

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Multipotentní sloučeniny v terapii Alzheimerovy choroby

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)



PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

2020

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem a že jsem všechny použité informační zdroje, z kterých jsem čerpal, v textu řádně citoval a uvedl je seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 31.8.2020

Jan Korábečný

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svým kolegům a spoluautorům předložených publikací za jejich spolupráci a podporu.

Velké poděkování patří zejména mým mentorům a nejbližším spolupracovníkům v čele s prof. Ing. Kamilem Kučou, Ph.D., dále prof. PharmDr. Kamilovi Musílkovi, Ph.D., plk. doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D., bez kterých by práce zde předkládaná nemohla vzniknout.

Z dalších bych rád vyzvednul kolegy z Katedry toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany), Centra biomedicínského výzkumu (Fakultní nemocnice Hradec Králové), Katedry chemie (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Hradec Králové), Katedry organické a bioorganické chemie, Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a Katedry farmaceutické botaniky (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové) a oddělení Experimentální neurobiologie a Translačních neurověd (Národní ústav duševního zdraví v Klecanech).

Řada výstupů vznikla ve spolupráci se zahraničními institucemi, kde jsem vykonával studijní/pracovní stáže. Poděkování tímto patří následujícím: RNDr. Slávka Hamuřáková, Ph.D. (Ústav chemických věd, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šáfárika, Slovenská republika), prof. Pierre Yves Renard (Katedra chemie, COBRA, Univerzita v Rouen, Francie), Dr. Young-Sik Jung (Korejský výzkumný institut chemických technologií, Daejeon, Jižní Korea), prof. Ulrike Holzgrabe (Institut farmacie a potravinářské chemie, Univerzita ve Würzburgu, Spolková republika Německo) a prof. Barbara Malawska (Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Jagellonská Univerzita, Krakov, Polská republika). Zvláštní poděkování pak patří prof. Maria Laura Bolognesi a prof. Manuela Bartolini (Katedra farmacie a biotechnologie, Univerzita v Bologni, Italská republika) a prof. José-Luis Marco Contellesovi (Institut organické chemie, Španělský národní výzkumný ústav, Madrid, Španělské království), s kterými řadu let probíhá plodná spolupráce na společných vědecko-výzkumných projektech.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým blízkým zejména svým rodičům a manželce Pavle a dětem za veškerou podporu.

V Hradci Králové 31. 8. 2020

PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Obsah

| | | |
|-------|---|-----|
| 1 | Úvod | 1 |
| 1.1 | Alzheimerova choroba | 1 |
| 1.1.1 | Patofyziologie onemocnění | 1 |
| 1.1.2 | Epidemiologické údaje a farmakoekonomická data..... | 10 |
| 1.2 | Současná léčba | 10 |
| 1.3 | Navrhované přístupy léčby..... | 10 |
| 1.4 | Multipotentní sloučeniny | 12 |
| 2 | Komentář k předloženým pracím | 16 |
| 2.1 | Multipotentní léčiva na bázi inhibitorů cholinesteras..... | 17 |
| 2.2 | Přírodní a semisyntetické deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby..... | 47 |
| 3 | Souhrn, závěry a možné směry dalšího výzkumu..... | 58 |
| 4 | Seznam zkratk..... | 62 |
| 5 | Literatura | 65 |
| 5.1 | Citace vlastních prací..... | 65 |
| 5.1.1 | Původní práce | 65 |
| 5.1.2 | Přehledové práce..... | 69 |
| 5.2 | Citace literatury ostatních autorů | 72 |
| 6 | Podíl předkladatele habilitační práce na jednotlivých publikacích | 92 |
| 6.1 | Původní práce | 92 |
| 6.2 | Přehledové práce..... | 93 |
| 6.3 | Práce nezahrnuté v habilitační práci | 94 |
| 6.3.1 | Kapitoly v knize..... | 94 |
| 6.3.2 | Monografie | 94 |
| 6.3.3 | Práce publikované v recenzovaných časopisech bez IF..... | 94 |
| 6.3.4 | Práce publikované v časopisech s IF..... | 95 |
| 6.3.5 | Patenty a užité vzory | 104 |
| 7 | Soubor publikovaných vědeckých prací | 105 |

1 Úvod

Předkládaná habilitační práce shrnuje výsledky dosažené v oblasti výzkumu a vývoje multipotentních sloučenin s možnou implikací pro terapii Alzheimerovy choroby. Práce je zaměřena zejména na návrh těchto sloučenin a vztah mezi strukturou a účinkem v rámci jednotlivých sérií. Z těchto důvodů je úvodní část věnována obecným poznatkům o nemoci, současné léčbě a vývoji multipotentních léčiv pro Alzheimerovu nemoc. Vlastní komentář je rozdělen na dvě části; první se zabývá čistě syntetickými deriváty na bázi malých molekul („Multipotentní léčiva na bázi inhibitorů cholinesteras“) a druhá kapitola je věnována alkaloidním strukturám a jejich semisyntetickým derivátům („Přírodní a semisyntetické deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby“). Veškeré přílohy habilitační práce jsou členěny na původní (PI-PXXIX) a souhrnné (SI-SXXI) práce, které jsou postupně uváděny a komentovány v textové části.

1.1 Alzheimerova choroba

1.1.1 Patofyziologie onemocnění

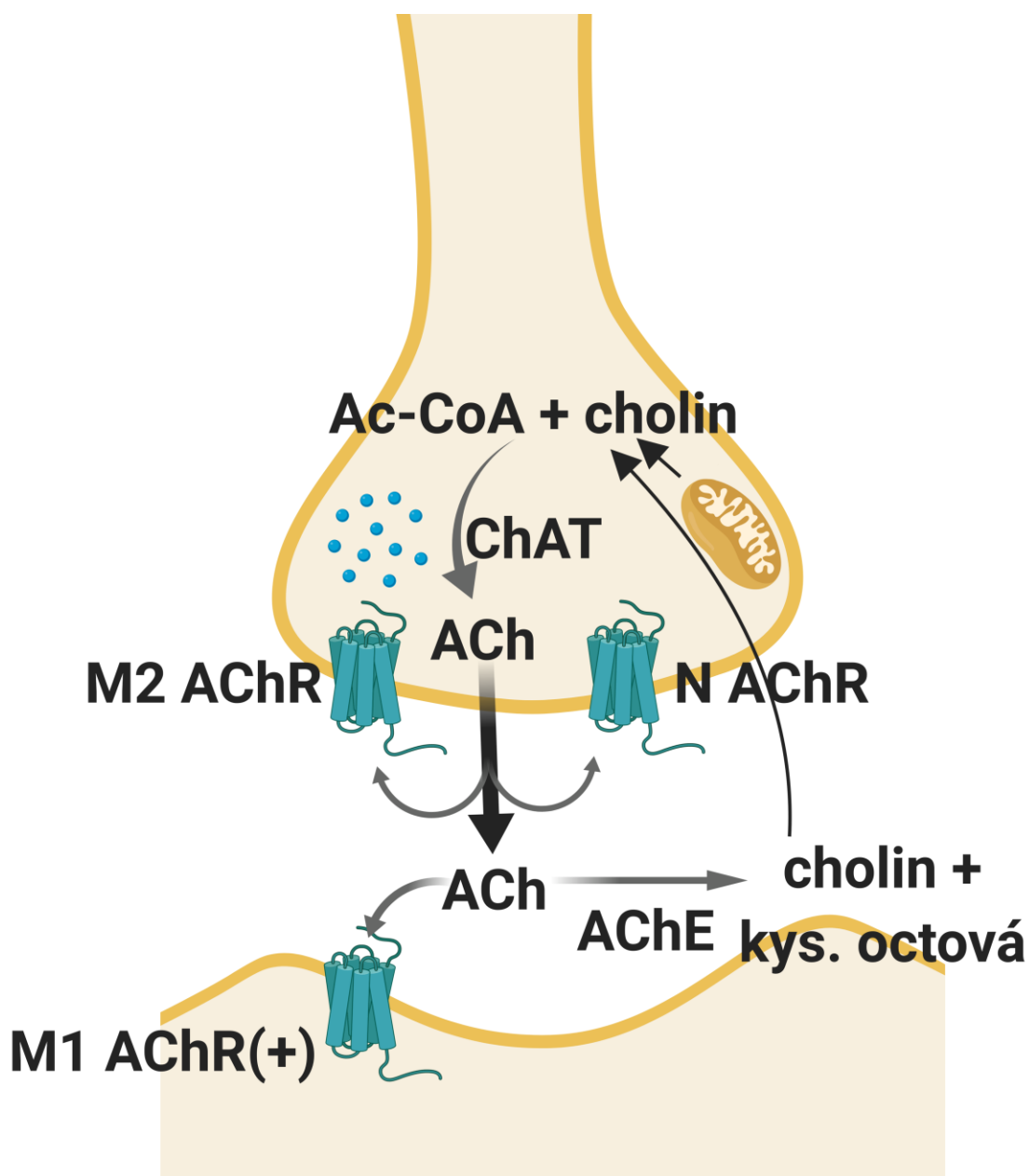
Alzheimerova demence (AD) byla poprvé popsána Aloisem Alzheimerem na konferenci v Tubingenu (Německo) roku 1906.¹ AD je považována za chronické a progresivní onemocnění mozku s neznámou etiologií. Smrt nastává obvykle 3 až 9 let od objevení prvních příznaků. V klinickém obrazu pacientů je pozorováno progresivní zhoršování paměťových funkcí, jako jsou schopnost zapamatování si, myšlení, chápání, učení, jazykové dovednosti, a prostorová a časová desorientace. Je také nutno podotknout, že asymptomatická fáze onemocnění začíná již přibližně 20 až 30 let před projevem prvotních symptomů nemoci. Za více než 100 let od prvního případu AD popsaného v roce 1906 byl učiněn velký pokrok při výzkumu patofyziologických pochodů tohoto onemocnění. Důležitou roli hraje zejména přítomnost některých aberantních proteinů, amyloidu beta (A β) a tau proteinu, dále oxidativní poškození buněčných struktur z důvodu nedostatečné kapacity antioxidačního obranného systému, zánětlivé procesy, deregulovaný tok některých iontů a nerovnováha některých neurotransmiterů.

AD je multifaktoriálním onemocněním, to znamená, že na jeho vzniku se podílí více faktorů současně. Mezi hlavní rizikový faktor patří věk. V ohrožení jsou zvláště lidé starší 65 let, u kterých je prevalence tohoto onemocnění odhadována okolo 4,4 % v Evropě.² Alarmující nárůst je pak pozorován u populace starší 85 let, kdy téměř každý třetí jedinec je v ohrožení. Další rizikový faktor je připisován genetické informaci. Zde hraje zásadní roli alela $\epsilon 4$ pro apolipoprotein E (APOE $\epsilon 4$).³ Samotný apolipoprotein E (ApoE) je zodpovědný za regulaci hladin cholesterolu a za lipidovou homeostázu tím, že umožňuje transport lipidů do různých tkání a buněk.⁴ Gen pro APOE existuje ve třech polymorfních variantách – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$. Nejvíce zastoupenou variantou v populaci je varianta $\epsilon 3$ (77,9 %), následována $\epsilon 4$ (13,7 %) a $\epsilon 2$ (8,4 %). APOE $\epsilon 4$ přispívá ve zvýšené míře k ukládání A β do senilních plaků. Přítomnost této alely vede k hyperlipidemii a hypercholesterolemii.⁵ Mutace genu pro presenilin-1 (PSEN1) je další rizikovou složkou v mozaice AD.⁶ Skupina presenilinů se řadí k transmembránovým proteinům, které jsou součástí katalytické jednotky γ -sekretasy, která se podílí na zpracování amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Činnost γ -sekretasy předchází štěpení APP pomocí β -sekretasy (BACE-1). Celý tento proces je označován jako amyloidogenní cesta, která vede ke vzniku monomerních jednotek A β .⁷ V současnosti bylo identifikováno více než 150 mutací PSEN1 a 25 mutací genu pro

APP (APP), které přispívají k nadměrné produkci A β .⁶ Mezi další rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost vzniku a rozvoje AD patří traumata v oblasti hlavy, nedostatečná funkce kardiovaskulárního systému (oběhové a srdeční vady), diabetes mellitus druhého typu, špatné stravovací návyky, nadměrná konzumace alkoholu a tabákových výrobků. Naproti tomu je potřeba zdůraznit, že míru rizika vzniku AD lze ovlivnit např. středomořskou dietou (ryby, zelenina), příjmem některých antioxidantů (karotenoidy, vitamin C), fyzickou aktivitou, edukační činností aj.⁸

Cholinergní hypotéza

Cholinergní transmise hraje klíčovou roli v pamatování, učení, pozornosti a jiných mozkových procesech. Acetylcholin (ACh) je hlavní mozkový neurotransmitter vyskytující se zejména v oblastech kortexu, bazálních ganglií a bazální části předního mozku.⁹ Obr. 1 ilustruje syntézu, uvolňování a zpětné vychytávání tohoto neuromediátoru. Cholinergní hypotéza AD byla poprvé představena v 70. letech 20. století.¹⁰ Předpokladem pro vznik této teorie byla snížená cholinergní aktivita pozorovaná u pacientů trpících AD. Celý koncept byl následně ověřen behaviorálními studiemi na zvířatech, kterým bylo aplikováno anticholinergikum skopolamin (nespecifický blokátor muskarinových receptorů). Tento experiment navodil u zvířat symptomy podobné těm, které se vyskytují u pacientů s AD. Naproti tomu, fysostigmin jako představitel skupiny parasymptomimetik byl schopen potlačit účinky skopolaminu a obnovit tak kognitivní funkce studovaných zvířat do původního stavu před aplikací anticholinergika.¹¹ Na základě těchto bylo uvedeno několik nepřímých parasymptomimetik, které jsou dodnes výhradní skupinou léčiv používanou v symptomatické léčbě tohoto onemocnění (bližší pojednání bude uvedeno v kapitole „1.2 Současná léčba“).

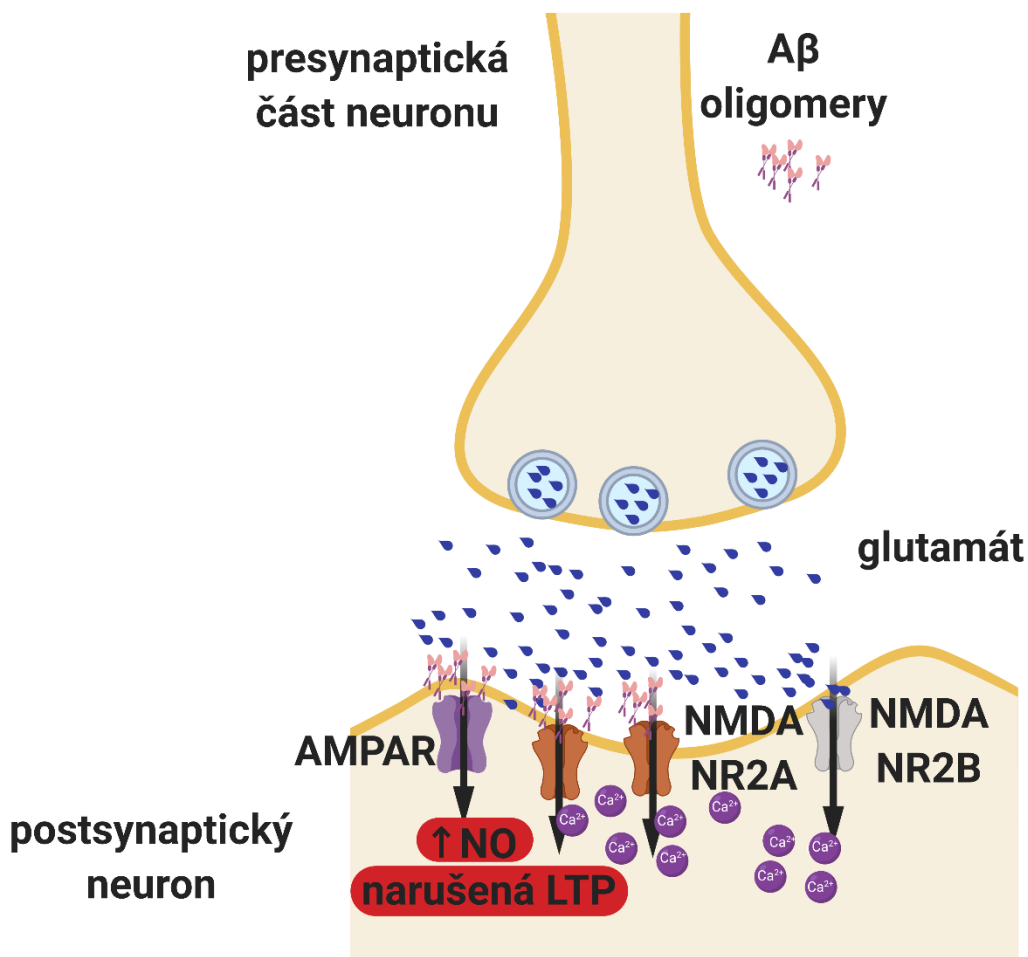


Obr. 1. Mechanismus transdukce cholinergního signálu mezi neurony. Cholin představuje klíčový substrát pro syntézu ACh. Další nezbytnou komponentou pro syntézu ACh je acetylkoenzym A (Ac-CoA), který je produkován Krebsovým cyklem. Cholinacetyltransferasa (ChAT, E.C. 2.3.1.6) generuje z těchto prekurzorů samotný ACh. Po uvolnění ACh do synaptické štěrbině dochází k aktivaci postsynaptického muskarinového receptoru (M1 AChR) a tím je zajištěn přenos signálu z jednoho neuronu na další. M2 AChR a nikotinové receptory (N AChR) jsou lokalizovány presynapticky. Hladina ACh v presynaptické štěrbině je regulována činností enzymu acetylcholinesterasy (AChE, E.C. 3.1.1.7), který rozkládá ACh zpět na cholin a kyselinu octovou. Cholin je následně resorbován zpět a využit pro další syntézu ACh. Převzato a modifikováno z ref.¹²

Hypotéza glutamátergí hyperfunkce

Vedle cholinergního přenosu je narušena i tzv. glutamátergí transmise. Glutamát, který je distribuován po celém centrálním nervovém systému (CNS), je intracelulární excitační aminokyselinou. Podílí se na synaptické plasticitě, tedy fundamentálním procesu souvisejícím s učení a pamětí. Glutamátergí transmise je řízena, mimo jiné, přes

tzv. *N*-methyl-*D*-aspartátové (NMDA) receptory (NMDAR), které patří do skupiny napětově řízených receptorů. Vedle NMDAR existují ještě ionotropní transmembránové receptory označované jako AMPA receptory (AMPA; zkratka AMPA je odvozena od syntetického agonisty tohoto receptoru, tedy α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny).¹³ V klidovém stavu má NMDAR membránový potenciál okolo -70 mV a je prakticky nepropustný pro vápenaté kationty z důvodu usazení hořečnatých kationtů v póru receptoru. Při indukci (nárůstu membránového potenciálu) dochází k depolarizaci membrány, odplavení hořečnatých kationtů a aktivaci receptoru vtokem vápenatých kationtů.¹⁴ Vlivem degenerativních změn je narušena signalizace přes NMDAR. Společným rysem je nadměrná a trvalá stimulace NMDAR zvýšenou hladinou glutamátu (Obr. 2). To vede k fenoménu označovanému jako excitotoxicita, který zahrnuje poškození nervových buněk a neurologické trauma. Pomalu se rozvíjející symptomy neurodegenerace jsou asociovány zejména s nadměrným vstupem vápenatých iontů skrze NMDAR.¹⁵ Provázanost jednotlivých patologických kaskád u AD navíc podtrhuje fakt, kdy samotný A β zvyšuje napětí na NMDAR a současně zapříčiňuje tzv. sekundární toxicitu.¹⁶ Nadměrné stimulaci NMDAR lze zabránit využitím specifických antagonistů. Jako nekompetitivní antagonist NMDAR je v současné době používán pro středně-těžká a těžká stádia onemocnění AD memantin (bližší pojednání bude uvedeno v kapitole „1.2 Současné léčba“).

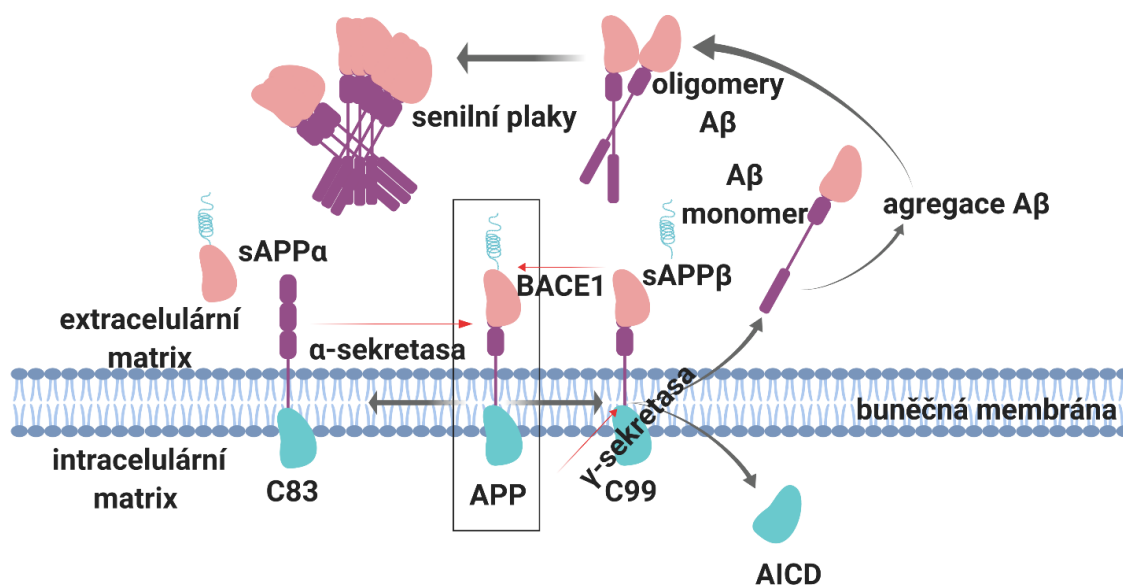


Obr. 2. Neuronální poškození je spojováno se zvýšeným vyplavováním glutamátu jako excitační aminokyseliny. Stimulací NMDAR (různé skupiny NR2A/NR2B) a AMPAR dochází k intracelulárnímu nárůstu hladin vápníku. Aktivací AMPAR je produkován oxid dusnatý (NO), jehož vysoké hladiny jsou spojovány s neurotoxicitou a následnou neurodegenerací. Oligomery A β akcelerují proces vyplavování

glutamátu a současně navozují sekundární toxicitu prostřednictvím NMDAR. Narušen je i proces dlouhodobé potenciace (LTP; z angl. long-term potentiation), což vede ke snížení synaptické aktivity.

Amyloidní hypotéza

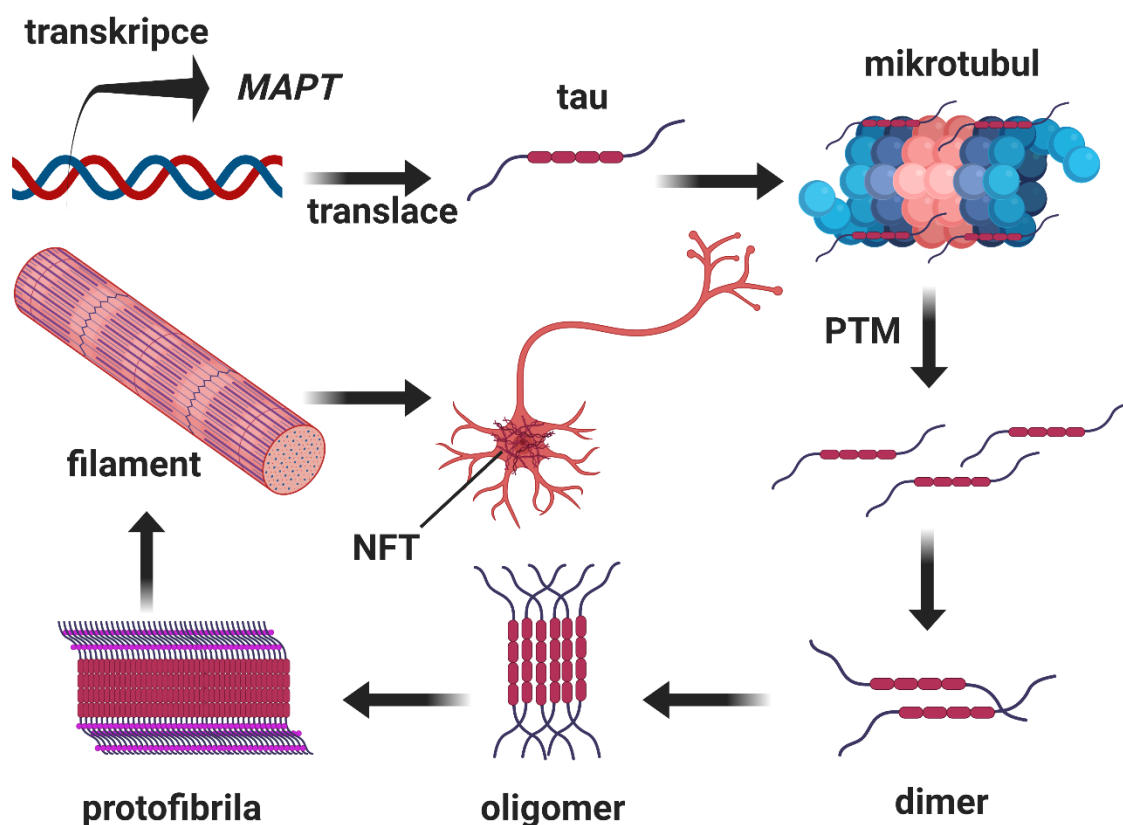
Nerovnováha mezi produkcí a odstraňováním A β z mozku dala vznik tzv. amyloidní teorii. Ta byla poprvé představena na začátku 90. let 20. století.¹⁷ Jak již bylo zmíněno, na začátku celé kaskády stojí APP, transmembránový protein, který je syntetizován v endoplasmatickém retikulu.¹⁸ Za fyziologických podmínek probíhá štěpení APP neamyloidogenní cestou, na které se podílí postupně α -sekretasa a γ -sekretasa (Obr. 3). Tímto se odlučuje z APP tzv. solubilní N-terminální ektodoména sAPP α .¹⁹ Za patologických podmínek probíhá štěpení APP tzv. amyloidogenní cestou, kdy se štěpení účastní prvně BACE-1, která produkuje solubilní protein APP beta (sAPP β). Ten je strukturně velice blízky sAPP α , rozdíl je pouze v uspořádání aminokyselin v C-terminálním konci. Následnou proteolytickou činností γ -sekretasy se odlučují jednotlivé monomery A β o různé délce, zpravidla v rozsahu 39-43 aminokyselin. Mezi nejčastější patří ty o délce 40 a 42 aminokyselin (A β ₄₀ a A β ₄₂). Pro familiární AD je charakteristická nadměrná produkce více patogenní formy A β ₄₂ (zvýšení poměru mezi A β ₄₂/A β ₄₀).²⁰ Monomery A β se následně shlukují ve vyšší útvary, tzv. oligomery, které jsou solubilní a neurotoxické. Oligomery A β ₄₂ tlumí synaptickou aktivitu (mechanismem snížení dlouhodobé potenciace (LTP)) a narušují paměťové funkce.²¹ Další agregace oligomerů vede k tvorbě fibril a amyloidních deposit, které již nepůsobí neurotoxicky.²² Z pohledu medicínské chemie nachází teoretické uplatnění v léčbě AD inhibitory BACE-1, z nichž celá řada dosáhla 3. fáze klinického testování (např. Lanabecestat, Verubecestat, Elenbecestat, Atabecestat nebo CNP520).²³ Klinické studie s těmito malými molekulami byly zpravidla pro nedostatek účinnosti ukončeny. Obdobná je i situace okolo inhibitorů γ -sekretasy. Z nich nejdále pokročily Avagacestat (3. fáze klinického testování) a BMS-708163 (2. fáze klinického testování). Jejich klinické hodnocení bylo předčasně ukončeno z důvodu výskytu četných nežádoucích účinků, které bylo připisováno vysoké substrátové promiskuitě γ -sekretasy.²⁴ Detailněji je o BACE-1 a sekretasových inhibitech, které vstoupily do klinického hodnocení, pojednáno v přílohách **SI-SII**. Vedle těchto dvou strategií pak existuje ještě celá řada dalších více či méně úspěšných přístupů jako např. podávání monoklonálních protilátek proti A β (imunoterapeutický přístup), aplikace látek zvyšujících permeabilitu a clearance A β z CNS, kationtových chelátorů selektivně vyvazujících některé prvky z vazby kov-A β a tím destabilizující fibrily A β aj.²⁵



Obr. 3. Amyloidogenní a neamyloidogenní zpracování APP. Při neamyloidogenní cestě dochází ke štěpení APP pomocí α - a γ -sekretas. Vznikají dva fragmenty, solubilní N-terminální ektodoména sAPP α a membránově vázaný C-terminální konec označovaný jako C83. Amyloidogenní cesta je realizována pomocí β - a γ -sekretas. Tímto způsobem dochází ke vzniku APP intracelulární domény (AICD) a N-terminálního fragmentu sAPP β . C-terminální jednotka C99 zůstává membránově vázaná, po její degradaci za účasti γ -sekretasy vznikají monomery A β (A β_{40} i A β_{42}). Monomerní jednotky A β se postupně shlukují v neurotoxické oligomery až senilní plaky. Převzato a modifikováno z ref.²⁶

Hypotéza hyperfosforylovaného tau proteinu

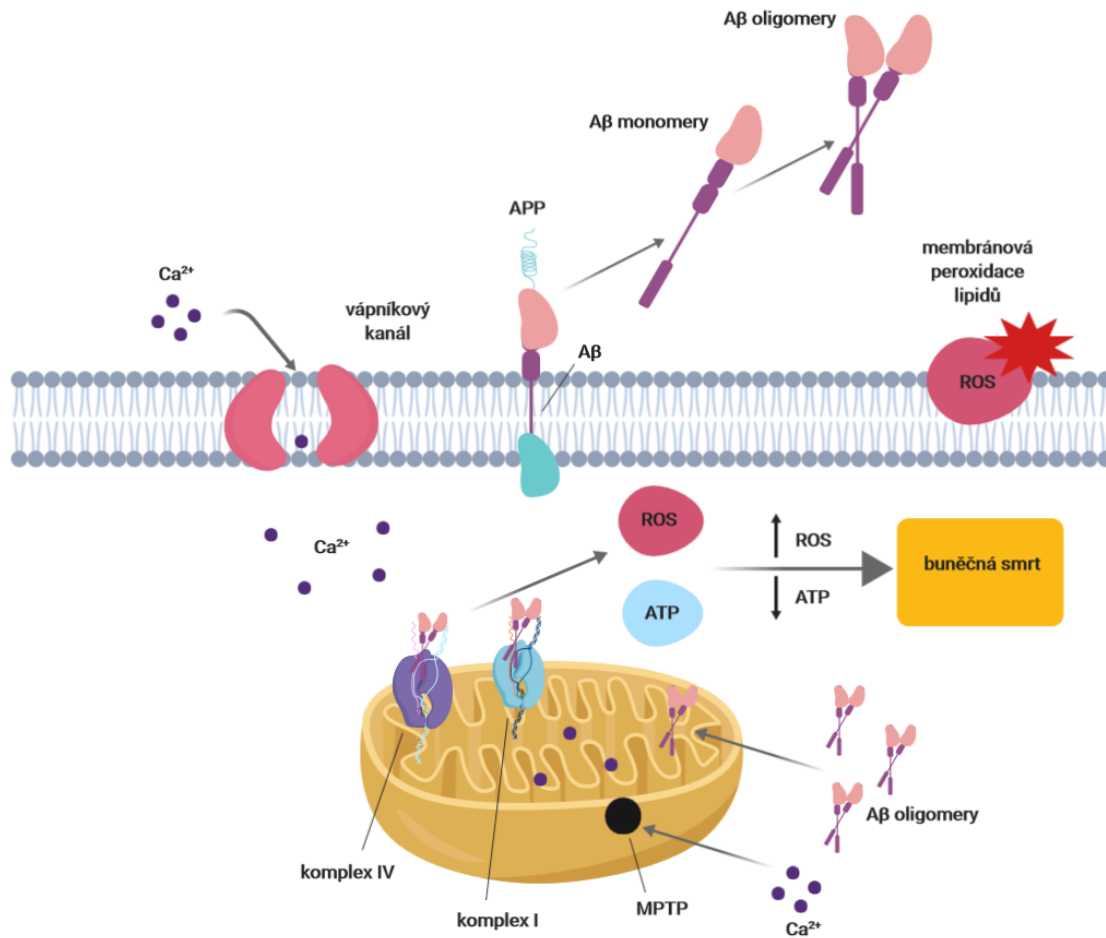
Primární fyziologickou funkcí tau proteinu je stabilizace sítě cytoskeletu neuronu vazbou na mikrotubuly. Za patologických podmínek představují shluky mikrotubul-asociovaných proteinů (MAP) tohoto proteinu další charakteristický nálezný neurodegenerativních onemocnění souhrnně označovaných jako tauopatie, mezi které patří rovněž AD. Tau se nachází převážně v neuronech, konkrétně je lokalizován na axonech, kde udržuje funkční transportní systém v chodu. Za patologických podmínek je jeho struktura výrazně modifikována. Tyto intracelulární strukturní modifikace, jmenovitě fosforylace tau, jsou příčinou kognitivních dysfunkcí a zodpovídají za neurodegenerativní procesy.²⁷ K dnešnímu dni bylo identifikováno více než 70 potenciálních míst pro fosforylaci proteinu tau, které mají patologickou relevanci.²⁸ Hyperfosforylovaný tau se shlukuje, podobně jako vzniklé monomery A β , do vyšších útvarů nazývaných neurofibrilární klubka (NFT, z angl. neurofibrillary tangles, Obr. 4).²⁹ Na rozdíl od oligomerů a plaků tvořených A β , celkové množství NFT úzce koreluje se stavem demence. Zvýšené hladiny hyperfosforylovaného tau proteinu u pacientů s AD lze detekovat zejména v prefrontálním kortexu a hipokampu.³⁰ Proces agregace a fibrilizace tau proteinu lze chápat jako několikastupňovou kaskádu, která začíná odpojením tau proteinu od mikrotubul. Klíčovou roli v tomto ohledu hrají enzymy regulující fosforylaci, konkrétně kinasa glykogensyntasy 3 β (GSK-3 β), mikrotubuly-regulující kinasa (MARK) a cyklin-dependentní kinasa 5 (CDK5).³¹



Obr. 4. Patologie tau proteinu. Tau je protein asociovaný s mikrotubuly. Za patologických podmínek je tau odtržen od mikrotubul a prochází post-translační modifikací (PTM) – fosforylací s následnou oligomerizací a agregací v neurofibrilární klubka (NFT; z angl. neurofibrillary tangles). MAPT je gen kódující tau protein. Převzato a modifikováno z ref.³²

Oxidativní stres

Deregulovaný redoxní systém je jedním z prvotních nálezů AD. Tato narušená rovnováha spouští různé buněčné signální dráhy, které jsou spojovány s nástupem a progresí neurodegenerativních procesů.³³ Reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a dusíku (RNS, z angl. reactive nitrogen species), dva hlavní mediátory oxidativního stresu (OS), způsobují četná poškození buněčných struktur. Nespecificky jsou zasaženy nejrůznější části biomolekul včetně proteinů, lipidů, sacharidů a nukleových kyselin v mozku i periferním systému.³⁴ Obranný antioxidantní systém je navíc s rostoucím věkem výrazně oslabován.³⁵ OS úzce koresponduje s agregací a ukládáním A β , přičemž poškozené struktury vlivem A β generují ROS a RNS (Obr. 5). Kritickou úlohu v tomto procesu hraje přítomnost aminokyseliny methioninu 35 (Met35) na A β , která je náchylná pro iniciaci a následnou řetězovou reakci tvorby ROS/RNS.³⁶ Mozková tkáň je navíc bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, které jsou v přítomnosti kyslíku, za katalýzy iontů železa, náchylné k oxidativnímu poškození.³⁷ Druhý úhel pohledu nabízí obrácený scénář, ve kterém OS předchází nadměrné produkci A β .³⁸ Vedle těchto dějů hrají klíčovou roli rovněž mitochondrie, resp. mitochondriální enzymy, ze kterých lze jmenovat cytochrom-c oxidasu, oxoglutarátdehydrogenasu, pyruvátdehydrogenasu, amyloid vázající alkoholdehydrogenasu, cyklofilin D, monoaminoxidasy (MAO) aj.³⁹ Z možností terapeutického ovlivnění se nabízí podávání antioxidantů, např. vitamínů E, C, kyseliny lipové, kurkuminu, N-acetylcysteinu a jiných.⁴⁰ Jejich účinnost je však v řadě klinických studií velmi často rozporována.⁴¹

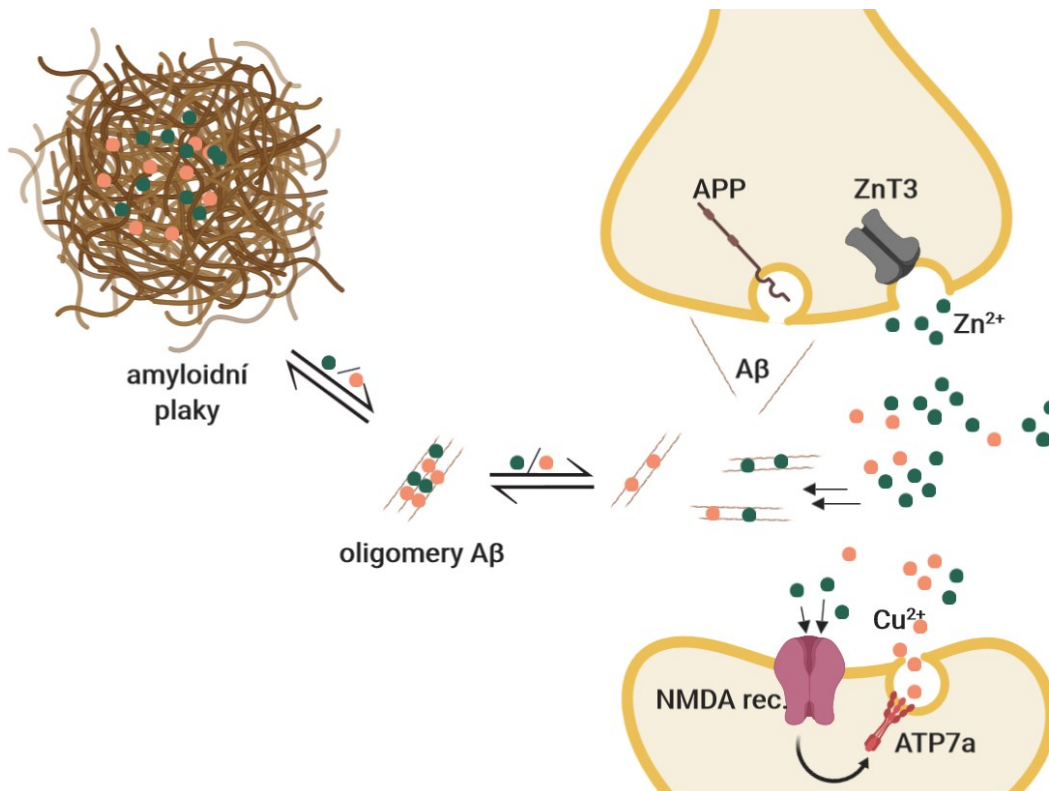


Obr. 5. Mitochondriální poškození způsobené vlivem OS. Nadměrná produkce Aβ navozuje dysfunkci komplexu I a IV, následkem čehož jsou generovány ROS a současně je spotřebováván adenosintrifosfát (ATP). Deplece ATP vede k nestabilitě mitochondrií, sekundárně pak dochází k iontové nerovnováze v cytosolu. ROS zvyšují propustnost mitochondriálního permeabilního tranzitního póru (MPTP), který umožňuje vstup vápenatých iontů do vnitřka mitochondrií. To vede k dysfunkci elektronového transportního řetězce a oxidativní fosforylaci. ROS současně spouští lipidovou peroxidaci buněčné membrány, v konečném důsledku je zahájena apoptóza buňky. Převzato a modifikováno z ref.⁴²

Nerovnováha přechodných prvků

Distribuce a rovnováha některých přechodných prvků v AD je diskutovaným tématem již řadu desetiletí. Zlom nastal však až v 90. letech 20. století, kdy bylo zjištěno, že se na agregaci Aβ mohou podílet ionty železa, hliníku a mědi. Tento objev úzce koreluje s výše diskutovaným OS, kde jsou tyto prvky katalyzátorem patofyziologických procesů spojených s kumulací agregátů Aβ (viz zjednodušené schéma na Obr. 6).^{43,44} Na druhou stranu, spojení mezi ionty hliníku a neurodegenerativními onemocněními je do značné míry kontroverzní; existují studie, které poukazují na vztah mezi zvýšenou expozicí hliníku a AD,⁴⁵ zatímco jiné studie toto tvrzení rozporují.⁴⁶ Měď je v organismu přítomna ve dvou valenčních formách, oxidované (Cu^{2+}) a redukované (Cu^+).⁴⁷ Jednotlivé redoxní stavy mědi koordinují celou řadu endogenních i exogenních ligandů, které se vyznačují přítomností některých z funkčních skupin, jako jsou např. karboxyl, imidazolový kruh, thiolová skupina cysteinu, thioether methioninu a kationtová interakce s nabitými částicemi.⁴⁸ Sérové a cerebrospinální hladiny mědi jsou u pacientů s AD výrazně zvýšeny.⁴⁹ Měď přispívá tvorbou ROS k oxidaci nízkodenzitních lipoproteinů (LDL,

z angl. low-density lipoprotein), které zvyšují koncentraci homocysteinu v plazmě. Nadměrná hladina homocysteinu je rovněž dalším rizikovým faktorem pro rozvoj AD.^{50,51} V pokročilých stádiích onemocnění dochází k redistribuci mědi do senilních plaků za současného snížení jeho celkové koncentrace v okolních tkáních.⁵² Za zajímavou zmínku rovněž stojí výsledky klinické studie, které poukazují, že příjem stravy bohaté na měď, cholesterol a nasycené mastné kyseliny zrychlují nástup kognitivních dysfunkcí.⁵³ Zinek je součástí některých enzymů (např. superoxid dismutasa 1), transkripčních faktorů (protein p53) a signálních molekul (proteinkinasa C).⁵⁴ V mozku je zinek přítomen jako zinečnatý kationt (Zn^{2+}) zejména v nervových zakončeních glutamátergního systému, odkud je po aktivaci extracelulárně uvolňován.⁵⁵ Zinek po uvolnění ze synapsí, zpravidla pomocí zinkového transportéru (ZnT3), interaguje s různými neuronálními receptory (NMDAR, iontovými kanály a transportéry).⁵⁶ U neurodegenerativních procesů je zinek, podobně jako měď, vázán v placích $A\beta$.⁵² Retence zinku v mozku je nejčastěji připisována narušeným transportním systémům pro tento prvek, mezi které patří ZnT1, ZnT3, ZnT4 a ZnT6.⁵⁷ Estrogen reguluje expresi ZnT3, může tak být považován za rizikový faktor AD odrážející mezipohlavní diverzitu.⁵⁸ Železo je klíčovou komponentou hemu v hemoglobinu, myoglobinu, cytochromu nebo třeba také kofaktorem ribonukleotid reduktasy (enzym syntetizující DNA). Je-li přítomen ve vyšší koncentraci, projevuje se jeho toxicita, vznikají superoxidové anionty a hydroxylové radikály, které nespecificky interagují s různými biomolekulami v organismu.⁵⁹ Podobně jako u předchozích kovů je kumulace železa dobře pozorovatelná v rámci senilních plaků $A\beta$.⁶⁰ V prodromálním stádiu AD se železo podílí na iniciaci a progresi OS s následnou zvýšenou senzitivitou buněk vůči indukovanému OS.⁶¹ Jako odpověď na tento stav je up-regulován protizánětlivě účinný laktoferin, transportní protein vázající volné železo, který eliminuje volné hydroxylové radikály a chrání tak DNA před poškozením.⁶²



Obr. 6. Model toxicity zinku a mědi na glutamátergních synapsích během AD. Narušená energetická bilance vlivem poškozených mitochondrií vede ke sníženému zpětnému vychytávání některých prvků (měď,

zinek), jejichž koncentrace je zvýšená a podílí se na agregaci A β do oligomerů až amyloidních plaků. Převzato a modifikováno z ref.⁶³

1.1.2 Epidemiologické údaje a farmakoekonomická data

AD je jednou z mnoha druhů demencí. Vedle tohoto chronického onemocnění ještě existují vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky a frontotemporální demence. AD čítá celkově mezi 60 až 80 % všech případů demencí. V celosvětovém měřítku zaujímá AD páté místo celkového počtu úmrtí.⁶⁴ Jak již bylo zmíněno v úvodu, onemocnění se začíná projevovat zpravidla od 65. roku života (přibližně 5% prevalence), u lidí nad 85 let trpí touto chorobou téměř každý druhý. Odhaduje se, že v roce 2050 budeme evidovat celkový počet 1,25 miliardy seniorů nad 65 let; tento počet bude představovat 22 % celosvětové populace. 79 % z nich se bude nacházet v rozvojových zemích, které mají nedostatečný přístup k léčbě.⁶⁵ Každoročně je nově diagnostikováno mezi 4,5-5,0 miliony pacientů s AD, přičemž je odhadováno, že může dojít k dvojnásobnému nárůstu okolo roku 2040.⁶⁶ Počet lidí trpících AD v České republice je odhadován na 153 tisíc a prognóza vývoje není příliš optimistická ani do dalších let, jelikož v rámci Evropy patříme k nejrychleji stárnoucí populaci.

AD představuje enormní ekonomickou zátěž. Meta-analýza z roku 2017 ukazuje, že roční léčba jednoho pacienta s AD vychází průměrně na 20.461 \$. Podle stádia onemocnění pak můžeme roční náklady na léčbu rozčlenit na 14.675 \$ pro mírné stádium demence, 19.975 \$ pro středně těžké stádium a 29.708 \$ pro terminální stádia AD.⁶⁷ Všechny tyto částky pokrývají jak výlohy na léčiva, tak i náklady spojené s ošetřujícím personálem. Některé studie však dokonce uvádí částku přesahující 70.000 \$ ročně.⁶⁸ Průměrné roční náklady na léčbu AD v České republice v roce 2016 byly vypočítány na 22.818 €. ⁶⁹ V zemích západního bloku pak léčebné výlohy dosahují až 3 % hrubého domácího produktu, v celosvětovém měřítku se jedná o 1 % HDP.

1.2 Současná léčba

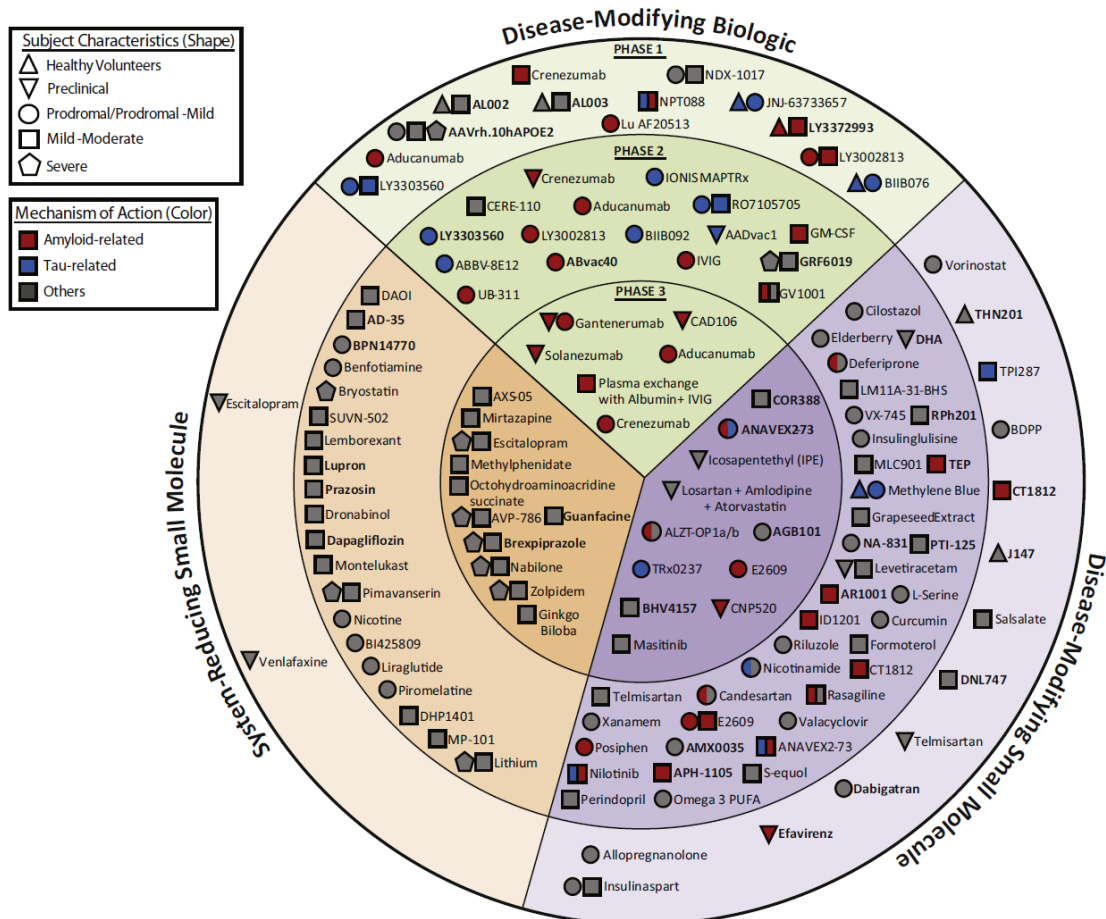
Současná léčba AD je pouze symptomatická a staví na dvou skupinách léčiv. První z nich je zastoupena inhibitory AChE. Z inhibitorů AChE nachází uplatnění v klinické praxi donepezil, galantamin a rivastigmin. Základ této skupině léčiv položila první generace inhibitorů AChE – takrin a fysostigmin. Takrin byl zaveden k užívání vůbec jako první léčivo AD v roce 1993.⁷⁰ Z důvodu výskytu závažných nežádoucích účinků, jako jsou hepatotoxicita a gastrointestinální dyskomfort, byl v roce 1998 stažen z užívání ve většině zemí světa; definitivně byl vyřazen z preskripce v roce 2013.⁷¹ Účinnost fysostigminu byla ověřována v řadě klinických studií. Většina z nich však byla předčasně ukončena z důvodu výskytu četných nežádoucích účinků jako např. nevolnost, zvracení, průjem, bolesti hlavy, křeče aj.⁷² Vedle skupiny inhibitorů AChE je dále používán antagonist NMDAR memantin. Ten je indikován pro středně těžká až těžká stádia onemocnění.⁷³ Bližší pojednání o používané léčbě je uvedeno v přílohách **SIII-SV** této habilitační práce.

1.3 Navrhované přístupy léčby

Z důvodu komplexnosti onemocnění a doposud nejasného mechanismu vzniku AD, nelze jednoznačně definovat cíl působení pro experimentálně vyvíjená léčiva, který by zaručoval klinickou účinnost. Jak již bylo uvedeno v úvodní kapitole „1.1.1 Patofyziologie onemocnění“, existuje celá řada hypotéz, na kterých je stavěn výzkum mnohých léčiv. Z malých molekul postoupily doposud nejdále v klinických studiích modulatory sekretas. Zpravidla se jednalo

o inhibitory BACE-1 (např. Verubecestat⁷⁴ nebo Elenbecestat²³), omezeně pak o modulatory γ -sekretasy (např. Semagacestat⁷⁵ nebo Avagacestat⁷⁶), jejichž klinická testování byla, z důvodu výskytu závažných nežádoucích účinků (rakovina kůže, náchylnost k infekčním onemocněním aj.), předčasně ukončena (viz přílohy **SI** a **SII**). Z dalších zvažovaných skupin léčiv byly klinicky evaluovány anti-agregancia A β , agonisté receptoru aktivovaném proliferátory peroxizomů, chelatační činidla, agonisté M1 AChR, vychytávače A β na periférii, inhibitory GSK-3 β , statiny a další. Z imunoterapeutických metod byly aplikovány monoklonální protilátky proti A β (Solanezumab a Bapineuzumab) i cílené protilátky proti tau proteinu (AADVac1).⁷⁷ I přes slibné výsledky na transgenních zvířecích modelech, nebyla klinická účinnost u žádného z výše zmiňovaných léčiv potvrzena u lidí. Bližší informace k zvažovaným farmakoterapeutickým přístupům v léčbě AD lze dohledat v přílohách **SVI-SVIII**.

V současné době je evidováno 132 různých klinických kandidátů pro terapii AD. 28 z nich se nachází ve třetí fázi klinického hodnocení (celkově 42 studií), 74 ve druhé fázi (83 studií) a 30 v první fázi (31 studií).⁷⁸ 19 z těchto kandidátních léčiv cílí na zlepšení kognitivních dysfunkcí, 14 lze klasifikovat jako podpůrnou léčbu neuropsychiatrických a behaviorálních symptomů, 96 léčiv má za cíl modulovat průběh onemocnění (většinou se jedná o anti-amyloidní terapeutika na bázi malých molekul nebo monoklonálních protilátek). Z celkového výčtu, sedm malých molekul a 10 biologických léčiv cílí na tau protein. Celkový přehled léčiv v klinických studiích na AD k začátku roku 2019 je znázorněn na Obr. 7.



Obř. 7. Vřechna lěčiva v klinických studiích k začátku roku 2019. Lěčiva jsou řazena dle fází klinického hodnocení (prostřední kruh značí 3. fázi, vnitřní 2. fázi, vnější zahrnuje lěčiva v 1. fázi klinického testování). Lěčiva v zeleném segmentu představují biologická terapeutika, ve fialovém se jedná o látky modulující průběh onemocnění, v oranřovém jsou vyznačeny kognitivní enhancery. Tvar jednotlivých ikon odráží kohortu, na které je dané lěčivo testované (zdraví dobrovolníci; preklinické, prodromální až mírné stádium, středně-těžké stádium a těžké stádium AD). Barva jednotlivých ikon symbolizuje cíl působení (červená – Aβ; modrá – tau; šedivá – jiné místo působení). Lěčiva nově uvedená do klinického hodnocení během roku 2018 jsou vypsána tučným písmem. Převzato z ref.⁷⁸

1.4 Multipotentní sloučeniny

Řada lěčiv doposud uvedených na trh byla vyvíjena na základě ovlivnění pouze jednoho patologického mechanismu. Tento koncept, v literatuře označovaný jako „jedno lěčivo, jeden cíl, jedno onemocnění“, je i v současné době dominantním ve vývoji lěčiv. Nicméně řada komplexních onemocnění (hypertenze, nádorová onemocnění, schizofrenie, AD a další) není adekvátně lěčena při použití lěčby cílené na jednu patologickou deficienci. Za tímto účelem tak byl poprvé v roce 2004 definován pojem „polyfarmakologie“ jako nový vývojový směr lěčiv pro oblast AD.^{79,80} Jejím smyslem je nejen navýřit účinnost lěčby, ale i snížit riziko výskytu nežádoucích účinků. Právě nevhodné lékové kombinace vedoucí k četným interakcím stojí za častou hospitalizací nebo dokonce úmrtím pacientů. Polyfarmakologii v AD lze rovněž chápat jako „společenskou poptávku“ v hledání nového vývojového konceptu lěčby AD. Ta je plně v souladu s mnohými neúspěchy řady lěčiv v klinických studiích. Statistické údaje poukazují na fakt, že mezi lety 2002-2012 byl schválen k terapii AD pouze memantin (2003) z celkového počtu

244 hodnocených léčiv v 413 klinických studiích. Míra úspěchu zavedení nového léčiva vyjádřena v procentech v tomto mezidobí pak odpovídá pouze 0,4 %.⁸¹

Polyfarmakologie může být chápána ve třech rovinách. Tradičně je u pacientů, kteří nevykazují dostatečnou terapeutickou odpověď, využívána kombinace léčiv (zpravidla v podobě dvou a více léčiv aplikovaných v různých formulacích). Tento přístup často naráží na compliance pacienta. Řešení se nabízí v podobě podávání multikompozitních formulací (např. vícesložkové kapsle), které, jak vyplývá z názvu, obsahují směs dvou a více aktivních léčiv. Tento přístup vede k navýšení compliance pacienta, ale nikterak neřeší možnost výskytu lékových interakcí. Příkladem takového léku uvedeného na trh v roce 2014 pro terapii AD je Namzaric kombinující donepezil s memantinem.⁸² Alternativou k oběma z výše zmíněných přístupů je podání jednoho léčiva, tj. jedné aktivní substance, která je schopná modulovat více patologických složek nemoci najednou. V takovém případě mluvíme o tzv. multipotentních sloučeninách (v anglické literatuře označované různými pojmy jako „multi-target directed ligands“, „designed multiple targets“, nebo též „magic bullets“). Je dobré rovněž připomenout, že řada léčiv na trhu má multipotentní charakter bez toho, aniž by byla vyvíjena s tímto úmyslem. Zpravidla byl jejich mechanismus účinku objasněn retrospektivně. Příkladem takovýchto struktur jsou atypická antipsychotika (např. aripiprazol), která vykazují multi-receptorovou vazbu.⁸³

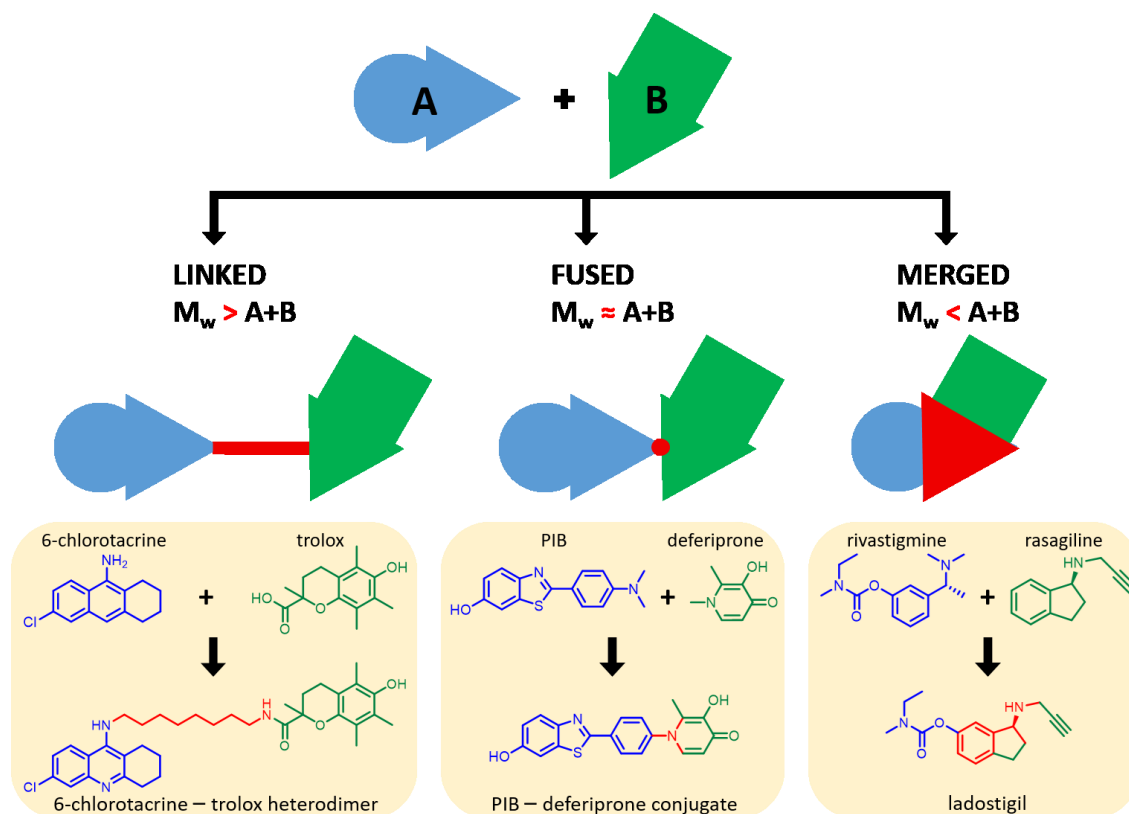
Vývoj multipotentních sloučenin prošel během posledních dvou dekad značnou evolucí. Vše odstartoval vývoj bis(7)-takrinu v roce 1996 (označovaného v anglické literatuře rovněž jako bis(7)-cognitin).⁸⁴ Tato molekula spojující dvě takrinové jednotky přes heptamethylenový můstek nejenže vykazovala téměř 1500× účinnější inhibici AChE oproti takrinu, ale byla i téměř 1000× selektivnější pro inhibici AChE oproti butyrylcholinesterase (E.C. 3.1.1.8; BChE).⁸⁵ Nad rámec těchto nepřímých parasympatomimetických vlastností prokázal bis(7)-takrin řadu modulačních aktivit ve vztahu k NMDAR, serotoninovým (5-HT₃) receptorům, a receptorům pro gama-aminomáselnou kyselinu (GABA), dále inhibici extracelulární signálně-regulační kinasy (ERK1/2), p38 mitogen-aktivované protein kinasy (MAPK), BACE-1, NO-syntasy, snížení kumulace Aβ a mnoho dalších. I přes příznivé výsledky za podmínek *in vitro* i *in vivo* byl výzkum bis(7)-takrinu ukončen z důvodu špatných farmakokinetických (10% absorpce po *per os* podání, vysoká vazba na plasmatické proteiny), farmakodynamických parametrů (účinnost, selektivita, metabolická stabilita aj.) i fyzikálně-chemických parametrů (nízká solubilita ve vodě). I přes tyto limitující faktory je bis(7)-takrin považován za průlomovou molekulu, která nastavila nový trend ve vývoji léčiv. Zejména poukázala na to, že je možné jedinou molekulou ovlivnit více patologických dějů, která mají přímou souvislost s patofyziologií AD. Bližší pojednání o této molekule lze dohledat v příloze **SIX**.

V dnešní době se uplatňují dva koncepční přístupy ve vývoji multipotentních sloučenin. První vychází ze znalostí (z angl. „knowledge-based“), druhý přístup je screeningový. „Knowledge-based“ strategie staví na biologických datech známých sloučenin, zatímco screeningový přístup se snaží najít novou, farmakologicky aktivní entitu pro daný cíl nebo systém z vybrané knihovny sloučenin. Screening je možno v dnešní době provádět jak pomocí výkonných přístrojů, které jsou schopné otestovat desetitisíce sloučenin denně, tak i virtuálně s využitím *in silico* metod (molekulové modelování, molekulová dynamika a další), vše paralelně na několik patologických systémů.⁸⁶ Robustnější screeningové metody se provádí na buněčných modelech a při zjištění žádaného efektu se retrospektivně odhaluje mechanismus účinku.

Po identifikaci nových chemických jednotek následuje fáze, kdy jsou dva vyselektované farmakofory včleněny do jedné molekuly (z angl. „designing in“). To je však možné pouze tehdy, když dochází alespoň k částečnému strukturnímu překryvu obou chemických částí. Mnohem častěji jsou proto preferovány takové molekuly, které mají efekt na oba cíle současně a tento efekt je potřeba pouze vybalancovat (navýšit či snížit jednu či druhou aktivitu pro daný cíl). Dalším možným scénářem ve vývoji multipotentních sloučenin, který může nastat, je, že docílíme srovnatelného efektu pro oba dané cíle, ale potřebujeme eliminovat třetí aktivitu, která je spojena např. s nežádoucími účinky nebo jinak snižuje terapeutický potenciál výsledné molekuly. Nastupuje tedy fáze optimalizace (v anglické literatuře je tento stav často spojován s termínem „designing out“). Ta je v současné době považována za jednu z nejvíce komplikovaných stránek ve vývoji multipotentních sloučenin.

Pokud se zaměříme na „knowledge-based“ přístup, máme na výběr tři možnosti designování multipotentních sloučenin (Obr. 8). První z nich představuje spojení dvou různých molekul s rozdílným farmakologickým efektem za pomoci řetězce (alifatický, etylenglykolový aj.; v angl. literatuře je tento přístup označován jako „linking approach“; Obr. 8). Řetězec přirozeně nebývá (někdy však být může) součástí ani jedné z předlohových struktur; volí se zpravidla, pokud jsou dvě struktury zcela odlišné a nelze použít další dvě strategie (viz dále). Klíčový je zejména charakter řetězce, jeho umístění na propojované ligandy a délka. Všechny tyto atributy je potřeba důsledně zvážit, protože při nesprávném použití může dojít k redukci či dokonce zániku jedné či více biologických aktivit.⁸⁷ Finální molekula vzniklá tímto způsobem může mít charakter proléčiva; v takovém případě je přítomen degradabilní řetězec obsahující funkční skupiny náchylné k hydrolýze (esterové nebo amidové vazby). Po metabolizaci v organismu dochází k uvolnění obou aktivních složek. V opačném případě vzniká metabolicky stabilní entita, která v těle působí na zvolené cíle jako celek. Důležité je rovněž zmínit, že v některých případech může být i samotný řetězec nositelem farmakologického účinku. V literatuře je popisována celá řada takto vzniklých derivátů. Velké množství z nich lze dohledat v přílohách **SX-SXIV**.

Dalším přístupem tvorby multipotentních sloučenin je přímé napojení obou aktivních ligandů bez použití spojovacího řetězce (v angl. literatuře je toto označováno jako tzv. „fusing approach“; Obr. 8). U tohoto přístupu je spojujícím článkem zpravidla jedna funkční skupina, která je přítomna v obou předlohových strukturách. V ideálním případě může dokonce dojít k úplnému překryvu obou částí molekuly při zachování farmakologických vlastností obou parentních struktur. V tomto případě, kdy dochází k úplnému překryvu, hovoříme o tzv. „merging approach“ (Obr. 8). Posledně jmenovaný je nejideálnějším přístupem z pohledu charakteru finální molekuly. Ta má logicky nejmenší molekulovou hmotnost a většinou splňuje i další fyzikálně chemické charakteristiky pro léčiva s prostupností do CNS. Veškeré výhody i úskalí při navrhování jednotlivých multipotentních sloučenin je detailněji diskutováno v kapitole „3. Souhrn, závěry a možné směry dalšího výzkumu“ a v příloze **SXV** této habilitační práce.



Obr. 8. Kombinace různých farmakoforů vedoucí k multipotentním sloučeninám s využitím „knowledge-based“ přístupu. Vlevo je zobrazena aplikace tzv. linking approach implementující alifatický řetězec do molekuly 6-chlortakrin-troloxového heterodimeru;⁸⁸ uprostřed je znázorněno přímé napojení PIB (zkratka pro Pittsburgh compound B) a deferipronu (fusing approach);⁸⁹ vpravo je ilustrován překryv dvou parentních struktur (rivastigminu a rasagilinu) vedoucí k ladostigilu (merging approach).⁹⁰ M_w označuje výslednou molekulovou hmotnost vzniklé multipotentní sloučeniny při aplikaci jednotlivých přístupů. Převzato z ref.⁹¹

2 Komentář k předloženým pracím

Výsledky shrnuté v předložené habilitační práci vznikly mezi lety 2008-2020. Během této doby jsem vykonával studijní doktorský program (2008-2012) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (nyní Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy) pod vedením doc. RNDr. Veroniky Opletalové, Ph.D. (školitel) a prof. Ing. Kamila Kuči, Ph.D. (školitel specialista). Další výsledky výzkumu zde zahrnuté byly získány na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany), Centru biomedicínského výzkumu (Fakultní nemocnice Hradec Králové) a na odděleních Experimentální neurobiologie a Translačních neurověd (Národní ústav duševního zdraví, Klecany). Veškerá práce vznikla za finanční podpory jednotlivých institucí (projekt Ministerstva Obrany - OVUOFVZ200805; Zdravotnická problematika DZRO ZHN 2012 a DZRO ZHN 2017; finanční prostředky Fakultní nemocnice Hradec Králové – č. 00179906; a projekt NPU I – č. LO1611), za podpory národních grantových agentur (*Grantová agentura České republiky* – č. P303-11-1907 (2011-2015); č. 15-16701S (2015-2017); č. 18-01734S (2018-2020); č. 20-29633J (2020-2022); *Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky* – č. 15-30954A (2015-2018)); a projektů InoMed (č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010046) a IT4Neuro(degeneration) (č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010054).

Většina prací zde uvedených je odrazem navázaných spoluprací se zahraničními partnery. Zde je na místě uvést, mezi mnohými, Univerzitu Pavla Josefa Šafárika v Košicích (pracovní skupina RNDr. Slávky Hamulákové), Univerzitu v Bologni (pracovní týmy prof. Marie Laury Bolognesi a prof. Manuely Bartolini) a Jagellonskou univerzitu v Krakově (tým vedený prof. Barbarou Malawskou). Výsledky vzájemné spolupráce se staly podkladem pro prezentování výsledků na řadě tuzemských i zahraničních konferencích ať už formou plakátových či ústních sdělení.

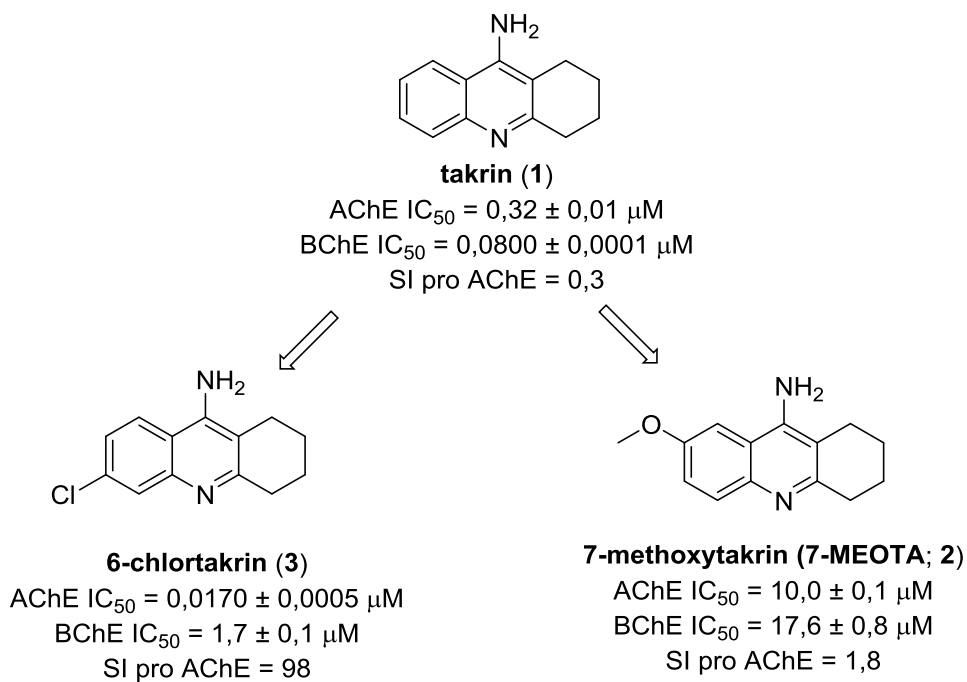
V rámci doktorského studijního programu jsem se věnoval zpravidla monomerním takrinovým derivátům. Jejich aktivita a farmakologický profil jsou však značně omezené zpravidla na inhibici AChE. Postupným vývojem jsem došel k takrinovým heterodimerům, případně jiným derivátům, u kterých je spojujícím článkem inhibice cholinesteras. Většina z těchto synteticky připravených sloučenin vykazuje multipotentní profil daný obvykle kombinací dvou farmakologických entit. Všechny tyto práce, resp. komentář k nim, jsou shrnuty v kapitole „2.1 Multipotentní léčiva na bázi inhibitorů cholinesteras“. Mimo oblast multipotentních sloučenin navržených na základě znalostí dostupných z literárních pramenů představují přírodní sloučeniny, resp. jejich semisyntetické analogy, další důležitou vývojovou větev ve vývoji farmak pro léčbu chorob spojených s CNS. Této problematice je věnována kapitola „2.2 Přírodní a semisyntetické deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby“, která diskutuje zejména haemanthaminové deriváty, fenolické sloučeniny nebo berberinová analoga.

Publikované práce jsou v textu citovány římskými čísly s prefixem „P“ pro původní práce (PI-PXXIX) a „S“ pro souhrnné články (SI-SXXI), aby je bylo možno snadno odlišit od prací jiných autorů. Podíl na jednotlivých pracích je vymezen v kapitole „6 Podíl předkladatele habilitační práce na jednotlivých publikacích“. V Tabulkách 1 a 2 na konci oddílů 2.1 a 2.2 jsou uvedeny pro srovnání nejúčinnější cholinesterasové inhibitory z každé série sloučenin.

2.1 Multipotentní léčiva na bázi inhibitorů cholinesteras

Tato kapitola zahrnuje veškeré multipotentní sloučeniny, které byly vyvinuty na bázi reverzibilních inhibitorů cholinesteras. Aktivita pro jednotlivé sloučeniny je vyjádřena jako polovina maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) stanovená na lidské rekombinantní AChE nebo lidské plasmatické BChE (není-li uvedeno jinak). Převážná většina z nich je stavěna na molekule takrinu (**1**), případně jeho méně toxického derivátu 7-methoxytakrinu (7-MEOTA; **2**)⁹² nebo jednoho z doposud nejúčinnějších takrinových derivátů 6-chlortakrinu (**3**) (Obr. 9).⁹³ O těchto derivátech je blíže pojednáno v přílohách **SXVI-SXVIII**. Hodnoty inhibičních koncentrací pro AChE a BChE u konkrétních zástupců jsou uváděny průběžně v textu a v příslušných tabulkách na konci každé kapitoly.

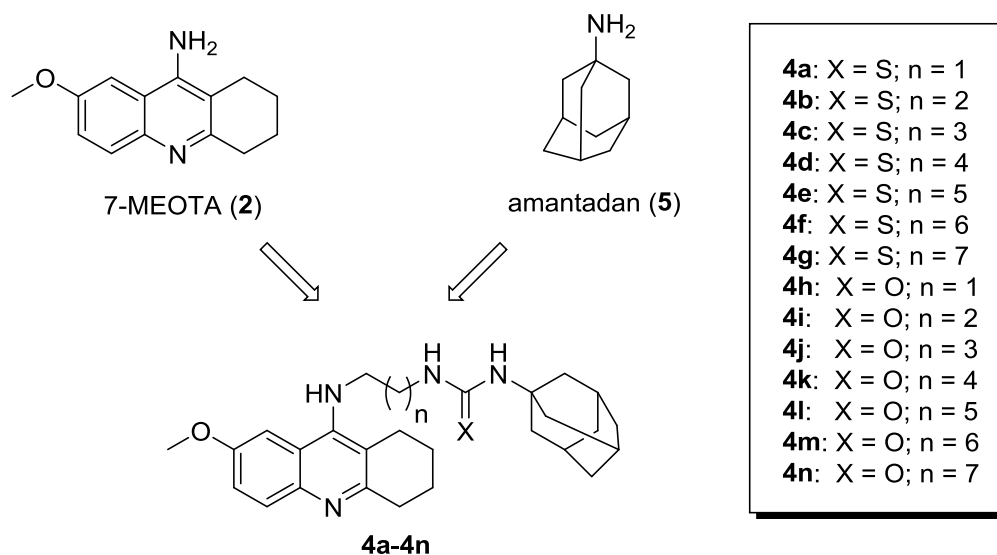
Často diskutovanou součástí vývoje inhibitoru cholinesteras je jejich relativní selektivita k AChE. Ta je dána poměrem hodnot BChE IC_{50} /AChE IC_{50} . Tuto hodnotu lze chápat jako orientační pro určení selektivity k danému enzymu, přičemž sloučeniny selektivní k AChE mají tuto hodnotu > 1 , neselektivní sloučeniny vykazují hodnoty blízké 1, inhibitory selektivní k BChE mají < 1 . V počátcích vývoje inhibitorů cholinesteras byl důraz kladen zejména na vysoce selektivní inhibitory AChE, s ohledem napojení AChE na centrální funkce v mozkové kůře.⁹⁴ Od tohoto dogmatu se však v současnosti upouští; existuje celá řada preklinických i klinických studií, které naopak favorizují podávání neselektivních nebo BChE-selektivních inhibitorů.⁹⁵ Tato poznání se zakládají na faktech, kdy jednak BChE-selektivní inhibitory mají výrazný pro-kognitivní efekt,⁹⁶ a dalším kritickým ukazatelem jsou hladiny BChE v průběhu AD. Řadou studií byla prokázána zvýšená hladina BChE v pozdějších stádiích AD (až na 120 % oproti fyziologickým hodnotám), která nahrává používání neselektivních nebo BChE-selektivních inhibitorů. Aktivita AChE klesá v pokročilých stádiích demence až k 10-15 % normálních hodnot pozorovaných u zdravých jedinců.^{94,95}



Obr. 9. Chemické struktury takrinu (**1**) a příbuzných derivátů (7-MEOTA (**2**) a 6-chlortakrinu (**3**)) včetně hodnot IC_{50} pro enzymy AChE a BChE.

Zájem o vývoj duálních inhibitorů AChE (tj. inhibitorů, které se vážou současně do katalytické části i periferního anionického místa enzymu) vzrostl v roce 1996 s vývojem bis(7)-takrinu (**SIX**),⁸⁵ kdy byla taktéž jinou vědeckou skupinou poprvé představena tzv. ne-cholinergní aktivita AChE.^{97,98} Ta spočívá v pro-agregačním efektu periferního anionického místa (PAS) AChE na Aβ. Tato interakce mezi PAS a Aβ vede ke konformačním změnám amyloidních fibril Aβ na β-skládaný list, který vykazuje zvýšený pro-agregační potenciál s následným toxickým působením.⁹⁹ Na základě tohoto faktu, který je spojovníkem mezi cholinergní a amyloidní hypotézou, byla vyvinuta celá řada pro-kognitivních léčiv. Součástí této práce budou rovněž představeny sloučeniny působící na této bázi s výrazným anti-agregačním účinkem ovlivněním PAS AChE.

Prvotní studie jsou spojeny s vývojem 7-MEOTA-adamantylaminových heterodimerů (**4a-4n**; Obr. 10). Tyto výsledky jsou sumarizovány v přílohách **PI** a **PII**. Při návrhu těchto sloučenin jsme se řídili cholinergním působením (zajištěna pomocí **2**) a antagonistickým působením vůči NMDAR (dáno přítomností amantadinu). Amantadin (chemicky 1-adamantylamin; **5**) je dříve schválené profylaktikum proti virovým onemocněním, jehož užívání je však v současné době obsoletní z důvodu výskytu virové rezistence. V současné době nachází uplatnění při paliativní léčbě Parkinsonovy choroby. Bližší pojednání o **5** a dalších adamantanových derivátech lze nalézt v příloze **SV** této práce. Komplexní terapeutický efekt **5** je zprostředkovan přes NMDAR, **5** dále zvyšuje vyplavování dopaminu, dopaminový reuptake, inaktivuje mikroglie a tím působí protizánětlivě.¹⁰⁰ Sloučenina **5** je navíc strukturně příbuzná k memantinu, schválenému léčivu pro terapii AD. Celkově bylo připraveno 14 nových 7-MEOTA-adamantylaminových heterodimerů (**4a-4n**), které se liší v délce spojovacího řetězce (dva až osm methylenových jednotek) a přítomností močoviny nebo thiomčoviny ve spojovacím můstku.

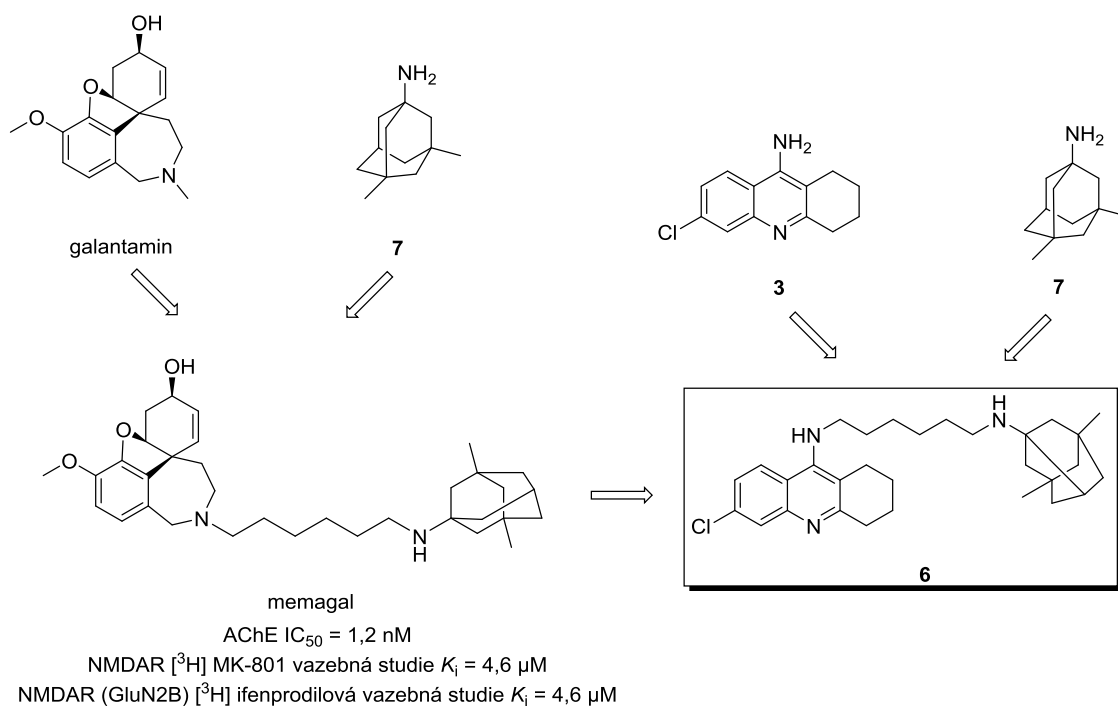


Obr. 10. 7-MEOTA-adamantylaminové heterodimery **4a-4n**.

Všechny sloučeniny z testované série byly účinnými inhibitory AChE i BChE v mikromolárních až sub-mikromolárních hodnotách IC_{50} . Z pohledu vztahu mezi strukturou a účinkem u derivátů **4a-4n** lze vypíchnout ty, které nesou pentamethylenový řetězec (**4d**: AChE IC_{50} = $0,53 \pm 0,10$ μ M; BChE IC_{50} = $1,4 \pm 0,2$ μ M; SI pro AChE = 2,6; **4k**: AChE IC_{50} = $0,69 \pm 0,13$ μ M; BChE IC_{50} = $0,22 \pm 0,04$ μ M; SI pro AChE = 0,3; Tab. 1). Za zmínku stojí zvrát v selektivitě účinku od AChE (**4d**) k BChE (**4k**) při záměně thiomčovinného linkeru za močovinnový. Nejselektivnějším

inhibitorem AChE v rámci této série byla sloučenina **4n** (SI pro AChE = 9,3). Nejúčinnější deriváty byly podrobeny molekulově modelovací studii. Výsledky byly plně v souladu s návrhem sloučenin, tj. část z molekul **4d** i **4k** nesoucí **2** je orientována do katalytické části enzymu, zatímco **5** interaguje s PAS v těsné blízkosti Trp286, který je označován za klíčové residuum v katalýze agregace A β .⁹⁷ Z navazujících studie s **4a-4n** dále vyplynulo, že některé heterodimery jsou rovněž účinnými inhibitory BACE-1. V tomto ohledu se nejlépe profilovala sloučenina **4m** (BACE-1 IC₅₀ = 2,0 ± 0,3 μM), ostatní, zejména ty, které obsahují thiomocovinovou funkční skupinu, vykazovaly slabší inhibici v sub-milimolární koncentraci hodnot IC₅₀. Stanovení přímé interakce mezi A β ₄₀ a **4a-4n** poukázalo na významnou účinnost proti agregaci tohoto proteinu, pro nejvíce potentní heterodimery (**4g**, **4l**, **4m** a **4n**) dosahovala inhibiční aktivita hodnot IC₅₀ shodně okolo 0,04 μM. Z testování aktivity vůči NMDA receptorům metodou patch-clamp na buněčné linii HEK293 exprimující rekombinantní GluN1/GluN2B receptor vyplynulo, že se heterodimer **4d** chová podobně jako memantin při interakci s tímto receptorem při membránovém napětí -60 mV (**4d**: NMDA IC₅₀ = 1,80 ± 0,13 μM; memantin: NMDA IC₅₀ = 1,00 ± 0,04 μM).¹⁰¹ Z dalších vlastností lze jmenovat zejména pravděpodobnost prostupu **4k** přes hematoencefalickou bariéru (HEB) pomocí pasivní difúze (pozn. stanoveno pomocí metody umělé membrány). Souhrn biologických aktivit k sloučeninám **4a-4n** je uveden v příloze **PIII**.

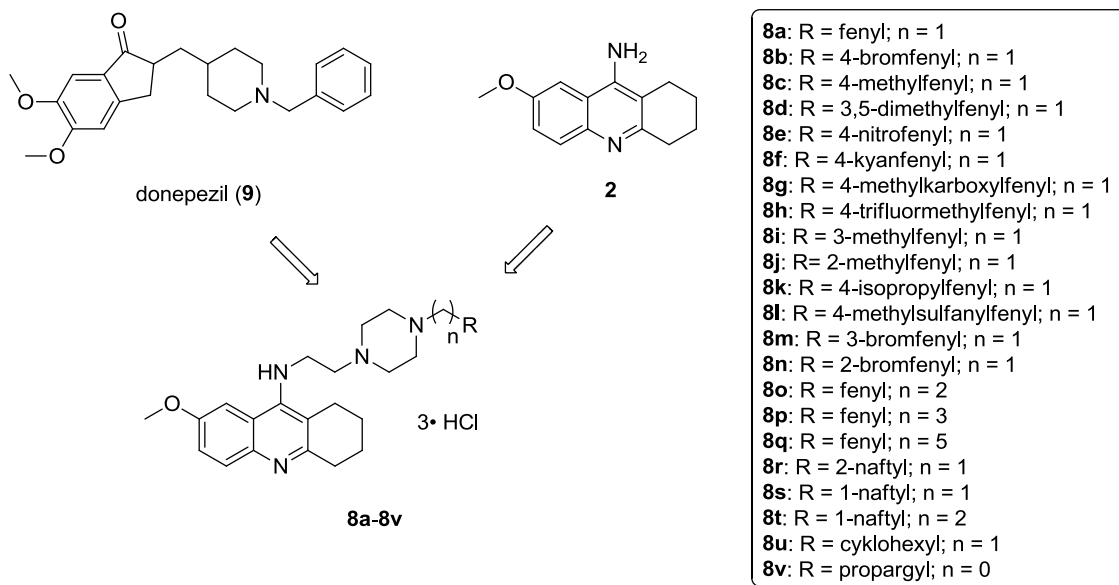
Soubor poznatků ze 7-MEOTA-adamantylaminové série posloužil pro návrh 6-chlortakrin-memantinového derivátu **6** (**PIV**, Obr. 11). Ten spojuje fragmenty **3** s memantinem (**7**). Inspirací byla rovněž studie kombinující inhibitor AChE galantamin s NMDAR antagonistou **7** za vzniku molekuly označované jako memagal (v literatuře známý též pod označením ARN14140; Obr. 11).¹⁰² Terapeutický efekt memagalu byl demonstrován i za podmínek *in vivo* na myších, kterým byl aplikován sub-chronicky A β ₂₅₋₃₅ k navození kognitivní dysfunkce.¹⁰³ Memagal prokázal pro-kognitivní charakter doprovázený neuroprotektivním působením vůči A β , ale jeho další použití je problematické z důvodu formy aplikace (intracerebroventrikulární podání). Design **6** byl založený na předpokládané duální interakci s AChE, kdy bylo sledováno umístění ligandu v aktivní části enzymu s využitím molekulově modelovací techniky ve vztahu k délce řetězce mezi oběma farmakofory. Dle výsledků *in silico* je pro inhibiční AChE aktivitu optimální šestiuhlíkatý řetězec. Studie potvrdila nanomolární charakter inhibice AChE a vysokou selektivitu pro tento enzym (**6**: AChE IC₅₀ = 9,41 ± 0,65 nM; BChE IC₅₀ = 2,1 ± 1,6 μM; SI pro AChE = 220). Na základě dalšího stanovení je u sloučeniny **6** předpoklad prostupu přes HEB pomocí pasivní difúze. Patch-clamp analýzou GluN1/GluN2B NMDA receptoru bylo zjištěno, že 6-chlortakrin-memantinový heterodimer **6** je, podobně jako **7**,¹⁰⁴ účinným blokátorem otevřeného póru NMDAR (**6**: IC₅₀ (-60 mV) = 1,80 ± 0,10 μM; IC₅₀ (+40 mV) = 16,01 ± 1,24 μM; **7**: IC₅₀ (-60 mV) = 0,79 ± 0,06 μM; IC₅₀ (+40 mV) = 22,01 ± 0,94 μM). Neuroprotektivní účinnost **6** byla ověřena na modelu hipokampálních lézí indukovaných mikroinjekcí NMDA do dorsální části hipokampu potkana. Zajímavostí je, že zavedené léčivo **7** nedosahovalo v tomto modelu neuroprotektce účinnosti heterodimeru **6**. To si vysvětlujeme použitím relativně malých dávek **7** v porovnání s dávkami aplikovanými v klinických studiích (podávání 20 mg/kg).¹⁰⁵



Obr. 11. Návrh 6-chlortakrin-memantinového heterodimeru **6** vycházející ze struktur **3**, **7** a memagalu.¹⁰²

Jako pokračování duálních inhibitorů vzdáleně příbuzných k bis(7)-takrinu jsme vyvinuli 7-MEOTA-donepezilové deriváty (**8a-8v**). Z názvu je patrné, že spojují strukturální charakteristiky **2** a *N*-benzylpiperazinu jako isosterní jednotky k *N*-benzylpiperidinu z donepezilu (**9**) (Obr 12; **PV**). Za návrhem této série stojí představa, kdy tricyklický fragment **2** je jak vhodným ligandem pro PAS, tak i katalytického místa AChE, zatímco *N*-benzyllová část interaguje výhradně s katalytickou částí enzymu. Tato představa je plně v souladu s krystalografickou strukturou **9** v AChE.¹⁰⁶ Celkově tato série čítala 22 7-MEOTA-donepezilových derivátů (**8a-8v**; Obr. 12), z nichž u většiny se jednalo o *N*-benzyl-substituovaná analoga. Všechny deriváty shodně vykazaly vybalancovaný inhibiční efekt na AChE i BChE v mikromolárních hodnotách IC_{50} . Substituce na aromatickém jádře elektron-donorními i elektron-akceptorními substituenty neměla významný vliv na inhibiční aktivitu. Nutno zmínit, že všechny fenyl-substituovaná deriváty (**8b-8n**) byly účinnější na AChE v porovnání s nesubstituovaným 7-MEOTA-donepezilovým derivátem (**8a**), žádný z nich však nepřekonal aktivitu předlohou molekuly **9** (AChE $IC_{50} = 0,0210 \pm 0,0023 \text{ }\mu\text{M}$; BChE $IC_{50} = 7,27 \pm 0,62 \text{ }\mu\text{M}$; SI pro AChE = 340).¹⁰⁷ Nejúčinnějším inhibitorem AChE a současně derivátem s nejvyšší selektivitou vůči tomuto enzymu byl hybrid **8b** (AChE $IC_{50} = 1,1 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$; BChE $IC_{50} = 17,9 \pm 1,5 \text{ }\mu\text{M}$; SI pro AChE = 16; Tab. 1). Nejvíce potentním BChE inhibitorem s výraznou mírou selektivity pro tento enzym byl *N*-propargylový derivát **8v** (AChE $IC_{50} = 12,9 \pm 0,7 \text{ }\mu\text{M}$; BChE $IC_{50} = 0,42 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{M}$; SI pro AChE = 0,03; Tab. 1). Pro další porovnání aktivit byly zvoleny enzymy zvířecího původu – AChE izolovaná z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*; EeAChE) a BChE z koňského séra (*Equus ferus caballus*; eqBChE). Zde jsme v případě EeAChE pozorovali nárůst v inhibiční účinnosti až o jeden řád. Tento trend v mezidruhové účinnosti je pozorovatelný i v rámci jiných studií a odráží strukturální diverzitu pro jednotlivé enzymy.¹⁰⁸ Kinetická studie prováděná na AChE se sloučeninou **8a** ukázala na smíšený typ inhibice, který reflektuje duální charakter inhibice zprostředkovaný přes PAS i katalytické místo enzymu. V souladu s tímto byla i naše pozorování v rámci molekulově modelovacích studií korespondující s návrhem 7-MEOTA-donepezilových derivátů, kdy pro **8b** bylo pozorováno

„sendvičové“ umístění 7-MEOTA mezi Trp286 a Tyr124 a pro *N*-(4-bromfenyl)methylovou část interakce s Trp86, analogicky jako u krystalografické struktury **9** v AChE.¹⁰⁶

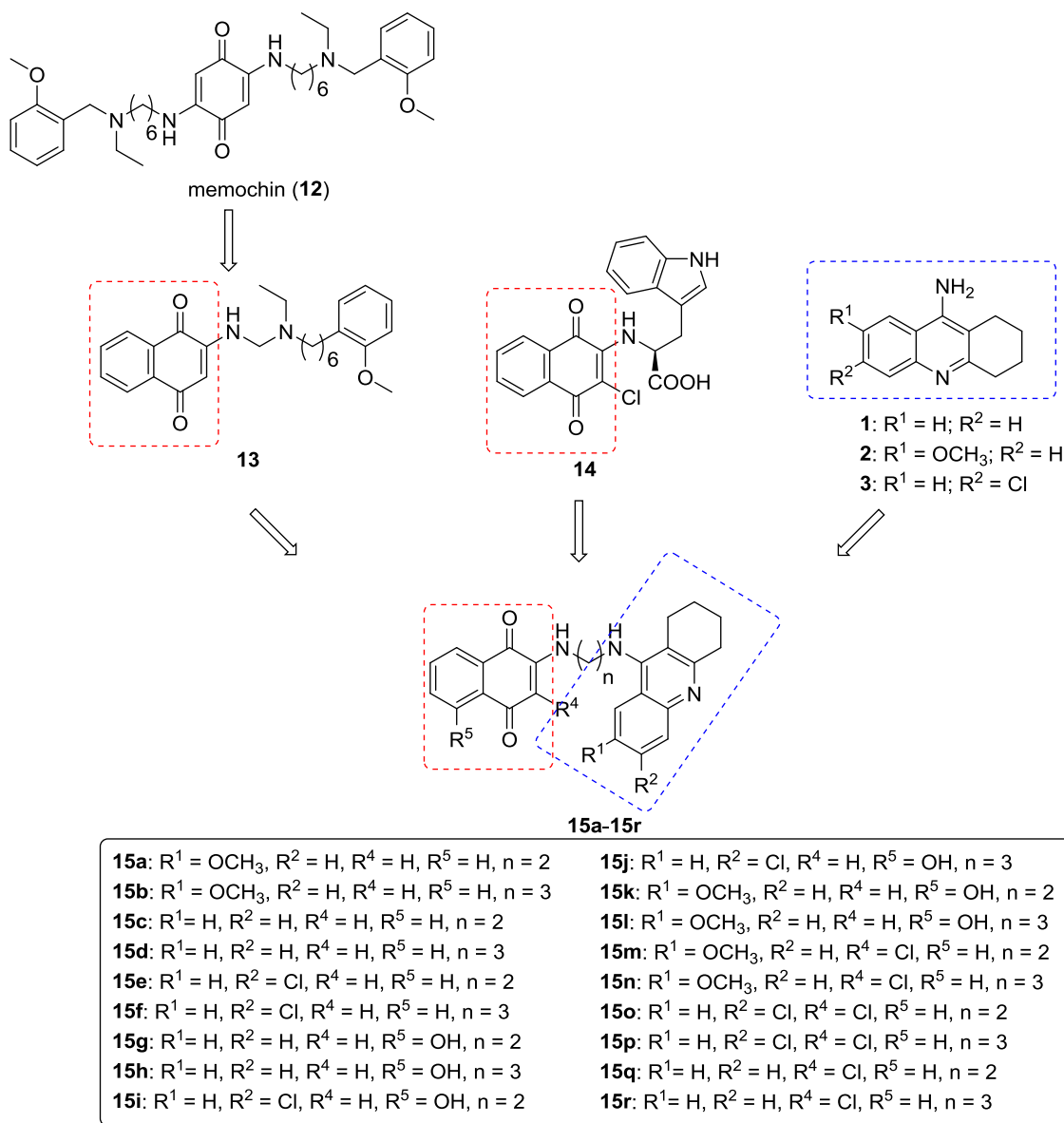


Obr. 12. 7-MEOTA-donepezilové heterodimery **8a-8v**.

Dva 7-MEOTA-donepezilové heterodimery, konkrétně **8i** (v literatuře kódován rovněž jako PC-37) a **8m** (PC-48), byly dále vybrány pro navazující studie. Role předkladatele habilitační práce v těchto studiích spočívala pouze v zajištění dostatečného množství sloučenin pro experimenty, proto tyto práce nejsou součástí komentáře. Z těchto studií lze uvést stanovení interakce s M1 AChR a N AChR,¹⁰⁹ behaviorální studie s laboratorními potkany kmene Wistar po expozici anticholinergikem 3-chinuklidinyl benzylátem,^{110,111} stanovení farmakokinetického profilu **8m** v plasmě a mozku laboratorních potkanů kmene Wistar,¹¹² stanovení profylaktické účinnosti proti otravě somanem,¹¹³ charakterizace metabolitů a metabolické stability po inkubaci s jaterními mikrozomy,¹¹⁴ analýza cholinesterasové účinnosti **8i** a **8m** s využitím kvantových teček¹¹⁵ a studie vazebnosti těchto heterodimerů do kavity β -cyklodextrinu s možným využitím pro následnou *in vivo* aplikaci.¹¹⁶

Mezi další významnou skupinu multipotentních heterodimerů patří takrin-kumarinové deriváty (**PVI**; Obr. 13). Kumarin (**10**) je frekventovaně využívaný farmakofor ve vývoji léčiv, přičemž pro neurodegenerativní choroby mají největší význam jeho antioxidační¹¹⁷ a protizánětlivé¹¹⁸ účinky. Některé kumarinové deriváty jsou rovněž potentními inhibitory AChE, nejznámější z nich, ensakulin, dosáhl 2. fáze klinického testování.¹¹⁹ V literatuře jsou dále dokumentovány série dalších hybridních struktur s kumarinovým fragmentem, které mají afinitu k různým enzymům/receptorům, případně mají nespecifický mechanismus působení (antioxidační, anti-amyloidní, chelatační vlastnosti aj.).¹¹⁸ Původní myšlenkou stojící za vývojem takrin-kumarinových heterodimerů je navýšení inhibiční účinnosti parentní struktury **1** v kombinaci s kumarinem, který, díky svému aromatickému charakteru, může být vhodným ligandem pro vazbu do PAS AChE. Námi prezentované takrin-kumarinové heterodimery (**11a-11e**; Obr. 13) se vyznačují přemostěním za pomoci alkylendiaminového (**11a-11c**) nebo thiosemikarbazidového (**11d**) řetězce nebo obsahují thiazolidinonový heterocyklus (**11e**). Z biologických vlastností byla stanovena inhibice cholinesteras. Nejsilnějším inhibitorem AChE i-BChE byl heterodimer **11c** (AChE $IC_{50} = 15,0 \pm 1,7$ nM; BChE $IC_{50} = 0,33 \pm 0,21$ μ M;

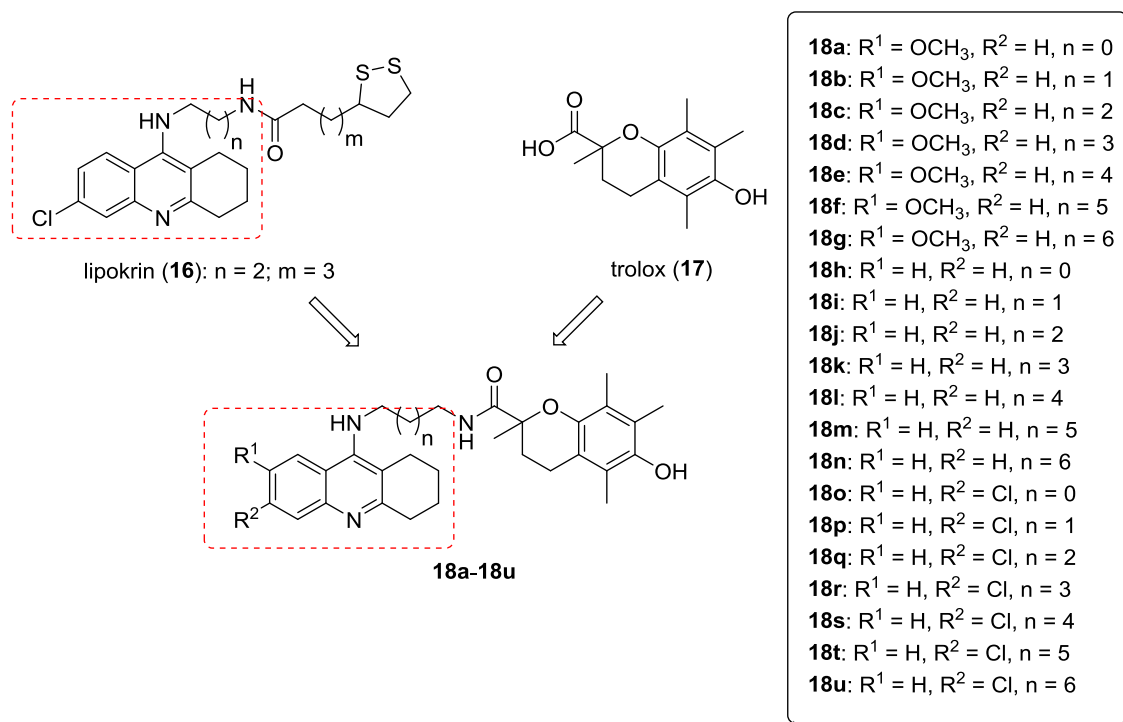
heterodimery jsou současně nejvíce selektivními pro dané cholinesterasy v rámci testované série: **15h** pro BChE a **15i** pro AChE. Chinony, včetně naftochinonu, jsou taktéž velice účinné inhibitory auto-agregace A β .¹²⁵ S přihlédnutím k tomuto faktu byly heterodimery **15a-15r** podrobeny stanovení vůči inhibici auto-agregace A β_{42} při 10 μ M koncentraci. Výsledkem je inhibice v rozsahu 22-52 %. Za nejúčinnější v tomto měřítku byla označena sloučenina **15p** (52% inhibice agregace). Pro porovnání lze ještě uvést inhibiční hodnoty dvou běžně používaných standardů inhibice agregace A β_{42} : kurkuminu (34% inhibice při 10 μ M) a bis(7)-takrinu (51% inhibice při 10 μ M).¹²⁶ Cytotoxicita byla stanovena na imortalizované myší kortikální neuronální linii Neuro2A (N2A) a cerebrálních granulových neuronech (CGN linie), přičemž průměrná viabilita po 24h inkubaci s **15i** (12,5 μ M) byla 85,6 \pm 13,8 % pro N2A linii, resp. 73,5 \pm 5,1 % pro CGN linii. Protektivní účinnost vybraných takrin-naftochinonových derivátů byla ověřena na buněčné linii N2A. A β_{42} a *terc*-butylhydroperoxid byly použity jako mediátory zánětu. V obou modelech bylo dosaženo statisticky významné protekce po podání **15e** i **15i**, která je připisována antioxidačnímu působení naftochinonové části molekuly, resp. její předpokládané konverzi na antioxidačně účinný hydrochinon.¹²⁷



Obr. 14. Takrin-naftochinonové heterodimery **15a-15r** a jejich návrh vycházející z memochinu (**12**), jeho monomerního derivátu (**13**), 3-chlor-1,4-naftochinon-2-yl-L-tryptofanu (**14**) a takrinových derivátů (**1-3**).

Z dalších antioxidačně účinných heterodimerů spojených s **1** lze vypíchnout skupinu takrin-troloxových derivátů (**PVIII**). Studie byla inspirována objevem lipokrinu (**16**; Obr. 15), takrinového heterodimeru spojeného s kyselinou lipoovou, který vykazoval sub-nanomolární inhibici AChE, inhiboval AChE-indukovanou agregaci A β a měl výrazný antioxidační účinek proti ROS.¹²⁸ Vitamin E, resp. jeho ve vodě rozpustný derivát trolox (**17**; Obr. 15), chrání buňky před toxickým vlivem ROS.¹²⁹ Spojením **17** s takrinovými deriváty (**1-3**) za pomoci alkylendiaminových můstků dalo vznik takrin-troloxovým heterodimerům (**18a-18u**; Obr. 15). Ty podle předpokladu a v souladu s parentním takrinovým fragmentem vykazovaly mikromolární až nanomolární inhibici obou cholinesteras. Aktivita vůči AChE stoupala v řadě 7-MEOTA-troloxové (**18a-18g**) > takrin-troloxové (**18h-18n**) > 6-chlortakrin-troloxové deriváty (**18o-18u**). Analogicky lze definovat pořadí účinnosti vůči BChE: 7-MEOTA-troloxové (**18a-18g**) = 6-chlortakrin-troloxové (**18o-18u**) > takrin-troloxové heterodimery (**18h-18n**). Účinnost napříč jednotlivými sériemi pro AChE vzrůstala s délkou řetězce, pro BChE lze tento trend označit za nespecifický, tj. není jasně

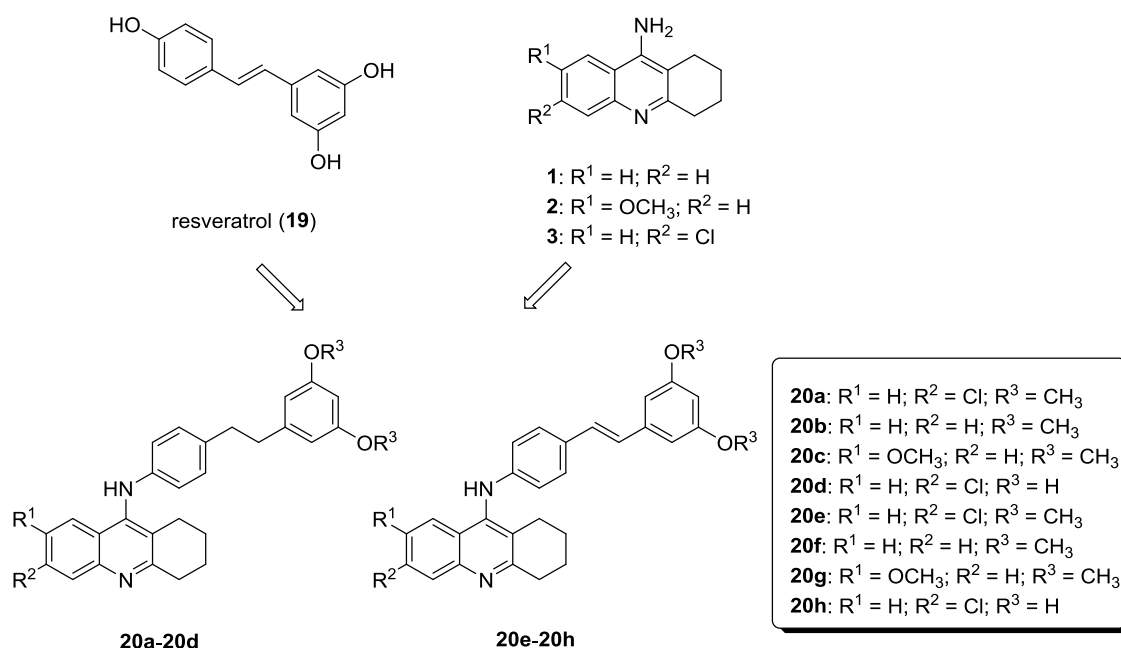
určen vztah mezi strukturou a účinkem. Z neúčinnějších inhibitorů se profilyovaly takrin-troloxové heterodimery **18o** (AChE $IC_{50} = 210 \pm 9$ nM; BChE $IC_{50} = 20 \pm 6$ nM; SI pro AChE = 0,1; Tab. 1) a **18u** (AChE $IC_{50} = 80 \pm 3$ nM; BChE $IC_{50} = 540 \pm 37$ nM; SI pro AChE = 6,8; Tab. 1). Pro sloučeninu **18u** byl objasněn smíšený typ inhibice vůči AChE. Molekulově modelovací studie předpověděla, že rozdílnost v afinitě vůči AChE je dána orientací takrinové části v aktivním místě AChE. Ta je v případě **18b** (7-MEOTA derivát) o 180° rozdílná oproti takrinovým farmakoforům **18i** a **18u**. Svou roli však hraje i část troloxová, která se v závislosti na délce spojovacího můstku, orientuje proti Trp86, resp. Tyr337 v PAS enzymu. Spojením obou farmakoforů došlo k částečné ztrátě antioxidačního účinku; žádná z testovaných sloučenin nedosahovala antioxidačního potenciálu samotného troloxu (DPPH $EC_{50} = 16,2 \pm 0,4$ μ M). Nejvíce se k této aktivitě přiblížil derivát **18u** (DPPH $EC_{50} = 44,1 \pm 0,9$ μ M). Na základě predikce průchodu přes HEB s využitím lipidické vrstvy byly označeny dva deriváty s možností prostupu do CNS pasivní difúzí (**18h** a **18u**). Inkubace **18u** s jaterními mikrozomy po dobu jedné hodiny určilo relativní stabilitu této sloučeniny; po této době zůstávalo více než 85 % **18u** nemetabolizováno. Sloučenina **18u** byla dále testována pro svou akutní toxicitu za podmínek *in vivo* u laboratorních potkanů po intramuskulární aplikaci. **18u** byla shledána netoxickou až do dávky 500 mg/kg (pozn. vyšší dávky nebyly testovány z důvodu omezené solubility **18u**) v porovnání s **3** ($LD_{50} = 7,5$ mg/kg).



Obr. 15. Takrin-troloxové heterodimery **18a-18u** a jejich předlohové struktury – lipokrin (**16**) a trolox (**17**).

Resveratrol (**19**; Obr. 16) je přírodní polyfenolická sloučenina obsažená zejména v hroznovém vínu a červeném víně. **19** je znám především pro svou protizánětlivou aktivitu ovlivněním mikroglíí (potlačení jejich fagocytózy, migrace, radikálové sekrece aj.).¹³⁰ **19** byl testován ve druhé fázi klinického hodnocení na kohortě 119 pacientů s AD (NCT01504854).¹³¹ Výsledky této studie nedávají jednoznačnou odpověď o potenciálu **19** v léčbě AD, doporučují pouze testování na větším vzorku pacientů. **19** má příznivý vliv na jaterní funkce.¹³² Některé studie dokonce poukazují na antiamyloidní efekt **19**.¹³³ Na základě těchto vlastností jsme navrhli kombinaci

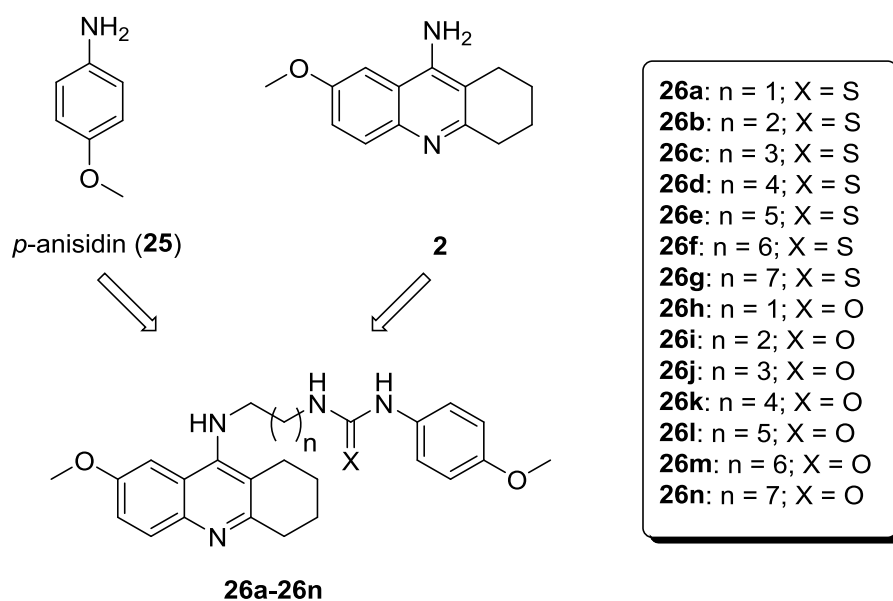
19 s jednotlivými takriny (**20a-20h**; **PIX**; Obr. 16). U tohoto typu návrhu sloučenin se jedná o tzv. „fusing approach“, tedy přímé napojení obou farmakoforů přes aromatickou amino-skupinu takrinu. Deriváty **20a-20d** obsahují nasycený řetězec mezi dvěma aromáty „resveratrolu“, zatímco deriváty **20e-20h** mají dvojnou vazbu v *trans* konfiguraci (v přírodních extraktech je větší zastoupení této formy).¹³⁴ Pouze některé testované deriváty ze série takrin-resveratrolových hybridů **20a-20h** byly aktivní na inhibici AChE (**20a**, **20b**, **20d** a **20h**), ostatní byly inaktivní při 10 μM koncentraci. Ani jeden z takrin-resveratrolových hybridů nebyl účinný na inhibici BChE při této koncentraci. Nejvíce potentními inhibitory AChE byly **20a** (AChE IC₅₀ = 0,8 ± 0,1 μM; Tab. 1) a **20d** (AChE IC₅₀ = 1,3 ± 0,1 μM; Tab. 1), přičemž **20d** vykázal nejvyšší efekt proti auto-agregaci Aβ (37,3 ± 4,1 %; testováno při 50 μM). Tento amyloidní profil je výraznější v porovnání s **19** (30,0 ± 8,7 %; 50 μM). Antioxidační efekt je zřejmě vázán pouze na methoxy-substituované deriváty (**20a**: DPPH EC₅₀ = 155 ± 4 μM; **19**: DPPH EC₅₀ = 25,6 ± 1,9 μM; **20d** a **20h**: DPPH EC₅₀ > 5000 μM). Cytotoxicita byla stanovena na primárních kulturách CGN buněčné linie. Pouze **20h** byla netoxická při nejvyšší testované koncentraci (50 μM), z ostatních lze vypíchnout **20d** a **20f** (cytotoxicita > 5 μM). Na základě výsledků cytotoxicity byl doporučen pro následné stanovení protizánětlivé a imunomodulační aktivity pouze derivát **20h**. Neuroprotektivní efekt byl sledován pomocí exprese indukovatelné formy NO-syntasy (iNOS) na modelu mikroglíi a astrocytů. Lipopolysacharid (LPS) byl v tomto případě použit jako mediátor zánětlivého poškození. Efekt **20h** byl dávkově závislý, zejména u astrocytů došlo k signifikantní redukci produkce dusitanů. Na imunomodulační aktivitu **20h** poukazuje snížená exprese receptoru TREM2 (z angl. Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2). Právě tento receptor je v poslední době skloňován jako rizikový faktor pro rozvoj sporadické formy AD.¹³⁵



Obr. 16. Takrin-resveratrolové hybridy **20a-20h**.

V další práci jsme se zaměřili na 6-chlortakrin-skutelarinové deriváty (**PX**). Skutelarin (chemicky (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-[5,6-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-4-oxochromen-7-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxane-2-karboxylová kyselina; **21**; Obr. 17) je přírodní flavon, který byl poprvé izolován z čínské byliny *Erigeron breviscapus* (čeleď Asteraceae). Mezi farmakologické vlastnosti **21** patří antioxidační a protizánětlivá aktivita, neuroprotektivní účinnost a schopnost inhibovat

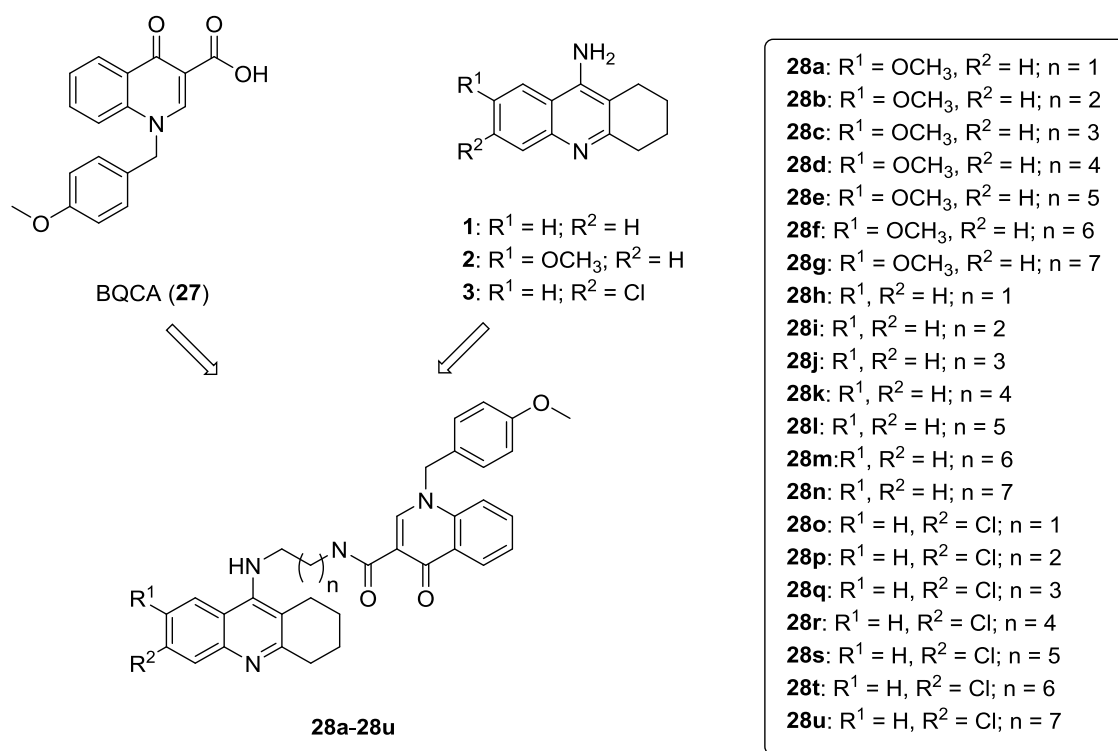
resp. močovinnového uskupení jako součástí spojovacího řetězce, které mohou vyústit ve vyšší afinitu k cholinesterásám.^{144,145} Spojovací můstek dále obsahoval alkylenový linker o různé délce k zajištění potřebného kontaktu mezi oběma částmi AChE i BChE. **25** byl zvolen do kombinace s ohledem jeho možného efektu na snížení intracelulární akumulace APP, což by vedlo k redukci množství produkovaného A β (tento efekt však nebyl stanoven).¹⁴⁶ Řada derivátů byla účinnějšími inhibitory AChE než předlohová struktura **2**. Aktivita vždy narůstala ke čtyřem uhlíkům ve spojovacím řetězci, pak měla mírně klesající tendenci. Výjimku tvořily deriváty s nejdelšími linkery, u kterých byla inhibiční aktivita vůči AChE opět stupňována. Pro inhibici BChE nelze vysledovat jednoznačný trend u sloučenin obsahující thiomocovinu; pro močovinnová analoga platí nárůst aktivity s prodlužující se délkou řetězce. Ze skupiny 7-MEOTA-*p*-anisidinových heterodimerů lze vyzvednout **26a** (AChE IC₅₀ = 43,6 ± 2,1 μM; BChE IC₅₀ = 1,0 ± 0,1 μM; SI pro AChE = 0,02; Tab. 1), **26g** (AChE IC₅₀ = 1,4 ± 0,4 μM; BChE IC₅₀ = 10,2 ± 4,7 μM; SI pro AChE = 7,5; Tab. 1), **26m** (AChE IC₅₀ = 1,7 ± 0,3 μM; BChE IC₅₀ = 1,7 ± 0,2 μM; SI pro AChE = 1; Tab. 1) a **26n** (AChE IC₅₀ = 2,1 ± 0,6 μM; BChE IC₅₀ = 1,3 ± 0,2 μM; SI pro AChE = 0,6; Tab. 1). V kinetické analýze s AChE se **26g** a **26k** chovaly jako nekompetitivní inhibitory. Zajímavé jsou poznatky z *in silico* studie, které poukazují na možnost orientace *p*-anisidinu do katalytické části enzymu AChE, zatímco **2** může interagovat na periférii enzymu.



Obr. 18. 7-MEOTA-*p*-anisidinové heterodimery (**26a-26n**).

BQCA (chemicky 1-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina; **27**, Obr. 19) je pozitivní alosterický modulátor M1 AChR.^{147,148} M1 AChR hrají důležitou roli v procesech spojených s pamětí a pozorností.^{149,150} Právě stimulace těchto receptorů je doprovázena nejen výrazným prokognitivním efektem, ale i poklesem fosforylace tau proteinu cestou aktivace proteinkinasy C a současné inhibice GSK-3 β .¹⁵¹ Ovlivněním M1 AChR lze rovněž docílit neamyloidogenního zpracování APP a z ní vyplývající produkce kratších, netoxických fragmentů A β .^{152,153} Vývoj selektivních ortosterických agonistů M1 AChR je problematický z důvodu homologie napříč jednotlivými subtypy muskarinových receptorů.¹⁵⁴ Z tohoto důvodu se vývoj modulátorů M1 AChR orientoval na méně konzervativní alosterické místo tohoto receptoru.¹⁵⁵ Jak je uvedeno výše, **27** patří do skupiny vysoce selektivních pozitivních

alosterických modulátorů M1 AChR. Jeho terapeutický potenciál v léčbě AD byl potvrzen na zvířecím modelu skopolaminem-indukované amnézie.¹⁵⁶ Na základě uvedeného jsme se rozhodli zkombinovat takriny **1-3** s **27** přes alkylendiaminový řetězec o různé délce, což vedlo k 21 novým takrin-BQCA heterodimerům **28a-28u** (Obr. 19; **PXII**). Předpokladem pro tuto sérii bylo duální posílení cholinergní transmise jak cestou inhibice cholinesteras, tak i modulací M1 AChR. Podobný koncept byl již navržen v minulosti u série takrin-xanomelinových heterodimerů.¹⁵⁷ Xanomelin je však ortosterickým agonistou muskarinových receptorů s převažující selektivitou pro M1/M4 AChR, jehož použití je limitováno nežádoucími účinky asociovanými se stimulací periferních M2/M3 AChR.¹⁵⁸ Všechny deriváty **28a-28u** byly účinnými inhibitory AChE/BChE dosahující mikromolárních až nanomolárních hodnot IC₅₀. Aktivita vůči AChE stoupala v řadě 7-MEOTA-BQCA (**28a-28g**) > takrin-BQCA (**28h-28n**) > 6-chlortakrin-BQCA (**28o-28u**); tento trend je pozorován i v rámci jiných sérií, které jsou součástí této práce (např. takrin-troloxové deriváty **18a-18u**). Nejvyšší účinnost vůči AChE v rámci série 7-MEOTA-BQCA heterodimerů je spojována s přítomností krátkého řetězce (n = 2 (**28a**), n = 3 (**28b**); Tab. 1). Pro takrin-BQCA heterodimery (**28h-28n**) dosáhl inhibiční potenciál vůči AChE maxima pro tříuhlíkatý derivát (**28i**; Tab. 1). Mezi deriváty **28o-28u** z poslední série nelze vypočítat jednoznačný trend v účinnosti, nejvyšší AChE inhibiční aktivitu měly heterodimery **28p** (n = 3; Tab. 1) a **28t** (n = 7). Ethylendiaminový řetězec byl shledán jako neoptimálnější pro inhibici BChE; tj. v každé sérii byl neúčinnějším inhibítorem ten s nejkratším spojovacím můstkem (**28a**, **28h** a **28o**). Vzhledem k tomu, že v rámci série nelze jednoznačně vymezit nejpotentnější sloučeniny, jsou hodnoty IC₅₀ pro nejzajímavější takrin-BQCA deriváty (**28a**, **28b**, **28h**, **28i**, **28o** a **28p**) sumarizovány pouze v Tabulce 1. Kinetická analýza mezi AChE a **28p** ukázala na smíšený typ inhibice. Aktivita vůči M1 AChR byla v rozporu s charakterem předložené sloučeniny **27**. Všechny testované deriváty vykazaly antagonistický efekt vůči těmto receptorům v mikromolárních hodnotách IC₅₀. To si můžeme vysvětlit preferenční vazbou takrinové části heterodimeru do alosterického místa receptoru. **1** je v literatuře zdokumentován jako antagonist M1 AChR.^{159,160} Z tohoto pohledu však nemusí být testované takrin-BQCA heterodimery zcela diskriminovány; svou roli může sehrát i metabolizace za podmínek *in vivo*, kdy může docházet k hydrolyze amidické vazby za odštěpení **27**. Lipofilní charakter sloučenin korespondoval s jejich cytotoxicitou (stanoveno na HepG2 buněčné linii); **28a-28u** snižovaly životaschopnost buněk o jeden až dva řády v porovnání s **1-3** a **27**. Predikce prostupu přes HEB naznačila, že pouze **28f** a **28b** jsou schopné transportu pasivní difúzí. Zvláštností **28f** z molekulově modelovací studie je orientace 7-MEOTA části do PAS AChE; tento fenomén však nebyl pozorován pro **28i** a **28p**.

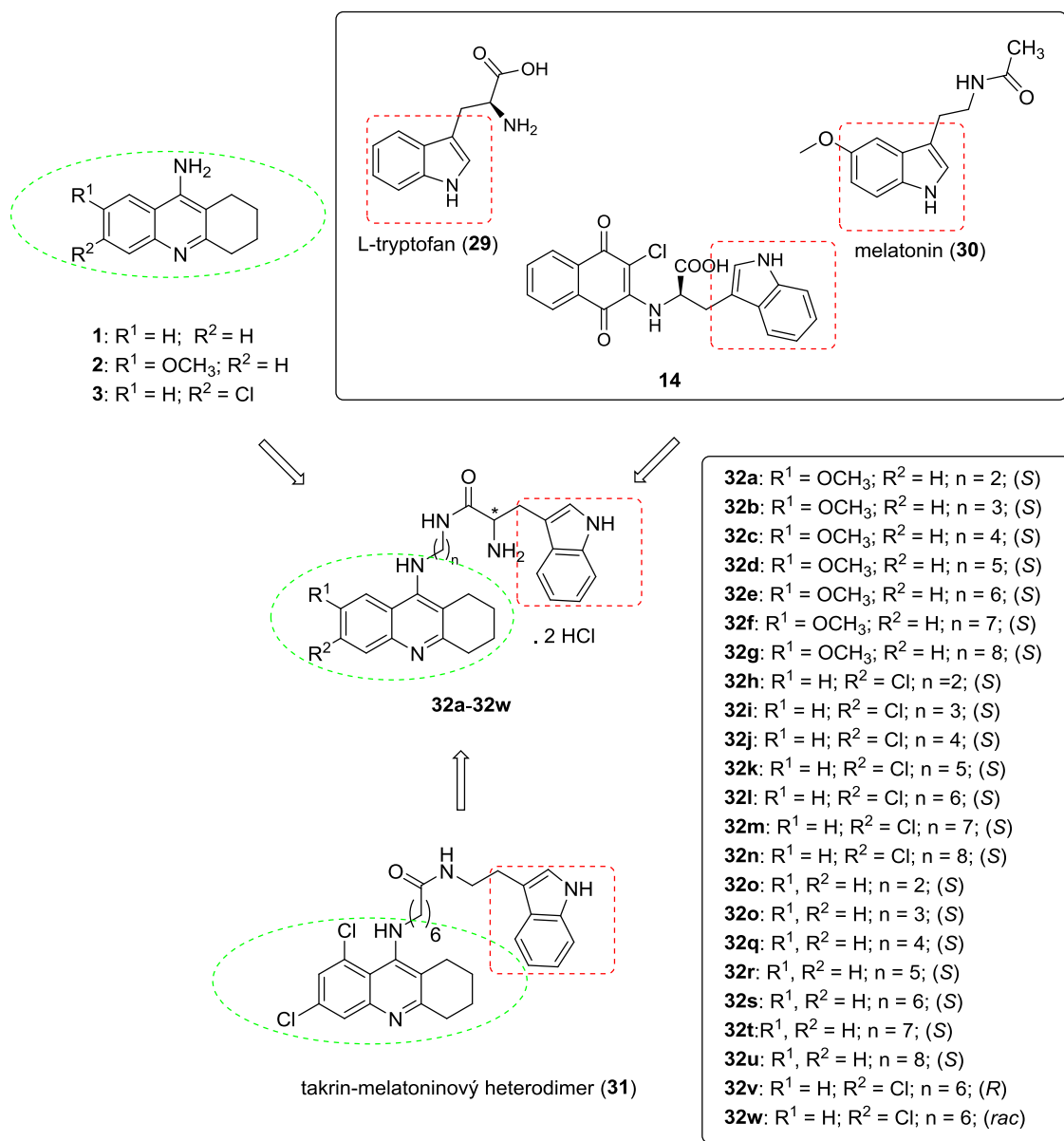


Obr. 19. Takrin-BQCA heterodimery (**28a-28n**).

Komplexní studie věnována takrin-tryptofanovým heterodimerům vznikla ve spolupráci s řadou českých i zahraničních výzkumných institucí (PXIII). L-Tryptofan (**29**; Obr. 20) je esenciální aminokyselina, jejíž nedostatečný příjem u starších osob je spojován s poruchami učení a paměti.¹⁶¹ Naproti tomu, dostatečný/zvýšený přísun **29** u transgenních myší se symptomy AD vede k celkové redukci intraneuronální akumulace A β v hipokampu.¹⁶² **29** je hodně využívaným základním stavebním kamenem ve vývoji anti-agregačně účinných sloučenin, mezi které patří dříve zmíněná dimerní sloučenina **14**, která zahrnuje strukturální motivy naftochinonu s **29**.¹⁶³ Indolový heterocyklus je součástí melatoninu (**30**; Obr. 20), hormonu produkovaného epifýzou, jehož úbytek je skloňován v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními včetně AD.¹⁶⁴ Melatonin je přirozeně vytvářen ze serotoninu, který má opět strukturální návaznost na **29**.¹⁶⁵ Bližší pojednání o **30** a jeho významu v AD je uvedeno v příloze **SXIX**. Jako předlohou serií pro takrin-tryptofanové deriváty posloužily právě takrin-melatoninové deriváty, z nichž nejlepší biologický profil vykázal heterodimer **31** (Obr. 20).^{166,167} Sloučenina **31** dosahovala pikomolárních hodnot IC₅₀ vůči AChE, vysokou míru selektivity pro tento enzym, neuroprotektivní efekt proti A β a výrazný antioxidační potenciál. V rámci námi prezentované série takrin-tryptofanových heterodimerů (**32a-32w**, Obr. 20) jsme prozkoumali biologický profil těchto heterodimerů, který sestával z inhibiční účinnosti vůči cholinesterasám, s navazující krystalografickou studií pro nejúčinnější deriváty na TcAChE a lidské BChE, anti-amyloidní vlastnosti jako inhibice auto-agregace A β ₄₂ a inhibice AChE-indukované agregace A β ₄₀, predikce prostupu přes HEB pomocí metody umělé semipermeabilní membrány, cytotoxický efekt, inhibice neuronální formy NO-syntasy (nNOS) a behaviorální studii s potkany v modelu skopolaminem indukované amnézie. V rámci objasnění vztahu mezi strukturou a účinkem k inhibici cholinesteras platí obdobná pravidla jako u výše uvedených serií. Inhibiční AChE aktivita klesala v řadě 6-chlortakrin-tryptofan (**32h-32n**) > takrin-tryptofan (**32o-32u**) > 7-MEOTA-tryptofanové deriváty (**32a-32g**), a dosahovala maxima pro deriváty s linkerem okolo pěti až šesti

methylenových jednotek (s výjimkou takrin-tryptofanové série, kde nejvyšší aktivitu vykázal osmiuhlíkatý derivát **32u**). Pro BChE platil totožný trend jako u inhibice AChE (klesání hodnot IC_{50} v řadě 6-chlortakrin-tryptofan (**32h-32n**) > takrin-tryptofan (**32o-32u**) > 7-MEOTA-tryptofanové deriváty (**32a-32g**)) s šestiuhlíkatým můstkem vykazujícím maximální aktivitu. Za nejúčinnější derivát můžeme označit **32l** (Tab. 1) s vybalancovaným profilem pro obě cholinesterasy (AChE $IC_{50} = 6,3 \pm 0,2$ nM; BChE $IC_{50} = 9,1 \pm 0,3$ nM; SI pro AChE = 1,4). Důležité je rovněž podotknout, že všechny sloučeniny z takrin-tryptofanové série si zachovaly optickou aktivitu, která byla ve shodě s **29**; absolutní konfigurace na chirálním centru byla v (*S*) konfiguraci (potvrzeno pomocí cirkulárního dichroismu). Pro rozšíření studované série jsme připravili další dva deriváty **32v** a **32w**. V případě sloučeniny **32v** se jedná o druhý enantiomer, chirální uhlík v tryptofanové části se nachází v (*R*) konfiguraci. Sloučenina **32w** je přítomna jako racemát. Z pohledu inhibice AChE nebyl prakticky žádný rozdíl mezi **32l**, **32v** a **32w** ($IC_{50} = 6,3 - 7,4$ nM). Naproti tomu inhibiční potenciál vůči BChE pro **32v** byl 15× nižší v porovnání s **32l** (**32v** BChE $IC_{50} = 140 \pm 5$ nM; **32l** BChE $IC_{50} = 9,1 \pm 0,3$ nM; Tab. 1). Tento rozdíl se podařilo objasnit za pomoci krystalografické studie, kdy derivát **32l** v (*S*) konformaci, resp. jeho dusíkový atom z indolu, je zapojen do vodíkové vazby s molekulou vody, která dále poskytuje vodíkový můstek s Thr120 a další molekulou vody. Tyto interakce v krystalografické struktuře **32v** chybí a jejich absence je tedy s největší pravděpodobností zodpovědná za pokles inhibiční aktivity. Dále byl charakterizován komplex **32l**, jako nejúčinnějšího inhibitoru AChE, s TcAChE. Dle předpokladu a souladu s krystalografickými studiemi dalších takrinových derivátů¹⁶⁸ byla 6-chlortakrinová část kotvena do katalytické části enzymu mezi Trp84 a Phe330 (číslování pro TcAChE) a tryptofanová část, resp. její protonovaná primární aminoskupina, je zapojena do kation- π interakce s Trp279. Propidium dijodid je selektivním inhibitorem AChE s preferenční vazbou do PAS.¹⁶⁹ K ověření interakce **32l** s touto částí enzymu jsme použili stanovení na vyvázání propidium dijodidu z PAS, kdy byla změřena disociační konstanta o hodnotě 4,82 μ M. Tato hodnota naznačuje přibližně 6,9× slabší vazbu **32l** do PAS v porovnání s propidium dijodidem.¹⁷⁰ V rámci celé série byla potvrzena vysoká účinnost na auto-agregaci A β_{42} v rozsahu od 18,7 % do 63,6 %. Optimální aktivita v tomto případě byla vázána na deriváty s delším řetězcem (šest až osm methylenových jednotek). Pro inhibici AChE-indukované agregace A β_{40} byl vybrán nejúčinnější inhibitor AChE z celé série (**32l**), který zaznamenal 48% inhibici pro shlukování tohoto proteinu. To je více než např. pro donepezil (22 %), ale méně než u bis(7)-takrinu (66,7 %).¹²⁶ V modelu semipermeabilní membrány byla stanovena možnost prostupu přes HEB, která ukázala, že **32l** a některé další deriváty mohou procházet pasivní difúzí. Nadměrná stimulace NMDA receptorů oxidem dusnatým vede k excitotoxicitě, která patří mezi fundamentální aspekty neurodegenerace.¹⁷¹ Excitotoxicitě lze předejít s využitím inhibitorů nNOS.¹⁷² Heterodimery **32a-32u**, bez rozdílu přítomnosti takrinového farmakoforu a délky řetězce, inhibovaly nNOS v mikromolárních hodnotách IC_{50} (18 - 45 μ M). Celkově lze však vnímat inhibiční potenciál takrin-tryptofanových heterodimerů za marginální s ohledem na rozdíl v inhibiční účinnosti oproti cholinesterasám. Maximální tolerovaná dávka **32l** byla stanovena na 70 mg/kg u laboratorních potkanů kmene Wistar po intraperitoneálním podání. Následně byl testován behaviorální efekt **32l** v Morissonově vodním bludišti v modelu skopolaminem-indukované amnézie. Sloučenina **32l** vykázala prokognitivní efekt po intracerebroventrikulární aplikaci nízké dávky testované sloučeniny (10 nM). Limitující vlastností takrin-tryptofanových derivátů je jejich malá metabolická stabilita. V navazující studii

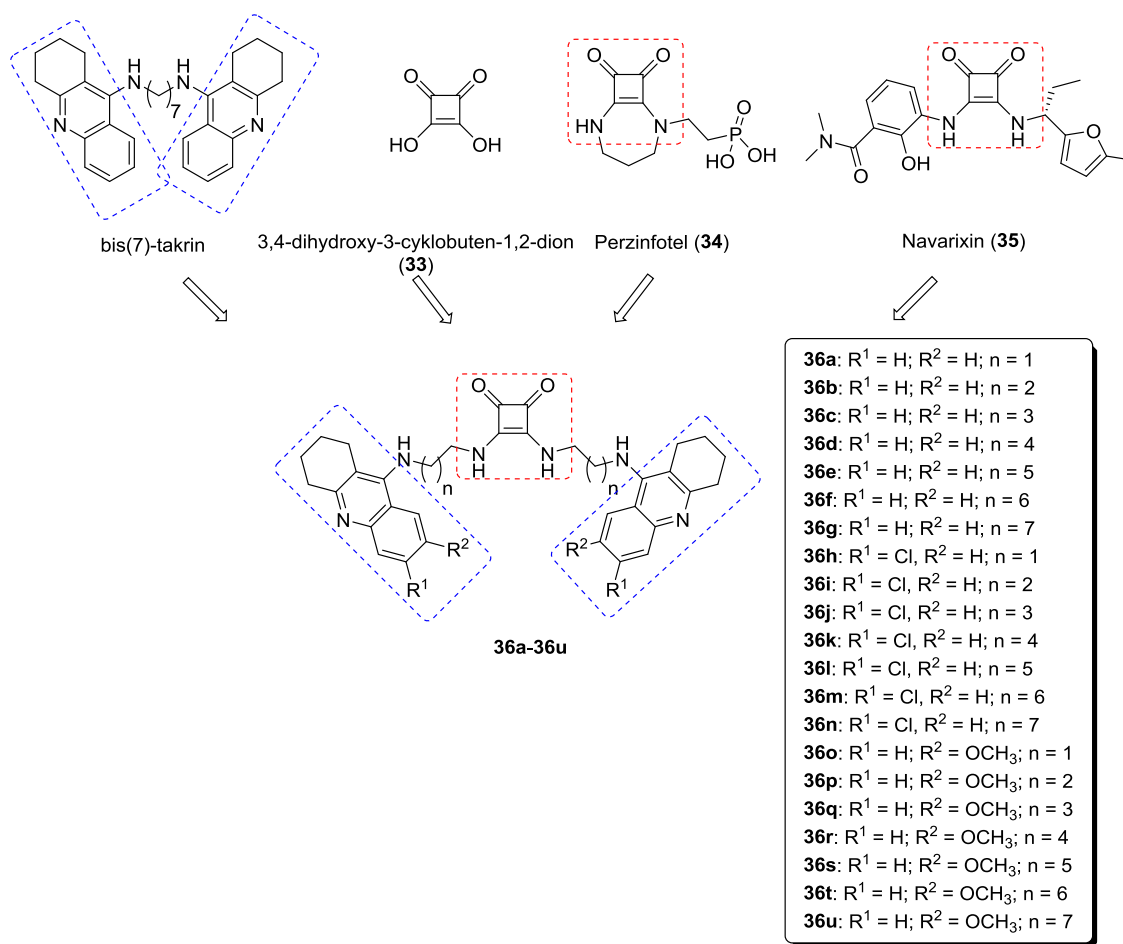
jsme odhalili, že amidická vazba je poměrně rychle hydrolyzována a vznikající metabolity přechází poměrně snadno do mozku.¹⁷³



Obr. 20. Takrin-tryptofanové heterodimery (**32a-32w**) a jejich design vycházející z indolových (**14**, **29** a **30**) a takrinových derivátů (**1**, **2**, **3** a **31**).

Kyselina čtvercová (**33**; Obr. 21), resp. amidy (skvaramidy) od ní odvezené, jsou mohutně využívány pro účely asymetrických syntéz jako chirální ligandy i jako katalyzátory zprostředkující vodíkové vazby s daným substrátem.^{174,175} Skvaramidový skelet je rovněž součástí některých klinických kandidátů, mezi které patří perzinfotel (**34**; antagonist NMDA receptorů; Obr. 21), neuroprotektivum testované při léčbě mrtvice,¹⁷⁶ a navarixin (**35**; antagonist CXCR1/CXCR2 receptorů; Obr. 21), protizánětlivé léčivo pro léčbu solidních tumorů.^{177,178} Skvaramid je plně bioisosterní jednotkou ke karboxylovým kyselinám, močovině, guanidinům aj.¹⁷⁹ V návaznosti na multipotentní profil bis(7)-takrinu v kombinaci s univerzálností **33**, resp. příslušeného amidu, jsme připravili sérii homodimerních takrinových sloučenin, tzv. takrin-skvaramidy (**36a-36u**; Obr. 21; **PXIV**). Začlenění skvaramidu do řetězce těchto duálních inhibitorů bylo plně v kontextu možnosti tvorby aromatických interakcí (střední část AChE, tzv. „mid-gorge region“, je částí

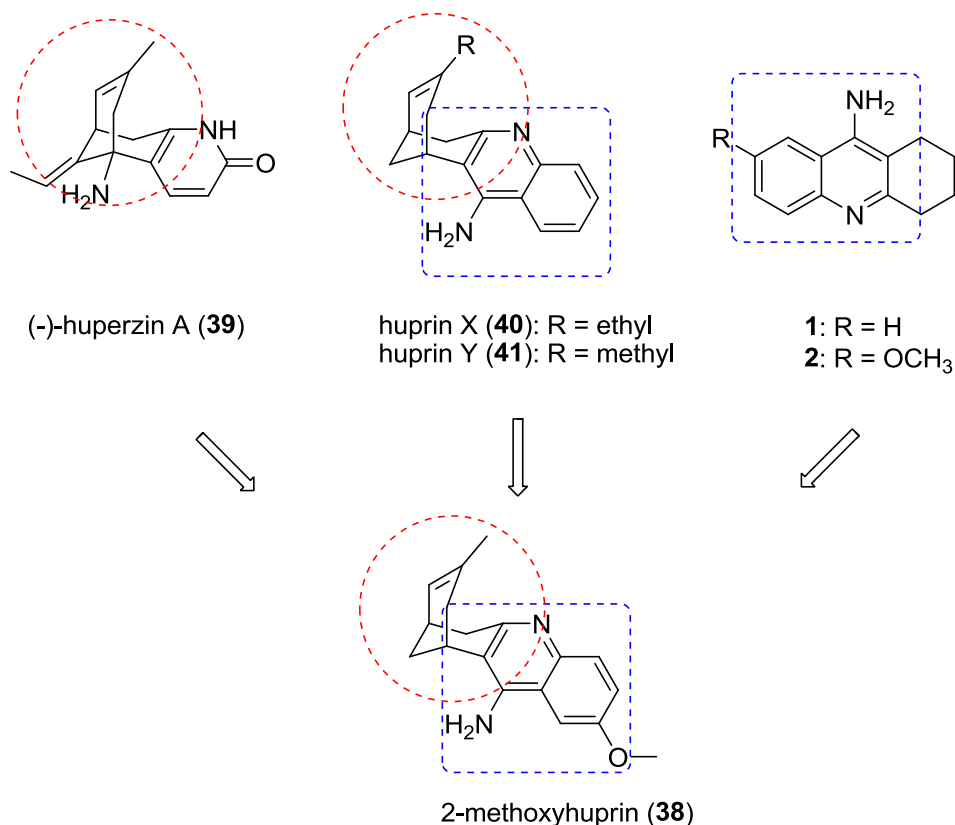
bohatou na aromatická residua)¹⁸⁰ i vodíkových vazeb mezi ligandem a enzymem. V syntéze byl kladen důraz na jednoduchost přípravy; byly použity dříve připravené α,ω -diaminoalkylen-takriny (**PVIII**) a jejich přímou kondenzací s komerčně dostupnou sloučeninou **33** ve výtěžku 6 - 87 %. Mimoto byla pozorována i tvorba monomerních aduktů, které ovšem byly velice nestabilní a z biologických experimentů vyloučeny. Takrinové (**36a-36g**) i 6-chlortakrinové (**36h-36n**) deriváty byly vysoce účinnými inhibitory AChE s hodnotami IC_{50} v nanomolární oblasti. Homodimery odvozené od 7-MEOTA (**36o-36u**) byly o dva až tři řády méně účinné. Inhibiční aktivita pro BChE byla vždy o jeden řád nižší v porovnání s AChE, a klesala v řadě takrin-skvaramidy (**36a-36g**) > 6-chlortakrin-skvaramidy (**36h-36n**) > 7-MEOTA-skvaramidy (**36o-36u**). Z tohoto vyplývá selektivní charakter testované série pro AChE. Nejvyšší aktivita vůči AChE je spojována s dvou až tříuhlíkatým linkerem, pro BChE byl tento trend nepravidelný. Za nejzajímavější z pohledu inhibice cholinesteras lze označit **36n** vykazující selektivitu pro AChE (AChE $IC_{50} = 10,0 \pm 0,4$ nM; BChE $IC_{50} > 100$ μ M; SI pro AChE > 10000; Tab. 1). Mechanismus inhibice byl stanoven pro **36i** jako nejúčinnějšího inhibitoru AChE a pro **36e** jako nejlepšího inhibitoru BChE. V obou případech byl zjištěn smíšený typ inhibice. Řada takrin-skvaramidů zejména z 6-chlortakrinové skupiny (**36h-36n**) vykazovala poměrně nízkou cytotoxicitu (> 64 μ M). Dále byla stanovena predikce prostupu, přičemž průchodu pomocí pasivní difúze je schopná pouze sloučenina **36i**. Multipotentní potenciál takrin-skvaramidových homodimerů je však nutné ověřit dalšími experimenty. V současné době jsou tyto sloučeniny testovány ve spolupráci s prof. Volkerem Lauschke (Karolinska Institute, Švédsko) na jejich inhibiční potenciál s nemutovanou a mutovanou formou BChE.



Obr. 21. Takrin-skvaramidové homodimery (**36a-36u**) a jejich návrh vycházející z bis(7)-takrinu a derivátů kyseliny čtvercové (3,4-dihydroxy-3-cyklobuten-1,2-dion; **33**) – perzinfotelu (**34**) a navarixinu (**35**).

Naše skupina představila nový typ inhibitoru – 2-methoxyhuprin, který spojuje strukturní vlastnosti **2** a huprinů Y (**37**; Obr. 22; **PXV**). 2-Methoxyhuprin (**38**, Obr. 22) není v pravém slova smyslu multipotentní sloučeninou. Její biologický profil je stále předmětem zkoumání. Návrh **38** vychází z **1**, resp. **2** (4-aminochinolinový heterocyklus), a huperzinu A (**39**; karbocyklická část). Oba dva fragmenty zaujímají v krystalových strukturách AChE odlišná, ale zároveň blízká místa, jejich spojení tak nabízí navýšení inhibičního efektu vůči tomuto enzymu.^{180–182} Toto je případ i huprinů X (**40**; Obr. 22) a Y (**41**; Obr. 22), které jsou nanomolárními a vysoce selektivními inhibitory AChE.¹⁸³ Skupina huprinů se stala předmětem velkého množství studií zabývajících se vývojem léčiv se zaměřením na terapii Myastenie gravis, spavé nemoci (africké trypanozomiázy), malárie a transmisivní spongiformní encefalopatie (prionové onemocnění). Detailněji je tato problematika diskutována v příloze **SXX**. U **38** je předpokladem nízká toxicita *in vivo* (díky začlenění strukturních motivů z **2**). Dále se předpokládá ovlivnění amyloidní kaskády (mírnění kognitivního deficitu vlivem Aβ₄₀), snížení glutamátové excitotoxicity díky bránění hyperstimulaci NMDAR a antioxidační působení.¹⁸⁴ V neposlední řadě může **38** sloužit jako základní stavební prvek pro syntézu duálních inhibitorů vyvíjených na bázi „linking approach“. Z výsledků biologických stanovení vyplývá, že **38** (AChE IC₅₀ = 2,6 ± 0,4 μM; BChE IC₅₀ = 3,8 ± 0,1 μM; SI pro AChE = 1,4) je účinnějším inhibitorem než předlohová struktura **2** vůči oběma cholinesterasám, avšak ani zdaleka nedosahuje účinnosti **41**. V kinetickém profilu inhibice AChE byl zaznamenán smíšený typ inhibice. Díky strukturní příbuznosti k jiným

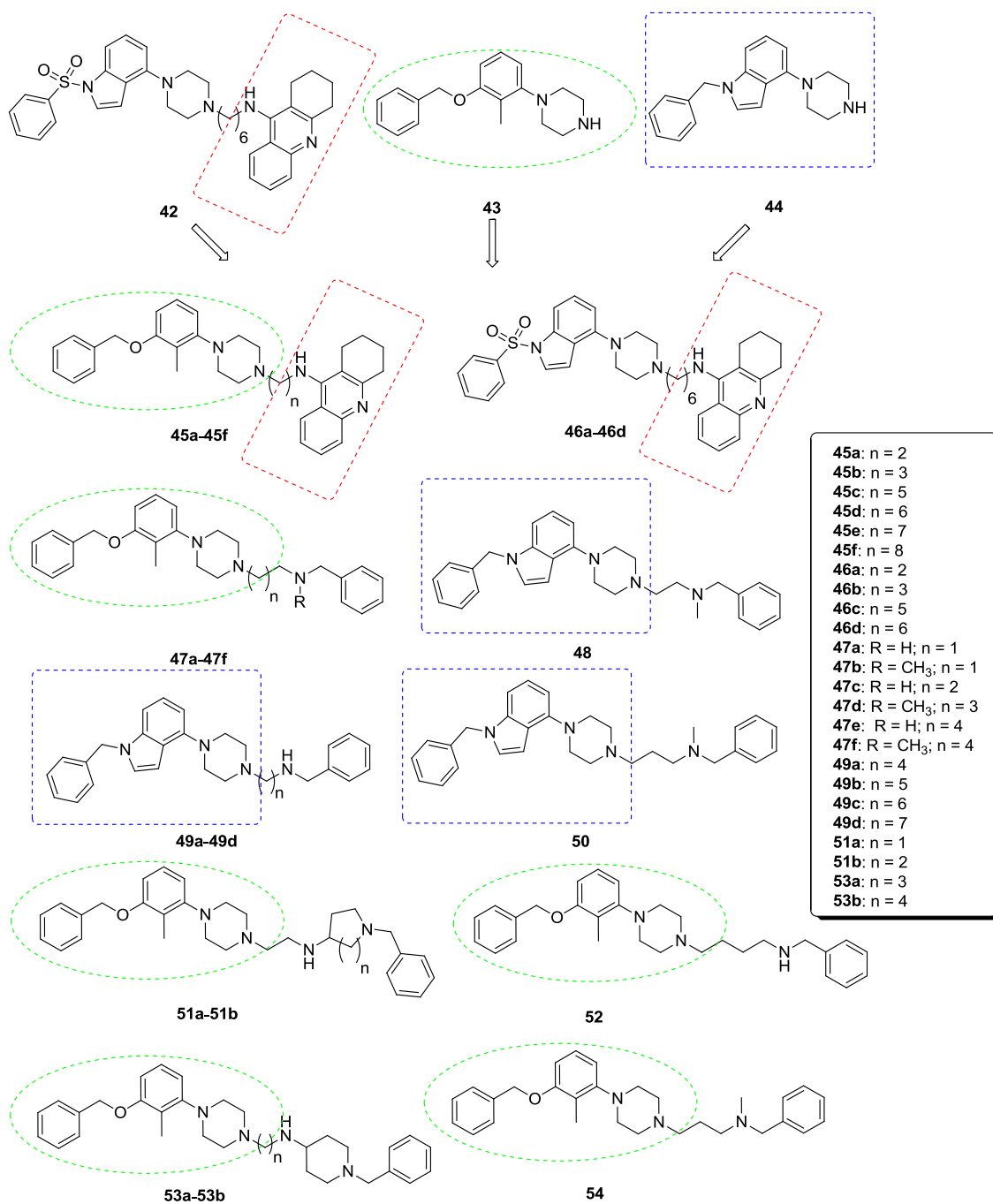
huprinovým derivátům a jejich známému farmakokinetickému profilu, je předpokladem prostupnost **38** do CNS. To je podloženo i pomocí stanovení prostupu semipermeabilní membránou (pasivní difúze do CNS). Tato data jsou již nyní k dispozici, ale doposud nebyla nikde publikována. Stanovení cytotoxicity prováděné na buněčných liniích HepG2, neuronální SH-SY5Y a lidském renálním adenokarcinomu (ACHN) jsou spíše srovnatelné s daty pro **41**, **2** a **3** na HepG2. Molekulově modelovací studii jsme zaměřili na stanovení rozdílů v orientaci dvou existujících enantiomerů **41** a dvou předpokládaných enantiomerů **38**. Z literatury je známo, že více účinným enantiomerem je *7S,11S-41* a to jak pro inhibici AChE, tak i BChE (*7S,11S-41* AChE $IC_{50} = 0,32$ nM vs. *7R,11R-38* AChE $IC_{50} = 123$ nM; *7S,11S-41* BChE $IC_{50} = 153$ nM vs. *7R,11R-41* BChE $IC_{50} = 247$ nM).¹⁸⁵ Na základě *in silico* experimentů jsme predikovali, že více účinným derivátem pro inhibici AChE může být *7S,11S-38*, naproti tomu se domníváme, že účinnějším pro inhibici BChE by mohl být *7R,11R-38*. Avšak chirální separace nebyla prováděna a tak výsledky molekulového modelování zůstávají pouze v rovině teorie.



Obr. 22. Návrh 2-methoxyhuprinu (**38**) vycházející z **2**, huperzinu A (**39**) a huprinů X (**40**) a Y (**41**).

5-HT₆ receptory se podílí na řízení kognitivních funkcí i do značné míry ovlivňují psychotické stavy, jako jsou deprese a úzkost.¹⁸⁶ Antagonisté 5-HT₆ receptorů modulují cholinergní, monoaminergní a glutamátergní systémy.^{187–189} Vedle kauzální terapie zprostředkované cholinergní transmisí, vykazují antagonisté 5-HT₆ receptorů i nemoc-modulující vlastnosti (synaptická remodelace, snížení neuronální hyperexcitability).^{190,191} Ačkoliv byl prokázán pozitivní efekt antagonistů 5-HT₆ receptorů na zvířecích modelech s AD, v klinických studiích jako monoterapie tato léčiva neobstála v porovnání s placebem-kontrolovanou skupinou.¹⁹² Vedle toho však jejich současné podávání s inhibitory cholinesteras mělo příznivý vliv na kognitivní projevy u pacientů s AD.¹⁹³ Mezi nejznámější antagonisty 5-HT₆ receptorů, které dosáhly druhé

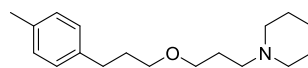
fáze (monoterapie), resp. třetí fáze klinického testování (v kombinaci s inhibitory cholinesteras), patří idalopirdin a intepirdin.¹⁹⁴ Na základě uvedeného jsme ve spolupráci s Jagelonskou univerzitou v Krakově (Polsko) navrhli nová multipotentní léčiva, která ve své struktuře zahrnují antagonistický efekt vůči 5-HT₆ receptorům a současně cholinergní efekt daný inhibicí cholinesteras (**PXVI**). Předlohou strukturu představovala sloučenina **42** (Obr. 23), která má vybalancovaný profil vůči cholinesterasám i 5-HT₆ receptoru (AChE IC₅₀ = 12,9 ± 0,2 nM; BChE IC₅₀ = 29,7 ± 3,6 nM; SI pro AChE = 2,3; K_i 5-HT₆ = 27,0 ± 0,1 nM).¹⁹⁵ Limitujícím faktorem pro další výzkum spojený s molekulou **42** jsou zejména její nepříznivé fyzikálně-chemické vlastnosti, které negativně ovlivňují její farmakokinetiku.¹⁹⁶ S tímto ohledem jsme pro konstrukci nových multipotentních sloučenin s duální afinitou pro 5-HT₆ receptory a cholinesterasy použili 1-(3-(benzyloxy)-2-methylfenyl)piperazin (**43**; Obr. 23) a 1-benzyl-4-(piperazin-1-yl)-1*H*-indol (**44**; Obr. 23). Oba dva fragmenty jsou zdokumentovány jako antagonisté 5-HT₆ receptoru.^{197,198} Za účelem inhibice cholinesteras jsme do nových struktur implementovali **1** nebo *N*-benzylamin, který je součástí donepezilu. To vedlo k syntéze celkově 28 nových sloučenin (**45a-54**; Obr. 23). Za nejúčinnější AChE inhibitory lze označit všechny takrinové deriváty (**45a-46d**), jejichž hodnoty IC₅₀ byly v rozmezí 3 – 62 nM. Zajímavostí dle molekulově modelovací studie je orientace takrinových derivátů s krátkým řetězcem (**45a, 45b, 46a, 46b**) v aktivním místě enzymu; takrinová část byla vložena mezi Trp84 a Phe330 (číslování pro TcAChE) do katalytické části enzymu a část interagující s 5-HT₆ receptorem je vložena do periferní části enzymu. Naproti tomu deriváty s delším linkerem (**45c-45f, 46c a 46d**) vykazují inverzní uspořádání v aktivní části enzymu. Takrinové deriváty byly rovněž vynikajícími inhibitory eqBChE s hodnotami IC₅₀ v rozsahu 2 – 85 nM. Deriváty *N*-benzylaminového typu jsou slabšími inhibitory AChE s hodnotami IC₅₀ v mikromolární oblasti (**47e, 49a-49d**); většina však nevykazuje žádnou aktivitu při 10 μM koncentraci. Všechny deriváty *N*-benzylaminového typu vyústily jako mikromolární inhibitory BChE. Celá série 5-HT₆-cholinesterasových modulátorů si zachovala, v souladu s předlohovými strukturami **43** a **44**, vysokou afinitu pro 5-HT₆ receptory v rozmezí K_i = 10 – 845 nM. Pro funkční stanovení byly vybrány deriváty **45d** a **49c**, z nichž oba vykazovaly antagonistický charakter. U sloučenin **45d** a **46d** byl stanoven typ inhibice pro AChE (**45d**), resp. pro BChE (**46d**). V obou případech se jednalo o nekompetitivní inhibitory. Některé další sloučeniny byly zhodnoceny i z pohledu inhibice auto-agregace Aβ₄₂ při 10 μM koncentraci s vynikající aktivitou mezi 48 – 95 %. U nejúčinnějších derivátů (**45d** a **46a**) pak byla stanovena hodnota IC₅₀ pro tento typ aktivity (**45d**: auto-agregace Aβ₄₂ IC₅₀ = 1,27 μM; **46a**: agregace Aβ₄₂ IC₅₀ = 1,29 μM). U řady sloučenin je příslib prostupu přes HEB pomocí pasivní difúze. U sloučeniny **45d** byla odhalena rychlá metabolizace po inkubaci s jaterními mikrozomy (50 % za 120 min) a nevýrazná interakce s cytochromem CYP3A4, která byla přibližně 170× slabší v porovnání s ketokonazolem. Celkově studie vyzdvihla potenciál **45d** (Tab. 1) jako nové multipotentní sloučeniny.



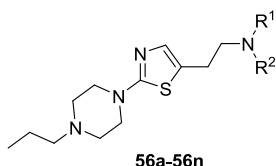
Obr. 23. Nové modulátory cholinesteras a 5-HT₆ receptorů (**45a-54**) odvozené z předlohových struktur **42-44**.

H₃ histaminové receptory byly poprvé popsány v roce 1983 jako autoreceptory, později jako heteroreceptory řídící uvolňování neurotransmiterů včetně ACh. Blokádou těchto receptorů selektivními antagonisty dochází k uvolňování nejen histaminu, ale i výše zmíněného ACh, dopaminu nebo noradrenalinu, které jsou nedílnou součástí kognitivních procesů. To nabízí možnost využití při léčbě některých onemocnění spojených s CNS.¹⁹⁹ Pitolisant (**55**; Obr. 24) je doposud jediným léčivem ze skupiny antagonistů H₃ histaminových receptorů, který našel praktické uplatnění v léčbě narkolepsie, Parkinsonovy choroby a spánkových poruch.²⁰⁰ V neposlední řadě je sledován i jeho prokognitivní potenciál v léčbě demencí včetně AD, schizofrenie a hyperkinetické poruchy (ADHD).²⁰¹ Podobně jako u výše zmíněných antagonistů

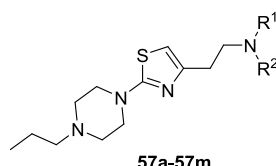
5-HT₆ receptorů, i zde byl pozorován aditivní efekt kombinace blokátorů H₃ histaminových receptorů s inhibitory cholinesteras.²⁰² V literatuře je zdokumentována řada ligandů s duálním efektem, tj. inhibicí cholinesteras s antagonizací H₃ histaminových receptorů.^{203–205} Tyto série sloučenin využívají zpravidla přístupů jako jsou „linking“ nebo „merging“ pro vývoj nových duálně působících molekul. V naší studii jsme se zaměřili na hledání nových strukturních motivů z nově vytvořené knihovny 50 sloučenin nesoucí thiazol a piperazin jako centrální heterocykly (**PXVII**). Na základě struktury jsou tyto duální modulátory dále členěny do tří rodin jako deriváty 1-[2-thiazol-5-yl-(2-aminoethyl)]-4-*n*-propylpiperazinu (**56a-56n**; Obr. 24), 1-[2-thiazol-4-yl-(2-aminoethyl)]-4-*n*-propylpiperazinu (**57a-57m**; Obr. 24) a 1-fenoxyalkyl-4-(amino)alkylpiperazinu (**58a-58w**; Obr. 24). Z pohledu vztahu mezi strukturou a účinkem je patrné, že inhibiční aktivita vůči cholinesterasám u derivátů nesoucí thiazolový cyklus je vázána na přítomnost fenylakylového fragmentu. Aktivní deriváty z první série (**56g-56i**) vykazují vyšší afinitu pro AChE, zatímco deriváty z druhé série (**57f-57j**) jsou buď neselektivními nebo mírně selektivními BChE inhibitory. Současně také platí, že deriváty z první série (**56a-56n**) mají obecně vyšší afinitu pro H₃ histaminové receptory oproti druhé sérii molekul. V rámci třetí série (**58a-58w**) se vybrané sloučeniny profilovaly jako účinnější inhibitory BChE oproti AChE, které vykazaly i nižší afinitu pro H₃ histaminové receptory v porovnání s první sérií (**56a-56n**). Pro kinetickou studii byly vybrány nejúčinnější cholinesterasové inhibitory – **56h**, **56i** a **58t** (Tab. 1). Pro oba stanovované enzymy (*Ee*AChE a *eq*BChE) lze mechanismus inhibice označit za smíšený u všech tří testovaných sloučenin. Fyzikálně-chemické vlastnosti s predikcí prostupu přes HEB byly stanoveny *in silico* u derivátů **56h**, **56i**, **57f** a **58t**, a přechod přes tuto membránu byl následně ověřen s využitím metody prostupu přes semipermeabilní membránu. Pro *in vivo* experimenty byl zvolen model skopolaminem navozené amnézie. Myši byly podrobeny testu pasivního vyhýbání za současného stanovení lokomoční aktivity. Mírný pokles lokomoční aktivity byl pozorován pro všechny sloučeniny v různých časových intervalech.



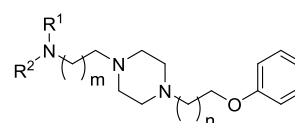
pitolisant (**55**)



56a-56n



57a-57m



58a-58w

56a: R¹ = H; R² = H
56b: R¹ = CH₃; R² = C₃H₇
56c: R¹ = CH₃; R² = C₆H₁₁
56d: R¹ = H; R² = CHO
56e: R¹ = CH₃; R² = CHO
56f: R¹ = CH₃; R² = COCH₂CH₃
56g: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₂C₆H₅
56h: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₃C₆H₅
56i: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₄C₆H₅
56j: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₅C₆H₅
56k: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₅
56l: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₄CH₃(*p*)
56m: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₄NO₂(*p*)
56n: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₄Cl(*p*)

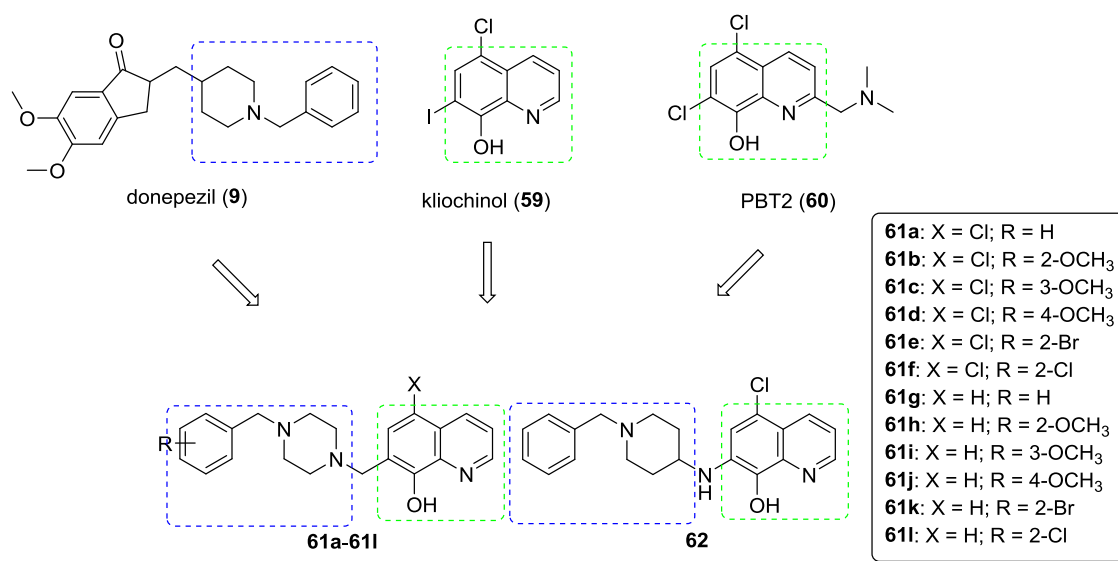
57a: R¹ = H; R² = H
57b: R¹ = CH₃; R² = H
57c: R¹ = CH₃; R² = CH₃
57d: R¹ = CH₃; R² = C₃H₇
57e: R¹ = CH₃; R² = COCH₃
57f: R¹ = CH₃; R² = CH₂C₆H₅
57g: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₂C₆H₅
57h: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₃C₆H₅
57i: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₄C₆H₅
57j: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₅C₆H₅
57k: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₅
57l: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₄CH₃(*p*)
57m: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₄NO₂(*p*)

58a: R¹ = H; R² = H; n = 1; m = 2
58b: R¹ = H; R² = H; n = 2; m = 2
58c: R¹ = H; R² = H; n = 3; m = 2
58d: R¹ = H; R² = H; n = 4; m = 2
58e: R¹ = H; R² = H; n = 5; m = 2
58f: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 2
58g: R¹ = H; R² = H; n = 7; m = 2
58h: R¹ = H; R² = H; n = 8; m = 2
58i: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 1
58j: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 3
58k: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 4
58l: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 5
58m: R¹ = H; R² = H; n = 6; m = 6
58n: R¹ = CH₃; R² = CH₃; n = 6; m = 3
58o: R¹ = CH₃; R² = C₂H₅; n = 6; m = 3
58p: R¹ = CH₃; R² = C₃H₇; n = 6; m = 3
58q: R¹ = CH₃; R² = C₆H₁₁; n = 6; m = 3
58r: R¹ = CH₃; R² = CH₂C₆H₅; n = 6; m = 3
58s: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₃C₆H₅; n = 6; m = 3
58t: R¹ = CH₃; R² = (CH₂)₅C₆H₅; n = 6; m = 3
58u: R¹ = CH₃; R² = COC₆H₅; n = 6; m = 3
58v: R¹ = CH₃; R² = COCF₃; n = 6; m = 3
58w: R¹ = H; R² = piperidin-1-yl; n = 6; m = 3

Obr. 24. Duálně působící molekuly mechanismy inhibice cholinesteras a antagonizace H₃ histaminových receptorů (**56a-56n**; **57a-57m**; a **58a-58w**). Uvedena je i struktura pitolisantu (**55**), selektivního H₃ histaminového antagonisty.

V další práci jsme představili sérii sloučenin kombinující strukturní fragmenty **9** a kliočinolu (**59**; Obr. 25), resp. PBT2 (**60**; Obr. 25; **PXVIII**). Sloučeniny **59** i **60** patří mezi dříve zvažovaná kandidátní léčiva pro terapii AD působící na bázi chelatace měďnatých kationtů.²⁰⁶ Historicky byl 8-hydroxychinolinový derivát **59** využíván jako antifungální a antiprotozoální terapeutikum, ale od jeho preskripce se ustoupilo v roce 1983 z důvodu neurotoxicity způsobené vyvazováním zinku v organismu.²⁰⁷ Právě tento nežádoucí účinek upozornil na nutnost orientovat vývoj na selektivní měďnaté chelátory. **59** i **60** snižují plasmatické hladiny Aβ₄₂. Obě sloučeniny mají schopnost degradovat amyloidní plaky vyvazováním kovu z komplexu kov-Aβ, čímž dochází k narušení jeho stability.²⁰⁸ Mechanismus působení **59** a **60** je však ještě o něco komplexnější; hovoří se o jejich ovlivnění fosforylace tau proteinu (cestou inhibice GSK-3β) a redistribuci mědi zpět do buňky. I přes příznivé výsledky z druhé fáze klinického testování s **59**, byly navazující studie zastaveny z důvodu přítomnosti stopového množství dijudovaného derivátu 8-hydroxychinolinu, který vzniká při průmyslové výrobě a je prokazatelným karcinogenem. **60** představuje druhou generaci 8-hydroxychinolinových derivátů s velmi podobným terapeutickým profilem jako **59**, u kterého při výrobě nevzniká vedlejší toxický produkt.²⁰⁹ I přes neúspěch v klinických studiích se obě sloučeniny staly hojně vyhledávanými ve vývoji multipotentních sloučenin pro léčbu neurodegenerativních chorob. V naší studii jsme skloubili několik biologických vlastností do jedné molekuly, které zahrnují inhibiční profil cholinesteras,

chelatační a antioxidační vlastnosti a neuroprotektivní potenciál. Celkově bylo připraveno 13 nových sloučenin (**61a-61l** a **62**; Obr. 25). Oproti předpokladu, všechny sloučeniny neinhibovaly AChE při screeningové 40 μ M koncentraci, hodnoty IC₅₀ tak nebyly stanoveny. V kontrastu s inhibičním profilem **9** je zajímavostí inverze účinku ve prospěch inhibice BChE. Většina aktivních sloučenin vyústila v inhibitory s mikromolární účinností hodnot IC₅₀ vůči tomuto enzymu. Nejúčinnější z toho pohledu byla molekula **61h** (BChE IC₅₀ = 5,7 \pm 0,2 μ M; Tab. 1). V návaznosti na prokázaný efekt **59** a **60** na inhibici oligomerizace A β ²¹⁰ jsme tuto sérii sloučenin nechali otestovat na inhibici auto-agregace A β ₄₂. Všechny sloučeniny inhibovaly agregaci tohoto peptidu v rozmezí 19 – 65 % při 50 μ M koncentraci. Za nejúčinnější v tomto experimentu lze označit **62**. 8-Hydroxychinolinový skelet, podle předpokladu, poskytl chelatační vlastnosti pro zinečnaté a měďnaté kationty u třech testovaných sloučenin (**61b**, **61h** a **62**) v poměru 2:1 (sloučenina:kationt). Substituce chlorem v poloze 5- chinolinu měla na chelataci negativní vliv, který jen potvrdil výsledky již dříve publikované studie.²¹¹ Antioxidační potenciál byl stanoven metodou neutralizace ABTS radikálu (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), kdy za experimentálních podmínek **61h** dokonce mírně převýšila účinnost **17**. Antioxidační účinnost na buněčné úrovni byla provedena na lidské buněčné linii gliomu (T67). K navození zánětlivé odpovědi byl použit *tert*-butylhydroperoxid. Pouze **61b** měla 15% efekt v podobě poklesu ROS. Dle výsledků se semipermeabilní membránou, všechny tři testované sloučeniny (**61b**, **61h** a **62**) mohou procházet přes HEB pomocí pasivní difúze.

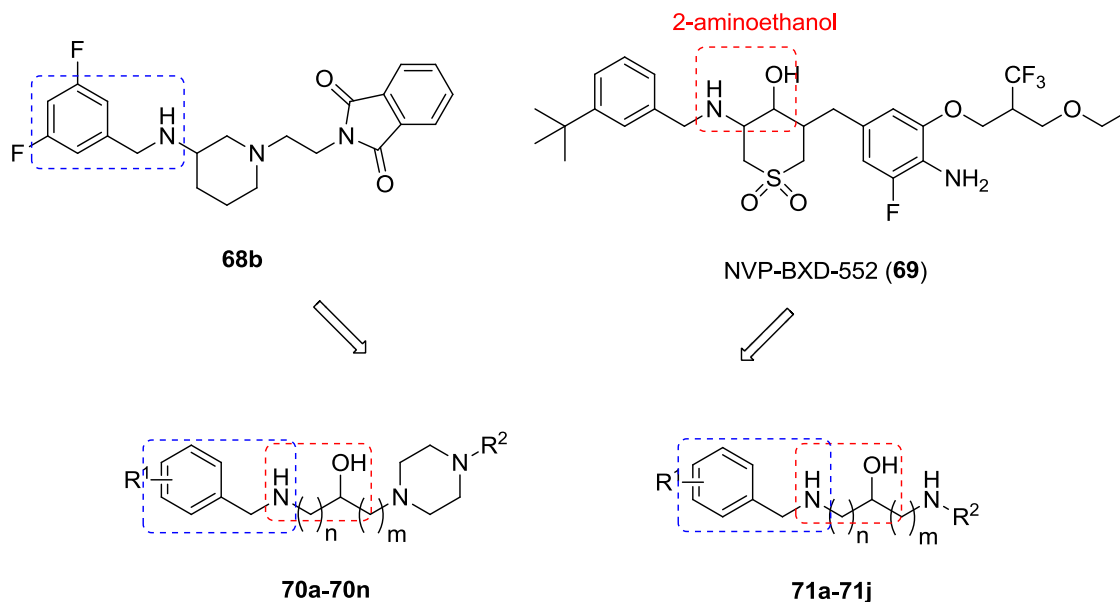


Obr. 25. Chelátory **61a-61l** a **62** na bázi donepezilu (**9**) s 8-hydroxychinolinovým základem z kliočinolu (**59**) a PBT2 (**60**).

Ve spolupráci s Jagelonskou univerzitou jsme se zaměřili na vývoj nových multipotentních sloučenin, které propojují cholinergní hypotézu (inhibice AChE/BChE) a amyloidní hypotézu (inhibice BACE-1; **PXIX**). Návrh těchto sloučenin vycházel z již dříve publikovaných struktur **63** a **64** (Obr. 26).^{212,213} Ty byly navrženy na základě strukturní podobnosti k **9** a rezultovaly v nanomolárně účinné inhibitory AChE s duálním efektem proti A β (inhibice agregace a neuroprotektivní charakter). Molekulově modelovací studie u nich předpověděla možnost současné interakce s oběma klíčovými částmi AChE, přičemž ftalimidová a sacharinová část se orientují do PAS, benzylaminová do katalytického místa enzymu. S ohledem na tyto příznivé vlastnosti jsme se rozhodli o rozšíření biologického profilu **63** a **64** o inhibici enzymu BACE-1.

Do řetězcové části ligandu jsme zavedli piperazin (**65a-65r**), hexahydropyrimidin (**66a-66d**), 3-aminopiperidin (**67b-67d**, **68a-68d**) nebo 3-aminopyrrolidin (**67a**) jako diaminoalkylové fragmenty, u kterých jsme předpokládali možnost interakce s katalytickou dyádou BACE-1 (zastoupená aminokyselinami Asp32 a Asp228).^{214,215} Do benzylaminové části jsme u většiny derivátů vložili jeden či více atomů fluoru, které se často vyskytují v BACE-1 inhibitech.²¹⁶ Celkově bylo vyvinuto 30 nových derivátů (**65a-68d**; Obr. 26). V případě devíti aktivních derivátů se hodnoty IC_{50} , stanovené na *EeAChE*, pohybovaly v rozmezí 0,83 – 19,18 μM , což je aktivita srovnatelná např. s galantaminem jakožto zavedeným léčivem pro AD.²¹⁷ Z výsledků biologického testování lze vysledovat, že piperazin a sacharin jsou optimálními fragmenty pro inhibiční aktivitu AChE. O vhodnosti délky řetězce rozhodovala substituce v aromatické, tedy benzylaminové, části. V případě nesubstituovaných derivátů lze za vhodný řetězec označit ethylenový (**65d**; *EeAChE* $IC_{50} = 0,83 \pm 0,02 \mu\text{M}$; Tab. 1) nebo butylenový (**65j**; *EeAChE* $IC_{50} = 3,01 \pm 0,09 \mu\text{M}$; Tab. 1). V případě 2-fluorbenzylaminové substituce byly pro aktivitu vůči AChE favorizovány spíše deriváty s delšími alifatickými řetězci (C4-C6) (např. **65n**; *EeAChE* $IC_{50} = 4,25 \pm 0,17 \mu\text{M}$; Tab. 1). Mírný pokles v aktivitě byl pozorován u 3-fluor a 4-fluor substituovaných derivátů. Výměna methylenového můstku za ethylenový, tedy výměna benzylaminu za 2-fenylethylamin, vedla až ke ztrátě aktivity. Ani jeden z 30 derivátů v rámci testované série nebyl účinným inhibitorem *EqBChE* (< 50 % inhibice při 10 μM). Inhibiční potenciál sloučenin pro BACE-1 byl sledován při screeningové 50 μM koncentraci, přičemž všechny deriváty inhibovaly v rozmezí 21,7 – 61,4 % (nejaktivnější sloučenina: **68d**). Jednoznačný vztah mezi strukturou a účinkem však nelze stanovit. Mechanismus inhibice AChE derivátu **65d** lze označit za nekompetitivní. Pouze pět testovaných sloučenin (**65a**, **65e**, **65r**, **66d** a **68b**) mělo relativně slabý inhibiční potenciál na auto-agregaci $A\beta_{42}$ (v rozsahu 13,3 – 39 %; stanoveno při 10 μM koncentraci sloučeniny), u ostatních byla tato aktivita méně než 10%. Některé kandidátní struktury (**65j**, **65n** a **65o**) mohou pravděpodobně procházet HEB za pomoci pasivní difúze. Molekulově modelovací studie byla v souladu s krystalografickou strukturou donepezilu¹⁰⁶ v aktivním místě; v tomto případě sacharinová část **65d** je orientována vně enzymu do periferní části, benzylaminová do katalytické části. V případě *in silico* experimentu s **68d** v aktivním místě BACE-1 výsledky předpovídají možnost interakce mezi nabitou částí sekundárního aminu 3-aminopiperidinu a Asp228 z katalytické dyády BACE-1.

inhibičního potenciálu BACE-1 (**PXX**). Benzylamin a jeho aromaticky substituovaná analoga byla zachována z důvodu inhibice AChE.²¹⁸ Do návrhu nových struktur byl promítnut i BACE-1 inhibitor známý pod označením NVP-BXD-552 (**69**; Obr. 27).²¹⁹ Screeningem komerčně dostupných chemikálií jsme vyselekovali několik primárních a sekundárních aminů, které posloužily jako ligandy s možností orientace do hydrofobních částí BACE-1 enzymu (S1 a S3)²²⁰ a současně jako periferní ligandy pro AChE/BChE. Anti-agregační efekt vůči A β byl předpokládán dle strukturální podobnosti s předchozími sériemi (viz deriváty ze sérií **65**, **66**, **67** a **68**) a rovněž dle přítomnosti benzylaminu, který se dle nejnovějších poznatků může včlenit mezi dvě části β -skládaného listu A β .²²¹ Návrh sloučenin doprovázely i výpočty předpokládaných fyzikálně-chemických vlastností, přičemž většina molekul splňuje Lipinského pravidlo pěti pro perorální dostupnost.²²² Celkově studie předkládá 24 sloučenin (**70a-70n** a **71a-71j**; Obr. 27). Z výsledků testování vyplývá, že jediným aktivním inhibitorem obou cholinesteras je pouze sloučenina **70h** (*EeAChE* IC₅₀ = 3,62 ± 0,07 μ M; *eqBChE* IC₅₀ = 9,36 ± 0,08 μ M; SI pro AChE = 2,6; Tab. 1). U ostatních derivátů nebyla stanovena hodnota IC₅₀ na *EeAChE* z důvodu inhibice < 50 % při 10 μ M koncentraci. Řada dalších derivátů však byla účinnými a selektivními inhibitory *eqBChE* s hodnotami IC₅₀ v rozmezí 1,49 - 16,61 μ M, z nichž nejúčinnější byl derivát **71a** (*eqBChE* IC₅₀ = 1,49 ± 0,38 μ M; Tab. 1). Aktivita vůči *eqBChE* byla obvykle vázána na 2,2-difenylaminové nebo 3,3-difenylpropylaminové deriváty; výjimku tvořily sloučeniny, které na druhém konci molekuly nesou 3-*terc*-butyl substituovaný benzylamin. Právě přítomnost 2,2-difenylaminu/3,3-difenylpropylaminu lze označit za klíčový aspekt v selektivitě pro BChE, který odráží objemnější kavitu tohoto enzymu oproti AChE.²²³ Celkově lze říci, že potentnější sloučeniny na *eqBChE* pochází ze série **71a-71j** (*eqBChE* IC₅₀ = 1,49 – 6,74 μ M), tj. neobsahují piperazin ve své struktuře. Všechny účinné inhibitory *eqBChE* byly testovány pro inhibici lidské BChE. Zde je zajímavostí, že nejúčinnější z nich pro *eqBChE* (**71a**; Tab. 1) měl aktivitu vůči lidské BChE < 50 % při 10 μ M koncentraci. Z tohoto pohledu lze vyzdvihnout **71g** (BChE IC₅₀ = 2,69 ± 0,12 μ M; Tab. 1). Sloučenina **71d** vykázala smíšený typ inhibice v kinetické studii s *eqBChE*. Inhibice BACE-1 byla prvně stanovena screeningově při 50 μ M koncentraci a pro nejúčinnější deriváty byly následně změřeny hodnoty IC₅₀. Aktivnějšími z tohoto pohledu byly molekuly druhé série (**71a-71j**) s hodnotami IC₅₀ v rozmezí 32,17 – 64,48 μ M. Aktivita je vázána na 2,2-difenylaminovou a/nebo 3,3-difenylpropylaminovou skupinu. Sedm testovaných sloučenin mělo na základě screeningu při 10 μ M inhibiční potenciál na auto-agregaci A β ₄₂ vyšší než 50 %. U dvou nejaktivnějších byly stanoveny jejich hodnoty IC₅₀ (**71d**: A β ₄₂ IC₅₀ = 3,09 ± 1,64 μ M; **71h**: A β ₄₂ IC₅₀ = 1,22 ± 0,89 μ M). V některých případech bylo ukázáno, že míra inhibice vůči agregaci A β může korelovat i s inhibicí agregace tau proteinu.^{224,225} S tímto ohledem jsme pro vybrané deriváty stanovili inhibici agregace tau proteinu. Nejvyšší aktivity dosáhla sloučenina **70m** (inhibice tau agregace při 10 μ M = 68 %). U všech derivátů v sérii byla předpovězena prostupnost přes HEB s využitím experimentu semipermeabilní membrány.



- | |
|--|
| 70a: n = 1; m = 1; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = pentan-2yl |
| 70b: n = 1; m = 1; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = fenyl |
| 70c: n = 1; m = 1; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = benzyl |
| 70d: n = 1; m = 1; R ¹ = H; R ² = difenylmethyl |
| 70e: n = 1; m = 1; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = difenylmethyl |
| 70f: n = 1; m = 1; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = difenylmethyl |
| 70g: n = 1; m = 1; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = bis(4-fluorfenyl)methyl |
| 70h: n = 1; m = 2; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = pentan-2yl |
| 70i: n = 1; m = 2; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = fenyl |
| 70j: n = 1; m = 2; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = benzyl |
| 70k: n = 1; m = 2; R ¹ = H; R ² = difenylmethyl |
| 70l: n = 1; m = 2; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = difenylmethyl |
| 70m: n = 1; m = 2; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = fenylmethyl |
| 70n: n = 1; m = 2; R ¹ = 4-OCH ₃ ; R ² = bis(4-fluorfenyl)methyl |
| 71a: n = 1; m = 1; R ¹ = H; R ² = 2,2-difenylethylamin |
| 71b: n = 1; m = 1; R ¹ = H; R ² = 3,3-difenylpropylamin |
| 71c: n = 1; m = 1; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = 2,2-difenylethylamin |
| 71d: n = 1; m = 1; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = 3,3-difenylpropylamin |
| 71e: n = 1; m = 2; R ¹ = H; R ² = 2,2-difenylethylamin |
| 71f: n = 1; m = 2; R ¹ = H; R ² = 3,3-difenylpropylamin |
| 71g: n = 1; m = 2; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = 2,2-difenylethylamin |
| 71h: n = 1; m = 2; R ¹ = 3- <i>terc</i> -butyl; R ² = 3,3-difenylpropylamin |
| 71i: n = 2; m = 1; R ¹ = H; R ² = 2,2-difenylethylamin |
| 71j: n = 2; m = 1; R ¹ = H; R ² = 3,3-difenylpropylamin |

Obr. 27. Sloučeniny kombinující inhibiční potenciál vůči AChE, BChE, BACE-1, a proteinům Aβ₄₂ a tau (**70a-70n** a **71a-71j**) strukturně odvozené od **68b** a BACE-1 inhibitoru NVP-BXD-552 (**69**).

Tabulka 1. Nejvíce účinné inhibitory AChE a BChE, jejich selektivita k AChE (SI) a odkaz na danou přílohu.

| inhibitor | AChE IC ₅₀ ± SEM μM | BChE IC ₅₀ ± SEM μM | SI pro AChE ^a | příloha |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------|
| takrin (1) | 0,32 ± 0,01 | 0,0800 ± 0,0001 | 0,3 | - |
| 7-MEOTA (2) | 10,0 ± 0,1 | 17,6 ± 0,8 | 1,8 | - |
| 6-chlortakrin (3) | 0,0170 ± 0,0005 | 1,7 ± 0,1 | 98 | - |
| 4d | 0,53 ± 0,10 | 1,4 ± 0,2 | 2,6 | PI |
| 4k | 0,69 ± 0,13 | 0,22 ± 0,04 | 0,3 | PII |
| 6 | 0,0094 ± 0,0007 | 2,1 ± 1,6 | 220 | PIV |
| 8b | 1,1 ± 0,1 | 17,9 ± 1,5 | 16 | PV |
| 8v | 12,9 ± 0,7 | 0,42 ± 0,01 | 0,03 | PV |
| 11c | 0,0150 ± 0,0017 | 0,33 ± 0,21 | 21,3 | PVI |
| 15h | 0,103 ± 0,004 | 0,0150 ± 0,0005 | 0,1 | PVII |
| 15i | 0,00072 ± 0,00006 | 0,5400 ± 0,016 | 750 | PVII |
| 18o | 0,210 ± 0,009 | 0,020 ± 0,006 | 0,1 | PVIII |
| 18u | 0,080 ± 0,003 | 0,540 ± 0,037 | 6,8 | PVIII |
| 20a | 0,8 ± 0,1 | ^{-b} | - | PIX |
| 20d | 1,3 ± 0,1 | ^{-b} | - | PIX |
| 24a | 0,0016 ± 0,0001 | 1,21 ± 0,07 | 740 | PX |
| 24b | 0,0019 ± 0,0001 | 0,170 ± 0,007 | 92 | PX |
| 24c | 0,0052 ± 0,0002 | 8,69 ± 0,04 | 1700 | PX |
| 26a | 43,6 ± 2,1 | 1,0 ± 0,1 | 0,02 | PXI |
| 26g | 1,4 ± 0,4 | 10,2 ± 4,7 | 7,5 | PXI |
| 26m | 1,7 ± 0,3 | 1,7 ± 0,2 | 1 | PXI |
| 26n | 2,1 ± 0,6 | 1,3 ± 0,2 | 0,6 | PXI |
| 28a | 2,6 ± 0,1 | 0,410 ± 0,023 | 0,2 | PXII |
| 28b | 2,2 ± 0,1 | 1,03 ± 0,03 | 0,5 | PXII |
| 28h | 0,190 ± 0,007 | 0,0590 ± 0,0012 | 0,3 | PXII |
| 28i | 0,130 ± 0,004 | 0,67 ± 0,03 | 5,2 | PXII |
| 28o | 0,075 ± 0,003 | 0,0830 ± 0,005 | 1,1 | PXII |
| 28p | 0,042 ± 0,001 | 3,70 ± 0,13 | 89 | PXII |
| 32l | 0,0063 ± 0,0002 | 0,0090 ± 0,0003 | 1,4 | PXIII |
| 32v | 0,0069 ± 0,0003 | 0,140 ± 0,005 | 20 | PXIII |
| 32w | 0,0074 ± 0,0004 | 0,0013 ± 0,0006 | 1,8 | PXIII |
| 36n | 0,0100 ± 0,0004 | > 100 | > 10000 | PXIV |
| 36i | 0,0020 ± 0,0003 | 0,110 ± 0,007 | 55 | PXIV |
| 36e | 0,0130 ± 0,0008 | 0,021 ± 0,002 | 1,6 | PXIV |
| 38 | 2,6 ± 0,4 | 3,8 ± 0,1 | 1,4 | PXV |
| 45d | 0,0140 ± 0,0004 | 0,0220 ± 0,0007 | 1,5 | PXVI |
| 56h | 13,9 (13,1-14,6) ^h | 14,6 (11,9 ± 20,2) ^h | 1,0 | PXVII |
| 56i | 18,3 (15,8-21,3) ^h | 6,0 (5,4-6,6) ^h | 0,3 | PXVII |
| 58t | ^{-c} | 3,3 | - | PXVII |
| 61h | ^{-d} | 5,7 ± 0,2 | - | PXVIII |
| 65d | 0,83 ± 0,02 | ^{-e} | - | PXIX |
| 65j | 3,01 ± 0,09 | ^{-e} | - | PXIX |

Tabulka 1 (pokračování). Nejvíce účinné inhibitory AChE a BChE, jejich selektivita k AChE (SI) a odkaz na danou přílohu.

| inhibitor | AChE IC ₅₀ ± SEM μM | BChE IC ₅₀ ± SEM μM | SI pro AChE ^a | příloha |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------|
| 65n | 4,25 ± 0,17 | - ^e | - | PXIX |
| 70h | 3,62 ± 0,07 ^f | 9,36 ± 0,08 ^g | - | PXX |
| 71a | - | 1,49 ± 0,38 ^g | - | PXX |
| 71g | - | 2,69 ± 0,12 | - | PXX |

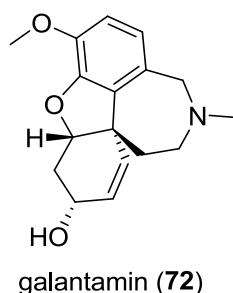
^a vypočítáno jako BChE IC₅₀/AChE IC₅₀; ^b neaktivní při 10 μM; ^c neaktivní při 50 μM; ^d neaktivní při 40 μM; ^e aktivita menší než 50 % při 10 μM koncentraci; ^f stanoveno na EeAChE; ^g stanoveno na eqBChE; ^h hodnota IC₅₀ se nachází v oblasti uvedeného konfidenčního intervalu

2.2 Přírodní a semisyntetické deriváty v léčbě Alzheimerovy choroby

Z historického pohledu představují přírodní, zejména rostlinné, produkty primární zdroj pro léčbu širokého spektra onemocnění. Analýza amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv shromážděná mezi lety 1981-2014 hovoří o tom, že více než polovina klinicky užívaných léčiv je přírodního původu.²²⁶ Z pohledu evolučního se jedná o struktury, které prošly dlouhým fylogenetickým procesem; jejich struktura je mnohdy odrazem ideální šablony pro interakci s určitým enzymem, proteinem nebo receptorem.²²⁷ Právě proto zauímají tyto struktury výsadní postavení ve vývoji nových léčiv.²²⁸ V porovnání s čistě syntetickými léčivy mají struktury na přírodní bázi obvykle více stereogenních center, rigidnější uskupení, více kyslíkových, méně dusíkových a sírných atomů, menší počet halogenů, zpravidla mají přemostění ve struktuře, obsahují spirocykly aj.²²⁹ U většiny rostlinných produktů na trhu (až 26 % malých molekul) se jedná o semisyntetické nebo jinak modifikované deriváty.²²⁶ Strukturální modifikace je často nezbytná z řady důvodů – omezená dostupnost přírodních sloučenin, limitovaná solubilita a metabolická nestabilita.²³⁰ Omezenou dostupností je v tomto případě myšlena nejen syntetická náročnost, ale i nevyhovující vlastnosti jako jsou absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece a toxicita (ADMET).²²⁹ Strukturální optimalizace bývá nedílnou součástí k objasnění vztahu mezi strukturou a účinkem. V ideálním případě by prováděné změny měly vést k vylepšení farmakokinetických a farmakodynamických vlastností, včetně snížení výskytu nežádoucích účinků. Zde je na místě podotknout, že ne vždy vedou změny ve struktuře k léčivu s ideálními fyzikálně-chemickými vlastnostmi a se zachovaným farmakologickým profilem. Z konkrétních kroků, které lze uplatnit v modifikaci předlohových struktur na přírodní bázi můžeme jmenovat derivatizaci (funkčními skupinami), častěji však jsou aplikovány změny vedoucí ke strukturálnímu zjednodušení.²³¹

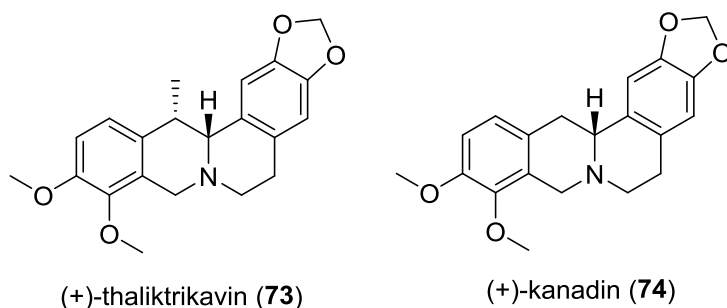
S přihlédnutím k terapii AD jsou léčiva na přírodní bázi zkoumána nejen experimentálně, ale i v klinických studiích. Z celkového výčtu klinických kandidátů, se až 13 % z nich nachází v některé fázi klinického testování.²³² Mezi nejzajímavější kandidáty můžeme zařadit resveratrol, kurkumin, huperzin A, silibilin, berberin aj. Od roku 2001 nachází uplatnění v klinické praxi galantamin (**72**; Obr. 28), který je izolovaný ze sněženky podsněžník (*Galanthus nivalis*, čeleď Amaryllidaceae) (**SIII**). Na zcela jiném principu funguje oligomanát sodný (známý též pod označením GV-971), léčivo schválené na konci roku 2019 v Číně pro středně těžká stádia AD. Oligomanát sodný reguluje a pomáhá nastavit rovnováhu střevní mikroflóry, tím tlumí periferně vyvolaný zánět a aktivaci mikroglií.²³³

Tato kapitola je věnována přírodním derivátům nebo jejich semisyntetickým derivátům, které byly primárně vyvinuty jako inhibitory cholinesteras. Jejich afinita k dalším biologickým cílům z pohledu multipotentního účinku byla v řadě případů experimentálně ověřena.



Obr. 28. Chemická struktura galantaminu (**72**).

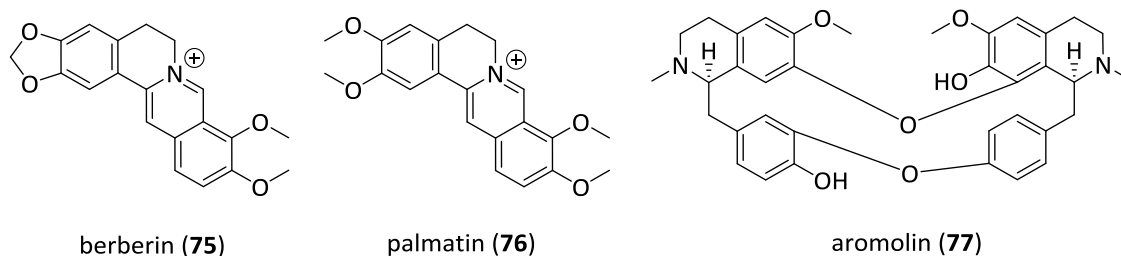
V rámci první studie byly ve spolupráci se skupinou z Katedry farmaceutické botaniky (Farmaceutická fakulta, UK) izolovány dva protoberberinové alkaloidy – (+)-thaliktrikavin (**73**; Obr. 29) a (+)-kanadin (**74**; Obr. 29; **PXXI**) (Tab. 2). Jedná se o deriváty, které byly již dříve izolovány z dymnivky duté (*Corydalis cava*; čeleď Papaveraceae).^{234,235} Oba alkaloidy byly srovnatelně účinnými inhibitory AChE jako **72**, bez afinity k BChE (Tab. 2). Stanovení mechanismu inhibice AChE ukázalo na kompetitivní typ pro obě sloučeniny. Tento druh inhibice odpovídá kompetici se substrátem, a tudíž vazba ligandu probíhá pravděpodobně do aktivní části enzymu. To bylo i následně predikováno s využitím metody molekulového modelování. Z větší míry je vazba těchto sloučenin ve shodě s umístěním **72** v krystalografické struktuře AChE.¹⁰⁶ Z predikce průchodu HEB lze vysledovat, že pouze **74** s největší pravděpodobností může procházet přes membrány s využitím pasivní difúze.



Obr. 29. Chemické struktury (+)-thaliktrikavinu (**73**) a (+)-kanadinu (**74**).

V navazující studii bylo izolováno celkově deset alkaloidů z dřšťálu obecného (*Berberis vulgaris*; čeleď Berberidaceae; **PXXII**). Z těchto deseti alkaloidů byly vůbec poprvé popsány struktury bersavinu, muraricinu a berbostrejdinu. Strukturně tyto deriváty náleží do skupin protoberberinových, bisbenzylisochinolinových, isochinolono-isochinolinových a isochinolono-benzylisochinolinových alkaloidů. Všechny deriváty byly podrobeny biologickému stanovení na inhibici AChE a BChE, inhibici prolyloligopeptidasy (POP; E.C. 3.4.21.26) a vybraný alkaloid aromolin rovněž na inhibici GSK-3 β (pouze 10 % při 10 μ M koncentraci). Z výsledků pro inhibici AChE byl nejúčinnějším inhibitorem berberin (**75**; AChE IC₅₀ = 0,7 \pm 0,1 μ M; BChE IC₅₀ = 30,7 \pm 3,5 μ M; SI pro AChE = 44; Obr. 30; Tab. 2). Dalším mikromolárně účinným inhibitorem AChE byl palmatin (**76**; Obr. 30), který rezultoval jako nejselektivnější inhibitor AChE (AChE IC₅₀ = 1,7 \pm 0,2 μ M; BChE IC₅₀ > 100 μ M; SI pro AChE > 86; Tab. 2). Z účinných inhibitorů BChE lze zmínit pouze aromolin (**77**; AChE IC₅₀ > 100 μ M; BChE IC₅₀ = 0,8 \pm 0,1 μ M; SI pro AChE < 0,008; Obr. 30; Tab. 2). Z kinetické analýzy inhibice BChE vyplývá, že alkaloid **77** je smíšeným inhibitorem tohoto enzymu, váže se tedy současně do samotného enzymu a inhibuje i substrát-BChE komplex vazbou v PAS části. Molekulově modelovací studie prováděná se **77** odhalila řadu klíčových interakcí s BChE. Dle výsledků je selektivita pro BChE dána charakterem kavity enzymu, který je tak lépe schopen pojmout tento relativně objemný ligand.²³⁶ POP je proteolytický enzym, který se podílí na řadě fyziologických procesů buněčné signalizace. Aktivita POP koreluje, mimo jiné, s patologií tau proteinu.²³⁷ Řada vědeckých týmů se domnívá, že selektivní inhibitory POP mohou představovat slibný směr v léčbě některých neurodegenerativních poruch včetně AD, Parkinsonovy choroby a jiných. Více je o tomto enzymu a klinicky relevantních inhibitorech pojednáno v příloze **SXXI**. V rámci naší studie byly všechny alkaloidní struktury slabými nebo dokonce neúčinnými inhibitory POP s hodnotami IC₅₀ v rozmezí 67 – 190 μ M. Nejúčinnějším v tomto směru byl bersavin (POP IC₅₀ = 67 \pm 6 μ M).

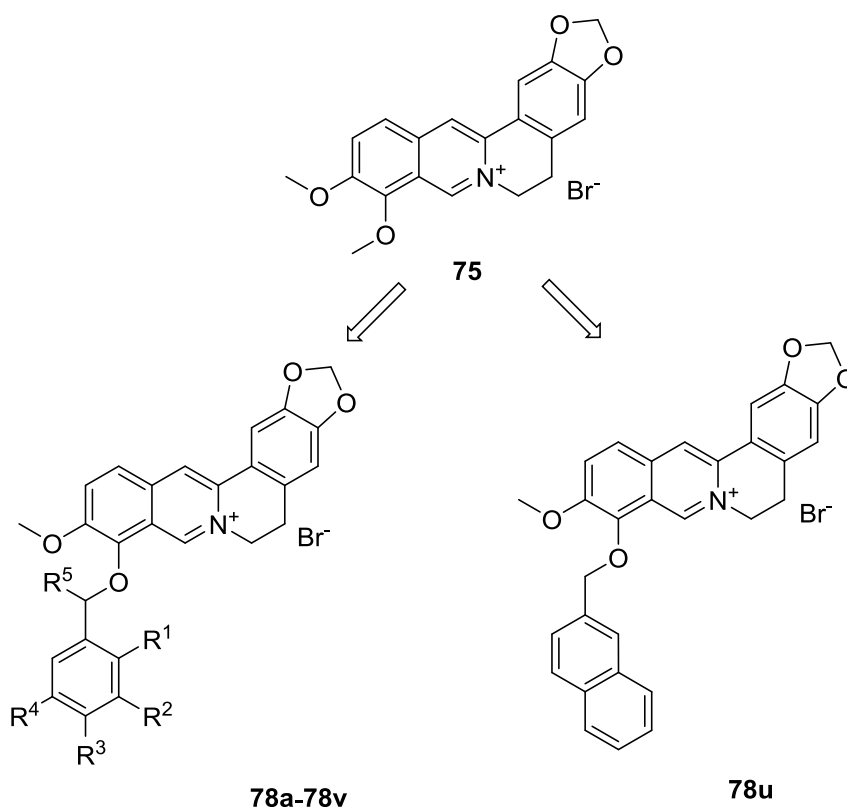
Dle výsledků propustnosti biologickou membránou může být problematickým aspektem celé série nízká permeabilita.



Obr. 30. Chemické struktury vybraných alkaloidů – berberinu (75), palmatinu (76) a aromolinu (77), izolovaných z *Berberis vulgaris*.

Za účelem studia vztahu mezi strukturou a účinkem jsme vyvinuli 22 nových semisyntetických derivátů odvozených od **75** (PXXIII). **75** lze vnímat jako multipotentní sloučeninu, která vykazuje antioxidační, protizánětlivý profil, a inhibiční aktivitu na MAO, cholinesterasy, agregaci A β a fosforylaci tau proteinu.^{238–241} Inhibice AChE a POP má přímý prokognitivní účinek, samotná inhibice POP navíc stimuluje buněčnou signalizaci M1 AChR.²⁴² Hydrofilní vlastnosti **75** jsou příčinou jeho nízké biodostupnosti a omezené prostupnosti přes biologické membrány.²⁴³ Proto jsme navrhli strukturální obměny na pozici 9- základního skeletu, zpravidla různě aromaticky substituovanými benzylovými fragmenty. Z literatury jsou známy např. 9-*N*-alkyl substituované deriváty od **75**, které mají výraznější antioxidační a A β anti-agregační efekty oproti parentní sloučenině.²⁴⁴ Substituce v poloze 12- u strukturálně blízkého berberubinu vedly k stimulaci glukosového transportu a zlepšily insulinovou resistenci.²⁰⁵ Tyto vlastnosti je možné s výhodou uplatnit nejen v léčbě diabetes mellitus druhého typu, ale lze je rovněž chápat jako preventivní s ohledem na fakt, kdy diabetes mellitus druhého typu je jedním z rizikových faktorů pro AD.²⁴⁵ Vedle toho má **75** schopnost regulovat hladiny cholesterolu.²⁴⁶ Zvýšené hladiny cholesterolu jsou také rizikovým faktorem AD.²⁴⁷ Nově připravené semisyntetické deriváty odvozené od **75** (**78a-78v**; Obr. 31) byly účinnějšími inhibitory AChE (s výjimkou **78d**) i BChE v porovnání s předlohou strukturou **75**. Hodnoty IC₅₀ se pohybovaly v mikromolárních koncentracích s poměrně malým rozpětím (AChE IC₅₀ = 0,8 – 75,8 μ M; BChE IC₅₀ = 1,3 – 21,5 μ M). Zatímco efekt 9-*O* substituce na aktivitu je zřejmý, pro inhibici obou cholinesteras nelze vysledovat žádný vztah mezi strukturou a účinkem. Toto se týká jak polohy substituentu na připojeném benzylovém zbytku nebo vlivu elektron-akceptorních/elektron-donorních skupin. Většina derivátů z této série jsou mírně selektivními inhibitory AChE. Za nejúčinnější inhibitory AChE lze označit **78j** a **78v** (Tab. 2); z pohledu inhibice je pro BChE nejvhodnějším ligandem **78u** (Tab. 2). Vynikající BChE selektivitou se prořadil berberinový derivát **78d** (Tab. 2). Pro inhibici POP platí, že veškeré substituce vedly k navýšení inhibičního potenciálu. Výsledkem jsou hodnoty IC₅₀ v rozmezí 10 – 79 μ M. Za více aktivní lze označit deriváty substituované v poloze 4- benzylového přívěšku a to elektron-akceptorními skupinami (CF₃ u **78s** a NO₂ u **78j**), tolerované byly i substituce malými elektron-donorními funkčními skupinami. Nejsilnějším POP inhibitorem byl derivát **78d** (POP IC₅₀ = 10,7 \pm 1,2 μ M). V rámci kinetické analýzy prováděné s **78s** pro AChE a **78u** pro BChE byl prokázán nekompetitivní typ inhibice (**78s** vs. AChE) a smíšený typ inhibice (**78u** vs. BChE). Oba dva mechanismy inhibice naznačují interakce s PAS daného enzymu. Molekulově modelovací studie prováděná se **78v** ukázala, že přítomný benzylový zbytek (oproti nesubstituované **75**) je pravděpodobně schopný interakce s Tyr72 a Trp286 v periferní části AChE a tím pádem je

zodpovědný za nárůst inhibičního potenciálu. To samé platí pro inhibici BChE pomocí **78u**; zde se ovšem berberinový skelet formuje převážně na periférii a naftylový přívěšek je uložen v blízkosti Trp82 u katalytické triády. Testované sloučeniny byly velmi slabými antioxidanty v porovnání s **17** a *N*-acetylcysteinem, s hodnotami $EC_{50} > 900 \mu\text{M}$. Pokles antioxidačního potenciálu je zapříčiněn substitucí volného fenolického hydroxyly (volný fenolický hydroxyl je přítomen u berberubinu), který je pro antioxidační vlastnosti klíčovým.²⁴⁸ Nejúčinnější deriváty (**78d**, **78u** a **78v**) byly vybrány pro inhibici auto-agregace $A\beta_{42}$ a agregaci zkrácené formy tau proteinu ($\text{tau}_{306-336}$) při $50\mu\text{M}$ koncentraci. Všechny sloučeniny dosahovaly výtečných inhibičních vlastností pro oba proteiny (inhibice agregace $A\beta_{42}$ = 82,6 - 97,2 %; inhibice agregace $\text{tau}_{306-336}$ = 31,9 - 62,0 %). Již pouze výčet dalších biologických vlastností byla testována cytotoxicita na ovariálních buňkách čínské křečka (CHO-K1), permeabilita přes membrány a kvantitativní vztah mezi strukturou a účinkem (QSAR).



- 78a:** R¹=H, R²=H, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78b: R¹=H, R²=CH₃, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78c: R¹=CH₃, R²=H, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78d: R¹=H, R²=H, R³=CH₃, R⁴=H, R⁵=H
78e: R¹=H, R²=H, R³=CH(CH₃)₂, R⁴=H, R⁵=H
78f: R¹=H, R²=CH₃, R³=H, R⁴=CH₃, R⁵=H
78g: R¹=H, R²=H, R³=Br, R⁴=H, R⁵=H
78h: R¹=H, R²=Br, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78i: R¹=Br, R²=H, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78j: R¹=H, R²=H, R³=NO₂, R⁴=H, R⁵=H
78k: R¹=H, R²=H, R³=SCH₃, R⁴=H, R⁵=H
78l: R¹=H, R²=NO₂, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78m: R¹=H, R²=Cl, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78n: R¹=H, R²=H, R³=Cl, R⁴=H, R⁵=H
78o: R¹=H, R²=Cl, R³=Cl, R⁴=H, R⁵=H
78p: R¹=H, R²=H, R³=COOCH₃, R⁴=H, R⁵=H
78q: R¹=H, R²=H, R³=CN, R⁴=H, R⁵=H
78r: R¹=H, R²=OCH₃, R³=H, R⁴=H, R⁵=H
78s: R¹=H, R²=H, R³=CF₃, R⁴=H, R⁵=H
78t: R¹=H, R²=H, R³=OCH₃, R⁴=H, R⁵=H
78v: R¹=H, R²=H, R³=H, R⁴=H, R⁵=CH₃

Obr. 31. 9-O-aryl-substituované berberinové deriváty **78a-78v**.

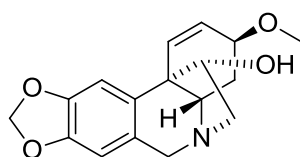
Řada dalších studií byla věnována haemantaminu (**79**; Obr. 32), hojně se vyskytujícímu alkaloidu v rámci čeledi Amaryllidaceae.²⁴⁹ Ten nachází spíše teoretické uplatnění v protinádorové terapii jako experimentální sloučenina pro vazbu na ribosomy s následnou stabilizací transkripčního

faktoru p53.²⁵⁰ **79** má výrazný cytotoxický efekt vůči různým nádorovým liniím.²⁵¹ Samotný haemantamin má rovněž výraznou účinnost vůči GSK-3 β ²⁵² a nespočet dalších strukturálně příbuzných derivátů izolovaných z rostlin čeledi Amaryllidaceae má inhibiční potenciál vůči AChE.²⁴⁹ V úvodní studii jsme sledovali vliv aromatických a alifatických esterů vázaných v poloze 11- základního skeletu **79**. Zatímco dle předpokladu byly **79** a všechny alifatické estery **80a-80f** inaktivní na inhibici AChE/BChE při 500 μ M koncentraci, z nově připravených derivátů (**80a-80l**; Obr. 32) se výrazněji profilovaly **80l** (AChE IC₅₀ = 14,7 \pm 1,8 μ M; BChE IC₅₀ > 500 μ M; SI pro AChE > 34; Tab. 2) jako vysoce selektivní inhibitor AChE a **80j** (Tab. 2), nejúčinnější BChE inhibitor s vybalancovanou potencí vůči oběma cholinesterasám (**PXXIV**). Z molekulově modelovací studie je patrné, že aromatická substituce v poloze 11- hraje významnou roli pro účinnost. Pro obě sloučeniny, **80j** a **80l**, je klíčová π - π interakce s aromatickými residui, které logicky nelze dosáhnout při alifatické substituci. Pro navazující experimenty byly vybrány právě tyto dvě sloučeniny, přičemž jejich inhibiční potenciál při 10 μ M koncentraci vůči GSK-3 β byl 15 % (**80j**), resp. 27 % (**80l**; GSK-3 β IC₅₀ = 34,80 \pm 0,01 μ M). Obě sloučeniny mají předpoklad prostupu HEB pasivní difúzí.

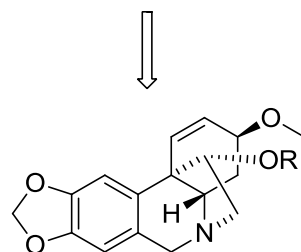
Navazující studie rozšířila skupinu haemantaminových struktur o 13 nových, aromaticky substituovaných derivátů (**80m-80y**; Obr. 32; **PXXV**). I v tomto případě byla substituována poloha 11-. Substituce v poloze 2- nitro skupinou (**80w**) nebo chlorem (**80y**) a v poloze 3- nitro skupinou (**80v**) u napojeného benzoátu rezultovala v nejúčinnější inhibitory AChE (Tab. 2). Estery haemantaminu a kyseliny 2-methoxybenzoové (**80s**) a kyseliny 2-chlorobenzoové (**80y**) byly nejlepšími inhibitory BChE (Tab. 2). **80y** a **80v** byly podrobeny stanovení na mechanismus inhibice AChE. **80v** lze označit za kompetitivní inhibitor, zatímco **80y** za nekompetitivní inhibitor AChE. V případě inhibice BChE byly **80s** (Tab. 2) a **80y** shodně smíšenými inhibitory tohoto enzymu. Všechny studované haemantaminové deriváty mohou pravděpodobně procházet HEB pomocí pasivní difúze. Analoga **80s**, **80v** a **80y** vykazala velice podobnou orientaci v aktivním místě AChE. Nižší účinnost **80s** na AChE může být připsána chybějící hydrofobní interakci, která je pozorována mezi atomem chloru derivátu **80y** a Trp86. U molekulově modelovací studie pro BChE se stejným výběrem derivátů (**80s**, **80v** a **80y**) lze odvodit nižší inhibiční potenciál **80v** kompletně jinou orientací v porovnání s dalšími dvěma analogy. Nitro skupina **80v** je orientovaná vodíkovým můstkem ke Gly119 (součást oxyanionového místa enzymu), což destabilizuje celý haemantaminový skelet a uvádí jej do energeticky méně výhodné polohy v porovnání s **80s** a **80y**.

Strukturálně příbuznou sloučeninou k **79** je ambelin (**81**; Obr. 32). Rozdíl je pouze v orientaci 5,10*b*-ethylového přemostění a v přítomnosti methoxy skupiny u **81** v poloze 7-. Podobně jako **79**, i **81** má slabý inhibiční efekt vůči cholinesterasám.²⁵³ Za účelem potenciace tohoto efektu jsme, analogicky jako u série výše, navrhli alifatické a aromatické substituce v poloze 11- (**PXXVI**). **81** byl izolován v dostatečném množství z *Nerine bowdenii* (Amaryllidaceae).²⁵³ Celkem bylo připraveno 20 derivátů ambelinu (**82a-82t**; Obr. 32). Podobně jako u haemantaminových derivátů, i zde hrála klíčovou roli přítomnost aromatického esteru pro inhibiční aktivitu. Z 20 derivátů byly pouze tři účinnými inhibitory AChE (**82f**, **82l** a **82m**) s hodnotami IC₅₀ mezi 48 – 55 μ M. Deriváty **82e**, **82f**, **82g**, **82i**, **82j**, **82l** a **82p** se profilovaly jako účinné inhibitory BChE s hodnotami IC₅₀ < 5 μ M a možností prostupu HEB pomocí pasivní difúze. Nejúčinnějším v tomto ohledu byl ambelinový derivát **82p** (AChE IC₅₀ > 100 μ M; BChE IC₅₀ = 0,1 μ M; SI pro AChE < 0,001; Tab. 2). Z posledních třech uvedených studií (**PXXIV-PXXVI**) lze celkově shrnout, že ambelinový

strukturní typ se svou typickou β orientací 5,10*b*-ethylového můstku udílí selektivitu pro BChE, zatímco α orientace přítomná u haemantaminového typu rezultuje v neselektivní inhibitory obou cholinesteras. Pro molekulově modelovací studii do aktivního místa BChE byly vybrány deriváty **82f** a **82i** s velmi blízkou prostorovou orientací. Za klíčové interakce lze označit neuspořádané π - π interakce s Phe329, Phe398 a Trp231. Substituce v poloze 2- u připojeného benzoátu se zdá být zásadní z pohledu možné tvorby atropoisomerů, které mohou navyšovat inhibiční efekt.

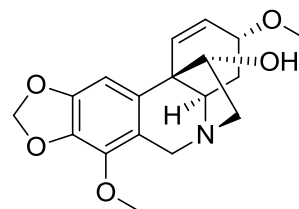


haemantamin (**79**)

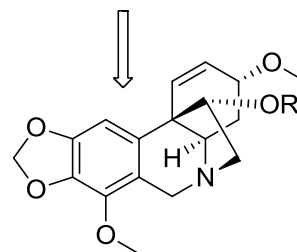


80a-80y

- 80a:** R = CH₃CO-
- 80b:** R = CH₂CH₃CO-
- 80c:** R = CH₂(CH₃)₂CO-
- 80d:** R = (CH₂)₃CH₃CO-
- 80e:** R = (CH₂)₄CH₃CO-
- 80f:** R = (CH₂)₂CH₃CO-
- 80g:** R = PhCO-
- 80h:** R = 3-ClPhCO-
- 80i:** R = 3-BrPhCO-
- 80j:** R = 2-CH₃PhCO-
- 80k:** R = 3-OCH₃PhCO-
- 80l:** R = 4-NO₂PhCO-
- 80m:** R = 3-CH₃PhCO-
- 80n:** R = 4-CH₃PhCO-
- 80o:** R = 4-ethylPhCO-
- 80p:** R = 4-ClPhCO-
- 80q:** R = 3-FPhCO-
- 80r:** R = 4-OCH₃PhCO-
- 80s:** R = 2-OCH₃PhCO-
- 80t:** R = 3,5-di(OCH₃)PhCO-
- 80u:** R = 3,4-di(OCH₃)PhCO-
- 80v:** R = 3-NO₂PhCO-
- 80w:** R = 2-NO₂PhCO-
- 80x:** R = 3,5-di(NO₂)PhCO-
- 80y:** R = 2-ClPhCO-



ambelin (**81**)

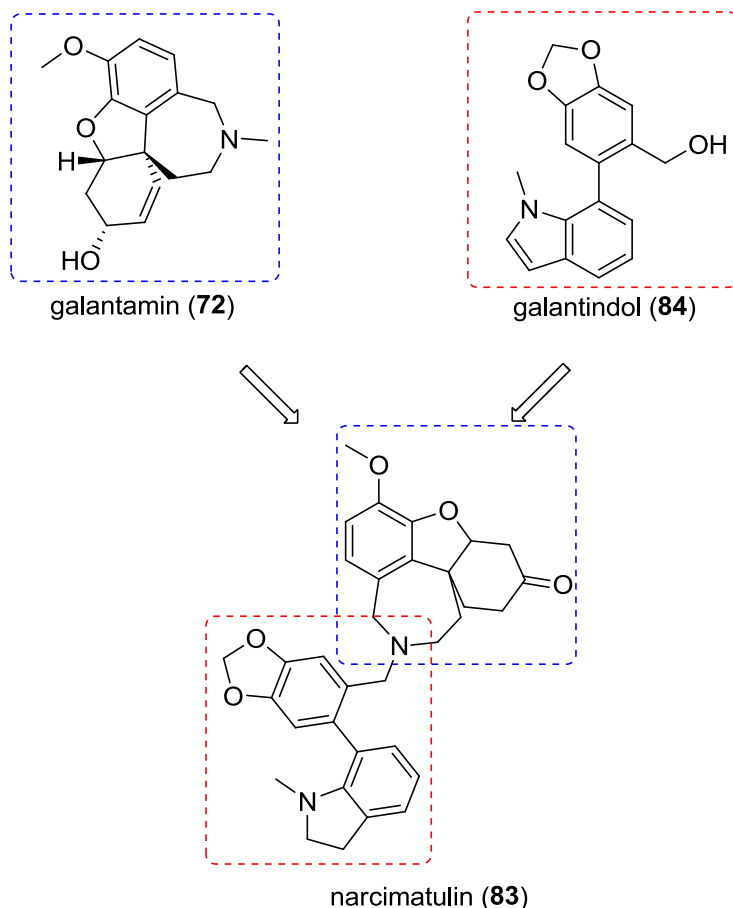


82a-82t

- 82a:** R = CH₃CO-
- 82b:** R = CH₂CH₃CO-
- 82c:** R = (CH₂)₃CH₃CO-
- 82d:** R = CH₂(CH₃)₂CO-
- 82e:** R = PhCO-
- 82f:** R = 2-CH₃PhCO-
- 82g:** R = 3-CH₃PhCO-
- 82h:** R = 4-CH₃PhCO-
- 82i:** R = 2-OCH₃PhCO-
- 82j:** R = 3-OCH₃PhCO-
- 82k:** R = 4-OCH₃PhCO-
- 82l:** R = 2-NO₂PhCO-
- 82m:** R = 3-NO₂PhCO-
- 82n:** R = 4-NO₂PhCO-
- 82o:** R = 2-naftoát
- 82p:** R = 1-naftoát
- 82q:** R = 2-furoát
- 82r:** R = 3-furoát
- 82s:** 3,4-di(OCH₃)PhCO-
- 82t:** 3,5-di(OCH₂CH₃)PhCO-

Obr. 32. Haemantaminové (**80a-80y**) a ambelinové deriváty (**82a-82t**) se substitucí v poloze 11-.

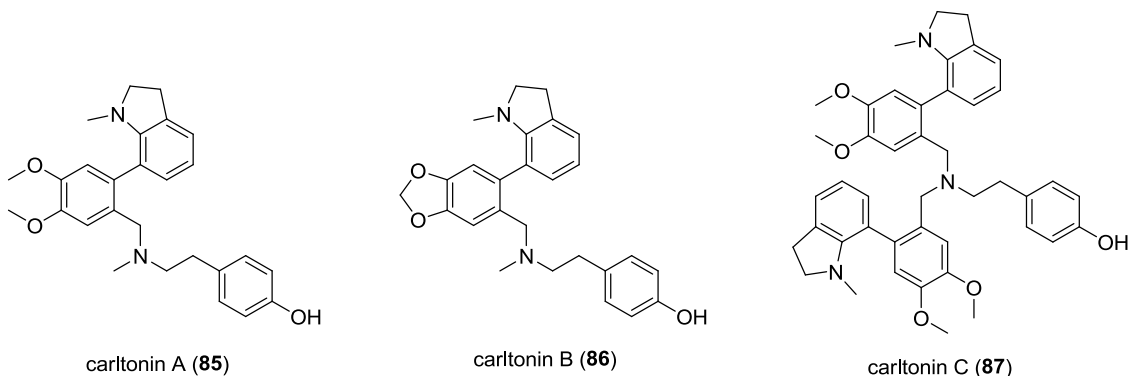
V další práci jsme se soustředili na izolaci alkaloidů z narcisu žlutého (*Narcissus pseudonarcissus*, čeleď Amaryllidaceae; **PXXVII**). Celkově bylo charakterizováno, pomocí kombinace MS, HRMS, 1D a 2D NMR experimentů, 21 známých struktur a jedna zcela nová struktura – narcimatulin (**83**; Obr. 33). Všechny alkaloidy byly podrobeny stanovení na inhibici cholinesteras, POP a GSK-3 β . Největší biologický potenciál na testované cíle vykázal právě zmiňovaný alkaloid **83**. Je mírně selektivním inhibitorem BChE a má dále vybalancovaný profil i s ohledem na inhibici POP a GSK-3 β (AChE IC₅₀ = 490 \pm 60 μ M; BChE IC₅₀ = 5,9 \pm 0,2 μ M; SI pro AChE = 0,01; POP IC₅₀ = 29,2 \pm 1,0 μ M; GSK-3 β IC₅₀ = 20,7 \pm 2,4 μ M; Tab. 2). **83** spojuje strukturální vlastnosti **72** a galantindolu (**84**; Obr. 33).



Obr. 33. Nově izolovaný alkaloid narcimatulin (**83**) z narcisu žlutého (*Narcissus pseudonarcissus*, čeleď Amaryllidaceae), který je strukturálně příbuzný k **72** a galantindolu (**84**).

V navazující studii se podařilo z cibule narcisu žlutého izolovat 13 známých alkaloidních struktur a tři zcela nové alkaloidy beladinového typu (**PXXVIII**). Nové struktury, pojmenované jako carltonin A (**85**), carltonin B (**86**) a carltonin C (**87**) (Obr. 34), byly charakterizovány pomocí kombinace MS, HRMS a 2D NMR experimentů. Nové alkaloidní struktury **85-87** byly vysoce selektivními a účinnými inhibitory BChE (Tab. 2). Vedle inhibičních vlastností na cholinesterasy byla dále sledována inhibice POP; pouze derivát **85** (Tab. 2) byl relativně slabým inhibitorem tohoto enzymu, jehož inhibiční potenciál byl však srovnatelný se **75** (**85** POP IC₅₀ = 143 \pm 12 μ M). Dva neúčinnější BChE inhibitory, **85** a **86**, byly podrobeny molekulově modelovací studii. V obou případech se jedná o pseudo-enantiomery (vznikají při protonizaci centrálního dusíkového atomu), které se mohou rozdílně orientovat do aktivního místa enzymu. Výsledkem *in silico* studie je, že za vyšší účinnost **86** v porovnání s **85** může stát přítomnost

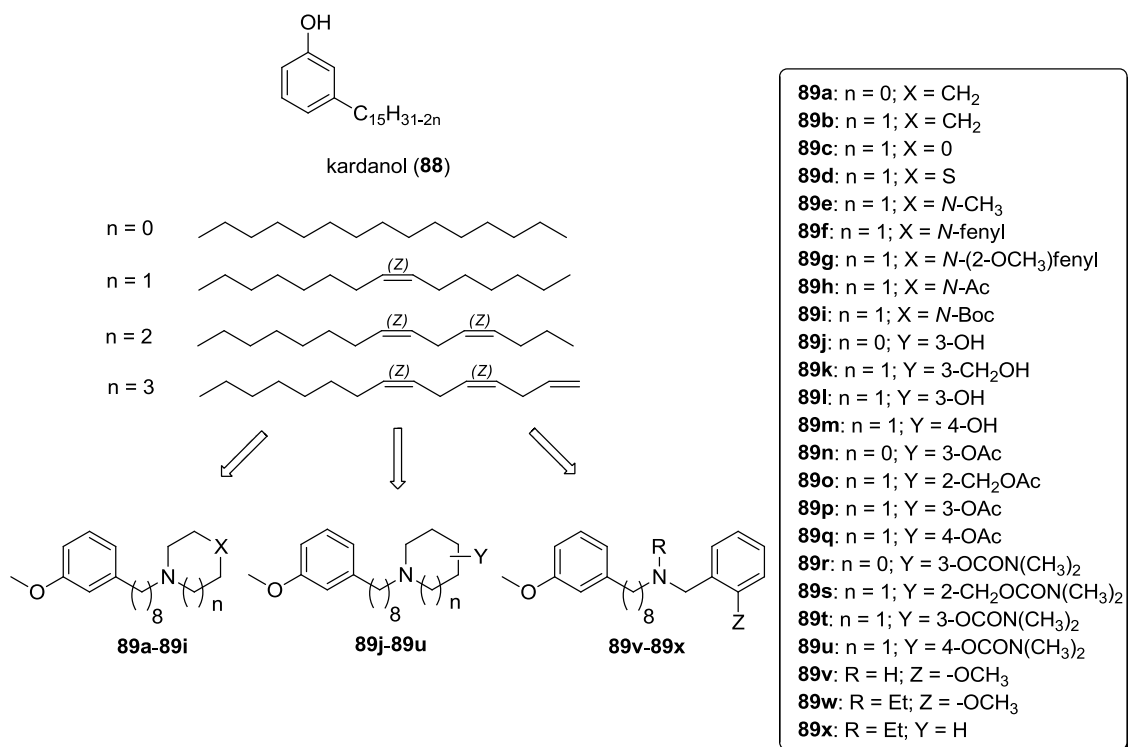
2*H*-1,3-benzodioxolanového kruhu, který „rozšiřuje“ aromatický charakter molekuly s možností interakce s dalšími aromatickými residui v kavitě BChE. Z pohledu vypočítané vazebné energie je nejlepším inhibitorem BChE pseudo-enantiomer (*R*)-**86**.



Obr. 34. Nové alkaloidy beladinového typu (**85-87**) vyizolované z cibulí narcisu žlutého (*Narcissus pseudonarcissus*, čeleď *Amaryllidaceae*).

Kardanol (**88**; Obr. 35) představuje skupinu fenolických lipidů, které jsou strukturně příbuzné k anakardiové kyselině. **88** je hojně obsažen v kešu oříškách.²⁵⁴ Při zpracování těchto oříšků vzniká viskózní nahnědlá tekutina, která obsahuje tři hlavní komponenty – **88**, anakardiovou kyselinu a kardol. Jedná se o bioaktivní komponenty, které mají řadu prospěšných vlastností a nachází tak teoretické uplatnění např. v léčbě nádorových onemocnění, zánětlivých stavů nebo obezity.²⁵⁵ U některých kardanolových derivátů byla již dříve demonstrována AChE inhibiční aktivita.²⁵⁶ S přihlédnutím k tomuto faktu jsme v rámci navazující studie vyvinuli nové kardanolové deriváty jako potenciální inhibitory cholinesteras s možnou účinností na agregaci A β (**PXXIX**). Koncepce celkového počtu 24 nových sloučenin (**89a-89x**; Obr. 35) byla postavena na duálním cílení do anionické i PAS části AChE. Kationickou část ligandu představovaly heterocyklické aminy jako pyrrolidin, piperidin, morfolin, thiomorfolin, *N*-substituované piperaziny, hydroxylovaný pyrrolidin a piperidin, resp. jeho příbuzné deriváty (*O*-acetyl a *O*-dimethylkarbamát). Druhou část molekuly, u které je předpoklad orientace do PAS AChE, tvořil 3-methoxyfenylový fragment. Koncepce těchto molekul byla primárně validována pomocí molekulově modelovacích studií. Dále byly vypočítány některé fyzikálně-chemické vlastnosti k posouzení, zda jsou sloučeniny schopné procházet HEB. U většiny sloučenin bylo předpovězeno, že mohou procházet HEB a působit v mozku. Toto bylo i následně experimentálně ověřeno u sloučeniny **89w** v modelu umělé semipermeabilní membrány. Všechny sloučeniny byly na úvod otestovány při 100 μ M koncentraci na inhibici *EeAChE*, přičemž 19 z nich inhibovalo tento enzym z více než 50 %. U sedmi nejúčinnějších (**89a**, **89n**, **89r**, **89t**, **89v**, **89w** a **89x**) byly stanoveny hodnoty IC₅₀, ve všech případech bylo dosaženo hladiny nižší než 20 μ M. Za nejpotentnější z nich lze označit **89w** (*EeAChE* IC₅₀ = 6,6 μ M; lidská AChE IC₅₀ = 5,7 \pm 0,5 μ M; *eqBChE* IC₅₀ = 5,0 μ M; SI pro *EeAChE* = 0,8; Tab. 2). U stejného výběru kardanolových sloučenin (**89a**, **89n**, **89r**, **89t**, **89v**, **89w** a **89x**) byla stanovena inhibiční aktivita vůči *eqBChE*. Bylo dosaženo velice podobných výsledků jako pro inhibici *EeAChE* (všechny deriváty dosahovaly hodnot IC₅₀ nižších než 25 μ M); neaktivnějším derivátem byl **89v** (*EeAChE* IC₅₀ = 17,2 μ M; *eqBChE* IC₅₀ = 3,1 μ M; SI pro AChE = 0,2; Tab. 2). Ze stanovení mechanismu inhibice AChE vyplývá, že **89a** je smíšeným typem inhibitoru a dalších šest derivátů (**89n**, **89r**, **89t**, **89v**, **89w** a **89x**) nekompetitivními inhibitory. Cytotoxicita byla stanovena na buněčné linii HT-29 lidského adenokarcinomu tlustého střeva, přičemž všechny sloučeniny byly

netoxické při 10 μ M koncentraci. Molekula **89w** byla podrobena stanovení při 50 μ M koncentraci na inhibici auto-agregace A β ₄₂, nebyl však pozorován žádný efekt. Absenci této aktivity si lze vysvětlit nepřítomností volné fenolické skupiny, která je u jiného typu příbuzných fenolických sloučenin klíčovou pro anti-amyloidní aktivitu.²⁵⁷



Obr. 35. Skupina fenolických kardanolových lipidů (**88**) a z něj odvozené deriváty (**89a-89x**) s inhibiční účinností vůči cholinesterasám.

Tabulka 2. Nejvíce účinné inhibitory AChE a BChE ze semisyntetických derivátů, jejich selektivita k AChE (SI) a odkaz na danou přílohu. Galantamin je zde uveden jako srovnávací standard.

| inhibitor | AChE IC ₅₀ ± SEM μM | BChE IC ₅₀ ± SEM μM | SI pro AChE ^a | příloha |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|----------------|
| Galantamin (72) | 0,26 ± 0,01 | 18,0 ± 1,9 | 69 | - |
| 73 | 0,38 ± 0,05 | > 100 | > 260 | PXXI |
| 74 | 0,70 ± 0,07 | > 100 | > 140 | PXXI |
| 75 | 0,7 ± 0,1 | 30,7 ± 3,5 | 44 | PXXII |
| 76 | 1,7 ± 0,2 | > 100 | > 86 | PXXII |
| 77 | > 100 | 0,8 ± 0,1 | < 0,008 | PXXII |
| 78d | 75,8 ± 9,1 | 5,8 ± 0,2 | 0,08 | PXXIII |
| 78j | 0,99 ± 0,04 | 8,0 ± 0,2 | 8,1 | PXXIII |
| 78u | 1,5 ± 0,1 | 1,26 ± 0,02 | 0,8 | PXXIII |
| 78v | 0,79 ± 0,02 | 5,8 ± 0,1 | 7,3 | PXXIII |
| 80j | 18,2 ± 1,3 | 6,6 ± 1,2 | 0,4 | PXXIV |
| 80l | 14,7 ± 1,8 | > 500 | > 34 | PXXIV |
| 80s | 90 ± 6 | 3,3 ± 0,4 | 0,04 | PXXV |
| 80v | 4,0 ± 0,3 | > 100 | > 34 | PXXV |
| 80w | 9,9 ± 0,5 | > 100 | > 10 | PXXV |
| 80y | 13 ± 1 | 5,6 ± 0,6 | 0,4 | PXXV |
| 82p | > 100 | 0,10 ± 0,01 | < 0,001 | PXXVI |
| 83 | 490 ± 60 | 5,9 ± 0,1 | 0,01 | PXXVII |
| 85 | > 100 | 0,91 ± 0,02 | < 0,009 | PXXVIII |
| 86 | > 100 | 0,031 ± 0,001 | < 0,0003 | PXXVIII |
| 87 | > 100 | 14,8 ± 1,1 | < 0,15 | PXXVIII |
| 89v | 17,2 ^b | 3,1 ^c | 0,2 | PXXIX |
| 89w | 6,6 ^b | 5,0 ^c | 0,8 | PXXIX |

^a vypočítáno jako BChE IC₅₀/AChE IC₅₀; ^b stanoveno na EeAChE; ^c stanoveno na eqBChE

3 Souhrn, závěry a možné směry dalšího výzkumu

Současná terapie AD má pouze paliativní charakter. Obě dvě zavedené skupiny terapeutik (inhibitory AChE a NMDAR antagonisté) mají krátkodobý efekt a jen mírní symptomy onemocnění, nezpomalují však jeho progresi. Posledním zavedeným léčivem se stal v roce 2002 memantin (NMDAR antagonista). Od té doby jsme pravidelně konfrontováni se selháním některého z dalších kandidátů, nejčastěji pro nedostatek účinnosti nebo z důvodu výskytu závažných nežádoucích účinků, pro které je nutné klinickou studii ukončit. Ostrůvek naděje přinesl až konec loňského roku v podobě oligomanátu sodného (GV-971) schváleného v Číně pro středně těžká stádia AD. Více než 30 let zkušeností, načerpání nových biologických poznatků o nemoci, ale i výše zmíněné neúspěchy celé řady klinických kandidátů, nás staví k přehodnocení postoje o vývoji účinných léčiv pro terapii AD.

Naše pracovní skupina se v největší míře orientuje na multipotentní sloučeniny pro terapii AD. V úzké kooperaci s tuzemskými i zahraničními partnery se zabýváme vývojem proti-alzheimerovských malých molekul po více než 10 let. Za tuto dobu se nám podařilo připravit více než 500 malých molekul cílených na různé patologické mechanismy. Pro některá onemocnění je koncept multipotentních sloučenin již dlouhodobě využíván (protinádorová léčiva, antidepresiva aj.). Zde je nutno zmínit, že v případě některých léčiv byl jejich vícesložkový mechanismus účinku objasněn až po zavedení do praxe; tyto struktury tak nebyly vyvíjeny cíleně pro působení na více místech současně. AD však stojí trochu stranou od ostatních onemocnění. Od popsání prvního případu Aloisem Alzheimerem z roku 1906 uběhlo téměř dalších sedm desetiletí, než byla formulována prvotní možná příčina AD v podobě narušeného cholinergního systému,¹⁰ později pak excitotoxické působení v podobě trvalé stimulace NMDAR receptorů zvýšenou hladinou glutamátu.¹⁵ Bohužel, tyto dva fenomény nejsou příčinou pro rozvoj symptomů spojených s AD, pouze jsou sekundárním projevem již narušené mozkové struktury. Velkým mezníkem ve výzkumu AD představují amyloidní hypotéza a teorie hyperfosforylovaného tau proteinu; dle všeho a s přihlédnutím k selhávající léčbě, ale ani tyto dostatečně neodráží podstatu nemoci. Poslední výzkumné studie ukazují na zánětlivý proces jako primární příčinu AD.²⁵⁸

Předložená habilitační práce popisuje syntetické deriváty, zpravidla příbuzné k takrinu nebo donepezilu, semisyntetické sloučeniny odvozené od přírodních struktur a izolované alkaloidy, v největší míře z čeledi Amaryllidaceae, z nichž všechny jsou směřovány k léčbě AD. Spojujícím článkem těchto molekul je inhibiční aktivita vůči cholinesterasám. Ta je provázena dalšími efekty jako jsou anti-amyloidní a anti-tau, enzymová inhibice (POP, BACE-1 aj.), ovlivnění receptorů (M1 AChR), nebo nespecifickými účinky (chelatace některých kationtů, antioxidační působení). Z důvodu multifaktoriálního charakteru AD je konceptu multipotentních sloučenin připisován největší příslib pro nalezení účinné terapie do budoucna (dle závěrů dosažených na mezinárodním sympoziu „The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases“; Lisabon, Portugalsko; 26. – 31. 3. 2019), ačkoliv výzkum takových léčiv spadá stále zatím pouze do preklinické fáze. Ročně je výzkumu multipotentních sloučenin pro různé indikace (nádorová onemocnění, deprese, hypertenze, AD aj.) věnováno stovky až tisíce nových studií (formou článků v impaktovaných časopisech nebo mezinárodních patentů).

První práce zabývající se vývojem multipotentních sloučenin pro terapii AD se začaly objevovat počátkem 21. století. Tento prudký nárůst však nevedl k uvedení žádného léčiva na trh. Nejdále

v klinickém testování postoupil ladostigil (2. fáze klinického hodnocení), který však nepřevyšoval benefity již zavedeného rivastigminu.⁹⁰ Z dalších léčiv lze ještě zmínit NP-61 (kombinovaný AChE inhibitor a modulátor A β), který nepřekročil 1. fázi klinického hodnocení.²⁵⁹ Aktuálně je tedy na místě se zamyslet, jak celý koncept multipotentních sloučenin dále posunout nebo reformovat tak, aby vedl k uvedení léčiva do klinické praxe. Řada takovýchto úvah byla námi nedávno představena (**SXV**).

Fyzikálně-chemické vlastnosti hrají důležitou roli při vývoji léčiv, zejména s ohledem dostupnosti do CNS a solubility výsledné molekuly. Z tohoto pohledu prošly multipotentní sloučeniny pro terapii AD velkou evolucí. Množství prací na tuto problematiku je věnováno tzv. „linking approach“, nebo-li spojení dvou rozdílných farmakoforů pomocí různých řetězců. To zcela logicky vede k tzv. molekulové obezitě, navýšení lipofility molekuly a jiným kritickým ukazatelům, které jsou v rozporu jednak s Lipinského pravidlem²²² pro perorální dostupnost léčiv (ta je velmi často preferována u pacientů s AD) a dále s dostupností do CNS. S přihlédnutím k druhému aspektu jsou na malé molekuly kladeny daleko přísnější kritéria (obvykle $M_w < 430-450$, $\log P < 4$, počet donorů vodíkových vazeb < 2 a počet akceptorů vodíkových vazeb < 7) a proto jsou v poslední době spíše preferovány další dva zmíněné přístupy („fusing“ a „merging“). Vedle těchto základních charakteristik pak jiné modely operují např. s polárním povrchem molekuly (v angl. literatuře uváděno jako „topological polar surface area“), který je pro CNS léčiva menší než 70 \AA^2 ; a logD, který je odrazem lipofility molekuly při konkrétním pH (zpravidla $\text{pH} = 7,4$). LogD pro léčiva cílená do CNS by měl mít tuto hodnotu < 3 . Důležitým ukazatelem je i disociační konstanta kyseliny, resp. její záporný dekadický logaritmus při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ označovaný jako pK_a , který by měl dosahovat hodnot mezi 7-9. V dnešní době rozmachu výpočetních technologií je možné veškeré fyzikálně-chemické vlastnosti předpovídat s využitím prediktivního software (např. MarvinSketch, ACD Labs Percepta aj.). Následným dosažením těchto hodnot do CNS modelů jako jsou např. BBB skóre²⁶⁰ nebo CNS multiparametrický optimalizační model²⁶¹ lze rychle získat zpětnou vazbu o možnosti prostupu navrhovaných léčiv přes HEB.

Cílení na konkrétní patologie ve správný čas je dalším kritickým prvkem při designování multipotentních sloučenin. Některé patologické pochody spojené s AD začínají již 20-30 let před nástupem klinických symptomů nemoci. Sem patří pozvolné ukládání A β do amyloidních plaků a hyperfosforylace tau proteinu s následnou agregací do neurofibrilárních klubek.²⁶² Tato pozorování jsou v souladu s neúspěchem řady klinických studií cílených na A β , ať už se jednalo o podávání monoklonálních protilátek nebo inhibitorů BACE-1 zpravidla pacientům v terminálních stádiích demence, kdy tato léčiva již zkrátka nemohou mít žádný efekt (shluky A β jsou všudypřítomné a mozková struktura je kompletně narušená, degenerovaná). Z těchto důvodů lze terapeutickou intervenci rozčlenit na tři stádia – primární prevence, sekundární prevence a symptomatická léčba. Primární prevence zahrnuje podávání terapeutik s cílem snížit riziko metabolického syndromu a zachovat správnou činnost kardiovaskulárního systému. V praxi se jedná o aplikaci antihypertenziv, dyslipidemik a antidiabetik.²⁶³ Sekundární prevence by měla být orientována na pacienty bez klinických symptomů AD, u kterých však byla zjištěna diagnostickými metodami přítomnost některých patologických markerů (A β , hyperfosforylovaný tau). Nasazení příslušné léčby je prioritou, avšak v praxi je tento přístup v současné době opomíjen. Symptomatická léčba je indikována pacientům s kognitivní dysfunkcí, kterým jsou podávány inhibitory AChE a/nebo blokátory NMDAR. Pro přenos poznatků v rámci vývoje multipotentních sloučenin a dosažení jejich maximální synergie je důležité mít na paměti,

že nemá smysl kombinovat léčiva, která spadají do různé kategorie terapeutické intervence. Zásadní otázkou vývoje proti-alzheimerovských léčiv zůstává, který z patologických mechanismů AD je klíčový pro úspěšnou terapii. Zde se domnívám, že zásadní úlohu hrají A β i hyperfosforylovaný tau protein, jejichž změny se objevují v rané fázi AD. Optimisticky se stavím zejména k revalidaci klinického potenciálu BACE-1 inhibitorů, případně jiných sloučenin ovlivňující metabolizaci A β , u kterých je jednoznačně prokázána jejich efektivita na agregaci A β ; bohužel všechny z nich byly užívány až v terminálních stádiích demence, kdy jsou změny na mozku nezvratné.

Neslučitelnost mechanismu účinku je často se vyskytující malignitou při vytváření multipotentních sloučenin za účelem dosažení širokospektrého účinku. Zavedená léčiva pro terapii AD, AChE inhibitory a NMDAR antagonistem memantin, působí specificky na daných enzymech/receptorech. Podobně lze nahlížet i na některá experimentální léčiva, která ovlivňují enzymy/receptory jako BACE-1, MAO, M1 AChR aj., u nichž je jejich efekt specifický pro daný cíl. Vedle toho existují receptorově/enzymově nespecifické účinky, kam patří např. antioxidační, chelatační vlastnosti nebo antiagregační účinek vůči A β . Nekompatibilita receptorově-enzymového specifického a nespecifického účinku je problematická zejména z pohledu nastavení správného dávkování. Nespecifická aktivita zpravidla vyžaduje daleko vyšší dávkování.

Další možnou překážkou ve vývoji multipotentních sloučenin je **správná volba mechanismu účinku** (reversibilní vs. ireversibilní) na dané cíle. Podobně jako je uvedeno v předchozím odstavci, i zde je potřeba mít na paměti, že tyto dva mechanismy účinku pro dva rozdílné cíle nelze prakticky kombinovat. Příkladem je donepezil, reversibilní inhibitor AChE, u kterého je efekt zajištěn relativně stabilní a dlouhodobou plasmatickou koncentrací (eliminační poločas = 70 h). Naproti tomu, řada reaktivních sloučenin obsahující *N*-propargylaminovou skupinu zodpovědnou za ireversibilní inhibici MAO disponuje relativně krátkým eliminačním poločasem (např. rasagilin má eliminační poločas 1,5 – 3,0 h).²⁶⁴ I přesto je tento efekt, daný tvorbou kovalentní vazby, dlouhodobý, protože funkce enzymu je obnovena až s jeho syntézou *de novo*. Tyto poznatky jsou analogicky přenositelné pro návrh multipotentních sloučenin určených k terapii AD, kdy kombinace reversibilního a ireversibilního efektu do jedné molekuly postrádá význam.

Dalším z kritických kroků je **balancování aktivit na různé cíle**. Ideálním případem multipotentního léčiva je takové, které vykazuje řádově stejnou účinnost na rozdílné cíle.⁷⁹ V opačném případě je nutné přistoupit k optimalizaci molekuly s využitím výše popsaných „designing in/out“ metod. Po dosažení rovnovážných hladin na dva rozdílné cíle může představovat další úskalí přenositelnost dat z *in vitro* experimentů do podmínek *in vivo*. V případě *in vivo* testování může být efekt sloučeniny závislý na rozdílné tkáňové distribuci (např. vyšší distribuce do periferních tkání vs. nízká prostupnost do CNS; zastoupení receptorů v určitých kompartmentech). Ani dosažení rovnovážného působení na dva a více rozdílných cílů však nemusí nutně znamenat, že jsme úspěšně dosáhli cíle. Příkladem může být kombinace s antagonisty NMDAR, kdy větší účinnost na tomto receptoru je často spojována s kognitivní dysfunkcí a psychotickými stavy.²⁶⁵

Z výše uvedeného je patrné, že vývoj multipotentních sloučenin, i při dodržení všech zásad a postupů, je nelehkým úkolem. Správně vytvořená multipotentní molekula může mít vylepšený

farmakokinetický profil, být bezpečnější (z pohledu nulového rizika lékových interakcí) a může navyšovat compliance pacienta, ale v porovnání s kombinační terapií nepřináší v současné době žádnou další výhodu. Právě kombinační terapie by v úvodní fázi výzkumu měla fungovat k ověření konceptu multipotentních sloučenin a odpovědět na otázku, zda má vůbec smysl pouštět se do hybridizace vybraných předlohových struktur. Vhodnými kandidáty pro návrh multipotentních sloučenin mohou být léčiva v klinice, tedy AChE inhibitory a NMDAR antagonisty memantinu. Fixní kombinace donepezilu a memantinu byla uvedena na trh v roce 2014 pod obchodním názvem Namzaric.¹⁹⁴ Z pohledu mechanismu účinku se u obou sloučenin jedná o reversibilní nekovalentní interakci s příslušnými cíli, obě léčiva mají podobná dávkovací schémata a jejich účinek je receptorově/enzymově specifický. Proto je tato kombinace vhodná pro hledání nové symptomatické léčby na bázi multipotentního léčiva. Zde bych rád zmínil, že naše výzkumná skupina se v posledních letech začala zabývat touto kombinací a v současnosti řeší na danou problematiku několik výzkumných projektů (Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky, projekt č. NU20-08-00296; Grantová agentura České republiky, projekt č. 20-12047S; Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání, projekty č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010054 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007444). Kromě inhibice AChE a antagonizování NMDAR připadají v úvahu ještě další narušené systémy neurotransmise, např. dopaminergní a GABAergní transmise. Z přístupů uplatnitelných v primární/sekundární prevenci lze využít cílení v rámci jedné metabolické cesty, která může vést v aditivní nebo synergický účinek. Zde připadá v úvahu např. kombinace BACE-1 a γ -sekretasových inhibitorů při amyloidogenním zpracování APP, nebo interakce s GSK-3 β , MARK a CDK5 kinasami, které jsou zodpovědné za fosforylaci tau proteínu.

4 Seznam zkratek

| | |
|--|---|
| 5-HT _{3/6} | serotoninové receptory subtyp 3 a 6 |
| A β | amyloid beta |
| A β ₄₀ /A β ₄₂ | isoformy amyloidu beta o délce 40, resp. 42 aminokyselin |
| ABTS | 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) |
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesterasa |
| ACHN | buněčná linie lidského renálního adenokarcinomu |
| AD | Alzheimerova demence |
| ADHD | hyperkinetická porucha; z angl. attention deficit hyperactivity disorder |
| ADMET | absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece a toxicita |
| AICD | intracelulární doména amyloidního prekurzorového proteinu |
| AMPA | α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina |
| AMPA | receptor pro AMPA |
| ApoE | apolipoprotein E |
| <i>APOE</i> ϵ 4 | alela ϵ 4 pro apolipoprotein E |
| <i>APP</i> | gen pro amyloidní prekurzorový protein |
| APP | amyloidní prekurzorový protein |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BACE-1 | β -sekretasa; z angl. beta-site APP cleaving enzyme 1 |
| BChE | butyrylcholinesterasa |
| BQCA | pozitivní alosterický modulátor M1 muskarinových receptorů; chemicky 1-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina |
| CDK5 | cyklin-dependentní kinasa 5 |
| CGN | buněčná linie cerebrálních granulových neuronů |
| ChAT | cholinacetyltransferasa |
| CHO-K1 | ovariální buňky čínského křečka |
| CNS | centrální nervový systém |
| CXCR1 | C-X-C chemokinový receptor 1/2 |
| <i>EeAChE</i> | acetylcholinesterasa izolovaná z elektrického úhoře (lat. <i>Electrophorus electricus</i>) |
| <i>eqBChE</i> | butyrylcholinesterasa z koňského séra (lat. <i>Equus ferus caballus</i>) |

| | |
|---------------|--|
| ERK1/2 | extracelulární signálně-regulační kinasa |
| GABA | receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou |
| GluN1/GluN2B | N1/N2B subtyp NMDA receptoru |
| GSK-3 β | kinasa glykogensyntasa 3 β |
| HEB | hematoencefalická bariéra |
| HepG2 | lidská buněčná linie jaterního karcinomu |
| HT-29 | buněčná linie lidského adenokarcinomu tlustého střeva |
| iNOS | indukovatelná forma NO-syntasy |
| LDL | nízkodenzitní lipoproteiny; z angl. low-density lipoprotein |
| logD | logaritmus rozdělovacího koeficientu při konkrétním pH |
| logP | logaritmus rozdělovacího koeficientu |
| LPS | lipopolysacharid |
| LTP | dlouhodobá potenciace (z angl. Long-term potentiation) |
| M1/M2/M4 AChR | muskarinový receptor subtyp 1/2/4 |
| MAO A/B | monoaminoxidasa A/B |
| MAP | mikrotubul-asociované proteiny |
| MAPK | p38 mitogen-aktivovaná protein kinasa |
| <i>MAPT</i> | gen kódující tau protein |
| MARK | mikrotubuly-regulující kinasa |
| MPTP | mitochondriální permeabilní tranzitní pór |
| M_w | molekulová hmotnost |
| N2A | imortalizovaná myší kortikální neuronální linie Neuro2A |
| N AChR | nikotinový receptor |
| NFT | neurofibrilární klubka; z angl. neurofibrillary tangles |
| NMDA | <i>N</i> -methyl-D-aspartát |
| NMDAR | <i>N</i> -methyl-D-aspartátový receptor |
| nNOS | neuronální formy NO-syntasy |
| NO | oxid dusnatý |
| NR2A/NR2B | podjednotky 2A/2B NMDA receptoru |
| OS | oxidativní stres |
| PAS | periferní anionické místo acetylcholinesterasy |
| pK_a | záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pro kyseliny stanovený při 25 °C |

| | |
|---------------|---|
| POP | prolyloligopeptidasa |
| <i>PSEN1</i> | gen pro presenilin-1 |
| PTM | post-translační modifikace |
| QSAR | kvantitativní vztah mezi strukturou a účinkem |
| RNS | reaktivní formy dusíku; z angl. reactive nitrogen species |
| ROS | reaktivní formy kyslíku; z angl. reactive oxygen species |
| sAPP α | solubilní N-terminální ektodoména APP |
| sAPP β | solubilní protein APP beta |
| SH-SY5Y | lidská buněčná neuroblastomová linie |
| T67 | lidská buněčná linie gliomu |
| TREM2 | receptor navozující patologickou kaskádu Alzheimerovy choroby; z angl. triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 |
| ZnT1/3/4/6 | zinkové transportéry 1/3/4/6 |

5 Literatura

5.1 Citace vlastních prací

5.1.1 Původní práce

PI. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kral, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Kuca, K. 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers as cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease treatment – synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Molecules*, **2013**, *18*(2), 2397-2418. DOI: 10.3390/molecules18022397. IF₂₀₁₃ = 2,095. AIS₂₀₁₃ = 0,553.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2397>

PII. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K. Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: A novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.*, **2015**, *24*, 2645-2655. DOI: 10.1007/s00044-015-1316-x. IF₂₀₁₅ = 1,436. AIS₂₀₁₅ = 0,244.

Full-text: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00044-015-1316-x>

PIII. Gazova, Z.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Siposova, K.; Drtinova, L.; Jost, P.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Fedunova, D.; Horak, M.; Kaniakova, M.; Wang, Z.-J.; Hamouda, A.K.; Kuca, K. Multi-target-directed therapeutic potential of 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers in the Alzheimer's disease treatment. *BBA-Mol. Basis Dis.*, **2017**, *1863*(2), 607-619. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.020. IF₂₀₁₇ = 5,108. AIS₂₀₁₇ = 1,701.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443916303027>

PIV. Kaniakova, M.; Nepovimova, E.; Kleteckova, L.; Skrenkova, K.; Holubova, K.; Chrienova, Z.; Hepnarova, V.; Kucera, T.; Koblrova, T.; Vales, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Horak, M. Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Curr. Alz. Res.*, **2019**, *16*(9), 821-833. DOI: 10.2174/1567205016666190228122218. IF₂₀₁₉ = 3,047. AIS₂₀₁₉ = 0,844.

Full-text: www.eurekaselect.com/170309/article

PV. Korabecny, J.; Dolezal, R.; Cabelova, P.; Horova, A.; Hrubá, E.; Ricny, J.; Sedlacek, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Andrs, M.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Sepsova, V.; Ripova, D.; Kuca, K. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modelling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *82*, 426-438. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.066. IF₂₀₁₄ = 3,447. AIS₂₀₁₄ = 0,720.

Full-text:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523414004905?via%3Dihub>

PVI. Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and biological evaluation of novel tacrine derivatives and tacrine-coumarin hybrids as cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*(16), 7073-7084. DOI: 10.1021/jm5008648. IF₂₀₁₄ = 5,447. AIS₂₀₁₄ = 1,367.

Full text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm5008648>

PVII. Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Peña-Altamira, L.E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G.E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M. Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M.L. Multitarget drug design strategy: quinone-tacrine hybrids designed to block amyloid-beta aggregation and to exert anticholinesterase and antioxidant effects. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57(20), 8576-8589. DOI: 10.1021/jm5010804. IF₂₀₁₄ = 5,447. AIS₂₀₁₄ = 1,367.

Full text: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm5010804>

PVIII. Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R. Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine – trolox hybrids: A novel class of centrally active, non-hepatotoxic multi-target-directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low in vivo toxicity. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58(22), 8985-9003. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01325. IF₂₀₁₅ = 5,589. AIS₂₀₁₅ = 1,473.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b01325>

PIX. Jerabek, J.; Uliassi, E.; Guidotti, L.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Kuca, K.; Bartolini, M.; Peña Altamira, L.E.; Petralla, S.; Monti, B.; Roberti, M; Bolognesi, M.L. Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 127, 250-262. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.048. IF₂₀₁₇ = 4,816. AIS₂₀₁₇ = 0,745.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416310546?via%3Dihub>

PX. Spilovska K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K. A novel tacrine-scutellarin hybrids as multipotent anti-Alzheimer's agents: design, synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2017**, 22(6), 1006. DOI: 10.3390/molecules22061006. IF₂₀₁₇ = 3,098. AIS₂₀₁₇ = 0,631.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/1006>

PXI. Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Gorecki, L.; Mezeiova, E.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-*p*-Anisidine Dimers as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*, **2015**, 20(12), 22084-22101. DOI: 10.3390/molecules201219836. IF₂₀₁₅ = 2,465. AIS₂₀₁₅ = 0,579.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/12/19836>

PXII. Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabnova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Pham, N.L.; Jun, D.; Staud, F.; Kaping, D.; Kuca, K.; Soukup, O. The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 150, 292-306. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.083. IF₂₀₁₈ = 4,833. AIS₂₀₁₈ = 0,748.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418302265?via%3Dihub>

PXIII. Chalupova, K.; Korabecny, J.; Bartolini, M.; Monti, B.; Lamba, D.; Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Brazzolotto, X.; Gastellier, A.-J.; Nachon, F.; Pejchal, J.; Jarosova, M.; Hepnarova, V.; Jun, D.; Hrabnova, M.; Dolezal, R.; Zdarova Karasova, J.; Mzik, M.; Kristofikova, Z.; Misik, J.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Benkova, M.; Setnicka, V.; Habartova, L.; Chvojkova, M.; Kleteckova, L.; Vales, K.; Mezeiova, E.; Uliassi, E.; Valis, M.; Nepovimova, E.; Bolognesi, M.L.; Kuca, K. Novel tacrine-tryptophan hybrids: multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *168*, 491-514. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.021. IF₂₀₁₉ = 5,572. AIS₂₀₁₈ = 0,798.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523419301357>

PXIV. Svobodova, B.; Mezeiova, E.; Hepnarova, V.; Hrabnova, M.; Muckova, L.; Koblrova, T.; Jun, D.; Soukup, O.; Luisa Jimeno, M.; Marco-Contelles, J.; Korabecny, J.* Exploring Structure-Activity Relationship in Tacrine-Squaramide Derivatives as Potent Cholinesterase Inhibitors. *Biomolecules*, **2019**, *9*, 379. DOI: 10.3390/biom9080379. IF₂₀₁₉ = 4,082. AIS₂₀₁₉ = -.

Full-text: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/379>

PXV. Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.L.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules*, **2017**, *22*(8), 1265. DOI: 10.3390/molecules22081265. IF₂₀₁₇ = 3,098. AIS₂₀₁₇ = 0,631.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/8/1265>

PXVI. Więckowska, A.; Wichur, T.; Godyń, J.; Bucki, A.; Marcinkowska, M.; Siwek, A.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Knez, D.; Głuch-Lutwin, M.; Kazek, G.; Latacz, G.; Mika, K.; Kołaczkowski, M.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Benkova, M.; Kiec-Kononowicz, K.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.*, **2018**, *9*(5), 1195-1214. DOI: 10.1021/acchemneuro.8b00024. IF₂₀₁₈ = 3,861. AIS₂₀₁₈ = 1,109.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acchemneuro.8b00024>

PXVII. Jończyk, J.; Lodarski, K.; Staszewski, M.; Godyń, J.; Zaręba, P.; Soukup, O.; Janockova, J.; Korabecny, J.; Sałat, K.; Malikowska-Racia, N.; Hebda, M.; Szałaj, N.; Filipek, B.; Walczyński, K.; Malawska, B.; Bajda, M. Search for multifunctional agents against Alzheimer's disease among non-imidazole histamine H3 receptor ligands. *In vitro* and *in vivo* pharmacological evaluation and computational studies of piperazine derivatives. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *90*, 103084. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103084. IF₂₀₁₉ = 4,831. AIS₂₀₁₉ = 0,643.

Full-text:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045206819302287?via%3Dihub>

PXVIII. Prati, F.; Bergamini, C.; Fato, R.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M.L. Novel 8-hydroxyquinoline derivatives as multitarget compounds for the treatment of Alzheimer's Disease. *ChemMedChem*, **2016**, *11*(12), 1284-1295. DOI: 10.1002/cmdc.201600014. IF₂₀₁₆ = 3,225. AIS₂₀₁₆ = 0,813.

Full-text: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.201600014>

PXXIX. Panek, D.; Więckowska, A.; Wichur, T.; Bajda, M.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Mika, K.; Janockova, J.; Soukup, O.; Knez, D.; [Korabecny, J.](#); Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *125*, 676-695. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.09.078. IF₂₀₁₇ = 4,816. AIS₂₀₁₇ = 0,745.

Full-text:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523416308169?via%3Dihub>

PXX. Panek, D.; Więckowska, A.; Jończyk, J.; Godyń, J.; Bajda, M.; Wichur, T.; Pasieka, A.; Knez, D.; Pislár, A.; [Korabecny, J.](#); Soukup, O.; Sepsova, V.; Sabat', R.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of 1-benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-modifying multifunctional anti-Alzheimer's agents. *ACS Chem. Neurosci.*, **2018**, *9*(5), 1074-1094. DOI: 10.1021/acscchemneuro.7b00461. IF₂₀₁₈ = 3,861. AIS₂₀₁₈ = 1,109.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.7b00461>

PXXI. Chlebek, J.; [Korabecny, J.](#); Dolezal, R.; Stepankova, S.; Pérez, D.I.; Hostalkova, A.; Opletal, L.; Cahlikova, L.; Macakova, K.; Kucera, T.; Hrabínova, M.; Jun, D. In Vitro and in Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules*, **2019**, *24*(7), 1340. DOI: 10.3390/molecules24071340. IF₂₀₁₉ = 3,267. AIS₂₀₁₉ = 0,601.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1340>

PXXII. Hostalkova, A.; Marikova, J.; Opletal, L.; [Korabecny, J.](#); Perez, I.D.; Hulcova, D.; Kunes, J.; Hrabínova, M.; Jun, D.; Novakova, L.; Kucera, T.; Andrisano, V.; Siatka, T. Cahlikova, L. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.*, **2019**, *82*(2), 239-248. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00592. IF₂₀₁₉ = 3,779. AIS₂₀₁₉ = 0,778.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.8b00592>

PXXIII. Sobolova, K.; Hrabínova, M.; Hepnarova, V.; Kucera, T.; Kobrlova, T.; Benkova, M.; Janockova, J.; Dolezal, R.; Prchal, L.; Benek, O.; Mezeiova, E.; Jun, D.; Soukup, O.; [Korabecny, J.*](#) Discovery of novel berberine derivatives with balanced cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition profile. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *203*, 112593. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112593. IF₂₀₁₉ = 5,572. AIS₂₀₁₉ = 0,798.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523420305651>

PXXIV. Kohelova, E.; Perinova, R.; Maafi, N.; [Korabecny, J.](#); Hulcova, D.; Marikova, J.; Kucera, T.; Martine-Gonzalez, L.; Hrainova, M.; Vorcakova, K.; Novakova, L.; De Simone, A.; Havellek, R.; Cahlikova, L. Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules*, **2019**, *24*(7), 1307. IF₂₀₁₉ = 3,267. AIS₂₀₁₉ = 0,601.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1307>

PXXV. Perinova, R.; Maafi, N.; [Korabecny, J.](#); Kohelova, E.; De Simone, A.; Al Mamun, A.; Hulcova, D.; Markova, J.; Kucera, T.; Jun, D.; Safratova, M.; Marikova, J.; Andrisano, V.; Jenco, J.; Kunes, J.; Martinez, A.; Novakova, L.; Cahlikova, L. Functionalized aromatic esters of the

Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, **2020**, *100*, 103928. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103928. IF₂₀₁₉ = 4,831. AIS₂₀₁₉ = 0,643.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004520681932125X>

PXXVI. Marikova, J.; Ritomska, A.; Korabecny, J.; Perinova, R.; Abdullah, Al M.; Kucera, T.; Kohelova, E.; Hulcova, D.; Kobrlova, T.; Kunes, J.; Cahlikova, L. Aromatic Esters of the Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Ambelline as Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *J. Nat. Prod.*, **2020**, *83*, 1359-1367. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00561. IF₂₀₁₉ = 3,779. AIS₂₀₁₉ = 0,778.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00561>

PXXVII. Hulcova, D.; Marikova, J.; Korabecny, J.; Hostalkova, A.; Jun, D.; Kunes, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Novakova, L.; Andrisano, V.; Ruzicka, A.; Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, **2019**, *165*, 112055. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112055. IF₂₀₁₉ = 3,044. AIS₂₀₁₉ = 0,740.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942219301979>

PXXVIII. Al Mamun, A.; Marikova, J.; Hulcova, D.; Janousek, J.; Safratova, M.; Novakova, L.; Kucera, T.; Hrabinoval, M.; Kunes, J.; Korabecny, J.*; Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as a novel structural scaffold for Alzheimer's disease. *Biomolecules*, **2020**, *10*(5), 800. DOI: 10.3390/biom10050800. IF₂₀₁₉ = 4,082. AIS₂₀₁₉ = -.

Full-text: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/5/800/htm>

PXXIX. Nunes Lemes, L.F.; de Andrade Ramos, G.; de Oliveira, S.; R.da Silva, F.M.; de Castro Couto, G.; da Silva Boni, M.; Guimarães, M.J.; O. Souza, I.N.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; do Nascimento Nogueira, P.C.; Rocha Silveira, E.; Soukup, O.; Korabecny, J.; C. Romeiro, N.; G. Castro, N.; Bolognesi, M.L.; Soares Romeiro, L.A. Cardanol-derived AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *108*, 687-700. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.12.024. IF₂₀₁₆ = 4,519. AIS₂₀₁₆ = 0,748.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415304128?via%3Dihub>

5.1.2 Přehledové práce

SI. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Musilek, K. Inhibitory gamma sekretázy v terapii Alzheimerovej choroby. *Ceska Slov. Farm.*, **2012**, *61*, 93-100. J_{sc}

Full-text: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-3-10/inhibitory-gamma-sekretazy-v-terapii-alzheimerovej-choroby-38551>

SII. Korabecny, J.; Spilovska, K.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Kuca, K. Amyloid Beta Hypothesis: Attention to β - and γ -Secretase Modulators. kapitola 1, publikováno v *Alzheimer's Disease - The 21st Century Challenge*; **2018**; Online ISBN 978-1-78923-463-3; DOI: 10.5772/intechopen.71628

Full-text: <https://www.intechopen.com/books/alzheimer-s-disease-the-21st-century-challenge/amyloid-beta-hypothesis-attention-to-and-secretase-modulators>

SIII. Zemek, F.; Sepsova, V.; Drtinova, L.; Nepovimova, E., Korabecny, J.; Kuca, K. Outcomes of Alzheimer's diseases therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert*

Opin. Drug Saf., **2014**, 13(6), 759-774. DOI: 10.1517/14740338.2014.914168. IF₂₀₁₄ = 1,758. AIS₂₀₁₄ = 0,836.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14740338.2014.914168>

SIV. Korabecny, J.; Zemek, F.; Soukup, O.; Spilovska, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Nepovimova, E.; Kuca, K. Current treatment and perspectives in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. kapitola v knize; publikováno v *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, **2014**, 6, 3-39. DOI: 10.1016/B978-0-12-803959-5.50001-5

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128039595500015>

SV. Spilovska, K.; Zemek, F.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Windisch, M.; Kuca, K. Adamantane – a lead structure for drugs in clinical practice. *Curr. Med. Chem.*, **2016**, 23(29), 3245-3266. DOI: 10.2174/0929867323666160525114026. IF₂₀₁₆ = 3,249. AIS₂₀₁₆ = 0,819.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/142487/article>

SVI. Soukup, O.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Kuca, K. Nové trendy ve vývoji nových léčiv Alzheimerovy nemoci. *Acta Medicinae*, **2014**, 11, 66-68. J_{sc}

Full-text: <http://www.actamedicinae.cz/login/issue112014.asp> (dostupné online po registraci a přihlášení)

SVII. Korabecny, J.; Hrubá, E.; Soukup, O.; Zemek, F.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Opletalova, V.; Kuca, K. Zvažované farmakoterapeutické přístupy léčby Alzheimerovy choroby. *Ceska Slov. Farm.*, **2012**, 61, 4-10. J_{sc}

Full-text: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-1-2-1/zvazovane-farmakoterapeuticke-pristupy-lecby-alzheimerovy-choroby-37396>

SVIII. Kuca, K.; Soukup, O.; Maresova, P.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Klimova, B.; Honegr, J.; Ramalho, T.; Franca, T.C. Current Approaches against Alzheimer's Disease in Clinical Trials. *J. Brazil. Chem. Soc.*, **2016**, 27(4), 641-649. DOI: 10.5935/0103-5053.20160048. IF₂₀₁₆ = 1,198. AIS₂₀₁₆ = 0,261.

Full-text: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532016000400641&script=sci_arttext&tlng=en

SIX. Korabecny, J. Prokognitivní potenciál bis(7)-takrinu jako zvažovaného terapeutika neurodegenerativních onemocnění. *Mil. Med. Sci. Lett.*, **2018**, 87(1), 34-44. DOI: 10.31482/mmsl.2018.006. J_{sc}

Full-text: https://www.mmsl.cz/artkey/mms-201801-0006_pro-cognitive-effect-of-bis-7-tacrine-as-potential-therapeutic-agent-against-neurodegenerative-disorders.php

SX. Mezeiova, E.; Chalupova, K.; Nepovimova, E.; Gorecki, L.; Prchal, L.; Malinak, D.; Kuca, K.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Donepezil Derivatives Targeting Amyloid- β cascade in Alzheimer's Disease. *Curr. Alz. Res.*, **2019**, 16(9), 772-800. DOI: 10.2174/1567205016666190228122956. IF₂₀₁₉ = 3,047. AIS₂₀₁₉ = 0,844.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/170311/article>

SXI. Korabecny, J.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Benek, O.; Juza, R.; Kaping, D.; Soukup, O. A systematic review on donepezil-based derivatives as potential cholinesterase inhibitors for

Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, **2019**, 26(30), 5625-5648. DOI: 10.2174/0929867325666180517094023. IF₂₀₁₉ = 4,184. AIS₂₀₁₉ = 0,745.

Full-text: www.eurekaselect.com/162233/article

SXII. Mezeiova, E.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Gorecki, L.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Janockova, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J.* Profiling donepezil template into multipotent hybrids with antioxidant properties. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2018**, 33(1), 583-606. DOI: 10.1080/14756366.2018.1443326. IF₂₀₁₈ = 4,027. AIS₂₀₁₈ = 0,474.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2018.1443326>

SXIII. Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Cikankova, T.; Spilovska, K.; Vaskova, L.; Mezeiova, E.; Kuca, K.; Hroudova, J. Newly developed drugs for Alzheimer's disease in relation to energy metabolism, cholinergic and monoaminergic neurotransmission. *Neuroscience*, **2018**, 370, 191-206. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.06.034. IF₂₀₁₈ = 3,244. AIS₂₀₁₈ = 0,997.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452217304396?via%3Dihub>

SXIV. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Soukup, O.; Kuca, K. Multitarget tacrine hybrids with neuroprotective properties to confront Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2017**, 17(9), 1006-1026. DOI: 10.2174/1568026605666160927152728. IF₂₀₁₇ = 3,374. AIS₂₀₁₇ = 0,704.

Full-text: www.eurekaselect.com/145857/article

SXV. Benek, O.; Korabecny, J.*; Soukup, O. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sciences*, **2020**, 41(7), 434-445. DOI: 10.1016/j.tips.2020.04.008. IF₂₀₁₉ = 13,503. AIS₂₀₁₉ = 3,946.

Full-text: [https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147\(20\)30094-8](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147(20)30094-8)

SXVI. Horak, M.; Holubova, K.; Nepovimova, E.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Korabecny, J.; Vyklicky L.; Kuca, K.; Stuchlik, A.; Ricny, J.; Vales, K.; Soukup, O. The pharmacology of tacrine at N-methyl-D-aspartate receptors. *Prog. Neuro-Psychoph.*, **2017**, 75, 54-62. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.01.003. IF₂₀₁₇ = 4,185. AIS₂₀₁₇ = 1,045.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584616302780?via%3Dihub>

SXVII. Soukup, O.; Jun, D.; Karasova-Zdarova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr. Alz. Res.*, **2013**, 10(8), 893-906. DOI: 10.2174/1567205011310080011. IF₂₀₁₃ = 3,796. AIS₂₀₁₃ = 1,113.

Full-text: www.eurekaselect.com/115716/article

SXVIII. Korabecny, J.; Spilovska, K.; Benek, O.; Musilek, K.; Soukup, O.; Kuca, K. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Cesk. Slov. Farm.*, **2012**, 61, 210-221. J_{sc}

Full-text: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-5-4/takrin-a-jeho-derivaty-v-terapii-alzheimerovy-choroby-39300>

SXIX. Korabecny, J. Melatonin jako základní stavební jednotka pro léčiva ve vztahu k neurodegenerativním poruchám. *Cesk. Slov. Farm.*, **2018**, 67, 51-58. J_{sc}

Full-text: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2018-2-7/melatonin-jako-zakladni-stavebni-jednotka-pro-leciva-ve-vztahu-k-neurodegenerativnim-porucham-105342>

SXX. Mezeiova, E.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Huprines – an insight into synthesis and biological properties. *Russ. Chem. Rev.*, **2020**, 89(10), 999-1039. DOI: 10.1070/RCR4938. IF₂₀₁₉ = 4,750. AIS₂₀₁₉ = 0,777.

Full-text: https://www.turpion.org/php/paper.phtml?journal_id=rc&paper_id=4938

SXXI. Babkova, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Kuca, K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Fut. Med. Chem.*, **2017**, 9(10), 1015-1038. DOI: 10.4155/fmc-2017-0030. IF₂₀₁₇ = 3,969. AIS₂₀₁₇ = 1,068.

Full-text: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fmc-2017-0030>

5.2 Citace literatury ostatních autorů

- (1) Hippus, H.; Neundörfer, G. The Discovery of Alzheimer's Disease. *Dialogues Clin Neurosci* **2003**, 5 (1), 101–108.
- (2) Qiu, C.; Kivipelto, M.; von Strauss, E. Epidemiology of Alzheimer's Disease: Occurrence, Determinants, and Strategies toward Intervention. *Dialogues Clin Neurosci* **2009**, 11 (2), 111–128.
- (3) Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. *Nat Rev Neurol* **2013**, 9 (2), 106–118. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>.
- (4) Mahley, R. W.; Rall, S. C. Apolipoprotein E: Far More than a Lipid Transport Protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2000**, 1, 507–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>.
- (5) Lahoz, C.; Schaefer, E. J.; Cupples, L. A.; Wilson, P. W.; Levy, D.; Osgood, D.; Parpos, S.; Pedro-Botet, J.; Daly, J. A.; Ordovas, J. M. Apolipoprotein E Genotype and Cardiovascular Disease in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* **2001**, 154 (3), 529–537.
- (6) De Strooper, B. Loss-of-Function Presenilin Mutations in Alzheimer Disease. Talking Point on the Role of Presenilin Mutations in Alzheimer Disease. *EMBO Rep* **2007**, 8 (2), 141–146. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400897>.
- (7) Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S.; Malinow, R. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* **2003**, 37 (6), 925–937.
- (8) Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer Disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochem Pharmacol* **2014**, 88 (4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>.
- (9) Mesulam, M.-M. Cholinergic Circuitry of the Human Nucleus Basalis and Its Fate in Alzheimer's Disease. *J. Comp. Neurol.* **2013**, 521 (18), 4124–4144. <https://doi.org/10.1002/cne.23415>.
- (10) Davies, P.; Maloney, A. J. Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *Lancet* **1976**, 2 (8000), 1403.
- (11) Bartus, R. T. Evidence for a Direct Cholinergic Involvement in the Scopolamine-Induced Amnesia in Monkeys: Effects of Concurrent Administration of Physostigmine and Methylphenidate with Scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1978**, 9 (6), 833–836. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90364-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90364-7).
- (12) Hampel, H.; Mesulam, M.-M.; Cuello, A. C.; Farlow, M. R.; Jacobini, E.; Grossberg, G. T.; Khachaturian, A. S.; Vergallo, A.; Cavedo, E.; Snyder, P. J.; Khachaturian, Z. S. The

- Cholinergic System in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease. *Brain* **2018**, *141* (7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>.
- (13) Song, I.; Huganir, R. L. Regulation of AMPA Receptors during Synaptic Plasticity. *Trends in Neurosciences* **2002**, *25* (11), 578–588. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02270-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02270-1).
- (14) Wang, R.; Reddy, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **2017**, *57* (4), 1041–1048. <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>.
- (15) Tymianski, M.; Charlton, M. P.; Carlen, P. L.; Tator, C. H. Source Specificity of Early Calcium Neurotoxicity in Cultured Embryonic Spinal Neurons. *J. Neurosci.* **1993**, *13* (5), 2085–2104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-05-02085.1993>.
- (16) Domingues, A.; Almeida, S.; da Cruz e Silva, E. F.; Oliveira, C. R.; Rego, A. C. Toxicity of β -Amyloid in HEK293 Cells Expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-Methyl-d-Aspartate Receptor Subunits. *Neurochemistry International* **2007**, *50* (6), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.03.001>.
- (17) Selkoe, D. J. The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuron* **1991**, *6* (4), 487–498.
- (18) Greenfield, J. P.; Tsai, J.; Gouras, G. K.; Hai, B.; Thinakaran, G.; Checler, F.; Sisodia, S. S.; Greengard, P.; Xu, H. Endoplasmic Reticulum and Trans-Golgi Network Generate Distinct Populations of Alzheimer Beta-Amyloid Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96* (2), 742–747. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.742>.
- (19) Chasseigneaux, S.; Allinquant, B. Functions of A β , SAPP α and SAPP β : Similarities and Differences. *J. Neurochem.* **2012**, *120 Suppl 1*, 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x>.
- (20) Younkin, S. G. Evidence That A Beta 42 Is the Real Culprit in Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol.* **1995**, *37* (3), 287–288. <https://doi.org/10.1002/ana.410370303>.
- (21) Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. Amyloid-Beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* **2008**, *14* (8), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>.
- (22) Ferreira, S. T.; Lourenco, M. V.; Oliveira, M. M.; De Felice, F. G. Soluble Amyloid-b Oligomers as Synaptotoxins Leading to Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>.
- (23) Moussa-Pacha, N. M.; Abdin, S. M.; Omar, H. A.; Alniss, H.; Al-Tel, T. H. BACE1 Inhibitors: Current Status and Future Directions in Treating Alzheimer's Disease. *Medicinal Research Reviews* **2020**, *40* (1), 339–384. <https://doi.org/10.1002/med.21622>.
- (24) Maia, M. A.; Sousa, E. BACE-1 and γ -Secretase as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* **2019**, *12* (1). <https://doi.org/10.3390/ph12010041>.
- (25) Hamley, I. W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (10), 5147–5192. <https://doi.org/10.1021/cr3000994>.
- (26) Spies, P. E.; Verbeek, M. M.; van Groen, T.; Claassen, J. A. H. R. Reviewing Reasons for the Decreased CSF A β 42 Concentration in Alzheimer Disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2012**, *17*, 2024–2034.
- (27) Guo, T.; Noble, W.; Hanger, D. P. Roles of Tau Protein in Health and Disease. *Acta Neuropathol* **2017**, *133* (5), 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- (28) Neddens, J.; Temmel, M.; Flunkert, S.; Kerschbaumer, B.; Hoeller, C.; Loeffler, T.; Niederkofler, V.; Daum, G.; Attems, J.; Hutter-Paier, B. Phosphorylation of Different Tau Sites during Progression of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6>.

- (29) Ballatore, C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q. Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, *8* (9), 663–672. <https://doi.org/10.1038/nrn2194>.
- (30) Marks, S. M.; Lockhart, S. N.; Baker, S. L.; Jagust, W. J. Tau and β -Amyloid Are Associated with Medial Temporal Lobe Structure, Function, and Memory Encoding in Normal Aging. *J. Neurosci.* **2017**, *37* (12), 3192–3201. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3769-16.2017>.
- (31) Mazanetz, M. P.; Fischer, P. M. Untangling Tau Hyperphosphorylation in Drug Design for Neurodegenerative Diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6* (6), 464–479. <https://doi.org/10.1038/nrd2111>.
- (32) Li, C.; Götz, J. Tau-Based Therapies in Neurodegeneration: Opportunities and Challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (12), 863–883. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.155>.
- (33) Feng, Y.; Wang, X. Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/472932/> (accessed Jul 2, 2019). <https://doi.org/10.1155/2012/472932>.
- (34) Sultana, R.; Mecocci, P.; Mangialasche, F.; Cecchetti, R.; Baglioni, M.; Butterfield, D. A. Increased Protein and Lipid Oxidative Damage in Mitochondria Isolated from Lymphocytes from Patients with Alzheimer's Disease: Insights into the Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and Initial Investigations into a Potential Biomarker for This Dementing Disorder. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *24* (1), 77–84. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101425>.
- (35) Sultana, R.; Butterfield, D. A. Role of Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *19* (1), 341–353. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1222>.
- (36) Ripoli, C.; Piacentini, R.; Riccardi, E.; Leone, L.; Li Puma, D. D.; Bitan, G.; Grassi, C. Effects of Different Amyloid β -Protein Analogues on Synaptic Function. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34* (4), 1032–1044. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.027>.
- (37) Bélanger, M.; Allaman, I.; Magistretti, P. J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* **2011**, *14* (6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- (38) Chen, L.; Na, R.; Gu, M.; Richardson, A.; Ran, Q. Lipid Peroxidation Up-Regulates BACE1 Expression in Vivo: A Possible Early Event of Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* **2008**, *107* (1), 197–207. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05603.x>.
- (39) Wojsiat, J.; Zoltowska, K. M.; Laskowska-Kaszub, K.; Wojda, U. Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/6435861>.
- (40) Ferreira, M. E. S.; de Vasconcelos, A. S.; da Costa Vilhena, T.; da Silva, T. L.; da Silva Barbosa, A.; Gomes, A. R. Q.; Dolabela, M. F.; Percário, S. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Should We Keep Trying Antioxidant Therapies? *Cell Mol Neurobiol* **2015**, *35* (5), 595–614. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0157-y>.
- (41) Polidori, M. C.; Nelles, G. Antioxidant Clinical Trials in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease - Challenges and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20* (18), 3083–3092.
- (42) Luque-Contreras, D.; Carvajal, K.; Toral-Rios, D.; Franco-Bocanegra, D.; Campos-Peña, V. Oxidative Stress and Metabolic Syndrome: Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/497802/> (accessed Jul 2, 2019). <https://doi.org/10.1155/2014/497802>.
- (43) Smith, M. A.; Harris, P. L. R.; Sayre, L. M.; Perry, G. Iron Accumulation in Alzheimer Disease Is a Source of Redox-Generated Free Radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (18), 9866–9868.

- (44) Bush, A. I.; Pettingell, W. H.; Multhaup, G.; d Paradis, M.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. Rapid Induction of Alzheimer A Beta Amyloid Formation by Zinc. *Science* **1994**, *265* (5177), 1464–1467. <https://doi.org/10.1126/science.8073293>.
- (45) Tomljenovic, L. Aluminum and Alzheimer's Disease: After a Century of Controversy, Is There a Plausible Link? *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *23* (4), 567–598. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101494>.
- (46) Mcdermott, J. R.; Smith, A. I.; Iqbal, K.; Wisniewski, H. M. ALUMINIUM AND ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet* **1977**, *310* (8040), 710–711. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)90516-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)90516-5).
- (47) Ridge, P. G.; Zhang, Y.; Gladyshev, V. N. Comparative Genomic Analyses of Copper Transporters and Cuproproteomes Reveal Evolutionary Dynamics of Copper Utilization and Its Link to Oxygen. *PLoS ONE* **2008**, *3* (1), e1378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001378>.
- (48) Franz, K. J. Copper Shares a Piece of the Pi. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (2), 85–86. <https://doi.org/10.1038/nchembio0208-85>.
- (49) Squitti, R.; Lupoi, D.; Pasqualetti, P.; Dal Forno, G.; Vernieri, F.; Chiovenda, P.; Rossi, L.; Cortesi, M.; Cassetta, E.; Rossini, P. M. Elevation of Serum Copper Levels in Alzheimer's Disease. *Neurology* **2002**, *59* (8), 1153–1161. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.8.1153>.
- (50) Nakano, E.; Williamson, M. P.; Williams, N. H.; Powers, H. J. Copper-Mediated LDL Oxidation by Homocysteine and Related Compounds Depends Largely on Copper Ligation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2004**, *1688* (1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.10.005>.
- (51) Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H.; D'Agostino, R. B.; Wilson, P. W. F.; Wolf, P. A. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346* (7), 476–483. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011613>.
- (52) Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. Copper, Iron and Zinc in Alzheimer's Disease Senile Plaques. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158* (1), 47–52.
- (53) Morris, M. C.; Evans, D. A.; Tangney, C. C.; Bienias, J. L.; Schneider, J. A.; Wilson, R. S.; Scherr, P. A. Dietary Copper and High Saturated and Trans Fat Intakes Associated with Cognitive Decline. *Arch. Neurol.* **2006**, *63* (8), 1085–1088. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.8.1085>.
- (54) Roohani, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R.; Schulin, R. Zinc and Its Importance for Human Health: An Integrative Review. *J Res Med Sci* **2013**, *18* (2), 144–157.
- (55) Sensi, S. L.; Paoletti, P.; Bush, A. I.; Sekler, I. Zinc in the Physiology and Pathology of the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10* (11), 780–791. <https://doi.org/10.1038/nrn2734>.
- (56) Smart, T. G.; Hosie, A. M.; Miller, P. S. Zn²⁺ Ions: Modulators of Excitatory and Inhibitory Synaptic Activity. *Neuroscientist* **2004**, *10* (5), 432–442. <https://doi.org/10.1177/1073858404263463>.
- (57) Lyubartseva, G.; Smith, J. L.; Markesbery, W. R.; Lovell, M. A. Alterations of Zinc Transporter Proteins ZnT-1, ZnT-4 and ZnT-6 in Preclinical Alzheimer's Disease Brain. *Brain Pathol.* **2010**, *20* (2), 343–350. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00283.x>.
- (58) Lee, J.-Y.; Kim, J.-H.; Hong, S. H.; Lee, J. Y.; Cherny, R. A.; Bush, A. I.; Palmiter, R. D.; Koh, J.-Y. Estrogen Decreases Zinc Transporter 3 Expression and Synaptic Vesicle Zinc Levels in Mouse Brain. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (10), 8602–8607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309730200>.
- (59) Zhang, A.-S.; Enns, C. A. Iron Homeostasis: Recently Identified Proteins Provide Insight into Novel Control Mechanisms. *J Biol Chem* **2009**, *284* (2), 711–715. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800017200>.

- (60) Collingwood, J.; Dobson, J. Mapping and Characterization of Iron Compounds in Alzheimer's Tissue. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *10* (2–3), 215–222.
- (61) Castellani, R. J.; Moreira, P. I.; Liu, G.; Dobson, J.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. Iron: The Redox-Active Center of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Neurochem. Res.* **2007**, *32* (10), 1640–1645. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9360-7>.
- (62) Mohamed, W. A.; Salama, R. M.; Schaalán, M. F. A Pilot Study on the Effect of Lactoferrin on Alzheimer's Disease Pathological Sequelae: Impact of the p-Akt/PTEN Pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *111*, 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.118>.
- (63) Lee, H. J.; Korshavn, K. J.; Kochi, A.; Derrick, J. S.; Lim, M. H. Cholesterol and Metal Ions in Alzheimer's Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (19), 6672–6682. <https://doi.org/10.1039/C4CS00005F>.
- (64) The top 10 causes of death <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed Jun 19, 2020).
- (65) Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* **2013**, *9* (1), 63–75.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>.
- (66) Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Sczufca, M. Global Prevalence of Dementia: A Delphi Consensus Study. *Lancet* **2005**, *366* (9503), 2112–2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0).
- (67) Maresova, P.; Dolejs, J.; Mohelska, H.; Bryan, L. K. Cost of Treatment and Care for People with Alzheimer's Disease: A Meta- Analysis. *Current Alzheimer Research* **2019**, *16* (14), 1245–1253. <https://doi.org/10.2174/1567205017666200102144640>.
- (68) Schaller, S.; Mauskopf, J.; Kriza, C.; Wahlster, P.; Kolominsky-Rabas, P. L. The Main Cost Drivers in Dementia: A Systematic Review. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **2015**, *30* (2), 111–129. <https://doi.org/10.1002/gps.4198>.
- (69) Holmerová, I.; Hort, J.; Rusina, R.; Wimo, A.; Šteffl, M. Costs of Dementia in the Czech Republic. *Eur J Health Econ* **2017**, *18* (8), 979–986. <https://doi.org/10.1007/s10198-016-0842-x>.
- (70) Summers, W. K.; Tachiki, K. H.; Kling, A. Tacrine in the Treatment of Alzheimer's Disease. A Clinical Update and Recent Pharmacologic Studies. *Eur. Neurol.* **1989**, *29 Suppl 3*, 28–32. <https://doi.org/10.1159/000116478>.
- (71) Qizilbash, N.; Birks, J.; Lopez Arrieta, J.; Lewington, S.; Szeto, S. WITHDRAWN: Tacrine for Alzheimer's Disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**, No. 3, CD000202. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000202>.
- (72) Filho, J. M. J. C.; Birks, J. Physostigmine for Dementia Due to Alzheimer's Disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2001**, No. 2. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001499>.
- (73) McShane, R.; Westby, M. J.; Roberts, E.; Minakaran, N.; Schneider, L.; Farrimond, L. E.; Maayan, N.; Ware, J.; Debarros, J. Memantine for Dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2019**, No. 3. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003154.pub6>.
- (74) Egan, M. F.; Kost, J.; Voss, T.; Mukai, Y.; Aisen, P. S.; Cummings, J. L.; Tariot, P. N.; Vellas, B.; van Dyck, C. H.; Boada, M.; Zhang, Y.; Li, W.; Furtek, C.; Mahoney, E.; Harper Mozley, L.; Mo, Y.; Sur, C.; Michelson, D. Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **2019**, *380* (15), 1408–1420. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812840>.
- (75) Doody, R. S.; Raman, R.; Farlow, M.; Iwatsubo, T.; Vellas, B.; Joffe, S.; Kieburtz, K.; He, F.; Sun, X.; Thomas, R. G.; Aisen, P. S.; Siemers, E.; Sethuraman, G.; Mohs, R. A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **2013**, *369* (4), 341–350. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210951>.

- (76) Coric, V.; Dyck, C. H. van; Salloway, S.; Andreasen, N.; Brody, M.; Richter, R. W.; Soininen, H.; Thein, S.; Shiovitz, T.; Pilcher, G.; Colby, S.; Rollin, L.; Dockens, R.; Pachai, C.; Portelius, E.; Andreasson, U.; Blennow, K.; Soares, H.; Albright, C.; Feldman, H. H.; Berman, R. M. Safety and Tolerability of the γ -Secretase Inhibitor Avagacestat in a Phase 2 Study of Mild to Moderate Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **2012**, *69* (11), 1430–1440. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.2194>.
- (77) Bittar, A.; Sengupta, U.; Kaye, R. Prospects for Strain-Specific Immunotherapy in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *npj Vaccines* **2018**, *3* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0046-8>.
- (78) Cummings, J.; Lee, G.; Ritter, A.; Sabbagh, M.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2019. *Alzheimers Dement (N Y)* **2019**, *5*, 272–293. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008>.
- (79) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (21), 6523–6543. <https://doi.org/10.1021/jm058225d>.
- (80) Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From Magic Bullets to Designed Multiple Ligands. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (15), 641–651. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03163-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03163-0).
- (81) Cummings, J. L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug-Development Pipeline: Few Candidates, Frequent Failures. *Alzheimer's Research & Therapy* **2014**, *6* (4), 37. <https://doi.org/10.1186/alzrt269>.
- (82) Deardorff, W. J.; Grossberg, G. T. A Fixed-Dose Combination of Memantine Extended-Release and Donepezil in the Treatment of Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *Drug Des Devel Ther* **2016**, *10*, 3267–3279. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>.
- (83) de Bartolomeis, A.; Tomasetti, C.; Iasevoli, F. Update on the Mechanism of Action of Aripiprazole: Translational Insights into Antipsychotic Strategies Beyond Dopamine Receptor Antagonism. *CNS Drugs* **2015**, *29*, 773–799. <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0278-3>.
- (84) Korábečný, J. PROKOGNITIVNÍ POTENCIÁL BIS(7)-TAKRINU JAKO ZVAŽOVANÉHO TERAPEUTIKA NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ. *MMSL* **2018**, *87* (1), 34–44. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2018.006>.
- (85) Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly Potent, Selective, and Low Cost Bis-Tetrahydroaminacrine Inhibitors of Acetylcholinesterase. Steps toward Novel Drugs for Treating Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (39), 23646–23649.
- (86) Proschak, E.; Stark, H.; Merk, D. Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (2), 420–444. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00760>.
- (87) Savelieff, M. G.; Nam, G.; Kang, J.; Lee, H. J.; Lee, M.; Lim, M. H. Development of Multifunctional Molecules as Potential Therapeutic Candidates for Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Last Decade. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 1221–1322. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00138>.
- (88) Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabínova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinák, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine-Troxolone Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (22), 8985–9003. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01325>.
- (89) Telpoukhovskaia, M. A.; Cawthray, J. F.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Scott, L. E.; Page, B. D. G.; Patrick, B. O.; Orvig, C. 3-Hydroxy-4-Pyridinone Derivatives Designed for Fluorescence Studies to Determine Interaction with Amyloid Protein as Well as Cell

- Permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25* (17), 3654–3657. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.059>.
- (90) Youdim, M. B. H. Multi Target Neuroprotective and Neurorestorative Anti-Parkinson and Anti-Alzheimer Drugs Ladostigil and M30 Derived from Rasagiline. *Exp Neurobiol* **2013**, *22* (1), 1–10. <https://doi.org/10.5607/en.2013.22.1.1>.
- (91) Benek, O.; Korabecny, J.; Soukup, O. A Perspective on Multi-Target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **2020**, *41* (7), 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.04.008>.
- (92) Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr Alzheimer Res* **2013**, *10* (8), 893–906. <https://doi.org/10.2174/1567205011310080011>.
- (93) Recanatini, M.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Valenti, P.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cavrini, V. SAR of 9-Amino-1,2,3,4-Tetrahydroacridine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Enzyme Inhibitory Activity, QSAR, and Structure-Based CoMFA of Tacrine Analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (10), 2007–2018.
- (94) Giacobini, E. Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase: A Valid Alternative for Therapy of Alzheimer's Disease? *Drugs Aging* **2001**, *18* (12), 891–898. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118120-00001>.
- (95) Nordberg, A.; Ballard, C.; Bullock, R.; Darreh-Shori, T.; Somogyi, M. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Prim Care Companion CNS Disord* **2013**, *15* (2). <https://doi.org/10.4088/PCC.12r01412>.
- (96) Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C.; Yu, Q.-S.; Mamczarz, J.; Holloway, H. W.; Giordano, T.; Chen, D.; Furukawa, K.; Sambamurti, K.; Brossi, A.; Lahiri, D. K. Selective Butyrylcholinesterase Inhibition Elevates Brain Acetylcholine, Augments Learning and Lowers Alzheimer Beta-Amyloid Peptide in Rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (47), 17213–17218. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508575102>.
- (97) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-Beta-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron* **1996**, *16* (4), 881–891.
- (98) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Calderón, F. Acetylcholinesterase Is a Senile Plaque Component That Promotes Assembly of Amyloid Beta-Peptide into Alzheimer's Filaments. *Mol. Psychiatry* **1996**, *1* (5), 359–361.
- (99) Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. Beta-Amyloid Aggregation Induced by Human Acetylcholinesterase: Inhibition Studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65* (3), 407–416. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01514-9).
- (100) Kim, J.-H.; Lee, H.-W.; Hwang, J.; Kim, J.; Lee, M.-J.; Han, H.-S.; Lee, W.-H.; Suk, K. Microglia-Inhibiting Activity of Parkinson's Disease Drug Amantadine. *Neurobiology of Aging* **2012**, *33* (9), 2145–2159. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.011>.
- (101) Kotermanski, S. E.; Johnson, J. W. Mg²⁺ Imparts NMDA Receptor Subtype Selectivity to the Alzheimer's Drug Memantine. *J. Neurosci.* **2009**, *29* (9), 2774–2779. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3703-08.2009>.
- (102) Simoni, E.; Daniele, S.; Bottegoni, G.; Pizzirani, D.; Trincavelli, M. L.; Goldoni, L.; Tarozzo, G.; Reggiani, A.; Martini, C.; Piomelli, D.; Melchiorre, C.; Rosini, M.; Cavalli, A. Combining Galantamine and Memantine in Multitargeted, New Chemical Entities Potentially Useful in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 9708–9721. <https://doi.org/10.1021/jm3009458>.
- (103) Reggiani, A. M.; Simoni, E.; Caporaso, R.; Meunier, J.; Keller, E.; Maurice, T.; Minarini, A.; Rosini, M.; Cavalli, A. In Vivo Characterization of ARN14140, a

- Memantine/Galantamine-Based Multi-Target Compound for Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 33172. <https://doi.org/10.1038/srep33172>.
- (104) Chen, H. S.; Pellegrini, J. W.; Aggarwal, S. K.; Lei, S. Z.; Warach, S.; Jensen, F. E.; Lipton, S. A. Open-Channel Block of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Responses by Memantine: Therapeutic Advantage against NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **1992**, *12* (11), 4427–4436.
- (105) Reisberg, B.; Doody, R.; Stöffler, A.; Schmitt, F.; Ferris, S.; Möbius, H. J.; Memantine Study Group. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348* (14), 1333–1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>.
- (106) Cheung, J.; Rudolph, M. J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M. S.; Gary, E. N.; Love, J.; Franklin, M. C.; Height, J. J. Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (22), 10282–10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>.
- (107) Viayna, E.; Gómez, T.; Galdeano, C.; Ramírez, L.; Ratia, M.; Badia, A.; Clos, M. V.; Verdaguer, E.; Junyent, F.; Camins, A.; Pallàs, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Arce, M. P.; Rodríguez-Franco, M. I.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J.; Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. Novel Huprine Derivatives with Inhibitory Activity toward β -Amyloid Aggregation and Formation as Disease-Modifying Anti-Alzheimer Drug Candidates. *ChemMedChem* **2010**, *5* (11), 1855–1870. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000322>.
- (108) Wiesner, J.; Kriz, Z.; Kuca, K.; Jun, D.; Koca, J. Acetylcholinesterases--the Structural Similarities and Differences. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2007**, *22* (4), 417–424. <https://doi.org/10.1080/14756360701421294>.
- (109) Sepsova, V.; Karasova, J. Z.; Tobin, G.; Jun, D.; Korabecny, J.; Cabelova, P.; Janska, K.; Krusek, J.; Skrenkova, K.; Kuca, K.; Soukup, O. Cholinergic Properties of New 7-Methoxytacrine-Donepezil Derivatives. *Gen. Physiol. Biophys.* **2015**, *34* (2), 189–200. https://doi.org/10.4149/gpb_2014036.
- (110) Misik, J.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Cabelova, P.; Kassa, J. The Effects of Novel 7-MEOTA-Donepezil like Hybrids and N-Alkylated Tacrine Analogues in the Treatment of Quinuclidinyl Benzilate-Induced Behavioural Deficits in Rats Performing the Multiple T-Maze Test. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2015**, *159* (4), 547–553. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.006>.
- (111) Misik, J.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Kracmarova, A.; Kassa, J. Effects of Novel Tacrine-Related Cholinesterase Inhibitors in the Reversal of 3-Quinuclidinyl Benzilate-Induced Cognitive Deficit in Rats—Is There a Potential for Alzheimer's Disease Treatment? *Neuroscience Letters* **2016**, *612*, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.021>.
- (112) Mzik, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Voříšek, V.; Palička, V.; Kuca, K.; Zdarova Karasova, J. An HPLC-MS Method for the Quantification of New Acetylcholinesterase Inhibitor PC 48 (7-MEOTA-Donepezil like Compound) in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1020*, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.038>.
- (113) Kassa, J.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Tumova, M. The Evaluation of Prophylactic Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase in Soman-Poisoned Mice - a Comparison with Commonly Used Pyridostigmine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *115* (6), 571–576. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12269>.
- (114) Zdarova Karasova, J.; Mzik, M.; Hroch, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Vorisek, V.; Palicka, V.; Kuca, K. The New Acetylcholinesterase Inhibitors PC-37 and PC-48 (7-Methoxytacrine-Donepezil-Like Compounds): Characterization of Their Metabolites in Human Liver Microsomes, Pharmacokinetics and In Vivo Formation of the Major Metabolites in Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *122* (4), 373–382. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12922>.

- (115) Sharma, S.; Singh, N.; Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Satnami, M. L.; Ghosh, K. K. Interaction of Synthesized Nitrogen Enriched Graphene Quantum Dots with Novel Anti-Alzheimer's Drugs: Spectroscopic Insights. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2020**, *38* (6), 1822–1837. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1619625>.
- (116) Sharma, S.; Banjare, M. K.; Singh, N.; Korábečný, J.; Fišar, Z.; Kuča, K.; Ghosh, K. K. Exploring Spectroscopic Insights into Molecular Recognition of Potential Anti-Alzheimer's Drugs within the Hydrophobic Pockets of β -Cycloamylose. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *311*, 113269. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113269>.
- (117) Bubols, G. B.; Vianna, D. da R.; Medina-Reimon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R. M.; Eifler-Lima, V. L.; Garcia, S. C. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini Rev Med Chem* **2013**, *13* (3), 318–334. <https://doi.org/10.2174/138955713804999775>.
- (118) Jameel, E.; Umar, T.; Kumar, J.; Hoda, N. Coumarin: A Privileged Scaffold for the Design and Development of Antineurodegenerative Agents. *Chemical Biology & Drug Design* **2016**, *87* (1), 21–38. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12629>.
- (119) Sourgens, H.; Hoerr, R.; Biber, A.; Steinbrede, H.; Derendorf, H. KA 672-HCl, a Neuronal Activator Against Dementia: Tolerability, Safety, and Preliminary Pharmacokinetics after Single and Multiple Oral Doses in Healthy Male and Female Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology* **1998**, *38* (4), 373–381. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1998.tb04438.x>.
- (120) Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C. Memoquin: A Multi-Target-Directed Ligand as an Innovative Therapeutic Opportunity for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **2009**, *6* (1), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.10.042>.
- (121) Bolognesi, M. L.; Chiriano, G.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Bottegoni, G.; Maestri, V.; Czvilkovich, S.; Windisch, M.; Cavalli, A.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Melchiorre, C. Synthesis of Monomeric Derivatives to Probe Memoquin's Bivalent Interactions. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 8299–8304. <https://doi.org/10.1021/jm200691d>.
- (122) Frenkel-Pinter, M.; Tal, S.; Scherzer-Attali, R.; Abu-Hussien, M.; Alyagor, I.; Eisenbaum, T.; Gazit, E.; Segal, D. Cl-NQTrp Alleviates Tauopathy Symptoms in a Model Organism through the Inhibition of Tau Aggregation-Engendered Toxicity. *Neurodegener Dis* **2017**, *17* (2–3), 73–82. <https://doi.org/10.1159/000448518>.
- (123) Scherzer-Attali, R.; Pellarin, R.; Convertino, M.; Frydman-Marom, A.; Egoz-Matia, N.; Peled, S.; Levy-Sakin, M.; Shalev, D. E.; Caflish, A.; Gazit, E.; Segal, D. Complete Phenotypic Recovery of an Alzheimer's Disease Model by a Quinone-Tryptophan Hybrid Aggregation Inhibitor. *PLoS One* **2010**, *5* (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011101>.
- (124) Alisi, L.; Cao, R.; De Angelis, C.; Cafolla, A.; Caramia, F.; Cartocci, G.; Librando, A.; Fiorelli, M. The Relationships Between Vitamin K and Cognition: A Review of Current Evidence. *Front Neurol* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00239>.
- (125) Martin, S. B.; Cenini, G.; Barone, E.; Dowling, A. L. S.; Mancuso, C.; Butterfield, D. A.; Murphy, M. P.; Head, E. Coenzyme Q10 and Cognition in Atorvastatin Treated Dogs. *Neurosci Lett* **2011**, *501* (2), 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.06.054>.
- (126) Bolognesi, M. L.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Chiriano, G.; Ceccarini, L.; Rosini, M.; Milelli, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Melchiorre, C. Bis(7)-Tacrine Derivatives as Multitarget-Directed Ligands: Focus on Anticholinesterase and Anti-amyloid Activities. *ChemMedChem* **2010**, *5* (8), 1215–1220. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000086>.
- (127) Lü, J.-M.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J Cell Mol Med* **2010**, *14* (4), 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>.

- (128) Rosini, M.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M. L.; Hrelia, P.; Minarini, A.; Tarozzi, A.; Melchiorre, C. Rational Approach to Discover Multipotent Anti-Alzheimer Drugs. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (2), 360–363. <https://doi.org/10.1021/jm049112h>.
- (129) Wu, T.-W.; Hashimoto, N.; Au, J.-X.; Wu, J.; Mickle, D. A. G.; Carey, D. Trolox Protects Rat Hepatocytes against Oxyradical Damage and the Ischemic Rat Liver from Reperfusion Injury. *Hepatology* **1991**, *13* (3), 575–580. <https://doi.org/10.1002/hep.1840130328>.
- (130) Wiedemann, J.; Rashid, K.; Langmann, T. Resveratrol Induces Dynamic Changes to the Microglia Transcriptome, Inhibiting Inflammatory Pathways and Protecting against Microglia-Mediated Photoreceptor Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2018**, *501* (1), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.223>.
- (131) Moussa, C.; Hebron, M.; Huang, X.; Ahn, J.; Rissman, R. A.; Aisen, P. S.; Turner, R. S. Resveratrol Regulates Neuro-Inflammation and Induces Adaptive Immunity in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroinflammation* **2017**, *14* (1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0779-0>.
- (132) Bishayee, A.; Darvesh, A. S.; Politis, T.; McGory, R. Resveratrol and Liver Disease: From Bench to Bedside and Community. *Liver International* **2010**, *30* (8), 1103–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02295.x>.
- (133) Feng, Y.; Wang, X.; Yang, S.; Wang, Y.; Zhang, X.; Du, X.; Sun, X.; Zhao, M.; Huang, L.; Liu, R. Resveratrol Inhibits Beta-Amyloid Oligomeric Cytotoxicity but Does Not Prevent Oligomer Formation. *NeuroToxicology* **2009**, *30* (6), 986–995. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.08.013>.
- (134) Palomino, O.; Gómez-Serranillos, M. P.; Slowing, K.; Carretero, E.; Villar, A. Study of Polyphenols in Grape Berries by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *870* (1), 449–451. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01225-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01225-X).
- (135) Leyns, C. E. G.; Gratuze, M.; Narasimhan, S.; Jain, N.; Koscal, L. J.; Jiang, H.; Manis, M.; Colonna, M.; Lee, V. M. Y.; Ulrich, J. D.; Holtzman, D. M. TREM2 Function Impedes Tau Seeding in Neuritic Plaques. *Nature Neuroscience* **2019**, *22* (8), 1217–1222. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0433-0>.
- (136) Guo, L.-L.; Guan, Z.-Z.; Huang, Y.; Wang, Y.-L.; Shi, J.-S. The Neurotoxicity of β -Amyloid Peptide toward Rat Brain Is Associated with Enhanced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis, All of Which Can Be Attenuated by Scutellarin. *Experimental and Toxicologic Pathology* **2013**, *65* (5), 579–584. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2012.05.003>.
- (137) Ghosh, N.; Ghosh, R.; Bhat, Z. A.; Mandal, V.; Bachar, S. C.; Nima, N. D.; Sunday, O. O.; Mandal, S. C. Advances in Herbal Medicine for Treatment of Ischemic Brain Injury. *Natural Product Communications* **2014**, *9* (7), 1934578X1400900739. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900739>.
- (138) Hong, H.; Liu, G.-Q. Protection against Hydrogen Peroxide-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells by Scutellarin. *Life Sciences* **2004**, *74* (24), 2959–2973. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.074>.
- (139) Chen, X.; Cui, L.; Duan, X.; Ma, B.; Zhong, D. Pharmacokinetics and Metabolism of the Flavonoid Scutellarin in Humans After a Single Oral Administration. *Drug Metab Dispos* **2006**, *34* (8), 1345–1352. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.009779>.
- (140) Sang, Z.; Li, Y.; Qiang, X.; Xiao, G.; Liu, Q.; Tan, Z.; Deng, Y. Multifunctional Scutellarin–rivastigmine Hybrids with Cholinergic, Antioxidant, Biometal Chelating and Neuroprotective Properties for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (4), 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.005>.

- (141) Li, C.; Lin, G.; Zuo, Z. Pharmacological Effects and Pharmacokinetics Properties of Radix Scutellariae and Its Bioactive Flavones. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **2011**, *32* (8), 427–445. <https://doi.org/10.1002/bdd.771>.
- (142) Nakajima, A.; Ohizumi, Y.; Yamada, K. Anti-Dementia Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid: A Review of Animal Studies. *Clin Psychopharmacol Neurosci* **2014**, *12* (2), 75–82. <https://doi.org/10.9758/cpn.2014.12.2.75>.
- (143) Foti, M. C. Antioxidant Properties of Phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2007**, *59* (12), 1673–1685. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0010>.
- (144) Recanatini, M.; Cavalli, A.; Hansch, C. A Comparative QSAR Analysis of Acetylcholinesterase Inhibitors Currently Studied for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Chem. Biol. Interact.* **1997**, *105* (3), 199–228. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00047-1](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00047-1).
- (145) Iqbal, J.; Zaib, S.; Saeed, A.; Muddassar, M. Biological Evaluation of Halogenated Thioureas as Cholinesterases Inhibitors Against Alzheimer's Disease & Molecular Modeling Studies. *Letters in Drug Design & Discovery* **2015**, *12* (6), 488–494.
- (146) Paula Lima, A. C.; Arriagada, C.; Toro, R.; Cárdenas, A. M.; Caviedes, R.; Ferreira, S. T.; Caviedes, P. Small-Molecule Aggregation Inhibitors Reduce Excess Amyloid in a Trisomy 16 Mouse Cortical Cell Line. *Biol. Res.* **2008**, *41* (2), 129–136. <https://doi.org/S0716-97602008000200001>.
- (147) Mistry, S. N.; Valant, C.; Sexton, P. M.; Capuano, B.; Christopoulos, A.; Scammells, P. J. Synthesis and Pharmacological Profiling of Analogues of Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Allosteric Modulators of the M1 Muscarinic Receptor. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (12), 5151–5172. <https://doi.org/10.1021/jm400540b>.
- (148) Ma, L.; Seager, M. A.; Wittmann, M.; Jacobson, M.; Bickel, D.; Burno, M.; Jones, K.; Graufelds, V. K.; Xu, G.; Pearson, M.; McCampbell, A.; Gaspar, R.; Shughrue, P.; Danziger, A.; Regan, C.; Flick, R.; Pascarella, D.; Garson, S.; Doran, S.; Kreatsoulas, C.; Veng, L.; Lindsley, C. W.; Shipe, W.; Kuduk, S.; Sur, C.; Kinney, G.; Seabrook, G. R.; Ray, W. J. Selective Activation of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Achieved by Allosteric Potentiation. *PNAS* **2009**, *106* (37), 15950–15955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900903106>.
- (149) Fisher, A.; Michaelson, D. M.; Brandeis, R.; Haring, R.; Chapman, S.; Pittel, Z. M1 Muscarinic Agonists as Potential Disease-Modifying Agents in Alzheimer's Disease: Rationale and Perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *920*, 315–320.
- (150) Levey, A. I.; Kitt, C. A.; Simonds, W. F.; Price, D. L.; Brann, M. R. Identification and Localization of Muscarinic Acetylcholine Receptor Proteins in Brain with Subtype-Specific Antibodies. *Journal of Neuroscience* **1991**, *11* (10), 3218–3226. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-10-03218.1991>.
- (151) Fisher, A. M1 Muscarinic Agonists Target Major Hallmarks of Alzheimer's Disease – The Pivotal Role of Brain M1 Receptors. *NDD* **2008**, *5* (3–4), 237–240. <https://doi.org/10.1159/000113712>.
- (152) Davis, A. A.; Fritz, J. J.; Wess, J.; Lah, J. J.; Levey, A. I. Deletion of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptors Increases Amyloid Pathology In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (12), 4190–4196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6393-09.2010>.
- (153) Nunan, J.; Small, D. H. Regulation of APP Cleavage by α -, β - and γ -Secretases. *FEBS Letters* **2000**, *483* (1), 6–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02076-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02076-7).
- (154) Jeffrey Conn, P.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W. Allosteric Modulators of GPCRs: A Novel Approach for the Treatment of CNS Disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8* (1), 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrd2760>.
- (155) Moran, S. P.; Maksymetz, J.; Conn, P. J. Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* **2019**, *40* (12), 1006–1020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.10.007>.

- (156) Shirey, J. K.; Brady, A. E.; Jones, P. J.; Davis, A. A.; Bridges, T. M.; Kennedy, J. P.; Jadhav, S. B.; Menon, U. N.; Xiang, Z.; Watson, M. L.; Christian, E. P.; Doherty, J. J.; Quirk, M. C.; Snyder, D. H.; Lah, J. J.; Levey, A. I.; Nicolle, M. M.; Lindsley, C. W.; Conn, P. J. A Selective Allosteric Potentiator of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Increases Activity of Medial Prefrontal Cortical Neurons and Restores Impairments in Reversal Learning. *J. Neurosci.* **2009**, *29* (45), 14271–14286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3930-09.2009>.
- (157) Fang, L.; Jumpertz, S.; Zhang, Y.; Appenroth, D.; Fleck, C.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Decker, M. Hybrid Molecules from Xanomeline and Tacrine: Enhanced Tacrine Actions on Cholinesterases and Muscarinic M1 Receptors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2094–2103. <https://doi.org/10.1021/jm901616h>.
- (158) Bymaster, F. P.; Carter, P. A.; Yamada, M.; Gomeza, J.; Wess, J.; Hamilton, S. E.; Nathanson, N. M.; McKinzie, D. L.; Felder, C. C. Role of Specific Muscarinic Receptor Subtypes in Cholinergic Parasympathomimetic Responses, in Vivo Phosphoinositide Hydrolysis, and Pilocarpine-Induced Seizure Activity. *European Journal of Neuroscience* **2003**, *17* (7), 1403–1410. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02588.x>.
- (159) Wess, J. Allosteric Binding Sites on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* **2005**, *68* (6), 1506–1509. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019141>.
- (160) Perry, E. K.; Smith, C. J.; Court, J. A.; Bonham, J. R.; Rodway, M.; Atack, J. R. Interaction of 9-Amino-1,2,3,4-Tetrahydroaminoacridine (THA) with Human Cortical Nicotinic and Muscarinic Receptor Binding in Vitro. *Neuroscience Letters* **1988**, *91* (2), 211–216. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90770-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90770-7).
- (161) Porter, R. J.; Lunn, B. S.; Walker, L. L. M.; Gray, J. M.; Ballard, C. G.; O'Brien, J. T. Cognitive Deficit Induced by Acute Tryptophan Depletion in Patients With Alzheimer's Disease. *AJP* **2000**, *157* (4), 638–640. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.4.638>.
- (162) Jenkins, T. A.; Elliott, J. J.; Ardis, T. C.; Cahir, M.; Reynolds, G. P.; Bell, R.; Cooper, S. J. Tryptophan Depletion Impairs Object-Recognition Memory in the Rat: Reversal by Risperidone. *Behavioural Brain Research* **2010**, *208* (2), 479–483. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.030>.
- (163) Scherzer-Attali, R.; Shaltiel-Karyo, R.; Adalist, Y. H.; Segal, D.; Gazit, E. Generic Inhibition of Amyloidogenic Proteins by Two Naphthoquinone–tryptophan Hybrid Molecules. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2012**, *80* (8), 1962–1973. <https://doi.org/10.1002/prot.24080>.
- (164) Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Leon, J.; Czarnocki, Z. Melatonin as an Antioxidant: Biochemical Mechanisms and Pathophysiological Implications in Humans. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50* (4), 1129–1146. <https://doi.org/0350041129>.
- (165) Zhao, D.; Yu, Y.; Shen, Y.; Liu, Q.; Zhao, Z.; Sharma, R.; Reiter, R. J. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00249>.
- (166) Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel Tacrine-Melatonin Hybrids as Dual-Acting Drugs for Alzheimer Disease, with Improved Acetylcholinesterase Inhibitory and Antioxidant Properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 459–462. <https://doi.org/10.1021/jm050746d>.
- (167) Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; González-Muñoz, G. C.; Usán, P.; García-Palomero, E.; López, M. G.; Villarroja, M.; García, A. G.; Martínez, A.; Rodríguez-Franco, M. I. Tacrine–Melatonin Hybrids as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and Neuroprotective Properties. *ChemMedChem* **2009**, *4* (5), 828–841. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800414>.
- (168) Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo Californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis5-Tacrine

- Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (18), 5491–5500. <https://doi.org/10.1021/jm060164b>.
- (169) Taylor, P.; Lwebuga Mukasa, J.; Lappi, S.; Rademacher, J. Propidium: A Fluorescence Probe for a Peripheral Anionic Site on Acetylcholinesterase. *Molecular Pharmacology* **1974**, *10* (4), 703–708.
- (170) Nunes-Tavares, N.; Nery da Matta, A.; Batista e Silva, C. M.; Araújo, G. M. N.; Louro, S. R. W.; Hassón-Voloch, A. Inhibition of Acetylcholinesterase from *Electrophorus Electricus* (L.) by Tricyclic Antidepressants. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2002**, *34* (9), 1071–1079. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00027-4).
- (171) Jiménez-Jiménez, F. J.; Alonso-Navarro, H.; Herrero, M. T.; García-Martín, E.; Agúndez, J. A. G. An Update on the Role of Nitric Oxide in the Neurodegenerative Processes of Parkinson's Disease. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23* (24), 2666–2679. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160812151356>.
- (172) Volbracht, C.; Beek, J. V.; Zhu, C.; Blomgren, K.; Leist, M. Neuroprotective Properties of Memantine in Different in Vitro and in Vivo Models of Excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience* **2006**, *23* (10), 2611–2622. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04787.x>.
- (173) Mžik, M.; Žďárová-Karasová, J.; Chalupová, K.; Korábečný, J.; Palička, V.; Šesták, V. UHPLC-HRMS Study of Anti-Alzheimer's Drug Candidates: Metabolism of 7-MEOTA-Tryptophan Hybrids Hampers Their Passage into Brain. *J Pharm Biomed Anal* **2019**, *174*, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.051>.
- (174) Chauhan, P.; Mahajan, S.; Kaya, U.; Hack, D.; Enders, D. Bifunctional Amine-Squaramides: Powerful Hydrogen-Bonding Organocatalysts for Asymmetric Domino/Cascade Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2015**, *357* (2–3), 253–281. <https://doi.org/10.1002/adsc.201401003>.
- (175) Zhao, B.-L.; Li, J.-H.; Du, D.-M. Squaramide-Catalyzed Asymmetric Reactions. *The Chemical Record* **2017**, *17* (10), 994–1018. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600140>.
- (176) Brandt, M. R.; Cummons, T. A.; Potestio, L.; Sukoff, S. J.; Rosenzweig-Lipson, S. Effects of the N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antagonist Perzinfotel [EAA-090; [2-(8,9-Dioxo-2,6-Diazabicyclo[5.2.0]Non-1(7)-En-2-Yl)-Ethyl]Phosphonic Acid] on Chemically Induced Thermal Hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *313* (3), 1379–1386. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084467>.
- (177) Dwyer, M. P.; Yu, Y.; Chao, J.; Aki, C.; Chao, J.; Biju, P.; Girijavallabhan, V.; Rindgen, D.; Bond, R.; Mayer-Ezel, R.; Jakway, J.; Hipkin, R. W.; Fossetta, J.; Gonsiorek, W.; Bian, H.; Fan, X.; Terminelli, C.; Fine, J.; Lundell, D.; Merritt, J. R.; Rokosz, L. L.; Kaiser, B.; Li, G.; Wang, W.; Stauffer, T.; Ozgur, L.; Baldwin, J.; Taveras, A. G. Discovery of 2-Hydroxy-N,N-Dimethyl-3-{2-[(R)-1-(5-Methylfuran-2-Yl)Propyl]Amino}-3,4-Dioxocyclobut-1-Enylamino}benzamide (SCH 527123): A Potent, Orally Bioavailable CXCR2/CXCR1 Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7603–7606. <https://doi.org/10.1021/jm0609622>.
- (178) Jaeger, K.; Bruenle, S.; Weinert, T.; Guba, W.; Muehle, J.; Miyazaki, T.; Weber, M.; Furrer, A.; Haenggi, N.; Tetaz, T.; Huang, C.-Y.; Mattle, D.; Vonach, J.-M.; Gast, A.; Kuglstatler, A.; Rudolph, M. G.; Nogly, P.; Benz, J.; Dawson, R. J. P.; Standfuss, J. Structural Basis for Allosteric Ligand Recognition in the Human CC Chemokine Receptor 7. *Cell* **2019**, *178* (5), 1222–1230.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.028>.
- (179) Storer, R. I.; Aciro, C.; Jones, L. H. Squaramides: Physical Properties, Synthesis and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2330–2346. <https://doi.org/10.1039/C0CS00200C>.
- (180) Dvir, H.; Wong, D. M.; Harel, M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D.; Camps, P.; Rosenberry, T. L.; Silman, I.; Sussman, J. L. 3D Structure of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Complexed with Huprine X at 2.1 Å Resolution: Kinetic

- and Molecular Dynamic Correlates. *Biochemistry* **2002**, *41* (9), 2970–2981. <https://doi.org/10.1021/bi011652i>.
- (181) Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y.-P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. Structure of Acetylcholinesterase Complexed with the Nootropic Alkaloid, (–)-Huperzine A. *Nature Structural Biology* **1997**, *4* (1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nsb0197-57>.
- (182) Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Quaternary Ligand Binding to Aromatic Residues in the Active-Site Gorge of Acetylcholinesterase. *PNAS* **1993**, *90* (19), 9031–9035. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9031>.
- (183) Muñoz-Torrero, D.; Camps, P. Huprines for Alzheimer’s Disease Drug Development. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2008**, *3* (1), 65–81. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.1.65>.
- (184) Tun, M. K. M.; Herzon, S. B. The Pharmacology and Therapeutic Potential of (–)-Huperzine A. *J Exp Pharmacol* **2012**, *4*, 113–123. <https://doi.org/10.2147/JEP.S27084>.
- (185) Camps, P.; El Achab, R.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. New Tacrine–Huperzine A Hybrids (Huprines): Highly Potent Tight-Binding Acetylcholinesterase Inhibitors of Interest for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (24), 4657–4666. <https://doi.org/10.1021/jm000980y>.
- (186) Benhamú, B.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M. L. Serotonin 5-HT₆ Receptor Antagonists for the Treatment of Cognitive Deficiency in Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (17), 7160–7181. <https://doi.org/10.1021/jm5003952>.
- (187) Rodríguez, J. J.; Noristani, H. N.; Verkhatsky, A. The Serotonergic System in Ageing and Alzheimer’s Disease. *Prog. Neurobiol.* **2012**, *99* (1), 15–41. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.010>.
- (188) Upton, N.; Chuang, T. T.; Hunter, A. J.; Virley, D. J. 5-HT₆ Receptor Antagonists as Novel Cognitive Enhancing Agents for Alzheimer’s Disease. *Neurotherapeutics* **2008**, *5* (3), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.05.008>.
- (189) Ramírez, M. J. 5-HT₆ Receptors and Alzheimer’s Disease. *Alzheimers Res Ther* **2013**, *5* (2), 15. <https://doi.org/10.1186/alzrt169>.
- (190) Foley, A. G.; Hirst, W. D.; Gallagher, H. C.; Barry, C.; Hagan, J. J.; Upton, N.; Walsh, F. S.; Hunter, A. J.; Regan, C. M. The Selective 5-HT₆ Receptor Antagonists SB-271046 and SB-399885 Potentiate NCAM PSA Immunolabeling of Dentate Granule Cells, but Not Neurogenesis, in the Hippocampal Formation of Mature Wistar Rats. *Neuropharmacology* **2008**, *54* (8), 1166–1174. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.03.012>.
- (191) Routledge, C.; Bromidge, S. M.; Moss, S. F.; Price, G. W.; Hirst, W.; Newman, H.; Riley, G.; Gager, T.; Stean, T.; Upton, N.; Clarke, S. E.; Brown, A. M.; Middlemiss, D. N. Characterization of SB-271046: A Potent, Selective and Orally Active 5-HT₆ Receptor Antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130* (7), 1606–1612. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703457>.
- (192) Maher-Edwards, G.; Dixon, R.; Hunter, J.; Gold, M.; Hopton, G.; Jacobs, G.; Hunter, J.; Williams, P. SB-742457 and Donepezil in Alzheimer Disease: A Randomized, Placebo-Controlled Study. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **2011**, *26* (5), 536–544. <https://doi.org/10.1002/gps.2562>.
- (193) Maher-Edwards, G.; Watson, C.; Ascher, J.; Barnett, C.; Boswell, D.; Davies, J.; Fernandez, M.; Kurz, A.; Zanetti, O.; Safirstein, B.; Schronen, J. P.; Zvartau-Hind, M.; Gold, M. Two Randomized Controlled Trials of SB742457 in Mild-to-Moderate Alzheimer’s Disease. *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* **2015**, *1* (1), 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2015.04.001>.

- (194) Calhoun, A.; Ko, J.; Grossberg, G. T. Emerging Chemical Therapies Targeting 5-Hydroxytryptamine in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **2017**, *22* (1), 101–105. <https://doi.org/10.1080/14728214.2017.1293651>.
- (195) Więckowska, A.; Kończakowski, M.; Bucki, A.; Godyń, J.; Marcinkowska, M.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Siwek, A.; Kazek, G.; Głuch-Lutwin, M.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Knez, D.; Wichur, T.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease: Combining Cholinesterase Inhibitors and 5-HT₆ Receptor Antagonists. Design, Synthesis and Biological Evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.016>.
- (196) Lipinski, C. A. Rule of Five in 2015 and beyond: Target and Ligand Structural Limitations, Ligand Chemistry Structure and Drug Discovery Project Decisions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *101*, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.029>.
- (197) Kończakowski, M.; Marcinkowska, M.; Bucki, A.; Śniecikowska, J.; Pawłowski, M.; Kazek, G.; Siwek, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Partyka, A.; Wasik, A.; Wesołowska, A.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P. Novel 5-HT₆ Receptor Antagonists/D₂ Receptor Partial Agonists Targeting Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *Eur J Med Chem* **2015**, *92*, 221–235. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.045>.
- (198) Singer, J. M.; Wilson, M. W.; Johnson, P. D.; Graham, S. R.; Cooke, L. W.; Roof, R. L.; Boxer, P. A.; Gold, L. H.; Meltzer, L. T.; Janssen, A.; Roush, N.; Campbell, J. E.; Su, T.-Z.; Hurst, S. I.; Stoner, C. L.; Schwarz, J. B. Synthesis and SAR of Tolyamine 5-HT₆ Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (9), 2409–2412. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.077>.
- (199) Esbenshade, T. A.; Browman, K. E.; Bitner, R. S.; Strakhova, M.; Cowart, M. D.; Brioni, J. D. The Histamine H₃ Receptor: An Attractive Target for the Treatment of Cognitive Disorders. *Br J Pharmacol* **2008**, *154* (6), 1166–1181. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.147>.
- (200) Schwartz, J.-C. The Histamine H₃ Receptor: From Discovery to Clinical Trials with Pitolisant. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163* (4), 713–721. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01286.x>.
- (201) Sadek, B.; Saad, A.; Sadeq, A.; Jalal, F.; Stark, H. Histamine H₃ Receptor as a Potential Target for Cognitive Symptoms in Neuropsychiatric Diseases. *Behav. Brain Res.* **2016**, *312*, 415–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.051>.
- (202) Cho, W.; Maruff, P.; Connell, J.; Gargano, C.; Calder, N.; Doran, S.; Fox-Bosetti, S.; Hassan, A.; Renger, J.; Herman, G.; Lines, C.; Verma, A. Additive Effects of a Cholinesterase Inhibitor and a Histamine Inverse Agonist on Scopolamine Deficits in Humans. *Psychopharmacology* **2011**, *218* (3), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2344-y>.
- (203) Khan, N.; Saad, A.; Nurulain, S. M.; Darras, F. H.; Decker, M.; Sadek, B. The Dual-Acting H₃ Receptor Antagonist and AChE Inhibitor UW-MD-71 Dose-Dependently Enhances Memory Retrieval and Reverses Dizocilpine-Induced Memory Impairment in Rats. *Behavioural Brain Research SreeTestContent1* **2016**, *297*, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.022>.
- (204) Kuder, K.; Łażewska, D.; Latacz, G.; Schwed, J. S.; Karcz, T.; Stark, H.; Karolak-Wojciechowska, J.; Kieć-Kononowicz, K. Chlorophenoxy Aminoalkyl Derivatives as Histamine H₃R Ligands and Antiseizure Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, *24* (2), 53–72. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.021>.
- (205) Huang, W.; Tang, L.; Shi, Y.; Huang, S.; Xu, L.; Sheng, R.; Wu, P.; Li, J.; Zhou, N.; Hu, Y. Searching for the Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease: Discovery of Quinoxaline-Based Hybrid Compounds with AChE, H₃R and BACE 1 Inhibitory

- Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (23), 7158–7167. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.061>.
- (206) Cherny, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Volitakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.-S.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Treatment with a Copper-Zinc Chelator Markedly and Rapidly Inhibits β -Amyloid Accumulation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Neuron* **2001**, *30* (3), 665–676. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00317-8).
- (207) Andersson, D. A.; Gentry, C.; Moss, S.; Bevan, S. Cloquinol and Pyrithione Activate TRPA1 by Increasing Intracellular Zn²⁺. *PNAS* **2009**, *106* (20), 8374–8379. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812675106>.
- (208) Crouch, P. J.; Savva, M. S.; Hung, L. W.; Donnelly, P. S.; Mot, A. I.; Parker, S. J.; Greenough, M. A.; Volitakis, I.; Adlard, P. A.; Cherny, R. A.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J.; White, A. R. The Alzheimer's Therapeutic PBT2 Promotes Amyloid- β Degradation and GSK3 Phosphorylation via a Metal Chaperone Activity. *J. Neurochem.* **2011**, *119* (1), 220–230. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07402.x>.
- (209) Duce, J. A.; Bush, A. I. Biological Metals and Alzheimer's Disease: Implications for Therapeutics and Diagnostics. *Progress in Neurobiology* **2010**, *92* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.003>.
- (210) Ryan, T. M.; Roberts, B. R.; McColl, G.; Hare, D. J.; Doble, P. A.; Li, Q.-X.; Lind, M.; Roberts, A. M.; Mertens, H. D. T.; Kirby, N.; Pham, C. L. L.; Hinds, M. G.; Adlard, P. A.; Barnham, K. J.; Curtain, C. C.; Masters, C. L. Stabilization of Nontoxic A β -Oligomers: Insights into the Mechanism of Action of Hydroxyquinolines in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2015**, *35* (7), 2871–2884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2912-14.2015>.
- (211) Ferrada, E.; Arancibia, V.; Loeb, B.; Norambuena, E.; Olea-Azar, C.; Huidobro-Toro, J. P. Stoichiometry and Conditional Stability Constants of Cu(II) or Zn(II) Cloquinol Complexes; Implications for Alzheimer's and Huntington's Disease Therapy. *Neurotoxicology* **2007**, *28* (3), 445–449. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.02.004>.
- (212) Guzior, N.; Bajda, M.; Skrok, M.; Kurpiewska, K.; Lewiński, K.; Brus, B.; Pišlar, A.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Development of Multifunctional, Heterodimeric Isoindoline-1,3-Dione Derivatives as Cholinesterase and β -Amyloid Aggregation Inhibitors with Neuroprotective Properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *92*, 738–749. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.027>.
- (213) Szałaj, N.; Bajda, M.; Dudek, K.; Brus, B.; Gobec, S.; Malawska, B. Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and β -Amyloid: Synthesis, Biological Evaluation of Heterodimeric Compounds with Benzylamine Pharmacophore. *Archiv der Pharmazie* **2015**, *348* (8), 556–563. <https://doi.org/10.1002/ardp.201500117>.
- (214) Mohamed, T.; Yeung, J. C. K.; Vasefi, M. S.; Beazely, M. A.; Rao, P. P. N. Development and Evaluation of Multifunctional Agents for Potential Treatment of Alzheimer's Disease: Application to a Pyrimidine-2,4-Diamine Template. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (14), 4707–4712. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.077>.
- (215) Laras, Y.; Garino, C.; Dessolin, J.; Weck, C.; Moret, V.; Rolland, A.; Kraus, J.-L. New N4-Substituted Piperazine Naphthamide Derivatives as BACE-1 Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (1), 181–187. <https://doi.org/10.1080/14756360802048939>.
- (216) Ghosh, A. K.; Osswald, H. L. BACE1 (β -Secretase) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (19), 6765–6813. <https://doi.org/10.1039/C3CS60460H>.
- (217) Shaik, J. B.; Palaka, B. K.; Penumala, M.; Kotapati, K. V.; Devineni, S. R.; Eadlapalli, S.; Darla, M. M.; Ampasala, D. R.; Vadde, R.; Amooru, G. D. Synthesis, Pharmacological Assessment, Molecular Modeling and in Silico Studies of Fused Tricyclic Coumarin

- Derivatives as a New Family of Multifunctional Anti-Alzheimer Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *107*, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.046>.
- (218) Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of Acetylcholinesterase Complexed with E2020 (Aricept): Implications for the Design of New Anti-Alzheimer Drugs. *Structure* **1999**, *7* (3), 297–307. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80040-9).
- (219) Rueeger, H.; Lueoend, R.; Rogel, O.; Rondeau, J.-M.; Möbitz, H.; Machauer, R.; Jacobson, L.; Staufenbiel, M.; Desrayaud, S.; Neumann, U. Discovery of Cyclic Sulfone Hydroxyethylamines as Potent and Selective β -Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Inhibitors: Structure-Based Design and in Vivo Reduction of Amyloid β -Peptides. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (7), 3364–3386. <https://doi.org/10.1021/jm300069y>.
- (220) Hong, L.; Koelsch, G.; Lin, X.; Wu, S.; Terzyan, S.; Ghosh, A. K.; Zhang, X. C.; Tang, J. Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 (Beta-Secretase) Complexed with Inhibitor. *Science* **2000**, *290* (5489), 150–153. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.150>.
- (221) Bajda, M.; Filipek, S. Computational Approach for the Assessment of Inhibitory Potency against Beta-Amyloid Aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27* (2), 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.072>.
- (222) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23* (1), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- (223) Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Crystal Structures of Human Cholinesterases in Complex with Huprine W and Tacrine: Elements of Specificity for Anti-Alzheimer's Drugs Targeting Acetyl- and Butyryl-Cholinesterase. *Biochem. J.* **2013**, *453* (3), 393–399. <https://doi.org/10.1042/BJ20130013>.
- (224) Fuse, S.; Matsumura, K.; Fujita, Y.; Sugimoto, H.; Takahashi, T. Development of Dual Targeting Inhibitors against Aggregations of Amyloid- β and Tau Protein. *Eur J Med Chem* **2014**, *85*, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.095>.
- (225) Pérez-Areales, F. J.; Di Pietro, O.; Espargaró, A.; Vallverdú-Queralt, A.; Galdeano, C.; Ragusa, I. M.; Viayna, E.; Guillou, C.; Clos, M. V.; Pérez, B.; Sabaté, R.; Lamuela-Raventós, R. M.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D. Shogaol–huprine Hybrids: Dual Antioxidant and Anticholinesterase Agents with β -Amyloid and Tau Anti-Aggregating Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (19), 5298–5307. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.053>.
- (226) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- (227) Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. From Protein Domains to Drug Candidates—Natural Products as Guiding Principles in the Design and Synthesis of Compound Libraries. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (16), 2878–2890. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020816\)41:16<2878::AID-ANIE2878>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020816)41:16<2878::AID-ANIE2878>3.0.CO;2-B).
- (228) Kellenberger, E.; Hofmann, A.; Quinn, R. J. Similar Interactions of Natural Products with Biosynthetic Enzymes and Therapeutic Targets Could Explain Why Nature Produces Such a Large Proportion of Existing Drugs. *Nat Prod Rep* **2011**, *28* (9), 1483–1492. <https://doi.org/10.1039/c1np00026h>.
- (229) Rodrigues, T.; Reker, D.; Schneider, P.; Schneider, G. Counting on Natural Products for Drug Design. *Nature Chemistry* **2016**, *8* (6), 531–541. <https://doi.org/10.1038/nchem.2479>.

- (230) Yao, H.; Liu, J.; Xu, S.; Zhu, Z.; Xu, J. The Structural Modification of Natural Products for Novel Drug Discovery. *Expert Opin Drug Discov* **2017**, *12* (2), 121–140. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1272757>.
- (231) Guo, Z. The Modification of Natural Products for Medical Use. *Acta Pharm Sin B* **2017**, *7* (2), 119–136. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.003>.
- (232) Tzvetkov, N. T.; Atanasov, A. G. Natural Product-Based Multitargeted Ligands for Alzheimer's Disease Treatment? *Future Medicinal Chemistry* **2018**, *10* (15), 1745–1748. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0146>.
- (233) Wang, X.; Sun, G.; Feng, T.; Zhang, J.; Huang, X.; Wang, T.; Xie, Z.; Chu, X.; Yang, J.; Wang, H.; Chang, S.; Gong, Y.; Ruan, L.; Zhang, G.; Yan, S.; Lian, W.; Du, C.; Yang, D.; Zhang, Q.; Lin, F.; Liu, J.; Zhang, H.; Ge, C.; Xiao, S.; Ding, J.; Geng, M. Sodium Oligomannate Therapeutically Remodels Gut Microbiota and Suppresses Gut Bacterial Amino Acids-Shaped Neuroinflammation to Inhibit Alzheimer's Disease Progression. *Cell Research* **2019**, *29* (10), 787–803. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0216-x>.
- (234) Cahlíková, L.; Hulová, L.; Hrabínová, M.; Chlebek, J.; Hošťálková, A.; Adamcová, M.; Šafratová, M.; Jun, D.; Opletal, L.; Ločárek, M.; Macáková, K. Isoquinoline Alkaloids as Prolyl Oligopeptidase Inhibitors. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.04.004>.
- (235) Chlebek, J.; Macáková, K.; Cahlíkovi, L.; Kurfürst, M.; Kunes, J.; Opletal, L. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis Cava* (Fumariaceae). *Nat Prod Commun* **2011**, *6* (5), 607–610.
- (236) Radic, Z.; Pickering, N. A.; Vellom, D. C.; Camp, S.; Taylor, P. Three Distinct Domains in the Cholinesterase Molecule Confer Selectivity for Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Biochemistry* **1993**, *32* (45), 12074–12084. <https://doi.org/10.1021/bi00096a018>.
- (237) Laitinen, K. S. M.; van Groen, T.; Tanila, H.; Venäläinen, J.; Männistö, P. T.; Alafuzoff, I. Brain Prolyl Oligopeptidase Activity Is Associated with Neuronal Damage Rather than β -Amyloid Accumulation. *NeuroReport* **2001**, *12* (15), 3309–3312.
- (238) Nechepurenko, I. V.; Boyarskikh, U. A.; Komarova, N. I.; Polovinka, M. P.; Filipenko, M. L.; Lifshits, G. I.; Salakhutdinov, N. F.; Tolstikov, G. A. LDLR Up-Regulatory Activity of Berberine and Its Bromo and Iodo Derivatives in Human Liver HepG2 Cells. *Dokl Chem* **2011**, *439* (1), 204. <https://doi.org/10.1134/S0012500811070093>.
- (239) Singh, I. P.; Mahajan, S. Berberine and Its Derivatives: A Patent Review (2009 – 2012). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2013**, *23* (2), 215–231. <https://doi.org/10.1517/13543776.2013.746314>.
- (240) Ahmed, T.; Gilani, A.-H.; Abdollahi, M.; Daglia, M.; Nabavi, S. F.; Nabavi, S. M. Berberine and Neurodegeneration: A Review of Literature. *Pharmacological Reports* **2015**, *67* (5), 970–979. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.002>.
- (241) Huang, M.; Jiang, X.; Liang, Y.; Liu, Q.; Chen, S.; Guo, Y. Berberine Improves Cognitive Impairment by Promoting Autophagic Clearance and Inhibiting Production of β -Amyloid in APP/Tau/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Experimental Gerontology* **2017**, *91*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.02.004>.
- (242) Hille, B.; Dickson, E.; Kruse, M.; Falkenburger, B. Chapter Ten - Dynamic Metabolic Control of an Ion Channel. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Blackwell, K. T., Ed.; Computational Neuroscience; Academic Press, 2014; Vol. 123, pp 219–247. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397897-4.00008-5>.
- (243) Xiao, D.; Liu, Z.; Zhang, S.; Zhou, M.; He, F.; Zou, M.; Peng, J.; Xie, X.; Liu, Y.; Peng, D. Berberine Derivatives with Different Pharmacological Activities via Structural Modifications. *Mini Rev Med Chem* **2018**, *18* (17), 1424–1441. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170321103139>.
- (244) Shan, W.-J.; Huang, L.; Zhou, Q.; Meng, F.-C.; Li, X.-S. Synthesis, Biological Evaluation of 9-N-Substituted Berberine Derivatives as Multi-Functional Agents of Antioxidant,

- Inhibitors of Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Amyloid- β Aggregation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46* (12), 5885–5893. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.051>.
- (245) Li, X.; Song, D.; Leng, S. X. Link between Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: From Epidemiology to Mechanism and Treatment. *Clin Interv Aging* **2015**, *10*, 549–560. <https://doi.org/10.2147/CIA.S74042>.
- (246) Wang, Y.; Zidichouski, J. A. Update on the Benefits and Mechanisms of Action of the Bioactive Vegetal Alkaloid Berberine on Lipid Metabolism and Homeostasis <https://www.hindawi.com/journals/cholesterol/2018/7173920/> (accessed Jul 29, 2020). <https://doi.org/10.1155/2018/7173920>.
- (247) Kivipelto, M.; Solomon, A. Cholesterol as a Risk Factor for Alzheimer's Disease - Epidemiological Evidence. *Acta Neurol. Scand., Suppl.* **2006**, *185*, 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00685.x>.
- (248) Pongkittiphon, V.; Chavasiri, W.; Supabphol, R. Antioxidant Effect of Berberine and Its Phenolic Derivatives Against Human Fibrosarcoma Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2015**, *16* (13), 5371–5376. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.13.5371>.
- (249) Dey, A.; Mukherjee, A. Chapter 6 - Plant-Derived Alkaloids: A Promising Window for Neuroprotective Drug Discovery. In *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products*; Brahmachari, G., Ed.; Natural Product Drug Discovery; Elsevier, 2018; pp 237–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809593-5.00006-9>.
- (250) Pellegrino, S.; Meyer, M.; Zorbas, C.; Bouchta, S. A.; Saraf, K.; Pelly, S. C.; Yusupova, G.; Evidente, A.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Lafontaine, D. L. J.; Yusupov, M. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **2018**, *26* (3), 416–425.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.009>.
- (251) Cedrón, J. C.; Ravelo, Á. G.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Estévez-Braun, A. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* **2015**, *20* (8), 13854–13863. <https://doi.org/10.3390/molecules200813854>.
- (252) Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules* **2018**, *23* (4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040719>.
- (253) Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabínová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; Jun, D.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Isolation of Amaryllidaceae Alkaloids from *Nerine Bowdenii* W. Watson and Their Biological Activities. *RSC Adv.* **2016**, *6* (83), 80114–80120. <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>.
- (254) Frollini, E.; Silva, C. G.; Ramires, E. C. 2 - Phenolic Resins as a Matrix Material in Advanced Fiber-Reinforced Polymer (FRP) Composites. In *Advanced Fibre-Reinforced Polymer (FRP) Composites for Structural Applications*; Bai, J., Ed.; Woodhead Publishing Series in Civil and Structural Engineering; Woodhead Publishing, 2013; pp 7–43. <https://doi.org/10.1533/9780857098641.1.7>.
- (255) Hemshekhar, M.; Sebastin Santhosh, M.; Kemparaju, K.; Girish, K. S. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *110* (2), 122–132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>.
- (256) de Paula, A. A. N.; Martins, J. B. L.; dos Santos, M. L.; Nascente, L. de C.; Romeiro, L. A. S.; Areas, T. F. M. A.; Vieira, K. S. T.; Gambôa, N. F.; Castro, N. G.; Gargano, R. New Potential AChE Inhibitor Candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44* (9), 3754–3759. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.03.045>.
- (257) Porzoor, A.; Alford, B.; Hügel, H. M.; Grando, D.; Caine, J.; Macreadie, I. Anti-Amyloidogenic Properties of Some Phenolic Compounds. *Biomolecules* **2015**, *5* (2), 505–527. <https://doi.org/10.3390/biom5020505>.

- (258) Kinney, J. W.; Bemiller, S. M.; Murtishaw, A. S.; Leisgang, A. M.; Salazar, A. M.; Lamb, B. T. Inflammation as a Central Mechanism in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* **2018**, *4*, 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>.
- (259) García-Palomero, E.; Muñoz, P.; Usan, P.; Garcia, P.; Delgado, E.; Austria, C. D.; Valenzuela, R.; Rubio, L.; Medina, M.; Martínez, A. Potent β -Amyloid Modulators. *NDD* **2008**, *5* (3–4), 153–156. <https://doi.org/10.1159/000113688>.
- (260) Gupta, M.; Lee, H. J.; Barden, C. J.; Weaver, D. F. The Blood–Brain Barrier (BBB) Score. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (21), 9824–9836. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01220>.
- (261) Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. *ACS Chem Neurosci* **2016**, *7* (6), 767–775. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00029>.
- (262) Golde, T. E.; DeKosky, S. T.; Galasko, D. Alzheimer's Disease: The Right Drug, the Right Time. *Science* **2018**, *362* (6420), 1250–1251. <https://doi.org/10.1126/science.aau0437>.
- (263) Hsu, D.; Marshall, G. A. Primary and Secondary Prevention Trials in Alzheimer Disease: Looking Back, Moving Forward. *Current Alzheimer Research* **2017**, *14* (4), 426–440. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160930112125>.
- (264) Chen, J. J.; Ly, A.-V. Rasagiline: A Second-Generation Monoamine Oxidase Type-B Inhibitor for the Treatment of Parkinson's Disease. *Am J Health Syst Pharm* **2006**, *63* (10), 915–928. <https://doi.org/10.2146/ajhp050395>.
- (265) Coan, E. J.; Saywood, W.; Collingridge, G. L. MK-801 Blocks NMDA Receptor-Mediated Synaptic Transmission and Long Term Potentiation in Rat Hippocampal Slices. *Neuroscience Letters* **1987**, *80* (1), 111–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90505-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90505-2).

6 Podíl předkladatele habilitační práce na jednotlivých publikacích

6.1 Původní práce

- PI. Vedení části syntetické práce, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PII. Vedení části syntetické práce, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PIII. Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části
- PIV. Návrh studie, vedení části syntetické práce, molekulově modelovací studie, diskuze k výsledkové části
- PV. První autor, syntéza derivátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části
- PVI. Návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PVII. Návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části
- PVIII. První spoluautor, návrh studie, syntéza derivátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PIX. Vedení části syntetické práce, návrh studie, diskuze k výsledkové části
- PX. Návrh studie, vedení části syntetické práce, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXI. První autor, návrh studie, syntéza derivátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXII. První spoluautor, návrh studie, syntéza derivátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXIII. První spoluautor, syntéza derivátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, návrh studie, koordinace dílčích experimentů
- PXIV. Korespondující autor, návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXV. Návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXVI. Syntéza intermediátů, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, koordinace studie
- PXVII. Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, koordinace studie
- PXVIII. Návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části
- PXIX. Syntéza některých derivátů, návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části

- PXX.** Syntéza některých derivátů, návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části
- PXXI.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXII.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXIII.** Korespondující autor, návrh studie, vedení části syntetické práce, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXIV.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXV.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXVI.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXVII.** Sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXXVIII.** Korespondující autor, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části, molekulově modelovací studie
- PXIX.** Návrh studie, sepisování manuskriptu, diskuze k výsledkové části

6.2 Přehledové práce

- SI.** Návrh tématu práce, vedení studentky, sepisování a revize manuskriptu
- SII.** První autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SIII.** Sepisování a revize manuskriptu
- SIV.** První autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SV.** Návrh tématu práce, vedení studentky, sepisování a revize manuskriptu
- SVI.** Sepisování a revize manuskriptu
- SVII.** První autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SVIII.** Sepisování a revize manuskriptu
- SIX.** První a korespondující autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SX.** Korespondující autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXI.** První autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXII.** Korespondující autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXIII.** První autor, sepisování a revize manuskriptu
- SXIV.** Návrh tématu práce, vedení studentky, sepisování a revize manuskriptu

- SXV.** Korespondující autor, sepisování a revize manuskriptu
- SXVI.** Sepisování a revize manuskriptu
- SXVII.** Sepisování a revize manuskriptu
- SXVIII.** První autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXIX.** První a korespondující autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXX.** Korespondující autor, návrh tématu práce, sepisování a revize manuskriptu
- SXXI.** Návrh tématu práce, vedení studentky, sepisování a revize manuskriptu

6.3 Práce nezahrnuté v habilitační práci

6.3.1 Kapitoly v knize

1. Musilek, K.; Korabecny, J.; Jun, D.; Kassa, J.; Kuca, K. Novel cholinesterase inhibitors. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. **2015**, 1071-1087. DOI: 10.1016/B978-0-12-800159-2.00072-5; ISBN 978-0-12-800159-2

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001592000725>

6.3.2 Monografie

1. Korabecny, J.; Soukup, O.; Valis, M. Alzheimerova nemoc – patofyziologie a současný stav a perspektivy výzkumu farmakoterapie. Maxdorf, **2020**, *in press*. ISBN: 978-80-7345-643-6

Full-text: <http://eshop.maxdorf.cz/kniha/alzheimerova-nemoc>

6.3.3 Práce publikované v recenzovaných časopisech bez IF

1. Jun, D.; Musilek, K.; Kassa, J.; Cabal, J.; Zdarova-Karasova, J.; Pohanka, M.; Bajgar, J.; Marek, J.; Komloova, M.; Soukup, O.; Holas, O.; Korabecny, J.; Dolezal, B.; Kuca, K. Vývoj univerzálního antidota otrav nervově paralytickými látkami na bázi reaktivátorů cholinesteráz: Od substance k autoinjektoru. *Urgentní medicína*, **2010**, 4, 15-19. ISSN: ISSN 1212-1924

Full-text: https://urgentnimediceina.cz/?page_id=102

2. Zdarova-Karasova, J.; Korabecny, J.; Pohanka, M.; Zemek, F.; Sepsova, V.; Kuca, K. Acetylcholinesterase inhibitors used or tested in Alzheimer Disease therapy; their passive diffusion through blood brain barrier: In vitro study. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **2013**, 7(22), 1471-1481. DOI: 10.5897/AJPP2013.2977

Full-text: <https://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/CAB53D536186>

3. Valis, M.; Koci, J.; Tucek, D.; Lutonsky, O.; Kopova, J.; Barton, P.; Vysata, O.; Krajickova, D.; Korabecny, J.; Masopust, J.; Klzo, L. Common yew intoxication: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, **2014**, 8, 4. DOI: 10.1186/1752-1947-8-4

Full-text: <https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-8-4>

4. Konecny, J.; Juza, R.; Gorecki, L.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Pharmacological profile of dizocilpine (MK-801) and its potential use in animal model of schizophrenia. *Mil. Med. Sci. Lett.*, **2019**, 88(4), 166-179. DOI: 10.31482/mmsl.2019.019.

Full-text: https://mmsl.cz/artkey/mms-201904-0003_pharmacological-profile-of-dizocilpine-mk-801-and-its-potential-use-in-animal-model-of-schizophrenia.php

5. Svobodova, B.; Gorecki, L.; Korabecny, J.* Prophylactic agents in the management of organophosphorus intoxication. *Mil. Med. Sci. Lett.*, **2019**, *88*(3), 121-133. DOI: 10.31482/mmsl.2019.016.

Full-text: https://mmsl.cz/artkey/mms-201903-0004_prophylactic-agents-in-the-management-of-organophosphorus-intoxication.php

6. Hymanova, M.; Kucera, T.; Benek, O.; Korabecny, J.*; Marek, J. Searching for New Antimicrobial Agents by Targeting Bacterial NAD Metabolism: Evaluation of Frentizole Derivatives Selected by Molecular Docking. *Mil. Med. Sci. Lett.*, **2020**, *89*(2), 66-73. DOI: 10.31482/mmsl.2020.005.

Full-text: https://mmsl.cz/artkey/mms-201903-0004_prophylactic-agents-in-the-management-of-organophosphorus-intoxication.php

7. Kuca, K.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Zdarova-Karasova, J.; Soukup, O.; Hrabina, M.; Jun, D. Influence of the distance between quaternary nitrogen and oxime group on the reactivation ability of oximes – antidotes against nerve agents. *J. Environ. Immunol. Toxicol.*, **2014**, *1*(1), 41-43. DOI: 10.7178/jeit.16

Full-text: <http://www.stmconnect.com/jeit/content/1/1/16.abstract>

6.3.4 Práce publikované v časopisech s IF

1. Pohanka, M.; Zdarova Karasova, J.; Kuca, K.; Pikula, J.; Holas, O.; Korabecny, J.; Cabal, J. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*, **2010**, *81*(1-2), 621-624. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.052. IF₂₀₁₀ = 3,722. AIS₂₀₁₀ = 0,818.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991401000010X?via%3Dihub>

2. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*(20), 6093-6095. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.08.044. IF₂₀₁₀ = 2,661. AIS₂₀₁₀ = 0,583.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10011674>

3. Kuca, K.; Marek, J.; Zdarova Karasova, J.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Kalasz, H. Novel Acetylcholinesterase reactivator – oxime K048 – reactivation activity in vitro. *Med. Chem.*, **2010**, *6*(1), 1-5. DOI: 10.2174/157340610791208709. IF₂₀₁₀ = 1,603. AIS₂₀₁₀ = -.

Full-text: www.eurekaselect.com/85445/article

4. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.*, **2010**, *7*(4), 327-331. DOI: 10.2174/157017810791130540. IF₂₀₁₀ = 0,785. AIS₂₀₁₀ = 0,208.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/84382/article/synthesis-and-vitro-evaluation-new-tacrine-derivates-bis-alkylene-linked-7-meota>

5. Marek, J.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of the pyridinium salts differing in the length of the *N*-alkyl substituent. *Molecules*, **2010**, *15*(3), 1967-1972. DOI: 10.3390/molecules15031967. IF₂₀₁₀ = 1,988. AIS₂₀₁₀ = 0,417.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/3/1967>

6. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Zemek, F.; Opletalova, V.; Patocka, J.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Kuca, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of *N*-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules*, **2010**, *15*(12), 8804-8812. DOI: 10.3390/molecules15128804. IF₂₀₁₀ = 1,988. AIS₂₀₁₀ = 0,417.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/8804>

7. Fisar, Z.; Hroudova, J.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. *In vitro* effects of acetylcholinesterase reactivators on monoamine oxidase activity. *Toxicol. Lett.*, **2011**, *201*(2), 176-180. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.12.023. IF₂₀₁₁ = 3,230. AIS₂₀₁₁ = 0,867.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427410018187>

8. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Korabecny, J.; Kuca, K. *In vitro* effects of acetylcholinesterase inhibitors and reactivators on Complex I of electron transport chain. *Neuroendocrinol. Lett.*, **2011**, *32*(3), 259-263. IF₂₀₁₁ = 1,296. AIS₂₀₁₁ = 0,249.

Full-text: <http://www.nel.edu/in-vitro-effects-of-acetylcholinesterase-inhibitors-and-activators-on-complex-i-of-electron-transport-chain-899/>

9. Korabecny, J.; Musilek, K.; Horova, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y. S.; Kuca, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine - new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*(21), 6563-6566. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.08.042. IF₂₀₁₁ = 2,554. AIS₂₀₁₁ = 0,572.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X11011279>

10. Korabecny, J.; Janovec, L.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y. S.; Kuca, K. Comparison of novel tacrine and 7-MEOTA derivatives with aromatic and alicyclic residues: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Lett. Org. Chem.*, **2013**, *10*(4), 291-297. DOI: 10.2174/1570178611310040011. IF₂₀₁₃ = 0,648. AIS₂₀₁₃ = 0,125.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/109634>

11. Zemek, F.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Karasova-Zdarova, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Albumin and Alpha 1-Acid Glycoprotein; An Old Acquaintance. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2013**, *9*(8), 943-954. DOI: 10.1517/17425255.2013.790364. IF₂₀₁₃ = 2,934. AIS₂₀₁₃ = 0,811.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2013.790364>

12. Sepsova, V.; Zdarova-Karasova, J.; Korabecny, J.; Zemek, F.; Bennion, B.J.; Kuca, K. Oximes: Inhibitors of human acetylcholinesterase – a structure-activity relationship (SAR) study. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*(8), 16882-16900. DOI: 10.3390/ijms140816882. IF₂₀₁₃ = 2,339. AIS₂₀₁₃ = 0,640.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/8/16882>

13. Korabecny, J.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Spilovka, K.; Nepovimova, E.; Andrs, M.; Nguyen, T.D.; Jun, D.; Musilek, K.; Kucerova-Chlupacova, M.; Kuca, K. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2014**, *14*(3), 215-221. DOI: 10.2174/1389557514666140219103138. IF₂₀₁₄ = 3,350. AIS₂₀₁₄ = 0,690.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/120474/article>

14. Kassa, J.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Tumova, M. The evaluation of prophylactic efficacy of newly developed reversible inhibitors of acetylcholinesterase in soman-poisoned mice – a comparison with commonly used pyridostigmine. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2014**, *115*(6), 571-576. IF₂₀₁₄ = 2,337. AIS₂₀₁₄ = 0,550.

Full-text: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12269>

15. Sepsova, V.; Zdarova-Karasova, J.; Tobin, G.; Jun, D.; Korabecny, J.; Cabelova, P.; Janska, K.; Krusek, J.; Kuca, K.; Soukup, O. Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *Gen. Physiol. Biophys.*, **2015**, *34*(2), 189-200. DOI: 10.4149/gpb_2014036. IF₂₀₁₅ = 0,892. AIS₂₀₁₅ = 0,267.

Full-text:

http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=4236&category_id=119&option=com_virtuemart&vmcchk=1&Itemid=1

16. Andrs, M.; Korabecny, J.; Jun, D.; Hodny, Z.; Bartek, J.; Kuca, K. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: the importance of the morpholine ring. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*(1), 41-71. DOI: 10.1021/jm501026z. IF₂₀₁₅ = 5,589. AIS₂₀₁₅ = 1,473.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm501026z>

17. Andrs, M.; Korabecny, J.; Jun, D.; Kuca, K. The development of ataxia telangiectasia mutated kinase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2014**, *14*(10), 805-811. DOI: 10.2174/1389557514666140820123656. IF₂₀₁₄ = 2,903. AIS₂₀₁₄ = 0,690.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/124033/article>

18. Dolezal, R.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Malinak, D.; Musilek, K.; Kuca, K. Ligand-based 3D QSAR analysis of reactivation potency of mono- and bis- pyridinium oximes toward VX-inhibited rat acetylcholinesterase. *J. Mol. Graphics Model.*, **2015**, *56*, 113-129. DOI: 10.1016/j.jmgm.2014.11.010. IF₂₀₁₅ = 1,674. AIS₂₀₁₅ = 0,464.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326314001983?via%3Dihub>

19. Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; Kuca, K. 6-Hydroxyquinolinium salts differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*(22), 5238-5241. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.09.060. IF₂₀₁₄ = 2,420. AIS₂₀₁₄ = 0,508.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X14010130>

20. Lee, S.K.; Park, M.K.; Yi, J.; Nahm, K.; Cho, D.W.; Ra, C.S.; Musilek, K.; Horova, A.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K. Preparation of 7-methoxy tacrine dimer analogues

and their *in vitro/in silico* evaluation as potential cholinesterase inhibitors. *B. Korean Chem. Soc.*, **2015**, 35(6), 1654-1660. DOI: 10.1002/bkcs.10317. IF₂₀₁₅ = 0,793. AIS₂₀₁₅ = 0,154.

Full-text: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bkcs.10317>

21. Andrs, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Hodny, Z.; Bartek, J.; Kuca, K. Small molecules targeting ATR kinase: an emerging way to enhance existing cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Target*, **2016**, 16(3), 200-208. DOI: 10.2174/156800961603160206122927. IF₂₀₁₆ = 2,992. AIS₂₀₁₆ = 0,811.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/139285/article>

22. Misik, J.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Cabelova, P.; Kassa, J. Effects of novel 7-MEOTA-donepezil like hybrids and *N*-alkylated tacrine analogues in the treatment of quinuclidinyl benzilate-induced behavioural deficit in rats performing the multiple T-maze test. *Biomed. Pap.*, **2015**, 159(4), 547-553. DOI: 10.5507/bp.2015.006. IF₂₀₁₅ = 0,924. AIS₂₀₁₅ = 0,303.

Full-text: https://biomed.papers.upol.cz/artkey/bio-201504-0006_the_effects_of_novel_7-meota-donepezil_like_hybrids_and_n-alkylated_tacrine_analogues_in_the_treatment_of_quinu.php

23. Malinak, D.; Gonda, J.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Honegr, J.; Soukup, O.; Buzga, M.; Kuca, K. A review of total synthesis of (+) lactacystin and its analogs. *Curr. Org. Chem.*, **2015**, 19(20), 1980-2001. DOI: 10.2174/1385272819666150730210044. IF₂₀₁₅ = 1,949. AIS₂₀₁₅ = 0,516.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/133644/article>

24. Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, M.; Marek, J.; Salajkova, S.; Pasdiorova, M.; Honegr, J.; Korabecny, J.; Nachtigal, P.; Nachon, F.; Jun, D.; Kuca, K. Synthesis, antimicrobial evaluation and molecular modeling of 5-hydroxyisoquinolinium salt series; the effect of the hydroxyl moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24(4), 841-848. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.01.006. IF₂₀₁₆ = 2,930. AIS₂₀₁₆ = 0,631.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089616300050?via%3Dihub>

25. Misik, J.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Kracmarova, A.; Kassa, J. Effects of novel tacrine-related cholinesterase inhibitors in the reversal of 3-quinuclidinyl benzilate-induced cognitive deficit in rats - is there a potential for Alzheimer's disease treatment? *Neurosci. Lett.*, **2016**, 612, 261-268. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.12.021. IF₂₀₁₆ = 2,180. AIS₂₀₁₆ = 0,603.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394015303116?via%3Dihub>

26. Mzik, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Vorisek, V.; Palicka, V.; Kuca, K.; Zdarova-Karasova, J. An HPLC-MS method for the quantification of new acetylcholinesterase inhibitor PC 48 (7-MEOTA-donepezil like compound) in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J. Chrom. B.*, **2016**, 1020, 85-89. IF₂₀₁₆ = 2,603. AIS₂₀₁₆ = 0,597.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023216301258>

27. Andrs, M.; Muthna, D.; Rezacova, M.; Seifrtova, M.; Siman, P.; Korabecny, J.; Benek, O.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. Novel caffeine derivatives with antiproliferative activity. *RSC Advances*, **2016**, 6, 32534-32539. IF₂₀₁₆ = 3,108. AIS₂₀₁₆ = 0,590.

Full-text: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra22889a#!divAbstract>

28. Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Nguyen, T.D.; Jun, D.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Malinak, D.; Gorecki, L.; Musilek, K.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine – 4-Pyridinealldoxime Hybrid as Novel Prophylactic Agent with Reactivation Properties in Organophosphate Intoxications. *Toxicol. Res.*, **2016**, *5*, 1012-1016. DOI: 10.1039/C6TX00130K. IF₂₀₁₆ = 1,969. AIS₂₀₁₆ = 0,850.

Full-text: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/tx/c6tx00130k#!divAbstract>

29. Dolezal, R.; Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra M.L.R.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Ramalho, T.C.; Kuca, K. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial *N*-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *121*, 699-711. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.05.058. IF₂₀₁₆ = 4,519. AIS₂₀₁₆ = 0,748.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416304561>

30. Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Malinak, D.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.*, **2016**, *90*(12), 2831-2859. IF₂₀₁₆ = 5,901. AIS₂₀₁₆ = 1,306.

Full-text: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-016-1827-3>

31. Misik, J.; Nepovimova, E.; Pejchal, J.; Kassa, J.; Korabecny, J.; Soukup, O. Cholinesterase inhibitor 6-chlorotacrine - in vivo toxicological profile and behavioural effects. *Curr. Alz. Res.*, **2018**, *15*(6), 552-560. DOI: 10.2174/1567205015666171212105412. IF₂₀₁₈ = 3,271. AIS₂₀₁₆ = 0,794.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/158225/article>

32. Kristofikova, Z.; Ricny, J.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Ripova, D. Inhibitors of acetylcholinesterase derived from 7-methoxytacrine and their effects on the choline transporter CHT1. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **2017**, *43*, 45-58. DOI: 10.1159/000453256. IF₂₀₁₇ = 2,886. AIS₂₀₁₇ = 0,962.

Full-text: <https://www.karger.com/Article/Abstract/453256>

33. Holas, O.; Kuca, K.; Korabecny, J.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Musilek, K.; Gorecki, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E. Alzheimer's disease drugs - in vitro comparison of cholinesterase inhibition and beta-amyloid modulation. *Lett. Drug Des. Discov.*, **2017**, *14*(6), 743-750. DOI: 10.2174/1570180814666161228143846. IF₂₀₁₇ = 0,924. AIS₂₀₁₇ = 0,135.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/148776/article>

34. Kuca, K.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Gorecki, L.; Musilek, K. Tetroxime: reactivation potency – *in vitro* and *in silico* study. *RSC Advances*, **2017**, *7*, 7041-7045. DOI: 10.1039/C6RA16499D. IF₂₀₁₇ = 2,936. AIS₂₀₁₇ = 0,564.

Full-text: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c6ra16499d#!divAbstract>

35. Kassa, J.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Jun, D. The influence of modulators of acetylcholinesterase on the resistance of mice against soman and on the effectiveness of antidotal treatment of soman poisoning in mice. *J. Appl. Biomed.*, **2018**, *16*(1), 10-14. DOI: 10.1016/j.jab.2017.01.004. IF₂₀₁₈ = 1,573. AIS₂₀₁₈ = 0,346.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1214021X16303155>

36. Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Malinak, D.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006–2016). *Exp. Opin. Ther. Pat.*, **2017**, 27(9), 971–985. DOI: 10.1080/13543776.2017.1338275. IF₂₀₁₇ = 2,867. AIS₂₀₁₇ = 0,778.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2017.1338275>

37. Hrabcova, V.; Korabecny, J.; Manyova, B.; Matouskova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Musilek, K.; Gorecki, L.; Nepovimova, E.; Kuca, K.; Jun, D. Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: *in vitro* screening of probes for novel selective insecticides. *RSC Advances*, **2017**, 7(62), 39279–39291. DOI: 10.1039/C7RA05838A. IF₂₀₁₇ = 2,936. AIS₂₀₁₇ = 0,564.

Full-text: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra05838a#!divAbstract>

38. Zdarova-Karasova, J.; Mzik, M.; Hroch, M.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Vorisek, V.; Palicka, V.; Kuca, K. The new acetylcholinesterase inhibitors PC-37 and PC-48 (7-MEOTA-donepezil like compounds): characterization of their metabolites in human liver microsomes; pharmacokinetics and *in vivo* formation of the major metabolites in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2018**, 122(4), 373–382. DOI: 10.1111/bcpt.12922. IF₂₀₁₈ = 2,452. AIS₂₀₁₈ = 0,629.

Full-text: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12922>

39. Soukup, O.; Korabecny, J.; Malinak, D.; Nepovimova, E.; Pham, N.L.; Musilek, K.; Hrabcova, M.; Sepsova, V.; Dolezal, R.; Pavek, P.; Jost, P.; Kobrlova, T.; Janockova, J.; Gorecki, L.; Psotka, M.; Nguyen, T.D.; Box, K.; Outhwaite, B.; Ceckova, M.; Sofr, A.; Jun, D.; Kuca, K. In vitro and *in silico* evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning - a new hope or a blind alley? *Med. Chem.*, **2018**, 14(3), 281–292. DOI: 10.2174/1573406414666180112105657. IF₂₀₁₈ = 2,530. AIS₂₀₁₈ = 0,507.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/158993/article>

40. Zdarova Karasova, J.; Sestak, V.; Korabecny, J.; Mezeiova, E.; Palicka, V.; Kuca, K.; Mzik, M. 1-Benzyl-4-methylpiperidinyl moiety in donepezil: The priority ticket across the blood-brain-barrier in rats. *J. Chromatogr. B*, **2018**, 1092, 350–358. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.06.034. IF₂₀₁₈ = 2,813. AIS₂₀₁₈ = 0,557.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023218306342?via%3Dihub>

41. Andrs, M.; Pospisilova, M.; Seifrtova, M.; Havelek, R.; Tichy, A.; Vejrychova, K.; Polednikova, M.; Forecki, L.; Jun, D.; Korabecny, J.*; Rezacova, M. Purin-6-one and pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity. *Fut. Med. Chem.*, **2018**, 10(17), 2029–2038. DOI: 10.4155/fmc-2018-0086. IF₂₀₁₈ = 3,617. AIS₂₀₁₈ = 0,909.

Full-text: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fmc-2018-0086>

42. Malinak, D.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Gorecki, L.; Nepovimova, E.; Psotka, M.; Dolezal, R.; Nguyen, T.D.; Musilek, K.; Kuca, K.; A review of the synthesis of quaternary acetylcholinesterase reactivators. *Curr. Org. Chem.*, **2018**, 22(16), 1619–1648. DOI: 10.2174/1385272822666180711123529. IF₂₀₁₈ = 2,029. AIS₂₀₁₈ = 0,345.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/163684/article>

43. Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Dolezal, R.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Janockova, J.; Pham, N.L.; Nguyen, T.D.; Valis, M.; Kuca, K. *N-alkylated tacrine analogues as potential drugs for Alzheimer's disease. Curr. Alz. Res.*, **2019**, *16*(4), 333-343. DOI: 10.2174/1567205016666190314163942. IF₂₀₁₉ = 3,047. AIS₂₀₁₉ = 0,844.

Full-text: <https://www.eurekaselect.com/170754/article>

44. Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Korabecny, J.; França, T.C.C.; de Castro, A.A.; Krejcar, O.; da Cunha, E.F.F.; Ramalho, T.C. Oxime K074 – in vitro and in silico reactivation of acetylcholinesterase inhibited by nerve agents and pesticides. *Toxin Rev.*, **2020**, *39*(2), 157-166. DOI: 10.1080/15569543.2018.1485702. IF₂₀₁₉ = 2,851. AIS₂₀₁₉ = 0,393.

Full-text:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15569543.2018.1485702?journalCode=itxr20>

45. Kaniakova, M.; Kleteckova, L.; Lichnerova, K.; Holubova, K.; Skrenkova, K.; Korinek, M.; Krusek, J.; Smejkalova, T.; Korabecny, J.; Vales, K.; Soukup, O.; Horak, M. 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity *in vivo*. *Neuropharmacology*, **2018**, *140*, 217-232. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.010. IF₂₀₁₈ = 4,367. AIS₂₀₁₈ = 1,255.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390818304878?via%3Dihub>

46. Pospisilova, M.; Andrs, M.; Seifrtova, M.; Havelek, R.; Jun, D.; Tomsik, P.; Prchal, L.; Dolezal, R.; Tichy, A.; Kucera, T.; Korabecny, J.*; Rezacova, M. Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *82*, 204-210. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.001. IF₂₀₁₉ = 4,831. AIS₂₀₁₉ = 0,643.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004520681830806X>

47. Nepovimova, E.; Janockova, J.; Misik, J.; Kubik, S.; Stuchlik, A.; Vales, K.; Korabecny, J.; Mezeiova, E.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Koblrova, T.; Pham, N.L.; Nguyen, T.D.; Konecny, J.; Kuca, K. Orexin supplementation in narcolepsy treatment: a review. *Med. Res. Rev.*, **2018**, *39*(3), 961-975. DOI: 10.1002/med.21550. IF₂₀₁₈ = 9,791. AIS₂₀₁₈ = 2,096.

Full-text: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.21550>

48. Janockova, J.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Koblrova, T.; Benkova, M.; Kuca, K.; Konecny, J.; Mezeiova, E.; Melikova, M.; Hepnarova, V.; Ring, A.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Investigation of New Orexin 2 Receptor Modulators Using In Silico and In Vitro Methods. *Molecules*, **2018**, *23*(11), 2926. DOI: 10.3390/molecules23112926. IF₂₀₁₈ = 3,060. AIS₂₀₁₈ = 0,620.

Full-text: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/2926>

49. Gorecki, L.; Soukup, O.; Kucera, T.; Malinak, D.; Jun, D.; Kuca, K.; Musilek, K.; Korabecny, J.* Oxime K203 – A drug candidate for the treatment of tabun intoxication. *Arch. Toxicol.*, **2019**, *93*(3), 673-691. DOI: 10.1007/s00204-018-2377-7. IF₂₀₁₉ = 5,059. AIS₂₀₁₉ = 1,122.

Full-text: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00204-018-2377-7>

50. Zdarova-Karasova, J.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Hroch, M.; Krejcirova, M.; Hrabnova, M.; Misik, J.; Novotny, L.; Hepnarova, V.; Kuca, K. Tacrine and its 7-methoxy derivate; time-change concentration in plasma and brain tissue and basic toxicological profile in rats. *Drug Chem.*

Toxicol., **2018**, just accepted. DOI: 10.1080/01480545.2019.1566350. IF₂₀₁₈ = 1,946. AIS₂₀₁₈ = 0,381.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01480545.2019.1566350>

51. Larik, F.A.; Faisal, M.; Saeed, A.; Channar, P.A.; Korabecny, J.; Jabeen, F.; Mahar, I.A.; Kazi, M.A.; Abbas, Q.; Murtanza, G.; Khan, G.S.; Hassan, M.; Seo, S.-Y. Investigation on the effect of alkyl chain linked mono-thioureas as Jack bean urease inhibitors, SAR, pharmacokinetics ADMET parameters and molecular docking studies. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *86*, 473-481. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.02.011. IF₂₀₁₉ = 4,831. AIS₂₀₁₉ = 0,643.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206818314664>

52. Janockova, J.; Korabecny, J.; Plsikova, J.; Babkova, K.; Konkolova, E.; Kucerova, D.; Vargova, J.; Koval, J.; Jendzelovsky, R.; Fedorocko, P.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Rosocha, J.; Soukup, O.; Hamulakova, S.; Kuca, K.; Kozurkova, M. 7-MEOTA-tacrine heterodimers as new anticancer drug candidates: Synthesis and biological evaluation. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2019**, *34*(1), 877-897. DOI: 10.1080/14756366.2019.1593159. IF₂₀₁₉ = 4,673. AIS₂₀₁₉ = 0,492.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2019.1593159>

53. Sharma, S.; Singh, N.; Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Satnami, M.L.; Ghosh, K.K. Interaction of Synthesized Nitrogen enriched Graphene Quantum Dots with Novel Anti-Alzheimer's Drugs: Spectroscopic Insights. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2019**, *38*(6), 1822-1837. DOI: 10.1080/07391102.2019.1619625. IF₂₀₁₈ = 3,310. AIS₂₀₁₈ = 0,494.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2019.1619625>

54. Koblrova, T.; Korabecny, J.; Soukup, O. Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*, **2019**, *423*, 75-83. DOI: 10.1016/j.tox.2019.05.006. IF₂₀₁₉ = 4,099. AIS₂₀₁₉ = 0,803.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X19301581>

55. Mzik, M.; Karasova-Zdarova, J.; Chalupova, K.; Korabecny, J.; Palicka, V.; Sestak, V. UHPLC-HRMS study of Anti-Alzheimer's drug candidates: metabolism of 7 MEOTA-tryptophan hybrids hampers their passage into brain. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **2019**, *174*, 134-144. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.05.051. IF₂₀₁₉ = 3,209. AIS₂₀₁₉ = 0,590.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708519305345>

56. Gorecki, L.; Junova, L.; Kucera, T.; Hepnarova, V.; Prchal, L.; Koblrova, T.; Muckova, L.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Tacroximes - novel unique compounds for the recovery of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase. *Fut. Med. Chem.*, **2019**, *11*(20), 2625-2634. DOI: 10.4155/fmc-2019-0027. IF₂₀₁₉ = 3,607. AIS₂₀₁₉ = 0,845.

Full-text: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/fmc-2019-0027>

57. Karabanovich, G.; Dusek, J.; Savkova, K.; Pavlis, O.; Pavkova, I.; Korabecny, J.; Kucera, T.; Kocova Vlckova, H.; Huszár, S.; Konyarikova, Z.; Konecna, K.; Jandourek, O.; Stolarikova, J.; Kordulakova, J.; Vavrova, K.; Pavek, P.; Klimesova, V.; Hrabalek, A.; Mikusova, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrophenyl-Containing 1,2,4-Triazoles and Their Trifluoromethyl Analogues as Highly Efficient Antitubercular Agents Inhibiting Decaprenylphosphoryl-β-D-

ribofuranose 2'-Oxidase. *J. Med. Chem.*, **2019**, 62(17), 8115-8139. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00912. IF₂₀₁₉ = 6,205. AIS₂₀₁₉ = 1,570.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00912>

58. Larik, F. A.; Saeed, A.; Faisal, M.; Hamdani, S.; Jabeen, F.; Channar, P. A.; Mumtaz, A.; Khan, I.; Kazi, M. A.; Abbas, Q.; Hassan, M.; Korabecny, J.; Seo, S.-Y. Synthesis, Inhibition Studies against AChE and BChE, Drug-like Profiling, Kinetic Analysis and Molecular Docking Studies of *N*-(4-Phenyl-3-Aroyl-2(3H)-ylidene) Substituted Acetamides. *J. Mol. Struct.*, **2019**, 1203, 127459. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.127459. IF₂₀₁₉ = 2,463. AIS₂₀₁₉ = 0,278.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286019315686>

59. Gorecki, L.; Andrys, R.; Schmidt, M.; Kucera, T.; Psotka, M.; Svobodova, B.; Hrabcova, V.; Hepnarova, V.; Bzonek, P.; Jun, D.; Kuca, K.; Korabecny, J.*; Musilek, K. Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase are neither Selective nor Reversible Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2020**, 11(1), 65-71. DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00477. IF₂₀₁₉ = 3,975. AIS₂₀₁₉ = 1,019.

Full-text: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsmchemlett.9b00477>

60. Malinak, D.; Dolezal, R.; Hepnarova, V.; Hozova, M.; Andrys, R.; Bzonek, P.; Racakova, V.; Korabecny, J.; Gorecki, L.; Mezeiova, E.; Psotka, M.; Jun, D.; Kuca, K.; Musilek, K. Synthesis, in vitro screening and molecular docking of isoquinolinium-5-carbaldoximes as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase reactivators. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2020**, 35(1), 478-488. DOI: 10.1080/14756366.2019.1710501. IF₂₀₁₉ = 4,673. AIS₂₀₁₉ = 0,492.

Full-text: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2019.1710501>

61. Juza, R.; Vlcek, P.; Mezeiova, E.; Musilek, K.; Soukup, O.; Korabecny, J.* Recent Advances with 5-HT₃ Modulators for Neuropsychiatric and Gastrointestinal Disorders. *Med. Res. Rev.* **2020**, 40, 1593-1678. DOI: 10.1002/med.21666. IF₂₀₁₉ = 9,300. AIS₂₀₁₉ = 2,144.

Full-text: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.21666>

62. Gorecki, L.; Andrs, M.; Rezacova, M.; Korabecny, J.* Discovery of ATR Kinase Inhibitor Berzosertib (VX-970, M6620): Clinical Candidate for Cancer Therapy. *Pharmacol. Therapeut.*, **2020**, 210, 107518. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107518. IF₂₀₁₉ = 10,557. AIS₂₀₁₉ = 2,858.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725820300462?via%3Dihub>

63. Sharma, S.; Kumar Banjare, M.; Singh, N.; Korabecny, J.; Fisar, Z.; Kuca, K.; K. Ghosh, K. Exploring Spectroscopic Insights into Molecular Recognition of Potential Anti-Alzheimer's Drugs within the Hydrophobic Pockets of β -Cycloamylose. *J. Mol. Liq.*, **2020**, 311, 113269. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113269. IF₂₀₁₉ = 5,065. AIS₂₀₁₉ = 0,620.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732220318237>

64. Soukup, O.; Benkova, M.; Dolezal, R.; Sleha, R.; Malinak, D.; Salajkova, S.; Markova, A.; Hympanova, M.; Prchal, L.; Ryskova, L.; Hobzova, L.; Sepčić, K.; Gunde-Cimerman, N.; Korabecny, J.; Jun, D.; Bostikova, V.; Bostik, P.; Marek, J. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel *N*-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, 203, 112584. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112584. IF₂₀₁₉ = 5,572. AIS₂₀₁₉ = 0,798.

Full-text: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523420305560>

65. Mezeiova, E.; Janockova, J.; Konecny, J.; Kobrlova, T.; Benkova, M.; Dolezal, R.; Prchal, L.; Karasova-Zdarova, J.; Soukup, O.; Korabecny, J.* From orexin receptor agonist YNT-185 to novel antagonists with drug-like properties for the treatment of insomnia. *Bioorg. Chem.*, **2020**, *just accepted*. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104179. IF₂₀₁₉ = 4,831. AIS₂₀₁₉ = 0,643.

6.3.5 Patenty a užité vzory

1. Korabecny, J.; Soukup, O.; Spilovska, K.; Kuca, K.; Jun, D. Konjugáty na bázi takrinu a tryptofanu, způsob jejich přípravy a jejich použití. CZ 306545 B6. Uděleno 18. 1. 2017
2. Andrs, M.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Rezacova, M.; Seifrtova, M.; Pospisilova, M.; Mazankova, N.; Jun, D.; Tichy, A.; Kuca, K. Deriváty 2-morfolino-3,4-dihydrochinazolin-4-onu se substitucí v poloze 8-, způsob jejich přípravy a jejich použití jako radio- a chemosenzitivizujících látek. CZ 308158 B6. Uděleno 18. 12. 2019. Schválený Úřadem průmyslového vlastnictví dne 7. 11. 2019. Značka spisu: PV 2018-212
3. Musilek, K.; Korabecny, J.; Pspotka, M.; Svobodova, B. Fenoxycetamidy pro nekovalentní inhibici komáří acetylcholinesterasy. CZ 33713 U1. Zapsáno 11. 2. 2020.

7 Soubor publikovaných vědeckých prací

Z důvodu rozsahu habilitační práce jsou na tomto místě uváděny pouze stěžejní výstupy v podobě všech původních vědeckých prací (**PI. – PXXIX.**) a dvou souhrnných vědeckých prací (**SIII. a SXV.**).

PI. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kral, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Kuca, K. 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers as cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease treatment – synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Molecules*, **2013**, *18*(2), 2397-2418. DOI: 10.3390/molecules18022397. IF₂₀₁₃ = 2,095.

PII. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Dolezal, R.; Jun, D.; Kuca, K. Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: A novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.*, **2015**, *24*, 2645-2655. DOI: 10.1007/s00044-015-1316-x. IF₂₀₁₅ = 1,436.

PIII. Gazova, Z.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Siposova, K.; Drtinova, L.; Jost, P.; Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Fedunova, D.; Horak, M.; Kaniakova, M.; Wang, Z.-J.; Hamouda, A.K.; Kuca, K. Multi-target-directed therapeutic potential of 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers in the Alzheimer's disease treatment. *BBA-Mol. Basis Dis.*, **2017**, *1863*(2), 607-619. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.11.020. IF₂₀₁₇ = 5,108.

PIV. Kaniakova, M.; Nepovimova, E.; Kleteckova, L.; Skrenkova, K.; Holubova, K.; Chrienova, Z.; Hepnarova, V.; Kucera, T.; Kobrlova, T.; Vales, K.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Horak, M. Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Curr. Alz. Res.*, **2019**, *16*(9), 821-833. DOI: 10.2174/1567205016666190228122218. IF₂₀₁₉ = 3,047.

PV. Korabecny, J.; Dolezal, R.; Cabelova, P.; Horova, A.; Hrubá, E.; Ricny, J.; Sedlacek, L.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Andrs, M.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Sepsova, V.; Ripova, D.; Kuca, K. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modelling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *82*, 426-438. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.066. IF₂₀₁₄ = 3,447.

PVI. Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hrabínova, M.; Spilovská, K.; Korabecny, J.; Kristian, P.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and biological evaluation of novel tacrine derivatives and tacrine-coumarin hybrids as cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57(16), 7073-7084. DOI: 10.1021/jm5008648. IF₂₀₁₄ = 5,447.

PVII. Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Peña-Altamira, L.E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G.E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M. Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M.L. Multitarget drug design strategy: quinone-tacrine hybrids designed to block amyloid-beta aggregation and to exert anticholinesterase and antioxidant effects. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*(20), 8576-8589. DOI: 10.1021/jm5010804. IF₂₀₁₄ = 5,447.

PVIII. Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R. Babkova, K.; Ondrejcek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabimova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine – trolox hybrids: A novel class of centrally active, non-hepatotoxic multi-target-directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low in vivo toxicity. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58(22), 8985-9003. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01325. IF₂₀₁₅ = 5,589.

PIX. Jerabek, J.; Uliassi, E.; Guidotti, L.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Hrabinova, M.; Kuca, K.; Bartolini, M.; Peña Altamira, L.E.; Petralla, S.; Monti, B.; Roberti, M; Bolognesi, M.L. Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *127*, 250-262. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.048. IF₂₀₁₇ = 4,816.

PX. Spilovska K.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Jun, D.; Hrabinoval, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Soukup, O.; Janockova, J.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Kaping, D.; Kuca, K. A novel tacrine-scutellarin hybrids as multipotent anti-Alzheimer's agents: design, synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2017**, 22(6), 1006. DOI: 10.3390/molecules22061006. IF₂₀₁₇ = 3,098.

PXI. Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Gorecki, L.; Mezeiova, E.; Sepsova, V.; Hrabinoval, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-*p*-Anisidine Dimers as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*, **2015**, *20*(12), 22084-22101. DOI: 10.3390/molecules201219836. IF₂₀₁₅ = 2,465.

PXII. Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabinova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Mezeiova, E.; Pham, N.L.; Jun, D.; Staud, F.; Kaping, D.; Kuca, K.; Soukup, O. The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *150*, 292-306. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.083. IF₂₀₁₈ = 4,833.

PXIII. Chalupova, K.; Korabecny, J.; Bartolini, M.; Monti, B.; Lamba, D.; Caliandro, R.; Pesaresi, A.; Brazzolotto, X.; Gastellier, A.-J.; Nachon, F.; Pejchal, J.; Jarosova, M.; Hepnarova, V.; Jun, D.; Hrabinova, M.; Dolezal, R.; Zdarova Karasova, J.; Mzik, M.; Kristofikova, Z.; Misik, J.; Muckova, L.; Jost, P.; Soukup, O.; Benkova, M.; Setnicka, V.; Habartova, L.; Chvojkova, M.; Kleteckova, L.; Vales, K.; Mezeiova, E.; Uliassi, E.; Valis, M.; Nepovimova, E.; Bolognesi, M.L.; Kuca, K. Novel tacrine-tryptophan hybrids: multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *168*, 491-514. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.02.021. IF₂₀₁₉ = 5,572.

PXIV. Svobodova, B.; Mezeiova, E.; Hepnarova, V.; Hrabinoval, M.; Muckova, L.; Kobrlova, T.; Jun, D.; Soukup, O.; Luisa Jimeno, M.; Marco-Contelles, J.; Korabecny, J. Exploring Structure-Activity Relationship in Tacrine-Squaramide Derivatives as Potent Cholinesterase Inhibitors. *Biomolecules*, **2019**, *9*, 379. DOI: 10.3390/biom9080379. IF₂₀₁₉ = 4,082.

PXV. Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabinoval, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.L.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules*, **2017**, 22(8), 1265. DOI: 10.3390/molecules22081265. IF₂₀₁₇ = 3,098.

PXVI. Więckowska, A.; Wichur, T.; Godyń, J.; Bucki, A.; Marcinkowska, M.; Siwek, A.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Knez, D.; Głuch-Lutwin, M.; Kazek, G.; Latacz, G.; Mika, K.; Kołaczkowski, M.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Benkova, M.; Kiec-Kononowicz, K.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel multi-target-directed ligands aiming at symptoms and causes of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.*, **2018**, *9*(5), 1195-1214. DOI: 10.1021/acscchemneuro.8b00024. IF₂₀₁₈ = 3,861.

PXVII. Jończyk, J.; Lodarski, K.; Staszewski, M.; Godyń, J.; Zaręba, P.; Soukup, O.; Janockova, J.; Korabecny, J.; Sałat, K.; Malikowska-Racia, N.; Hebda, M.; Szałaj, N.; Filipek, B.; Walczyński, K.; Malawska, B.; Bajda, M. Search for multifunctional agents against Alzheimer's disease among non-imidazole histamine H3 receptor ligands. In vitro and in vivo pharmacological evaluation and computational studies of piperazine derivatives. *Bioorg. Chem.*, **2019**, *90*, 103084. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103084. IF₂₀₁₉ = 4,831.

PXVIII. Prati, F.; Bergamini, C.; Fato, R.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Bolognesi, M.L. Novel 8-hydroxyquinoline derivatives as multitarget compounds for the treatment of Alzheimer's Disease. *ChemMedChem*, **2016**, *11*(12), 1284-1295. DOI: 10.1002/cmdc.201600014. IF₂₀₁₆ = 3,225.

PXIX. Panek, D.; Więckowska, A.; Wichur, T.; Bajda, M.; Godyń, J.; Jończyk, J.; Mika, K.; Janockova, J.; Soukup, O.; Knez, D; Korabecny, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 125, 676-695. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.09.078. IF₂₀₁₇ = 4,816.

PXX. Panek, D.; Więckowska, A.; Jończyk, J.; Godyń, J.; Bajda, M.W.; Wichur, T.; Pasieka, A.; Knez, D.; Pislár, A.; Korabecny, J.; Soukup, O.; Sepsova, V.; Sabat', R.; Kos, J.; Gobec, S.; Malawska, B. Design, synthesis and biological evaluation of 1-benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-modifying multifunctional anti-Alzheimer's agents. *ACS Chem. Neurosci.*, **2018**, *9*(5), 1074-1094. DOI: 10.1021/acchemneuro.7b00461. IF₂₀₁₈ = 3,861.

PXXI. Chlebek, J.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Stepankova, S.; Pérez, D.I.; Hostalkova, A.; Opletal, L.; Cahlikova, L.; Macakova, K.; Kucera, T.; Hrabinoval, M.; Jun, D. In Vitro and in Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules*, **2019**, *24*(7), 1340. DOI: 10.3390/molecules24071340. IF₂₀₁₉ = 3,267.

PXXII. Hostalkova, A.; Marikova, J.; Opletal, L.; Korabecny, J.; Perez, I.D.; Hulcova, D.; Kunes, J.; Hrabinova, M.; Jun, D.; Novakova, L.; Kucera, T.; Andrisano, V.; Siatka, T. Cahlikova, L. Isoquinoline Alkaloids from *Berberis vulgaris* as Potential Lead Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.*, **2019**, *82*(2), 239-248. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00592. IF₂₀₁₉ = 3,779.

PXXIII. Sobolova, K.; Hrabínová, M.; Hepnarová, V.; Kucera, T.; Kobrlova, T.; Benkova, M.; Janockova, J.; Dolezal, R.; Prchal, L.; Benek, O.; Mezeiova, E.; Jun, D.; Soukup, O.; Korabecny, J. Discovery of novel berberine derivatives with balanced cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition profile. *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *203*, 112593. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112593. IF₂₀₁₉ = 5,572.

PXXIV. Kohelova, E.; Perinova, R.; Maafi, N.; Korabecny, J.; Hulcova, D.; Marikova, J.; Kucera, T.; Martine-Gonzalez, L.; Hrainova, M.; Vorcakova, K.; Novakova, L.; De Simone, A.; Havelek, R.; Cahlikova, L. Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules*, **2019**, 24(7), 1307. IF₂₀₁₉ = 3,267.

PXXV. Perinova, R.; Maafi, N.; Korabecny, J.; Kohelova, E.; De Simone, A.; Al Mamun, A.; Hulcova, D.; Markova, J.; Kucera, T.; Jun, D.; Safratova, M.; Marikova, J.; Andrisano, V.; Jenco, J.; Kunes, J.; Martinez, A.; Novakova, L.; Cahlikova, L. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorg. Chem.*, **2020**, *100*, 103928. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103928. IF₂₀₁₉ = 4,831.

PXXVI. Marikova, J.; Ritomska, A.; Korabecny, J.; Perinova, R.; Abdullah, Al M.; Kucera, T.; Kohelova, E.; Hulcova, D.; Kobrlova, T.; Kunes, J.; Cahlikova, L. Aromatic Esters of the Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Ambelline as Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *J. Nat. Prod.*, **2020**, *83*, 1359-1367. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00561. IF₂₀₁₉ = 3,779.

PXXVII. Hulcova, D.; Marikova, J.; Korabecny, J.;
Hostalkova, A.; Jun, D.; Kunes, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.;
De Simone, A.; Novakova, L.; Andrisano, V.; Ruzicka, A.;
Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus*
pseudonarcissus L. cv. Dutch Master as potential drugs
in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*,
2019, 165, 112055. DOI:
10.1016/j.phytochem.2019.112055. IF₂₀₁₉ = 3,044.

PXXVIII. Al Mamun, A.; Marikova, J.; Hulcova, D.; Janousek, J.; Safratova, M.; Novakova, L.; Kucera, T.; Hrabínová, M.; Kunes, J.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as a novel structural scaffold for Alzheimer's disease. *Biomolecules*, **2020**, *10*(5), 800. DOI: 10.3390/biom10050800. IF₂₀₁₉ = 4,082.

PXXIX. Nunes Lemes, L.F.; de Andrade Ramos, G.; de Oliveira, S.; R.da Silva, F.M.; de Castro Couto, G.; da Silva Boni, M.; Guimarães, M.J.; O. Souza, I.N.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; do Nascimento Nogueira, P.C.; Rocha Silveira, E.; Soukup, O.; Korabecny, J.; C. Romeiro, N.; G. Castro, N.; Bolognesi, M.L.; Soares Romeiro, L.A. Cardanol-derived AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *108*, 687-700. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.12.024. IF₂₀₁₆ = 4,519.

SIII. Zemek, F.; Sepsova, V.; Drtinova, L.; Nepovimova, E., Korabecny, J.; Kuca, K. Outcomes of Alzheimer's diseases therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin. Drug Saf.*, **2014**, 13(6), 759-774. DOI: 10.1517/14740338.2014.914168. IF₂₀₁₄ = 1,758.

SXV. Benek, O.; Korabecny, J.; Soukup, O. A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sciences*, **2020**, *41*(7), 434-445. DOI: 10.1016/j.tips.2020.04.008. IF₂₀₁₉ = 13,503.