jednotkách Hz. Spinová multiplicita je charakterizována znaky s (singlet), d (dublet), t (triplet) nebo m (multiplet).

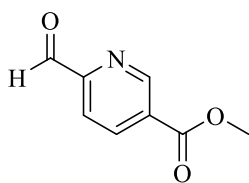
LC-MS byla stanovena pomocí Agilent Infinity II 1290 UHPLC systému spojeného s DAD spektrometrem a Agilent 6470 QqQ hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace byla provedena na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm/1,8 μ m) s 0,1 % kyselinou mravenčí ve vodě jako mobilní fází A a 0,1 % kyselinou mravenčí v acetonitrilu jako mobilní fází B.

Hmotnostní spektra (HRMS) byla získána pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass, USA) a jsou interpretována v programu software Xcalibur 4.3.73.11.

5.1. Příprava příslušného acylchloridu 49 jako výchozí látky pro syntézu nikotinamidů 53-55

methyl 6-formylnikotinát, 45.

Sloučenina **45** byla připravena reakcí výchozí látky **44** (2,00 g; 13,23 mmol; 1 ekv.) rozpuštěné v bezvodém DMSO (40 ml) pod dusíkovou atmosférou, dále byl přidán I₂ (3,36 g; 13,23 mmol; 1 ekv.) a TFA (3,04 ml; 39,69 mmol; 3 ekv.), která byla do reakční směsi pomalu přikapávána. Reakční směs byla míchána při teplotě 160 °C po dobu 2 hod pod dusíkovou atmosférou. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po uplynutí reakčního času byl k reakční směsi přidán 0,5 M roztok Na₂S₂O₃ (100 ml) a následně byl celý roztok reakční směsi zalkalizován na pH 8,1 pomocí 2 M NaOH. Reakční směs byla extrahována (3 × EtOAc) a následně bylo provedeno přečištění pomocí sloupcové chromatografie (Hept/EtOAc; 10:1).



45

Produkt **45** byl získán jako žlutá pevná látka.

C₈H₇NO₃. M = 165,15 g/mol.

Výtěžnost reakce byla 1,38 g (63 %).

T_t = 120,2-121,3 °C.

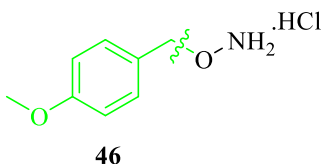
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,05 (s; 1H, CHO), 9,26 (s, 1H; ArH), 8,50 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H; ArH), 8,04 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H; ArH), 3,93 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192,9; 164,4; 154,6; 150,3; 138,5; 128,7; 121,5; 52,7 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₈H₈NO₃⁺ (m/z): 166,0499; experimentální hodnota: 166,0493.

***O*-(4-methoxybenzyl)hydroxylamin hydrochlorid, 46.**

Sloučenina **46** byla připravena reakcí výchozí látky **59** (0,50 g; 3,76 mmol; 1 ekv.) rozpuštěné v bezvodém THF (15 ml) pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C, dále byl přidán NaH (0,14 g; 5,64 mmol; 1,5 ekv.), který byl předem aktivován petroletherem. Následně byl přidán KI (0,06 g; 0,38 mmol; 0,1 ekv.) a 4-methoxybenzylchlorid (**60**) (0,61 ml; 4,51 mmol; 1,2 ekv.). Reakční směs byla míchána při l.t. po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po uplynutí reakčního času bylo odpařeno rozpouštědlo a ke směsi byla přidána 3 M HCl v MeOH (5 ml). Následně byla provedena precipitace v Et₂O (40 ml) po dobu 2 hod při l.t. a precipitát reakční směsi byl přefiltrován přes fritu za vakua.



Produkt **46** byl získán jako bílá pevná látka.

C₈H₁₂ClNO₂. M = 189,64 g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,52 g (73 %).

T_t = 189,5-190,6 °C.

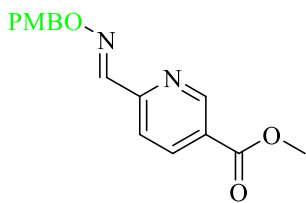
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,33 (s; 3H; NH₃), 7,35 (d; *J* = 8,7 Hz; 2H; 2 × ArH), 6,96 (d; *J* = 8,7 Hz; 2H; 2 × ArH), 5,01 (s; 2H; CH₂), 3,76 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,8; 131,1; 125,6; 113,9; 75,2; 55,1 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₈H₁₂NO₂⁺ (m/z): 154,0863; experimentální hodnota: 154,0857.

methyl 6-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)nikotinát, 47.

Sloučenina **47** byla připravena reakcí výchozí látky **45** (0,50 g; 3,03 mmol; 1 ekv.) rozpuštěné v bezvodém pyridinu (30 ml) pod dusíkovou atmosférou. Následně byla přidána sloučenina **46** (0,63 g; 3,33 mmol; 1,1 ekv.) a celá reakční směs byla míchána při l.t. po dobu 1,5 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Dále byla reakční směs odpařena a extrahována (3 × DCM). Směs byla dále přečištěna pomocí sloupcové chromatografie s Al₂O₃ jako SF (Hept/EtOAc; 9/1).



47

Produkt **47** byl získán jako bílá pevná látka.

$C_{16}H_{16}N_2O_4$. $M = 300,31$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,47 g (52 %).

$T_i = 87,5-88,5$ °C.

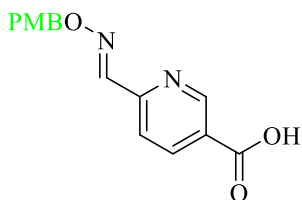
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3-d$) δ 9,18 (s; 1H; ArH), 8,28-8,25 (m; 1H; ArH), 8,22 (s; 1H; CH), 7,89 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H; ArH), 7,36 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; $2 \times$ ArH), 6,91 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; $2 \times$ ArH), 5,21 (s; 2H; CH_2), 3,96 (s; 3H; CH_3), 3,81 (s; 3H; CH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3-d$) δ 165,4; 159,6; 155,3; 150,8; 148,8; 137,4; 130,2; 128,9; 125,7; 120,3; 113,9; 80,0; 55,2; 52,4 ppm.

HRMS (HESI⁺): $[M^+]$: vypočítaná hodnota pro $C_{16}H_{17}N_2O_4^+$ (m/z): 301,1183; experimentální hodnota: 301,1173.

6-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)nikotinová kyselina, **48**.

Sloučenina **48** byla připravena reakcí výchozí látky **47** (0,45 g; 1,50 mmol; 1 ekv.) rozpuštěné v acetonu (3,1 ml). Dále byl přidán 2 M NaOH (1,3 ml). Reakční směs byla míchána při l.t. 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po uplynutí reakčního času byla reakční směs odpařena. K reakční směsi byla přidána destilovaná voda (5 ml) a následně byla okyselena na pH 2 pomocí 1 M HCl. Poté byla reakční směs míchána při l.t. po dobu 1 hod a vzniklý precipitát byl přefiltrován za vakua přes fritu a promyt destilovanou vodou.



48

Produkt **48** byl získán jako bílá pevná látka.

$C_{15}H_{14}N_2O_4$. $M = 286,29$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,39 g (91 %).

$T_i = 199,2-201,2$ °C.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 13,50 (s; 1H; COOH), 9,06 (s; 1H; ArH), 8,31-8,28 (m; 1H; ArH), 8,26 (s; 1H; CH), 7,89 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H; ArH), 7,37 (d; $J = 8,6$

Hz; 2H; 2 × ArH), 6,94 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H; 2 × ArH), 5,18 (s; 2H; CH₂), 3,75 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,8; 159,1; 154,2; 150,3; 148,8; 137,6; 130,2; 128,8; 126,5; 120,2; 113,7; 76,0; 55,0 ppm.

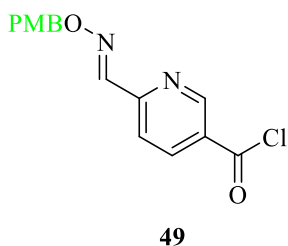
HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₅H₁₅N₂O₄⁺ (m/z): 287,1026; experimentální hodnota: 287,1018.

6-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)nikotinoyl chlorid, 49.

Sloučenina **49** byla připravena reakcí výchozí látky **48** (0,30 g; 1,05 mmol; 1 ekv.) s thionylchloridem (**61**) (1,2 ml) pod dusíkovou atmosférou. Celá reakční směs byla následně míchána při teplotě 50 °C po dobu 2 hod pod dusíkovou atmosférou. Následně byla celá reakční směs odpařena a použita jako meziproduct přímo do dalšího reakčního kroku.

Meziproduct **49** byl získán jako hnědá pevná látka.

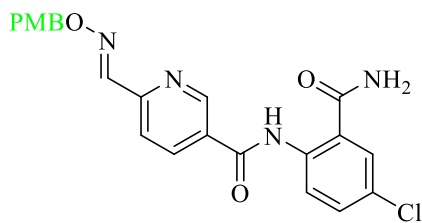
C₁₅H₁₃ClN₂O₃. M = 304,73 g/mol.



5.2. Příprava příslušných nikotinamidů 53-55 jako výchozích látek pro syntézu monokvartérních solí 56-58

Nikotinamidy **53-55** byly připraveny rozpuštěním příslušných aminů **50-52** (1,10 mmol; 1,05 ekv.) v bezvodém THF (30 ml) pod inertní dusíkovou atmosférou, k rozpuštěným aminům byl přidán Et₃N (2,21 mmol; 2,1 ekv.). Reakční směs byla ochlazená na -5 °C a následně k ní byla přidána výchozí látka **49** (1,05 mmol; 1 ekv.) rozpuštěná v bezvodém THF (4,8 ml). Reakční směs byla po 10 minutách ohřáta na l.t. a míchána 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Poté bylo z reakční směsi odpařeno rozpouštědlo. Odpařená reakční směs byla precipitována v 10 % vodném roztoku Na₂CO₃ (2 ml) a destilované vodě (18 ml). Vzniklý precipitát byl přefiltrován přes fritu za vakua a promyt destilovanou vodou.

***N*-(2-karbamoyl-4-chlorfenyl)-6-((((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl) nikotinamid, 53.**



53

Produkt **53** byl získán jako světle hnědá pevná látka.

$C_{22}H_{19}ClN_4O_4$. $M = 438,87$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,38 g (83 %).

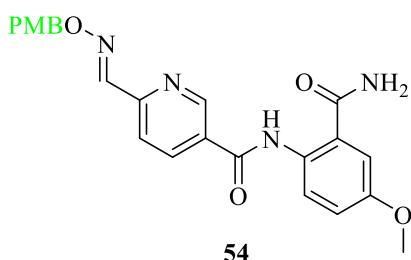
$T_f = 212,5-214,5$ °C.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,99 (s; 1H; NH), 9,08 (s; 1H; ArH), 8,65 (d; $J = 9,0$ Hz; 1H; ArH), 8,54 (s; 1H; NH), 8,30-8,29 (m; 1H; ArH), 8,28 (s; 1H; CH), 8,03 (s; 1H, NH), 8,00 (s; 1H; ArH), 7,97 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H; ArH), 7,68-7,65 (m; 1H; ArH), 7,38 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 6,94 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 5,19 (s; 2H; CH₂), 3,75 (s; 3H; CH₃) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169,6; 162,4; 159,1; 153,6; 148,7; 148,2; 138,5; 135,6; 132,2; 130,2; 129,9; 128,7; 128,3; 126,9; 122,0; 121,1; 120,4; 113,7; 76,0; 55,0 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro $C_{22}H_{20}ClN_4O_4^+$ (m/z): 439,1168; experimentální hodnota: 439,1153.

***N*-(2-karbamoyl-4-methoxyfenyl)-6-((((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl) nikotinamid, 54.**



54

Produkt **54** byl získán jako světle hnědá pevná látka.

$C_{23}H_{22}N_4O_5$. $M = 434,45$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,37 g (80 %).

$T_f = 197,8-199,8$ °C.

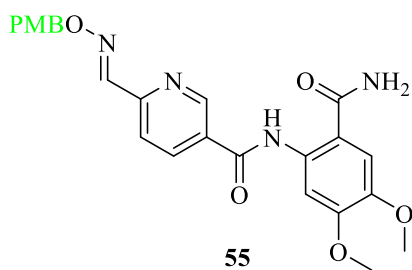
1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,74 (s; 1H; NH), 9,08 (s; 1H; ArH), 8,53 (d; $J = 9,1$ Hz; 1H; ArH), 8,44 (s; 1H; NH), 8,31-8,27 (m; 2H; 1 \times ArH; 1 \times CH), 7,96 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H; ArH), 7,89 (s; 1H; NH), 7,46 (s; 1H; ArH), 7,38 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 7,21-

7,18 (m; 1H; ArH), 6,95 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H; $2 \times$ ArH), 5,19 (s; 2H; CH₂), 3,82 (s; 3H; CH₃), 3,75 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,6; 161,9; 159,1; 154,6; 153,3; 148,8; 148,1; 135,4; 132,7; 130,3; 130,2; 128,9; 121,9; 121,1; 120,4; 118,0; 113,7; 113,6; 75,9; 55,5; 55,0 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₂₃H₂₃N₄O₅⁺ (m/z): 435,1663; experimentální hodnota: 435,1646.

***N*-(2-karbamoyl-4,5-dimethoxyfenyl)-6-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)nikotinamid, 55.**



Produkt **55** byl získán jako světle hnědá pevná látka.

C₂₄H₂₄N₄O₆. M = 464,48 g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,41 g (83 %).

T_t = 187,3-188,7°C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,53 (s; 1H; NH), 9,09 (s; 1H; ArH), 8,47 (s; 1H; ArH), 8,38 (s; 1H; NH), 8,31-8,27 (m; 2H; $1 \times$ ArH; $1 \times$ CH), 7,97 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H; ArH), 7,76 (s; 1H; NH), 7,47 (s; 1H; ArH), 7,38 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; $2 \times$ ArH), 6,95 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; $2 \times$ ArH), 5,19 (s; 2H; CH₂), 3,84 (s; 3H; CH₃), 3,82 (s; 3H; CH₃), 3,75 (s; 3H; CH₃) ppm.

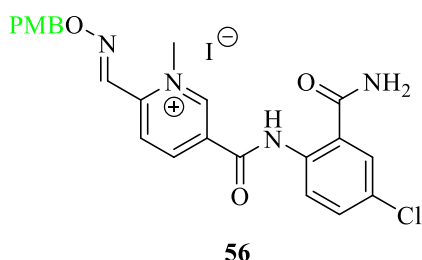
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,9; 162,0; 159,1; 153,4; 151,6; 148,7; 148,1; 143,9; 135,3; 130,2; 130,2; 128,8; 120,4; 113,7; 111,6; 110,2; 103,5; 76,0; 55,9; 55,4; 55,0 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₂₄H₂₅N₄O₆⁺ (m/z): 465,1769; experimentální hodnota: 465,1752.

5.3. Příprava příslušných monokvartérních solí 56-58 jako výchozích látek pro syntézu cílových molekul 41-43

Výchozí látky **53-55** (0,81 mmol; 1 ekv.) byly rozpuštěny v bezvodém ACN (16 ml) pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs byla ohřáta na 65 °C a v průběhu 120 hodin byl postupně přidán za intenzivního míchání CH₃I (8,91 mmol; 11 ekv.) Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s celulosovou a silikagelovou SF. Po uplynutí reakční doby bylo odpařeno rozpouštědlo z reakční směsi. Odpařená reakční směs byla precipitována v THF (68 ml) a míchána 1 hod při 65 °C. Vzniklý precipitát byl přefiltrován přes fritu za vakua a promyt horkým THF.

5-((2-karbamoyl-4-chlorfenyl)karbamoyl)-2-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)-1- methylpyridinium jodid, **56**.



Produkt **56** byl získán jako oranžová pevná látka.

C₂₃H₂₂ClIN₄O₄. M = 580,81 g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,12 g (26 %).

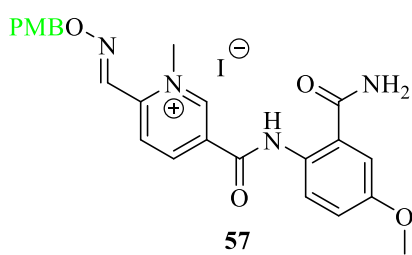
T_f = 193,7-194,4 °C.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,08 (s; 1H; NH), 9,50 (s; 1H; ArH), 8,87 (s; 1H; CH), 8,82 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; ArH), 8,60 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H; ArH), 8,57 (s; 1H; NH), 8,52 (d; *J* = 8,9 Hz; 1H; ArH), 8,06-8,01 (m; 2H; 1 × NH; 1 × ArH), 7,72 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H; ArH), 7,44 (d; *J* = 8,3 Hz; 2H; 2 × ArH), 6,97 (d; *J* = 8,3 Hz; 2H; 2 × ArH), 5,36 (s; 2H; CH₂), 4,46 (s; 3H; CH₃), 3,77 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169,3; 159,5; 159, 5; 148,3; 147,0; 142,0; 141,5; 137,5; 133,0; 132,3; 130,7; 128,5; 127,9; 125,1; 122,7; 122,2; 113,8; 77,6; 55,1; 46,7 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₂₃H₂₂ClIN₄O₄⁺ (m/z): 453,1324; experimentální hodnota: 453,1319.

5-((2-karbamoyl-4-methoxyfenyl)karbamoyl)-2-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)-1-methylpyridinium jodid, 57.



Produkt **57** byl získán jako oranžová pevná látka.

$C_{24}H_{25}IN_4O_5$. $M = 576,39$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,12 g (26 %).

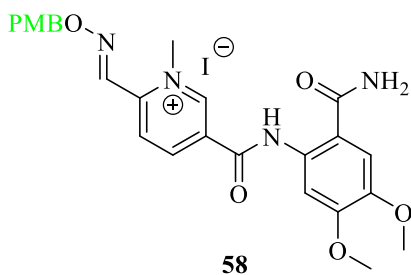
$T_t = 188,7-190,3^\circ C$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,83 (s; 1H; NH), 9,49 (s; 1H; ArH), 8,87 (s; 1H; CH), 8,84-8,80 (m; 1H; ArH), 8,59 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H; ArH), 8,48 (s; 1H; NH), 8,39 (d; $J = 9,0$ Hz; 1H; ArH), 7,89 (s; 1H; NH), 7,48 (s; 1H; ArH), 7,44 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 7,26-7,21 (m; 1H; ArH), 6,98 (d; $J = 8,6$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 5,36 (s; 2H; CH₂), 4,46 (s; 3H; CH₃), 3,88 (s; 3H; CH₃), 3,77 (s; 3H; CH₃) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170,2; 159,4; 158,9; 155,3; 148,0; 146,9; 142,0; 141,4; 133,4; 131,6; 130,7; 127,9; 125,0; 122,7; 122,2; 117,9; 113,8; 113,7; 77,6; 55,6; 55,1; 46,7 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro $C_{24}H_{25}N_4O_5^+$ (m/z): 449,1819; experimentální hodnota: 449,1809.

5-((2-karbamoyl-4,5-dimethoxyfenyl)karbamoyl)-2-(((4-methoxybenzyl)oxy)imino)methyl)-1-methylpyridinium jodid, 58.



Produkt **58** byl získán jako oranžová pevná látka.

$C_{25}H_{27}IN_4O_6$. $M = 606,42$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,37 g (76 %).

$T_t = 189,2-191,0^\circ C$.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,73 (s; 1H; NH), 9,50 (s; 1H; ArH), 8,87 (s; 1H; CH), 8,81 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H; ArH), 8,60 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H; ArH), 8,44 (s; 1H; NH), 8,35 (s; 1H; ArH), 7,80 (s; 1H; NH), 7,51 (s; 1H; ArH), 7,44 (d; $J = 8,5$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 6,98 (d; $J = 8,5$ Hz; 2H; 2 \times ArH), 5,36 (s; 2H; CH₂), 4,46 (s; 3H; CH₃), 3,87-3,83 (m; 6H; 2 \times CH₃), 3,77 (s; 3H; CH₃) ppm.

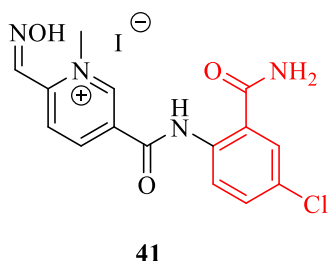
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170,6; 159,4; 158,9; 151,6; 148,1; 146,9; 144,5; 142,0; 141,2; 134,4; 133,4; 130,7; 127,9; 125,1; 113,8; 111,6; 111,0; 103,8; 77,6; 55,9; 55,4; 55,1; 46,7 ppm.

HRMS (HESI $^+$): [M^+]: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6^+$ (m/z): 479,1925; experimentální hodnota: 479,1908.

5.4. Příprava cílových molekul 41-43

Cílové molekuly **41-43** byly připraveny rozpuštěním výchozích látek **56-58** (0,20 mmol; 1 ekv.) v bezvodém DCM (6,5 ml) pod dusíkovou atmosférou. K reakční směsi byl pomalu přikápan anisol (0,80 mmol; 4 ekv.) a následně byl přidán AlCl_3 (0,80 mmol; 4 ekv.). Heterogenní směs byla míchána při l.t. po dobu 3 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s celulosovou SF. Po 3 hod byla reakční směs přefiltrována přes fritu za vakua a promyta DCM. Směs byla dále přečištěna pomocí sloupcové chromatografie s celulosovou SF (ACN/ H_2O ; 20/1).

5-((2-karbamoyl-4-chlorfenyl)karbamoyl)-2-((hydroxyimino)methyl)-1-methylpyridinium jodid, **41**.



Produkt **41** byl získán jako žlutá pevná látka ve formě směsi *syn/anti* izomerů.

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClIN}_4\text{O}_3$. $M = 460,66$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,03 g (35 %).

$T_t = 223,9-225,9$ °C.

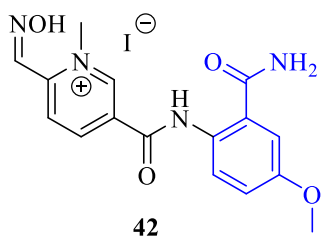
LC-MS nekalibrovaná čistota: 98 %.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s; 1H; NH), 13,09 (s; 1H; NOH), 13,07 (s; 0,4H; NOH), 9,51 (s; 1H; ArH), 8,80 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H; ArH), 8,75 (s; 1H; CH), 8,62-58 (m; 2H; 1 \times NH; 1 \times ArH), 8,51 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H; ArH), 8,04 (m; 1H; ArH), 8,03 (s; 1H; NH), 7,72 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H; ArH), 4,47 (s; 3H; CH_3) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169,2; 159,6; 149,7; 146,7; 141,5; 141,1; 137,4; 136,5; 132,1; 128,6; 127,9; 124,5; 122,8; 122,7; 46,4 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₅H₁₄ClN₄O₃⁺ (m/z): 333,0749; experimentální hodnota: 333,0740.

5-((2-karbamoyl-4-methoxyfenyl)karbamoyl)-2-((hydroxyimino)methyl)-1-methylpyridin-1-ium jodid, 42.



Produkt **42** byl získán jako žlutá pevná látka ve formě směsi *syn/anti* izomerů.

C₁₆H₁₇IN₄O. M = 456,24 g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,04 g (42 %).

T_f = 203,8 – 205,8 °C.

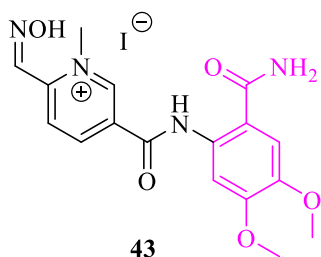
LC-MS nekalibrovaná čistota: 95 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,47 (s; 1H; NH), 12,85 (s; 1H; NOH), 12,82 (s; 0,3H; NOH), 9,50 (s; 1H; ArH), 8,80 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H; ArH), 8,74 (s; 1H; CH), 8,57 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H; ArH), 8,53 (s; 1H; NH), 8,37 (d; *J* = 8,9 Hz; 1H; ArH), 7,88 (s; 1H; NH), 7,49 (s; 1H; ArH), 7,23-7,20 (m; 1H; ArH), 4,47 (s; 3H; CH₃), 3,83 (s; 3H; CH₃) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,8; 159,6; 155,9; 149,9; 147,2; 142,1; 141,8; 133,5; 132,1; 125,3; 123,3; 118,5; 114,3, 56,2; 47,1 ppm.

HRMS (HESI⁺): [M⁺]: vypočítaná hodnota pro C₁₆H₁₇N₄O₄⁺ (m/z): 329,1244; experimentální hodnota: 329,1230.

5-((2-karbamoyl-4,5-dimethoxyfenyl)karbamoyl)-2-((hydroxyimino)methyl)-1-methylpyridinium jodid, 43.



Produkt **43** byl získán jako žlutá pevná látka ve formě směsi *syn/anti* izomerů.

$C_{17}H_{19}IN_4O_5$. $M = 486,27$ g/mol.

Výtěžnost reakce byla 0,02 g (17 %).

$T_f = 143,4-145,4$ °C.

LC-MS nekalibrovaná čistota: 98 %.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,75 (s; 1H; NOH), 13,67 (s; 0,3H; NOH), 13,45 (s; 1H; NH), 9,49 (s; 1H; ArH), 8,78 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H; ArH), 8,74 (s; 1H; CH), 8,60 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H; ArH), 8,50 (s; 1H; NH), 8,35 (s; 1H; ArH), 7,80 (s; 1H; NH), 7,54 (s; 1H; ArH), 4,47 (s; 3H; CH_3), 3,88-3,82 (m; 6H; $2 \times CH_3$) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 170,7; 159,0; 151,6; 146,6; 144,5; 141,5; 141,0; 134,4; 133,0; 124,8; 111,7; 111,1; 103,8; 55,5; 48,5; 46,6 ppm.

HRMS (HESI⁺): $[M^+]$: vypočítaná hodnota pro $C_{17}H_{19}N_4O_5^+$ (m/z): 359,1350; experimentální hodnota: 359,1342.

6. Závěr

Teoretická část diplomové práce nejprve stručně popisuje funkci a strukturu AChE i BChE v živých organismech, inhibici AChE působením OP a její reaktivaci. Dále jsou zmíněny zástupci komerčně dostupných reaktivátorů a problém s jejich prostupností přes HEB, což má za následek jejich sníženou koncentraci v CNS. V závěru teoretické části proto uvádím možnosti, které by mohly vést ke zvýšení koncentrace reaktivátorů v CNS.

Hlavním cílem této práce je syntéza potenciálních reaktivátorů ChE v podobě 5-substituovaných derivátů odvozených od struktury komerčně dostupného reaktivátoru 2-PAM. V teoretické části je proto tomuto reaktivátoru věnována největší pozornost. Nejprve uvádím obecné informace o 2-PAM, následně popisuji jeho syntézu včetně mechanismů. Dále jsou zmíněny deriváty 2-PAM a izomerie oximů. Následně také zmiňuji možnosti pro zvýšení prostupu reaktivátoru do mozku. Za tímto účelem lze využít vývoj nových strukturálních typů reaktivátorů, konjugaci reaktivátorů s glukosou a také inhibici Pgp. Další možností je proléčivo pro-2-PAM, připravené pro potenciálně vyšší prostupnost přes HEB.

V praktické části se věnuji sedmikrokové syntéze derivátů **41-43** monokvartérního reaktivátoru 2-PAM, který je substituován v poloze C5 třemi různými amidovými substituenty. Po sedmikrokové syntéze byla celková výtěžnost finálních produktů 2–3 %. Pro finální produkt **41** obsahující atom chlóru na C5 amidovém substituentu byla celková výtěžnost 2 %. V případě finálního produktu s methoxy skupinou **42** nebo finálního produktu **43** se dvěma methoxy skupinami na C5 amidovém substituentu byla finální výtěžnost 3 %.

Hlavní cíl práce, syntéza 5-substituovaných pyridinium-2-aldoximů byl splněn. Struktury meziproductů a finálních produktů **41-43** byly stanoveny pomocí metod NMR a HRMS. LC-MS nekalibrovaná čistota finálních molekul byla $\geq 95\%$. Všechny látky byly izolovány v pevném skupenství a byly u nich stanoveny teploty tání. Pouze u jednoho meziproductu **49**, který byl bez přečištění použit k dalšímu kroku syntézy nebyla změřena teplota tání ani určena výtěžnost. V části výsledky a diskuse popisují reakční mechanismy jednotlivých kroků a diskutují problémy a případně změny reakčních podmínek u těchto kroků.

Výsledné produkty budou testovány *in vitro* a *in vivo* jako potenciální reaktivátory ChE. Toto biologické testování však již není součástí této diplomové práce. Účinnější reaktivace by mohlo být docíleno díky přítomnosti funkčních skupin schopných tvořit vodíkové vazby s aminokyselinovými residui v ChE. Tyto interakce by mohly vést ke zvýšení celkové rigidity molekuly reaktivátoru včetně silnějších π - π interakcí v CAS enzymu. Správnost této hypotézy bude prokázána na základě biologického testování.

7. Použitá literatura

- [1] PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase—important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. **2004**, 47(4), 215–228.
- [2] ELSINGHORST, Paul Wilhelm, Franz WOREK, Horst THIERMANN a Timo WILLE. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opinion on Drug Discovery*. **2013**, 8(12), 1467–1477.
- [3] DELFINO, Reinaldo T., Tatiana S. RIBEIRO a José D. FIGUEROA-VILLAR. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2009**, 20(3), 407–428.
- [4] MCCAULEY, Linda A. Epidemiology of chemical warfare agents. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Elsevier, **2020**, s. 67–77. ISBN 978-0-12-819090-6.
- [5] MORITA, Hiroshi, Nobuo YANAGISAWA, Tamie NAKAJIMA, Mikio SHIMIZU, Hidemitsu HIRABAYASHI, Hiroshi OKUDERA, Masahiko NOHARA, Youko MIDORIKAWA a Shohei MIMURA. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet (London, England)*. **1995**, 346(8970), 290–293.
- [6] OKUMURA, Tetsu, Nobukatsu TAKASU, Shinichi ISHIMATSU, Shou MIYANOKI, Akihiro MITSUHASHI, Keisuke KUMADA, Kazutoyo TANAKA a Shigeaki HINOHARA. Report on 640 Victims of the Tokyo Subway Sarin Attack. *Annals of Emergency Medicine*. **1996**, 28(2), 129–135.
- [7] YOUNG, Robert A. a Annetta WATSON. Organophosphate nerve agents. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Elsevier, **2020**, s. 97–126. ISBN 978-0-12-819090-6.
- [8] BHAKHOA, Hanusha, Lydia RHYMAN a Ponnadurai RAMASAMI. Theoretical study of the molecular aspect of the suspected novichok agent A234 of the Skripal poisoning. *Royal Society Open Science*. **2019**, 6(2), 181831.
- [9] Alexei Navalny: Russia opposition leader poisoned with Novichok – Germany. *BBC News* [online]. **2020**. Dostupné z: <https://www.bbc.com/news/world-europe-54002880>.
- [10] CHAMBERS, Janice E., Mary B. DAIL a Edward C. MEEK. Oxime-mediated reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase with emphasis on centrally-active oximes. *Neuropharmacology*. **2020**, 175, 108201.
- [11] QUINN, Daniel, Joseph TOPCZEWSKI, Nilanthi YASAPALA a Alexander LODGE. Why is Aged Acetylcholinesterase So Difficult to Reactivate? *Molecules*. **2017**, 22(9), 1464.
- [12] JOKANOVIĆ, Milan a Milica PROSTRAN. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Current Medicinal Chemistry*. **2009**, 16(17), 2177–2188.

- [13] OHTA, Hikoto, Takeshi OHMORI, Shinichi SUZUKI, Hiroshi IKEGAYA, Koichi SAKURADA a Takehiko TAKATORI. New Safe Method for Preparation of Sarin-Exposed Human Erythrocytes Acetylcholinesterase Using Non-Toxic and Stable Sarin Analogue Isopropyl p-Nitrophenyl Methylphosphonate and its Application to Evaluation of Nerve Agent Antidotes. *Pharmaceutical Research*. **2006**, 23(12), 2827–2833.
- [14] ENGLISH, Brett A. a Andrew A. WEBSTER. Acetylcholinesterase and its Inhibitors. In: *Primer on the Autonomic Nervous System*. B.m.: Elsevier, **2012**, s. 631–633. ISBN 978-0-12-386525-0.
- [15] LAMY, Elodie, Léa PILYSER, Claire PAQUET, Elodie BOUAZIZ-AMAR a Stanislas GRASSIN-DELYLE. High-sensitivity quantification of acetylcholine and choline in human cerebrospinal fluid with a validated LC-MS/MS method. *Talanta*. **2021**, 224, 121881.
- [16] MESULAM, M.-M. Acetylcholine Neurotransmission in CNS. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. B.m.: Elsevier, **2009**, s. 1–4. ISBN 978-0-08-045046-9.
- [17] BAJGAR, Jiří. Toxicodynamics. In: *Nerve Agents Poisoning and its Treatment in Schematic Figures and Tables*. B.m.: Elsevier, **2012**, s. 19–43. ISBN 978-0-12-416047-7.
- [18] WAISKOPF, Nir a Hermona SOREQ. Cholinesterase Inhibitors. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Elsevier, **2015**, s. 761–778. ISBN 978-0-12-800159-2.
- [19] JOHNSON, G. a S. MOORE. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*. **2006**, 12(2), 217–225.
- [20] KOVARIK, Zrinka, Zoran RADIĆ, Harvey A. BERMAN, Vera SIMEON-RUDOLF, Elsa REINER a Palmer TAYLOR. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochemical Journal*. **2003**, 373(1), 33–40.
- [21] SHENOUDA, Josephine, Paula GREEN a Lester SULTATOS. An evaluation of the inhibition of human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase by the organophosphate chlorpyrifos oxon. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2009**, 241(2), 135–142.
- [22] GÓRECKI, Lukáš, Jan KORÁBEČNÝ, Kamil MUSÍLEK, Dávid MALIŇÁK, Eugénie NEPOVIMOVÁ, Rafael DOLEŽAL, Daniel JUN, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of toxicology*. **2016**, 90(12), 2831–2859.
- [23] LOCKRIDGE, Oksana. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*. **2015**, 148, 34–46.

- [24] MASSON, Patrick a Oksana LOCKRIDGE. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2010**, 494(2), 107–120.
- [25] ÇOKUĞRAŞ, A Neşe. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk J Biochem*. **2003**, 28(2), 54-61.
- [26] KANG, Jasjit, V. H. ZETTEL a N. I. WARD. The Organophosphate Pesticides. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. **1995**, 5(4), 325–339.
- [27] ALOZI, Maria a Mutasem RAWAS-QALAJI. Treating organophosphates poisoning: management challenges and potential solutions. *Critical Reviews in Toxicology*. **2020**, 50(9), 764–779.
- [28] ČOLOVIĆ, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIC, Tamara D. LAZAREVIC-PASTI, Aleksandra M. BONDZIC a Vesna M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. **2013**, 11(3), 315–335
- [29] MANGAS, Iris, Eugenio VILANOVA, Jorge ESTÉVEZ a Tanos C. C. FRANÇA. Neurotoxic Effects Associated with Current Uses of Organophosphorus Compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2016**. 27(5), 809-825.
- [30] THIERMANN, Horst, T. ZILKER, F. EYER, N. FELGENHAUER, P. EYER a F. WOREK. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate pesticide-poisoned patients. *Toxicology Letters*. **2009**, 191(2–3), 297–304.
- [31] PASHIROVA, Tatiana N., Anissa BRAĀKI, Irina V. ZUEVA, Konstantin A. PETROV, Vasily M. BABAEV, Evgenia A. BURILOVA, Darya A. SAMARKINA, Ildar Kh. RIZVANOV, Eliana B. SOUTO, Ludovic JEAN, Pierre-Yves RENARD, Patrick MASSON, Lucia Ya. ZAKHAROVA a Oleg G. SINYASHIN. Combination delivery of two oxime-loaded lipid nanoparticles: Time-dependent additive action for prolonged rat brain protection. *Journal of Controlled Release*. **2018**, 290, 102–111.
- [32] MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Julien RENOU, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI, Florian NACHON, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research*. **2012**, 45(5), 756–766.
- [33] YOUNG, Robert A. a Annetta WATSON. Organophosphate nerve agents. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Elsevier, **2020**, s. 97–126. ISBN 978-0-12-819090-6.
- [34] MASSON, Patrick, Florian NACHON a Oksana LOCKRIDGE. Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. **2010**, 187(1–3), 157–162.
- [35] MALIŇÁK, Dávid, Eugenie NEPOVIMOVA, Daniel JUN, Kamil MUSÍLEK a Kamil KUČA. Novel Group of AChE Reactivators – Synthesis, In Vitro Reactivation and Molecular Docking Study. *Molecules*. **2018**, 23(9), 2291.

- [36] BAJGAR, Jiří. Prophylaxis against organophosphorus poisoning. *Journal of medicinal chemistry*. **2004**, 1, 1-16.
- [37] UWAYDAH, Nabeel I., Stephen L. HOSKINS, Stephen P. BRUTTIG, Henry FARRAR, Nick C. COPPER, Donald J. DEYO, Michael A. DUBICK a George C. KRAMER. Intramuscular versus Intraosseous Delivery of Nerve Agent Antidote Pralidoxime Chloride in Swine. *Prehospital Emergency Care*. **2016**, 20(4), 485–492.
- [38] PSOTKA, Miroslav, David MALIŇÁK, Lukáš GORECKI, Thuy Duong NGUYEN, Ondřej SOUKUP, Daniel JUN, Kamil KUČA, Kamil MUSÍLEK a Jan KORÁBEČNÝ. HLö-7–A review of acetylcholinesterase reactivator against organophosphorus intoxication. *Military Medical Science Letters*. **2017**, 86(2), 70–83.
- [39] FAIZ NORRAHIM, Mohd Nor, Mas Amira IDAYU ABDUL RAZAK, Noor Aisyah AHMAD SHAH, Herdawati KASIM, Wan Yusmawati WAN YUSOFF, Norhana Abdul HALIM, Siti Aminah MOHD NOR, Siti Hasnawati JAMAL, Keat Khim ONG, Wan Md ZIN WAN YUNUS, Victor Feizal KNIGHT a Noor Azilah MOHD KASIM. Recent developments on oximes to improve the blood brain barrier penetration for the treatment of organophosphorus poisoning: a review. *RSC Advances*. **2020**, 10(8), 4465–4489.
- [40] GUPTA, Ramesh C., Jason PITT a Snjezana ZAJA-MILATOVIĆ. Blood–brain barrier damage and dysfunction by chemical toxicity. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Elsevier, **2020**, s. 811–827. ISBN 978-0-12-819090-6.
- [41] SAKURADA, Koichi, Hiroshi IKEGAYA, Hikoto OHTA, Tomoko AKUTSU a Takehiko TAKATORI. Hydrolysis of an acetylthiocholine by pralidoxime iodide (2-PAM). *Toxicology Letters*. **2006**, 166(3), 255–260.
- [42] KARASOVÁ, Jana Žďárová, Jaroslav CHLÁDEK, Miloš HROCH, Fusek JOSEF, Daniela HNIDKOVÁ a Kamil KUČA. Pharmacokinetic study of two acetylcholinesterase reactivators, trimedoxime and newly synthesized oxime K027, in rat plasma: Pharmacokinetic study of oxime K027 and trimedoxime. *Journal of Applied Toxicology*. **2013**, 33(1), 18–23.
- [43] HULSE, Elspeth J., James D. HASLAM, Stevan R. EMMETT a Tom WOOLLEY. Organophosphorus nerve agent poisoning: managing the poisoned patient. *British Journal of Anaesthesia*. **2019**, 123(4), 457–463.
- [44] JOKANOVIĆ, Milan a Miloš P. STOJILJKOVIĆ. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology*. **2006**, 553(1–3), 10–17.
- [45] KUČA, Kamil, Daniel JUN a Kamil MUSÍLEK. Structural Requirements of Acetylcholinesterase Reactivators. *Mini reviews in medicinal chemistry*. **2006**, 6, 269–77.

- [46] CABAL, Jiří, Kamil KUČA a Jiří KASSA. Specification of the Structure of Oximes Able to Reactivate Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Pharmacology and Toxicology*. **2004**, 95(2), 81–86.
- [47] WILSON, Irwin B. a Sara GINSBURG. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1955**, 18, 168–170.
- [48] MUSIL, Karel, Veronika FLORIANOVÁ, Pavel BUCEK, Vlastimil DOHNAL, Kamil KUČA a Kamil MUSÍLEK. Development and validation of a FIA/UV–vis method for pKa determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2016**, 117, 240–246.
- [49] KUČA, Kamil, Martina HRABINOVÁ, Ondřej SOUKUP, Gunnar TOBIN, Jana KARASOVÁ a Miroslav POHANKA. Pralidoxime-the gold standard of acetylcholinesterase reactivators- reactivation in vitro efficacy. *Bratislavské lekárske listy*. **2010**, 111(9), 502–504.
- [50] DHUGURU, Jyothi, Eugene ZVIAGIN a Rachid SKOUTA. FDA-Approved Oximes and Their Significance in Medicinal Chemistry. *Pharmaceuticals*. **2022**, 15, 66.
- [51] DA SILVA, Jorge Alberto Valle, Eugenie NEPOVIMOVA, Teodorico Castro RAMALHO, Kamil KUČA a Tanos CELMAR COSTA FRANÇA. Molecular modeling studies on the interactions of 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime, 4-PA, 2-PAM, and obidoxime with VX-inhibited human acetylcholinesterase: a near attack conformation approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2019**, 34(1), 1018–1029.
- [52] GUPTA, Rishab a Mayur PARMAR. Pralidoxime. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, **2022**. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/MED/32644334#free-full-text>.
- [53] KITAGAWA, Daniel. Kinetic Parameters Survey for Manufacture of Pralidoxime. *American Journal of Chemical Engineering*. **2015**, 3, 39.
- [54] WOREK, Franz, Horst THIERMANN a Timo WILLE. Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Archives of Toxicology*. **2020**, 94(7), 2275–2292.
- [55] WILSON, Irwin B. The inhibition and reactivation of acetylcholinesterase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1966**, 135(1 Myasthenia Gr), 177–183.
- [56] ALSTON, Theodore A. Pralidoxime Rescues Both Muscarinic and Nicotinic Systems: *Anesthesia & Analgesia*. **2005**, 101(3), 926.
- [57] GINSBURG, Sara a Irwin B. WILSON. Oximes of the Pyridine Series. *Journal of the American Chemical Society*. **1957**, 79(2), 481–485.
- [58] MCMURRY, John. *Organická chemie*. 8. Brno: VUTIUM, VŠCHT Praha, **2015**. ISBN 978-80-214-4769-1.

- [59] OKUNO, Sou, Koichi SAKURADA, Hikoto OHTA, Hiroshi IKEGAYA, Yuko KAZUI, Tomoko AKUTSU, Takehiko TAKATORI a Kimiharu IWADATE. Blood–brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2008**, 227(1), 8–15.
- [60] SAKURADA, Koichi, Hiroshi IKEGAYA, Hikoto OHTA, Hisayo FUKUSHIMA, Tomoko AKUTSU a Ken WATANABE. Effects of oximes on mitochondrial oxidase activity. *Toxicology Letters*. **2009**, 189(2), 110–114.
- [61] GUIMARÃES, Ana Paula, Tanos CELMAR COSTA FRANÇA, Teodorico Castro RAMALHO, Magdalena NASCIMENTO RENNÓ, Elaine Fontes Ferreira DA CUNHA, Karina Silvia MATOS, Daiana Teixeira MANCINI a Kamil KUČA. Docking studies and effects of syn-anti isomery of oximes derived from pyridine imidazol bicycled systems as potential human acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Applied Biomedicine*. **2011**, 9(3), 163–171.
- [62] MALIŇÁK, Dávid, Jan KORÁBEČNÝ, Ondřej SOUKUP, Lukáš GÓRECKI, Eugénie NEPOVIMOVÁ, Miroslav PSOTKA, Rafael DOLEŽAL, Thuy D. NGUYEN, Eva MEZEIOVÁ, Kamil MUSÍLEK a Kamil KUČA. A Review of the Synthesis of Quaternary Acetylcholinesterase Reactivators. *Current Organic Chemistry*. **2018**, 22(16), 1619–1648.
- [63] SPÖHRER, Ute a Peter EYER. Separation of geometrical syn and anti isomers of obidoxime by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1995**, 693(1), 55–61.
- [64] NSIKABAKA, Samuel, Walid G. HARB a Manuel.F. RUIZ-LÓPEZ. The role of water on the acid-promoted E/Z isomerization of oximes in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. **2006**, 764(1–3), 161–166.
- [65] KALÁSZ, Huba, Syed M. NURULAIN, Gabor VERESS, Sandor ANTUS, Ferenc DARVAS, Ernest ADEGHATE, Abdu ADEM, Farzad HASHEMI a Kornelia TEKES. Mini review on blood-brain barrier penetration of pyridinium aldoximes: BBB penetration of pyridinium aldoximes. *Journal of Applied Toxicology*. **2015**, 35(2), 116–123.
- [66] ARNOTT, John A a Sonia Lobo PLANEY. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. **2012**, 7(10), 863–875.
- [67] SAKURADA, Koichi a Hikoto OHTA. No promising antidote 25 years after the Tokyo subway sarin attack: A review. *Legal Medicine*. **2020**, 47, 101761.
- [68] JEONG, Hee Chun, Nam Sook KANG, No-Joong PARK, Eul Kyun YUM a Young-Sik JUNG. Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2009**, 19(4), 1214–1217.
- [69] MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Géraldine SAINT-ANDRÉ, Emilie GILLON, Alain WAGNER, Rachid BAATI, Ludovic JEAN, Florian NACHON a Pierre-Yves RENARD. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chemical Communications*. **2011**, 47(18), 5295.

- [70] ZORBAZ, Tamara, Petra MIŠETIĆ, Nicolas PROBST, Suzana ŽUNEC, Antonio ZANDONA, Gordana MENDAŠ, Vedran MICEK, Nikolina MAČEK HRVAT, Maja KATALINIĆ, Anissa BRAĀKI, Ludovic JEAN, Pierre-Yves RENARD, Vesna GABELICA MARKOVIĆ a Zrinka KOVARIK. Pharmacokinetic Evaluation of Brain Penetrating Morpholine-3-hydroxy-2-pyridine Oxime as an Antidote for Nerve Agent Poisoning. *ACS Chemical Neuroscience*. **2020**, 11(7), 1072–1084.
- [71] GARCIA, Gregory E., Amy J. CAMPBELL, John OLSON, Deborah MOORAD-DOCTOR a Venee I. MORTHOLE. Novel oximes as blood–brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chemico-Biological Interactions*. **2010**, 187(1–3), 199–206.
- [72] HELDMAN, Eli, Yacov ASHANI, Lily RAVEH a Eliezer S. RACHAMAN. Sugar conjugates of pyridinium aldoximes as antidotes against organophosphate poisoning. *Carbohydrate Research*. **1986**, 151, 337–347.
- [73] BHONSLE, Jayendra B., Robert CAUSEY, Benjamin L. OYLER, Cecilia BARTOLUCCI, Dorian LAMBA, Alessandro PESARESI, Nanaji K. BHAMARE, Iswarduth SOOJHAWON a Gregory E. GARCIA. Evaluation and computational characterization of the facilitated transport of Glc carbon C-1 oxime reactivators across a blood brain barrier model. *Chemico-Biological Interactions*. **2013**, 203(1), 129–134.
- [74] DA SILVA, Ophélie, Nicolas PROBST, Christophe LANDRY, Anne-Sophie HANAK, Pierre WARNAULT, Caroline COISNE, André-Guilhem CALAS, Fabien GOSSELET, Charlotte COURAGEUX, Anne-Julie GASTELLIER, Marilène TRANCART, Rachid BAATI, Marie-Pierre DEHOUCQ, Ludovic JEAN, Florian NACHON, Pierre-Yves RENARD a José DIAS. A New Class of Bi- and Trifunctional Sugar Oximes as Antidotes against Organophosphorus Poisoning. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2022**, 65(6), 4649–4666.
- [75] KOBRLOVÁ, Tereza, Jan KORÁBEČNÝ a Ondřej SOUKUP. Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*. **2019**, 423, 75–83.
- [76] GALLAGHER, Erin, Il MINN, Janice E. CHAMBERS a Peter C. SEARSON. In vitro characterization of pralidoxime transport and acetylcholinesterase reactivation across MDCK cells and stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells (BC1-hBMECs). *Fluids and Barriers of the CNS*. **2016**, 13(1), 10.
- [77] JOOSEN, Marloes J.A., Marcel J. VAN DER SCHANS, Christian G.M. VAN DIJK, Willem C. KUIJPERS, Heleen M. WORTELBOER a Herman P.M. VAN HELDEN. Increasing oxime efficacy by blood–brain barrier modulation. *Toxicology Letters*. **2011**, 206(1), 67–71.
- [78] JOOSEN, Marloes J.A., Stefanie M. VESTER, Jouk HAMELINK, Steven D. KLAASSEN a Roland M. VAN DEN BERG. Increasing nerve agent treatment efficacy by P-glycoprotein inhibition. *Chemico-Biological Interactions*. **2016**, 259, 115–121.

- [79] KHAN, Farhat A., Amy J. CAMPBELL, Benjamin HOYT, Christine HERDMAN, Therese KU, Sonia THANGAVELU a Richard K. GORDON. Oxidative mechanisms for the biotransformation of 1-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime to pralidoxime chloride. *Life Sciences*. **2011**, 89(25–26), 911–917.
- [80] SHIH, Tsung-Ming, John A. GUARISCO, Irwin KOPLOVITZ, Robert K. KAN, Todd M. MYERS a John H. MCDONOUGH. The oxime Pro-2-PAM provides minimal protection against the CNS effects of the organophosphorus nerve agents sarin, cyclosarin, and VX in guinea pigs. *Toxicology Letters*. **2010**, 196, S271.
- [81] YE, Rongzi, Yuanjie CAO, Xiaoxiang XI, Long LIU a Tieqiao CHEN. Metal – and radical-free aerobic oxidation of heteroaromatic methanes: an efficient synthesis of heteroaromatic aldehydes. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2019**, 17(17), 4220–4224.
- [82] CLAYDEN, Jonathan, Nick GREEVES a Stuart WARREN. *Organic Chemistry*. B.m.: OUP Oxford, **2012**. ISBN 978-0-19-927029-3.
- [83] *Boc Deprotection Mechanism - HCl* [online]. Dostupné z: http://commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm.
- [84] WUTS, Peter G. M. a Theodora W. GREENE. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. B.m.: John Wiley & Sons, **2006**. ISBN 978-0-470-05347-8.
- [85] KERN, Nicolas, Thomas DOMBRAY, Aurélien BLANC, Jean-Marc WEIBEL a Patrick PALE. Silver(I)-Catalyzed Deprotection of *p* – Methoxybenzyl Ethers: A Mild and Chemoselective Method. *The Journal of Organic Chemistry*. **2012**, 77(20), 9227–9235.