

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Ústav organické chemie a technologie

**SYNTÉZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH
CHIRÁLNÍCH DIAMIDŮ NA BÁZI 1-(6-
FLUORBENZTHIAZOL-2-YL)ETHANAMINU**

Bc. Barbora Svobodová

Diplomová práce

2017

THE UNIVERSITY OF PARDUBICE

Faculty of chemical technology

Department of organic chemistry and technology

**SYNTHESIS OF BIOLOGICAL ACTIVE DIAMIDES
BASED ON 1-(6-FLUOROBENZOTHAZOLE-2-
YL)ETHANAMINE**

Bc. Barbora Svobodová

Thesis

2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 6.5. 2017

Barbora Svobodová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Ing. Vladimíru Pejchalovi, Dr., vedoucímu mé diplomové práce za jeho cenné rady, připomínky a důležité pokyny při vypracování této práce. Dále paní Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za pomoc při testování připravených diamidů. Mému příteli Ondrovi za velkou podporu při studiu. Největší poděkování však patří mým rodičům, kteří mě vždy podporovali a umožnili mi studium na vysoké škole.

ANOTACE

Tématem diplomové práce je syntéza biologicky aktivních chirálních diamidů na bázi 1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)ethanaminu. Byla provedena literární rešerše s cílem nalézt vhodné postupy přípravy chirálních diamidů obsahující benzthiazolový blok a kyselinu 4-aminobenzoovou.

Na základě této rešerše bylo v experimentální části vybranou modifikovanou metodou připraveno dvanáct nových sloučenin. Připravené diamidy byly charakterizovány bodem tání a NMR spektrometrií. Agarovou mikrodiluční metodou u nich byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pro bakterie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*.

KLÍČOVÁ SLOVA

alanin, benzthiazol, diamid, fosgen, benzoylchlorid, para-aminobenzoová kyselina

TITLE: Synthesis of biological active diamides based on 1-(6-fluorobenzothiazole-2-yl)ethanamine.

ANNOTATION

The topic of this thesis is the synthesis of biological active diamides based on 1-(6-fluorobenzothiazole-2-yl)ethanamine. Literature search was conducted to find a suitable procedures for the preparation of chiral diamides containing benzothiazole block and an 4aminobenzoic acid.

On the basis of this research was the experimental section selected by a modified method in new twelve compounds. Prepared diamides were characterized by melting point and NMR spectrometry. As an indication, they was determined a minimum inhibitory concentration against bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* genus by using agar's microdilution method.

KEY WORDS

alanine, benzothiazole, diamide, phosgene, benzoyl chloride, para-aminobenzoic acid

Seznam použitých zkratek

NMR - Nukleární magnetická resonance

THF - Tetrahydrofuran

DMF – Dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

PTS- p-toluensulfonová kyselina

MIC – minimální inhibiční koncentrace

TOL- toluen

L-Ala NCA- L-Alanin*N*-karboxyanhydrid

NK – negativní kontrola

PK – pozitivní kontrola

AMP – ampicilin

SULF. – sulfomethoxazol

BTA – benzthiazoly

MIC – minimální inhibiční koncentrace

CCM – česká sbírka mikroorganismů

Seznam obrázků, schémat a tabulek

Obrázek 1: Rozdělení amidů podle substituce na amidickém dusíku.

Obrázek 2: Rozdělení amidů podle povahy substituentů.

Obrázek 3: Rezonanční stabilizace konjugované báze amidu.

Obrázek 4: Vznik vodíkové vazby s molekulou vody.

Obrázek 5: Močovina.

Obrázek 6: Barbituráty.

Obrázek 7: ϵ -kaprolaktam.

Obrázek 8: Paracetamol.

Obrázek 9: Využití derivátů benzthiazolů.

Obrázek 10: Struktura N-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-acetamidu.

Obrázek 11: Struktura 2-[4-(4-substituovaných benzamido/ fenylacetamido/ 3-fenylpropionamido) benzyl/ feny] benzthiazolů.

Obrázek 12: Struktura N-(6-chlor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamidu.

Obrázek 13: Struktura léčiva Glibenclamidu.

Obrázek 14: Struktura 6-substituovaného-1,3-benzthiazol-2-aminu.

Obrázek 15: Struktura 2-chlor-N-(6-substituovaných benzthiazol-2-yl)acetamidů.

Obrázek 16: Obecná struktura diamidů obsahující 4-aminobenzoovou kyselinu a benzthiazolový blok.

Obrázek 17: Staphylococcus aureus.

Obrázek 18: Escherichia coli.

Obrázek 19: Pseudomonas aeruginosa.

Obrázek 20: Enterococcus faecalis.

Obrázek 21: Disková difúzní metoda.

Obrázek 22: E-test.

Obrázek 23: Schéma mikrodiluční destičky

Obrázek 24: Obecná struktura diamidů na bázi benzthiazolů a kyseliny 4-aminobenzoové.

Obrázek 25: Mikrotitrační destička.

Obrázek 26: Model mikrotitrační destičky a její rozdělení.

Obrázek 27: Názorný popis rozpipetování mikrotitrační destičky.

Obrázek 28: ^1H NMR spektrum sloučeniny 2-methyl-*N*-(4-[(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl)fenyl)benzamid.

Obrázek 29: ^{13}C NMR spektrum sloučeniny 2-methyl-*N*-(4-[(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl)fenyl)benzamid.

Schéma 1: Hydrolýza amidů.

Schéma 2: Reakce amidů s kyselinou dusitou.

Schéma 3: Redukce amidu.

Schéma 4: Hofmannovo odbourávání amidů.

Schéma 5: Příprava amidů z kyselin.

Schéma 6: Příprava amidů z funkčních derivátů kyselin.

Schéma 7: Příprava amidů z nitrilů.

Schéma 8: Beckmannův přesmyk.

Schéma 9: Příprava benzthiazolových derivátů.

Schéma 10: Dekarboxylační redox cyklizace.

Schéma 11: Intramolekulární cyklizace.

Schéma 12: Příprava 2-aminobenzthiazolů.

Schéma 13: Příprava 2-aminobenzthiazolů.

Schéma 14: Příprava (4*R*)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionu.

Schéma 15: Příprava 2-aminofenylthiolátu draselného.

Schéma 16: Příprava (1*R*)-1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-hydrochloridu.

Schéma 17: Příprava (1*R*)-1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-*p*-toluensulfonátu.

Schéma 18: Syntéza *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-acetamidu.

Schéma 19: Syntéza 2-[4-(4-substituovaných benzamido/ fenylacetamido/ 3-fenylpropionamido) benzyl/ fenyl] benzthiazolů.

Schéma 20: Obecná syntéza substituovaných benzamidů na bázi benzthiazolů.

Schéma 21: Syntéza 1 - [(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-substituovaných fenyl diamidů.

Schéma 22: Syntéza *N*-(6-chlor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamidu.

Schéma 23: Syntéza 2-chlor-*N*-(6-substituovaných benzthiazol-2-yl)acetamidů.

Schéma 24: Syntéza *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-fenylpiperazin-1-yl)acetamidu.

Schéma 25: Příprava substituovaných-[(benzoyl)amino]benzoových kyselin.

Schéma 26: Příprava substituovaných-[(benzoyl)amino]benzoylchloridů.

Schéma 27: Příprava konečného produktu.

Tabulka 1: Přehled referenčních kmenů použitých pro testování antibakteriálních účinků diamidů na bázi benzhiazolů.

Tabulka 2: Přehled testovaných diiamidů

Tabulka 3: Ředící řada Ampicilinu.

Tabulka 4: Ředící řada Sulfomethoxazolu.

Tabulka 5: MIC Antibiotik.

Tabulka 6: MIC testovaných diamidů.

Obsah

1 ÚVOD	15
2 TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 Amidy	16
2.1.1 Obecná charakteristika amidů	16
2.1.2 Fyzikální vlastnosti amidů	17
2.1.3 Chemické vlastnosti amidů	18
2.1.4 Příprava amidů	21
2.2 Benzthiazoly	23
2.2.1 Obecná charakteristika benzthiazolů	23
2.2.2 Využití benzthiazolů	23
2.2.3 Příprava benzthiazolových derivátů	25
2.2.3.1 Příprava 2-substituovaných benzthiazolů	25
2.2.3.2 Příprava 2-aminobenzthiazolů	26
2.2.3.3 Příprava chirálních substituovaných benzthiazolethanaminů	27
2.3 Syntéza a biologické vlastnosti amidů na bázi benzthiazolů	29
2.3.1 Amidy na bázi benzthiazolů s protirakovinnými účinky	29
2.3.2 Amidy na bázi benzthiazolů s antimikrobiálními účinky	30
2.3.3 Diamidy na bázi benzthiazolů s antifungálními účinky	33
2.3.4 Amidy na bázi benzthiazolů s antidiabetickými účinky	35
2.3.5 Amidy na bázi benzthiazolů s protizánětlivými účinky	37
2.4 Syntéza diamidů obsahující kyselinu 4-aminobenzoovou a benzthiazolový blok	39
2.5 Bakterie	40
2.5.1 Obecná charakteristika bakterií	40
2.5.2 Staphylococcus aureus	42
2.5.2 Escherichia coli	43
2.5.3 Pseudomonas aeruginosa	44
2.5.4 Enterococcus faecalis	45
2.6 Metody stanovení antimikrobiální aktivity	46

2.6.1	Difúzní metody	46
2.6.2	Diluční metody	48
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
3.1	Komerčně dostupná chemická činidla	50
3.2	Charakteristika výchozích látek	51
3.2.1	(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin 4-toluensulfonát	51
3.2.2	(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin 4-toluensulfonát	52
3.3	Syntéza diamidů obsahující kyselinu 4-aminobenzoovou a benzthiazolový blok	53
3.3.1	Příprava 4-[(4-substituovanýchbenzoyl)amino]benzoových kyselin	53
3.3.1.1	Příprava 4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoové kyseliny	53
3.3.1.2	Příprava 4-[(4-methoxybenzoyl)amino]benzoové kyseliny	54
3.3.1.3	Příprava 4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoové kyseliny	55
3.3.1.4	Příprava 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoové kyseliny	56
3.3.1.5	Příprava 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoové kyseliny	57
3.3.1.6	Příprava 4-(benzoylamino)benzoové kyseliny	58
3.3.2	Příprava 4-[(4-substituovanýchbenzoyl)amino]benzoylchloridů	59
3.3.2.1	Příprava 4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoylchloridu	59
3.3.2.2	Příprava 4-[(4-methoxybenzoyl)amino]benzoylchloridu	60
3.3.2.3	Příprava 4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoylchloridu	61
3.3.2.4	Příprava 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoylchloridu	62
3.3.2.5	Příprava 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoylchloridu	63
3.3.2.6	Příprava 4-(benzoylamino)benzoylchloridu	64
3.3.3	Příprava výsledných diamidů	65
3.3.3.1	Příprava 4-metyl-N-(4-[[[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	65
3.3.3.2	Příprava 4-metyl-N-(4-[[[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	66
3.3.3.3	Příprava 4-metoxymetyl-N-(4-[[[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	67
3.3.3.4	Příprava 4-metoxymetyl-N-(4-[[[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	68
3.3.3.5	Příprava 2-metyl-N-(4-[[[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	69
3.3.3.6	Příprava 2-metyl-N-(4-[[[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	70
3.3.3.7	Příprava 4-chlor-N-(4-[[[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]benzamidu	71
3.3.3.8	Příprava 4-chlor-N-(4-[[[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]-3-nitrobenzamidu	72
3.3.3.9	Příprava 4-chlor-N-(4-[[[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]-3-nitrobenzamidu	73

3.3.3.10 Příprava 4-chlor- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid	74
3.3.3.11 Příprava 4-(benzoylamino)- <i>N</i> -{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}benzamid	75
3.3.3.12 Příprava 4-(benzoylamino)- <i>N</i> -{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}benzamid	76
3.4 Metody charakterizace	77
3.5 Charakterizace 4-{{substituovanýchbenzoyl}amino}benzoových kyselin	78
3.5.1 4-{{(4-metylbenzoyl)amino}benzoová kyselina	78
3.5.3 4-{{(2-metylbenzoyl)amino}benzoová kyselina	80
3.5.4 4-{{(4-chlorbenzoyl)amino}benzoová kyselina	81
3.5.5 4-{{(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino}benzoová kyselina	82
3.5.6 4-{{fenylbenzoyl}benzoová kyselina	83
3.6 Charakterizace 4-{{substituovanýchbenzoyl}amino}benzoylchloridů	84
3.6.1 4-{{(4-metylbenzoyl)amino}benzoylchlorid	84
3.6.4 4-{{(4-chlorbenzoyl)amino}benzoylchlorid	87
3.6.5 4-{{(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino}benzoylchlorid	88
3.6.6 4-{{benzoylamino}benzoylchlorid	89
3.7 Charakterizace výsledných diamidů	90
3.7.1 4-metyl- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	90
3.7.2 4-metyl- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	91
3.7.3 4-metoxy- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	92
3.7.4 4-metoxy- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	93
3.7.5 2-metyl- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	94
3.7.6 2-metyl- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	95
3.7.7 4-chlor- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	96
3.7.8 4-chlor- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	97
3.7.9 4-chlor- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid	98
3.7.10 4-chlor- <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid	99
3.7.11 <i>N</i> -(4-{{(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	100
3.7.12 <i>N</i> -(4-{{(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl}karbamoyl}fenyl)benzamid	101
3.8 Antimikrobiální testování	102
3.8.1 Bakteriální kmeny	102
3.8.2 Testované látky	103
3.8.3 Kultivační média	104
3.8.4 Reagencia	105
3.8.5 Chemikálie	106

3.8.6	Bakteriální kultury	106
3.8.7	Pomůcky a přístroje	106
3.9	Pracovní postup	107
3.9.1	Příprava bakteriální suspenze	107
3.9.2	Příprava zásobních roztoků antibiotik a diamidů	107
3.9.3	Příprava ředící řady jednotlivých látek	108
3.9.3.1	Příprava ředící řady antibiotik	108
3.9.3.2	Příprava ředící řady diamidů	109
3.10	Mikrodiluční metoda v bujónu	109
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	112
4.2	Příprava chloridů	113
4.3	Příprava výchozích diamidů	114
4.4	NMR analýza	116
4.5	Stanovení antibakteriální aktivity	119
5	ZÁVĚR	122
6	POUŽITÁ LITERATURA	123

1 Úvod

Substituované benzthiazoly jsou heterocyklické systémy, jež vykazují širokou škálu významných biologických vlastností. Mezi nejdůležitější látky tohoto typu patří benzthiazoly substituované v poloze 2. Tato substituce byla prokázána jako nejvhodnější z hlediska ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností těchto sloučenin. Biologická aktivita zmíněných látek zahrnuje především antibakteriální, antifungální či protinádorový účinek. Benzthiazoly a benzoxazoly se také projevují jako účinné inhibitory různých enzymů, jako jsou 5-lipoxygenázy, cyklooxygenázy, aldosy a aldehyd reduktázy, serin hydrolázy nebo inhibitory trombinu, známého jako koagulační faktor II (F2).

V posledních několika letech bylo prokázáno, že benzthiazoly a jejich deriváty jsou účinné proti gram-negativním i gram-positivním bakteriím (např. *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* atd.) a kvasinkám rodu *Candida*. Právě zvýšený výskyt onemocnění způsobený těmito kvasinkami se stává závažným, a to především kvůli nárůstu pacientů, jež mají poškozené přirozené obranné mechanismy (HIV, leukemie, pacienti, kteří podstoupili radioterapii, chemoterapii, transplantaci atd.). Z obecného hlediska lze tedy říci, že benzthiazoly mohou být použity jako unikátní a všestranné látky pro experimentální přípravu léků.

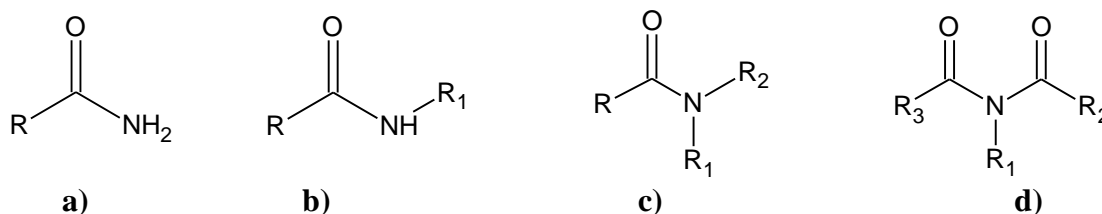
Cílem této diplomové práce bylo připravit další řadu nových sloučenin a provést orientační testování jejich antimikrobiálních aktivit vůči bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

2 Teoretická část

2.1 Amidy

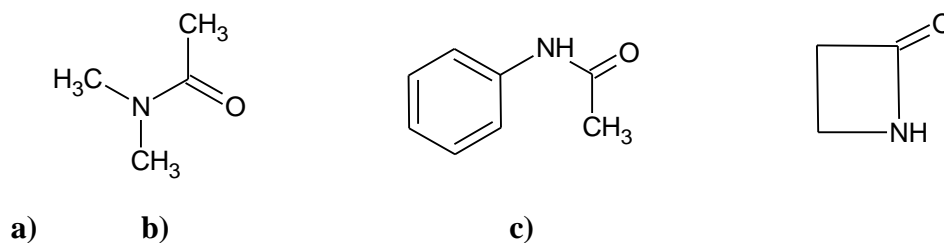
2.1.1 Obecná charakteristika amidů

Amidy patří mezi funkční deriváty karboxylových kyselin odvozené nahrazením hydroxylové skupiny v karboxylu skupinou NR_2 ($\text{R} = \text{H}$, alkyl, aryl, atd.). Podle substituce na amidickém dusíku dělíme amidy na primární ($-\text{CONH}_2$) (**Obrázek 1a**), sekundární ($-\text{CONH}-$) (**Obrázek 1b**) a terciární ($-\text{CON}<$) (**Obrázek 1c**). Pokud jsou na dusíku dvě karbonylové skupiny, jedná se o imidy (**Obrázek 1d**)[1].



Obrázek 1: Rozdělení amidů podle substituce na amidickém dusíku.

Dále lze amidy klasifikovat podle povahy substituentů a celkové struktury na alifatické (**Obrázek 2a**), aromatické například anilidy, benzamidy (**Obrázek 2b**) a cyklické-laktamy (**Obrázek 2c**). Alifatické amidy mají jednoduché uhlovodíkové substituenty (alkylové skupiny), zatímco aromatické amidy zahrnují ve své molekule alespoň jeden aromatický kruh. Sloučeniny obsahující amidovou skupinu jako součást cyklu se nazývají laktamy nebo také vnitřní amidy [1].



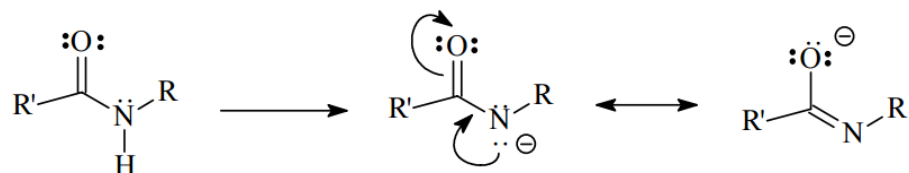
Obrázek 2: Rozdělení amidů podle povahy substituentů.

2.1.2 Fyzikální vlastnosti amidů

Hlavní fyzikální vlastnosti amidů lze rozdělit do následujících kategorií.

1) Zásaditost

Amidy mohou vystupovat jako slabé kyseliny i báze. Kyselost vodíku na dusíku je dána možností rezonanční stabilizace vznikajícího aniontu (**Obrázek 3**). Hodnoty pKa amidů se pohybují přibližně mezi 16-17.

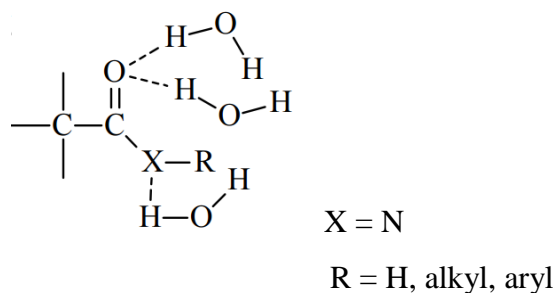


Obrázek 3: Resonanční stabilizace konjugované báze amidu.

V silně kyselém prostředí koncentrovaných minerálních kyselin může u amidů docházet k protonaci na kyslíku. Preference protonace kyslíku nad dusíkem opět vyplývá z možnosti rezonanční stabilizace kationtu. Hodnoty pKa konjugovaných kyselin amidů leží v rozmezí -0,5 až -1,5.

2) Rozpustnost

Primární a sekundární amidy jsou rozpustné ve vodě a v protických rozpouštědlech díky možnosti vytvářet s těmito látkami vodíkové vazby (**Obrázek 4**). U terciárních amidů, jež nemají žádný vodíkový atom, je rozpustnost daleko nižší.



Obrázek 4: Vznik vodíkové vazby s molekulou vody.

3) Bod tání, bod varu

Amidy jsou většinou krystalické látky s charakteristickými body tání. Výjimku tvoří metanamid, který je při laboratorní teplotě kapalný s bodem tání 3 °C. Ve srovnání s ostatními deriváty karboxylových kyselin mají amidy nejvyšší body varu. Příčinou takto vysokého bodu varu u primárních amidů a *N*-alkylamidů jsou opět vodíkové můstky. Oproti tomu u *N,N*-dialkylamidů, které vodíkové můstky nevytvářejí, je bod varu nejnižší [2].

2.1.3 Chemické vlastnosti amidů

Mezi nejdůležitější reakce amidů patří hydrolýza a redukce. Hydrolýza může být katalyzována jak kyselé, tak i bazické. V případě kyselých hydrolýzy reaguje konjugovaná kyselina amidu s vodou a vznikající intermediát odštěpuje amoniak, respektive amin za vzniku karboxylové kyseliny. V prostředí alkalického hydroxidu je prvním krokem hydrolýzy adice hydroxidového iontu na karbonylovou skupinu. Vzniklý intermediát se pak za asistence vody rozpadá na sůl karboxylové kyseliny a amoniak nebo amin (**Schéma 1**) [3].

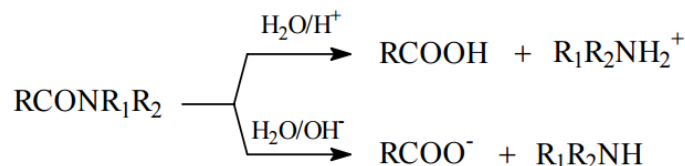


Schéma 1: Hydrolýza amidů.

V případech, kdy klasická hydrolýza amidů probíhá obtížně, se využívá reakce primárních a sekundárních amidů s kyselinou dusitou. Elektrofil v podobě nitrosoniového kationtu se generuje přímo z reakční směsi z alkalického dusitanu a silné minerální kyseliny. Primární amidy poskytují jako konečný produkt karboxylovou kyselinu a plynný dusík. Sekundární amidy dávají N-nitrosoamidy (**Schéma 2**).

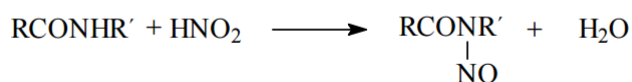
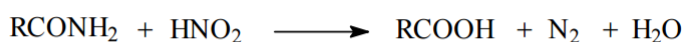


Schéma 2: Reakce amidů s kyselinou dusitou.

Amidy lze redukovat působením LiAlH_4 na odpovídající aminy, dochází přitom k redukcí karbonylové skupiny amidu na skupinu CH_2 (**Schéma 3**).

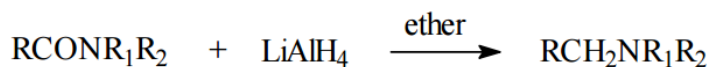


Schéma 3: Redukce amidu.

Mezi další důležitou reakci primárních amidů (sekundární a terciární amidy takto nereagují) patří Hofmannovo odbourávání, při němž v prvním kroku dochází k substituci vodíku halogenem na dusíku. Vzniklý N-halogenamid se v bazickém prostředí dále přesmykuje na isokyanát a ten se hydrolyzuje až na amin (**Schéma 4**). Reakce je také vhodná pro přípravu některých aminokyselin[4].

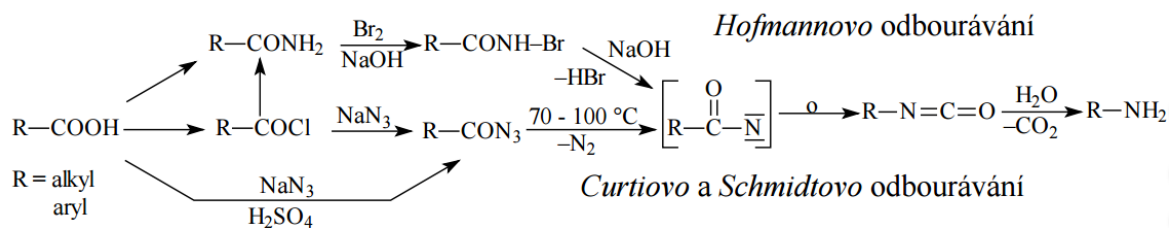
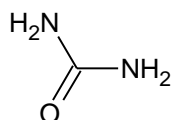
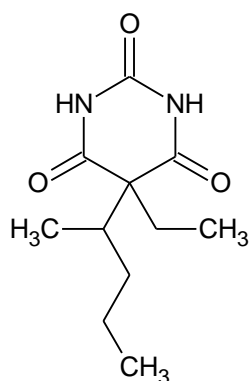


Schéma 4: Hofmannovo odbourávání amidů.

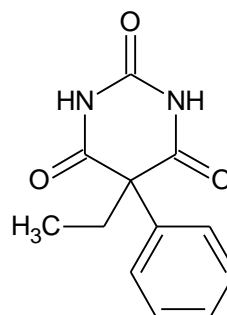
K biologicky významným amidům kyseliny uhličité lze zařadit močovinu (**Obrázek 5**), která je konečným produktem metabolismu proteinů u savců. Jako velmi významné cyklické amidy lze zmínit deriváty od kyseliny barbiturové, které mají důležité zastoupení ve farmaceutickém průmyslu jako sedativa, hypnotika či narkotika. Jako příklad lze uvést fenobarbital a pentobarbital (**Obrázky 6**) [2].



Obrázek 5: Močovina.



Pentobarbital



Fenobarbital

Obrázek 6: Barbituráty.

2.1.4 Příprava amidů

Amidy lze připravovat z kyselin či z jejich funkčních derivátů. Nejběžnější způsob přípravy amidů z kyselin je převedení kyseliny na sůl s amoniakem, nebo primárním či sekundárním aminem, která se pak podrobí tepelnému rozkladu. Teploty se pohybují kolem 200°C (Schéma 5).

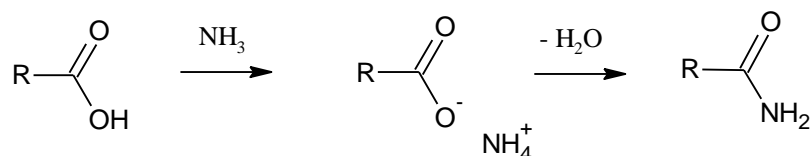


Schéma 5: Příprava amidů z kyselin.

V případě reakce aminů s reaktivními halogenidy je nutné reakční směs chladit. Anhydridy reagují při laboratorní teplotě, u esterů se jejich aminolýza provádí za zvýšené teploty (Schéma 6). Cyklické anhydridy poskytují odpovídající imidy. Z nitrilů lze připravit amidy, buď kyselé, nebo bazicky katalyzovanou adicí vody na trojnou vazbu (Schéma 7) [5].

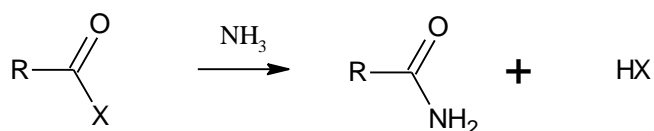


Schéma 6: Příprava amidů z funkčních derivátů kyselin.

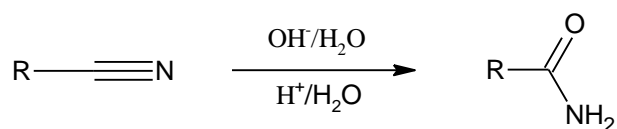


Schéma 7: Příprava amidů z nitrilů.

Jako další vhodné výchozí látky pro přípravu amidů mohou sloužit keteny nebo oximy. V případě ketenů dochází snadno k jejich reakci s amoniakem, primárním respektive sekundárním aminem za vzniku příslušného amidu. Oximy v kyselém prostředí podléhají Beckmannovu přesmyku (**Schéma 8**). Tento přesmyk je zvláště výhodný u symetricky substituovaných a cyklických oximů, protože zde může vznikat pouze jeden produkt a to amid nebo laktam. Jako příklad lze uvést ϵ -kaprolaktam (**Obrázek 7**), který se průmyslově využívá k výrobě silonu. Beckmannovým přesmykem dochází také k výrobě antipyretika Paracetamolu (**Obrázek 8**) [5].

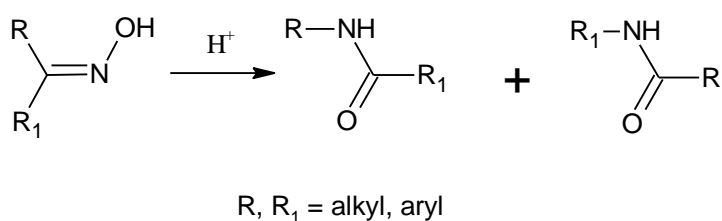
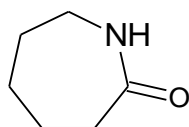
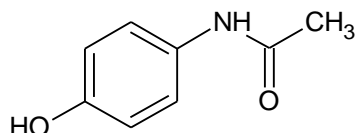


Schéma 8: Beckmannův přesmyk.



Obrázek 7: ϵ -kaprolaktam.



Obrázek 8: Paracetamol.

2.2 Benzthiazoly

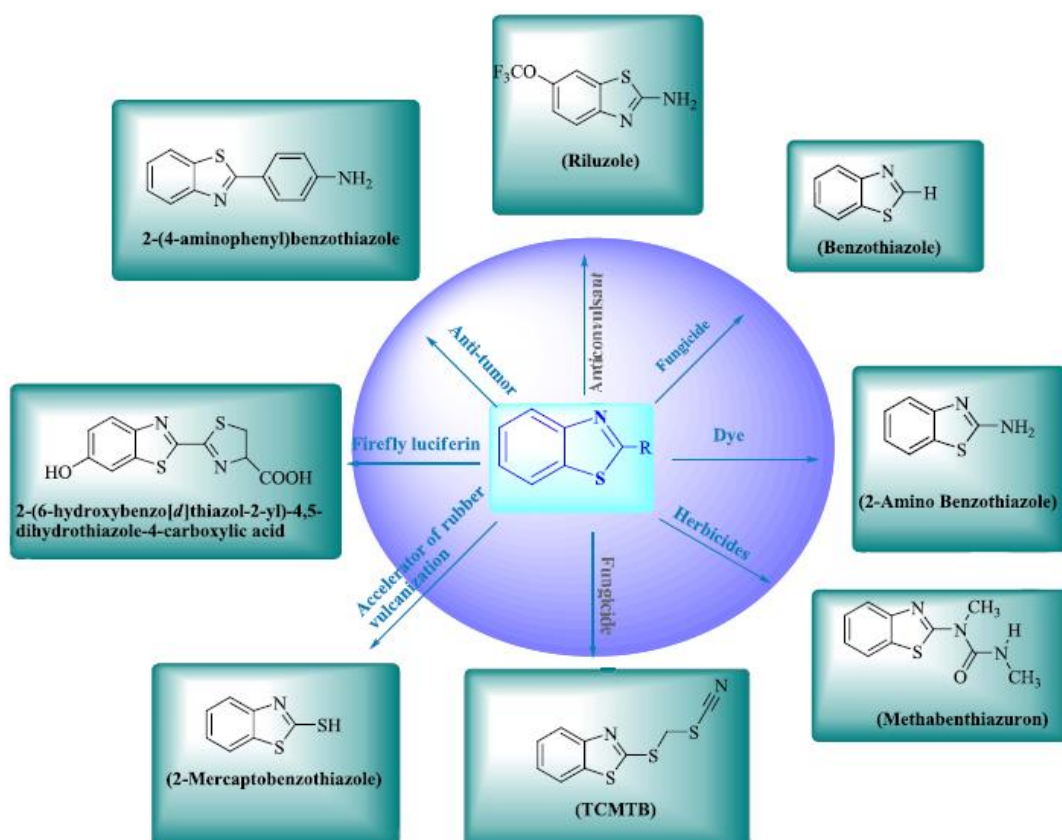
2.2.1 Obecná charakteristika benzthiazolů

Benzthiazoly (BTA) patří mezi aromatické heterocyklické sloučeniny s molekulovým vzorcem C_7H_5NS [6]. Jejich struktura vykazuje přirozenou afinitu k různým biologickým receptorům, proto jejich molekula představuje ideální zdroj fragmentu, který se využívá jako základ pro návrh a syntézu cílových biologicky aktivních derivátů [7]. Tyto deriváty vykazují protinádorový [8], antimikrobiální [9], antispasmolytické [10], antivirový [11], tuberkulostatický [12], antimalarický [13], analgetický [14], antidiabetický [15] a antifungicidní [16] účinek. Mezi nejdůležitější biologicky aktivní látky této skupiny patří deriváty substituované v poloze 2 [17].

Benzthiazolový skelet lze nalézt i jako součást přírodní látek. Světlušky disponují biologicky aktivními pigmenty takzvanými Luciferiny, které jsou schopné emitovat energii v podobě světla. Dále benzthiazoly tvoří součást aromatických složek vyskytující se v čajových lístcích nebo brusinkách. Dokonce mohou být jejich struktury vyrobeny houbami *Aspergillus clavatus* a *Polyporus frondosus* [18, 19].

2.2.2 Využití benzthiazolů

Benzthiazolové deriváty nacházejí uplatnění v různých odvětvích chemického průmyslu např. v polymerní chemii [20,21], barvářství [22,23], léčivech [24] atd. V poslední době byly BTA deriváty vyhodnoceny jako potenciální amyloidy vázající diagnostická činidla u neurodegenerativních onemocnění [25,26], selektivní inhibitory hydrolás amidů mastných kyselin [27], inhibitory stearylkoenzymu D-9 desaturázy [28], antagonisté LTD4 receptoru [29] a histaminu [30]. Jsou také užitečné jako omezovače chuti k jídlu, při redukci hmotnosti [31]. Dále tvoří meziprodukty při výrobě barviv [32], zobrazovacích činidel pro β -amyloidní plaky a fotografických senzibilizátorů [33]. 2-substituované deriváty BTA tvoří velkou skupinu cizorodých látek, které jsou vyráběny po celém světě pro nejrůznější aplikace, jak je znázorněno na **Obrázku 9** [34].



Obrázek 9: Využití derivátů benzthiazolů.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414009878>

Nesubstituovaný benzthiazol vykazuje fungicidní účinek[35]. Metabenzthiazuron se využívá jako herbicid a prodává se pod obchodním názvem Tribunil a Ormet [36]. 2-aminobenzthiazol se používá při výrobě některých disperzních azobarviv [37]. Riluzol (2-amino-6-trifluormethoxybenzthiazol) se prodává pod názvem Rhone-Poulenc (Rilutek) a využívá se pro léčení amyotrofické laterální sklerózy [38]. 2-(4-aminofenyl)benzthiazol vykazuje protinádorové účinky [39]. BTA deriváty katalyzují tvorbu sulfidové vazby (zesíťování) mezi nenasycenými elastomerními polymery za účelem získání pružného a elasticky zesíťovaného materiálu. Příkladem je 2-merkaptobenzthiazol (MBT / BTSH), který se používá jako akcelerátor při vulkanizaci gumy (např. výrobapneumatik) [40]. Mezi hlavní cíle BTA syntéz patří nejen rozvoj více různorodých a komplexních bioaktivních sloučenin, ale také jejich využití pro další aplikace, jako je výroba již zmíněných barviv. Proto syntézy derivátů těchto sloučenin získávají čím dál více pozornosti ze strany organických chemiků a biologů.

2.2.3 Příprava benzthiazolových derivátů

2.2.3.1 Příprava 2-substituovaných benzthiazolů

Nejjednodušší příprava benzthiazolových derivátů spočívá v reakci 2-aminothiofenolů se substituovanými nitrily, aldehydy, karboxylovými kyselinami, chloridy nebo estery. Jako katalyzátor se nejčastěji používá *N,N*-dimethylformamid (**Schéma 9**) [41].

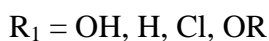
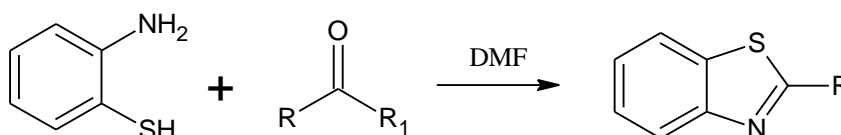


Schéma 9: Příprava benzthiazolových derivátů.

Jako další způsoby příprav BTA derivátů lze uvést např. dekarboxylační redox cyklizace umožňující syntézu 2-substituovaných benzthiazolů z *o*-chlornitrobenzenů a aryloctových kyselin v přítomnosti elementární síry a *N*-methylmorfolinu bez přítomnosti rozpouštědla (**Schéma 10**) [42].

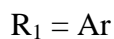
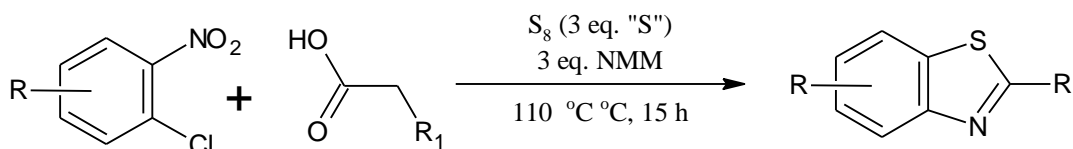
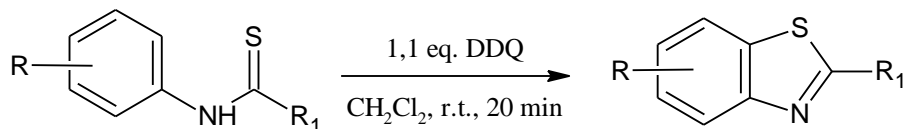


Schéma 10: Dekarboxylační redox cyklizace.

Intramolekulární cyklizaci N-substituovaných-fenyl-aryl-karbothioamidů s 2,6-dichlor-3,5-dikyan-1,4-benzochinonu (DDQ) v dichlormetanu při laboratorní teplotě lze získat různé benzthiazoly s vysokými výtěžky (**Schéma 11**) [43].



$R_1 = \text{Ar}$

Schéma 11: Intramolekulární cyklizace.

2.2.3.2 Příprava 2-aminobenzthiazolů

2-aminobenzthiazoly, jakožto molekuly vykazující celou řadu biologických aktivit, lze připravit následujícími způsoby. V obou případech je výchozí látkou substituovaný anilin, který v první reakci reaguje s thiokyanatanem draselným v ledové kyselině octové. Produkt této reakce reaguje dále s kapalným brómem za vzniku substituovaného 2-aminobenzthiazolu (**Schéma 12**) [44]. Ve druhém případě reaguje stejná výchozí látka s thioyanatanem amonným v kombinaci s bromdimetylsulfonium bromidem (BDSM) na konečný produkt (**Schéma 13**) [45].

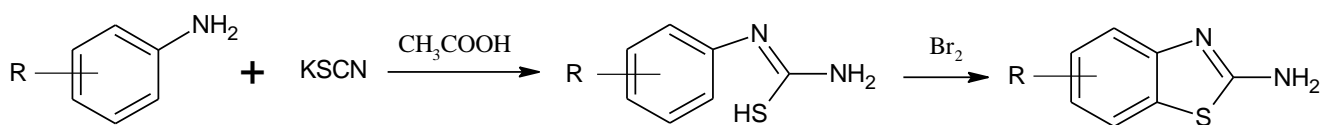


Schéma 12: Příprava 2-aminobenzthiazolů.

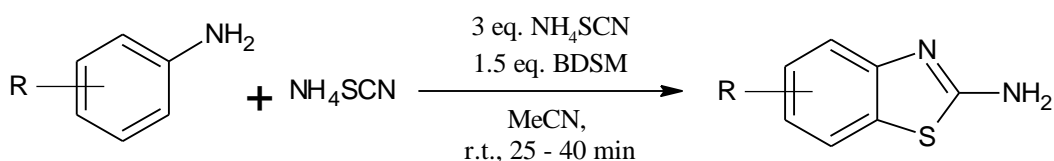


Schéma 13: Příprava 2-aminobenzthiazolů.

2.2.3.3 Příprava chirálních substituovaných benzthiazolethanaminů

Substituované benzthiazolethanaminy se připravují ve formě stabilní hydrochloridové či p-toluensulfonové soli. V prvním reakčním stupni reaguje opticky čistý alanin s fosgenem v tetrahydrofuranu za vzniku opticky čistého 4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionu (**Schéma 14**). Dalším krokem je příprava substituovaného 2-aminofenylthiolátu draselného. Ten se získá reakcí 2-aminobenzthiazolu s vodným roztokem hydroxidu draselného (**Schéma 15**). V dalším reakčním stupni reaguje 2-aminofenylthiolát draselný s 4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionem za vznik substituovaného opticky čistého 1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-hydrochloridu (**Schéma 16**). Hydrochloridovou sůl lze převést reakcí s p-toluensulfonovou kyselinou na 1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-p-toluensulfonát (**Schéma 17**). Tímto způsobem lze připravit i jiné enantiomerní 1-(1,3-benzthiazol-2-yl)-2-alkyl-1-aminy, kde je možno jako výchozí aminokyselinu použít valin, leucin nebo fenylalanin [46].

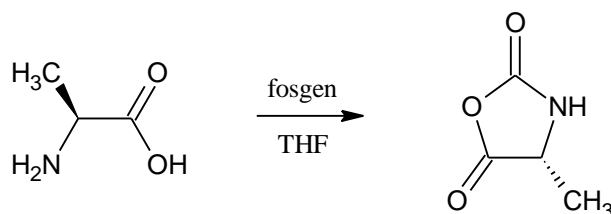


Schéma 14: Příprava (4R)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionu.

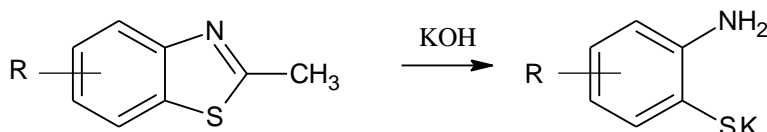


Schéma 15: Příprava 2-aminofenylthiolátu draselného.

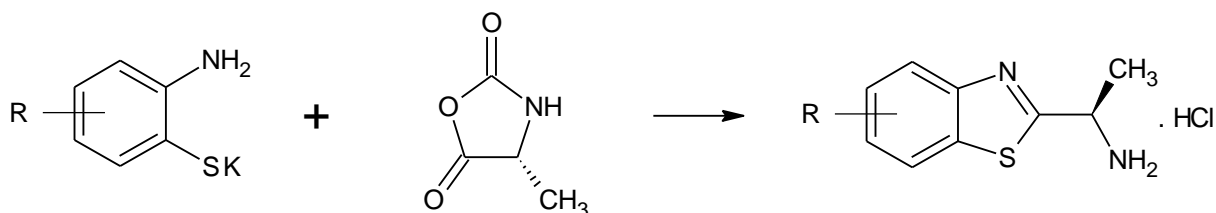


Schéma 16: Příprava (1*R*)-1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-hydrochloridu.

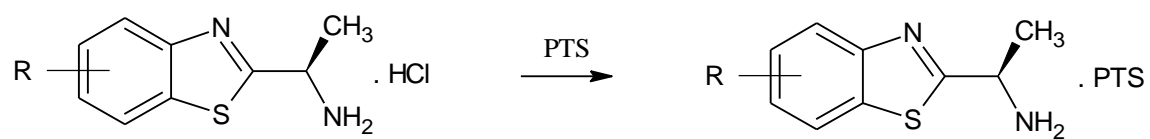


Schéma 17: Příprava (1*R*)-1-(1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin-p-toluensulfonátu.

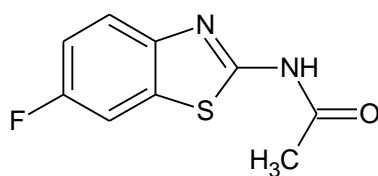
2.3 Syntéza a biologické vlastnosti amidů na bázi benzthiazolů

Jak již bylo uvedeno, benzthiazolové deriváty vykazují celou řadu biologických aktivit. Níže je uveden stručný přehled amidů na bázi benzthiazolů, zahrnující popis syntéz několika vybraných zástupců těchto látek, jež vykazují především protirakovinné, antimikrobiální, antidiabetické a protizánětlivé účinky.

2.3.1 Amidy na bázi benzthiazolů s protirakovinnými účinky

Rakovina nebo též nádorové onemocnění je různorodá skupina chorob, jejichž společným rysem je to, že některá populace vlastních buněk organismu se vymkne kontrole a začne relativně autonomně růst, ačkoli za normálních okolností jsou buňky schopny svou mutaci detekovat a opravit. Bujení pak může být naprosto neškodné (např. bradavice), ale také může v poměrně krátké době postiženého zahubit (např. některé nádory krve – některé leukemie) [47].

Rakovina tedy představuje vážný celosvětový problém, kvůli kterému přijde ročně o život téměř sedm milionů lidí. Z tohoto důvodu jsou globální výzkumná úsilí v této oblasti zaměřena především na vývoj nových účinných protinádorových léků. Mezi vhodné kandidáty patří i benzthiazolové deriváty například *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)acetamid (**Obrázek 10**), který patří mezi inhibitory enzymů PDK1. Tyto enzymy se podílí na rozvoji a progresi řady nádorových buněk. Vědci věnují velkou pozornost tomuto typu inhibitorů pro jeho využití v léčbě rakoviny [48]. *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-acetamid byl syntetizován reakcí 6-fluor-2-aminobenzthiazolu s acetanhydridem (**Schéma 18**) [49].



Obrázek 10: Struktura *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-acetamidu.

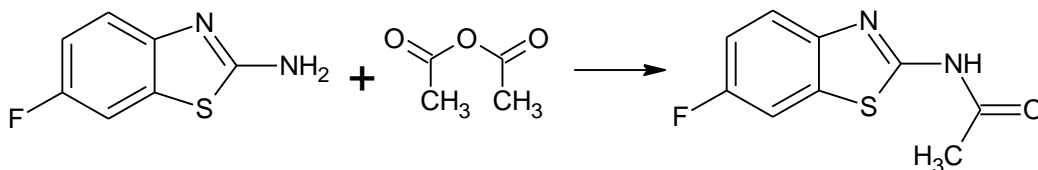


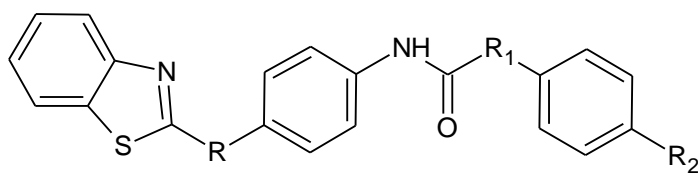
Schéma 18: Syntéza *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-acetamidu.

2.3.2 Amidy na bázi benzthiazolů s antimikrobiálními účinky

Antimikrobiální látky snižují nebo blokují růst a množení bakterií [50]. Tyto látky patří k nejčastěji používaným terapeutickým lékům na celém světě [51], což má ale za následek vznik rezistence těchto léčiv vůči patogenům. Bez ohledu na značné pokroky v oblasti antimikrobiální terapie, zůstávají infekční nemoci způsobené bakteriemi nebo houbami stále velkým problémem, a proto neustále roste potřeba vyvinout nové molekuly s lepšími antimikrobiálními vlastnostmi. Za tímto účelem byly syntetizovány různé BTA deriváty, u nichž se prokázaly zvýšené účinky proti bakteriím a houbám [52].

Proti různým gram-pozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) a gram-negativním (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), bakteriím se jako velice vhodná projevila nová řada 2-[4-(4-substituovaných benzamido/ fenylacetamido/ 3-fenylpropionamido) benzyl/ fenyl] benzthiazolů (**Obrázek 11**) [53].

Tyto látky lze připravit reakcí thionylchloridu s příslušnou karboxylovou kyselinou (1) v benzenu. Vzniklý roztok chloridu (2) se poté přidá k ledově chladné směsi 2-(4-aminobenzyl/ fenyl)benzthiazolu (3), hydrogenuhličitanu sodnému, diehtyletheru a vodě. Takto vzniklá směs se zfiltruje výsledný produkt (4) v podobě krystalů se suší ve vakuu (**Schéma 19**) [53].

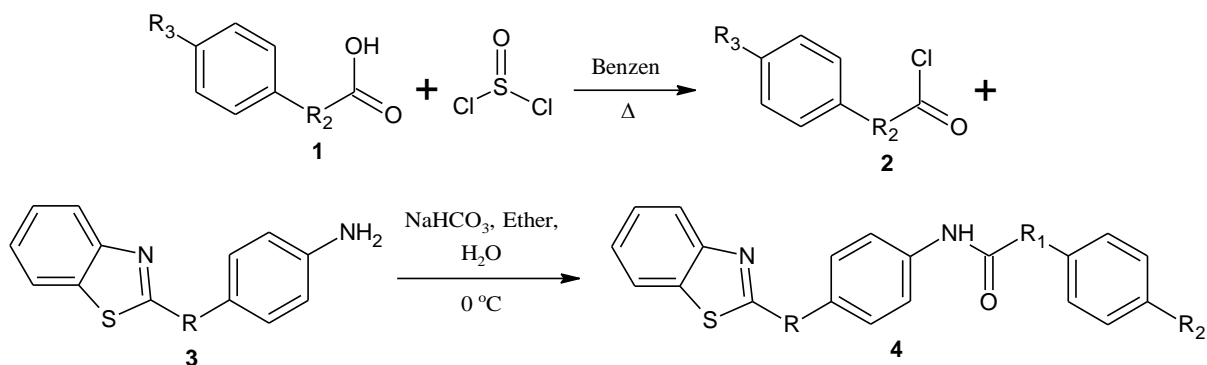


R = -, CH₂

R₁ = -, CH₂, C₂H₄

R₂ = H, F, Cl, Br, NO₂, CH₃, C₂H₅, OCH₃, C(CH₃)₃, OCH(CH₃)C₂H₅

Obrázek 11: Struktura 2-[4-(4-substituovaných benzamido/ fenylacetamido/ 3-fenylpropionamido) benzyl/ fenyl] benzthiazolů.



R = -, CH₂

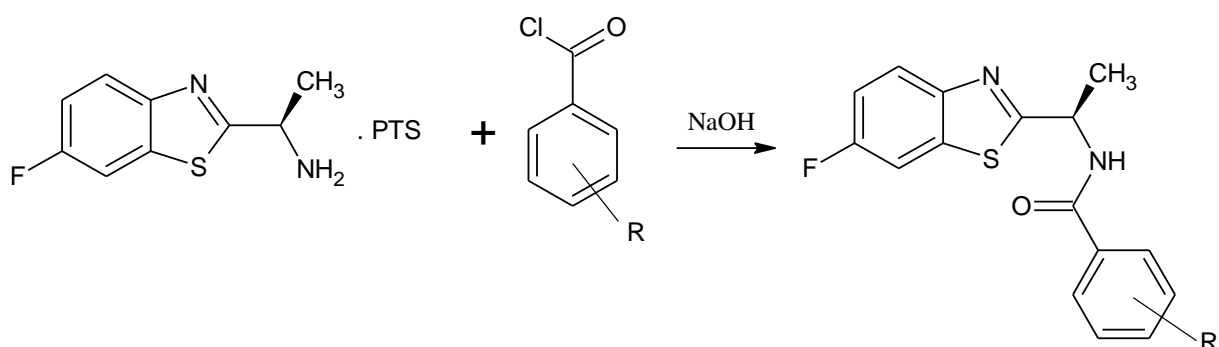
R₁ = -, CH₂, C₂H₄

R₂ = H, F, Cl, Br, NO₂, CH₃, C₂H₅, OCH₃, C(CH₃)₃, OCH(CH₃)C₂H₅

Schéma 19: Syntéza 2-[4-(4-substituovaných benzamido/ fenylacetamido/ 3-fenylpropionamido) benzyl/ fenyl] benzthiazolů.

V rámci studie byly dále popsány přípravy substituovaných *N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-benzamidů. Jejich syntéza byla založena na kondenzační reakci (*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanaminu se substituovanými benzoylchloridy. Reakce probíhala ve směsi toluen-voda, kde je (*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin uvolněn z jeho *p*-toluensulfonové soli a následně reaguje se substituovaným benzoylchloridem v prostředí vodného roztoku hydroxidu sodného (**Schéma 20**) [54].

Všechny popsané sloučeniny byly testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu proti různým kmenům bakterií a plísní. Některé sloučeniny vykazují antibakteriální a antimykotickou aktivitu srovnatelnou nebo mírně lepší než je účinnost běžně používaných antibiotik chloramfenikolu, cefoperazonu a amfotericinu B [54].



R= -2-Cl, -3-Cl, -4-Cl, -3-F, -2-methyl, -2-methoxy, -3-NO₂, -4-NO₂ nebo tyto substituenty byly kombinovány.

Schéma 20: Syntéza substituovaných *N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-benzamidů.

2.3.3 Diamidy na bázi benzthiazolů s antifungálními účinky

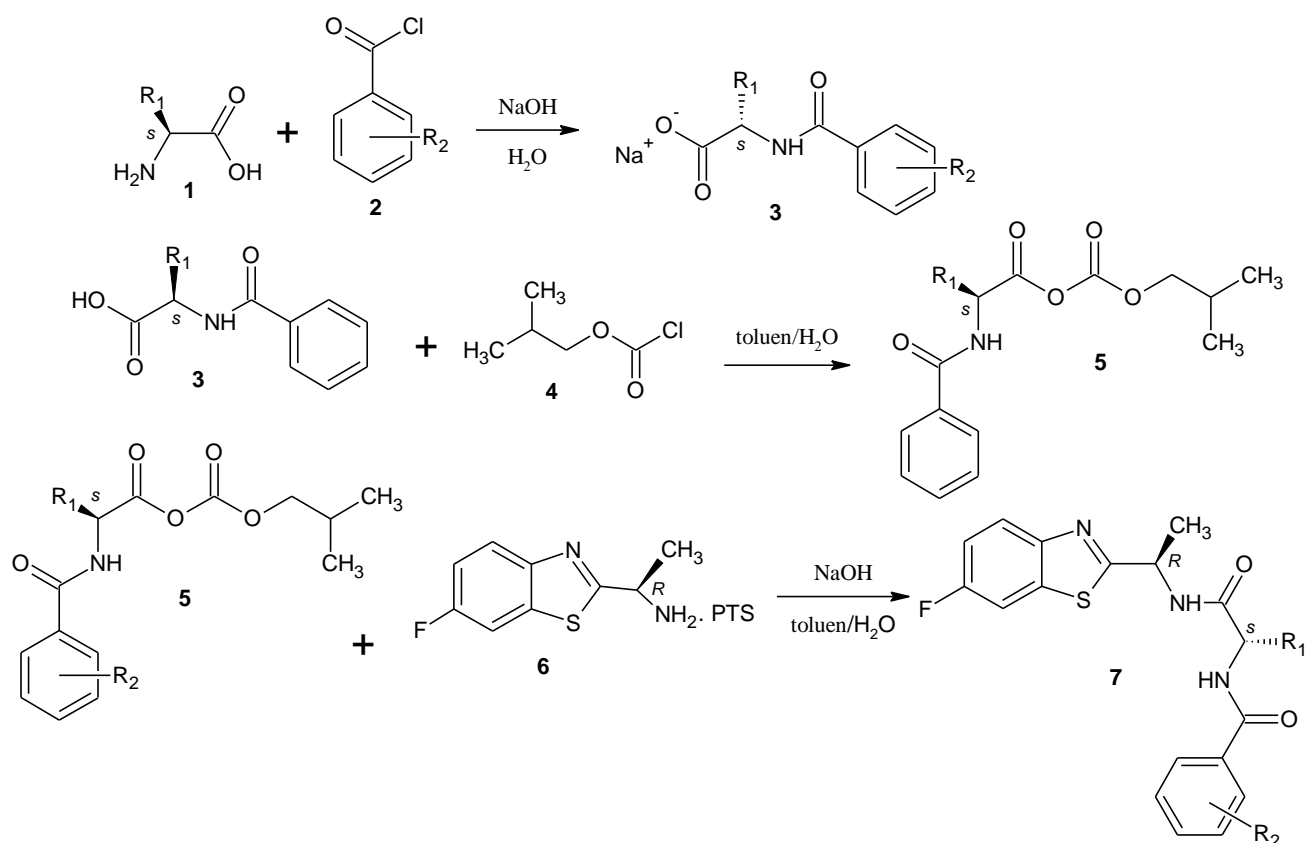
Mykózy neboli plísňová onemocnění, jsou lidská onemocnění vyvolaná houbami, mikromycetami. Povrchové mykózy postihují kůži a viditelné sliznice. Hluboké mykózy jsou orgánové a systémové. Systémové mykotické infekce, které postihují vnitřní orgány u osob s těžkou poruchou imunitního systému (u nemocných AIDS), jsou velmi závažné.

Počet vzniku těchto onemocnění stoupá díky používání širokospektrálních antibiotik, kortikosteroidů, cytostatik i chirurgických výkonů s následnou imunosupresí (např. transplantace).

K léčbě se používají tzv. Antimykotika. Jedná se o antibiotika nebo chemoterapeutika. Mezi nejběžnější patří Ketonazol, Klotrimazol nebo Amfotericin B. Bohužel však, obdobně jako u bakterií a antibiotik, narůstá rezistence houbových organismů vůči těmto lékům a léčba je pak téměř neúčinná [55].

Nová řada 1 - [(1R) -1- (6-fluor-1, 3-benzthiazol-2-yl)-3-substituovaných fenyl diamidů byla syntetizována a testována na antifungální aktivitu proti různým kmenům *Candida*. Sloučeniny 11e, 11g, 11h, 11j, 11n, 11o, 11p a 11q vykazovaly antifungální účinky, proti patogenním *C. albicans* HE 169, *C. tropicalis* 31 / HK, *C. tropicalis* 14 / HK a *C. parapsilosis* p69, srovnatelné nebo vyšší než běžně používané antibiotikum amfotericin B.

Syntéza těchto látek spočívá v kondenzaci L-amino kyseliny (1) se substituovanými benzoylchloridy (2) v toluenu. Vzniklý intermediát (3) následně reaguje s isobutyl chloroformiátem (4) na intermediát (5), který v konečném kroku podléhá kondenzaci s *R*-1-(6-flourbenzthiazol-2-yl)ethanaminem (6), jež se vyskytuje ve formě paratoluen sulfonové soli (PTS) na výsledný produkt (7) (Schéma 21) [56].



11e) R₁ = *S*-isopropyl, R₂ = 3-F

11n) R₁ = *S*-benzyl, R₂ = 3-F

11g) R₁ = *S*-isopropyl, R₂ = 2-CH₃

11o) R₁ = *S*-benzyl, R₂ = 2-CH₃

11h) R₁ = *S*-isopropyl, R₂ = 4-CH₃

11p) R₁ = *S*-benzyl, R₂ = 4-CH₃

11j) R₁ = *S*-isopropyl, R₂ = 4-Cl-3-NO₂

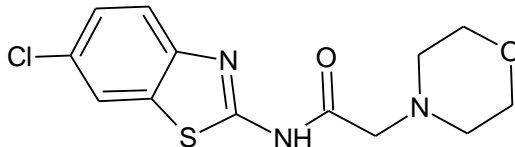
11q) R₁ = *S*-benzyl, R₂ = 4-Cl-3-NO₂

Schéma 21: Syntéza 1 - [(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-3-substituovaných fenyl diamidů.

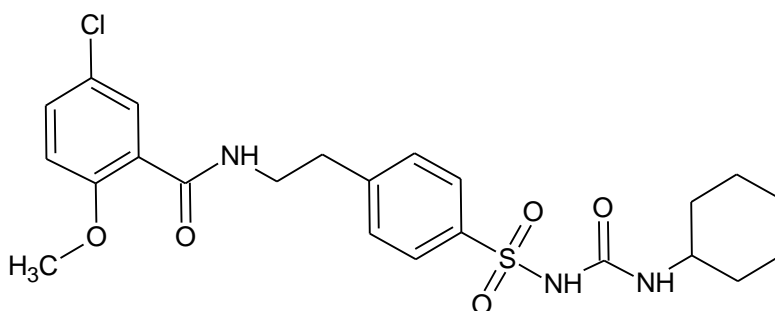
2.3.4 Amidy na bázi benzthiazolů s antidiabetickými účinky

Diabetes mellitus patří mezi metabolické onemocnění, které způsobuje vysokou hladinu glukózy v krvi. U diabetu typu 1 je produkce inzulínu, hormonu, jež snižuje hladinu cukru v krvi a je produkován β buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, nedostatečná, zatímco v případě diabetu typu 2 tělesné buňky nereagují na produkci inzulínu (tzv. inzulínová rezistence). Příznaky tohoto onemocnění se mohou vyznačovat polyurií (časté močení), polydipsií (stálá žízeň) a polyfagií (hlad) [57]. Přebytek cukru v krvi může také vést k vážným zdravotním problémům, jako jsou poškození ledvin, srdce, nervů atd. [58].

Sloučenina *N*-(6-chlor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamid (**Obrázek 12**) vykazovala maximální hypoglykemické účinky srovnatelné se standardně užívaným lékem Glibenclamidem (**Obrázek 13**) [59].



Obrázek 12: Struktura *N*-(6-chlor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamidu.



Obrázek 13: Struktura léčiva Glibenclamidu.

Syntéza *N*-(6-chlor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamidu spočívá v reakci 6-chlor-2-aminobenzthiazolu (**1**) s chloracetyl chloridem (**2**) [60]. Vzniklý 2-chloracetamid-6-chlorbenzthiazol (**3**) reaguje s morfolinem (**4**) na výsledný produkt (**5**) [61].

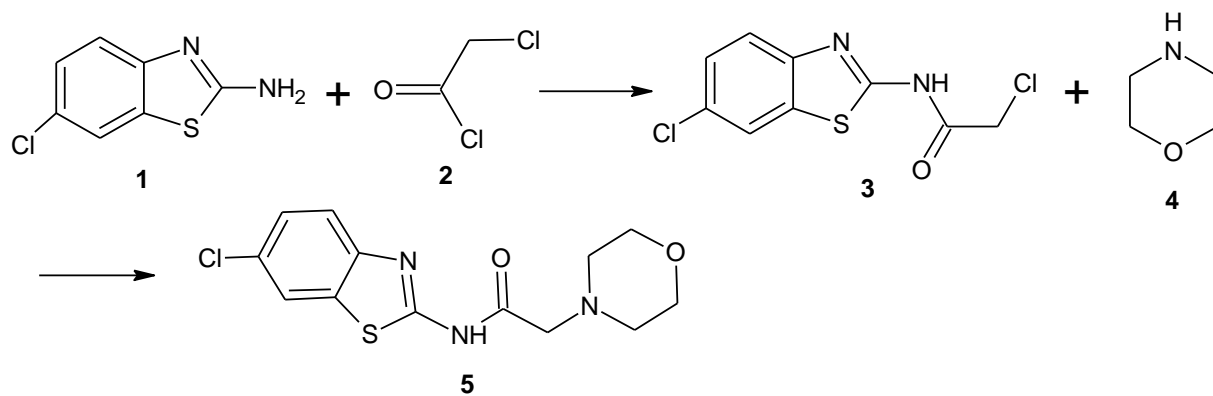
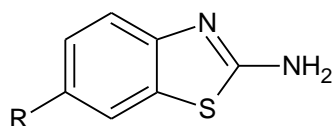


Schéma 22: Syntéza *N*-(6-chloro-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-morfolinacetamidu.

2.3.5 Amidy na bázi benzthiazolů s protizánětlivými účinky

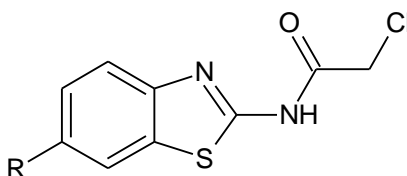
Nesteroidní protizánětlivé léky (NSPZL) zahrnují celou řadu preparátů, jejichž analgetický účinek spočívá v inhibici enzymu cyklooxygenázy (COX). Tento enzym katalyzuje konverzi kyseliny arachidonové na látky, které se nazývají prostaglandiny (PG). PG se účastní imunitních a zánětlivých procesů a jejich nadměrná činnost je tlumena některými léky, např. již zmíněnými nesteroidními antiflogistiky [62].

Deriváty 6-substituovaných-1,3-benzthiazol-2-aminů (**Obrázek 14**) a 2-chlor-*N*-(6-substituovanýchbenzthiazol-2-yl) acetamidů (**Obrázek 15**) vykazují významné protizánětlivé účinky [63].



R = H, CH₃, OCH₃, F, Cl

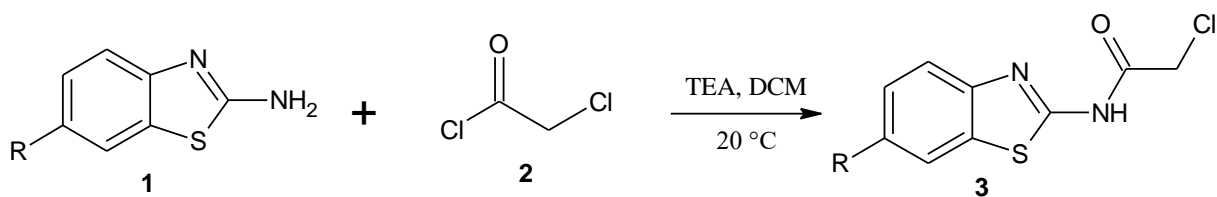
Obrázek 14: Struktura 6-substituovaného-1,3-benzthiazol-2-aminu.



R = H, CH₃, OCH₃, F, Cl

Obrázek 15: Struktura 2-chlor-*N*-(6-substituovanýchbenzthiazol-2-yl)acetamidů.

Syntéza 2-chlor-*N*-(6-substituovanýchbenzthiazol-2-yl)acetamidů (**3**) spočívá v reakci 6-substituovaného-1,3-benzthiazol-2-aminu (**1**) s chloracetyl chloridem (**2**) [64].



R = H, CH₃, OCH₃, F, Cl

Schéma 23: Syntéza 2-chlor-*N*-(6-substituovaných benzthiazol-2-yl)acetamidů.

Mezi další amidy na bázi benzthiazolů vykazující protizánětlivé, ale i anestetické účinky patří *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-fenylpiperazin-1-yl)acetamid (**5**). Syntéza této látky probíhá dvoustupňovou syntézou (**Schéma 24**) [64]. 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin (**1**) reaguje v suchém benzenu s chloracetyl chloridem (**2**). Tento meziprodukt (**3**) reaguje ve druhém stupni s fenylpiperazinem (**4**) v absolutním etanolu [65].

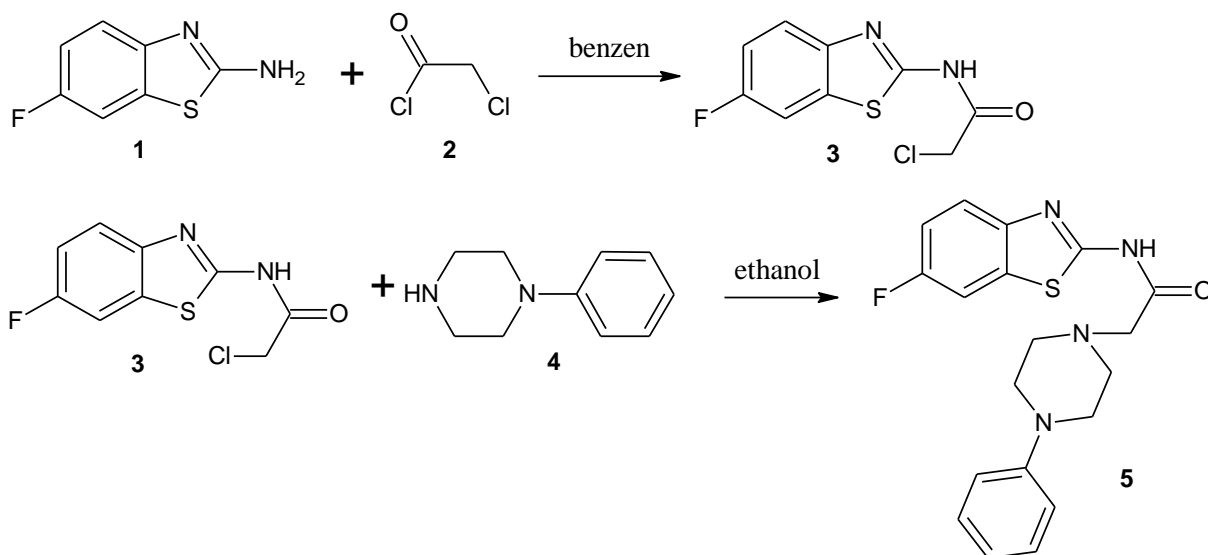
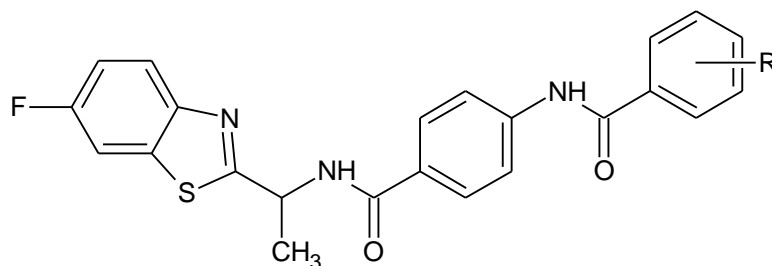


Schéma 24: Syntéza *N*-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-fenylpiperazin-1-yl)acetamidu.

2.4 Syntéza diamidů obsahující kyselinu 4-aminobenzoovou a benzthiazolový blok

Syntézy diamidů obsahující 4-aminobenzoovou kyselinu a benzthiazolový blok nebyly doposud publikovány (**Obrázek 16**) a jejich syntéza a studium antimikrobiálních aktivit jsou předmětem této práce.



Obrázek 16: Obecná struktura diamidů obsahující 4-aminobenzoovou kyselinu a benzthiazolový blok.

2.5 Bakterie

Z důvodů zaměření této diplomové práce mimo jiné i na antibakteriální účinky připravených diamidů na bázi benzthiazolů a kyseliny 4-aminobenzoové, je tato část věnována obecné charakteristice těchto mikroorganismů s následujícím podrobnějším popisem čtyř druhů bakterií, jež byly testovány v experimentální části.

2.5.1 Obecná charakteristika bakterií

Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou prokaryotických mikroorganismů na světě. Celkově se odhaduje, že na Zemi žije asi 5×10^{30} (jedinců) bakterií. Celkový počet druhů se dá jen tušit, odhady sahají od 107 k 109 druhům. Jejich velikost se pohybuje v řádech mikrometrů. Vzhledově jsou velice rozmanité, nabývají tvarů od koulí po tyčinky až spirály. Bakterie patří mezi první formy života, které se objevily na Zemi a jsou přítomny ve většině prostředí. Obývají půdu, vodu, kyselé horké prameny, radioaktivní odpady a hluboké části zemské kůry. Dokáží žít v symbiotických a parazitických vztazích uvnitř a na povrchu mnohobuněčných organismů (rostliny, zvířata, lidé) [66].

Bakterie jsou životně důležité, ale i životně nebezpečné mikroorganismy. Člověk se z jejich prospěchu může těšit např. v průmyslu, kde se již téměř tisíc let používají k přípravě fermentovaných (kvašených) potravin, jako je sýr, sojová omáčka, nakládaná zelenina, kyselé zelí, ocet, víno, pivo a jogurt. Mléčných bakterií se využívá při průmyslové produkci kyseliny mléčné. Ta totiž vzniká kvašením sacharidů. Fermentací sacharidů za přítomnosti máselných bakterií se zase využívá k produkci kyseliny octové a máselné, kvašením vzniklé kyseliny máselné se průmyslově vyrábí butanol a aceton. Mezi další látky, které jsou produkovány bakteriemipatří xanthany, jež se používají jako maziva, přísady do potravin, při výrobě nátěrových hmot, keramiky a různých dalších prostředků. V průmyslu se též uplatňují enzymy získané z bakterií. Některé protězy se přidávají do některých pracích prášků, ke štěpení škrobu se užívá amyláz, v medicíně našly uplatnění streptokinázy [67].

Schopnost bakterií rozkládat mnohé látky se využívá především ve zpracovávání (např. toxického) odpadu, v čistírnách odpadních vod a domácích septických. Bakterie schopné trávit uhlovodíky v ropě jsou využívány při čištění ropných skvrn. V chemickém

průmyslu se bakterie používají k produkci nejrůznějších chemických látek, případně léků či agrochemikálií. Bakterie se rovněž používají namísto pesticidů v biologickém boji proti škůdcům. V tomto ohledu je známá půdní bakterie *Bacillus thuringiensis* (BT). Pomocí geneticky upravených bakterií se také vyrábí inzulin a další hormony, růstové faktory či protilátky [68].

Nicméně kromě prospěšných bakterií existují i bakterie patogenní způsobující choroby, někdy souhrnně zvané bakteriózy či bakteriální infekce. Ty se neomezují jen na člověka, naopak různé bakterie napadají široké spektrum hostitelských druhů včetně hub, rostlin a prvoků. Přestože některé bakterie mohou být patogeny i na samotném povrchu těla daného organismu, značné množství jich vstupuje dovnitř různými tělními otvory, například u rostlin průduchy, skrz sliznicemi živočichů, ranami, případně přes kůži. V místě, kde se usídlí, mohou způsobit hnisání, ničit tkáň či pletiva (např. nekróza) či škodit svými vlastními toxiny [69].

Mezi nejběžnější lidské bakteriální nemoci patří například zubní kaz, z vážnějších nemocí je ve světě velmi častá tuberkulóza. S potravou se do těla dostává například bakteriemi rodu *Salmonella* (salmonelóza), *Shigella* (shigelóza provázená průjmy) nebo *Listeria* (původce listeriózy), vzdušnou cestou například *Mycobacterium spp.* (TBC a lepra) nebo *Chlamydomphila psittaci* (původce jedné z chlamydióz). Ranami se do těla dostane například původce tetanu, *Clostridium tetani*. Speciální případ jsou přenosy přes členovce, vyskytující se například u bakterií *Borrelia spp.* (jeden druh původcem boreliózy), *Rickettsia spp.* (tyfus a jiné). Přes urogenitální trakt se bakterie mohou dostat do těla pohlavním stykem, jako například *Neisseria gonorrhoeae* (kapavka) či *Treponema pallidum* (syfilis).

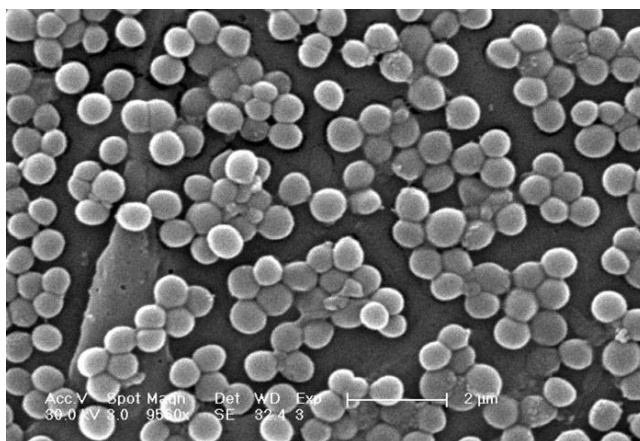
Lidské tělo bojuje s bakteriemi pomocí některých složek imunitního systému. Proti extracelulárním bakteriím (žijícím mimo lidské buňky, obvyklé infekce) v těle bojují hlavně buňky neutrofilů – k tomu jim však pomáhá i tzv. komplement a různé protilátky. Vnitrobuněčné bakterie jsou cílem aktivovaných makrofágů a TC-lymfocytů [70].

2.5.2 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus patří mezi grampozitivní bakterie vytvářející koky (0,5-1,5 μm v průměru). Mohou se vyskytovat jednotlivě, ve čtveřicích, krátkých řetězcích, nebo se shlukovat to tvaru připomínající hrozen (z řec. staphylé – hrozen) (**Obrázek 17**). Jsou nepohyblivé a nevytvářejí spory. Produkují katalasu. Až na výjimky jsou fakultativně anaerobní, poměrně odolné vůči podmínkám zevního prostředí.

Způsobují velmi často různé infekce v rozsahu od mírných zánětů kůže a měkkých tkání až po život ohrožující sepse („otravy krve“, směřující až do septického šoku spojeného se selháváním orgánů), syndrom toxického šoku a nekrotizující pneumonie. Patogenita této bakterie je výsledkem produkce toxinů (exfoliativní toxiny, enterotoxiny atd.), které způsobují ničení tkáně nemocného. Tvoří žlutý pigment (od toho odvozeno druhové jméno aureus - zlatý), zkvašuje mannitol a přibližně u třetiny lidské populace je přirozeně přítomen na kůži a sliznicích.

Lokalizované infekce se mohou řešit chirurgicky. Přibližně 90% stafylokoků je rezistentních na běžný penicilin, v důsledku produkce enzymu beta-laktamázy. Tudíž se musejí používat tzv. peniciliny inhibující beta-laktamázu (oxacilin/meticilin nebo cloxacilin s AMP). Dále se používají makrolidy, cefalosporiny I. a IV. generace, aminoglykosidy, linkosamidy, tetracykliny, glykopeptidy, chloramfenikol. Nicméně i přes zavedení léčby, peniciliny inhibující beta-laktamázu, existují i tzv. Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo oxacilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (ORSA), jež způsobují obtížně léčitelné infekce u lidí a zvířat [71].



Obrázek 17: *Staphylococcus aureus*.

https://phil.cdc.gov/PHIL/Images/7821/7821_lores.jpg

2.5.2 *Escherichia coli*

Zástupci rodu *Escherichia* jsou rovné gramnegativní tyčinky (0,5-0,8x2-3 μ m), až na výjimky pohyblivé. Mohou tvořit pouzdra polysacharidového charakteru. Nejvýznamějším druhem je *Escherichia coli* (**Obrázek 18**), fakultativně anaerobní bakterie.

Escherichia coli patří ke střevní mikroflóře teplokrevných živočichů, včetně člověka. Z tohoto důvodu je její přítomnost v pitné vodě indikátorem fekálního znečištění. Člověku je jako součást přirozené mikroflory prospěšná, jelikož produkuje řadu látek, které brání rozšíření patogenních bakterií (koliciny) a podílí se i na tvorbě některých vitamínů (např. vitamín K) [72].

Patologicky se může vyskytovat v krevních vzorcích, a být tak původcem bakterémie. Často způsobuje nosokomiální infekce tj. infekce získané v nemocnicích.

Bakteriální infekce jsou léčeny antibiotiky (beta-laktamová antibiotika, fluorochinolony a aminoglykosidy). Jelikož *Escherichia coli* má krátkou generační dobu, může se u ní stejně jako u ostatních bakterií velice rychle vyvinout rezistence k používanému antibiotiku [73].



Obrázek 18: *Escherichia coli*.

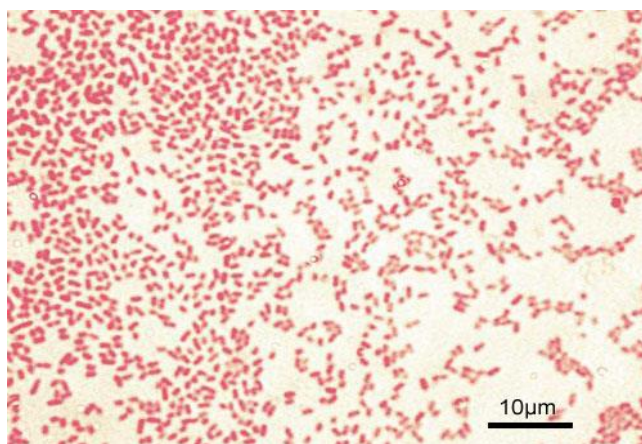
https://cs.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#/media/File:Escherichia_coli_Gram.jpg

2.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa patří mezi gramnegativní rovné až lehce zahnuté tyčinky (0,5-1x1,5-5 μm) uspořádané jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Jsou pohyblivé, nesporulují. Jedná se o striktně aerobní bakterie (**Obrázek 19**)

Jako potenciální patogen vyvolává řadu onemocnění, jako je zánět močových cest, středního ucha či hnisání popálenin. U pacientů s cystickou fibrózou způsobuje pneumonie. U diabetiků a intravenózních narkomanů je zodpovědná za osteomyelitidu. U pacientů, kteří mají dlouhodobě zavedený katétr, může vyústit v pyelonefritidu.

Je značně rezistentní vůči antibiotikům a je pečlivě sledována v lékařství, hygienické a potravinářské mikrobiologii. Léčí se kombinací piperacilinu (jeden z ureidopenicilinů) v kombinaci s inhibitory beta-laktamáz [74].



Obrázek 19: *Pseudomonas aeruginosa*.

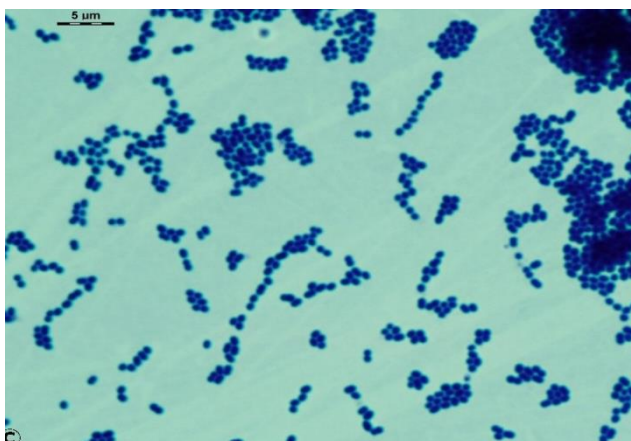
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Pseudomonas_aeruginosa_Gram.jpg

2.5.4 *Enterococcus faecalis*

Enterokoky jsou grampozitivní koky (0,8-1 μm v průměru) uspořádané ve dvojicích i krátkých řetězcích. Jedná se o fakultativně anaerobní organismy - mohou žít v prostředí na kyslík jak chudém, tak bohatém.

Dva druhy enterokoků se běžně vyskytují v lidské střevní mikroflóře - *Enterococcus faecalis* (90-95 %) (**Obrázek 20**) a *Enterococcus faecium* (5-10%) [75].

Enterokoky mohou způsobit zánět močových cest, infekční endokarditidu, divertikulitidu a meningitidu. Tyto nemoci se léčí antibiotiky, některé enterokoky jsou však vůči antibiotikům rezistentní. Většina enterokoků je citlivá na ampicilin, gentamycin a vankomycin. U enterokoků rezistentních k vankomycinu (VRE - vankomycin rezistentní enterokoky) se podává linezolid [76].



Obrázek 20: *Enterococcus faecalis*.

<http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20light%20microscopy.html>

2.6 Metody stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení mikrobiální aktivity je klíčovým ukazatelem pro testování účinnosti antibiotik a jiných antimikrobiálních látek v mikrobiologii. Pro toto testování bylo vyvinuto několik základních metod, jak získat přesné údaje, na základě kterých se volí vhodná terapie. Hodnoty, které testováním získáváme, jsou směrodatným ukazatelem pro volbu vhodného léčiva a jeho dávkování. Nedílnou součástí každého testování jsou výsledky udávané ve zkratkách **MIC** a **MBC** [76,77].

MIC, je zkratka pro minimální inhibiční koncentrace, která viditelně inhibuje růst daného mikroorganismu po inkubaci přes noc. Konkrétní hodnota patří mezi základní údaje udávané ke každé antimikrobiální látce. Metody stanovení podléhají pravidlům referenčních organizací jako je CLSI nebo EUCAST [78].

MBC je zkratka pro minimální baktericidní koncentrace, znamená nejnižší možná koncentrace dané látky potřebná k usmrcení 99,9 % mikroorganismů [77].

Metody testování antimikrobiálních látek dělíme na:

- 1) **Difúzní metody**
- 2) **Diluční metody**

2.6.1 Difúzní metody

Jedná se převážně o testy kvalitativní, kdy výsledkem je citlivost či rezistence k vybrané antibakteriální látce. Principem této metody je v difúzi antibiotika do agaru, ve kterém je naočkovaný bakteriální kmen. Pokud dochází k inhibici, vytvoří se na agaru viditelné inhibiční zóny.

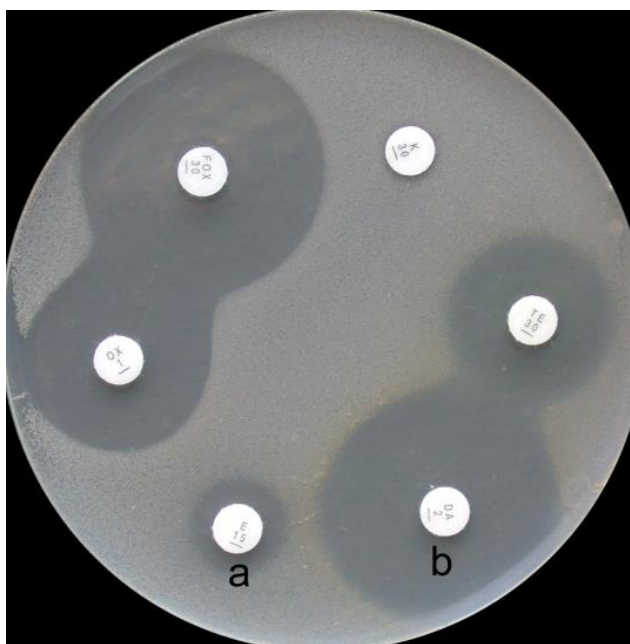
A) Disková difúzní metoda

Slouží ke zjištění, zda je antibiotikum účinné či je daný kmen rezistentní. Hodnocení probíhá na základě měření velikosti inhibičních zón vůči retenčním hodnotám. Metoda spočívá v izolaci čisté kolonie a následném vytvoření zákalu ve fyziologickém roztoku o hodnotě 0,5 dle stupnice McFarlanda. Takto připravená mikrobiální suspenze se

rozetře po ploše agaru, nejčastěji Müller-Hintonův. Následně se na to aplikují pomocí speciálních dávkovačů disky, napuštěné antibiotiky. Takto připravená miska se kultivuje 24 hodin při teplotě 37°C. Po inkubaci se měří velikosti inhibičních zón a výsledky se porovnávají s retenčními hodnotami dle CLSI (Clinical & laboratory standards institute).

Pokud je daný kmen rezistentní, tak difundující antibiotikum z disku, nezastaví růst a nedojde k tvorbě inhibiční zóny. Rezistentní kmeny jsou i ty, které dosáhly velikosti inhibiční zóny menší, než je referenční hodnota.

V případě citlivosti vůči danému antibiotiku, okolo disku se vytvoří inhibiční zóna. Pokud její velikost překračuje referenční hodnoty, je bakterie na daný typ antibiotika citlivá (**Obrázek 21**).



Obrázek 24: Disková difúzní metoda.

<http://www.szu.cz/stafylokoky-indukovana-rezistence-ke-klindamycinu>.

B) E-test

E-test, je také kvantitativní metoda, která poskytne informaci o koncentraci antibiotika, která účinná na daný mikrobiální kmen. Zjišťuje se tedy MIC. K tomuto testování se využívá speciálně napuštěný proužek s rostoucí koncentrací antibiotika. Aplikace je podobná jako v předcházejícím případě, až na to, že nyní aplikujeme proužek. Pokud je daný mikroorganismus citlivý, vytvoří se zóna inhibice ve tvaru elipsy, která přetíná proužek v místě, udávající hodnotu MIC (**Obrázek 22**).



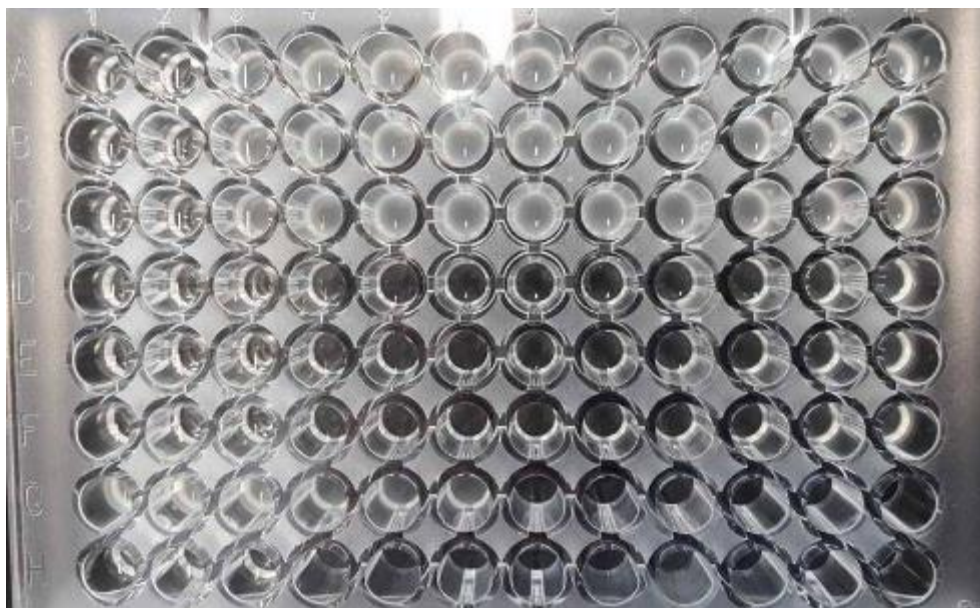
Obrázek 52: E-test. [51]

<http://www.biomerieux-diagnostics.com/etest>.

2.6.2 Diluční metody

Tyto testy slouží ke zjištění kvantitativní MIC. Tato metoda je mnohem přesnější než difúzní metody. Provádí se na mikrotitrační destičce, kde do každé jamky se dává tekutý bujón s klesající koncentrací antibiotik. Nejčastěji se využívá dvojkového ředění. Do všech jamek se poté přidá inokulum (bakteriální zákal dle stupnice McFarlanda) a na závěr se přidávají pozitivní kontroly – pouze čisté médium (bujón) a inokulum, a negativních kontroly, pouze čistý bujón, z důvodu kontroly kontaminace. Veškeré jamky se dělávají v tripletech, aby byla zajištěna objektivnost výsledků. Připravená destička se nechá kultivovat opět při 37°C po dobu 24 hodin.

Výsledek se odečte pouhým okem, nebo spektrofotometrem. Hodnota minimální inhibiční koncentrace je koncentrace jamky, ve které jako poslední došlo k zastavení růstu - inhibici, což znamená není zakalená (**Obrázek 23**).



Obrázek 26: Schéma mikrodiluční destičky, kde poslední nezakalená jamka ukazuje hodnotu MIC. Jak je patrné řádky A-C jsou totožné, totéž D-F, v řádku G, jsou v tripletech pozitivní kontroly a v řádku H negativní kontroly.

3 Experimentální část

3.1 Komerčně dostupná chemická činidla

Toluen p.a. - Penta

NaOH pevný p.a.-Penta

n-Hexan 95% -SigmaAldrich

Kyselina chlorovodíková p.a. – Penta

N,N-dimethylformamid 99,8 % - Sigma Aldrich

Destilovaná voda

Benzoylchlorid 99 % - Sigma Aldrich

4-methylbenzoylchlorid 98 % - Sigma Aldrich

4-methoxybenzoylchlorid99 % – Sigma Aldrich

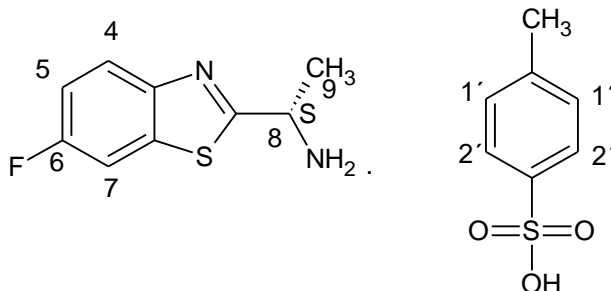
4-chlorbenzoylchlorid 99 % – Sigma Aldrich

4-chlor-3-nitrobenzoylchlorid 98 % - Sigma Aldrich

3.2 Charakteristika výchozích látek

3.2.1 (1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin 4-toluensulfonát

Tato sloučenina byla připravena na pracovišti ÚOCHT. Látka byla před použitím analyzována NMR spektrometrií.



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 241 - 242 °C

$[\alpha]_D^{25} = -18,8$ (c = 1, methanol)

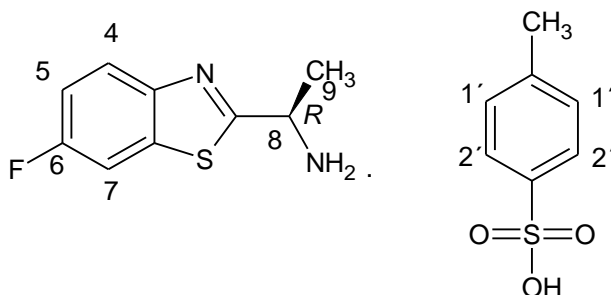
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400.13 MHz): $\delta = 8,74$ (s, 2H, NH₂); 8,12 (dd, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,4 Hz, H7); 8,09 (dd, 1H, ³*J* = 9,2 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,8 Hz, H4); 7,48 (d, 2H, ³*J* = 8,0 Hz, H-1'); 7,37 (dt, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, ³*J* = 9,2 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H5); 7,10 (d, 2H, ³*J* = 8,0 Hz, H2'); 5,01 (kv, 1H, ³*J* = 6,8 Hz, H8); 2,28 (s, 3H, CH₃); 1,66 (d, 3H, ³*J* = 6,8 Hz, H-9).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100.62 MHz): $\delta = 169,1$ (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 159,9 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 243,5 Hz); 148,8; 144,9; 138,5; 136,4 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,9); 128,5; 125,7; 124,3 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 115,5 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 109,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,4 Hz); 48,4; 20,9; 19,9.

¹⁹F NMR (DMSO-*d*₆, 376.46 MHz): $\delta = -115,2$.

3.2.2 (1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin 4-toluensulfonát

Tato sloučenina byla připravena na pracovišti ÚOCHT. Látka byla před použitím analyzována NMR spektrometrií.



Vzhled: Bílá pevná látka

Bod tání: 241 - 242 °C

$[\alpha]_D^{25} = +18,5$ ($c = 1$, methanol)

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400.13 MHz): $\delta = 8,75$ (s, 2H, NH₂); 8,12 (dd, 1H, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,4 Hz, H7); 8,09 (dd, 1H, ³*J* = 9,1 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,48 (d, 2H, ³*J* = 8,0 Hz, H-1'); 7,37 (dt, 1H, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 7,10 (d, 2H, ³*J* = 8,0 Hz, H2'); 5,01 (kv, 1H, ³*J* = 6,8 Hz, H8); 2,28 (s, 3H, CH₃); 1,66 (d, 3H, ³*J* = 6,8 Hz, H-9).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100.62 MHz): $\delta = 169,1$ (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,2 Hz); 159,9 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 243,2 Hz); 148,8; 144,9; 138,5; 136,4 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8); 128,5; 125,7; 124,3 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 115,5 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 109,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 48,4; 20,9; 19,9.

¹⁹F NMR (DMSO-*d*₆, 376.46 MHz): $\delta = -115,2$.

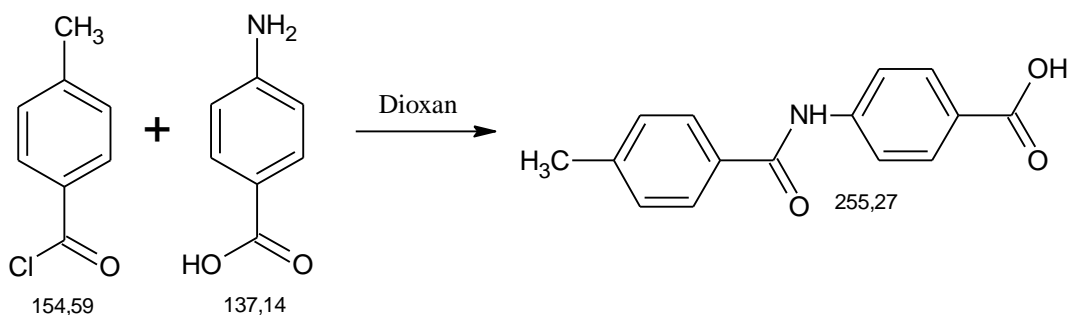
3.3 Syntéza diamidů obsahující kyselinu 4-aminobenzoovou a benzthiazolový blok

Syntéza výsledných diamidů na bázi kyseliny 4-aminobenzoové a benzthiazolového bloku zahrnuje tři reakční kroky. V prvním kroku syntézy vzniká 4-[(4-substituovaná benzoyl)amino]benzoová kyselina, která podléhá fosgenaci a poskytuje produkt druhého reakčního kroku a tím je 4-[(4-substituovaný benzoyl)amino]benzoylchlorid, jež reaguje s 1-(6-fluoro-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS na výsledný diamid. Jednotlivé reakční kroky jsou podrobněji popsány a znázorněny v následujících kapitolách.

3.3.1 Příprava 4-[(4-substituovaných benzoyl)amino]benzoových kyselin

3.3.1.1 Příprava 4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

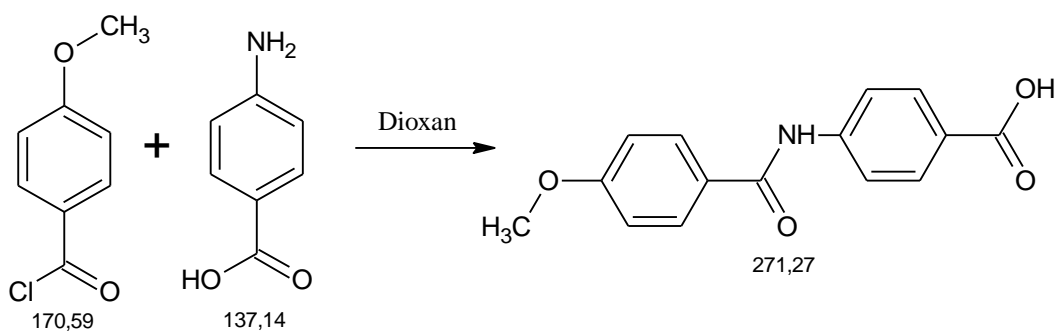
4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
4-methylbenzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

Pracovní postup:

Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky bylo předloženo 6 g (0,044 mol) 4-aminobenzoové kyseliny a 140 ml dioxanu. Reakční směs byla následně míchána, dokud nebyl všechen obsah rozpuštěn. Do této reakční směsi bylo postupně přidáno 5,9 ml (0,045 mol) 4-methylbenzoylchloridu rozpuštěného v 10 ml dioxanu. Následně byla reakční směs míchána 3 hodiny. Poté byl vyloučený produkt izolován filtrací. Produkt byl následně promyt 2 x 20 ml vody a poté byl sušen stáním na vzduchu. Bylo připraveno 4,85 g (80 % výtěžek) produktu.

3.3.1.2 Příprava 4-[(4-methoxybenzoyl)amino]benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

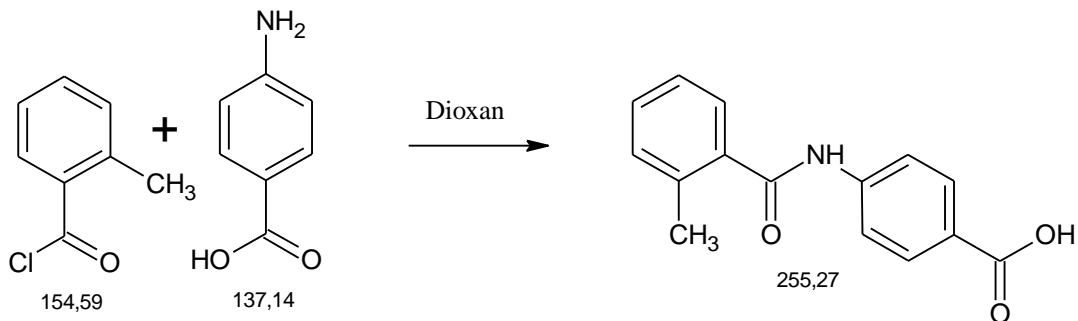
4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
4-methoxybenzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsaným v kapitole 3.3.1.1. Bylo připraveno 4,98 g (83 % výtěžek) produktu.

3.3.1.3 Příprava 4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

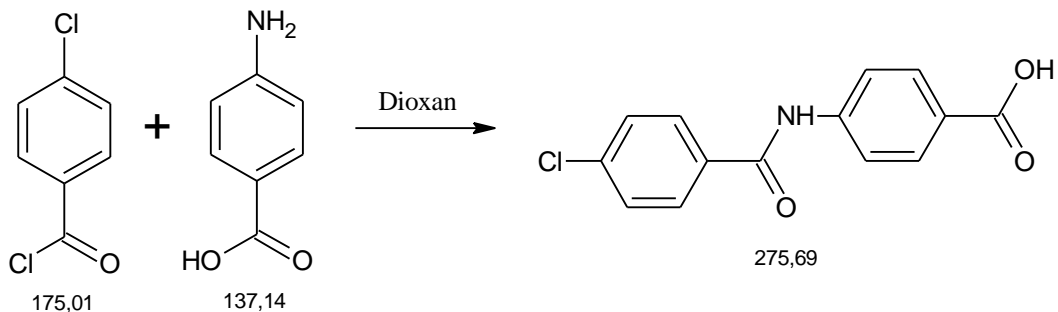
4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
2-methylbenzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.1.1. Bylo připraveno 5,12 g (85 % výtěžek) produktu.

3.3.1.4 Příprava 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

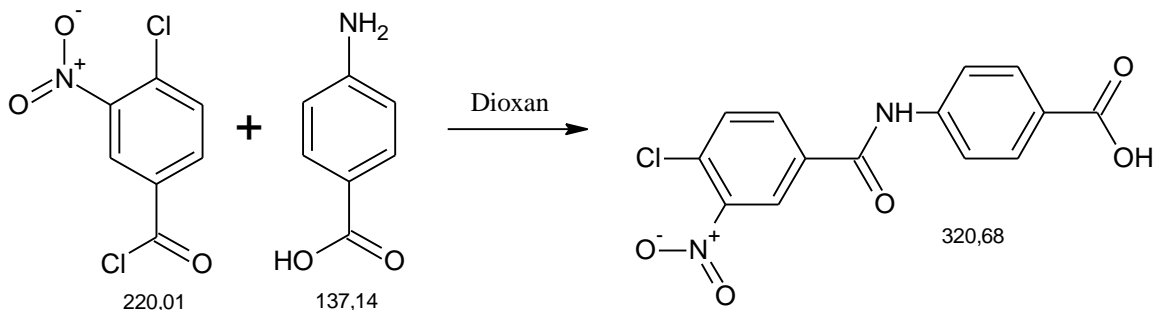
4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
4-chlorbenzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.1.1. Bylo připraveno 4,94 g (82 % výtěžek) produktu.

3.3.1.5 Příprava 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

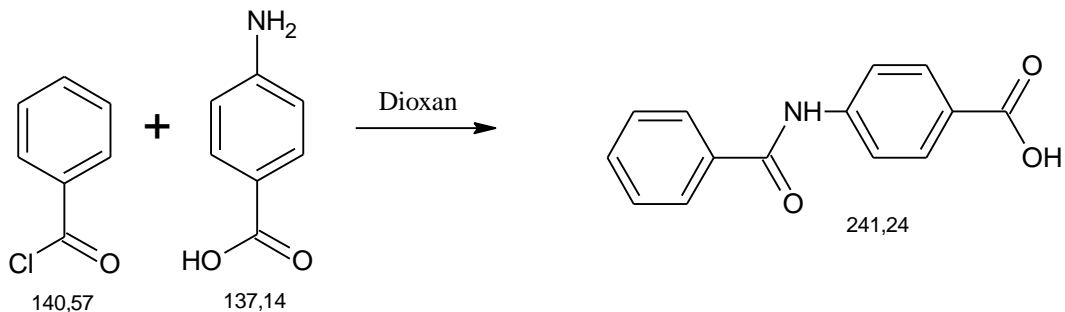
4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
4-chlor-3-nitrobenzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsaným v kapitole 3.3.1.1. Bylo připraveno 5 g (83 % výtěžek) produktu.

3.3.1.6 Příprava 4-(benzoylamino)benzoové kyseliny

Reakční schéma:



Násada:

4-aminobenzoová kyselina	6 g (0,044 mol)
benzoylchlorid	5,9 ml (0,045 mol)
Dioxan	140 ml

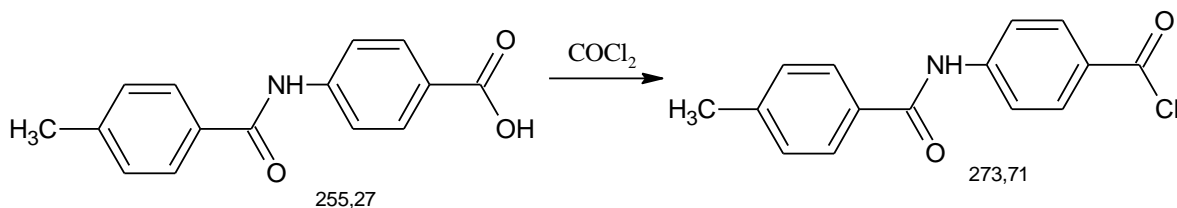
Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.1.1. Bylo připraveno 4,80 g (80 % výtěžek) produktu.

3.3.2 Příprava 4-[(4-substituovanýchbenzoyl)amino]benzoylchloridů

3.3.2.1 Příprava 4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

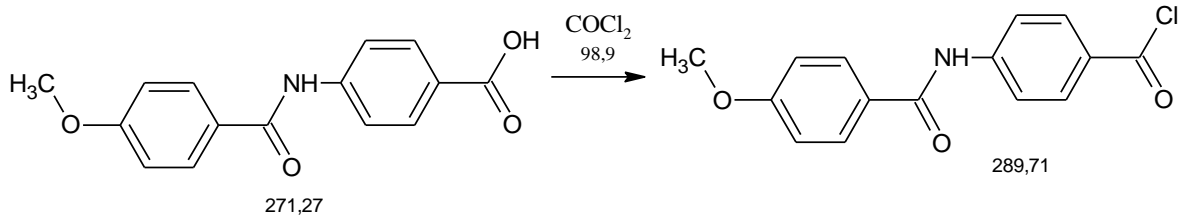
4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoová kyselina	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	Kat. množství
Toluen	80 ml
Fosgen	5 g (0,05 mol)

Pracovní postup:

Do 250 ml kulaté baňky bylo předloženo 2 g 4-[(4-methylbenzoyl)amino]benzoové kyseliny a 80 ml toluenu. Z reakční směsi bylo následně azeotropickou destilací oddestilováno cca 10 ml směsi voda-toluen. Reakční směs byl následně ochlazená na teplotu 95 °C. Do reakční směsi přidáno katalytické množství N,N-dimethylformamidu a dále bylo do reakční směsi postupně nadávkováno 5g plynného fosgeny. Vznikající CO₂ a HCl byly likvidovány v absorpční koloně s 15 % NaOH. Po ukončení fosgenace, byla reakční směs cca 1 hodinu refluxována. Následně byla reakční směs ochlazená za současného zavádění suchého dusíku na laboratorní teplotu. Vakuovou destilací (50 °C/ 100-110 mbar) bylo z reakční směsi oddestilován veškerý toluen. Následně byl produkt krystalizován z hexanu. Vyloučený produkt byl odfiltrován a promyt 10 ml hexanu. Bylo připraveno 1,8 g (90 % výtěžek) produktu.

3.3.2.2 Příprava 4-[(4-methoxybenzoyl)amino]benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

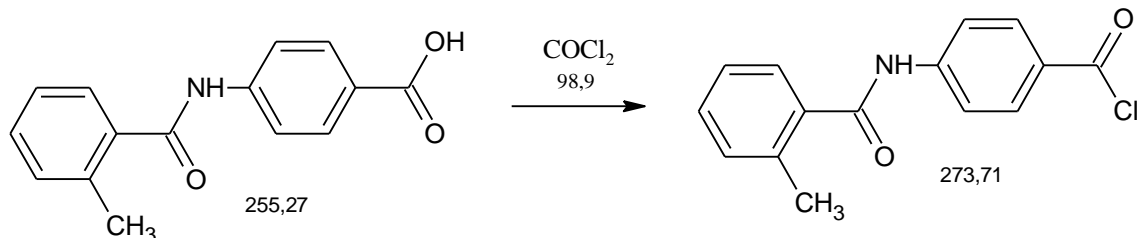
4-[(4-methoxybenzoyl)amino]benzoová kyselina	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	kat. množství
Toluen	60 ml
COCl_2	5 g (0,05 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1. Bylo připraveno 1,75 g (výtěžek 87,5 %) produktu.

3.3.2.3 Příprava 4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

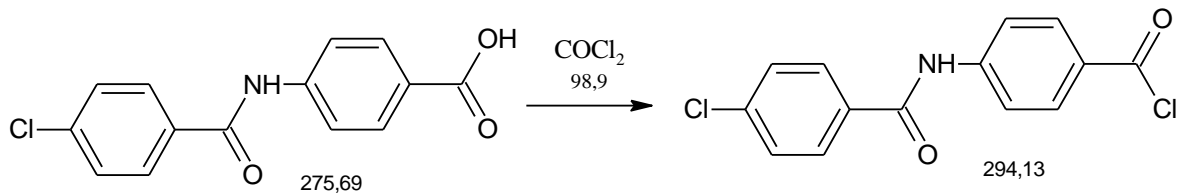
4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoová kyselina	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	Kat. množství
Toluen	60 ml
COCl_2	5 g (0,05 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1. Bylo připraveno 1,94 g (výtěžek 97 %) produktu.

3.3.2.4 Příprava 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

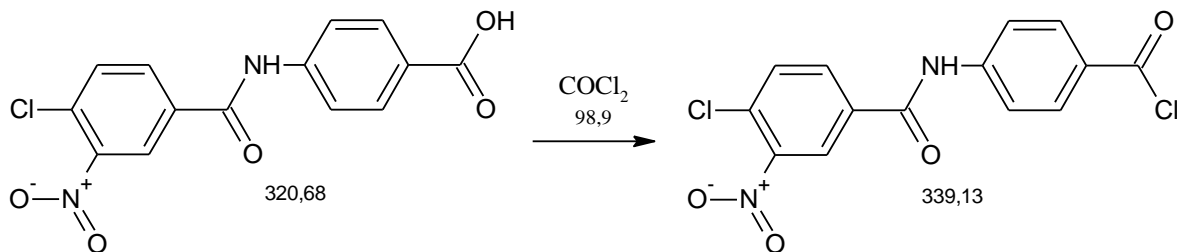
4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoová kyseliny	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	Kat. množství
Toluen	60 ml
COCl_2	5 g (0,05 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1. Bylo připraveno 1,83 g (výtěžek 91,5 %) produktu.

3.3.2.5 Příprava 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

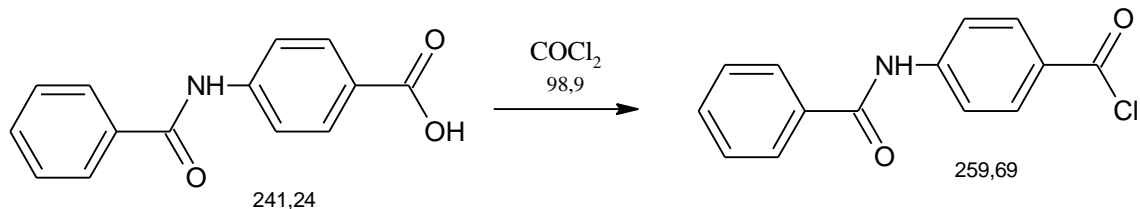
4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoová kyselina	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	Kat. množství
Toluen	60 ml
COCl_2	5 g (0,05 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1. Bylo připraveno 1,77 g (výtěžek 88,5 %) produktu.

3.3.2.6 Příprava 4-(benzoylamino)benzoylchloridu

Reakční schéma:



Násada:

4-(benzoylamino]benzoová kyselina	2 g (0,008 mol)
N,N-dimethylformamid	Kat. množství
Toluen	60 ml
COCl_2	5 g (0,05 mol)

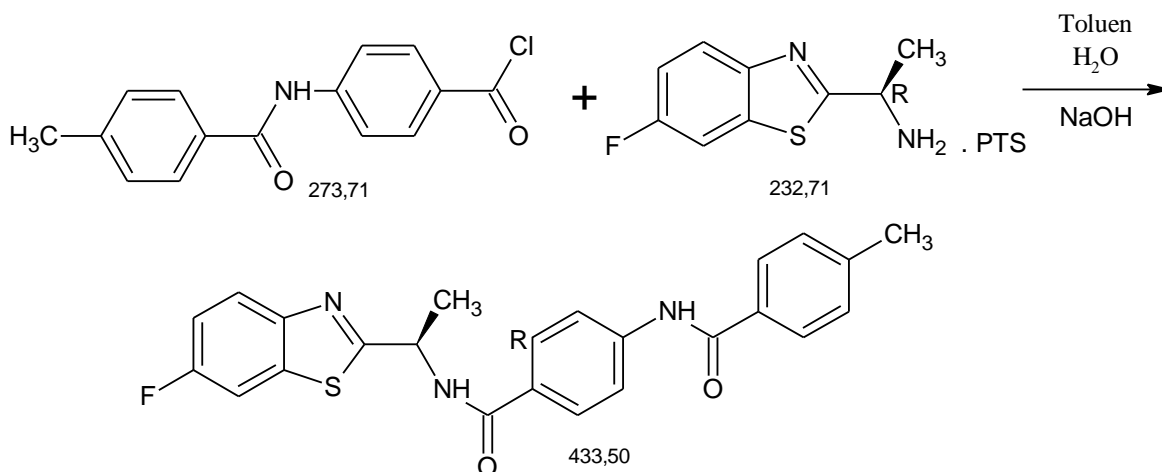
Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1. Bylo připraveno 1,86 g (výtěžek 93 %) produktu.

3.3.3 Příprava výsledných diamidů

3.3.3.1 Příprava 4-metyl-N-(4-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

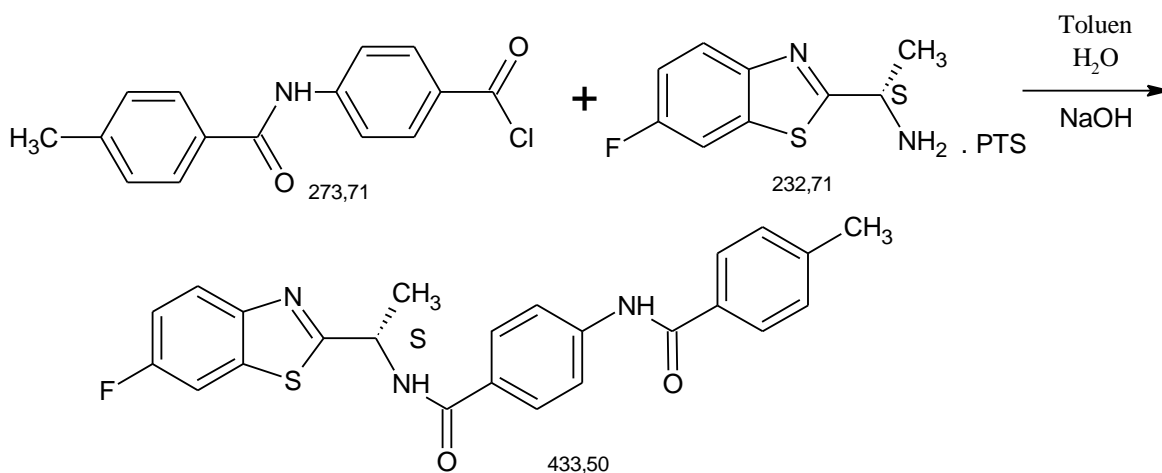
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	60 ml
4-[(4-metylbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Do 250 ml baňky bylo předloženo 1,47 g (1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin ve formě 4-toluensulfonové soli a 40 ml toluenu. Do této reakční směsi byl za míchání následně přidán roztok 1,1 g 4-[(4-metylbenzoyl)amino]benzoylchloridu v 20 ml toluenu. Do reakční směsi bylo dále přidáno 60 ml destilované vody. Dále bylo v reakční směsi přidávkem 10 % NaOH upraveno pH na hodnotu 10-11. Reakční směs byla míchána 3 hodiny. Vyloučený produkt byl zfiltrován a usušen na vzduchu. Po usušení byl produkt předložen do 250 ml baňky a bylo k němu přidáno 70 ml vody. Reakční směs byla vyhřáta na teplotu 70 °C a byla dále při této teplotě 30 minut míchána. Produkt byl následně odfiltrován a promyt 40 ml vody. Izolovaný produkt byl sušen stáním na vzduchu. Bylo připraveno 1,91 g (74 % výtežek) produktu.

3.3.3.2 Příprava 4-metyl-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

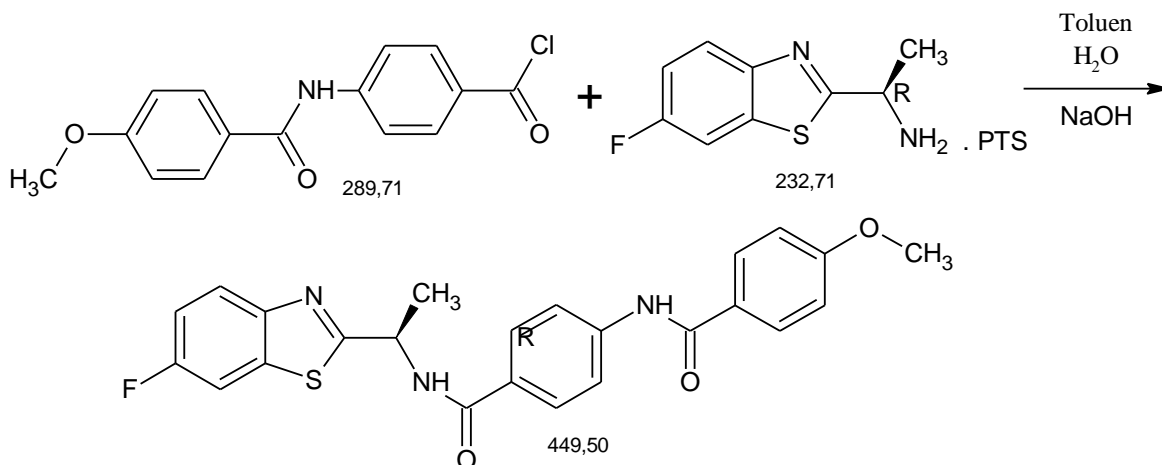
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-metylbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,89 g (73 % výtežek) produktu.

3.3.3.3 Příprava 4-metoxy-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)benzamidů

Reakční schéma:



Násada:

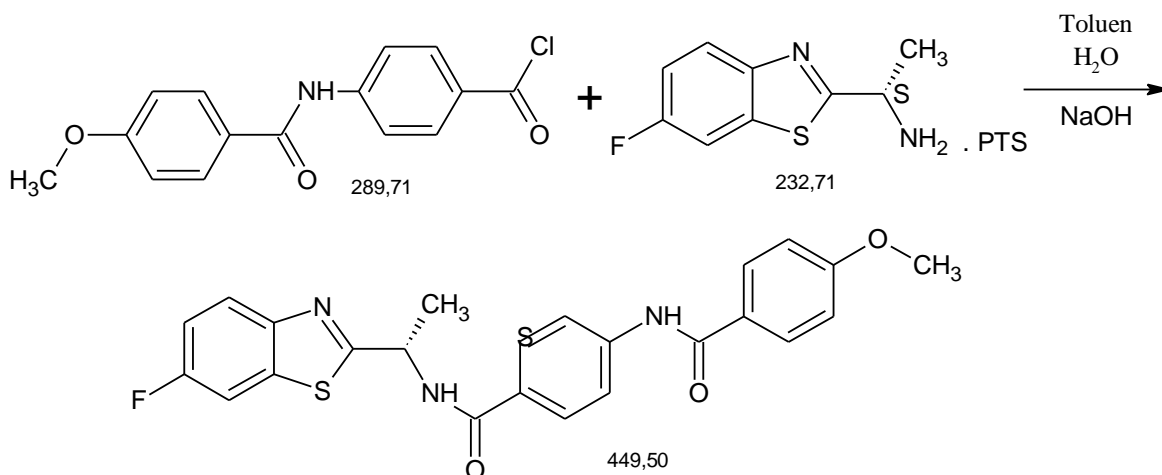
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-metoxybenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,97 g (76 % výtežek) produktu.

3.3.3.4 Příprava 4-metoxy-*N*-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

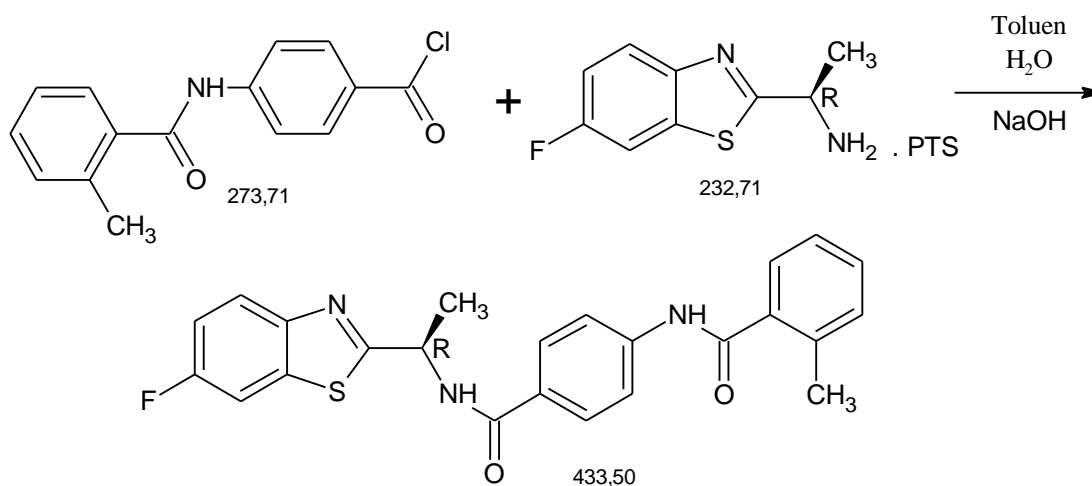
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-metoxybenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(<i>1S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,96 g (76 % výtěžek) produktu.

3.3.3.5 Příprava 2-metyl-*N*-(4-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl}fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

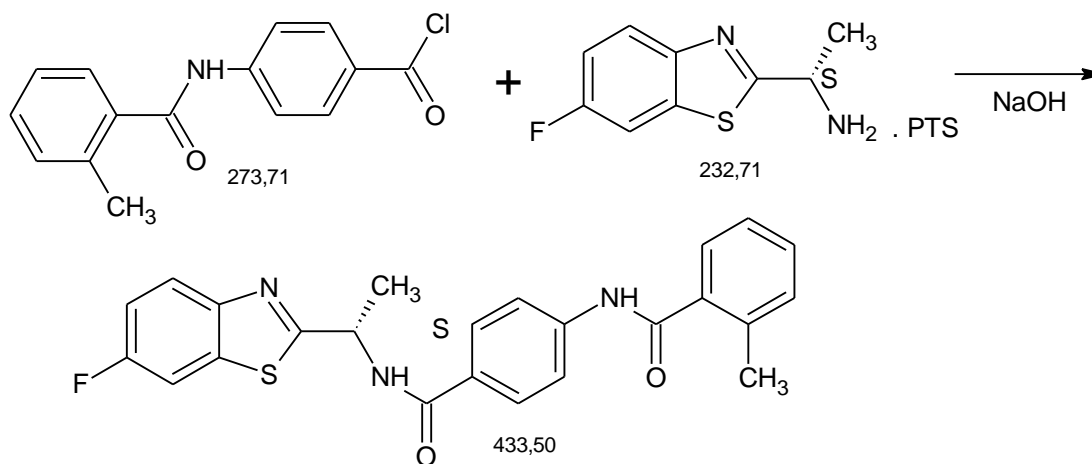
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(2-methylbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 2,01 g (78 % výtěžek) produktu.

3.3.3.6 Příprava 2-metyl-*N*-(4-[(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

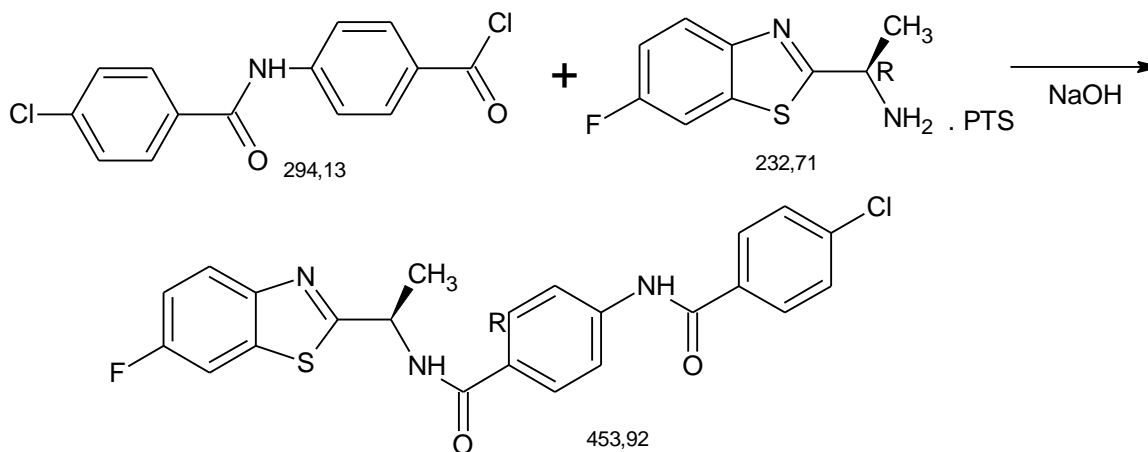
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(2-metylbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáným v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,98 g (77 % výtěžek) produktu.

3.3.3.7 Příprava 4-chlor-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

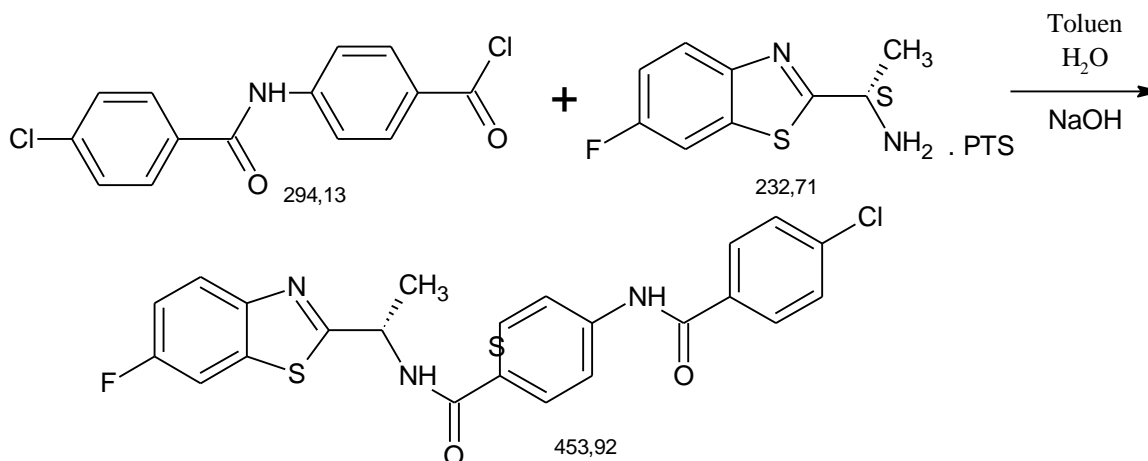
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(<i>(1R)</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.4.3.1. Bylo připraveno 1,93 g (75 % výtěžek) produktu.

3.3.3.8 Příprava 4-chlor-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamidů

Reakční schéma:



Násada:

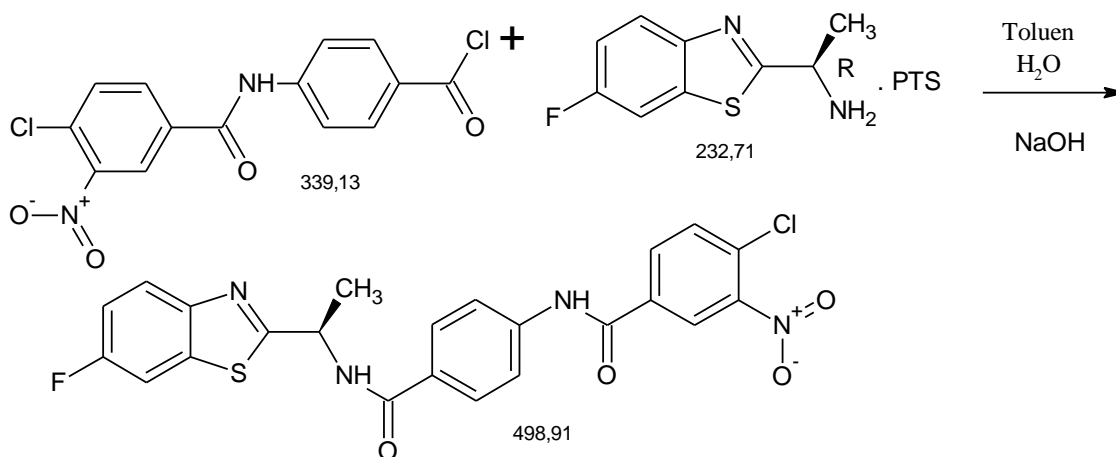
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(<i>(1S)</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,95 g (76 % výtěžek) produktu.

3.3.3.9 Příprava 4-chlor-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamid

Reakční schéma:



Násada:

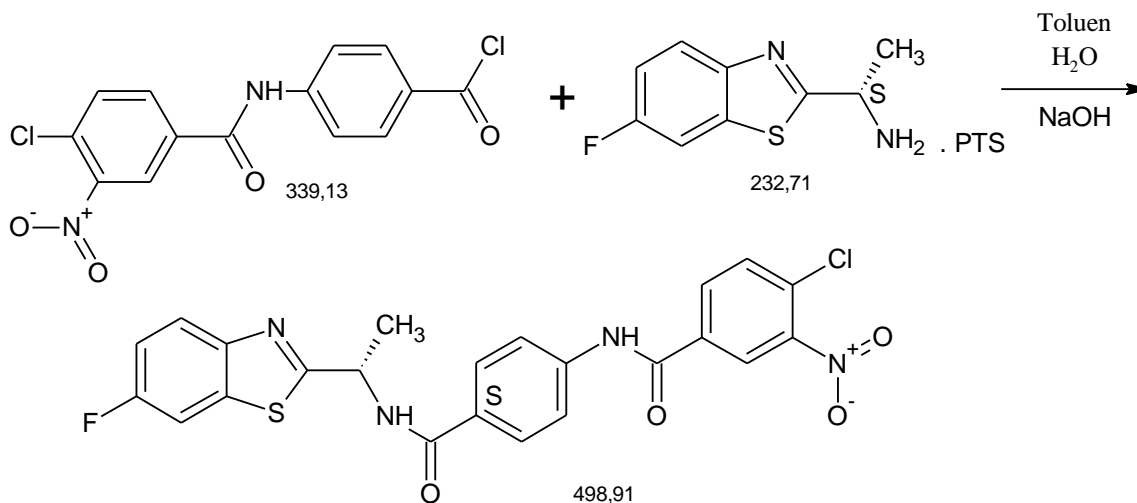
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(<i>1R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,96 g (76 % výtěžek) produktu.

3.3.3.10 Příprava 4-chlor-*N*-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamidů

Reakční schéma:



Násada:

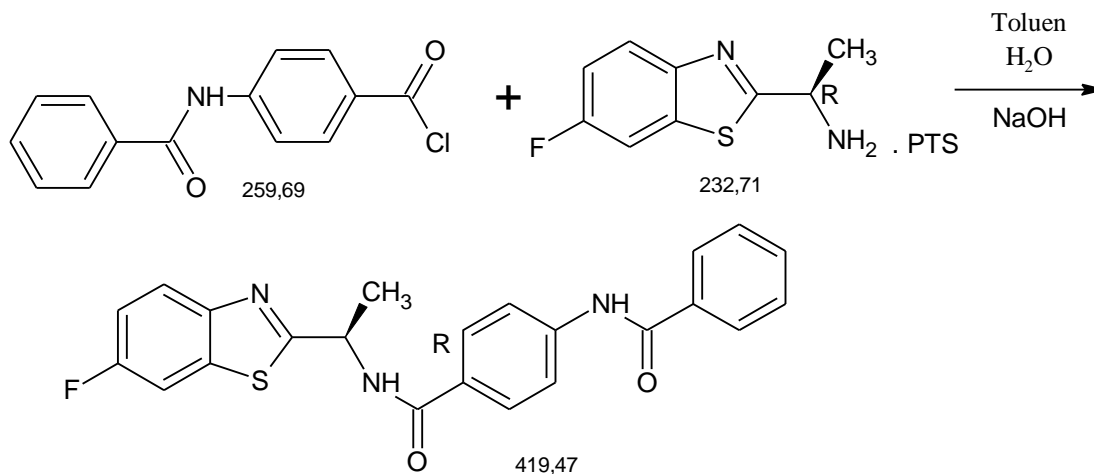
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,94 g (75 % výtěžek) produktu.

3.3.3.11 Příprava 4-(benzoylamino)-*N*-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

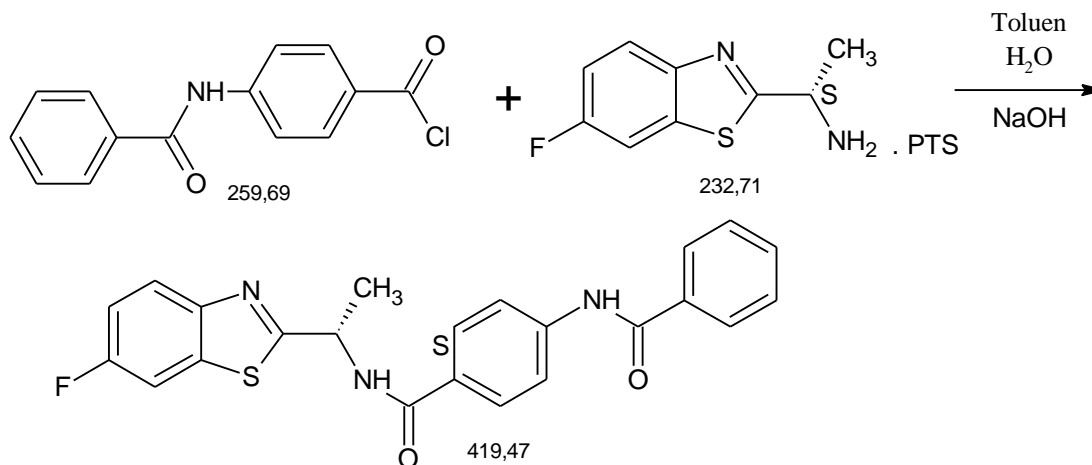
Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-(benzoylamino)benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,89 g (73 % výtěžek) produktu.

3.3.3.12 Příprava 4-(benzoylamino)-*N*-[(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]benzamidu

Reakční schéma:



Násada:

Destilovaná voda	60 ml
Toluen	20 ml
4-(aminobenzoyl)benzoylchlorid	1,1 g (0,004 mol)
(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanamin-PTS	1,47 g (0,004 mol)

Pracovní postup:

Produkt byl připraven postupem popsáním v kapitole 3.3.3.1. Bylo připraveno 1,85 g (72 % výtěžek) produktu.

3.4 Metody charakterizace

Bod tání

Teplota tání byla stanovena pomocí bodotávku Büchi Melting Point B -540. U bodotávku je možnost sledovat proces tání přes zvětšovací sklo a průběh reakce je viditelný na LCD displeji.

NMR spektroskopie

NMR spektra byla měřena v deuteriochloroformu a hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K na přístroji Bruker Avance 400 MHz v pulzním módu s Fourierovou transformací. Spektra byla měřena v 5-ti milimetrové širokopásmové laditelné sondě a frekvence použité při měření byly u ^1H spekter 400,13 MHz, pro ^{13}C spektra pak 100,62 MHz, a ^{19}F spektra 376,46 MHz. Všechna NMR spektra (^1H , ^{13}C a ^{19}F) byla měřena standardním způsobem. Hodnoty ^1H a ^{13}C chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ($\delta(^1\text{H}) = 7,25$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 77,0$ ppm (CDCl_3), ($\delta(^1\text{H}) = 2,5$ ppm ($\delta(^{13}\text{C}) = 39,5$ ppm (DMSO) a přepočteny do δ -stupnice.

Optická otáčivost

K měření byl použit Polarimetr M341 Perkin-Elmer. Polarimetr má zabudovanou sodíkovou výbojku (Na 589 nm) a rtuťovou výbojku (Hg 578, 546, 436 a 365 nm). Přístroj byl kalibrován na methanol.

$$[\alpha]_{\text{D}25} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

$$l = 1$$

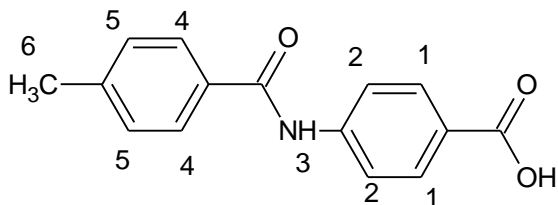
$$c = \text{g}/100\text{ml}$$

Stanovení elementární analýzy

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

3.5 Charakterizace 4-[(substituovanýchbenzoyl)amino]benzoových kyselin

3.5.1 4-[(4-metylbenzoyl)amino]benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 80%

Bod tání: 279,5-281,3 °C

¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,78 (1H, s, OH); 10,45 (1H, s, NH 3); 7,93 (6H, m, H1, H2, H4); 7,34 (2H, d, ³J = 8,3 Hz, H5); 2,38 (3H, s, H6).

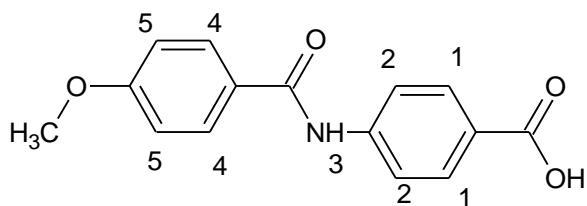
¹³C NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆): δ = 168,5; 167,2; 144,9; 143,4; 133,2; 131,7, 130,4; 129,3; 126,8; 120,9; 22,5.

Elementární analýza: C₁₅H₁₃NO₃ (M_r = 255,27)

Vypočteno: C(71,50 %), H(5,19 %), N(5,66 %)

Stanoveno: C(71,53 %), H(5,21 %), N(5,68 %)

3.5.2 4-[(4-metoxybenzoyl)amino]benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 83%

Bod tání: 309,4 – 312,2 °C

¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,64 (1H, s, OH); 10,37 (1H, s, NH 3); 7,98 (2H, d, ³J = 8,9 Hz, H1); 7,92 (4H, m, H2, H4); 7,07 (2H, d, ³J = 8,9 Hz, H5); 3,84 (3H, s, CH₃)

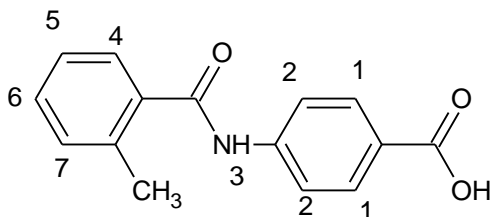
¹³C NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆): δ = 167,6; 165,9; 162,8; 144,2; 130,8; 130,4; 127,2; 125,9; 120,1; 114,3; 56,1.

Elementární analýza: C₁₅H₁₃NO₄ (M_r = 271,27)

Vypočteno: C(66,43 %), H(4,79 %), N(5,03 %)

Stanoveno: C(66,45 %), H(4,82 %), N(5,08 %)

3.5.3 4-[(2-metylbenzoyl)amino]benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 85%

Bod tání: 314,2 - 316 °C

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 12,78 (1H, s, OH); 10,62 (1H, s, NH3); 7,93 (1H, d, ³J = 8,9 Hz, H1); 7,69 (1H, d, ³J = 8,9 Hz, H2); 7,48 (1H, d, ³J = 7,6 Hz, H4); 7,40 (1H, dt, ³J = 7,0 Hz, ⁴J = 1,3 Hz H6); 7,31 (2H, m, H5, H7); 2,39 (3H, s, CH₃).

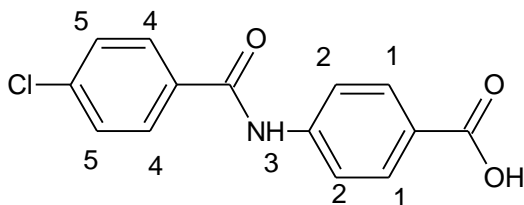
¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 168,5; 167,2; 144,9; 143,4; 133,2; 131,7; 130,4; 129,3; 126,8; 120,9; 22,5.

Elementární analýza: C₁₅H₁₃NO₃ (M_r = 255,27)

Vypočteno: C(70,65 %), H(5,01 %), N(5,50 %)

Stanoveno: C(70,69 %), H(5,04 %), N(5,53 %)

3.5.4 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 82 %

Bod tání: 327,1 - 331,2 °C

¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆): δ = 12,78 (1H, s, OH); 10,59 (1H, s, NH 3); 7,99 (2H, d, ³J = 8,7 Hz, H1); 7,93 (4H, m, H2, H4); 7,62 (2H, d, ³J = 8,7 Hz, H5).

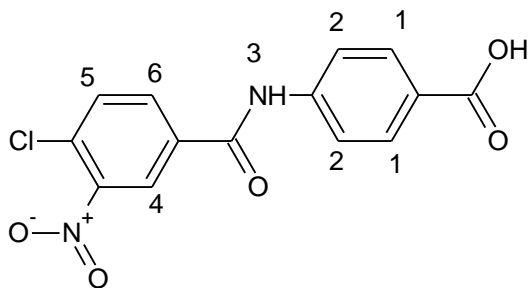
¹³C NMR (100.62 MHz, DMSO-d₆): δ = 167,0; 164,9; 143,1; 136,7; 133,3; 130,3; 129,8; 128,6; 125,7; 119,6.

Elementární analýza: C₁₄H₁₀ClNO₃ (M_r = 275,69)

Vypočteno: C(60,99 %), H(3,66 %), N(5,08 %)

Stanoveno: C(61,24 %), H(3,68 %), N(5,03 %)

3.5.5 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 83%

Bod tání: 328,7 – 330,8 °C

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,78 (1H, s, OH); 10,78 (1H, s, NH); 8,63 (H, d, 4J = 2,1 Hz, H4); 8,25 (H, dd, 3J = 8,4 Hz, 4J = 2,1 Hz, H6); 7,95 (3H, m, H2, H5); 7,88 (2H, d, 3J = 8,9 Hz, H1).

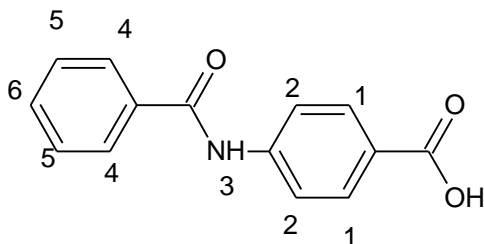
^{13}C NMR (100.62 MHz, DMSO- d_6): δ = 166,9; 162,9; 147,3; 142,7; 134,6; 133,0; 132,0; 130,3; 128,4; 126,1; 125,0; 119,7.

Elementární analýza: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_5$ (M_r = 320,68)

Vypočteno: C(52,46 %), H(2,73 %), N(8,81 %)

Stanoveno: C(52,49 %), H(2,74 %), N(8,83 %)

3.5.6 4-(fenylbenzoyl)benzoová kyselina



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 80%

Bod tání: 289,1 – 291,3 °C

^1H NMR (400.13 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,77 (1H, s, OH); 10,55 (1H, s, NH 3); 7,95 (6H, m, H1, H2, H4); 7,57 (3H, m, H5, H6).

^{13}C NMR (100.62 MHz, DMSO- d_6): δ = 167,0; 166,0; 143,3; 134,7; 131,9; 130,3; 128,5; 127,8; 125,5; 119,5.

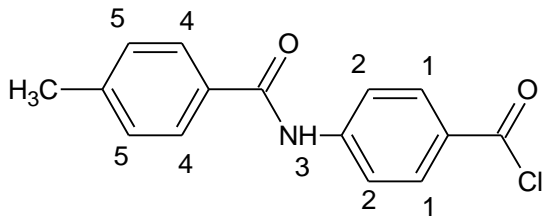
Elementární analýza: $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ($M_r = 241,24$)

Vypočteno: C(69,70 %), H(4,60 %), N(5,81 %)

Stanoveno: C(70,01 %), H(4,58 %), N(6,03 %)

3.6 Charakterizace 4-[(substituovanýchbenzoyl)amino]benzoylchloridů

3.6.1 4-[(4-metylbenzoyl)amino]benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

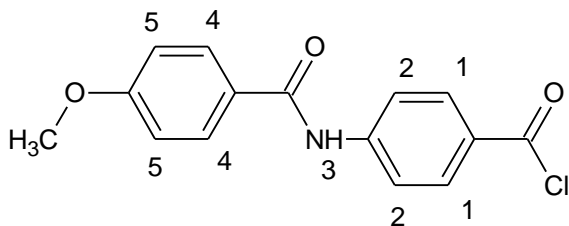
Výtěžek: 90%

Bod tání: 77,5 – 78,9 °C

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ= 8,15 (2H, d, ³J = 8,7 Hz, H1); 8,03 (2H, d, ³J = 8,4Hz, H4); 7,28 (2H, d, ³J = 8,2 Hz, H5); 7,05 (2H, d, ³J = 8,7 Hz, H2); 2,4 (3H, s, H6)

¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃):δ= 167,6; 154,2; 145,5; 143,6; 132,8; 131,9; 129,6; 129,4; 129,3; 120,7; 21,5.

3.6.2 4-[(4-metoxybenzoyl)amino]benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

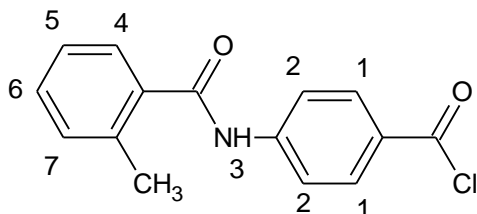
Výtěžek: 87,5%

Bod tání: 105,6 – 109,2 °C

^1H NMR (400.13 MHz, CDCl_3): δ = 8,15 (2H, d, 3J = 8,7 Hz, H1); 8,09 (2H, d, 3J = 8,9 Hz, H4); 7,04 (2H, d, 3J = 8,7 Hz, H5); 6,96 (2H, d, 3J = 8,9 Hz, H2); 3,88 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 167,8; 163,6; 154,5; 145,1; 133,0; 131,8; 129,4; 127,2; 121,1; 114,1; 55,8.

3.6.3 4-[(2-metylbenzoyl)amino]benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

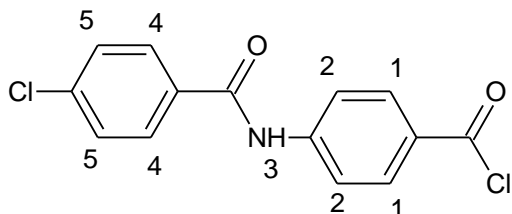
Výtěžek: 97%

Bod tání: 51,9 – 54,3 °C

^1H NMR (400.13 MHz, ν): = 8,17 (2H, d, $^3J = 8,6$ Hz, H1); 7,80 (1H, d, $^3J = 7,9$ Hz, H4); 7,40 (1H, t, $^3J = 7,4$ Hz, H6); 7,30 (2H, m, H5, H7); 7,06 (2H, d, $^3J = 8,5$ Hz, H2); 2,59 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (100.62 MHz, CDCl_3): 167,8; 153,7; 137,6; 135,6; 133,4; 133,1; 131,6; 131,4; 130,2; 129,8; 126,3; 120,6; 119,2; 21,4.

3.6.4 4-[(4-chlorbenzoyl)amino]benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

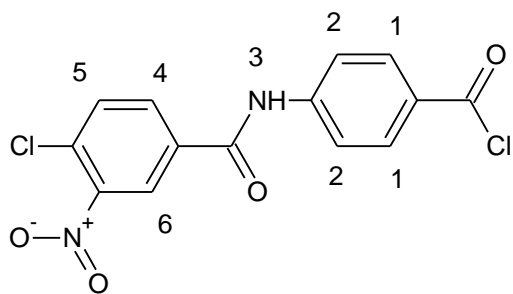
Výtěžek: 91,5%

Bod tání: 115 – 116,2 °C

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ= 8,17 (2H, d, ³J = 8,7 Hz, H1); 8,08 (2H, d, ³J = 8,9 Hz, H4); 7,47 (1H, t, ³J = 8,9 Hz, H5); 7,05 (1H, d, ³J = 8,7 Hz, H2).

¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ= 167,6; 154,0; 144,7; 139,3; 133,4; 133,0; 131,0; 129,7; 129,1; 120,8.

3.6.5 4-[(4-chlor-3-nitrobenzoyl)amino]benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

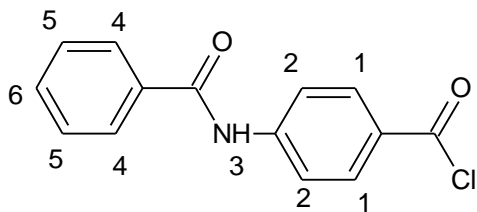
Výtěžek: 88,5%

Bod tání: 154,3 – 157,0 °C

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): δ = 8,53 (H, d, ⁴J = 2,3 Hz, H4); 8,34 (H, dd, ³J = 8,6 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, H6); 8,9čř (3H, m, H2, H5); 7,88 (2H, d, ³J = 8,9 Hz, H1).

¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 166,9; 162,9; 148,3; 144,7; 135,6; 133,0; 132,0; 130,3; 128,4; 127,1; 125,0; 119,7.

3.6.6 4-(benzoylamino)benzoylchlorid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 93%

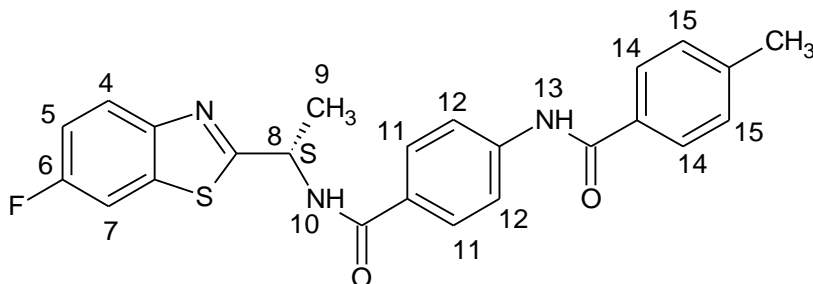
Bod tání: 81,3 – 85,4 °C

^1H NMR (400.13 MHz, CDCl_3): δ = 8,16 (4H, m, H1, H4); 7,57 (1H, t, $^3J = 7,2$ Hz, H6); 7,48 (2H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H2); 7,05 (1H, d, $^3J = 8,5$ Hz, H2);

^{13}C NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 167,6; 154,0; 145,6; 134,6; 132,8; 132,7; 129,5; 129,4; 128,6; 120,6.

3.7 Charakterizace výsledných diamidů

3.7.1 4-metyl-N-(4-[[[(1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl]benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 74%

Bod tání: 270,1 – 275,9 °C

Vzhled: Bílá pevná lát

$[\alpha]_D^{25} = -71,0$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,42$ (1H, s, NH_{13}); 9,21 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 7,99 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,98 – 7,92 (5H, m, H7, H11, H12); 7,90 (2H, d, $^3J = 8,2$ Hz, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 7,35 (2H, d, $^3J = 8,2$ Hz, H15); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,39 (3H, s, CH_3); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,3$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 165,8; 165,7; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,3$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,4$ Hz); 142,4; 142,0; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 131,7; 128,4; 128,3; 127,8; 128,4; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,5$ Hz); 119,5; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 48,0; 21,1; 19,9.

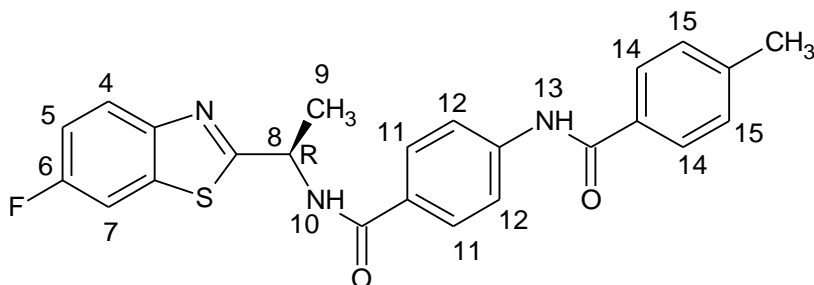
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 43350$)

Vypočteno: C(66,50 %), H(4,65 %), N(6,96 %), S(7,40 %),.

Stanoveno: C(66,68 %), H(4,60 %), N(6,83 %), S(7,57 %)

3.7.2 4-metyl-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 73%

Bod tání: 267,2 – 272,3 °C

$[\alpha]_D^{25} = +71,6$ (c = 1, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,42$ (1H, s, NH_{13}); 9,21 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 7,99 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,9$ Hz, H4); 7,98 – 7,92 (5H, m, H7, H11, H12); 7,90 (2H, d, $^3J = 8,2$ Hz, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 7,35 (2H, d, $^3J = 8,2$ Hz, H15); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,39 (3H, s, CH_3); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,3$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 165,8; 165,7; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,3$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,4$ Hz); 142,4; 142,0; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 131,7; 128,4; 128,3; 127,8; 128,4; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,5$ Hz); 119,5; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,9$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 48,0; 21,1; 19,9.

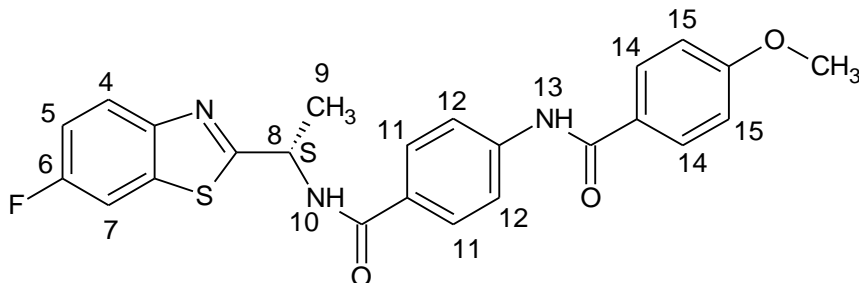
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 43350$)

Vypočteno: C(66,50 %), H(4,65 %), N(6,96 %), S(7,40 %),.

Stanoveno: C(66,66 %), H(4,57 %), N(6,80 %), S(7,54 %)

3.7.3 4-metoxy-*N*-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 76%

Bod tání: 272,6 – 274,9 °C

$[\alpha]_D^{25} = -52,0$ (c = 1, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,35$ (1H, s, NH13); 9,20 (1H, d, $^3J = 7,5$ Hz, NH10); 8,00 - 7,90 (8H, m, H4, H7, H11, H12, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 7,07 (2H, d, $^3J = 8,8$ Hz, H15); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,84 (3H, s, OCH3); 1,69 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,2$ Hz); 165,8; 165,2; 162,1; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 241,9$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,5$ Hz); 142,5; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 129,8; 128,3; 126,6; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,7$ Hz); 119,4; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,1$ Hz); 113,7; 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 26,9$ Hz); 55,5; 47,9; 19,9.

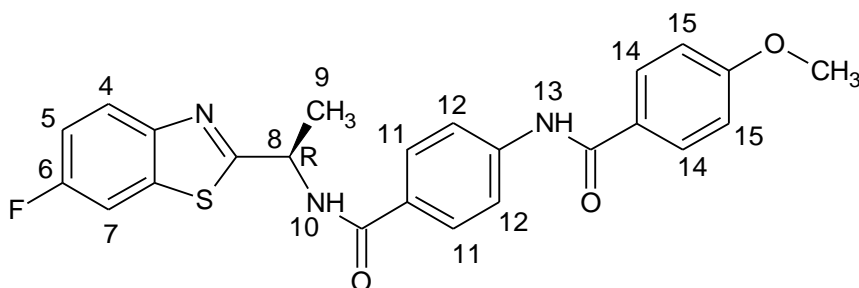
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: C₂₄H₂₀FN₃O₃S (M_r = 449,50)

Vypočteno: C(64,13 %), H(4,48 %), N(6,35 %), S(7,13 %),.

Stanoveno: C(64,00 %), H(4,55 %), N(6,60 %), S(7,07 %)

3.7.4 4-metoxy-*N*-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 76%

Bod tání: 268,7 – 275,8 °C

$[\alpha]_D^{25} = +52,3$ ($c = 1$, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,34$ (1H, s, NH_{13}); 9,20 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 8,00 - 7,90 (8H, m, H4, H7, H11, H12, H14); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 7,07 (2H, d, $^3J = 8,87$ Hz, H15); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,84 (3H, s, OCH_3); 1,69 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 165,8; 165,2; 162,1; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,3$ Hz); 142,5; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,9$ Hz); 129,8; 128,3; 126,6; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,7$ Hz); 119,4; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,1$ Hz); 113,7; 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 55,5; 47,9; 19,9.

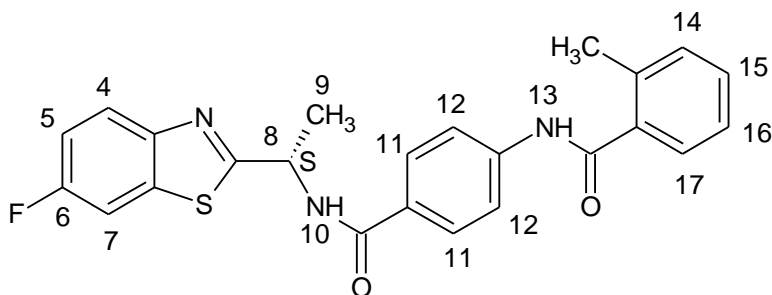
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ ($M_r = 449,50$)

Vypočteno: C(64,13 %), H(4,48 %), N(6,35 %), S(7,13 %),.

Stanoveno: C(64,03 %), H(4,54 %), N(6,57 %), S(7,02 %)

3.7.5 2-metyl-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 78%

Bod tání: 266,8 – 270,5 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = - 77,7$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,57$ (1H, s, NH13); 9,20 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH10); 7,99 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 5,0$ Hz, H4); 7,97 – 7,94 (3H, m, H7, H12, H17); 7,86 (2H, d, $^3J = 8,6$ Hz, H11); 7,49 – 7,29 (5H, m, H5, H14, H15, H16); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,39 (3H, s, CH₃); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,2$ Hz); 168,2; 165,6; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,3$ Hz); 149,7; 142,3; 136,8; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 135,3; 130,6; 129,9; 128,4; 128,3; 127,3; 125,7; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 118,8; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 48,0; 19,9; 19,3.

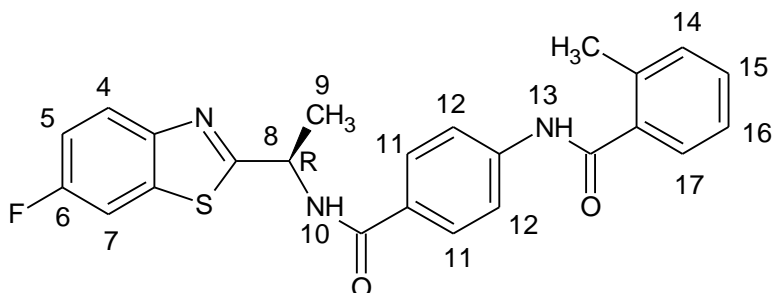
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: C₂₄H₂₀FN₃O₂S ($M_r = 43350$)

Vypočteno: C(66,50 %), H(4,65 %), N(6,96 %), S(7,40 %),.

Stanoveno: C(66,62 %), H(4,60 %), N(6,81 %), S(7,52 %)

3.7.6 2-metyl-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 77%

Bod tání: 255,5 – 259,0 °C

$[\alpha]_D^{25} = +78,1$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,56$ (1H, s, NH_{13}); 9,20 (1H, d, $^3J = 7,8$ Hz, NH_{10}); 7,99 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,8$ Hz, H4); 7,97 – 7,94 (3H, m, H7, H12, H17); 7,86 (2H, d, $^3J = 8,8$ Hz, H11); 7,49 – 7,29 (5H, m, H5, H14, H15, H16); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 2,39 (3H, s, CH_3); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 168,2; 165,6; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 149,; 142,3; 136,8; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 135,3; 130,6; 129,9; 128,4; 128,3; 127,3; 125,7; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 118,8; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,0$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 48,0; 19,9; 19,3.

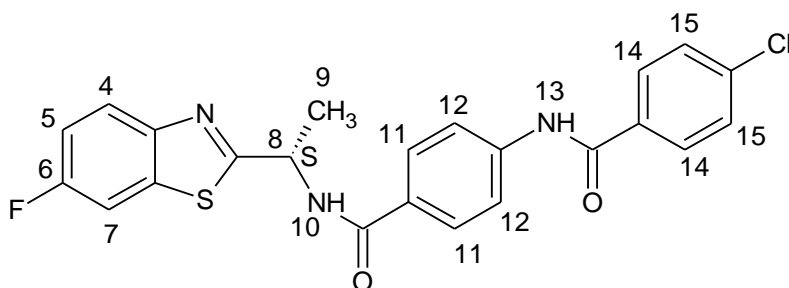
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 43350$)

Vypočteno: C(66,50 %), H(4,65 %), N(6,96 %), S(7,40 %),.

Stanoveno: C(66,65 %), H(4,60 %), N(6,83 %), S(7,55 %)

3.7.7 4-chlor-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 75%

Bod tání: 272,5 – 277,0 °C

$[\alpha]_D^{25} = -64,2$ (c = 1, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,58$ (1H, s, NH_{13}); 9,23 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 8,02 – 7,89 (8H, m, H₄, H₇, H₁₁, H₁₂, H₁₄); 7,62 (2H, d, $^3J = 8,6$ Hz, H₁₅); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,5$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H₅); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H₈); 1,69 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H₉).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 165,8; 164,8; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 241,9$ Hz); 149,8; 142,1; 136,7; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 133,3; 129,8; 128,7; 128,6; 128,4; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 119,6; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,1$ Hz); 48,0; 19,9.

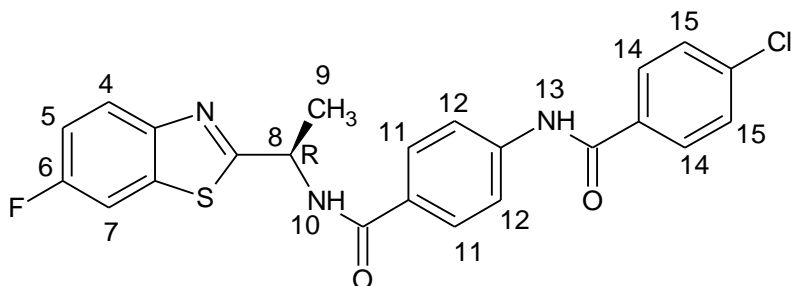
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: C₂₃H₁₇ClFN₃O₂S (M_r = 453,92)

Vypočteno: C(60,86 %), H(3,77 %), N(9,26 %), S(7,06 %),.

Stanoveno: C(60,73 %), H(3,83 %), N(9,38 %), S(6,97 %)

3.7.8 4-chlor-*N*-(4-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 76%

Bod tání: 269,1 – 274,0 °C

$[\alpha]_D^{25} = +64,7$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,59$ (1H, s, NH13); 9,23 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH10); 8,02 – 7,89 (8H, m, H4, H7, H11, H12, H14); 7,62 (2H, d, $^3J = 8,5$ Hz, H15); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 1,69 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,1$ Hz); 165,8; 164,8; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,1$ Hz); 149,8; 142,1; 136,7; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 133,3; 129,8; 128,7; 128,6; 128,4; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 119,6; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,0$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 48,0; 19,9.

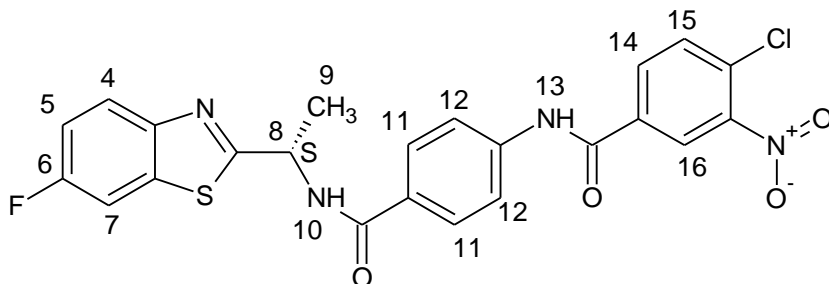
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 453,92$)

Vypočteno: C(60,86 %), H(3,77 %), N(9,26 %), S(7,06 %),.

Stanoveno: C(60,70 %), H(3,81 %), N(9,36 %), S(6,94 %)

3.7.9 4-chlor-N-(4-[(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid



Vzhled: Nažloutlá pevná látka

Výtěžek: 76%

Bod tání: 181,7 – 183,9 °C

$[\alpha]_D^{25} = -44,3$ (c = 1, methanol)

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 10,81$ (1H, s, NH13); 9,26 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH10); 8,66 (1H, d, $^4J = 2,1$ Hz, H14); 8,29 (1H, dd, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,1$ Hz, H5); 8,01 - 7,94 (5H, m, H12, H15, H16); 7,90 (2H, d, $^3J = 8,8$ Hz, H12); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 176,8; 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,1$ Hz); 165,8; 162,8; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 149,7; 147,4; 141,6; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,4$ Hz); 134,6; 133,0; 132,0; 129,1; 128,4; 128,3; 125,0; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 119,7; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,3$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 45,0; 19,9.

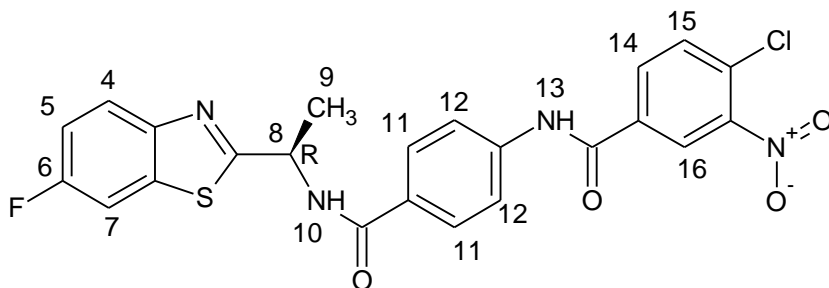
^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: C₂₃H₁₆ClFN₄O₄S (M_r = 498,91)

Vypočteno: C(55,37 %), H(3,23 %), N(11,23 %), S(6,43 %),.

Stanoveno: C(55,50 %), H(3,30 %), N(11,05 %), S(6,32 %)

3.7.10 4-chlor-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid



Vzhled: Nažloutlá pevná látka

Výtěžek: 75%

Bod tání: 210,5 – 216,9 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +44,6$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,80$ (1H, s, NH13); 9,26 (1H, d, $^3J = 7,8$ Hz, NH10); 8,66 (1H, d, $^4J = 2,0$ Hz, H14); 8,29 (1H, dd, $^3J = 8,5$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, H5); 8,01 - 7,94 (5H, m, H12, H15, H16); 7,90 (2H, d, $^3J = 8,7$ Hz, H12); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 5,51 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,8; 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 165,8; 162,8; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,0$ Hz); 149,7; 147,4; 141,6; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$ Hz); 134,6; 133,0; 132,0; 129,1; 128,4; 128,3; 125,0; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,8$ Hz); 119,7; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,7$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 45,0; 19,9.

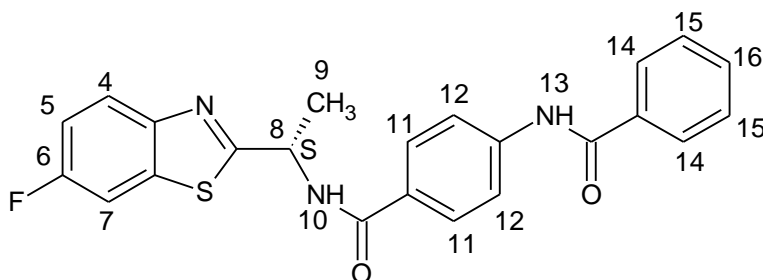
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: C₂₃H₁₆ClFN₄O₄S ($M_r = 498,91$)

Vypočteno: C(55,37 %), H(3,23 %), N(11,23 %), S(6,43 %),.

Stanoveno: C(55,47 %), H(3,30 %), N(11,01 %), S(6,30 %)

3.7.11 N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluoro-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]carbamoyl]phenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 73%

Bod tání: 231,6 - 235,5

$[\alpha]_D^{25} = -48,0$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,51$ (1H, s, NH_{13}); 9,22 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 7,96 (8H, m, H4, H7, H11, H12, H14); 7,62 (1H, t, $^3J = 7,2$ Hz, H16); 7,55 (2H, t, $^3J = 7,2$ Hz, H15); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 5,52 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 1,69 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,1$ Hz); 165,8; 165,7; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,5$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,2$ Hz); 142,3; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 134,6; 131,8; 128,5; 128,4; 128,3; 127,8; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,4$ Hz); 119,5; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 47,9; 19,9.

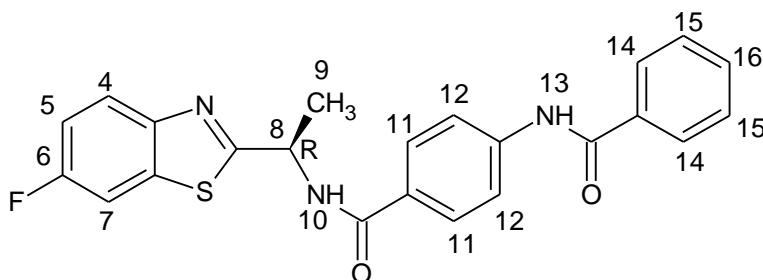
$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 419,47$)

Vypočteno: C(65,86 %), H(4,33 %), N(10,02 %), S(7,64 %),.

Stanoveno: C(65,70 %), H(4,28 %), N(10,13 %), S(7,52 %)

3.7.12 N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluoro-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]carbamoyl]phenyl)benzamid



Vzhled: Bílá pevná látka

Výtěžek: 72%

Bod tání: 241,3 – 244,7

$[\alpha]_D^{25} = +48,8$ ($c = 1$, methanol)

$^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10,51$ (1H, s, NH_{13}); 9,22 (1H, d, $^3J = 7,6$ Hz, NH_{10}); 7,96 (8H, m, H4, H7, H11, H12, H14); 7,62 (1H, t, $^3J = 7,3$ Hz, H16); 7,55 (2H, t, $^3J = 7,0$ Hz, H15); 7,37 (1H, dt, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 5,52 (1H, kv, $^3J = 7,2$ Hz, H8); 1,70 (3H, d, $^3J = 7,2$ Hz, H9).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,62 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 176,2$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 165,8; 165,7; 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,5$ Hz); 149,7 (d, $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,3$ Hz); 142,3; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 134,6; 131,8; 128,5; 128,4; 128,3; 127,8; 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,4$ Hz); 119,5; 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 25,0$ Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 47,9; 19,9.

$^{19}\text{F NMR}$ (376,46 MHz, DMSO- d_6): $\delta = -116,6$

Elementární analýza: $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ ($M_r = 419,47$)

Vypočteno: C(65,86 %), H(4,33 %), N(10,02 %), S(7,64 %),.

Stanoveno: C(65,73 %), H(4,26 %), N(10,17 %), S(7,50 %)

3.8 Antimikrobiální testování

3.8.1 Bakteriální kmeny

Testovány byly celkem 4 druhy bakterií *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (**Tabulka 1**).

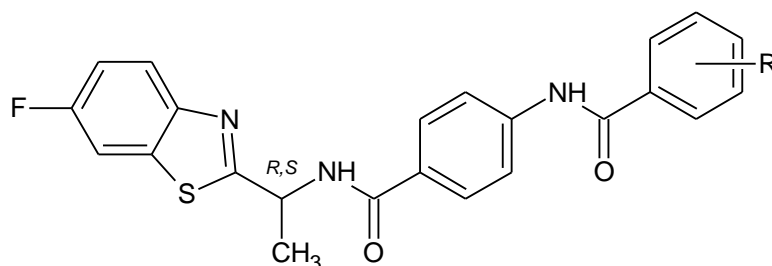
Tabulka 1: Přehled referenčních kmenů použitých pro testování antibakteriálních účinků diamidů na bázi benziazolů.

Bakterie	Referenční číslo	Původ
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4517	Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4223	Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	Česká sbírka mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně

Bakterie byly inkubovány za aerobních podmínek na TSA agaru při teplotě 37°C, 24 hodin. Podmínky inkubace byly po celou dobu experimentu neměnné. Všechny mikroorganismy byly uchovávány v lednici pro mikrobiologické kultury a byly pravidelně každých 24 hodin přeočkovány na vhodná živná média [79].

3.8.2 Testované látky

Obecná struktura testovaných diamidů na bázi benzthiazolů a kyseliny 4-aminobenzoové je vyobrazena na **obrázku 24**. V **Tabulce 2** jsou přehledně zobrazeny použité diamidy, typ postranního řetězce navázaného na benzenovém jádru a také systematický název jednotlivých látek.



Obrázek 24: Obecná struktura diamidů na bázi benzthiazolů a kyseliny 4-aminobenzoové.

Označení	R	Systematický název
1a	4-Chl-3-NO ₂	4-chlor-N-(4-{{[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid
1b	4-Chl-3-NO ₂	4-chlor-N-(4-{{[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl)-3-nitrobenzamid
1c	2-CH ₃	2-methyl-N-(4-{{[(1 <i>S</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl}phenyl)benzamid
1d	2-CH ₃	2-methyl-N-(4-{{[(1 <i>R</i>)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl}phenyl)benzamid

3.8.3 Kultivační média

TSA agar

HiMedia, Indie

Složení:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g/l
Sojový pepton	5 g/l
Chlorid sodný	5 g/l
Agar	15 g/l

Příprava:

40 g přípravku v 1000 ml destilované vody bylo zahříváno do úplného rozpuštění a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Mueller-Hintonův Bujón

HiMedia, Indie

Složení:

Hovězí masová infuze	300 g/l
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	17,5 g/l
Škrob	1,5 g/l

Příprava:

21 g přípravku v 1000 ml destilované vody bylo zahříváno do úplného rozpuštění, rozplněno dle požadavků a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

BHI Bujón

HiMedia, Indie

Složení:

Telecí mozková infuse	200 g/l
Infuse z hovězího srdce	250 g/l

Proteosový pepton	10 g
Chlorid sodný	5 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)sodný	2,5 g/l
Dextrosa	2 g/l

Příprava:

37 g přípravku v 1000 ml destilované vody bylo zahříváno do úplného rozpuštění, rozplněno do zkumavek a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

3.8.4 Reagencia

Fyziologický roztok

Složení:

Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Příprava:

8,5 g chloridu sodného bylo naváženo a rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Při teplotě 121°C byl roztok sterilizován po dobu 15 minut v autoklávu. Dále byl skladován při chladničkové teplotě (2–5 °C).

3.8.5 Chemikálie

Sulfamethoxazol, SIGMA-ALDRICH

Ampicilin, SIGMA-ALDRICH

Ethanol 96 %, PENTA, ČR

Chlorid sodný, LACHEMA, ČR

Dimethylsulfoxid 99,99 %, DMSO, SIGMA, ČR

NaOH

3.8.6 Bakteriální kultury

Všechny kultury pocházejí z České sbírky mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně.

Escherichia coli CCM 3954

Staphylococcus aureus CCM 4223

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955

Enterococcus faecalis CCM 4224

3.8.7 Pomůcky a přístroje

- **Přístroje a zařízení:** analytické a laboratorní váhy (Kern), plynový kahan, chladnička, termostat, vortex (IKA Vortex Genius 3), nefelometr (Densi-La-Meter II, Erba Lachema), jednokanálové pipety (Biohit), horkovzdušný sterilizátor (BMT, Sterimat 51042), autokláv.
- **Jednorázové sterilní pomůcky:** bakteriologické kličky, kalibrované špičky, mikrotitrační 96ti-jamkové destičky, plastové Petriho misky, plastové zkumavky.
- **Další pomůcky:** Odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky, plastové a kovové stojánky.

3.9 Pracovní postup

3.9.1 Příprava bakteriální suspenze

Kultury testovaných mikroorganismů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* byly inkubovány v médiu BHI 24 h při 37 °C v mikrozkušavkách typu eppendorf. Po inkubaci byly zkumavky odstředěny v centrifuze, supernatant byl odstraněn a přidáním fyziologického roztoku byla vytvořena bakteriální suspenze, která odpovídala 0,5 stupni MCFarlandovy zákalové stupnice. Stupeň zákalu bakteriální suspenze tak odpovídal $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/1 ml. Stupeň zákalu byl kontrolován laboratorním denzitometrem.

3.9.2 Příprava zásobních roztoků antibiotik a diamidů

Zásobní roztoky antibiotik tvořily dvě zkumavky. V jedné zkumavce bylo rozpuštěno 51,2 g antibiotika Ampicilinu v 10 ml fosfátového pufru (pH = 8). Ve druhé zkumavce bylo rozpuštěno 102,4 g antibiotika Sulfamethoxazolu v 10 ml 2M NaOH.

Zásobní roztoky diamidů tvořily celkem 4 zkumavky. Do každé zkumavky bylo naváženo 51,2 g testované látky a následně toto množství bylo rozpuštěno v 10 ml DMSO. Z takto připravených zásobních roztoků jak antibiotik, tak diamidů byly připraveny ředící řady.

3.9.3 Příprava ředící řady jednotlivých látek

3.9.3.1 Příprava ředící řady antibiotik

Ze zásobních roztoků antibiotik byly připraveny ředící řady (**Tabulka 3 a Tabulka 4**). Bylo použito dvojkového ředění.

Tabulka 3: Ředící řada Ampicilinu.

Ředící řada antibiotika Ampicilinu (AMP)				
Zkumavka	Koncentrace [µg/ml]	Zdroj výchozího roztoku	M-H bujon	celkový počet ml
1	512	1 ml ze zásob. roztoku AMP	9 ml	10
2	256	1 ml ze zkumavky č. 1 (512)	1 ml	2
3	128	1 ml ze zkumavky č. 1 (512)	3 ml	4
4	64	1 ml ze zkumavky č. 1 (512)	7 ml	8
5	32	1 ml ze zkumavky č. 4 (64)	1 ml	2
6	16	1 ml ze zkumavky č. 4 (64)	3 ml	4
7	8	1 ml ze zkumavky č. 4 (64)	7 ml	8
8	4	1 ml ze zkumavky č. 7 (8)	1 ml	2
9	2	1 ml ze zkumavky č. 7 (8)	3 ml	4
10	1	1 ml ze zkumavky č. 7 (8)	7 ml	8
11	0,5	1 ml ze zkumavky č. 10 (1)	1 ml	2
12	0,25	1 ml ze zkumavky č. 10 (1)	3 ml	4

Tabulka 4: Ředící řada Sulfamethoxazolu.

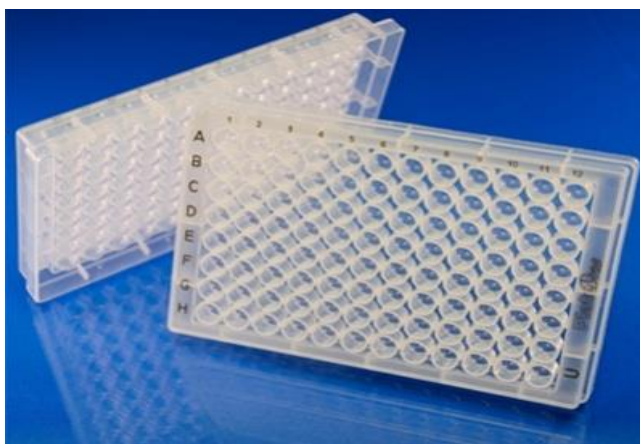
Ředící řada antibiotika Sulfomethoxazolu (SULF.)				
Zkumavka	Koncentrace [µg/ml]	Zdroj výchozího roztoku	M-H bujon	celkový počet ml
1	1024	1 ml ze zásob. roztoku SULF.	9 ml	10
2	512	1 ml ze zkumavky č. 1 (1024)	1 ml	2
3	256	1 ml ze zkumavky č. 2 (512)	1 ml	4
4	128	1 ml ze zkumavky č. 1 (512)	3 ml	8
5	64	1 ml ze zkumavky č. 1 (512)	7 ml	2
6	32	1 ml ze zkumavky č. 5 (64)	1 ml	4
7	16	1 ml ze zkumavky č. 5 (64)	3 ml	8
8	8	1 ml ze zkumavky č. 5 (64)	7 ml	2
9	4	1 ml ze zkumavky č. 8 (8)	1 ml	4
10	2	1 ml ze zkumavky č. 8 (8)	3 ml	8
11	1	1 ml ze zkumavky č. 8 (8)	7 ml	2
12	0,5	1 ml ze zkumavky č. 11 (1)	1 ml	4

3.9.3.2 Příprava ředící řady diamidů

Příprava ředících řad diamidů vycházely z ředící řady antibiotika Ampicilinu (**Tabulka 3**). Celkem tedy byly připraveny 4 ředící řady po 12 zkumavkách.

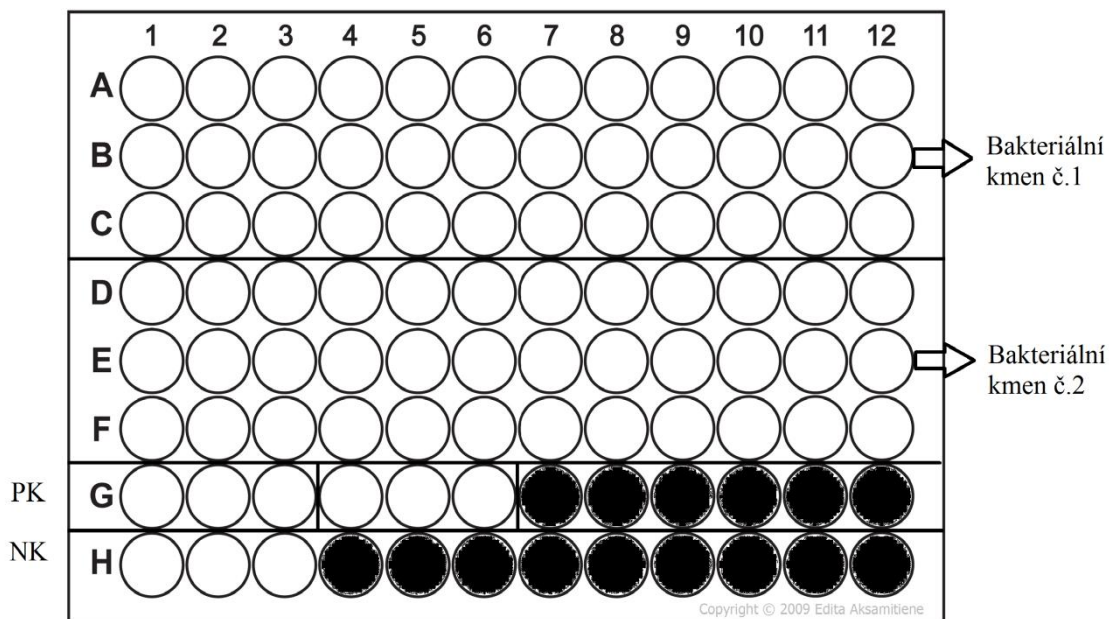
3.10 Mikrodiluční metoda v bujónu

Pro stanovení antibakteriální aktivity testovaných látek (**Tabulka 2**) byla použita mikrodiluční metoda v bujónu. Jedná se o metodu, kdy jsou plněny malé objemy do sterilní mikrotitrační destičky s jamkami s okrouhle kónickým dnem. V našem případě byly použity mikrotitrační destičky s 96 jamkami (**Obrázek 25**). Destičky byly rozděleny na čtyři části. První a druhou část tvořily vždy triplety jamek. Třetí část zahrnovala pozitivní kontrolu (PK) a poslední část tvořila negativní kontrolu (NK) (**Obrázek 26**).



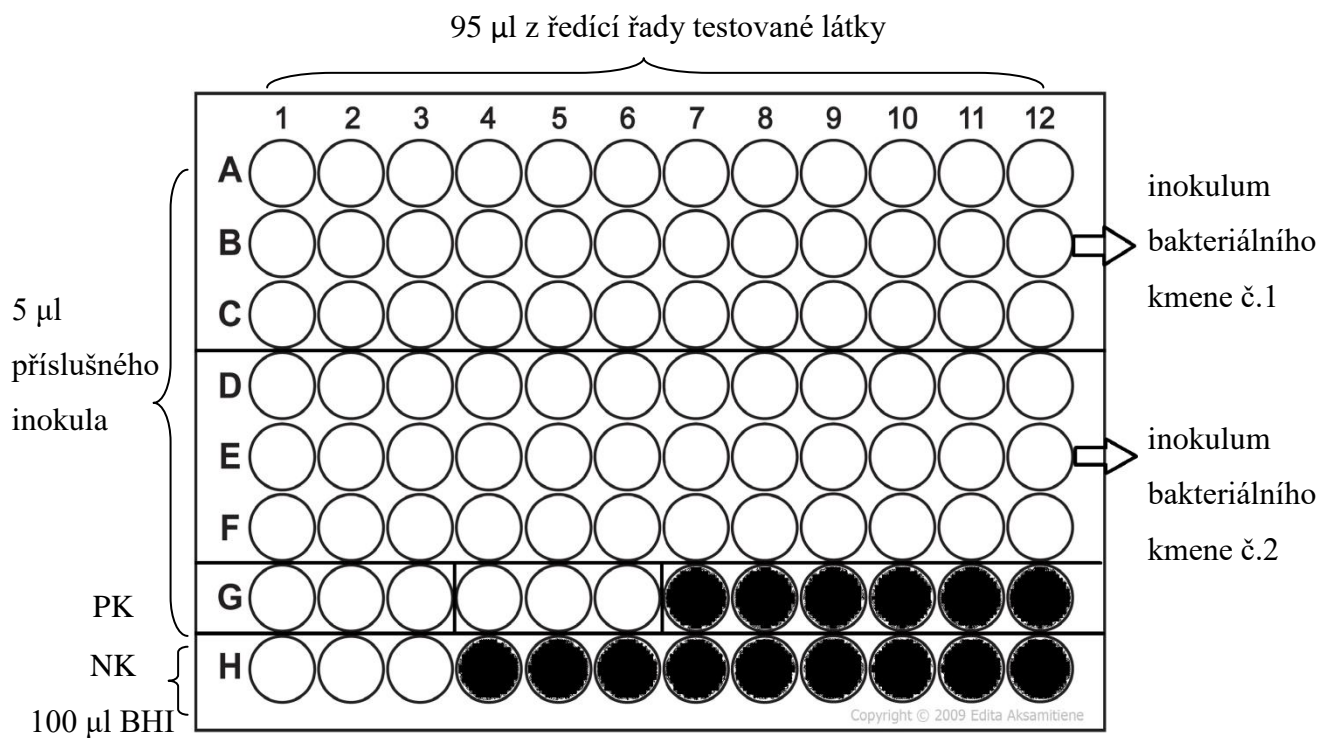
Obrázek 25: Mikrotitrační destička.

http://ecomед.cz/katalog/Standardne_96_miesticne_259/3056_Standardne_96_miesticne_



Obrázek 26: Model mikrotitrační destičky a její rozdělení.

Postup napipetování mikrotitrační destičky byl následující. Do každé jamky A1-F12 bylo aplikováno 5 μ l příslušného inokula (bakteriální suspenze). Dále do jamek A1-F12 bylo pipetou přidáno 95 μ l z ředící řady testované látky a to vždy tak, že obsah ze zkumavky č. 1 o koncentraci 512 byl nepipetován do jamek A1-F1, obsah zkumavky č. 2 o koncentraci 256 byl nepipetován do jamek A2-F2 atd. (**Tabulka 3**). Pozitivní kontrola (PK) obsahovala 5 μ l příslušného inokula a 95 μ l živné půdy konkrétně M-H bujónu. Negativní kontrola (NK) obsahovala pouze M-H bujón (**Obrázek 27**).



Obrázek 27: Názorný popis rozpipetování mikrotitrační destičky.

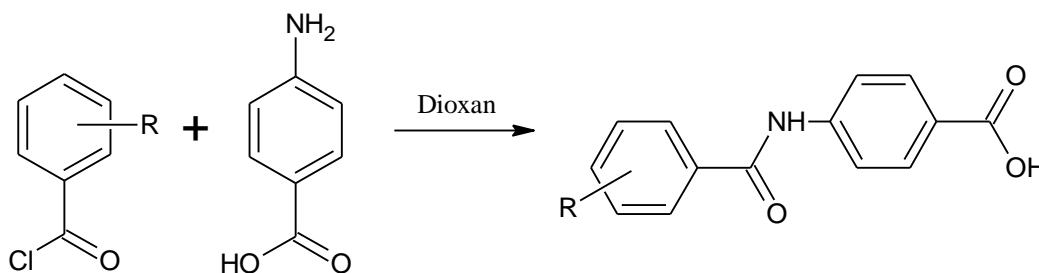
4 Výsledky a diskuse

Výsledné diamidy byly syntetizované třístupňovou syntézou. V prvním reakčním stupni reagovala 4-aminobenzoová kyselina se substituovanými-benzoylchloridy za vzniku substituovaných-[(fenyl)karbamoyl]benzoových kyselin, které ve druhém reakčním stupni reagovaly s fosgenem za vzniku příslušných chloridů. Tyto chloridy reagovaly ve třetím reakčním stupni, jež reagovaly s *R* nebo *S* 1-(6-fluoro-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanaminem za vzniku konečných produktů. Jednotlivé reakční stupně jsou diskutovány v následujících kapitolách.

4.1 Příprava výchozí kyselin

V prvním reakčním stupni reagovala 4-aminobenzoová kyselina se substituovanými benzoylchloridy za vzniku substituovaných-[(benzoyl)amino]benzoových kyselin. Jako rozpouštědlo byl použit dioxan. Předložená 4-aminobenzoová kyselina byla nejprve rozpuštěna v dioxanu a do tohoto roztoku byl postupně nadávkován roztok vybraného chloridu kyselin v dioxanu. Dioxanu bylo použito jednak jako rozpouštědla a dále dioxan reaguje s reakcí vzniklým chlorovodíkem za vzniku solvátu. Během dávkování chloridu docházelo k vylučování požadovaného produktu, který byl izolován filtrací. Následně byl produkt promýván vodou, čímž byl z produktu odstraněn dioxan a v něm rozpuštěné nečistoty. Produkt byl sušen stáním na vzduchu při laboratorní teplotě (**Schéma 25**).

V tomto reakčním stupni bylo dosaženo výtěžků 80 – 85 %.

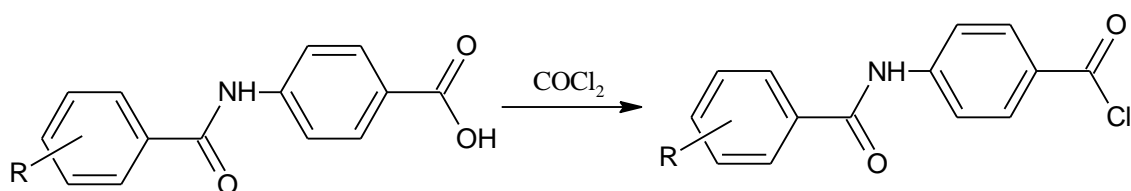


R = H, 4-CH₃, 4-OCH₃, 2-CH₃, 4-Cl, 4-Cl-3-NO₂.

Schéma 25: Příprava substituovaných-[(benzoyl)amino]benzoových kyselin.

4.2 Příprava chloridů

Ve druhém reakčním stupni byly reakcí s fosgenem syntetizovány chloridy kyselin, které byly syntetizovány v předchozím reakčním stupni. Předložená substituovaná-[(benzoyl)amino]benzoová kyselina byla nejprve vysušena azeotropickým oddestilováním směsi toluen- voda. Destilace byla ukončena při dosažení teploty 110 °C na přestupníku. Reakce byla katalyzována N,N-dimethylformamidem. Do reakční směsi byl následně nadávkován plyný fosgen. Teplota reakční směsi byla během fosgenace udržována v rozmezí 95 – 105 °C. Vyvíjející se CO₂ a HCl byly likvidovány v absorpční koloně 15 % NaOH. Po ukončení zavádění fosgenu byla reakční směs ještě 1 hodinu refluxována. Během této doby došlo k dokončení chloridační reakce a k následnému odstranění toxického fosgenu z reakční směsi. Reakční směs byla následně ochlazena na laboratorní teplotu. Reakční směs byla během chlazení inertizována suchým dusíkem z důvodu zamezení možné hydrolyzy chloridů vlivem vzdušné vlhkosti. Následně byl z reakční směsi destilací za sníženého tlaku (50 °C/100-110 mbar) oddestilován toluen. Vyloučený produkt byl dále krystalizován z *n*-hexanu a byl izolován filtrací (**Schéma 26**). V tomto reakčním stupni bylo dosaženo výtěžků 87 – 97 %.

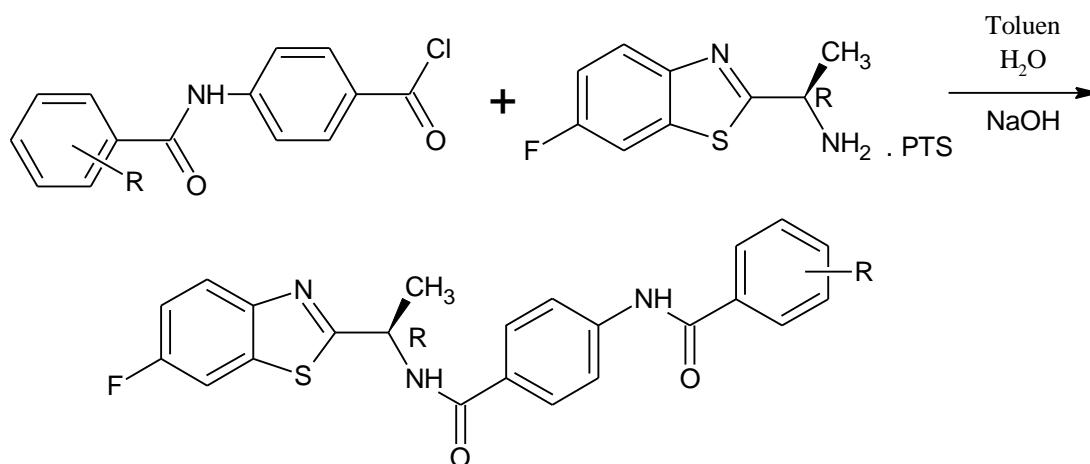


R = H, 4-CH₃, 4-OCH₃, 2-CH₃, 4-Cl, 4-Cl-3-NO₂.

Schéma 26: Příprava substituovaných-[(benzoyl)amino]benzoylchloridů.

4.3 Příprava výchozích diamidů

Ve třetím reakčním stupni reagoval příslušný substituovaný-[(benzoyl)amino]benzoylchlorid s opticky čistým 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanaminem za vzniku konečného diamidu (**Schéma 27**).



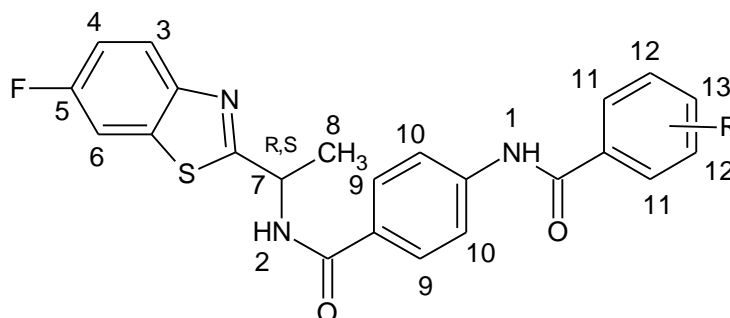
R = H, 4-CH₃, 4-OCH₃, 2-CH₃, 4-Cl, 4-Cl-3-NO₂.

Schéma 27: Příprava konečného produktu.

Chirální 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-ethanaminy vstupují do reakce ve formě stabilní 4-toluensulfonové soli. Z této soli byl amin ve formě báze uvolněn reakcí s vodným 10 % roztokem hydroxidu přímo v reakční směsi za přítomnosti substituovaného-[(benzoyl)amino]benzoylchloridu. Reakce probíhala ve heterogenní směsi toluen – voda. Takto uvolněný amin ihned reagoval v toluenové vrstvě s příslušným substituovaným chloridem za vzniku požadovaného diamidu. Hydroxid sodný, který byl do reakční směsi přidáván, jednak uvolňoval vlastní amin z 4-toluensulfonové soli a dále reagoval s reakcí vzniklým chlorovodíkem za vzniku chloridu sodného. Chlorid sodný a 4-toluensulfonan sodný byly rozpuštěny ve vodné vrstvě. Reakce probíhala v heterogenní směsi toluen – voda. Během přidávání 10 % roztoku hydroxidu sodného docházelo k vylučování produktu. Během reakce bylo nutné kontrolovat hodnotu pH a případně ji dalším přidávkem hydroxidu sodného udržovat v rozmezí hodnot pH 10 – 11. Následně byla reakční směs míchána tři hodiny při laboratorní teplotě a poté zfiltrována. Výsledný produkt byl usušen na vzduchu. Konečný produkt byl vzhledem ke své velmi nízké

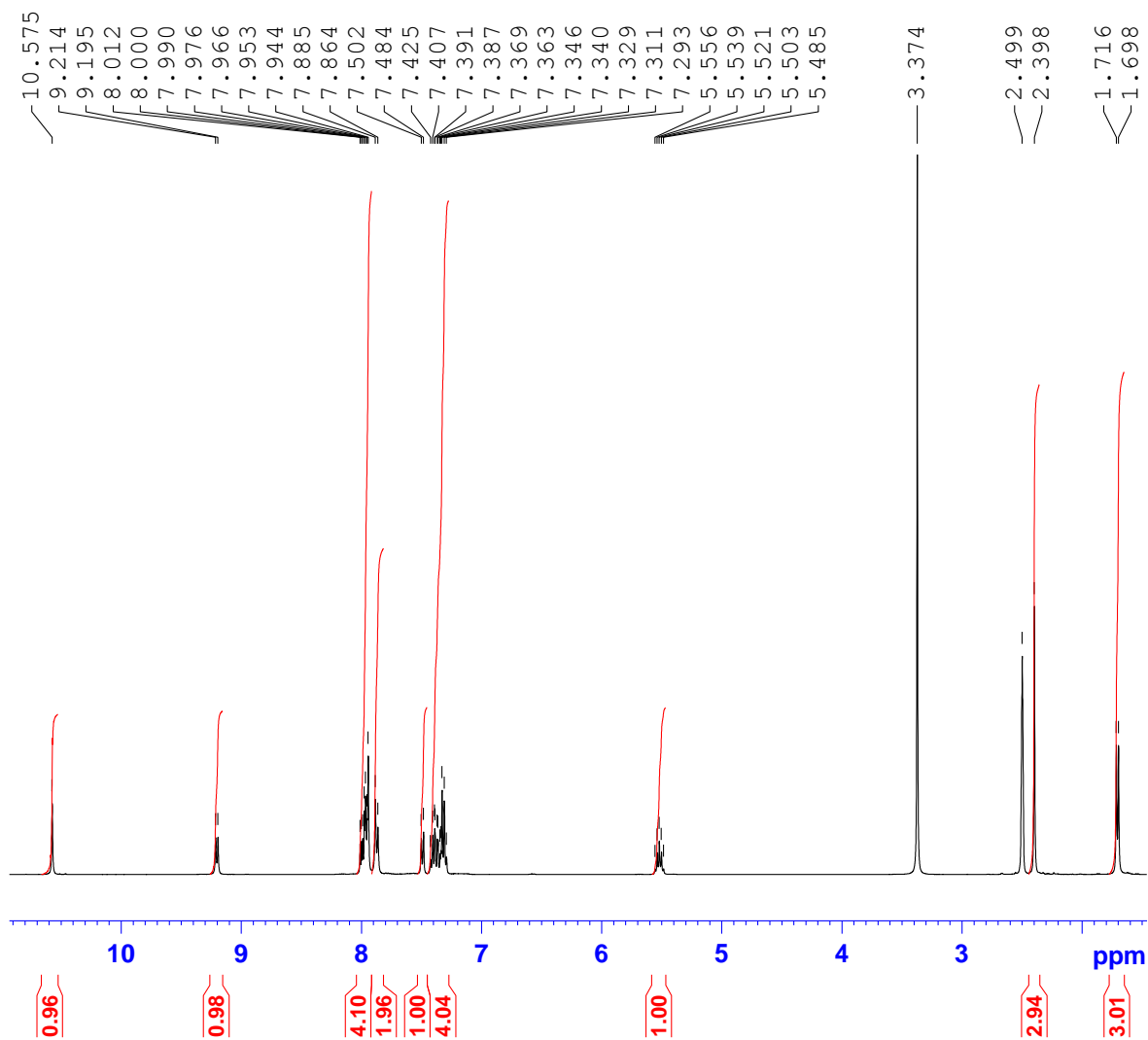
rozpustnosti v toluenu (a to i při teplotě 70 °C) filtrován ze směsi toluen – voda a byl kontaminován anorganickými nečistotami včetně sodné soli karboxylové kyseliny, která vznikla reakcí chloridu kyseliny s hydroxidem sodným. Tyto nečistoty byly z produktu odstraněny rozmícháním produktu ve vodě a následným ohřevem na teplotu 70 °C. Po následné filtraci a promytí vodou již izolované produkty tyto nečistoty neobsahovaly. Vybrané diamidy byly připraveny ve výtěžku 70 – 78 % a následně charakterizovány pomocí bodu tání, NMR spektrometrie, měření optické otáčivosti a elementární analýzy.

4.4 NMR analýza

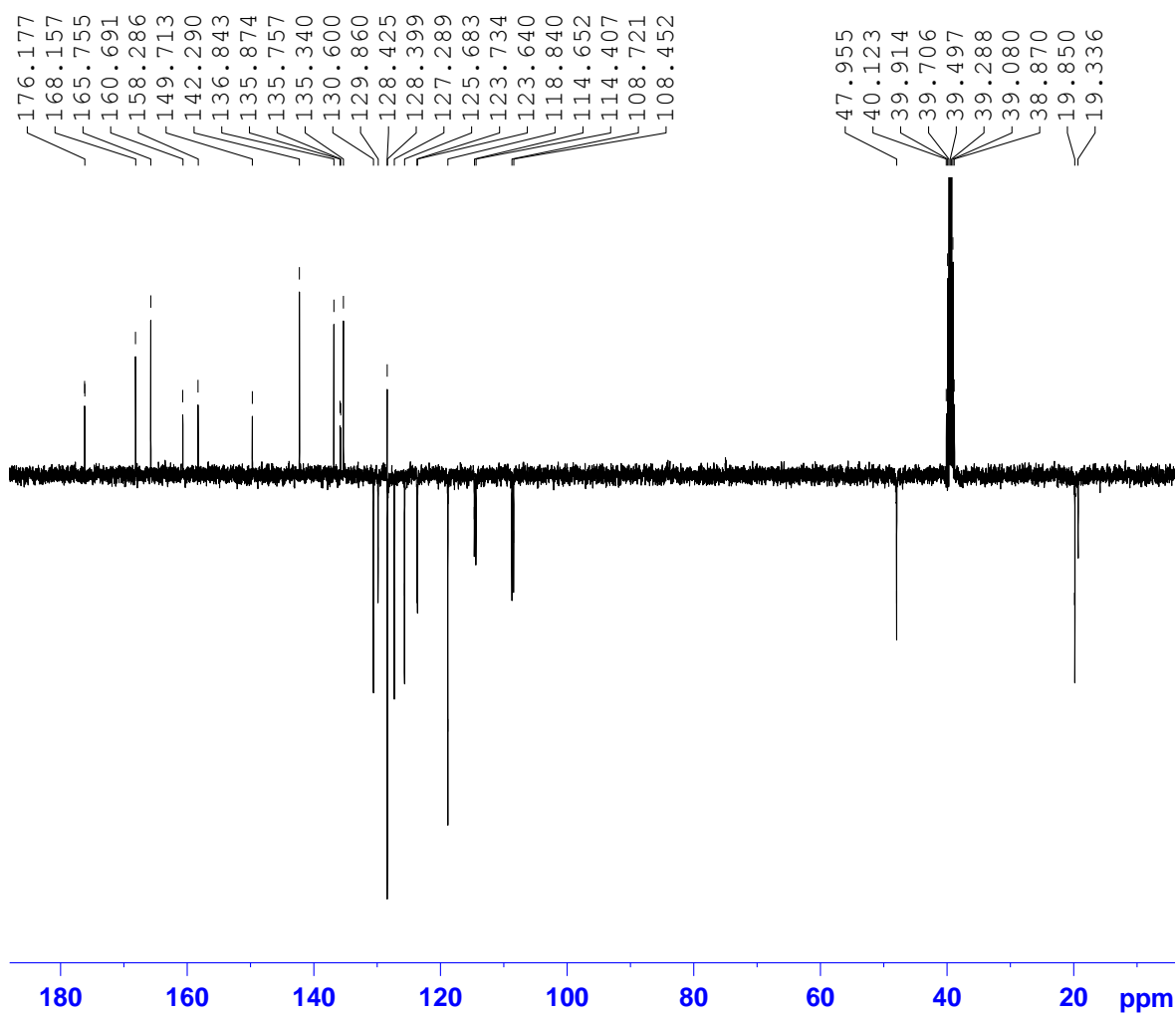


Připravené sloučeniny obsahují dvě amidové skupiny CONH. Signál protonů amidové skupiny NH1 je ve ^1H NMR spektrech zobrazen jako singlet, amidové skupiny NH2 vlivem interakce s protonem *CH* skupiny jako dublet s odpovídající integrálními hodnotami. Signál protonu 7 (*CH* – CH_3) je vlivem interakce protonů methylové skupiny a protonu amidové *NH* skupiny zobrazen jako kvintet s příslušnými interakčními konstantami.

Přítomnost fluoru navázaného v poloze 6 v benzthiazolovém bloku dokazují signály protonů 3, 4 a 6. Signál protonu H3 je zobrazen jako dublet dubletu. Proton H3 interaguje přes tři vazby s protonem H4 ($d, {}^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = \text{cca } 9 \text{ Hz}$) a zároveň s fluorem v poloze 5 přes čtyři vazby ($d, {}^4J(^1\text{H}, ^{19}\text{F}) = \text{cca } 4,9 \text{ Hz}$). Proton H4 interaguje přes tři vazby s protonem H3 (${}^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = \text{cca } 9 \text{ Hz}$), přes čtyři vazby s protonem H6 ${}^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = \text{cca } 2,6 \text{ Hz}$) a také přes tři vazby s fluorem vázaném v poloze 5 ${}^3J(^1\text{H}^{19}\text{F}) = \text{cca } 9 \text{ Hz}$). Tento signál by měl být zobrazen jako dublet dubletu dubletu. Protože interakční konstanty H – H a H – F přes tři vazby jsou shodné, je tento signál zobrazen jako dublet tripletu. Signál protonu H6 je zobrazen jako dublet dubletu. Proton H6 interaguje přes čtyři vazby s protonem H4 ($d, {}^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = \text{cca } 2,6 \text{ Hz}$) a zároveň s fluorem v poloze 5 přes tři vazby ($d, {}^3J(^1\text{H}, ^{19}\text{F}) = \text{cca } 9 \text{ Hz}$).



Obrázek 28: ¹H NMR spektrum sloučeniny 2-methyl-*N*-(4-[[1*S*]-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl}fenyl)benzamid.



Obrázek 29: ^{13}C NMR spektrum sloučeniny 2-methyl-*N*-(4-([(1*S*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl)fenyl)benzamid.

V uhlíkovém ^{13}C NMR spektru jsou přítomny dva signály odpovídající amidovým skupinám CONH. Dále jsou v uhlíkovém NMR spektru přítomny signály odpovídající jednotlivým uhlíkům benzthiazolového bloku a substituovaného benzenového jádra. Jelikož jaderný spin fluorového isotopu ^{19}F je $\frac{1}{2}$ a má přírodní zastoupení 100 % jsou všechny signály vlivem interakce fluor – uhlík zobrazeny jako dublety s různou velikostí interakční konstanty C-F, která závisí na poloze uhlíku v molekule vůči fluoru. Jsou zde zaznamenány i fluorové interakce přes pět vazeb u uhlíku C1 ($^5J(^{13}\text{C}, ^{19}\text{F}) = \text{cca } 1,5 \text{ Hz}$). S rostoucí vzdáleností atomu uhlíku od fluoru hodnota interakční konstanty klesá.

4.5 Stanovení antibakteriální aktivity

U vybraných diamidů byl dále testován antibakteriální účinek na kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*. Určování antibakteriálního účinku diamidů a zjišťování jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) bylo prováděno mikrodiluční metodou v bujónu dle normy ČSN EN ISO 20776-1 z roku 2007. Výsledkem tohoto testu byla MIC udávaná nejčastěji v jednotkách $\mu\text{g/ml}$. Dle této normy je MIC definována jako nejnižší koncentrace antibakteriální látky, která inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu ve zkumavkách makrodilučního provedení nebo jamkách destičky u mikrodilučního provedení testu.

Jako první byly stanoveny MIC antibiotik Ampicilinu a Sulfamethoxazolu proti vybraným kmenům bakterií. Za standard byly pak použity námi zjištěné hodnoty MIC antibiotika Ampicilinu, a to proto, že ředící řady testovaných diamidů byly připraveny obdobně jako ředící řada AMP. Výsledky MIC antibiotik a testovaných diamidů vůči vybraným kmenům bakterií jsou znázorněny v **Tabulkách 5 a 6**.

Tabulka 5: MIC Antibiotik.

MIC použitých ATB [$\mu\text{g/ml}$]	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
AMP	256	2	256	512
SULF.	512	128	256	>512

Tabulka 6: MIC testovaných diamidů.

Diamidy	MIC [$\mu\text{g/ml}$]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
1a	512	512	512	16
1b	512	512	512	4
1c	512	512	512	8
1d	512	512	512	8

- 1a** 4-chlor-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamid
- 1b** 4-chlor-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamid
- 1c** 2-methyl-N-(4-[[*(1S)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl]phenyl)benzamid
- 1d** 2-methyl-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]karbamoyl]phenyl)benzamid

Všechny testované diamidy vykazovaly určitý inhibiční účinek na vybrané kmeny bakterií. Nicméně hodnoty MIC testovaných diamidů pro kmeny *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* byly vysoké v porovnání se standardními hodnotami MIC u Ampicilinu. Nejlepší výsledek byl pozorován při stanovení inhibice růstu u bakterie *Enterococcus faecalis*, kde byla vyhodnocena minimální inhibiční koncentrace 4 $\mu\text{g/ml}$ u sloučeniny 4-chlor-N-(4-[[*(1R)*-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl]fenyl)-3-nitrobenzamid.

Enterokoky jsou grampozitivní bakterie, značně odolné k zevnímu prostředí a přirozeně rezistentní k mnoha antimikrobním přípravkům a dezinfekčním prostředkům. Uplatňují se jako etiologická agens komunitních infekcí, nejčastěji močového traktu, infekcí břicha a pánve. Hrají významnou roli i jako původci nozokomiálních infekcí

močového a respiračního traktu, chirurgických ran a méně často infekcí krevního řečiště, zejména u pacientů dlouhodobě hospitalizovaných, s těžkým základním onemocněním a po předchozí terapii širokospektrými antibiotiky. Většina enterokokových infekcí je způsobena druhem *Enterococcus faecalis a faecium*. V případě izolace těchto kmenů z biologického materiálu, které jsou často rezistentní k aminopenicilinům, je nutno v terapii použít glykopeptidy – vankomycin nebo teikoplanin. V posledních letech jsou však některé infekce vyvolány VRE, jejichž léčba může představovat velký problém [80, 81, 82, 83].

Nadměrné aplikace vankomycinu a mnoha širokospektrých antimikrobních přípravků, ke kterým jsou enterokoky přirozeně rezistentní – cefalosporiny, fluorochinolony, aztreonam, klindamycin, metronidazol může vést k narušení přirozené střevní flóry s následným pomnožením kmenů VRE, které střevo většinou jen kolonizují [84, 85]. Při zánětlivě změněné střevní sliznici následkem chemoterapie může však dojít k jejich přestupu do krve a dále do různých orgánů, kde mohou způsobit závažné endogenní nozokomiální infekce [86].

Proto je v dnešní době, velká snaha vyvinout léčiva, která by prokázala maximální inhibiční účinky proti bakteriím a minimální vedlejší účinky na lidský organismus.

Výsledky MIC získané mikrodiluční metodou v bujónu v této diplomové práci mají pouze informativní význam, pro přesnější stanovení MIC testovaných diamidů je nutné provést opakovaná měření, nicméně mohou být odrazovým můstkem pro testování nových antibakteriálních léčiv.

5 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na přípravu vybraných diamidů, obsahující 4-aminobenzoovou kyselinu a benzthiazolový blok. Cílem práce bylo provést literární rešerši a nalézt vhodné postupy přípravy amidů obsahující benzthiazolový blok a případně nalézt jejich popsané biologické aktivity. Další součástí literární rešerše bylo zpracovat známé poznatky o syntéze diamidů obsahující kyselinu 4-aminobenzoovou a benzthiazolový blok.

V rámci diplomové práce bylo připraveno dvanáct nových nepopsaných diamidů obsahujících 4-aminobenzoovou kyselinu a benzthiazolový blok. Připravené sloučeniny byly charakterizovány bodem tání, optickou otáčivostí a NMR spektrometrií a elementární analýzou.

V další části bylo u vybraných syntetizovaných diamidů na Katedře biologických a biochemických věd provedeno stanovení antibakteriální aktivity na kmenech *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*. Antibakteriální aktivita byla stanovena mikrodiluční metodou v bujónu. Bylo zjištěno, že vybrané diamidy vykazují antibakteriální aktivitu vůči testovaným kmenům bakterií. Nicméně MIC kmenů *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* byly prokazatelně horší než MIC Ampicilinu. Nejlepší výsledek byl pozorován při stanovení inhibice růstu u bakterie *Enterococcus faecalis*, kde byla vyhodnocena minimální inhibiční koncentrace 4 µg/ml u sloučeniny 4-chlor-N-(4-[[[(1R)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)etyl]karbamoyl}fenyl]-3-nitrobenzamidu.

6 Použitá literatura

1. DERUITER, J. Amides and related functional groups. *Principles of Drug Action 1*, 2005.
2. ČERVINKA, Otakar a kol. *Chemie organických sloučenin. Díl 2*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 73-79.
3. *Introducing amides*[online]. 2016 [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: muvarna.bg/EN/Students.
4. ŠIMŮNEK, P. *Organická chemie I: (pro posluchače kombinovaného studia oboru Speciální chemickobiologické obory)* [online]. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: upce.cz/fcht/uocht/informace/OCH1.pdf.
5. HANUSEK, J. *Organická chemie II. Pardubice: Univerzita Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 2003*.
6. *Benzothiazole* [online]. 2016 [cit. 2016-03-31]. Dostupné z: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzothiazole#section=Top
7. HORTON, D. A., G. T. BOURNE a M. L. SMYTHE. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures. *Chemical review*. 2003, (103), 893-930.
8. HUANG, S. T, I. J. HSEI a C. CHEN. Synthesis and anticancer evaluation of bis (-benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles. *Bioorganic Medicinal of Chemistry*. 2006, (14), 6106-6119.
9. SINGH, M., S. K. SINGH, M. GANGWAR a G. NATH. Design, synthesis and mode of action of some benzothiazole derivatives bearing an amide moiety as antibacterial agents. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2014, (4), 19013-19023.
10. SIDDIQUI, A RANA, S. A. KHAU, J. STABLES, A. RANA, M. ALAM, F. MDARSHAD a M. A. BHAT. Synthesis and anticonvulsant activity of sulfonamide derivatives hydrophobic domain. *Bioorganic Medicinal of Chemistry*. 2007, (17), 255-259.
11. RANA, A, J. STABLES, T. AKHTAR, R. LODDO a P. COLLA. In vitro antitumor and antiviral activities of new benzothiazole and 1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives. *Acta Pharmaceutica*. 2008, (58), 135-149.

12. PALMER, F. J., R. B. TRIGG a J. V. WARRINGTON. Benzothiazolines as antituberculous agent. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1971, (14), 248-251.
13. BURGER, A. a S. N. SAWHEY. Antimalarials. III. Benzothiazole amino alcohols. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1968, (11), 270-273.
14. SIDDIQUI, N., M. ALAM a A. A. SIDDIQUI. Synthesis and analgesic activity of some 2-[[4-(alkyl thioureido) phenyl] sulphonamido]-6-substituted benzothiazole. *Asian Journal of Chemistry*. 2004, (16), 1005-1008.
15. PATTAN, S. R., Ch. SURESH, V. D. PUJAR, V. V. K. REDDY, V. P. RASAL a B. C. KOTI. Synthesis and antidiabetic activity of 2-amino [50(4-sulphonylbenzylidene-2,4-thiazolidenedione)-7-chloro-6-flourobenzothiazole. *Indian Journal of Chemistry*. 2005, (44B), 2404-2408.
16. SINGH, S. P. a S. SEGAL.. Study of fungicidal activities of some benzothiazoles. *Indian Journal of Chemistry*. 1988, (27B), 941-943.
17. PEJCHAL, V., A. IMRAMOVSKÝ, Š. ŠTĚPÁNKOVÁ, Z. PADĚLKOVÁ a J. JAMPÍLEK. 1,3-Substituted Imidazolidine-2,4,5-triones: Synthesis and Inhibition of Cholinergic Enzymes. *Molecules*. 2011, (16), 7565-7582. ISSN 1420-3049.
18. GUNAWARDANA, G. P., S. KOHMOTO, S. P. GUNESAKARA, O. J. MCCONNELL a F. E. KOEHN. Dercitine, a new biologically active acridine alkaloid from a deep water marine sponge, *Dercitus* sp. *Journal of American Chemical Society*. 1988, (110), 4856-4858.
19. GUNAWARDANA, G. P., S. KOHMOTO a N. S. BURREN. New cytotoxic acridine alkaloids from two deep water marine sponges of the family Pachastrellidae. *Tetrahedron Lett*. 1989, (30), 4359-4362.
20. KOKELLENBERG, H. a C. S. MARVE. Polymers containing anthraquinone units: benzimidazole and benzothiazole polymers. *Journal of Polymer Scientific and Polymer Chemistry*. 1970, (8), 3199-3209.
21. CAO, Z., F. QIU, Q. WANG, et al. Synthesis of azo benzothiazole polymer and its application of 1,2 Y-branched and 2, 2 MacheZehnder interferometer switch. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*. 2013, (124), 4036-4040.
22. GWON, S., S. LEE, Y. SON a S. KIM. Benzothiazole and indole based dye sensor: Optical switching functions with pH stimuli. *Fibers and Polymers*. 2012, (13), 1101-1104.

23. OKOH, O. A., R. H. BISBY, C. L. LAWRENCE, C. E. ROLPH, a R. B. SMITH. Promising nearinfrared non-targeted probes: benzothiazole heptamethine cyanine dyes. *Journal of Sulfur Chemistry*. 2014, (35), 42-56.
24. GILCHRIST, T. E. *Heterocyclic Chemistry*. Tthird edition. Longman, 1992..
25. HENRIKSEN, G., A. I. HAUSER, A. D. WESTWELL, B. H. YOUSEFI, M. SCHWAIGER, A. DRZEGA a H. J. WESTER. Metabolically stabilized benzothiazoles for imaging of amyloid plaques. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, (50), 1087-1089.
26. MATHIS, C. A., Y. WANG, D. P. HOLT, G. F. HAUNG, M. L. DEBNATH a W. E. KLUNK. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003, (43), 2740-2754.
27. WANG, X., K. SARRIS, K. KAGE, et al. Synthesis and evaluation of benzothiazole-based analogues as novel, potent, and selective fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, (52), 170-180.
28. BLACK, C., D. DESCHENES, M. GAGNON, N. LACHANCE, Y. LEBLANC, S. LEGER, C. S. LI a R. M. OBALLA. *A1 20061116*, (WO) 2006122200.
29. LAU, C. K., C. DUFRESNE, Y. GAREAU et al. Evolution of a series of non-quinoline leukotriene D4 receptor antagonist; synthesis and sar of benzothiazoles and thiazoles substituted benzyl alcohols as potent LTD4 antagonists. *Bioorganic of Medicinal Chemistry*. 1995, (5), 1615-1620.
30. APELT, J., S. GRASSMANN, X. LIGNEAU et al. Search for histamine H3 receptor antagonists with combined inhibitory potency at N-tau-methyltransferase: ether derivatives. *Die Pharmazie*. 2005, (60), 97-106.
31. RANA, A., N. SIDDIQUI, S. A. KHAN, S. EHTAISHAMUL HAQUE a M. A. BHAT. N-[[[(6- substituted-1,3-benzothiazole-2-yl)amino]carbonothioyl]-2/4-substituted benzamides: synthesis and pharmacological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008, (43), 1114-1122.
32. RAZUS, A. C., L. BIRZAN, N. M. SURUGIU, A. C. CORBU a F. CHIRALEU. Syntheses of azulen-1-yl-benzothiazol-2-yl aiazenes. *Dyes Pigments*. 2007, (74), 26-33.
33. PARTON, R. L., D. A. STEGMAN, K. W. WILLIAMS a V. L. CHAND. *Benzothiazole, benzoselenazole or benzooxazole sensitizers for photographic films*, 1995, US5516628 A.

34. SEO, K. W., M. PARK, J. G. KIM, T. W. KIM a H. J. KIM. Effects of benzothiazole on the xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of acetaminophen. *Journal of Applied Toxicology*. 2000, (20), 427-430.
35. REEMTSMA, T., O. FIEHN, G. KALNOWSKI a M. JEKEL. Microbial transformations and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial waste water. *Environmental Science and Technology*. 1995, (29), 478-485.
36. HARTLEY, D., H. KIDD a ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (GREAT BRITAIN). *The Agrochemicals Handbook*. Nottingham, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 1987.
37. PETERS, A. T. a S. S. YANG. Monoazo disperse dyes derived from nitro-2-aminobenzothiazoles. *Dyes Pigments*. 1995, **28**(3), 151-164.
38. *Rilutek*[online]. 2016 [cit. 2016-04-4]. Dostupné z: drugs.com/pro/rilutek.html.
39. a) SHI, D. F., T. D. BRADSHAW, S. WRIGLEY, C. J. MCCALL, P. LELIEVELD, I. FICHTNER a M. F. STEVENS. Antitumor benzothiazoles 3. Synthesis of 2-(4-aminophenyl) benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996, (39), 3375-3384.
- b) HUTCHINSON, I., S. A. JENNINGS, B. R. VISHNUVAJJALA, A. D. WESTWELL a M. F. STEVENS. Antitumor benzothiazoles 16. Synthesis and pharmaceutical properties of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002, (45), 744-747.
40. a) FIEHN, O., T. REEMTSMA a M. JEKEL. Extraction and analysis of various benzothiazoles from industrial wastewater. *Analytica Chimica Acta*. 1994, (295), 297-305.
- b) REEMTSMA, T. Determination of 2-substituted benzothiazoles of industrial use from water by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spektrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2000, (14), 1612-1618.
41. a) BEN-ALLOUM, A, S. BAKKAS a M. SOUFIAOUI. Nouvelle voie de synthese des 2- arylbenzothiazoles transfert d'Electrons active par micro-ondes. *Tetrahedron Lett*. 1997, (38), 6395-6396.
- b) SEIJAS, J. A., M. P. VAZQUEZ-TATO, M. R. CARBALLIDO-REBOREDO, J. CRECENTE- CAMPO a L. ROMAR-LOPEZ. Lawesson's reagent and

- microwaves: a new efficient access to benzoxazoles and benzothiazoles from carboxylic acids under solvent-free conditions. *Synlett*. 2007, (31), 313-316.
42. GUNTREDDI, T., R. VANJARI a K. N. SINGH. *Organic Letter*. 2015, (17), 976-978.
 43. BOSE, D. S., M. IDREES a B. SRIKANTH. *Synthesis*. 2007, (číslo), 819-823.
 44. KEERTHIKUMAR, C. T., J. KESHAVAYYA, T. RAJESH a S. K. PEETHAMBAR. Synthesis, characterization and biological activity of heterocyclic azo dyes derived from 2-aminobenzothiazole. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013, **5** (1), 296-301.
 45. BHALERAO, D. S. a K. G. AGAMANCHI. *Synlett*. 2007 (číslo), 2952-2956.
 46. HIJIKATA, C. *Process for producing substituted alkylamine derivative*. (Tokyo JP: Ihara Chemical Industry Co., Ltd.). WO0174794 (A1). 2001.
 47. *Rakovina* [online]. 2016 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina
 48. LEE, A. C.-H., RAMANUJULU, P. M., POULSEN, A. et al. Thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives as PDK1 inhibitors discovered by fragment-based screening. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2012, **22**(12), 4023 – 4027.
 49. DYSON et al. *Journal of the Indian Chemical Society*. 1931, (8), 147,163.
 50. Antimicrobial—Definition from the Merriam-Webster Online Dictionary.
 51. NOGRADY, T. a F. D. WEAVER. *Medicinal Chemistry: a Molecular & Biochemical Approach*. New York: Oxford University Press, 2005, 559.
 52. SAEED, S., N. RASHID; P. G. JONES; M. ALI a R. HUSSAIN. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010, (45), 1323–1331.
 53. BOLELLI, K., I. YALCIN; T. ERTAN-BOLELLI et al. “Synthesis of novel 2-[4-(4-substituted benzamido/phenylacetamido)phenyl]benzothiazoles as antimicrobial agents”. *Medicinal Chemistry Research*. 2012, (21), 3818–3825.
 54. PEJCHAL, V., M. PEJCHALOVÁ a Z. RŮŽIČKOVÁ. Synthesis, structural characterization, antimicrobial and antifungal activity of substituted 6-fluorobenzo[d]thiazole amides. *Medicinal Chemistry Research*.
 55. LEOŠ NAVRÁTIL A KOLEKTIV. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024723198.

56. PEJCHALOVÁ M.; HAVELEK R.; KRÁLOVEC K.; RŮŽIČKOVÁ Z.; PEJCHAL V. *Novel derivatives of substituted 6-fluorobenzothiazole diamides: synthesis, antifungal activity and cytotoxicity. Medicinal Chemistry Research.*
57. *Diabetes Mellitus* [online]. 2016 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: medicalnewstoday.com/info/diabetes.
58. *Diabetes Mellitus*[online]. 2016 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: nlm.nih.gov/medlineplus/diabetes.html.
59. MARIAPPAN, G., P. PRABHAT, L. SUTHARSON, J. BANERJEE, U. PATANGIA a S. NATH. *Journal of Korean Chemistry and Society.* 2012, (56), 251– 256.
60. DEODHAR, MEENAKSHI N., ASHISHKUMAR C. DONGRE, a SAYALI D. KUDALE. (název) *Asian Journal of Chemistry.* 2012, (24), 2747 – 2752.
61. MARIAPPAN, PRABHAT, SUTHARSON, BANERJEE, PATANGIA, NATH. *Journal of the Korean Chemical Society.* 2012, (56), 251 – 256.
62. DANNHARDT, G. a W. KIEFER. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2001, (36), 109–126.
61. YADAV, S. K., S. M. MALIPATIL a S. K. YADAV. *International Journal of Drug Discovery Herbal Res.* 2011, (1), 42–43.
63. PAPADOPOULOU, MARIA V., WILLIAM D. BLOOMER, HOWARD S. ROSENZWEIG et al. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2012, (55), 5554 – 5565.
64. PAPADOPOULOU, CH., A. GERONIKAKI a D. , HADJIPAVLOU-LITINA. Synthesis and biological evaluation of new thiazolyl/benzothiazolyl-amides, derivatives of 4-phenyl-piperazine. *Il Farmaco.*2005, **60** (11-12), 969 – 973.
65. ROSYPAL, Stanislav. *Bakteriologie a virologie.* Praha: Scientia, 1994.
66. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná.* [s.l.] : Neptun, 2001.
67. KAPRÁLEK, František. *Základy bakteriologie.* Praha : Karolinum, 2000. 241 s. ISBN 80-7184-811-5.
68. LHOTSKÝ, Josef. *Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů. Nový pohled na viry a bakterie.* Praha, Academia, 2015, 208 s.
69. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Medical Microbiology, Fifth edition.* [s.l.] : Elsevier, 2005.
70. HORÁČEK, Jiří. *Základy lékařské mikrobiologie.* [s.l.] : Karolinum, 2000.

71. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. opr. a dopl. vyd., V nakladatelství Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
72. LEE, Sang Yup. *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. [S.l.]: Springer, 2009. ISBN 978-1-4020-9393-7.
73. *Pseudomonas aeruginosa* [online]. 2016 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/pseudomonas_aeruginosa.php.
74. RYAN K. J, ed. a C. G. Ray, ed. *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2004. 294 s. ISBN 0-8385-8529-9.
75. HIRT, H. a P. M Schlievert a G. M. Dunny. "In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10". *Infection and Immunity*. 2002, **70** (2), 716–723.
76. VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie obecná*, Brno: Neptun, 2005.
77. BEDNÁŘ V. *Lékařská mikrobiologie*, Praha: Triton, 1996.
78. ANDREWS J. M. „Determination of minimum inhibitory concentrations,“ *Journal antimicrobial chemotherapy*, p. 1049, 2002.
79. BOSÁKOVÁ, K. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014.
80. EMORI, T. Grace a Robert P. GAYNES. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*. 1993, **6** (4), 428–442.
81. GRÜNEBERG, R. N. Changes in urinary pathogens and their antibiotic sensitivities, 1971-1992. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994, Suppl A, (33), 1–8.
82. HÁJEK, V. a A. SOUČKOVÁ. Rod *Enterococcus*. BEDNÁŘ, Marek et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, s. 213–214.
83. RUOFF K. L., L. de la MAZA, M. J. MURTAGH et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinica. Microbiology*. 1990, (28), 435–437.
84. UTTLEY, A. H. C, C. H COLLINS, J. NAIDO a R. C. GEORGE. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1988, (1), 57–58.

85. LECLERCQ, R., E. DERLOT, J. DUVAL a P. COURVALIN. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine*. 1988, (319), 157–161.
86. DE PAUW, B. E. The sequence of infective event in prolonged neutropenia. KLASTERSKY, J. A., ed. *Febrile neutropenia*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1997, 35–40.