

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



Takrin-benzothiazolové deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby

Diplomová práce

Školitel: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eugenie Nepovimová

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 16. 5. 2016

Lucie Svobodová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D., Mgr. Eugenii Nepovimové a PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. za odborné rady, věnovaný čas, trpělivost a ochotu, kterou mi během zpracovávání diplomové práce věnovali. Dále bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za NMR analýzu a PharmDr. Vendule Šepsové, Ph.D. za stanovení biologické aktivity. Práce byla podpořena programem SVV 260 291.

1. OBSAH

1.	OBSAH	4
2.	ABSTRAKT	5
3.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
4.	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
4.1.	Alzheimerova choroba	11
4.1.1.	Rizikové faktory	11
4.1.2.	Klinické projevy	12
4.1.3.	Patofyziologie	13
4.2.	Cholinergní teorie.....	13
4.2.1.	Acetylcholin	14
4.2.2.	Cholinesterasy	15
4.3.	Amyloidní teorie.....	17
4.4.	Tau protein	18
4.5.	Terapie AD.....	18
4.5.1.	Inhibitory cholinesteras.....	18
4.5.2.	Memantin.....	21
4.5.3.	Multi-Target Directed Ligands.....	21
5.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	23
5.1.	CÍL PRÁCE	23
5.2.	Design.....	23
5.3.	Obecné údaje o syntéze	24
5.4.	Syntéza	25
5.4.1.	Obecný postup	25
5.5.	Biologické testování	47
5.5.1.	Tabulka naměřených hodnot	49
6.	DISKUSE	50
7.	ZÁVĚR	51
8.	REFERENCE	52

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Lucie Svobodová

Školitel: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eugenie Nepovimová

Název diplomové práce: Takrin-benzothiazolové deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění končící smrtí. Projevy AD nesou často neuropsychiatrický charakter, jako je např. ztráta paměti, porucha orientace v prostoru, ztráta kognitivních funkcí aj. Etiologie onemocnění má multifaktoriální charakter a není doposud dobře známa. Mezi hlavní histopatologické rysy patří: přítomnost extracelulárních amyloidních plaků, výskyt intracelulární agregátů hyperfosforylovaného tau proteinu a smrt neuronů, a to zejména cholinergních. Rovněž oxidační stres, který hraje v procesu stárnutí důležitou roli, přispívá k patofyziologii onemocnění. Vzhledem k tomu, že ke vzniku AD přispívá mnoho faktorů, nejnovějším trendem ve vývoji léčiv proti AD je ovlivnění co nejvíce patologických procesů v mozku. Taková léčiva jsou označována jako Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs). V rámci této studie bychom chtěli představit takrin-benzothiazolové hybridy kombinující takrin s aminobenzothiazolovým fragmentem. K propojení těchto dvou farmakoforů byly použity uhlíkaté řetězce o různých délkách. Takrin byl prvním lékem schváleným FDA k terapii AD. Mechanismus jeho účinku je založen na inhibici cholinesteras s následným zvýšením hladiny acetylcholinu v synaptických štěrbinách. Benzothiazol by díky své planární struktuře mohl bránit protein-protein interakcím a tím pádem vykazovat antiamyloidní účinek. Kromě toho, benzothiazolový fragment představuje základní skelet inhibitorů beta-amyloid vázající alkohol-dehydrogenasy (ABAD). ABAD je mitochondriální enzym, který přispívá k oxidačnímu stresu v progresi AD. Z tohoto důvodu by mohla jeho inhibice zabránit produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a fungovat neuroprotektivně. Na základě výše uvedených skutečností by se mohly

struktury nesoucí takrin a benzothiazolovou farmakofor stát slibnými léčivy v terapii AD. Nicméně pouze *in vitro* a *in vivo* stanovení jejich biologické aktivity odhalí skutečnou hodnotu těchto látek v terapii Alzheimerovy choroby. Tato práce zahrnuje syntézu látek a jejich *in vitro* hodnocení na cholinesterasach. Sloučeniny vykazaly inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy v mikromolárních až nanomolárních koncentracích.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Lucie Svobodová

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Eugenie Nepovimová

Title of Diploma Thesis: Tacrine-Benzothiazole Derivatives in Alzheimer's Disease Therapy

Alzheimer's disease (AD) is a progressive fatal neurodegenerative disorder and the most common type of dementia. It is manifested by a variety of neuropsychiatric symptoms such as memory loss, visuospatial deficits etc. Etiology of the disease has a multifactorial character and is not well known. Among the major pathological features belong: presence of extracellular amyloid plaques, intracellular aggregates of hyperphosphorylated tau protein and neuronal loss, especially loss of cholinergic neurons. Also the oxidative stress of the neuronal cells contributes to the pathophysiology of the disease. As AD is influenced by multiple factors, the main strategy in treatment is hitting multiple targets in the brain as well. Such drugs are denoted as multi-target-directed ligands (MTDLs) and they affect different molecular abnormalities of AD. Within this work, we would like to bring out new tacrine - benzothiazole hybrids combining tacrine with the amino benzothiazole moiety. Linkers of different lengths were used to connect these two scaffolds. Tacrine was the first drug approved for AD treatment by FDA. Its mechanism of action is based on inhibition of cholinesterases and thereby increasing the level of synaptic acetylcholine. On the other hand, benzothiazole, as a planar molecule, could prevent the protein-protein interactions and thus it could exhibit potential anti-amyloid effect. Moreover, benzothiazole moiety represents a core scaffold of inhibitors of amyloid-binding alcohol dehydrogenase (ABAD). ABAD is a mitochondrial enzyme that contributes to oxidative stress in AD progression. Therefore, its inhibition could avoid

ROS production and act neuroprotectively. Based on the above-mentioned facts, molecules bearing tacrine and benzothiazole skeleton could become promising drug candidates in AD therapy. Nevertheless, just *in vitro* and *in vivo* evaluation of biological activity will reveal their real value in the field of Alzheimer's disease. This work includes synthesis of new compounds and their *in vitro* evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition. They exerted bio-activity in micromolar and nanomolar concentration.

3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-MEOTA	7-methoxytakrin
ABAD	A β vázající alkoholdehydrogenasa
A β	Beta-amyloidní protein
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
ALT	Alaninaminotransferasa
APP	Prekurzor amyloidního proteinu
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CAS	Katalytické aktivní místo
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina)
FDA	Food and Drug Administration
ChAT	Cholin-acetyltransferasa
MTDLs	Multi-Target-Directed Ligands
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-glutamát
PAS	Periferní anionické místo
PSE ₁	Presenilin 1
PSE ₂	Presenilin 2
ROS	Reaktivní formy kyslíku

TMS

Tetramethylsilan

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1. ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je multifaktoriální, neurodegenerativní a progresivní onemocnění, které v současné době nelze efektivně léčit. Nemoc začíná často pozvolna bez výrazných symptomů, které by prvotně AD odlišily od jiných typů demencí. (1) Základním a prvním příznakem je zhoršená paměť, později se objevují poruchy kognitivních funkcí, prostorová a časová desorientace a až úplná ztráta paměti. Z histopatologického hlediska se nemoc projevuje jak mikroskopicky, tak i makroskopicky. Dosavadní dostupná terapie je pouze paliativní a neřeší příčinu a progresi nemoci. (2)

Globální stárnutí populace je jedním z velkých problémů 21. století, s hlubokými ekonomickými, politickými a sociálními důsledky pro lidstvo. AD je jedním z nejčastějších typů demence, podíl mezi ostatními typy je mezi 60–80 %. (3) Počet pacientů s AD se každým rokem exponenciálně zvyšuje, vzhledem ke stoupající délce a kvalitě života populace. Odhady říkají, že na celém světě žije až 44 milionů populace s tímto typem demence. (4) Prevalence AD se zvyšuje s věkem, již od osmdesátého věku života je kolem 14,5 % u mužů a 16,4 % u žen. (5) Vyšší prevalence v ženské části populace je způsobena tím, že ženy se obecně dožívají vyššího věku než muži.

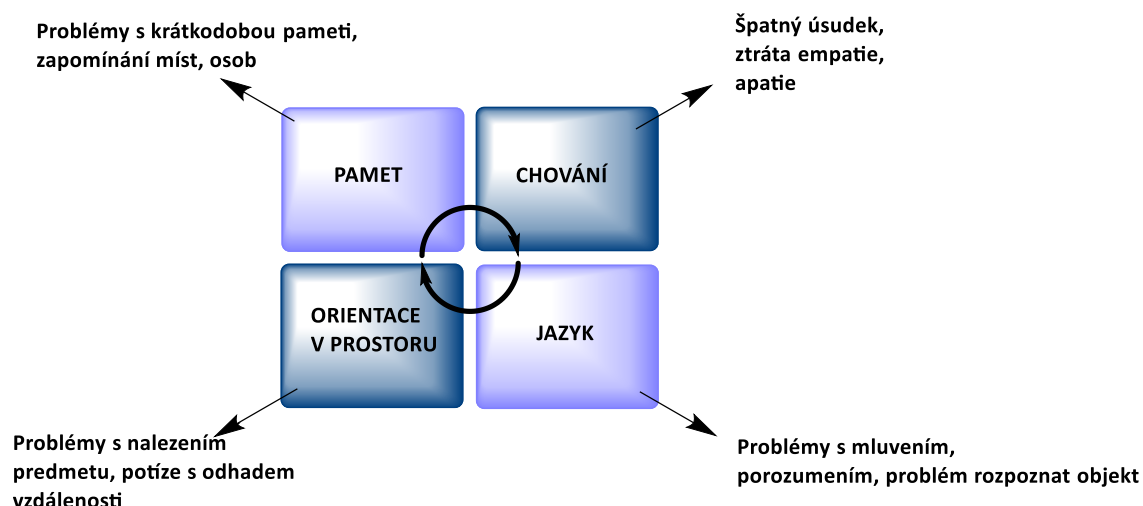
4.1.1. Rizikové faktory

Na rozvoj a intenzitu AD má vliv několik rizikových faktorů. Mezi hlavní patří vyšší věk, pohlaví, výskyt demence v rodinné anamnéze a genetické predispozice. (6) Ke vzniku AD mohou přispět rovněž i jiná onemocnění, např. diabetes mellitus (7), hypercholesterolemie (8) a jiné kardiovaskulární choroby. (9) Ovlivnitelnými rizikovými faktory jsou zdravý životní styl, vyšší mentální aktivita, kouření a obezita. Vyšší riziko

vzniku AD je také u osob, které v minulosti prodělaly traumatické poranění hlavy (10) a/nebo u pacientů trpících depresivními stavy. (11)

Vliv na rozvoj Alzheimerovy choroby mají také genetické predispozice, a to především mutace na chromozomech 1, 14, 19 a 21. Na chromozomu číslo 21 je umístěn gen pro kódování amyloidního prekurzorového proteinu (APP), jehož mutace bývá zjištěna u většiny pacientů s tzv. presenilní formou AD. Dochází k mutacím také na chromosomech číslo 14, kdy dojde ke změně genu pro presenilin 1 (PSE₁) a na chromosomech číslo 1, kde dochází k mutaci genu pro presenilin 2 (PSE₂). (12)

4.1.2. Klinické projevy



Obrázek 1, Klinické projevy AD

Klinické symptomy AD se neprojevují náhle, ale přichází postupně a jsou velice nespecifické. Zpočátku se objevují drobné výpadky paměti, které však nijak nenarušují vykonávání běžných denních aktivit. Později se projevuje typický příznak, kdy pacient odkládá věci na neznámá místa a nenachází je. Dále se objevují větší a větší výpadky paměti, problémy s orientací v prostoru a také potíže s plánováním denních aktivit. Krátkodobá paměť selhává a postupem času nastává problém i u dlouhodobé paměti. Dochází také k poruchám vnímání vizuálních jevů, k neschopnosti orientovat se v časovém prostoru, ztrátě sociální komunikace a poruše mezilidských interakcí.

Nakonec všechny tyto symptomy vedou ke změně osobnosti člověka, k neschopnosti samostatného života a až k úplné demenci. (13)

4.1.3. Patofyziologie

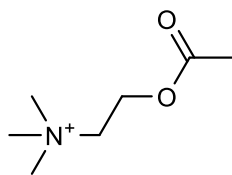
V průběhu onemocnění dochází k ireverzibilním makroskopickým i mikroskopickým změnám na mozku, zejména pak na temporálních lalocích, amygdale a hippocampu. (14) Tyto změny pak mají za následek klinické projevy AD, jako ztráta paměti, kognitivních funkcí a neschopnost orientace v prostoru.

Mikroskopicky se změny projevují několika různými způsoby, které jsou popsány v kapitolách 4.2, 4.3 a 4.4.

4.2. CHOLINERGNÍ TEORIE

Na začátku sedmdesátých let dvacátého století započal výzkum mozkové tkáně pacientů trpících AD s nadějí, že neurochemický proces, který nemoc způsobuje, bude přesně identifikován, aby se mohlo přijít s jasnou a racionální terapií. Cholinerní teorie AD uvádí, že neurony zodpovědné za cholinerní transmisi v přední části mozku výrazně ubývají v průběhu AD. Tento úbytek lze detekovat histopatologicky snižujícím se množstvím neuronů a také neurochemicky, kdy dochází k úbytku markerů pro syntézu acetylcholinu (ACh). (15) Později byl také identifikován úbytek enzymu, který je zodpovědný za syntézu ACh. Tento enzym se nazývá cholin-acetyltransferasa (ChAT) a podílí se na reakci, při které vzniká z cholinu a acetylkoenzymu A (Acetyl-CoA) acetylcholin. (16) Dále psychofarmakologické studie na humánních i animálních modelech shodně ukázaly, že systémová blokáce cholinerních receptorů způsobuje poruchy pozornosti, učení a defekty v paměti. (17) Z cholinerní teorie se odvíjí dnešní farmakoterapie AD.

4.2.1. Acetylcholin



Obrázek 2, Acetylcholin

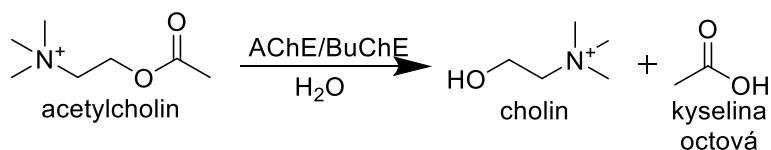
Acetylcholin je neurotransmitter, který přenáší nervové vzruchy jak ve vegetativním nervovém systému, v centrálním nervovém systému a také na nervosvalové ploténce. Syntéza acetylcholinu probíhá v cytoplasmě jednotlivých neuronů, které aktivně vychytávají cholin a za účasti enzymu ChAT a Acetyl-CoA z něj vzniká acetylcholin. (18) Ten pak je skladován ve vysoké koncentraci ve vezikulách. K uvolňování acetylcholinu dochází při nervové stimulaci, kdy nastane zvýšení koncentrace vápenatých iontů a změna akčního potenciálu. Následně dojde ke změně akčního potenciálu, vezikuly s acetylcholinem se uvolní a dojde k jejich splynutí s presynaptickou membránou. Acetylcholin tedy pronikne do synaptické štěrbině. Zde se váže na postsynaptický receptor. (19)

Rozlišujeme dva druhy receptorů, na které se může acetylcholin vázat. Prvním typem jsou muskarinové cholinergní receptory, které mají různou stavbu a lze je rozlišit na několik podtypů M_1 , M_2 a M_3 . Celkem jich existuje pět, avšak ne u všech je jejich funkce objasněna. V mozku se vyskytují všechny tři podtypy a účastní se procesů jako ukládání do paměti, učení nebo vnímání bolesti. Druhým typem receptorů, na které se acetylcholin váže, jsou nikotinové receptory, které lze najít na nervosvalové ploténce a v gangliových synapsích. (20)

Degradace acetylcholinu probíhá velmi rychle za přítomnosti enzymů cholinesteras.

4.2.2. Cholinesterasy

Charakteristika



Obrázek 3, Odbourávání acetylcholinu

Cholinesterasy štěpí acetylcholin na cholin a acetát v synaptické štěrbině a tím ukončují nervový vzruch. Pokud dojde k inhibici těchto dvou esteraz zvýší se koncentrace acetylcholinu na muskarinových a nikotinových receptorech. Na odbourávání acetylcholinu se podílí acetylcholinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasa (BuChE, E.C. 3.1.1.8). AChE lze najít fyziologicky hlavně v mozku, v červených krvinkách, v neuromuskulárních ploténkách a jiných neurálních synapsích. BuChE vzniká v játrech a fyziologicky se vyskytuje hlavně na periferii v krevní plazmě. (21) AChE se z velké části podílí na odbourávání acetylcholinu v nervové soustavě, lze ji najít i v neuronálních placích. Její aktivita během rozvoje onemocnění klesá.

Struktura

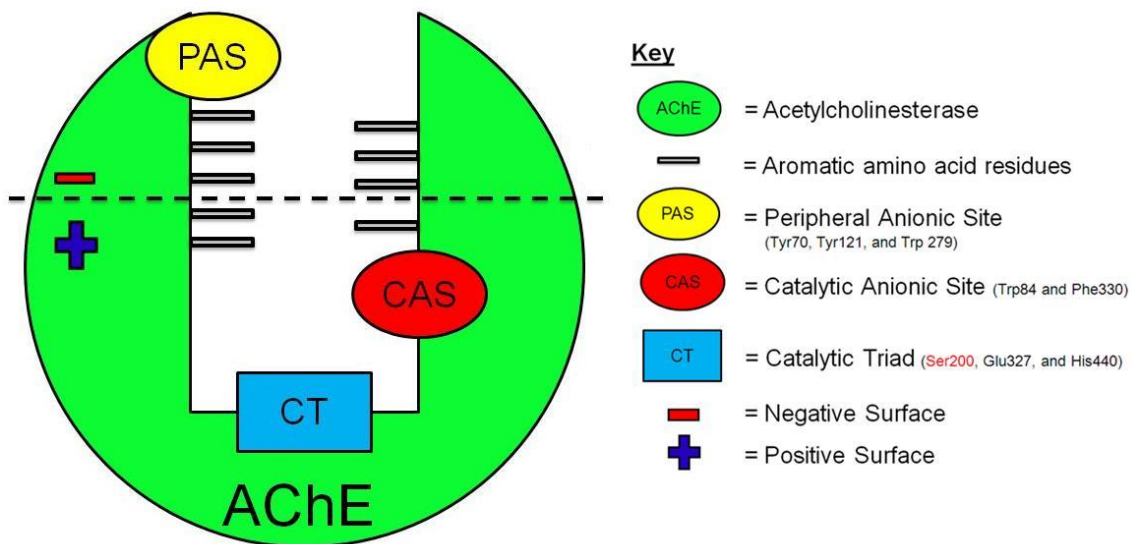
Struktura obou cholinesteras se velice podobá; oba enzymy mají aktivní místo situované v hydrofobní kavitě. Zde dochází k degradaci ACh, AChE je mnohem selektivnější k ACh než BuChE, tento rozdíl je objasněn odlišnou sekvencí aminokyselin v aktivním místě obou enzymů. BuChE na rozdíl od AChE je rovněž schopná degradovat neuroaktivní peptidy. (22)

AChE existuje ve třech různých globulárních formách, které obsahují jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky (G_1 monomer, G_2 dimer a G_4 tetramer). V mozku se vyskytují hlavně G_1 a G_4 formy. (21)

Aktivní místo AChE (CAS) se skládá z esterové části a několika menších podjednotek. Esterová část má sekvenci aminokyselin Ser-His-Glu. Zde probíhá hydrolýza esterové vazby ACh. Tato sekvence je typická pro všechny cholinesterasy a nazývá se katalytická triáda. Katalytická triáda napomáhá držení ACh v aktivním místě, aby bylo dosaženo optimální pozice pro hydrolýzu. Další podjednotky tvoří acylová kapsa, oxanionové místo

a anionická podjednotka. (23) Kvartérní dusík na ACh se váže do anionického místa a je zodpovědný za správnou orientaci ACh v enzymu. Oxanionové místo interaguje s atomy kyslíku v ACh. Důležité pro katalýzu je také periferní anionické místo (PAS), které se nachází na povrchu enzymu a je důležité pro vstup substrátu do enzymu. Skládá se z aminokyselin Tyr70, Tyr121 a Trp279. Kvartérní dusík acetylcholinu se se váže do PAS. Na toto místo se mohou vázat však i jiné substráty než ACh, jako léčiva a toxiny. Bylo také vypořádováno, že A β interaguje právě s tímto místem. Tato interakce napomáhá tvorbě toxických A β oligomerů a následně i větších agregátů. Proto blokáce PAS je jeden z možných budoucích přístupů v terapii AD. (24)

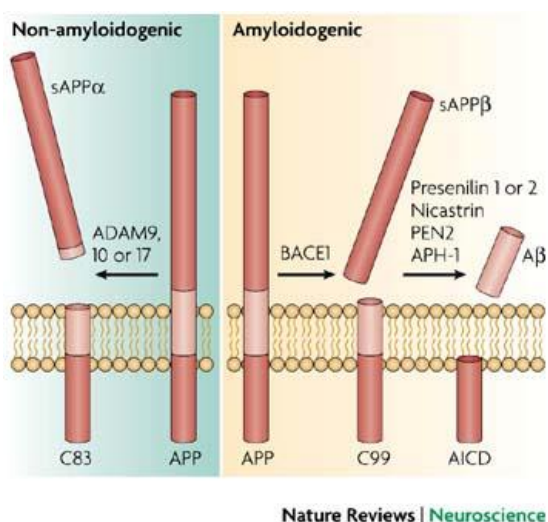
Samotná katalýza probíhá tak, že v CAS vzniká vysoce reaktivní intermediát mezi acetylcholinem a serinem. Hydroxylová skupina serinu se naváže na část substrátu za vzniku acylderivátu enzymu a cholinu. Dále reaguje acylovaný intermediát s menší molekulou vody v přítomnosti His440 za vzniku uvolněné kyseliny octové a volného enzymu, který má obnovenou opět enzymatickou funkci. (25)



Obrázek 4, Aktivní místo AChE, převzato z citace 25

4.3. AMYLOIDNÍ TEORIE

Tato teorie vznikla na začátku devadesátých let minulého století. (26) Amyloidní teorie vysvětluje vznik AD přítomností extracelulárních neuritických plaků, které jsou tvořeny β -amyloidním proteinem ($A\beta$). Tento protein se skládá ze 40 nebo 42 aminokyselin. $A\beta_{42}$ se vyskytuje mnohem častěji, vzhledem k tomu, že má větší tendenci agregovat a tvořit tak oligomery a následně neuritické plaky než $A\beta_{40}$. (14) $A\beta$ vzniká z APP. Ne vždy však z prekursoru vznikne $A\beta$, jsou totiž dvě cesty zpracovávání APP (Obrázek 5). Jedna z nich je neamyloidogenní, kdy nedochází k vzniku $A\beta$. V tomto případě, se APP štěpí enzymem α -sekretasou a poté γ -sekretasou, následkem čehož vznikají fragmenty tohoto prekursoru. Druhá cesta se nazývá amyloidogenní. Ta již vede ke vzniku $A\beta$. APP je štěpeno β -sekretasou a následně γ -sekretasou, v důsledku čehož vzniká $A\beta$. (27) Díky své struktuře se vzniklé proteiny mohou mezi sebou náhodně shlukovat, čímž dochází k tvorbě oligomerů a následně extracelulárních neuritických plaků.



Obrázek 5, Tvorba $A\beta$ z APP amyloidní a neamyloidní cestou, převzat z citace 27

Extracelulární plaky tvořené $A\beta$ pak interagují s enzymem $A\beta$ vázající alkoholdehydrogenasou (ABAD). ABAD je mitochondriální enzym, který katalyzuje redoxní reakce alkoholových skupin na mnoha substrátech, například na steroidech, rozvětvených mastných kyselinách apod. Jeho lokalizace je hlavně v mitochondriích, ale může také procházet do plazmatické membrány, kde se uskutečňuje jeho kontakt s $A\beta$. (28) Tento děj vede k tomu, že ABAD zprostředkovává intraneurální mitochondriální toxicitu $A\beta$. Dochází k vzniku cytotoxických aldehydů v mitochondriích.

Výsledky několika nedávných studií ukázaly, že ABAD může také přispívat k rozvoji AD redukováním neuroprotektivních hladin estrogenů pomocí jeho redoxního potenciálu, který však je po navázání A β blokován. (29) Inhibitory ABAD pak mohou být hodnotnými potenciálními léčivy v terapii AD.

4.4. TAU PROTEIN

Další změnou na úrovni nervových buněk u pacientů s AD je přítomnost hyperfosforylovaného proteinu tau. Za fyziologických podmínek se tento protein vyskytuje v axonech neuronů a zvyšuje tím stabilitu mikrotubulů. Při jeho hyperfosforylaci dochází k přerušení vazby na mikrotubuly, které se z tohoto důvodu začnou rozpadat, a tau protein začne agregovat a vytvářet tak neurofibrilární klubka. (30)

Některé studie naznačují, že patologie tau proteinu je velice příbuzná vlastnostem prionů, jelikož aplikace vzorku, který obsahuje patologický tau protein (získaný z mozku pacienta s AD nebo z mozku myši s tautopatií) do zdravého hostitele vede k rozvoji patologických jevů spojených s tau proteinem. (31)

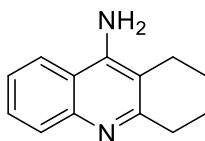
4.5. TERAPIE AD

4.5.1. Inhibitory cholinesteras

Existují tři základní typy inhibice cholinesteras. Při ireverzibilní inhibici dochází k vytvoření komplexu inhibitoru s molekulou cholinesterasy. Do této skupiny inhibitorů lze zařadit organofosfáty, které se však v terapii AD nevyužívají, jejich použití je limitované a bývají zneužívány jako chemické zbraně. (32) Při reverzibilní inhibici dochází k blokování cholinesterasy pouze po dobu přítomnosti aktivní látky, po disociaci inhibitoru se funkce enzymu obnovuje. Mezi reverzibilní inhibitory lze zařadit, například, takrin, donepezil a galantamin. (33) Poslední skupinu tvoří tzv. pseudoreverzibilní inhibitory cholinesteras, které vytváří s enzymem stabilní komplex až po dobu několika hodin. Do této skupiny řadíme rivastigmin a jiné karbamátové deriváty. (34) Bohužel

inhibice cholinesteras s sebou nese také širokou škálu nežádoucích účinků, jelikož dochází ke zvýšení cholinergní aktivity v periferních tkáních. (35)

- *Takrin*

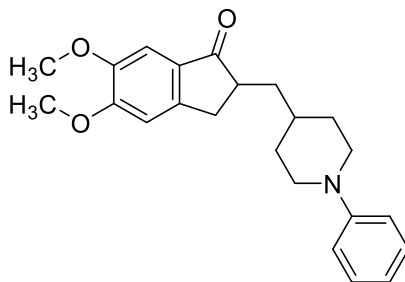


Obrázek 6, Takrin

Takrin (9-amino-1,2,3,4 tetrahydroakridin) byl vyvinut jako první léčivo pro terapii AD. Váže se do aktivního místa cholinesteras, čímž způsobuje jejich inhibici. Při dalších výzkumech a klinických zkouškách však bylo zjištěno, že ne u všech pacientů se podařilo docílit cíleného terapeutického účinku, někteří na léčbu vůbec nereagovali. (36)

Další velkou nevýhodou takrinu je jeho hepatotoxicita, která brání širšímu klinickému a praktickému použití. Hepatotoxicita se projevuje zvýšením hladin enzymu alaninaminotransferasy (ALT). Při testování 2446 pacientů se objevila zvýšená hladina ALT nad nejvyšší povolenou normu u 1203 z nich. Trojnásobku nejvyšší povolené normy dosáhly hodnoty ALT u 621 pacientů (37).

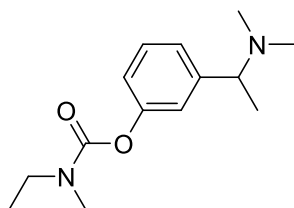
- *Donepezil*



Obrázek 7, Donepezil

Donepezil je derivát piperidinu se systematickým názvem 2[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on. Díky přítomnosti dvou rovin ve struktuře, je diametrálně selektivnější v inhibičních vlastnostech k AChE než k BuChE. (38) Terapeutický účinek má na mírné až střední formy AD; zejména na zlepšení kognitivních funkcí. Jeho nežádoucí účinky nejsou tak závažné jako u takrinu, avšak může se objevit nauzea a gastrointestinální obtíže. (39) Léčivé přípravky s donepezilem jsou v České republice registrovány.

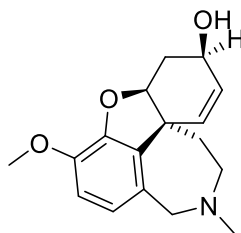
- *Rivastigmin*



Obrázek 8, Rivastigmin

Rivastigmin je pseudo-reverzibilní inhibitor cholinesteras a chemicky se jedná o [3-[(1S)-1-(dimethylamino)ethyl]fenyl]-N-ethyl-N-methylkarbamát. (40) Má inhibiční vlastnosti na oba dva typy cholinesteras, na AChE a BuChE. Používá se v terapii lehkých a středních forem AD. Jeho nežádoucí účinky jsou podobné jako u ostatních inhibitorů cholinesteras, hlavně tedy gastrointestinální obtíže. (41)

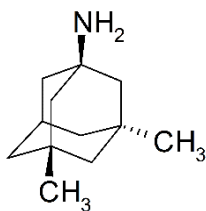
- *Galantamin*



Obrázek 9, Galantamin

Galantamin, chemicky (4a*S*,6*R*,8a*S*)-3-methoxy-11-methyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4a*H*-[1]-benzofuro-[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol se používá v terapii lehkých a středních forem AD. Je to přírodní alkaloid, získávaný z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Nebyl však izolován primárně k terapii AD, primárně se používal v terapii myasthenia gravis a dalších poruch centrálního nervového systému. Inhibuje oba typy cholinesteras, je však mnohem selektivnější k AChE. (42) Dávka galantaminu se během terapie postupně zvyšuje, čímž se také zvyšuje riziko vzniku nežádoucích účinků.

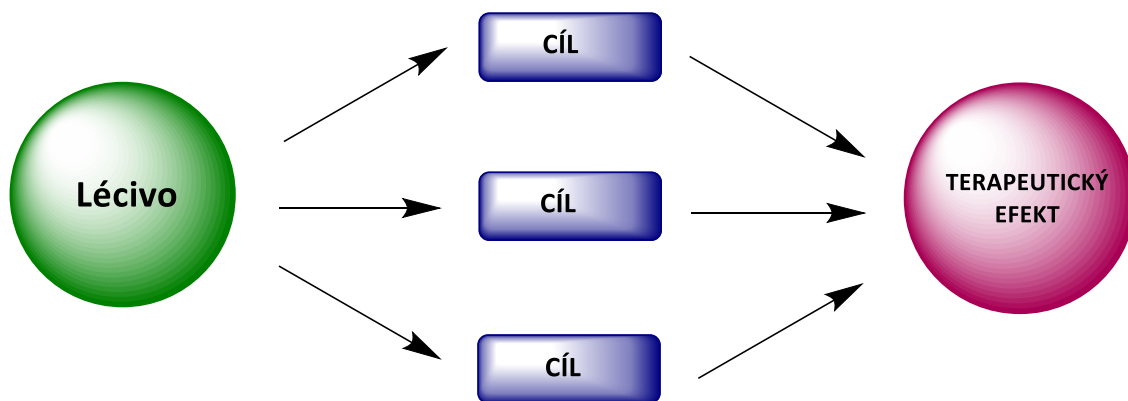
4.5.2. Memantin



Obrázek 10, Memantin

Memantin, chemicky 1-amino-3,5-dimethyladamantan je schválený v Evropě a USA k terapii středně těžkých až těžkých forem AD. Jedná se o antagonistu *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. Zvýšená chronická aktivace NMDA receptorů u pacientů s Alzheimerovou chorobou vede k poškození a následné smrti neuronů v důsledku hyperinfuze vápenatých iontů skrz NMDA receptory. (43) Memantin má schopnost rychle zablokovat tento chronický proces a tím snížit influx Ca^{2+} iontů. (44)

4.5.3. Multi-Target Directed Ligands



Obrázek 11, Multi-Target Directed Ligands

AD je onemocnění multifaktoriální a jeho podstata není momentálně pořádně známa. Dosud registrovaná léčiva se často užívají ve vysokých dávkách a ve vzájemných kombinacích, což má za následek větší pravděpodobnost vzniku nežádoucích účinků. Nyní se terapeutický trend přiklání k možnostem léčby, která by cílila na několik faktorů a symptomů nemoci zároveň. Takovýmto léčivům se říká Multi-Target Directed Ligands (MTDLs). Struktura léčiva se obvykle skládá ze dvou farmakoforů, které jsou různými

způsoby spojeny k sobě. Každá část takového léčiva pak by měla interagovat se specifickým aktivním místem cíleného proteinu a vytvářet tak vícero farmakologických odpovědí. Spojením dvou molekul má výhodu také v tom, že se snižuje riziko farmakokinetických a farmakodynamických interakcí a také riziko interakcí s ostatními léčivy v organismu. Další nespornou výhodou MTDLs je zjednodušení terapie a zvýšení compliance pacienta. (45)

5. PRAKTICKÁ ČÁST

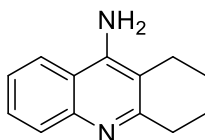
5.1. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit sérii 21 konjugátů, které v sobě kombinují dvě molekuly, a to takrin a benzothiazol. Tyto substrukтуры byly spojovány různě dlouhými uhlíkovými řetězci. Molekuly byly navrženy dle strategie MTDLs; jednak aby inhibovaly AChE i BuChE, a zároveň aby vykazovaly inhibiční účinek na A β a ABAD.

5.2. DESIGN

Pro design molekuly jsme zvolili spojení dvou farmakoforů, které by potenciálně mohly mít pozitivní vliv v terapii AD, a to takrinu a benzathiazolu.

Takrin je reverzibilní inhibitor cholinesteras a byl prvním léčivem zavedeným na trh v terapii AD. Ovšem navzdory jeho závažným nežádoucím účinkům se již nepoužívá (viz kapitola 4.5.1).

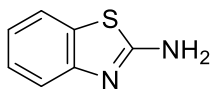


Obrázek 12, Takrin

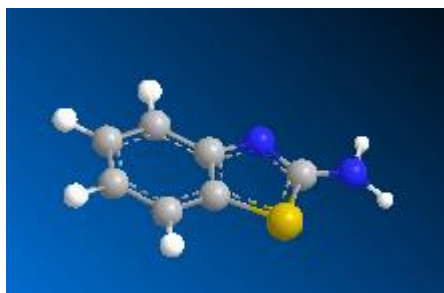
Pro syntézu jsme použili různé deriváty takrinu. 7-Methoxytakrin (7-MEOTA) byl objeven v České republice jako méně toxický derivát takrinu pro terapii AD. (46) 6-Chlortakrin má také vysoký inhibiční potenciál vůči acetylcholinesterasám. (47)

Benzothiazoly jsou planární heterocykly, jejichž různé deriváty se používají jako léčiva v centrálním nervovém systému. (48) Jejich vlastnosti jsou hlavně antikonvulzivní, neuroprotektivní a také bylo experimentálně prokázáno, že deriváty benzothiazolu se vážou na amyloidní struktury v mozku a tím zabraňují protein-protein interakcím. (49) Další důležitou vlastností benzothiazolů je schopnost inhibice mitochondriálního enzymu ABAD. Důsledkem této inhibice dochází ke snižování oxidačního stresu a s tím spojené

neuroprotektce. (50) Všechny tyto vlastnosti by mohly mít zajímavý pozitivní efekt v terapii AD.



Obrázek 13, 2-aminobenzothiazol



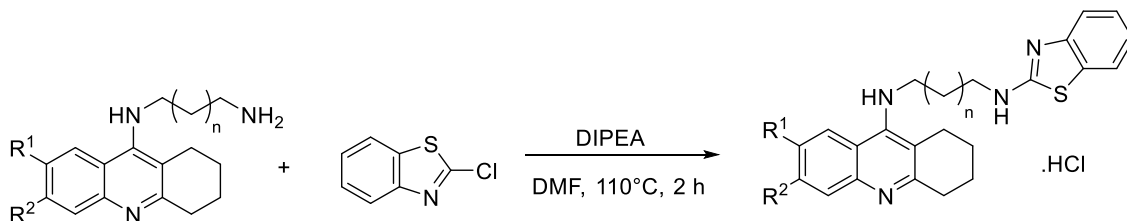
Obrázek 14, 3D Struktura 2-aminobenzothiazolu

5.3. OBECNÉ ÚDAJE O SYNTÉZE

Veškeré chemikálie, které byly použity pro syntézu, byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Česká republika). Reakce byly monitorovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách potažených silikagelem 60 F254 (Merck, Česká republika). Sloupcová chromatografie se prováděla na silikagelu 0.063 – 0.200 mm s porozitou 60 (Merck, Česká republika).

Všechny deriváty byly charakterizovány teplotou tání a NMR spektry. K měření teplot tání byl použit bodotávek PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Německo) bez korekce. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian S500 (při frekvenci 500 MHz pro ^1H NMR spektra a 126 MHz pro ^{13}C NMR spektra; Varian Comp. Palo Alto, USA) nebo na spektrometru Varian Mercury VX BB 300 (při frekvenci 300 MHz pro ^1H NMR spektra a 75 MHz pro ^{13}C NMR spektra; Varian Comp. Palo Alto, USA). Chemické posuny δ jsou udávány v ppm a vztaženy k použitému referenčnímu standardu tetramethylsilanu (TMS).

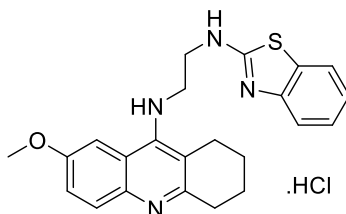
5.4. SYNTÉZA



5.4.1. Obecný postup

2-Chlorbenzothiazol (1 ekvivalent) byl umístěn do baňky opatřené míchadlem a septem. Dále byl do baňky přidán dimethylformamid (DMF) (5 ml) a směs byla míchána v argonové atmosféře. Poté byl do roztoku přidán *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) (2 ekvivalenty). Nakonec byl do reakční směsi přidán příslušný diamin (1 ekvivalent), který byl před tím rozpuštěn v minimálním množství DMF. Finální směs byla zahřívána při 110°C pod zpětným chladičem po dobu dvou hodin. Výsledná reakční směs byla ochlazená na pokojovou teplotu a byla extrahována nejdříve dichlormethanem (CH₂Cl₂) (3 × 100 ml) a poté vodou (1 × 100 ml). Sesbírané organické vrstvy byly sušeny pomocí Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze ethyl-acetát : methanol : 26% vodný roztok amoniaku (60:1:1,2). Získaná čistá báze byla rozpuštěna v methanolu a sycena plynným chlorovodíkem. Odparek byl přelit acetonitrilem za vzniku patřičného hydrochloridu ve formě pevné látky.

- (1) ***N*²-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)ethan-1,2-diamin hydrochlorid**



Žlutý prášek

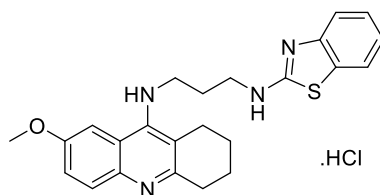
Výtěžek: 38 %

Teplota tání: 186,4 – 195,6°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,73 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,51 – 7,44 (m, 2H), 7,37 – 7,32 (m, 2H), 4,31 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 4,00 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,05 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 2,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,00 – 1,89 (m, 4H),

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,01, 163,15, 156,84, 155,33, 150,34, 132,48, 126,79, 124,05, 123,22, 122,31, 120,84, 118,06, 112,37, 103,43, 56,36, 45,55, 28,04, 25,43, 24,81, 21,89, 20,28.

- (2) ***N*³-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)propan-1,3-diamin-hydrochlorid**



Světle žlutý prášek

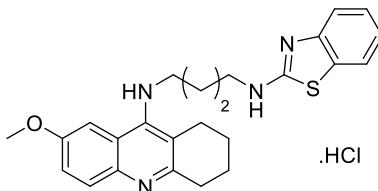
Výtěžek: 25%

Teplota tání: 154,3 – 160,1°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,77 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,54 – 7,47 (m, 2H), 7,43 (dd, *J* = 9,2, 2,5 Hz, 1H), 7,40 – 7,35 (m, 1H), 4,16 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,73 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,99 – 2,94 (m, 2H), 2,86 – 2,81 (m, 2H), 2,31 (p, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,98 – 1,88 (m, 4H),

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,81, 157,05, 151,12, 139,27, 134,14, 129,20, 126,35, 125,45, 124,43, 123,86, 121,71, 118,82, 115,21, 113,33, 104,67, 56,86, 45,67, 30,41, 29,25, 26,17, 23,17, 21,75.

- (3) *N*⁴-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)butan-1,4-diamin hydrochlorid



Žlutý prášek

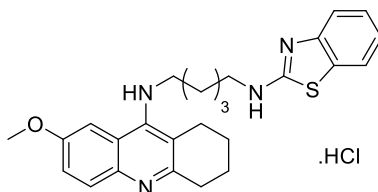
Výtěžek: 16 %

Teplota tání: 173,9 – 176,6 °C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,79 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,70 – 7,63 (m, 2H), 7,58 – 7,48 (m, 2H), 7,45 – 7,35 (m, 2H), 4,02 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,70 – 3,61 (m, 2H), 3,00 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 2,79 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 2,04 – 1,85 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,74, 157,04, 151,00, 139,40, 134,19, 129,18, 126,29, 125,40, 124,43, 123,92, 121,71, 118,90, 115,20, 113,25, 104,61, 56,77, 47,78, 29,30, 28,99, 26,31, 26,02, 23,18, 21,79.

- (4) ***N*⁵-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)pentan-1,5-diamin-hydrochlorid**



Nažloutlý prášek

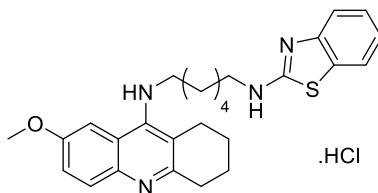
Výtěžek: 21 %

Teplota tání: 176,4 – 180,9°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,79 (dd, *J* = 8,0, 1,1 Hz, 1H), 7,73 – 7,68 (m, 2H), 7,60 – 7,56 (m, 1H), 7,55 – 7,47 (m, 2H), 7,42 – 7,37 (m, 1H), 4,02 – 3,95 (m, 5H), 3,61 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,04 – 2,99 (m, 2H), 2,82 – 2,76 (m, 2H), 1,98 – 1,91 (m, 6H), 1,90 – 1,82 (m, 2H), 1,67 – 1,57 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,79, 157,27, 150,95, 139,55, 134,49, 129,26, 126,33, 125,33, 124,40, 123,86, 121,78, 118,83, 115,28, 113,12, 105,32, 56,75, 48,43, 31,43, 29,30, 28,91, 25,65, 24,87, 23,16, 21,84.

- (5) ***N*⁶-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)hexan-1,6-diamin-hydrochlorid**



Nažloutlý prášek

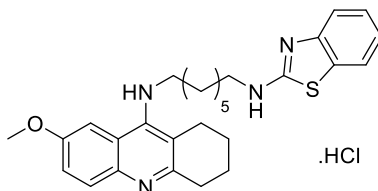
Výtěžek: 27 %

Teplota tání: 149,7 – 154,6°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,81 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,69 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,58 (dd, *J* = 8,1, 1,1 Hz, 1H), 7,55 – 7,49 (m, 2H), 7,41 – 7,36 (m, 1H), 3,99 – 3,94 (m, 5H), 3,58 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,04 – 2,99 (m, 2H), 2,77 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 1,95 (p, *J* = 3,1 Hz, 4H), 1,92 – 1,85 (m, 2H), 1,85 – 1,78 (m, 2H), 1,61 – 1,50 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,65, 157,20, 150,74, 139,48, 134,48, 129,23, 126,29, 125,40, 123,92, 121,75, 118,69, 115,15, 112,92, 105,02, 56,62, 48,52, 31,81, 29,25, 29,14, 27,42, 27,33, 25,66, 23,17, 21,86.

- (6) ***N*⁷-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)heptan-1,7-diamin-hydrochlorid**



Žluté krystaly

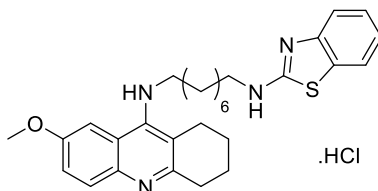
Výtěžek: 33 %

Teplota tání: 121,6 – 128,1°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,77 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,72 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,51 – 7,44 (m, 1H), 7,42 (dd, *J* = 9,2, 2,5 Hz, 1H), 7,37 – 7,31 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,94 – 3,86 (m, 2H), 3,58 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,05 – 2,95 (m, 2H), 2,73 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 1,96 – 1,89 (m, 4H), 1,89 – 1,82 (m, 2H), 1,82 – 1,74 (m, 2H), 1,56 – 1,43 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,40, 156,86, 150,51, 139,30, 134,26, 129,05, 126,14, 125,25, 124,34, 123,84, 121,70, 118,45, 115,11, 112,67, 104,82, 56,73, 48,46, 31,88, 29,78, 29,22, 29,11, 27,54, 25,66, 23,13, 21,80.

- (7) *N*⁸-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)oktan-1,8-diamin-hydrochlorid



Žlutý prášek

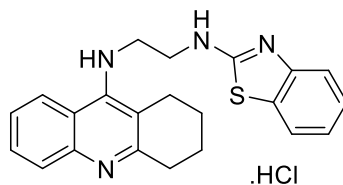
Výtěžek: 15 %

Teplota tání: 142,8 – 151,4°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7,78 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,74 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,59 – 7,55 (m, 1H), 7,52 – 7,45 (m, 2H), 7,37 – 7,32 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,95 – 3,89 (m, 2H), 3,57 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,05 – 2,98 (m, 2H), 2,79 – 2,71 (m, 2H), 1,99 – 1,90 (m, 4H), 1,88 – 1,81 (m, 2H), 1,78 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,53 – 1,38 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169,18, 158,50, 157,04, 150,57, 139,82, 134,39, 129,05, 126,07, 125,33, 124,59, 123,81, 121,73, 118,54, 115,24, 112,76, 104,93, 56,65, 47,54, 40,40, 31,95, 30,15, 30,07, 29,22, 27,66, 27,63, 25,62, 23,14, 21,84.

- (8) ***N*²-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)ethan-1,2-diamin-hydrochlorid**



Hnědý prášek

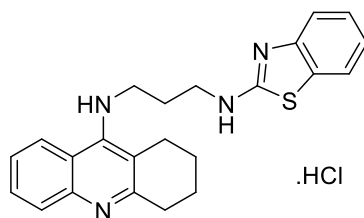
Výtěžek: 6 %

Teplota tání: 148,3 – 156,0°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,44 – 8,41 (m, 1H), 7,80 – 7,72 (m, 3H), 7,58 – 7,54 (m, 1H), 7,54 – 7,46 (m, 2H), 7,38 – 7,33 (m, 1H), 4,38 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 4,04 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,07 – 3,00 (m, 2H), 2,83 – 2,77 (m, 2H), 1,98 – 1,90 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 158,43, 153,00, 140,23, 139,29, 134,11, 129,11, 126,95, 126,20, 125,75, 125,00, 123,75, 120,20, 117,62, 115,61, 114,32, 47,05, 29,42, 25,81, 22,93, 21,65.

- (9) ***N*³-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)propan-1,3-diamin-hydrochlorid**



Žlutý prášek

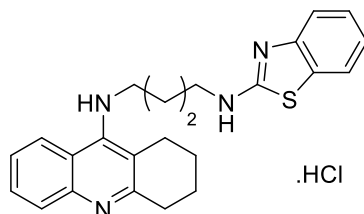
Výtěžek: 22,8 %

Teplota tání: 155,9 - 162,8°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,43 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,83 – 7,74 (m, 2H), 7,69 (dd, *J* = 8,5, 1,1 Hz, 1H), 7,61 – 7,55 (m, 1H), 7,55 – 7,47 (m, 2H), 7,43 – 7,33 (m, 1H), 4,20 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,75 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,03 – 2,93 (m, 2H), 2,82 – 2,73 (m, 2H), 2,38 – 2,28 (m, 2H), 2,00 – 1,90 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,90, 152,01, 139,47, 139,37, 134,03, 129,18, 126,59, 126,33, 124,46, 123,86, 120,04, 116,97, 115,24, 113,28, 46,21, 30,08, 29,31, 25,29, 22,94, 21,72.

- (10) *N*⁴-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)butan-1,4-diamin-hydrochlorid



Hnědý prášek

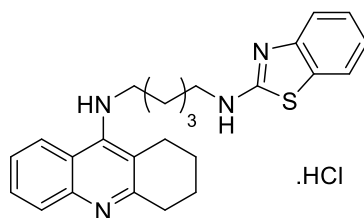
Výtěžek: 36 %

Teplota tání: 146,6 – 150,9°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,42 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,82 – 7,72 (m, 3H), 7,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,54 – 7,47 (m, 1H), 7,37 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,06 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,67 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,04 – 2,96 (m, 2H), 2,78 – 2,69 (m, 2H), 2,07 – 1,99 (m, 2H), 1,98 – 1,89 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,84, 151,88, 139,50, 139,31, 134,00, 129,16, 126,52, 126,35, 126,28, 123,90, 120,05, 117,09, 115,20, 113,08, 48,36, 29,33, 28,63, 26,31, 25,17, 22,96, 21,75.

- (11) ***N*⁵-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)pentan-1,5-diamin-hydrochlorid**



Světle žlutý prášek

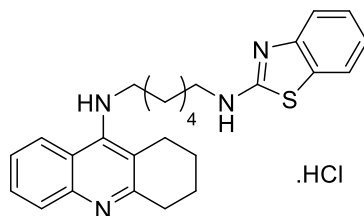
Výtěžek: 38 %

Teplota tání: 222,9 – 231,6°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,42 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,81 (ddd, *J* = 8,0, 5,9, 4,7 Hz, 2H), 7,75 (dd, *J* = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 7,58 (ddd, *J* = 8,4, 7,0, 1,3 Hz, 2H), 7,54 – 7,49 (m, 1H), 7,41 – 7,35 (m, 1H), 4,02 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,67 – 3,58 (m, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,73 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,01 – 1,90 (m, 6H), 1,87 (p, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,67 – 1,58 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,84, 151,68, 139,62, 139,29, 134,01, 129,18, 126,44, 126,40, 126,28, 123,91, 120,06, 116,99, 115,13, 112,89, 48,73, 30,98, 29,31, 28,81, 25,04, 24,79, 22,98, 21,79.

- (12) *N*⁶-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)hexan-1,6-diamin-hydrochlorid



Šedý prášek

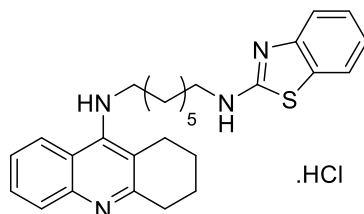
Výtěžek: 20 %

Teplota tání: 140,0 – 143,2°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,39 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,85 – 7,73 (m, 3H), 7,61 – 7,53 (m, 2H), 7,49 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,36 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,04 – 3,93 (m, 2H), 3,59 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,71 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,01 – 1,86 (m, 6H), 1,86 – 1,76 (m, 2H), 1,63 – 1,49 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,78, 151,59, 139,59, 139,28, 133,97, 129,12, 126,44, 126,33, 126,21, 123,88, 120,05, 116,94, 115,12, 112,77, 48,91, 31,33, 29,30, 29,09, 27,30, 27,21, 24,97, 22,96, 21,78.

- (13) ***N*⁷-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)heptan-1,7-diamin-hydrochlorid**



Hnědý prášek

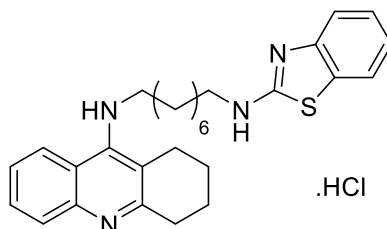
Výtěžek: 19 %

Teplota tání: 132,3 – 136,8°C

¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,38 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,86 – 7,74 (m, 3H), 7,61 – 7,53 (m, 2H), 7,49 (td, *J* = 8,2, 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,35 (ddd, *J* = 8,1, 7,5, 1,3 Hz, 1H), 4,03 – 3,90 (m, 2H), 3,57 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,02 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,69 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 2,01 – 1,91 (m, 6H), 1,91 – 1,82 (m, 2H), 1,82 – 1,72 (m, 2H), 1,58 – 1,41 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,83, 151,57, 139,66, 139,61, 134,01, 129,11, 126,50, 126,30, 126,15, 124,50, 123,87, 120,07, 116,95, 115,19, 112,76, 31,41, 29,77, 29,29, 29,15, 27,58, 27,53, 24,95, 22,97, 21,82.

- (14) ***N*⁸-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)propan-1,3-diamin-hydrochlorid**



Hnědý prášek

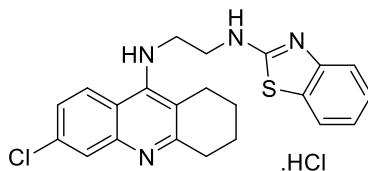
Výtěžek: 14 %

Teplota tání: 58,0 – 67,4°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,39 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,88 – 7,72 (m, 3H), 7,62 – 7,53 (m, 2H), 7,48 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,95 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,56 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,03 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,70 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 2,04 – 1,90 (m, 4H), 1,90 – 1,81 (m, 2H), 1,81 – 1,72 (m, 2H), 1,54 – 1,38 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169,23, 157,88, 151,59, 140,74, 139,68, 134,02, 128,92, 126,48, 126,29, 125,85, 125,02, 123,69, 120,08, 116,97, 115,49, 112,77, 49,10, 47,40, 31,48, 30,10, 30,06, 29,30, 27,64, 27,60, 24,93, 22,97, 21,82.

- (15) ***N*²-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)ethan-1,2-diamin-hydrochlorid**



Světle žlutý prášek

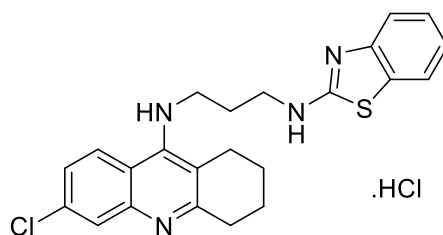
Výtěžek: 31 %

Teplota tání: 180,1 – 189,7°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,50 (bs, 1H), 8,48 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 8,10 (bs, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,46 (t, *J* = 9,9 Hz, 2H), 7,36 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,27 – 4,11 (m, 2H), 4,03 – 3,87 (m, 2H), 2,96 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,66 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 1,85 – 1,65 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,22, 156,18, 151,87, 138,43, 137,03, 127,42, 126,97, 125,46, 123,55, 122,53, 117,94, 115,37, 114,70, 112,72, 46,33, 45,07, 28,14, 24,60, 21,51, 20,18.

- (16) ***N*³-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)propan-1,3-diamin-hydrochlorid**



Hnědý prášek

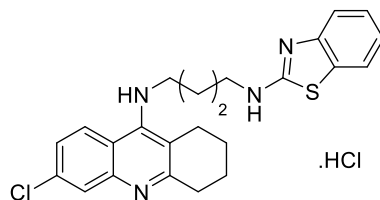
Výtěžek: 30 %

Teplota tání: 214,3 – 221,0°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,40 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,67 – 7,61 (m, 1H), 7,55 – 7,42 (m, 3H), 7,37 – 7,28 (m, 1H), 4,18 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,84 – 3,63 (m, 2H), 3,06 – 2,86 (m, 2H), 2,82 – 2,65 (m, 2H), 2,43 – 2,22 (m, 2H), 2,06 – 1,81 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169,17, 157,67, 152,34, 140,71, 140,10, 139,85, 128,91, 128,64, 126,92, 125,94, 125,13, 123,63, 118,97, 115,58, 115,25, 113,70, 46,39, 44,70, 30,10, 29,34, 25,14, 22,81, 21,63.

- (17) ***N*⁴-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)butan-1,4-diamin-hydrochlorid**



Žlutý prášek

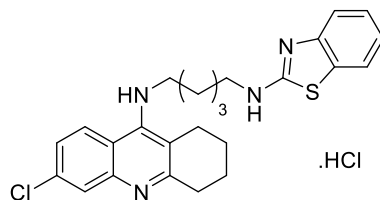
Výtěžek: 30 %

Teplota tání: 190,8 – 200,5°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,45 (dd, *J* = 9,2, 2,4 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,53 – 7,46 (m, 1H), 7,41 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,26 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 3,95 – 3,84 (m, 2H), 3,72 – 3,60 (m, 2H), 2,96 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,64 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 1,89 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,82 – 1,69 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166,84, 155,77, 151,48, 138,93, 137,29, 128,06, 127,63, 125,70, 124,52, 124,41, 123,32, 118,21, 114,69, 114,49, 112,11, 47,00, 45,56, 28,35, 27,22, 25,41, 24,49, 21,77, 20,55.

- (18) N^5 -(benzo[d]thiazol-2-yl)- N^1 -(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)pentan-1,5-diamin-hydrochlorid



Světle žlutý prášek

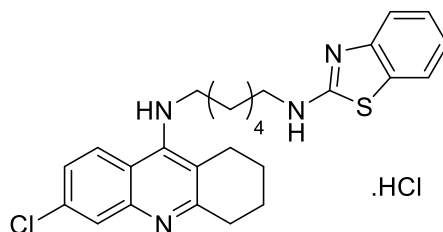
Výtěžek: 31 %

Teplota tání: 207,5 – 217,1°C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,42 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,96 (bs, 1H), 7,84 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,54 (dd, $J = 9,2, 2,1$ Hz, 1H), 7,39 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,24 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 3,90 – 3,79 (m, 2H), 3,64 – 3,52 (m, 2H), 2,97 (t, $J = 5,9$ Hz, 2H), 2,63 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 1,87 – 1,73 (m, 6H), 1,69 (p, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,48 (p, $J = 7,2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,86, 155,75, 151,35, 139,04, 137,33, 128,09, 127,47, 125,65, 124,20, 123,12, 118,27, 115,01, 114,43, 112,00, 47,32, 45,68, 29,53, 28,35, 27,89, 24,38, 23,54, 21,77, 20,59.

- (19) *N*⁶-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)hexan-1,3-diamin-hydrochlorid



Hnědý prášek

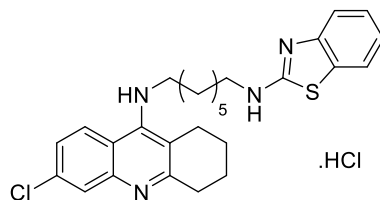
Výtěžek: 23 %

Teplota tání: 224,8 – 234,0°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,40 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,81 – 7,75 (m, 2H), 7,60 – 7,52 (m, 2H), 7,52 – 7,46 (m, 1H), 7,39 – 7,32 (m, 1H), 4,03 – 3,91 (m, 2H), 3,59 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,69 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,00 – 1,93 (m, 4H), 1,93 – 1,87 (m, 2H), 1,86 – 1,79 (m, 2H), 1,62 – 1,50 (m, 4H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169,25, 157,67, 152,06, 140,39, 139,97, 129,06, 128,77, 126,77, 126,06, 124,67, 123,80, 119,09, 115,36, 115,30, 113,31, 47,42, 31,17, 29,32, 29,14, 27,32, 27,23, 24,82, 22,85, 21,72.

- (20) ***N*⁷-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)heptan-1,3-diamin-hydrochlorid**



Hnědé krystaly

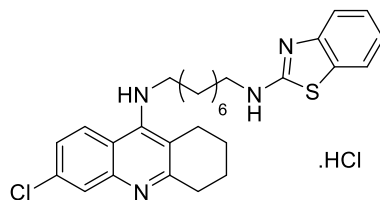
Výtěžek: 26 %

Teplota tání: 65,2 – 74,9°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,40 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,84 – 7,76 (m, 2H), 7,60 – 7,53 (m, 2H), 7,53 – 7,48 (m, 1H), 7,40 – 7,34 (m, 1H), 4,00 – 3,93 (m, 2H), 3,59 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,69 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,01 – 1,91 (m, 4H), 1,91 – 1,84 (m, 2H), 1,80 (p, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,59 – 1,43 (m, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,70, 152,05, 140,42, 139,99, 139,49, 129,16, 128,76, 126,74, 126,21, 124,42, 123,88, 119,09, 115,37, 115,14, 113,29, 49,13, 31,26, 29,77, 29,32, 29,14, 27,58, 27,53, 24,80, 22,85, 21,73.

- (21) ***N*⁸-(benzo[d]thiazol-2-yl)-*N*¹-(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)oktan-1,8-diamin-hydrochlorid**



Žluté krystaly

Výtěžek: 11 %

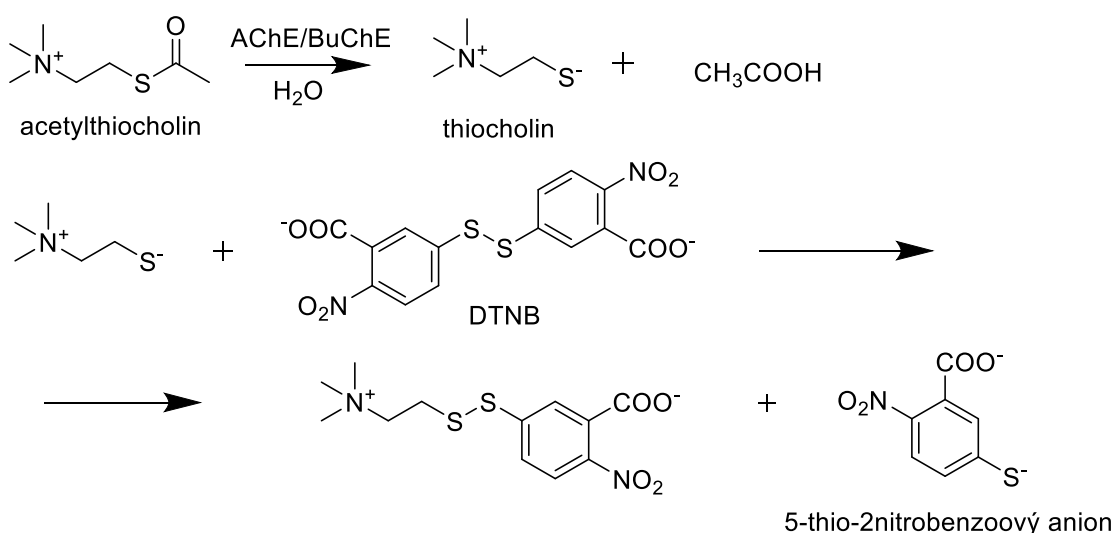
Teplota tání: 156,7 – 174,1°C

¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8,39 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,82 – 7,76 (m, 2H), 7,59 – 7,53 (m, 2H), 7,53 – 7,47 (m, 1H), 7,36 (td, *J* = 7,8, 0,8 Hz, 1H), 3,99 – 3,91 (m, 2H), 3,57 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,01 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 2,01 – 1,91 (m, 4H), 1,86 (p, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,79 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,54 – 1,40 (m, 8H).

¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 157,71, 152,04, 140,43, 139,99, 139,89, 129,09, 128,76, 126,72, 126,10, 124,61, 123,83, 119,10, 115,37, 115,24, 113,28, 31,33, 30,12, 30,07, 29,32, 29,24, 27,65, 27,62, 24,78, 22,85, 21,74.

5.5. BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

Inhibice nových takrin-benzothiazolových derivátů byla stanovena *in vitro* spektrofotometrickou metodou dle Ellmana na lidské rekombinantní AChE a lidské plazmatické BuChE. Princip metody (Obrázek 15) je založen na hydrolýze acetylthiocholinu/butyrylthiocholinu cholinesterasami za vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. Thiocholin pak reaguje s 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou kyselinou) (DTNB) a dochází k uvolnění žlutě zbarveného chromoforu, 5-thio-2-nitrobenzenového aniontu, který je spektrofotometricky detekován. (51)



Obrázek 15, Chemicky znázorněná metoda dle Ellmana

Pro měření cholinesterasové aktivity byl použit multikanálový spektrofotometr Multi – mode microplate reader Synergy 2 (Vermont, USA). Jako květy byly použity destičky s 96 jamkami z tvrzeného polystyrenu (ThermoFisher Scientific, USA). Celé stanovení bylo provedeno za použití 0,1 M pufru $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ – pH 7,4. Cholinesterasy byly naředěny tímto pufrem na aktivitu 2,0 U/ml. K tomuto enzymovému roztoku (10 μl) byl přidán čerstvě připravený roztok, který se skládal z 0,01 M DTNB (20 μl), 0,01 M acetylthiocholin-chloridu (20 μl) nebo butyrylthiocholin-jodidu, 0,1 M fosfátového pufru – pH 7,4 (40 μl) a příslušného inhibitoru (10 μl). Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm při teplotě 37°C po 5 minutové inkubaci

za automatického protřepávání kyvety. Pro každou sloučeninu byla provedena tři nezávislá měření a pro vyhodnocení statistických údajů byl použit software GraphPad Prism 5 (San Diego, USA).

5.5.1. Tabulka naměřených hodnot

Tabulka 1, Výsledky biologického hodnocení

sloučenina	délka řetězce	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)		SI
				AChE	BuChE	
1	2	-O-CH ₃	H	34,660 ± 4,330	1,340 ± 0,055	0,039
2	3	-O-CH ₃	H	10,360 ± 0,929	0,196 ± 0,006	0,019
3	4	-O-CH ₃	H	12,190 ± 0,783	0,462 ± 0,013	0,04
4	5	-O-CH ₃	H	3,918 ± 0,324	1,595 ± 0,023	0,407
5	6	-O-CH ₃	H	1,265 ± 0,226	0,417 ± 0,020	0,329
6	7	-O-CH ₃	H	33,630 ± 17,090	4,188 ± 0,084	0,125
7	8	-O-CH ₃	H	2,823 ± 0,361	1,608 ± 0,060	0,57
8	2	H	H	0,671 ± 0,033	0,064 ± 0,001	0,095
9	3	H	H	1,727 ± 0,076	0,008 ± 0,001	0,005
10	4	H	H	0,525 ± 0,022	0,024 ± 0,002	0,046
11	5	H	H	0,854 ± 0,037	0,011 ± 0,001	0,013
12	6	H	H	0,136 ± 0,006	0,020 ± 0,001	0,147
13	7	H	H	0,089 ± 0,002	0,043 ± 0,002	0,483
14	8	H	H	0,068 ± 0,002	0,483 ± 0,010	7,103
15	2	H	Cl	0,004 ± 0,001	0,799 ± 0,037	199,75
16	3	H	Cl	0,055 ± 0,002	0,041 ± 0,003	0,745
17	4	H	Cl	0,014 ± 0,001	0,382 ± 0,016	27,286
18	5	H	Cl	0,018 ± 0,001	0,049 ± 0,001	2,722
19	6	H	Cl	0,009 ± 0,001	0,259 ± 0,011	28,778
20	7	H	Cl	0,016 ± 0,001	0,270 ± 0,010	16,875
21	8	H	Cl	0,018 ± 0,001	1,325 ± 0,041	73,611
2-Aminobenzothiazol				167,100 ± 46,120	>1000	
7-MEOTA				10,000 ± 0,975	17,56 ± 0,795	1,756
Takrin				0,320 ± 0,014	0,088 ± 0,001	0,275
6-Chlortakrin				0,0176 ± 0,001	1,727 ± 0,098	98,125

6. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo připravit 21 derivátů. Nové struktury byly navrženy na základě předpokladu, že spojením takrinu a benzothiazolu a navázáním různých substituentů na aromatický kruh takrinu, vzniknou nové deriváty, které budou mít multipotentní aktivitu, a jednou z jejich vlastností bude inhibiční aktivita na AChE i BuChE.

Deriváty substituované atomem chloru v poloze 6 (**15–21**) vykazovaly nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AChE (IC_{50} 0,004 – 0,055 μ M). Nejpotentnější sloučeninou vůči AChE byl derivát s dvojuhlíkatým spojovacím řetězcem (**15**, IC_{50} 4 nM). Tato řada chlorderivátů inhibovala i butyrylcholinesterasu s hodnotami IC_{50} 0,041–1,325 μ M. Sloučeniny substituované v poloze 6 chlorem byly rovněž nejselektivnější řadou vůči AChE v porovnání s ostatními. U derivátu nejaktivnějšího vůči AChE (**15**) byl zároveň zjištěn nejvyšší index selektivity (SI 199,75).

V řadě nesubstituovaných derivátů (**8–14**) byla zjištěna výraznější inhibice BuChE (IC_{50} 0,008–0,483 μ M) než AChE, s výjimkou látky **14** (vůči AChE IC_{50} 0,068 μ M, zatímco vůči BuChE IC_{50} 0,483 μ M). Nejaktivnější molekulou na BuChE byl derivát **9** s dvojuhlíkatým spojovacím řetězcem (IC_{50} 8 nM), který inhiboval AChE v podstatně vyšší koncentraci (IC_{50} 1,727 μ M).

Nejméně aktivní řadou byly deriváty s methoxyskupinou v poloze 7 (**1–7**). AChE inhibovaly v rozmezí IC_{50} 1,256 – 34,660 μ M, BuChE v rozmezí IC_{50} 0,196 – 4,188 μ M. V této řadě inhiboval AChE nejvíce derivát **5** (IC_{50} 1,265 μ M) a BuChE derivát **2** (IC_{50} 0,196 μ M). Obecně byla tato série také selektivnější vůči BuChE.

Téměř všechny připravené konjugáty vykazovaly lepší inhibiční aktivitu než standard 7-MEOTA. Některé chlorderiváty (**15, 17, 19, 20**) vykazovaly dokonce lepší inhibiční aktivitu než standard 6-chlortakrin.

Co se týče délky spojovacího řetězce, jako nejvýhodnější se jevílo spojovat oba farmakofory uhlíkatým řetězcem o délce dvou až tří uhlíků.

7. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce bylo připraveno 21 nových derivátů kombinujících takrin a benzothiazol. Ke stanovení inhibičních aktivit vůči AChE a BuChE bylo provedeno *in vitro* testování těchto derivátů Ellmanovou metodou a výsledky byly porovnány s takrinem, 7-MEOTA a 6-chlortakrinem. Veškeré hodnoty IC_{50} připravených konjugátů se pohybovaly v mikromolárních až nanomolárních oblastech. Z výsledků biologického hodnocení nelze vyvodit přesnější závěry o vztahu inhibiční aktivity a délky spojovacího řetězce. Chlorsubstituce na akridinu v poloze 6 měla pozitivní vliv na inhibice AChE, zatímco sloučeniny s nesubstituovaným tetrahydroakridinem působily nejlépe na BuChE. Substituce akridinu methoxyskupinou v poloze 7 se neosvědčila. Nejaktivnější deriváty s vyšší selektivitou k AChE (**2**, **9** a **15**) měly v molekule dvoj- až tříuhlíkatý spojovací řetězec. Nejlepším derivátem se jevil chlorderivát č. 15, jelikož byl nejaktivnější ze všech ostatních derivátů oproti AChE (IC_{50} 0,004 μ M) a zároveň měl nejvyšší index selektivity ($SI=199,75$). Tato a další látky budou podrobeny dalšímu *in vitro* testování na vybraných cílových proteinech k ověření jejich multipotentního profilu.

8. REFERENCE

1. HUANG, Yadong a Lennart MUCKE. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. 16.3.2012, roč. 148, č.6, s. 1204-1222.
2. ZEC, Ronald F a Nicole R BURKETT. Non-pharmacological and pharmacological treatment of the cognitive and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *NeuroRehabilitation*. 2008, roč. 23, č. 5, s. 425–438.
3. SOSA-ORTIZ, Ana Luisa, Isaac ACOSTA-CASTILLO a Martin J PRINCE. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. *Archives of medical research* [online]. 2012, roč. 43, č. 8, s. 600–8 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 1873-5487. Dostupné z: doi:10.1016/j.arcmed.2012.11.003
4. *Alzheimer's Disease International* [online]. 2016 [vid. 1. leden 2016]. Dostupné z: doi:http://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/
5. ČESKÁ ALZHEIMEROVSKÁ SPOLEČNOST. [online]. 2016. Dostupné z: www.alzheimer.cz
6. ATES, M P, Y KARAMAN, S GUNTEKIN a M A ERGUN. Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience* [online]. 2016, roč. 325, s. 124–131 [vid. 11. duben 2016]. ISSN 1873-7544. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.051
7. BIESELS, G J, S STAEKENBORG, E BRUNNER, C BRAYNE a P SCHELTENS. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet neurology* [online]. 2006, roč. 5, č. 1, s. 64–74. ISSN 1474-4422; 1474-4422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(05)70284-2
8. WENG, Pei-Hsuan, Jen-Hau CHEN, Ta-Fu CHEN, Yu SUN, Li-Li WEN, Ping-Keung YIP, Yi-Min CHU a Yen-Ching CHEN. Interactions between ApoE ε4 status and hypercholesteremia on response to acetylcholinesterase inhibitor in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2015, roč. 11, č. 7, s. P728 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 15525260. Dostupné z: doi:10.1016/j.jalz.2015.06.1626
9. KAPASI, A a J A SCHNEIDER. Vascular contributions to cognitive impairment,

- clinical Alzheimer's disease, and dementia in older persons. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2016, roč. 1862, č. 5, s. 878–86 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.023
10. WEINER, Michael W, Dallas P VEITCH, Jacqueline HAYES, Thomas NEYLAN, Jordan GRAFMAN, Paul S AISEN, Ronald C PETERSEN, Clifford JACK, William JAGUST, John Q TROJANOWSKI, Leslie M SHAW, Andrew J SAYKIN, Robert C GREEN, Danielle HARVEY, Arthur W TOGA, Karl E FRIEDL, Anthony PACIFICO, Yvette SHELINE, Kristine YAFFE a Brian MOHLENOFF. Effects of traumatic brain injury and posttraumatic stress disorder on Alzheimer's disease in veterans, using the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* [online]. 2014, roč. 10, č. 3 Suppl, s. S226–35 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 1552-5279. Dostupné z: doi:10.1016/j.jalz.2014.04.005
 11. HERBERT, Joe a Paul J. LUCASSEN. Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis – What do we need to know? *Frontiers in Neuroendocrinology* [online]. 2015 [vid. 7. leden 2016]. ISSN 00913022. Dostupné z: doi:10.1016/j.yfrne.2015.12.001
 12. RAO, A. T., A. J. DEGNAN a Lucien M. LEVY. Genetics of Alzheimer disease. B.m.: *American Society of Neuroradiology*. 2014, roč. 35, č.3, s.457-458, doi: 10.3174/ajnr.A3545
 13. MAYEUX, Richard a Yaakov STERN. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, roč. 2, č. 8. , doi: 10.1101/cshperspect.a006239
 14. SERRANO-POZO, Alberto, Matthew P. FROSCH, Eliezer MASLIAH a Bradley T. HYMAN. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011, roč. 1, č. 1, s. 1-8, doi: 10.1101/cshperspect.a006189
 15. BARTUS, R T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental neurology* [online]. 2000, roč. 163, s. 495–529. ISSN

0014-4886. Dostupné z: doi:10.1006/exnr.2000.7397

16. 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, and Psychiatry* [online]. 1999, roč. 66, s. 137–147. ISSN 0022-3050. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.66.2.137
17. THIEL, Christiane M. Cholinergic modulation of learning and memory in the human brain as detected with functional neuroimaging. *Neurobiology of Learning and Memory* [online]. 2003, roč. 80, č. 3, s. 234–244 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 10747427. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-7427(03)00076-5
18. BIAGIONI, S., A. M. TATA, A. DE JACO a G. AUGUSTI-TOCCO. Acetylcholine synthesis and neuron differentiation. *International Journal of Developmental Biology*. 2000, roč. 44, č. 6, s. 689–697.
19. LULLMANN HEINZ, MOHR KLAUS, Hein Lutz. Barevný Atlas Farmakologie. *Grada publishing*, 2004, s.108-109, ISBN: 978-80-247-1672-5
20. CUMMINGS, Jeffrey L, Communicative DISORDERS a Related Disorders AS-. Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 2004, č.351, s. 56–67.
21. ANAND, Preet a Baldev SINGH. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmaceutical Research*, 2013, roč.36, č.4, s. 375-399.
22. PIDRMAN Vladimír, LÁTALOVÁ Klára. Inhibitory cholinesteráz v léčbě demence - jejich bezpečnost a možná úskalí. *Interní medicína pro praxi*, 2003, č.8, s. 18-22.
23. ALLISON GRANBERRY. Acetylcholinesterase: A Story of Substrate Traffic and Inhibition by Green Mamba Snake Toxin [online]. 2015. Dostupné z: doi:http://proteopedia.org/wiki/index.php/Group:SMART:Acetylcholinesterase:A_Story_of_Substrate_Traffic_and_Inhibition_by_Green_Mamba_Snake_Toxin
24. ZHOU, Yanzi, Shenglong WANG a Yingkai ZHANG. Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM

- Molecular Dynamics Simulations. *The journal of physical chemistry. B* [online]. 2010, roč. 114, č. 26, s. 8817–8825. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp104258d
25. DVIR, Hay, Israel SILMAN, Michal HAREL, Terrone L. ROSENBERRY a Joel L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*. 2010, roč. 187, č. 1-3, s. 10–22.
 26. HARDY, J A a G A HIGGINS. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 1992, roč.256, č.5054, s.184-185.
 27. LAFERLA, Frank M., Kim N. GREEN a Salvatore ODDO. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* [online]. 2007, roč. 8, č. 7, s. 499–509. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn2168
 28. MARQUES, Alexandra T, Pedro A FERNANDES a Maria João RAMOS. Molecular dynamics simulations of the amyloid-beta binding alcohol dehydrogenase (ABAD) enzyme. *Bioorganic & medicinal chemistry* [online]. 2008, roč. 16, č. 21, s. 9511–8 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 1464-3391. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2008.09.043
 29. KISSINGER, Charles R, Paul A REJTO, Laura A PELLETIER, James A THOMSON, Richard E SHOWALTER, Melwyn A ABREO, Charles S AGREE, Stephen MARGOSIAK, Jerry J MENG, Robert M AUST, Darin VANDERPOOL, Bin LI, Anna TEMPCZYK-RUSSELL a J Ernest VILLAFRANCA. Crystal structure of human ABAD/HSD10 with a bound inhibitor: implications for design of Alzheimer's disease therapeutics. *Journal of molecular biology* [online]. 2004, roč. 342, č. 3, s. 943–52 [vid. 1. květen 2016]. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2004.07.071
 30. MANDELKOW, Eva Maria a Eckhard MANDELKOW. Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012, roč.2, č.7, doi: 10.1101/cshperspect.a006247
 31. CLAVAGUERA, Florence, Hiroyasu AKATSU, Graham FRASER, R Anthony

- CROWTHER, Stephan FRANK, Jürgen HENCH, Alphonse PROBST, David T WINKLER, Julia REICHWALD, Matthias STAUFENBIEL, Bernardino GHETTI, Michel GOEDERT a Markus TOLNAY. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2013, roč. 110, č. 23, s. 9535–40 [vid. 14. duben 2016]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1301175110
32. BAJGAR, Jiri. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. 2004, roč. 38, s. 151–216. ISSN 0065-2423.
33. GIACOBINI, Ezio. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological research* [online]. 2004, roč. 50, č. 4, s. 433–440. ISSN 1043-6618 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2003.11.017
34. TAYEB, Haythum O, Hyun Duk YANG, Bruce H PRICE a Frank I TARAZI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics* [online]. 2012, roč. 134, č. 1, s. 8–25. ISSN 1879-016X (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2011.12.002
35. PURANDARE, N. Drug Treatments and Dementia (Bradford Dementia Group, Good Practice Guides; 1): By Stephen Hopker. *Psychiatric Bulletin* [online]. 2000, roč. 24, č. 6, s. 239a–239 [vid. 13. květen 2016]. ISSN 09556036. Dostupné z: doi:10.1192/pb.24.6.239-a
36. QIZILBASH, N, J BIRKS, J LÓPEZ-ARRIETA, S LEWINGTON a S SZETO. Tacrine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Of Systematic Reviews* (Online) [online]. 2000, č. 2, s. CD000202. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=10796507&site=ehost-live>
37. WATKINS, P B, H J ZIMMERMAN, M J KNAPP, S I GRACON a K W LEWIS. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *The Journal of the American Medical Association*. 1994, roč. 271, č. 13, s. 992–998.

38. ASIRI, Yousif A. a Gamal A.E. MOSTAFA. Donepezil. In: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology [online]. 2010, s. 117–150.
Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512510350035>
39. BRYSON, H M a P BENFIELD. Donepezil. *Drugs & aging*. 1997, roč. 10, č. 3, s. 234. ISSN 1170-229X.
40. BAR-ON, P, C B MILLARD, M HAREL, H DVIR, A ENZ, J L SUSSMAN a I SILMAN. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine,. *Biochemistry* [online]. 2002, roč. 41, č. 11, s. 3555–3564. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi020016x
41. JIRÁK, Roman a Kateřina VNOUČKOVÁ. Rivastigminum. *Remedia*. 2003, roč. 13, s. 372–378.
42. HARVEY, Alan L. The pharmacology of galanthamine and its analogues. *Pharmacol Ther*. 1995, roč.68, č.1, s.113-128.
43. LIPTON, Stuart A. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRX* [online]. nedatováno, roč. 1, č. 1, s. 101–110. ISSN 1545-5343. Dostupné z: doi:10.1602/neurorx.1.1.101
44. PETROVIČ, Miloš, Miloslav SEDLÁČEK, Martin HORÁK, Ladislav VYKLIČKÝ a Fyziologický AVČR. Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie*, 2004, č.18, s. 81-89.
45. CAVALLI, Andrea, Maria Laura BOLOGNESI, Anna MINARINI, Michela ROSINI, Vincenzo TUMIATTI, Maurizio RECANATINI a Carlo MELCHIORRE. Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, roč. 51, č. 3, s. 347–372. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm7009364
46. PATOČKA, BIELAVSKY, FUSEK. Advances in synthesis of tacrine derivatives as potential-drugs for treatment of Alzheimer's disease. *Homeost. Health Dis*.

1994, roč. 35, s. 299–301.

47. KOCHI, Akiko, Todd J ECKROAT, Keith D GREEN, Abdelrahman S MAYHOUB, Mi Hee LIM a Sylvie GARNEAU-TSODIKOVA. A novel hybrid of 6-chlorotacrine and metal-amyloid-[small beta] modulator for inhibition of acetylcholinesterase and metal-induced amyloid-[small beta] aggregation. *Chem. Sci.* [online]. 2013, roč. 4, č. 11, s. 4137–4145. Dostupné z: doi:10.1039/C3SC51902C
48. DOLEŽAL, Martin. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. 2014. vyd. *Praha: Karolinum*, 2014. ISBN 9788024623825.
49. CHOI, Myung Min, Eun A. KIM, Hoh Gyu HAHN, Kee DAL NAM, Seung Ju YANG, Soo Young CHOI, Tae Ue KIM, Sung Woo CHO a Jae Wan HUH. Protective effect of benzothiazole derivative KHG21834 on amyloid β -induced neurotoxicity in PC12 cells and cortical and mesencephalic neurons. *Toxicology* [online]. 2007, roč. 239, č. 3, s. 156–166. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2007.07.010
50. HROCH L., AITKEN L, BENEK O., DOLEZAL M., KUCA K., GUNN-MOORE F., Musilek K. Benzothiazoles - Scaffold of Interest for CNS Targeted Drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2015, roč. 22, s. 730–747.
51. REINER, E, G SINKO, M SKRINJARIĆ-SPOLJAR a V SIMEON-RUDOLF. Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2000, roč. 51, č. 1, s. 13–18.