

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Syntéza nových biskvarterních reaktivátorů  
cholinesteras obsahujících  
pyridindikarboxamidovou složku**

**Diplomová práce**

Autor: Bc. Eliška Prchalová

Studijní program: N1407 Chemie

Studijní obor: Bioorganická chemie a toxikologie škodlivin

Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Hradec Králové

Srpen 2020



## Zadání diplomové práce

**Autor:** Bc. Eliška Prchalová

**Studium:** S18CH017NP

**Studijní program:** N1407 Chemie

**Studijní obor:** Bioorganická chemie a toxikologie škodlivin

**Název diplomové práce:** **Syntéza nových biskvartérních reaktivátorů cholinesteras obsahujících pyridindikarboxamidovou složku**

**Název diplomové práce AJ:** Synthesis of novel bisquaternary cholinesterase reactivators containing pyridinedicarboxamide component

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity sloučenin využívaných jako reaktivátory acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy.
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připravených biskvartérních solí obsahujících pyridindikarboxamidovou složku, které budou následně poskytnuty na biologické testování jako potenciální reaktivátory cholinesteras.
3. Sepsání diplomové práce.

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus

**Garantující pracoviště:** Katedra chemie,  
Přírodovědecká fakulta

**Vedoucí práce:** RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

**Oponent:** RNDr. Miroslav Psoška, PhD.

**Datum zadání závěrečné práce:** 6.11.2019

## **Prohlášení:**

*„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny zdroje, ze kterých jsem čerpala.“*

V Hradci Králové dne 30.7.2020

Eliška Prchalová

### **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala RNDr. Dávidovi Maliňákovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady nejenom při experimentální, ale i při teoretické části této práce. Dále bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi CSc., Ing. Janě Svobodové, Ph.D. a RNDr. Patriku Olekšákovi, PhD. za naměření NMR spekter a PharmDr. Rudolfovi Andryšovi Ph.D. za naměření MS spekter, bez nich by tato práce nevznikla.

## **Anotace**

Tato diplomová práce se zabývá syntézou nových typů potenciálních reaktivátorů cholinesteras. V teoretické části je porovnaná acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa, zároveň je popsána jejich inhibice a reaktivace. Je zde popsána terapie při otravách organofosforovými sloučeninami. Dále jsou uvedeny komerčně používané reaktivátory inhibovaných cholinesteras. V praktické části je uvedena příprava výchozích látek a sady šesti potenciálních reaktivátorů, které obsahují pyridindikaboxamidovou složku. Struktura připravených sloučenin byla ověřena pomocí NMR a MS analýz. Připravené sloučeniny budou dále *in vitro* biologicky testovány na reaktivaci inhibovaných cholinesteras.

## **Klíčová slova**

acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, reaktivátory, oximy, pyridindikarboxamid

## **Annotation**

The diploma thesis deals with the synthesis of new types of potent reactivators used for reactivation of cholinesterases. The theoretical part compares acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase, moreover inhibition and reactivation of these cholinesterases is described. In this thesis is described therapy used for organophosphates poisoning. The thesis mentions commercially used reactivators of inhibited cholinesterases. The practical part covers synthesis of starting compounds and a line of six potential reactivators with pyridindicarboxamide group. Synthesized compounds were verified via NMR and MS analysis. Synthesized compounds will be *in vitro* biologically tested on their reactivation ability of inhibited cholinesterases.

## **Keywords**

acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, reactivators, oximes, pyridinedicarboxamide

## Obsah

Úvod.....	10
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>12</b>
1.1. Acetylcholin.....	12
1.2. Cholinergní receptory .....	12
1.2.1. Muskarinové receptory .....	13
1.2.2. Nikotinové receptory .....	14
1.3. Cholinesterasy.....	14
1.3.1. Acetylcholinesterasa .....	14
1.3.2. Butyrylcholinesterasa.....	17
1.4. Inhibice cholinesteras .....	19
1.4.1. Inhibitory cholinesteras.....	20
1.5. Terapie .....	21
1.5.1. Reaktivátory .....	22
1.6. Reaktivace cholinesteras.....	24
<b>2. Design .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Cíle práce.....</b>	<b>28</b>
<b>4. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>30</b>
4.1. Příprava monokvarterních solí.....	31
4.1.1. Příprava 1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 50. ....	34
4.1.2. Příprava výchozí látky 1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2- ((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 53. ....	34
4.2. Příprava biskvarterních solí .....	35
<b>5. Experimentální část.....</b>	<b>38</b>
5.1. Postup přípravy monokvarterních solí .....	39

5.1.1. Příprava	1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 50. ....	39
5.1.2. Příprava	1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 53. ....	40
5.2.	Příprava biskvarterních solí .....	41
5.2.1. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(3-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)propyl)pyridinium dibromidu, 36 .....	41
5.2.2. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromidu, 37 .....	42
5.2.3. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromidu, 38. ....	43
5.2.4. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromidu, 39. ....	44
5.2.5. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromidu, 40. ....	45
5.2.6. Příprava	3,4-dikarbamoyl-1-(( <i>E</i> )-4-(3-hydroxy-4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)but-2-en-1-yl)pyridinium dibromid, 41. ....	46
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>50</b>

## Seznam použitých zkratek v textu

Å	angström
AcOH	kyselina octová
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
BuCh	butyrylcholin
BuChE	butyrylcholinesterasa
BuOH	butanol
CAS	katalytické aktivní místo
CNS	centrální nervová soustava
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
$E_A$	aktivační energie
ekv	ekvivalent
HEB	hematoencefalytická bariéra
hod	hodiny
ChAT	cholinacetyltransferasa
ChE	cholinesterasa
$K_D$	disociační konstanta
$\lambda$	vlnová délka
MeOH	methanol



min	minuty
MS	hmotnostní spektrometrie
NPL	nervově paralytické látky
NMR	nukleární magnetická rezonance
OP	organofosfát
PAS	periferní anionické místo
PNS	periferní nervová soustava
S <sub>N</sub> 2	bimolekulární nukleofilní substituce
SNAP	protein spojený se synapsí
TLC	tenkovrstvá chromatografie
T <sub>t</sub>	teplota tání
UV	ultrafialové záření
VAMP	membránové proteiny spojené s vezikuly

## Úvod

Chemické zbraně a jejich zneužití jsou v dnešní době stále aktuálním a vážným tématem, přestože v roce 1925 byla podepsána „Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění chemických zbraní a jejich zničení“ [1]. Nervově paralytické látky (NPL) jsou jedny z nejvíce toxických chemických zbraní, které mohou být synteticky připraveny z komerčně dostupných látek [2]. Zneužití NPL během války v Perském zálivu, v Japonsku a Sýrii vedlo k zvětšení zájmu o výzkum antidot na NPL [1].

Organofosfáty (OP) byly nejdříve používány především jako pesticidy v zemědělském průmyslu, ke změně došlo v roce 1936 kdy v laboratořích IG Farben byl syntetizován (*RS*)-ethyl-*N,N*-dimethylfosforoamidokyanidat, známý jako tabun. Jeho silně nervově paralytických vlastností si povšimnul německý chemik Gerhard Schrader. Prvotním cílem výzkumu v roce 1934 byla příprava nových OP, použitelných jako pesticidy v zemědělství, ale po objevu tabunu v roce 1936 se výzkum, pod novým názvem Trilon, vydal směrem syntézy OP jakožto chemických zbraní a celkem bylo připraveno více než 2000 látek [3]. Chvilí po objevu tabunu byl připraven další známý a nebezpečný derivát, sarin, pojmenovaný na počest členů vědeckého týmu: Schrader, Ambros, Ritter a van der Linde [4]. Objev tabunu a sarinu byl v roce 1944 následován objevem somanu, všechny tyto látky jsou souhrnně označovány jako G-látky od slova „German“. Po konci druhé světové války se západní spojenci a Sovětský svaz zmocnili továren IG Farben a projektu Trilon, který byl kódovým názvem pro výzkum OP jakožto chemických zbraní [5]. Obě strany začaly nově připravovat vlastní chemické zbraně. Britové vynalezli VX v roce 1949, své poznatky vyměnili s USA za jejich poznatky o termonukleárních zbraních [3]. Během této doby Sověti syntetizovali svůj derivát, RVX, který se později stal „prototypem“ pro látky pod souhrnným označením NOVIČOK. Dalším připraveným derivátem se stal čínský CVX. Všechny tyto látky spadají do skupiny V-látek od slova „venemous“, protože symptomy otravy připomínaly otravu hadím uštknutím [6].

Přes zákaz používání chemických zbraní byly zaznamenány nové syntetické postupy pro výrobu NPL a není vyloučeno, že mnohé země tyto látky připravené k použití stále skladují.

Jedním z posledních příkladů zneužití OP byla poprava Kim Čong-nama, bratra severokorejského vůdce Kim Čong-una látkou VX v roce 2017 anebo otrava agenta Sergeje Skripala a jeho dcery látkou Novičok [7, 8].

Hrozbou pro civilisty není jenom teroristické zneužití NPL, ale i přechovávání a používání OP pesticidů, které ročně způsobí až 3 000 000 intoxikací a z toho 200 000 případů končí úmrtím [1].

Nebezpečí OP je v jejich rychlém vstřebávání přes sliznice a kůži, vysoké toxicitě a především ireverzibilní vazbě na acetylcholinesterasu (AChE). AChE podléhá ireverzibilní inhibici OP a ztrácí svoji katalytickou schopnost degradovat acetylcholin (ACh). OP se kompetitivně vážou do aktivního místa AChE. V první fázi se OP naváže na Ser203 a ve druhé fázi dochází k dealkylaci alkoxy substituentu OP a stabilizaci pomocí His447, tomuto procesu se říká „stárnutí AChE“ [9]. Inhibovaná AChE není nadále schopná plnit svoji funkci a hydrolyzovat acetylcholin (ACh) na neuromuskulárních spojeních. To vede k trvalé stimulaci neuronů a cholinergní krizi způsobené hromaděním se ACh na nervových synapsích. Mezi symptomy otravy patří PSL syndrom: zvýšená perspirace, salivace a lakrimace, také mióza a celková paralýza včetně periferní obrny dýchacích svalů. Smrt nastává udušením za plného vědomí [10].

Terapie po expozici OP spočívá v aplikaci anticholinergik, antikonvulzantů a oximových reaktivátorů AChE [9]. Mezi komerčně dostupné a používané oximové reaktivátory v dnešní době patří pralidoxim, obidoxim, methoxim, asoxim (HI-6) a trimedoxim [11]. Žádný z těchto reaktivátorů není dostatečně univerzální a schopen reaktivovat cholinesterasu (ChE) inhibovanou více různými OP. A proto se mnoho výzkumných skupin zabývá vývojem nových reaktivátorů, které by byly schopny reaktivovat širší spektrum NPL inhibovaných ChE.

Cílem mé práce je příprava nových typů reaktivátorů, doplňujících skupinu reaktivátorů ze sady „K“ reaktivátorů (K054, K268, K362, K459) připravovaných na různých výzkumných pracovištích v Hradci Králové, které by se daly používat jako potenciální reaktivátory inhibovaných ChE.

# 1. Teoretická část

## 1.1. Acetylcholin

Acetylcholin (ACh; **3**) je excitační neurotransmitter cholinergního systému nacházející se v neuromuskulárních spojeních, synapsích ganglií a viscerálním motorickém systému [12]. Syntéza molekul ACh je katalyzována cholinacetyltransferasou (ChAT), která spojuje acetylkoenzym A (**2**) (vznikající z glukosy v mitochondriích) a cholin (**1**) (přijímán převážně v potravě) v cytoplazmě presynaptického axonu (Schéma 1). Molekuly ACh jsou nadále uchovávány v synaptických vezikulách, které mohou obsahovat až 10 000 molekul ACh. K uvolnění dochází procesem exocytózy, ACh se transportuje do synaptické štěrbině, kde dosedá na cholinergní receptory na postsynaptické membráně dalšího neuronu [13].

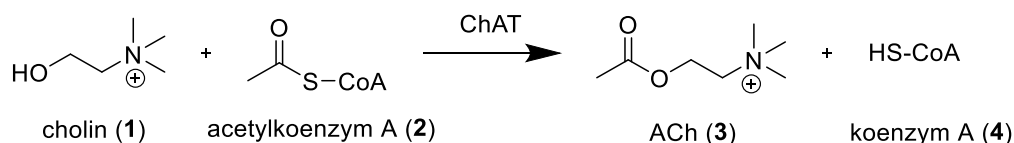
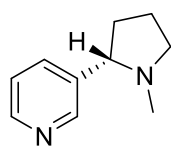


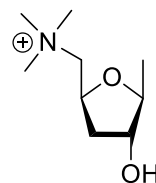
Schéma 1: Syntéza ACh (**3**).

## 1.2. Cholinergní receptory

Cholinergní receptory je souhrnné označení receptorů které jsou stimulovány ACh [14]. Při šíření akčního potenciálu dochází k depolarizaci presynaptické membrány neuronu, otevírají se napětím řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, zvýšená intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  vede k aktivaci specifických proteinů (VAMPs a SNAPs) a fúzi vezikulární membrány s plazmatickou membránou presynaptického neuronu [15]. Uvolněný ACh dosedá na receptory postsynaptického neuronu, které lze rozdělit na dva podtypy, nikotinové a muskarinové, jejichž názvy jsou odvozeny od jejich afinity k jejich přirozeným agonistům nikotinu (**5**) a muskarinu (**6**) (Obrázek 1) [14].



nikotin (5)



muskarin (6)

**Obrázek 1:** Struktura nikotinu (5) a muskarinu (6).

### 1.2.1. Muskarinové receptory

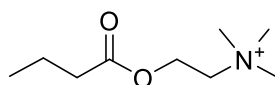
Tento typ receptorů je spřažen s G proteinem a exprimován napříč centrální nervovou soustavou (CNS), vegetativními ganglii, hladkou svalovinou a orgány parasympatiku [14]. Jedná se o transmembránové receptory, které sedmkrát procházejí membránou a jsou spřažené s G proteinem na intracelulární straně membrány, proto se můžeme setkat i s pojmem metabotropní receptory. Jejich účinek spočívá v kaskádovité produkci sekundárních messengerů a následné fosforylaci a aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů anebo otevření  $\text{K}^+$  kanálů v závislosti na podtypu muskarinového receptoru. To vede k hyperpolarizaci membrány postsynaptického neuronu a následnému otevření napětově řízených kanálů a šíření nervového vzruchu [16]. Celkem existuje pět podtypů muskarinových receptorů označených zkratkou M1 až M5, které se odlišují afinitou třetí intracelulární smyčky k specifickému G proteinu. Byla prokázána podobnost mezi receptory M1, M3 a M5 a mezi M2 a M4. Zatímco první zmíněná skupina (M1, M3, M5) fosforyluje cílovou skupinu proteinů a mobilizuje intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$ , druhá skupina (M2, M4) inhibuje adenylát cyklázu a reguluje  $\text{K}^+$  iontové kanály [14]. M1 receptory lze nalézt v CNS, buňkách vegetativních ganglií a exokrinních žláz. Naproti tomu M2 receptory lze nalézt nejen v CNS, ale i v srdci. M3 jsou stejně jako M1 lokalizovány v exokrinních žlázách a CNS, a navíc i v hladké svalovině. M4 a M5 se převážně vyskytují v CNS. Přestože muskarinové receptory vykazují vyšší dobu latence než nikotinové, jejich afinita k ACh je podstatně vyšší s  $K_D$  přibližně 30 nM, zatímco u nikotinových receptorů se hovoří o hodnotě  $K_D$  30  $\mu\text{M}$  [16]. Podráždění těchto receptorů jejich agonistou, od kterého je odvozeno jejich jméno, muskarinem (6), způsobuje depolarizaci postsynaptické membrány a typické cholinergní příznaky, miózu, zvýšenou lakrimaci, salivaci, bronchokonstrikci a bradykardii [15, 17].

## 1.2.2. Nikotinové receptory

Nikotinové receptory existují ve dvou základních podtypech, svalovém a neuronálním, mezi kterými jsou drobné strukturní odlišnosti [18]. Toto je pouze základní rozdělení, existuje až 17 podtypů nikotinových receptorů [19]. Svalový podtyp se skládá ze dvou podjednotek  $\alpha$ , jedné  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ , zatímco neuronální podtyp je tvořen  $\alpha$  a  $\beta$ , nebo pouze  $\alpha$  [18]. Tyto receptory fungují jako ionotropní receptory řízené ligandem plnící funkci iontového kanálu [20]. ACh se váže na extracelulární část  $\alpha$  podjednotek, iontový kanál se otevře a stane se propustným pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a u některých podtypů pro  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. To vede k hyperpolarizaci membrány postsynaptického neuronu a následnému otevření napětově řízených kanálů a šíření nervového vzruchu [16]. Podráždění agonistou, například nikotinem (5), vede k trvalé depolarizaci postsynaptické membrány a projevuje se hypotenzí, třesem, záškuby ve svalech až paralýzou [15, 17].

## 1.3. Cholinesterasy

ChE jsou enzymy ze skupiny karboxyesteras zodpovědné za regulaci neurotransmise v cholinergních synapsích a neuromuskulárních spojeních pomocí hydrolýzy ACh na acetyl a cholin a butyrylcholinu (BuCh; 7) (Obrázek 2) na butyryl a cholin [21]. Acetylcholinesterasa (AChE; UniProtKB-P0458) a její sesterský enzym butyrylcholinesterasa (BuChE; UniProtKB-P06276) ve své struktuře obsahují katalytické místo (CAS), ve kterém katalytickou triádou aminokyselin rozkládají ACh a BuCh, zároveň v tomto místě často dochází k inhibici těchto enzymů [21].



butyrylcholin (7)

Obrázek 2: Struktura BuCh (7).

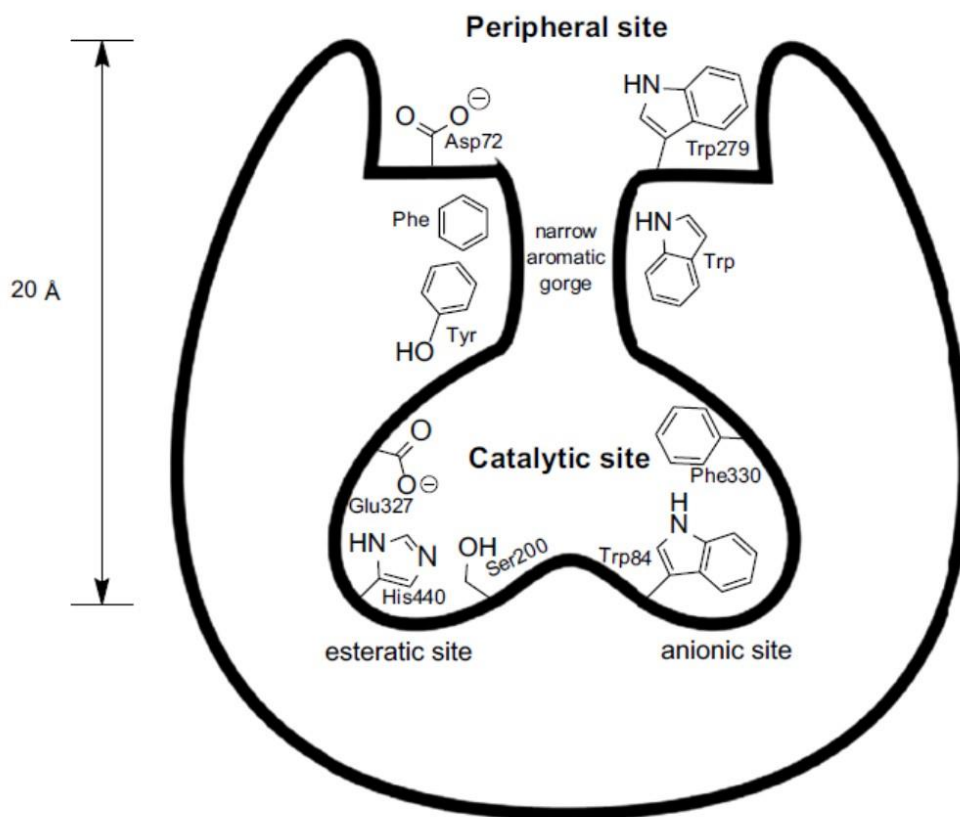
### 1.3.1. Acetylcholinesterasa

AChE je serinová hydroláza, ze skupiny  $\alpha/\beta$  hydrolas, která zahrnuje ChE, karboxyesterasy a lipasy. Nachází se převážně na neuromuskulárních spojeních a cholinergních synapsích v mozku. Je to esenciální enzym nezbytný pro život a vyskytuje se ve všech eukaryotických organismech. Její rolí je terminace

neurotransmise rapidní hydrolyzou ACh na acetát a cholin. Katalytická aktivita AChE je poměrně vysoká, dokáže rozložit až 25 000 molekul ACh za vteřinu. AChE může být inhibována jak přírodními, tak syntetickými toxiny, poté ztrácí svoji schopnost hydrolyzy ACh a terminace neurotransmise, a pokud její schopnost není obnovena včas dojde k „stárnutí“ enzymu, kdy AChE svoji katalytickou aktivitu ireverzibilně ztratí a to mnohdy vede až k úmrtí [22].

### **1.3.1.1. Struktura**

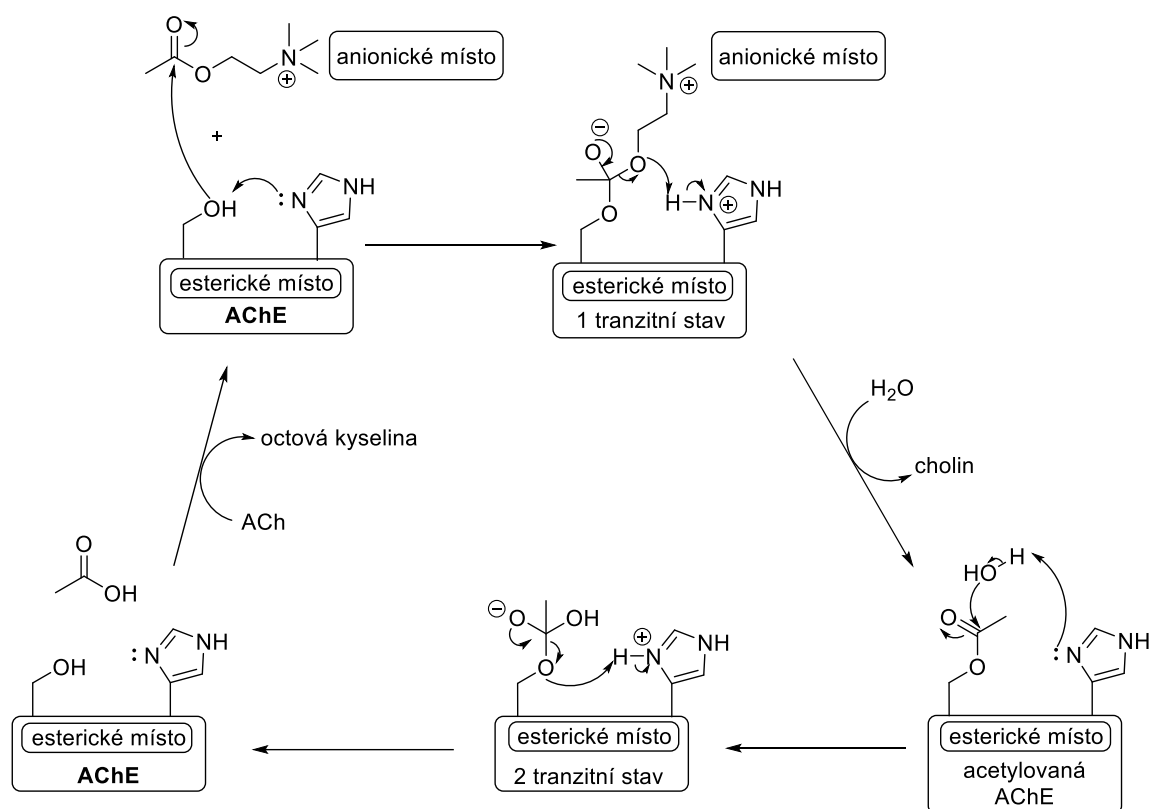
Molekula AChE (UniProtKB-P0458) má elipsoidní tvar. Jejím nejvýznamnějším strukturním prvkem je úzká hluboká štěrbina lemovaná periferním anionickým místem (PAS), které se skládá především z hydrofobních aromatických zbytků aminokyselin jejichž úlohou je alosterická modulace CAS na dně štěrbiny, kde se nachází aktivní místo enzymu (Obrázek 3) [23]. CAS lze rozdělit na dvě podjednotky, anionickou a esterickou podjednotku. Esterická podjednotka v AChE, patřící Parejnoku kalifornskému (*Torpedo californica*), obsahuje katalytickou triádu tří aminokyselin, Ser200, His440 a Glu327 a anionická podjednotka je tvořena Trp84, Phe330, Tyr33 [22].



**Obrázek 3:** Struktura AChE (Parejnek kalifornský, *Torpedo californica*; UniProtKB-P0458) [9].

ACh je při vstupu do štěrby orientován kation- $\pi$  interakcemi s aromatickými residui k CAS. Zde anionické místo orientuje ACh pomocí interakce s kvarterním dusíkem cholinu, tak aby mohlo dojít k vazbě na katalytickou triádu [9]. V prvním kroku hydroxylová skupina Ser200 nukleofilně atakuje elektrofilní uhlík substrátu a dojde k tvorbě dočasné kovalentní acylové vazby a vzniku acetylované AChE. V prvním kroku se z komplexu uvolní cholin, ve druhém kroku se uvolňuje acetyl, který s vodou tvoří kyselinu octovou (Schéma 2) [24].



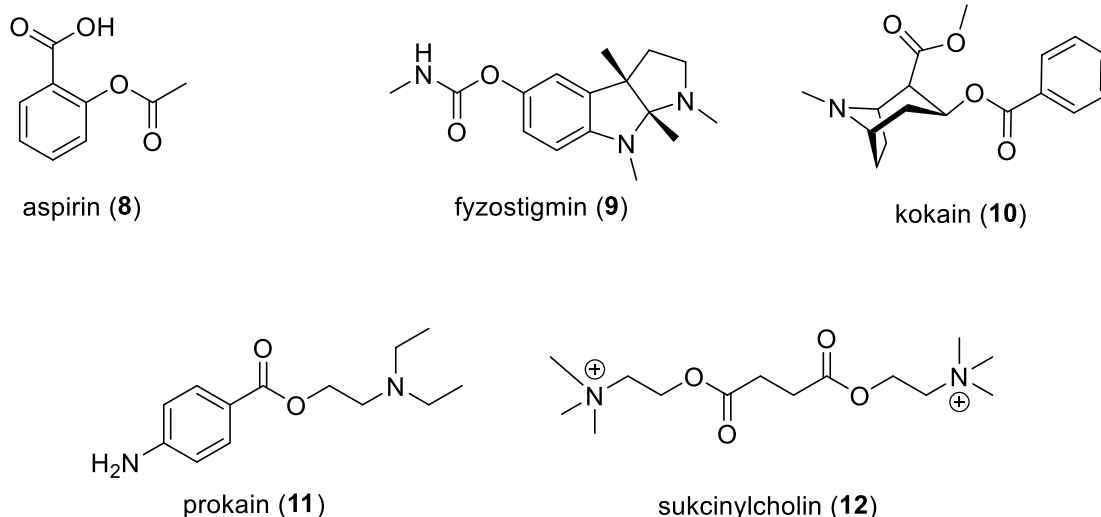


**Schéma 2:** Mechanismus hydrolyzy ACh.

### 1.3.2. Butyrylcholinesterasa

BuChE je druhý podtyp ChE, je známá pod dalšími názvy jako například sérová ChE anebo nespecifická ChE. Na rozdíl od AChE, která se vyskytuje jako membránový enzym především na erythrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině a celkově všech částech mozku, BuChE existuje především v plazmě, játrech, hladkých svalech a slinivce břišní [9].

BuChE je schopná hydrolyzovat ACh a objemnější substráty jako BuCh (7) (Obrázek 2), účastní se detoxifikačních procesů a metabolismu některých esterových sloučenin bez cholinové složky, jako aspirin (8), fyzostigmin (9) a kokain (10) (Obrázek 4). Zároveň je schopná hydrolyzovat esterické sloučeniny, které nachází své využití jako anestetika, příkladem mohou být prokain (11) a sukcinylcholin (12) (Obrázek 4) [24]. Mezi další substráty patří i gherlin, peptidický hormon ovlivňující chuť k jídlu [21].



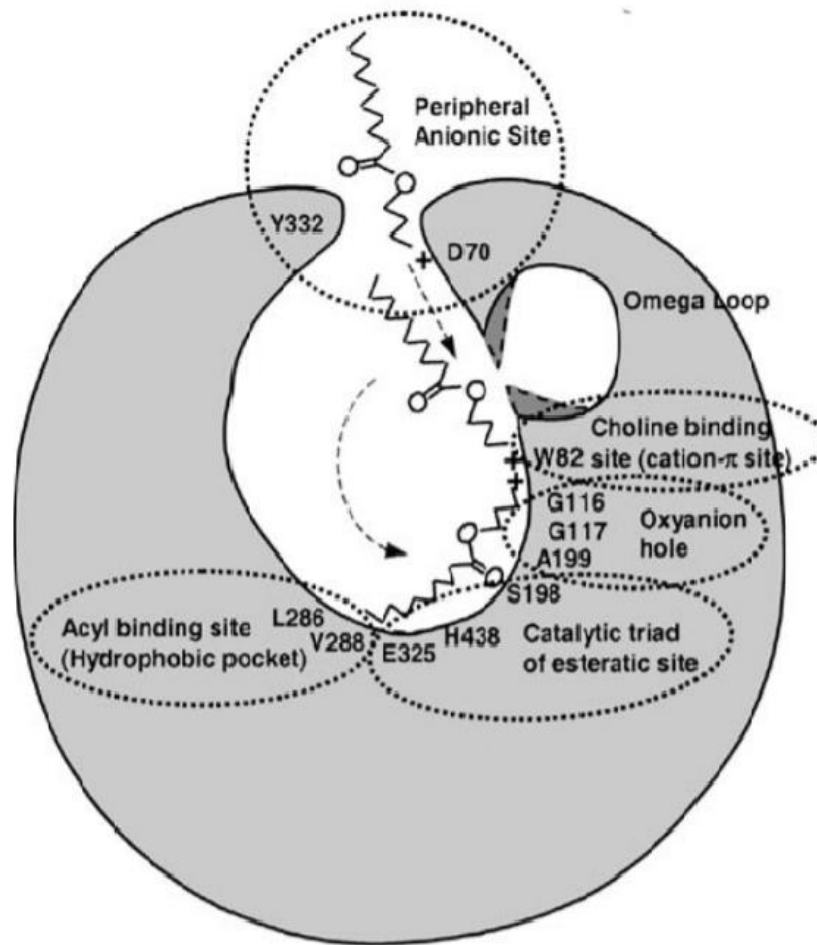
**Obrázek 4:** Struktury aspirinu (8), fyzostigminu (9), kokainu (10), prokainu (11) a sukcinylcholinu (12).

### 1.3.2.1. Struktura

Lidská BuChE (UniProtKB-P06276) je tetramer spojený proteinem bohatým na polyprolin a každá z jeho čtyř podjednotek se skládá z 574 aminokyselin [25]. Stejně jako AChE je jedním z jejich hlavních strukturních prvků hluboká štěrbina lemovaná aromatickými residui z PAS na jejímž dně se nachází CAS obsahující katalytickou triádu složenou ze Ser198, Glu325 a His438 (Obrázek 5) [26]. CAS BuChE je objemnější než CAS AChE, proto je méně stereospecifická a schopná degradovat i větší substráty jako výše zmíněný BuCh (7), aspirin (8), fyzostigmin (9) a kokain (10) [26].

### 1.3.2.2. Bioscavenger

V poslední době došlo k testování BuChE jako antidota používaného při otravě OP a NPL [27]. Pro tuto funkci se zavedl pojem „bioscavenger“, poprvé tento výraz v souvislosti s otravou OP zavedl Main a kolektiv již v roce 1956 [28]. Bioscavengery v podobě BuChE jsou alternativní terapií při otravách NPL a OP, protože je dokážou zachytit již v krevním oběhu předtím, než dosáhnou AChE v CNS. Inhibice BuChE nemá žádné fyziologické příznaky, zatímco inhibice AChE způsobuje smrtelné otravy. BuChE vážou OP pomocí reverzibilní vazby do aktivního místa, které je o 200 Å větší než v případě AChE [29]. Po navázání OP dochází k hydrolýze OP nebo ke vzniku ireverzibilní vazby, v tomto případě dochází k procesu, kterému se říká stárnutí enzymu a dealkylaci alkylového řetězce na atomu fosforu [30].



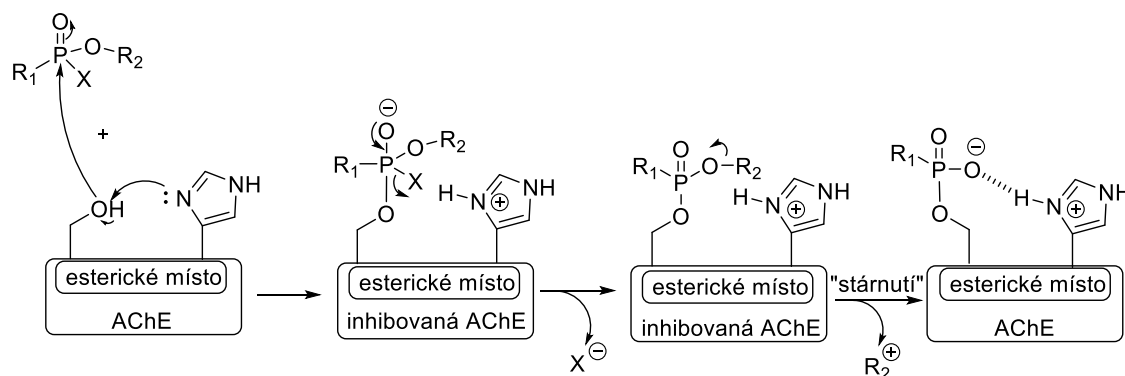
**Obrázek 5:** Struktura monomeru lidské BuChE (UniProtKB-P06276) [31].

## 1.4. Inhibice cholinesteras

AChE i BuChE podléhají ireverzibilní inhibici OP a ztrácí svoji katalytickou schopnost degradovat příslušné molekuly. Inhibovaný enzym ztrácí svoji funkci a není nadále schopen degradovat ACh, který se následně hromadí na nervových synapsích a způsobuje trvalou stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů. Mezi hlavní symptomy patří zvýšená perspirace, salivace a lakrimace, také mióza a celková paralýza včetně periferní obrny dýchacích svalů. Smrt nastává udušením za plného vědomí [10]. Účinek inhibitorů ChE je soustředěn na důležité domény těchto enzymů, CAS na dně štěrbině nebo PAS, v některých případech na obě tyto domény [23].

OP se kompetitivně váže do aktivního místa AChE. V první fázi se OP naváže na Ser200 a ve druhé fázi dochází k dealkylaci alkoxy substituentu OP a stabilizaci

pomocí His440, tomuto procesu se říká „stárnutí“ AChE. V první fázi je mechanismus vazby OP podobný vazbě ACh. OP proniká do aktivního místa enzymu přes úzkou štěrbinu na jejímž dně se nachází CAS. CAS sestává ze dvou podjednotek, esterické podjednotky obsahující katalytickou triádu a anionické podjednotky orientující substrát do správné polohy. Katalytická triáda se skládá ze tří aminokyselin, Ser200, His440 a Glu327 a anionická podjednotka z Trp84, Phe330, Tyr33. Serinová skupina z katalytické triády nukleofilně atakuje atom fosforu v OP, vzniká kovalentní vazba mezi atomem kyslíku a fosforu a dochází k odstoupení halogenu ve formě aniontu. Tato reakce dává za vznik fosforylovanému enzymu, který vykazuje vysokou stabilitu a může podléhat spontánní hydrolyze. V tomto okamžiku enzym podléhá ještě jedné reakci, která probíhá snadněji než hydrolyza, a to intramolekulární reakci, taktéž známé jako „stárnutí“ enzymu. Takle forma enzymu nemůže být reaktivována a trvale ztrácí svoji schopnost degradace ACh. Proces stárnutí je charakterizován dealkylací alkoxy substituentu na atomu fosforu a následnou stabilizací komplexu vznikem vodíkového můstku mezi histidinovým residuem a kyslíkem na atomu fosforu (Schéma 3). Délka trvání procesu stárnutí je odlišná pro každý OP, v případě somanu může trvat 2 minuty, zatímco v případě VX až 48 hodin [9, 11, 24].

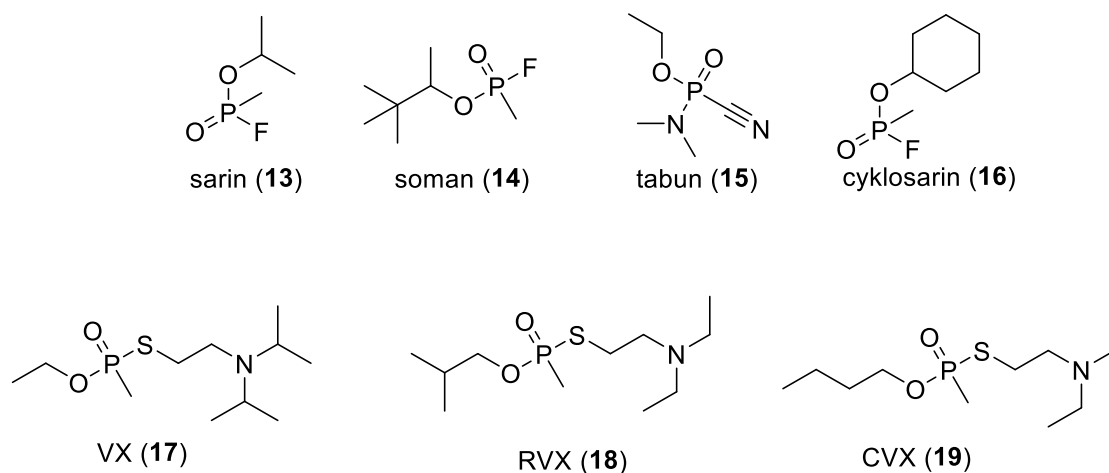


**Schéma 3:** Inhibice AChE.

### 1.4.1. Inhibitory cholinesteras

Inhibitory ChE jsou nejenom OP pesticidy, jako paraoxon a methylparaoxon [32], ale i chemické zbraně, které jsou vzhledem ke svému mechanismu působení známy také jako NPL [9]. Tyto látky lze dělit do dvou skupin, starší série G-látek a novější série V-látek. G-látky jsou více těkavé, proto se nachází především v podobě aerosolů

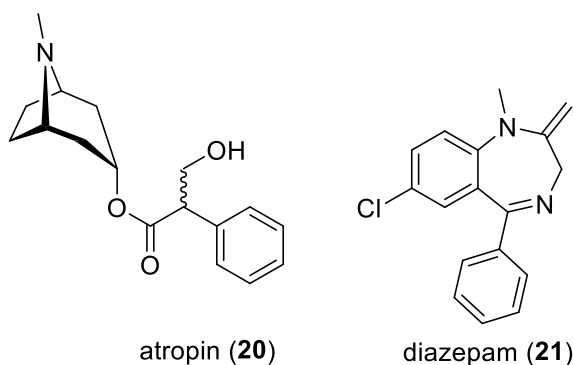
a zahrnují sarin (**13**), soman (**14**), tabun (**15**) a cyklosarin (**16**) (Obrázek 6). V-látky jsou kapaliny a patří sem VX (**17**), RVX (**18**) a CVX (**19**) (Obrázek 6). Jejich skupenství má vliv na jejich stálost v prostředí, kdy V-látky jsou stálejší než G-látky a v prostředí přetrvávají déle [9].



**Obrázek 6:** Struktury sarinu (**13**), somanu (**14**), tabunu (**15**), cyklosarinu (**16**), VX (**17**), RVX (**18**) a CVX (**19**).

## 1.5. Terapie

Existuje profylaxní terapie, používaná před vystavením organismu OP látkám. Profylaxní terapie spočívá v podání reverzibilních inhibitorů AChE (pyridostigmin, galanthamin), oximových reaktivátorů a bioscavengerů v podobě rekombinantní BuChE [33]. Terapie po expozici OP spočívá v aplikaci anticholinergik, antikonvulzantů a oximových reaktivátorů ChE pomocí tříkomorových autoinjektorů, kdy každá z komor obsahuje jednu ze složek terapie [34]. Jako anticholinergikum se podává atropin (**20**) (Obrázek 7), který působí jako agonista cholinergních receptorů. Antikonvulzant je například diazepam (**21**) (Obrázek 7). Komerčně dostupné a používané reaktivátory jsou pralidoxim (**22**), obidoxim (**23**), methoxim (**24**), asoxim (HI-6; **25**) a trimedoxim (**26**) (Obrázek 8) [9–11].



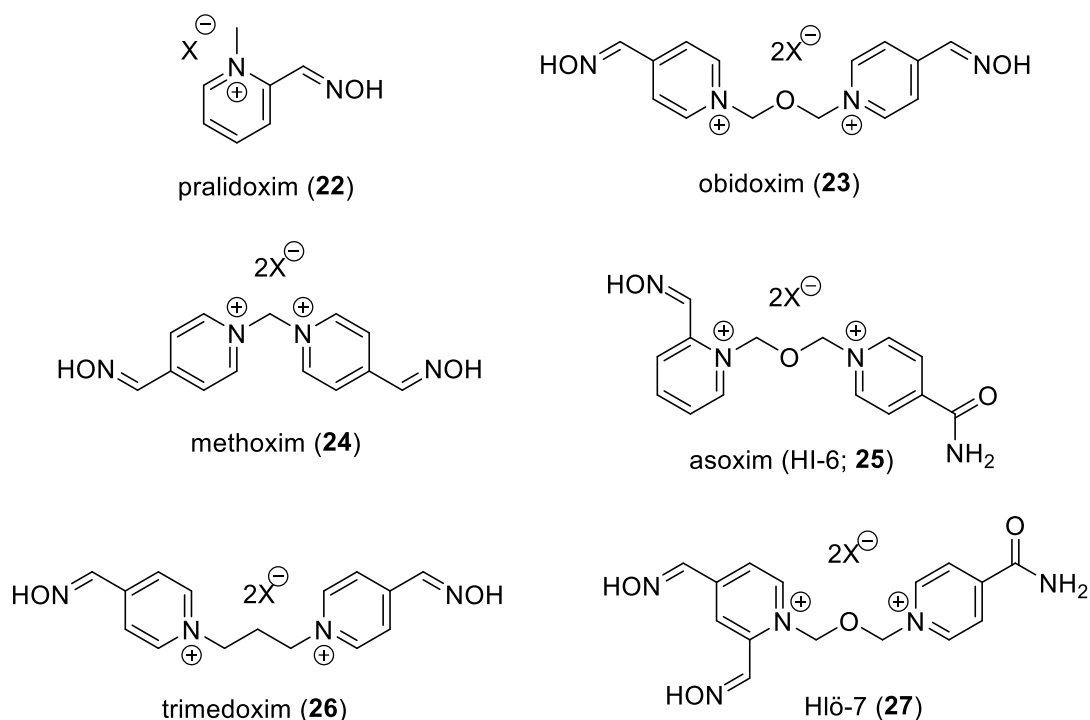
**Obrázek 7:** Struktury atropinu (20) a diazepamu (21).

### 1.5.1. Reaktivátory

Zatímco anticholinergika a antikonvulzanty jsou používány jako symptomatická terapie, oximové reaktivátory jsou schopné odstranit příčinu intoxikace a reaktivovat AChE. Mechanismus působení reaktivátorů spočívá v reaktivaci inhibované AChE a BuChE a obnovení jejich katalytické aktivity. Oximátový anion nejdříve napadne atom fosforu ve fosforylované AChE, dojde ke vzniku komplexu a jeho následnému rozpadnutí, za obnovení serinové skupiny a katalytické funkce enzymu. Hlavní výzvy v přípravě reaktivátorů je jejich propustnost přes hematoencefalickou bariéru (HEB), obecně nízká lipofilita a permanentní náboj na kvarterních dusících brání reaktivátorům kvantitativně prostupovat přes biologické membrány pasivní difúzí, proto účinkují především v periferní nervové soustavě (PNS). Experimentálně bylo dokázáno, že pralidoxim (22) (Obrázek 8) po intravenosním podání prostupuje do CNS přibližně z 10 %, zatímco bispyridinové aldoximy prostupují pouze v rozmezí 1-3%, to je způsobeno zvýšením počtu permanentních nábojů v molekule [11]. Zvýšení lipofility molekuly je možné dosáhnout např. zavedením atomu halogenu do struktury [35]. Další možností, jak zvýšit propustnost přes HEB je zavedení glukosové skupiny, která je následně rozeznávána glukosovými transportéry a transportována přes HEB společně s reaktivátorem [36]. Existuje i přístup kdy je možno se zcela vyhnout HEB a to pomocí „bypassu“, kdy je reaktivátor podán intranasálně, přes sliznici nosní dutiny. Další výzvu představuje univerzálnost reaktivátorů, pro použití při otravách různými typy OP sloučenin a v neposlední řadě i možnost reaktivace „zestárlé“ formy enzymu [9-11].

Reaktivátory jsou svojí strukturou monokvarterní nebo biskvarterní pyridiniové soli, nesoucí oximovou skupinu nezbytnou pro plnění své funkce alespoň na jednom z pyridinových kruhů. Existují tři hlavní strukturální podtypy reaktivátorů, bez náboje a bez oximové skupiny [37], bez náboje s oximovou skupinou [38] a monokvarterní a nebo biskvarterní s oximovou skupinou [9]. Biskvarterní reaktivátory s oximovou skupinou lze navíc rozdělit na monooximové a bisoximové reaktivátory [10].

Dnes je používána především řada komerčně dostupných reaktivátorů ChE, pralidoxim (**22**), obidoxim (**23**), methoxim (**24**), asoxim (HI-6; **25**) a triedoxim (**26**) (Obrázek 8). Pralidoxim (**22**) je reaktivátor s jedním nábojem a jednou oximovou skupinou na pyridinovém jádře v poloze C2. Je to účinný reaktivátor sarinem a VX inhibovanou AChE a méně účinný v případě inhibice somanem a tabunem [39–41]. Methoxim (**24**) byl první bispyridiniový oxim účinný proti tabunu, sarinu a VX, ale stále neúčinný v případě somanu [42, 43]. Obidoxim (**23**), trimedoxim (**26**) a HLö7 (**27**) (Obrázek 8) jsou nejúčinnější reaktivátory v případě otrav tabunem, ale jejich účinnost výrazně klesá při inhibici VX [44, 45]. Asoxim (HI-6; **25**) je nejúčinnější reaktivátor pro ChE inhibované sarinem, ale není vhodný při inhibici tabunem [46]. Přestože bispyridiniové reaktivátory jsou obecně účinnější než monopyridiniové, není žádný z nich plně univerzální a využitelný při otravách všemi doposud známými OP.

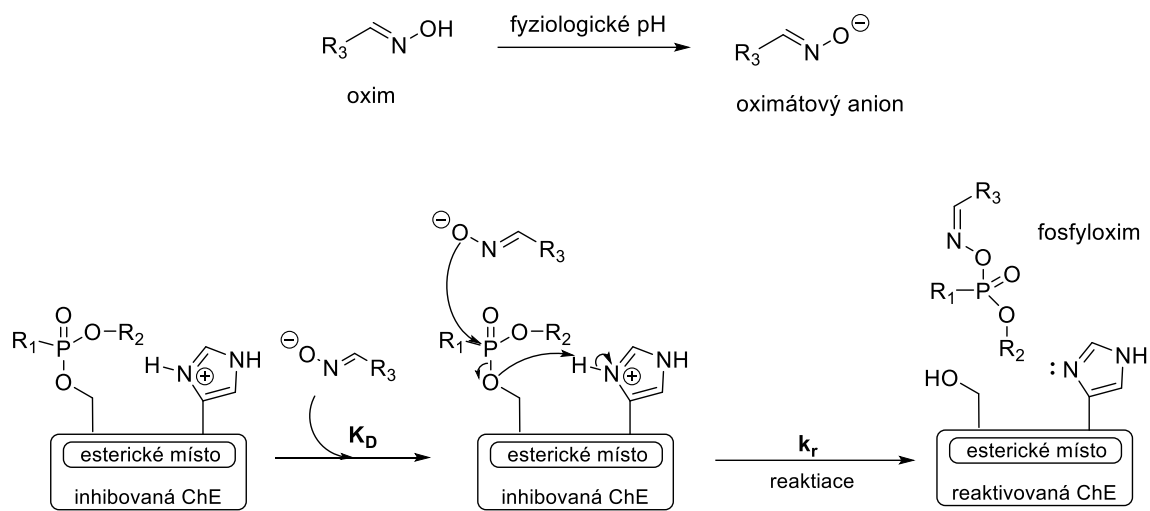


**Obrázek 8:** Struktury pralidoximu (22), obidoximu (23), methoximu (24), asoximu (HI-6; 25), trimedoximu (26) a Hlö-7 (27).

## 1.6. Reaktivace cholinesteras

Reaktivace ChE probíhá nukleofilním atakem oximátového aniontu. Ten vzniká při fyziologickém pH disociací oximové skupiny, a následně je schopen nukleofilně atakovat atom fosforu na fosforylované ChE. Poté nově vzniká komplex mezi reaktivátorem a OP nazývaný „fosfyloxim“ a aktivní forma ChE připravená opět degradovat příslušné molekuly (Schéma 4). Důležitou podmínkou pro úspěšnou reaktivaci je nezestárlá forma enzymu, protože dnešní reaktivátory stále nejsou schopné reaktivovat „zestárlou“ formu enzymu [9].



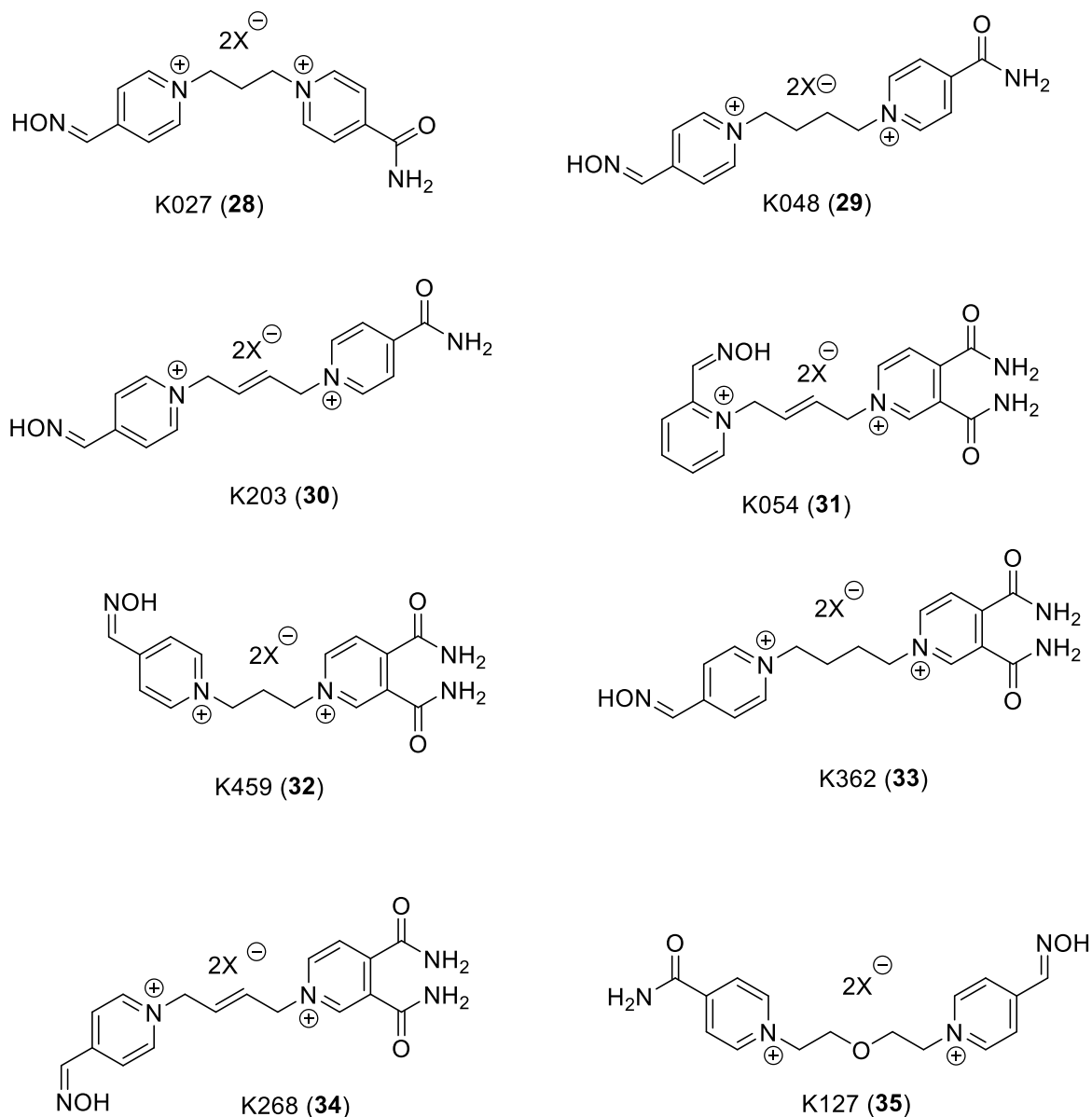


**Schéma 4:** Reaktivace OP inhibované ChE.

## 2. Design

Tato diplomová práce se zabývá syntézou nových biskvarterních reaktivátorů ChE obsahujících pyridindikarboxamidovou složku, jakožto strukturních analogů již dříve připravených reaktivátorů ChE inhibovaných OP sloučeninami.

Jako předloha sloužil komerčně dostupný reaktivátor asoxim (HI-6; **25**) a řada reaktivátorů s označením „K“ připravena výzkumnými skupinami z Hradce Králové [9]. Oxim **25** je biskvarterní reaktivátor s jednou oximovou skupinou v poloze C2 a jednou amidickou skupinou v poloze C4 na pyridinových skeletech, jeho spojovací řetězec obsahuje atom kyslíku (Obrázek 8). Oximová skupina má v poloze C2 a C4 nižší hodnotu pKa, díky tomu lépe tvoří oximátový anion za fyziologických podmínek, pKa oximové skupiny je nadále snižováno substitucí pyridinového jádra elektronakceptorní skupinou. Deriváty substituované elektrondonorní skupinou, například hydroxyskupinou by měly mít vyšší hodnotu pKa oximové skupiny a tím znesnadňovat tvorbu oximátového anionu. Studie ukazují, že minimálně jedna oximová skupina je esenciální pro reaktivaci inhibovaného enzymu, druhá oximová skupina zvyšuje účinnost jen minimálně. Lepší účinnost je také způsobena dvakrát vyšší pravděpodobností správné sterické orientace symetrické molekuly do CAS enzymu [47, 48]. Rostoucí délka řetězce zvyšuje lipofilitu, usnadňuje průchod HEB a heteroatom v podobě kyslíku se pomocí vodíkových vazeb lépe váže na tyrosinová residua v ChE [49]. Inspirací pro tuto diplomovou práci se staly dvě skupiny reaktivátorů s označením „K“. První skupina sestává ze tří reaktivátorů, K027 (**28**) [50], K048 (**29**) [51] a především K203 (**30**) [52] (Obrázek 9). Jsou to strukturní analogy trimedoximu, ve své struktuře obsahují dvě pyridinová jádra spojená alifatickým řetězcem lišícím se počtem uhlíků a násobností vazeb. Pyridinová jádra jsou substituována oximovou skupinou, která poskytuje oximátový anion nezbytný k reaktivaci a amidickou skupinou [1, 9, 53]. Druhá skupina oximových reaktivátorů sestává z K054 (**31**) [54], K459 (**32**) [33], K362 (**33**) [55], K268 (**34**) [47] a K127 (**35**) [56] (Obrázek 9). Tato řada je analogem první skupiny „K“ reaktivátorů, rozdíl spočívá v substituci druhého jádra bez oximové skupiny dvěma amidickými skupinami.



**Obrázek 9:** Strukturální předlohy 28-35 pro nově připravované reaktivátory.

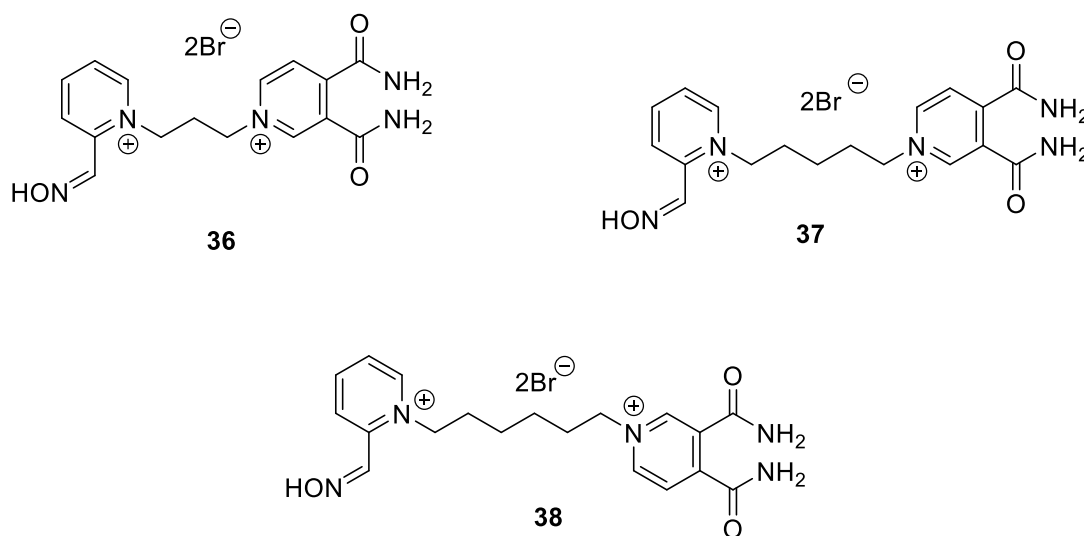
Reaktivátory připravované v této diplomové práci jsou strukturálními analogy druhé skupiny „K“ reaktivátorů. Obsahují 2-pyridinaldoximový a 4-pyridinaldoximový fragment spojený alifatickým řetězcem s 3,4-pyridindikarboxamidovým heteroaromatickým jádrem. Jádro s oximovou skupinou je u jednoho z derivátů substituováno hydroxyskupinou v poloze C3. Přítomností hydroxyskupiny by měl být potvrzen vliv substituentů na tvorbu oximátového aniontu, jehož vznik má přímý dopad na reaktiváční schopnost molekul. Existují i reaktivátory bez náboje s hydroxyskupinou, kde samotná hydroxyskupina může být nukleofilem a atakovat OP inhibovanou ChE [9, 57].

### 3. Cíle práce

Cílem práce je příprava šesti nových biskvarterních monooximových reaktivátorů obsahujících pyridindikarboxamidovou složku, které budou vykazovat potenciální schopnost reaktivace OP inhibovaných ChE. Připravené látky se mezi sebou liší polohou oximové skupiny a substitucí jádra obsahujícího oximovou skupinu. Další rozdíl je v délce spojovacího řetězce, použití násobných vazeb a substituci heteroatomem. Nové molekuly doplňují skupinu potenciálních reaktivátorů ChE s označením „K“ už připravených výzkumnými skupinami z Hradce Králové.

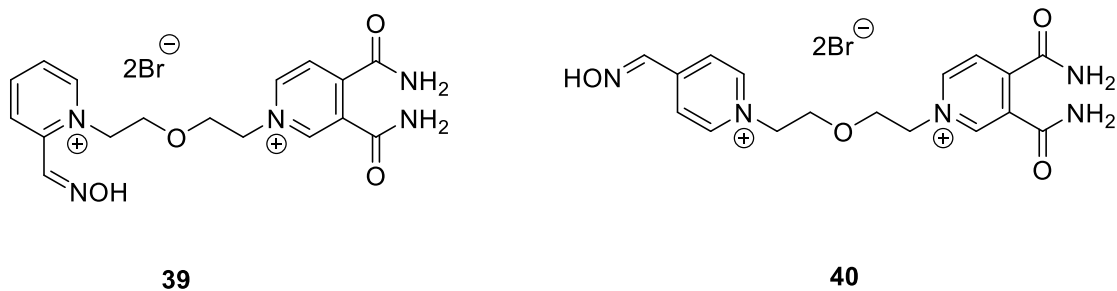
Nově připravené reaktivátory lze rozdělit do tří skupin podle substituce na jádře s oximovou skupinou anebo začleněním heteroatomu do spojovacího řetězce.

První skupina obsahuje 2-pyridinaldoximové jádro a jednotlivé deriváty **36-38** se liší délkou spojovacího řetězce (Obrázek 10).



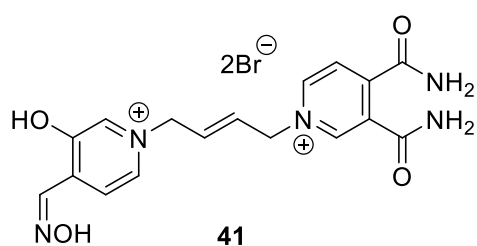
**Obrázek 10:** Sloučeniny **36-38** s 2-pyridinaldoximovou složkou.

Druhá skupina obsahuje dva deriváty, **39** a **40**, s 2-pyridinaldoximovým, 4-pyridinaldoximovým jádrem a pyridindikarboxamidovou složkou, jejich spojovací řetězec obsahuje atom kyslíku (Obrázek 11).



**Obrázek 11:** Sloučeniny **39-40** se spojovacím řetězcem obsahujícím atom kyslíku.

Třetí skupina sestává z jednoho derivátu **41** obsahujícího 4-pyridinaldoximové jádro substituované hydroxyskupinou v poloze C3 (Obrázek 12).



**Obrázek 12:** Sloučenina **41** s 4-pyridinaldoximou složkou substituovanou hydroxyskupinou v poloze C3.

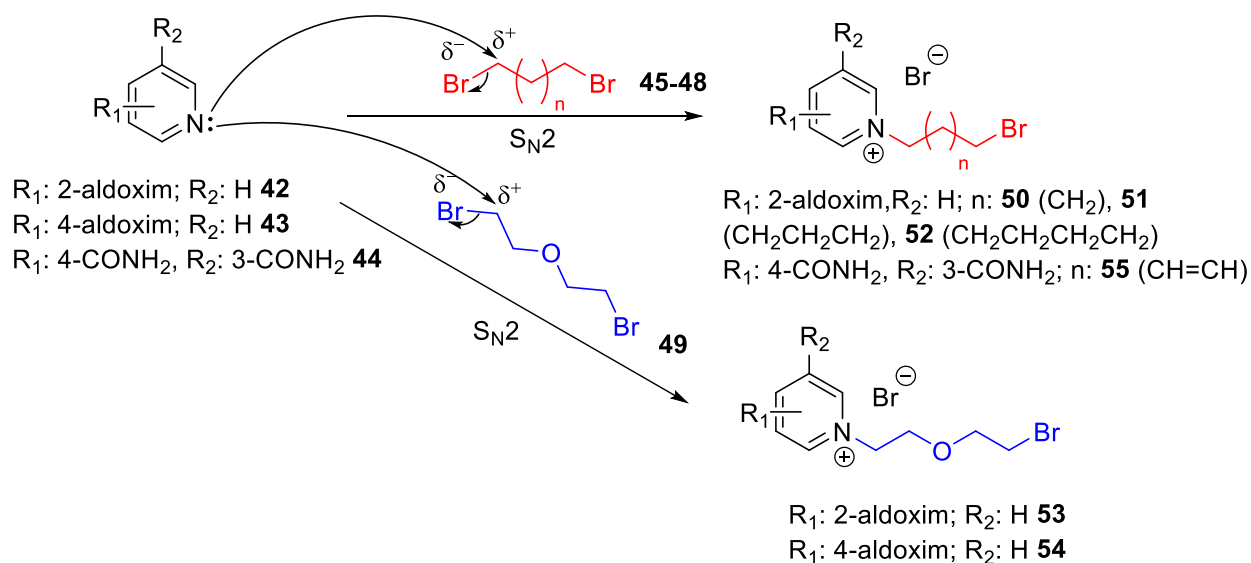
## 4. Výsledky a diskuze

V této diplomové práci jsem si dala za cíl syntézu nových typů potenciálních reaktivátorů ChE inhibovaných OP, které strukturně doplňují reaktivátory ze skupiny „K“ reaktivátorů. Inspirací pro struktury nových reaktivátorů je komerčně dostupný reaktivátor asoxim (HI-6; **25**) (Obrázek 8) a oximové reaktivátory z řady „K“ reaktivátorů připravené výzkumnými skupinami z vědeckých institucí v Hradci Králové: K027 (**28**), K048 (**29**), K203 (**30**), K054 (**31**), K459 (**32**), K362 (**33**), K268 (**34**) a K127 (**35**) (Obrázek 9).

V této práci bylo připraveno celkem šest nových reaktivátorů **36-41**, jejichž struktury se mezi sebou vzájemně liší použitým spojovacím řetězcem, polohou oximové skupiny a substitucí na pyridinovém jádru na kterém je navázaná oximová skupina.

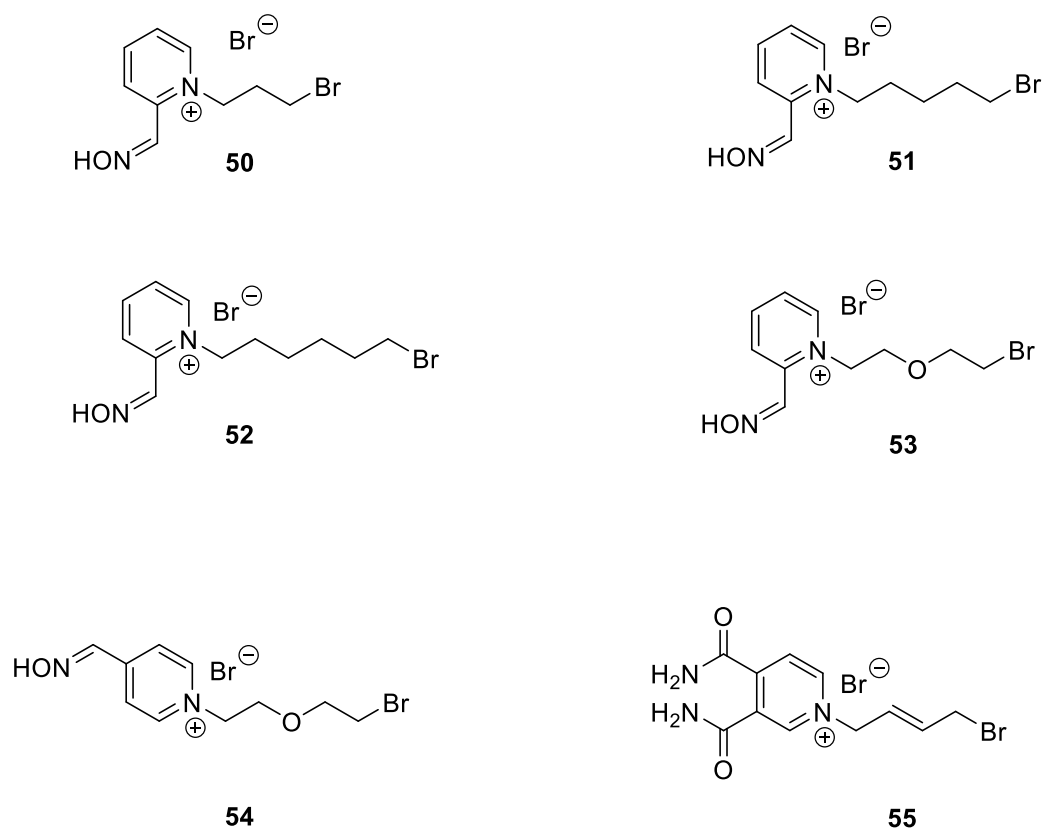
## 4.1. Příprava monokvarterních solí

Výchozí látky pro přípravu finálních produktů byly předem připravené monokvarterní amoniové soli **50-55**, které byly připravené z komerčně dostupných látek (2-pyridinaldoxim (**42**), 4-pyridinaldoxim (**43**) a 3,4-pyridindikarboxamid (**44**)). Syntéza monokvarterních amoniových solí probíhá reakčním mechanismem bimolekulární nukleofilní substituce ( $S_N2$ ) mezi pyridinovým derivátem a alkylovým řetězcem o různé délce a nasycenosti (Schéma 5). Atom dusíku na pyridinovém jádře je nukleofil a svým volným elektronovým párem atakuje uhlík vázaný polární kovalentní vazbou s atomem bromu, díky této vazbě vzniká na uhlíku parciální kladný náboj a stává se substrátem pro  $S_N2$ . Přechodného stavu se účastní obě molekuly a reakce probíhá bez vzniku karbokationtu. Nukleofil přistupuje k atomu uhlíku z protilehlé strany k odstupujícímu atomu bromu, ke změně konfigurace však nedochází, protože reakční centrum molekuly není stereogenním centrem.



**Schéma 5:** Všeobecná příprava monokvarterních amoniových solí **50-55**.

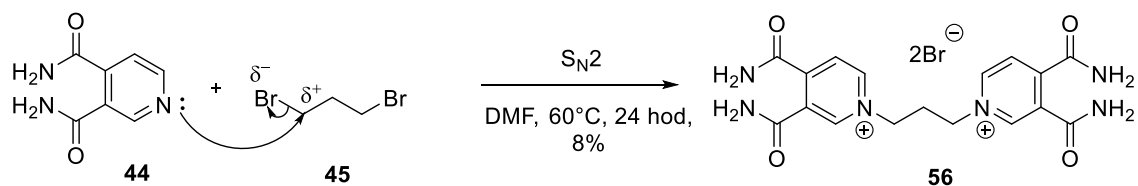
Struktura monokvarterních solí **50-55** (Obrázek 13) použitých pro syntézu cílových biskvarterních amoniových solí tvoří polovinu skeletu molekuly. Monokvarterní soli **51-52** [58], **54** [59] a **55** [60] byly připraveny dříve a publikovány.



**Obrázek 13:** Struktury monokvarterních solí **50-55**.

V nejvyšším výtěžku 86% byla získaná monokvarterní amoniová sůl **55** s násobnou vazbou v použitém řetězci [60], protože na dvojně vazbě je vyšší elektronová hustota a dochází ke snížení elektronové hustoty na uhlíku vázaném polární kovalentní vazbou s atomem bromu. Tím se zvyšuje jeho parciální kladný náboj ( $\delta^+$ ) a zároveň se zvyšuje energie výchozí látky, to má za následek snížení aktivační energie reakce ( $E_A$ ) a snadnější průběh  $S_N2$  reakce.

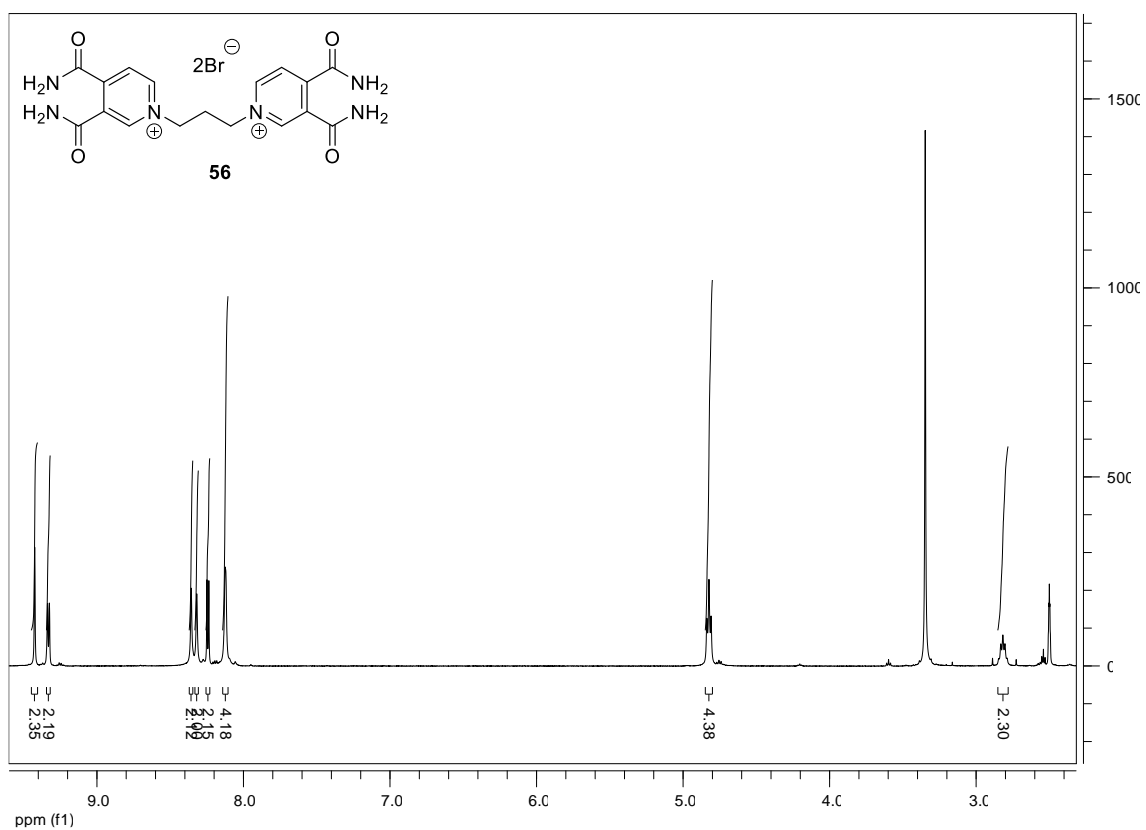
Zároveň byla snaha připravit monokvarterní amoniovou sůl reakcí sloučeniny **44** s 1,3-dibromopropanem (**45**) (Schéma 6), ale docházelo k vícenásobné substituci a nešlo izolovat monokvarterní amoniovou sůl, vznikala pouze biskvarterní amoniová sůl **56**, která byla izolovaná ve výtěžku 8%. Zbytek v reakční směsi tvořila výchozí látka, identifikovaná pomocí TLC a porovnaná se standardem.



**Schéma 6:** Vznik biskvarterní amoniové soli **56**.



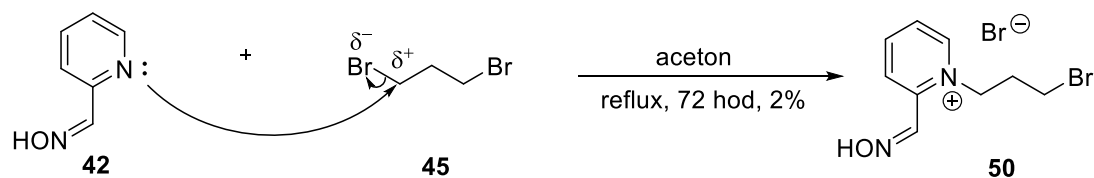
Přítomnost vzniklé biskvarterní sloučeniny **56** byla potvrzena NMR analýzou (Obrázek 14) a MS analýzou.



**Obrázek 14:** <sup>1</sup>H NMR spektrum (DMSO-*d*<sub>6</sub>) vznikající biskvarterní amoniové soli **56**.

#### 4.1.1. Příprava 1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 50.

1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid (**50**) byl připraven podle schématu 7. Reakce probíhala mechanismem  $S_N2$  mezi 2-pyridinaldoximem (**42**) a 1,3-dibrompropanem (**45**) v prostředí acetonu. Aceton byl zvolen jako aprotické rozpouštědlo, protože použití protického rozpouštědla by zpomalovalo průběh  $S_N2$  reakce. Důvodem by byla solvatace nukleofilu, kdy rozpouštědlo obklopí nukleofil a vytvoří s ním vodíkové vazby, to má za následek stabilizaci nukleofilu a snížení jeho energie a reaktivity. Reakce probíhala za refluxu po dobu 72 hod. Ve druhém kroku byla provedena precipitace ve směsi  $CH_3CN$  a acetonu v poměru 1:5, po dobu 30 min a za refluxu. Filtrát byl promyt horkým acetonem. Nízká výtěžnost 2% byla způsobena polohou aldoximové skupiny na uhlíku C2 a jejím elektronakceptorním efektem, který snižuje nukleofilitu dusíku na pyridinovém jádře. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC, za použití silikagelové a celulosové destičky. Pro vyvíjení silikagelové destičky byla použita mobilní fáze  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$  v poměru 9/1/2% a pro celulosové destičky byla použita fáze *n*-BuOH/ $H_2O$ /AcOH v poměru 5/2/1. Na závěr byla potvrzena struktura látky pomocí NMR a MS analýzy.

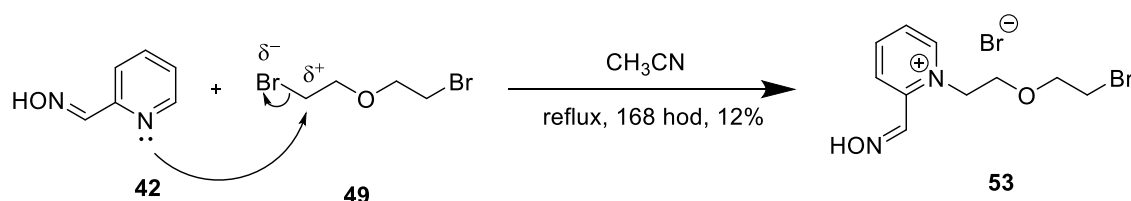


**Schéma 7:** Příprava 1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu (**50**).

#### 4.1.2. Příprava výchozí látky 1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 53.

1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid (**53**) byl mnou připraven podle schématu 8 [61]. Reakce probíhala mechanismem  $S_N2$  mezi 2-pyridinaldoximem (**42**) a bis(2-bromethyl)etherem (**49**) v prostředí aprotického rozpouštědla  $CH_3CN$ . Aprotické rozpouštědlo bylo zvoleno, protože protické rozpouštědlo by solvatovalo nukleofil, snižovalo jeho reaktivitu a energii

a zpomalovalo průběh  $S_N2$ . Reakce probíhala po dobu 168 hodin za refluxu. Ve druhém kroku byla provedena precipitace ve směsi  $CH_3CN$  a acetonu v poměru 1:10, po dobu 30 min a za refluxu. Filtrát byl promyt horkým acetonem. Výtěžnost byla pouze 12%, protože aldoximová skupina v poloze C2 svým elektronakceptorním efektem snižuje nukleofilitu dusíku na pyridinovém jádře a důležitou roli hrály i sterické efekty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC destiček se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Pro vyvíjení silikagelových destiček byla použita mobilní fáze  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$  v poměru 9/1/2% a pro celulosové destičky byla použita fáze  $n-BuOH/H_2O/AcOH$  v poměru 5/2/1. Látky byly detekované pod UV lampou ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Na závěr byla potvrzena struktura látky pomocí NMR a MS analýzy.



**Schéma 8:** Příprava 1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu (**53**).

## 4.2. Příprava biskvarterních solí

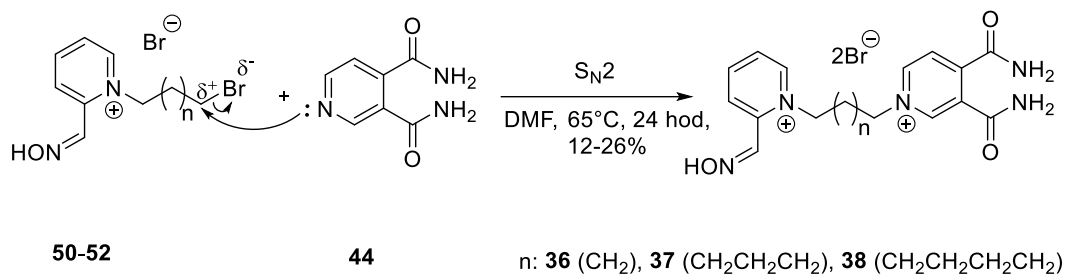
Bylo připraveno šest biskvarterních solí jejichž společným fragmentem je pyridindikarboxamidová složka. Příprava výchozích látek **50** a **53** byla popsána v předchozí kapitole. U derivátů **50-54** byl mechanismem  $S_N2$  atom bromu ve spojovacím řetězci substituován za 3,4-pyridindikarboxamid (**44**), vzniklé produkty byly biskvarterní soli **36-40** (Schéma 9 a 10). U derivátu **55** byl atom bromu ve spojovacím řetězci substituován za 3-hydroxy-4-pyridinaldoxim (**57**), byla připravená sloučenina **41** (Schéma 11).

Příprava finálních produktů probíhala mechanismem  $S_N2$ , kvůli sterickým vlivům substrátu. Substrátem je monokvarterní amoniová sůl s alifatickým řetězcem tvořeným primárním alkylhalogenidem. Primární alkylhalogenidy jsou stericky téměř nebráněné, a proto se vazba mezi primárním alkylhalogenidem a nukleofilem tvoří snadno, proto reakce probíhá mechanismem  $S_N2$ . Zároveň pro zvýšení energie

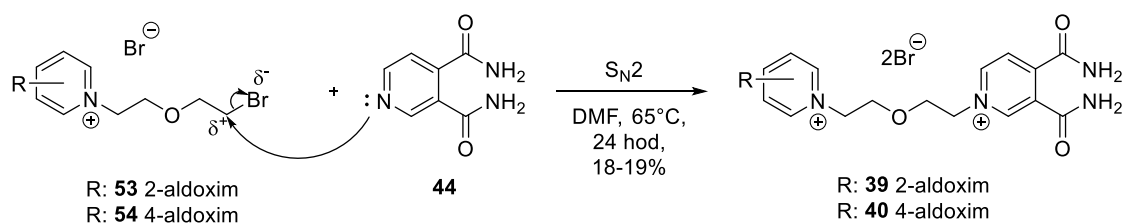
základního stavu a zvýšení reakční rychlosti bylo zvoleno aprotické rozpouštědlo (DMF), které nemůže solvatovat vzniklý nukleofil a zpomalovat průběh reakce.

Finální produkty **36-40** byly připraveny dle schématu 9-10. Reakce probíhala mechanismem S<sub>N</sub>2 mezi 3,4-pyridindikarboxamidem (**44**) a monokarterními solemi **50-54**. V případě derivátu **41** reakce probíhala mezi monokvarterní solí **55** a 3-hydroxy-4-pyridinaldoximem (**57**) (Schéma 11). Vzhledem k mechanismu reakce bylo zvoleno DMF jako polární aprotické rozpouštědlo. Reakce probíhala při 65 °C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován pomocí metody TLC. Pro TLC byla použita silikagelová destička a celulosová destička, pro silikagelové destičky byla použita fáze CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> v poměru 9/1/2% a pro celulosové destičky byla použita fáze *n*-BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH v poměru 5/2/1. Precipitace probíhala v acetonu za laboratorní teploty, při které se produkty téměř nerozpouštěly a zůstávaly v precipitátu ve formě biskvarterních solí a výchozí látky rozpuštěné v acetonu přešly do filtrátu. Protože produkty **37-41** byly po precipitaci stále částečně znečištěné monokvarterní solí byl proveden reflux v CH<sub>3</sub>CN po dobu 30 min a následná filtrace a promytí horkým CH<sub>3</sub>CN. Postupem byly získány látky **36-41** v následujících výtěžnostech 3,4-dikarbamoyl-1-(3-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)propyl)pyridinium dibromid (**36**) 26%, 3,4-dikarbamoyl-1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromid (**37**) 14%, 3,4-dikarbamoyl-1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromid (**38**) 12%, 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromid (**39**) 18%, 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromid (**40**) 19% a 3,4-dikarbamoyl-1-((*E*)-4-(3-hydroxy-4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)but-2-en-1-yl)pyridinium dibromid (**41**) 75%. Rozdílné výtěžnosti u sloučenin **36-40** (12-26%) jsou důsledkem různé délky alkylového řetězce a přítomnosti heteroatomu v řetězci. Výjimkou je derivát **41**, který byl získán v 75% výtěžku. Vyšší výtěžnost může být způsobena nenasyceností alkylového řetězce. Na dvojně vazbě je vyšší elektronová hustota a dochází ke snížení elektronové hustoty na uhlíku vázaném polární kovalentní vazbou s atomem bromu. Tím se zvyšuje jeho parciální kladný náboj ( $\delta^+$ ) a zároveň se zvyšuje energie výchozí látky, to má za následek snížení E<sub>A</sub> a snadnější průběh

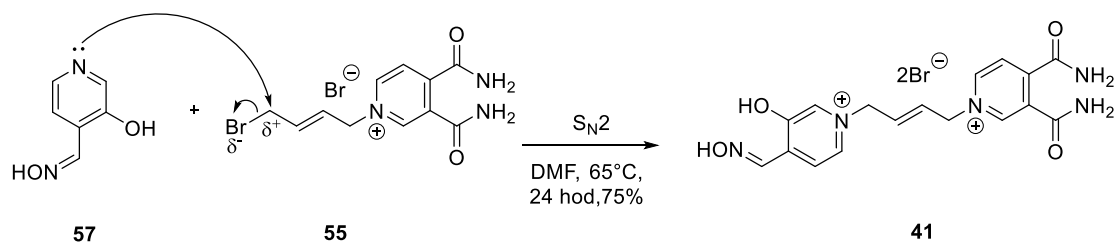
$S_N2$  reakce. Některé výtěžnosti mohou být nižší kvůli omezené schopnosti precipitace biskvarterních amoniových solí v použitých rozpouštědlech, ta může vést ke ztrátám. Nekalibrovaná HPLC čistota (UV;  $\lambda = 254$  nm) všech finálních produktů **36-41** byla  $\geq 98,0$  %.



**Schéma 7:** Příprava biskvarterních amoniových solí **36-38**.



**Schéma 80:** Příprava biskvarterních amoniových solí **39** a **40**.



**Schéma 91:** Příprava biskvarterní amoniové soli **41**.

## 5. Experimentální část

Použité chemikálie jsou komerčně dostupné u výrobce Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika). Chemikálie byly použity bez přečištění. Průběh reakcí byl sledován pomocí silikagelových TLC destiček (Merck Silica gel 60 F<sub>245</sub>) a celulosových TLC destiček (Merck Cellulose F) (Sigma-Aldrich, Česká republika). Pro silikagelové destičky byla jako mobilní fáze použita směs CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub> v poměru 9/1/2% a pro celulosové destičky byla jako mobilní fáze použita směs *n*-BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH v poměru 5/2/1. Detekce byla prováděná pod UV lampou (CAMAG, VWR International, Česká republika) při vlnové délce 254 nm. Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 (Donau Lab, Česká republika) bez korekce.

Pro každou sloučeninu byla naměřena <sup>1</sup>H NMR a <sup>13</sup>C NMR spektra. <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektra připravených sloučenin byla měřena při laboratorní teplotě v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro <sup>1</sup>H a 125,71 MHz pro <sup>13</sup>C) (Varian Comp. Palo Alto, USA) a FT NMR spektrometru Avance NEO 500 MHz (499,87 MHz pro <sup>1</sup>H a 125,71 MHz pro <sup>13</sup>C) (Bruker, Německo). Chemické posuny ( $\delta$ ) jsou v obou typech spekter uváděny v jednotkách ppm. V <sup>1</sup>H spektrech jsou vztaženy k centrálnímu píku DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  = 2,50 ppm) a v <sup>13</sup>C spektrech jsou vztaženy k centrálnímu píku DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  = 39,43 ppm). Interakční konstanty (*J*) jsou uváděny v jednotkách Hz. Spinová multiplicita je charakterizována znaky s (singlet), d (dublet), t (triplet) nebo m (multiplet).

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí ionizační metody elektrosprejové ionizace (ESI/MS) a následnou selekcí iontu přes trojitý kvadrupól na přístroji Agilent 6470. Spektra byla vyhodnocena programem MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

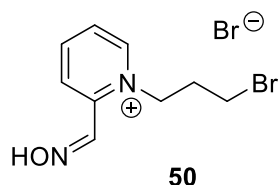
## 5.1. Postup přípravy monokvarterních solí

### 5.1.1. Příprava 1-(3-brompropyl)-2-

#### ((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 50.

Při přípravě výchozí látky **50** byl nejdříve rozpuštěn 2-pyridinaldoxim (**42**) (20,00 g, 163,77 mmol, 1 ekv) v 160 ml acetonu v inertní atmosféře dusíku za laboratorní teploty. Následně byl přidán 1,3-dibrompropan (**45**) (84 ml, 818,87 mmol, 5 ekv). Reakční směs byla refluxovaná po dobu 72 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. V dalším kroku byla provedena precipitace přidáním směsi CH<sub>3</sub>CN a acetonu v poměru 1:5. Směs byla precipitována za refluxu po dobu 30 min. V posledním kroku byla provedena filtrace za sníženého tlaku, produkt zůstává jako precipitát a byl promyt horkým acetonem.

#### 1-(3-brompropyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid, 50.



Získaná sloučenina **50** byla izolována jako světlá tuhá látka.

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

M = 324,02 g.mol<sup>-1</sup>

Výtěžnost: 1,115 g (2%)

T<sub>t</sub>: 162,8-164,0°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 98,6%

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,16 (s; 1H; NOH), 9,05 (d, *J* = 5,3 Hz; 1H; ArH), 8,79 (s; 1H; CH), 8,58-8,55 (m; 1H; ArH), 8,41 (d; *J* = 6,9 Hz; 1H; ArH), 8,13-8,10 (m; 1H; ArH), 4,85-4,82 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,64 (t; *J* = 6,6 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 2,43-2,37 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

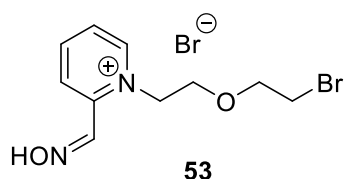
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 147,0; 146,1; 145,3; 141,3; 127,5; 125,9; 56,6; 32,8; 30,0 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>2</sub>O<sup>+</sup> (m/z): 243,0, experimentální hodnota: 243,0.

### 5.1.2. Příprava 1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu, 53.

Při přípravě výchozí látky **53** byl nejdříve rozpuštěn 2-pyridinaldoxim (**42**) (4,85 g, 39,72 mmol, 1 ekv) v 250 ml CH<sub>3</sub>CN v inertní atmosféře dusíku za laboratorní teploty. Následně byl přidán bis(2-bromethyl)ether (**49**) (25 ml, 198,52 mmol, 5 ekv). Reakční směs byla refluxována po dobu 168 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. V dalším kroku byl odpařen CH<sub>3</sub>CN a byla provedena precipitace přidáním směsi CH<sub>3</sub>CN a acetonu v poměru 1:10. Směs byla precipitována za refluxu po dobu 30 min. V posledním kroku byla provedena filtrace za sníženého tlaku, produkt zůstává jako precipitát a byl promyt horkým acetonem.

#### 1-(2-(2-bromethoxy)ethyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid, 53.



Získaná sloučenina **53** byla izolována jako šedá tuhá látka.

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

M = 354,04 g.mol<sup>-1</sup>

Výtěžnost: 1,685 g (12%)

T<sub>t</sub>: 162,5-164,5°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 88,6%

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 13,06 (s; 1H; NOH), 9,01 (d; *J* = 6,2 Hz; 1H; ArH), 8,81 (s; 1H; CH), 8,59-8,56 (m; 1H; ArH), 8,42 (d; *J* = 8,2 Hz; 1H; ArH), 8,14-8,11 (m; 1H; ArH), 5,00 (t; *J* = 4,8 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,91-3,89 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,72-3,70 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,50-3,47 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 147,5; 146,5; 145,3; 141,8; 127,0; 125,4; 70,0; 68,1; 57,2; 32,0 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> (*m/z*): 273,0; experimentální hodnota: 273,2.

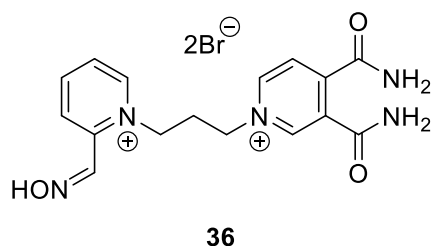


## 5.2. Příprava biskvarterních solí

### 5.2.1. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-(3-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)propyl)pyridinium dibromidu, 36

Pro přípravu produktu **36** byla nejdříve rozpuštěna výchozí látka **50** (300 mg, 0,93 mmol, 1 ekv) v 6 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3,4-pyridindikarboxamid (**44**) (307 mg, 1,86 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku a promyta acetonem.

#### 3,4-dikarbamoyl-1-(3-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)propyl)pyridinium dibromid, 36.



Získaná sloučenina **36** byla izolována jako šedá tuhá látka.

$C_{16}H_{19}Br_2N_5O_3$

$M = 489,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 119 mg (26%)

$T_f$ : 215,2-217,0°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 98,2%

**<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  13,20 (s; 1H; NOH), 9,41 (s; 1H; ArH), 9,31 (d;  $J = 6,3 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 9,18 (d;  $J = 5,7 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,86 (s; 1H; CH), 8,61-8,58 (m; 1H; ArH), 8,46 (d;  $J = 8,2 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,36 (s; 1H; NH), 8,32 (s; 1H; NH), , 8,23 (d;  $J = 6,2 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,17-8,14 (m; 1H; ArH), 8,11 (s; 1H; NH), 8,10 (s; 1H; NH), 4,92 (t;  $J = 7,5 \text{ Hz}$ ; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,87-4,84 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 2,67-2,61 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

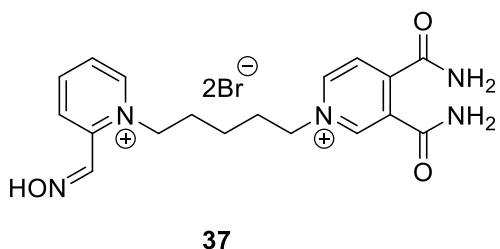
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  165,4; 163,7; 150,6; 147,2; 146,3; 145,8; 145,4; 144,5; 141,3; 134,1; 127,4; 126,1; 125,7; 57,5; 54,5; 31,0 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>2+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>2+</sup> (m/z): 164,6; experimentální hodnota: 164,5.

### 5.2.2. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromidu, 37.

Výchozí monokvarterní sůl **51** (500 mg, 1,42 mmol, 1 ekv) byla rozpuštěna v 10 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3,4-pyridindikarboxamid (**44**) (469 mg, 2,84 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku v acetonu za laboratorní teploty. Po precipitaci byla látka stále částečně znečištěná monokvarterní solí, a proto byl proveden reflux v CH<sub>3</sub>CN po dobu 30 min a následná filtrace v horkém CH<sub>3</sub>CN.

#### 3,4-dikarbamoyl-1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromid, 37.



Získaná sloučenina **37** byla izolována jako šedá tuhá látka.

C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

M = 517,22 g.mol<sup>-1</sup>

Výtěžnost: 104 mg (14%)

T<sub>t</sub>: 200,5-202,5°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 99,9%

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,14 (s; 1H; NOH), 9,41 (s; 1H; ArH), 9,32 (d; J=5,7 Hz; 1H; ArH), 9,18 (d; J = 5,5 Hz; 1H; ArH), 8,81 (s; 1H; CH), 8,60-8,54 (m; 1H; ArH), 8,41 (d; J = 8,0 Hz; 1H; ArH), 8,37-8,32 (m; 2H, 2 x NH); 8,20 (d; J = 6,0 Hz; 1H; ArH), 8,14-8,08 (m; 3H; 2 x NH + ArH), 4,79 (t; J = 6,9 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,68 (t; J = 6,6 Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 2,07-2,03 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1,92-1,83 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1,45-1,36 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

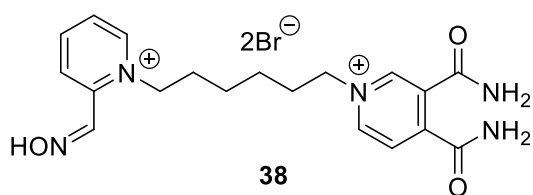
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165,4; 163,6; 150,4; 146,7; 146,1; 145,9; 145,2; 144,3; 141,3; 134,1; 127,4; 126,0; 125,8; 60,3; 57,3; 29,7; 29,5; 21,8 ppm.

MS (ESI $^+$ ):  $[\text{M}]^{2+}$ : vypočítaná hodnota pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3^{2+}$  ( $m/z$ ): 178,6; experimentální hodnota: 178,7.

### 5.2.3. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromidu, 38.

Výchozí monokvarterní sůl **52** (500 mg, 1,37 mmol, 1 ekv) byla rozpuštěna v 10 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3,4-pyridindikarboxamid (**44**) (453 mg, 2,74 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku v acetonu za laboratorní teploty. Po precipitaci byla látka stále částečně znečištěná monokvarterní solí, a proto byl proveden reflux v  $\text{CH}_3\text{CN}$  po dobu 30 min a následná filtrace za sníženého tlaku v horkém  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

#### 3,4-dikarbamoyl-1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromid, 38.



Získaná sloučenina **38** byla izolována jako hnědý olej.

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_3$

$M = 531,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 88 mg (12%)

Čistota (DAD $_{254\text{nm}}$ ): 99,0%

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13,12 (s; 1H; NOH), 9,40 (s; 1H; ArH), 9,31 (d;  $J = 6,2$  Hz; 1H; ArH), 9,16 (d;  $J = 6,1$  Hz; 1H; ArH), 8,80 (s; 1H; CH), 8,58-8,54 (m; 1H; ArH), 8,40 (d;  $J = 7,8$  Hz; 1H; ArH), 8,37-8,31 (m; 2H; 2 x NH), 8,18 (d;  $J = 6,2$  Hz; 1H; ArH), 8,12-8,04 (m; 3H; 2 x NH + ArH), 4,78 (t;  $J = 7,5$  Hz; 2H;  $\text{CH}_2$ ), 4,67 (t;  $J = 7,4$

Hz; 2H; CH<sub>2</sub>), 2,01-1,93 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1,85-1,77 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1,44-1,31 (m; 4H; 2 x CH<sub>2</sub>) ppm.

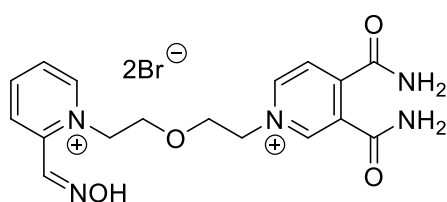
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 165,4; 163,7; 150,4; 146,7; 146,0; 145,9; 145,1; 144,3; 141,4; 134,1; 127,4; 125,9; 125,8; 60,5; 57,6; 30,1; 30,0; 24,7; 24,6 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>2+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>2+</sup> (m/z): 185,6; experimentální hodnota: 185,6.

#### 5.2.4. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromidu, 39.

Výchozí monokvarterní sůl **53** (500 mg, 1,41 mmol, 1 ekv) byla rozpuštěna v 10 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3,4-pyridindikarboxamid (**44**) (467 mg, 2,82 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku v acetonu za laboratorní teploty. Po precipitaci byla látka stále částečně znečištěná monokvarterní solí, a proto byl proveden reflux v CH<sub>3</sub>CN po dobu 30 min a následná filtrace za sníženého tlaku v horkém CH<sub>3</sub>CN.

#### 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromid, 39.



**39**

Získaná sloučenina **39** byla izolována jako tuhá látka.

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

M = 519,19 g.mol<sup>-1</sup>

Výtěžnost: 134 mg (18%)

Tt: 214,7-216,7°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 99,8%

**<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 13,11 (s; 1H; NOH), 9,27 (s; 1H; ArH), 9,09-9,06 (m; 1H; ArH), 8,91-8,86 (m; 1H; ArH), 8,76 (s; 1H; CH), 8,55-8,49 (m; 1H; ArH), 8,41-8,34 (m; 2H; 2 x NH), 8,31-8,27 (m; 1H; ArH), 8,17-8,06 (m; 4H; 2 x NH + 2 x ArH), 5,00-4,92 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,86-4,78 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,02-3,94 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,91-3,84 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

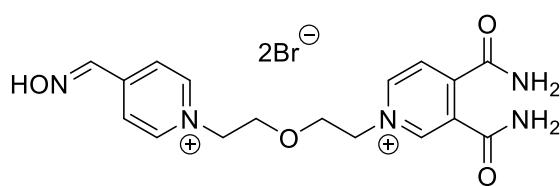
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 165,4; 163,5; 150,6; 147,0; 146,6; 146,4; 145,4; 144,4; 141,7; 133,8; 126,8; 125,6; 125,5; 68,1; 60,2; 57,2 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>2+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup> (m/2z): 179,6; experimentální hodnota: 179,7.

### 5.2.5. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromidu, 40.

Výchozí monokvarterní sůl **54** (300 mg, 0,85 mmol, 1 ekv) byla rozpuštěna v 6 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3,4-pyridindikarboxamid (**44**) (280 mg, 1,70 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku v acetonu při laboratorní teploty. Po precipitaci byla látka stále částečně znečištěná monokvarterní solí, a proto byl proveden reflux v CH<sub>3</sub>CN po dobu 30 min a následná filtrace za sníženého tlaku v horkém CH<sub>3</sub>CN.

### 3,4-dikarbamoyl-1-(2-(2-(4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)ethoxy)ethyl)pyridinium dibromid, 40.



**40**

Získaná sloučenina **40** byla izolována jako šedá tuhá látka.

C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

M = 519,19 g.mol<sup>-1</sup>

Výtěžnost: 83 mg (19%)

T<sub>i</sub>: 155,0-157,0°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 98,0%

**<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 12,83 (s; 1H; NOH), 9,33 (s; 1H; ArH), 9,15 (d; *J* = 5,9 Hz; 1H; ArH), 8,96 (d; *J* = 6,4 Hz; 2H; 2 x ArH), 8,42-8,39 (m; 2H; NH + CH), 8,33 (s; 1H, NH), 8,19 (d; *J* = 6,4 Hz; 2H; 2 x ArH), 8,16-8,13 (m; 2H; NH + ArH), 8,09 (s; 1H, NH), 4,89-4,83 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,80-4,73 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 4,01-3,96 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 3,94-3,89 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

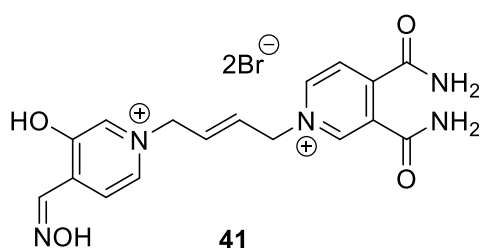
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** δ 165,4; 163,6; 150,6; 148,5; 146,8; 145,2; 145,0; 144,5; 133,8; 125,6; 123,7; 68,5; 68,0; 60,3; 59,6 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>2+</sup>: vypočítaná hodnota pro C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup> (m/2z): 179,6; experimentální hodnota: 179,6.

### **5.2.6. Příprava 3,4-dikarbamoyl-1-((*E*)-4-(3-hydroxy-4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)but-2-en-1-yl)pyridinium dibromid, 41.**

Výchozí monokvarterní sůl **55** (275 mg, 0,73 mmol, 1 ekv) byla rozpuštěna v 5 ml DMF pod inertní atmosférou dusíku za laboratorní teploty. Po rozpuštění byl přidán 3-hydroxy-4-pyridinaldoxim (**57**) (200 mg, 1,45 mmol, 2 ekv). Směs byla zahřívána při 65°C po dobu 24 hod. Průběh reakce byl kontrolován zkouškou na TLC destičkách se silikagelovou a celulosovou stacionární fází. Po 24 hod byla provedena precipitace v acetonu za laboratorní teploty po dobu 1 hod. Směs byla filtrována za sníženého tlaku v acetonu za laboratorní teploty. Po precipitaci byla látka stále částečně znečištěná monokvarterní solí, a proto byl proveden reflux v CH<sub>3</sub>CN po dobu 30 min a následná filtrace za sníženého tlaku v horkém CH<sub>3</sub>CN.

**3,4-dikarbamoyl-1-((E)-4-(3-hydroxy-4-((hydroxyimino)methyl)pyridinium-1-yl)but-2-en-1-yl)pyridinium dibromid, 41.**



Získaná sloučenina **41** byla izolována jako šedá tuhá látka.

$C_{17}H_{19}Br_2N_5O_4$

$M = 517,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Výtěžnost: 283 mg (75%)

T: 187,6-189,5°C

Čistota (DAD<sub>254nm</sub>): 99,3%

**<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  13,17 (s; 1H; NOH), 9,57 (d;  $J = 4,6 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 9,38 (s; 1H; ArH), 9,27 (d;  $J = 6,3 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,98 (d;  $J = 6,1 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,43-8,36 (m; 5H; 2 x NH + ArH + CH), 8,22 (d;  $J = 6,2 \text{ Hz}$ ; 1H; ArH), 8,12 (s; 1H; NH), 8,09 (s; 1H; NH), 6,31-6,27 (m; 2H; 2 x CH); 5,44-5,40 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 5,38-5,36 (m; 2H; CH<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  165,4; 163,6; 150,8; 146,2; 144,5; 141,6; 139,9; 136,9; 136,0; 134,0; 130,2; 129,8; 126,1; 124,5; 124,4; 60,9; 60,7 ppm.

MS (ESI<sup>+</sup>): [M]<sup>2+</sup>: vypočítaná hodnota pro  $C_{17}H_{19}N_5O_4^{2+}$  (m/2z): 178,6; experimentální hodnota: 178,7.

## 6. Závěr

Teoretická část diplomové práce se zabývá studiem poznatků o otravách NPL a terapií těchto otrav, ke kterým se využívají reaktivátory inhibovaných ChE. Dále jsou v ní rozebrány základní poznatky o funkci CNS, včetně studia ACh, jeho syntézy a degradace ChE. Je zde zahrnuté rozlišení a popis enzymů AChE a BuChE. Následně jsou zde popsány OP a rozříděny dle jejich historického dělení do dvou skupin na G-látky a V-látky. V neposlední řadě se teoretická část práce zabývala rozdělením a strukturami dnešních komerčně používaných reaktivátorů.

Dále byla vysvětlena úskalí komerčně používaných reaktivátorů, a to jejich neuniverzálnost a nízká propustnost přes HEB. V kapitolách design a cíle práce byla popsána struktura nově připravených molekul **36-41**, které jsou strukturními analogy již připravených „K“ reaktivátorů inspirovaných strukturou asoximu (HI-6, **25**). Mezi nově připravenými molekulami je i derivát **41** s hydroxyskupinou substituovanou na jádře nesoucím oximovou skupinu. Tento derivát byl připraven za účelem studia vlivu funkčních skupin na tvorbu oximátového aniontu. Vznik oximátového aniontu má přímý vliv na reaktivační schopnosti nově připravovaných derivátů. V případě derivátu **41** může komplex OP-ChE nukleofilně atakovat i hydroxyskupina [9, 57].

Hlavním cílem této diplomové práce byla teda příprava šesti nových potenciálních reaktivátorů **36-41**, které strukturně doplňují reaktivátory ze skupiny „K“ reaktivátorů (K054 (**31**), K459 (**32**), K362 (**33**), K268 (**34**)). Tyto látky budou testovány *in vitro* na jejich schopnost reaktivace ChE inhibovaných OP.

Nově připravené potenciální reaktivátory **36-41** jsou svojí strukturou biskvarterní amoniové soli. Jejich skelet se skládá ze dvou pyridiniových jader, kdy jedno nese oximovou skupinu a druhé jádro nese dvě amidické skupiny. Derivát **41** je na jádře s oximovou skupinou v poloze C4 navíc substituován hydroxyskupinou v poloze C3. Jednotlivé deriváty se odlišují délkou a nasyceností spojovacího řetězce. V případě derivátů **39** a **40** byl zvolen etherový řetězec.

První cíl této práce byla příprava dvou monokvarterních amoniových solí **50** a **53**, tento cíl byl úspěšně splněn. Monokvarterní soli byly získány ve výtěžku 12% pro derivát **53** a 2% pro derivát **50**. Syntéza ostatních derivátů monokvarterních



solí **51** [58] , **52** [58], **54** [59] a **55** [60] byla v minulosti již publikována. Druhým cílem byla syntéza šesti potenciálních reaktivátorů **36-41**, která také proběhla úspěšně. V diplomové práci byly rozebrány mechanismy jednotlivých reakcí. Výtěžky připravených biskvarterních solí **36-40** se pohybovali v rozmezí 12-26% v závislosti na délce řetězce a přítomnosti heteroatomu v řetězci. Výjimkou byl derivát **41**, který byl získán ve výtěžku 75%. Vyšší výtěžnost může být způsobena nenasyčeností alkylového řetězce. Při výtěžnosti má důležitou roli schopnost precipitace biskvarterních amoniových solí v použitých rozpouštědlech, ta může vést ke ztrátám.

Struktury všech látek byly ověřeny MS a NMR analýzou a u pevných látek byly stanoveny jejich teploty tání. Připravené finální produkty **36-41** budou testovány *in vitro* na jejich schopnost reaktivovat OP inhibovanou AChE a hlavně BuChE.

## 7. Použitá literatura

- [1] GORECKI, Lukas, Ondrej SOUKUP, Tomas KUCERA, David MALINAK, Daniel JUN, Kamil KUČA, Kamil MUSILEK a Jan KORABECNY. Oxime K203: a drug candidate for the treatment of tabun intoxication. *Archives of Toxicology*. **2019**, 93(3), 673–691.
- [2] BLACK, R. M. a J. M. HARRISON. The Chemistry of Organophosphorus Chemical Warfare Agents. In: *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, **2006** [vid. 2020-06-29], 781–840.
- [3] SZINICZ, L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*. **2005**, 214(3), 167–181.
- [4] COLEMAN (AUTH.), Kim. *A History of Chemical Warfare*. 1. vyd. B.m.: Palgrave Macmillan UK, **2005** [vid. 2020-06-29].
- [5] WIENER, Sage W. a Robert S. HOFFMAN. Nerve Agents: A Comprehensive Review: *Journal of Intensive Care Medicine*. **2016** [vid. 2020-07-20].
- [6] NEPOVIMOVA, Eugenie a Kamil KUČA. Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data. *Food and Chemical Toxicology*. **2018**, 121, 343–350.
- [7] PADDOCK, Richard C. a Choe SANG-HUN. Kim Jong-nam Was Killed by VX Nerve Agent, Malaysians Say. *The New York Times*. **2017** [vid. 2018-04-19].
- [8] What are Novichok nerve agents? *BBC News*. **2018** [vid. 2020-06-11].
- [9] GORECKI, Lukas, Jan KORABECNY, Kamil MUSILEK, David MALINAK, Eugenie NEPOVIMOVA, Rafael DOLEŽAL, Daniel JUN, Ondrej 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.
- [10] MUSILEK, Kamil, Jan KORABECNY, Daniel JUN, Jiri KASSA a Kamil KUČA. Chapter 72 - Novel Cholinesterase Reactivators. In: Ramesh C. GUPTA, ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*. Boston: Academic Press, **2015** [vid. 2020-06-12], 1071–1087.
- [11] MALINAK, David, Jan KORABECNY, Ondrej SOUKUP, Lukas GORECKI, Eugenie NEPOVIMOVA, Miroslav PSOTKA, Rafael DOLEŽAL, Thuy NGUYEN, Eva MEZEIOVA, Kamil MUSILEK a Kamil KUČA. A review of the synthesis of quaternary acetylcholinesterase reactivators. *Current Organic Chemistry*. **2018**, 22, 1619–1648.
- [12] PURVES, Dale, George J. AUGUSTINE, David FITZPATRICK, Lawrence C. KATZ, Anthony-Samuel LAMANTIA, James O. MCNAMARA a S. Mark WILLIAMS. Acetylcholine. *Neuroscience. 2nd edition*. **2001** [vid. 2020-03-20].

- [13] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry*. 2. ed., rev.enl. Stuttgart: Thieme, **2005**. Flexibook.
- [14] TIWARI, Prashant, Shubhangi DWIVEDI, Mukesh Pratap SINGH, Rahul MISHRA a Anish CHANDY. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **2013**, 3(5), 413–420.
- [15] WESTFALL, T. C. Cholinergic Neurotransmission in the Autonomic and Somatic Motor Nervous System. In: Larry R. SQUIRE, ed. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press, **2009** [vid. 2020-03-20], 827–834.
- [16] KRAMER, Ijsbrand M. Chapter 4 - Cholinergic Signaling and Muscle Contraction. In: Ijsbrand M. KRAMER, ed. *Signal Transduction (Third Edition)*. Boston: Academic Press, **2016** [vid. 2020-03-24], 263–327.
- [17] BARCELOUX, DG. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants, and Venomous Animals*. **2008**
- [18] JAROMÍR MYSLIVEČEK. *Základy neurovědy*. 1. vydání. V Praze: Triton, **2003**.
- [19] LUKAS, Ronald J, Jean-Pierre CHANGEUX, Nicolas Le NOVÈRE, Edson X ALBUQUERQUE, David J K BALFOUR, Darwin K BERG, Daniel BERTRAND, Vincent A CHIAPPINELLI, Paul B S CLARKE, Allan C COLLINS, John A DANI, Sharon R GRADY, Kenneth J KELLAR, Jon M LINDSTROM, Michael J MARKS, Maryka QUIK, Palmer W TAYLOR a Susan WONNACOTT. International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. *Pharmacological Reviews*. **1999**, 51(2), 397–401.
- [20] MAĎA P.; FONTANA J. a kolektiv. Neurotransmisní systémy, Funkce buněk a lidského těla. 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze **2014** [vid. 2020-03-23].
- [21] POPE, Carey N. a Stephen BRIMIJOIN. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochemical Pharmacology*. **2018**, 153, Diamond Jubilee Special Issue: Celebrating 60 Years of Excellence, 205–216.
- [22] ČOLOVIĆ, Mirjana B, Danijela Z KRSTIĆ, Tamara D LAZAREVIĆ-PAŠTI, Aleksandra M BONDŽIĆ a Vesna M VASIĆ. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. **2013**, 11(3), 315–335.
- [23] WAISKOPF, Nir a Hermona SOREQ. Cholinesterase Inhibitors. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, **2015**, 761–778.
- [24] PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*. **2018**, 47(4), 215–228.

- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] MASSON, Patrick, Florian NACHON, Clarence A. BROOMFIELD, David E. LENZ, Laurent VERDIER, Lawrence M. SCHOPFER a Oksana LOCKRIDGE. A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chemico-Biological Interactions*. **2008**, 175(1), Proceedings of the IX International Meeting on Cholinesterases, 273–280.
- [28] MAIN, A. R. The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP, and parathion. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **1956**, 34(2), 197–216.
- [29] MASSON, Patrick. Chapter 75 - Catalytic Bioscavengers: The New Generation of Bioscavenger-Based Medical Countermeasures. In: Ramesh C. GUPTA, ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*. Boston: Academic Press, **2015** [vid. 2020-03-13], 1107–1123.
- [30] MASSON, Patrick a Daniel ROCHU. Catalytic Bioscavengers Against Toxic Esters, an Alternative Approach for Prophylaxis and Treatments of Poisonings. *Acta Naturae*. **2009**, 1(1), 68–79
- [31] ÇOKUĞRAŞ, A Neşe. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk J Biochem*. **2003**, 28 (2); 54-61.
- [32] MUSILEK, Kamil, Marketa KOMLOOVA, Ondrej HOLAS, Anna HOROVA, Miroslav POHANKA, Frank GUNN-MOORE, Vlastimil DOHNAL, Martin DOLEZAL a Kamil KUCA. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage-Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**, 19(2), 754–762.
- [33] MUSILEK, K., M. KOMLOOVA, O. HOLAS, A. HOROVA, M. POHANKA, F. GUNN-MOORE, V. DOHNAL, M. DOLEZAL, M. DOLEZAL a K. KUCA. Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage-Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2011**, 19(2), 754–762.
- [34] REBMANN, Terri, Bruce W. CLEMENTS, Jeffrey A. BAILEY a R. Gregory EVANS. Organophosphate Antidote Auto-Injectors vs. Traditional Administration: A Time Motion Study. *The Journal of Emergency Medicine*. **2009**, 37(2), 139–143.
- [35] MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Julien RENO, 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.

- [36] 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.
- [37] DE KONING, Martijn Constantijn, Gabriele HORN, Franz WOREK a Marco VAN GROL. Discovery of a potent non-oxime reactivator of nerve agent inhibited human acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2018**, 157, 151–160.
- [38] MARAKOVIĆ, Nikola, Anamarija KNEŽEVIĆ, Vladimir VINKOVIĆ, Zrinka KOVARIK a Goran ŠINKO. Design and synthesis of N-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. **2016**, 259, 122–132.
- [39] SAKURADA, Koichi, Kazuo MATSUBARA, Keiko SHIMIZU, Hiroshi SHIONO, Yasuo SETO, Koichiro TSUGE, Mineo YOSHINO, Ikuko SAKAI, Harutaka MUKOYAMA a Takehiko TAKATORI. Pralidoxime Iodide (2-PAM) Penetrates Across the Blood-Brain Barrier. *Neurochemical Research*. **2003**, 28(9), 1401–1407.
- [40] STERNER, Teresa R., Christopher D. RUARK, Tammie R. COVINGTON, Kyung O. YU a Jeffery M. GEARHART. A physiologically based pharmacokinetic model for the oxime TMB-4: simulation of rodent and human data. *Archives of Toxicology*. **2013**, 87(4), 661–680.
- [41] KOPLOVITZ, I. a J. R. STEWART. A comparison of the efficacy of HI6 and 2-PAM against soman, tabun, sarin, and VX in the rabbit. *Toxicology Letters*. **1994**, 70(3), 269–279.
- [42] WILSON, Irwin B. a Sara GINSBURG. Reactivation of alkylphosphate inhibited acetylcholinesterase by bis quaternary derivatives of 2-PAM and 4-PAM. *Biochemical Pharmacology*. **1959**, 1(3), 200–206.
- [43] INNS, R. H. a L. LEADBEATER. The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphonate poisoning in the guinea-pig. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1983**, 35(7), 427–433.
- [44] CABAL, Jiří, K. KUČA a J. KASSA. Specification of the Structure of Oximes Able to Reactivate Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **2004**, 95(2), 81–86.
- [45] CARLETTI, Eugénie, Nadine AURBEK, Emilie GILLON, Mélanie LOIODICE, Yvain NICOLET, Juan-Carlos FONTECILLA-CAMPS, Patrick MASSON, Horst THIERMANN, Florian NACHON a Franz WOREK. Structure–activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun. *Biochemical Journal*. **2009**, 421(1), 97–106.
- [46] WOREK, Franz, Nadine AURBEK, Marianne KOLLER, Christian BECKER, Peter EYER a Horst THIERMANN. Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochemical Pharmacology*. **2007**, 73(11), 1807–1817.

- [47] HOLAS, Ondrej, Kamil MUSILEK, Anna HOROVA, Veronika OPLETALOVA a Kamil KUCA. SAR Study on Reactivators of Ethyl-Paraoxon Inhibited Acetylcholinesterase. *Letters in Drug Design & Discovery*. **2012**, 9, 587–594.
- [48] MUSILEK, Kamil, Kamil KUCA, Daniel JUN, Vlastimil DOHNAL a Martin DOLEZAL. Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2006**, 16(3), 622–627.
- [49] MERCEY, Guillaume, Julien RENOU, Tristan VERDELET, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI, Emilie GILLON, Mélanie ARBOLÉAS, Mélanie LOIODICE, Florian NACHON, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD. Phenyltetrahydroisoquinoline–Pyridinaldoxime Conjugates as Efficient Uncharged Reactivators for the Dephosphylation of Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**, 55(23), 10791–10795
- [50] KUCA, Kamil, Jiří BIELAVSKÝ, Jiří CABAL a Marcela BIELAVSKÁ. Synthesis of a potential reactivator of acetylcholinesterase — 1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(carbamoylpyridinium) propane bromide. *Tetrahedron Letters*. **2003**, 44, 3123–3125.
- [51] KUČA, Kamil, Jiří BIELAVSKÝ, Jiří CABAL a Jiří KASSA. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2003**, 13(20), 3545–3547.
- [52] MUSILEK, Kamil, Daniel JUN, Jiri CABAL, Jiri KASSA, Frank GUNN-MOORE a Kamil KUCA. Design of a Potent Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase Synthesis and Evaluation of (E)-1-(4-Carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene Dibromide (K203). *Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**, 50(22), 5514–5518.
- [53] KARASOVA, Jana Zdarova, Jaroslav CHLADEK, Milos HROCH, Fusek JOSEF, Daniela HNIDKOVA a Kamil KUCA. 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.
- [54] KUCA, Kamil, Lucie MUSILOVA, Jiri PALECEK, Vladimir CIRKVA, Martin PAAR, Kamil MUSILEK, Martina HRABINOVA, Miroslav POHANKA, Jana Zdarova KARASOVA a Daniel JUN. Novel Bisquaternary Oximes—Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules*. **2009**, 14(12), 4915–4921.
- [55] MALINAK, David, Eugenie NEPOVIMOVA, Daniel JUN, Kamil MUSILEK a Kamil KUCA. Novel Group of AChE Reactivators—Synthesis, In Vitro Reactivation and Molecular Docking Study. *Molecules*. **2018**, 23(9), 2291.
- [56] KIM, Tae-Hyuk, Kamil KUCA, Daniel JUN a Young-Sik JUNG. Design and synthesis of new bis-pyridinium oxime reactivators for acetylcholinesterase

- inhibited by organophosphorous nerve agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**, 15(11), 2914–2917.
- [57] SAINT-ANDRÉ, Géraldine, Maria KLIACHYNA, Sanjeevarao KODEPELLY, Ludivine LOUISE-LERICHE, Emilie GILLON, Pierre-Yves RENARD, Florian NACHON, Rachid BAATI a Alain WAGNER. Design, synthesis and evaluation of new  $\alpha$ -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron*. **2011**, 67(34), 6352–6361.
- [58] LEE, Hyun Myung, Jin Soo SHIN, Soo Bong HAN, Yu Kyoung JUNG, Meeheyin KIM, Sang-Ho LEE, Gyeunghaeng HUR a Young-Sik JUNG. Reactivation of Paraoxon-inhibited Acetylcholinesterase by Monoquaternary Pyridinium Oximes with N-Alkylbromide Side Chains. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **2016**, 37(1), 64–68.
- [59] DE KONING, Martijn, Marloes JOOSEN, Daan NOORT, A ZUYLEN a M.C. TROMP. Peripheral site ligand–oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Bioorganic & medicinal chemistry*. **2011**, 19, 588–94.
- [60] HOFMANOVA T. *Syntéza nových halogen-4-pyridinaldoximových biskvarterních solí jako potenciálních reaktivátorů butyrylcholinesterasy*. Hradec Králové, **2020**. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta. Katedra chemie.
- [61] PRCHALOVÁ E. *Příprava nových typů reaktivátorů butyrylcholinesterasy*. Hradec Králové, **2018**. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta. Katedra chemie.