

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKEJ A BIOORGANICKEJ CHÉMIE

Syntéza nových huprínov ako potenciálnych
inhibítorov cholínesteráz

Diplomová práca



Školiteľ: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Školiteľ špecialista: RNDr. Eva Mezeiová, Ph.D.

PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Lucia Pokrievková

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

Lucia Pokrievková

POĎAKOVANIE

Týmto by som chcela poďakovať doc. PharmDr. Jaroslavovi Rohovi, Ph.D., RNDr. Eve Mezeiovej, Ph.D. a PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. za ich profesionálny prístup odborné rady, venovaný čas, ochotu a trpezlivosť, ktorú mi behom spracovania diplomovej práce preukázali. Ďalej by som rada poďakovala doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za NMR analýzu, PharmDr. Ondřeji Soukupovi, PhD. za stanovenie permeability nových zlúčenín cez lipidické membrány, npor. PharmDr. Vendule Šepsovej a Mgr. Martině Hrabínovej za stanovenie biologických parametrov syntetizovaných liečiv. Za finančnú podporu vďačím SVV – SVV 260 183.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organickej a bioorganickej chémie

Študent: Lucia Pokrievková

Školiteľ: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Školiteľ špecialista: RNDr. Eva Mezeiová, Ph.D., PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Názov práce: Syntéza nových huprínov ako potenciálnych inhibítorov cholinesteráz

Alzheimerova choroba (AD) je komplexné neurodegeneratívne ochorenie, ktoré sa prejavuje postupnou stratou krátkodobej a v pokročilejších štádiách aj dlhodobej pamäte. Charakteristickým histopatologickým znakom AD je prítomnosť neuritických plakov a neurofibrilárnych klobiek v postihnutých oblastiach mozgu. Pri ochorení tiež dochádza k rozsiahlej poruche cholinergnej neurotransmisie. Do súčasnej terapie sú zahrnuté iba dve skupiny liečiv. Prvú tvoria inhibítory acetylcholinesterázy (AChEI), do druhej zaradujeme memantín, ktorý je antagonistom glutamátových receptorov. Cieľom diplomovej práce bola syntéza novej skupiny liečiv na báze multipotentných zlúčenín tzv. multi-target directed ligands (MTDLs) odvodených od huprínov. Nové zlúčeniny sú navrhnuté tak, aby boli schopné interagovať s obidvomi anionickými miestami achetylcholinesterázy (AChE), čím je vystupňovaný ich inhibičný účinok voči enzýmu. V rámci experimentálnej časti diplomovej práce boli navrhnuté a pripravené dva štruktúrne typy huprínov. Prvým boli heterodiméry na báze huprín-L-tryptofánu (HupY-L-Trp) s rôznou dĺžkou spojovacieho reťazca. Náplňou druhej syntézy bol dizajn a príprava 2-metoxyhuprínu. Inhibičná aktivita nových derivátov voči cholinesteráze (ChE) bola stanovená pomocou Ellmanovej metódy a vyjadrená ako hodnota IC_{50} . Tieto merania vykonali pracovníci Katedry toxikológie a vojenskej farmácie v Hradci Králové (Fakulta vojenského zdravotníctva, Univerzita obrany, Brno). Biologické výsledky nových analógov sa porovnávali s hodnotami referenčných zlúčenín (takrín, 6-chlórtakrín a 7-metoxytakrín). Priepustnosť nových potenciálnych liečiv cez biologické bariéry bola experimentálne overená pomocou tzv. parallel artificial membrane permeability assay

(PAMPA). Toto stanovenie vykonali pracovníci Centra biomedicínskeho výskumu (Fakultná nemocnica Hradec Králové). Biologické výsledky nových derivátov boli rovnako porovnané s hodnotami referenčných zlúčenín. Všetky novovzniknuté molekuly preukázali inhibičnú aktivitu voči obom podtypom ChE v mikromolárnych až nanomolárnych hodnotách IC_{50} s predpokladanou priepustnosťou do CNS.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic And Bioorganic Chemistry

Student: Lucia Pokrievková

Supervisor: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Supervisor specialist: RNDr. Eva Mezeiová, Ph.D., PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Title of Diploma thesis: Synthesis of novel huprine derivatives as potential cholinesterase inhibitors

Alzheimer's disease (AD) is a complex neurodegenerative disease that is manifested by the gradual loss of short-term and, at more advanced stages, also of long-term memory. The characteristic histopathological features of AD is the presence of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in affected brain regions. Cholinergic neurotransmission is also one of the key pathological findings in AD. Only two drug groups are used in AD therapy. The first group consists of acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs). Memantine, which is a glutamate receptors antagonist, belongs to the second one. The aim of the diploma thesis was the synthesis of a new group of drugs acting as multipotent ligands (multi-target directed ligands, MTDLs) derived from huprines. The new compounds were designed to be able to interact with both anionic sites of acetylcholinesterase (AChE), thereby exaggerating the enzyme-inhibiting effect. In the experimental part of the diploma thesis two structural types of huprines were designed and prepared. The heterodimers based on huprine-L-tryptophan (HupY-L-Trp) with different side chain lengths were the first type. The aim of the second synthesis was the design and preparation of a 2-methoxyhuprine. The inhibitory activity of the new derivatives against cholinesterase (ChE) was determined by method of Ellman and obtained results are expressed as the IC_{50} value. These measurements were carried out by the staff of the Department of Toxicology and Military Pharmacy in Hradec Králové (Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Brno). The biological results of the new compounds were compared with the reference drugs (tacrine, 6-chlorotacrine and 7-methoxytacrine). The rate of

permeability of new derivatives through the blood-brain barrier was determined by using parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). This determination was carried out by the staff of the Centre of Biomedical Research (Faculty Hospital Hradec Králové). The biological results of the new compounds were compared with the references. All newly emerged compounds demonstrated inhibitory activity against both ChE subtypes in micromolar to nanomolar IC_{50} values with presumed CNS availability.

OBSAH

1 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA	10
2.1.1 Epidemiológia	10
2.1.2 Rizikové a ochranné faktory	10
2.1.3 Klinické prejavy	11
2.1.4 Diagnostika	12
2.2 PATOFYZIOLÓGIA.....	13
2.2.1 Cholinergná teória AD	13
2.2.2 Amyloidná teória AD.....	15
2.2.3 Tau hypotéza AD	16
2.2.4 Glutamátová teória AD	18
2.3 SÚČASNÉ LIEČIVÁ V TERAPII AD	19
2.3.1 Inhibítory ChE	19
2.3.2 Inhibítory NMDAR.....	22
2.4 MTDLs	24
2.4.1 Charakteristika	24
2.4.2 MTDLs ako novodobé liečivá	24
2.5 HUPRÍNY	26
2.5.1 Charakteristika a vznik	26
2.5.2 Deriváty huprínov	27
3 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	30
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	31
4.1 HUPRÍN-TRYPTOFÁNOVÉ DERIVÁTY	31
4.1.1 Návrh nových štruktúr	31
4.1.2 Syntetická časť v rámci prípravy derivátov HupY-L-Trp	33

4.1.3	Biologické testovanie derivátov HupY-L-Trp.....	43
4.2	2-METOXYHUPRÍN	47
4.2.1	Návrh 2-metoxyhuprínu	47
4.2.2	Syntetická časť v rámci prípravy 2-metoxyhuprínu	49
4.2.3	Biologické testovanie 2-metoxyhuprínu	52
5	DISKUSIA.....	54
6	ZÁVER.....	56
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	57

1 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5-HT ₃	Serotonínový receptor
6-CITHA	6-Chlórtakrín
7-MEOTA	7-Metoxytakrín
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACh	Acetylcholín
AChE	Acetylcholinesteráza
AChEI	Inhibítor acetylcholíesterázy
AMK	Aminokyselina
APOE	Apolipoproteín E
APP	Prekurzor amyloidného proteínu
ATCh	Acetylthiocholín
A β	Amyloidný proteín β (β -amyloid)
BACE-1	β -sekretáza 1
BChE	Butyrylcholinesteráza
BTCh	Butyrylthiocholín
ChAT	Cholínacetyltransferáza
ChE	Cholinesteráza
ChEI	Inhibítor cholinesterázy
CNS	Centrálny nervový systém
CT	Počítačová tomografia (Computed tomography)
DS	Downov syndróm
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

FAD	Familiárna Alzheimerova choroba (Familiar Alzheimer's disease)
GABA _A	Receptor pre γ -aminomaslovú kyselinu
Glu	Glutamát (glutámová kyselina)
GSK3 β	Glykogén syntáza kináza 3 beta
HEB	Hematoencefalická bariéra
HRMS	Vysokorozlišovacia hmotnostná spektrometria (High resolution mass spectrometry)
(-)-HupA	(-)-huperzín A
HupX	Huprín X
HupY	Huprín Y
HupZ	Huprín Z
HupY-L-Trp	Derivát huprín-L-tryptofánu
IC ₅₀	Inhibičná koncentrácia, ktorá zníži aktivitu enzýmu o 50% (Inhibitory concentration)
L-Trp	L-tryptofán
mAChR	Muskarínový receptor
MAO	Monoaminoxidáza
MRI	Magnetická rezonancia (Magnetic resonance imaging)
MTDL	Multifunkčne zameraná zlúčenina (Multi-target-directed ligand)
nAChR	Nikotínový receptor
NMDAR	<i>N</i> -metyl-D-aspartát receptor (glutamátový receptor)
NSAIDs	Nesteroidné antiflogistiká (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
NÚ	Nežiaduce účinky

PAMPA	Test umelej paralelnej membránovej priepustnosti (Parallel artificial membrane permeability assay)
PBS	Fosfátový pufer (Phosphate buffered saline)
PSEN1	Gén pre presenilín 1
PSEN2	Gén pre presenilín 2
RF	Rizikové faktory
rt	Laboratórna teplota (Room temperature)
SI	Index selektivity (IC_{50} <i>h</i> BChE / IC_{50} <i>h</i> AChE)
THA	9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridín (takrín)
THA-L-Trp	Takrín-L-tryptofán

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) patrí v súčasnosti k najčastejšie sa vyskytujúcim neurodegeneratívnym ochoreniam mozgu. Má progresívny charakter a je spojená s kognitívnou poruchou až demenciou. Prevalencia AD rastie s vekom. Incidencia AD stúpa v dôsledku predlžovania stredného veku života a starnutia populácie. Ochorenie výrazne znižuje kvalitu života pacienta i jeho blízkeho okolia. Je jednou z hlavných primárnych príčin mortality vo svete. Momentálne AD nedokážeme kauzálne liečiť. Vývoj choroby sa dá spomaliť symptomatickou (kognitívnou) terapiou a tým oddialiť jej ťažké štádiá. Predmetom najnovších výskumov sú nové druhy liečby, ktoré by dokázali AD vyliečiť alebo zastaviť jej progres.^{1,2}

2.1.1 Epidemiológia

AD je svetovo najčastejšou príčinou ireverzibilnej demencie u starších ľudí (až 80%). Približne 1% pacientov s AD tvorí skupina do 65 rokov. Výskyt ochorenia rastie s vekom. V kategórii nad 85 rokov je postihnutých už 30% obyvateľstva.³ Odhaduje sa, že v roku 2050 počet prípadov AD prevýši hodnotu 130 miliónov.^{2,4} Stúpajúca prevalencia a incidencia súvisí so starnutím populácie. Najvyšší výskyt ochorenia zaznamenávajú štáty ako Čína, USA, oblasti západného Pacifiku a vyspelých európskych štátov. V ČR sa počet pacientov odhaduje na 120 000. Náklady na diagnostiku a liečbu každým rokom narastajú. Napriek tomu je choroba aj v dnešnej dobe značne poddiagnostikovaná.^{5,6}

2.1.2 Rizikové a ochranné faktory

AD patrí k ochoreniam s neznámou etiológiou. S určitosťou však vieme charakterizovať jej rizikové faktory (RF). Prepuknutiu choroby predchádza kumulácia viacerých RF a následné prekonanie samoregulačných, opravných mechanizmov mozgu. Genetické pozadie patrí k rizikám daným a teda neovplyvniteľným. Ďalšiu skupinu RF je možné sledovať a eliminovať. Momentálne je jedinou prevenciou proti AD zníženie ovplyvniteľných RF a využitie faktorov protektívnych.⁷

Po genetickej stránke je AD heterogénne ochorenie. Pozitívna rodinná anamnéza je hlavným RF familiárnej Alzheimerovej choroby (FAD). Spôsobuje ju kombinácia určitých alel,

vd'aka ktorým je nositeľ náchylnejší k rozvoju AD. Genetické predispozície sa teda vzťahujú hlavne na FAD. Týmto typom trpí malé percento pacientov, ktorým bola choroba diagnostikovaná. FAD sa prejavuje skorým nástupom, ešte pred 65. rokom života. Na úrovni DNA súvisí s mutáciou génu pre prekursor amyloidného proteínu (APP) na 21. chromozóme, ďalej génu pre presenilín 1 (PSEN1) na 14. chromozóme alebo presenilín 2 (PSEN2) na 1. chromozóme.^{8,9}

Ďalšou formou je sporadická AD, ktorá sa oproti FAD vyskytuje v absolútnej prevahe. Príznaky oboch foriem sú rovnaké, rozdiel je len v manifestácii ochorenia vzhľadom k veku pacienta. Sporadická AD sa začína prejavovať po 65. roku života. Ani pri tomto type sa nedajú vylúčiť genetické vplyvy. Poškodenie býva spájané s mutáciou génu pre apolipoproteín E (APOE), konkrétne *APOE-ε4*.^{8,10}

Ovplyviteľné RF súvisia hlavne so životným štýlom, pridruženými civilizačnými ochoreniami a v neposlednom rade aj so stupňom vzdelania a mentálnou aktivitou človeka. Medzi tieto faktory patrí nedostatočná fyzická aktivita, fajčenie, príjem alkoholu, obezita, cukrovka, vysoký krvný tlak, hypercholesterolémia, ateroskleróza a ostatné kardiovaskulárne komplikácie. Jedným z možných dôvodov vzniku AD sú zriedkavo aj rôzne úrazy hlavy.¹¹

K ochranným faktorom, ktoré zvyšujú odolnosť proti AD, patrí vyššie vzdelanie, udržiavanie psychickej aktivity aj v pokročilom veku, primeraná fyzická záťaž a pohyb, hormonálna suplementácia po menopauze alebo vedľajší účinok nesteroidných antiflogistík (NSAIDs).¹¹ Prevenciu možno tiež podporiť príjmom vitamínov skupiny B (hlavne B12 a kyselina listová), antioxidantov (vitamíny C a E) a nenasýtených mastných kyselín.¹²

2.1.3 Klinické prejavy

AD je progresívne degeneratívne ochorenie. V dôsledku patologických zmien v mozgu je primárne postihnutá pamäť. AD začína miernymi príznakmi, ktoré sa individuálnou rýchlosťou stupňujú, až vyradia pacienta z každodenného života. Postihnutý je v terminálnej fáze choroby odkázaný na celodennú starostlivosť.^{2,12}

Neurodegeneratívne zmeny postihujú spočiatku viac krátkodobú pamäť. Pacienti majú v raných štádiách problémy s náročnejšími aktivitami (vedenie motorového vozidla, bicyklovanie, práca s PC). Neskôr sa objavujú poruchy hlbokých spomienok a naučených činností. V poslednom štádiu je problematické zvládanie bežných úkonov (prijímanie potravy, obliekanie, výkon hygieny).^{2,13}

K zhoršeniu pamäte a myslenia sa postupne pridávajú behaviorálne a psychické príznaky (zmätenosť, zlá orientácia v priestore a čase, agresivita, agitovanosť, depresie). Ďalej sa objavujú výkyvy cirkadiálnych rytmov, inkontinencia, postihnutý nedokáže rozpoznať tváre, zabúda mená osôb, bežné názvy a slová.^{2,13}

Príčina smrti pacientov trpiacich AD najčastejšie priamo súvisí s neurodegeneratívnym poškodením organizmu. V pokročilom štádiu zaznamenávame pridružený výskyt bronchopneumónií, rôzne úrazy, zhoršenie imunity, až zlyhávanie neurohumorálneho riadenia homeostázy.²

2.1.4 Diagnostika

Včasná diagnostika AD je veľmi dôležitá. Podchytenie choroby v začiatkoch zvyšuje účinnosť nasadenej liečby. Je ale nutné rozpoznať prirodzené starnutie alebo mierny kognitívny deficit od začínajúcej demencie.^{6,1}

AD patrí k heterogénnym ochoreniam. Pri diagnostike sa sledujú charakteristické príznaky, ako napr. zhoršenie pamäte, problémy s výkonom bežných činností, problémy s rečou a myslením, zmeny v nálahe a správaní, dezorientácia v čase a priestore a ďalšie kognitívne deficity. Potvrdeniu diagnózy ďalej predchádza mnoho rôznych vyšetrení, ako klinických, tak testových.^{6,14}

Ku klinickým vyšetreniam patrí CT a MRI, ktoré v prípade pozitívneho výsledku preukážu určité morfológické zmeny (atrofiu mozgu). Ďalej je k dispozícii stanovenie tripletu bielkovín mozgomiešneho moku oproti kontrolným non-alzheimerovským osobám. Pozitívny výsledok v prospech AD dokazujú zvýšené hladiny tau a hlavne fosfotau proteínu (podkapitola 2.2.3). Nadlimitná je tiež hladina patologického β -amyloidu (podkapitola 2.2.2). Kvôli častému pridruženiu depresií a psychóz sa z pravidla vykonávajú aj psychiatrické a psychologické vyšetrenia.^{2,15}

Neuropsychologické testy majú oproti prístrojovým metódam jednu podstatnú výhodu. Pacienta dokážeme testovať v úplne ranom štádiu alebo dokonca niekoľko rokov pred manifestáciou AD, kedy sú morfológické zmeny na mozgu minimálne, až žiadne. Patria sem rôzne dotazníky, jednoduché logické cvičenia, či menovanie slov začínajúcich rovnakým písmenom. Test sa následne vyhodnocuje pomocou tabuliek.¹⁵

2.2 PATOFYZIOLÓGIA

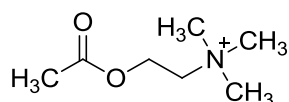
AD je ochorenie neurónov, v ktorých prebiehajú degeneratívne zmeny rôzneho pôvodu. Charakteristická je difúzna kortikálna atrofia mozgovej kôry. Oproti zdravému jedincovi zaznamenávame nadmerný pokles počtu neurónov CNS a to hlavne v parientálnych a temporálnych lalokoch. V dôsledku atrofie mozgového tkaniva dochádza k zdanlivému zväčšeniu cerebrálnych komôr (tzv. relatívny hydrocefalus). Mozog postihnutého má nižšiu hmotnosť v porovnaní s rovesníkmi, ktorí starnú prirodzeným spôsobom. Hmotnosť mozgu zdravého jedinca v rovnakom veku je v priemere o viac ako 100 gramov vyššia. Existuje viacero príčin atrofie. Primárnym dôvodom je patologický úbytok neurónov a neurofibril v kôre, sekundárnym demyelinizácia vlákien v podkôrových oblastiach.^{16,17}

Hlavnou neuropatologickou črtou AD je objektívny nález senilných plakov neuritického pôvodu, ktoré sú extracelulárne tvorené amyloidným proteínom β ($A\beta$). Typická je tiež prítomnosť neurofibrilárnych pletencov, vznikajúcich intracelulárne v cytoplazme postihnutých neurónov. Spomínané kľbká pozostávajú z patologickej formy tau proteínu, ktorý vytvára špirálovitú štruktúru.^{16,17}

Ďalej sa zistilo, že pacienti s AD majú v niektorých oblastiach mozgu narušenú homeostázu cholinergného systému. Následkom tejto odchýlky je porucha kognitívnych funkcií.¹⁸ Kvôli rozmanitému pôvodu ochorenia sa uvádzajú 3 hlavné teórie rozvoja AD. Dané hypotézy sa navzájom nevycludujú. Bližšie sú vysvetlené v nasledujúcich podkapitolách.

Okrem atrofických zmien, patologických proteínov a odchýlok v neurotransmisii sa pri AD objavuje aj mitochondriálna dysfunkcia. Tá následne vedie k uvoľňovaniu voľných kyslíkových radikálov a oxidatívneho stresu. Všetky spomínané faktory sa komplexne podieľajú na rozvoji AD.¹⁸

2.2.1 Cholinergná teória AD



Obrázok 1. Molekula acetylcholínu.

Acetylcholín (ACh) je endogénna molekula. Chemicky sa jedná o ester kyseliny octovej a aminoalkoholu cholínu (Obrázok 1). Patrí k dôležitým neuromediátorom vegetatívneho i centrálného nervového systému, pôsobí tiež na nervovosvalovej platničke. V organizme

vzniká v cytoplazme neurónov z cholínu a acetyl-CoA pôsobením enzýmu cholínacetyltransferázy (ChAT), ktorá prenáša acetylový zvyšok na aminoalkohol (cholín). ACh je skladovaný vo vezikulách nervových buniek, malá časť sa nachádza aj extravezikulárne v cytoplazme.¹⁹

Pri podráždení nervovej bunky akčným potenciálom dochádza k depolarizácii jej membrány, influxu Ca^{2+} iónov do bunky a vyplaveniu ACh z vezikúl do synaptickej štrbiny. ACh sa tu následne viaže na príslušné receptory, čím dochádza k cholinergnej neurotransmisii. Akčný potenciál je vzápätí ukončený pôsobením cholínesterázy (ChE), ktorá odbúrava ACh. K tejto degradácii dochádza na extracelulárnej membráne synaptickej štrbiny. Neuroprenášač je katalyticky hydrolyzovaný, pričom sa rozkladá na kyselinu octovú a cholín, ktorý je späťne vychytávaný do nervového zakončenia k recyklácii (reuptake). Priebeh degradácie ACh zobrazuje Schéma 1.^{19,20}

Vyplavený ACh interaguje s dvomi typmi receptorov. Prvým je metabotropný muskarínový receptor (mAChR), ktorý je spojený s G-proteínom. Neurochemický prenos na ňom rádovo prebieha v sekundách. V súčasnosti vieme o existencii piatich podtypov mAChR ($M_1 - M_5$). Zatiaľ bola objasnená fyziologická funkcia prvých troch (M_1 - neuronálne, M_2 - srdcové, M_3 - žľazové/hladkosvalové). ACh ovplyvňuje mAChR na efektoroch parasymptatiku a v potných žľazách.²⁰

Druhým typom je ionotropný nikotínový receptor (nAChR), ktorý je spojený s iónovým kanálom. Neurochemický prenos na ňom rádovo prebieha v milisekundách. Známe sú dva podtypy nAChR (N_N - neuronálne a N_M - muskulárne). ACh ovplyvňuje nAChR vo vegetatívnych gangliách a v dreni nadobličiek (N_N), na neuromuskulárnej platničke (N_M) a rovnako v celom CNS.²⁰

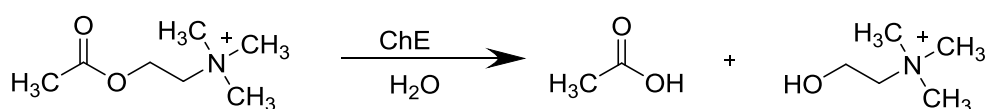


Schéma 1. Hydrolýza ACh na cholín a kyselinu octovú.

Začiatkom 70. rokov prebehlo prvé systematické biochemické vyšetrenie mozgu pacientov s AD. Výskum bol zameraný na identifikáciu jasnej neurochemickej abnormality, ktorá by poskytla základy pre rozvoj racionálnej terapie ochorenia. Zistenia ukázali, že u postihnutých je znížená tvorba a vyplavenie ACh z presynaptických zakončení.^{21,22}

Tento presynaptický cholinergný deficit súvisí jednak s nízkou hladinou ChAT a tiež s patologicky zvýšenou hladinou určitého typu ChE (podkapitola 2.3.1). Pri AD sa teda v dôsledku zníženej hladiny ChAT tvorí nedostatok ACh, ktorý je navyše rýchlo degradovaný

ChE. Ďalej je v rámci choroby obmedzený vstup cholínu do neurónov a zhoršená je aj využiteľnosť acetyl-CoA. Mení sa tiež počet nAChR, ktorý je pri AD znížený, zatiaľ čo koncentrácia mAChR ostáva relatívne zachovaná.²³

ACh zohráva dôležitú úlohu pri učení a správnej funkcii pamäte. V dôsledku poškodenia cholinergného systému sa u pacientov s AD rozvíja kognitívna porucha. Jej stupeň je úmerný degenerácii cholinergných neurónov a nedostatočnej transmisii ACh pri tomto ochorení.^{21,22}

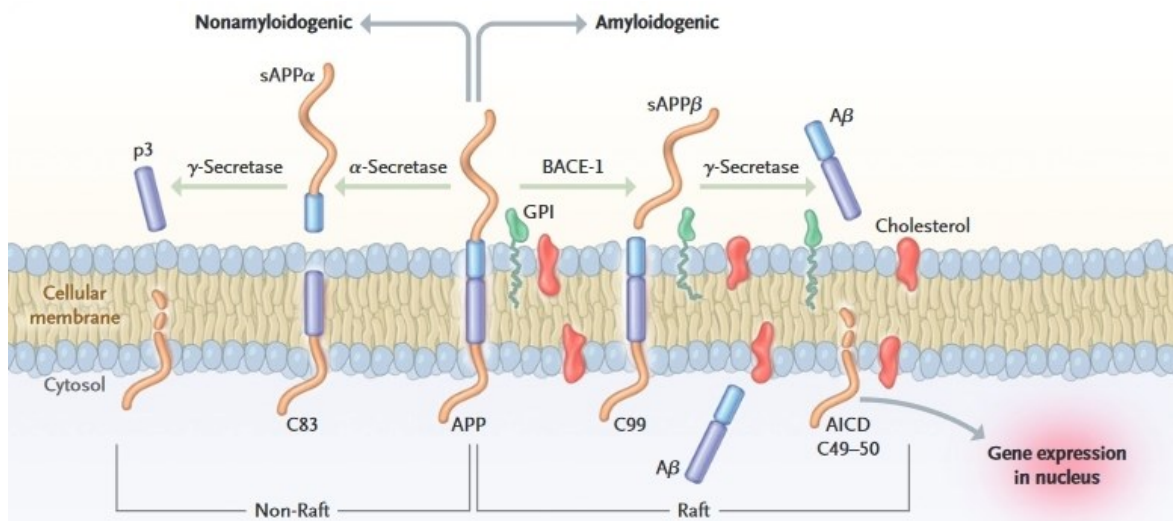
Výsledky zvieracích štúdií potvrdili danú teóriu. Zdravému mladému jedincovi bol podaný muskarínový antagonist skopolamín, ktorý u neho v dôsledku blokády cholinergnej aktivity spôsobil príznaky typické pre AD (najmä zhoršenie pamäte). Prejavy boli rovnaké ako u starých neliečených jedincov. Pri následnom podaní inhibítora acetylcholinesterázy (AChEI) fysostigmínu došlo k vymiznutiu príznakov.²¹

Z výskumov je teda známe, že AChEI dokážu čiastočne upraviť kognitívny deficit pacientov. Na základe týchto poznatkov je založená dnešná terapia AD, ktorá primárne zahŕňa nepriame cholinomimetiká - inhibítory cholinesteráz (ChEI, podkapitola 2.3.1).¹

2.2.2 Amyloidná teória AD

Daná hypotéza je podložená existenciou APP. Za fyziologických podmienok podlieha tento prekursor neamyloidogénnemu spracovaniu. APP je rozkladaný α -sekreázou a v zápätí γ -sekreázou za vzniku $A\beta$ s veľkosťou do 40 fragmentov AMK (Obrázok 2). $A\beta_{40}$ sa podieľa na tvorbe nových neuronálnych synapsií.^{2,16}

Pri AD je však vo zvýšenej miere prítomné patologické štiepenie APP. Proteín je najskôr vystavený enzymatickému pôsobeniu β -sekreázy 1 (BACE-1) a následne γ -sekreázy, pričom vzniká aberantný $A\beta$ s veľkosťou 42 fragmentov AMK (Obrázok 2).¹⁷ Extraneuronálne umiestnený $A\beta_{42}$ sa vyznačuje zvýšenou agregabilitou a typicky odoláva proteázam. Jeho odbúravanie je nedostatočné, vzniká v prebytku, čo považujeme za významný spúšťač faktor AD. V miestach senilného plaku sa navyše manifestuje sterilný zápal, dochádza k uvoľneniu mediátorov akútnej zápalovej reakcie (interleukínov, cytokínov), aktivácii cyklooxygenáz a nadmernému uvoľneniu excitačných AMK. Všetky spomínané faktory prispievajú k rozvoju AD.²



Obrázok 2. Schematické znázornenie spracovania APP. Neamyloidogénne štiepenie začína α -sekretázou za vzniku rozpustného APP α (sAPP α) a C-terminálneho zvyšku C83, ktorý je ďalej štiepený γ -sekretázou. Amyloidogénne štiepenie začína BACE-1 za vzniku rozpustného APP β (sAPP β) a C-terminálneho zvyšku C99, ktorý je následne štiepený γ -sekretázou na A β . Obrázok prevzatý z citácie 8.

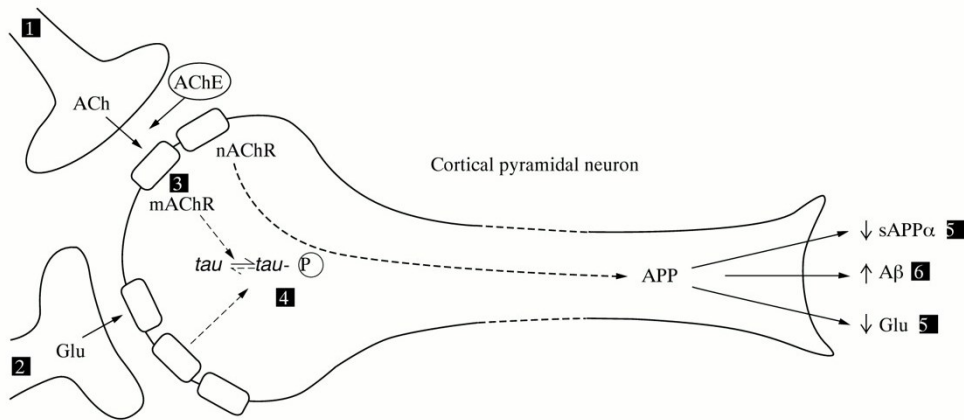
FAD (začiatok pred 65. rokom života) je priamo geneticky podmienená. Súvisí s mutáciou génu pre APP na 21. chromozóme. Príkladom sú klinické pozorovania u pacientov s Downovým syndrómom (DS). U týchto jedincov s trizómiou 21. chromozómu dochádza už v nízkom veku k úbytku kognitívnych funkcií. Prakticky u všetkých jedincov, ktorí sa dožijú 50. roku života, sa objavia prejavy demencie. Kvôli lokalizácii génu pre APP na 21. chromozóme je trizómiou pri DS akumulácia A β ešte viac podporená. Z toho vyplýva, že patologické zmeny pozorované pri AD sú veľmi podobné zmenám pri DS a bezprostredne súvisia s anomáliou na 21. chromozóme.¹⁶

2.2.3 Tau hypotéza AD

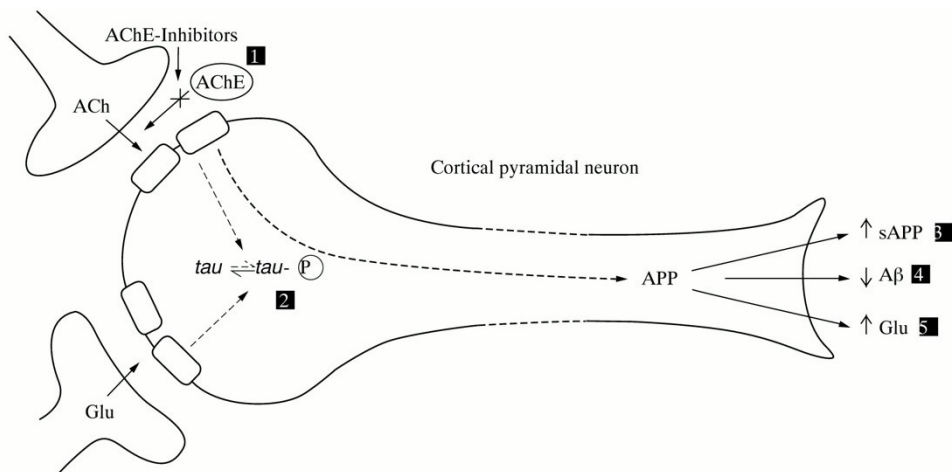
Tau proteín je za fyziologických podmienok intraneuronálny stabilizátor mikrotubulov a axónov. Podporuje tiež ich polymerizáciu. Neurofibrilárne kľbká prítomné pri AD sú tvorené abnormálnym hyperfosforylovaným proteínom tau. K fosforylácii dochádza pôsobením kináz. AMK reťazce fosfotau proteínu sú skrátené, dochádza k jeho vyviazaniu z povrchu mikrotubulov, čím je podstatne narušený axonálny transport v organizme. Patologická forma proteínu je odolná voči chemickému a enzymatickému pôsobeniu. Agreguje do nerozpustných fibríl a v mozgovom tkanive pretrváva aj po apoptóze neurónu, v ktorom vznikol. Pri diagnostike AD sa porovnáva hodnota fosfotau k celkovému množstvu tau proteínu. Podobne sa zrovnáva aj hodnota A β_{42} k celkovému množstvu A β v organizme.^{15,16}

Podstatu spomínaných teórií uvádza Obrázok 3. Zobrazený je súhrn patologických zmien pri AD a hypotetický mechanizmus účinku dokonalého liečiva v terapii AD.

A)



B)



Obrázok 3. Schematický diagram neurónu: A) zmeny neurotransmisie pri AD, B) hypotetický mechanizmus účinku dokonalého AChEI. Vysvetlivky A): (1) znížená kortikálna cholinergná neurotransmisia; (2) znížená kortikokortikálna glutamatergná neurotransmisia v dôsledku straty neurónov alebo poškodenia synapsie; (3) obmedzená väzba mAChR (M_1) a druhého posla; (4) hyperfosforylácia tau proteínu - prekursor neurofibrilárnych pletencov; (5) znížená sekrécia rozpustného APP; (6) zvýšená produkcia $A\beta$; (7) znížená produkcia glutamátu (Glu). Predpokladá sa, že tieto zmeny spôsobujú klinické príznaky AD a prispievajú k zhoršeniu ochorenia. Vysvetlivky B): (1) AChEI znižujú degradáciu endogénne uvoľneného ACh, čo vedie k jeho vyššej koncentrácii na synapsách a následnej interakcii s receptormi pre ACh; (2) znížená fosforylácia tau proteínu; (3) fyziologická sekrécia APP; (4) znížená produkcia $A\beta$; (5) návrat k fyziologickej glutamátergnej neurotransmisii, pravdepodobne v dôsledku aktivácie mAChR a nAChR. Obrázok prevzatý z citácie 21.

2.2.4 Glutamátová teória AD

Významnú rolu v procese neuroplasticity mozgu (pamäť a učenie) zohráva aj ionotropný glutamátový receptor (NMDAR). Tento fakt podporil vznik tzv. glutamátovej teórie. V počiatočnom štádiu ochorenia zaznamenávame nadmernú stimuláciu NMDAR. Tento jav môže mať viacero príčin, napr. prítomnosť $A\beta$, tau proteínu, oxidačný stres, mitochondriálna dysfunkcia, chronický neuronálny zápal.²⁴

Ďalším stimulátorom NMDAR je glutamát (Glu). Fyziologický výdaj tohto neuromediátoru je veľmi dôležitý pre pamäť a učenie. Pri AD sa však Glu uvoľňuje v nadbytku, pričom je znížené jeho spätné vychytávanie v postihnutých oblastiach mozgu.^{17,25}

V dôsledku spomínanej patológie nastáva pri AD nadmerné zasýtenie NMDAR glutámovou kyselinou, stimulácia receptorov je prílišná, čo následne destabilizuje vnútorné prostredie nervových buniek a vedie až k ich smrti. Tento jav sa komplexne nazýva bunková excitotoxicita. V pokročilejších štádiách choroby dochádza v dôsledku excitotoxicity k postupnému úbytku neurónov v postihnutej oblasti a následne až k nezvratnej degenerácii glutamátergného systému (systému excitačných AMK).^{17,25}

Z danej hypotézy vyplýva, že inhibítory NMDAR dokážu priaznivo ovplyvniť degeneratívne zmeny neurónov pri AD a tým spomaliť progres ochorenia (podkapitola 2.3.2).¹⁷

2.3 SÚČASNÉ LIEČIVÁ V TERAPII AD

Na základe cholinergnej teórie sú podstatou dnešnej liečby ChEI. Inhibíciou mozgových ChE zvyšujú dostupnosť ACh na synapsách, čím pozitívne ovplyvňujú cholinergnú transmisiu a s ňou spojený kognitívny deficit. Hneď ako je pacientovi choroba diagnostikovaná, sa ChEI stávajú liekmi prvej voľby. Sú indikované pri ľahkých a stredne ťažkých formách AD. Oddiaľujú závažnejšie štádiá ochorenia, zvyšujú kvalitu života a predlžujú obdobie samostatnosti pacienta (podkapitola 2.3.1).^{2,25}

Glutamátová teória zaradila do terapie liečivá druhej voľby. Sú nimi antagonisti NMDAR. Užívajú sa pri ťažkých formách AD. Klinicky aktívna je zatiaľ jediná látka - memantín (podkapitola 2.3.2). Iba spomínané 2 farmakoterapeutické prístupy sú podľa medicíny založenej na dôkazoch.^{25,26}

Farmakoterapia Alzheimerovej choroby je navyše doplnená o psychofarmaká, Ginkgo bilobu, estrogény, NSAIDs, antioxidanty, vitamíny a liečivá účinné proti pridruženým vaskulárnym ochoreniam.²

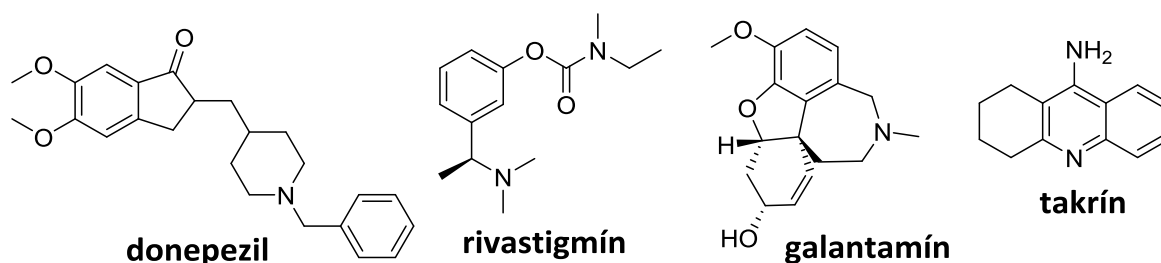
2.3.1 Inhibítory ChE

V súčasnej dobe sa v klinickej praxi uplatňujú iba centrálné ChEI (nepriame cholinomimetiká). Spadajú pod tzv. kognitívnu terapiu, ktorá má doteraz najbližšie k neexistujúcej kauzálnej liečbe AD a moduluje klinický obraz choroby.^{25,27}

V rámci ľudského organizmu rozoznávame dva typy ChE. Prvým druhom je acetylcholinesteráza (AChE; EC 3.1.1.7). Vyskytuje sa hlavne na neuromuskulárnych spojoch a synapsách, kde hydrolyzou ACh ukončuje cholinergnú neurotransmisiu.²⁸ Druhým typom enzýmu je butyrylcholinesteráza (BChE; EC 3.1.1.8), nazývaná tiež pseudocholinesteráza alebo plazmatická ChE. Vzniká v pečeni, odkiaľ je krvou transportovaná do rôznych častí organizmu. BChE je schopná okrem ACh hydrolyzovať aj väčšie substráty, jej fyziologická funkcia však nebola úplne objasnená. Pri AD dochádza k zníženiu hladiny AChE, zatiaľ čo hladina BChE sa nemení alebo rastie. Dá sa predpokladať, že v tomto prípade BChE čiastočne preberá funkciu AChE. Vývoj nových liečiv je preto v súčasnosti zameraný na duálne inhibítory (inhibícia AChE a zároveň BChE).²⁹

Blokádou AChE a/alebo BChE sa zlepšuje porušená cholinergná transmisia. Na základe podtypov inhibovaných ChE delíme inhibítory na selektívne a neselektívne. Selektívny inhibítor vykazuje vyššiu afinitu k jednému z podtypov ChE a neselektívne inhibítory

spôsobujú blokádu obidvoch podtypov rovnako. Ďalej sa podľa biochemického profilu inhibície (trvácnosť komplexu liečivo-enzým) ChEI delia na reverzibilné, pseudo-ireverzibilné a ireverzibilné.^{25,27} Prehľad chemických štruktúr ChEI v súčasnosti používaných v terapii AD (donepezil, rivastigmín, galantamín) a vyradeného takrínu uvádza Obrázok 4.



Obrázok 4. Prehľad chemických štruktúr liečiv schválených k terapii AD.

2.3.1.1 Takrín (Cognex®)

Takrín (THA, Obrázok 4) bol v roku 1945 pôvodne vyvíjaný ako dezinfekčná zlúčenina.²⁷ Neskôr boli dezinfekčné účinky v klinických testoch vyvrátené a naopak sa preukázal jeho univerzálny charakter v terapii AD (vysvetlené nižšie).³⁰

Štruktúra THA obsahuje 1,2,3,4-tetrahydroakridínový skelet. Chemicky sa jedná o 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridín. Vďaka interakcii so širokým spektrom cieľov a dráh vykazuje v rámci cholinergného systému viacero mechanizmov účinku. Primárnym je inhibícia ChE, ktorá je sprostredkovaná väzbou do aktívneho miesta enzýmu (nekompetitívne). Je duálnym reverzibilným ChEI, vykazuje však mierne vyššiu selektivitu k BChE. THA ďalej zvyšuje syntézu a uvoľňovanie ACh a ovplyvňuje tiež mAChR/nAChR (down-regulácia a aktivácia podtypu M₁ a blok podtypu M₂ mAChR, up-regulácia nAChR).^{30,31}

Komplexnosť účinku THA sa prejavuje aj mimo cholinergného systému. Blokuje napr. sekréciu APP, zvyšuje cerebrálny prietok krvi a dokáže antagonizovať NMDAR.³⁰

Kvôli dobrým anticholinergným vlastnostiam bol THA v roku 1993 zavedený do klinickej praxe ako prvý AChEI v terapii AD. Nevýhodou tejto zlúčeniny je však jej hepatotoxicita a gastrointestinálna toxicita. Kvôli spomínaným NÚ bol THA krátko po schválení stiahnutý z trhu a dnes sa v terapii AD nepoužíva.^{27,31}

Podstatou súčasného výskumu v oblasti AD je vývoj jeho derivátov s vylepšeným farmakologickým profilom. Potenciálne analógy THA sa vyznačujú zníženou toxicitou a zachovaním výhodných anticholinergných vlastností. Príkladom je 7-metoxytakrín (7-MEOTA), ktorý bol pôvodne vyvíjaný Katedrou toxikológie a vojenskej farmácie v Hradci Králové (80. roky 20. storočia).^{27,30}

2.3.1.2 Donepezil (Aricept®)

Donepezil (Obrázok 4) patrí medzi najúčinnšie centrálne AChEI. V terapii AD sa začal užívať v roku 1996. Jeho štruktúra zahŕňa piperidínový fragment. Je to liečivo so systematickým názvom 2-[(1-benzylpiperidín-4-yl)metyl]-5,6-dimetoxy-2,3-dihydro-indén-1-ón. Patrí k selektívnym reverzibilným AChEI. Vykazuje selektivitu voči AChE (nekompetitívne). Prechádza hematoencefalickou bariérou (HEB), pôsobí teda centrálne, čím sú odstránené jeho NÚ na periférny nervový systém. Výhodou je dobrá biologická dostupnosť, dlhý polčas účinku (až 70 hodín, čo umožňuje podávanie 1× denne), minimálne NÚ, antioxidačné a neuroprotektívne vlastnosti. Zároveň bráni ukladaniu β -amyloidných plakov v CNS. Je dobre tolerovaný liečivý prípravok s počiatočnou dávkou 1×5 mg denne. Pri dobrej znášanlivosti sa dávka po mesiaci zdvihne na 1×10 mg denne. Vďaka svojim priaznivým vlastnostiam je dnes predlohou štruktúrou pre vývoj nových liečiv.^{26,27}

2.3.1.3 Rivastigmín (Exelon®)

Rivastigmín (Obrázok 4) je inhibítor karbamátového typu, do terapie AD zavedený v roku 2000. Podáva sa vo forme soli s kyselinou vínou (tartrát). Chemicky sa jedná o [3-[(1*S*)-1-(dimetylamino)etyl]fenyl]-*N*-etyl-*N*-metylkarbamát. Patrí k neselektívnym pseudo-ireverzibilným AChEI. Inhibuje obidva typy ChEs (kompetitívne), s čím súvisia jeho gastrointestinálne NÚ. Tieto ťažkosti dokážeme eliminovať častejším dávkovaním alebo použitím transdermálnych náplastí (Exelon® Patch). Výhodou sú minimálne liekové interakcie. Priaznivo tiež ovplyvňuje psychotické príznaky AD. Od syntetických derivátov fysostigmínu sa odlišuje terciárnou aminoskupinou, ktorá umožňuje jeho prestup cez HEB a následné pôsobenie v CNS. Dávka liečiva sa titruje - prvý mesiac sa podáva 2×1,5 mg denne, druhý mesiac 2×3 mg denne, tretí mesiac 2×4,5 mg denne a od štvrtého mesiaca sa užíva dávka 2×6 mg denne perorálne.^{26,27}

2.3.1.4 Galantamín (Galantamin Mylan®)

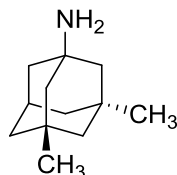
Galantamín (Obrázok 4) bol pôvodne izolovaný zo snežienky (*Galanthus*, Amaryllidaceae). Chemicky sa jedná o (4*aS*,6*R*,8*aS*)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-metoxy-11-metyl-4*aH*-[1]benzofuro[3*a*,3,2-*ef*][2]benzazepín-6-ol. Ide o benzoazepínový alkaloid, dnes vyrábaný synteticky. V niektorých krajinách sa používal k liečbe myastenien gravis. K liečbe AD bol schválený v roku 2001. Jeho tetracyklická štruktúra je tvorená

benzofurobenzazepínovým skeletom. Mechanizmus účinku spočíva v selektívnej reverzibilnej inhibícii AChE (kompetitívne). Ďalším významným mechanizmom je interakcia s nAChR. Galantamín sa viaže na aktívne miesto receptora, kde spôsobuje jeho alosterickú moduláciu. Na takto modulovanom nAChR je podporený cholinergný prenos, čo je pri liečbe AD rovnako pozitívne ako inhibícia AChE.³² Výhodou je veľmi dobré vstrebávanie po perorálnom podaní, môže však vytvárať depo v tukovom tkanive (kvôli výraznému lipofilnému charakteru). Môže spôsobovať gastrointestinálne NÚ. Má krátky poločas účinku, podáva sa 1× denne v retardovanej forme alebo 2× denne vo forme neretardovanej. Je obvykle dobre znášaný s minimom NÚ. Prvý mesiac sa užíva dávka 1×8 mg (2×4 mg) denne, druhý mesiac 1×16 mg (2×8 mg) denne a od tretieho mesiaca 1×24 mg (2×12 mg) denne.^{26,27}

2.3.2 Inhibítory NMDAR

Na základe glutamátovej teórie boli do terapie AD zaradené inhibítory NMDAR (podkapitola 2.2.4).^{17,25}

2.3.2.1 Memantín (Ebixa®)



Obrázok 5. Chemická štruktúra memantínu.

Memantín (Obrázok 5) je doteraz jediným klinicky schváleným liečivom danej skupiny. V terapii AD sa používa od roku 2002. Je derivátom adamantánu s chemickým názvom 3,5-dimetyltricyklo[3.3.1.1^{3,7}]dekán-1-amín.^{26,27}

Patrí k nekompetitívnym parciálnym antagonistom NMDAR. Daný receptor má formu napät'ovo riadeného iónového kanálu. Mechanizmus účinku memantínu spočíva v naviazaní do vnútorného kanálu NMDAR, kde spôsobuje jeho blokádu. K tomuto deju však dochádza iba za zvýšenej hladiny Glu, kedy je akčný potenciál na receptore príliš vysoký. Liečivo teda vykazuje selektivitu voči patologickému procesu na NMDAR, fyziologickú hladinu neuromediátoru liečivo neovplyvňuje. Ďalšou výhodou memantínu je rýchla kinetika väzby, ktorá spôsobuje okamžitý nástup účinku a jeho následné rýchle odoznenie. Po naviazaní na receptor simuluje

prítomnosť Mg^{2+} , čím bráni influxu Ca^{2+} do bunky, ktorého nadbytok vedie v konečnom dôsledku k smrti neurónov.^{26,33}

Memantín teda ako inhibítor NMDAR pôsobí proti bunkovej excitotoxicite.³³ Medzi jeho ďalšie pozitívne vplyvy na priebeh AD radíme inhibíciu enzýmu glykogén syntázy kinázy 3 beta (GSK3 β), ktorá spôsobuje degeneráciu patologického tau proteínu.²⁶

Memantín je dobre tolerovaný a vyvoláva minimum NÚ. Okrem kognitívnych funkcií pozitívne ovplyvňuje aj chovanie pacientov (napr. zlepšenie fungovania v domácom prostredí a verbálnu komunikáciu, zachovanie základných návykov a zručností). V terapii je často kombinovaný s AChEI. Obvyklá terapeutická dávka je 1 \times 20 mg (2 \times 10 mg) denne. Na začiatku liečby sa dávka titruje, začína sa 1 \times 5 mg denne. Postupne sa každý ďalší deň pridáva 5 mg.^{26,27}

2.4 MTDLs

2.4.1 Charakteristika

Od zavedenia memantínu (2002) nebolo v oblasti terapie AD schválené žiadne nové liečivo. V súčasnosti je známa iba symptomatická liečba, ktorá je zameraná na zlepšenie kognitívnych a pamäťových funkcií.^{4,27}

Multifaktoriálna povaha a komplikovaná etiológia AD si žiadala nový farmakologický prístup. V dôsledku tohto podnetu bola vytvorená inovatívna metóda, ktorej podstatou je vznik hybridných zlúčenín, schopných ovplyvniť viacero patologických mechanizmov ochorenia súčasne. Kombináciou známych štruktúr, ktoré dokážu zasiahnuť určitý cieľ a iných aktívnych zložiek vznikajú multifunkčne zamerané zlúčeniny tzv. multi-target directed ligands (MTDLs). Nové MTDLs môžu byť vyhliadkou do budúcnosti nielen v terapii AD, ale aj pri liečbe iných komplikovaných ochorení.^{4,27}

Podaním takéhoto širokospektrého liečiva (vzhľadom na etiológiu AD), by sa mohol spomaliť alebo zastaviť progres choroby na mnohých úrovniach. Vývoj MTDLs tak smeruje k zvýšeniu účinnosti a zníženiu množstva podávaných liečiv v terapii AD.^{4,34}

Okrem lepších a komplexnejších účinkov na pôvod ochorenia sa s novými látkami ponúka možnosť odstránenia niektorých NÚ. Vďaka zjednodušeniu terapeutického režimu odbúraním polyfarmakoterapie (polypragmázie) by sa mohla zlepšiť compliance a adherencia pacienta k liečbe.^{4,34}

2.4.2 MTDLs ako novodobé liečivá

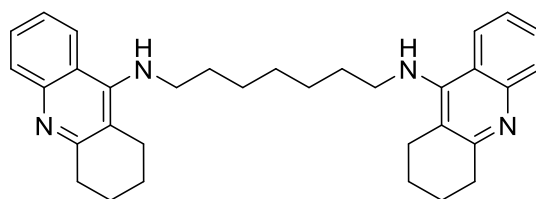
Priekupníckou molekulou v oblasti vývoja MTDLs sa stal bis(7)-takrín (Obrázok 6). Tento homodimérny derivát THA bol jednou z prvých multipotentných zlúčenín zameraných na experimentálnu liečbu AD. V jeho štruktúre sú prepojené dve molekuly THA alifatickým reťazcom s dĺžkou siedmich uhlíkových atómov. Bis(7)-takrín je vysoko selektívny AChEI, ktorý prevyšuje inhibičnú aktivitu materského THA 1500× (bis(7)-takrín: AChE IC_{50} = 0,4 nM; THA: AChE IC_{50} = 590 nM). Bis(7)-takrín je však horším inhibítorom BChE než parentný THA, práve kvôli jeho vystupňovanej selektivitě smerom k AChE (bis(7)-takrín: BChE IC_{50} = 390 nM; SI = 156; THA: BChE IC_{50} = 44 nM; SI = 0,08).³⁵

Skrátením dĺžky alkylového reťazca bis(7)-takrínu boli syntetizované menej účinné deriváty. Ak sa naopak alkylový reťazec predĺžil na C8 a viac, nová zlúčenina vykazovala

mierne zníženú afinitu voči AChE a naopak mierne zvýšenú afinitu voči BChE s klesajúcou tendenciou od C10 (vrátane).³⁵

Štruktúra bis(7)-takrínu, ktorá zahŕňa 7-uhlíkový alifatický reťazec je optimálna pre navodenie účinku a plne korešponduje so vzdialenosťou medzi dvomi anionickými miestami AChE (20 Å). V dôsledku uvedených faktov tak dochádza k zvýšenému počtu interakcií medzi účinnou látkou a enzýmom, čím je posilnený inhibičný potenciál bis(7)-takrínu voči AChE. Táto zlúčenina navyše dokáže okrem cholinergného systému zasiahnuť aj ďalšie receptorové a enzýmové systémy. *In vitro* štúdie preukázali nootropný efekt bis(7)-takrínu v dôsledku antagonizmu receptora pre γ -aminomaslovú kyselinu (GABA_A). Potvrdili tiež inhibíciu serotonínového receptora (5-HT₃), čím sekundárne dochádza k uvoľneniu ACh presynapticky a následnému zlepšeniu pamäťových funkcií. Zlúčenina ďalej dokáže navodiť neuroprotektívny účinok napr. pri ischémii mozgových tkanív.³⁵

Jeho nedostatočná absorpcia a relatívne rýchla metabolizácia sú prekážkou pre ďalšie klinické hodnotenie. Toto liečivo je však zaujímavou predlohou štruktúrou pre celú radu nových zlúčenín s výhodnými vlastnosťami v terapii AD.³⁵



Obrázok 6. Chemická štruktúra bis(7)-takrínu.

V súčasnosti vývoj MTDLs pokročil smerom k novým zlúčeninám. Okrem perspektívnych derivátov takrínu sa ako predlohy látky vo výskume uplatňujú donepezil, huprín (podkapitola 2.5.1), ale aj galantamín a rivastigmín.³⁶

2.5 HUPRÍNY

2.5.1 Charakteristika a vznik

Hupríny sú novodobé ChEI, z hľadiska inhibície enzýmu účinnejšie ako momentálne klinicky schválené terapeutika. Ich vzniku predchádzali znalosti z kryštalografických štúdií, v ktorých sa podrobne skúmala štruktúra aktívneho miesta AChE. Výsledky týchto štúdií ukázali, že THA (podkapitola 2.3.1.1) a prírodná zlúčenina (-)-huperzín A [(-)-HupA] obsadzujú podobné, ale nie totožné miesta AChE. Na základe spomínaných vedeckých poznatkov sa predlohovými molekulami pre dizajn huprínov stali práve THA a (-)-HupA. Spojením daných štruktúr tak vznikla zlúčenina, ktorá sa dokáže lepšie rozložiť v kavite AChE, čím je podporený jej inhibičný potenciál voči enzýmu.^{35,37}

(-)-HupA bol prvýkrát izolovaný v roku 1986 z plavúňa (*Huperzia*, Lycopodiaceae). Tento seskviterpénový alkaloid je silný reverzibilný AChEI, ktorý sa v dnešnej dobe využíva pri liečbe AD v ázijských krajinách [(-)-HupA: AChE IC₅₀ = 260 nM].^{38,39}

V molekule huprínu nájdeme kombináciu 4-aminochinolínovej časti THA a karbocyclického skeletu (-)-HupA.⁴⁰ Štruktúrne fragmenty použité pri dizajne huprínov odvodených z predlohových molekúl zobrazuje Schéma 2.

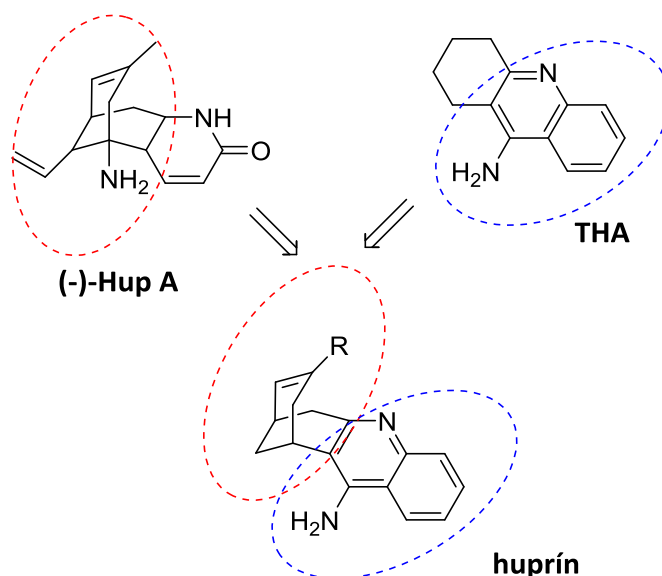


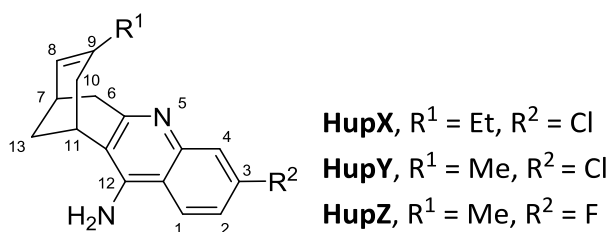
Schéma 2. Štruktúrne fragmenty huprínových derivátov odvodených z predlohových molekúl.

2.5.2 Deriváty huprínov

2.5.2.1 Monomérne deriváty

V posledných rokoch bolo pripravených viac ako 40 rôznych huprínov v racemickej forme. Účelom syntézy bolo dosiahnutie vyššieho inhibičného potenciálu nových zlúčenín v porovnaní so samostatne pôsobiacim THA a/alebo (-)-HupA. Medzi najsľubnejšie novovzniknuté monomérne deriváty patrí huprín Y (HupY, Obrázok 7) a jeho 9-etylový analóg huprín X (HupX, Obrázok 7). Tieto látky sú vysoko selektívne AChEI a vykazujú niekoľkonásobne silnejšiu inhibičnú aktivitu voči AChE než pôvodné molekuly, z ktorých boli navrhnuté (HupY: AChE IC_{50} = 0,78 nM; BChE IC_{50} = 290 nM; SI = 371,8; HupX: AChE IC_{50} = 0,75 nM; BChE IC_{50} = 15,8 nM; SI = 21,1).^{37,41} Výsledky stanovenia priepustnosti pomocou tzv. parallel artificial membrane permeability assay metódy (PAMPA) cez lipidickú membránu ukázali, že tieto novodobé hybridy sú schopné penetrácie do CNS.³⁹

Ďalším pripraveným derivátom bol huprín Z (HupZ, Obrázok 7). Jeho štruktúra obsahuje v polohe C3 menší atóm fluóru. Biologické testy však ukázali, že táto zmena v stavbe molekuly viedla k zníženiu inhibičnej aktivity voči ChEs (HupZ: AChE IC_{50} = 4,58 nM; BChE IC_{50} = 477 nM; SI = 104,15).⁴¹

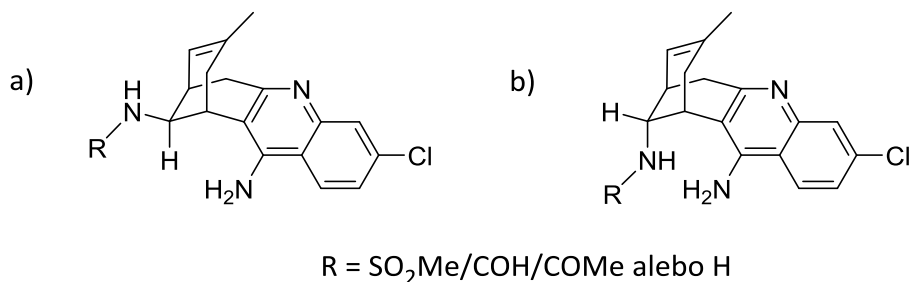


Obrázok 7. Chemická štruktúra huprínu X, Y a Z.

Kvôli získaniu ešte lepších interakčných vlastností voči AChE prebehli snahy o inováciu štruktúry huprínových derivátov. Cieľom modifikácie sa stal metylénový mostík medzi C7 - C11. Zmena mala viesť k tomu, aby nová molekula dokázala obsadiť obidve časti AChE. Prvé takéto pokusy o prestavbu molekuly však zlyhali kvôli stretu nadmerných substituentov situovaných na C13 s AMK zvyškami enzýmu.³⁹

Ďalšou zmenou pri hľadaní účinnejších derivátov bola modifikácia na rovnakom uhlíku (C13), kam bol tentokrát zavedený menší substituent (formamido-, acetamido- alebo metylsulfonylamidoskupina). Vznikla tak nová generácia 13-amidohuprínov v dvoch možných diastereoizomérnych usporiadaniach (Obrázok 8). V konečnom dôsledku však ani jeden

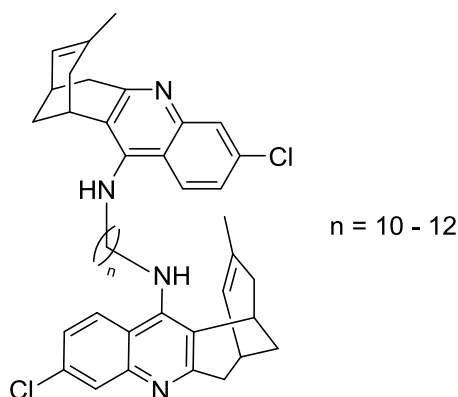
z novopripravených derivátov neprevýšil inhibičnú aktivitu HupY (najúčinnnejšie deriváty mali AChE IC₅₀ v rozmedzí 41 - 98 nM).³⁹



Obrázok 8. Chemická štruktúra 13-amidohupirínov v dvoch stereoizomérnych formách a) a b).

2.5.2.2 Homodimérne a heterodimérne deriváty

Pozornosť syntetických chemikov sa v posledných rokoch zamerala aj na prípravu dimérov HupY a jeho analógov. Zdvojením molekuly materského hupirínu cez uhl'ovodíkový mostík vznikli homodimérne deriváty bis(HupY) (Obrázok 9). Tieto zlúčeniny prejavili tripanocídnu aktivitu (*T. brucei* IC₅₀ = 0,50 μM) a stali sa predlohou štruktúrou pre vývoj ďalších účinnejších liečiv.^{42,43}

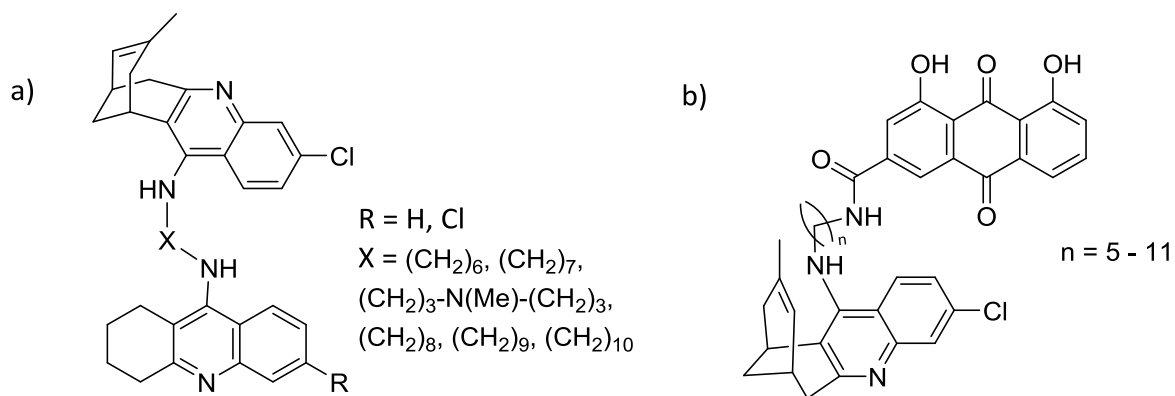


Obrázok 9. Chemická štruktúra homodimérnych derivátov HupY.

Príklady heterodimérnych zlúčenín pozostávajúcich z fragmentov HupY a THA sú znázornené na Obrázku 10 po a. Tieto hupirín-takrínové hybridy preukázali selektívny charakter inhibície AChE (AChE IC₅₀ = 0,31 - 9,09 nM) oproti BChE (BChE IC₅₀ = 24,6 - 139 nM). Okrem toho deriváty 6-chlórtakrínu (6-ClTHA) a HupY vykazovali dobrú inhibičnú aktivitu voči BACE-1 (BACE-1 IC₅₀ = 4,9 μM). Z čoho vyplýva, že tieto zlúčeniny dokážu tlmiť tvorbu Aβ z APP, čím by mohol byť ovplyvnený jeden z hlavných patologických mechamizmov AD.

Väčšina hybridov testovaných pomocou PAMPA dosiahla hodnoty permeability, ktoré naznačujú, že ich prechod cez HEB pomocou pasívnej difúzie je možný.^{36,42} Niektoré huprín-takrínové hybridy tiež preukázali duálnu tripanocídne-antiplasmodiálnu aktivitu (*T. brucei* IC₅₀ = 0,15 - 0,56 µM; najúčinnnejšie deriváty mali hodnoty IC₅₀ voči *P. falciparum* v rozmedzí 0,35 - 0,52 µM) a preto môžu byť okrem terapie AD perspektívnymi zlúčeninami aj pre liečbu malárie a spavej choroby v budúcnosti.⁴²

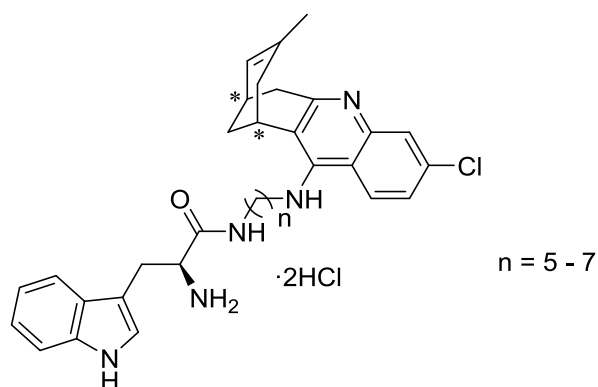
Huprín-rheinové deriváty (Obrázok 10 po b) obsahujú vo svojej štruktúre alkylový reťazec s dĺžkou 5 - 11 uhlíkových atómov. Všetky syntetizované hybridy vykazovali inhibičnú aktivitu smerom k obidvom podtypom ChE a tiež k BACE-1 (AChE IC₅₀ = 1,07 - 3,60 nM; BChE IC₅₀ = 265 - 620 nM; BACE-1 IC₅₀ = 80 - 120 nM). Výsledky merania PAMPA ukázali, že väčšina zlúčenín by mohla prestúpiť cez HEB. Navyše sa uskutočnili testy, pri ktorých sa zistilo, že tieto nové deriváty dokážu znížiť celkovú hladinu rozpustného Aβ.^{36,45}



Obrázok 10. Chemická štruktúra a) huprín-takrínových derivátov, b) huprín-rheinových derivátov.

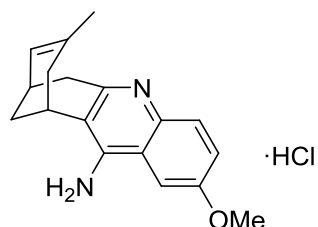
3 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Prvým cieľom diplomovej práce bola syntéza hybridov HupY-L-Trp s rôznou dĺžkou spojovacieho reťazca ($n = 5 - 7$), stanovenie ich inhibičnej aktivity voči ľudským ChEs a experimentálne overenie prechodu pripravených zlúčenín cez biologické membrány vrátane HEB. Chemickú štruktúru syntetizovaných derivátov HupY-L-Trp uvádza Obrázok 11.



Obrázok 11. Chemická štruktúra syntetizovaných derivátov HupY-L-Trp.

Druhým cieľom diplomovej práce bola syntéza 2-metoxyhuprínu, stanovenie jeho inhibičnej aktivity voči ľudským ChEs a experimentálne overenie prechodu pripravenej zlúčeniny cez biologické membrány vrátane HEB. Chemickú štruktúru syntetizovaného 2-metoxyhuprínu uvádza Obrázok 12.



Obrázok 12. Chemická štruktúra syntetizovaného 2-metoxyhuprínu.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 HUPRÍN-TRYPTOFÁNOVÉ DERIVÁTY

4.1.1 Návrh nových štruktúr

Na základe poznatkov zhrnutých v podkapitole 2.5 boli navrhnuté nové zlúčeniny, ktoré by v budúcnosti mohli priaznivo ovplyvniť priebeh AD. Stavebnými jednotkami pre dizajn a následnú syntézu nových huprínových derivátov sa stali HupY (podkapitola 2.5.2.1) a L-tryptofán (L-Trp). HupY bol zvolený pre svoju inhibičnú aktivitu voči AChE a molekula L-Trp kvôli svojim antiagregačným vlastnostiam proti A β . Spomínaným zlúčením vznikli heterodimérne deriváty HupY-L-Trp, v ktorých sú jednotlivé fragmenty prepojené alkylovým reťazcom s dĺžkou 5 až 7 metylénových jednotiek.

L-Trp je aromatická, pre človeka esenciálna AMK. Vo svojej štruktúre obsahuje indol a je východiskovým materiálom pre syntézu iných endogénnych molekúl.^{46,47} Vedecká skupina prof. Scherzer-Attali identifikovala úlohu aromatických zvyškov AMK pri tvorbe a stabilizácii amyloidných štruktúr. Za zvyšok s najväčším amyloidogénnym potenciálom bol označený práve L-Trp. Následne bol vyslovený predpoklad, že zlúčeniny obsahujúce túto AMK, by mohli cielene rozpoznávať aromatické štruktúry, ktoré majú zasiahnuť a tým inhibovať tvorbu A β v postihnutých oblastiach.^{48,49}

Návrh nových MTDLs (HupY-L-Trp) vychádzal z heterodimérov takrín-L-tryptofánu (THA-L-Trp), ktoré sa vyznačujú inhibičným potenciálom voči ChEs a antiagregačným účinkom proti A β . Najsľubnejšou pripravenou zlúčeninou bol derivát **S-K1035**, ktorý preukázal vysokú inhibičnú účinnosť voči AChE a BChE. Okrem toho bola zlúčenina **S-K1035** schopná inhibovať autoagregáciu A β_{42} a tiež AChE indukovanú agregáciu A β_{40} . Za účelom zvýšenia inhibičného potenciálu THA-L-Trp analógov, bol THA-fragment substituovaný za HupY, čím sa dosiahla vyššia inhibičná aktivita voči ChEs. Návrh vzniku hybridov HupY-L-Trp z predlohouvých molekúl zobrazuje Schéma 3.

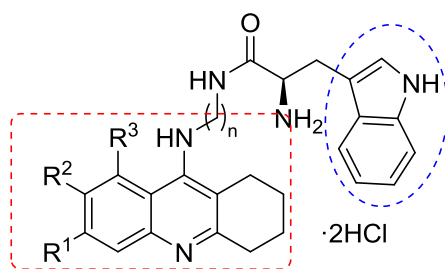
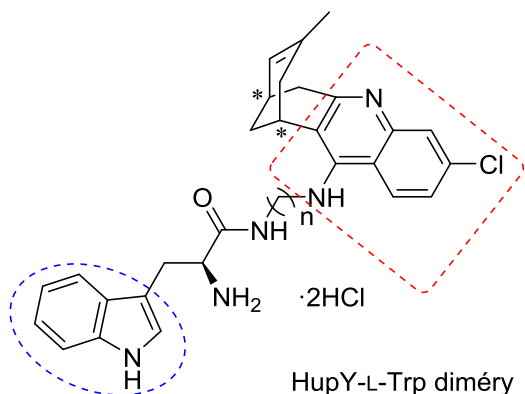
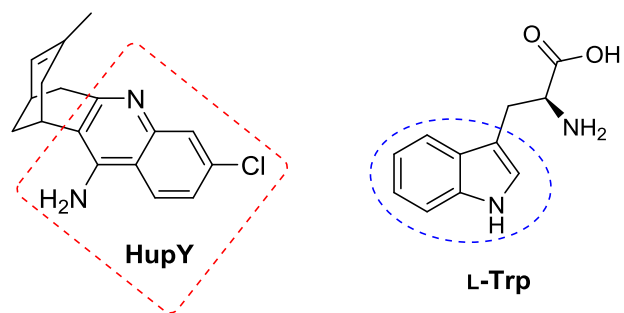


Schéma 3. Návrh vzniku heterodimérnych derivátov odvodených od HupY v spojení s L-Trp.

4.1.2 Syntetická časť v rámci prípravy derivátov HupY-L-Trp

4.1.2.1 Všeobecná syntetická časť

Všetky chemikálie použité pri syntéze boli najvyššej dostupnej čistoty (bez ďalšej úpravy) a dodané firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Reakcie boli monitorované pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) na hliníkových platničkách potiahnutých silikagélom 60 F254 (Merck, Praha, Česká republika). Výsledné škvrny boli vizualizované postrekom roztoku *p*-anizaldehydu s následným zahrievaním alebo ultrafialovým svetlom (254 nm). Pri čistení surových produktov stĺpcovou chromatografiou bol použitý silikagél 100; 0,063 - 0,200 mm s porozitou 70 - 230 ASTM (Fluka, Praha, Česká republika). Reakcie sprostredkované mikrovlnami boli uskutočnené za použitia mikrovlnného reaktora Discover SP zameraného na CEM.

^1H NMR a ^{13}C NMR spektrá boli zaznamenané v deuterovanom chloroforme (CDCl_3), deuterovanom metanole (CD_3OD) alebo v deuterovanom dimetylsulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) na spektrometri Varian S500. Chemické posuny δ sú udané v ppm a multiplicitné spiny sú uvedené ako singlet (s), rozsiahly singlet (bs), dublet (d), dublet dubletu (dd), dublet tripletu (dt), dublet dubletu dubletov (ddd) alebo multipliet (m). Interakčné konštanty (J) sú udané v Hz. Priradenie chemických posunov je založené na štandardných NMR experimentoch (^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, HMBC). Teploty topenia boli stanovené pomocou prístroja M-565 (Büchi, Švajčiarsko) a sú nekorigované. Hmotnostné spektrá s vysokým rozlíšením syntetizovaných zlúčenín boli analyzované pomocou systému LC-MS pozostávajúceho z UHPLC Dionex Ultimate 3000 a hmotnostného spektrometra Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Nemecko). Čistota látok bola vyššia než 95% (nekalibrovaná HPLC čistota).

4.1.2.2 Syntéza intermediátov a cieľových zlúčenín

3,7-dichlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2,4,6,8,10,14-hexén [(±)-3]

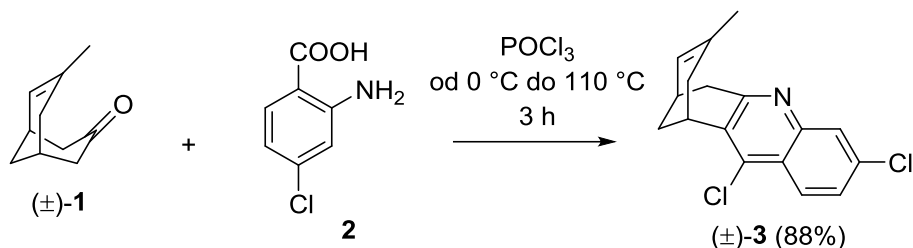


Schéma 4. Príprava intermediátu (±)-3.

K východiskovej látke (±)-1 (7-metylbicyklo[3.3.1]non-6-én-3-ón; 2045 mg; 13,61 mmol) bola pridaná látka **2** (2-amino-4-chlórbenzoová kyselina; 13,61 mmol). Následne bol za chladenia pridaný POCl₃ (136,1 mmol). Zmes bola miešaná 3 hodiny pri 100 °C pod spätným chladičom. Po ukončení reakcie bol výsledný roztok vliaty do zmesi nasýteného roztoku NH₃ a ľadu. Vodná fáza bola premytá s CH₂Cl₂ (3 × 100 ml). Organická fáza bola vysušená (Na₂SO₄) a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Surový produkt (±)-**3** bol čistený stĺpcovou chromatografiou (mobilná fáza - PE:EtOAc - 4:1; Schéma 4).

M.w.: 304,21 g/mol

Výťažok: 88%

¹H NMR (CDCl₃): δ 8,12 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H); 7,97 (d; *J* = 2,1 Hz; 1H); 7,48 (dd; *J* = 9,0; 2,1 Hz; 1H); 5,54 (d; *J* = 4,4 Hz; 1H); 3,75 (m; 1H); 3,19 (dd; *J* = 17,7; 5,4 Hz; 1H); 3,10 (dt; *J* = 17,0; 2,0 Hz; 1H); 2,79 (m; 1H); 2,55 (dd; *J* = 17,7; 5,8 Hz; 1H); 2,05 - 2,08 (m; 2H); 1,93 - 1,98 (m; 1H); 1,53 (s; 3H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 160,2; 147,4; 140,8; 135,2; 133,6; 132,7; 127,5; 127,4; 125,5; 125,0; 124,1; 40,4; 37,0; 30,7; 28,6; 28,3; 23,3.

HRMS [M+H]⁺: 281,1623 (vypočítané pre [C₁₈H₂₁N₂O]⁺: 281,1609).

***N*¹-{7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2,4,6,8,10,14-hexén-3-yl}alkán-1,5-diamíny [(±)-5-7]**

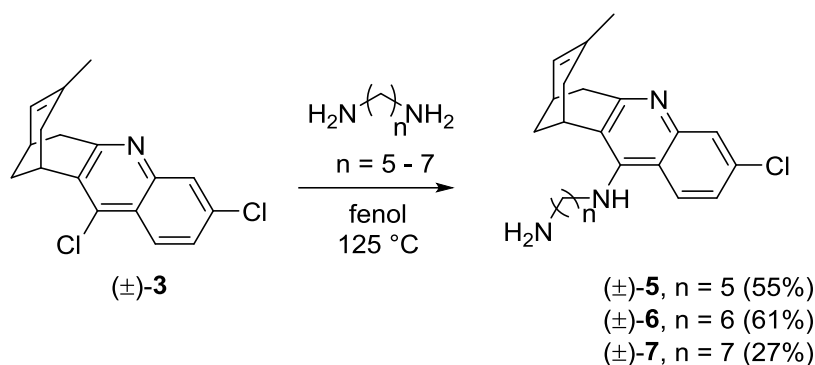


Schéma 5. Príprava intermediátov (±)-5-7 s rôznou dĺžkou spojovacieho reťazca.

Do banky bola navážená východisková látka (±)-3 (800 mg; 2,63 mmol) a fenol (23,67 mmol). Suspenzia sa nechala miešať asi 5 minút pri 85 °C za vzniku homogénnej zmesi. K vzniknutému roztoku bola pridaná prvá časť α,ω -diaminoalkánu (5,26 mmol) a táto zmes bola miešaná pri 125 °C pod spätným chladičom. Po 1 hodine bol pridaný ďalší podiel α,ω -diaminoalkánu (5,26 mmol) a zahrievanie pokračovalo ďalšie 3 hodiny. Po ukončení reakcie bola zmes zriedená s CH₂Cl₂ (50 ml) a premytá vodným roztokom 2 M NaOH (50 ml). Organická fáza bola premytá s H₂O (20 ml) a nasýteným roztokom NaCl (20 ml), následne bola vysušená (Na₂SO₄) a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Surový produkt reakcie (±)-5-7 bol chromatograficky čistnený (mobilná fáza - EtOAc:MeOH:NH₃ - 8:1:0,2; Schéma 5).

***N*¹-{7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2,4,6,8,10,14-hexén-3-yl}pentán-1,5-diamín [(±)-5]**

M.w.: 369,94 g/mol

Výtěžok: 55%

hnedý olej

¹H NMR (CDCl₃): δ 7,92 (d; *J* = 9,1 Hz; 1H); 7,87 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,27 (dd; *J* = 9,1; 2,2 Hz; 1H); 5,54 (d; *J* = 5,5 Hz; 1H); 4,00 (bs; 1H); 3,44 - 3,50 (m; 2H); 3,29 - 3,31 (m; 1H); 3,14 (dd; *J* = 17,5; 5,6 Hz; 1H); 2,99 (dt; *J* = 17,5; 1,9 Hz; 1H); 2,73 - 2,76 (m; 3H); 2,45 - 2,55 (m; 5H); 2,02 - 2,06 (m; 1H); 1,90 - 1,94 (m; 1H); 1,80 (d; *J* = 17,0 Hz; 1H); 1,70 - 1,75 (m; 2H); 1,43 - 1,60 (m; 5H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 158,4; 150,3; 148,4; 134,0; 131,6; 127,4; 125,5; 125,4; 124,2; 121,2; 119,0; 50,4; 41,7; 39,9; 37,0; 32,7; 31,5; 29,1; 28,2; 27,5; 24,2; 23,6.

HRMS [M+H]⁺: 371,1968 (vypočítané pre [C₂₂H₂₈ClN₃]⁺: 371,1942).

***N*¹-{7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2,4,6,8,10,14-hexén-3-yl}hexán-1,6-diamín [(±)-6]**

M.w.: 383, 96 g/mol

Výtěžok: 61%

hnedý olej

¹H NMR (CDCl₃): δ 7,93 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H); 7,87 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,27 (dd; *J* = 9,0; 2,2 Hz; 1H); 5,53 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 4,01 (bs; 1H); 3,42 - 3,51 (m; 2H); 3,28 - 3,30 (m; 1H); 3,14 (dd; *J* = 17,5; 5,6 Hz; 1H); 2,99 (dt; *J* = 17,5; 2,0 Hz; 1H); 2,73 (t; *J* = 7,1 Hz; 2H); 2,64 - 2,70 (m; 4H); 2,53 (dd; *J* = 16,8; 5,2 Hz; 1H); 2,02 - 2,06 (m; 2H); 1,90 - 1,94 (m; 1H); 1,80 (d; *J* = 17,0 Hz; 1H); 1,67 - 1,75 (m; 2H); 1,49 - 1,53 (m; 5H); 1,37 - 1,46 (m; 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 158,4; 150,3; 148,4; 134,0; 131,6; 127,4; 125,4; 125,4; 124,2; 121,1; 119,0; 50,4; 41,6; 39,8; 36,9; 32,6; 31,6; 29,1; 28,2; 27,5; 26,7; 26,6; 23,3.

HRMS [M+H]⁺: 385,2121 (vypočítané pre [C₂₃H₃₀ClN₃]⁺: 385,2099).

***N*¹-{7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2,4,6,8,10,14-hexén-3-yl}heptán-1,7-diamín [(±)-7]**

M.w.: 397,99 g/mol

Výtěžok: 27%

hnedý olej

¹H NMR (CDCl₃): δ 7,95 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H); 7,90 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,27 (dd, *J* = 9,0; 2,2 Hz; 1H); 5,53 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 4,25 (bs; 1H); 3,43 - 3,52 (m; 2H); 3,29 - 3,31 (m; 1H); 3,15 (dd; *J* = 17,6; 5,6 Hz; 1H); 3,01 (dt; *J* = 17,6; 1,9 Hz; 1H); 2,83 - 2,86 (m; 2H); 2,73 (bs; 1H); 2,53 (dd; *J* = 17,4; 5,4 Hz; 1H); 2,02 - 2,06 (m; 1H); 1,90 - 1,93 (m; 1H); 1,81 (d; *J* = 17,0 Hz; 1H); 1,55 - 1,74 (m; 6H); 1,51 (s; 3H); 1,34 - 1,43 (m; 6H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 157,8; 150,7; 147,7; 134,4; 131,8; 126,7; 125,6; 125,4; 124,3; 120,7; 118,7; 50,3; 40,8; 39,5; 36,9; 31,5; 30,1; 29,1; 28,9; 28,1; 27,4; 26,7; 26,5; 23,4.

HRMS [M+H]⁺: 399,2290 (vypočítané pre [C₂₄H₃₂ClN₃]⁺: 399,2255).

(2*S*)-2-amino-*N*-[5-(7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}])heptadeka-2(11),3,5,7,9,14-hexén-3-yl]amino)alkyl]-3-(1*H*-indol-3-yl)propánamid dihydrochloridy [8-10·2HCl]

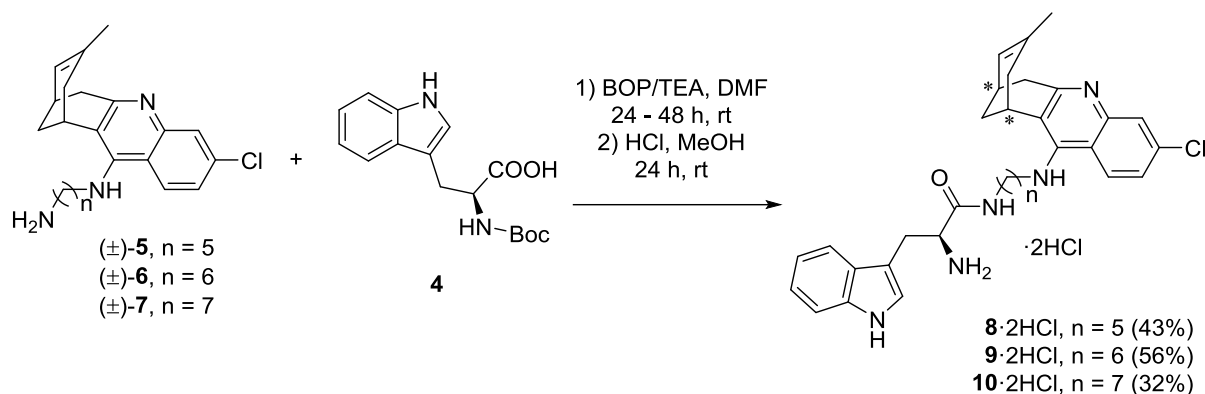


Schéma 6. Syntéza finálnych zlúčenín **8-10·2HCl**.

K roztoku komerčne dostupného tryptofánového derivátu **4** (*N*-[(*tert*-butoxy)karbonyl]-*L*-tryptofán; Merck, Praha, Česká republika; 190,9 mg; 0,627 mmol) v DMF (~ 3,8 ml) bol pridaný TEA (1,88 mmol) a zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote (rt). Po 30 minútach bol do banky pridaný BOP [(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimetylamino)fosfónium hexafluórfosfát; 0,627 mmol] a po ďalšej hodine roztok východiskovej látky (±)-**5-7** (0,627 mmol) v DMF (~ 3,8 ml). Zmes bola miešaná 24 - 48 hodín pri rt. Po ukončení reakcie bola zmes zriedená s EtOAc (30 ml) a premytá s H₂O (25 ml). Vodná fáza bola následne premytá s ďalším podielom EtOAc (2× 30 ml). Organická fáza bola vysušená (Na₂SO₄) a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Surový produkt reakcie **8-10** bol čistený stĺpcovou chromatografiou (mobilná fáza - CHCl₃:MeOH - 20:1). Príslušný amid sa ďalej rozpustil v MeOH a k vzniknutej zmesi bol pridaný vodný roztok 4 M HCl. Reakčná zmes sa miešala pri rt 24 hodín. Všetky rozpúšťadlá boli odparené pod zníženým tlakom, čím sa získal finálny produkt vo forme dihydrochloridu (**8-10·2HCl**; Schéma 6).

(2*S*)-2-amino-*N*-[5-({7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]}heptadeka-2(11),3,5,7,9,14-hexén-3-yl}amino)pentyl]-3-(1*H*-indol-3-yl)propánamid dihydrochlorid [8·2HCl]

M.w.: 629,07 g/mol

Výtěžok: 43%

biela amorfná látka

¹H NMR (CDCl₃): δ 8,36 (d; *J* = 9,2 Hz; 1H); 7,77 - 7,78 (m; 1H); 7,60 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H); 7,55 (dd, *J* = 9,2; 1,9 Hz; 1H); 7,33 (t; *J* = 8,1 Hz; 1H); 7,22 (d; *J* = 4,3 Hz; 1H); 7,03 - 7,07 (m; 1H); 6,97- 7,01 (m; 1H); 5,57 - 5,58 (m; 1H); 4,09 (t; *J* = 7,3 Hz; 1H); 3,88 - 3,92 (m; 2H); 3,46 - 3,47 (m; 1H); 3,33 - 3,36 (m; 1H); 3,16 - 3,27 (m; 3H); 3,04 - 3,10 (m; 1H); 2,84 - 2,89 (m; 1H); 2,74 - 2,75 (m; 1H); 2,57 (m; 1H); 2,06 - 2,08 (m; 1H); 1,90 - 1,80 (m; 2H); 1,77 - 1,80 (m; 2H); 1,59 (s; 3H; CH₃); 1,34 - 1,41 (m; 2H); 1,25 - 1,31 (m; 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 168,6; 155,4; 149,8; 139,5; 138,8; 136,7; 133,2; 128,0; 127,0; 125,4; 124,2; 123,7; 121,3; 118,7; 117,9; 117,7; 116,2; 114,2; 111,1; 106,8; 53,9; 48,1; 39,0; 34,8; 34,7; 29,5; 28,1; 27,9; 27,5; 26,4; 25,9; 23,6; 22,1.

HRMS [M+H]⁺: 556,2840 (vypočítané pre [C₃₃H₃₈ClN₅O]⁺: 556,2798).

(2*S*)-2-amino-*N*-[6-(*{*7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]}heptadeka-2(11),3,5,7,9,14-hexén-3-yl}amino)hexyl]-3-(1*H*-indol-3-yl)propánamid dihydrochlorid [9·2HCl]

M.w.: 643,1 g/mol

Výtěžok: 56%

biela amorfná látka

¹H NMR (CD₃OD): δ 8,37 (dd; *J* = 9,3; 1,3 Hz; 1H); 7,76 (dd; *J* = 3,4; 2,1 Hz; 1H); 7,60 (dt; *J* = 7,9; 1,0 Hz; 1H); 7,54 (dd; *J* = 9,3; 2,2 Hz; 1H); 7,35 (dt; *J* = 8,1; 0,9 Hz; 1H); 7,21 (d; *J* = 2,5 Hz; 1H); 7,07 (ddd; *J* = 8,0; 6,9; 1,1 Hz; 1H); 5,59 (d; *J* = 5,7 Hz; 1H); 4,08 (td; *J* = 7,4; 1,5 Hz; 1H); 3,91 - 3,98 (m; 2H); 3,45 - 3,47 (m; 1H); 3,34 (m; 1H); 3,21 (m; 3H); 3,05 (dt; *J* = 13,3; 6,9 Hz; 1H); 2,88 (d; *J* = 17,6 Hz; 1H); 2,75 - 2,76 (m; 1H); 2,56 (dd; *J* = 17,2; 5,9 Hz; 1H); 2,05 - 2,09 (m; 1H); 1,90 - 1,95 (m; 2H); 1,78 - 1,86 (m; 2H; 2×H); 1,58 (s; 3H; CH₃); 1,31 (m; 6H; 2×H; 2×H; 2×H).

¹³C NMR (CD₃OD): δ 168,5; 155,4; 149,8; 139,5; 138,8; 136,7; 133,1; 128,0; 127,0; 125,3; 124,1; 123,7; 121,3; 118,7; 117,8; 117,7; 116,2; 114,2; 111,1; 106,7; 53,8; 48,3; 39,1; 24,7; 34,6; 29,7; 28,4; 27,9; 27,5; 26,4; 26,0; 25,9; 25,9; 22,1.

HRMS [M+H]⁺: 570,2996 (vypočítané pre [C₃₄H₄₀ClN₅O]⁺: 570,2955).

(2*S*)-2-amino-*N*-[7-({7-chlór-15-metyltetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]}heptadeka-2(11),3,5,7,9,14-hexén-3-yl}amino)heptyl]-3-(1*H*-indol-3-yl)propánamid dihydrochlorid [10·2HCl]

M.w.: 657,13 g/mol

Výtěžok: 32%

biela amorfná látka

¹H NMR (CDCl₃): δ 8,39 (d; *J* = 9,3 Hz; 1H); 7,78 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,61 (dq; *J* = 7,9; 1,1 Hz; 1H); 7,55 (dd; *J* = 9,3; 2,2 Hz; 1H); 7,35 - 7,37 (m; 1H); 7,21 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H); 7,09 (dddd; *J* = 8,2; 7,0; 2,6; 1,2 Hz; 1H); 7,02 (ddd; *J* = 8,1; 6,9; 1,1 Hz; 1H); 5,58 (d; *J* = 5,58 Hz; 1H); 4,06 - 4,09 (m; 1H); 3,92 - 4,00 (m; 2H); 3,45-3,46 (m; 1H); 3,32 - 3,36 (m; 1H); 3,14 - 3,28 (m; 3H); 3,04 (dt, *J* = 13,6; 7,0 Hz; 1H); 2,85 - 2,89 (m; 1H); 2,76 (m; 1H); 2,53 - 2,57 (m; 1H); 2,02 - 2,09 (m; 1H); 1,80 - 1,94 (m; 4H); 1,58 (s; 3H); 1,29 - 1,42 (m; 6H); 1,17 - 1,21 (m; 2H).

¹³C NMR (CDCl₃): δ 168,5; 155,4; 149,8; 139,6; 138,8; 136,8; 133,1; 128,0; 127,0; 125,3; 124,1; 123,7; 121,4; 118,8; 117,8; 117,8; 116,2; 114,2; 111,1; 106,7; 53,8; 48,2; 39,2; 34,7; 34,6; 29,8; 28,4; 27,9; 27,5; 26,4; 26,3; 25,9; 22,1.

HRMS [M+H]⁺: 584,3153 (vypočítané pre [C₃₅H₄₂ClN₅O]⁺: 584,3111).

4.1.3 Biologické testovanie derivátov HupY-L-Trp

4.1.3.1 Inhibičná aktivita voči AChE/BChE - Princíp a postup merania

Schopnosť látok inhibovať ChEs bola stanovená pomocou Ellmanovej metódy a vyjadrená ako hodnota IC₅₀. Ľudská rekombinantná AChE (AChE; EC 3.1.1.7), ľudská plazmatická BChE (BChE; EC 3.1.1.8), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB, Ellmanovo činidlo), fosfátový pufer (PBS, pH = 7,4); acetylthiocholín (ATCh) a butyrylthiocholín (BTCh) boli dodané firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

Princíp metódy je založený na hydrolýze ATCh alebo BTCh jednotlivými ChE za vzniku thiocholínu a kyseliny octovej. Thiocholín ďalej reaguje s DTNB za vzniku iónu kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoovej (žlté sfarbenie), ktorý je stanovený spektrofotometricky (Schéma 7).⁵⁰

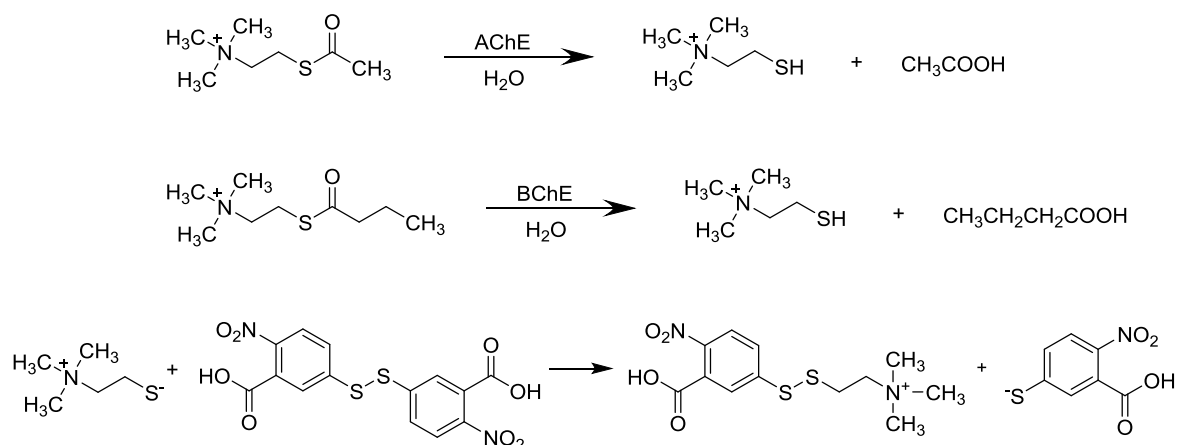


Schéma 7. Schéma hydrolýzy acetylthiocholínu a butyrylthiocholínu príslušnou ChE za vzniku thiocholínu a jeho následná reakcia s kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou za uvoľnenia iónu 5-thio-2-nitrobenzoovej kyseliny.

Pri meraní boli použité polystyrénové 96-jamkové Nunc mikrodôštičky s plochým dnom (Thermo Fisher, USA). Všetky merania prebehli v 0,1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄ pufré (pH = 7,4). Enzým bol pripravený s koncentráciou 2,0 U/ml a rozpipetovaný po 2 ml. Reakčná zmes bola zložená zo 40 μl 0,1 M PBS, 20 μl DTNB, 10 μl enzýmu a 20 μl substrátu. Inhibítor (10⁻³-10⁻⁹ M) bol pridaný 5 minút pred zahájením Ellmanovej reakcie. Aktivita enzýmu bola meraná pri 412 nm a 37 °C po dobu 2 minút na multifunkčnom spektrofotometri Synergy 2 (Vermont, USA). Každá koncentrácia bola meraná v troch nezávislých meraniach. Štatistické vyhodnotenie prebehlo pomocou softvéru GraphPad Prism 5 (San Diego, USA).

Tieto biologické merania vykonali pracovníci Katedry toxikológie a vojenskej farmácie v Hradci Králové (Fakulta vojenského zdravotníctva, Univerzita obrany, Brno).

4.1.3.2 Inhibičná aktivita voči AChE/BChE - Výsledky merania

Pre každú zlúčeninu boli vykonané tri nezávislé merania inhibičnej aktivity a výsledky sú vyjadrené ako ich priemerné hodnoty \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Ďalej bol vypočítaný index selektivity ($SI = IC_{50} \text{ hBChE} / IC_{50} \text{ hAChE}$). Výsledky biologických meraní sú zhrnuté v Tabuľke 1.

Zlúčenina	$IC_{50} \pm SEM$ (nM)		SI ($IC_{50} \text{ hBChE} / IC_{50} \text{ hAChE}$)
	<i>hAChE</i>	<i>hBChE</i>	
8 ·2HCl	22,7 \pm 0,7	68,3 \pm 2,2	3,01
9 ·2HCl	11,7 \pm 0,5	45,7 \pm 1,9	3,91
10 ·2HCl	12,1 \pm 0,8	84,5 \pm 4,3	6,98
THA	320 \pm 1,3	80 \pm 0,1	0,25
6-CITHA	20,0 \pm 1	1780 \pm 97	89
7-MEOTA	10000 \pm 974	17560 \pm 795	1,76

Tabuľka 1. Inhibičná aktivita zlúčenín **8-10**·2HCl a referenčných zlúčenín pre ľudskú AChE (*hAChE*) a ľudskú BChE (*hBChE*) vyjadrené ako hodnoty IC_{50} (dáta k referenčným zlúčeninám prevzaté z citácie 51).⁵¹

4.1.3.3 Stanovenie miery penetrácie do CNS - princíp a postup stanovenia

Predpoklad prechodu látok cez HEB bol stanovený pomocou PAMPA testu. Na dané meranie bola použitá aparátúra zložená z 96-jamkovej donorovej a 96-jamkovej akceptorovej platničky.

Podrobný postup merania:

- 1) do donorovej platničky, ktorá obsahuje PVDF (polyvinylidén fluorid) membránový filter, boli nanesené 4 μL BPL (β -propiolaktón rozpustený v dodekáne s koncentráciou 20 mg/mL);
- 2) akceptorová PTFE (polytetrafluóretylén) platnička bola naplnená samotným PBS (pH = 7,4; 300 μL , V_a);
- 3) do jamiek donorovej platne bolo napipetovaných 300 μL testovanej látky (V_d) v štyroch replikátoch pre štyri časové intervaly následnej inkubácie. Látky boli testované pri 30 - 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$;
- 4) donorová platnička bola opatrne položená na akceptorovú;
- 5) aparátúra bola umiestnená do tmy a ponechaná na inkubáciu pri rt. Následne bol zaznamenaný čas a pomocou pasívnej difúzie sa stanovil potenciál priestupnosti, pričom testované látky difundovali z donorovej jamky cez lipidovú membránu o ploche 0,28 cm^2 do akceptorovej jamky;
- 6) koncentrácia danej látky v donorovej a akceptorovej jamke bola hodnotená po 3, 4, 5 a 6 hodinách inkubácie meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky použitím spektrofotometra;
- 7) taktiež boli pripravené roztoky daných látok s tzv. teoretickou koncentráciou, pri ktorej sa predpokladá spojenie roztokov z donorovej a akceptorovej jamky (teoretická rovnováha, equilibrium);
- 8) koncentrácie látok v donorovej a akceptorovej jamke a taktiež teoretická koncentrácia boli vypočítané použitím rovnice regresie získanej z kalibračných kriviek;
- 9) následne boli vypočítané hodnoty permeačného koeficientu P_e pre každý časový bod a z aritmetického priemeru kvadruplikátu bola stanovená jeho výsledná hodnota, na základe ktorej bol určený predpoklad priepustnosti látky cez HEB;
- 10) počas celého pokusu bola premeriavaná aj koncentrácia zásobných roztokov testovaných látok (100 μM), čím bola sledovaná ich stabilita a prípadné zrážanie v rozpúšťadle.

Výpočet P_e bol uskutočnený podľa rovnice:

$$\log Pe = \log \left[C \times -\ln \left(1 - \frac{[látka]_{akceptor}}{[látka]_{equilibrium}} \right) \right]$$

$$C = \frac{V_d \times V_a}{(V_d + V_a) \times a \times t}$$

V_d je objem v donorovej jamke (300 μ L), V_a je objem v akceptorovej jamke (300 μ L), a je plocha jamky (0,28 cm^2), t je čas merania v sekundách, $[látka]_{akceptor}$ je koncentrácia látky v akceptorovej jamke a $[látka]_{equilibrium}$ je koncentrácia látky v teoretickej rovnováhe.⁵²

Toto biologické stanovenie vykonali pracovníci Centra biomedicínskeho výskumu (Fakultná nemocnica Hradec Králové).

4.1.3.3 Stanovenie miery penetrácie do CNS - výsledky stanovenia

Pre každú zlúčeninu boli vykonané tri nezávislé merania PAMPA a výsledky sú vyjadrené ako ich priemerné hodnoty \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Ďalej bola zhodnotená miera prestupu cez HEB. Výsledky biologických meraní sú zhrnuté v Tabuľke 2.

Zlúčenina	Odhad permeácie cez HEB	
	$P_e \pm \text{SEM} (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})$	CNS (+/-)
8·2HCl	5,6 \pm 0,56	CNS+
9·2HCl	5,01 \pm 0,56	CNS+
10·2HCl	5,1 \pm 0,21	CNS+
THA	3,75 \pm 0,49	CNS+
Donepezil	7,3 \pm 0,9	CNS+
Chlorpromazín	5,1 \pm 0,3	CNS+
Rivastigmín	6,6 \pm 0,5	CNS+
Cefuroxím	2,70 \pm 0,1	CNS-
Piroxikam	2,20 \pm 0,15	CNS-
Chlorothiazid	0,13 \pm 0,02	CNS-

Tabuľka 2. Predpoklad prechodu zlúčenín 8-10·2HCl cez HEB a niektoré ďalšie pozitívne/negatívne štandardy vyjadrené ako hodnoty P_e . CNS+ (vysoká pravdepodobnosť prieniku pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}) > 4,0$; CNS- (nízka pravdepodobnosť prieniku pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}) < 2,0$; CNS +/- (neurčitý prienik pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})$ od 4,0 do 2,0 (dáta k štandardom prevzaté z citácie 51).

4.2 2-METOXYHUPRÍN

4.2.1 Návrh 2-metoxyhuprínu

Ako už bolo načrtnuté v podkapitole 2.5, dá sa predpokladať, že huprínové deriváty by mohli komplexnejšie zasiahnuť aktívne miesto AChE, čím by bola vystupňovaná ich inhibičná aktivita voči danému enzýmu.

Za základné stavebné jednotky pre dizajn a následnú syntézu nového huprínu boli zvolené HupY (podkapitola 2.5.2.1) a 7-MEOTA. HupY je pre tento návrh kľúčovou molekulou z hľadiska vysokej selektivity voči AChE.⁴⁰

Predlohovou štruktúrou 7-MEOTA bola molekula THA, ktorý je relatívne toxický a vykazuje vysokú selektivitu voči BChE. Jeho analóg 7-MEOTA je však neselektívny inhibítor ChEs s potlačenou hepatotoxicitou. Tieto odlišné vlastnosti daných derivátov môžu byť pripísané faktu, že sú v organizme metabolizované rozličnou cestou.⁴⁰

Spojením daných predlohových molekúl bol vytvorený základ pre dizajn 2-metoxyhuprínu, ktorý zobrazuje Schéma 8.

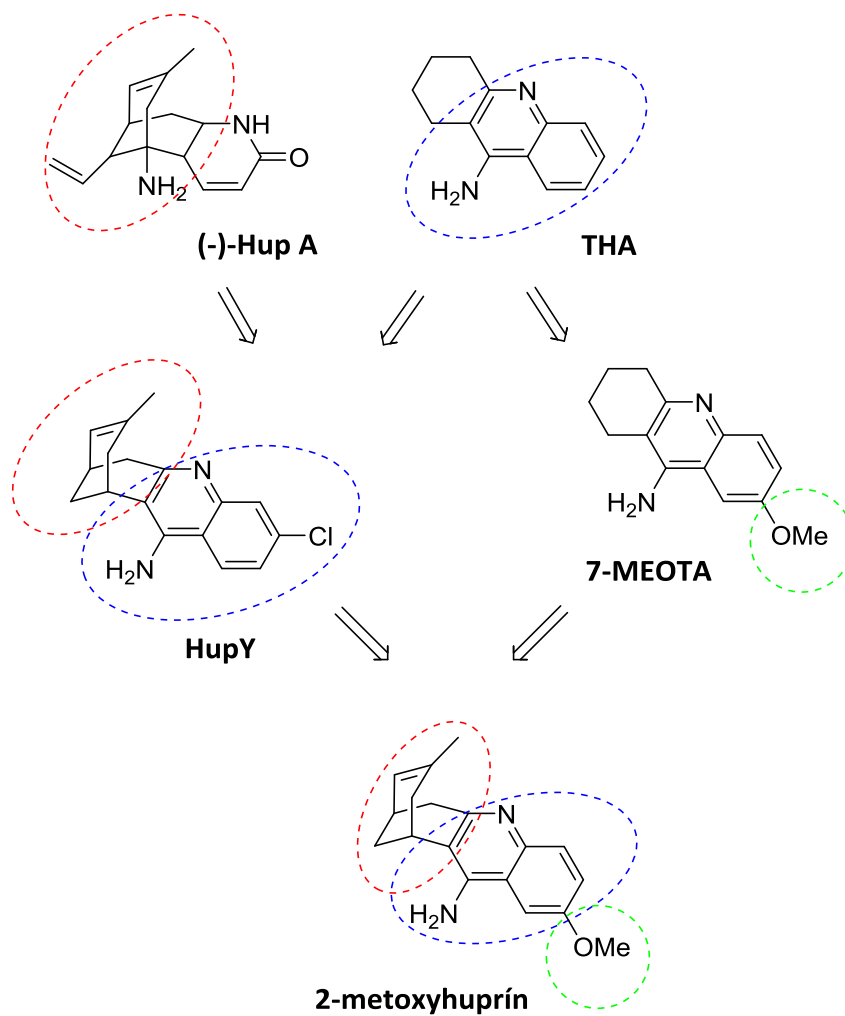


Schéma 8. Návrh vzniku 2-metoxyhuprínu z predlohových molekúl.

4.2.2 Syntetická časť v rámci prípravy 2-metoxyhuprínu

4.2.2.1 Syntéza intermediátov a cieľovej zlúčeniny

7-metylénbicyklo[3.3.1]nonán-3-ón [13]

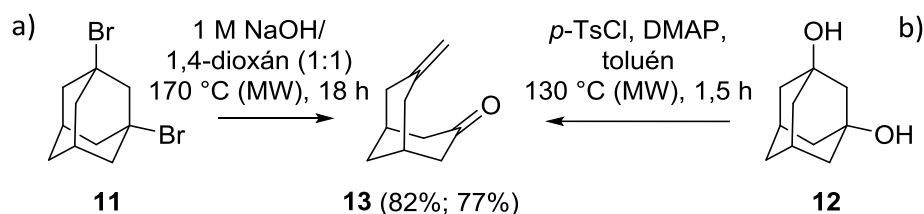


Schéma 9. Príprava ketónu **13**.

a) Suspenzia východiskovej látky **11** (1,3-dibrómadamantán; 200 mg; 0,68 mmol) v zmesi 1 M NaOH/1,4-dioxán (~ 4,2 ml; 1:1) bola za mikrovlnného ohrevu (MW - 50 W, 300 psi, intenzívne miešanie) miešaná 18 hodín pri 175 °C. Po ukončení reakcie bol výsledný roztok zriedený s EtOAc (8 ml) a premytý s H₂O (4 ml). Vodná fáza bola následne opäť premytá s ďalším podielom EtOAc (8 ml). Organická fáza bola vysušená (Na₂SO₄) a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Surový produkt **13** bol čistený stĺpcovou chromatografiou (mobilná fáza - PE:EtOAc - 4:1; Schéma 9).

Výtťažok: 82%

biela kryštalická látka

Hodnoty ¹H a ¹³C NMR spektier sa zhodovali s dostupnými údajmi z literatúry.⁴⁰

b) Suspenzia východiskovej látky **12** (1,3-adamantándiol; 250 mg; 1,49 mmol), *p*-TsCl (708 mg; 3,74 mmol) a DMAP (454 mg; 3,74 mmol) v suchom toluéne (~ 5,4 ml) bola miešaná 1,5 hodiny pri 130 °C v mikrovlnnom reaktore (MW - 50 W, 300 psi, intenzívne miešanie). Surová reakčná zmes bola odfiltrovaná a filtrát bol zahustený odparením pod zníženým tlakom. Surový produkt **13** bol čistený stĺpcovou chromatografiou (mobilná fáza - PE:EtOAc - 4:1; Schéma 9).

Výtťažok: 77%

Hodnoty ¹H a ¹³C NMR spektier sa zhodovali s dostupnými údajmi z literatúry.⁴⁰

***rac*-6-metoxy-15-metyl-10-azatetracyklo[11.3.1.0^{2,11}.0^{4,9}]heptadeka-2(11),3,5,7,9,14-hexén-3-amín hydrochlorid [(±)-15·HCl]**

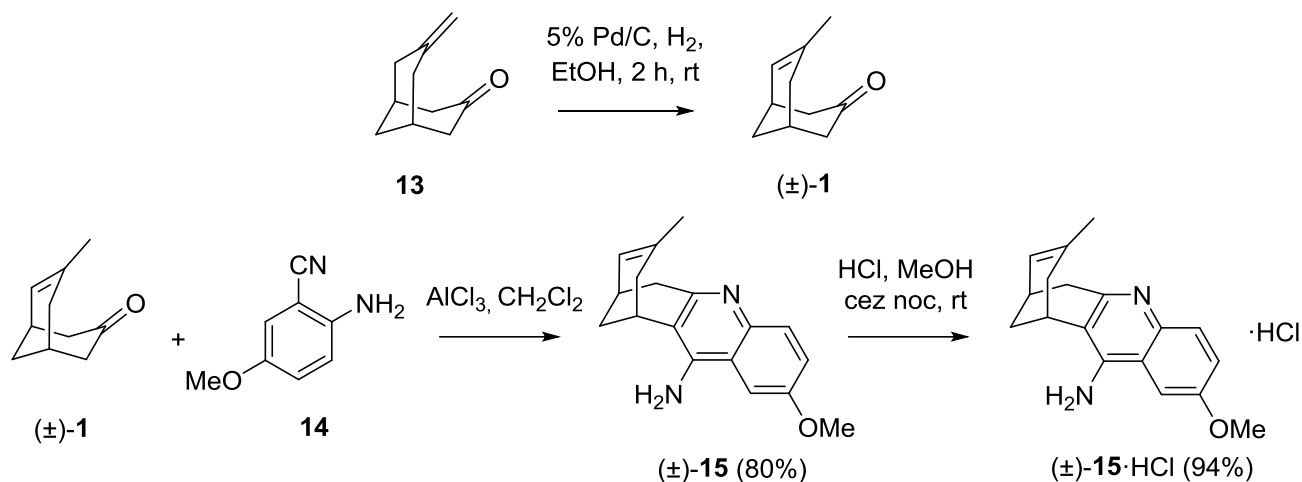


Schéma 10. Príprava intermediátu **(±)-1** a syntéza zlúčeniny **(±)-15** s následným pokračovaním reakcie až k finálnemu produktu **(±)-15·HCl**.

K roztoku východiskovej látky **13** (108 mg; 0,72 mmol) v absolútnom EtOH (~ 2,2 ml) bolo pridané 5% Pd/C (20 mg). Reakčná zmes bola miešaná 2 hodiny pri rt vo vodíkovej atmosfére. Po ukončení reakcie sa katalyzátor odfiltroval a filtrát bol zahustený odparením pod zníženým tlakom. Surový produkt reakcie **(±)-1** (7-metylbicyklo[3.3.1]non-6-én-3-ón) bol použitý pre ďalší krok syntézy bez akejkoľvek purifikácie (Schéma 10).

Hodnoty ¹H a ¹³C NMR spektier sa zhodovali s dostupnými údajmi z literatúry.⁴⁰

K roztoku zlúčeniny **(±)-1** (92 mg; 0,615 mmol) v CH₂Cl₂ (~ 1 ml) bol ďalej pridaný bezvodý AlCl₃ (126,5 mg; 0,95 mmol) a nitril **14** (2-amino-5-metoxybenzonitril; 121 mg; 0,79 mmol). Reakčná zmes bola v mikrovlnnom reaktore miešaná 2 hodiny pri 95 °C (MW - 50 W, 300 psi, intenzívne miešanie). Po ukončení reakcie bola pridaná zmes THF/H₂O (~ 7,5 ml; 2:1). Na úpravu pH (8 - 9) bol k zmesi následne pridaný vodný roztok 2 M NaOH. Výsledná zmes sa miešala ďalších 30 minút. Organická a vodná fáza boli oddelené, vodná fáza bola následne premytá s CH₂Cl₂ (2× 8 ml). Kombinovaná organická fáza bola vysušená (Na₂SO₄) a rozpúšťadlá odparené pod zníženým tlakom. Surový produkt **(±)-15** (2-metoxyhuprín) sa podrobil čisteniu stĺpcovou chromatografiou (mobilná fáza - CH₂Cl₂:MeOH:TEA - 95:5:1; Schéma 10).

Výtťažok: 80%

biela pevná látka

Hodnoty ^1H a ^{13}C NMR spektier sa zhodovali s dostupnými údajmi z literatúry.⁴⁰

Zlúčenina (\pm)-**15** (70 mg; 0,25 mmol) bola následne rozpustená v MeOH (~ 1 ml), potom bol pridaný metanolický roztok 2 M HCl (~ 1 ml). Zmes sa nechala miešať cez noc pri rt. Rozpúšťadlá boli odparené pod zníženým tlakom, čím sa získal finálny racemický produkt vo forme hydrochloridu [\pm]-**15**·HCl; Schéma 10].

Výtťažok: 94%

svetložltá pevná látka

Teplota topenia: 280 °C

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 7,97 (d; $J = 2,7$ Hz; 1H); 7,90 (d; $J = 9,2$ Hz; 1H); 7,48 (dd; $J = 9,2$; 2,6 Hz; 1H); 5,49 (d; $J = 5,2$ Hz; 1H); 3,91 (s; 3H; OCH₃); 3,35 (bs; 1H); 3,13 (dd; $J = 17,8$; 5,5 Hz; 1H); 2,91 (m; 1H); 2,68 (bs; 1H); 2,38 (m; 1H); 1,85 (m; 3H; H; 2×H); 1,50 (s; 3H; CH₃).

^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 157,0; 153,6; 148,8; 133,2; 132,6; 124,5; 124,2; 120,8; 116,4; 112,9; 103,1; 56,5; 35,2; 34,3; 28,0; 26,5; 25,6; 23,3.

HRMS [M+H]⁺: 281,1623 (vypočítané pre [C₁₈H₂₁N₂O]⁺: 281,1609).

4.2.3 Biologické testovanie 2-metoxyhuprínu

4.2.3.1 Inhibičná aktivita voči AChE/BChE - Princíp a postup merania

Stanovenie inhibičnej aktivity voči AChE/BChE prebehlo za rovnakých podmienok ako u derivátov HupY-L-Trp. Princíp a podrobný postup merania uvádza podkapitola 4.1.3.1.

4.2.3.2 Inhibičná aktivita voči AChE/BChE - Výsledky merania

Pre každú zlúčeninu boli vykonané tri nezávislé merania inhibičnej aktivity a výsledky sú vyjadrené ako ich priemerné hodnoty \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Ďalej bol vypočítaný index selektivity ($SI = IC_{50} \text{ hBChE} / IC_{50} \text{ hAChE}$). Výsledky biologických meraní sú zhrnuté v Tabuľke 3.

Zlúčenina	IC ₅₀ \pm SEM (μ M)		SI (IC ₅₀ hBChE / IC ₅₀ hAChE)
	hAChE	hBChE	
(\pm)-15·HCl	2,63 \pm 0,36	3,76 \pm 0,12	1,43
THA	0,32 \pm 0,013	0,08 \pm 0,001	0,68
6-CITHA	0,02 \pm 0,001	1,78 \pm 0,097	100,68
7-MEOTA	10,00 \pm 0,974	17,56 \pm 0,795	1,76

Tabuľka 3. Inhibičná aktivita zlúčeniny (\pm)-15·HCl a referenčných zlúčenín pre ľudskú AChE (hAChE) a ľudskú BChE (hBChE) vyjadrené ako hodnoty IC₅₀ (dáta k referenčným zlúčeninám prevzaté z citácie 40).

4.2.3.3 Stanovenie miery penetrácie do CNS - princíp a postup stanovenia

Stanovenie miery penetrácie do CNS prebehlo za rovnakých podmienok ako u derivátov HupY-L-Trp. Princíp a podrobný postup merania uvádza podkapitola 4.1.3.3.

4.2.3.4 Stanovenie miery penetrácie do CNS - výsledky stanovenia

Pre každú zlúčeninu boli vykonané tri nezávislé merania PAMPA a výsledky sú vyjadrené ako ich priemerné hodnoty \pm štandardná chyba priemeru (SEM). Ďalej bola zhodnotená miera prestupu cez HEB. Výsledky biologických meraní sú zhrnuté v Tabuľke 4.

Zlúčenina	Odhad permeácie cez HEB	
	$P_e \pm \text{SEM} (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})$	CNS (+/-)
(\pm)-15·HCl	7,64 \pm 0,22	CNS+
THA	5,30 \pm 0,20	CNS+
Donepezil	7,3 \pm 0,9	CNS+
7-MEOTA	6,50 \pm 1,85	CNS+
6-CITHA	5,00 \pm 0,45	CNS+
Cefuroxím	2,70 \pm 0,1	CNS-
Piroxikam	2,20 \pm 0,15	CNS-

Tabuľka 4. Predpoklad prechodu zlúčeniny (\pm)-15·HCl cez HEB a niektoré ďalšie pozitívne/negatívne štandardy vyjadrené ako hodnoty P_e . CNS+ (vysoká pravdepodobnosť prieniku pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}) > 4,0$; CNS- (nízka pravdepodobnosť prieniku pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}) < 2,0$; CNS +/- (neurčitý prienik pomocou pasívnej difúzie), $P_e (10^{-6} \text{ cm.s}^{-1})$ od 4,0 do 2,0 (dáta k štandardom prevzaté z citácie 40).

5 DISKUSIA

V rámci diplomovej práce boli navrhnuté a pripravené dva štruktúrne typy huprínových derivátov. Ich predlohomé molekuly boli volené na základe vlastností, ktoré majú spojitosť s etiológiou AD a mohli by mať pozitívny dopad na liečbu tohto ochorenia.

V prvej sérii boli syntetizované hybridy HupY-L-Trp. Pripravené boli konkrétne tri cieľové zlúčeniny **8-10**·2HCl, ktoré sa navzájom líšili dĺžkou spojovacieho reťazca. V prvom kroku syntézy prebehol medzi východiskovou látkou (\pm)-**1** (7-metylbicyklo[3.3.1]non-6-én-3-ón) a kyselinou **2** (2-amino-4-chlórbenzoová kyselina) cyklokondenzačný typ reakcie, ku ktorej došlo intramolekulárne za zvýšenej teploty pôsobením dehydratačného činidla (POCl_3). Cyklizáciou tak vznikol derivát (\pm)-**3** v 88% výťažku (Schéma 4).

Nukleofilná substitúcia (\pm)-**3** s príslušným α,ω -diaminoalkánom ($n = 5 - 7$) viedla ku vzniku látok (\pm)-**5-7**. Táto reakcia prebiehala v prostredí fenolu za zvýšenej teploty. Výťažky daných reakcií boli v rozmedzí 27 - 61%. Relatívne nízke hodnoty výťažnosti (hlavne 27% pre derivát so siedmimi metylénovými jednotkami v spojovacom reťazci) si vysvetľujeme rozkladnými produktmi vzniknutými počas reakcií, ktoré sme neboli schopní izolovať v procese chromatografie, z čoho vyplýva, že sa nám ich nepodarilo identifikovať (Schéma 5).

V treťom kroku syntézy reagovala komerčne dostupná zlúčenina **4** (*N*-[(*tert*-butoxy)karbonyl]-*L*-tryptofán, *N*-Boc-*L*-Trp) s organickou bázou TEA, pričom došlo k tvorbe soli, ktorá ďalej reagovala s intermedátmi (\pm)-**5-7** v prítomnosti BOP [(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimetylamino)fosfónium hexafluórfosfát]. Výsledkom tejto reakcie boli produkty **8-10**. Z daných amidov boli prostredníctvom vodného roztoku 4 M HCl (došlo k odchráneniu Boc chrániacej skupiny) pripravené konečné zlúčeniny vo forme hydrochloridov **8-10**·2HCl. Aj v tomto prípade boli výťažky nízke (32 - 56%), čo mohlo byť spôsobené prítomnosťou rozkladných produktov pozorovaných na TLC platničkách počas priebehu reakcií (Schéma 6).

V druhej sérii bol syntetizovaný nový huprínový derivát (\pm)-**15**·HCl (2-metoxyhuprín). V prvom kroku syntézy bol pripravený ketón **13** (7-metylbicyklo[3.3.1]nonán-3-ón) dvomi rôznymi spôsobmi. V oboch prípadoch došlo k fragmentácii východiskových zlúčenín **11** (1,3-dibrómadamantán) alebo **12** (1,3-adamantándiol) za mikrovlnového ohrevu (Schéma 9).

V druhom kroku syntézy prebehla vo vodíkovej atmosfére izomerizácia dvojitej väzby zlúčeniny **13** za vzniku ketónu (\pm)-**1** (7-metylbicyklo[3.3.1]non-6-én-3-ón), ktorá bola katalyzovaná 5% Pd/C (Schéma 10).

Ďalší krok syntézy predstavovala Friedländerova reakcia medzi derivátom (\pm)-**1** a nitrilom **14** (2-amino-5-metoxybenzonitril). Konkrétny mechanizmus účinku spočíva v reakcii 2-aminosubstituovanej karbonylovej štruktúry (**14**) s ďalšom zlúčeninou obsahujúcou karbonyl [\pm]-**1**] až na aldolovú formu, ktorá dehydratáciou počas eliminačnej reakcie prešla na nenasýtený karbonylový derivát. Následne došlo opäť k dehydratácii za vzniku primárneho aromatického amínu (\pm)-**15**. Syntetizovaný produkt poskytol reakciou s vodným roztokom 4 M HCl konečný huprínový analóg vo forme hydrochloridu (\pm)-**15**·HCl (Schéma 10).

Každý novopripravený derivát huprínu vykazoval duálnu inhibičnú aktivitu voči obom podtypom ChE. Tieto výsledky boli stanovené pomocou Ellmanovej metódy a sú vyjadrené hodnotou IC_{50} , ktorá pri daných zlúčeninách dosahovala mikromolárne, až nanomolárne hodnoty (Tabuľka 1 a 3). Pomocou PAMPA testu bola stanovená pravdepodobnosť prechodu cez HEB prostredníctvom pasívnej difúzie. U všetkých pripravených zlúčenín boli pri meraní zaznamenané hodnoty, ktoré značia vysokú pravdepodobnosť permeácie cez biologické membrány vrátane HEB (Tabuľka 2 a 4).

Všetky nové deriváty dosiahli alebo prekonalí inhibičnú aktivitu referenčných zlúčenín (THA, 6-CITHA, 7-MEOTA) voči *hAChE*. Selektivita THA, ktorá je vystupňovaná smerom k *hBChE* prekonaná nebola. Toto zistenie môže byť vnímané pozitívne s ohľadom na fakt, že v priebehu AD dochádza k zachovaniu alebo zvýšeniu hladín BChE, zatiaľ čo hladiny AChE klesajú. Neselektívne ChEI by teda mohli mať veľký potenciál nielen v raných, ale i v pokročilejších štádiách ochorenia.⁵³

Najvyrovnanejší vzťah medzi štruktúrou a účinkom spomedzi syntetizovaných hybridov HupY-L-Trp dosiahla zlúčenina **9**·2HCl. Ďalšie cieľové produkty syntézy **8**·2HCl a **10**·2HCl vykazovali oproti derivátu **9**·2HCl slabší inhibičný potenciál voči obom podtypom ľudskej ChE. Dĺžku spojovacieho reťazca o veľkosti šiestich uhlíkových atómov môžeme preto hodnotiť ako optimálnu pre kontaktovanie tzv. katalytickej časti AChE s jej periférnou anionickou časťou.

U všetkých zlúčenín, ktoré boli pripravené v rámci diplomovej práce sa predpokladá aj antiagregačná aktivita voči A β . Pre toto biologické hodnotenie sú zaujímavé najmä deriváty HupY-L-Trp, v ktorých by mohol práve L-Trp slúžiť ako nosič pre ciele rozpoznanie amyloidných agregátov v postihnutých oblastiach mozgu.

6 ZÁVER

Ciele predkladanej diplomovej práce boli splnené. Syntetizovala som hybridy HupY-L-Trp (**8-10**·2HCl) s rôznou dĺžkou spojovacieho reťazca ($n = 5 - 7$) a 2-metoxyhuprín [(±)-**15**·HCl], ktoré by mohli byť prínosom pre budúcu terapiu AD. Spracovanie kapitoly venovanej spomínanému 2-metoxyhuprínu je podložené vedeckým článkom v odbornom časopise *Molecules* (citácia 40), na ktorom som sa podieľala ako spoluautorka.

Zlúčeniny pripravené v rámci mojej diplomovej práce boli *in vitro* testované voči *hAChE* a *hBChE* pomocou Ellmanovej metódy. Tieto biologické merania vykonali pracovníci Katedry toxikológie a vojenskej farmácie v Hradci Králové (Fakulta vojenského zdravotníctva, Univerzita obrany, Brno). Výsledky meraní boli udané ako hodnoty IC_{50} a porovnané s referenčnými zlúčeninami (THA, 6-CITHA, 7-MEOTA). Všetky nové hupríny preukázali schopnosť inhibovať obidva podtypy ChE v mikromolárnych, až nanomolárnych koncentráciách. K stanoveniu priechodu látok lipidickou membránou bol použitý PAMPA test. Toto biologické stanovenie vykonali pracovníci Centra biomedicínskeho výskumu (Fakultná nemocnica Hradec Králové). Mieru prestupu do CNS odzrkadľuje permeačný koeficient P_e , ktorý u nových zlúčenín dosiahol hodnoty nad $4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$; čo značí vysokú pravdepodobnosť prieniku testovaných látok do CNS prostredníctvom pasívnej difúzie.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ČECHOVÁ, L., A. BARTOŠ, D. DOLEŽIL a D. ŘÍPOVÁ. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*. 2011, 12(3), 175–180. ISSN 12131814, 18035280.
2. JIRÁK, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2008, 9(4), 240–244. ISSN 12131814, 18035280.
3. CUMMINGS, J.L. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2004, 351(1), 56–67. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra040223
4. UNZETA, M., G. ESTEBAN, I. BOLEA, W.A. FOGEL, R.R. RAMSAY, M.B.H. YODIM, K.F. TIPTON a J. MARCO-CONTELLAS. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2016, 10(205), 1–17. ISSN 1662-4548. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2016.00205
5. ČECHOVÁ, L., A. BARTOŠ, D. DOLEŽIL a D. ŘÍPOVÁ. Alzheimerova nemoc a mírná kognitivní porucha: diagnostika a léčba. *Neurologie pro praxi*. 2011, 12(3), 175–180. ISSN 12131814, 18035280.
6. Výskyt demence. *Česká alzheimerovská společnost* [online]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/>
7. CLARKE, P.J., V.W. MARSHALL, C.D. RYFF a C.J. ROSENTHAL. Well-Being in Canadian Seniors: Findings from the Canadian Study of Health and Aging*. *Canadian Journal on Aging / La Revue canadienne du vieillissement* [online]. 2000, 19(2), 139–159. ISSN 1710-1107, 0714-9808. Dostupné z: doi:10.1017/S0714980800013982
8. QUERFURTH, H.W. a F.M. LAFERLA. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2010, 362(4), 329–344. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra0909142
9. SZABOÓ, R. 100 rokov od začiatku histórie Alzheimerovej choroby. *Lekárske listy*. 2006, 22(21).
10. TURČÁNI, P. Alzheimerova choroba. *Neuroscience*. 2001, p. 27.

11. GULAŠOVÁ, I. Alzheimerova choroba - rizikové a protektívne faktory. *KONTAKT - časopis pro ošetrovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. 2011, 8(4), 389–499. ISSN 1804-7122.
12. ONDREJÍČEK, A. *Syntéza a in vitro testování takrin - troloxových derivátů jako potenciálních inhibitorů acetylcholinesterasy*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
13. HORT, J. a R. RUSINA. *Paměť a její poruchy* [online]. 2007. Dostupné z: <https://www.martinus.sk/?uItem=36501>
14. GAUTHIER, S., ed. *Clinical Diagnosis and Management of Alzheimer's Disease*. 3 edition. New York: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-415-37299-2.
15. BARTOS, A. a D. RIPOVA. Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci. *Psychiatrie pro praxi*. 2007, 8(1), 17–21. ISSN 12130508.
16. MRAVEC, B. *Nervový systém: patofyziológia (skriptum pre študentov lekárskech fakúlt)*. 2013. ISBN 978-80-89607-08-2.
17. BARTKO, D., I. ČOMBOR, Š. MADARÁSZ a M. LULIAK. DEMENCIA ALZHEIMEROVHO TYPU. *Via Practica*. 2008, 5(10), 398–402.
18. KASA, Peter, Zoltan RAKONCZAY a Karoly GULYA. *The cholinergic system in Alzheimer disease* [online]. 1997. *Progress in Neurobiology*, 52. Dostupné z: [doi:10.1016/S0301-0082\(97\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00028-2)
19. LINCOVÁ, D. *Základní a aplikovaná farmakologie* [online]. 1. vydanie. 2002 [vid. 2018-08-29]. 24. Dostupné z: <https://www.martinus.sk/?uItem=116630>
20. MLADĚNKA, P. *Léčiva ovlivňující cholinergní systém (studijný materiál Farmaceutické fakulty UK)*. B.m.: Univerzita karlova, Farmaceutická fakulta v HK. 2016
21. FRANCIS, P.T., A.M. PALMER, M. SNAPE a G.K. WILCOCK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 1999, 66(2), 137. Dostupné z: [doi:10.1136/jnnp.66.2.137](https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137)

22. TERRY, A. V. a J. J. BUCCAFUSCO. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2003, 306(3), 821–827. ISSN 0022-3565, 1521-0103. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.102.041616
23. JIRAK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004, 18(4), 212–214. ISSN 12127973.
24. DANYSZ, W. a C.G. PARSONS. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, 167(2), 324–352. ISSN 1476-5381. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x
25. JIRAK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. 2012, 8(3), 107–108. ISSN 18012434.
26. JIRAK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. 2009, 5(4), 176–178. ISSN 18012434.
27. DOLEŽAL, M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém* [online]. Prvý dotisk. 2014 [vid. 2018-08-29]. ISBN 978-80-246-2382-5. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/MED00182284>
28. POHANKA, M. CHOLINESTERASES, A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. *Biomedical Papers* [online]. 2011, 155(3), 219–223. ISSN 12138118, 18047521. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2011.036
29. DARVESH, S. Butyrylcholinesterase as a Diagnostic and Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13(10).
30. HORAK, M., K. HOLUBOVA, E. NEPOVIMOVA, J. KRUSEK, M. KANIAKOVA, J. KORABECNY, L. VYKLICKY, K. KUCA, A. STUCHLIK, J. RICNY, K. VALES a O. SOUKUP. The pharmacology of tacrine at N-methyl-d-aspartate receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. 2017, 3(75), 54–62. ISSN 0278-5846. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnpbp.2017.01.003

31. IBACH, B. a E. HAEN. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2004, 10(3), 231–251. ISSN 1381-6128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612043386509
32. MARCO-CONTELLAS, J., M. DO CARMO CARREIRAS, C. RODRÍGUEZ, M. VILLARROYA a A.G. GARCÍA. Synthesis and Pharmacology of Galantamine. *Chemical Reviews* [online]. 2006, 106(1), 116–133. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr040415t
33. ZIGOVA, E. Liečba Alzheimerovej demencie memantinom. *Psychiatrie pro praxi* [online]. 2007, 7(6). ISSN 12130508. Dostupné z: <https://www.psychiatriepropraxi.cz/artkey/psy-200606-0008.php>
34. AGIS-TORRES, A., M. SÖLHUBER, M. FERNANDEZ a J.M. SANCHEZ-MONTERO. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology* [online]. 2014, 12(1), 2–36. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X113116660047
35. KORÁBEČNÝ, J. PROKOGNITIVNÍ POTENCIÁL BIS(7)-TAKRINU JAKO ZVAŽOVANÉHO TERAPEUTIKA NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ. *MMSL* [online]. 2018, 87(1), 34–44. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2018.006
36. GUZIOR, N., A. WIECKOWSKA, D. PANEK a B. MALAWSKA. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*. 2015, 22(3), 373–404. ISSN 1875-533X.
37. CAMPS, P., R. EL ACHAB, J. MORRAL, D. MUÑOZ-TORRERO, A. BADIA, J. E. BAÑOS, N. M. VIVAS, X. BARRIL, M. OROZCO a F. J. LUQUE. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2000, 43(24), 4657–4666. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm000980y
38. JAN, M., Z. KRŠKOVÁ a J. DUŠEK. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. 2011, 7(1), 39–41. ISSN 18012434.

39. MUÑOZ-TORRERO, D. a P. CAMPS. Huprines for Alzheimer's disease drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2008, 3(1), 65–81. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.3.1.65
40. MEZEIOVA, E., J. KORABECNY, V. SEP SOVA, M. HRABINOVA, P. JOST, L. MUCKOVA, T. KUCERA, R. DOLEZAL, J. MISIK, K. SPILOVSKA a N. PHAM. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules* [online]. 2017, 22(8), 1265. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22081265
41. ALCALÁ, M.M., N. M. VIVAS, S. HOSPITAL, P. CAMPS, D. MUÑOZ-TORRERO a A. BADIA. Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology* [online]. 2003, 44(6), 749–755. ISSN 0028-3908. Dostupné z: doi:10.1016/S0028-3908(03)00071-6
42. SOLA, I., S. CASTELLÀ, E. VIAYNA, C. GALDEANO, M.C TAYLOR, S.Y. GBEDEMA, B. PÉREZ, M.V. CLOS, D.C. JONES, A.H. FAIRLAMB, C.W. WRIGHT, J.M. KELLY a D. MUÑOZ-TORRERO. Synthesis, biological profiling and mechanistic studies of 4-aminoquinoline-based heterodimeric compounds with dual trypanocidal–antiplasmodial activity. *New Developments in Antiinfectives Research* [online]. 2015, 23(16), 5156–5167. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2015.01.031
43. SOLA, I., A. ARTIGAS, M.C. TAYLOR, F.J. PÉREZ-AREALES, E. VIAYNA, M.V. CLOS, B. PÉREZ, C.W. WRIGHT, J.M. KELLY a D. MUÑOZ-TORRERO. Synthesis and biological evaluation of N-cyanoalkyl-, N-aminoalkyl-, and N-guanidinoalkyl-substituted 4-aminoquinoline derivatives as potent, selective, brain permeable antitrypanosomal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2016, 24(21), 5162–5171. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2016.08.036
44. CAMPS, P., X. FORMOSA, D. MUÑOZ-TORRERO, J. PETRIGNET, A. BADIA a M.V. CLOS. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Huprine–Tacrine Heterodimers: Subnanomolar Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2005, 48(6), 1701–1704. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm0496741
45. VIAYNA, E., I. SOLA, M. BARTOLINI, A. DE SIMONE, C. TAPIA-ROJAS, F.G. SERRANO, R. SABATÉ, J. JUÁREZ-JIMÉNEZ, B. PÉREZ, F.J. LUQUE, V.

- ANDRISANO, M.V. CLOS, N.C. INESTROSA a D. MUÑOZ-TORRERO. Synthesis and Multitarget Biological Profiling of a Novel Family of Rhein Derivatives As Disease-Modifying Anti-Alzheimer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2014, 57(6), 2549–2567. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm401824w
46. PAWAR, A.P., K.F. DUBAY, J. ZURDO, F. CHITI, M. VENDRUSCOLO a C.M. DOBSON. Prediction of “Aggregation-prone” and “Aggregation-susceptible” Regions in Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2005, 350(2), 379–392. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2005.04.016
47. PALEGO, L., L. BETTI, A. ROSSI a G. GIANNACCINI. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *Journal of Amino Acids* [online]. 2016. Dostupné z: doi:10.1155/2016/8952520
48. AZRIEL, R. a E. GAZIT. Analysis of the Minimal Amyloid-forming Fragment of the Islet Amyloid Polypeptide AN EXPERIMENTAL SUPPORT FOR THE KEY ROLE OF THE PHENYLALANINE RESIDUE IN AMYLOID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001, 276(36), 34156–34161. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M102883200
49. RECHES, M. a E. GAZIT. Amyloidogenic hexapeptide fragment of medin: homology to functional islet amyloid polypeptide fragments. *Amyloid* [online]. 2004, 11(2), 81–89. ISSN 1350-6129. Dostupné z: doi:10.1080/13506120412331272287
50. ELLMAN, G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES a R.M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1961, 7(2), 88–95. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
51. NEPOVIMOVA, E., J. KORABECNY, R. DOLEZAL, K. BABKOVA, A. ONDREJICEK, D. JUN, V. SEPSOVA a A. HOROVA. Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, 58(22), 8985–9003. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01325

52. MÜLLER, C., J. ELLIOTT, J. CHRYSSANTHACOPOULOS, D. DERYNG, C. FOLBERTH, T.A.M. PUGH a E. SCHMID. Implications of climate mitigation for future agricultural production. *Environmental Research Letters* [online]. 2015, 10(12), 125004. ISSN 1748-9326. Dostupné z: doi:10.1088/1748-9326/10/12/125004
53. NORDBERG, A., C. BALLARD, R. BULLOCK, T. DARREH-SHORI a M. SOMOGYI. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion for CNS Disorders* [online]. 2013, 15(2), 0–0. ISSN 2155-7780. Dostupné z: doi:10.4088/PCC.12r01412