

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Syntéza a charakterizace anticholinergních karbamátů obsahujících
benzthiazolový blok**

Bc. Ingrid Galgaňáková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ingrid Galgaňáková**
Osobní číslo: **C17527**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie organických specialit**
Název tématu: **Syntéza a charakterizace anticholinerních karbamátů
obsahujících benzthiazolový blok**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Zpracovat známé poznatky o anticholinerních derivátech obsahujících benzthiazolový blok.
2. Zpracovat metody syntézy karbamátů obsahujících benzthiazolový blok.

Experimentální část:

1. Vyvinout vhodnou metodu přípravy karbamátů obsahujících benzthiazolový blok.
2. Touto metodou připravit sérii vybraných karbamátů.
3. Připravené sloučeniny charakterizovat dostupnými experimentálními metodami.
4. Výsledky zpracovat formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Bc. Ingrid Galgaňáková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Vladimíru Pejchalovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za cenné rady, připomínky a pokyny při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., za veškerou pomoc při vypracování teoretické i experimentální části diplomové práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině a všem známým, kteří mě během studia podporovali.

ANOTACE

Tématem diplomové práce je syntéza a následná charakterizace nepopsaných anticholinergních karbamátů obsahujících benzthiazolový blok.

V teoretické části byla provedena rešerše, jejímž cílem bylo nalézt vhodnou syntézu karbamátů s výše zmíněným benzthiazolovým blokem. Literární rešerše byla také zaměřena na studie stanovující inhibiční aktivitu anticholinergních sloučenin s benzthiazolovým blokem. Poznatky byly dále využity při syntéze vybraných sloučenin.

Na základě vypracované literární rešerše bylo v experimentální části připraveno 18 nových karbamátů. Připravené karbamáty byly charakterizovány NMR spektroskopií, bodem tání, HRMS MALDI a elementární analýzou.

Na závěr byla u těchto karbamátů stanovena inhibiční aktivita proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Také byla stanovena lipofilita připravených karbamátů. Zjištěním míry lipofility připravených karbamátů lze dokázat schopnost sloučeniny přecházet přes lipofilní hematoencefalickou bariéru.

KLÍČOVÁ SLOVA

benzthiazol, chlorformiát, karbamát, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz

TITLE

Synthesis and characterization of anticholinergic carbamates containing benzothiazole block

ANNOTATION

The topic of this diploma thesis is the synthesis and subsequent characterization of non-described anticholinergic carbamates containing benzthiazole block.

In the theoretical part, a search was carried out to find a suitable carbamate synthesis with the aforementioned benzthiazole block. The literature search was also focused on studies determining the inhibitory activity of anticholinergic compounds with the benzthiazole block. The findings were further used in the synthesis of selected compounds.

Based on the literature search, 18 new carbamates were prepared in the experimental part. The prepared compounds were characterized by NMR spectroscopy, melting point, HRMS MALDI and elemental analysis.

Finally, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity was determined for these carbamates. Lipophilicity of prepared carbamates was also determined. By determining the lipophilicity of the prepared carbamates, the ability of the compound to cross the lipophilic blood-brain barrier can be demonstrated.

KEYWORDS

benzothiazole, chloroformate, carbamate, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors

OBSAH	
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM SCHÉMÁT	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 LIPOFILITA	16
1.2 ACETYLCHOLIN	16
1.3 CHOLINESTERÁZY	17
1.3.1 <i>Obecná charakteristika</i>	17
1.3.2 <i>Acetylcholinesteráza</i>	17
1.3.3 <i>Butyrylcholinesteráza</i>	18
1.3.4 <i>IC₅₀</i>	18
1.4 INHIBITORY	19
1.4.1 <i>Takrin</i>	20
1.4.2 <i>Galantamin</i>	21
1.4.3 <i>Donepezil</i>	21
1.4.4 <i>Rivastigmin</i>	22
1.5 BENZTHIAZOLY	23
1.5.1 <i>Obecná charakteristika</i>	23
1.5.2 <i>Využití</i>	23
1.5.3 <i>Syntéza</i>	23
1.6 CHLORFORMIÁTY	25
1.6.1 <i>Obecná charakteristika</i>	25
1.6.2 <i>Využití</i>	25
1.6.3 <i>Syntéza</i>	27
1.7 KARBAMÁTY	28
1.7.1 <i>Obecná charakteristika</i>	28
1.7.2 <i>Využití</i>	28
1.7.3 <i>Syntéza</i>	28
1.8 STUDIE INHIBITORŮ OBSAHUJÍCÍCH BENZTHIAZOLOVÝ BLOK.....	30

1.8.1	Studie derivátů na bázi močovin	30
1.8.2	Studie substituovaných imidazolidin-2,4,5-trionů	31
1.8.3	Studie derivátů na bázi takrinu	32
1.8.4	Studie benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou	33
1.8.5	Studie benzthiazolových karbamátů	34
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1	KOMERČNĚ DOSTUPNÁ CHEMICKÁ ČINIDLA	36
2.2	CHARAKTERISTIKA VÝCHOZÍCH SLOUČENIN	37
2.2.1	6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	37
2.3	SYNTÉZA VÝCHOZÍCH SLOUČENIN	38
2.3.1	Syntéza 2-amino-5-fluorfenylthiolátu draselného	38
2.3.2	Syntéza 1,3-oxazolidin-2,5-dionu	38
2.3.3	Syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu	39
2.3.4	Syntéza isopropylchlorformiátu	40
2.4	SYNTÉZA KARBAMÁTŮ	41
2.4.1	Methyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	41
2.4.2	Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	42
2.4.3	Propyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	43
2.4.4	Isopropyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	44
2.4.5	Butyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	45
2.4.6	Isobutyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	46
2.4.7	2-chlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	47
2.4.8	2,2,2-trichlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	48
2.4.9	2,2,2-trifluorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	49
2.4.10	Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	50
2.4.11	Ethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	51
2.4.12	Propyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	52
2.4.13	Isopropyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	53
2.4.14	Butyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	54
2.4.15	Isobutyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	55
2.4.16	2-chlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	56
2.4.17	2,2,2-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	57
2.4.18	2,2,2-trifluorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	58

2.5	METODY CHARAKTERIZACE.....	59
2.5.1	<i>Bod tání</i>	59
2.5.2	<i>NMR spektroskopie</i>	59
2.5.3	<i>Elementární analýza</i>	59
2.5.4	<i>HRMS MALDI</i>	59
2.6	CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH VÝCHOZÍCH LÁTEK A KARBAMÁTŮ.....	60
2.6.1	<i>Isopropylchlorformiát</i>	60
2.6.2	<i>1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid</i>	61
2.6.3	<i>Methyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	62
2.6.4	<i>Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	63
2.6.5	<i>Propyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	64
2.6.6	<i>Isopropyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	65
2.6.7	<i>Butyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	66
2.6.8	<i>Isobutyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	67
2.6.9	<i>2-chlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	68
2.6.10	<i>2,2,2-trichlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	69
2.6.11	<i>2,2,2-trifluorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát</i>	70
2.6.12	<i>Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	71
2.6.13	<i>Ethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	72
2.6.14	<i>Propyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	73
2.6.15	<i>Isopropyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	74
2.6.16	<i>Butyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	75
2.6.17	<i>Isobutyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	76
2.6.18	<i>2-chlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	77
2.6.19	<i>2,2,2-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	78
2.6.20	<i>2,2,2-trifluorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát</i>	79
2.7	STANOVENÍ AKTIVITY AChE A IC ₅₀	80
2.7.1	<i>Použitá činidla</i>	80
2.7.1.1	PBS.....	80
2.7.1.2	DTNB.....	80
2.7.1.3	Acetylcholinesteráza (AChE) z elektrického úhoře.....	80
2.7.1.4	Acetylthiocholin jodid (ATCh).....	80
2.7.1.5	Butyrylcholinesteráza (BChE) z koňského séra.....	80
2.7.2	<i>Stanovení aktivity AChE a BChE</i>	81

2.7.2.1	Srovnávací roztok	81
2.7.2.2	Vzorek s enzymovým preparátem	81
2.7.2.3	Postup.....	81
2.7.3	<i>Stanovení IC₅₀</i>	82
2.7.3.1	Srovnávací roztok	82
2.7.3.2	Vzorek bez inhibitoru	82
2.7.3.3	Vzorek s inhibitorem	82
2.7.3.4	Postup.....	83
2.7.4	<i>Stanovení rozdělovacího koeficientu</i>	83
2.7.4.1	Postup.....	83
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	84
3.1	SYNTÉZA 1-(6-FLUOR-1,3-BENZTHIAZOL-2-YL)METHANAMIN HYDROCHLORIDU	84
3.2	SYNÉZA ISOPROPYLCHLORFORMIÁTU	84
3.3	SYNTÉZA KARBAMÁTŮ	85
3.3.1	<i>Syntéza karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benthiazol-2-aminu</i>	85
3.3.2	<i>Syntéza karbamátů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu</i>	85
3.4	BILANCE A NORMY.....	86
3.4.1	<i>THN normy</i>	86
3.4.2	<i>Látková bilance</i>	87
3.4.3	<i>Odpady</i>	87
3.5	BIOLOGICKÉ VÝSLEDKY.....	88
3.5.1	<i>Aktivita enzymového preparátu (AEP) u AChE a BChE</i>	88
3.5.2	<i>IC₅₀ studovaných inhibitorů při inhibici AChE nebo BChE</i>	88
3.5.3	<i>Rozdělovací koeficient 1-oktanol : voda</i>	90
4	ZÁVĚR	92
5	SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ.....	94

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura takrinu	21
Obrázek 2 - Struktura galantaminu	21
Obrázek 3 - Struktura donepezilu	22
Obrázek 4 - Struktura rivastigminu	22
Obrázek 5 - Struktura benzthiazolu	23
Obrázek 6 - Struktura chlorformiátů	25
Obrázek 7 - Struktura karbamátů	28
Obrázek 8 - Sloučeniny na bázi močoviny s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE	31
Obrázek 9 - Sloučeniny na bázi imidazolidin-2,4,5- trionů s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE	32
Obrázek 10 - Sloučenina na bázi takrinu s největším inhibičním účinkem na AChE	33
Obrázek 11 - Benzthiazolové karbamáty se zabudovanou aminokyselinou s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE	34
Obrázek 12 - Benzthiazolové karbamáty s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE	35
Obrázek 13 - Inhibitor 4: grafická závislost v_0/v_i vs. koncentrace inhibitoru (AChE)	89
Obrázek 14 - Inhibitor 6: grafická závislost v_0/v_i vs. koncentrace inhibitoru (BChE)	90
Obrázek 15 - Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát	92
Obrázek 16 - 2,2,2-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát	93

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1 - Přeměna acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou	17
Schéma 2 - Přeměna acetylthiocholinu na thiocholin a kyselinu octovou	18
Schéma 3 - Štěpení DTNB a vznik chromoforu	19
Schéma 4 - Syntéza benzthiazolu se substitucí v poloze 2	23
Schéma 5 - Syntéza benzthiazolu s aminoskupinou v poloze 2	24
Schéma 6 - Methylace terciálního aminu	25
Schéma 7 - Syntéza dialkylního karbonátu se stejnými substituenty	26
Schéma 8 - Syntéza dialkylního karbonátu s různými substituenty	26
Schéma 9 - Syntéza uretanu	26
Schéma 10 - Syntéza chlorformiátů	27
Schéma 11 - Syntéza benzylchlorformiátu	27
Schéma 12 - Syntéza karbamátů reakcí aminu s alkylchlorformiátem	28
Schéma 13 - Syntéza karbamátů reakcí izokyanátu a alkoholu	29

Schéma 14 - Syntéza karbamátů reakcí aminu s CO ₂	29
Schéma 15 - Curtiův přesmyk	29
Schéma 16 - Syntéza derivátů na bázi močoviny	30
Schéma 17 - Syntéza substituovaných imidazolidin-2,4,5- trionů	31
Schéma 18 - Syntéza derivátů na bázi takrinu	32
Schéma 19 - Syntéza benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou	33
Schéma 20 - Syntéza benzthiazolových karbamátů.....	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Přehled vlastností nejznámějších inhibitorů cholinesteráz.....	20
Tabulka 2 - THN normy	86
Tabulka 3 - Látková bilance surovin na 1 t výrobku (100 %)	87
Tabulka 4 - IC ₅₀ karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu	88
Tabulka 5 - IC ₅₀ karbamátů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu.....	89
Tabulka 6 - Rozdělovací koeficient 1-oktanol : voda.....	91

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
ATCh	Acetylthiocholin
BČOV	Biologická čistírna odpadních vod
BCh	Butyrylcholin
BChE	Butyrylcholinesteráza
BTCh	Butyrylthiocholin
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
DMBA	2,4-dimethoxybenzaldehyd
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
HRMS	High-resolution Mass Spectroscopy
ChAT	Cholin-acetyltransferáza
ChES	Cholinesteráza
IChE	Inhibitor cholinesteráz
NMR	Nukleární magnetická resonance
PBS	Fosfátový pufr
PTS	P-toluensulfonová kyselina
RNCO	Substituovaný izokyanát
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TNB ⁻	5-merkpto-2-nitrobenzoátový aniont
ÚOCHT	Ústav organické chemie a technologie

ÚVOD

Benzthiazoly jsou látky s širokým spektrem biologických účinků. Je známo, že jsou tyto látky využívané a nepostradatelné pro přípravu léčiv. Benzthiazoly se také uplatňují v barvářském průmyslu.

Karbamáty jsou látky, které mají rozmanité možnosti uplatnění. Jsou užívány v textilnictví, dále jako agrochemikálie a především jako aktivní farmaka. Karbamáty jsou také nedílnou součástí chemického a barvářského průmyslu, kde zastávají funkci výchozích látek, intermediátů i rozpouštědel.

Bylo nalezeno několik studií, které dokazují, že látky obsahující benzthiazolový blok jsou schopné inhibovat acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Tyto studie jsou popsány v rámci diplomové práce.

Cílem diplomové práce je navázání na provedené studie anticholinergních sloučenin.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lipofilita

Sloučeniny, respektive léky v organismu musejí překonávat biologické membrány, a to nejen aktivním, ale i pasivním transportem. Právě pasivní transport je závislý na lipofilitě membrán¹.

Lipofilita je tedy vlastnost sloučeniny, která má za následek absorpci, distribuci, metabolismu v organismu. Je tedy jednou z klíčových vlastností sloučeniny¹.

Lipofilita je určena pomocí rozdělovacího koeficientu¹. Tento koeficient je určován v dvoufázovém systému, a to na základě poměru rovnovážných koncentrací konkrétního inhibitoru. Schopnost procházet přes hematoencefalickou bariéru (mezi mozkem a krví) je právě závislá na rozdělovacím koeficientu *n*-oktanol : voda¹.

1.2 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) je neurotransmitter. Jedná se tedy o látku, která má za úkol přenos nervového vzruchu².

ACh vzniká z cholinu, který je přijímán potravou a z acetylkoenzymu A v přítomnosti enzymu cholin-acetyltransferázy (ChAT)².

Pokud se zvýší koncentrace Ca^{2+} , přičemž dochází u vzruchové aktivity, dojde k uvolnění acetylcholinu z vezikulů a difundaci do synaptické štěrbině. Dalším krokem je navázání na postsynaptický receptor – bílkovinu³.

Existují dva typy receptoru pro ACh – nikotinové a muskarinové. Prvním typem je nikotinový receptor, který se nachází na nervosvalové ploténce a ve vegetativních gangliích⁴.

Druhý typ, muskarinové receptory, můžeme rozdělit na podtypy. Podtyp M1 nalezneme ve vegetativních gangliích, v CNS a exokrinních žlázách. Podtyp M2 v srdci a podtyp M3 v hladké svalovině. Celkem existuje 5 podtypů, nicméně funkce některých je stále neznámá⁴.

Acetylcholin působí velice krátký čas, zhruba 2 ms, a poté dochází k jeho degradaci pomocí enzymů cholinesteráz².

1.3 Cholinesterázy

1.3.1 Obecná charakteristika

Cholinesterázy (ChES) patří do skupiny serinových hydroláz, které jsou zodpovědné za rozklad ACh a butyrylcholinu (BCh)⁵.

Cholinesterázy je možné rozdělit do dvou forem. První formou je acetylcholinesteráza (AChE) a druhou butyrylcholinesteráza (BChE)⁶. Obě tyto formy mají obdobné katalytické vlastnosti, jsou však rozdílné v buněčné, mimobuněčné distribuci a substrátové specifitě⁷.

AChE štěpí především neurotransmitter ACh na cholin a kyselinu octovou⁸ (schéma 1). Tento proces je potřebný k návratu cholinergního neuronu z aktivovaného stavu ke stavu relaxace⁹.

BChE je schopna štěpit nejrůznější substráty, do kterých můžeme zahrnout nejen látky jako acetylcholin, ale i butyrylcholin, sukcinylcholin, organofosfáty a kokain¹⁰.

Je dokázáno, že v mozku člověka netrpícího žádnou chorobou je hlavním enzymem AChE, který rozkládá ACh a BChE má pouze podpůrnou funkci¹¹.

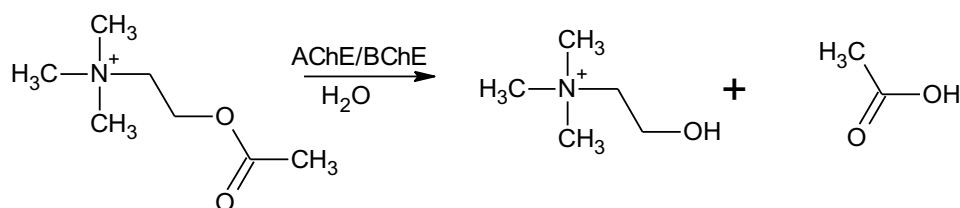


Schéma 1 - Přeměna acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou

1.3.2 Acetylcholinesteráza

Jak už bylo zmíněno výše, AChE patří do skupiny serinových hydroláz⁵. AChE je příčinou hydrolyzy acetylcholinu, což je neurotransmitter rozpadající se na cholin a kyselinu octovou⁸.

AChE je součástí mnoha tkání, například nervů, svalů, motorických i senzorických vláken, centrálních i periferních tkání⁹. Nalezneme ji především v axonech a neuronech⁷.

Je dokázáno, že inhibice AChE má pozitivní dopad u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (AD). Důsledkem této inhibice se u těchto pacientů zvýší hladina acetylcholinu v mozku, a tím dojde k zlepšení cholinergní synapse¹².

AD je neurodegenerativní porucha. Pacienti s AD trpí poruchou paměti, pozornosti, prostorové orientace. Často dochází i k motorickým problémům¹³. Nejčastější formou AD je demence. Odhaduje se, že do roku 2050 bude více než 152 milionů lidí trpících tímto

syndromem¹⁴. Inhibice AChE může být vhodnou strategií pro vývoj nových léčiv u lidí trpících AD¹⁵.

1.3.3 Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza, jinak nazývaná pseudocholinesteráza, štěpí butyrylcholin mnohonásobně rychleji než acetylcholin¹⁶.

Jak již bylo uvedeno výše, BChE štěpí nejrůznější substráty zahrnující acetylcholin, butyrylcholin, sukcinylcholin, organofosfáty a třeba i kokain¹⁰.

Syntéza BChE probíhá v játrech a vyskytuje se především v krevní plazmě¹⁷. Hladina BChE při onemocnění pacientů AD progresivně a výrazně stoupá¹⁸.

1.3.4 IC₅₀

Pomocí hodnoty IC₅₀ se vyjadřuje inhibiční aktivita inhibitorů, tedy jejich účinnost. IC₅₀ vyjadřuje koncentraci inhibitoru, kdy dojde k poklesu aktivity enzymu na 50 %¹⁹. Substrátem u AChE je acetylthiocholin (ATCh), u BChE se jako substrát používá butyrylthiocholin (BTCh)¹⁹.

Nejvíce užívanou metodou v dnešní době pro určení aktivity ChEs je bezpochyby Ellmanova metoda. Principem této metody je hydrolýza esterů thiocholinu a následný vznik kyseliny²⁰ (schéma 2 a 3).

Následkem reakce SH- skupiny s 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) je vznik 5-merkpto-2-nitrobenzoátového aniontu (TNB⁻). Tento anion dále přechází na 2-nitro-5-thiobenzoovou kyselinu a je měřen při vlnové délce 412 nm spektrofotometricky. Aktivita enzymu je přímo úměrná barevné intenzitě kyseliny²⁰.

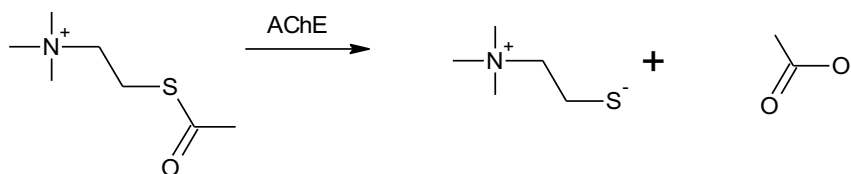


Schéma 2 - Přeměna acetylthiocholinu na thiocholin a kyselinu octovou

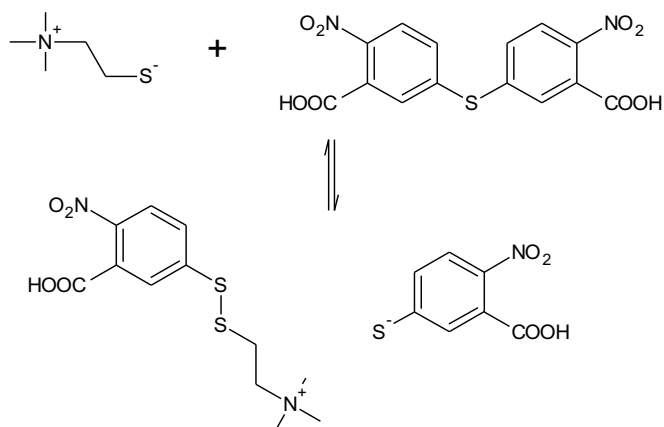


Schéma 3 - Štěpení DTNB a vznik chromoforu

1.4 Inhibitory

Inhibitory cholinesteráz můžeme rozdělit na tři základní typy, a to ireverzibilní, reverzibilní a pseudoreverzibilní. Reverzibilní inhibitory jsou známé pro svůj terapeutický účinek, zatímco ireverzibilní inhibitory mají často toxické účinky²¹.

Pokud se vytvoří komplex inhibitoru vázaný kovalentně k molekule cholinesterázy, můžeme mluvit o ireverzibilní inhibici. Příkladem inhibitorů působících ireverzibilně jsou organofosfáty²².

Dalším případem je reverzibilní inhibice. Při této inhibici dochází k inhibici cholinesterázy jen na určitou dobu. Po disociaci inhibitoru se enzym znovu aktivuje. Příkladem takového inhibitoru je takrin, galantamin či donepezil²³.

Nakonec je zde pseudoreverzibilní inhbice, jejímž úkolem je tvorba komplexu s enzymem jen na pár hodin. Jako příklad je zde možné uvést rivastigmin či ostatní karbamátové deriváty²⁴.

Inhibitory cholinesteráz (IChE) jsou efektivní nejen u pacientů s demencí doprovázející Parkinsonovu chorobu, ale také u lidí trpících demencí s Lewyho tělisky²⁵. Inhibitory AChE jsou dnes využívány při léčbě AD, myasthenie gravis, glaukomu a dalších²¹.

Je dokázáno, že pacienti s AD mají poruchu cholinergní neurotransmise. Pokud těmto pacientům podáme IChE, dojde ke zvýšení synaptického ACh, což má za následek oddálení progresu symptomů AD²⁶. Při podání IChE nedochází pouze k progresi symptomů, ale také ke zlepšení denní aktivity nemocného¹¹.

Efektivita jako taková je u IChE prokázána. Co se týká léků, používá se donepezil, galantamin, rivastigmin, které jsou první volbou pro léčbu pacientů s AD²⁷. Tyto léky však doprovází nepříjemné vedlejší účinky, například zvracení, průjem, nauzea a anorexie²⁸. Byly

provedeny studie, které měly poukázat na rozdíly v účinnosti a efektivitě léčby AD u těchto léčiv. Nicméně, existence patologických změn v mozku nemocných může mít za následek rozdílnou účinnost, toleranci i bezpečnost²⁹.

Je smutným konstatováním, že v dnešní době neexistuje lék pro pacienty trpící touto chorobou. Je však dokázáno, že léky dokážou zlepšit stav, příznaky a také zpomalit průběh AD³⁰. V posledních letech dochází k intenzivnímu zkoumání inhibitorů AChE jako terapeutik pro léčbu AD³¹. V tabulce je uveden přehled vlastností nejznámějších inhibitorů cholinesteráz (tabulka 1).

Tabulka 1 - Přehled vlastností nejznámějších inhibitorů cholinesteráz

název	donepezil	rivastigmin	galantamin	takrin
skupina	piperidin	karbamát	terciální alkaloid	akridin
inhibice	AChE	AChE i BChE	AChE	AChE i BChE
inhibice	reverzibilní	pseudoreverzibilní	reverzibilní	reverzibilní
eliminace	játra	ledviny	játra i ledviny	játra
akumulace	vysoká	velmi nízká	nízká	neznámá
četnost podání	1x denně	2x denně	1x až 2x denně	4x denně
množství	5–10 mg/den	6–12 mg/den	16–24 mg/den	120– 160 mg/den

1.4.1 Takrin

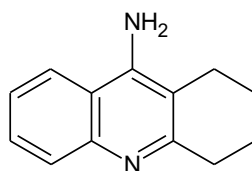
Už výše bylo zmíněno, že se jedná o reverzibilní inhibitor²³, jehož systematický název je 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (obrázek 1).

Takrin je inhibitor, který působí centrálně, byl poprvé syntetizován v roce 1945 Albertem a Gleghill. Byl jedním z prvních léčiv používaných při léčbě lidí s AD³².

Je však dokázáno, že nemusí mít u všech pacientů trpících AD pozitivní výsledky. Byla provedena studie, která zjišťovala efektivnost a účinnost takrinu. Bohužel bylo odhaleno, že někteří pacienti nevykazovali žádné zlepšení, dokonce na takrin nereagovali³³.

Následně však výsledky dalších studií dokazují, že při léčbě takrinem spolu s lecitem ke zlepšení stavu pacientů opravdu dochází, a to na základě psychomotorických testů³⁴.

Vážným nedostatkem takrinu je jeho hepatotoxicita, která ve velké míře brání využití v léčbě³⁵.



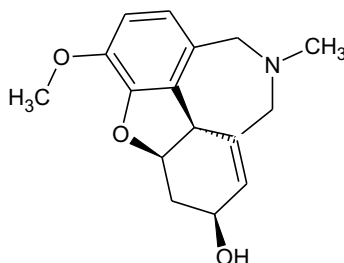
Obrázek 1 - Struktura takrinu

1.4.2 Galantamin

Galantamin, jehož systematický název je (4a*S*,6*R*,8*aS*)-3-methoxy-11-methyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro4a*H*-[1]-benzofuro-[3*a*,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol, je přírodní terciální alkaloid⁷ (obrázek 2).

Jedná se o reverzibilní inhibitor, který inhibuje jak AChE, tak BChE. Je mnohonásobně selektivnější k inhibici AChE. BChE inhibuje v tak malém množství, že se označuje pouze za inhibitor AChE³⁶.

U galantaminu byla také provedena studie s poměrně pozitivními výsledky. Pacienti užívali léky v době 6 či 12 měsíců. Léčba byla velmi dobře snášena, zlepšovala denní aktivitu pacientů a také zpomalovala vývoj poruch chování a symptomů. Nežádoucí účinky se dají považovat za mírné a přechodné³⁷.



Obrázek 2 - Struktura galantaminu

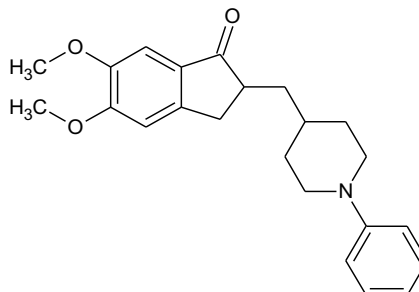
1.4.3 Donepezil

Donepezil je reverzibilní inhibitor patřící do skupiny piperidinů⁷. Chemicky se jedná o látku se vzorcem 2[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on (obrázek 3).

Mnohonásobně více inhibuje AChE než BChE³⁸, proto se dá pokládat pouze za inhibitor AChE¹⁰.

Co se týká nežádoucích účinků, můžeme zmínit gastrointestinální potíže (zvracení, průjem, nauzea a další), nejedná se však o účinky tak závažné jako u takrinu³⁷. Donepezil nemá dokázané hepatotoxické účinky³⁹.

Donepezil prokázal svou účinnost po pravidelném podávání po 14 až 30 týdnech u lidí trpících mírnou až středně závažnou formou AD, přesto se o jeho efektivnosti a účinnosti dále vedou diskuze³⁹.

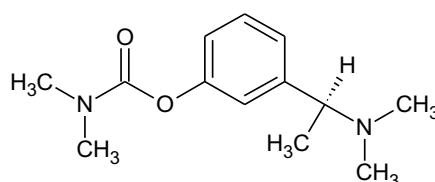


Obrázek 3 - Struktura donepezilu

1.4.4 Rivastigmin

Rivastigmin můžeme zařadit do skupiny pseudoreverzibilních IChE⁴⁰. Systematický název této sloučeniny je [3-[(1S)- 1-(dimethylamino)ethyl]fenyl]-N-ethyl-N-methylkarbamát (obrázek 4).

Jako jediný z výše uvedených inhibuje oba typy cholinesteráz, tedy AChE i BChE⁷. Rivastigmin podobně jako ostatní IChE způsobuje především gastrointestinální potíže⁴¹. Tyto potíže se projevují jako zvracení, průjem, bolest hlavy, bolesti břicha a další⁴².

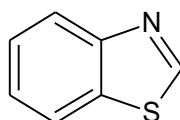


Obrázek 4 - Struktura rivastigminu

1.5 Benzthiazoly

1.5.1 Obecná charakteristika

Benzthiazoly jsou aromatické heterocyklické sloučeniny, které ve své struktuře obsahují síru a dusík (obrázek 5).



Obrázek 5 - Struktura benzthiazolu

Deriváty benzthiazolů jsou dnes často využívány v různých komerčních produktech na základě vykazujících biologických vlastností. Nejširší spektrum biologických vlastností nabízí benzthiazoly substituované v poloze 2. Tyto sloučeniny se mohou pyšnit řadou biologických aktivit, jako jsou účinky antibakteriální⁴³, antifungální⁴⁴, protinádorové⁴⁵ či antidiabetické⁴⁶.

1.5.2 Využití

Benzthiazolové bloky jsou dnes hojně využívány jako univerzální nosiče pro některá farmaka, například léčiva Alzheimerovy choroby⁴⁷.

Na základě širokého spektra biologických vlastností jsou u benzthiazolů často prováděny cytotoxické testy *in vitro*⁴⁸.

Jak již bylo zmíněno, nespočet léčiv obsahuje ve své struktuře benzthiazol, příkladem může být riluzol a pramipexol. Dále se benzthiazol běžně využívá v barvivech. Typickým zástupcem pro použití benzthiazolů v barvivech je thioflavin⁴⁹.

1.5.3 Syntéza

Benzthiazoly substituované v poloze 2 se běžně připravují reakcí dostupného 2-aminothiofenolu s aldehydy a disiřičitanem sodným v N,N-dimethylformamidu (DMF)⁵⁰ (schéma 4).

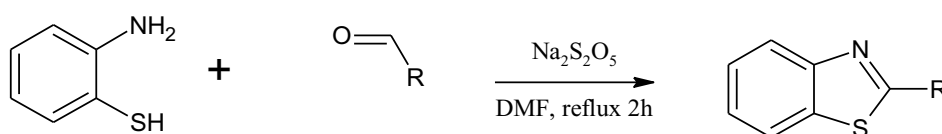


Schéma 4 - Syntéza benzthiazolu se substitucí v poloze 2

Reakcí anilinu (respektive anilinu substituovaného fluorem) a thiokyanatanu sodného za přítomnosti bromu v ledové kyselině octové vzniká benzthiazol substituovaný aminoskupinou⁵¹ (schéma 5).

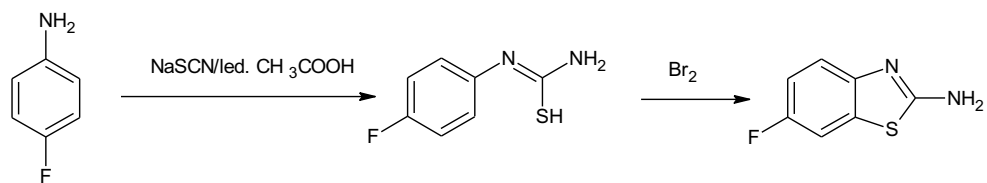
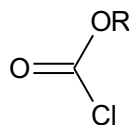


Schéma 5 - Syntéza benzthiazolu s aminoskupinou v poloze 2

1.6 Chlorformiáty

1.6.1 Obecná charakteristika

Chlorformiáty jsou formálně popisovány jako estery kyseliny chlormravenční (obrázek 6).



Obrázek 6 - Struktura chlorformiátů

Většina chlorformiátů jsou bezbarvé, těkavé kapaliny s poměrně nízkým bodem tání a vysokým bodem varu⁵².

Nedílnou vlastností chlorformiátů je jejich dráždivost a leptavost při přímém kontaktu s kůží a očima. Pokud dojde ke vdechnutí, mohou chlorformiáty způsobit kašel, bolest v krku a dokonce i plicní edém. Požití chlorformiátů může mít za následek zvracení, bolest břicha a nevolnost⁵².

Některé chlorformiáty (isopropylchlorformiát, benzylchlorformiát) se rozkládají již za pokojové teploty na CO₂ a alkylchlorid⁵². Chlorformiáty jsou rozpustné ve většině organických rozpouštědel. Přidavkem vody hydrolyzují na CO₂, příslušný alkohol a HCl⁵³.

1.6.2 Využití

V dnešní době jsou chlorformiáty hojně využívány jako intermediáty při výrobě pesticidů, herbicidů, jako meziproducty při výrobě parfémů, barviv a polymerů⁵².

Chlorformiáty se často využívají při alkylationi terciálních aminů (schéma 6). Tato reakce je dobře proveditelná za mírných laboratorních podmínek a výtěžky dosahují vysokých hodnot 85–100 %⁵⁴.

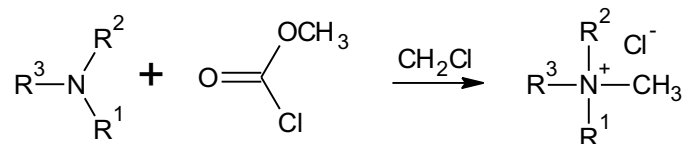


Schéma 6 - Methylatione terciálního aminu

Dalším využitím chlorformiátů jsou n-dealkylační reakce, konkrétně syntéza sekundárních aminů. Při této syntéze se používají především chlorformiáty s vyšším alkylovým řetzcem⁵⁵.

Chlorformiáty jsou často využívaná činidla při syntéze karbamátů a karbonátů. Reakcí chlorformiátů s nadbytkem alkoholu ochotně vznikají dialkylkarbonáty se stejnými substituenty⁵⁶ (schéma 7).

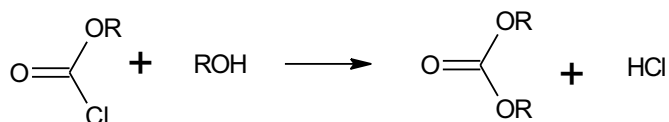


Schéma 7 - Syntéza dialkylkarbonátů se stejnými substituenty

Syntéza dialkylkarbonátů, respektive alkylarylkarbonátů substituovaných různými substituenty je obvykle prováděna reakcí příslušného chlorformiátu a alkoholátu⁵⁶ (schéma 8).

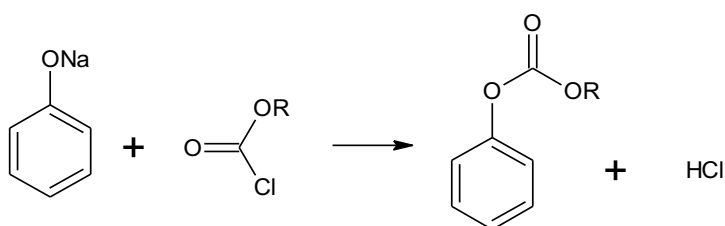


Schéma 8 - Syntéza dialkylkarbonátů s různými substituenty

Dalším využitím je reakce alkylchlorformiátu s primárním či sekundárním aminem⁵³. Typickým příkladem je reakce ethylchlorformiátu s amoniakem, kdy vzniká ethylkarbamát s triviálním názvem uretan. Od této sloučeniny je odvozen skupinový název uretany užívaný pro estery kyseliny karbamové⁵⁶ (schéma 9).

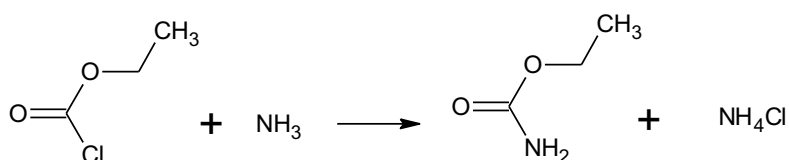


Schéma 9 - Syntéza uretanu

Benzylchlorformiát se často využívá jako ochranná skupina hydroxylových a aminoskupin⁵⁶.

1.6.3 Syntéza

Chlorformiáty ochotně vznikají reakcí alkoholu s fosgenem⁵²(schéma 10).

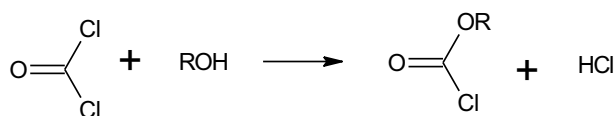


Schéma 10 - Syntéza chlorformiátů

Jako kyslíkatý nukleofil však nemusí vystupovat pouze alkohol. Reakce je proveditelná i s fenoly, respektive s konjugovanou bází (alkoholát, fenolát). Při syntéze aromatických chlorformiátů je zapotřebí báze⁵⁶ (schéma 11).

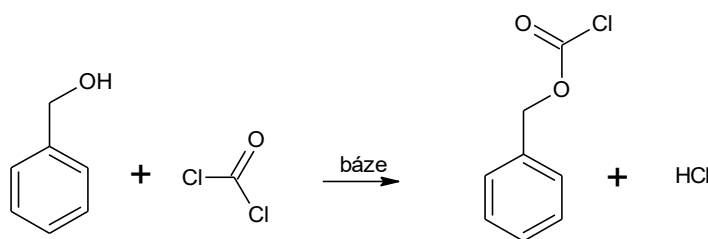


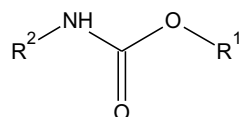
Schéma 11 - Syntéza benzylchlorformiátu

Při nízké teplotě vznikají alkylchlorformiáty, respektive arylchlorformiáty, zvýšením teploty pak vznikají až dialkylchlorformiáty, respektive diarylchlorformiáty⁵³.

1.7 Karbamáty

1.7.1 Obecná charakteristika

Všeobecně jsou karbamáty estery odvozené od kyseliny karbamové, jejíž vzorec je NH_2COOH (obrázek 7). U kyseliny karbamové dochází k dekarboxylaci na amin a oxid uhličitý, jedná se tedy o látku nestálou na rozdíl od karbamátu⁵⁷.



Obrázek 7 - Struktura karbamátů

Cyklické i nocyklické karbamáty, které mají na dusíku navázán vodík, jsou velmi slabými N-kyselinami⁵⁸. Karbamáty jsou látky vyskytující se v kapalném či krystalickém skupenství, které tvoří vodíkové vazby⁵⁹.

1.7.2 Využití

Karbamáty patří do skupiny organických sloučenin, jejichž množství v přírodě se neustále a razantně mění zásahem člověka⁶⁰.

Dnes jsou syntetizovány látky, které slouží jako agrochemikálie⁶¹, pomocné textilní přípravky⁶² a především jsou využívány jako aktivní farmaka při léčbě Alzheimerovy choroby⁶³ a lidí trpících HIV⁶⁴.

Obecně lze říci, že karbamáty jsou mnohem více reaktivní vůči činidlům než aminy. Karbamáty se lehce syntetizují z primárních, popř. sekundárních aminů. Cesta zpět, tudíž z aminů na karbamát je také lehce realizovatelná, proto se dají karbamáty využívat jako chránící skupiny⁵⁸. V dnešní době jsou především využívány jako chránící skupina aminoskupin při syntéze aminů i peptidů⁶⁵.

1.7.3 Syntéza

Nejčastějším případem pro syntézu karbamátů je reakce aminu s alkylchlorformiátem⁵⁷ (schéma 12).

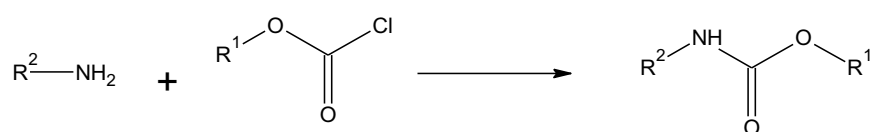


Schéma 12 - Syntéza karbamátů reakcí aminu s alkylchlorformiátem

Další možností je syntéza reakcí izokyanátu a alkoholu⁵⁷. Izokyanát je nejčastěji syntetizován z aminu a COCl_2 ⁶⁶(schéma 13).

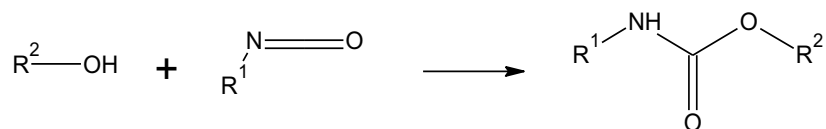


Schéma 13 - Syntéza karbamátů reakcí izokyanátu a alkoholu

Neméně důležitou je syntéza vycházející z aminu a CO_2 . V dalším kroku reaguje vytvořený karbamátový aniont s elektrofilem⁶⁷ (schéma 14). CO_2 je nejen ekonomicky výhodný, ale i ekologicky přijatelný (netoxický, nehořlavý). Navíc se jedná o obnovitelný zdroj⁶⁸.

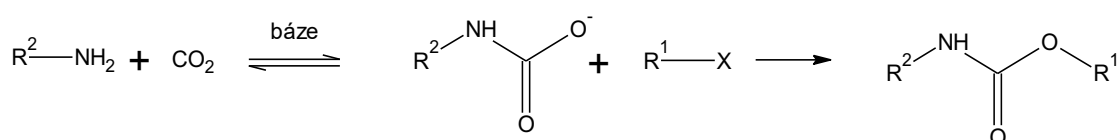


Schéma 14 - Syntéza karbamátů reakcí aminu s CO_2

Karbamáty se dají připravit i termálním rozkladem acylazidu, tato reakce se nazývá Curtiův přesmyk. Výsledný intermediát reaguje s alkoholem za vzniku karbamátů⁶⁹ (schéma 15).

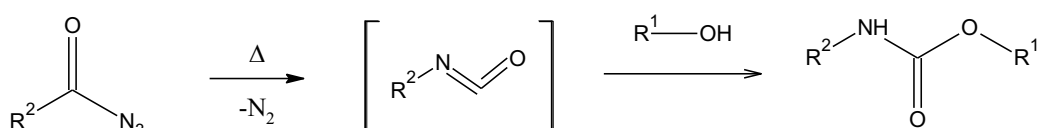


Schéma 15 - Curtiův přesmyk

1.8 Studie inhibitorů obsahujících benzthiazolový blok

1.8.1 Studie derivátů na bázi močovin

V roce 2011 byla provedena studie zaměřující se na syntézu derivátů na bázi močovin s anticholinergními vlastnostmi. Při tomto experimentu bylo syntetizováno a charakterizováno 10 nových sloučenin⁵¹.

Syntéza je založena na reakci (*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethanaminu ve formě *p*-toluensulfonové soli (PTS) se substituovanými fenylyzokyanáty v toluenu za vzniku produktu. Výchozí (*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethanamin je připraven třístupňovou syntézou. Prvním krokem je syntéza (4*R*)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionu, který vzniká fosgenací D-alaninu v THF. Druhý krok zahrnuje reakci 6-fluor-1,3-benzthiazol-aminu s vodným roztokem KOH. Třetím krokem je reakce (4*R*)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2,5-dionu s 2-amino-5-fluorbenzenthiolem sodným⁵¹ (schéma 16).

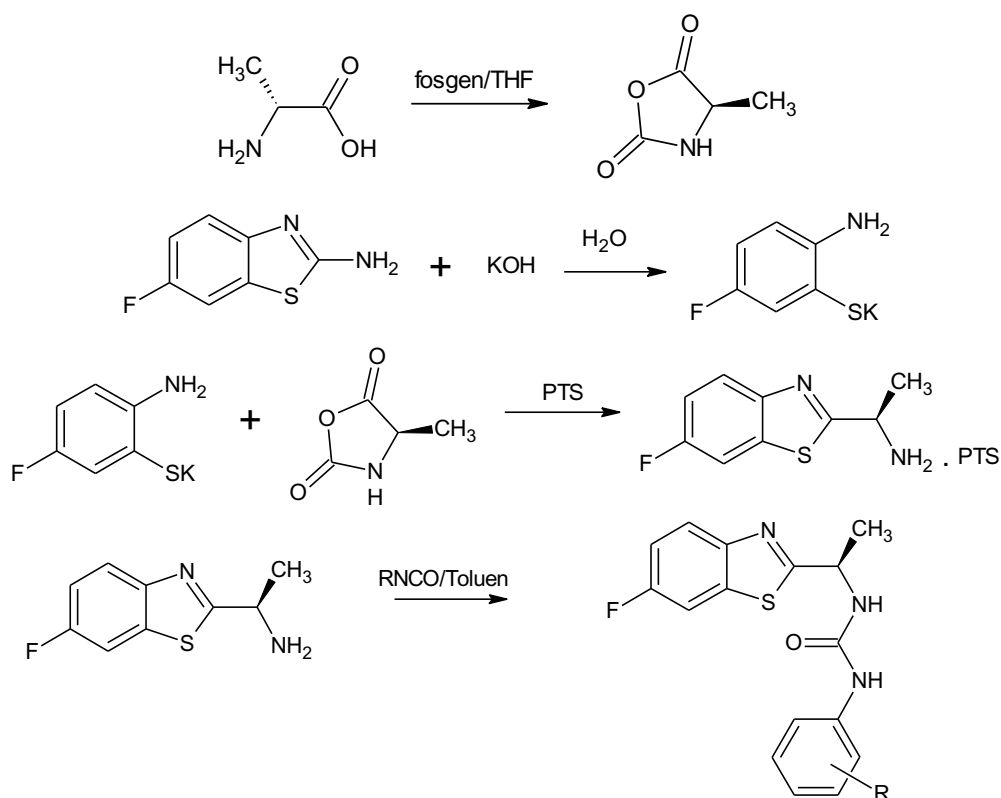
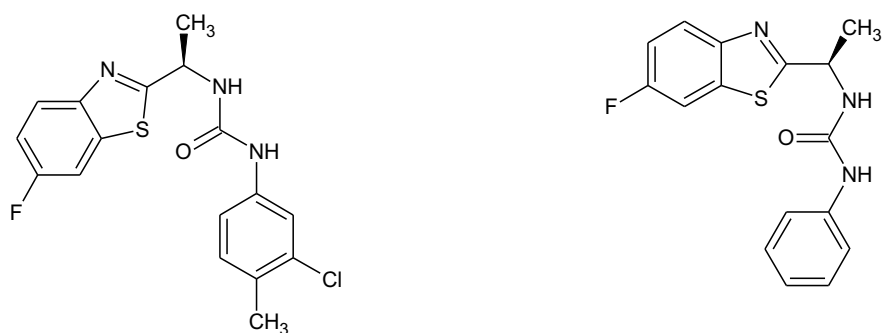


Schéma 16 - Syntéza derivátů na bázi močovin

Výtěžky sloučenin se pohybovaly v rozmezí 85–88 %. U sloučenin byla stanovena IC_{50} proti AChE i BChE⁵¹. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u sloučenin uvedených na obrázku (obrázek 8).



IC₅₀ AChE 15,2 μM

IC₅₀ BChE 3,65 μM

Obrázek 8 - Sloučeniny na bázi močoviny s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE

1.8.2 Studie substituovaných imidazolidin-2,4,5-trionů

Dále byla provedena studie substituovaných imidazolidin-2,4,5-trionů navazující na předchozí studii derivátů na bázi močoviny. Bylo připraveno 11 nových sloučenin⁷⁰.

Při této studii byly použity disubstituované močoviny z předchozí studie. (*R*)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin ve formě PTS soli byl připraven výše popsanou třístupňovou syntézou uvedenou v kapitole 1.8.1. Připravený intermediát reagoval se substituovanými fenyloxykarbonyly. Disubstituované močoviny následně reagovaly s oxalylchloridem. Reakce probíhala v dichlormethanu (DCM) a produkty byly získány vysrážením z *n*-hexanu⁷⁰.

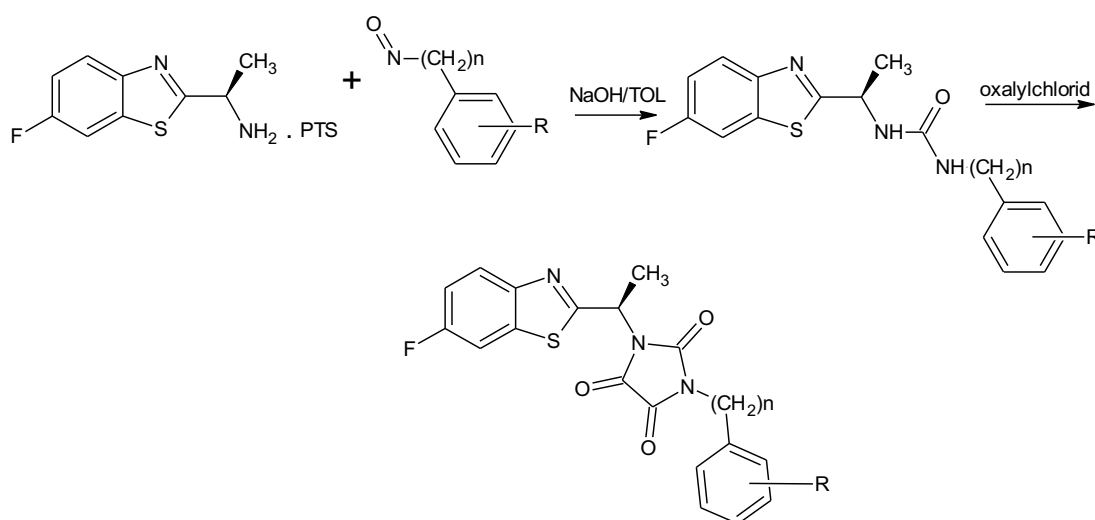
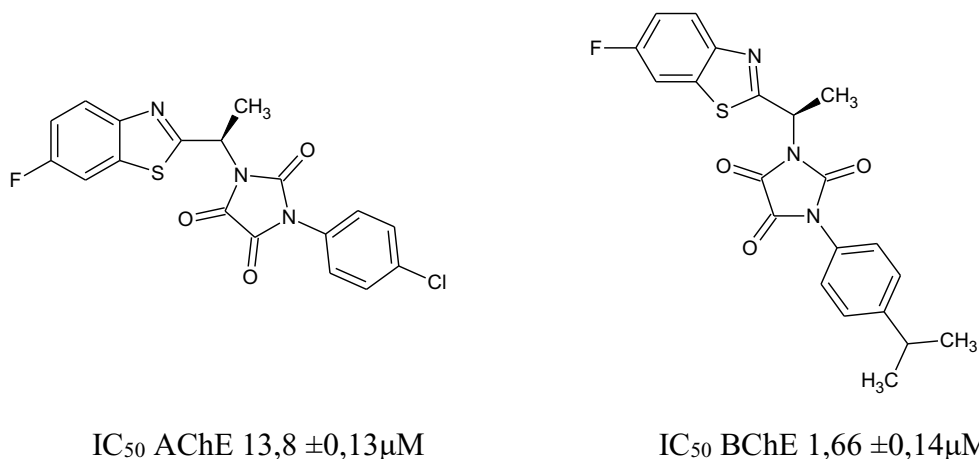


Schéma 17 - Syntéza substituovaných imidazolidin-2,4,5- trionů

Výtěžky těchto sloučeniny se pohybovaly v rozmezí 80–90 %. Produkty byly porovnány se standardními inhibitory, jako je rivastigmin (IC_{50} BChE $19,95 \pm 0,20 \mu\text{M}$) a galantamin (IC_{50} AChE $4 \pm 0,13 \mu\text{M}$, IC_{50} BChE $7,96 \pm 0,59 \mu\text{M}$), které se běžně využívají⁷⁰. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u sloučenin uvedených na obrázku (obrázek 9).



Obrázek 9 - Sloučeniny na bázi imidazolidin-2,4,5- trionů s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE

1.8.3 Studie derivátů na bázi takrinu

V roce 2013 proběhla studie, která měla za úkol syntézu látek na bázi benzthiazolu a takrinu. Byly připraveny 4 nové sloučeniny⁷¹.

Chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin byl připraven reakcí komerčně dostupné kyseliny anthranilové a cyklohexanonu v přítomnosti POCl_3 . Dalším krokem byl přidavek kyseliny 6-aminohexanové v přítomnosti KI katalyzátoru a fenolu. Nakonec byla tato sloučenina kondenzována s řadou různých derivátů aminobenzthiazolu⁷¹ (schéma 18).

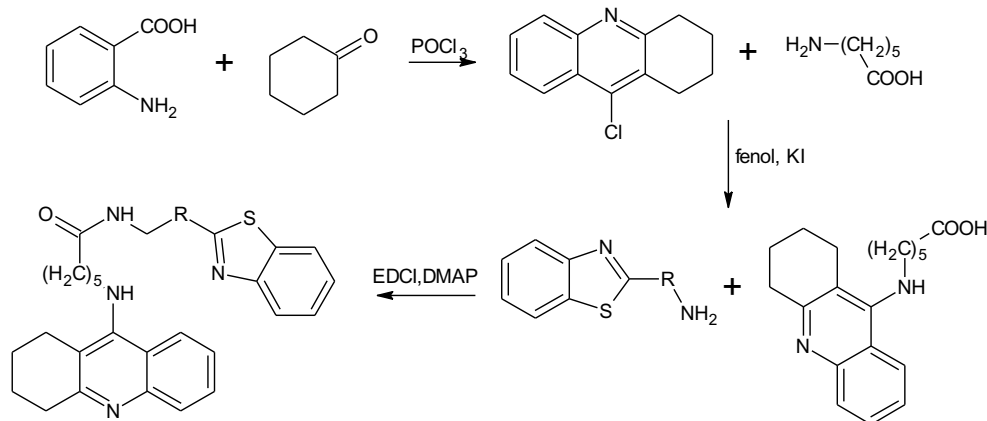
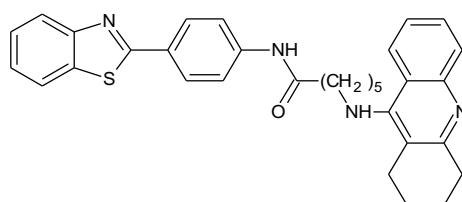


Schéma 18 - Syntéza derivátů na bázi takrinu

U syntetizovaných látek byla určena IC_{50} proti acetylcholinesteráze a výsledky byly porovnány se standardním inhibitorem takrinem. Inhibiční koncentrace takrinu je IC_{50} AChE 0,19 μ M a látka uvedená na obrázku (obrázek 10) vykazovala IC_{50} AChE 0,34 μ M, což je hodnota velice blízká⁷¹.



IC_{50} AChE 0,34 μ M

Obrázek 10 - Sloučenina na bázi takrinu s největším inhibičním účinkem na AChE

1.8.4 Studie benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou

Další rozsáhlou studií byla syntéza a testování anticholinergních aktivit u benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou. V rámci této práce bylo připraveno 23 nových sloučenin třístupňovou syntézou⁴⁸.

V prvním reakčním stupni reagoval L-norvalin, respektive L-valin ve formě sodné soli s příslušnými alkylchlorformiáty za vzniku karbamátů sodných solí obou aminokyselin. Tyto karbamáty bez izolace reagovaly ve druhém reakčním stupni s isobutylchlorformiátem za vzniku příslušného isobutyl acylkarbonátu. Tento meziprodukt bez izolace reagoval v posledním reakčním stupni s (*R*)-1-(6-fluorbenzthiazol-2-yl)aminem ve formě PTS soli za vzniku konečných produktů (schéma 19). Tato syntéza je poměrně dobře proveditelná pro různé aminokyseliny i chlorformiáty⁴⁸.

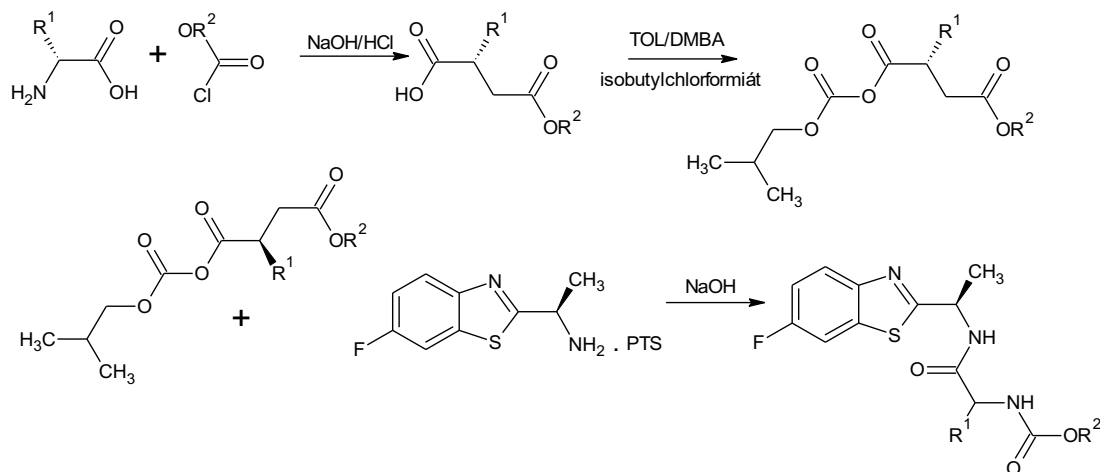
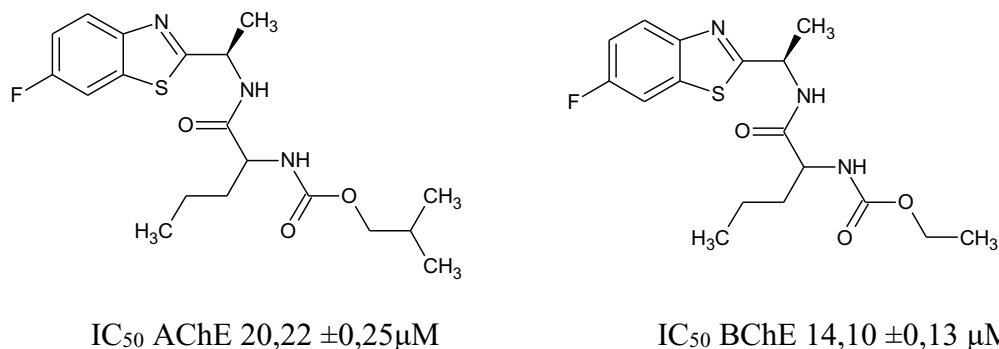


Schéma 19 - Syntéza benzthiazolových karbamátů se zabudovanou aminokyselinou

U sloučenin byla stanovena IC_{50} vůči AChE i BChE. Dále byly hodnoty porovnány se standardními inhibitory rivastigminem a galantaminem⁴⁸. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u sloučenin uvedených na obrázku (obrázek 11).



Obrázek 11 - Benzthiazolové karbamáty se zabudovanou aminokyselinou s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE

1.8.5 Studie benzthiazolových karbamátů

V roce 2016 byla zveřejněna studie zaměřena na syntézu 1-[(1*R*)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]-3-alkylkarbamátů. Bylo připraveno 16 nových sloučenin⁷².

Výchozí sloučenina (*R*)-1-(6-fluorobenzthiazol-2-yl)ethanamin, která byla připravena jako odpovídající PTS sůl postupem uvedeným v kapitole 1.8.1. reagovala s příslušným alkylchlorformiátem za přítomnosti NaOH za vzniku požadovaných karbamátů⁷² (schéma 20).

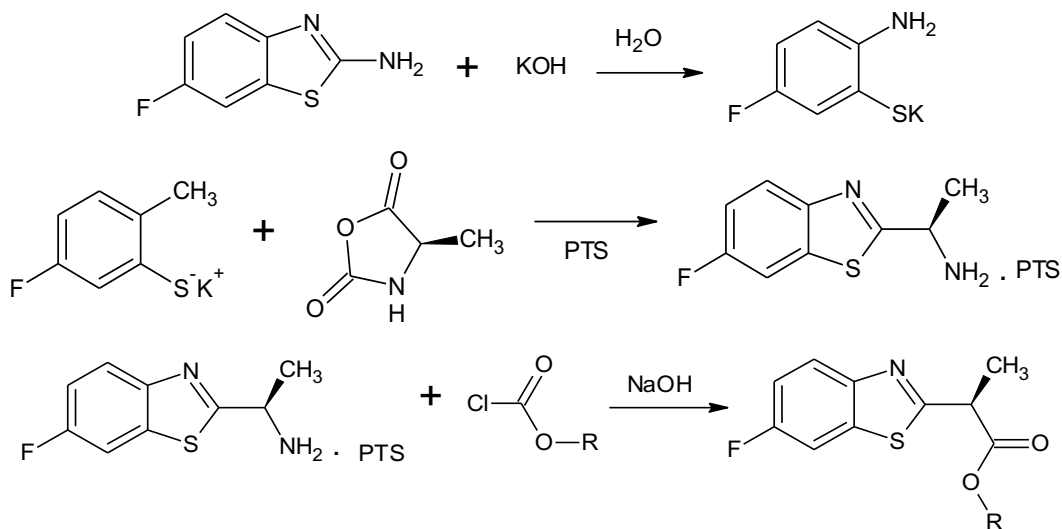
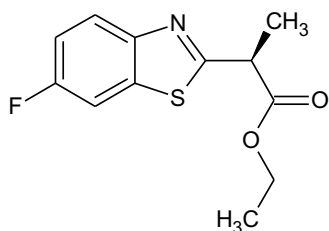
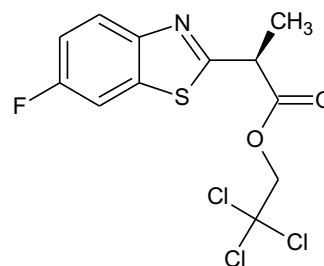


Schéma 20 - Syntéza benzthiazolových karbamátů

Výtěžky těchto sloučenin se pohybovaly v rozmezí 80–90 %. U těchto karbamátů byla stanovena inhibiční aktivita AChE i BChE. Inhibiční aktivita připravených karbamátů byla následně porovnávána s referenční látkou rivastigminem. Při této studii se jasně prokázalo, že lineární alifatické řetězce mají prokazatelně vyšší inhibiční aktivitu než rozvětvené sloučeniny⁷². Nejlepších výsledků bylo dosaženo u sloučenin uvedených na obrázku (obrázek 12).



IC₅₀ AChE 6,06 ±0,02μM



IC₅₀ BChE 8,31 ±0,03 μM

Obrázek 12 - Benzthiazolové karbamáty s největším inhibičním účinkem na AChE a BChE

2 Experimentální část

2.1 Komerčně dostupná chemická činidla

Butylchlorformiát 98% – Sigma-Aldrich

Destilovaná voda

Ethylchlorformiát 97% – Sigma-Aldrich

Fosgen – Sigma-Aldrich

Glycin \geq 99% – Sigma-Aldrich

Hydroxid draselný 48% – Sigma-Aldrich

Hydroxid sodný 10% – Sigma-Aldrich

Isobutylchlorformiát 98% – Sigma-Aldrich

Isopropanol \geq 99% – Sigma-Aldrich

Kyselina chlorovodíková 36,5% – Sigma-Aldrich

Methylchlorformiát 99% – Sigma-Aldrich

N-hexan 95% – Sigma-Aldrich

Propylchlorformiát 98% – Sigma-Aldrich

Tetrahydrofuran \geq 99% – Sigma-Aldrich

Toluen p.a. – Sigma-Aldrich

Triethylamin \geq 99% – Sigma-Aldrich

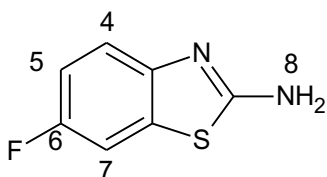
2-chlorethylchlorformiát 97% – Sigma-Aldrich

2,2,2-trichlorethylchlorformiát 98% – Sigma-Aldrich

2,2,2-trifluorethylchlorformiát 98% – Sigma-Aldrich

2.2 Charakteristika výchozích sloučenin

2.2.1 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin



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

Vzhled: nažloutlá pevná látka

Bod tání: 182–184 °C

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

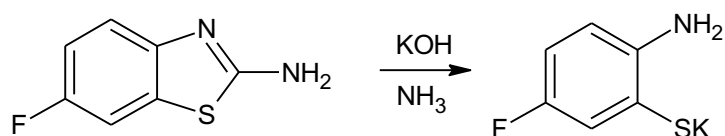
¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 165,3$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 2,2$ Hz); $156,4$ (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 235,3$ Hz); $148,8$; $131,6$ (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); $117,1$ (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 8,6$ Hz); $113,2$ (d,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

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

2.3 Syntéza výchozích sloučenin

2.3.1 Syntéza 2-amino-5-fluorfenylthiolátu draselného

Reakční schéma:



Násada:

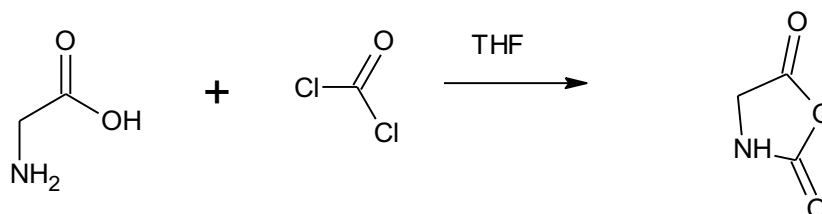
KOH 48%	43,2 g (0,37 mol)
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	12,0 g (0,07135 mol)

Pracovní postup:

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

2.3.2 Syntéza 1,3-oxazolidin-2,5-dionu

Reakční schéma:



Násada:

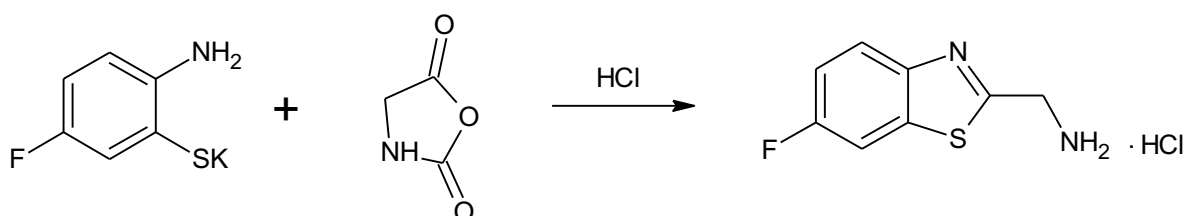
Gly-NCA	15,32 g (0,204 mol)
THF	150 ml
fosgen	60 g (0,6 mol)

Pracovní postup:

Do reaktoru o objemu 0,25 l bylo předloženo 15,32 g Gly-NCA a 150 ml suchého THF. Takto připravená směs byla při laboratorní teplotě 30 minut míchána. Během následující hodiny bylo do směsi nadávkováno 60 g fosgenu, postupně byla směs vyhřáta na 40 °C. Při teplotě 40–42 °C byla směs míchána, dokud se všechen glycin nerozpustil. Aniž by reakční směs přesáhla 40 °C, bylo oddestilováno 350 ml THF. Do destilačního zbytku bylo přidáno 150 ml hexanu. Získaný produkt byl zfiltrován a promyt 20 ml hexanu. Touto reakcí bylo připraveno 18,97 g produktu, což je 92% výtěžek.

2.3.3 Syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

Reakční schéma:



Násada:

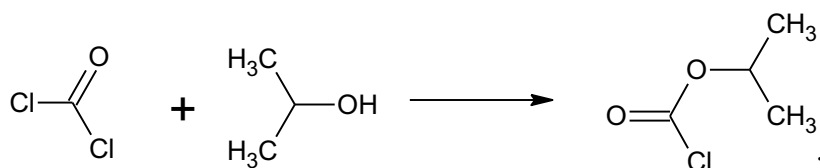
konc. HCl	45,5 g
voda	53,0 g
K ⁺ sůl	55,0 g
1,3-oxazolidin-2,5-dion	8,08 g (0,08)
THF	26,0 g

Pracovní postup:

Do reaktoru o objemu 0,5 l bylo předloženo 45,5 g konc. HCl a 53 ml vody. Do ochlazené směsi bylo nadávkováno 55 g vodného roztoku K⁺ soli, aniž by teplota přesáhla 5 °C. Následně bylo do reakční směsi přidáno 26 g THF a 8,08 g 1,3-oxazolidin-2,5-dionu. Dále byla reakční směs vyhřáta na teplotu 50 °C a při této teplotě byla míchána 4 hodiny. Po ochlazení na teplotu 20 °C byl výsledný produkt zfiltrován a promyt 2x 20 ml toluenu. Produkt byl sušen na vzduchu. Touto reakcí bylo připraveno 14,98 g (96% výtěžek).

2.3.4 Syntéza isopropylchlorformiátu

Reakční schéma:



Násada:

fosgen	70 g (0,7 mol)
isopropanol	25 ml (0,3 mol)

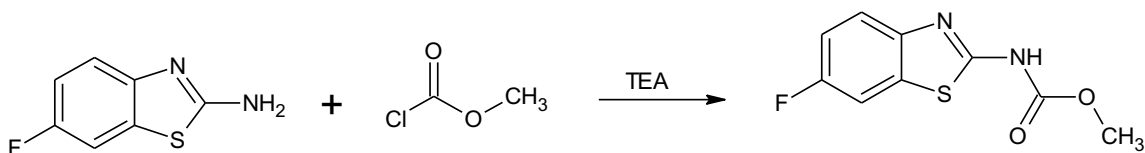
Pracovní postup:

Ve tříhrdlé 10ml baňce bylo zkapalněno 70 g fosgenu. Do fosgenu bylo postupně přidáno 25 ml isopropanolu tak, aby teplota reakční směsi nepřesáhla 0 °C. Reakční směs byla postupně ohřata na 20 °C. Z reakční směsi byl následně suchým dusíkem vystripován nezreagovaný fosgen. Reakcí vzniklý HCl a stripovaný fosgen byly likvidovány v louhové absorpci (10% NaOH). Isopropylchlorfomiát byl připraven v kvantitativním výtěžku.

2.4 Syntéza karbamátů

2.4.1 Methyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

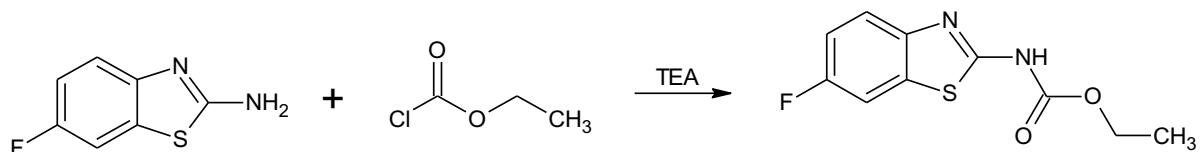
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
methylchlorformiát	497 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Do baňky o objemu 250 ml bylo předloženo 1 g (0,006 mol) 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin a 50 ml toluenu. Následně bylo přidáno 497 μ l methylchlorformiátu. Dalším krokem bylo přidání 1 ml TEA. Takto připravená směs byla 24 hodin míchána. Po 24 hodinách byla směs zahřata a filtrována za horka. Dále bylo přidáno 20 ml destilované vody a směs byla zahřívána až do rozpuštění veškeré sraženiny. Po oddělení organické vrstvy a následném ochlazení na teplotu 5–10 °C byl vykrystalizovaný produkt izolován filtrací. Izolovaný produkt byl sušen na vzduchu. Bylo připraveno 1,14 g produktu (84% výtěžek).

2.4.2 Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

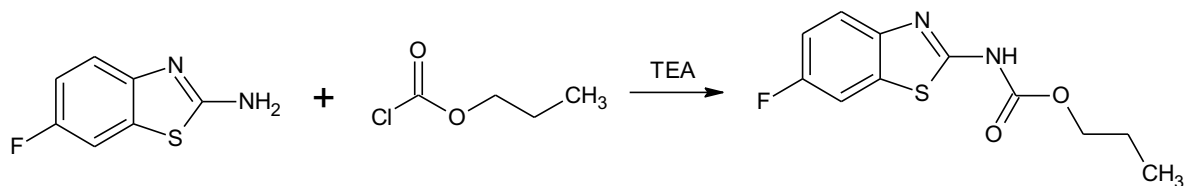
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
ethylchlorformiát	604 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,12 g produktu (78% výtěžek).

2.4.3 Propyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

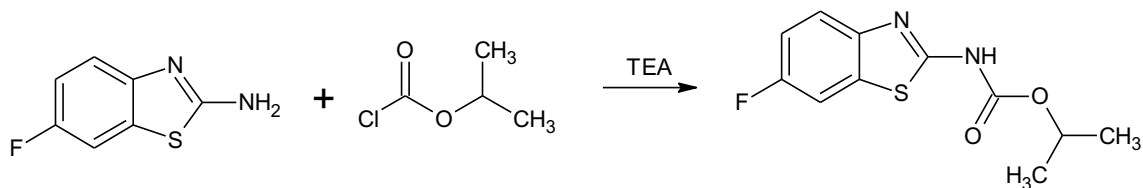
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
propylchloroformiát	712 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,25 g produktu (82% výtěžek).

2.4.4 Isopropyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

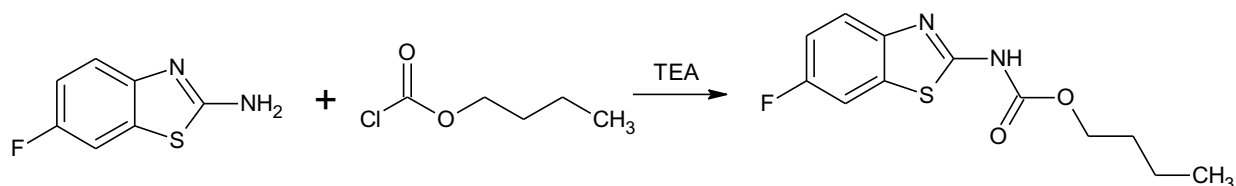
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
isopropylchlorformiát	714 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,24 g produktu (81% výtěžek).

2.4.5 Butyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

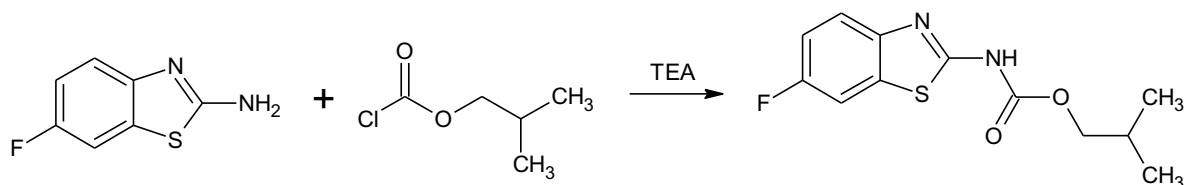
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
butylchlorformiát	819 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,34 g produktu (83% výtěžek).

2.4.6 Isobutyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

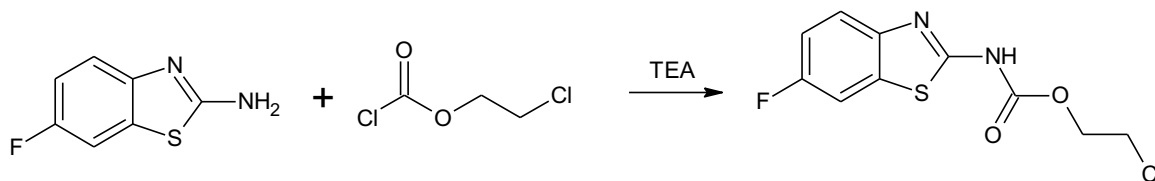
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
isobutylchlorformiát	821 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,27 g produktu (79% výtěžek).

2.4.7 2-chlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

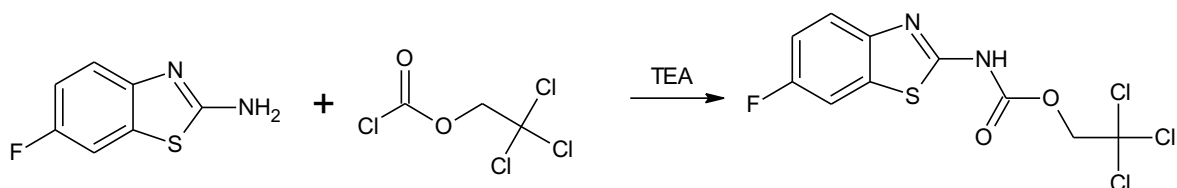
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
2-chlorethylchlorformiát	678 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,25 g produktu (76% výtěžek).

2.4.8 2,2,2-trichlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

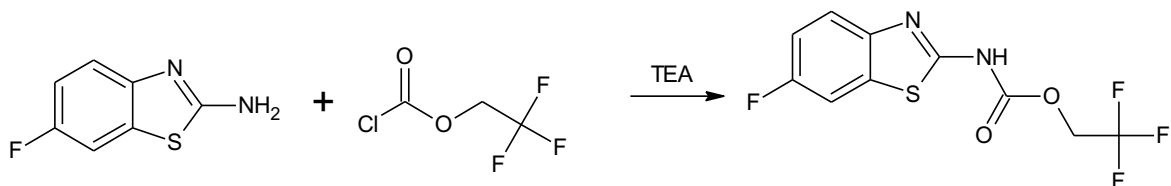
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
2,2,2-trichlorethylchlorformiát	827 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,63 g produktu (79% výtěžek).

2.4.9 2,2,2-trifluorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Reakční schéma:



Násada:

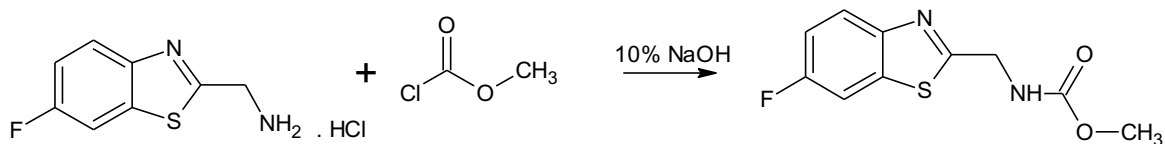
6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin	1 g (0,006 mol)
2,2,2-trifluorethylchlorformiát	710 μ l (0,0065 mol)
TEA	1 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	20 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Bylo připraveno 1,52 g produktu (86% výtěžek).

2.4.10 Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

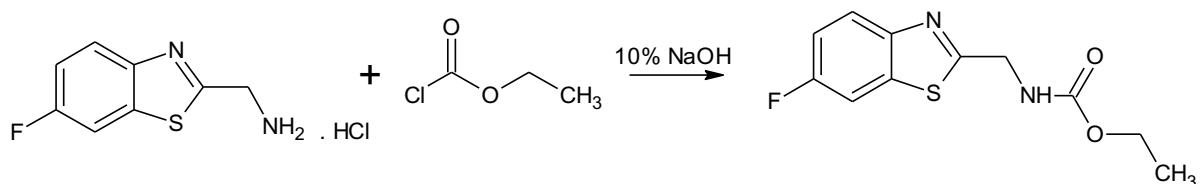
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
methylchlorformiát	459 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Do baňky o objemu 250 ml bylo předloženo 1,09 g (0,005 mol) 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu a 50 ml toluenu. Následně bylo přidáno 459 μ l methylchlorformiátu a 50 ml vody. Přidáním 3 ml 10% NaOH bylo za stálého míchání upraveno pH na hodnotu 9–10. Tato hodnota byla v průběhu reakce ověřována pomocí pH indikátorového papírku. Pokud hodnota pH neodpovídala požadované hodnotě, bylo přidáno 1–2 ml 10% NaOH. Směs byla další dvě hodiny takto ponechána a za laboratorní teploty míchána. Po separaci vrstev bylo z organické vrstvy vakuově (30–40 mbar/50 °C) oddestilováno 20 ml toluenu. Následně byla směs ochlazena a produkt byl vykryštalizován. Produkt byl sušen za laboratorní teploty. Bylo připraveno 1,01 g produktu (84% výtěžek).

2.4.11 Ethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

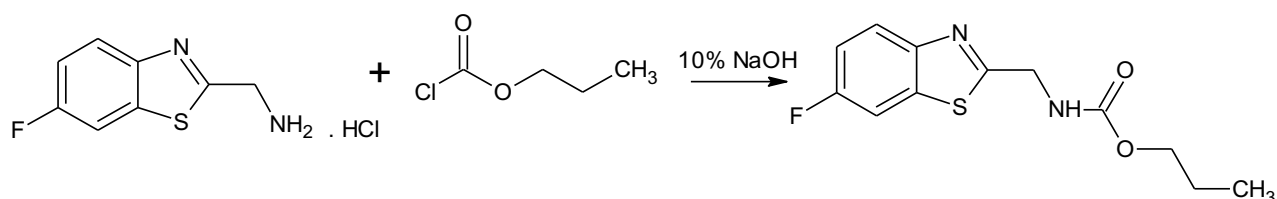
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
ethylchlorformiát	558 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,09 g produktu (86% výtěžek).

2.4.12 Propyl[(6fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

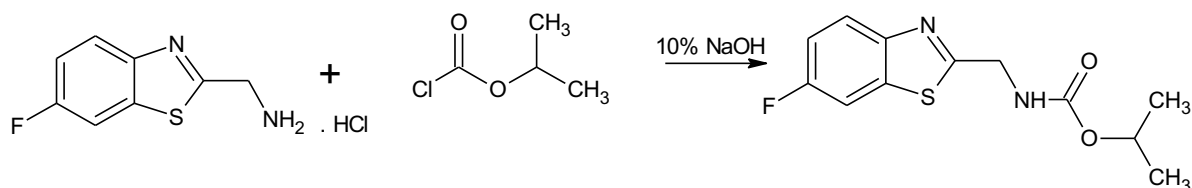
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
propylchlorformiát	657 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,06 g produktu (79% výtěžek).

2.4.13 Isopropyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

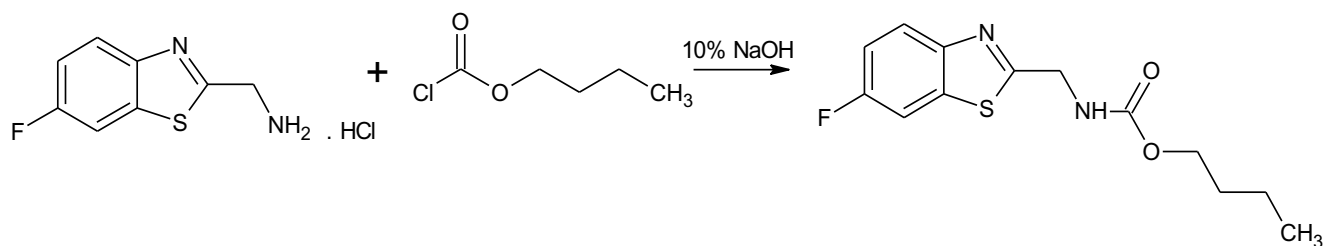
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
isopropylchlorformiát	659 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,11 g produktu (83% výtěžek).

2.4.14 Butyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

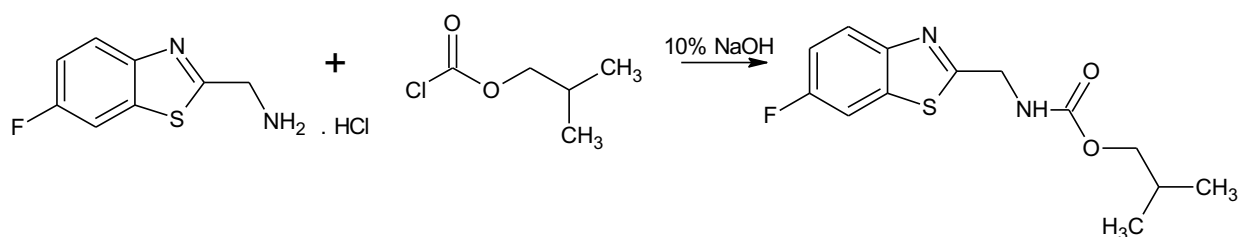
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
butylchlorformiát	756 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,14 g produktu (81% výtěžek).

2.4.15 Isobutyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

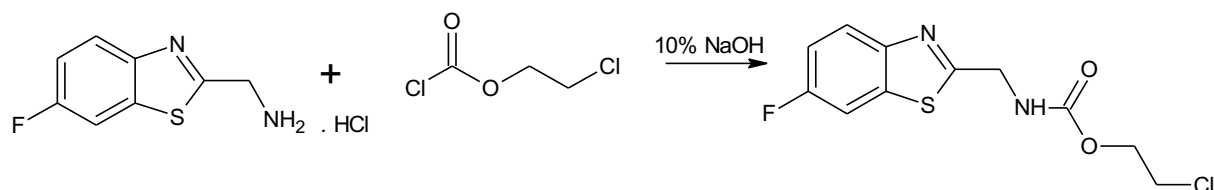
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
isobutylchloroformiát	758 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,19 g produktu (84% výtěžek).

2.4.16 2-chlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

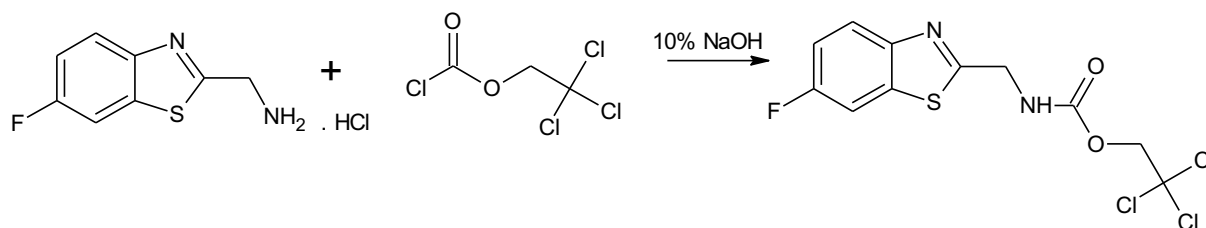
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
2-chlorethylchloroformiát	626 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,15 g produktu (80% výtěžek).

2.4.17 2,2,2,-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

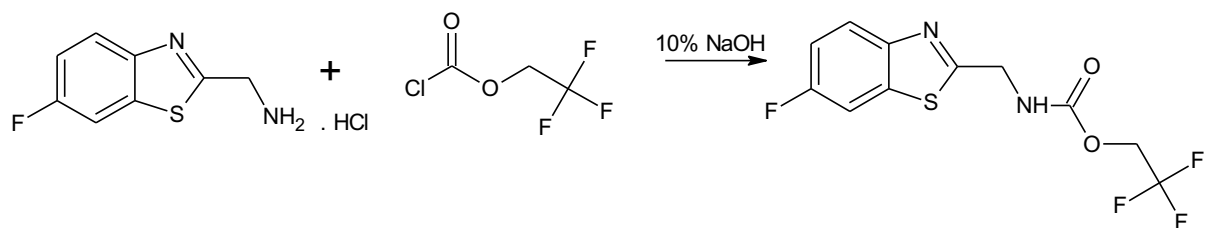
1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
2,2,2-trichlorethylchlorformiát	763 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,36 g produktu (76% výtěžek).

2.4.18 2,2,2-trifluorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

Reakční schéma:



Násada:

1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,09 g (0,005 mol)
2,2,2-trifluorethylchlorformiát	656 μ l (0,006 mol)
NaOH 10%	3 ml
toluen	50 ml
destilovaná voda	50 ml

Postup:

Syntéza produktu probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.10. Bylo připraveno 1,33 g produktu (86% výtěžek).

2.5 Metody charakterizace

2.5.1 Bod tání

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

2.5.2 NMR spektroskopie

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

2.5.3 Elementární analýza

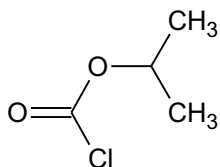
Elementární analýza byla provedena na přístroji FLASH 2000 CHNS Organic elemental analyser.

2.5.4 HRMS MALDI

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí MALDI hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) vybaveného dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz) metodou "dried droplet". Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů v normálním hmotnostním rozsahu (m/z 200–2000) s rozlišením 100 000 při $m/z = 400$. Pro volbu pozice laseru byla využita předdefinovaná spirálová schémata pohybu. Jako matrice byl použit 0,2 M roztok 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB) ve směsi acetonitril : voda (95 : 5), přičemž molární poměr matrice : vzorek byl vždy přibližně 40 : 1. Výsledné spektrum tvoří průměr z celého měření.

2.6 Charakterizace připravených výchozích látek a karbamátů

2.6.1 Isopropylchlorformiát

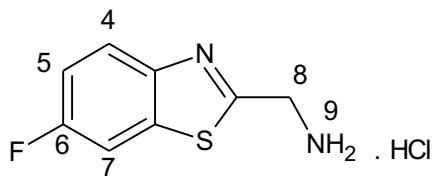


Vzhled: bezbarvá kapalina

^1H NMR (400,13 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,09$ (1H, m, CH); $1,39$ (1H, dd, $^3J = 6,3$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100,62 MHz, CDCl_3): $\delta = 149,9$; $77,7$; $21,4$.

2.6.2 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 96 %

Bod tání: 202–204 °C (dekompozice)

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9,03 (1H, t, ³J = 5,8 Hz, NH H9); 8,09 (1H, dd, ⁴J = 2,8 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 8,00 (1H, dd, ³J = 8,9 Hz, ⁴J(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,41 (1H, dt, ⁴J = 2,7 Hz, ³J = 9,1 Hz, ³J(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,55 (1H, s, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164,1 (d, ⁴J(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 159,8 (d, ¹J(¹⁹F, ¹³C) = 242,7 Hz); 148,7; 136,5 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 123,8 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 9,9 Hz); 115,1 (d, ³J(¹⁹F, ¹³C) = 25,0 Hz); 108,9 (d, ²J(¹⁹F, ¹³C) = 27,6 Hz); 4,55 (H2, s, H9).

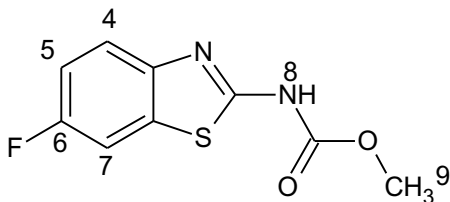
¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -115,5.

Elementární analýza: C₈H₈ClFN₂S (M_r = 218,68)

Vypočteno: C(43,94 %), H(3,69 %), N(12,81 %), S(14,66 %)

Stanoveno: C(44,22 %), H(3,79 %), N(12,62 %), S(14,42 %)

2.6.3 Methyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 84 %

Bod tání: 319–321 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,12 (1H, s, NH H8); 7,87 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,68 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,8 Hz, H4); 7,27 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 3,78 (3H, s, H9).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159,6 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,3 Hz); 157,2 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 241,5 Hz); 152,8; 146,3; 132,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,6 Hz); 121,2 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,1 Hz); 113,9 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,1 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 28,2 Hz); 53,0.

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

Elementární analýza: C₉H₇FN₂O₂S (M_r = 226,23)

Vypočteno: C(47,78 %), H(3,12 %), N(12,38 %), S(14,17 %)

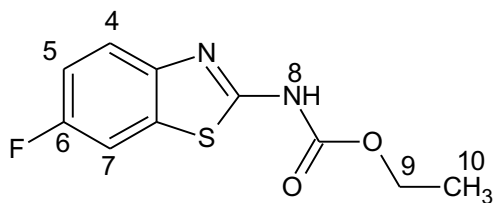
Stanoveno: C(48,01 %), H(3,00 %), N(12,20 %), S(14,42 %)

HRMS MALDI: C₉H₇FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 227,02850 m/z

Stanoveno: 227,02858 m/z

2.6.4 Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 78 %

Bod tání: 249–251 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,05 (1H, s, NH H8); 7,85 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,7 Hz, H7); 7,68 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,25 (1H, dt, ⁴*J* = 2,9 Hz, ³*J* = 9,2 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H5); 4,24 (2H, q, ³*J* = 7,1 HZ, H9); 2,49 (3H, t, ³*J* = 1,7 HZH10).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161,9 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,1 Hz); 159,4 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 240,5 Hz); 153,8; 146,1; 133,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,9 Hz); 121,2 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 10,2 Hz); 114,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,8 Hz); 108,1 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 26,0 Hz); 62,0; 14,3.

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

Elementární analýza: C₁₀H₉FN₂O₂S (M_r = 240,25)

Vypočteno: C(49,99 %), H(3,78 %), N(11,66 %), S(13,35 %)

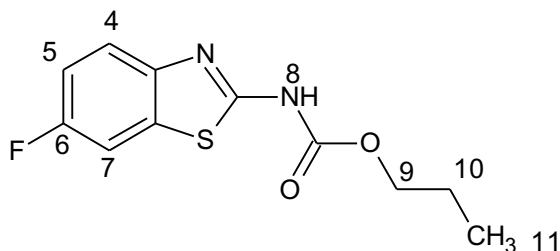
Stanoveno: C(49,78 %), H(3,69 %), N(11,88 %), S(13,53 %)

HRMS MALDI: C₁₀H₉FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 241,04415 m/z

Stanoveno: 241,04430 m/z

2.6.5 Propyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 81 %

Bod tání: 232–234 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,03 (1H, s, NH H8); 7,86 (1H, dd, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,68 (1H, dd, ³*J* = 8,6 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,7 Hz, H4); 7,25 (1H, dt, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,15 (2H, t, ³*J* = 6,8 Hz, H9); 2,50 (2H, m, H10); 1,66 (3H, m, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,5 Hz); 159,6 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 241,5 Hz); 152,3; 145,1; 133,4 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 12,6 Hz); 121,8 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,1 Hz); 113,9 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 25,1 Hz); 108,1 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,5 Hz); 67,3; 21,7; 10,1.

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

Elementární analýza: C₁₁H₁₁FN₂O₂S (M_r = 254,28)

Vypočteno: C(51,96 %), H(4,36 %), N(11,02 %), S(12,61 %)

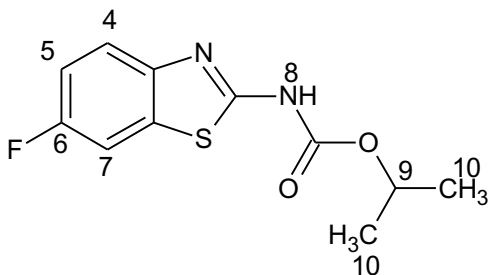
Stanoveno: C(52,18 %), H(4,27 %), N(10,79 %), S(12,85 %)

HRMS MALDI: C₁₁H₁₁FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 255,05980 m/z

Stanoveno: 255,06008 m/z

2.6.6 Isopropyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 81 %

Bod tání: 234–235 °C

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): δ = 11,70 (1H, s, NH H8); 7,87 (1H, dd, 4J = 2,7 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 8,8 Hz, H7); 7,67 (1H, dd, 3J = 8,8 Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 4,8 Hz, H4); 7,37 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ = 2,6 Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$ = 9,1 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,1 Hz, H5); 4,99 (1H, m, H9); 1,29 (6H, d, J = 6,3 Hz, H10).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): δ = 166,5 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 3,3 Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 242,2 Hz); 153,6; 147,6; 133,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 11,6 Hz); 122,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 9,8 Hz); 114,3 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 23,8 Hz); 108,3 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 28,3 Hz); 69,9; 21,7.

^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): δ = -116,6.

Elementární analýza: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ (M_r = 254,28)

Vypočteno: C(51,96 %), H(4,36 %), N(11,02 %), S(12,61 %)

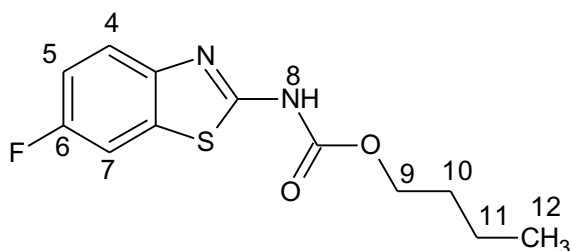
Stanoveno: C(51,67 %), H(4,47 %), N(10,82 %), S(12,37 %)

HRMS MALDI: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]

Vypočteno: 255,05980 m/z

Stanoveno: 255,06003 m/z

2.6.7 Butyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 83 %

Bod tání: 220–221 °C

^1H NMR (400,13 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,05 (1H, s, NH H8); 7,86 (1H, dd, 4J = 2,7 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 8,7 Hz, H7); 7,68 (1H, dd, 3J = 8,8 Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 4,8 Hz, H4); 7,25 (1H, dt, 4J = 2,7 Hz, 3J = 9,1 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,1 Hz, H5); 4,20 (2H, t, 3J = 6,7 Hz, H9); 1,63 (2H, m, H10); 1,37 (2H, m, H11); 0,92 (3H, t, 3J = 7,7 Hz, H12).

^{13}C NMR (100,62 MHz, DMSO- d_6): δ = 166,3 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 3,2 Hz); 159,2 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 243,5 Hz); 152,6; 146,6; 133,1 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 11,8 Hz); 122,3 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 9,3 Hz); 114,2 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 24,5 Hz); 108,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 28,3 Hz); 65,1; 30,3; 18,5; 13,6.

^{19}F NMR (376,46 MHz, DMSO- d_6): δ = -116,6.

Elementární analýza: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ (M_r = 268,31)

Vypočteno: C(53,72 %), H(4,88 %), N(10,44 %), S(11,95 %)

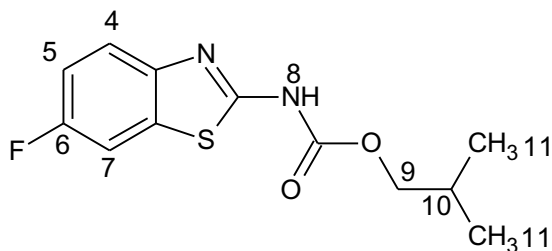
Stanoveno: C(53,48 %), H(5,00 %), N(10,22 %), S(12,19 %)

HRMS MALDI: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]

Vypočteno: 269,07545 m/z

Stanoveno: 269,07562 m/z

2.6.8 Isobutyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 79 %

Bod tání: 235–236 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,07 (1H, s, NH H8); 7,86 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,7 Hz, H7); 7,68 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,8 Hz, H4); 7,25 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,2 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H5); 3,98 (2H, d, ³*J* = 6,5 Hz H9); 1,95 (1H, m, H10); 0,93 (3H, d, ³*J* = 6,8 Hz, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,1 Hz); 159,7 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,1 Hz); 154,8; 148,6; 135,3 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,4 Hz); 122,9 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 114,5 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 23,9 Hz); 108,1 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 28,1 Hz); 71,6; 45,5; 27,4; 18,7.

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

Elementární analýza: C₁₂H₁₃FN₂O₂S (M_r = 268,31)

Vypočteno: C(53,72 %), H(4,88 %), N(10,44 %), S(11,95 %)

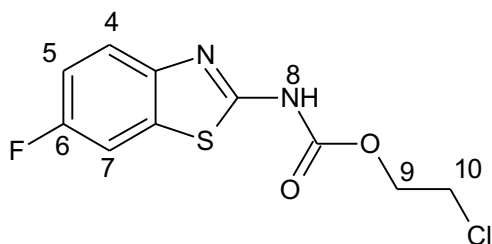
Stanoveno: C(53,45 %), H(4,98 %), N(10,68 %), S(11,73 %)

HRMS MALDI: C₁₂H₁₃FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 269,07545 m/z

Stanoveno: 269,07556 m/z

2.6.9 2-chlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 76 %

Bod tání: 287–288 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 12,27$ (1H, s, NH H8); 7,87 (1H, dd, $^4J = 2,4$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,6$ Hz, H7); 7,70 (1H, dd, $^3J = 8,6$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,6$ Hz, H4); 7,25 (1H, dt, $^4J = 2,4$ Hz, $^3J = 9,0$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H5); 4,47 (2H, t, $^3J = 5,0$ Hz H9); 3,9 (2H, t, $^3J = 5,4$ Hz H10).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 165,9$ (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$ Hz); 158,4 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 240,1$ Hz); 153,8; 146,4; 132,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 12,8$ Hz); 121,4 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 8,8$ Hz); 114,4 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,0$ Hz); 108,2 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 28,0$ Hz); 65,8; 42,6.

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

Elementární analýza: C₁₀H₈ClFN₂O₂S (M_r = 274,70)

Vypočteno: C(43,72 %), H(2,94 %), N(10,20 %), S(11,67 %)

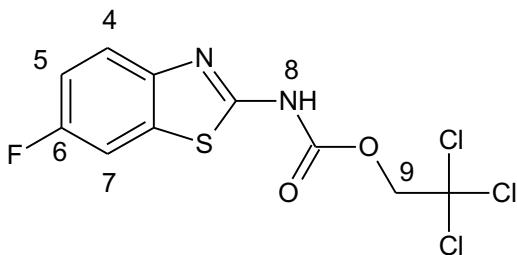
Stanoveno: C(43,50 %), H(2,85 %), N(10,44 %), S(11,90 %)

HRMS MALDI: C₁₀H₈ClFN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 275,00518 m/z

Stanoveno: 275,00539 m/z

2.6.10 2,2,2-trichlorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 79 %

Bod tání: 245–246 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,67 (1H, s, NH H8); 7,89 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,6 Hz, H7); 7,73 (1H, dd, ³*J* = 8,7 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,6 Hz, H4); 7,27 (1H, dt, ⁴*J*(¹H, ¹H) = 2,6 Hz, ³*J*(¹H, ¹H) = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 5,06 (2H, s, H9).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 158,6 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 245,3 Hz); 151,6; 145,2; 132,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 12,6 Hz); 121,2 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,2 Hz); 114,2 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 23,8 Hz); 108,3 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 28,1 Hz); 95,1; 74,3.

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

Elementární analýza: C₁₀H₆Cl₃FN₂O₂S (M_r = 343,59)

Vypočteno: C(34,96 %), H(1,76 %), N(8,15 %), S(9,33 %)

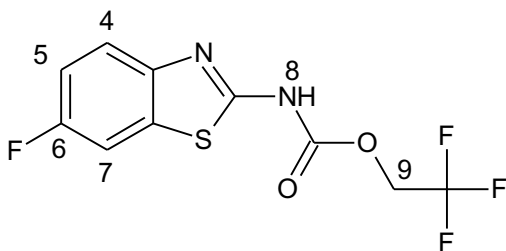
Stanoveno: C(35,18 %), H(1,88 %), N(7,91 %), S(9,10 %)

HRMS MALDI: C₁₀H₆Cl₃FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 342,92724 m/z

Stanoveno: 342,92763 m/z

2.6.11 2,2,2-trifluorethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 86 %

Bod tání: 229–230 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12,59 (1H, s, NH H8); 7,89 (1H, dd, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,6 Hz, H7); 7,72 (1H, dd, ³*J* = 9,2 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 5,1 Hz, H4); 7,26 (1H, dt, ⁴*J*(¹H, ¹H) = 2,6 Hz, ³*J*(¹H, ¹H) = 9,2 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H5); 4,74 (2H, q, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H9).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,5 Hz); 159,3 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 237,8 Hz); 152,8; 142,6 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,3 Hz); 132,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 12,8 Hz); 123,2 (q, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 276,2 Hz); 121,5 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,2 Hz); 114,3 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 22,8 Hz); 108,2 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 28,4 Hz); 60,9 (q, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 34,7 Hz).

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -72,9; -116,6.

Elementární analýza: C₁₀H₆F₄N₂O₂S (M_r = 294,23)

Vypočteno: C(40,82 %), H(2,06 %), N(9,52 %), S(10,90 %)

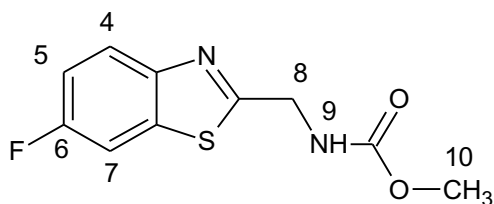
Stanoveno: C(40,61 %), H(1,99 %), N(9,76 %), S(11,15 %)

HRMS MALDI: C₁₀H₆F₄N₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 295,01589 m/z

Stanoveno: 295,01614 m/z

2.6.12 Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 84 %

Bod tání: 125–126 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,17 (1H, t, $^3J = 5,8$ Hz, NH-H9); 7,98 (1H, dd, $^4J = 2,7$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,9$ Hz, H7); 7,95 (1H, dd, $^3J = 8,9$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 5,0$ Hz, H4); 7,36 (1H, dt, $^4J = 2,8$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 4,57 (2H, d, $^3J = 6,2$ Hz, H8); 3,6 (3H, s, H10).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172,04 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,3$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,9$ Hz); 157,1; 149,6; 135,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,8$ Hz); 123,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,7$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,7$ Hz); 108,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,2$ Hz); 51,9; 42,9.

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

Elementární analýza: C₁₀H₉FN₂O₂S (M_r = 240,25)

Vypočteno: C(49,99 %), H(3,78 %), N(11,66 %), S(13,35 %)

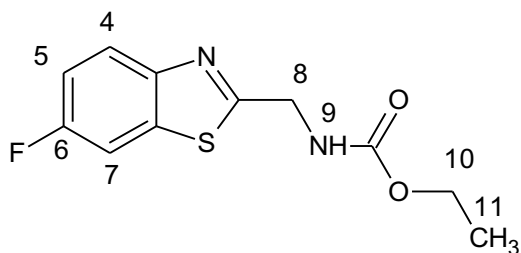
Stanoveno: C(49,78 %), H(3,70 %), N(11,85 %), S(13,53 %)

HRMS MALDI: C₁₀H₉FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 241,04415 m/z

Stanoveno: 241,04411 m/z

2.6.13 Ethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 86 %

Bod tání: 133–134 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,13 (1H, t, ³*J* = 6,0 Hz, NH H9); 7,97 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,1 Hz, H7); 7,95 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,2 Hz, H4); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,60 (2H, d, ³*J* = 6,1 Hz, H8); 4,1 (2H, q, ³*J* = 7,1 Hz, H10); 1,20 (3H, t, ³*J* = 7,1 Hz, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,4 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,2 Hz); 159,6 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 241,9 Hz); 156,6; 149,7; 135,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,6 Hz); 123,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,4 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,7 Hz); 60,3; 42,8; 14,6.

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

Elementární analýza: C₁₁H₁₁FN₂O₂S (M_r = 254,28)

Vypočteno: C(51,96 %), H(4,36 %), N(11,02 %), S(12,61 %)

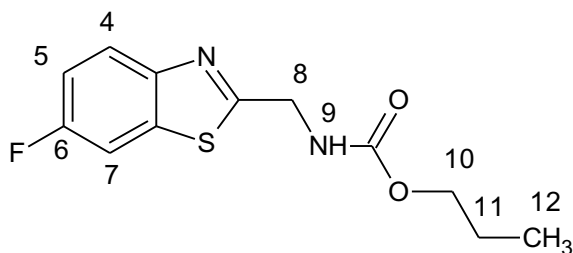
Stanoveno: C(52,28 %), H(4,44 %), N(10,79 %), S(12,33 %)

HRMS MALDI: C₁₁H₁₁FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 255,05980 m/z

Stanoveno: 255,06008 m/z

2.6.14 Propyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 79 %

Bod tání: 127–128 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,16 (1H, t, 3J = 5,9 Hz, NH H9); 7,97 (1H, dd, 4J = 2,7 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,3 Hz, H7); 7,96 (1H, dd, 3J = 8,9 Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 4,8 Hz, H4); 7,36 (1H, dt, 4J = 2,7 Hz, 3J = 9,0 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,0 Hz, H5); 4,56 (2H, d, 3J = 6,2 Hz, H8); 3,97 (2H, t, 3J = 6,6 Hz, H10); 1,58 (2H, m, H11); 0,90 (3H, d, 3J = 7,6 Hz, H12).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,1 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 3,3 Hz); 159,6 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 242,6 Hz); 156,7; 149,7; 135,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 11,5 Hz); 123,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 9,2 Hz); 114,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 25,4 Hz); 108,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 27,0 Hz); 65,8; 42,8; 22,0; 10,2.

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

Elementární analýza: C₁₂H₁₃FN₂O₂S (*M_r* = 268,31)

Vypočteno: C(53,72 %), H(4,88 %), N(10,44 %), S(11,95 %)

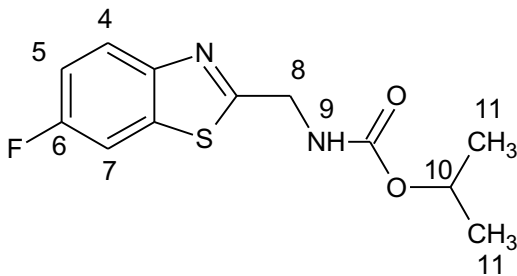
Stanoveno: C(53,50 %), H(4,97 %), N(10,28 %), S(12,14 %)

HRMS MALDI: C₁₂H₁₃FN₂O₂S [*M*+H⁺]

Vypočteno: 269,07545 *m/z*

Stanoveno: 269,07556 *m/z*

2.6.15 Isopropyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 83 %

Bod tání: 138–140 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,07 (1H, t, $^3J = 5,9$ Hz, NH H9); 8,00 (1H, dd, $^4J = 2,6$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,0$ Hz, H7); 7,97 (1H, dd, $^3J = 9,0$ Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 4,8$ Hz, H4); 7,37 (1H, dt, $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,6$ Hz, $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$ Hz, H5); 4,80 (1H, m, H10); 4,54 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H8); 1,20 (6H, d, $J = 6,2$ Hz, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,3 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,2$ Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$ Hz); 156,2; 149,7; 135,8 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,7$ Hz); 123,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$ Hz); 114,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,7$ Hz); 108,7 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 27,0$ Hz); 67,6; 42,7; 22,0.

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

Elementární analýza: C₁₂H₁₃FN₂O₂S (M_r = 268,31)

Vypočteno: C(53,72 %), H(4,88 %), N(10,44 %), S(11,95 %)

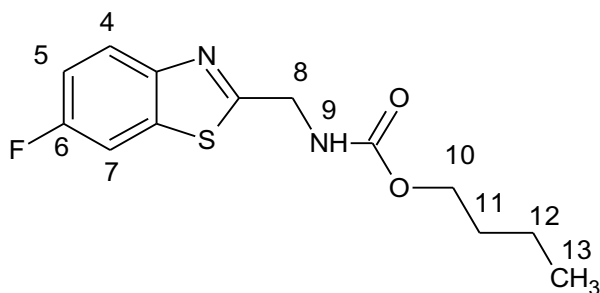
Stanoveno: C(53,93 %), H(4,99 %), N(10,27 %), S(11,74 %)

HRMS MALDI: C₁₂H₁₃FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 269,07545 m/z

Stanoveno: 269,07532 m/z

2.6.16 Butyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 81 %

Bod tání: 116–117 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,15 (1H, t, 3J = 6,1 Hz, NH H9); 7,98 (1H, dd, 4J = 2,5 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 8,8 Hz, H7); 7,96 (1H, dd, 3J = 8,9 Hz, $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 4,9 Hz, H4); 7,36 (1H, dt, 4J = 2,7 Hz, 3J = 9,1 Hz, $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$ = 9,1 Hz, H5); 4,56 (2H, d, 3J = 6,2 Hz, H8); 4,01 (2H, t, 3J = 6,5 Hz, H10); 1,55 (2H, m, Hz, H11); 1,34 (2H, m, H12); 0,90 (3H, t, 3J = 7,5 Hz, H13).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172,2 (d, $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 3,4 Hz); 159,5 (d, $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 242,6 Hz); 156,7; 149,7; 135,7 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 12,6 Hz); 123,6 (d, $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 10,4 Hz); 114,5 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 25,4 Hz); 108,6 (d, $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ = 27,7 Hz); 64,1; 42,8; 30,7; 18,6; 13,6.

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

Elementární analýza: C₁₃H₁₅FN₂O₂S (M_r = 282,33)

Vypočteno: C(55,30 %), H(5,36 %), N(9,92 %), S(11,36 %)

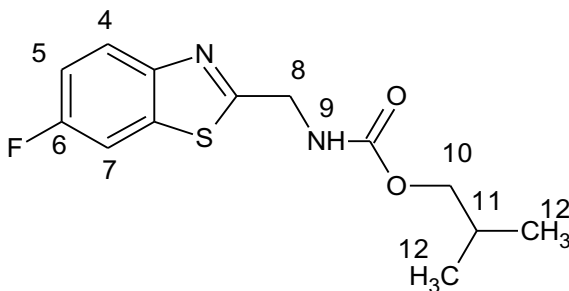
Stanoveno: C(53,08 %), H(5,25 %), N(10,17 %), S(11,55 %)

HRMS MALDI: C₁₃H₁₅FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 283,09110 m/z

Stanoveno: 283,09114 m/z

2.6.17 Isobutyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 84 %

Bod tání: 117–118 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,23 (1H, t, ³*J* = 6,2 Hz, NH H9); 8,04 (1H, dd, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 8,00 (1H, dd, ³*J* = 8,9 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,0 Hz, H4); 7,40 (1H, dt, ⁴*J* = 2,5 Hz, ³*J* = 8,9 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H5); 4,61 (2H, d, ³*J* = 6,2 Hz, H8); 3,86 (2H, d, ³*J* = 6,6 Hz, H10); 1,92 (1H, m, H11); 0,95 (3H, d, ³*J* = 6,8 Hz, H12).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 2,9 Hz); 159,6 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 241,8 Hz); 156,8; 149,7; 135,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 12,1 Hz); 123,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,3 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 26,8 Hz); 70,3; 42,8; 27,2; 18,8.

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

Elementární analýza: C₁₃H₁₅FN₂O₂S (M_r = 282,33)

Vypočteno: C(55,30 %), H(5,36 %), N(9,92 %), S(11,36 %)

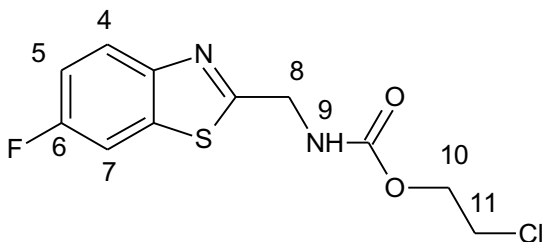
Stanoveno: C(53,11 %), H(5,27 %), N(10,13 %), S(11,58 %)

HRMS MALDI: C₁₃H₁₅FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 283,09110 m/z

Stanoveno: 283,09135 m/z

2.6.18 2-chlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 80 %

Bod tání: 107–108 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,38 (1H, t, ³*J* = 6,1 Hz, NH H9); 7,98 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,7 Hz, H7); 7,95 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 5,1 Hz, H4); 7,36 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,59 (2H, d, ³*J* = 5,9 Hz, H8); 4,28 (2H, t, ³*J* = 5,2 Hz, H10); 3,82 (2H, t, ³*J* = 5,1 Hz, H11).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,7 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,2 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,1 Hz); 156,2; 149,6; 135,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 12,3 Hz); 123,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,7 Hz); 108,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,0 Hz); 64,5; 43,1; 42,8.

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

Elementární analýza: C₁₁H₁₀ClFN₂O₂S (M_r = 288,73)

Vypočteno: C(45,76 %), H(3,49 %), N(9,70 %), S(11,11 %)

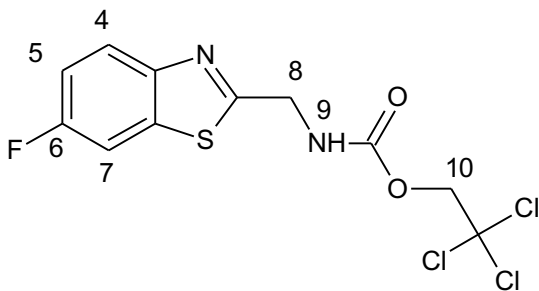
Stanoveno: C(45,99 %), H(4,58 %), N(9,52 %), S(10,90 %)

HRMS MALDI: C₁₁H₁₀ClFN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 289,02083 m/z

Stanoveno: 241,02087 m/z

2.6.19 2,2,2-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 76 %

Bod tání: 137–138 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,78 (1H, t, ³*J* = 6,1 Hz, NH H9); 7,99 (1H, dd, ⁴*J* = 2,6 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,9 Hz, H7); 7,97 (1H, dd, ³*J* = 9,0 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 4,9 Hz, H4); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,0 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,0 Hz, H5); 4,89 (2H, s, H10); 4,64 (2H, d, ³*J* = 6,1 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,2 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 3,4 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,4 Hz); 155,0; 149,6; 135,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,8 Hz); 123,7 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,4 Hz); 114,6 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,1 Hz); 96,0; 73,6; 43,0.

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

Elementární analýza: C₁₁H₈Cl₃FN₂O₂S (M_r = 357,62)

Vypočteno: C(36,94 %), H(2,25 %), N(7,83 %), S(8,97 %)

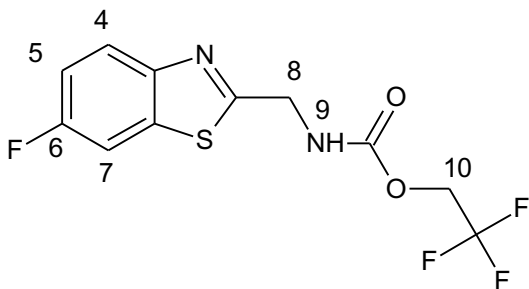
Stanoveno: C(36,69 %), H(2,33 %), N(7,58 %), S(9,20 %)

HRMS MALDI: C₁₁H₈Cl₃FN₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 356,94289 m/z

Stanoveno: 356,94300 m/z

2.6.20 2,2,2-trifluorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát



Vzhled: bílá pevná látka

Výtěžek: 86 %

B.t.: 116,7–117,3 °C

¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,74 (1H, t, ³*J* = 6,0 Hz, NH H9); 7,99 (1H, dd, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 8,8 Hz, H7); 7,97 (1H, dd, ³*J* = 9,1 Hz, ⁴*J*(¹⁹F, ¹H) = 5,0 Hz, H4); 7,37 (1H, dt, ⁴*J* = 2,7 Hz, ³*J* = 9,1 Hz, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,1 Hz, H5); 4,74 (2H, q, ³*J*(¹⁹F, ¹H) = 9,2 Hz, H10); 4,63 (2H, d, ¹*J* = 6,2 Hz, H8).

¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171,0 (d, ⁴*J*(¹⁹F, ¹³C) = 2,9 Hz); 159,5 (d, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 242,7 Hz); 154,9; 149,6 (d, ⁵*J*(¹⁹F, ¹³C) = 1,3 Hz); 135,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 11,9 Hz); 123,6 (d, ³*J*(¹⁹F, ¹³C) = 9,6 Hz); 123,5 (q, ¹*J*(¹⁹F, ¹³C) = 279,2 Hz); 114,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 24,9 Hz); 108,7 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 27,3 Hz); 60,0 (d, ²*J*(¹⁹F, ¹³C) = 35,0 Hz); 43,0.

¹⁹F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*₆): δ = -72,9; -116,5.

Elementární analýza: C₁₁H₈F₄N₂O₂S (M_r = 308,25)

Vypočteno: C(42,86 %), H(2,62 %), N(9,09 %), S(10,40 %)

Stanoveno: C(43,08 %), H(2,50 %), N(9,32 %), S(10,17 %)

HRMS MALDI: C₁₁H₈F₄N₂O₂S [M+H⁺]

Vypočteno: 309,03154 m/z

Stanoveno: 309,03161 m/z

2.7 Stanovení aktivity AChE a IC₅₀

2.7.1 Použitá činidla

2.7.1.1 PBS

Fosfátový pufr	
NaCl	4 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1,45 g
KCl	0,1 g
redestilovaná voda	500 ml

Podle tabulky byl připraven 0,1 M pufr o hodnotě pH 7,4. Takto připravený pufr je uchováván v lednici.

2.7.1.2 DTNB

DTNB je komerčně dostupný produkt 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny. DTNB bylo naředěno tak, aby odpovídalo koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M.

2.7.1.3 Acetylcholinesteráza (AChE) z elektrického úhoře

V 0,1 M PBS bylo rozpuštěno cca 10 mg AChE. Preparát acetylcholinesterázy je uchováván při -6 °C v umělohmotných zkumavkách.

2.7.1.4 Acetylthiocholin jodid (ATCh)

ATCh je komerčně dostupný produkt. Byl naředěn PBS jako 0,1 M roztok a $1 \cdot 10^{-3}$ M roztok. Roztok o koncentraci 0,1 M byl použit pro stanovení aktivity enzymového preparátu. Roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M byl použit pro stanovení IC₅₀.

2.7.1.5 Butyrylcholinesteráza (BChE) z koňského séra

V 0,1 M PBS bylo rozpuštěno cca 10 mg BChE. Preparát butyrylcholinesterázy je uchováván při -6 °C v umělohmotných zkumavkách.

2.7.2 Stanovení aktivity AChE a BChE

2.7.2.1 Srovnávací roztok

Srovnávací roztok	
0,1 M PBS	1192 μ l
$5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB	800 μ l
0,1 M ATCh	8 μ l

Do kyvety bylo pipetou napipetováno 1192 μ l 0,1 M PBS o hodnotě pH 7,4. Následně bylo přidáno 800 μ l $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB a 8 μ l 0,1 M ATCh.

2.7.2.2 Vzorek s enzymovým preparátem

Vzorek s enzymovým preparátem	
0,1 M PBS	1184 μ l
$5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB	800 μ l
0,1 M ATCh	8 μ l
AChE (BChE)	8 μ l

Do kyvety bylo pipetou napipetováno 1184 μ l 0,1 M PBS o hodnotě pH 7,4. Následně bylo přidáno 800 μ l $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB, 8 μ l 0,1 M ATCh. Na závěr bylo přidáno 8 μ l AChE, nebo BChE, čímž došlo k zahájení reakce.

2.7.2.3 Postup

Po dobu 72 s byla v 3s intervalech měřena absorbance při vlnové délce 412 nm. Absorbance byla měřena spektrofotometrem s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA. Aktuální aktivita enzymu byla stanovována na začátku každého dne měření.

Vynesením závislosti absorbance na čase byla z rovnice přímky zjištěna hodnota aktivity enzymu pro $x = 60$ (z definice 1U). Aktuální aktivita je tedy dána rovnicí:

$$AEP = y \text{ (z rovnice přímky)} * 17,67 \text{ (U/ml EP)}$$

16,67...přepočítávací faktor zahrnuje informaci o celkovém objemu reakční směsi (2 ml), množství dávkovaného enzymu (0,008 ml), délce kyvety (1 cm) a molárním absorpčním koeficientu ($14150 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.7.3 Stanovení IC₅₀

2.7.3.1 Srovnávací roztok

Srovnávací roztok	
0,1 M PBS	1520 µl
5.10 ⁻⁴ M DTNB	400 µl
0,001 M ATCh	80 µl

Do kyvety bylo pipetou napipetováno 1520 µl 0,1 M PBS o hodnotě pH 7,4. Následně bylo přidáno 400 µl 5.10⁻⁴ M DTNB a 80 µl 0,001 M ATCh.

2.7.3.2 Vzorek bez inhibitoru

Vzorek bez inhibitoru	
0,1 M PBS	x µl
5.10 ⁻⁴ M DTNB	400 µl
0,001 M ATCh	80 µl
AChE (BChE)	y µl

Do kyvety bylo pipetou napipetováno 400 µl 5.10⁻⁴ M DTNB, 80 µl 0,001 M ATCh. Následně bylo přidáno 0,1 M PBS o hodnotě pH 7,4, tak aby celkový objem včetně enzymového preparátu byl 2 ml. Nakonec bylo přidáno tolik AChE, nebo BChE, aby jeho aktivita v reakční směsi byla 0,2 U. Množství enzymového preparátu bylo vypočteno z aktuální aktivity enzymu.

2.7.3.3 Vzorek s inhibitorem

Vzorek s inhibitorem	
0,1 M PBS	x µl
5.10 ⁻⁴ M DTNB	400 µl
0,001 M ATCh	80 µl
AChE (BChE)	y µl
inhibitor	10, 30, 50, 70 µl

Do kyvety bylo pipetou napipetováno 400 µl 5.10⁻⁴ M DTNB, 80 µl 0,001 M ATCh. Následně bylo přidáno 0,1 M PBS o hodnotě pH 7,4, tak aby celkový objem včetně enzymového preparátu a inhibitoru byl 2 ml. V dalším kroku bylo přidáno různé množství

inhibitoru (dle požadované koncentrace ve výsledné reakční směsi). Nakonec bylo přidáno tolik AChE, nebo BChE, aby jeho aktivita v reakční směsi byla 0,2 U. Množství enzymového preparátu bylo vypočteno z aktuální aktivity enzymu.

2.7.3.4 Postup

Po dobu 72 s byla v 3s intervalech měřena absorbance při vlnové délce 412 nm. Absorbance byla měřena spektrofotometrem s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA.

Na základě změny absorbance v čase byla zjištěna reakční rychlost $v = \Delta A / \Delta t$. Vynesemím závislosti absorbance na čase byly zjištěny rychlosti jednotlivých reakcí. V dalším kroku byly sestaveny závislosti v_0/v_i vs. $[I]$. v_0 je odrazem neinhibované reakce, v_i je pak hodnota rychlosti reakce inhibované. $[I]$ udává hodnotu koncentrace inhibitoru v reakční směsi. Po dosazení hodnot do grafu byla určena rovnice regrese. Na závěr byla z této rovnice vypočtena hodnota IC_{50} pro $y = 2$ (vychází z definice IC_{50}).

2.7.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu

2.7.4.1 Postup

1,5 ml 1-oktanolu a 10 μ l oktanolového roztoku určitého inhibitoru o koncentraci 0,01 M bylo protřepáváno 15 min. Následně byl 1 ml této směsi napipetován do kyvety. V dalším kroku byla změřena absorbance daného inhibitoru při vlnové délce absorpčního maxima. Tímto krokem byla stanovena hodnota absorbance, která odpovídala 100 % daného inhibitoru v 1-oktanolu.

Ke směsi tvořené 1,5 ml 1-oktanolu a 1,5 ml demineralizované vody bylo přidáno 10 μ l oktanolového roztoku určitého inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Takto připravená směs byla protřepávána 15 min a dalších 10 min centrifugována při 3000 ot./min. Následně byl 1 ml oktanolové vrstvy napipetován do kyvety. V dalším kroku byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě $(\%)_1$. Rozdílem byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě $100 - (\%)_1$.

Na závěr byly dopočteny rozdělovací koeficienty daných inhibitorů v soustavě 1-oktanol : voda.

$$K_{ow} = \frac{(\%)_1}{100 - (\%)_1} = \frac{c_1}{c_2}$$

3 Výsledky a diskuze

V rámci diplomové práce byla provedena syntéza karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu a syntéza karbamátů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu. Všechny připravené karbamáty byly charakterizovány bodem tání, NMR spektroskopii. Čistota látek byla ověřena elementární analýzou a HRMS MALDI.

Kromě nových anticholinergních karbamátů byla připravena také výchozí látka 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid a isopropylchlorformiát. Následně byla u připravených karbamátů stanovena inhibiční aktivita proti AChE, BChE a lipofilita.

3.1 Syntéza 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

Výchozí sloučenina 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid byla připravena třístupňovou syntézou. V prvním reakčním kroku reagoval 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-amin s 48 % KOH za vzniku 2-amino-5-fluorobenzthiolátu draselného. V dalším reakčním stupni reagoval plynný fosgen s Gly-NCA v THF za vzniku 1,3-oxazolidin-2,5-dionu. V závěrečném reakčním stupni byl nejprve 2-amino-5-fluorobenzthiolát draselný reakcí s HCl převeden na 2-amino-5-fluorobenzthiol, který dále reagoval s 1,3-oxazolidin-2,5-dionem za vzniku výsledného produktu 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu. Při syntéze benzthiazolových aminů se běžně NCA aminokyseliny do reakce přidávají ve formě tetrahydrofuranového roztoku. Vzhledem k nízké rozpustnosti byl Gly-NCA do reakce přidán v pevném stavu. Po ochlazení reakční směsi se produkt vyloučil ve formě HCl soli. Výsledný produkt byl zfiltrován a promyt toluenem, čímž byly z produktu odstraněny oxidační produkty na bázi disulfidu. Tato sloučenina byla připravena s 96% výtěžkem.

3.2 Syntéza isopropylchlorformiátu

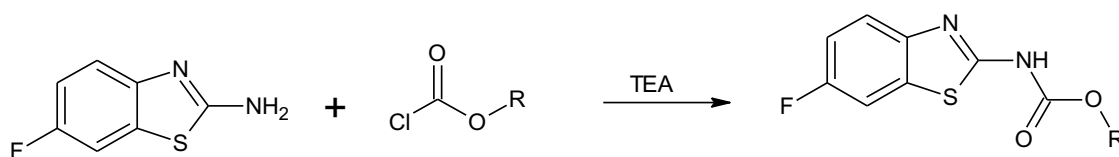
Tato sloučenina byla připravena reakcí isopropanolu s fosgenem. Reakce byla prováděna bez rozpouštědla v kapalném fosgenu. Teplota během reakce byla udržována do 20 °C. Při vyšších teplotách může docházet k samovolnému rozkladu za vzniku isopropylchloridu a oxidu uhličitého. Fosgen byl v reakční směsi udržován v nadbytku, aby nedošlo k případné tvorbě karbonátů. Tento produkt nebylo možno rafinovat destilací, protože by při ohřevu došlo k jeho intenzivnímu rozkladu. Z připraveného produktu byl pouze suchým dusíkem odstraněn fosgen a produkt byl skladován do 4 °C.

3.3 Syntéza karbamátů

Na základě rozdílných výchozích sloučenin byly připraveny dvě série karbamátů. Syntéza anticholinergních karbamátů vycházela z 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu a z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu.

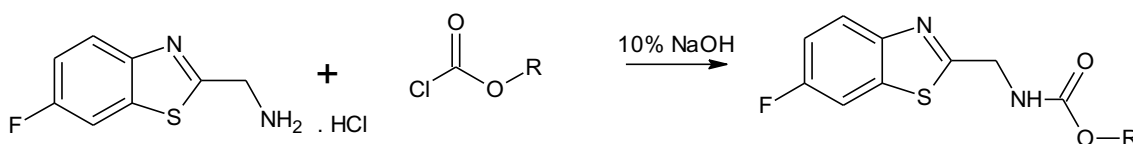
Všechny připravené karbamáty byly charakterizovány bodem tání, NMR spektroskopií, elementární analýzou a HRMS MALDI.

3.3.1 Syntéza karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu



První série karbamátů byla syntetizována reakcí 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu s příslušným alkylchloroformiátem. Reakce probíhala za laboratorní teploty v toluenu. Vzniklý chlorovodík reagoval s přidáním triethylaminem za vzniku příslušného hydrochloridu. Takto připravená reakční směs byla míchána 24 hodin. Reakční směs byla následně vyhřáta k varu a horký toluenový roztok byl přefiltrován, čímž byly z produktu odděleny nerozpustné nečistoty. Z filtrátu byl dále za horka extrahován vodou triethylamin hydrochlorid. Z toluenového roztoku byl ochlazením na teplotu 5–10 °C a následnou krystalizací izolován produkt, který byl odfiltrován a sušen na vzduchu. Výtěžky těchto karbamátů se pohybovaly v rozmezí 76–86 %.

3.3.2 Syntéza karbamátů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu



Druhá série karbamátů byla syntetizována reakcí 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu s příslušným alkylchloroformiátem. Výchozí amin byl do reakce použit ve formě hydrochloridové soli. Amin byl ze soli uvolněn reakcí s 10%

vodným roztokem NaOH. Vzniklý amin okamžitě reagoval s příslušným alkylchlorformiátem. Reakce probíhala v heterogenním prostředí toluen – voda za laboratorní teploty. Konec reakce byl určen na základě mezioperační kontroly (TLC SiO₂ Hexan – ethylacetát 3 : 1). Takto připravená reakční směs byla míchána 2 hodiny. Odstraněním vodné vrstvy byly z produktu odstraněny anorganické nečistoty, včetně vzniklého NaCl. Z oddělené organické vrstvy bylo destilací za sníženého tlaku (50–52 °C/40–50 mbar) oddestilováno cca 20 ml toluenu. Následným ochlazením roztoku došlo ke krystalizaci produktu. Na závěr byl produkt zfiltrován a sušen na vzduchu. Výtěžky těchto karbamátů se pohybovaly v rozmezí 76–86 %. Postup syntézy byl zvolen tak, aby byl technologicky aplikovatelný. Postup práce byl dále doplněn o výpočet THN norem, látkovou bilanci a bilanci odpadů i s návrhem jejich likvidace.

3.4 Bilance a normy

Na základě laboratorních pokusů byly pro syntézu karbamátu vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu vypočteny orientační spotřební normy, látková bilance a bilance odpadů.

3.4.1 THN normy

Tabulka 2 - THN normy

Výrobek: Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát		
	SUROVINA	THN (t/t)
1	1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid	1,090
2	Methylchlorformiát	0,561
3	Toluen	2,17
4	10% NaOH	0,300

3.4.2 Látková bilance

Tabulka 3 - Látková bilance surovin na 1 t výrobku (100 %)

Výrobek: Methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát									
Vstup látek			Výstup látek						
	SUROVINA	THN	Výrobek	ODPAD					
		t/t	t	Pevné odpady		Kapalné odpady		Plynné odpady	
				forma výstupu	t	forma výstupu	t	forma výstupu	t
1	1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanaminhydrochlorid	1,090	0,918			DZ	0,172		
2	Methylchlorformiát	0,561	0,476			DZ	0,085		
3	Toluen	2,17	0			DZ	2,17		
4	NaOH	0,300	0			OV	0,300		

3.4.3 Odpady

Bilance je vztažena na 1 t výrobku methyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamátu.

Při výrobě vzniká 50 t odpadního toluenu, který se z cca 95 % regeneruje destilací. Destilovaný se použije zpět do reakce.

Při výrobě dále vznikají odpadní vody z izolace v množství 5000 l na 1 t výrobku. Odpadní vody obsahující NaCl v množství 300 kg/t výrobku budou po stanovení inhibice nitrifikačních kalů vypouštěny a likvidovány na BČOV.

Také vzniká destilační zbytek v podobě 2,2 t toluenu na 1 t výrobku. Destilační zbytky budou likvidovány na spalovně.

3.5 Biologické výsledky

3.5.1 Aktivita enzymového preparátu (AEP) u AChE a BChE

Aktivita enzymového preparátu AChE a BChE byla stanovena před začátkem každého měření.

3.5.2 IC₅₀ studovaných inhibitorů při inhibici AChE nebo BChE

Syntéza těchto karbamátů měla navázat na předchozí studie, jejichž produkty vykazovaly inhibiční aktivitu proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Proto byla u připravených karbamátů stanovena inhibiční aktivita proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, inhibiční koncentrace IC₅₀ vyjadřuje koncentraci inhibitoru, kdy dojde k poklesu aktivity enzymu na 50 %.

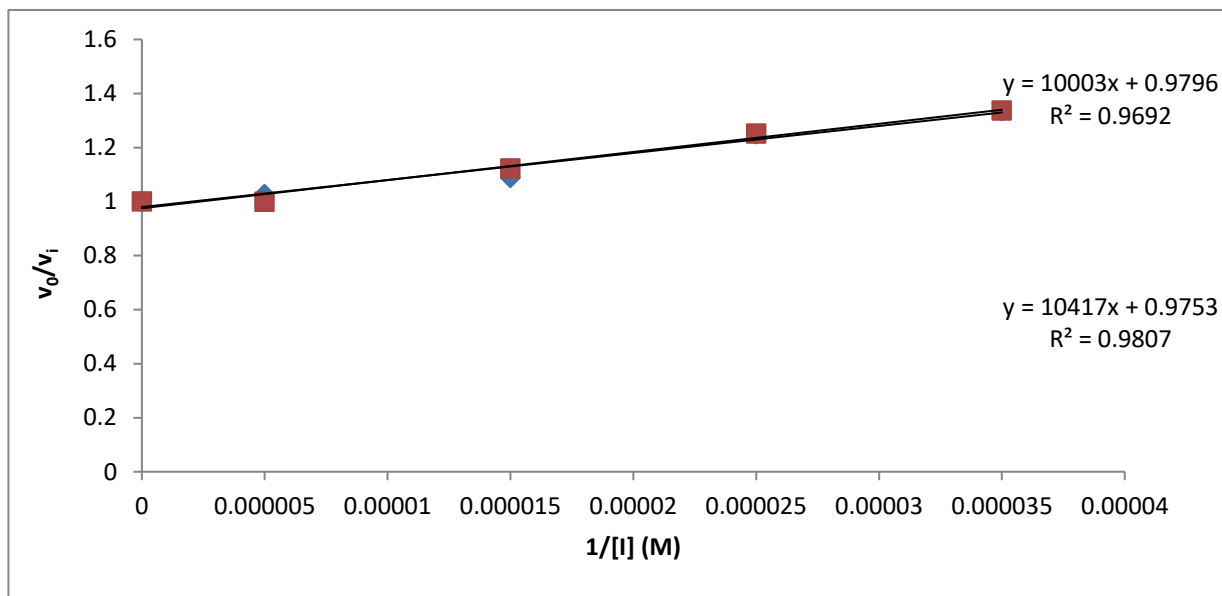
V tabulkách 4 a 5 jsou uvedeny hodnoty inhibiční aktivity proti AChE i BChE připravených karbamátů. Na obrázcích 13 a 14 jsou uvedeny příklady grafické závislosti v₀/v_i na koncentraci inhibitoru.

Tabulka 4 - IC₅₀ karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benthiazol-2-aminu

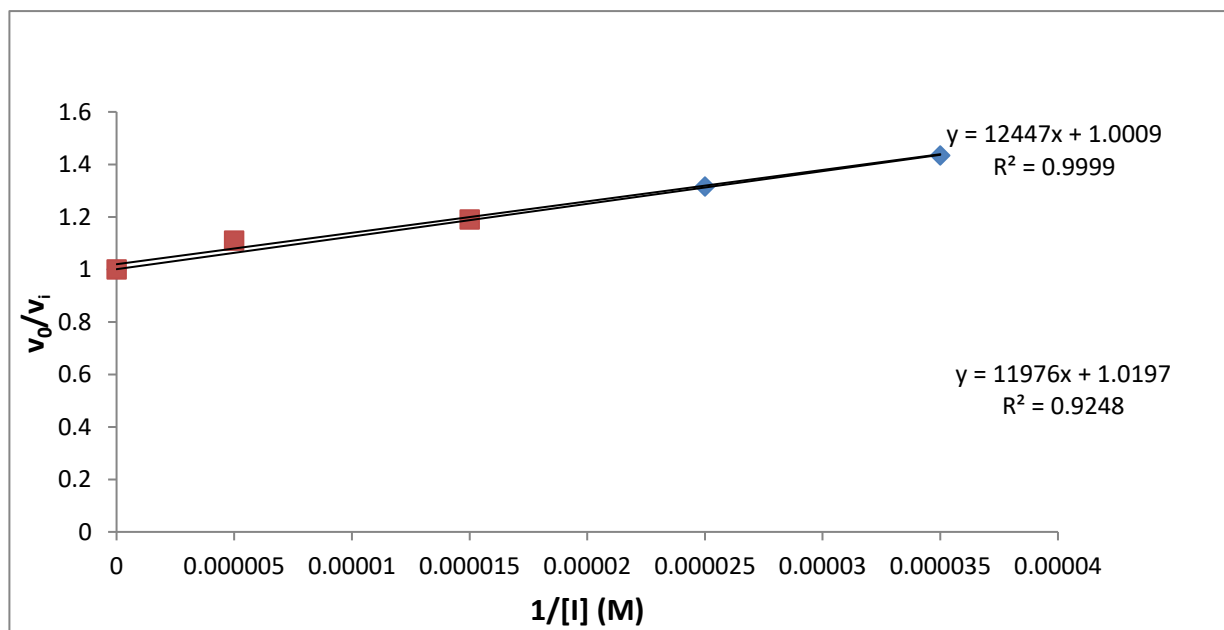
číslo	R	IC ₅₀ μM ACHE	IC ₅₀ μM BChE
1	CH ₃	56,27 ±1,72	87,53 ±4,51
2	CH ₂ CH ₃	50,47 ±0,12	188,51 ±12,13
3	CH ₂ CH ₂ CH ₃	63,68 ±0,99	299,42 ±1,46
4	CH ₂ (CH ₃) ₂	100,24 ±1,87	203,90 ±4,92
5	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	90,36 ±1,05	232,65 ±11,06
6	CH ₂ CH ₂ (CH ₃) ₂	74,26 ±1,15	81,06 ±0,79
7	CH ₂ CH ₂ Cl	72,06 ±2,45	251,90 ±14,56
8	CH ₂ CHCl ₃	175,21 ±26,50	240,58 ±31,99
9	CH ₂ CHF ₃	185,48 ±4,23	190,53 ±14,59

Tabulka 5 - IC_{50} karbamátů vycházejících z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu

číslo	Vzorec	IC_{50} μM AChE	IC_{50} μM BChE
10	CH ₃	230,93 \pm 2,20	149,22 \pm 0,47
11	CH ₂ CH ₃	210,50 \pm 11,85	222,78 \pm 7,67
12	CH ₂ CH ₂ CH ₃	212,88 \pm 14,32	211,57 \pm 18,51
13	CH ₂ (CH ₃) ₂	86,73 \pm 5,60	85,27 \pm 0,80
14	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	241,80 \pm 11,68	185,50 \pm 7,09
15	CH ₂ CH ₂ (CH ₃) ₂	209,96 \pm 33,24	149,97 \pm 9,74
16	CH ₂ CH ₂ Cl	259,72 \pm 4,46	141,61 \pm 8,80
17	CH ₂ CHCl ₃	227,37 \pm 11,56	6,83 \pm 0,47
18	CH ₂ CHF ₃	91,21 \pm 2,61	95,44 \pm 14,98



Obrázek 13 - Inhibitor 4: grafická závislost v_0/v_i vs. koncentrace inhibitoru (AChE)



Obrázek 14 - Inhibitor 6: grafická závislost v_0/v_i vs. koncentrace inhibitoru (BChE)

Hodnoty IC_{50} karbamátů byly porovnány se standardními inhibitory rivastigminem a galantaminem. Nejvyšší inhibiční aktivitu proti AChE vykazovala látka č. 2 ($50,47 \pm 0,12 \mu\text{M}$), tato hodnota je však nesrovnatelná s inhibiční aktivitou standardních inhibitorů. Hodnota IC_{50} AChE pro inhibitor galantamin používaný v praxi je $4 \pm 0,13 \mu\text{M}$.

Za zmínku stojí látka č. 17, která vykazovala nejen nejvyšší inhibiční aktivitu proti BChE ($6,83 \pm 0,47 \mu\text{M}$), ale i nejvyšší lipofilitu. Inhibiční aktivita proti butyrylcholinesteráze látky č. 17 je dokonce nižší než hodnota standardního inhibitoru rivastigminu (IC_{50} BChE $19,95 \pm 0,20 \mu\text{M}$).

Obecně nelze říci, která série připravených karbamátů inhibuje lépe acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu, jelikož výsledné hodnoty IC_{50} jsou pro konkrétní karbamáty rozdílné.

Na závěr je nutné dodat, že inhibiční aktivita látky č. 17 je srovnatelná i se standardními inhibitory používanými v praxi.

3.5.3 Rozdělovací koeficient 1-oktanol : voda

Rozdělovací koeficient 1-oktanol : voda vyjadřuje schopnost látek procházet přes hematoencefalickou bariéru, tedy mezi mozkem a krví. Čím vyšší je hodnota rozdělovacího koeficientu, tím lépe inhibitor prochází skrze hematoencefalickou bariéru. V tabulce 6 jsou uvedeny rozdělovací koeficienty v systému 1-oktanol : voda. Nejvyšší

lipofilitu vykazovala opět látka č. 17. Za zmínku stojí relativně dobrá shoda experimentu (logP experiment) s teorií (logP chemdraw).

Na základě hodnot IC_{50} lze usoudit, že látky i přes svůj vysoký rozdělovací koeficient, nejsou použitelné v praxi.

Tabulka 6 - Rozdělovací koeficient 1-oktanol : voda

číslo	logP experiment	logP chemdraw	tPSA chemdraw
1	2,45 ±0,54	2,88	50,69
2	2,98 ±0,40	3,22	50,69
3	3,41 ±0,51	3,71	50,69
4	3,11 ±0,14	3,28	50,69
5	3,94 ±0,52	4,12	50,69
6	3,91 ±0,40	4,1	50,69
7	3,60 ±0,44	3,59	50,69
8	4,70 ±0,53	4,61	50,69
9	3,49 ±0,36	3,86	50,69
10	2,88 ±0,22	2,62	50,69
11	2,90 ±0,21	2,96	50,69
12	3,55 ±0,35	3,44	50,69
13	3,68 ±0,24	3,54	50,69
14	3,98 ±0,41	3,86	50,69
15	3,64 ±0,60	3,84	50,69
16	3,01 ±0,13	3,33	50,69
17	4,06 ±0,28	4,35	50,69
18	3,55 ±0,25	3,6	50,69

4 Závěr

V rámci diplomové práce byla provedena syntéza karbamátů vycházejících z 6-fluor-1,3-benzthiazol-2-aminu a syntéza vycházející z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu. Následně byla u těchto karbamátů stanovena inhibiční aktivita proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.

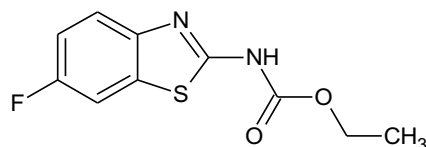
Cílem diplomové práce bylo nalézt vhodné postupy pro přípravu anticholinergních karbamátů obsahujících benzthiazolový blok. V rámci teoretické části byly popsány provedené studie, které se zabývaly právě látkami s benzthiazolovým blokem.

V experimentální části byla syntetizována výchozí látka 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochlorid a isopropylchlorfomiát. Na základě literární rešerše byl vyvinut postup syntézy a následně bylo tímto postupem připraveno 18 anticholinergních karbamátů obsahujících benzthiazolový blok. Pro řadu karbamátů, která vycházela z 1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methanamin hydrochloridu byl vyvinut postup, který lze technologicky aplikovat. Výtěžky karbamátů se pohybovaly v rozmezí 76–86 %.

Všechny připravené karbamáty byly charakterizovány NMR spektroskopií a bodem tání. Čistota produktů byla ověřena elementární analýzou a HRMS MALDI.

Dále byly u připravených karbamátů Ellmanovou metodou stanoveny hodnoty IC_{50} charakterizující inhibiční aktivitu proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Na závěr byla u těchto karbamátů stanovena lipofilita, která vyjadřuje schopnost sloučeniny procházet skrze hematoencefalickou bariéru.

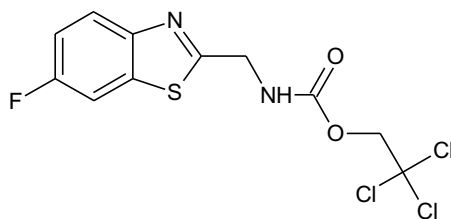
Hodnoty IC_{50} karbamátů byly porovnány se standardními inhibitory. Nejvyšší inhibiční aktivitu proti acetylcholinesteráze vykazovala látka uvedená na obrázku 15. Tato hodnota je však neporovnatelná s inhibitory používanými v praxi.



IC_{50} AChE $50,47 \pm 0,12 \mu\text{M}$

Obrázek 15 - Ethyl(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)karbamát

Nejvyšší inhibiční aktivitu proti butyrylcholinesteráze vykazovala látka uvedená na obrázku 16. Inhibiční aktivita této látky je srovnatelná se standardním inhibitorem rivastigminem, který se běžně používá v praxi. Látka uvedená na obrázku 16 vykazovala také nejvyšší lipofilitu.



IC₅₀ BChE 6,83 ±0,47 μM

Obrázek 16 - 2,2,2-trichlorethyl[(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)methyl]karbamát

5 SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. KERNS, E. H., LI, D. *Drug-like Properties: Concept, Structure Design and Methods*. USA: Academic press, 2008. 552. ISBN 9780080951621.
2. IAGIONI, S., TATA, A. M., DE JACO, A., AUGUSTI-TOCCO, G. Acetylcholine synthesis and neuron differentiation. *International Journal of Developmental Biology*. 2000, **44**(6), 689–697.
3. LULLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L. *Barevný Atlas Farmakologie*. 4. ČR: Grada publishing, 2012. 384. ISBN 978-80-247-3903-3.
4. CUMMINGS, J. L. Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2004, 351, 56–67.
5. MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*. 1993, **41**(1), 31.
6. PRASASTY, V., RADIFAR, M., ISTYASTONO, E. Natural Peptides in Drug Discovery Targeting Acetylcholinesterase. *Molecules*. 2018, **23**(9), 2344.
7. BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2007, **2**, 112–117.
8. RATARETINAM, R. K., GNANA, P. V. S. Rapid neurobehavioural analysis based on the effects of an acetylcholinesterase inhibitor from *Tephrosia purpurea* in Zebrafish. *Annals of Neurosciences*. 2012, **19**, 8–13.
9. CACHO, L. W., CERF, J. A. Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section. *Journal of Anatomy*. 1960, **94**, 74–81.
10. MASSOULIÉ, J., BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual Review of Neuroscience*. 1982, **5**, 57.
11. RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica*. 2003, **54**, 183–189.
12. SILMAN, I., SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005, **5**, 293–302.
13. ZHAO, Q., CHEN, X., ZHOU, Y. Quantitative multimodal multiparametric imaging in Alzheimer's disease. *Brain Informatics*. 2016, **3**, 29–37.
14. WHO. *Dementia Fact Sheet* [online]. 2017 [cit. 28.3.2019]. Dostupné z <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.

15. GRILL, J. D., CUMMINGS, J. L. Novel targets for Alzheimer's disease treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010, **10**, 711–728.
16. HUANG, Y.J., BALDASSARRE, H., WANG, B., LAZARIS, A ., LEDUC, M. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 2007, **104**(34), 13603–13608.
17. ANAND, P., SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmaceutical Research*. 2013, **36**(4), 375–399.
18. ATACK, J. R., PERRY, E. K., BONHAM, J. R. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 1986, **4**, 263–277.
19. MIAO, Y., HE, N., ZHU, J. J. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chemical reviews*, 2010, **110**(9), 5216–5234.
20. ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, J., KUČA, K., JUN, D., BAJGAR, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. 2010, **104**(1), 46–50.
21. THOMPSON, P. A., WRIGHT, D. E., COUNSELL, C. E., ZAJICEK, J. Statistical analysis, trial design and duration in Alzheimer's disease clinical trials: a review. *International Psychogeriatrics*. 2012, **24**, 689–697.
22. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. 2004, **38**, 151–216.
23. GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological research*. 2004, **50**(4), 433–440.
24. TAYEB, H. O., YANG, H. D., PRICE, B. H., TARAZI, F. I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*. 2012, **134**(1), 8–25.
25. LEMSTRA, A. W., EIKELNOOM, P., VAN GOOL, W. A. The cholinergic deficiency syndrome and its therapeutic implications. *Gerontology*. 2003, **49**, 55–60.
26. LOY, C., SCHEINDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006, 1, CD001747.
27. TRINH, N .H., HOBLYN, J., MOHANTY, S., YAFFE, K. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *The Journal of American Medical Association*. 2003, **289**(2), 210–216.

28. SHAH, S., REICHMAN, W. E. Treatment of Alzheimer's disease across the spectrum of severity. *Clinical Interventions in Aging*. 2006, **1**, 131–142.
29. BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006, **1**: CD005593.
30. BATEMAN, R. J., AISEN, P. S., DE STROOPER, B., FOX, N. C., LEMERE, C. A., RINGMAN, J. M., SALLOWAY, S., SPERLING, R. A., WINDISCH, M., XIONG, C. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Research & Therapy*. 2011, **3**(1), 1.
31. CHEN, Y., LIU, Z. L., FU, T. M., LI, W., XU, X. L., SUN, H. P. Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors with small core structures through shape-based virtual screening. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. 2015, **25**, 3442–3446.
32. FREEMAN, S. E., DAWSON, R. M. Tacrine: a pharmacological review. *Progress in neurobiology*. 1991, **36**(4), 257–277.
33. QIZILBASH, N., BIRKS, J., LÓPEZ-ARRIETA, J., LEWINGTON, S., SZETO, S. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Of Systematic Reviews*. 2000, **2**:CD000202.
34. SUMMERS, W. K., VIESSELMAN, J. O., MARSH, G. M., CANDELORA, K. Use of THA in treatment of Alzheimer-like dementia: pilot study in twelve patients. *Biological Psychiatry*. 1981, **16**, 145–53.
35. WATKINS, P. B., ZIMMERMAN, H. J., KNAPP, M. J., GRACON, S. I., LEWIS, K. W. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of the American Medical Association*. 1994, **271**(13), 992–998.
36. HARVEY, A. L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacology & Therapeutics*. 1995, **68**(1), 113–128.
37. SCOTT, L. J., GOA, K. L. Galantamine – a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2000, **60**(5), 1095–1122.
38. YOUSIL, A. A., GAMAL, A. E. M. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodolog, volume 37*. USA: Academic press, 2010. 528. ISBN 9780123977564.
39. BRYSON, H. M., BENFIELD, P. Donepezil. *Drugs & aging*. 1997, **10**(3), 234.
40. BAR-ON, P., MILLARD, C. B., HAREL, M., DVIR, H., ENZ, A., SUSSMAN, J. L., SILMAN, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry*. 2002, **41**(11), 3555–3564.
41. JIRÁK, R., VNOUČKOVÁ, K. Rivastigminum. *Remedia*. 2003, **13**, 372–378.
42. ENGLISH, F. The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *International Journal of Clinical Practice*; 2002, **127**, 45–63.

43. ABBS FEN REJIA, T. F., RAJASEKHARAN, K. N. Synthesis of 2-[2,4-diaminothiazol-5-oyl]benzothiazoles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2010, **47**(4), 994–997.
44. HUANG, W., YANG, G. Microwave-assisted, one-pot syntheses and fungicidal activity of polyfluorinated 2-benzylthiobenzothiazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006, **14**, 8280–8285.
45. HAVRYLYUK, D., MOSLA, L., ZIMENKOVSKY, B., VASYLENKO, O., GZELLA, A., LESYK, R. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, **45**(11), 5012–5021.
46. PATTAN, S. R., SURESH, CH., PUJAR, V. D., REDDY, V. V. K., RASAL, V. P., KOTI, B. C. Synthesis and antidiabetic activity of 2-amino [5' (4-sulphonylbenzylidene-2,4-thiazolidenedinone)-7-chloro-6-flourobenzothiazole. *Indian Journal of Chemistry, Sect. B: Organic chemistry, including medical chemisrmy*. 2005, **44**(11), 2404–2408.
47. ALAGILLE, D., DACOSTA, H., BALDWIN, R. M., TAMAGNAN, G. D. 2-Arylimidazo[2,1-*b*]benzothiazoles: A new family of amyloid binding agents with potential for PET and SPECT paging of Alzheimer's brain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2011, **21**(10), 2966–2968.
48. IMRAMOVSKÝ, A., PECHAL, V., ŠIMŮNEK, P., ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., KRÁLOVEC, K., BRUČKOVÁ, L., VORČÁKOVÁ, K., JAMPÍLEK, J., VANČO, J., MANDÍKOVÁ, J., TREJTAR, F. Synthesis and in vitro evaluation of new derivatives of 2-substituted-6fluorobenzo[*d*]thiazoles as cholinesterase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2013, **21**(7), 1735–1748.
49. LE BOZEC, L., MOODY, CH. J. Naturally Occurring Nitrogen–Sulfur Compounds. The Benzothiazole Alkaloids. *Australian Journal of Chemistry*. 2009, **62**(7), 639–647.
50. KHAN, K. M., RAHIM, F., TAHA, M., KHAN, M., HAQ, Z. U., CHOUDLARY, M. I., MESAİK, M. A., HALIM, S. A. Synthesis of novel inhibitors of β -glucuronidase based on benzothiazole skeleton and study of their binding affinity by molecular doping. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2011, **19**(14), 4286–4294.
51. PEJCHAL; V.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; DRABINA, P. Synthesis of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-substituted phenyl ureas and their inhibition activity to acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2011, **48**(1), 57–62.
52. National Academie of Sciences, Engineering, and Medicine. *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemical: Volume 20*. Washington, DC: The national. 2016. 194. ISBN 978-0-309-44915-1.

53. HANUSEK, J. Organická chemie: vlastnosti a reaktivita organických sloučenin: [bakalářský studijní program, 2. sešit]. Vyd. 4., opr. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014. 123. ISBN 978-80-7395-762-9.
54. KOBLER, H., MUNZ, R., GASSER, G. A., SIMCHEN, G. Eine einfache Synthese von Tetraalkylammoniumsalzen mit funktionellen Anionen Justus. *European Journal of Organic Chemistry*. 1978, **12**, 1937–1945.
55. JHA, A. Unusual synthesis of 1-(4-fluorobenzyl)-N-(1-(1-(4-fluorobenzyl)-6-isopropoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)piperidin-4-yl)-6-isopropoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-amine. *ARKIVOC*. 2006,**1**, 13–20.
56. LIŠKA, F. *Deriváty kyseliny uhličité* [online]. ÚOCH- učební materiály, 2005 [cit. 19.2.2019]. Dostupné z: <https://uoch.vscht.cz/files/uzel/0006592/Uhlicita.pdf?redirected>.
57. STREITWIESER, A. *Introduction to organic chemistry*. Vyd. 4. New York: Macmilan Publishing Company, 1992. 1299. ISBN 0024181706
58. MINDL, J. Struktura a reaktivita karbamátů. *Chemické listy*. 2000, **94**(3), 175.
59. SUN, H. Ab initio characterizations of molecular structures, conformation energies, and hydrogen-bonding properties for polyurethane hard segments. *Macromolecules*. 1993, **26**(22), 5924.
60. SAHOO, A., SETHUNATHAN, N., SAHOO, P. K. J. Microbial degradation of carbosulfan by carbosulfan- and carbofuran-retreated rice soil suspension. *Environ. Health Science Journal*. 1998, **B33**, 369.
61. NOVARTIS AG, NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH. Novel herbicides. REMPFLER, H., MUHLENBACH, M., LUTZ, W., LUETHY, CH. European patent application. WO9847864. 29.10.1998.
62. MIKOLACZYK, W., WAWRO, D., STRUSCZYK, H. Cellulose carbamet spinning solutions prepared for the manufacture of fibers. *Fibres & Textile in Eastern Europe*. 1998, **6**, 53–55.
63. LAWRENCE, M., KLEIN, D. L., NEMOTO, P. Synthesis and preliminary structure-activity relationships of 1-[(3-fluoro-4-pyridinyl)amino]-3-methyl-1H-indol-5-yl methyl carbamate (P10358), a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 1997, **7**(2), 157.
64. SQUIBB & SONS INC. Aminediol protease inhibitors. GORDON, E. M., BARISH, J. C., BISACCHI, G. S. Spojené státy americké. US 5559256. 24.9.1996.
65. GUANGCHENG, L., ELLMAN, J. A. A General Solid-Phase Synthesis Strategy for the Preparation of 2-Pyrrolidinemethanol Ligands. *The Journal of Organic Chemistry*. 1995, **60**(24), 7712.

66. OZAKI, S. Recent advances in isocyanate chemistry. *Chemical Reviews*. 1972, **72**(5), 457–496.
67. YOSHIDA, M., HARA, N., OKUYAMA, S. Catalytic production of urethanes from amines and alkyl halides in supercritical carbon dioxide. *Chemical Communications*. 2000,**2**, 151–152.
68. ABLA, M., CHOL, J. C., SKAKURA, T. Halogen-free process for the conversion of carbon dioxide to urethanes by homogeneous catalysis. *Chemical Communications*. 2001, **21**, 2238–2239.
69. ERHARDT, P. W. Curtius conversion of acids to amines under neutral conditions via an anthrylmethyl carbamate. *The Journal of Organic Chemistry*. 1979, **44**, 883–884.
70. PEJCHAL, V., ŠTEPÁNKOVÁ, Š., PADĚLKOVÁ, Z., IMRAMOVSKÝ A., JAMPÍLEK, J. 1,3-Substituted Imidazolidine-2,4,5-triones: Synthesis and Inhibition of Cholinergic Enzymes. *Molecules*. 2011, **16**, 7565–7582.
71. KERI, R. S., Quintanova, C., MARQUES, S. M., ESTEVES, A. R., CARDOSO, S. M., SANTOS, M. A. Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine–benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer’s disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2013, **21**(15), 4559–4569.
72. PEJCHAL, V., ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., PEJCHALOVÁ, M., KRÁLOVEC, K., HAVELEK, R., RŮŽIČKOVÁ, Z., AJANI, H., LO, R., LEPŠÍK, M. Synthesis, structural characterization, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors. *Bioorganic and Medical chemistry*. 2016, **24**(7), 1560–1572.