

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**BIOSCAVENGERY JAKO PROFYLAKTIKA  
OTRAV ORGANOFOSFOROVÝMI  
INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Hradec Králové, 2009

Mgr. Lucie Musilová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Moje největší poděkování patří školiteli-specialistovi PharmDr. Danielovi Junovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, trpělivost, toleranci, pomoc a permanentní dobrou náladu při řešení této práce.

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za její milý přístup a za zaštitění mého studia na farmaceutické fakultě.

Ing. Kamilovi Kučovi, Ph.D. děkuji za nakažlivé pracovní nadšení a rady, Kamilovi Musílkovi, Ph.D. za poskytnuté reaktivátory, PharmDr. Janě Žďárové-Karasové, Martině Hrabinové a Petrovi Stodůlkovi za pomoc, dobré rady a pohodovou atmosféru v laboratoři, Ing. Markovi Linkovi, Ph.D. za provedení MS analýz, MVDr. Lád'ovi Novotnému, Ph.D. a Mgr. Honzovi Misíkovi za pomoc při *in vivo* experimentech a laboratorním potkanům že naše experimenty přežili.

Dále děkuji kolektivu katedry biochemických věd Faf UK, kolektivu katedry toxikologie a centra pokročilých studií FVZ UO a studentům, kteří se na těchto pracovištích také snažili tvořit výsledky do svých disertačních nebo diplomových prací za vytvoření přátelského prostředí.

Můj dík patří také francouzskému velvyslanectví v Praze za poskytnutí stipendia na obě stáže ve Francii.

Děkuji také kolektivu Département de Toxicologie Centre de Recherches du service de santé des armées v La Tronche, prof. Patrick Masson, IEF Florian Nachon, Ph.D., Dr. Frédérique Renault, Marita Pfutz, Dr. Daniel Rochu, Dr. Marie-Thérèse Froment, Mélanie Liodice, Emilie Gillon a Dr. Eugenie Carletti, že mi poskytli příležitost vykonat stáž na tomto skvělém pracovišti a naučit se spoustu nových věcí a za dodání enzymu fosfotriestery.

Děkuji i Dr. Zrinka Kovarik, Ph.D. a Dr. Maja Katalinic z Institute for Medical Research and Occupational Health v Záhřebu že mi umožnily přijet na stáž a poskytlly cenné rady.

Svým rodičům děkuji za podporu a toleranci, kterou mi po celou dobu studia prokazovali.

Práce prezentované v této disertační práci vznikly díky finanční podpoře z Výzkumného záměru MO0FVZ0000604 (Informační zabezpečení krizového managementu pro oblast zdravotnictví), grantu NATO CBP.EAP.CLG 983 024 (Butyrylcholinesterase and aldoximes - bioscavengers for detoxification of organophosphates) a grantu DGA 08co501 (Bioépurateurs catalytiques des neurotoxiques organophosphorés : Optimisation et Fonctionnalisation).

# OBSAH

Seznam zkratk	6
<b>1. ÚVOD</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Organofosforové inhibitory AChE</b>	<b>8</b>
2.1.1 Nervově paralytické látky (NPL)	8
2.1.2 Pesticidy	10
<b>2.2 Cholinergní přenos</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Mechanismus účinku OFI</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Klinický obraz intoxikace OFI</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Současná terapie a profylaxe otrav OF</b>	<b>16</b>
2.5.1 Antidotní výbava AČR	19
<b>2.6 Nové přístupy k profylaxi a terapii otrav OFI</b>	<b>20</b>
2.6.1 Bioscavengery	20
2.6.2 Reaktivátory AChE a BuChE	29
<b>3. CÍLE PRÁCE</b>	<b>31</b>
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Chemická modifikace PTE pomocí biokompatibilních polymerů, následná biochemická charakterizace vzniklých konjugátů a hodnocení jejich stability <i>in vitro</i></b>	<b>32</b>
4.1.1 Příprava a charakterizace konjugátů fosfotriesterasy s methoxy-polyethylen glykolem jako potenciální katalytický bioscavenger proti otravám organofosfáty	32
4.1.2 Hodnocení termální stability <i>in vitro</i> a podání nativní PTE a modifikované PTE <i>in vivo</i> a hodnocení farmakokinetiky a imunitní odpovědi u potkana	34
<b>4.2 Návrh a <i>in vitro</i> testování pseudokatalytických scavengerů organofosfátů na bázi cholinesterasy v kombinaci s oximovým reaktivátorem a hodnocení účinnosti vybraných oximových reaktivátorů na reaktivaci lidské erytrocytární AChE a plazmatické BuChE inhibovaných OFI</b>	<b>39</b>
4.2.1 Schopnost komerčně dostupných oximů reaktivovat lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu inhibovanou paraoxonem <i>in vitro</i>	39
4.2.2 Reaktivace lidské acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy inhibované paraoxonem vybranými oximy <i>in vitro</i>	41
4.2.3 Reaktivace acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy – význam v profylaxi otrav nervově paralytickými látkami	43
4.2.4 <i>In vitro</i> reaktivací účinnost komerčně dostupných oximů na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu inhibovanou organofosforovými pesticidy	44

4.2.5	Nové biskvarterní oximy – reaktivace AChE a BuChE inhibované paraoxonem	46
4.2.6	Nové nukleofilní sloučeniny s oximovou skupinou jako reaktivátory cholinesteras inhibovaných paraoxonem	47
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>SOUHRN</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>60</b>
9.1	Publikace vztahující se k tématu disertační práce (I. – VII.)	60
9.2	Seznam všech publikací	126
9.3	Seznam prezentací na vědeckých setkáních	127

## Seznam zkratek

AČR	Armáda České republiky
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChR	acetylcholinový receptor
BuChE	butyrylcholinesterasa
CaE	karboxylesterasa
CNS	centrální nervový systém
DFP	diisopropylfluorofosfát
Eq-BuChE	koňská butyrylcholinesterasa
FBS-AChE	fetální bovinní sérová acetylcholinesterasa
HEB	hematoencefalická bariéra
HPBP	lidský fosfát-vázající protein
Hu-BuChE	lidská butyrylcholinesterasa
ChE	cholinestrerasy
MPEG	methoxy-polyethylenglykol
MRT	mean residence time, čas setrvání léčiva v těle
NPL	nervově paralytické látky
OF	organofosfáty
OFI	organofosforové inhibitory
OP	organophosphate
PEG	polyethylenglykol
PON1	paraoxonasa 1
PTE	fosfotriesterasa
rHu-AChE	rekombinantní lidská acetylcholinesterasa
rHu-BuChE	rekombinantní lidská butyrylcholinesterasa

# 1. ÚVOD

Organofosforové inhibitory acetylcholinesterasy jsou velmi toxické chemické sloučeniny, které jsou ve velkém množství využívány v zemědělství jako pesticidy za účelem zvýšení hospodářské produkce. Do kontaktu s nimi přichází velké množství lidí a každý rok je zaznamenáno přibližně milion otrav a statisíce úmrtí v důsledku otravy, hlavně v rozvojových zemích. Přestože je používání vysoce toxických OFI jako chemických bojových látek zakázáno, byly tyto látky v minulosti několikrát zneužity. Z těchto důvodů je vývoj nových metod profylaxe a terapie intoxikací OFI stále aktuální. Současná profylaxe a terapie dokáže ochránit intoxikovaného jedince před letálními účinky OFI, ale nedokáže zabránit dalšímu toxickému působení OFI, které může mít za následek snížení výkonnosti, poruchy chování, ztrátu vědomí a možné trvalé poškození mozku.

Současný výzkum se zabývá vývojem nové skupiny antidot, tzv. biologických scavengerů („vychytávačů“) OFI, což jsou enzymy, které jsou schopny zlikvidovat molekuly OFI v krevním oběhu ještě dříve, než se dostanou na místo svého cílového toxického účinku (acetylcholinesterasa). Bioscavengery mohou být rozděleny podle funkčního principu na stechiometrické (jedna molekula enzymu váže 1 molekulu OFI), pseudokatalytické (kombinace stechiometrického bioscavengeru a reaktivátoru, obnovujícího aktivitu tohoto bioscavengeru) nebo katalytické (enzym štěpí OFI na netoxické produkty).

Tato disertační práce se zabývá možným využitím enzymu fosfotriesterasy jako katalytického bioscavengeru a dále návrhem a *in vitro* testováním pseudokatalytických scavengerů organofosfátů na bázi cholinesterasy v kombinaci s oximovým reaktivátorem.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Organofosforové inhibitory AChE

Jsou to organické sloučeniny fosforu. Sloučeniny podobné struktury se používají v zemědělství jako pesticidy (insekticidy), dále v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, pro nehořlavé úpravy materiálů, ve veterinární i humánní medicíně jako léčiva nebo jako experimentální sloučeniny pro výzkum nervových funkcí a některé z nich mohou být použity také jako bojové chemické látky s nervově paralytickým účinkem.

#### 2.1.1 Nervově paralytické látky (NPL)

NPL jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek. Jsou vysoce toxické, relativně stálé, jsou prakticky bez zápachu, mají rychlý nástup účinku a do organismu pronikají všemi branami vstupu (inhalačně ve formě par sliznicí dýchacích cest, perorálně se zamořenou potravou a vodou, spojivkami i neporušenou kůží). Syntéza NPL není složitá, je poměrně levná a jsou proto vojensky i teroristicky snadno použitelné. NPL byly poprvé syntetizovány ve 30. letech 20. století v Německu jako insekticidy a díky jejich toxicitě byly některé z nich zařazeny do výzbroje vybraných armád. Do popředí zájmu se tyto látky dostaly i v nedávné době také díky zneužití sarinu sektou Aum Shinrikyo v roce 1994 ve městě Matsumoto a v roce 1995 v Tokijském metru. Tyto incidenty si vyžádaly celkem 19 obětí a několik tisíc zasažených (1;2). Dále byly použity Irákem v iránsko-irácké válce (1983-1988).

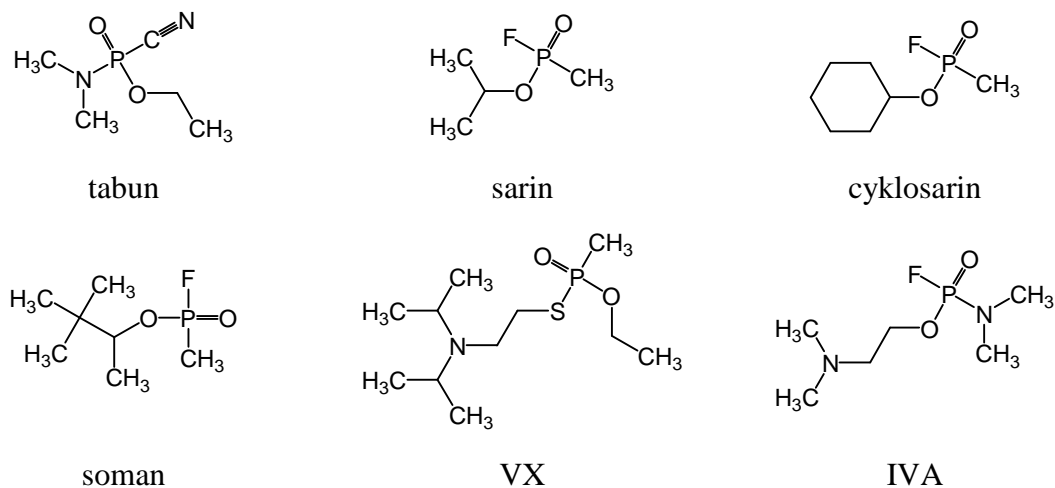
NPL jsou v literatuře děleny na dvě skupiny, které jsou označovány jako G-látky a V-látky. G-látky (podle „German“) byly původně syntetizovány v Německu ve 30. letech minulého století jako nové typy insekticidních přípravků, později však byly použity jako komponenty chemických zbraní. Jsou to bezbarvé těkavé kapaliny v čistém stavu bez zápachu, relativně dobře rozpustné ve vodě a výborně v organických rozpouštědlech. V terénu vydrží bez ztráty toxicity (v závislosti na látce a klimatických podmínkách) několik hodin až dní. Zástupci skupiny G-látek jsou tabun (GA – O-ethylmethylamidokyanofosfát), sarin (GB – O-isopropylmethylfluorofosfonát), cyklosarin (GF – cyklohexylmethylfluorofosfonát) a soman (GD – O-pinakolylmethylfluorofosfonát).



V-látky (podle „venom“) jsou bezbarvé kapaliny bez výraznějšího zápachu, ve vodě jsou špatně rozpustné, v organických rozpouštědlech a tucích jsou rozpustné dobře. Mají velmi nízkou těkavost a v terénu vydrží týdny až měsíce. Jsou toxicitější než G-látky, ve srovnání s nimi také lépe pronikají kůží. Zástupci této skupiny jsou látka VX (O-ethyl-S-(2-diisopropyl-aminoethyl)-methylthiofosfonát), která byla do výzbroje zavedena po 2. Světové válce a její struktura byla publikována až v roce 1974 a ruský analog této látky VR (O-isobutyl-S-(diethylaminoethyl)-methylthiofosfonát).

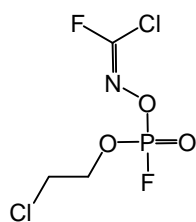
Látka se střední těkavostí a její analogy – označovány zkratkami GV, GP, IVA (intermediate volatility agent; dimethylamido-O-(2-dimethylaminoethyl)-fluorofosfonát) je svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobná ostatním NPL. V terénu vydrží déle než G-látky, ale kratší dobu než látka VX. Není známo, že by tuto látku měla některá z armád ve výzbroji (3-7).

Obr. 1: Chemické struktury vybraných NPL

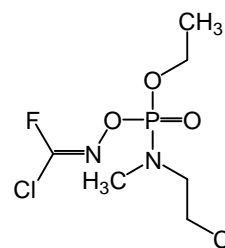


Během 80. - 90. let byla Ruskem vyvinuta skupina látek s názvem Novichok („nováček“), o kterých se hovoří jako o třetí a čtvrté generaci NPL a jsou údajně 10x toxicitější než látka VX (8). Struktury těchto látek nebyly však oficiálně potvrzeny a není známo, že by je nějaká armáda měla ve výzbroji.

Obr. 2: Předpokládané chemické struktury látek skupiny Novichok



Novichok 1 (A-230)



Novichok 2 (A-232)

NPL jsou jedny z nejtoxičtějších nízkomolekulárních látek. Jejich toxický účinek je možné vyjádřit hodnotou  $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ , což je koncentrace látky v daném objemu vzduchu, která při určité době expozice (1 min) vyvolá smrt ( $\text{LC}_{50}$ ) 50 % osob při inhalační expozici. Z tohoto hlediska má nejvyšší toxicitu látka VX, nižší soman a ještě nižší sarin. Látka VX je díky své lipofilitě vysoce toxická i při perkutánní expozici (3-7).

Tabulka 1: Toxicita některých NPL pro člověka

Látka	Inhalační toxicita $\text{LC}_{50}$ ( $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Perkutánní toxicita $\text{LD}_{50}$ pro člověka 70 kg(mg)
Sarin	150 - 1000	500 - 2000
Soman	70 - 500	500 - 1500
VX	15 - 40	10 - 60

V současné době je používání chemických zbraní zakázáno Úmluvou o zákazu chemických zbraní a o jejich zničení, jejíž poslední verze vstoupila v platnost 14. 1. 1997 (1).

### 2.1.2 Pesticidy

Více než 100 různých OF je používáno jako pesticidy (zejména s insekticidním účinkem) na celém světě. Jsou aplikovány asi na 95 procentech zemědělské půdy(9). OF jsou silné a velmi účinné insekticidy a v této skupině pesticidů jsou nejpočetnější skupinou používaných látek. Skupina OF pesticidů je dále dělena do několika chemických podtříd, jako jsou např. organofosfáty, organothiofosfáty, fosfonáty, fosfonthioáty apod. V důsledku expozice pesticidům dochází ročně až k miliónu případů otrav a tisícům úmrtí, zejména v zemích třetího světa (10). Jejich široké použití v zemědělské velkovýrobě i dostupnost pro maloodběratele dává možnosti náhodných,

profesionálních i suicidálních intoxikací, proto je léčba otrav organofosforovými sloučeninami stále vysoce aktuální. Zástupci používaných OF pesticidů jsou např. parathion, malathion, dichlorvos, demeton, diazinon, fosalon, chlorpyrifos, methamidofos, dimefox, leptofos-oxon a spousty dalších (11;12).

## 2.2 Cholinergní přenos

Cholinergní přenos nervového vzruchu je na synapsi zprostředkován chemickou látkou acetylcholinem (ACh). ACh slouží jako přenašeč (neuromediátor) na nervosvalové ploténce, v CNS a ve vegetativním nervovém systému na všech pregangliových, všech parasymptických postgangliových a některých sympatických postgangliových nervových zakončeních. Syntéza ACh probíhá v cytoplazmě nervového zakončení z exogenně dodávaného cholinu (z potravy), na který je navázána acetylová skupina z acetylkoenzymu A. Tato reakce je katalyzována enzymem cholinacetyltransferasou (EC 2.3.1.6). ACh je v buňce skladován v synaptických vezikulách, jejichž obsah je při přenosu nervového vzruchu uvolněn exocytózou do synaptické štěrbin. Uvolněný ACh se naváže na acetylcholinové receptory (AChR), což jsou membránové proteiny skládající se z několika podjednotek a nacházejí se na postsynaptické membráně ve vegetativních gangliích a orgánech inervovaných parasymptikem (srdce, hladké svaly oka, bronchů, močovodu, cév, trávicího ústrojí a žláz inervovaných parasymptikem). V klidovém stavu (nepřítomnost ACh) je AChR uzavřený. Po navázání ACh na AChR dojde ke konformační změně a v receptoru se otevře transmembránový kanálek, kterým začnou podle koncentračního spádu proudit ionty ( $K^+$  z buňky,  $Na^+$  do buňky) a vzniklý elektrický potenciál se šíří dále po nervovém vlákne jako elektrický impulz k další synapsi (3-7;13-16).

Receptory pro ACh jsou dvojího typu: nikotinové (N), které mohou být stimulovány nikotinem a muskarinové (M), které mohou být aktivovány alkaloidem muskarinem, u nichž můžeme rozlišit různé podtypy v závislosti na jejich chemické struktuře, lokalizaci, způsobu přenosu signálu a chemické selektivitě. N-receptory muskulární ( $N_M$ ) jsou lokalizované na nervosvalové ploténce, N-receptory neuronální ( $N_N$ ) na postsynaptické membráně ve vegetativních gangliích. Podjednotky N-receptorů tvoří svým uspořádáním iontový kanál pro kationy  $Na^+$ ,  $K^+$  a  $Ca^{2+}$ . Bylo identifikováno pět typů M-receptorů ( $M_1 - M_5$ ).  $M_1$ -receptory (neuronální) jsou lokalizovány v CNS, periferních neuronech a v parietálních buňkách žaludku a zprostředkovávají hlavně

excitační účinky ACh (pomalá stimulace v CNS, zvýšení sekrece HCl v žaludku). M<sub>2</sub>-receptory (kardiální) se nacházejí v srdci a v neuronálních tkáních (i hladkých svalech) a jsou odpovědné za inhibiční reakce (inhibice srdeční frekvence, presynaptická inhibice v centrálním i periferním nervovém systému). M<sub>3</sub>-receptory (žlázy/hladké svaly) zprostředkovávají především excitační účinky ACh a cholinergní stimulace (zvýšení sekrece bronchiálních, slinných a dalších žláz, kontrakce hladkých svalů vnitřních orgánů), v hladkých svalech cév však působí nepřímo relaxačně (uvolnění NO způsobuje vazodilataci). V CNS receptory zajišťují různé funkce včetně regulace korové excitability, paměti, učení, přenos bolestivých podnětů a ovlivňují kontrolu motoriky. Funkční význam receptorů M<sub>4</sub> a M<sub>5</sub> nebyl dosud přesně definován. M-receptory jsou spojeny s G-proteinem a podle typu G-proteinu dochází buď k aktivaci, nebo inhibici efektoru. Antagonistou všech typů M-receptorů je atropin, typ N<sub>M</sub> je antagonizován tubokurarinem, N<sub>N</sub> trimetafanem (13-15).

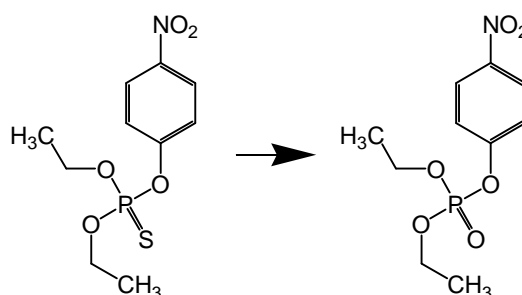
Molekula ACh je na receptor navázána v průměru 2 milisekundy a po disociaci je ACh okamžitě hydrolyzován specifickým enzymem acetylcholinesterasou (AChE, EC 3.1.1.7), která je lokalizována v těsné blízkosti receptoru, na cholin a acetát, nebo působením méně specifické sérové butyrylcholinesterasy (BuChE, EC 3.1.1.8). ACh je nejprve vázán kvarterním dusíkem na anionické místo (místo vázající cholin) enzymu a karboxylovou skupinou na esteratické místo AChE, vzniká komplex enzym-substrát. Odštěpením cholinu vzniká acetylovaný enzym, který reaguje s vodou na komplex enzym-kyselina a ten se spontánně rozpadá na enzym a kyselinu octovou. AChE je pak znovu připravena štěpit další molekuly ACh. Po rozložení ACh se receptor vrací do původního stavu, transmembránový kanálek se uzavře a aktivním transportem za dodání energie ve formě ATP (adenosintrifosfát) se obnoví původní iontové poměry. Cholin je pak aktivním transportním mechanismem recyklován do nervového zakončení, kde může být opět použit pro syntézu ACh (3;4;7;13-16).

### **2.3 Mechanismus účinku OFI**

OFI se vážou na hydroxylovou skupinu serinu v aktivním místě AChE a fosforylují jej a tím inhibují aktivitu AChE. Dialkylfosfáty a dialkylfosfonáty, které nemají volnou hydroxylovou skupinu na atomu fosforu, jsou acylační (fosforylační) inhibitory cholinesteras (ChE) a jiných serinových esteras. Na atom fosforu jsou navázány různé substituenty (většinou alifatické alkyly) a odstupující skupina je

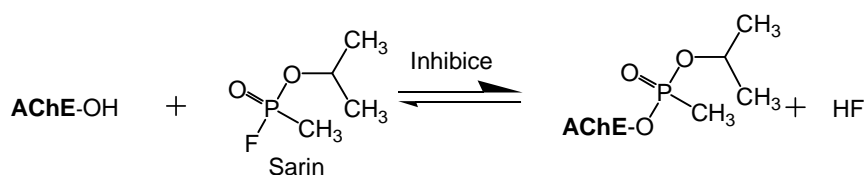
nejčastěji halogen (F), nitrilová skupina nebo substituovaný merkaptan. Z OF sloučenin s atomem síry navázaným dvojnou vazbou na fosfor (P=S) se stanou inhibitory ChE až po enzymatické oxidaci (cytochrom P450 a glutathion-S-oxidasa) této vazby na vazbu P=O v organismu. Příkladem mohou být dva pesticidy: parathion (který je oxidován na paraoxon) a malathion (který je oxidován na malaoxon).

Obr. 3: Metabolizace pesticidu parathion na paraoxon



Během inhibice se nejprve tvoří reverzibilní komplex enzym-OF. OF je na AChE nejdříve poután nekovalentními vazby a je vhodně orientován tak, aby mohlo dojít k vytvoření chemické vazby mezi atomem kyslíku enzymu a atomem fosforu inhibitoru. Vzniká fosforylovaný enzym za současného uvolnění odstupující skupiny (3;7;17).

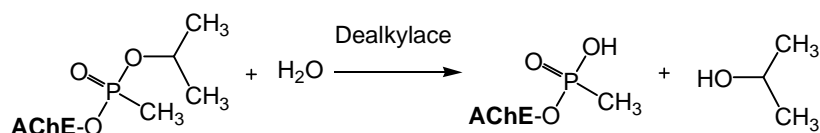
Obr. 4: Inhibice AChE sarinem



Čím větší je afinita OF k AChE a čím větší je rychlost přeměny komplexu enzym-OF na fosforylovaný enzym, tím silnější je OF inhibitor. Fosforylovaný enzym se vodou hydrolyzuje velmi pomalu a fyziologická funkce AChE je zablokována. Jedná se o ireverzibilní inhibici. Fosforylovaný enzym může podstoupit buď spontánní reaktivaci (obnovení aktivity) nebo dealkylaci, která se nazývá stárnutí neboli ageing komplexu enzym-OF. Proces dealkylace zahrnuje neenzymatické odštěpení jedné z alkoxylových skupin navázaných na fosfor účinkem vody ve formě alkoholu a je tím rychlejší, čím je alkoxy řetězec větší a rozvětvenější (18). Pokud k tomuto ději dojde,

alkylovaná AChE se stává nepřístupnou účinku reaktivátorů AChE (nereaktivovatelnou) a její aktivita se obnoví až po syntéze AChE *de novo*, která trvá necelých 6 dní u mozkové AChE (19), okolo 20 dní u synaptické AChE (20), a přibližně 120 dní u erytrocytární AChE (jako syntéza nového erytrocytu) (21). Nejrychleji probíhá dealkylace u AChE inhibované somanem (řádově minuty), u sarinu se udává řádově kolem 10 hodin a u V-látek dealkylace nebyla pozorována do 24 hodin. Tento děj probíhá jak v nervovém systému, tak i v krevním oběhu (erytrocytární AChE a plazmatická BuChE).

Obr. 5: Dealkylace (ageing) AChE inhibované sarinem



Fosforylovaná AChE nemůže vykonávat svoji fyziologickou funkci - hydrolyzovat ACh, který se tak hromadí na cholinergních synapsích a dochází k dlouhodobému nadměrnému dráždění receptorů a vzniká akutní cholinergní krize. Předpokládá se, že pouze 1-3 % z celkové dávky OF se dostane na místo toxického působení (AChE na cholinergních synapsích), zbytek je vyvázan ChE a dalšími enzymy v krevním oběhu (erytrocytární AChE, plazmatická BuChE, karboxylesterasy (CaE), albumin, paraoxonasa), které tak slouží jako přirozené scavengery, nebo detoxikován (22). OF dále reagují i s neurotoxickou esterasou, s hydrolasami jako je trypsin, chymotrypsin a s četnými serinovými peptidasami (např. prolylendopeptidasa), které hrají roli v tvorbě neuropeptidů a hormonů. Reakce OF se sekundárními cíli, esterasami, serinovými amidasami a peptidasami mohou být odpovědné za necholinergní subletální účinky OF a za chronickou toxicitu při expozici nízkým dávkám OF. Některé OF (soman či různé pesticidy) mohou tvořit depo v tukové tkáni a z ní jsou opět pozvolna vyplavovány (7;17;23-25). Podle nejnovějších poznatků tvoří OF vazbu s některými tyrosiny v molekulách dalších proteinů (např. albumin,  $\alpha$ -2-makroglobulin, složka 3 komplementu, transferin, tubulin,  $\alpha$ -1-antitrypsin, kinezin, apolipoprotein,  $\beta$ -podjednotka ATP-syntasy). Vazba OF na tyrosin enzymů nepodléhá ageingu a je velmi stabilní. Rychlost reakce je v porovnání s fosforylací či fosfonylací aktivního místa

cholinesteras několikanásobně nižší a proto se zmíněné biomolekuly tímto způsobem interakce výrazně nepodílejí na snížení toxicity OF v organismu (26).

## 2.4 Klinický obraz intoxikace OFI

Klinické příznaky akutní intoxikace OFI jsou způsobeny nadměrnou stimulací cholinergních receptorů. Symptomy intoxikace lze rozdělit na muskarinové, nikotinové a centrální.

Muskarinové příznaky (nadměrná stimulace muskarinových receptorů) se projevují miózou, poruchou akomodace spojenou s bolestí v očích, překrvením a otokem spojivek a nosní sliznice, zvýšeným pocením, slzením a sliněním (v důsledku nadměrné stimulace potních, slzných a slinných žláz), zvýšenou sekrecí bronchiálních žlázek a zúžením bronchů, dušností a pocitem tíže na hrudi, zvýšenou střevní peristaltikou (průjem až spontánní defekace), bolestmi až kolikovitého charakteru, nauceou, zvracením, častým močením, bradykardií a poklesem krevního tlaku.

Nikotinové příznaky (nadměrná stimulace nikotinových receptorů na nervosvalových ploténkách a sympatických gangliích) jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem a záškuby příčně pruhovaných svalů. Dále se vyskytují tonicko-klonické křeče, které mohou skončit až ochrnutím (paralýzou) kosterních a dýchacích svalů.

Centrální příznaky se projevují závratěmi, napětím, úzkostí, neklidem, emoční labilitou, zmateností, depresivními stavy, poruchami hybnosti, depresi dechových a kardiovaskulárních center v prodloužené míše až bezvědomím. Těžké intoxikace mohou skončit smrtí v důsledku poruchy funkce dechových center a paralýzy dýchacích svalů včetně bránice. Vzniklá akutní respirační insuficience vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce.

Po překonání akutní cholinergní krize trpí intoxikovaný jedinec celkovým metabolickým rozvratem (důsledek dlouhodobé hypoxie a acidózy). Neurologické a neuropsychické poruchy (zvýšená únava, poruchy spánku, emoční labilita, úzkost, deprese, poruchy paměti, koncentrace a učení) mohou přetrvávat celé měsíce po intoxikaci OFI. Komplikací otrav OFI může být remise otravy způsobená vyplavením OFI z depotních míst (např. somanu z tukové tkáně), nebo uvolněním OFI z vazby na proteiny krevní plazmy.

### Pozdní neurotoxický efekt

Některé OFI (např. tri-o-kresylfosfát) způsobují stav zvaný pozdní neurotoxický efekt. Tento stav se projevuje až za několik dnů nebo týdnů po expozici OFI. Jedná se o motorické a senzorické poruchy, histologické změny v periferních neuronech (degenerace axonů a myelinu), inhibicí a dealkylací tzv. neurotoxické esterasy. Klinický průběh je charakterizován ve 30-40 % příznaky akutní otravy OFI, poté následuje bezpříznakové období latence (8 dní až 1 měsíc). Toto období je vystřídáno fází cholinergního dráždění (asi 30 % postižených), vyskytují se bolesti až parestezie končetin (všichni postižení trpí bolestmi až křečemi v lýtkách). Během několika hodin následuje obrna volných pohybů, která se postupně zhoršuje. Paralýza trvá 1-2 měsíce, poté nastává stadium denervace a vzniká těžká atrofie svalů končetin (2-6 měsíců). Může dojít i k částečnému zlepšení, ale rekonvalescence bývá dlouhá (roky) (4;7).

## **2.5 Současná terapie a profylaxe otrav OF**

Terapie otravy OFI zahrnuje podání antidot (látek, které zabraňují toxickému účinku OFI), zamezení dalšího průniku toxické látky do organismu (opuštění zamořeného prostoru, odmoření zasažených míst, výplach žaludku s přísadou aktivního uhlí v případě perorální otravy) a zabezpečení základních životních funkcí (umělé dýchání při zástavě dechu, nepřímá masáž srdce při zástavě srdeční činnosti). Antidotní terapie se skládá z podání anticholinergik a reaktivátorů AChE a bývá doplněna antikonvulzivní terapií.

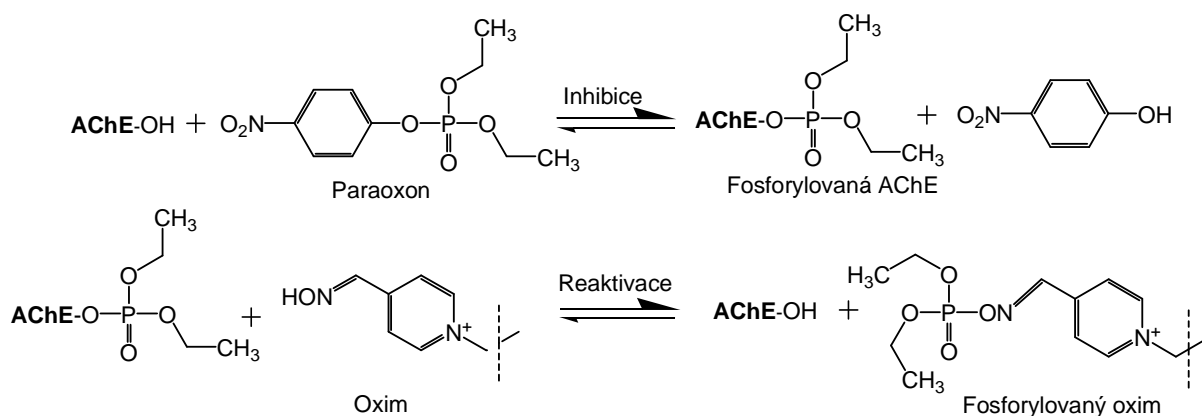
Anticholinergika jsou funkční neboli symptomatická antidota, zabraňující účinkům nahromaděného ACh na cholinergní receptory. Nejpoužívanějším léčivem z této skupiny je atropin. Atropin blokuje stimulační působení ACh na periferních muskarinových receptorech, ale je málo účinný na nikotinových receptorech a špatně proniká přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (24). Podává se intramuskulárně nebo intravenózně v dávce 2-4 mg po 10-30 minutových intervalech až do prvních příznaků atropinizace (rozšíření zornic, zčervenání pokožky, suchost sliznic, tachykardie). Po zasažení určitými NPL (sarin, soman) je výhodné podat kombinaci atropinu a anticholinergik s centrálním antimuskarinovým účinkem, jako je např. benaktyzin.

Reaktivátory AChE jsou kauzální antidota, která mají schopnost obnovovat (reaktivovat) aktivitu AChE inhibované OF. Oximy reaktivují fosforylovanou AChE tím, že uvolní navázaný OF z aktivního místa enzymu díky své vysoké afinitě k enzymu



a silné nukleofilně. V průběhu reaktivačního procesu dochází k tvorbě defosforylovaného enzymu a fosforylovaného oximu a k obnově aktivity enzymu. Rychlost reaktivace závisí na struktuře OF fosforylujícího aktivního místa AChE, na druhu enzymu, na struktuře a koncentraci oximu a také na rychlosti dealkylace zbytku OF v aktivním místě enzymu (ageing). Fosforylované oximy vznikající během reaktivace mohou být silné inhibitory cholinesteras, což může způsobit opětovnou inhibici reaktivovaného enzymu, jsou však velmi nestálé. Fosforylované oximy s aldoximovou skupinou v poloze 2 mají poločas rozpadu kratší než 1 minuta, zatímco fosforylované oximy s aldoximovou skupinou v poloze 4 mají poločas rozpadu delší než 60 minut (17;27). Oximy se vážou na AChE jako reverzibilní kompetitivní inhibitory a tvoří s AChE komplexy buď na aktivním místě nebo na alosterickém místě nebo na obou a chrání tak AChE před fosforylací. Toho se využívá při profylaxi před otravou OF (viz níže). Reaktivátory AChE mají podobnou strukturu, lišící se počtem pyridiniových kruhů, počtem a pozicí oximových a dalších skupin (karbamoylová apod.) a délkou spojovacího řetězce. Nejběžnějšími používanými reaktivátory jsou pralidoxim, trimedoxim, obidoxim, methoxim a oxim HI-6 (28).

Obr. 6: Reaktivace AChE inhibované OF paraoxon



Pralidoxim (2-PAM) je monokvarterní oxim účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem a látkou VX, ale nedostatečně účinný na AChE inhibovanou tabunem a somanem. Špatně proniká hematoencefalickou bariérou do CNS. Je to jediný používaný monopyridiniový oximový reaktivátor. V antidotní výbavě ho mají např. armády Velké Británie a USA.

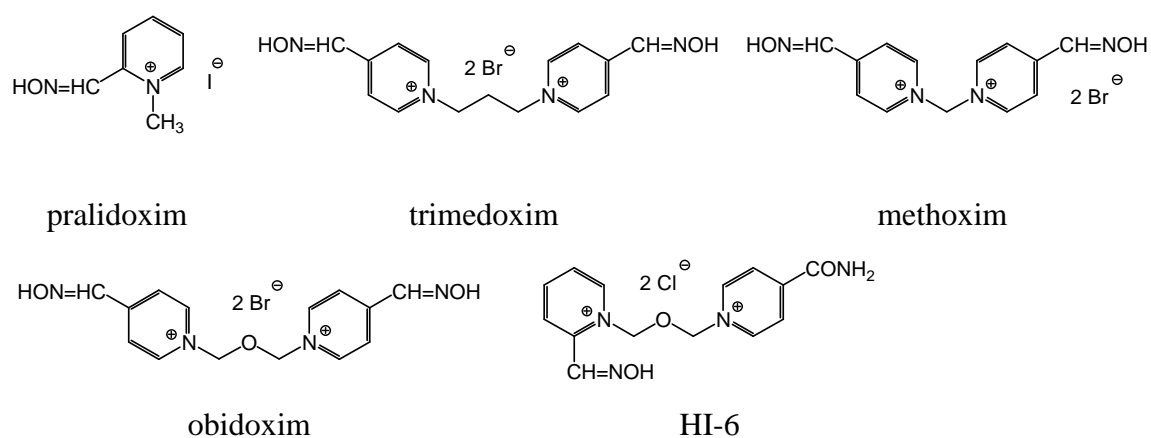
Trimedoxim (TMB-4) je bispyridiniový oxim, u kterého byla prokázána schopnost léčit zvířata experimentálně intoxikovaná tabunem, sarinem a látkou VX, ale ne somanem. Má ze všech používaných reaktivátorů nejvyšší toxicitu.

Obidoxim (LüH-6, Toxogonin) je dobrý reaktivátor AChE inhibované tabunem, sarinem a látkou VX, ale ne somanem. K jeho nežádoucím účinkům patří hepatotoxicita, ale je méně toxický než trimedoxim. V antidotní výbavě armády má obidoxim např. Česká republika, Německo, Finsko, Norsko a Nizozemsko. Toxogonin (od německého výrobce Merck) je jediným registrovaným antidotem otrav OFI pro civilní použití v ČR.

Methoxim (MMB-4) je zařazen do antidotní výbavy Armády České republiky (AČR) ve formě injekčního přípravku RENOL. Je účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem, cyklosarinem, VX a VR (29-31).

Oxim HI-6 je účinný při reaktivaci AChE inhibované somanem a také sarinem a látkou VX. Dle dostupných údajů je však jeho účinnost u reaktive AChE inhibované tabunem nedostatečná. HI-6 má ze všech dříve jmenovaných oximů nejnižší toxicitu. HI-6 je součástí antidotní výbavy Švédska a Kanady, České republiky (viz níže) a v současné době se připravuje jeho zavedení v AČR ve formě tříkomorového autoinjektoru. Oxim HI-6 je v současnosti využíván nejčastěji ve formě dichloridové soli, je však snaha nahradit tuto sůl dimethansulfonátem, který má oproti dichloridu výhodnější vlastnosti, zejména vyšší stabilitu a lepší rozpustnost při nižších teplotách (32).

Obr. 7: Chemické struktury vybraných reaktivátorů



Podání anticholinergik a reaktivátorů AChE je obvykle doplněno antikonvulzivní terapií z důvodu potřeby zabránit vzniku záchvatů v CNS, které vedou k tonicko-klonickým generalizovaným křečím a následnému poškození CNS. Lékem volby je diazepam, který se podává intramuskulárně v dávce 10 mg (7;33).

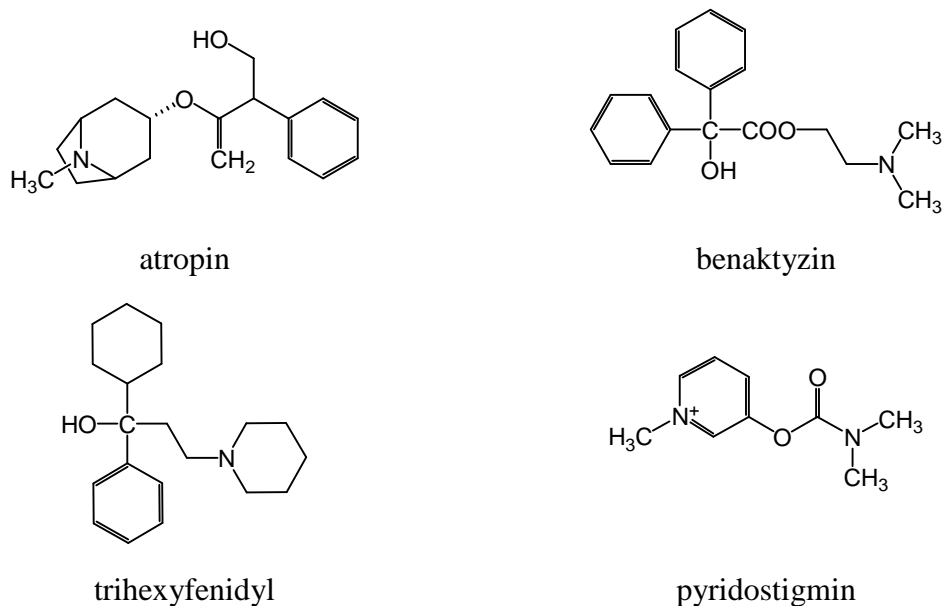
### **2.5.1 Antidotní výbava AČR**

AČR má k dispozici profylaktická a terapeutická antidota. Profylaxe je podávána při předpokladu následné expozice organismu NPL a je realizována podáním přípravku PANPAL, který se skládá z tablety A (anticholinergika benaktyzin 0,8 mg a trihexyfenidyl 0,6 mg) a z tablety B (pyridostigmin 35 mg). Karbamát pyridostigmin je reverzibilní inhibitor AChE sloužící k dočasné ochraně AChE před následným účinkem NPL. Špatně proniká přes hematoencefalickou bariéru. Benaktyzin a trihexyfenidyl jsou anticholinergní látky s převahou centrálního účinku, které slouží k odstranění rizika nežádoucích účinků pyridostigminu, možnému zvýšení dávky pyridostigminu a k oslabení centrálních účinků NPL. Dalším profylaktikem je přípravek TRANSANT s obsahem oximu HI-6 (0,8 g). Jedná se o 2 transdermální náplasti, ze kterých se HI-6 vstřebává přes kůži po dobu až 8 hodin. Přípravek je určen pro podání osobám, které jsou vystaveny riziku intoxikace NPL v rámci válečného konfliktu nebo při likvidaci zásob bojových chemických látek a může být použit rovněž jako součást medikamentózní léčby při následném léčení otrav NPL.

Pro první pomoc formou svépomoci a vzájemné pomoci je v AČR zaveden autoinjektor COMBOPEN s obsahem obidoximu (220 mg) a atropinu (2 mg) a autoinjektor s diazepamem (5 mg).

Pro lékařskou pomoc má AČR k dispozici antidota na bázi anticholinergik CHONOL I s obsahem atropinu (4 mg) a CHONOL II s obsahem benaktyzinu (10 mg), dále antidota na bázi reaktivátorů AChE RENOL obsahující methoxim (1,0 g) a ANTIVA obsahující HI-6 (0,8 g) (7).

Obr. 8: Chemické struktury anticholinergik a reverzibilního inhibitoru AChE pyridostigminu



## 2.6 Nové přístupy k profylaxi a terapii otrav OFI

### 2.6.1 Bioscavengery

Současná terapie a profylaxe otrav OFI dokáže ochránit intoxikovaného jedince před letálními účinky OFI. Je však svým působením primárně zaměřena na léčbu projevů intoxikace spojených s inhibicí AChE, která ačkoliv může způsobit bezprostřední ohrožení života, není jedinou molekulou v těle, jejíž funkce je ovlivněna reakcí s OFI. Díky tomu má uvedený přístup své nedostatky. Nedokáže zabránit dalšímu toxickému působení OFI, které může mít za následek snížení výkonnosti, poruchy chování, ztrátu vědomí a možné trvalé poškození mozku. Současná léčba neumožňuje zvýšení dávek podávaných léků, protože mají ve vyšších dávkách nepřijatelné nežádoucí účinky. Pokud navíc dojde k ageingu fosforylované AChE, stávají se oximové reaktivátory neúčinné. Z těchto důvodů se výzkum zaměřuje na alternativní přístupy terapie a profylaxe otrav OFI. Jeden z těchto alternativních přístupů je zaměřen na ochranu AChE před inhibicí. Současný výzkum se zabývá identifikací proteinů, které mohou působit jako biologické scavengery („vychytávače“) OF a které si zachovají stabilitu v krevním oběhu po co nejdelší dobu. Tyto bioscavengery jsou schopny neutralizovat molekuly OF v krevním oběhu ještě dříve, než se dostanou na místo svého toxického účinku (molekuly AChE na

cholinergních synapsích). Funkce bioscavengeru by měla být rychlá, ireverzibilní a specifická. V ideálním případě by bioscavenger měl dostatečně dlouho vydržet v krevním oběhu, za nepřítomnosti OFI by měl být biologicky neškodný a neměl by vyvolávat imunitní odpověď. Bioscavengery mají také několik technologických omezení. Enzym musí být rychle dostupný ve velkém množství, musí být aktivní proti širokému spektru OF, musí vykazovat termální stabilitu a být stabilní v různých klimatických podmínkách bez ztráty aktivity a také je potřeba vyvinout vhodný způsob aplikace. V neposlední řadě jsou také důležité ekonomické aspekty průmyslové výroby těchto proteinů, které mají status „orphan drugs“ (25). Bioscavengery fungují, jak již bylo popsáno výše, buď stechiometricky (vážou nebo vychytají OF), pseudokatalyticky (aktivita stechiometrického bioscavengeru je kontinuálně obnovována vhodnou látkou) nebo katalyticky (štěpí OF substrát na biologicky inertní produkty).

Enzymy jsou využívány v terapii (jako biofarmaka) už řadu let. Mají četné výhody jako je specifita, katalytická účinnost a postrádají vážné nežádoucí účinky.

### **Stechiometrické bioscavengery**

Zahrnují přirozeně se vyskytující lidské proteiny - cholinesterasy (AChE a BuChE) a karboxylesterasy. Jsou to enzymy, které reagují s OF, ale nekatalyzují jejich hydrolýzu. Stechiometrické bioscavengery jsou schopny vázat jednu molekulu OF na jednu molekulu proteinu. V uplynulých letech bylo testováno použití exogenně podané AChE, BuChE i CaE.

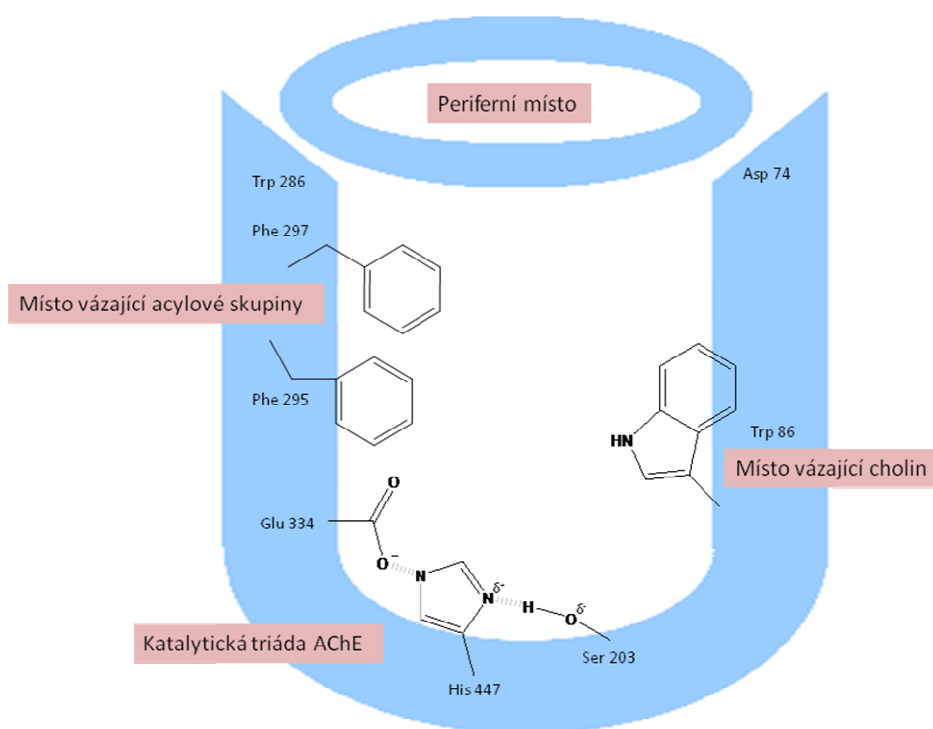
### **Cholinesterasy (ChE)**

ChE jsou serinové  $\alpha/\beta$  hydrolasy katalyzující hydrolýzu esterové vazby. ChE se liší v substrátové specifitě a citlivosti na inhibitory. Na základě svých katalytických vlastností rozlišujeme u člověka dva typy ChE. Acetylcholinesterasa přednostně hydrolyzuje malé substráty jako je ACh a butyrylcholinesterasa (zvaná také pseudocholinesterasa nebo nepravá cholinesterasa) je schopna hydrolyzovat objemnější substráty jako je butyrylcholin.

Na základě provedených krystalografických studií AChE z různých živočišných druhů byla podrobněji poznána struktura aktivního místa tohoto enzymu. Vlastní aktivní místo se nachází na dně prohlubně ve tvaru úzkého hrdla, která je z poloviny zanořena v molekule enzymu a je lemována aminokyselinami s hydrofobními postranními řetězci. Jeho hloubka je relativně velká, okolo 20 Å (2 nm). Studium vzájemných interakcí AChE s jejími modulátory bylo v této oblasti nalezeno několik charakteristických míst,

podílejících se významně na těchto interakcích. Jejich struktura je při mezidruhovém srovnání poměrně konzervována, zejména hlavních 14 aminokyselin tvořících hrdlo. Například struktura lidské AChE je z 84 % totožná se strukturou enzymu *Torpedo californica* (34). Aktivní místo lidského enzymu, vzdálené přibližně 4 Å (0,4 nm) od spodní části hrdla, se skládá ze čtyř hlavních částí: (1) z katalytické triády, což je oblast kde dochází ke štěpení substrátu a je složena z aminokyselin Glu 334, His 447 a Ser 203; (2) kapsy, kde dochází k nekovalentní vazbě acylových skupin, složené z aromatických aminokyselin Phe 295 and Phe 297; (3) podjednotky vázající cholin (nazývané v literatuře také také „anionické místo“), složené z Trp 86, Glu 202 a Tyr 337 a (4) periferního místa, skládajícího se z aminokyselin Trp 286, Tyr 72, Tyr 124 a Asp 74 (35).

Obr. 9: Struktura aktivního místa AChE (volně podle (35))



Kromě těchto míst se v AChE se dále nacházejí ještě dvě další významné oblasti, interagující s modulátory. Je to zejména místo zahrnující aminokyseliny Trp 86, Tyr 133, Tyr 337 a Phe 338, kde dochází dle typu přítomného modulátoru k převážně hydrofobním interakcím a tzv. oxianionická prohlubeň, složená z Gly 121, Gly 122 a Ala 204, kde dochází ke stabilizaci tranzitního stavu ACh v průběhu jeho štěpení (36).

Zajímavé je, že struktura hrdla nezahrnuje kladně nabitě substituenty, jak by se dalo s ohledem na strukturu ACh předpokládat. Číslování aminokyselin aktivního místa přirozeně závisí na živočišném druhu, ze kterého enzym pochází.

Struktura BuChE je podobná struktuře AChE (je ze 73 % homologní a z 54 % identická), liší se zejména nepřítomností místa vázajícího cholin (37)

Funkcí **AChE** je ukončení účinku ACh na postsynaptických membránách a neuromuskulárním spojení. Hydrolýza neuromediátoru ACh acetylcholinesterasou je jedna z nejrychlejších známých enzymatických reakcí (až 5000 molekul ACh za sekundu). AChE se vyskytuje na cholinergních synapsích a nervosvalových ploténkách, v kostech a také vázáná na vnější membráně erytrocytů. Dále se vyskytuje např. v elektrickém orgánu paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*; electric eel) a parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*). Její molekulová hmotnost je 70-75 kDa (monomer). Vyskytuje se v organizmech buď v globulární formě jako monomer, dimer nebo tetramer nebo v asymetrické formě složené až z 12 podjednotek, které jsou přichyceny na kolagenové vlákno. Cholinesterasy se mohou vyskytovat v rozpustné formě nebo přichycené na membránu pomocí glykolipidického řetězce (38). AChE je méně glykosylovaná než BuChE a dochází u ní k inhibici přebytkem substrátu (ACh). Selektivními inhibitory AChE jsou alkaloid huperzin A a biskvartrení sloučenina BW284C51 (1,5-bis-(4-allyldimethylamoniumfenyl)penta-3-on dibromid).

Inhibice AChE se využívá v terapii a prevenci pooperačních atonií trávicího ústrojí a močových cest, k vyvolání miózy a snížení nitroočního tlaku při glaukomu, jako antidota periferních kompetitivních myorelaxancií, k symptomatice léčbě Alzheimerovy choroby (rivastigmin, donepezil, galantamin) a k léčbě při myasthenia gravis. Používají se krátkodobé reverzibilní inhibitory AChE, které účinkují jako nepřímě působící parasymptomimetika (edrofonium, neostigmin, pyridostigmin, ambenonium, fyzostigmin) (13).

**BuChE** je syntetizována v játrech a vyskytuje se v různých tkáních obratlovců (plazma, játra, střevo, pankreas, srdce, mozek), ale její fyziologická role není dosud plně objasněna. BuChE je schopná hydrolyzovat nebo vyvázat celou řadu toxických esterů včetně heroinu, kokainu, prokainu, karbamátů a OF. Hydrolyzuje také krátkodobě působící periferní myorelaxancia sukcinylcholin (suxamethonium) a mivakurium. V důsledku genetického polymorfismu mají někteří jedinci nižší aktivitu BuChE (atypická BuChE) a svalová paralýza po podání myorelaxancií u nich může místo 2-6 minut přetrvávat až několik hodin (13;39;40).

V rámci výzkumu využití bioscavengerů v profylaxi a terapii otrav OF byla provedena již řada studií.

Bylo testováno *in vivo* podání fetální bovinní sérové AChE (FBS-AChE) myším a opicím a bylo zjištěno, že premedikace FBS-AChE poskytuje ochranu před několikanásobnými LD<sub>50</sub> OF (41;42). Dále byla porovnána farmakokinetika nativní a rekombinantní AChE (bovinní, opičí a lidské) a zároveň bylo prokázáno, že cílená konjugace (pegylace) molekul polyethylenglykolu (PEG) s molekulami lysinu na povrchu rekombinantní lidské AChE (rHu-AChE) vede ke vzniku aktivního enzymu s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi. Pegylace AChE měla za následek prodloužení doby existence enzymu v krevním oběhu a přispěla ke snížení imunologické odpovědi, která se vyskytuje po opakovaném podání AChE. V *in vivo* studii měla tato pegylovaná AChE schopnost ochránit zvířata před letální dávkou (2,5 LD<sub>50</sub>) somanu a poskytovala vyšší úroveň ochrany než nativní AChE (43).

Dále bylo testováno podání koňské BuChE (eq-BuChE) opicím, které byly intoxikovány somanem a sarinem (44). Podaná BuChE poskytla ochranu před několikanásobnými LD<sub>50</sub> NPL. Protože opakované podání proteinu z jiného živočišného druhu může způsobit problémy díky reakci imunitního systému, vědecké úsilí se zaměřilo na testování lidské plazmatické BuChE (Hu-BuChE), s cílem získat bioscavenger, který bude mít minimální fyziologické, imunologické a psychologické nežádoucí účinky při podání člověku. Eliminační poločas Hu-BuChE u morčat a opic byl 70-75 hodin (45). Saxena et al měřili stabilitu plazmatické Hu-BuChE *in vitro* a zjistili, že lyofilizovaný enzym se dá skladovat 24 měsíců, při 4, 25 nebo 37°C a po rekonstituci je aktivní *in vivo* (46). Hu-BuChE podaná v 10x vyšší dávce než je potřebná pro ochranu proti 5 LD<sub>50</sub> somanu nezpůsobuje žádné poruchy chování. Celkovým závěrem těchto studií je, že Hu-BuChE je bezpečný a účinný bioscavenger. V současné době je Hu-BuChE produkována společností Baxter Healthcare Corporation a v USA byly provedeny dvě klinické hodnocení (první fáze) podání Hu-BuChE. Obě studie byly dvojitě zaslepené a placebem kontrolované. První studie měla za cíl hodnocení bezpečnosti, tolerance a farmakokinetiky intravenózně podané jediné dávky Hu-BuChE zdravým dospělým dobrovolníkům. Do studie mělo být zaregistrováno 28 dobrovolníků, kteří byli náhodně přiřazeni (randomizace) do skupin a každá skupina dostala jednu ze tří možných dávek Hu-BuChE nebo placebo intravenózní infuzí (46;47). Účelem druhé klinické studie, která probíhala současně s první studií, bylo hodnocení bezpečnosti, tolerance a farmakokinetiky intramuskulárně podané jediné



dávky Hu-BuChE zdravým dospělým dobrovolníkům. Do této studie mělo být zaregistrováno 8 dobrovolníků (48). Výsledky těchto studií nebyly ještě publikovány. Hu-BuChE se získává z prošlé lidské krve a celková dostupnost závisí na množství prošlé krve, která je zrovna k dispozici. Protože zásoby krve závisí na počtu dárců krve a krev je potřeba hlavně pro jiné účely, byla snaha získat Hu-BuChE z rekombinantních zdrojů. Takové zdroje mohou zabezpečit dostatečný přísun enzymu stejné čistoty a aktivity. V USA byla společností Nexia Biotechnologies vyvinuta produkce rekombinantní Hu-BuChE (rHu-BuChE) z mléka transgenních koz. Tento produkt je znám pod názvem Protexia™. Tato rHu-BuChE má velmi podobnou účinnost jako Hu-BuChE získávaná z lidské plazmy, ale její struktura se od Hu-BuChE liší jiným typem glykosylace a vyskytuje se v mléce transgenních koz jako monomer nebo dimer, kdežto plazmatická Hu-BuChE je ve formě tetrametru. Důsledkem těchto rozdílů je jiný farmakokinetický profil rHu-BuChE a kratší poločas v krevním oběhu. Molekula rHu-BuChE byla proto modifikována připojením několika molekul PEG a její farmakokinetický profil byl velmi podobný plazmatické Hu-BuChE (49;50). V USA byla provedena klinická studie (také první fáze), hodnotící bezpečnost, toleranci, farmakokinetiku a imunogenicitu intramuskulárního podání přípravku Protexia™ zdravým dobrovolníkům. Klinické hodnocení je dvojité zaslepené a placebem kontrolované a zadavatelem je společnost PharmAthene. Do studie bylo zařazeno 32 dobrovolníků, kteří byli rozděleni do 5 skupin. Dobrovolníci z první skupiny dostali jednu dávku 50 mg Protexia, z druhé skupiny jednu dávku 100 mg Protexia, ze třetí skupiny dvě dávky po 250 mg (1. a 72. den), ze čtvrté skupiny jednu dávku 500 mg a z páté skupiny jednu dávku 750 mg Protexia (51). Výsledky klinického hodnocení nebyly dosud publikovány.

Model stechiometrického bioscavengeru byl u laboratorních zvířat funkční, má však nevýhodu, že rozsah ochrany během expozice OFI je přímo úměrný koncentraci nezreagovaného aktivního bioscavengeru v krevním oběhu. Protože molekulová hmotnost proteinového bioscavengeru je v rozmezí 60-80 kDa a molekulová hmotnost OFI je okolo 180 Da, je hmotnostní poměr bioscavenger:OFI přibližně 500:1. Z toho vyplývá, že pro ochranu před několikanásobnými LD<sub>50</sub> OFI je nezbytná přítomnost poměrně vysoké koncentrace bioscavengeru v oběhu.

Potřebnou velkou dávku bioscavengeru by mohlo být možné snížit současným podáním vhodného oximového reaktivátoru. Podání oximu by mohlo umožnit nepřetržitou reaktivaci bioscavengeru, jehož účinek by se změnil ze stechiometrického

na pseudokatalytický a bioscavenger by byl schopný neutralizovat daleko více OF. Přitom by byl spotřebováván pouze reaktivátor, jehož cena je pouze malým zlomkem předpokládané ceny u komerčně dostupného bioscavengeru.

**Pseudokatalytické bioscavengery** se tedy skládají z kombinace cholinesterasy a vhodného oximového reaktivátoru. Doctor et al provedl experiment, při kterém myším premedikovaným FBS-AChE podal ihned po expozici sarinu reaktivátor HI-6. Ukázalo se, že podání HI-6 po premedikaci FBS-AChE zvýšilo účinnost bioscavengeru proti sarinu *in vivo* z poměru 1:1 (samotná AChE) na 65:1 (52).

Protože jako vhodný bioscavenger se jeví BuChE, byly provedeny experimenty zabývající se reaktivací BuChE s cílem vytvořit pseudokatalytický scavenger založený na kombinaci BuChE a oximu (53). Najít vhodný oxim, který by byl schopný v dostatečné míře reaktivovat BuChE inhibovanou OFI, se ale zatím nepodařilo. Je proto potřeba navrhnout a zkoumat nové oximové reaktivátory, které by tuto schopnost měly (54;55).

**Katalytické bioscavengery** zahrnují enzymy jako je lidská paraoxonasa 1 (HuPON 1; aryldialkylfosfatasa, EC 3.1.8.1) a bakteriální fosfotriesterasa (PTE; EC 3.1.8.1). U olivně obecné (*Loligo vulgaris*) byl objeven enzym DFPasa (diisopropylfluorofosfatasa, EC 3.1.8.2). Tyto enzymy jsou nazývány fosfotriesterasy, organofosforové hydrolasy, organofosfáty-degradující enzymy, parathion hydrolasy nebo paraoxonasy. Dále do skupiny katalytických bioscavengerů patří i mutanti cholinesteras, které po cílené mutaci ve své aminokyselinové struktuře získaly schopnost štěpit OF (např. mutant BuChE G117H). Jiná třída enzymů schopných degradovat NPL jsou prolidasy (EC 3.4.13.9), které byly identifikovány u mikroorganismů druhu *Alteromonas haloplanktis* a také lakasa (EC 1.10.3.2) z houby hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*). Výše jmenované enzymy mají schopnost hydrolyzovat molekuly OF. Geny pro hydrolýzu OF, *opd* (organo phosphate degradation), byly nalezeny u bakterií *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium sp.* a *Agrobacterium radiobacter*, lokalizovány na extrachromozomálním plazmidu.

Použití katalytických bioscavengerů je výhodné díky nižším potřebným dávkám (nižší koncentraci v krevním oběhu, které jsou dostatečné pro detoxifikaci velké dávky OFI (jako při akutní expozici).

Nejaktivnější OF štěpící enzym je **fosfotriesterasa**, která byla izolována z bakterií druhu *Pseudomonas diminuta* a z půdních bakterií *Flavobacterium*. Patří do skupiny amidohydrolas, ale její evoluční původ je nejasný (18). U archebakterií *Sulfolobus solfataricus* a *Sulfolobus acidocaldarius* byla nalezena termofilní forma PTE (56). Nativní forma PTE je dimerický metaloenzym se dvěma atomy zinku a s molekulovou hmotností 36 kDa/monomer. Atomy  $Zn^{2+}$  v aktivním místě mohou být substituovány za atomy  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , nebo  $Ni^{2+}$  aniž by enzym ztratil svoji katalytickou aktivitu. PTE obsahující atomy  $Co^{2+}$  je nejúčinnější, ale nejméně stabilní isoforma a v nižší koncentraci musí být stabilizována proteinovým prostředím. Inkubace PTE s různými chelatačními činidly, jako je např. EDTA, má za následek inaktivaci enzymu. Rekombinantní PTE je nyní produkována pomocí různých expresních systémů (*Escherichia coli*). Přírodní substrát PTE není dosud známý. PTE hydrolyzuje zejména OF triestery a byla zaznamenána slabá smíšená esterasová a laktonasová aktivita. Mezi její substráty patří OF insekticidy včetně paraoxonu a jeho analogů, parathionu, fensulfothionu a dalších. Navíc je schopná hydrolyzovat NPL soman, sarin a dokonce i látku VX, ale katalytická účinnost pro tyto substráty je nižší než pro méně toxické insekticidy (57).

Reakční mechanismus štěpení OF zahrnuje polarizaci vazby P=O nebo P=S substrátu (zvýšení elektrofilního charakteru fosforu), potom dva divalentní kationty enzymu aktivují molekulu vody a zahájí nukleofilní atak a dojde k hydrolyze vazby P-O za současné neutralizace záporného náboje na odstupující skupině (58).

V *in vivo* studiích bylo prokázáno, že laboratorní zvířata, kterým byla podána PTE před expozicí OF, tolerovali 50x vyšší dávku paraoxonu, než kontrolní skupina. Terapeutické využití PTE *in vivo* je omezeno jejím poločasem v plazmě, který se uvádí v rozmezí 100 minut až 5 hodin. Protože PTE je bakteriálního původu, dá se předpokládat, že aplikace tohoto enzymu vyvolá u člověka imunitní reakci. Aby byla získána PTE s výhodnějšími vlastnostmi pro *in vivo* podání (prodloužení poločasu v krevním oběhu a snížení imunogenicity), byly provedeny experimenty s enkapsulací PTE do biodegradabilních nosičů. PTE byla úspěšně enkapsulována do myších erytrocytů a do lipozomů (59;60). Rovněž byly provedeny první experimenty s pegylací PTE (61). Do budoucna se počítá s využitím PTE ve formě pěny nebo ukotvené na pevném nosiči jako dekontaminačního prostředku pro povrchovou dekontaminaci kůže a povrchů zasažených OF nebo by PTE mohla být používána jako katalytický

bioscavenger jak při mimotělním oběhu (detoxifikace krve osoby zasažené OF) tak i ve formě injekčního přípravku (62).

**Paraoxonasa 1** je kalcium-dependentní enzym o velikosti 43-45 kDa a v krvi je vázán na povrchu HDL (lipoprotein s vysokou hustotou) ve spojení s lidským fosfát-vázajícím proteinem (HPBP). Jeho fyziologický substrát ani biologická funkce nebyly zcela objasněny. PON1 je schopná hydrolyzovat OF, laktony, aromatické karboxylestery a účastní se v metabolismu léčiv a xenobiotik. Navíc byly popsány antioxidační účinky, schopnost vázat fosfolipidy a anti-aterosklerotická aktivita. PON1 je tedy považována za enzym se smíšenou funkcí, který má rozmanité substráty. Koncentrace PON1 v lidské plazmě se mezi jedinci liší až 13krát. PON1 se vyznačuje genetickým polymorfismem a jednotlivé isoformy mají rozdílnou substrátovou specifitu. PON1 je lidský protein, takže její injekční podání by nemuselo nezpůsobovat imunitní reakci. Katalytická účinnost proti somanu a sarinu je podobná jako u PTE a PON1 je schopná štěpit i fosforylované oximy, takže její podání společně s reaktivátory by mohlo být výhodné. Vylepšení OF-hydrolasové aktivity by mohlo být realizováno díky proteinovému inženýrství. Použití PON1 jako bioscavengeru při intoxikaci OF bylo úspěšně testováno u myší a potkanů. Uvažuje se také o použití enzymu do dekontaminačních prostředků. Hu-PON1 může být, stejně jako BuChE, izolována z prošlé lidské plazmy podle protokolu správné výrobní praxe, nebo se dá získat rekombinantní PON1 pomocí expresních systémů. Purifikace z plazmy nebo izolace rekombinantní PON1 z expresních systémů jsou obtížné procesy a neposkytují vysoké výtěžky. Izolovaná PON1 má nízkou stabilitu, protože k jejímu správnému fungování je zapotřebí vazba s HDL a HPBP. Tyto problémy by bylo možné vyřešit např. uzavřením PON1 do lipozomů nebo ukotvením na syntetické HDL částice (25).

Ve snaze vylepšit katalytické vlastnosti enzymových bioscavengerů, jako je substrátová specifita a katalytická účinnost, se provádí racionální design a cílená mutageneze aktivního místa enzymu. Cílem je získat katalytické bioscavengery (PTE, Hu-PON1), které by byly schopné hydrolyzovat co nejširší spektrum OF optimální rychlostí a ze stechiometrických bioscavengerů (AChE, BuChE) vytvořit scavengery s katalytickými vlastnostmi.

Byli připraveni mutanti cholinesteras s katalytickými vlastnostmi jako je mutant BuChE G117H, schopný hydrolyzovat paraoxon, sarin, echothiopat a VX, který však kvůli rychlému ageingu nehydrolyzuje soman. Později vytvořený dvojitý mutant

BuChE G117H/E197Q je již schopen soman štěpit. Jejich schopnost hydrolyzovat OF je ale zatím stále příliš pomalá pro předpokládané praktické využití a nevyrovná se PTE a PON1 (63;64). Dále jsou vyvíjeny mutacemi upravené AChE, které jsou oproti přirozeně se vyskytujícímu enzymu velmi dobře reaktivovatelné a které by mohly být ve spojení s vhodným oximem využívány jako pseudokatalytické bioscavengery s vysokou aktivitou (65). V případě PTE se podařil připravit mutant PTE G60A, který přednostně hydrolyzuje více toxické S<sub>P</sub>-enantiomery NPL, oproti nativní PTE, která štěpí spíše méně toxické R<sub>P</sub>-enantiomery (66). Rovněž PON1 byla upravována cílenými mutacemi a byly připraveny např. mutanti H115W/Y71A a H115W/F347W, které hydrolyzují širší spektrum OF, než přirozeně se vyskytující PON1 (67).

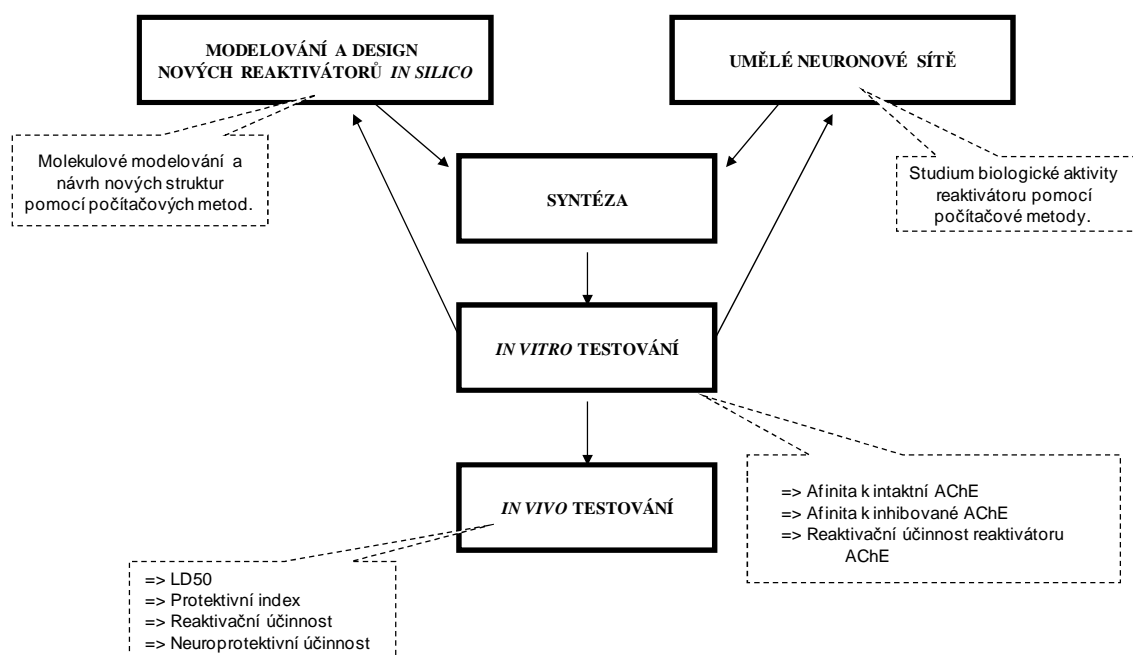
### 2.6.2 Reaktivátory AChE a BuChE

Oximové reaktivátory AChE jsou důležitou součástí antidotní terapie otrav OFI a v současné době se stále pracuje na zlepšení vlastností používaných reaktivátorů, či na syntéze nových reaktivátorů. Aby oxim lépe účinkoval, je výhodné, aby procházel HEB a působil tak v místě, kde inhibice AChE způsobuje nejvážnější problémy – v CNS. Je proto snaha zvýšit lipofilitu oximu přidáním lipofilních substituentů (fenyl, naftyl, delší alkylové řetězce, skupina -CF<sub>3</sub> apod.) do molekuly oximu a tím i průnik přes HEB (68). I přes zvýšenou lipofilitu molekuly přítomnost kvarterního dusíku významně snižuje průnik těchto látek do mozku. Dalším přístupem, řešícím tuto vlastnost reaktivátorů, je příprava jejich lipofilních proléčiv (např. proléčiva pralidoximu nazývaná „pro-2-PAM“), kdy ke kvarternizaci dusíku dojde teprve po průniku aplikované látky do mozku. Podání pro-2-PAM morčatům intoxikovaným DFP a somanem snížilo, na rozdíl od pralidoximu, výskyt záchvatů a neurologických poruch (69). Dalším přístupem je spojení reaktivátoru s molekulou, která by sloužila jako vhodný přenašeč přes HEB (např. vhodné cukry nebo aminokyseliny). Dosavadní pokusy připravit takovéto sloučeniny nevedly k dostatečně aktivním látkám (70).

Oximy, které se používají v současné době k léčbě otrav OFI, nejsou schopny účinně reaktivovat AChE inhibovanou všemi druhy OF. Je proto snaha nalézt oxim, který by dobře reaktivoval AChE inhibovanou rozdílnými OF – širokospektrý reaktivátor AChE. Díky široké variabilitě v chemické struktuře OFI bude nalezení látky s univerzální účinností velmi složité či dokonce nemožné. Z tohoto důvodu je pozornost obrácena k terapeutickému využití kombinace více reaktivátorů, které se svým spektrem účinku vhodně doplňují (71).

Současný vývojový proces (obr. 10) nových reaktivátorů AChE zahrnuje molekulové modelování a docking, které pomocí počítačových metod zkoumá interakce inhibitorů AChE s intaktním enzymem a interakce reaktivátorů AChE s inhibovaným enzymem a výstupem těchto metod je požadavek na strukturu aktivního reaktivátoru AChE. Dále je testována biologická aktivita navržených reaktivátorů pomocí umělých neuronových sítí a poté jsou reaktivátory syntetizovány. Dále je ověřována účinnost těchto reaktivátorů *in vitro* a *in vivo* (72). Na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany bylo syntetizováno a testováno mnoho potenciálních nových širokospektrých reaktivátorů AChE. Podařilo se připravit např. oxim K027, který dobře reaktivuje AChE inhibovanou OF pesticidy, a oxim K203, který má schopnost dobře reaktivovat AChE inhibovanou tabunem.

Obr. 10: Schéma vývojového procesu nových reaktivátorů AChE (72)



Dalším směrem ve výzkumu je vývoj reaktivátorů BuChE pro přípravu pseudokatalytického scavengeru, protože oximy používané k reaktivaci OF inhibované AChE nejsou účinné při reaktivaci OF inhibované BuChE.

### 3. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo studovat nové možnosti v profylaxi a terapii otrav organofosforovými inhibitory acetylcholinesterasy a přinést nové informace a poznatky týkající se této oblasti, které by vedly ke zlepšení účinnosti podané profylaxe a terapie ve srovnání se současným stavem.

Díličními cíli bylo:

1. Zkoumat využití enzymu fosfotriestery jako katalytického scavengeru.
  - a) Provést a optimalizovat chemické modifikace PTE pomocí biokompatibilních polymerů, následné biochemické charakterizace vzniklých konjugátů a hodnocení jejich stability *in vitro*.
  - b) Zkoumat podání nemodifikované a modifikované PTE *in vivo* a zhodnotit farmakokinetiku a imunitní odpověď u potkana.
  
2. Zabývat se návrhem a *in vitro* testováním pseudokatalytických scavengerů organofosfátů na bázi cholinesterasy v kombinaci s oximovým reaktivátorem a zkoumat účinnost vybraných oximových reaktivátorů na reaktivaci lidské erytrocytární AChE a plazmatické BuChE inhibovaných OFI.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Chemická modifikace PTE pomocí biokompatibilních polymerů, následná biochemická charakterizace vzniklých konjugátů a hodnocení jejich stability *in vitro*

#### 4.1.1 Příprava a charakterizace konjugátů fosfotriestery s methoxy-polyethylen glykolem jako potenciální katalytický bioscavenger proti otravám organofosfáty

Jun D., Musilová L., Link M., Loiodice M., Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning (*submitted*)

Bioscavengery jsou považovány za nová slibná antidota proti otravám OF. V naší práci jsme se zaměřili na rekombinantní bakteriální PTE produkovanou *E. coli*. Tento enzym je schopen katalyzovat hydrolýzu řady OF. Velkou nevýhodou tohoto katalytického bioscavengeru nehumánního původu je jeho poměrně krátký poločas v organismu a imunitní reakce po opakovaném experimentálním podání u zvířat. Tyto problémy je možné vyřešit pomocí konjugace enzymu s biokompatibilními polymery. Podobným způsobem byly upraveny např. rekombinantní AChE a BuChE a bylo prokázáno, že došlo k vylepšení jejich farmakokinetického profilu a snížení imunitní odezvy organismu po opakovaném podání.

Připravili jsme konjugáty rekombinantní PTE (36 kDa) s různými typy methoxy-polyethylenglykolu (MPEG), které by mohly sloužit jako potenciální katalytický bioscavenger. Cílem naší práce bylo vylepšit biologické vlastnosti enzymu, aby bylo v budoucnu možné jeho podání člověku jako antidota proti OF intoxikacím. Ze sedmi typů MPEG jsme po předchozích pokusech vybrali pro navazující experimenty dva lineární monofunkční deriváty MPEG s reaktivní aldehydovou skupinou s molekulovou hmotností 2 kDa a 5 kDa. Molekuly MPEG reagují s primárními aminoskupinami aminokyseliny lysinu na povrchu molekuly enzymu. Monomer PTE má na svém povrchu sedm volných aminoskupin a jednu aminoskupinu na N-konci, které jsou teoreticky schopné reagovat s molekulami MPEG. Reakce PTE s molekulami MPEG probíhá ve dvou fázích: tvorba Schiffovy báze, vznikající reakcí karbonylové



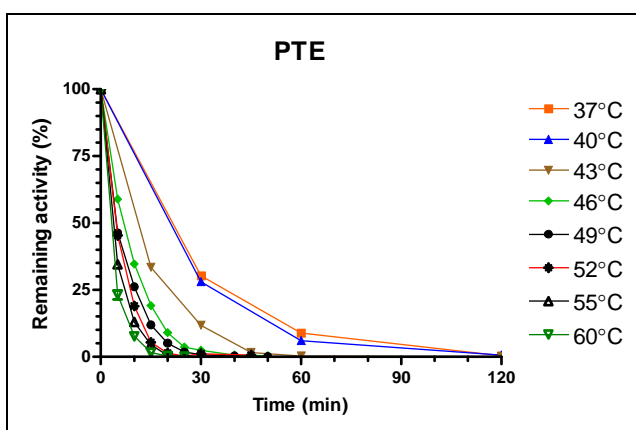
skupiny aldehydu s primární aminoskupinou lysinu, která je v další fázi *in situ* redukována přítomným kyanoborohydridem sodným na sekundární amin, který tvoří vazbu mezi polymerem a enzymem a je velmi stabilní. Optimalizovali jsme reakční podmínky (poměr jednotlivých látek vstupujících do reakce, teplotu a dobu modifikace PTE) a připravili jsme homogenní populaci plně modifikované rekombinantní PTE. Výsledné konjugáty měly podle analýz provedených pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF molekulovou hmotnost přibližně 52 kDa (pro MPEG 2 kDa) a 76 kDa (pro MPEG 5 kDa). U obou konjugátů jsme určili  $K_m$  a  $V_{max}$  a rovněž jsme sledovali stabilitu modifikovaných enzymů za fyziologických podmínek (37 °C a pH 7,4). Na základě výsledků těchto experimentů jsme pro budoucí *in vivo* testování vybrali rekombinantní PTE modifikovanou 5 kDa MPEG, která vykazovala vyšší stabilitu za uvedených fyziologických podmínek *in vitro*.

#### 4.1.2 Hodnocení termální stability *in vitro* a podání nativní PTE a modifikované PTE *in vivo* a hodnocení farmakokinetiky a imunitní odpovědi u potkana

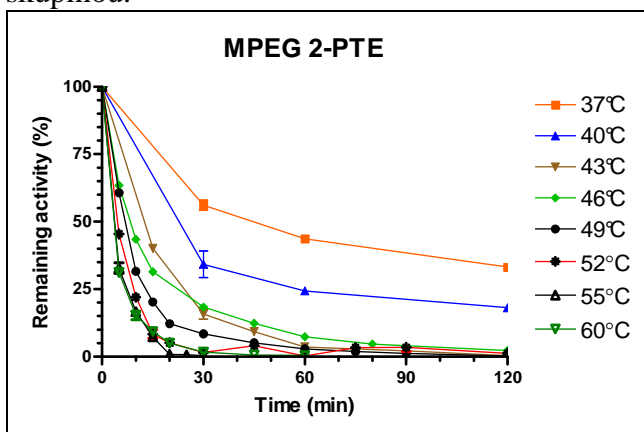
##### Termální stabilita PTE

Termální stabilita byla měřena v 0,2 M borátovém pufru (pH 8,5; 0,1 mM CoCl<sub>2</sub>) při různých teplotách (od 37°C do 60°C). V určených časových intervalech bylo odebráno potřebné množství enzymu a po ochlazení na 25°C byla spektrofotometricky změřena reziduální aktivita PTE v 50 mM borátovém pufru (pH 8,5; 0,1 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,1 % BSA) za použití paraoxonu jako substrátu při 400 nm.

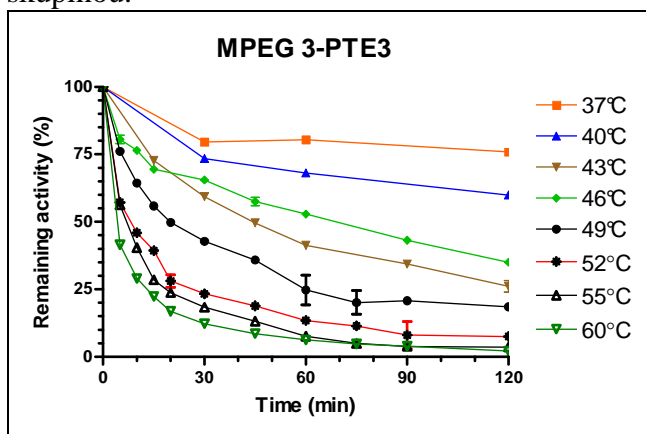
Obrázek 1: Termální stabilita nativní PTE



Obrázek 2: Termální stabilita PTE modifikované 2 kDa MPEG s aldehydickou funkční skupinou.



Obrázek 3: Termální stabilita PTE modifikované 5 kDa MPEG s aldehydickou funkční skupinou.



Protože měla PTE modifikovaná 5 kDa MPEG s aldehydickou funkční skupinou lepší termální stabilitu v tomto (obrázek 1-3) i předchozím experimentu (příloha I), byl takto modifikovaný enzym vybrán pro následující *in vivo* studii.

### ***In vivo* studie vlastností nativní a modifikované PTE po podání u potkana**

Cílem této studie bylo zjištění poločasu PTE modifikované 5 kDa MPEG s aldehydickou skupinou po intramuskulárním podání u potkana a porovnání s nativní PTE a kontrolou. Dále měla studie za cíl hodnocení imunitní odpovědi, která by mohla vzniknout po opakovaném podání obou druhů enzymu potkana. Nepřímé hodnocení imunitní odpovědi je založeno na hodnocení změny poločasu po druhé aplikaci nativního a modifikovaného enzymu, která následuje u stejných skupin experimentálních zvířat měsíc po prvním podání. Přímé hodnocení imunitní odpovědi je založeno na stanovení celkové hladiny protilátek v krvi potkanů.

### **Materiál**

Chemikálie použité v tomto experimentu byly analytické čistoty a byly zakoupeny od firem Sigma Aldrich (Praha, Česká republika), Pliva-Lachema (Brno, Česká republika), Acros Organics (Geel, Belgie), LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, Francie) a PENTA (Praha, Česká republika). Voda byla purifikována pomocí přístroje GORO AQUA 35 (GORO, Praha, Česká republika). Měření bylo provedeno na spektrofotometru Helios  $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), grafy a matematické zpracování výsledků bylo provedeno pomocí softwaru GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, CA, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## Metodika

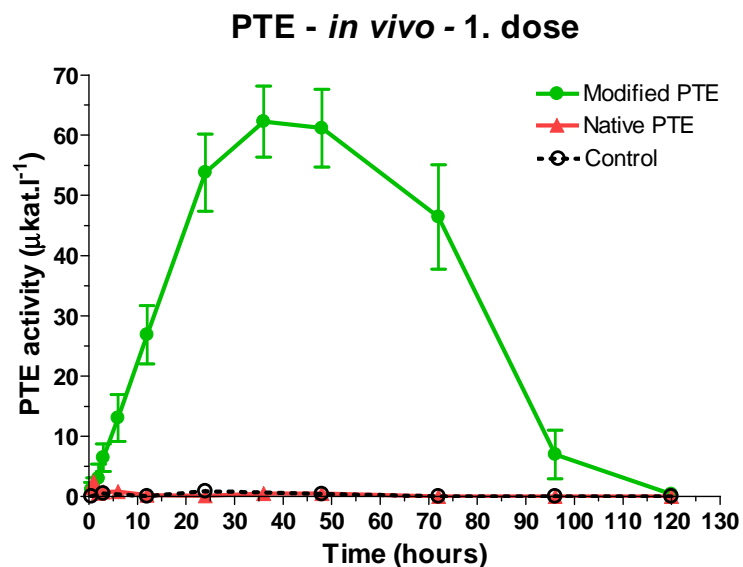
Jako vhodné modelové laboratorní zvíře pro tento experiment byly zvoleny samice potkana kmene WISTAR, jejichž hmotnost byla v rozmezí 200-230 g při první aplikaci enzymu a 220-250 g při druhé aplikaci o měsíc později. Pokusná zvířata byla krmena standardní dietou a vodou *ad libitum*. Prováděné experimenty byly schváleny Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Před vlastním pokusem byla rozdělena po šesti do tří skupin. Pro podání PTE bylo jako způsob aplikace vybráno intramuskulární podání, které je stejné jako v případě použití autoinjektoru obsahujícího antidota proti otravám OF. Aplikovaný objem byl vždy 0,2 ml. První skupině potkanů byla podána modifikovaná PTE v dávce  $1,19 \text{ mg.kg}^{-1}$  (odpovídající  $34,5 \text{ } \mu\text{kat.kg}^{-1}$ ), druhé skupině potkanů nativní nemodifikovaná PTE v dávce  $0,54 \text{ mg.kg}^{-1}$  (odpovídající opět  $34,5 \text{ } \mu\text{kat.kg}^{-1}$ ), a třetí skupině kontrolní vzorek (samotné vehikulum – sterilní 50 mM borátový pufr, pH 8,5; 0,1 mM  $\text{CoCl}_2$ ). Aktivita PTE v krvi potkana byla měřena ve stanovených časových intervalech (čas 0 + 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h až 120 h). Krev byla potkanům odebírána z laterální ocasní žíly do heparinizovaných kapilár. Aktivita PTE v krvi potkana byla měřena v 50 mM borátovém pufru (pH 8,5; 0,1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 0,1 % BSA) za použití paraoxonu jako substrátu. 5  $\mu\text{l}$  krve bylo hemolyzováno v 980  $\mu\text{l}$  borátového pufru a po přidání 15  $\mu\text{l}$  paraoxonu (70 mM) byla měřena aktivita PTE spektrofotometricky při 370 nm. Stejný postup byl opakován za čtyři týdny.

## Výsledky a diskuze

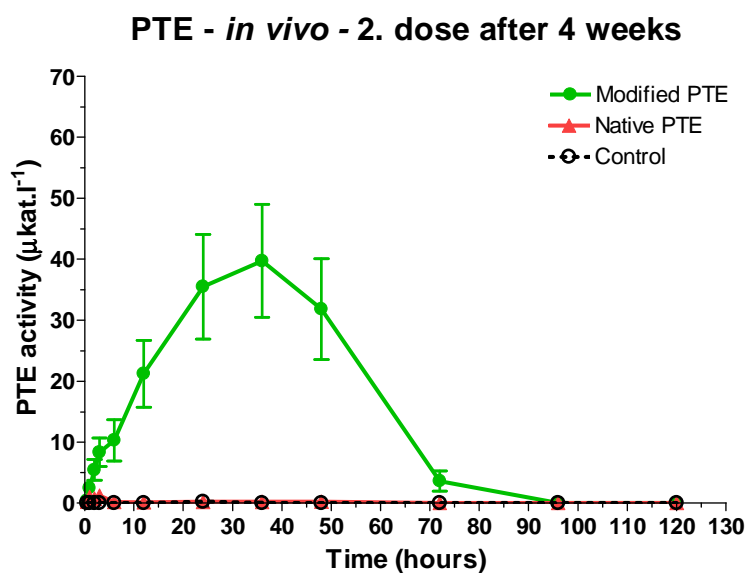
Aktivita nemodifikované rekombinantní PTE v krvi potkanů po aplikaci byla na hranici měřitelnosti a po zhruba třech hodinách byla prakticky srovnatelná s nulovou hodnotou aktivity u kontrolní skupiny. Aktivita modifikované PTE v krvi potkanů však postupně narůstala, po 36 hodinách dosáhla maxima ( $62,3 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ ) a po 120 hodinách klesla na nulovou hodnotu (obrázek 4). Aby bylo možné zjistit, zda enzym vyvolává po opakované aplikaci imunitní odpověď, byl tento experiment u stejné skupiny experimentálních zvířat po měsíci zopakován. Výsledky byly velmi podobné jako u prvního podání (obrázek 5). Maximální aktivita enzymu v krvi byla zjištěna opět po 36 hodinách od aplikace a byla oproti prvnímu podání nižší ( $39,7 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ ). Na základě těchto zjištění můžeme konstatovat, že pegylovaná PTE má výrazně prodloužený

poločas v krevním oběhu potkana, v porovnání s nativní PTE a díky zvýšené stabilitě je její aktivita v krvi po aplikaci přibližně 20x vyšší.

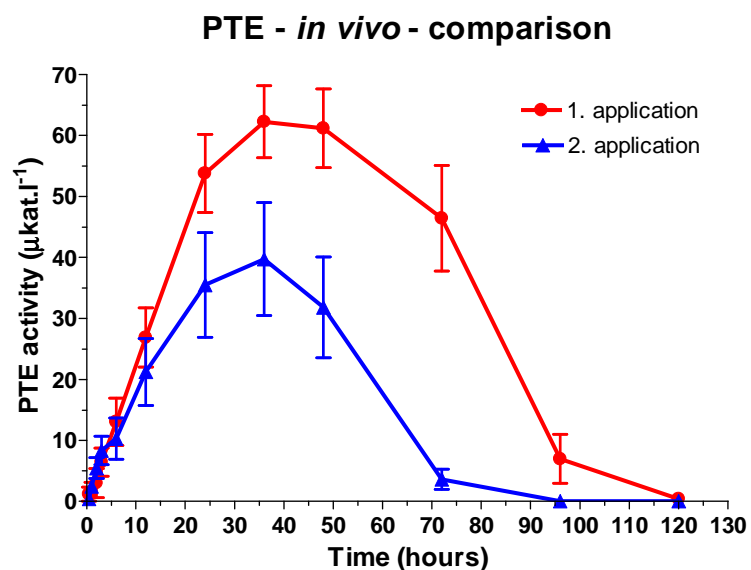
Obrázek 4: Aktivita modifikované PTE, nativní PTE a porovnání s kontrolní skupinou po první dávce.



Obrázek 5: Aktivita modifikované PTE, nativní PTE a porovnání s kontrolní skupinou po druhé dávce, která byla aplikována po 4 týdnech.



Obrázek 6: Porovnání aktivity modifikované PTE po prvním (červeně) a druhém (modře) podání – proložení dat z obrázků 4 a 5.



Maximální aktivita modifikovaného enzymu v krvi byla oproti teoretické maximální aktivitě, které by se dosáhlo při dokonalém transportu aplikovaného enzymu do krevního oběhu potkana, přibližně 10x nižší. Modifikovaný enzym vykázal ve srovnání s nativní PTE 40x větší hodnotu MRT. Další *in vivo* studie modifikovaného enzymu budou zaměřeny na podrobné zhodnocení imunitní odpovědi, které bude provedeno stanovením hladiny protilátek a dále na zhodnocení projektivního indexu připraveného enzymu u experimentálně navozených otrav OFI.

## **4.2 Návrh a *in vitro* testování pseudokatalytických scavengerů organofosfátů na bázi cholinesterasy v kombinaci s oximovým reaktivátorem a hodnocení účinnosti vybraných oximových reaktivátorů na reaktivaci lidské erytrocytární AChE a plazmatické BuChE inhibovaných OFI**

### **4.2.1 Schopnost komerčně dostupných oximů reaktivovat lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu inhibovanou paraoxonem *in vitro***

Jun D., Musilová L., Kuča K., Kassa J., Bajgar J.: Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon *in vitro*. *Chem Biol. Interact.* (2008) 175, 421-424.

Oximové reaktivátory AChE jsou základní součástí antidotní terapie otrav OFI inhibitory (pesticidy, NPL). Jsou to deriváty pyridiniových nebo bispyridiniových aldoximů. Jsou schopny rozštěpit vazbu mezi inhibovanou AChE a OFI inhibitorem a tím reaktivovat enzym. Během posledních dvou desetiletí byl vědecký výzkum zaměřen na butyrylcholinesterasu (BuChE) jako bioscavenger schopný vylučovat molekuly NPL nebo pesticidů z krevního řečiště, která by sloužila jako nespecifické profylaktikum otrav OP. BuChE je inhibována OP stejným způsobem jako AChE – fosforylací hydroxylové skupiny serinu v aktivním místě. Existuje proto hypotéza, že reaktivátory AChE, používané pro léčbu otrav NPL a pesticidy, by mohly reaktivovat BuChE inhibovanou OP a sloužit v kombinaci s BuChE jako „pseudokatalytický“ bioscavenger. V této studii byla *in vitro* zkoumána účinnost komerčně dostupných oximových reaktivátorů (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6) reaktivovat lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE inhibovanou pesticidem paraoxon. Jako zdroj enzymů byla použita krev od zdravých dobrovolníků, zdrojem AChE byly hemolyzované erythrocyty a zdrojem BuChE byla krevní plazma. Doba inhibice a koncentrace paraoxonu, která způsobí 95% inhibici enzymů, byly vypočítány z experimentálně naměřených dat. Oximy byly testovány v koncentracích 100  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , vlastní reaktivace trvala 10 minut. Pro měření aktivity enzymů byla použita modifikovaná metoda dle Ellmana. Od získaných hodnot reaktivace (%) byly odečteny hodnoty odpovídající hydrolýze substrátu způsobené reaktivátorem.

Nejúčinnější reaktivátory AChE inhibované paraoxonem byly obidoxim a trimedoxim v 100  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  koncentraci. Ostatní oximy testované v této práci nedosáhly dostatečné reaktivační účinnosti (méně než 25 %). V případě reaktivace BuChE, pouze trimedoxim dosáhl reaktivační účinnosti 12,4 % v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Z dosažených výsledků tedy vyplývá, že oximy schopné reaktivovat AChE jsou slabé reaktivátory BuChE a kombinace BuChE s testovanými reaktivátory nemůže být navržena jako pseudokatalytický scavenger. V této práci byla zkoumána pouze reaktivace cholinesteras inhibovaných paraoxonem. Abychom lépe porozuměli této problematice, je nezbytné prozkoumat i jiné inhibitory a další oximové reaktivátory, abychom pochopili vztah mezi strukturou a účinkem reaktivátorů. Z dostupné literatury vyplývá, že toto jsou jedny z prvních údajů zabývajících se problematikou využití BuChE jako pseudokatalytického scavengeru.



#### 4.2.2 Reaktivace lidské acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy inhibované paraoxonem vybranými oximy *in vitro*

Musilová L., Kuča K., Jung Y. S., Jun D.: In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clin Toxicol.* (2009) 47, 545-550.

Tato práce navazuje na výsledky získané v předchozí experimentální studii. Byla testována *in vitro* schopnost 18 reaktivátorů s rozdílnou strukturou reaktivovat lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE inhibovanou pesticidem paraoxon. Testované reaktivátory byly porovnány s komerčně dostupnými reaktivátory AChE. Cílem práce bylo zkoumat vztah mezi strukturou a účinkem reaktivátorů a také zjistit, zda by BuChE mohla být reaktivována těmito sloučeninami a mohla tak sloužit jako pseudokatalytický scavenger. Testované sloučeniny patří mezi monokvarterní (2-PAM, 3-PAM, 4-PAM) nebo biskvarterní symetrické (methoxim, obidoxim, trimedoxim, K005, K033, K074, K075, K099, K101, K117, K316 a K317) nebo asymetrické (HI-6, K027, K048, K127, K203, K206, K252 a K269) oximové reaktivátory. Mají jednu nebo dvě funkční pyridiniové aldoximové skupiny v poloze 2 (2-PAM, HI-6, K005, K033, K316), 3 (3-PAM, K099, K101, K317) nebo 4 (methoxim, obidoxim, trimedoxim, 4-PAM, K027, K048, K074, K075, K117, K127, K203, K206, K252, K269) na pyridiniovém kruhu. Biskvarterní reaktivátory se liší délkou spojovacího řetězce (od jedné do pěti methylenových skupin) a v přítomnosti dvojně vazby nebo kyslíku ve spojovacím řetězci. Pro testování reaktivační účinnosti byla použita modifikovaná metoda dle Ellmana.

Nejvyšší účinnosti při reaktivaci inhibované AChE dosáhly látky K027 (86.0 %), K075 (55.3 %), K203 (50.4 %), K048 (50.3 %) a také K074 (46.4 %) při koncentraci 100  $\mu$ M. Při testování reaktivační účinnosti na BuChE byly naměřeny poměrně nízké hodnoty reaktivace při koncentraci oximu 100  $\mu$ M: K117 (16.4 %), trimedoxim (12.2 %), K269 (10.6 %) a K075 (10.3 %). Reaktivační účinnost ostatních testovaných oximů byla nižší než 10 %. Ukázalo se, že biskvarterní oximové deriváty jsou účinnější než monokvarterní. Nejlepší testované reaktivátory byly biskvarterní aldoximy s dvěma aldoximovými skupinami na pyridiniovém kruhu v poloze 4 nebo s jednou oximovou a

jednou karbamoylovou skupinou v poloze 4 a měly tří- nebo čtyř-členný spojovací řetězec (propanový, 2-oxapropanový, butanový nebo but-2-enový).

### 4.2.3 Reaktivace acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy – význam v profylaxi otrav nervově paralytickými látkami

Jun D., Musilová L., Kuča K., Musílek K., Bajgar J.: Reactivation of AChE and BuChE activity – possible implications for prophylaxis against nerve agents. *In Bajgar, J. (ed): Central and peripheral nervous system: Effects of highly toxic organophosphates and their antidotes (2009) Research Signpost, Kerala, India, ISBN 978-81-308-0331-9 (in press)*

V této studii je diskutována problematika využití BuChE jako bioscavengeru a také koncept pseudokatalytického scavengeru, který je založen na kombinaci cholinesterasy a účinného reaktivátoru. Dále byla *in vitro* sledována účinnost komerčně dostupných oximových reaktivátorů (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6) reaktivovat lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE inhibovanou OF inhibitorem diisopropylfluorofosfát (DFP). DFP je látka strukturně podobná NPL sarin, byl vyvinut během 2. Světové války a je přibližně 10krát méně toxický než sarin. AChE i BuChE byla inhibována 120 minut roztokem DFP v koncentraci, která způsobí 95% inhibici enzymů. Inhibované enzymy byly reaktivovány po dobu 10 minut roztokem oximu v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Enzymatická aktivita byla měřena spektrofotometricky podle modifikované Ellmanovy metody.

Bylo zjištěno, že nejúčinnějšími reaktivátory AChE inhibované DFP jsou obidoxim a trimedoxim v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Reaktivační účinnost ostatních oximů nepřesáhla 10 %. Při reaktivaci BuChE inhibované DFP nepřekročil žádný z oximů hodnotu 10 %, pouze obidoxim dosáhl reaktivační účinnosti 9,5 %. Podle dosažených výsledků můžeme konstatovat, že reaktivovatelnost inhibované AChE byla dvakrát vyšší než BuChE a kombinace testovaných reaktivátorů a BuChE proto není vhodná pro použití jako pseudokatalytický scavenger a je třeba nalézt účinnější sloučeniny a prozkoumat reaktivaci cholinesteras inhibovaných i jinými OF.

#### 4.2.4 *In vitro* reaktivační účinnost komerčně dostupných oximů na lidskou acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu inhibovanou organofosforovými pesticidy

Musilová L., Kuča K., Pohanka M., Holas O., Jun D.: *In vitro* ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (*submitted*)

V této studii byla *in vitro* zkoumána účinnost komerčně dostupných oximových reaktivátorů (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6) reaktivovat lidskou erytrocytární AChE a plazmatickou BuChE inhibovanou pěti strukturně odlišnými pesticidy a OFI (paraoxon, dichlorvos, diisofluorofosfát, methamidofos a leptofos-oxon). Abychom zjistili, proč v případě AChE inhibované pesticidem methamidofos dochází k vyšší reaktivaci při nižší testované koncentraci oximu, testovali jsme reaktivační účinnost obidoximu v koncentračním rozmezí  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$  M. Jako zdroj lidských enzymů byla použita krev od zdravých dobrovolníků, zdrojem AChE byly hemolyzované erytrocyty a zdrojem BuChE byla krevní plazma. Doba inhibice a koncentrace pesticidů, vyvolávající 95% inhibici enzymů, byly vypočítány z experimentálně naměřených dat. Oximy byly testovány v koncentracích 100  $\mu$ M a 10  $\mu$ M a reaktivace trvala 10 minut. Reaktivační účinnost obidoximu u AChE inhibované pesticidem methamidofos byla hodnocena při koncentracích  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$  M. Pro měření aktivity enzymů byla použita modifikovaná metoda dle Ellmana. Od získaných hodnot reaktivace (%) byly odečteny hodnoty odpovídající hydrolýze substrátu způsobené reaktivátorem.

Podle našich výsledků jsou nejlepší širokospektré reaktivátory trimedoxim a obidoxim, protože jejich reaktivační účinnost přesáhla 50 % v případě AChE inhibované pesticidy paraoxon, leptofos-oxon a methamidofos. Aktivita AChE inhibované OF sloučeninami DFP a dichlorvos byla obnovena nedostatečně. V případě AChE inhibované OF dichlorvos, paraoxon, DFP a leptofos-oxon, způsobuje vyšší koncentrace reaktivátoru (100  $\mu$ M) vyšší reaktivaci fosforylovaného enzymu. U AChE inhibované OF methamidofos byla pozorována opačná situace a vyšší reaktivační účinnost byla dosažena při nižší koncentraci oximu (10  $\mu$ M). Testovali jsme proto reaktivaci AChE inhibované pesticidy při různých koncentracích obidoximu, který byl vybrán jako vhodný modelový oxim. Získali jsme tak zvonovitou křivku,

charakterizující vztah mezi koncentrací reaktivátoru a reaktivační účinností pro každý inhibitor. Zjistili jsme, že maximální hodnota reaktivace AChE inhibované OF methamidofos je skutečně při koncentraci  $10^{-5}$  M obidoximu, zatímco u ostatních OF je maximum při  $10^{-4}$  M obidoximu. Tento jev se dá vysvětlit např. vyšší mírou inhibice AChE při vyšší koncentraci oximu a také vznikem fosforylovaných oximů, které způsobují opětovnou inhibici AChE. V případě BuChE inhibované OF pesticidy nebylo dosaženo dostatečných a terapeuticky využitelných hodnot reaktivace. Je proto zapotřebí otestovat další oximové reaktivátory s jinou strukturou.

#### 4.2.5 Nové biskvarterní oximy – reaktivace AChE a BuChE inhibované paraoxonem

Kuča K., Musilová L., Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Žďárová-Karasová J.: Novel bisquaternary oximes – Reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon (*submitted*)

V této práci byly připraveny čtyři nové biskvarterní reaktivátory cholinesteras (K053, K054, K068 a K071) s odlišnou chemickou strukturou. Cílem této práce bylo získat nové oximy, které by v budoucnu mohly nahradit klinicky používané reaktivátory. Jako vhodný OFI byl pro tento experiment zvolen paraoxon. Byla hodnocena jejich schopnost reaktivovat AChE a BuChE inhibovanou paraoxonem. Jejich reaktivační účinnost byla porovnána se standardními reaktivátory (pralidoxim, obidoxim a HI-6). Reaktivace BuChE se momentálně hodně zkoumá, protože je snaha vytvořit tzv. pseudokatalytický bioscavenger, který by mohl sloužit jako profylaktikum nebo léčivo otrav OFI. Metoda práce byla stejná jako v publikaci 3 (Musilová L., Kuča K., Jung Y. S., Jun D.: In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clin Toxicol.* (2009) 47, 545-550).

Podle našich výsledků žádný z nově připravených reaktivátorů nepřekonal reaktivační účinnost obidoximu, který je považován za nejúčinnější reaktivátor paraoxonem inhibované AChE. Oxim K053 dosáhl podobných hodnot reaktivační účinnosti jako pralidoxim a HI-6. Ostatní oximy byly při reaktivaci AChE neúčinné. Nové oximy tedy nejsou lepší než standardní reaktivátory a nebudou dále pro tyto účely zkoumány. V případě reaktivace BuChE nebylo dosaženo uspokojivých výsledků, což je v souladu s dříve popsány výsledky, podle kterých je reaktivace BuChE velmi obtížná a jiná než u AChE. Pouze obidoxim a oximy K053 a K068 dosáhly reaktivační účinnosti u BuChE okolo 10 %. Tato hodnota je relativně nízká, ale v porovnání s předchozími výsledky dostatečná. Výsledky z této práce by mohly být v budoucnu použity při návrhu sloučeniny s lepší účinností na reaktivaci OF-inhibovanou BuChE.

#### 4.2.6 Nové nukleofilní sloučeniny s oximovou skupinou jako reaktivátory cholinesteras inhibovaných paraoxonem

Musilová L., Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Kuča K.: Novel Cholinesterase Reactivators as Nucleophiles for Treatment of Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase (*submitted*)

Nové reaktivátory AChE jsou syntetizovány jako potenciální antidota pro léčbu otrav OFI, nebo jako součást pseudokatalytických bioscavengerů pro zlepšení profylaxe otrav NPL. V této práci byly připraveny tři nové potenciální reaktivátory cholinesteras (K064, K065, K066) a byla testována jejich schopnost reaktivovat paraoxonem inhibovanou AChE a BuChE. Všechny nově syntetizované sloučeniny jsou nesymetrické biskvarterní látky s jednou oximovou skupinou v poloze 2. Reaktivační účinnost nových oximových reaktivátorů byla porovnána s klinicky používanými reaktivátory (pralidoxim, obidoxim a HI-6).

Ukázalo se, že žádný z připravených oximů nedosáhl stejné reaktivační účinnosti jako standardní reaktivátory v případě AChE i BuChE. Co se týká reaktivace AChE, potvrdily naše výsledky fakt, že obidoxim je v současné době nejlepší reaktivátor v případě paraoxonem inhibované AChE. Naopak oxim HI-6 neprokázal dostatečnou účinnost při reaktivaci AChE inhibované paraoxonem. V případě reaktivace BuChE byla reaktivační účinnost nově připravených reaktivátorů nedostatečná (méně než 5 %). Přestože nově syntetizované oximy nepřekonalý klinicky používané oximy, je příprava nových strukturních obměn reaktivátorů (i když ne vždy s uspokoivými výsledky) potřebná pro získání dalších znalostí o vztahu mezi strukturou a účinkem reaktivátorů AChE a BuChE. Takové poznatky mohou v budoucnu pomoci při návrhu univerzální sloučeniny s širokým spektrem reaktivační aktivity.

## 5. ZÁVĚR

Výsledky našich experimentů prezentované v této práci jsou shrnuty v následujících bodech:

- Naším cílem byla příprava pegylované rekombinantní PTE. Podařilo se nám připravit rekombinantní bakteriální PTE modifikovanou s pomocí biokompatibilních polymerů odvozených od polyethylenglykolu. Analýzou s využitím SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF jsme zjistili, že molekuly MPEG byly navázány na všech teoreticky dostupných volných aminoskupinách aminokyseliny lysinu na povrchu PTE a také na N-konci. Modifikovaný enzym si zachoval svou aktivitu a také hodnoty  $K_m$  a  $V_{max}$ . Optimalizovali jsme podmínky modifikační reakce (vzájemný poměr enzymu, polymeru a redukčního činidla, dobu a teplotu) tak, abychom vždy získali PTE s navázanými osmi molekulami MPEG. Ze všech testovaných polymerů jsme nakonec vybrali pro navazující experimenty lineární MPEG o molekulové hmotnosti 5 kDa s aldehydovou skupinou. Ta tvoří po reakci s primární aminoskupinou a následné redukcí sekundární amin. Hlavním důvodem výběru bylo, že enzym měl po modifikaci zachovánu katalytickou aktivitu a zároveň vykázal v provedeném experimentu nejlepší termostabilitu za fyziologických podmínek (pH 7,4, teplota 37 °C). Proto jsme předpokládali, že takto modifikovaná rekombinantní PTE bude dostatečně stabilní i v organismu a rozhodli jsme se takto upravený enzym testovat *in vivo*.
- V *in vivo* experimentu byl laboratorním potkanům intramuskulárně aplikován pufrovaný roztok modifikované a nemodifikované (nativní) PTE a odpovídající kontrolní vzorek obsahující pouze pufr. Následně byla sledována aktivita podaného enzymu v krvi potkanů ve stanovených časových intervalech. Ukázalo se, že aktivita nemodifikované rekombinantní PTE v krvi potkanů po aplikaci byla na hranici měřitelnosti a po zhruba třech hodinách byla prakticky srovnatelná s nulovou hodnotou aktivity u kontrolní skupiny. Aktivita modifikované PTE v krvi potkanů však postupně narůstala, po 36 hodinách dosáhla maxima a po 120 hodinách klesla na nulovou hodnotu. Aby bylo možné zjistit, zda enzym vyvolává po opakované aplikaci imunitní odpověď, byl tento



experiment u stejné skupiny experimentálních zvířat po měsíci zopakován. Výsledky byly velmi podobné jako u prvního podání. Na základě těchto zjištění můžeme konstatovat, že pegylovaná PTE je stabilnější a má výrazně prodloužený poločas v krevním oběhu potkana, v porovnání s nemodifikovanou PTE.

Tyto výsledky nemohly být v době odevzdání disertační práce publikovány, protože nebylo dokončeno stanovení protilátek v krvi potkanů.

- Část této disertační práce byla zaměřena na nalezení vhodných kandidátů ze skupiny reaktivátorů pro přípravu tzv. pseudokatalytického bioscavengeru, skládajícího se z cholinesterázy a vhodného oximového reaktivátoru. Pro tento účel byly testovány jak komerčně používané reaktivátory, tak i nově syntetizované látky. Na základě zhodnocení výsledků provedených experimentů bylo zjištěno, že biskvarterní sloučeniny dosahovaly lepší reaktivační účinnosti než sloučeniny monokvarterní a svou roli ve vztahu struktura-účinek hrály i počet a poloha oximových skupin na pyridiniovém kruhu. Nejlepšími testovanými reaktivátory byly biskvarterní aldoximy se dvěma aldoximovými skupinami na pyridiniovém kruhu v poloze 4 nebo s jednou oximovou a jednou karbamoylovou skupinou v poloze 4 a zároveň měly tří- nebo čtyř-členný spojovací řetězec (propanový, 2-oxapropanový, butanový nebo but-2-enový). Žádný z testovaných oximů však neprokázal schopnost stejně dobře reaktivovat AChE inhibovanou různými OFI a být tak univerzálním reaktivátorem se širokým spektrem účinku. Účinnost oximů v reaktivaci BuChE inhibované různými OFI byla ve srovnání s AChE výrazně nižší. Nejvyšší hodnoty dosahovaly pouze 16 % (látka K117, trimedoxim, K269, K075, obidoxim), což není pro praktické využití dostatečné. Pro přípravu pseudokatalytického scavengeru, fungujícího na bázi BuChE, bude tedy zapotřebí syntetizovat sloučeniny s vyšší reaktivační účinností. Experimentálně zjištěné strukturální znaky účinných reaktivátorů BuChE by mohly představovat vhodnou cestu k syntéze nových sloučenin s vyšší aktivitou.

## 6. SOUHRN

### **Bioscavengery jako profylaktika otrav organofosforovými inhibitory acetylcholinesterasy**

Nervově paralytické látky (tabun, soman, sarin, VX) a pesticidy (parathion, malathion, chlorpyrifos) jsou vysoce toxické organofosforové sloučeniny, které ireverzibilně inhibují enzym AChE. Inhibovaná AChE nemůže plnit svou fyziologickou funkci – štěpení neuromediátoru acetylcholinu. Následné nahromadění acetylcholinu na cholinergních synapsích způsobuje cholinergní krizi, která může skončit až smrtí intoxikovaného organismu. Současný přístup k profylaxi otrav OFI spočívá v podávání reverzibilních inhibitorů AChE (pyridostigmin), centrálně působících anticholinergik (benaktyzin, trihexyfenidyl) a reaktivátorů AChE (HI-6). Přípravky s obsahem uvedených látek jsou zavedeny v armádách některých států, včetně AČR. Terapie otrav je založena na aplikaci anticholinergik (atropin), reaktivátorů AChE (obidoxim, methoxim, HI-6) a antikonvulziv (diazepam). Všechna tato antidota mohou chránit před smrtí následkem otravy organofosfáty, nezabrání ale následné paralýze po expozici, křečím a poruchám až trvalému poškození činnosti mozku. Relativně nový přístup k profylaxi a léčbě otrav OFI je použití určitých enzymů jako bioscavengerů. Bioscavengery mají schopnost účinně neutralizovat toxické OF v krevním oběhu ještě předtím, než dosáhnou svých přirozených cílů (synaptická AChE) a způsobí intoxikaci. Pro tyto účely jsou intenzivně studovány katalytické (fosfotriesterasa, paraoxonasa), stechiometrické (AChE, BuChE) a také pseudokatalytické (kombinace cholinesterasy a oximového reaktivátoru) bioscavengery.

V naší práci jsme se zabývali přípravou modifikované rekombinantní PTE, která by sloužila jako katalytický bioscavenger. PTE je enzym bakteriálního původu a její nevýhodou je krátký poločas v krevním oběhu a navození imunitní odpovědi po opakovaném podání. Jednou z možností jak obejít tyto problémy je modifikace enzymového bioscavengeru konjugací s vhodným biokompatibilním polymerem na bázi polyethylenglykolu (pegylace), což může zlepšit jeho stabilitu v krevním oběhu a imunotoleranci díky snížené schopnosti imunitního systému rozpoznávat takto upravený enzym. Podařilo se nám připravit PTE modifikovanou pomocí MPEG, optimalizovat postup modifikace a porovnat vlastnosti modifikované PTE s nativní PTE *in vitro* a

následně *in vivo*. Ukázalo se, že modifikovaný enzym měl výrazně vyšší stabilitu a delší poločas v krevním oběhu potkana.

Dále jsme se v naší práci zabývali návrhem a testováním pseudokatalytického bioscavengeru, který by se skládal z cholinesterasy (AChE nebo BuChE) a vhodného oximového reaktivátoru. Oxim by měl mít co nejširší spektrum účinku (schopnost reaktivovat AChE nebo BuChE inhibovanou rozdílnými OF). Při našich experimentech jsme zjistili, že nejúčinnější reaktivátory cholinesteras mají několik společných strukturálních rysů: jsou biskvarterní, s jednou nebo dvěma oximovými skupinami v poloze para (4) na pyridinovém kruhu a délkou spojovacího řetězce mezi 3-4 členy. BuChE inhibovaná OFI byla velmi obtížně reaktivovatelná a hodnoty reaktivity byly na rozdíl od AChE velmi nízké. Testované oximy proto nejsou vhodné jako součást pseudokatalytického bioscavengeru v kombinaci s BuChE, výsledky však mohou být použity při hledání struktur nových účinných reaktivátorů.

## 7. SUMMARY

### **Bioscavengers as prophylactics of poisonings caused by organophosphate inhibitors of acetylcholinesterase**

Nerve agents (tabun, soman, sarin, VX) and pesticides (parathion, malathion, chlorpyrifos) are highly toxic organophosphorus compounds. They irreversibly inhibit enzyme AChE. Inhibited AChE cannot perform its physiological role – hydrolysis of acetylcholine. Subsequent accumulation of acetylcholine on cholinergic synapses causes cholinergic crisis and can lead to death of intoxicated organism. Current prophylaxis of OP poisonings consists of administration reversible AChE inhibitors (pyridostigmine), central anticholinergics (benactyzine, trihexyphenidyl) and AChE reactivators (HI-6). These substances are contained in antidotal means in some armies, including Czech Armed Forces. Therapy of OP poisonings is based on administration of anticholinergics (atropine), reactivators of AChE (obidoxime, methoxime, HI-6), reversible inhibitors of AChE (pyridostigmine) and anticonvulsives (diazepam). These antidotes can protect human from death, but they don't prevent from postexposure incapacitation, convulsions and permanent brain damage. Relatively new approach in prophylaxis and therapy of OP intoxications is administration of certain enzymes as bioscavengers. Bioscavengers are capable of neutralizing of toxic OPs in the bloodstream rapidly before they can reach their natural targets (synaptic AChE) and cause intoxication. Catalytic (phosphotriesterase, paraoxonase), stoichiometric (AChE, BuChE) and pseudo catalytic (combination of cholinesterase and oxime reactivator) bioscavengers are intensively investigated for these purposes.

In our work we concerned with preparation of modified recombinant PTE which could serve as catalytic bioscavenger. PTE is an enzyme of bacterial origin and its disadvantage is relatively short half-life in the blood stream and immunogenicity after repeated administration. One way to circumvent these problems is the modification of enzyme bioscavenger by conjugation with suitable biocompatible polymer based on polyethylene glycol (pegylation). This approach can improve its circulatory stability and immunotolerance due to the decreased ability of immune system to recognize modified enzyme. We have prepared MPEG-modified PTE, we have optimized modification process and we compared properties of modified PTE and native PTE *in vitro* and

subsequently *in vivo*. It was shown that modified enzyme had significantly higher stability and longer half-life in bloodstream of the rat.

Next step of our work was design and testing of pseudo catalytic bioscavenger which consists of cholinesterase (AChE or BuChE) and suitable oxime reactivator. Oxime should have wide spectrum of reactivation efficiency (ability to reactivate different OP-inhibited AChE or BuChE). Our experiments shown that the most efficient reactivators have several common structural features: they are bisquaternary with one or two oxime groups in para position on pyridinium rings and connecting chain with 3 or 4 members. OP-inhibited BuChE was very uneasily reactivatable and values of reactivation were very low in comparison with AChE. Therefore, tested oximes are not suitable as a part of pseudo catalytic bioscavenger in combination with BuChE, but the results can be used in searching for new structures of efficient reactivators.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bajgar, J. (2006) *Používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu: od historie k současnosti* Nucleus HK, Hradec Králové.
2. Bismuth, C., Borron, S. W., Baud, F. J., and Barriot, P. (2004) Chemical weapons: documented use and compounds on the horizon, *Toxicol. Lett.* 149, 11-18.
3. Bajgar, J. (1982) *Klinicko-laboratorní diagnostika otrav nervově paralytickými látkami* VLA JEP, Hradec Králové.
4. Bajgar, J., Fusek, J., and Hrdina, V. (1994) *Vojenská toxikologie* VLA JEP, Hradec Králové.
5. Kassa, J., Krs, O., and Cabal, J. (1992) *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BCHL* VLA JEP, Hradec Králové.
6. Matoušek, J. and Bajgar J. (1979) *Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy, sborník vědeckých prací VLVDÚ* JEP, Hradec Králové.
7. Patočka, J. a. k. (2004) *Vojenská toxikologie* Grada publishing, Praha.
8. Halámek, E., Kobliha, Z., and Pitschmann, V. (2007) *Analýza bojových chemických látek* Univerzita obrany Brno, Vyškov.
9. <http://www.toxickelatky.arnika.org/pesticides>, (cit. 29.9.2009)
10. Costa, L. G. (2006) Current issues in organophosphate toxicology 4, *Clin. Chim. Acta* 366, 1-13.
11. <http://www.pesticideinfo.org>, (cit. 29.9.2009)
12. [http://www.alanwood.net/pesticides/class\\_pesticides.html](http://www.alanwood.net/pesticides/class_pesticides.html) (cit. 29.9.2009)
13. Lincová, D. and Farghali, H. (2002) *Základní a aplikovaná farmakologie* Galén, Praha.
14. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., and Bieger, D. (2001) *Barevný atlas farmakologie* Grada publishing, Praha.
15. Lüllmann, H., Mohr, K., and Wehling, M. (2004) *Farmakologie a toxikologie* Grada Publishing, Praha.
16. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., and Rodwell, V. W. (2002) *Harperova biochemie* Nakladatelství H&H, Jinočany.

17. Reiner, E. and Radic, Z. (2001) Mechanism of action of cholinesterase inhibitors, in *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors* (Giacobini Ezio, Ed.) 1 ed., Dunitz Martin Ltd, Geneva.
18. Lenz, D. E., Broomfield, C. A., Yeung, D. T., Masson, P., Maxwell, D. M., and Cerasoli, D. M. (2007) Nerve agent bioscavengers: Progress in development of a new mode of protection against organophosphorus exposure, in *Chemical warfare agents: Chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics* (Romano, J. Jr., Lukey, B., and Salem, H., Eds.) 2. ed., Taylor and Francis, New York.
19. Wenthold, R. J., Mahler, H. R., and Moore, W. J. (1974) The half-life of acetylcholinesterase in mature rat brain, *J. Neurochem.* 22, 941-943.
20. Kasprzak, H. and Salpeter, M. M. (1985) Recovery of acetylcholinesterase at intact neuromuscular junctions after in vivo inactivation with diisopropylfluorophosphate, *J. Neurosci.* 5, 951-955.
21. Trojan, S. a. k. (1999) *Lékařská fyziologie* Grada Publishing, Praha.
22. Ding, S. J., Carr, J., Carlson, J. E., Tong, L., Xue, W., Li, Y., Schopfer, L. M., Li, B., Nachon, F., Asojo, O., Thompson, C. M., Hinrichs, S. H., Masson, P., and Lockridge, O. (2008) Five tyrosines and two serines in human albumin are labeled by the organophosphorus agent FP-biotin, *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1787-1794.
23. Bajgar, J., Fusek, J., and Hrdina, V. (1991) *Vojenská toxikologie* VLA JEP, Hradec Králové.
24. Bajgar, J. (2004) Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment, *Adv. Clin. Chem.* 38, 151-216.
25. Rochu, D., Chabriere, E., and Masson, P. (2007) Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning, *Toxicology* 233, 47-59.
26. Lockridge, O., Li, B., Grigoryan, H., Duysen, E. G., Masson, P., Nachon, F., and Schopfer, L. M. (2009) A new motif for organophosphorus agent binding to proteins that have no active site serine, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.
27. Eyer, P. A. and Worek, F. (2007) Oximes, in *Chemical warfare agents: Toxicology and treatment* (Marrs, T. C., Maynard, R. L., and Sidell, F. R., Eds.) 2. ed., John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
28. Milatovic, D. and Jokanovic, M. (2009) Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in the treatment of OP poisoning, in *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (Gupta, R. C., Ed.) 1. ed., Academic Press, London.
29. Shih, T. M., Skovira, J. W., O'Donnell, J. C., and McDonough, J. H. (2009) In vivo reactivation of blood, brain and tissue cholinesterase activity inhibited by

organophosphorus nerve agents at a lethal dose, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.

30. Kassa, J. and Cabal, J. (1999) A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with presently used oximes and H oximes against sarin by in vitro and in vivo methods, *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 560-565.
31. Kassa, J. and Cabal, J. (1999) A comparison of the efficacy of a new asymmetric bispyridinium oxime BI-6 with currently available oximes and H oximes against soman by in vitro and in vivo methods, *Toxicology* 132, 111-118.
32. Krummer, S., Thiermann, H., Worek, F., and Eyer, P. (2002) Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate, *Arch. Toxicol.* 76, 589-595.
33. Jokanovic, M. and Stojiljkovic, M. P. (2006) Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning, *Eur. J. Pharmacol.* 553, 10-17.
34. Goncalves, A., Franco, T. C. C., Wilter, A., and Figueroa-Villar, J. D. (2009) Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun, *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 968-975.
35. Abou-Donia, M. B. (2003) Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity, *Arch. Environ. Health* 58, 484-497.
36. Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., and Shafferman, A. (1998) Functional characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase, *J. Biol. Chem.* 273, 19509-19517.
37. Ekholm, M. and Konschin, H. (2009) Comparative model building of human butyrylcholinesterase, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 467, 161-172.
38. Cooper, J. R., Bloom, F. E., and Roth, R. H. (2003) *The biochemical basis of neuropharmacology* Oxford University Press, New York.
39. Goodall, R. (2004) Cholinesterase: phenotyping and genotyping, *Ann. Clin. Biochem.* 41, 98-110.
40. Lockridge, O. and Masson, P. (2000) Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk, *Neurotoxicology* 21, 113-126.
41. Wolfe, A. D., Blick, D. W., Murphy, M. R., Miller, S. A., Gentry, M. K., Hartgraves, S. L., and Doctor, B. P. (1992) Use of cholinesterases as pretreatment drugs for the protection of rhesus monkeys against soman toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117, 189-193.
42. Maxwell, D. M., Castro, C. A., De La Hoz, D. M., Gentry, M. K., Gold, M. B., Solana, R. P., Wolfe, A. D., and Doctor, B. P. (1992) Protection of rhesus



monkeys against soman and prevention of performance decrement by pretreatment with acetylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115, 44-49.

43. Kronman, C., Cohen, O., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, A., and Shafferman, A. (2007) Polyethylene-glycol conjugated recombinant human acetylcholinesterase serves as an efficacious bioscavenger against soman intoxication, *Toxicology* 233, 40-46.
44. Broomfield, C. A., Maxwell, D. M., Solana, R. P., Castro, C. A., Finger, A. V., and Lenz, D. E. (1991) Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 633-638.
45. Lenz, D. E., Maxwell, D. M., Koplovitz, I., Clark, C. R., Capacio, B. R., Cerasoli, D. M., Federko, J. M., Luo, C., Saxena, A., Doctor, B. P., and Olson, C. (2005) Protection against soman or VX poisoning by human butyrylcholinesterase in guinea pigs and cynomolgus monkeys, *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 205-210.
46. Saxena, A., Sun, W., Luo, C., and Doctor, B. P. (2005) Human serum butyrylcholinesterase: in vitro and in vivo stability, pharmacokinetics, and safety in mice, *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 199-203.
47. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00333515?term=butyrylcholinesterase&rank=2>, (cit. 15.9.2009)
48. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00333528?term=butyrylcholinesterase&rank=1>, (cit. 15.9.2009)
49. Cerasoli, D. M., Griffiths, E. M., Doctor, B. P., Saxena, A., Fedorko, J. M., Greig, N. H., Yu, Q. S., Huang, Y., Wilgus, H., Karatzas, C. N., Koplovitz, I., and Lenz, D. E. (2005) In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger, *Chem. Biol. Interact.* 157-158, 363-365.
50. Lenz, D. E., Yeung, D., Smith, J. R., Sweeney, R. E., Lumley, L. A., and Cerasoli, D. M. (2007) Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review, *Toxicology* 233, 31-39.
51. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00744146?term=protexia&rank=1>, (cit. 15.9.2009)
52. Doctor, B. P., Blick, D. W., Caranto, G., Castro, C. A., Gentry, M. K., Larrison, R., Maxwell, D. M., Murphy, M. R., Schutz, M., Waibel, K., and . (1993) Cholinesterases as scavengers for organophosphorus compounds: protection of primate performance against soman toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 87, 285-293.
53. Kovarik, Z., Katalinic, M., and Sinko, G. (2009) Oxime-Assisted reactivation of phosphorylated butyrylcholinesterase, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.

54. Aurbek, N., Thiermann, H., Eyer, F., Eyer, P., and Worek, F. (2009) Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis, *Toxicology* 259, 133-139.
55. Carletti, E., Aurbek, N., Gillon, E., Liodice, M., Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C., Masson, P., Thiermann, H., Nachon, F., and Worek, F. (2009) Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun, *Biochem. J.* 421, 97-106.
56. Porzio, E., Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., and Manco, G. (2007) A new phosphotriesterase from *Sulfolobus acidocaldarius* and its comparison with the homologue from *Sulfolobus solfataricus*, *Biochimie* 89, 625-636.
57. Ghanem, E. and Raushel, F. M. (2005) Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 459-470.
58. Aubert, S. D., Li, Y., and Raushel, F. M. (2004) Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase, *Biochemistry* 43, 5707-5715.
59. Pei, L., Omburo, G., McGuinn, W. D., Petrikovics, I., Dave, K., Raushel, F. M., Wild, J. R., DeLoach, J. R., and Way, J. L. (1994) Encapsulation of phosphotriesterase within murine erythrocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124, 296-301.
60. Petrikovics, I., Hong, K., Omburo, G., Hu, Q. Z., Pei, L., McGuinn, W. D., Sylvester, D., Tamulinas, C., Papahadjopoulos, D., Jaszberenyi, J. C., and Way, J. L. (1999) Antagonism of paraoxon intoxication by recombinant phosphotriesterase encapsulated within sterically stabilized liposomes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 56-63.
61. Jun, D., Kuca, K., Bajgar, J., Hruby, M., Kucka, J., Renault, F., and Masson, P. (2007) Phosphotriesterase modified by poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide], *Toxicology* 233, 235.
62. Masson, P. and Rochu, D. (2009) Catalytic Bioscavengers: The next generation of bioscavenger-based medical countermeasures, in *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (Gupta, R. C., Ed.) 1. ed., Academic Press, London.
63. Millard, C. B., Lockridge, O., and Broomfield, C. A. (1995) Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase, *Biochemistry* 34, 15925-15933.
64. Millard, C. B., Lockridge, O., and Broomfield, C. A. (1998) Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase, *Biochemistry* 37, 237-247.
65. Kovarik, Z., Radic, Z., Berman, H. A., and Taylor, P. (2007) Mutation of acetylcholinesterase to enhance oxime-assisted catalytic turnover of methylphosphonates, *Toxicology* 233, 79-84.

66. Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M. A., Wu, F., and Raushel, F. M. (2001) Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues, *Biochemistry* 40, 1332-1339.
67. Kirby, S., Norris, J., and Smith, J.R. (2009) Human paraoxonase double mutants hydrolyze organophosphorus compounds, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.
68. Jeong, H. C., Park, N. J., Chae, C. H., Musilek, K., Kassa, J., Kuca, K., and Jung, Y. S. (2009) Fluorinated pyridinium oximes as potential reactivators for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent, *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6213-6217.
69. Gordon, R. K., Campbell, A. J., Clarkson, E. D., DeMar, J. C., Haigh, J. R., Herdman, Ch. A., Khan, F. A., Leader, H., Marek, E., Nambiar, M. P., Owens, R. R., Ratcliffe, R. H., and Schulz, S. M. (2009) Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.
70. Garcia, G. E., Campbell, A. J., Olson, J., Legler, P. M., Moorad-Doctor, J., and Kim, A. (2009) Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators, in *10th International Meeting on Cholinesterases*.
71. Worek, F., Aurbek, N., and Thiermann, H. (2007) Reactivation of organophosphate-inhibited human AChE by combinations of obidoxime and HI 6 in vitro, *J. Appl. Toxicol.* 27, 582-588.
72. Kuca, K., Cabal, J., Jun, D., Kassa, J., Bartosova, L., Kunesova, G., and Dohnal, V. (2005) Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators - antidotes used for treatment of nerve agent poisonings, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 149, 429-431.

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce (I. – VII.)

**I.** Jun D., **Musilová L.**, Link M., Loiodice M., Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning (*submitted*)

**II.** Jun D., **Musilová L.**, Kuča K., Kassa J., Bajgar J.: Potency of Several Oximes to Reactivate Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon In Vitro. *Chem.-Biol.Interact.* (2008) 175, 421-424.

**III.** **Musilová L.**, Kuča K., Jung Y. S., Jun D.: In Vitro Oxime-Assisted Reactivation of Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Clin Toxicol.* (2009) 47, 545-550.

**IV.** Jun D., **Musilová L.**, Kuča K., Musílek K., Bajgar J.: Reactivation of AChE and BuChE activity – Possible implications for prophylaxis against nerve agents. In *Central and peripheral nervous system: Effects of highly toxic organophosphates and their antidotes* (Bajgar, J., Ed.) (2009) Research Signpost, Kerala, India, ISBN 978-81-308-0331-9 (*in press*)

**V.** **Musilová L.**, Kuča K., Pohanka M., Holas O., Jun D.: *In vitro* ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (*submitted*)

**VI.** Kuča K., **Musilová L.**, Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Žďárová- Karasová J.: Novel bisquaternary oximes – Reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon (*submitted*)

**VII.** **Musilová L.**, Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Kuča K.: Novel Nucleophilic Compounds with Oxime Group as Reactivators of Paraoxon-Inhibited Cholinesterases (*submitted*)

# I.

## **Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning**

Jun D., Musilová L., Link M., Loiodice M., Nachon F.,  
Rochu D., Renault F., Masson P.

*(submitted)*

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF METHOXY  
POLYETHYLENE GLYCOL-CONJUGATED PHOSPHOTRIESTERASE AS A  
POTENTIAL CATALYTIC BIOSCAVENGER AGAINST  
ORGANOPHOSPHATE POISONING**

Daniel Jun<sup>1,2</sup>, Lucie Musilová<sup>3</sup>, Marek Link<sup>4</sup>, Mélanie Loiodice<sup>5</sup>, Florian Nachon<sup>5</sup>,  
Daniel Rochu<sup>5</sup>, Frédérique Renault<sup>5</sup>, Patrick Masson<sup>5</sup>

*<sup>1</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Czech Republic, <sup>2</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Praha, Czech Republic, <sup>3</sup>Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic, <sup>4</sup>Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Králové, Czech Republic, <sup>5</sup>Institut de Recherche Biomédicale des Armées - CRSSA, Département de Toxicologie, Unité d'Enzymologie, La Tronche cedex, France*

**ABSTRACT**

Bioscavengers are considered as promising antidotes against organophosphate poisoning. We focused on a bacterial phosphotriesterase (PTE) expressed in *E. coli*. The main disadvantage of this non-human catalytic bioscavenger is its relatively short half-life in the organism and strong immunogenicity after repeated administration. Therefore, we prepared different methoxy polyethylene glycol (MPEG) conjugated recombinant PTE as a potential catalytic bioscavenger with the aim to improve its biological properties. Enzyme was modified with two linear monofunctional MPEG derivatives with reactive aldehyde group of molecular weight 2 kDa and 5 kDa. We optimized reaction conditions (reagent ratios, temperature and duration of modification reaction) and we prepared homogeneous population of fully modified recombinant PTE with molecular weight around 52 kDa and 76 kDa, respectively. Modified PTE was characterized using SDS-PAGE and MALDI-TOF and by determining  $K_m$  and  $V_{max}$ . We also investigated thermal stability of modified enzyme at 37 °C. Based on our results, for future *in vivo* evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics properties, we selected recombinant PTE modified with 5 kDa MPEG aldehyde for its superior thermal stability.

## KEYWORDS

phosphotriesterase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, organophosphate, scavenger, bioscavenger, pegylation, methoxy polyethylene glycol, pesticides, nerve agents

## INTRODUCTION

Organophosphorus (OP) compounds are widely used around the whole world as pesticides (e. g. malathion, diazinon, chlorpyrifos) in agriculture, as lubricants and softeners and flame retardants in the industry and as highly toxic nerve agents (e. g. sarin, soman, VX) for military purposes in some armies. Nerve agents and oxon forms of OP pesticides are toxic compounds towards living organisms due to their ability to inhibit enzymes acetylcholinesterase (AChE; EC3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) in an irreversible manner. Their mechanism of action is phosphonylation or phosphorylation of serine hydroxyl group in the active site of enzyme. Inhibition of AChE involved in neurotransmission can lead in cholinergic crisis and possibly death of intoxicated organism [1,2]. For the recovery of inhibited AChE activity during the therapy of intoxication, compounds from the group of aldoxime reactivators are employed usually in combination with anticholinergic drug atropine [3,4,5]. Their reactivation efficacy depends on their chemical structure and also type of OP inhibitor [6,7].

Relatively new group of potential prophylactics and therapeutics are bioscavengers, which are considered as promising antidotes against organophosphate poisoning. Biomolecules (typically enzymes) from this group are capable of neutralizing OP inhibitors rapidly in the bloodstream after their penetration into organism before they reach their physiological targets [3,8]. Suitable candidates for these purposes are cholinesterases (stoichiometric scavengers), human paraoxonase, carboxylesterase and PTE (catalytic scavengers). The advantage of bioscavengers compared to current antidotes is their ability to prevent irreversible effects of organophosphate intoxications, such as post exposure incapacitation or brain damage [9]. They can also be used in post-exposure treatments, as active components in topical skin protectants and for decontamination of skin, mucosa, and wounds under mild conditions [10].

We focused on a bacterial PTE expressed in *E. coli*. This enzyme is a zinc metalloprotein, which catalyzes the hydrolysis of a wide variety of organophosphates

and related phosphonates with a high catalytic turnover and broad substrate specificity [11]. The main disadvantage of this non-human catalytic bioscavenger is its relatively short half-life in the organism, possible immunogenicity after repeated administration and various adverse disposition physiological factors [12,13]. A way to circumvent these problems is the conjugation of PTE with biocompatible polyethylene glycol derivatives. Cohen et al. demonstrated that controlled conjugation of polyethylene-glycol (PEG) side-chains to lysine residues of rHuAChE as well as of rHuBChE, can generate bioactive cholinesterase enzymes exhibiting an improved pharmacokinetic profile [14,15]. The pegylation of insulin almost completely eliminated the resultant conjugate's immunogenicity, allergenicity, and antigenicity. The conjugates were observed to remain in the systemic circulation for longer periods of time than unmodified insulin after subcutaneous administration [16].

The aim of present study was preparation of recombinant PTE ( $M_w = 36$  kDa) conjugated with methoxy polyethylene glycol (MPEG) derivatives with reactive aldehyde group, their characterization and optimization of conjugation process. The objective of reaction optimization was to obtain homogeneous and fully MPEG-modified PTE, with the aim to improve its biological properties. We also determined thermal stability of modified enzymes at physiological conditions (pH 7.4, 37 °C).

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Chemicals*

Chemicals used in experiments were of analytical grade and were purchased from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic), Pliva-Lachema (Brno, Czech Republic), Acros Organics (Geel, Belgium), LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, France) and PENTA (Prague, Czech Republic). Water was purified on a GORO AQUA 35 apparatus (GORO, Prague, Czech Republic).

### *Preparation and purification of PTE*

Enzyme was prepared as previously described [17]. *P. diminuta* PTE was expressed in *E. coli* HMS 174 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA) carrying the plasmid pET17b-PTE<sub>m</sub>. pET17b was from Novagen. Briefly, the enzyme was purified as follows: (a) ion exchange chromatography on Fast Flow DEAE-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden); (b) affinity chromatography on Green 19-Agarose gel



(Sigma); and (c) size exclusion chromatography on Ultrogel AcA54 (Biosepra, Cergy-Saint-Christophe, France) [18]. Prior the experiment, PTE solution in 50 mM borate (sodium tetraborate/sodium hydroxide) buffer, pH 8.5, was re-purified using ultra filtration unit (cut-off 30 kDa; Vivascience AG, Germany) and was subsequently filtered through 0.22- $\mu$ m disposable syringe filter (Millipore, Czech Republic) to avoid bacterial contamination. The final concentration of PTE was estimated using the bicinchoninic acid method with bovine serum albumin (BSA) as the protein standard and was 1.45 mg.ml<sup>-1</sup>.

#### *Modification of PTE*

MPEG polymers *O*-[2-(6-oxocaproylamino)ethyl]-*O'*-methylpolyethylene glycol aldehyde (MPEG 2 kDa;  $M_w = 2$  kDa) and *O*-[2-(6-oxocaproylamino)ethyl]-*O'*-methylpolyethylene glycol aldehyde (MPEG 5 kDa;  $M_w = 5$  kDa) were used for PTE modification. Polymers were dissolved in 0.2 M borate buffer (pH 8.5; 0.1 mM CoCl<sub>2</sub>) together with reduction agent sodium cyanoborohydride (NaBH<sub>3</sub>CN) and mixed with PTE solution. We used different PTE/MPEG/ NaBH<sub>3</sub>CN molar ratios for modification ranging from 1:80:8 000 to 1:2 400:96 000. Reaction time was from 1 to 24 hours and the reaction temperature 25 °C or 40 °C. Reaction was stopped after addition of 10% glycine solution into reaction mixture. The rest of unreacted polymer was removed from modified PTE using ultrafiltration unit (cut-off 10 kDa; Vivascience AG, Germany). Modification process was monitored by measuring of enzyme activity and carrying out SDS-PAGE (7.5% separation gel). Electrophoresis was performed using Mini-PROTEAN 3 Cell system (Bio-Rad, Prague, Czech Republic). Proteins on gels were stained using EZBlue Gel Staining Reagent (colloidal Coomassie brilliant blue G-250; Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic), Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad, Prague, Czech Republic) was used as an appropriate molecular marker.

#### *Measurement of PTE activity*

Enzymatic activity was measured in 50 mM borate buffer (pH 8.5; 0.1 mM CoCl<sub>2</sub>; 0.1 % BSA) at 25°C, using 1 mM paraoxon as substrate. Enzyme activity was estimated using spectrophotometer Helios Alfa (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) by monitoring the change in absorbance at 400 nm, corresponding to the released *p*-nitrophenol from paraoxon after its hydrolysis.

### *Mass spectrometric analysis*

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used for recombinant PTE and its MPEG-conjugated products molecular weight determination. PTE or its MPEG-conjugated products were dissolved in 50 mM borate buffer pH 8.5, containing 1 mM calcium chloride to a final concentration of  $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . An aliquot of sample was mixed with  $10 \text{ mg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/50% water/0.1% trifluoroacetic acid (v/v), deposited onto a MALDI plate and dried. Mass spectra were acquired in the linear positive ion mode using a 4800 MALDI TOF/TOF<sup>TM</sup> Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

### *Determination of $K_m$ and $V_{max}$*

Kinetic parameters of enzyme were determined in 50 mM borate buffer (pH 8.5; 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$ ) at 25°C. Enzyme was incubated with varying concentrations of paraoxon (5 – 2 000  $\mu\text{M}$ ). PTE catalysis obeys the Michaelis-Menten model. Calculations for determination of catalytic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  were performed using software GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, CA, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### *Thermal stability*

Thermal stability was investigated at 37 °C in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$ ). Residual activity was measured after incubation at desired time intervals. Samples of the enzymes for thermal stability were incubated using thermometer controlled metal-block-thermostat MBT 250 (Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Germany). At required time, aliquots of the enzyme samples were taken and chilled. At required time, aliquots of the enzyme samples were taken chilled and the activity was determined.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

MPEG 2 kDa and MPEG 5 kDa aldehydes react with lysine (Lys)  $\epsilon$ -amino group. There are seven free Lys amino groups on the surface of monomeric PTE and one amino group located at the N-terminus, which are theoretically capable of reacting with MPEG molecules. The probability of N-terminus reaction depends on pH during

conjugation. Reaction of PTE with MPEG aldehyde has two steps: formation of Schiff base (condensation), which is in the next step immediately reduced *in situ* by sodium cyanoborohydride to the secondary amine (Fig. 1) [19]. Yielded secondary amine bond is stable in the organism.

We established optimal conditions of the modification such as ratio of enzyme (set as 1), polymer and reduction agent. The aim was to obtain fully modified homogeneous population of recombinant PTE with single band on SDS-PAGE gel. Based on residual activity of conjugated enzyme and number of bands on SDS-PAGE gel (results not shown), we determined optimal molar ratios of enzyme/polymer/ $\text{NaBH}_3\text{CN}$  1:1 200:48 000 for MPEG 2 kDa and 1:800:40 000 for MPEG 5 kDa. Optimal reaction time for conjugation of recombinant PTE with both MPEG 2 kDa and MPEG 5 kDa was 24 hours to get fully modified PTE at given reactant ratios. Lower reaction temperature 25 °C provided conjugates with higher activity than those prepared at 40 °C. The catalytic activity of prepared modified enzymes was not significantly altered, as well as their  $K_m$  values (Table 1).

According to the SDS-PAGE gel and measured mass spectra, we obtained fully modified homogeneous population of recombinant PTE with molecular weight around 52 kDa and 76 kDa, respectively (Fig. 2 and Fig. 3). Mass spectra of prepared MPEG conjugates revealed, similarly to the SDS-PAGE gel, one population of conjugated enzyme (two wide and relatively disperse peaks corresponding to the modified PTE ion having one and two positive charges).

Based on the thermostability results, the most stable enzyme at 37 °C and physiological pH (7.4) was PTE modified by MPEG 5 kDa. This conjugate had significantly higher stability than recombinant PTE and PTE-MPEG 2 kDa. Because the thermal stability is crucial for long half-life of the administered enzyme in the circulation [20], PTE modified by MPEG 5 kDa is the most suitable candidate for further *in vivo* evaluation.

## CONCLUSIONS

We established optimal conditions for the modification of PTE with MPEG 2 kDa and MPEG 5 kDa, and we obtained fully modified homogeneous population of recombinant PTE.

Based on our results, for future *in vivo* evaluation of pharmacokinetics and pharmacodynamics properties we selected recombinant PTE modified with MPEG 5 kDa aldehyde for its superior thermal stability.

Our further studies will be focused on investigation of bioavailability and pharmacokinetics of the conjugate, evaluation of immunological response following repeated administration in suitable animal model, and estimation of its protective properties. Modified PTE could be a suitable candidate for protection against organophosphate poisoning.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the MoD of the Czech Republic (project MO0FVZ0000604), and Plan de coopération militaire Franco-Tchèque (16A03-FR20) and DGA grant 08co501.

### **REFERENCES**

- [1] L. G. Sultatos, Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides, *J. Toxicol. Environ. Health.* 43 (1994) 271-289.
- [2] L. G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology, *Clin. Chim. Acta.* 366 (2006) 1-13.
- [3] J. Bajgar, J. Fusek, K. Kuca, L. Bartosova, and D. Jun, Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction, *Mini. Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 461-466.
- [4] F. Worek, N. Aurbek, J. Wetherell, P. Pearce, T. Mann, and H. Thiermann, Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: pig versus minipig acetylcholinesterase, *Toxicology.* 244 (3-2-2008) 35-41.
- [5] J. Bajgar, J. Fusek, J. Kassa, K. Kuca, and D. Jun, Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 2977-2986.
- [6] K. Kuca, J. Cabal, Y. S. Jung, K. Musilek, O. Soukup, D. Jun, M. Pohanka, L. Musilova, J. Karasova, L. Novotny, and M. Hrabnova, Reactivation of human brain homogenate cholinesterases inhibited by Tabun using newly developed oximes K117 and K127, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 105 (2009) 207-210.

- [7] L. Musilova, K. Kuca, Y. S. Jung, and D. Jun, In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Clin. Toxicol. (Phila)*. 47 (2009) 545-550.
- [8] P. Masson and D. Rochu, Catalytic Bioscavengers: The Next Generation of Bioscavenger-Based Medical Countermeasures, 1st (2009) 1053-1065.
- [9] B. P. Doctor and A. Saxena, Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity, *Chem. Biol. Interact.* 157-158:167-71. Epub@2005 Nov 15. (15-12-2005) 167-171.
- [10] G. A. Omburo, J. M. Kuo, L. S. Mullins, and F. M. Raushel, Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase, *J. Biol. Chem.* 267 (5-7-1992) 13278-13283.
- [11] I. Petrikovics, T. C. Cheng, D. Papahadjopoulos, K. Hong, R. Yin, J. J. DeFrank, J. Jaing, Z. H. Song, W. D. McGuinn, D. Sylvester, L. Pei, J. Madec, C. Tamulinas, J. C. Jaszberenyi, T. Barcza, and J. L. Way, Long circulating liposomes encapsulating organophosphorus acid anhydrolase in diisopropylfluorophosphate antagonism, *Toxicol. Sci.* 57 (2000) 16-21.
- [12] K. Tuovinen, E. Kaliste-Korhonen, F. M. Raushel, and O. Hanninen, Eptastigmine-phosphotriesterase combination in DFP intoxication, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 (1996) 364-369.
- [13] O. Cohen, C. Kronman, T. Chitlaru, A. Ordentlich, B. Velan, and A. Shafferman, Effect of chemical modification of recombinant human acetylcholinesterase by polyethylene glycol on its circulatory longevity, *Biochem. J.* 357 (1-8-2001) 795-802.
- [14] C. Kronman, O. Cohen, L. Raveh, O. Mazor, A. Ordentlich, and A. Shafferman, Polyethylene-glycol conjugated recombinant human acetylcholinesterase serves as an efficacious bioscavenger against soman intoxication, *Toxicology.* 233 (2007) 40-46.
- [15] K. D. Hinds and S. W. Kim, Effects of PEG conjugation on insulin properties, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (17-6-2002) 505-530.
- [16] D. Rochu, N. Beaufet, F. Renault, N. Viguie, and P. Masson, The wild type bacterial Co(2+)/Co(2+)-phosphotriesterase shows a middle-range thermostability, *Biochim. Biophys. Acta.* 1594 (11-2-2002) 207-218.
- [17] D. Rochu, N. Viguie, F. Renault, D. Crouzier, M. T. Froment, and P. Masson, Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence, *Biochem. J.* 380 (15-6-2004) 627-633.

[18] M. Sasatsu, H. Onishi, and Y. Machida, Preparation of a PLA-PEG block copolymer using a PLA derivative with a formyl terminal group and its application to nanoparticulate formulation, *Int. J. Pharm.* 294 (27-4-2005) 233-245.

[19] J. M. Harris and R. B. Chess, Effect of pegylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 214-221.

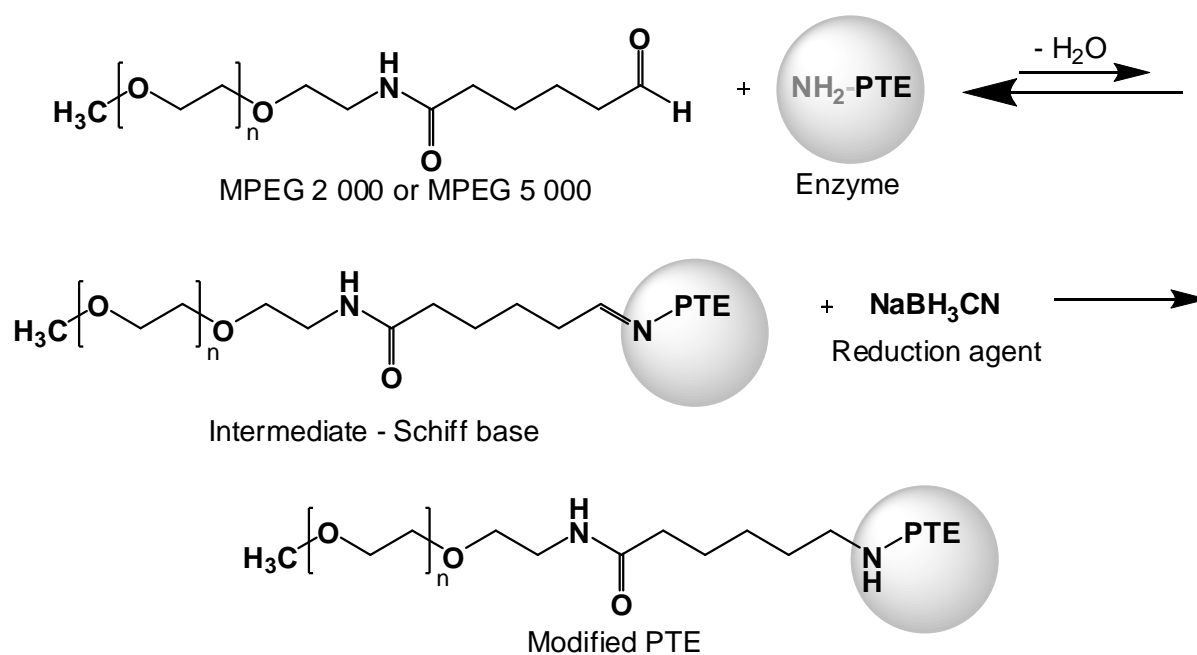


Figure 1. Reaction scheme of PTE with MPEG 2 kDa or MPEG 5 kDa. Reaction consists of two steps – (a) formation of Schiff base and (b) its subsequent reduction with sodium cyanoborohydride to the secondary amine.

Enzyme	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) (95% confidence interval)	$V_{max}$ ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (95% confidence interval)
<b>PTE</b>	289.8 (183.5 - 396.1)	3.14 (2.75 - 3.53)
<b>PTE-MPEG 2 kDa</b>	266.8 (197.8 - 335.8)	2.12 (1.94 - 2.30)
<b>PTE-MPEG 5 kDa</b>	232.1 (183.9 - 280.2)	1.64 (1.53 - 1.75)

Table 1.  $K_m$  and  $V_{max}$  of recombinant PTE end prepared MPEG conjugates. Catalytic parameters of enzyme were determined in 50 mM borate buffer (pH 8.5; 0.1 mM  $\text{CoCl}_2$ ) at 25°C.

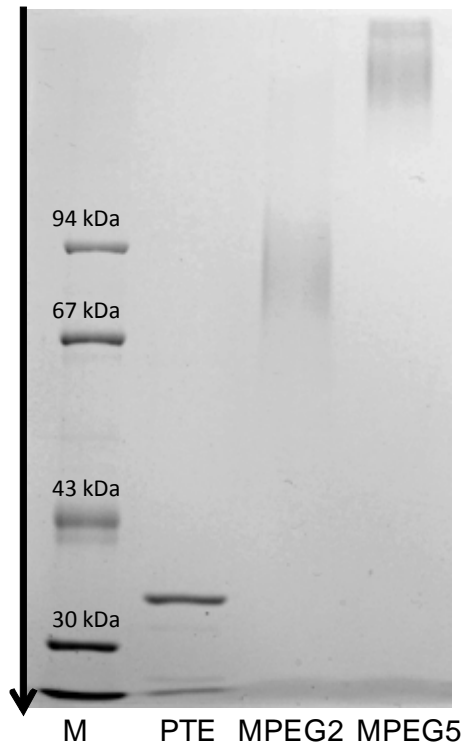


Figure 2. SDS-PAGE (7.5%). Legend: M - Kaleidoscope Prestained Standard, PTE – recombinant enzyme, MPEG2 – PTE conjugated with MPEG 2 kDa, MPEG5 – PTE conjugated with MPEG 5 kDa. Gel was stained using Coomassie brilliant blue.



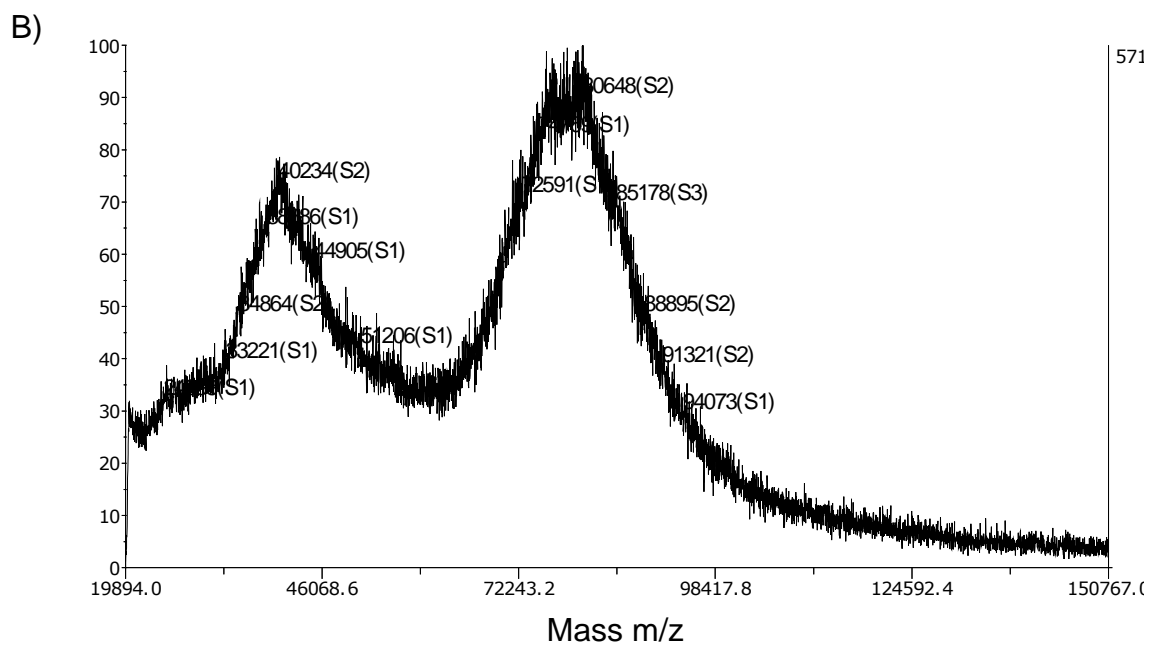
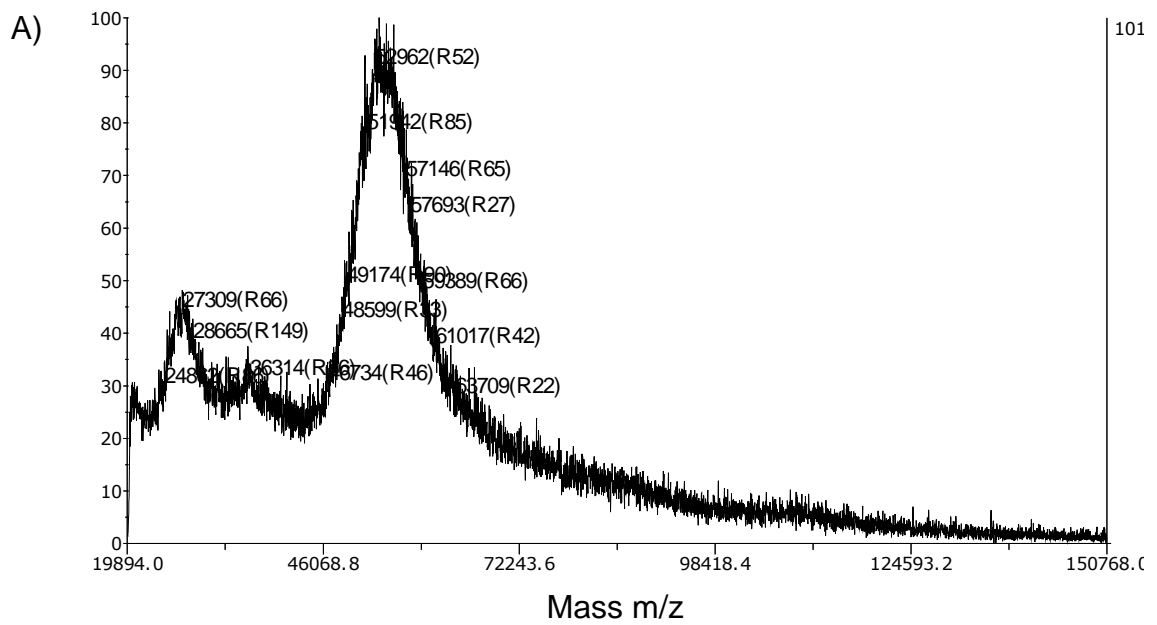


Figure 3. Mass spectra of A) PTE conjugated with MPEG 2 kDa ( $M_w=52$  kDa) and B) PTE conjugated with MPEG 5 kDa ( $M_w=76$  kDa). Left peaks correspond to the ions with double positive charges, right ones to the ions with one charge.

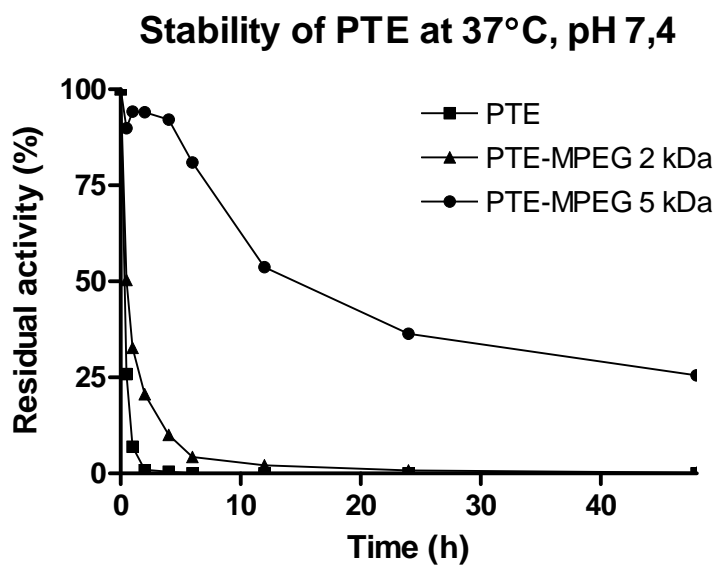


Figure 4. Thermal stability of recombinant PTE and prepared MPEG conjugates at 37°C. Stability was measured in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 mM CoCl<sub>2</sub>).

## II.

### **Potency of Several Oximes to Reactivate Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon In Vitro**

Jun D., Musilová L., Kuča K., Kassa J., Bajgar J.

*Chem Biol.Interact.* (2008) 175, 421-424.



Contents lists available at ScienceDirect

## Chemico-Biological Interactions

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chembioint](http://www.elsevier.com/locate/chembioint)

## Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon in vitro

D. Jun<sup>a,b,\*</sup>, L. Musilova<sup>c</sup>, K. Kuca<sup>a,b</sup>, J. Kassa<sup>b</sup>, J. Bajgar<sup>b</sup><sup>a</sup> Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic<sup>c</sup> Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Available online 7 May 2008

## Keywords:

Acetylcholinesterase  
 Butyrylcholinesterase  
 Pesticide  
 Organophosphate  
 Reactivator  
 Oxime  
 Bioscavenger

## ABSTRACT

Organophosphorus pesticides (e.g. chlorpyrifos, malathion, and parathion) and nerve agents (sarin, tabun, and VX) are highly toxic organophosphorus compounds with strong inhibition potency against two key enzymes in the human body—acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8). Subsequent accumulation of acetylcholine at synaptic clefts can result in cholinergic crisis and possible death of intoxicated organism. For the recovery of inhibited AChE, derivatives from the group of pyridinium or bispyridinium aldoximes (called oximes) are used. Their efficacy depends on their chemical structure and also type of organophosphorus inhibitor. In this study, we have tested potency of selected cholinesterase reactivators (pralidoxime, obidoxime, trimeboxime, methoxime and H-oxime HI-6) to reactivate human erythrocyte AChE and human plasma BuChE inhibited by pesticide paraoxon. For this purpose, modified Ellman's method was used and two different concentrations of oximes (10 and 100  $\mu\text{M}$ ), attainable in the plasma within antidotal treatment of pesticide intoxication were tested. Results demonstrated that obidoxime (96.8%) and trimeboxime (86%) only reached sufficient reactivation efficacy in case of paraoxon-inhibited AChE. Other oximes evaluated did not surpassed more than 25% of reactivation. In the case of BuChE reactivation, none of tested oximes surpassed 12.5% of reactivation. The highest reactivation efficacy was achieved for trimeboxime (12.4%) at the concentration 100  $\mu\text{M}$ . From the data obtained, it is clear that only two from currently available oximes (obidoxime and trimeboxime) are good reactivators of paraoxon-inhibited AChE. In the case of BuChE, none of these reactivators could be used for its reactivation.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) reactivators are generally used as a part of the antidotal therapy following intoxications with organophosphorus inhibitors [1]. From the molecular level, they are able to break down the bond

between inhibited AChE and inhibitor, which arose within the AChE inhibition, and thus reactivate the enzyme. Afterwards, the enzyme is able to fulfill its physiological role in the organism [2].

During two last decades, many scientific efforts have been focused on plasma cholinesterase (butyrylcholinesterase; BuChE; EC 3.1.1.8) as bioscavenger capable to sequester the molecules of nerve agents or pesticides from the blood stream and so to serve as nerve agent-nonspecific prophylactics [3]. Several efforts were aimed to preparation, purification and large-scale production of such scavenging BuChE [4]. Other new approaches were focused

\* Correspondence author at: Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, Hradec Kralove 503 32, Czech Republic. Tel.: +420 973 251 504; fax: +420 495 518 094.

E-mail address: [jun@pmfhk.cz](mailto:jun@pmfhk.cz) (D. Jun).

on development of catalytic BuChE capable to catch the inhibitor, detoxify and once again serve as a new scavenger. Such modifications were possible using the preparation of BuChE mutants [5].

BuChE as well as AChE is the serine hydrolase that belongs to the esterase family within higher eukaryotes. Compared to AChE, BuChE function is unknown till today. It is able to split down similar substrates as AChE does, and due to this, it can act as AChE in case of Alzheimer's disease [6]. It is also inhibited by nerve agents and pesticides in the same manner—phosphorylation of the serine hydroxyl group in its active site [7].

Due to the above-mentioned facts, there exists the hypothesis that also AChE reactivators used for treatment of nerve agent and pesticides intoxications could reactivate inhibited BuChE and so serve as “pseudocatalytic” bioscavengers.

To find out if BuChE is reactivable by AChE reactivators we wanted to test the currently available AChE reactivators (pralidoxime, obidoxime, trimeboxime, methoxime and HI-6) for their in vitro reactivation potency in this study. For comparison, we have also tested these oximes in parallel for their in vitro reactivation of AChE.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

AChE reactivators pralidoxime (2-PAM; 1-methyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium chloride); obidoxime (1, 3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropane dichloride); trimeboxime (TMB4; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-propane dibromide) and methoxime (MMB4; 1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-methane dibromide) were purchased from Leciva (Czech Republic) and Merck (Germany), respectively. HI-6 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-carbamoylpyridinium)-2-oxapropane dichloride) was purchased from Phoenix Chemicals Ltd. (United Kingdom).

Purity of all tested AChE reactivators was tested using TLC (DC-Alufolien Cellulose F; mobile phase *n*-butanol:acetic acid:water=5:1:2; detection by Dragendorff reagent) and NMR (Varian Gemini 300, Palo Alto, CA, USA).

Paraoxon (POX; *O,O*-diethyl-*O*-4-nitrophenylphosphate) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) in 95% purity. All other chemicals used in this study were of analytical purity and were purchased from Sigma–Aldrich (Czech Republic).

### 2.2. In vitro reactivation of AChE and BuChE

Human blood samples were obtained from healthy volunteers. The blood samples were centrifuged for 20 min at 5000 rpm and the plasma was removed as supernatant, frozen and was kept under  $-80^{\circ}\text{C}$  (source of BuChE). Then, the erythrocytes were hemolyzed in phosphate buffer (0.01 M, pH 7.4) in a ratio 1:10 (w/w), frozen and kept under  $-80^{\circ}\text{C}$  (source of AChE). Time of enzyme inhibition with paraoxon (2 h, corresponding to  $7 \times T_{1/2}$ ) was calculated from experimentally determined half life ( $T_{1/2}$ ) of reaction between enzyme and paraoxon. Concentration of paraoxon,

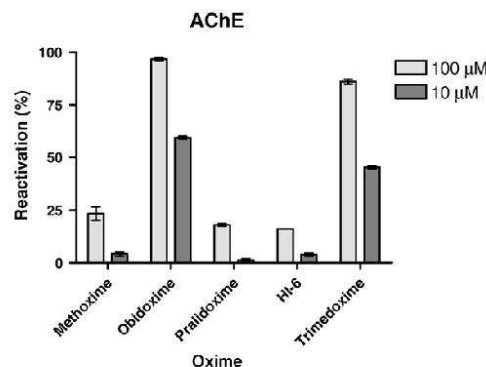


Fig. 1. Reactivation of paraoxon-inhibited acetylcholinesterase.

causing 95% enzyme inhibition ( $3.38 \times 10^{-6}$  M for AChE and  $1.4 \times 10^{-7}$  M for BuChE) was calculated from experimentally founded  $\text{IC}_{50}$  values. The inhibition of AChE was started in plastic cuvette by addition of paraoxon solution in isopropanol to the mixture of phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) and hemolyzate (activity before inhibition was set to 3.33 U/L) or plasma (activity was set to 13.3 U/L). After inhibition, the solution of reactivator in phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) was added to the mixture containing inhibited enzyme (final concentration of tested reactivator was 100 or 10 μM). After 10 min of reactivation, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) was added and the enzymatic reaction was initiated by addition of AChE substrate acetylthiocholine or BuChE substrate butyrylthiocholine. The final concentration of DTNB and acetylthiocholine or butyrylthiocholine in the mixture was 1 mM. The volume of sample in cuvette was 2 mL. The activity of AChE in hemolyzate and BuChE in plasma was determined with a modified method according to Ellman et al. [8]. The absorbance was measured at 436 nm for 1 min using a spectrophotometer (Helios Alfa, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). AChE activity was measured after 2 min of delay for minimizing of the interference of DTNB with thiols in hemolyzate. All results were

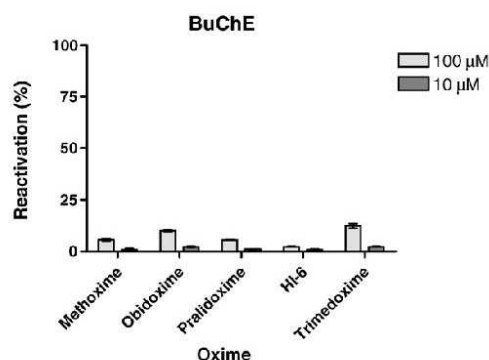


Fig. 2. Reactivation of paraoxon-inhibited butyrylcholinesterase.

**Table 1**  
Potency of cholinesterase reactivators to reactivate paraoxon-inhibited acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at concentrations 100 and 10  $\mu$ M

Reactivator	Reactivation (%)							
	AChE				BuChE			
	100 $\mu$ M		10 $\mu$ M		100 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Methoxime	23.4	3.2	4.3	1.1	5.6	0.4	0.8	0.6
Obidoxime	96.8	0.6	59.4	0.6	9.9	0.3	2.2	0.3
Pralidoxime	18.1	0.6	1.3	0.6	5.5	0.1	1.0	0.2
HI-6	16.1	0.0	3.9	0.6	2.3	0.2	0.8	0.4
Trimedoxime	86.0	1.1	45.3	0.6	12.4	1.1	2.3	0.2

corrected for hydrolysis of substrate by reactivators. Solutions of different cystein concentrations (added instead of hemolyzate) were prepared for absolute calibration of used method. Reactivation potency was calculated from the following equation:

$$\% R = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i}\right) \times 100$$

where % *R* is percent of reactivation,  $a_0$  is activity of intact enzyme,  $a_i$  is activity of inhibited enzyme and  $a_r$  is activity of reactivated enzyme.

Each measurement was repeated three times. All experiments were conducted under standard laboratory temperature (25°C). Calculations were performed using software GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com.

### 3. Results

Data characterizing *in vitro* activity of tested oximes towards paraoxon-inhibited AChE and BuChE are summarized in Figs. 1 and 2. Appropriate values of all results of reactivation are shown in Table 1.

From the results obtained for AChE reactivation, it is clear that the most potent reactivators tested in our study seem to be obidoxime and trimedoxime. Their reactivation activity surpassed other oximes tested. Although the highest reactivation potency was achieved at 100  $\mu$ M, potency at the concentration 10  $\mu$ M is also sufficient. Both concentrations of reactivators used in the experiment are attainable in the human plasma in case of use of reactivator during antidotal therapy. Except trimedoxime and obidoxime, the other oximes tested in this study (pralidoxime, HI-6 and methoxime) did not reached sufficient reactivation efficacy.

In case of reactivation of BuChE, none from the currently available oximes reached satisfactory reactivation potency. Trimedoxime only showed 12.4% of reactivation efficacy at the concentration 100  $\mu$ M.

### 4. Discussion

Prophylaxis against nerve agents and pesticides poisoning is currently well investigated throughout the world. Quaternary (pyridostigmine) and non-quaternary (physostigmine, huperzine, and 7-methoxytacrine) cholinesterase inhibitors, AChE reactivators or bioscav-

engers are tested or established (pyridostigmine) as prophylactics against these intoxications [9,10]. Bioscavengers are the newest scientific approach. Several studies have demonstrated that exogenously administered human serum BuChE can be used successfully as a safe, efficacious, and single prophylactic treatment to counteract the toxicity of nerve agents or pesticides [11]. The upper limit of human BuChE dose required for protection against organophosphates toxicity sufficient to protect erythrocyte AChE above 30% of baseline activity ranges, depending on nerve agent, from 134 to 249 mg/70 kg [12].

Currently, catalytic bioscavengers are considered to be more promising than stoichiometric. Paraoxonase and phosphotriesterase seem to be the right substitution. In this study, use of BuChE together with reactivators was discussed as potential "pseudocatalytic" scavenger. This concept was successfully demonstrated by Caranto et al., when the efficacy of fetal bovine serum AChE to detoxify sarin was amplified by addition of bis-quaternary oximes [13].

From the results obtained, it is clear that the oximes able to reactivate paraoxon-inhibited AChE are poor reactivators of paraoxon-inhibited BuChE. Due to this fact, such combination could not be used as pseudocatalytic scavenger supporting the turnover of nerve agents and pesticides detoxification.

However, in this work, we have tested only reactivation of paraoxon-inhibited cholinesterases. For better understanding of this problem, larger number of nerve agents and pesticides should be tested as inhibitors. Moreover, currently available oximes (pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime and HI-6) were tested only. Also larger group (not only the currently available ones) of AChE reactivators should be tested to get structure-activity relationship which could help in subsequent synthesis of new reactivators of BuChE—"rational synthesis of BuChE reactivators".

As discussed above, the data obtained in this work is the first one discussing the "pseudocatalytic bioscavenger" topics. They showed that currently available oximes are of poor efficacy in case of BuChE reactivation. To solve this problem more precisely, more investigation is needed.

### Acknowledgements

The authors are indebted to Mrs. M. Hrabnova for her skillful technical assistance. Financial support of the

Ministry of Defence, grant INTOX OPUOFVZ 200603 is gratefully acknowledged.

## References

- [1] D. Jun, K. Kuca, J. Picha, V. Koleckar, J. Marek, Potency of novel oximes to reactivate sarin inhibited human cholinesterases, *Drug Chem. Toxicol.* 31 (2008) 1–9.
- [2] F. Worek, N. Aurbek, J. Wetherell, P. Pearce, T. Mann, H. Thiermann, Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: pig versus mini pig acetylcholinesterase, *Toxicology* 244 (2008) 35–41.
- [3] D. Kolarich, A. Weber, M. Pabst, J. Stadimann, W. Teschner, H. Ehrlich, H. Schwarz, F. Altmann, Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma, *Proteomics* 8 (2008) 254–263.
- [4] D.M. Cerasoli, E.M. Griffiths, B.P. Doctor, A. Saxena, J.M. Fedorko, N.H. Greig, Q.S. Yu, Y. Huang, H. Wilgus, C.N. Karatzas, I. Koplovitz, D.E. Lenz, In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (protexia) as a potential nerve agent bioscavengers, *Chem. Biol. Interact.* 157–158 (2005) 363–365.
- [5] D.E. Lenz, D. Yeung, J.R. Smith, R.E. Sweeney, L.A. Lumley, D.M. Cerasoli, Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review, *Toxicology* 233 (2007) 31–39.
- [6] N.H. Greig, D.K. Lahiri, K. Sambamurti, Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy, *Int. Psychogeriatr.* 14 (Suppl. 1) (2002) 77–91.
- [7] D. Aslanian, P. Gróf, F. Renault, P. Masson, Raman spectroscopic study of conjugates of butyrylcholinesterase with organophosphates, *Biochim. Biophys. Acta* 1249 (1995) 37–44.
- [8] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.H. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [9] A. Levy, G. Cohen, E. Gilat, J. Kapon, S. Dachir, S. Abraham, M. Herskovitz, Z. Teitelbaum, L. Raveh, Extrapolating from animal studies to the efficacy in humans of a pretreatment combination against organophosphate poisoning, *Arch. Toxicol.* 81 (2007) 353–359.
- [10] E.X. Albuquerque, E.F.R. Pereira, Y. Aracava, W.P. Fawcett, M. Oliveira, W.R. Randall, T.A. Hamilton, R.K. Kan, J.A. Romano, M. Adler, Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 13220–13225.
- [11] A. Saxena, W. Sun, C. Luo, T.M. Myers, I. Koplovitz, D.E. Lenz, B.P. Doktor, Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds, *J. Mol. Neurosci.* 30 (2006) 145–148.
- [12] Y. Ashani, S. Pistinner, Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model, *Toxicol. Sci.* 77 (2004) 358–367.
- [13] G.R. Caranto, K.H. Waibel, J.M. Asher, R.W. Larrison, K.M. Brecht, M.B. Schutz, L. Raveh, Y. Ashani, A.D. Wolfe, D.M. Maxwell, et al., Amplification of the effectiveness of acetylcholinesterase for detoxification of organophosphorus compounds by bis-quaternary oximes, *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 347–357.

### **III.**

## **In Vitro Oxime-Assisted Reactivation of Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase.**

Musilová L., Kuča K., Jung Y. S., Jun D.

*Clin Toxicol.* (2009) 47, 545-550



ARTICLE

## *In vitro* oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase

LUCIE MUSILOVA<sup>1</sup>, KAMIL KUČA<sup>2,3,4</sup>, YOUNG-SIK JUNG<sup>5</sup>, and DANIEL JUN<sup>2,3,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>2</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, J.E. Purkinje University, Horeni, Usti nad Labem, Czech Republic

<sup>5</sup>Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Yuseong, Taejeon, Republic of Korea

<sup>6</sup>Department of Water Resources and Environmental Modeling, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka, Praha, Czech Republic

**Introduction.** Organophosphorus pesticides and nerve agents are highly toxic to humans and other living organisms, primarily because of their interaction with enzyme acetylcholinesterase. The aim of our study was to find suitable reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and to recommend the most efficacious compounds for the next evaluation as antidotes for intoxication by pesticides. **Methods.** Eighteen structurally different oxime reactivators were tested for their *in vitro* ability to reactivate paraoxon-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase and human plasma butyrylcholinesterase to find out structure–activity relationship within this set of compounds. Their reactivation ability was compared with commercially available acetylcholinesterase reactivators (pralidoxime, methoxime, trimedoxime, obidoxime, and HI-6). **Results and discussion.** The best reactivation ability was achieved with obidoxime, trimedoxime, compounds K027, K075, K203, and K048. We have also tested reactivation of butyrylcholinesterase with the aim to recommend an efficient reactivator, able to perform a “pseudo catalytic” bioscavenger with butyrylcholinesterase, which is developed as new antidote of organophosphate poisonings. Such combination could allow an enhancement of prophylactic and therapeutic efficiency of administered enzyme. Compounds K117, K269, K075, and trimedoxime were found to be the most potent reactivators of inhibited butyrylcholinesterase. **Conclusions.** In this work, we have evaluated only reactivation of paraoxon-inhibited cholinesterases. To get better understanding of this problem, a larger number of organophosphorus inhibitors should be used.

**Key words** Acetylcholinesterase; Butyrylcholinesterase; Oxime; Reactivator; Paraoxon; Pesticide; Organophosphate; Bioscavenger

### Introduction

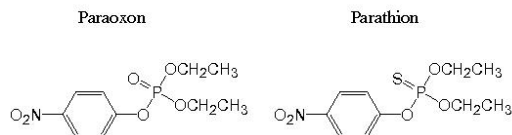
Organophosphorus pesticides (e.g., paraoxon, malathion, and methamidophos) and some chemical warfare agents (nerve agents, e.g., tabun, sarin, VX) are highly toxic to humans and other living organisms. They irreversibly inhibit enzymes acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8). Subsequent accumulation of acetylcholine at synaptic clefts in nervous system because of the inhibition of AChE can induce cholinergic crisis and lead to death of intoxicated person. For diagnosis and prognosis of organophosphate (OP) poisoning, the most useful parameter is the cholinesterase activity.<sup>1</sup>

Currently used antidotes in therapy of OP poisonings are anticholinergics (atropine), which antagonize the effect of accumulated acetylcholine and AChE reactivators (oximes), which reactivate inhibited AChE<sup>2</sup> in combination with anticonvulsive drugs (e.g., diazepam). Their reactivation ability depends on their chemical structure and also type of the organophosphorus inhibitor. Oxime reactivators of AChE are used worldwide in the treatment of OP poisoning and they are also introduced as prophylactic and therapeutic antidotes against nerve agent intoxications in some armies. Oximes hydrolytically cleave the OP molecule from the active site of inhibited AChE and regenerate its enzymatic function.<sup>3</sup> At this time, none of the commercially available oximes is sufficiently effective against all known organophosphorus nerve agents and pesticides.<sup>4</sup> Therefore, it is very important to find new “broad spectrum” cholinesterase reactivators.<sup>5</sup>

Paraoxon (*O,O*-diethyl *O*-4-nitro-phenyl phosphate), the active metabolite of pesticide parathion (*O,O*-diethyl-*O*-4-nitro-phenyl phosphorothioate), is a highly toxic non-muropathic OP,<sup>5</sup> which is acutely neurotoxic because of the inhibition of AChE<sup>6</sup> (Fig. 1).

Received 13 March 2009; accepted 21 May 2009.

Address correspondence to Lucie Musilova, Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic. E-mail: lucie.musil@centrum.cz



**Fig. 1.** Structure of organophosphorus pesticides and paraoxon parathion.

During the last two decades there have been efforts to find more effective antidotes against OP intoxications and for this purpose bioscavengers were developed and tested. Enzyme bioscavengers (cholinesterases, phosphotriesterase, or human paraoxonase) could serve as an efficient pretreatment to neutralize highly toxic OPs in the bloodstream before they reach their physiological targets. Several studies have demonstrated that human serum BuChE (EC 3.1.1.8) can be used successfully as a safe and effective prophylactic treatment to counteract the toxicity of different OPs in the bloodstream before they reach their physiological targets. Several studies have demonstrated that human serum BuChE (EC 3.1.1.8) can be used successfully as a safe and effective prophylactic treatment to counteract the toxicity of different OPs in the bloodstream before they reach their physiological targets. Several studies have demonstrated that human serum BuChE (EC 3.1.1.8) can be used successfully as a safe and effective prophylactic treatment to counteract the toxicity of different OPs in the bloodstream before they reach their physiological targets. Several studies have demonstrated that human serum BuChE (EC 3.1.1.8) can be used successfully as a safe and effective prophylactic treatment to counteract the toxicity of different OPs in the bloodstream before they reach their physiological targets.

In our work, we tested 18 structurally different reactivators for their *in vitro* ability to reactivate paraoxon-inhibited erythrocyte AChE and BuChE to find out structure-activity relationship within this set of compounds. Reactivation of BuChE was also tested, because the aim of our work was to find out whether this enzyme can be reactivated by AChE reactivators. BuChE could serve, in combination with suitable efficient reactivator, as a "pseudo catalytic" bioscavenger. The catalytic activity of OP-inhibited cholinesterase could be quickly and continuously renewed in the presence of an oxime.<sup>14</sup> Such combination could provide increased protection against OP intoxication in comparison with the enzyme administered alone. From the practical point of view, suitable enzyme for this purpose could be BuChE, because it is under several clinical trials.<sup>15-17</sup>

Chemical structures of tested reactivators are shown in Table 1. From a chemical point of view, the tested compounds are monoquaternary (2-PAM, 3-PAM, and 4-PAM) or bisquaternary symmetric (methoxime, obidoxime, trimedoxime, K005, K033, K074, K075, K099, K101, K117, K316, and K317) or asymmetric (HI-6, K027, K048, K127, K203, K206, K252, and K269) oxime reactivators. They have one or two functional pyridinium aldoxime groups at position two (2-PAM, HI-6, K005, K033, and K316), three (3-PAM, K099, K101, and K317), or four (methoxime, obidoxime, trimedoxime, 4-PAM,

K027, K048, K074, K075, K117, K127, K203, K206, K252, and K269) at the pyridine rings. The bisquaternary reactivators differ in the length of the connecting chain (from one upto five methylene groups) and in presence or absence of double bond or oxygen group in the connecting chain.

## Materials and methods

### Chemicals

All AChE reactivators were synthesized at the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence (Czech Republic).

Purity of all tested AChE reactivators was tested using TLC (DC-Alufolien Cellulose F; mobile phase *n*-butanol : acetic acid : water = 5 : 1 : 2; detection by Dragendorff Reagent) and nuclear magnetic resonance (Varian Gemini 300, Palo Alto, CA, USA) before their use.

Paraoxon (*O,O*-diethyl-*O*-4-nitrophenylphosphate) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) in 95% purity. All other chemicals used in this experiment were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Prague Czech Republic).

### *In vitro* reactivation of AChE and BuChE

The blood samples were collected from healthy volunteers from the vein into a disposable syringe containing 3.8% sodium citrate (the ration blood/citrate was 1:10 w/w). The citrated blood was centrifuged for 20 min at 2856 g and the plasma was removed as supernatant, frozen, and was kept under  $-80^{\circ}\text{C}$  (source of BuChE). The erythrocytes were washed three times with phosphate buffer (PB; 0.1 M, pH 7.4) and then hemolyzed in PB (0.01 M, pH 7.4) in a ratio 1:10 (w/w), frozen, and kept under  $-80^{\circ}\text{C}$  (source of AChE). Time of enzyme inhibition with paraoxon (2 h, corresponding to  $7 \times T_{1/2}$ ) was calculated from experimentally determined half-life ( $T_{1/2}$ ) of reaction between enzyme and paraoxon. Concentration of paraoxon, causing 95% enzyme inhibition ( $3.38 \times 10^{-6}$  M for AChE and  $1.4 \times 10^{-7}$  M for BuChE), was calculated from experimentally founded  $\text{IC}_{50}$  values. The inhibition of AChE was started in plastic cuvette by addition of paraoxon solution in isopropanol to the mixture of PB (0.05 M, pH 7.4) and hemolyzate (activity before inhibition was set to 10 U/L) or plasma (activity was set to 13.3 U/L). Final concentration of isopropanol in the sample was 5%. Blank samples with uninhibited enzyme were incubated for 2 h with isopropanol (final concentration 5%). After inhibition, the solution of reactivator in PB (0.05 M, pH 7.4) was added to the mixture containing inhibited enzyme (final concentration of tested reactivator was 100 or 10  $\mu\text{M}$ ). After 10 min of reactivation, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in PB (0.05 M, pH 7.4) was added and the enzymatic reaction was initiated by addition of AChE substrate acetylthiocholine or BuChE substrate butyrylthiocholine. The final concentration

**Table 1.** Structures of tested reactivators

Name	Structure of tested reactivator	Name	Structure of tested reactivator
HI-6		K075	
Methoxime		K099	
Obidoxime		K101	
Trime-doxime (TMB-4)		K117 (KR-22435)	
Pralidoxime (2-PAM)		K127 (KR-22432)	
3-PAM		K203	
4-PAM		K206	
K005		K252	
K027		K269	
K033		K316	
K048		K317	
K074			

of DTNB and acetylthiocholine or butyrylthiocholine in the mixture was 1 mM. The activity of AChE in hemolyzate and BuChE in plasma was determined with a modified method according to Ellman et al.<sup>18</sup> The absorbance was measured at 436 nm for 1 min using a spectrophotometer (Helios Alfa;

Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). AChE activity was measured after 2 min of delay for minimizing of the interference of DTNB with thiols in hemolyzate. All results were corrected for hydrolysis of substrate by reactivators (oximolysis). Solutions of different cystein concentra-

tions (added instead of hemolyzate) were prepared for absolute calibration of used method. Reactivation ability was calculated from the formula:

$$\%R = \left( 1 - \frac{(a_0 - a_r)}{(a_0 - a_i)} \right) \times 100,$$

where %R is percent of reactivation,  $a_0$  is activity of intact enzyme,  $a_i$  is activity of inhibited enzyme, and  $a_r$  is activity of reactivated enzyme minus oximolysis.

Each measurement was repeated three times and was conducted under standard laboratory temperature (25°C). Calculations were performed using software GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA (www.graphpad.com).

All experiments were carried out in compliance with the current law of Czech Republic.

## Results

Data showing *in vitro* ability of tested oximes to reactivate paraoxon-inhibited AChE and BuChE are summarized in Table 2. For comparison, the reactivation ability of standard AChE reactivators (HI-6, obidoxime, methoxime, trimedoxime, and pralidoxime) is also shown, which we estimated previously using the same *in vitro* model.<sup>19</sup>

According to the results acquired for AChE reactivation, obidoxime (96.9% of reactivation), trimedoxime (86.0%),<sup>19</sup> and compound K027 (86.0%) seem to be the most effective reactivators tested in our study. From the newly developed oximes, compounds K075 (55.3%), K203 (50.4%), K048 (50.3%), and also K074 (46.4%) had good reactivation ability. The highest reactivation ability for these oximes was obtained at the concentration 100 µM, but obidoxime and trimedoxime had sufficient ability also at the lower concentration 10 µM. Both concentrations of reactivators used in the experiment are attainable in plasma.<sup>20</sup> The other tested oximes were not able to satisfactorily reactivate paraoxon-inhibited AChE (below 40%) in concentration applicable for *in vivo* experiments.

In the case of paraoxon-inhibited BuChE reactivation, only compound K117 (16.4%), trimedoxime (12.2%), compound K269 (10.6%), and K075 (10.3%) were a little effective at the concentration of 100 µM. Compound K117 seems to be the best BuChE reactivator with its 16.4% of reactivation ability. The other reactivators tested in our experiment did not show significant reactivation ability (below 10%).

## Discussion

Oximes are not equally effective against all organophosphorus inhibitors of cholinesterases. There is a clear demand for "broad spectrum" cholinesterase reactivators with higher reactivation ability than those clinically available. To realize this need, a

**Table 2.** Potency of tested oximes to reactivate paraoxon-inhibited human erythrocyte AChE and plasma BuChE at concentrations 100 and 10 µM

Concentration	Reactivation (%)							
	AChE				BuChE			
	100 µM		10 µM		100 µM		10 µM	
Reactivator	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
HI-6 <sup>19</sup>	16.1	0	3.9	0.7	2.3	0.2	0.8	0.4
Methoxime <sup>19</sup>	23.4	3.2	4.3	1.1	6.1	0.4	0.9	0.6
Obidoxime <sup>19</sup>	96.9	0.7	59.4	0.7	9.9	0.3	2.2	0.3
Trimedoxime <sup>19</sup>	86.0	1.1	45.3	0.6	12.2	1.2	1.3	0.2
Pralidoxime <sup>19</sup>	18.0	0.7	1.3	0.7	5.5	0.1	1.0	0.2
3-PAM	0	0	0.4	3.3	0.6	0.1	0	0
4-PAM	0	0	0	0	1.9	0.1	0.3	0
K005	3.21	2.1	1.6	0.5	0.2	0.2	0.8	0.1
K027	86.0	1.1	22.4	3.4	4.6	0.9	0.6	0.1
K033	13.8	1.1	4.3	0	7.7	0.5	1.6	0.9
K048	50.3	0	11.2	2.2	3.3	0.6	1.2	0.1
K074	46.4	0.6	27.9	1.1	9.3	0.7	1.2	1.1
K075	55.3	0.6	30.2	0	10.3	0.3	2.1	0.4
K099	3.2	0	0.5	0.5	2.3	0.8	1.0	0.3
K101	2.7	0.5	1.1	1.1	3.2	0.3	1.3	0.6
K117 (KR-22435)	14.9	0.4	3.3	0.4	16.4	0	3.8	0
K127 (KR-22432)	19.9	0.4	1.5	0	9.8	0.1	1.3	0.1
K203	50.4	0.4	16.3	0.4	6.4	0.1	0.9	0.1
K206	30.4	0	6.9	0.4	7.2	0.1	0.9	0
K252	16.3	0.4	0.4	0.4	2.4	0.1	0.1	0.1
K269	26.8	0.7	9.4	0	10.6	0.1	1.6	0
K316	2.6	1.9	1.9	1.3	1.8	0.2	0.6	0.1
K317	7.7	0.7	5.2	0.7	3.8	0.2	0.9	0.1

%, mean value of three independent determinations, time of inhibition by paraoxon 120 min; time of reactivation by AChE reactivators – 10 min; pH 7.4; temperature 25°C.

lot of new AChE reactivators of potential clinical utility have been developed.<sup>21,22</sup>

The aim of our work was *in vitro* testing of reactivation ability of various oximes using paraoxon as cholinesterase inhibitor and to compare them with previously tested currently available reactivators used in antidotal therapy (HI-6, obidoxime, methoxime, trimedoxime, and pralidoxime) to find structure–activity relationship within this set of reactivators.

Bisquaternary oxime derivatives were more effective reactivators of paraoxon-inhibited human erythrocyte AChE in comparison with monoquaternary oxime compounds (2-PAM, 3-PAM, and 4-PAM). The most potent reactivators in our test were bisquaternary aldoximes, with two aldoxime groups on the pyridinium rings at position four (obidoxime, trimedoxime, K075, and K074) or with one oxime and one carbamoyl group at position four (K027, K048, and K203). They have propane, 2-oxapropane, butane, or but-2-ene linkers between two pyridinium rings. Their reactivation ability in 100 µM concentration surpassed 45% level.

The best reactivator was obidoxime (96.9% reactivation ability in 100  $\mu\text{M}$  concentration and 59.4% in 10  $\mu\text{M}$  concentration),<sup>19</sup> which has two aldoxime groups at position four and 2-oxapropane linker, in contrast to its analogues K316, with two aldoxime groups at position two (only 2.6% in 100  $\mu\text{M}$  concentration) and K317, with two aldoxime groups at position three (7.7% in 100  $\mu\text{M}$  concentration). Also Musilek et al. confirmed earlier that the oxime group at position four substantially increases the ability of the novel compounds to reactivate paraoxon-inhibited rat brain AChE.<sup>23,24</sup>

The second most potent reactivator was trimedoxime (86% reactivation ability in 100  $\mu\text{M}$  concentration and 45.3% in 10  $\mu\text{M}$  concentration), which has two oxime groups at position four and propane linker. This is in good agreement with Oh et al.,<sup>25</sup> who compared ability of bispyridinium oximes to reactivate paraoxon-inhibited housefly AChE according to the length of connecting chain. They found that the order of reactivation ability was  $(\text{CH}_2) < (\text{CH}_2)_2 < (\text{CH}_2)_3 > (\text{CH}_2)_4 > (\text{CH}_2)_7$ . Thus, trimedoxime with the propane linker  $-(\text{CH}_2)_3-$  showed the highest activity in this series of compounds, followed by K074 and methoxime. Another compound with propane linker and one aldoxime group in position four – K027 – reached 86% reactivation ability in 100  $\mu\text{M}$  concentration and 22.4% in 10  $\mu\text{M}$  concentration followed by compound K048 with butane linker and one oxime group in position four (50.3% reactivation ability in 100  $\mu\text{M}$  concentration). These compounds were tested for reactivation ability of paraoxon-inhibited human red blood cell AChE *in vitro* and *in vivo* in rats exposed to paraoxon by Petroianu et al.<sup>5,26</sup> and they concluded that K027 and K048 are the most promising new oximes, because they had the best results *in vitro* and also confer the best protection *in vivo*. They acquired similar results also with methyl-paraoxon-inhibited AChE *in vitro* and *in vivo*.<sup>21,27</sup>

According to our results, trimedoxime and K027 were equally effective at higher concentration, but at lower concentration, trimedoxime was much more effective (45.3%) than K027 (22.4%). The reason for this fact is that the curve of reactivation process at whole concentration range of oxime is bell-shaped.<sup>28,29</sup> The higher reactivation activity of some compounds at the lower concentration is caused by stronger inhibition of intact AChE at higher concentrations. There is also possibility of the formation of highly reactive phosphoryl-oximes (POXs), which are able to re-inhibit the enzyme<sup>30</sup> and decrease measured reactivation ability of reactivators. These POXs could be decomposed in blood, because there is evidence that human plasma is capable of degrading dimethyl- and diethyl-POX of obidoxime and trimedoxime by paraoxonase.<sup>31</sup> The reactivation process is characterized in the increasing part and the decreasing part of the curve shows both reactivation and inhibition of liberated intact AChE by the reactivator itself. Each reactivator varies in the optimal concentration for reactivation. Some oximes could have this optimum at lower concentrations (e.g., 10  $\mu\text{M}$ ).<sup>28,29,32</sup>

Compounds K074 and K075 differ only in presence of double bond in connecting chain, whereas K075 (55.3% of

reactivation in 100  $\mu\text{M}$  concentration) with but-2-en linker had better reactivation ability than K074 with butane linker (46.4% of reactivation in 100  $\mu\text{M}$  concentration). Previously, it was confirmed that the compounds K074 and K075 are effective reactivators of nerve agent-inhibited AChE *in vitro* and *in vivo*.<sup>33–37</sup>

Compounds K075 and K203 differ in one functional group. K203 (50.4% of reactivation) has carbamoyl group instead of one aldoxime group and K075 with two oxime groups was slightly better reactivator. It can be seen that the number of oxime groups does not influence reactivation ability of OP-inhibited AChE so significantly. Similar conclusions were described by Kuca et al.<sup>4</sup> Other tested oximes did not achieve sufficient reactivation ability. For example, compounds K117 and K127 were synthesized and tested to reactivate paraoxon-inhibited housefly and bovine red blood cells AChE by Kim et al.,<sup>38</sup> but the results were not satisfactory.

Another purpose of our study was to find out whether paraoxon-inhibited plasmatic BuChE is reactivatable by tested oximes. Such combination of BuChE with oxime could serve as ‘pseudo catalytic’ scavenger. Unfortunately, none from the tested oximes reached sufficient reactivation ability in comparison with values measured for AChE. The best reactivation ability was achieved by compounds K117 (16.4%), trimedoxime (12.2%), K269 (10.6%), and K075 (10.3%) in 100  $\mu\text{M}$  concentration. All these compounds are bisquaternary aldoximes, with two aldoxime groups on the pyridinium rings at position four with propane and but-2-en or 3-oxapentane linker. It seems that compounds with two aldoxime groups in para-position on the pyridinium ring and longer connecting chain could be more convenient for reactivation of BuChE. Similar finding was made also by Karasova et al., who assessed *in vivo* reactivation of tabun-inhibited rat plasmatic BuChE. The best reactivation ability was achieved by trimedoxime, compounds K127, K117, and obidoxime.<sup>39</sup>

In this work, we have evaluated only reactivation of paraoxon-inhibited cholinesterases. To get better understanding of this problem, a larger number of OP inhibitors should be used.

## References

1. Aygun D, Doganay Z, Altintop L, Guven H, Onar M, Deniz T, Sunter T. Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. *Clin Toxicol* 2002; 40:903–910.
2. Kuca K, Cabal J, Jun D, Hrabanova M. Potency of five structurally different acetylcholinesterase reactivators to reactivate human brain cholinesterases inhibited by cyclosarin. *Clin Toxicol* 2007; 45:512–515.
3. Bajgar J, Kuca K, Jun D, Bartosova L, Fusek J. Cholinesterase reactivators: the fate and effects in the organism poisoned with organophosphates/nerve agents. *Curr Drug Metab* 2007; 8:803–809.
4. Kuca K, Juna D, Musilek K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6:269–277.
5. Petroianu GA, Arafat K, Kuca K, Kassa J. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: *in vitro* reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by paraoxon. *J Appl Toxicol* 2006; 26:64–71.

6. Qian Y, Venkatraj J, Barhoumi R, Pal R, Datta A, Wild JR, Tiffany-Castiglioni E. Comparative non-cholinergic neurotoxic effects of paraoxon and diisopropyl fluorophosphate (DFP) on human neuroblastoma and astrocytoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 219:162–167.
7. Saxena A, Sun W, Luo C, Myers TM, Koplovitz I, Lenz DE, Doctor BP. Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J Mol Neurosci* 2006; 30:145–148.
8. Kolanich D, Weber A, Pabst M, Stadlmann J, Teschner W, Ehrlich H, Schwarz HP, Altmann F. Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma. *Proteomics* 2008; 8:254–63.
9. Grunwald J, Marcus D, Papier Y, Raveh L, Pittel Z, Ashani Y. Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug. *J Biochem Biophys Methods* 1997; 34:123–135.
10. Lockridge O, Blong RM, Masson P, Froment MT, Millard CB, Broomfield CA. A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 1997; 36:786–795.
11. Pan Y, Gao D, Yang W, Cho H, Yang G, Tai HH, Zhan CG. Computational redesign of human butyrylcholinesterase for antio cocaine medication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:16656–16661.
12. Wang Y, Schopfer LM, Duysen EG, Nachon F, Masson P, Lockridge O. Screening assays for cholinesterases resistant to inhibition by organophosphorus toxicants. *Anal Biochem* 2004; 329:131–138.
13. Wang Y, Boeck AT, Duysen EG, Van KM, Saunders TL, Lockridge O. Resistance to organophosphorus agent toxicity in transgenic mice expressing the G117H mutant of human butyrylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196:356–366.
14. Doctor BP, Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem Biol Interact* 2005; 157–158: 167–171.
15. First Time in Human Study of Protexia. 2008. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00744146>. Accessed 4 March 2009.
16. A Study of Plasma-Derived Human Butyrylcholinesterase Administered Intramuscularly. 2007. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00333528>. Accessed 4 March 2009.
17. Pharmacokinetic (PK) and Safety Study of Plasma-Derived Human Butyrylcholinesterase Administered Intravenously. 2007. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00333515>. Accessed 4 March 2009.
18. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88–95.
19. Jun D, Musilova L, Kuca K, Kassa J, Bajgar J. Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon *in vitro*. *Chem Biol Interact* 2008; 175:421–424.
20. Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem* 2004; 38:151–216.
21. Petroianu GA, Arafat K, Nurulain SM, Kuca K, Kassa J. *In vitro* oxime reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by methylparaoxon. *J Appl Toxicol* 2007; 27:168–175.
22. Okuno S, Sakurada K, Ohta H, Ikegaya H, Kazui Y, Akutsu T, Takatori T, Iwade K. Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdehyde methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 227:8–15.
23. Musilek K, Holas O, Kuca K, Jun D, Dohnal V, Dolezal M. Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:5673–5676.
24. Musilek K, Holas O, Kuca K, Jun D, Dohnal V, Opletalova V, Dolezal M. Novel series of bispyridinium compounds bearing a (Z)-but-2-ene linker – synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17:3172–3176.
25. Oh KA, Park NJ, Park NS, Kuca K, Jun D, Jung YS. Reactivation of DFP- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterases by pyridinium oximes. *Chem Biol Interact* 2008; 175:365–367.
26. Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Al-Sultan MA, Kuca K, Kassa J. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6 and methoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to the organophosphate paraoxon. *J Appl Toxicol* 2006; 26:262–268.
27. Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Shafiqullah M, Kassa J, Kuca K. Five oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methylparaoxon. *J Appl Toxicol* 2007; 27:453–457.
28. Musilek K, Kuca K, Jun D, Dohnal V, Dolezal M. Synthesis of a novel series of bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005; 20:409–415.
29. Kuca K, Kassa J. *In vitro* reactivation of acetylcholinesterase using the oxime K027. *Vet Hum Toxicol* 2004; 46:15–18.
30. Worek F, Eyer P, Kiderlen D, Thiermann H, Szinicz L. Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase 3. *Arch Toxicol* 2000; 74:21–26.
31. Kiderlen D, Worek F, Klimmek R, Eyer P. The phosphoryl oxime-destroying activity of human plasma. *Arch Toxicol* 2000; 74:27–32.
32. Kuca K, Kassa J. A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime-1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by *in vitro* methods. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003; 18:529–535.
33. Kassa J, Jun D, Karasova J, Bajgar J, Kuca K. A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in soman, cyclosarin and tabun-poisoned rats. *Chem Biol Interact* 2008; 175:425–427.
34. Kuca K, Cabal J, Musilek K, Jun D, Bajgar J. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J Appl Toxicol* 2005; 25:491–495.
35. Kuca K, Cabal J, Jun D, Musilek K. *In vitro* reactivation potency of acetylcholinesterase reactivators - K074 and K075 - to reactivate tabun-inhibited human brain cholinesterases. *Neurotox Res* 2007; 11:101–106.
36. Kovarik Z, Calic M, Sinko G, Bosak A, Berend S, Vrdoljak AL, Radic B. Oximes: reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. *Chem Biol Interact* 2008; 175:173–179.
37. Calic M, Bosak A, Kuca K, Kovarik Z. Interactions of butane, but-2-ene or xylene-like linked bispyridinium para-aldoximes with native and tabun-inhibited human cholinesterases. *Chem Biol Interact* 2008; 175:305–308.
38. Kim TH, Oh KA, Park NJ, Park NS, Kim YJ, Yum EK, Jung YS. Reactivation Study of Pyridinium Oximes for Acetylcholinesterases Inhibited by Paraoxon or DFP. *J Appl Biomed* 2006; 4:67–72.
39. Karasova JZ, Kassa J, Jung YS, Musilek K, Pohanka M, Kuca K. Effect of several new and currently available oxime cholinesterase reactivators on tabun-intoxicated Rats. *Int J Mol Sci* 2008; 9(11):2243–2252.

## IV.

### **Reactivation of AChE and BuChE activity – Possible implications for prophylaxis against nerve agents.**

Jun D., Musilová L., Kuča K., Musílek K., Bajgar J.

*In Central and peripheral nervous system: Effects of  
highly toxic organophosphates and their antidotes*  
(Bajgar, J., Ed.) (2009) Research Signpost, Kerala, India,  
ISBN 978-81-308-0331-9  
*(in press)*



# 9

## Reactivation of AChE and BuChE activity – Possible implications for prophylaxis against nerve agents

Daniel Jun<sup>1,2</sup>, Lucie Musilova<sup>3</sup>, Kamil Kuca<sup>1,2</sup>, Kamil Musilek<sup>2</sup> and Jiri Bajgar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Trebesska I 575, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense Trebesska I 575, Hradec Kralove, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove, Czech Republic

### Abstract

*The primary targets of organophosphates (OP), such as pesticides (paraoxon, malathion, chlorpyrifos) and nerve agents (sarin, soman, tabun, VX) are enzymes from the group of cholinesterases - acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase*

Correspondence/Reprint request: Dr. Daniel Jun, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic. E-mail: jun@pmfhk.cz



EC 3.1.1.8). Their interaction with human or other living organisms is associated with high toxicity; irreversible inhibition of AChE can result in cholinergic crisis and possibly death. Antidotes currently used for OP intoxications consist of a combination of prophylaxis with carbamates (mostly pyridostigmine) and therapy with anticholinergics (atropine), AChE oxime reactivators (pralidoxime, oxime HI-6) and anticonvulsant drugs (diazepam). Another approach for prophylaxis is administration of suitable scavenger, which is capable of neutralizing OP rapidly after its penetration into organism. For these purposes, catalytic (e.g. paraoxonase, phosphotriesterase) and stoichiometric (cholinesterases) enzyme scavengers are intensively investigated. Because of their turnover, catalytic scavengers are preferred to stoichiometric ones. Combination of cholinesterase and suitable reactivator can serve as pseudocatalytic scavenger, where the enzyme is continuously reactivated by oxime. Suitable enzyme for this purpose could be BuChE, because it is under clinical trials now. There is a possibility, that AChE reactivators used for treatment of nerve agent and pesticides-intoxications, could also reactivate inhibited BuChE. For testing of this hypothesis, we evaluated reactivation potency of commercially available AChE reactivators (pralidoxime, trimedoxime, methoxime, obidoxime and HI-6) to reactivate human AChE and BuChE inhibited by diisopropyl fluorophosphate (DFP), a compound structurally similar to sarin. According to our results, reactivatability of inhibited AChE is almost two-times higher, than that of BuChE. For construction of effective pseudocatalytic scavenger, more potent compounds are needed. To solve this problem, a lot of investigation on this field must be done.

## Introduction

The primary targets of toxic organophosphates (OP), such as pesticides (paraoxon, malathion, chlorpyrifos) and nerve agents (sarin, soman, tabun, VX), are enzymes from the family of cholinesterases - acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8). OPs irreversibly inhibit cholinesterases by phosphorylation of the serine hydroxyl group in the enzyme active site.

Before the starting of its toxic action, OP is after its absorption through the skin or lungs transported by the blood stream to the different sites in central and peripheral nervous system. Blood cholinesterases (erythrocyte AChE and BuChE) are the first targets for OPs after their penetration into the organism and therefore they are good markers for diagnostic of the severity of poisoning. Inhibition of AChE is the cause of OP acute toxicity [1]. Inhibited synaptic AChE is not able to hydrolyze neuromediator acetylcholine, which can result in cholinergic crisis and possible death of intoxicated organism.

OPs interact also with other biomolecules in the organism (secondary targets), which results in non-cholinergic effects, such as delayed neurotoxicity [2].

### **Current antidotal therapy of OP intoxications**

Antidotes currently used for OP intoxications consist a combination of prophylaxis and therapy. For prophylaxis, compounds with protective effect against inhibition of cholinesterases are often used. Suitable reversible inhibitors for these purposes are carbamates (mostly pyridostigmine) and oxime reactivators (H-oxime HI-6).

Subsequent therapy of OP intoxication consists administration of anticholinergics (atropine) and AChE oxime reactivators (pralidoxime, obidoxime, oxime HI-6) in combination with anticonvulsant drugs (diazepam) [3,4]. Oxime reactivators of AChE represent the crucial part of the antidotal therapy of OP intoxications [5]. These compounds are able to react with OP in the enzyme active site which results in break down of the bond between OP moiety and serine hydroxyl group. This process leads to renewal of AChE activity and enzyme is able to fulfill its physiological role again [6]. Depending on the OP inhibitor, inhibited cholinesterases differ in the structure of inhibited active site. This is the reason, why there is no single universal oxime reactivator able to reactivate enzymes inhibited by all kinds of OP. Currently used AChE reactivators (obidoxime, HI-6) are relative broad-spectrum, in comparison with the older ones (e.g. pralidoxime).

Relatively new approach for prophylaxis (and perhaps for therapy) is administration of suitable enzymes, which are capable to scavenge OP rapidly after its penetration into the bloodstream [7]. Suitable enzyme scavengers for these purposes are cholinesterases, because they are natural OP targets with high selectivity and sufficient reaction rate with OPs. Because one molecule of cholinesterase neutralizes one molecule of OP (reaction ratio 1:1), these bioscavengers are called stoichiometric. Catalytic enzyme scavengers, represented by human paraoxonase or bacterial phosphotriesterase are the second group of bioscavengers. While stoichiometric bioscavengers are broad-spectrum for all OPs, catalytic ones are more selective (e.g. phosphotriesterase).

### **BuChE as bioscavenger**

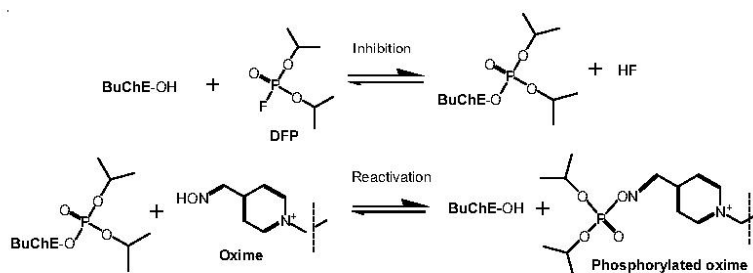
In the last years, a lot of efforts were focused on human BuChE as a suitable bioscavenger which can serve as OP non-specific prophylactic [7]. Methods for large scale production of BuChE from outdated human plasma and for production from the transgenic goat milk were developed [8]. Also different

mutants of BuChE were prepared with the aim to make the enzyme with catalytic properties against different OPs [9]. BuChE and its mutants were also developed as a new therapeutic for protection against the toxicity of cocaine [10,11]. BuChE as well as AChE is the serine hydrolase that belongs to the serine esterase family. Compared to AChE, its function is not clear till today. It is able to split down similar substrates as AChE does (including acetylcholine), and due to this, it can substitute AChE in the case of Alzheimer's disease [12]. It is also able to hydrolyze miscellaneous esters, such as are aspirin, heroin and some local anesthetics, e.g. procaine [13]. BuChE is also inhibited by nerve agents and pesticides in the same manner as AChE – phosphorylation of the serine hydroxyl group in its active site [14]. A major limitation of protection with cholinesterase is the 1:1 stoichiometry of enzyme detoxification of OP compounds which, in combination with the approximately 200-fold difference in molecular weight between OP compounds and cholinesterases, necessitates the use of large amounts of enzyme to provide protection [2]. The upper limit of human BuChE dose, which is required for protection against organophosphate toxicity, sufficient to protect erythrocyte AChE above 30 % of baseline activity ranges, depending on nerve agent, from 134 to 249 mg/70 kg [15].

### Concept of pseudocatalytic scavenger

Combination of cholinesterase and potent AChE or BuChE reactivator can serve as a pseudocatalytic scavenger, where the activity of OP-inhibited enzyme is continuously renewed by oxime reactivator (Fig. 1).

For this purpose, relative broad spectrum oxime is needed, because reactivation potency depends on the structure of OP inhibitor. Reactivation velocity must be high enough to prevent aging of inhibited enzyme. For example, the *in vitro* stoichiometric neutralization of sarin by AChE was



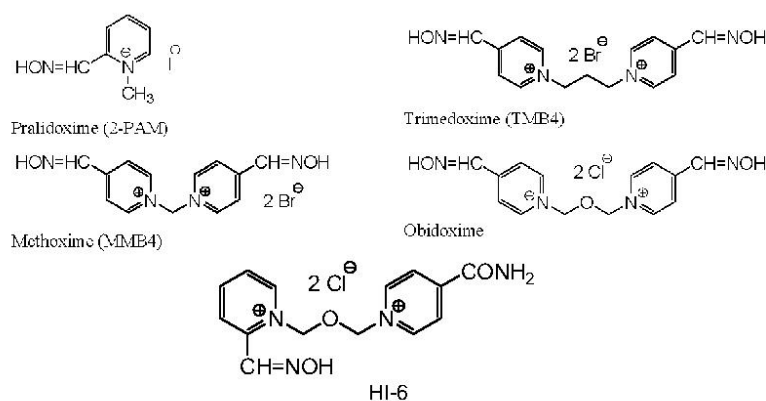
**Figure 1.** Principle of pseudocatalytic scavenger – an example of inhibition and subsequent reactivation of BuChE inhibited by DFP.

increased from 1:1 to 3200:1 by the addition of the relative broad-spectrum oxime HI-6, while the *in vivo* stoichiometry was increased to 57:1 in mice by HI-6 [2]. From the practical point of view, suitable enzyme for this purpose could be BuChE, because it is currently under clinical trials [16].

## Reactivation of human AChE and BuChE inhibited by DFP

There is a possibility, that AChE reactivators, used for treatment of nerve agent and pesticides-intoxications, could also reactivate inhibited BuChE. For testing of this hypothesis, we evaluated *in vitro* reactivation potency of commercially available AChE reactivators (pralidoxime, trimedoxime, methoxime, obidoxime and HI-6; Fig. 2) to reactivate human plasma BuChE and erythrocyte AChE, inhibited by diisopropyl fluorophosphate (DFP). DFP, a compound structurally similar to nerve agent sarin, was developed during World War II and it is only about 10 times less toxic than sarin.

The whole method is described in [17]. Briefly, cholinesterases were inhibited by solution of DFP for 120 min to 5 % of its original activity. Then, inhibited enzyme was incubated for 10 min with solution of reactivator at concentration 100 and 10  $\mu$ M. Activity of AChE (BuChE) was measured spectrophotometrically by modified method according to Ellman [18] with acetylthiocholine (butyrylthiocholine) as substrate. Reactivation potency was calculated from the formula:  $\%_{\text{react}} = 100 - 100(V_{\text{native}} - V_{\text{react}}) / (V_{\text{native}} - V_{\text{inhib}})$ , where  $\%_{\text{react}}$  is percent of reactivation,  $V_{\text{native}}$  is activity of intact enzyme,  $V_{\text{inhib}}$  is activity of inhibited enzyme and  $V_{\text{react}}$  is the activity of reactivated enzyme.



**Figure 2.** Structures of oxime reactivators currently used in the therapy of OP-poisonings.

## Results and discussion

Data characterizing *in vitro* activity of tested oximes towards DFP-inhibited AChE and BuChE are summarized in Fig. 3 and Fig. 4. Appropriate values of all reactivation activities are shown in Tab. 1.

The most potent reactivators of DFP-inhibited AChE at 100 and 10  $\mu\text{M}$  were obidoxime and trimeodoxime. Reactivation activity of other tested oximes was below 10 %. Both concentrations of tested reactivators used in experiment are attainable in human plasma in the case of administration use of reactivator during antidotal therapy.

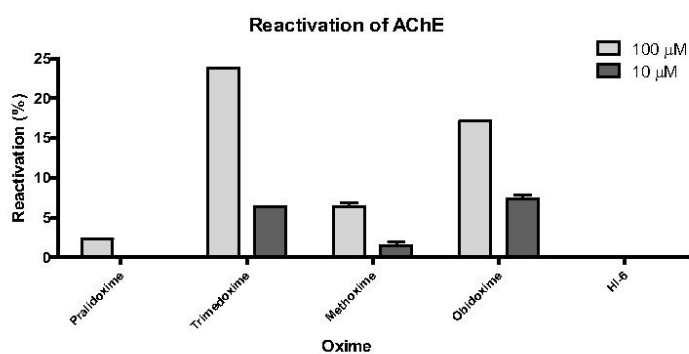


Figure 3. Reactivation of DFP-inhibited AChE by currently used oxime reactivators.

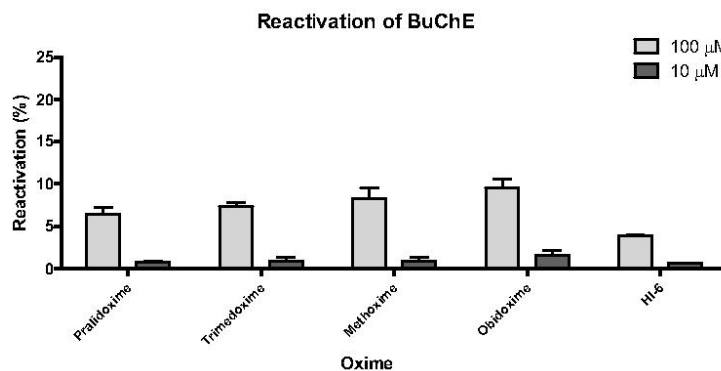


Figure 4. Reactivation of DFP-inhibited BuChE by currently used oxime reactivators.

**Table 1.** Potency of cholinesterase reactivators to reactivate DFP-inhibited acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at concentrations 100  $\mu$ M and 10  $\mu$ M.

Concentration	Reactivation (%)							
	AChE				BuChE			
	100 $\mu$ M		10 $\mu$ M		100 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
Reactivator	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Pralidoxime	2.3	0	0	0	6.4	0.6	0.7	0.1
Trimedoxime	23.8	0	6.4	0	7.3	0.3	0.8	0.3
Methoxime	6.4	0.3	1.5	0.3	8.2	0.9	0.8	0.2
Obidoxime	17.1	0	7.4	0.3	9.5	0.7	1.5	0.4
HI-6	0	0	0	0	3.8	0.1	0.7	0

In the case of reactivation of DFP-inhibited BuChE, none from the currently available oximes reached reactivation potency higher than 10 % (at both concentrations). The most active compound was obidoxime again (9.5%).

According to our results, reactivatability of inhibited AChE was almost two-times higher, than that of BuChE. Oximes able to reactivate DFP-inhibited AChE are poor reactivators of DFP-inhibited BuChE. Hence the combination of tested compounds with BuChE is not suitable for the construction of pseudocatalytic scavenger supporting the turnover of nerve agents and pesticides detoxification. Moreover, similar results with the same reactivators were obtained for AChE and BuChE inhibited by pesticide paraoxon [17]. For the development of effective pseudocatalytic scavenger, more potent compounds are needed. For better insight into this problematic, larger number of nerve agents and pesticides should be tested as cholinesterase inhibitors. Rational design of new BuChE reactivators can bring new leading structures with higher efficacy.

## Conclusions

Concept of pseudocatalytic scavenger is very attractive for several reasons. Analogous to stoichiometric and catalytic bioscavenger, it also prevents non-cholinergic effects of OPs, such as post exposure incapacitation and brain damage [19]. The amount of cholinesterase administered together with oxime reactivator, which ensures the same prophylactic effect against OP intoxication as sole enzyme, could be lower [2]. Therefore, this concept can save the cost of administered prophylaxis, because the price of oxime reactivator is incomparable with the price of pure cholinesterase suitable for human use. Lower enzyme dose also decreases possible immunotolerance

issues during repeated bioscavenger administration. Immune response of organism could be important limiting factor for long term or repeated prophylaxis with enzyme bioscavenger, especially for recombinant enzymes which are not identical with wild type ones [20]. Possible solution of this problem is, for example, encapsulation or pegylation of such enzyme.

On the other hand, the disadvantage of pseudocatalytic scavenger is, in comparison with stoichiometric enzyme scavenger, unequal prophylactic efficacy against different types of toxic OPs. Enzyme bioscavenger efficacy depends on the reactivator used in combination with enzyme and for this reason relatively broad spectrum reactivators are needed. This is not a big problem when the pseudocatalytic bioscavenger is based on AChE. Oxime HI-6 is potent reactivator of nerve agent-inhibited AChE (with low efficacy for pesticides), while obidoxime can be used in the case of OP pesticide-inhibited AChE. But according to our results, potency of commercially available AChE reactivators to reactivate BuChE inhibited by common pesticides is very low [17]. Another issue is attainable reactivation rate with such reactivators. In this regard is AChE better candidate for pseudocatalytic scavenger than BuChE. Also different mutants of cholinesterases could provide improved efficacy of pseudocatalytic combination of enzyme and oxime reactivator than wild type enzymes. But none from these enzymes is endorsed for human use at this time, although BuChE is in clinical trials now and probably it will be approved by Food and Drug Administration (FDA) in the near future. From the safety point of view, administration of homologous enzyme (e.g. BuChE isolated from outdated human plasma) could be practically without any side effects. On the contrary, administration of reactivators can evoke some adverse reactions.

We can conclude, that concept of pseudocatalytic bioscavenger can improve the efficacy and reduce the cost of prophylaxis based on cholinesterase stoichiometric scavengers, until more potent catalytic scavengers will be available.

## Acknowledgement

The authors are indebted to Mrs M. Hrabínova for her skillful technical assistance. Financial support of the Ministry of Defence, grant INTOX OPUOFVZ 200603 and NATO grant CBP.EAP.CLG 983 024 is gratefully acknowledged.

## References

1. Costa, L.C. 2006, *Clin. Chim.*, 366, 1.
2. Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Koplovitz, I.M., Sweeney, R.E. 2006, *Arch. Toxicol.*, 80, 756.

3. Levy, A., Cohen, G., Gilat, E., Kapon, J., Dachir, S., Abraham, S., Herskovitz, M., Teitelbaum, Z., Raveh, L. 2007, *Arch. Toxicol.*, 81, 353.
4. Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Aracava, Y., Fawcett, W.P., Oliveira, M., Randall, W.R., Hamilton, T.A., Kan, R.K., Romano, J.A., Adler, M. 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13220.
5. Jun, D., Kuca, K., Picha, J., Koleckar, V., Marek, J. 2008, *Drug. Chem. Toxicol.*, 31, 1.
6. Worek, F., Aurbek, N., Wetherell, J., Pearce, P., Mann, T., Thiermann, H. 2008, *Toxicology*, 244, 35.
7. Kolarich, D., Weber, A., Pabst, M., Stadlmann, J., Teschner, W., Ehrlich, H., Schwarz, H., Altmann, F. 2008, *Proteomics*, 8, 254.
8. Cerasoli, D.M., Griffiths, E.M., Doctor, B.P., Saxena, A., Fedorko, J.M., Greig, N.H., Yu, Q.S., Huang, Y., Wilgus, H., Karatzas, C.N., Koplovitz, I., Lenz, D.E. 2005, *Chem. Biol. Interact.*, 157-158, 363.
9. Lenz, D.E., Yeung, D., Smith, J.R., Sweeney, R.E., Lumley, L.A., Cerasoli, D.M. 2007, *Toxicology*, 233, 31.
10. Sáez-Valero, J., de Gracia, J.A., Lockridge, O. 2005, *Neurosci. Lett.*, 383, 93.
11. Sun, H., Shen, M.L., Pang, Y.P., Lockridge, O., Brimijoin, S. 2002, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 710.
12. Greig, N.H., Lahiri, D.K., Sambamurti, K. 2002, *Int. Psychogeriatr.*, 14 (Suppl. 1), 77.
13. Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O. 2005, *Biochem Pharmacol.*, 70, 1673.
14. Aslanian, D., Gróf, P., Renault, F., Masson, P. 1995, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1249, 37.
15. Ashani, Y., Pistinner, S. 2004, *Toxico. Sci.*, 77, 358.
16. First Time in Human Study of Protexia: 2008 (Accessed March 4, 2009, at <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00744146>.)
17. Jun, D., Musilova, L., Kuca, K., Kassa, J., and Bajgar, J. 2008, *Chem Biol Interact*, 17, 421.
18. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr., Featherstone, R.H. 1961, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88.
19. Dunn, M.A., Sidell, F.R. 1989, *J. Am. Med. Assoc.*, 262, 649.
20. Chilukuri, N., Sun, W., Naik, R.S., Parikh, K., Tang, L., Doctor, B.P., Saxena, A. 2008, *Chem. Biol. Interact*, 175, 255.



## V.

### ***In vitro* ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase**

Musilová L., Kuča K., Pohanka M., Holas O., Jun D.

*(submitted)*

# IN VITRO ABILITY OF CURRENTLY AVAILABLE OXIMES TO REACTIVATE ORGANOPHOSPHATE PESTICIDE-INHIBITED HUMAN ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE

Lucie Musilová<sup>1</sup>, Kamil Kuča<sup>2,3</sup>, Miroslav Pohanka<sup>2</sup>, Ondřej Holas<sup>4</sup>, Daniel Jun<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic;* <sup>2</sup>*Center of Advanced Studies,* <sup>3</sup>*Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic;* <sup>4</sup>*Department of Pharmaceutical Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic;* <sup>5</sup>*Department of Water Resources and Environmental Modeling, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka, 165 21, Czech Republic*

## ABSTRACT

We have in vitro tested ability of common, commercially available cholinesterase reactivators (pralidoxime, obidoxime, methoxime, trimedoxime and HI-6) to reactivate human acetylcholinesterase (AChE) inhibited by five structurally different organophosphate pesticides or inhibitors (paraoxon, dichlorvos, DFP, leptophos-oxon and methamidophos). We also tested reactivation of human butyrylcholinesterase (BuChE) with the aim to find potent oxime, suitable to serve in combination with this enzyme as a “pseudocatalytic” bioscavenger. Such combination could allow an increase of prophylactic and therapeutic efficacy of administered enzyme. According to our results, the best broad-spectrum AChE reactivators were trimedoxime and obidoxime in the case of paraoxon, leptophos-oxon and methamidophos-inhibited AChE. Methamidophos and leptophos-oxon were quite easily reactivatable by all tested reactivators. In case of methamidophos-inhibited AChE the lower oxime concentration (10 µM) had higher reactivation ability than the concentration 100 µM. Therefore, we evaluated reactivation ability of obidoxime in concentration range  $10^{-3}$  M –  $10^{-7}$  M. The reactivation of methamidophos-inhibited AChE with different obidoxime concentrations resulted in bell shaped curve with maximum of reactivation in  $10^{-5}$  M. In case of BuChE, no reactivator exceeded 15% reactivation ability and therefore none from the

oximes can be recommended as a candidate for “pseudocatalytic” bioscavenger with BuChE.

## **KEYWORDS**

Reactivation, oxime, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, organophosphate, scavenger

## **INTRODUCTION**

Organophosphates (OPs) are widely used as pesticides (e.g. parathion, methamidophos) in agriculture, as plasticizers and flame retardants (cresyl diphenyl phosphate, triaryl phosphate) in the industry and as toxic chemical warfare agents (nerve agents, e.g. sarin, VX). OP pesticide poisonings causes tens of thousands of deaths every year in the whole world [1]. OP pesticides irreversibly inhibit enzymes acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8) by phosphorylation or phosphonylation of the serine hydroxyl group at the enzyme’s active site. Inhibited AChE cannot cleave the neuromediator acetylcholine which is then accumulated in the nerve synapses and causes cholinergic crisis, which can lead to death [2]. Current treatment of OP poisonings involves the administration of anticholinergic drug (atropine), anticonvulsants (diazepam) and for the recovery of function of inhibited AChE antidotes from the group of pyridinium or bispyridinium aldoximes (oximes) are used. Therapeutic efficacy of these compounds depends on their chemical structure and also type of organophosphorus inhibitor. Prophylaxis is realized by administration of reversible inhibitors of AChE (e.g. carbamate pyridostigmine) [3].

Relatively new approach in treatment of OP poisonings is using of enzyme bioscavengers. These bioscavengers are able to catch and neutralize toxic OP molecules in the bloodstream, before they can reach their physiological target - AChE in different tissues [4]. They can prevent from post-exposure incapacitation and toxic effects that are commonly observed in animals treated by traditional antidotal regimen [5]. Many scientific efforts have been focused on butyrylcholinesterase (BuChE) as bioscavenger capable to sequester the molecules of nerve agents or pesticides from the bloodstream and so to serve as OP-nonspecific prophylactics [6,4]. BuChE was evaluated in several clinical studies (phase I) in USA. The aim of our work was to test and summarize reactivation ability of common, commercially available AChE reactivators (methoxime, pralidoxime, obidoxime, trimedoxime and HI-6) and to evaluate their potential

usefulness in the OP pesticide poisoning antidotal treatment. We have *in vitro* tested their potency to reactivate human AChE inhibited by five structurally different pesticides. Moreover, we also tested in parallel reactivation of BuChE with the aim to find potent oxime, suitable to serve in combination with this enzyme (administered as prophylactic antidote or occurring naturally in blood) as a “pseudocatalytic” bioscavenger. Such combination could allow an increase of prophylactic and therapeutic efficacy of administered enzyme and also a decrease of amount of enzyme and cost of such a bioscavenger [7].

## MATERIAL AND METHODS

Reactivation potency of five oximes (methoxime, pralidoxime, obidoxime, trimedoxime and HI-6) was tested by *in vitro* screening test. For this purpose modified Ellman’s method was used [8]. Paraoxon (diethyl 4-nitrophenyl phosphate, the active form of pesticide parathion), dichlorvos (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate), DFP (diisopropyl fluorophosphate), leptophos-oxon (*O*-(4-bromo-2,5-dichlorophenyl) *O*-methyl phenylphosphonothioate) and methamidophos (*O,S*-dimethyl phosphoramidothioate) were selected as appropriate model OP pesticides and inhibitors. Enzymes were inhibited to 5 % of their original activity using concentration corresponding to IC<sub>95</sub> in order to avoid the excess of inhibitor. Time of enzyme inhibition (equivalent to 7×T<sub>1/2</sub>) was calculated separately for each compound from experimentally determined half- life (T<sub>1/2</sub>) of reaction between enzyme and inhibitor (data not published). Human erythrocyte hemolysate was used as a source of AChE and human plasma was used as a source of BuChE. Inhibited enzymes were incubated for 10 min with solution of reactivator in concentrations 100 μM and 10 μM (and 10<sup>-8</sup> M - 10<sup>-2</sup> M for obidoxime). Reactivation potency was calculated from the formula:

$$\% R = [1 - (a_0 - a_r) / (a_0 - a_i)] * 100,$$

where % R is percent of reactivation, a<sub>0</sub> is activity of intact enzyme, a<sub>i</sub> is activity of inhibited enzyme and a<sub>r</sub> is activity of reactivated enzyme. Detailed description of the method can be found in Musilova et al [9].

## RESULTS AND DISCUSSION

Measured values of reactivation ability of tested oxime reactivators are summarized in Table 1 and Table 2. Reactivators were *in vitro* evaluated in

concentrations 100  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ , which are usually attainable in plasma within clinical treatment in the hospital in the case of intoxication by OPs [10].

Our results demonstrated that the best broad-spectrum AChE reactivators after 10 minutes of reactivation are trimedoxime and obidoxime, because they reached more than 50 % of reactivation in the case of paraoxon, leptophos-oxon and methamidophos-inhibited AChE. DFP- and dichlorvos-inhibited AChE was not sufficiently reactivated. Methamidophos and leptophos-oxon are quite easily reactivatable by all tested reactivators. In case of reactivation dichlorvos-, paraoxon-, DFP- and leptophos-oxon-inhibited AChE, higher oxime concentration caused higher reactivation of phosphorylated enzyme. Reverse behavior was observed for methamidophos-inhibited enzyme, where the maximum reactivation ability was achieved with lower oxime concentration. Therefore, we investigated relation between oxime concentration and type of used inhibitor. Obidoxime was selected as a suitable model oxime and its reactivation ability was estimated in concentration range (depending on the inhibitor)  $10^{-8} \text{ M} - 10^{-2} \text{ M}$  (Fig. 2 - 6). As a result, we obtained bell-shaped dependencies of reactivation ability on obidoxime concentration for each inhibitor. Maximum level of reactivation for each inhibitor was achieved at different obidoxime concentration and especially for methamidophos, the maximum was shifted towards lower concentrations. While the lower oxime concentration (right side of the bell-shaped graph) causes practically only reactivation of phosphorylated enzyme, with increasing concentration occurs enzyme inhibition with reactivator (left side of the graph) [11]. Another important factor affecting reactivation process is formation of phosphorylated oximes during reactivation [12]. Their presence causes re-inhibition of the enzyme and therefore has strong influence on the course of reactivation curve.

According to our results, reactivation ability of tested oximes for BuChE was very low in comparison with values measured for AChE. Similar results with reactivation of OP-inhibited BuChE were obtained also by Aurbek et al [13].

## CONCLUSIONS

According to our results, bisquaternary oximes seem to be more potent reactivators of pesticide-inhibited AChE than monoquaternary pralidoxime. No reactivator achieved sufficient ability to reactivate OP pesticide-inhibited BuChE and therefore none from the oximes can be recommended as a candidate for “pseudocatalytic” bioscavenger with

BuChE. Because of this, larger group (not only the currently available ones) of reactivators should be tested to get structure-activity relationship which could help in subsequent synthesis of new reactivators of BuChE - “rational synthesis of BuChE reactivators”.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the NATO grant CBP.EAP.CLG 983 024 and Plan de coopération militaire Franco-Tchèque (16A03-FR20) and DGA grant 08co501.

## References

- [1] L. G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology, *Clin. Chim. Acta* 366 (2006) 1-13.
- [2] D. M. Maxwell, K. M. Brecht, I. Koplovitz, and R. E. Sweeney, Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?, *Arch. Toxicol.* 80 (2006) 756-760.
- [3] J. Bajgar, J. Fusek, K. Kuca, L. Bartosova, and D. Jun, Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction, *Mini. Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 461-466.
- [4] A. Saxena, W. Sun, C. Luo, T. M. Myers, I. Koplovitz, D. E. Lenz, and B. P. Doctor, Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds, *J. Mol. Neurosci.* 30 (2006) 145-148.
- [5] D. M. Maxwell, K. M. Brecht, B. P. Doctor, and A. D. Wolfe, Comparison of antidote protection against soman by pyridostigmine, HI-6 and acetylcholinesterase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264 (1993) 1085-1089.
- [6] D. Kolarich, A. Weber, M. Pabst, J. Stadlmann, W. Teschner, H. Ehrlich, H. P. Schwarz, and F. Altmann, Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma, *Proteomics.* 8 (2008) 254-263.
- [7] D. E. Lenz, D. Yeung, J. R. Smith, R. E. Sweeney, L. A. Lumley, and D. M. Cerasoli, Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review, *Toxicology* 233 (20-4-2007) 31-39.
- [8] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr., and R. M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-95.
- [9] L. Musilova, K. Kuca, Y. S. Jung, and D. Jun, In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Clin. Toxicol. (Phila)* 47 (2009) 545-550.

- [10] J. Bajgar, Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment, *Adv. Clin. Chem.* 38 (2004) 151-216.
- [11] D. E. Lorke, S. M. Nurulain, M. Y. Hasan, K. Kuca, K. Musilek, and G. A. Petroianu, Eight new bispyridinium oximes in comparison with the conventional oximes pralidoxime and obidoxime: in vivo efficacy to protect from diisopropylfluorophosphate toxicity, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 920-928.
- [12] J. Stenzel, F. Worek, and P. Eyer, Preparation and characterization of dialkylphosphoryl-obidoxime conjugates, potent anticholinesterase derivatives that are quickly hydrolyzed by human paraoxonase (PON1192Q), *Biochem. Pharmacol.* 74 (1-11-2007) 1390-1400.
- [13] N. Aurbek, H. Thiermann, F. Eyer, P. Eyer, and F. Worek, Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis, *Toxicology* 259 (17-5-2009) 133-139.





Fig. 2. Relationship between obidoxime concentration and corresponding reactivation ability of methamidophos-inhibited AChE

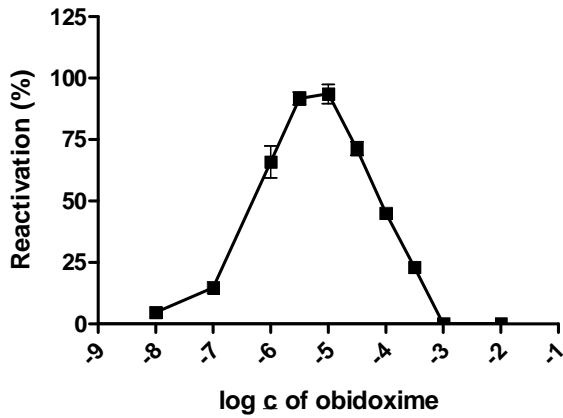


Fig. 3. Relationship between obidoxime concentration and corresponding reactivation ability of paraoxon-inhibited AChE

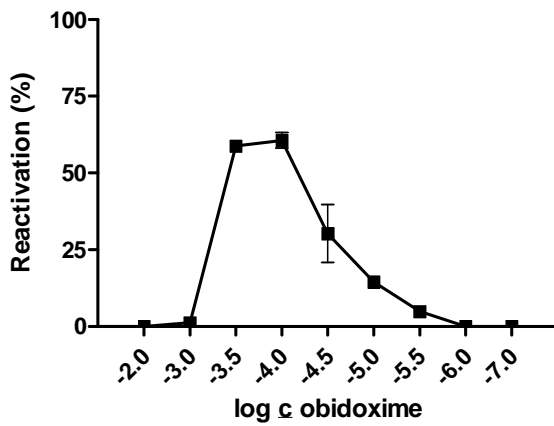


Fig. 4. Relationship between obidoxime concentration and corresponding reactivation ability of dichlorvos-inhibited AChE

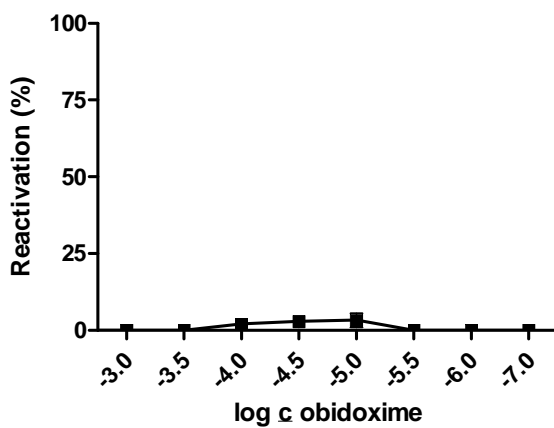


Fig. 5. Relationship between obidoxime concentration and corresponding reactivation ability of DFP-inhibited AChE

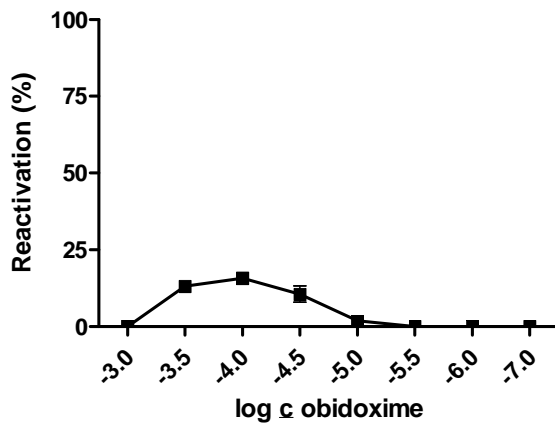
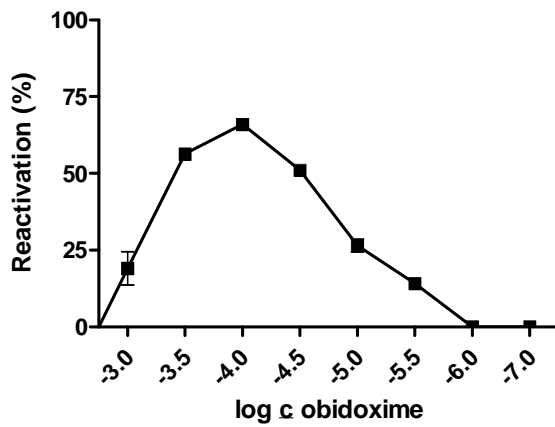


Fig. 6. Relationship between obidoxime concentration and corresponding reactivation ability of leptophos-oxon-inhibited AChE



## VI.

### **Novel bisquaternary oximes – Reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon**

Kuča K., Musilová L., Jun D., Paleček J., Cirkva L.,  
Musílek K., Pohanka M., Žďárová- Karasová J.

*(submitted)*

## Novel Bisquaternary Oximes – Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon

Kamil Kuca,<sup>1</sup> Lucie Musilova,<sup>2</sup> Jiri Palecek,<sup>3</sup> Vladimir Cirkva,<sup>4</sup> Martin Paar,<sup>2</sup> Kamil Musilek,<sup>1</sup> Martina Hrabnova,<sup>1</sup> Miroslav Pohanka,<sup>1</sup> Jana Zdarova Karasova<sup>1</sup>, Daniel Jun<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic*

<sup>2</sup>*Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic*

<sup>3</sup>*Institut für Organische Chemie and Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe (BMWZ), Leibniz Universität Hannover, Hannover; Germany*

<sup>4</sup>*Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v. v. i., Prague, Czech Republic*

<sup>5</sup>*Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Praha, Czech Republic*

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: [kucakam@pmfhk.cz](mailto:kucakam@pmfhk.cz)

Received: / Accepted: / Published:

---

**Abstract:** There were prepared four novel bisquaternary aldoxime cholinesterase reactivators differing in their chemical structure. Afterwards, their biological activity was evaluated for their ability to reactivate acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8) inhibited by paraoxon. Their reactivation activity was compared with standard reactivators – pralidoxime, obidoxime and HI-6 – which are clinically used at present time. As resulted, none of the prepared compounds surpassed obidoxime which is considered to be the most potent compounds if used for reactivation of AChE inhibited by paraoxon. In case of BuChE reactivation, two compounds (K053 and K068) achieved similar results as obidoxime.

Keywords: acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; reactivator; nerve agent; oxime; pesticide; scavenger.

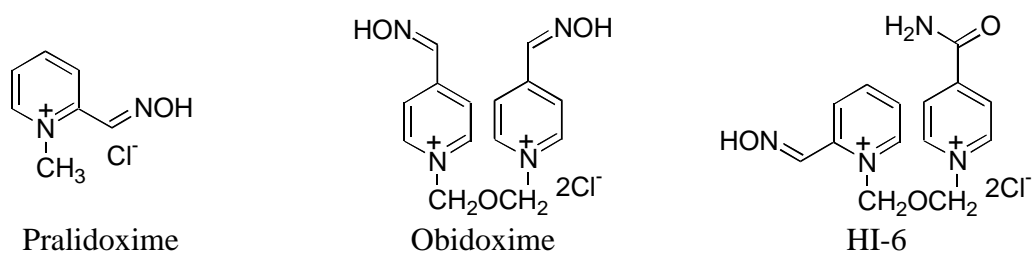
---

## Introduction

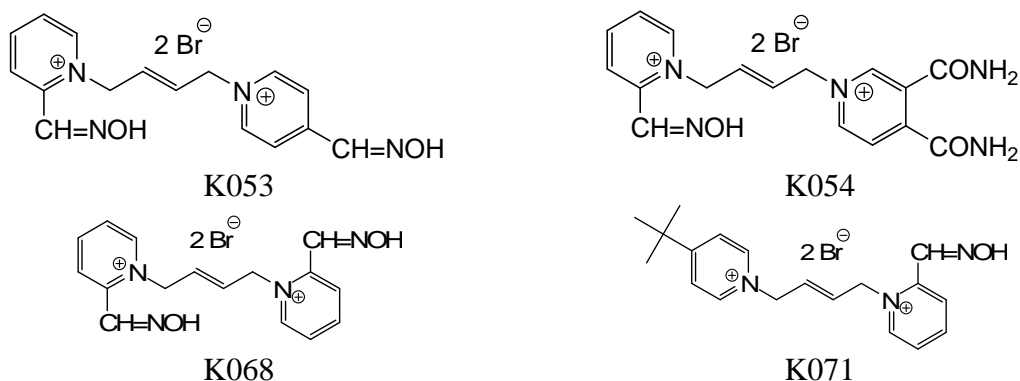
Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) reactivators are group of drugs originally developed as antidotes for the treatment of nerve agent poisonings.<sup>1</sup> They are administered by soldiers using autoinjectors in case of need as immediate help if they were intoxicated by nerve agents.<sup>2</sup> With the increasing demands on the agricultural production, several kinds of pesticides are extensively used. Among them, organophosphorus pesticides play a very important role.<sup>3</sup> Unfortunately, these compounds act biochemically very similarly as nerve agents (e.g. sarin) do. They inhibit enzymes AChE and butyrylcholinesterase (BuChE; 3.1.1.8).<sup>2,4</sup> If considered AChE, its inhibition is a life threatening process, because AChE terminates nerve impulses on the synaptic clefts of the nerve system.<sup>2</sup> After the inhibition, it cannot degrade the neuromediator acetylcholine (ACh), ACh cumulates on the synaptic clefts, it overstimulates receptors and intoxicated organism can die because of cholinergic crisis.<sup>2</sup> Standard therapy of such intoxications consists of anticholinergic drugs (mostly atropine), AChE reactivators (clinically used – pralidoxime, obidoxime, HI-6; Figure 1) and anticonvulsives (diazepam or avizafone).<sup>5</sup> Choice of anticholinergics and anticonvulsives is relatively resistant to changes. On the contrary, there are described many new derivatives from the group of AChE reactivators.<sup>1</sup>

In this study, we have prepared four novel bisquaternary aldoxime cholinesterase reactivators (K053, K054, K068 and K071) with the aim to get new more promising oxime candidates which could in future replace clinically used reactivators (Figure 2). Paraoxon (POX) was selected as an appropriate organophosphate inhibitor of cholinesterases in our experiment. Newly prepared compounds were also tested for their reactivation of BuChE. BuChE reactivation is at present time well investigated to get so-called “pseudocatalytic scavenger” able to act as prophylaxis or treatment of nerve agent poisonings.<sup>6-8</sup>

**Figure 1.** Chemical structures of clinically used acetylcholinesterase reactivators



**Figure 2.** Chemical structures of novel acetylcholinesterase reactivators

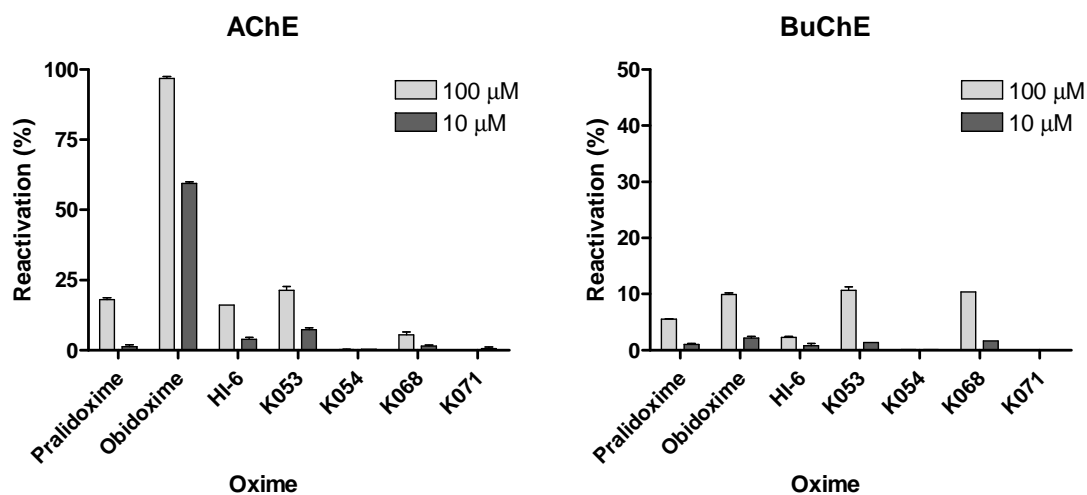


## Results and Discussion

All obtained results are summarized in Table 1 and for better visualization also in Figure 3.

**Table 1** Potency of tested oximes to reactivate POX- inhibited human erythrocyte AChE and plasma BuChE at concentrations 100  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. (% , mean value of three independent determinations, time of inhibition by paraoxon 120 min; time of reactivation by AChE reactivators - 10 min; pH 7.4; temperature 25  $^{\circ}$ C).

Concentration	Reactivation (%)							
	AChE				BuChE			
	100 $\mu$ M		10 $\mu$ M		100 $\mu$ M		10 $\mu$ M	
Reactivator	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Pralidoxime <sup>6</sup>	18.0	0.7	1.3	0.7	5.5	0.1	1.0	0.2
Obidoxime <sup>6</sup>	96.9	0.7	59.4	0.7	9.9	0.3	2.2	0.3
HI-6 <sup>6</sup>	16.1	0	3.9	0.7	2.3	0.2	0.8	0.4
K053	21.4	1.4	7.3	0.8	10.7	0.6	1.4	0
K054	0	0	0.4	0	0.2	0	0.2	0
K068	5.4	1.0	1.5	0.4	10.4	0	1.7	0
K071	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figure 3** Reactivation of paraoxon-inhibited AChE and BuChE by novel bisquaternary aldoxime reactivators.

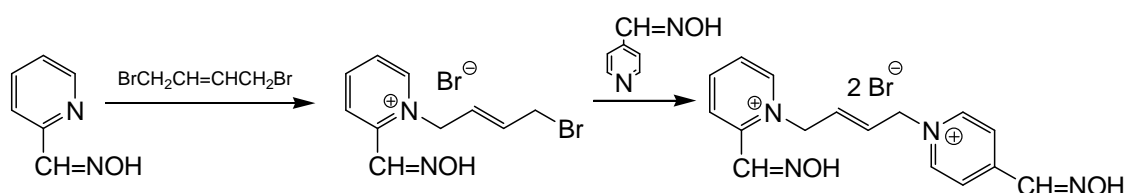
As resulted, obidoxime was the most potent reactivator in treatment of paraoxon-inhibited AChE at both concentrations tested (10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M). Newly prepared oxime K053 together with pralidoxime and HI-6 reached comparable results which are considered to be satisfactory for survival of intoxicated organism.<sup>9,10</sup> All other evaluated oximes were not effective in case of AChE reactivation. In case of BuChE reactivation, much more bad results were obtained. This result corresponds with the general finding described already earlier, that reactivation of BuChE is very difficult and different to that for AChE.<sup>11-13</sup> In this case, obidoxime and two novel oximes (K053 and K068) achieved reactivation around 10 %. No other oximes (including pralidoxime and HI-6) were able to reactivate sufficiently the POX-inhibited BuChE.

If obtained results are compared, new AChE reactivators are not better than the clinically used ones, so that their further investigation could be not recommended. Due to this, novel structurally different oximes derived from clinically used ones (especially from obidoxime) should be designed and tested for their reactivation potency against POX. On the contrary, if considered BuChE reactivation, two oximes could be of further interest (K053 and K068). Although they did not reach extraordinary quality in their reactivation, 10 % reactivation is in view of other our results published earlier relatively enough.<sup>7</sup> Due to this, if novel BuChE reactivators will be designed in the future, results of this study could be used as first approximation to the desired structure with higher BuChE reactivation potency.

## Experimental section

*Synthetic part:* All chemicals used in this study were of reagent grade. They were obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich, Czech Republic). All newly prepared reactivators were prepared using standard synthetic approach described several-times before by Musilek et al.<sup>14,15</sup> As can be clearly seen from the reactivators' structure, in the case of asymmetric reactivators there is the need to prepare them through the monoquaternary intermediate. To obtain the monoquaternary compound, there is a need of mild conditions to prevent a creation of symmetric bisquaternary compound (Figure 4).

**Figure 4.** General scheme of the synthesis of novel acetylcholinesterase reactivators



NMR data together with melting points and yields of prepared compounds are listed below:

*trans*-2,4'-Bis[(hydroxyimino)methyl]-1,1'-(but-2-ene-1,4-diyl)bispyridinium dibromide (K053); yield 68 %; m.p. 194-196 °C; <sup>1</sup>H NMR ( $\delta$ , 300 MHz, D<sub>2</sub>O) 5.52 (d, 2H, J = 4.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.89 (d, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.03 (dt, 1H, J = 16, 4.5 Hz, CH=), 6.34 (dt, 1H, J = 16, 8 Hz, CH=), 8.07 (t, 1H, J = 6 Hz, arom H-5), 8.21 (d, 1H, J = 6 Hz, arom H-3), 8.24 (d, 2H, J = 6 Hz, arom H-3', H-5'), 8.38 (s, 1H, CH=N), 8.61 (t, 1H, J = 6 Hz, arom H-4), 8.63 (s, 1H, CH=N), 8.85 (d, 1H, J = 6 Hz, arom H-6), 8.87 (d, 2H, J = 6 Hz, arom H-2', H-6'). The signals of =NOH disappeared in deuterated solvent; <sup>13</sup>C NMR ( $\delta$ , 75 MHz, D<sub>2</sub>O) 48.37 (CH<sub>2</sub>), 62.23 (CH<sub>2</sub>), 126.94 (CH=), 126.96 (CH=), 127.02 (CH-3', 5'), 129.90 (CH-3), 132.85 (CH-5), 146.95 (CH-2', 6'), 146.99 (CH-6), 148.18 (C-4'), 148.21 (CH-4), 148.74 (CH=N), 151.41 (CH=N), 157.37 (C-2).

*trans*-3,4-Dicarbamoyl-2'-(hydroxyimino)methyl-1,1'-(but-2-ene-1,4-diyl)bispyridinium dibromide (K054); yield 55 %; m.p. 209-211 °C; <sup>1</sup>H NMR ( $\delta$ , 300 MHz, D<sub>2</sub>O) 5.40 (d,



2H, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.54 (d, 2H, J = 5 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.04 (dt, 1H, J = 16, 7 Hz, CH=), 6.42 (dt, 1H, J = 16, 5 Hz, CH=), 8.09 (t, 1H, J = 6 Hz, arom H-5'), 8.34 (d, 1H, J = 6 Hz, arom H-3'), 8.43 (d, 1H, J = 7 Hz, arom H-5), 8.59 (t, 1H, J = 6 Hz, arom H-4'), 8.64 (s, 1H, CH=N), 8.86 (d, 1H, J = 6 Hz, arom H-6'), 9.11 (d, 1H, J = 7 Hz, arom H-6), 9.25 (s, 1H, arom H-2). The signals of CONH<sub>2</sub> and =NOH disappeared in deuterated solvent; <sup>13</sup>C NMR (δ, 75 MHz, D<sub>2</sub>O) 48.48 (CH<sub>2</sub>), 61.25 (CH<sub>2</sub>), 127.51 (CH=), 129.08 (CH=), 129.30 (CH-5), 129.91 (CH-3'), 130.27 (CH-5'), 135.86 (C-3), 144.12 (CH-6), 146.76 (CH-6'), 148.37 (CH-4'), 148.76 (CH-2), 149.88 (CH=N), 152.04 (C-4), 157.32 (C-2'), 167.90 (CONH<sub>2</sub>), 169.49 (CONH<sub>2</sub>).

*trans-2,2'-Bis[(hydroxyimino)methyl]-1,1'-(but-2-ene-1,4-diyl)bispyridinium dibromide* (K068); yield 60 %; m.p. 196-199 °C; <sup>1</sup>H NMR (δ, 300 MHz, D<sub>2</sub>O) 5.28 (d, 4H, J = 5 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>), 6.06 (t, 2H, J = 5 Hz, 2 x CH=), 8.08 (dt, 2H, J = 8, 1.5 Hz, 2 x arom H-5), 8.38 (dd, 2H, J = 8, 1.5 Hz, 2 x arom H-3), 8.60 (dt, 2H, J = 8, 1.5 Hz, 2 x arom H-4), 8.78 (s, 2H, 2 x CH=N), 8.87 (dd, 2H, J = 8, 1.5 Hz, 2 x arom H-6). The signal of =NOH disappeared in deuterated solvent; <sup>13</sup>C NMR (δ, 75 MHz, D<sub>2</sub>O) 48.53 (CH<sub>2</sub>), 127.45 (CH=), 129.80 (CH-3), 130.53 (CH-5), 145.01 (CH-6), 148.57 (CH-4), 148.74 (CH=N), 157.31 (C-2).

*trans-4'-tert-Butyl-2-(hydroxyimino)methyl-1,1'-(but-2-ene-1,4-diyl)bispyridinium dibromide* (K071); yield 47 %; m.p. >300 °C; <sup>1</sup>H NMR (δ, 300 MHz, D<sub>2</sub>O) 1.25 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>), 5.22 (d, 2H, J = 5 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.84 (d, 2H, J = 8 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.04 (dm, 1H, J = 16 Hz, CH=), 6.32 (dm, 1H, J = 16 Hz, CH=), 8.02-9.25 (m, 8H, arom), 8.64 (s, 1H, CH=N). The signal of =NOH disappeared in deuterated solvent; <sup>13</sup>C NMR (δ, 75 MHz, D<sub>2</sub>O) 31.55 (CH<sub>3</sub>), 38.45 (C), 48.38 (CH<sub>2</sub>), 64.37 (CH<sub>2</sub>), 126.61 (CH-3',5'), 127.47 (CH=), 127.54 (CH=), 128.30 (CH-3), 129.84 (CH-5), 142.96 (CH-2',6'), 146.05 (CH-6), 146.69 (CH-4), 148.70 (CH=N), 157.94 (C-2), 166.88 (C-4').

*Biochemical part:* Purity of novel compounds was checked once again using TLC technique and HPLC technique immediately prior the experiment (Jun et al. 2007,2008).<sup>16-17</sup>

Paraoxon (POX; O,O-diethyl-O-4-nitrophenylphosphate) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) in 95% purity. Reactivation activity of synthesized reactivators was tested using our in vitro reactivation test.<sup>7</sup> Short description of this method is summarized here:

Human erythrocyte AChE or plasma BuChE were inhibited by solution of paraoxon to 5 % of their original activity. Time of enzyme inhibition with paraoxon (2 hours, corresponding to  $7 \times T_{1/2}$ ) was calculated from experimentally determined half life ( $T_{1/2}$ ) of reaction between enzyme and paraoxon. Then, inhibited enzyme was incubated for 10 min with solution of reactivator at concentration  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M. Activity of AChE (BChE) was measured spectrophotometrically by modified method according to Ellman with acetylthiocholine (butyrylthiocholine) as substrate.<sup>18</sup> Reactivation potency was calculated from the formula:

$$\%R = (1 - (a_0 - a_r) / (a_0 - a_i)) \times 100$$

where %R is percent of reactivation,  $a_0$  is activity of intact enzyme,  $a_i$  is activity of inhibited enzyme and  $a_r$  is activity of reactivated enzyme minus oximolysis.

Each measurement was repeated three times and was conducted under standard laboratory temperature (25 °C). Calculations were performed using software GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com).

All experiments were carried out in compliance with the current law of Czech Republic.

### **Acknowledgement**

Authors would like to thank Mrs Martina Hrabínová and Mr. Petr Stodulka for their excellent technical help. This work was supported by the NATO grant agency – project no. CBP.EAP.CLG 983 024.

### **References**

1. Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dolezal, M. Progress in synthesis of new acetylcholinesterase reactivators during the period 1990-2004. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 229-238.
2. Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, *38*, 151-216.
3. Eddleston, M.; Eyer, P.; Worek, F.; Sheriff, M.H.; Buckley, N.A. Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning. *QJM.* **2008**, *101*, 467-474.
4. Kuca, K.; Kassa, J. In vitro reactivation of acetylcholinesterase using of the oxime K027. *Vet. Hum. Toxicol.* **2004**, *46*, 15-18.

5. Musilek, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Kassa, J.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase - synthesis and evaluation of (E)-1-(4-carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene dibromide (K203). *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5514-5518.
6. Jun, D.; Musilova, L.; Kuca, K.; Kassa, J.; Bajgar, J. Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon and methyl-paraoxon *in vitro*. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 421-424.
7. Musilova, L.; Kuca, K.; Jung, Y.S.; Jun, D. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clin. Toxicol.* **2009**, *47*, 545-550.
8. Musilova, L.; Jun, D.; Kuca, K.; Pohanka, M.; Katalinic, M.; Kovarik, Z. Development of new antidotes of organophosphate intoxications: Oxime-assisted reactivation of dimethoxy- and diethoxy-phosphorylated human butyrylcholinesterase for construction of "pseudo catalytic" bioscavengers. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, S216.
9. Bajgar, J.; Fusek, J.; Kuca, K.; Bartosova, L.; Jun, D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 461-466.
10. Kuca, K.; Jun, D.; Bajgar, J. Currently used cholinesterase reactivators against nerve agent intoxication: comparison of their effectivity *in vitro*. *Drug Chem. Toxicol.* **2007**, *30*, 31-40.
11. Kovarik, Z.; Vrdoljak, A.L.; Berend, S.; Katalinic, M.; Kuca, K.; Musilek, K.; Radic, B. Evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2009**, *60*, 19-26.
12. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K. In vitro reactivation of trichlorfon-inhibited butyrylcholinesterase using HI-6, obidoxime, pralidoxime and K048. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 680 – 683.
13. Carletti, E.; Aurbek, N.; Gillon, E.; Loiodice, M.; Nicolet, Y.; Fontecilla-Camps, J.C.; Masson, P.; Thiermann, H.; Nachon, F. Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 97-106.
14. Musilek, K.; Lipka, L.; Racakova, V.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, V. New methods in synthesis of acetylcholinesterase reactivators and evaluation of their potency to reactivate cyclosarin-inhibited AChE. *Chem. Papers* **2006**, *60*, 48-51.
15. Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (E)-but-2-ene linker – Preparation and reactivation of tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Biorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6733-6741.
16. Jun, D.; Stodulka, P.; Kuca, K.; Koleckar, V.; Dolezal, B.; Simon, P.; Veverka, M. HPLC analysis of HI-6 dichloride and dimethanesulfonate – antidotes

- against nerve agents and organophosphorus pesticides. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2783-2787.
17. Jun, D.; Stodulka, P.; Kuca, K.; Koleckar, V.; Dolezal, B.; Simon, P.; Veverka, M. TLC analysis of intermediates arising during the preparation of oxime HI-6 dimethanesulfonate. *J. Chrom. Sci.* **2008**, *46*, 316-319.
  18. Ellman, GL.; Courtney, KD.; Andres, V.; Feather-Stone, RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.

## VII.

### **Novel Nucleophilic Compounds with Oxime Group as Reactivators of Paraoxon-Inhibited Cholinesterases**

Musilová L., Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K.,  
Pohanka M., Kuča K.

*(submitted)*

## Novel Nucleophilic Compounds with Oxime Group as Reactivators of Paraoxon-Inhibited Cholinesterases

Lucie Musilova,<sup>1</sup> Daniel Jun,<sup>2,3</sup> Jiri Palecek,<sup>4</sup> Vladimir Cirkva,<sup>5</sup> Kamil Musilek,<sup>2</sup> Martin Paar,<sup>1</sup> Martina Hrabínová,<sup>2</sup> Miroslav Pohanka,<sup>2</sup> Kamil Kuca<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>2</sup> Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>3</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Praha, Czech Republic

<sup>4</sup> Institut für Organische Chemie and Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe (BMWZ), Leibniz Universität Hannover, Hannover; Germany

<sup>5</sup> Institute of Chemical Process Fundamentals of the ASCR, v. v. i., Prague, Czech Republic

**Abstract:** New cholinesterase reactivators are synthesized as potential antidotes for treatment of organophosphorus agent poisonings or as part of pseudo catalytic scavengers for improvement of the nerve agent prophylaxis. In this study, three novel potential cholinesterase reactivators (K064, K065, K066) were synthesized and tested for their potency to reactivate acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.3) and butyrylcholinesterase (BuChE, 3.1.1.8) inhibited by pesticide paraoxon. As resulted, none from the synthesized compounds surpassed currently clinically used reactivators (pralidoxime, obidoxime and HI-6).

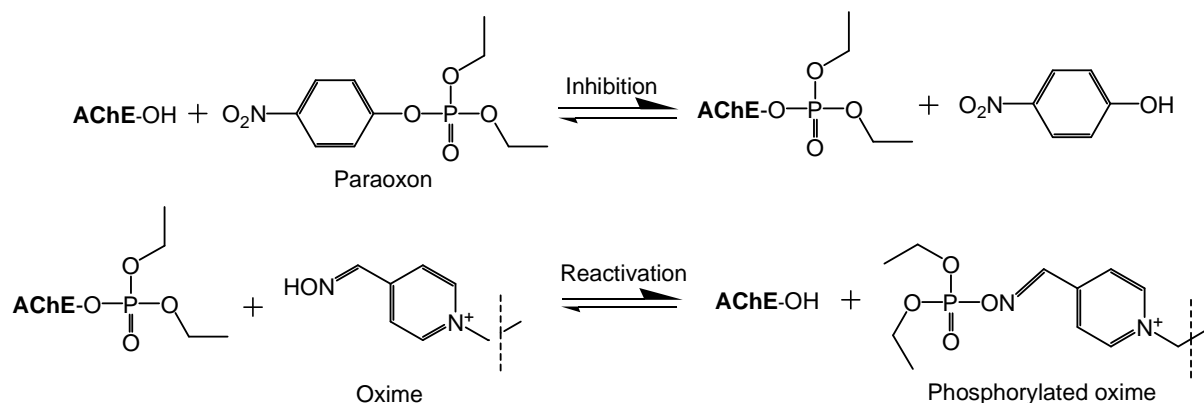
**Keywords:** acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; nerve agent; pesticide; reactivator; oxime; paraoxon; scavenger

### Introduction

Chemical warfare agents (CWA) pose extraordinary high threat if considered their misuse by terrorists. As known from the past, they were already misused by the Aum Shinrikjo sect in 1995 in Tokyo subway (so called Sarin Attack).<sup>1</sup> Owing to the simple preparation and availability of precursors of these agents, they could be much more easily misused if compared with biological (delay in symptoms onset) or nuclear (relatively expensive) weapons. Nerve agents seem to be the most toxic group of CWA

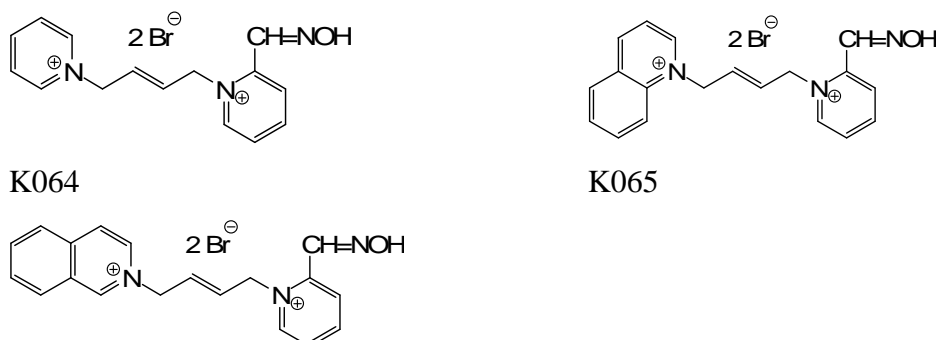
with the highest probability of use. Sarin, soman or VX agent are the most known members of the nerve agent family.<sup>2</sup>

These agents cause an inhibition of cholinesterases which are then unable to split endogenic esters in the human body (Figure 1). Especially, inhibited acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is unable to serve its physiological role – splitting the neuromediator acetylcholine at the synaptic clefts. This failure of nerve system leads to cholinergic crisis and death of the intoxicated organism.<sup>3</sup>



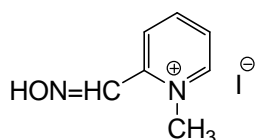
**Figure 1** AChE is inhibited immediately when paraoxon reacts with serine hydroxyl group in the enzyme active site. Reactivation occurs when oxime reactivator cleaves the bond between AChE and diethoxyphosphoryl moiety.

There are several approaches how to fight against the nerve agent intoxications. Several drugs are administered prior (prophylaxis) and several after (treatment) the nerve agent intoxication.<sup>4</sup> Among the prophylactic approaches, bioscavengers are considered to be most promising direction.<sup>5-7</sup> If the post-exposure treatment is discussed, AChE reactivators are the most important group of antidotes and therefore finding of the most universal AChE reactivator is of high interest.<sup>8-10</sup>

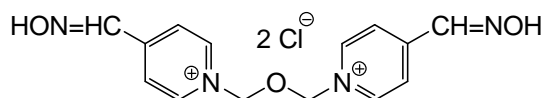


**Figure 2** Structures of newly prepared cholinesterase reactivators.

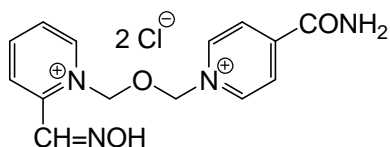
In this communication, synthesis of three novel cholinesterase reactivators (K064, K065, K066) is described (Figure 2). Furthermore, their potency to reactivate human AChE and butyrylcholinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8) inhibited by the pesticide paraoxon (*O,O*-diethyl *O*-4-nitro-phenyl phosphate) is described. Clinically used AChE reactivators, pralidoxime, obidoxime and HI-6, were used as appropriate standards for the comparison (Figure 3).



Pralidoxime (2-PAM)



Obidoxime



HI-6

**Figure 3** Structures of clinically used AChE reactivators, currently used in the therapy of organophosphate agent poisonings.

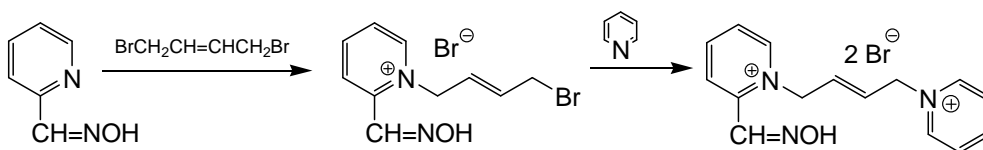
## Materials and Methods

### Chemicals

As shown in the Figure 2, all newly prepared compounds are non-symmetric bisquaternary compounds with the oxime group which is responsible for the reactivation process (Figure 1). Owing to this fact, stepwise synthetic approach via the monoquaternary intermediate is needed (Figure 4). To get the required monoquaternary intermediate, the first reaction was conducted at specific reaction conditions (excess of alkylating agent; very diluted solution). The exact description of this approach was described earlier by our group in Musilek et al.<sup>11-13</sup>



**Figure 4.** General preparation of bisquaternary non-symmetric AChE reactivators



Yields of all reaction, melting points and NMR spectra of obtained products are summarized in Table 1. As shown, the yields are in the range between 24-55 %, which is comparable with the yields obtained for similar compounds published earlier.<sup>11-13</sup>

**Table 1.** Melting points, yields of all reactions and NMR spectra of newly prepared compounds

Comp.	m.p.	Yield	NMR Spectra
K064	>300°C	55%	<sup>1</sup> H NMR ( $\delta$ , 300 MHz, D <sub>2</sub> O) 5.43 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.83 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.06 (dm, 1H, <i>J</i> = 16 Hz, CH=), 6.37 (dm, 1H, <i>J</i> = 16 Hz, CH=), 8.04-9.35 (m, 9H, arom), 8.68 (s, 1H, CH=N). The signal of =NOH disappeared in deuterated solvent. <sup>13</sup> C NMR ( $\delta$ , 75 MHz, D <sub>2</sub> O) 47.59 (CH <sub>2</sub> ), 63.53 (CH <sub>2</sub> ), 126.73 (CH=), 126.76 (CH=), 128.72 (CH-3',5'), 129.03 (CH-3), 129.61 (CH-5), 142.18 (CH-2',6'), 146.03 (CH-6), 147.88 (CH-4), 148.13 (CH-4'), 149.25 (CH=N), 157.02 (C-2).
K065	>300°C	24%	<sup>1</sup> H NMR ( $\delta$ , 300 MHz, D <sub>2</sub> O) 5.45 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.93 (d, 2H, <i>J</i> = 8 Hz, CH <sub>2</sub> ), 6.09 (dm, 1H, <i>J</i> = 16 Hz, CH=), 6.29 (dm, 1H, <i>J</i> = 16 Hz, CH=), 8.02-9.35 (m, 11H, arom), 8.79 (s, 1H, CH=N). The signal of =NOH disappeared in deuterated solvent. <sup>13</sup> C NMR ( $\delta$ , 75 MHz, D <sub>2</sub> O) 48.23 (CH <sub>2</sub> ), 60.03 (CH <sub>2</sub> ), 118.40 (arom), 123.31 (arom), 123.58 (arom), 123.88 (arom), 127.12 (CH=), 127.33 (CH=), 128.55 (arom), 129.41 (arom), 129.54 (CH-3), 134.22 (CH-5), 139.64 (arom), 142.65 (arom), 144.46 (arom), 146.85 (CH-6), 148.38 (CH-4), 149.81 (CH=N), 157.26 (C-2).
K066	185-188°C	25%	<sup>1</sup> H NMR ( $\delta$ , 300 MHz, D <sub>2</sub> O) 5.42 (d, 2H, <i>J</i> = 6.5 Hz, CH <sub>2</sub> ), 5.54 (d, 2H, <i>J</i> = 5.5 Hz, CH <sub>2</sub> ), 6.08 (dt, 1H, <i>J</i> = 16, 6.5 Hz, CH=), 6.37 (dt, 1H, <i>J</i> = 16, 5.5 Hz, CH=), 8.02-8.28 (m, 6H, arom H-5', H-4,5,6,7,8), 8.42 (d, 1H, <i>J</i> = 6 Hz, arom H-3'), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6 Hz, arom H-3), 8.54-8.60 (m, 1H, arom H-4'), 8.62 (s, 1H,

			<p>CH=N), 8.87 (d, 1H, <math>J = 6</math> Hz, arom H-6'), 9.77 (s, 1H, arom H-1). The signal of =NOH disappeared in deuterated solvent.</p> <p><math>^{13}\text{C}</math> NMR (<math>\delta</math>, 75 MHz, <math>\text{D}_2\text{O}</math>) 48.42 (<math>\text{CH}_2</math>), 62.37 (<math>\text{CH}_2</math>), 127.53 (<math>\text{CH}=\text{}</math>), 127.62 (<math>\text{CH}=\text{}</math>), 128.64 (arom), 129.25 (arom), 129.62 (<math>\text{CH}-3</math>), 129.89 (arom), 132.33 (arom), 133.57 (<math>\text{CH}-5</math>), 139.59 (arom), 142.93 (arom), 146.54 (<math>\text{CH}-6</math>), 148.73 (<math>\text{CH}-4</math>), 149.18 (arom), 151.83 (<math>\text{CH}=\text{N}</math>), 157.22 (C-2).</p>
--	--	--	---

Purity of all tested AChE reactivators was tested using TLC (Merck; DC-Alufolien Cellulose F; mobile phase *n*-butanol : acetic acid : water – 5 : 1 : 2; detection by Dragendorff Reagent) and NMR (Varian Gemini 300, Palo Alto CA, USA) prior to their use.<sup>14-15</sup>

Paraoxon (POX; *O,O*-diethyl-*O*-4-nitrophenylphosphate) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) in 95% purity. All other chemicals used in this experiment were of analytical grade and were purchased from Sigma Aldrich (Czech Republic).

#### *In vitro* reactivation of AChE and BuChE

All the prepared compounds were tested for their activity to reactivate AChE and BuChE inhibited by paraoxon. The whole method is described in Musilova et al.<sup>16</sup> Briefly, human erythrocyte AChE or plasma BuChE were inhibited by solution of paraoxon to 5 % of its original activity. Time of enzyme inhibition with paraoxon (2 hours, corresponding to  $7 \times T_{1/2}$ ) was calculated from experimentally determined half life ( $T_{1/2}$ ) of reaction between enzyme and paraoxon. Then, inhibited enzyme was incubated for 10 min with solution of reactivator at concentration  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M. Activity of AChE (BuChE) was measured spectrophotometrically by modified method according to Ellman with acetylthiocholine (butyrylthiocholine) as substrate.<sup>17</sup> Reactivation potency was calculated from the formula:

$$\%R = (1 - (a_0 - a_r) / (a_0 - a_i)) \times 100$$

where %R is percent of reactivation,  $a_0$  is activity of intact enzyme,  $a_i$  is activity of inhibited enzyme and  $a_r$  is activity of reactivated enzyme minus oximolysis.

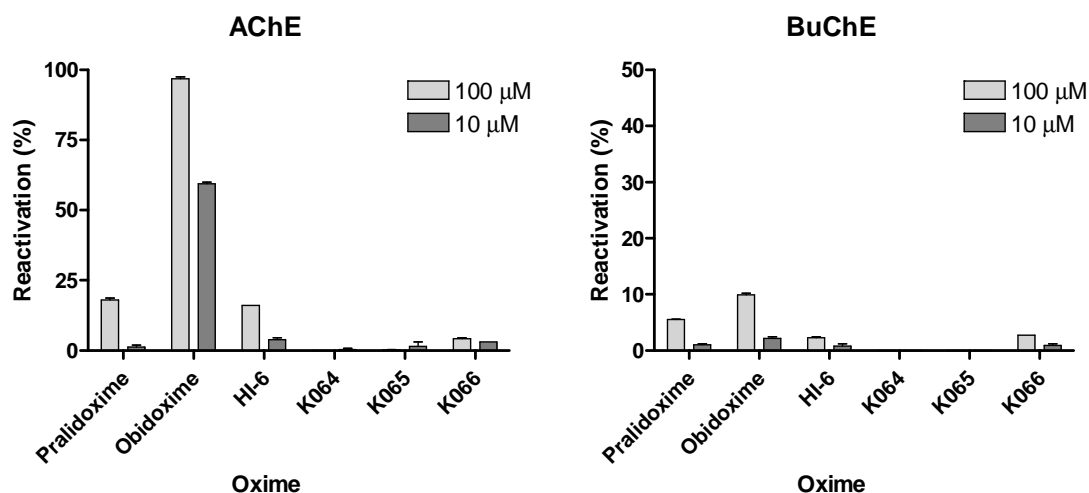
Each measurement was repeated three times and was conducted under standard laboratory temperature (25 °C). Calculations were performed using software GraphPad

Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com).

All experiments were carried out in compliance with the current law of Czech Republic.

## Results and Discussion

Reactivation results are shown in Figure 4 and Table 2.



**Figure 4** Reactivation of paraoxon-inhibited AChE and BuChE by newly prepared bisquaternary oxime reactivators.

	Reactivation (%)							
	AChE				BuChE			
	100 μM		10 μM		100 μM		10 μM	
Reactivator	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Pralidoxime <sup>18</sup>	18.0	0.7	1.3	0.7	5.5	0.1	1.0	0.2
Obidoxime <sup>18</sup>	96.9	0.7	59.4	0.7	9.9	0.3	2.2	0.3
HI-6 <sup>18</sup>	16.1	0	3.9	0.7	2.3	0.2	0.8	0.4
K064	0	0	0.4	0.4	0	0	0	0
K065	0.2	0.2	1.5	1.5	0	0	0	0
K066	4.2	0.3	3.0	0	2.7	0	0.9	0.3

**Table 2** Potency of tested oximes to reactivate paraoxon- inhibited human erythrocyte AChE and plasma BuChE at concentrations 100 μM and 10 μM. (% , mean value of three independent determinations, time of inhibition by paraoxon 120 min; time of reactivation by AChE reactivators - 10 min; pH 7.4; temperature 25 °C).

According to our results, the most potent reactivator of paraoxon-inhibited AChE from newly developed compounds (at both concentrations tested) was oxime K066. However, its reactivation ability did not surpass 5 %. In case of paraoxon-inhibited BuChE, the most promising compound was again reactivator K066. Reactivation ability of other tested oximes was below 1.5 %.

It is clearly shown that no oxime prepared in this study is able to reach reactivation potency of standard reactivators for both AChE and BuChE. If considered AChE reactivation, our results confirm the general fact, that obidoxime is at present time the most active reactivator in case of paraoxon poisoning.<sup>18,19</sup> On the contrary, currently the most discussed oxime – oxime HI-6 – should not be used as treatment of paraoxon because of almost no benefit. Similar results were published already earlier.<sup>8,18</sup> In case of BuChE reactivation, only obidoxime was able to slightly reactivate BuChE inhibited by paraoxon (cca 10 %). Reactivation activity of other tested reactivators was insufficient. The problem of BuChE reactivation by clinically used reactivators was already discussed earlier.<sup>16,20</sup>

Although our new reactivators did not surpass those clinically active ones, the need of novel structural variants (although with non-favorable results) is necessary to get the compact view on the structure-activity relationship to design in future a universal compound with broad reactivation activity.

### **Acknowledgement**

This work was supported by the MoD of the Czech Republic (project OVUOFVZ200902 - Novel Prophylactic Antidotes of Nerve Agent Poisonings Based on Scavengers).

### **References**

1. Tu, AT. *ACS Symposium Series.*, **2000**, 745, 304.
2. Bajgar, J. *Adv. Clin. Chem.*, **2004**, 38, 151.
3. Zdarova Karasova, J.; Bajgar, J.; Novotny, L.; Kuca, K. *J. Appl. Biomed.*, **2009**, 7, 93.
4. Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jun, D. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16, 2977.
5. Masson, P.; Nachon, F.; Broomfield, CA.; Lenz, DE.; Verdier, L.; Schopfer, LM.; Lockridge, O. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, 175, 273.

6. Saxena, A.; Sun, W.; Luo, C.; Myers, TM.; Koplovitz, I.; Lenz, DE.; Doctor, BP. *J. Mol. Neurosci.*, **2006**, *30*, 145.
7. Rochu, D.; Chabriere, E.; Masson, P. *Toxicology.*, **2007**, *233*, 47.
8. Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Pohanka, M.; Zdarova Karasova, J.; Novotny, L.; Musilova, L. *J. Appl. Biomed.*, **2009**, *7*, 143.
9. Kassa, J.; Kuca, K.; Cabal, J.; Paar, M. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **2006**, *69*, 1875.
10. Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dolezal, M. *Curr. Org. Chem.*, **2007**, *11*, 229.
11. Musilek, K.; Lipka, L.; Racakova, V.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, V. *Chem. Papers.*, **2006**, *60*, 48.
12. Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. *Biorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 6733.
13. Musilek, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Kassa, J.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5514.
14. Jun, D.; Stodulka, P.; Kuca, K.; Koleckar, V.; Dolezal, B.; Simon, P.; Veverka, M. *Anal. Lett.*, **2007**, *40*, 2783.
15. Jun, D.; Stodulka, P.; Kuca, K.; Koleckar, V.; Dolezal, B.; Simon, P.; Veverka, M. *J. Chrom. Sci.*, **2008**, *46*, 316.
16. Musilova, L.; Kuca, K.; Jung, YS.; Jun, D. *Clin. Toxicol.*, **2009**, *47*, 545.
17. Ellman, GL.; Courtney, KD.; Andres, V.; Feather-Stone, RM. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88.
18. Jun, D.; Musilova, L.; Kuca, K.; Kassa, J.; Bajgar, J. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *175*, 421.
19. Raszewski, G.; Filip, R. *Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2009**, *105*, 37.
20. Musilova, L.; Jun, D.; Kuca, K.; Pohanka, M.; Katalinic, M.; Kovarik, Z. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, S216.

## 9.2 Seznam všech publikací

Jun D., **Musilová L.**, Link M., Loidice M., Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning (*submitted*)

Jun D., **Musilová L.**, Kuča K., Kassa J., Bajgar J.: Potency of Several Oximes to Reactivate Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon In Vitro. *Chem.-Biol.Interact.* (2008) 175, 421-424.

**Musilová L.**, Kuča K., Jung Y. S., Jun D.: In Vitro Oxime-Assisted Reactivation of Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Clin Toxicol.* (2009) 47, 545-550.

Jun D., **Musilová L.**, Kuča K., Musílek K., Bajgar J.: Reactivation of AChE and BuChE activity – Possible implications for prophylaxis against nerve agents. In *Central and peripheral nervous system: Effects of highly toxic organophosphates and their antidotes* (Bajgar, J., Ed.) (2009) Research Signpost, Kerala, India, ISBN 978-81-308-0331-9 (*in press*)

**Musilová L.**, Kuča K., Pohanka M., Holas O., Jun D.: In vitro ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (*submitted*)

Kuča K., **Musilová L.**, Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Žďárová- Karasová J.: Novel bisquaternary oximes – Reactivation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon (*submitted*)

**Musilová L.**, Jun D., Paleček J., Cirkva L., Musílek K., Pohanka M., Kuča K.: Novel Nucleophilic Compounds with Oxime Group as Reactivators of Paraoxon-Inhibited Cholinesterases (*submitted*)

Kuča K., Jun D., Cabal J., **Musilová L.**: Bisquaternary Oximes as Reactivators of Tabun-Inhibited Human Brain Cholinesterases: An in vitro Study. (2007) *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 101, 25–28

Kuča K., Cabal J., Jung Y.S., Musílek K., Soukup O., Jun D., Pohanka M., **Musilová L.**, Karasová J., Novotný L., Hrabínová M.: Reactivation of Human Brain Homogenate Cholinesterases Inhibited by Tabun using Newly Developed Oximes K117 and K127. (2009) *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105(3), 207-210

### 9.3 Seznam prezentací na vědeckých setkáních

Jun D., **Musilová L.**, Link M., Loiodice M., Rochu D., Renault F., Masson P., Nachon F.: Preparation of Methoxy Polyethylene Glycol-Conjugated Phosphotriesterase as a Potential Catalytic Bioscavenger against Organophosphate Poisoning. *10th International Meeting on Cholinesterases, Šibenik, Chorvatsko*. Book of Abstracts (2009)

**Musilová L.**, Jun D., Kuča K., Pohanka M., Katalinić M., Kovarik Z.: *In Vitro* Ability of Currently Available Oximes to Reactivate Pesticide-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *10th International Meeting on Cholinesterases, Šibenik, Chorvatsko*. Book of Abstracts (2009)

**Musilová L.**, Jun D., Kuča K., Pohanka M., Katalinić M., Kovarik Z.: Development of New Antidotes of Organophosphate Intoxications: Oxime-Assisted Reactivation of Dimethoxy- and Diethoxy-Phosphorylated Human Butyrylcholinesterase for Construction of "Pseudo Catalytic" Bioscavengers. *EUROTOX 2009, Drážďany, Německo*. Toxicology Letters 189S; doi:10.1016/j.toxlet.2009.06.561

Jun D., **Musilova L.**, Kuča K., Novotny L.: Commercially Available Antidotes of Organophosphate Poisonings (Pralidoxime, Obidoxime, Methoxime, Trimedoxime and HI-6) and Newly Developed Oxime K027 as Reactivators of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Selected Organophosphate Pesticides. *EUROTOX 2009, Drážďany, Německo*. Toxicology Letters 189S; doi:10.1016/j.toxlet.2009.06.562

Jun D., **Musilová L.**, Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Optimization of Conditions for Preparation of PEG-Conjugated Phosphotriesterase. *7th Symposium on CBRNE Threats, Jyväskylä, Finsko*. Symposium Proceedings (2009)

**Musilová L.**, Jun D., Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Příprava nových enzymových scavengerů jako profylaktik otrav organofosfáty: modifikace fosfotriestery a acetylcholinestery biokompatibilními polymery. *Studentská vědecká konference, Faf UK, Hradec Králové*. Sborník abstraktů (2008)

**Musilová L.**, Jun D., Kuča K.: Potency of five currently used oximes to reactivate organophosphate pesticide inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. *Chemical and Biological Defense Physical Science and Technology Conference, New Orleans, USA*. Book of Abstracts (2008)

Jun D., **Musilová L.**, Kuča K., Pohanka M.: Potency of several structurally different oxime reactivators to reactivate human acetylcholinesterase inhibited by pesticide methamidophos in vitro. *Chemical and Biological Defence Physical Science and Technology Conference, New Orleans, USA*. Book of Abstracts (2008)

Jun D., **Musilová L.**, Nachon F., Rochu D., Renault F., Masson P.: Preparation of Polyethylene Glycol-Conjugated Phosphotriesterase and Study of Its Thermal Stability. *Medical Chemical Defense Bioscience Review, Hunt Valley, Maryland, USA*. Abstract Book (2008)

Jun D., **Musilová L.**, Kuča K.: Development of „Pseudo Catalytic“ Bioscavengers Based on Oxime-Assisted Reactivation of Human Butyrylcholinesterase as Antidotes of Organophosphate Intoxications. *TOXCON 2009, Brno. Interdisciplinary Toxicology*, 2, 109 (2009)

**Musilová L.**, Jun D., Kuča K., Musílek K., Kassa J., Bajgar J.: Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Leptophos-oxon with Different Oxime Reactivators In Vitro. *Spiez, Švýcarsko. Book of Abstracts* (2008)

Jun D., **Musilová L.**, Lázenska H., Kuča K., Kassa J., Bajgar J.: Potency of Several Oximes to Reactivate Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon and Methyl-paraoxon in vitro. *The IXth International Meeting on Cholinesterases, Suzhou, Čína. Book of Abstracts* (2007)

**Musilová L.**, Jun D., Marek J., Kuča K., Musílek K., Jung Ys., Karasová J.: In vitro potency of several oximes to reactivate human erythrocyte blood acetylcholinesterase inhibited by diisopropyl fluorophosphate (DFP). *The 100th National Meeting of the Korean Chemical Society, Daegu, Korea. Book of Abstracts* (2007)

**Musilová L.**, Jun D., Kuča K., Musílek K., Karasová J.: Reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by diisopropyl fluorophosphate (DFP) in vitro by selected oximes. *Scientific Conference on Chemical and Biological Defense Research, Timonium, Maryland, USA. Book of Abstracts* (2007)