

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**



**Vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou nových modulátorů  
acetylcholinesterasy**

Disertační práce

Mgr. Markéta Komlóová

Obor: Farmaceutická chemie

Školitel: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Školitel – specialista: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Hradec Králové, 2012



Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracovávání čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.

Tato disertační práce vznikla za podpory Grantové agentury UK (117909/2009/B-CH/FaF) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR SVV-2012-265-001.

V Hradci Králové, 2012

.....  
Mgr. Markéta Komlóová



### Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům p. prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivé vedení v průběhu mého doktorského studia. Dalé bych chtěla poděkovat všem kolegům na katedře toxikologie FVZ UO za podporu a vytvoření přátelské atmosféry na pracovišti.



## Seznam zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
AChR	acetylcholinový receptor
Asp	aspartová kyselina
BChE	butyrylcholinesterasa
Glu	glutamová kyselina
HEB	hemato-encefalická bariéra
His	histidin
IAS	alfa anionické místo
Leu	leucin
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
MG	myasthenia gravis
nAChR	nikotinové acetylcholinové receptory
NPL	nervově paralytické látky
NS	nervový systém
OP	organofosforové sloučeniny
PAS	periferní anionické místo
Phe	fenylalanin
SAR	vztah mezi strukturou a účinkem
Ser	serin
SI	index selektivity, poměr $IC_{50}$ BCHE/ $IC_{50}$ AChE
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin





## OBSAH

<b>1</b>	<b>PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU POZNÁNÍ .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Acetylcholin .....</b>	<b>11</b>
1.1.1	Syntéza, uvolňování a rozklad ACh.....	11
1.1.2	Acetylcholinové receptory .....	12
<b>1.2</b>	<b>Cholinesterasy .....</b>	<b>15</b>
1.2.1	Acetylcholinesterasa .....	15
1.2.2	Butyrylcholinesterasa .....	17
<b>1.3</b>	<b>Inhibitory acetylcholinesterasy.....</b>	<b>19</b>
1.3.1	Ireverzibilní inhibitory AChE .....	19
1.3.2	Reverzibilní inhibitory AChE .....	27
<b>1.4</b>	<b>Myasthenia gravis .....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Příprava a testování periferně působících inhibitorů AChE jako potenciálních terapeutik myasthenia gravis .....</b>	<b>37</b>
3.1.1	Příprava a hodnocení bispyridinových inhibitorů AChE .....	37
3.1.2	Příprava a hodnocení bisochinolinových a bischinolinových inhibitorů AChE.....	39
3.1.3	Příprava nesymetrických inhibitorů AChE .....	41
<b>3.2</b>	<b>Příprava a testování vybraných periferních inhibitorů AChE jako profylaktik před zasažením NPL .....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Příprava a testování symetrických periferních inhibitorů AChE obsahujících but-2-enový spojovací řetězec .....	43
3.2.2	Příprava a testování periferních inhibitorů AChE s <i>terc</i> -butylovým substituentem.....	45
3.2.3	Testování účinnosti reversibilních inhibitorů AChE jako farmakologické pre-treatment u somanem intoxikovaných myší .....	47
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ ..</b>	<b>55</b>

<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>69</b>

# 1 Přehled současného stavu poznání

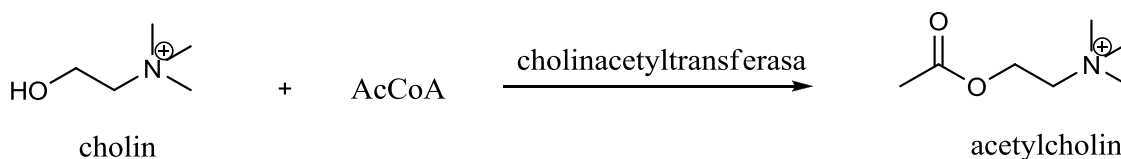
## 1.1 Acetylcholin

V roce 1914 izoloval sir Henry Hallett Dale z námele látku, která měla na orgány stejný účinek jako stimulace parasympatického nervového systému, a nazval ji acetylcholin (ACh). Jeho fyziologickou funkci a především jeho význam pro nervovou soustavu však objasnil až o něco později Otto Loewi, který zkoumal chemickou podstatu přenosu nervového impulzu. V roce 1936 pak společně získali za objev ACh a jeho funkce Nobelovu cenu za medicínu<sup>1-3</sup>.

ACh je neurotransmiter, účastní se přenosu nervového vzruchu v centrálním i periferním nervovém systému (NS). Ve vegetativním periferním NS působí jako mediátor v pregangliových vláknech sympatiku a parasympatiku a postgangliových vláknech parasympatiku. V somatickém periferním NS zprostředkovává přenos na nervosvalové plotence, čili v místě kde jsou inervovány příčně pruhované svaly.

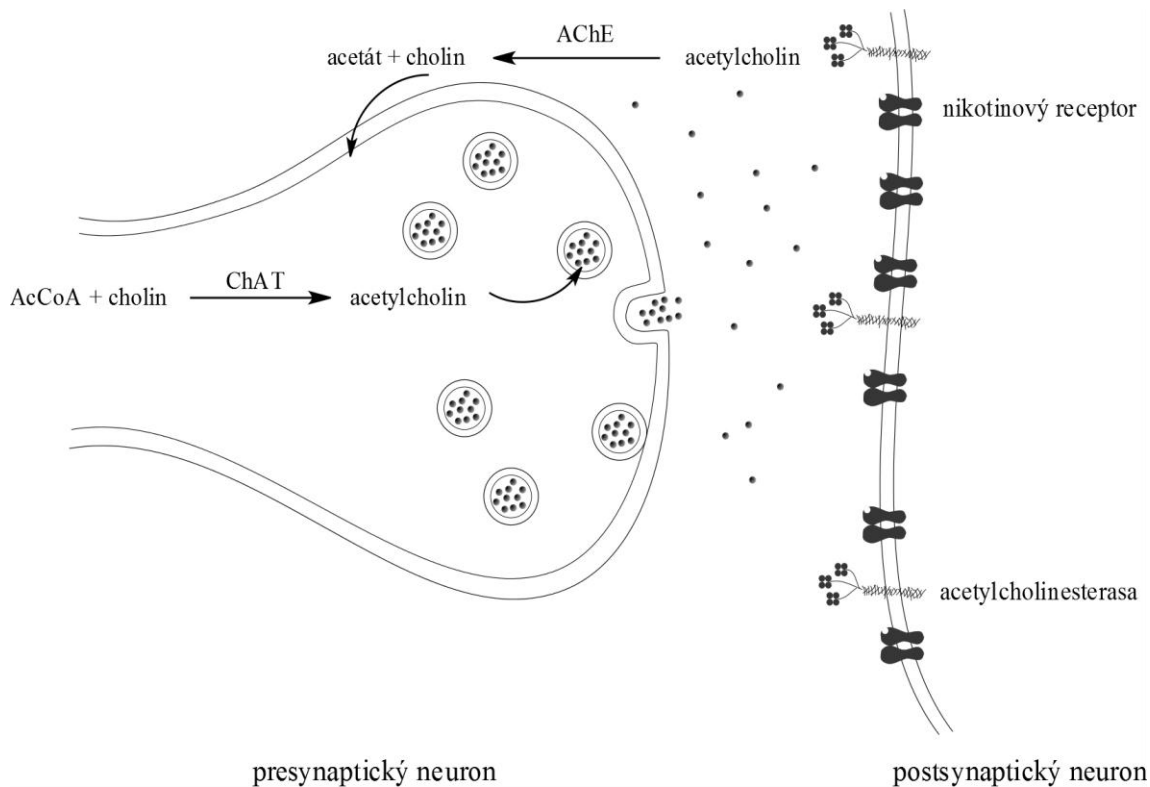
### 1.1.1 Syntéza, uvolňování a rozklad ACh

ACh je syntetizován v cytoplazmě neuronů z cholinu a acetyl-CoA pomocí enzymu cholin-O-acetyltransferasy (Obr. 1). Cholin je do neuronu přijímán z plazmy nebo ze synaptické štěrbině zpětným vychytáváním po rozložení ACh uvolněného nervovou stimulací.



**Obrázek 1** Schéma syntézy ACh pomocí cholinacetyltransferasy

V nervovém zakončení je ACh skladován ve vezikulách, které vlivem akčního potenciálu a následného vstupu kalciových iontů do buňky splývají s membránou presynaptického zakončení. Dochází k vylití ACh do synaptické štěrbině a je umožněno jeho působení na acetylcholinové receptory (AChR) postsynaptické membrány. Aby ACh působil jen požadovanou dobu a nedocházelo po jeho disociaci od receptoru k dalším interakcím s AChR, je velmi rychle rozkládán enzymem acetylcholinesterasou (AChE) na kyselinu octovou a cholin, vracející se zpět do presynaptického neuronu jako prekurzor pro syntézu nové molekuly ACh<sup>4</sup> (Obr. 2).



**Obrázek 2** Schéma cholinerní synapse (upraveno podle Lincova, D. et al.<sup>5</sup>)

### 1.1.2 Acetylcholinové receptory

Schopnost ACh vyvolávat v organismu širokou škálu odpovědí je dána heterogenitou acetylcholinových receptorů. Rozlišujeme je na dva základní typy: muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR), pojmenované podle svých selektivních agonistů muskarinu a nikotinu (Obr. 3). Nacházejí se na postsynaptické části nervového spojení, kde jejich stimulace vyvolává cholinerní odpověď. Některé typy těchto receptorů však můžeme nalézt i na presynaptickém neuronu, kde slouží k autoregulačně. Strukturou se od sebe mAChR a nAChR výrazně liší. nAChR tvoří transmembránové iontové kanály a jejich stimulace vyvolá rychlou excitační odpověď. mAChR patří do skupiny metabotropních receptorů spřažených s G-regulačním proteinem. Odpověď na stimulaci mAChR může být excitační i inhibiční, ve srovnání s ionotropními receptory však pomalejší. Oba typy receptorů hrají důležitou roli jak v centrálním tak periferním NS.



**Obrázek 3** Struktury selektivních agonistů nikotinových a muskarinových receptorů (chemické struktury podle The Merck Index<sup>6</sup>)

## Muskarinové receptory

Pomocí selektivních antagonistů bylo postupně nalezeno pět typů muskarinových receptorů ( $M_1$ - $M_5$ ), lišících se navzájem lokalizací a odpovědí, kterou vyvolává jejich stimulace<sup>7</sup>.

Metabotropní receptory, jejichž funkce je spojena s činností tzv. G-regulačních proteinů, jsou jedním z nejčastěji se vyskytujících typů receptorů u savců. Přestože mohou jednotliví zástupci metabotropních receptorů plnit v organismu různé úlohy, být aktivovány různými, mnohdy strukturně velice odlišnými ligandy, a zprostředkovávat množství různých odpovědí, je jejich struktura do značné míry podobná<sup>8, 9</sup>. Tvoří je sedm transmembránových částí, propojených intracelulárními a extracelulárními smyčkami. Na extracelulární doméně se nachází vazebné místo pro ligand, intracelulární doména je odpovědná za interakci s G-proteinem<sup>10</sup>. G-protein je tvořen třemi podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Podjednotka  $\alpha$  je největší a charakterizuje celý G-protein. Právě variabilita podjednotky  $\alpha$  určuje různé typy G-proteinů, které lze rozdělit na čtyři základní podskupiny podle struktury a funkce ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  a  $G_{12/13}$ ). G protein slouží k aktivaci druhých posílů a je tedy spojovacím článkem mezi receptorem v membráně a efektorovým proteinem uvnitř buňky, který je zodpovědný za vlastní odpověď buňky na aktivaci receptoru<sup>11</sup>.

mAChR patří do rodiny metabotropních receptorů. Podtypy  $M_1$ ,  $M_3$  a  $M_5$  jsou spřaženy s  $G_q$  proteinem a zprostředkovávají přes aktivaci druhého posla – fosfolipázu C excitační odpověď.  $M_2$  a  $M_4$  zajišťují přes  $G_i$  protein inhibiční odpověď potlačením aktivity adenylátcyklázy<sup>12</sup>.

Lokalizace jednotlivých podtypů M receptorů, společně s jejich hlavními agonisty a antagonisty a reakcí, kterou v organismu vyvolávají, je shrnuta v tabulce (Tab. 1).

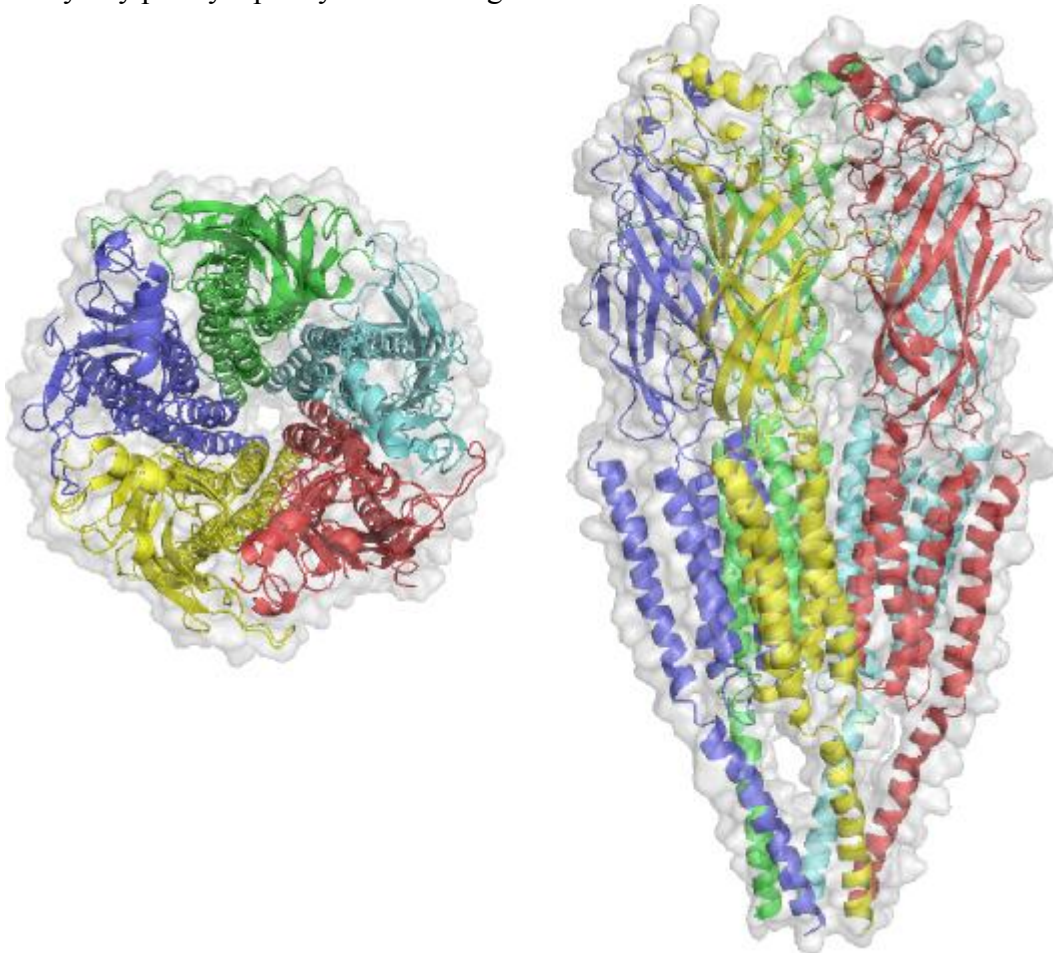
typ receptoru	lokalizace	funkce	agonisté	antagonisté
$M_1$	exokrinní žlázy, CNS, parietální buňky v žaludku	sekrece žaludeční HCl, salivace, paměť	ACh oxotremorin muskarin vedaklidin milamelin	atropin oxybutynin ipratropium olanzapin
$M_2$	srdce	útlum srdeční činnosti	betanechol	dimetinden vedaklidin aklidinium bromid
$M_3$	hladká svalovina, endokrinní a exokrinní žlázy plicí CNS	konstrikce hladké svaloviny (bronchokonstrikce) sekrece žláz akomodace vasodilatace indukce zvracení	ACh betanechol oxotremorin pilocarpin	atropin alvamelin ipratropium tiotropium tolterodin vedaklidin aklidinium bromid
$M_4$	CNS		ACh karbachol oxotremorin vedaklidin	himbacin tropikamid
$M_5$	CNS		ACh karbachol oxotremorin	milamelin sabkomelin vedaklidin

**Tabulka 1** Přehled lokalizace, funkce, agonistů a antagonistů jednotlivých typů muskarinových receptorů<sup>5, 13-15</sup>

### Nikotinové receptory

Nikotinové receptory rozdělujeme podle lokalizace na neuronální ( $N_N$  receptory) a muskulární ( $N_M$  receptory). Neuronální receptory se nacházejí na postsynaptické membráně vegetativních ganglií a v centrálním NS, kde se účastní kognitivních procesů, jako je učení, paměť, pozornost a stav vědomí. Muskulární jsou receptory lokalizované na postsynaptické membráně neurosvalové ploténky.

nAChR jsou tzv. ionotropní receptory. Jejich makromolekula vytváří plazmatickou membránou procházející kanál, který je specificky propustný pro  $Na^+$  a  $K^+$  ionty. Strukturně se jedná o glykoproteiny složené z pěti podjednotek, uspořádaných do kruhu kolem centrálního póru<sup>16</sup>. Je známo pět základních typů podjednotek:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ . Svou stavbou si jsou podobné; tvoří je intracelulární část, čtyři transmembránové domény a větší extracelulární část. Pentamer nAChR (Obr. 4) obsahuje vždy alespoň dvě podjednotky  $\alpha$  a minimálně dvě vazebná místa pro ACh, nacházející se na rozhraní mezi  $\alpha$  a sousední podjednotkou<sup>17</sup>. Ionový kanál je v klidovém stavu zavřený a otevírá se až po obsazení všech vazebných míst pro ACh. Otevřeným kanálem proudí do buňky  $Na^+$  ionty, které vyvolávají depolarizaci, a vzniká tak rychlý postsynaptický excitační signál.



**Obrázek 4** Struktura pentametu nikotinového receptoru (PDB kód 2BG9, obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer<sup>18</sup>)

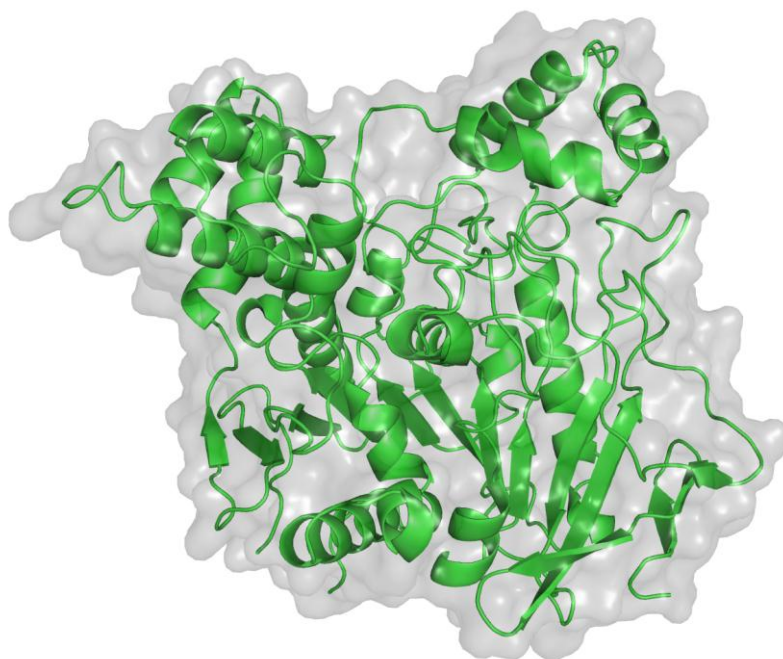
## 1.2 Cholinesterasy

Cholinesterasy jsou serinové hydrolasy, katalyzující hydrolýzu esterů, především pak esterů kvartérního alkoholu cholinu. Do této skupiny patří dva hlavní zástupci: acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7.) a butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8.), které se od sebe částečně liší strukturou, funkcí, lokalizací a afinitou k různým substrátům a modulátorům jejich aktivity<sup>19</sup>.

### 1.2.1 Acetylcholinesterasa

Hlavním substrátem AChE je acetylcholin, k němuž se také vyznačuje největší afinitou. Právě rychlý rozklad ACh na cholin a kyselinu octovou a tudíž ukončení jeho působení v cholinergních synapsích je hlavní funkcí AChE v organismu. Jelikož je AChE zodpovědná za terminaci cholinergní transmise, jsou kladeny vysoké nároky na její aktivitu. Uvádí se, že je to jeden z nejvýkonnějších enzymů, s číslem obratu  $7.4 \times 10^5$  molekul ACh/min<sup>20, 21</sup>. Vyskytuje se v zakončeních cholinergních neuronů, dále pak na membráně erytrocytů, ve slinivce a plicích.

Struktura AChE byla po dlouhou dobu předmětem rozsáhlých studií a je již poměrně podrobně popsána. Obsahuje doménu charakteristickou pro tzv.  $\alpha/\beta$  hydrolasy, která se vyskytuje u velkého množství hydrolytických enzymů. Skládá se z centrálních  $\beta$ -listů spojených pomocí  $\alpha$ -helixů (Obr. 5). Pro tyto enzymy je také typické složení katalytického místa, obecně tvořeného katalytickou triádou nukleofil-histidin-kyselina<sup>22, 23</sup>.



**Obrázek 5** Lidská acetylcholinesterasa (PDB kód 1B41, obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer<sup>18</sup>)

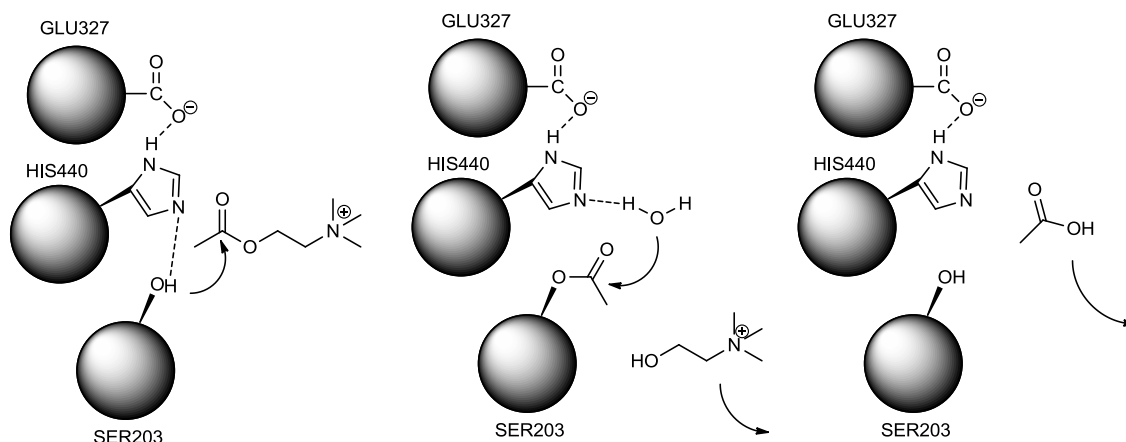
Aktivní místo enzymu se nachází na dně 20Å hluboké pod povrch enzymu zasahující prohlubně. Tvoří ho tzv **esteratické místo** s aminokyselinami katalytické triády Ser – His – Glu. Při rozkladu ACh podléhá po aktivaci protonem nukleofilní serin acylaci. Poblíž esteratického místa se nachází  **$\alpha$ -anionické místo** (IAS), tvořené aromatickými aminokyselinami Trp, Phe a Tyr. Vlivem interakce mezi kladně nabitým dusíkem cholinu a anionickým místem je umožněna optimální orientace molekuly ACh směrem k esteratickému místu<sup>24</sup>. Další významnou oblastí je tzv. **periferní anionické místo** (PAS,  $\beta$ -anionické místo). Nachází se na povrchu enzymu poblíž vstupu do

aktivní prohlubně a jako takové je výborným cílem pro případné modulatory aktivity enzymu. Tvoří ho aminokyseliny Tyr, Trp a Asp<sup>25</sup>.

U obratlovců se AChE vyskytuje v různých molekulárních formách, lišících se kvartérní strukturou, rozpustností a také způsobem ukotvení na membránu buněk<sup>26</sup>. Předpokládá se, že variabilita typů AChE a jejich rozdílná distribuce v organismu je důsledkem odlišných nároků jednotlivých tkání a synapsí na funkci enzymu<sup>27</sup>. Katalytická doména je shodná pro všechny typy AChE a pouze podle různých C-koncových peptidů je rozlišujeme na tři základní typy. **AChE-R** (readthrough) tvoří rozpustnou monomerní formu a vyskytuje se u savců pouze v malé míře. **AChE-H** (hydrofobic) tvoří dimery kotvené glykofosfatidylinositolem k plazmatické membráně krevních buněk. Nejrozšířenějším typem AChE v cholinergní tkáni je **AChE-T** (tailed), exprimovaná v mozkových a svalových buňkách dospělých savců<sup>28</sup>. AChE-T vytváří širokou škálu forem s odlišnou kvartérní strukturou, přes homomerní oligomery (tzv. globulární forma, označovaná<sup>29</sup> pokud jde o monomery G<sub>1</sub>, dimery G<sub>2</sub> a tetramery G<sub>4</sub>, k hetero-oligomerním formám, vznikajícím asociací s tzv. kotvícími proteiny. Asymetrické formy AChE-T jsou tvořeny jedním, dvěma nebo třemi tetrametry katalytických podjednotek (označované podle Bona et al.<sup>29</sup> A<sub>4</sub>, A<sub>8</sub> a A<sub>12</sub>) spojenými disulfidickými můstky s trojitým helixem kolagenového vlákna. Tyto formy se vyskytují v tzv. basální lamině v extracelulárním matrix nervosvalové ploténky<sup>30</sup>. Asociací tetrameru globulární formy AChE s 20kDa hydrofobním proteinem (tzv. PRiMA, Proline Rich Membrane Anchor) vzniká další typ heterooligomerních AChE-T, který se vyskytuje v mozku a svalech savců. PRiMA protein udržuje jednotlivé podjednotky tetrameru AChE pohromadě a zároveň slouží jako kotva, upevňující AChE do membrány neuronu či svalové buňky<sup>31</sup>.

### Hydrolyza ACh

Při katalytickém rozkladu ACh hraje zásadní roli aminokyselina katalytické triády serin v esteratickém místě kavity AChE. Serinový hydroxyl je aktivován vodíkovou vazbou s imidazolovým dusíkem histidinu, další aminokyseliny katalytické triády. Karbonylový uhlík ACh podléhá nukleofilnímu ataku aktivovaným hydroxylem, odstupující skupinou je cholin a enzym zůstává na krátkou dobu acetylován. Vzniklá kovalentní vazba je však velmi rychle hydrolyzována za obnovení katalytického místa<sup>32</sup> (Obr. 6).



**Obrázek 6** Schéma hydrolyzy ACh pomocí katalytické triády v aktivním místě enzymu

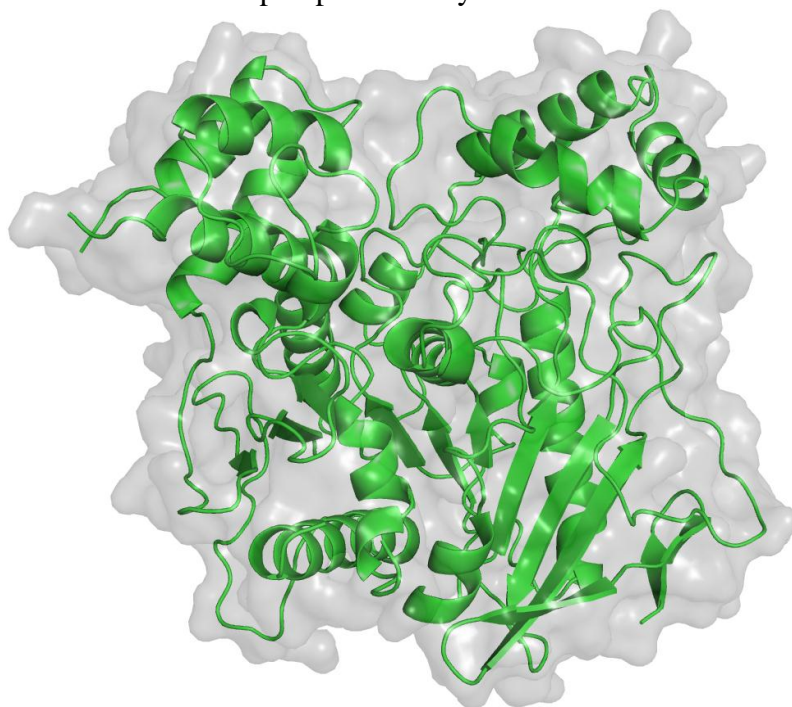


## 1.2.2 Butyrylcholinesterasa

Dalším zástupcem ze skupiny cholinesteras je butyrylcholinesterasa (Obr. 7), nazývaná tak kvůli své vysoké aktivitě vůči butyrylcholinu<sup>33</sup>. Bývá též označována jako plazmatická cholinesterasa, podle toho, že má u lidí v plazmě vyšší aktivitu než AChE<sup>19</sup>, či nespecifická, podle toho, že má proti AChE poměrně širokou substrátovou specifitu.

BChE se vyskytuje společně s AChE v nervových synapsích. Při poruchách funkce AChE, nebo jejím dočasném vyřazení z činnosti vlivem některých toxických látek, je schopna do určité míry nahradit její působení<sup>34</sup>. Dále se pak nachází v játrech, střevech, srdci, ledvinách, plicích a plazmě<sup>35, 36</sup>. Plazmatická BChE je syntetizována v játrech a odtud je uvolňována do plazmy. Hlavní funkce BChE v organismu není dosud plně objasněna. Působí však jako významný plazmatický scavenger některých exogenních látek (kyselina acetylsalicylová<sup>37</sup>, succinylcholin<sup>38</sup>, kokain<sup>39</sup>, prokain<sup>40</sup>, organofosfáty<sup>41</sup>). Její farmakologický a toxikologický význam je v posledních letech předmětem zájmu především v souvislosti s možným profylaktickým využitím před otravou organofosforovými sloučeninami<sup>42</sup>.

Schopnost BChE katalyzovat hydrolyzu velkého množství různých substrátů vychází částečně z její struktury. Uvádí se, že s AChE vykazuje 54% podobnost v sekvenci aminokyselin<sup>43</sup>. Podobně jako AChE se vyskytuje nejčastěji ve své tetramerní formě a její aktivní místo, složené z katalytické triády, je na dně prohlubně, zasahující jako u AChE hluboko pod povrch enzymu.

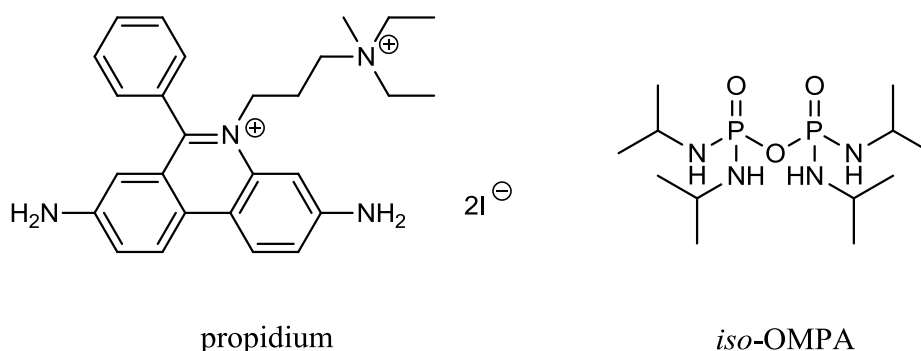


**Obrázek 7** Lidská butyrylcholinesterasa (PDB kód 1POM, obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer<sup>18</sup>)

Od AChE se však odlišuje distribucí aminokyselin v kavitě enzymu. Některé aromatické aminokyseliny typické pro AChE jsou ve struktuře BChE nahrazeny alifatickými a aktivní místo je tudíž přístupné i pro objemné substráty. Například za vazbu pro BChE selektivního inhibitoru *iso*-OMPA (Obr. 8) (tetra-isopropylpyrofosforamid) jsou zřejmě odpovědná residua aminokyselin valinu a leucinu. Na stejných pozicích jsou v případě AChE residua aminokyseliny

fenylalaninu, která znemožňují interakci objemnějšího inhibitoru a *iso*-OMPA AChE neinhibuje<sup>44</sup>. Aromatické aminokyseliny vyskytující se u AChE při vstupu do katalytické prohlubně a tvořící PAS, jsou ve struktuře BChE také zčásti nahrazeny alifatickými. To má za následek, že k inhibitorům interagujícím s AChE právě přes toto místo (propidium, Obr. 8 či huperzin A, Obr. 20), je BChE resistantní a jsou tedy selektivními inhibitory AChE<sup>45</sup>.

Další významnou odlišností BChE a AChE je jejich chování v přebytku ACh. Zatímco AChE je přebytkem substrátu inhibována, BChE se ve vysokých koncentracích ACh aktivuje<sup>46</sup>. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je absence PAS u BChE. Inhibice přebytkem substrátu u AChE může být zřejmě důsledkem interakce molekuly ACh na PAS a sterického zabránění dalším molekulám ACh pronikat do úzké kavity enzymu, kde dochází k samotnému rozkladu substrátu<sup>47</sup>.



**Obrázek 8** Struktury selektivních inhibitorů cholinesteras<sup>6</sup>

### 1.3 Inhibitory acetylcholinesterasy

Velké množství přirozeně v přírodě se vyskytujících i uměle připravených látek má schopnost působit jako inhibitory AChE (AChEI). Inhibice účinku AChE vede ke zpomalení rozkladu a hromadění ACh v místech jeho působení. Tento proces má význam jak farmakologický, tak toxikologický.

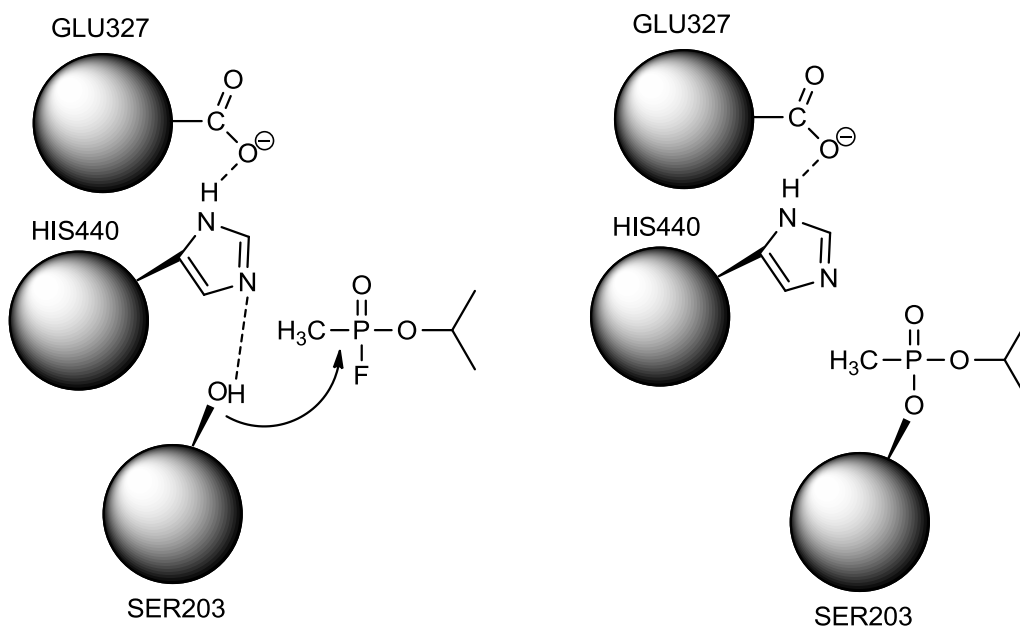
Podle délky působení lze AChEI rozdělit na reverzibilní a ireverzibilní a podle způsobu interakce s enzymem na acylující, tvořící kovalentní vazbu se serinem v esteratické části aktivního místa (organofosfáty, karbamáty, alkylsulfonáty) a neacylující, interagující nekovalentně s anionickými místy v kavitě enzymu pomocí elektrostatických sil (amoniové soli, kumarinové sloučeniny, takrin)<sup>32, 48</sup>.

Látky, které inhibují AChE ireverzibilně, jsou pro živý organismus toxické. Ve většině případů se jedná o organické sloučeniny fosforu (organofosfáty, OP), používané např. v zemědělství jako pesticidy, ale také zneužívané jako bojové chemické látky.

Mezi reverzibilní inhibitory AChE patří významná léčiva řady nemocí, které jsou důsledkem narušené cholinergní transmise. Patří mezi ně Alzheimerova choroba, pooperační atonie GIT a močového měchýře, glaukom a v neposlední řadě také svalové onemocnění myasthenia gravis. Dále se používají např. k ukončení působení kompetitivních myorelaxancií po celkové anestezii a předmětem zájmu je také jejich využití jako profylaktik před vystavením organismu působení ireverzibilních inhibitorů<sup>49</sup>.

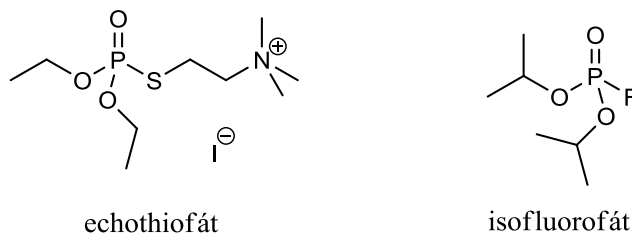
#### 1.3.1 Ireverzibilní inhibitory AChE

Organofosforové sloučeniny (OP) jsou zástupci ireverzibilních inhibitorů AChE. Nejčastěji se jedná o organické sloučeniny kyseliny fosforečné, fosfonové a jejich sírná analoga. Obsahují ve své struktuře elektrondeficitní fosfor, schopný vytvářet stabilní kovalentní vazbu se serinem v aktivním místě enzymu (Obr. 9). Hydrolýza této vazby pak probíhá velmi pomalu (řádově ve stovkách hodin) nebo neprobíhá vůbec a k obnově enzymu je zapotřebí syntézy *de novo*.



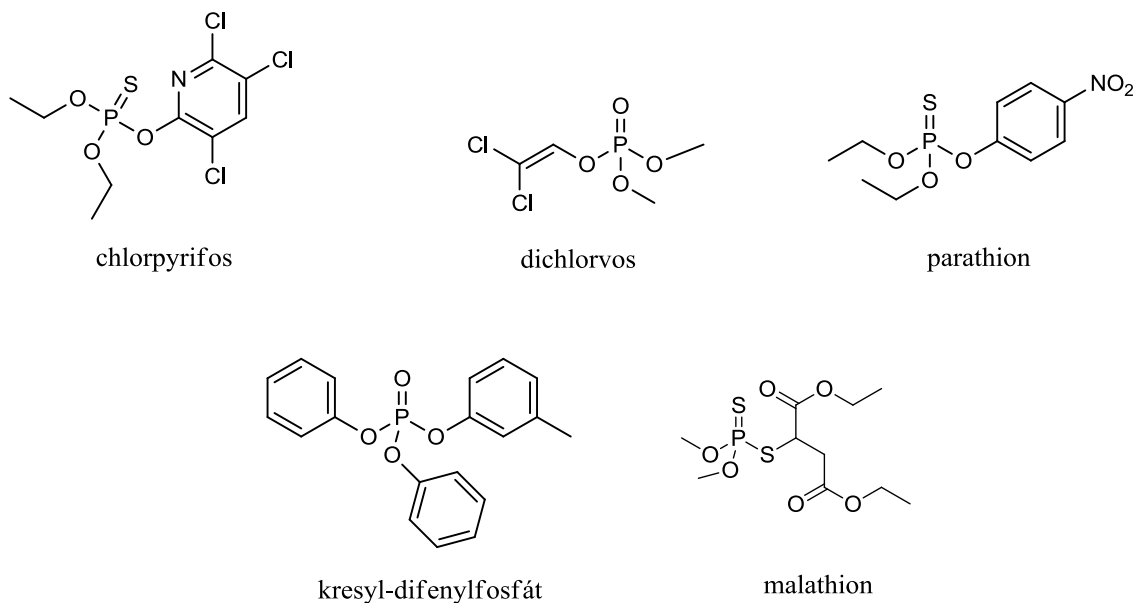
**Obrázek 9** Schéma reakce OP sloučeniny se serinem v aktivním esteratickém místě AChE

Sloučeniny OP struktury byly a omezeně ještě jsou používány v humánní či veterinární medicíně jako látky vyvolávající miózu a k terapii glaukomu (echothiofát jodid, isofluorofát, Obr. 10).



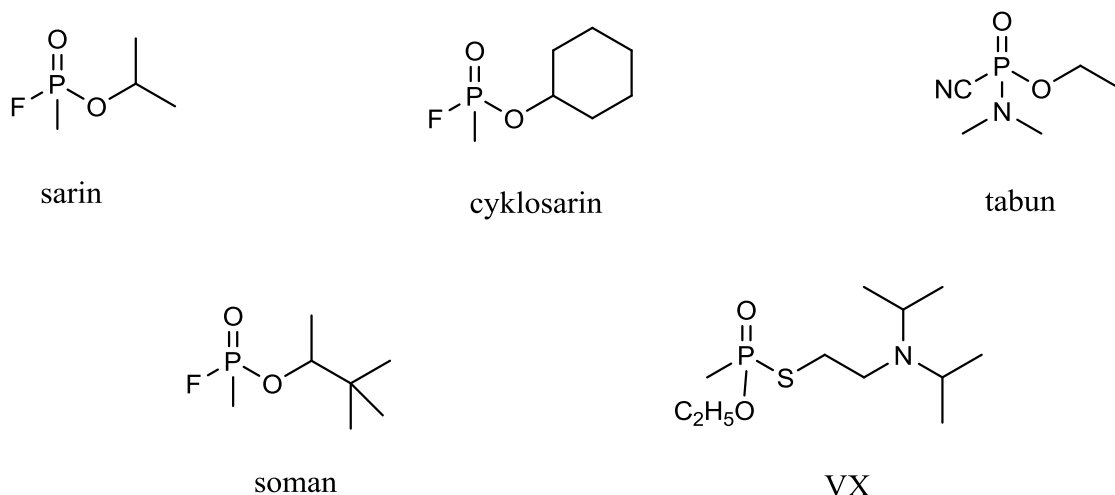
**Obrázek 10** Struktury organofosforových sloučenin dříve používaných v terapii glaukomu<sup>6</sup>

Dále jsou používány v zemědělství jako insekticidy a herbicidy (parathion, malathion, dichlorvos a chlorpyrifos, Obr. 11) a v průmyslu jako rozpouštědla, změkčovače a zpomalovače hoření (kresyl-difenylofosfát, Obr. 11)<sup>50</sup>. Otravy způsobené OP pesticidy jsou závažným problémem v rozvojových zemích. Uvádí se, že OP stojí za úmrtím až 200 tis. lidí ročně<sup>51</sup>.



**Obrázek 11** Struktury některých organofosforových pesticidů<sup>6</sup>

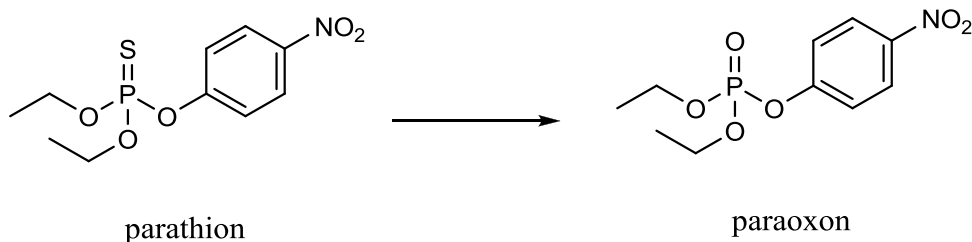
Díky své vysoké toxicitě jsou OP zneužívány jako bojové chemické látky (tzv. nervově paralytické látky, NPL). Zástupci NPL jsou sarin, soman, cyklosarin, tabun a VX<sup>49</sup> (Obr. 12).



**Obrázek 12** Struktury zástupců nervově paralytických plynů<sup>6</sup>

### Klinické příznaky otravy OP sloučeninami

OP sloučeniny jsou lipofilní látky s dobrým vstupem přes biologické bariéry, včetně HEB. V krvi jsou částečně vychytávány enzymy, např. plazmatickou BChE, a také inaktivovány biotransformačními enzymy<sup>52</sup>. Při procesu biotransformace však může docházet i k nežádoucím efektům. Příkladem je tzv. letální syntéza (Obr. 13), kdy vlivem oxidačních procesů vzniká ze sirného pesticidu parathion podstatně více toxický kyslíkatý derivát paraoxon<sup>53</sup>.



**Obrázek 13** Schéma letální syntézy

Intoxikace OP vede inhibicí AChE k nahromadění ACh v synaptické štěrbině, nadměrné stimulaci cholinergních receptorů a následně k jejich desenzibilizaci. Jelikož jsou zasaženy receptory vegetativního NS, neurosvalové ploténky a díky dobré prostupnosti OP sloučenin HEB i receptory v centrálním NS, projevuje se otrava centrálními a periferními muskarinovými a nikotinovými příznaky. Soubor symptomů plynoucích z nadměrné stimulace cholinergního systému se nazývá akutní cholinergní krize<sup>49</sup>.

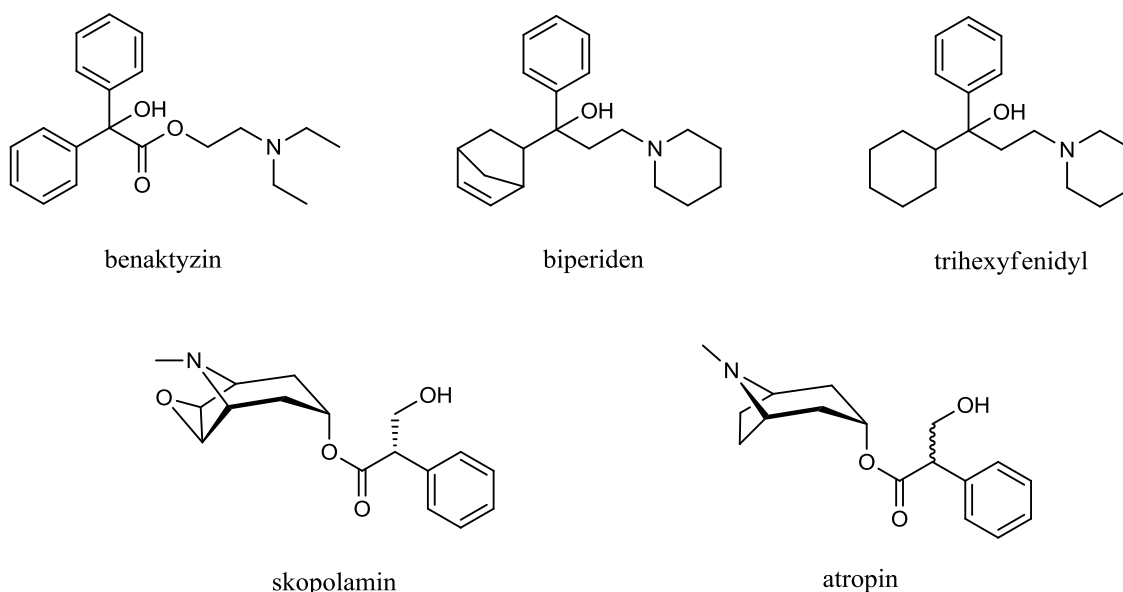
Nadměrná stimulace postgangliových mAChR vegetativního NS a současně gangliových nAChR má proti sobě působící odezvu. Zatímco aktivace nAChR se projevuje tachykardií, hypertenzí a mydriázou, při klinické manifestaci otravy většinou pozorujeme příznaky plynoucí z nadměrného dráždění mAChR - hypotenzi, bradykardii a miózu. Zároveň se objevuje bronchospasmus, zvýšená salivace, slzení, pocení a bronchiální sekrece. Centrálními příznaky otravy je zmatenost, úzkost, bolest hlavy, neklid, závrať, neřídka kóma a selhávání dýchacích a kardiovaskulárních center v prodloužené míše, což v kombinaci s bronchospasmem a ochablostí dýchacích svalů vlivem desenzibilizace nAChR na nervosvalové ploténce vede k vážnému ohrožení života<sup>54-56</sup>.

## Terapie akutních otrav OP sloučeninami

Pro záchranu člověka, vystaveného působení OP sloučenin, je důležitý především včasný a rychlý zásah ošetřujícího, který by měl v první řadě zamezit dalšímu kontaktu s noxou a zajistit základní životní funkce. Nejvíce ohroženo je dýchání, proto by měl být intoxikovanému poskytnut dostatečný přísun kyslíku. Ošetřující poskytující první pomoc by měl dbát na svou vlastní bezpečnost a chránit se před kontaktem s toxickou látkou. Některé příznaky intoxikace (zvracení, neasea) mohou být vyvolány kontaminací rozpouštědly, v kterých jsou OP sloučeniny rozpuštěny (xylen)<sup>57, 58</sup>.

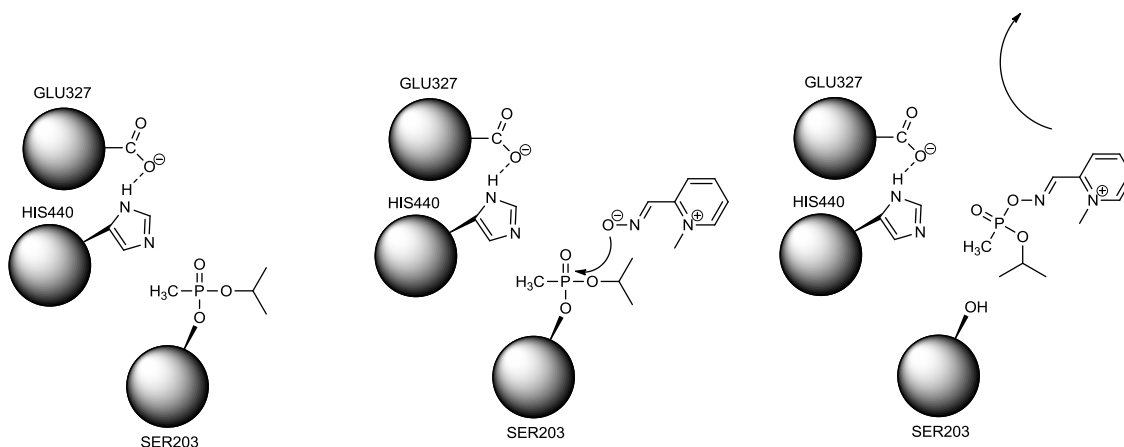
Při poskytování první pomoci je nutné co nejrychleji podat specifická antidota, která můžeme podle mechanismu účinku rozdělit na funkční a kauzální. Jako **funkční antidota** se označují antagonisté cholinergních receptorů. Obsazením receptorů zamezují anticholinergika jejich stimulaci nadbytečným ACh a zmírňují tak projevy cholinergní krize. Lékem volby ve světě je atropin (Obr. 14), podávaný i.m. či i.v. (popř. v infuzi, čímž se sníží kolísání koncentrace atropinu v plasmě<sup>59</sup> v dávce 1-3 mg podle závažnosti příznaků. V případě, že zasažený organismus nereaguje na podaný atropin, je nutné dávky opakovat až do stabilizace systolického krevního tlaku na minimální hodnotu 80 mmHg<sup>60</sup>. Přestože tolerance intoxikovaného organismu je vůči atropinu výrazně zvýšena, je nutno neustále monitorovat životní funkce, aby nedošlo k předávkování atropinem a rozvoji deliria<sup>61</sup>.

Atropin jen omezeně proniká přes HEB a je proto účinný především proti příznakům vzniklých stimulací periferních cholinergních receptorů. Další příklady anticholinergik, schopných pronikat přes HEB a působících tedy i proti centrálním příznakům jsou např. benaktyzin (používané i AČR), skopolamin, biperiden (Obr. 14).



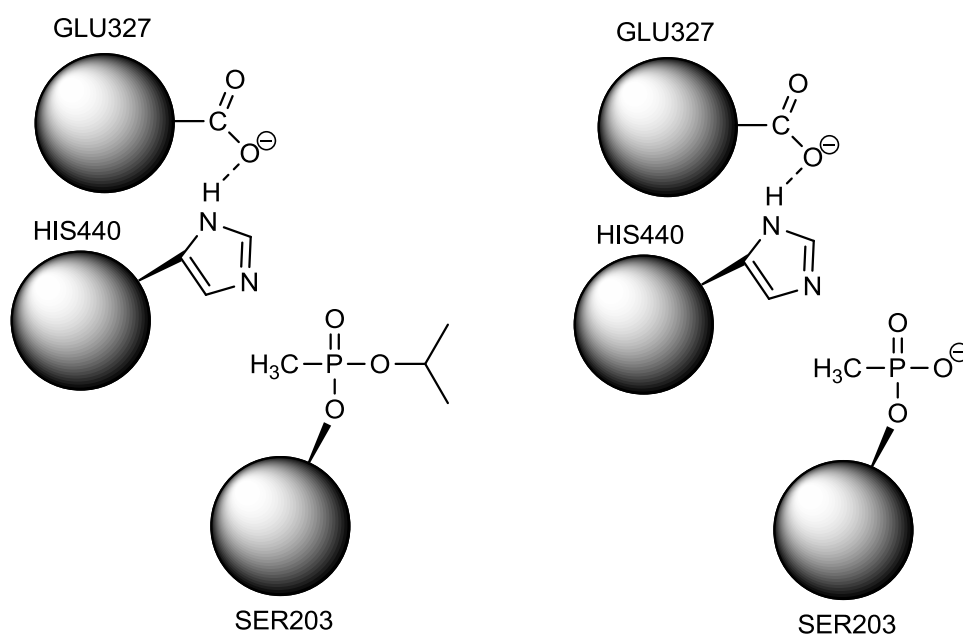
Obrázek 14 Struktura anticholinergních látek, používaných v terapii a profylaxi před zasažením NPL<sup>6</sup>

Další složku antidotní terapie tvoří reaktivátory AChE, označované jako tzv. **kauzální antidota**. Jsou to silně nukleofilní látky schopné obnovit funkci inhibované AChE. Reaktivátory obsahují ve své molekule jednu nebo dvě oximové skupiny, které tvoří ve fyziologickém pH odštěpením protonu oximátový anion. V této formě pak reagují s fosforem OP sloučeniny za uvolnění hydroxyly aktivního serinu<sup>62</sup> (Obr. 15).



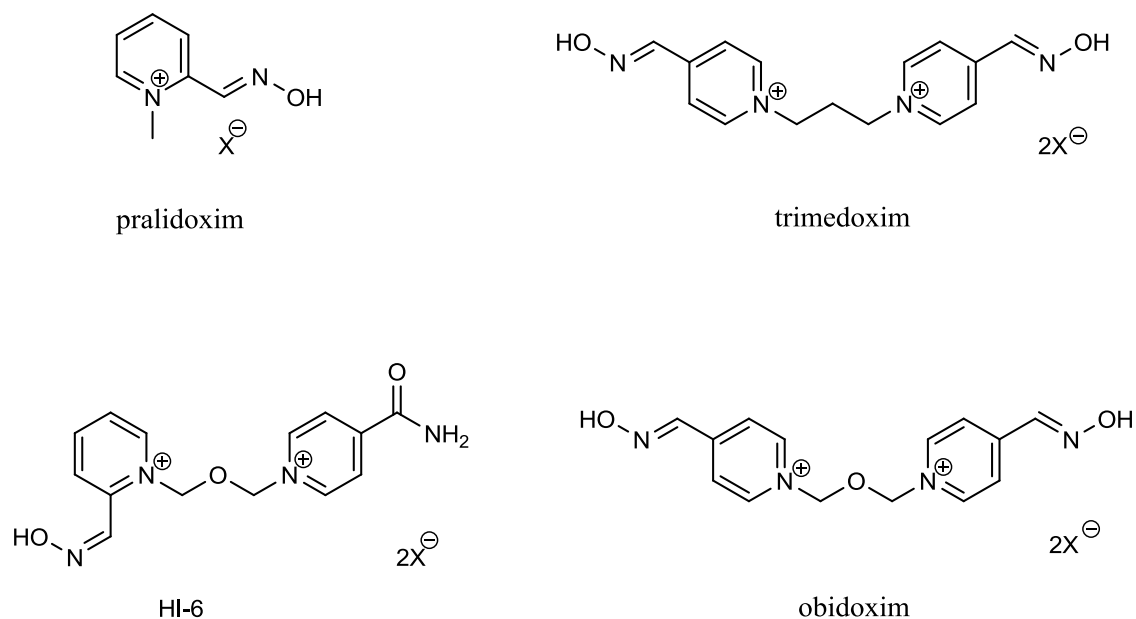
**Obrázek 15** Schéma reaktivace enzymu inhibovaného OP sloučeninou

Účinek reaktivátorů je do jisté míry limitován tzv. stárnutím (aging). Při něm dochází k dealkylaci fosforylové části komplexu enzym-inhibitor a stabilizaci tohoto komplexu interakcí s okolními aminokyselinami. Enzym se tak stává nereaktivovatelným<sup>63</sup> (Obr. 16). Rychlost stárnutí je závislá na struktuře OP. Nejrychleji procesu dealkylace podléhá AChE inhibovaná somanem.



**Obrázek 16** Schéma tzv. stárnutí komplexu enzym-inhibitor, OP sloučenina spontánně dealkyluje a částečný záporný náboj znemožňuje přístup reaktivátoru

Prvním připraveným reaktivátorem byl v polovině 50. let 20. stol. pralidoxim (označovaný 2-PAM, Obr. 17), vyvinutý Wilsonem et al.<sup>64</sup>. Dalšími příklady reaktivátorů jsou obidoxim, trimedoxim a HI-6 (používaná i AČR, Obr. 17). Nevýhodou všech v současnosti známých reaktivátorů je jejich nízká efektivita proti některým typům OP, nesnadný přístup přes HEB a rychlé vylučování z těla ledvinami<sup>65</sup>.



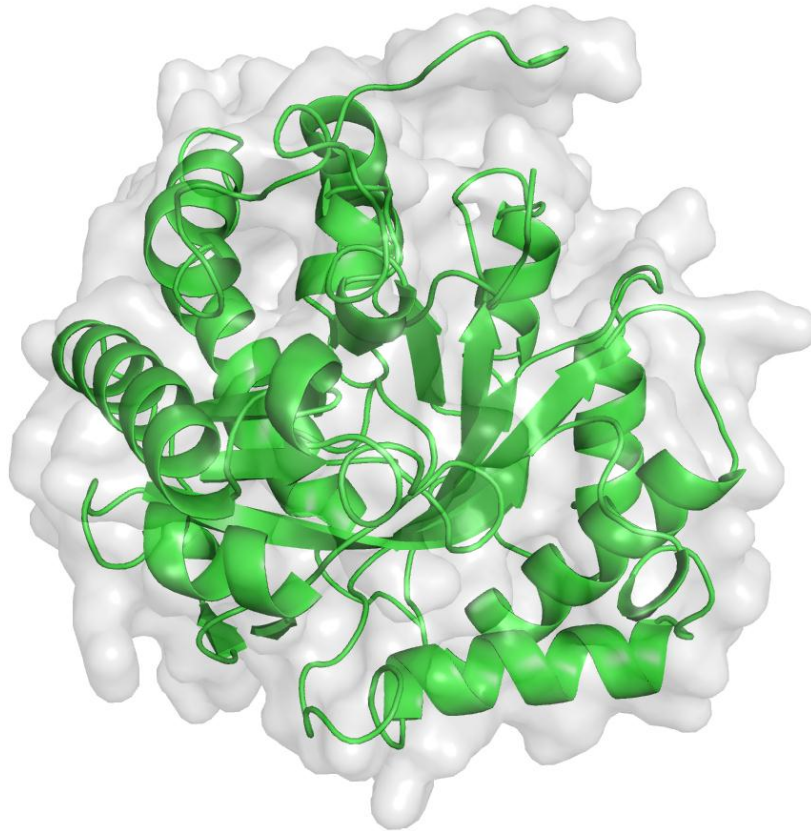
**Obrázek 17** Struktura zástupců reaktivátorů AChE<sup>6</sup>

Funkční a kauzální antidotní terapie bývá doplněna látkami s antikonvulzivním účinkem pro zabránění rozvoji generalizovaných tonicko-klonických křečí, vyskytujících se častěji u otrav NPL<sup>66</sup>. U pacientů intoxikovaných OP pesticidy dostatečně léčených oxygenoterapií se objevují křeče spíše výjimečně<sup>67</sup>. Lékem volby je diazepam v dávce 10 mg i.m. Současné podání antikonvulziva u pacientů zasažených NPL, kteří jsou léčeni periferně působícím anticholinergikem může mít vliv na snížení možnosti poškození některých struktur CNS<sup>68</sup>.

V současné době se výzkum zaměřuje nejen na vývoj účinnějších reaktivátorů se širším spektrem účinku, ale také na možnost využití enzymů jako součásti antidotní terapie nebo profylaxe před zasažením OP<sup>69</sup>. Jedná se o dva typy enzymů. Jedním jsou tzv. stechiometrické scavengery, které na svou molekulu vážou molekulu OP a tím ji vyřazují z oběhu. V popředí zájmu stojí především přirozená nebo geneticky upravená BChE, která by sloužila jako scavenger OP v plazmě<sup>70, 71</sup>. Inhibice BChE se klinicky nijak neprojeví, současně se ale snižuje nabídka OP pro inhibici AChE. Z praktického hlediska je však významné jen její využití coby profylaktika při hrozbě expozice organismu OP. Terapeutické využití jako antidota např. při pozření pesticidu je znevýhodněno faktem, že se BChE k OP váže stechiometricky a na dekontaminaci by bylo zapotřebí enormně velké množství enzymu<sup>72</sup>.

Druhým typem profylakticky působících enzymů jsou katalytické scavengery. Ve fázi výzkumu je využití rekombinantních bakteriálních fosfotriesteras (Obr. 18), paraoxonas a dalších hydrolas, schopných enzymaticky rozložit molekulu OP. Snížení hladiny OP v plazmě by vedlo k dalšímu zefektivnění následné standardní antidotní terapie<sup>73-76</sup>.



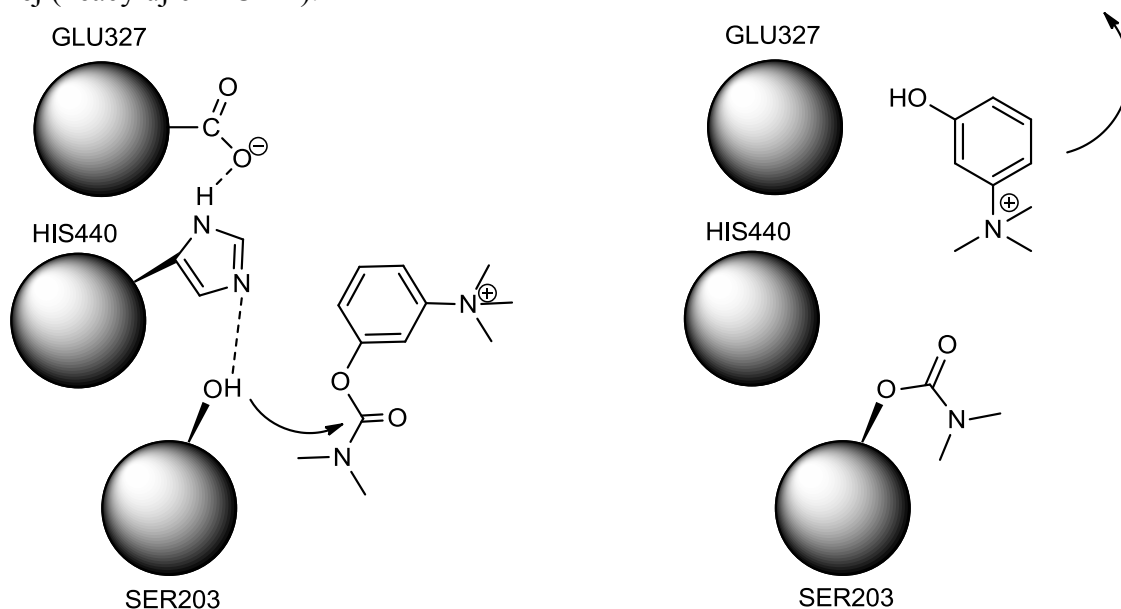


**Obrázek 18** Fosfotriesterasa (PDB kód 1PTA, obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer<sup>18</sup>)



### 1.3.2 Reverzibilní inhibitory AChE

Reverzibilní inhibitory mají schopnost tvořit kovalentní vazbu v aktivním místě enzymu (acylující AChEI, Obr. 19), která je však snadno hydrolyzovatelná, a snižují tedy aktivitu AChE pouze na omezený čas (desítky minut až hodin). Patří sem ale také sloučeniny, jejichž interakce s enzymem jsou nevazebné, založené na vzájemné přitažlivosti jejich molekuly k aminokyselinovým residuům v aktivním místě či mimo něj (neacylující AChEI).

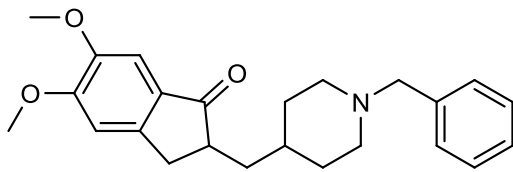


**Obrázek 19** Schéma inhibice AChE neostigminem

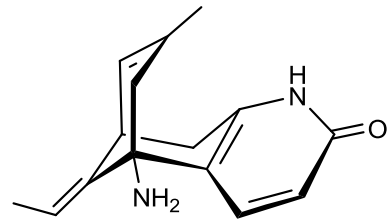
Strukturálně tvoří tyto látky skupinu poměrně různorodou. Látky s vyšší lipofilitou a tedy dobrou penetrací přes HEB působí na receptory v CNS. Zvýšení koncentrace ACh v cholinergních synapsích CNS se využívá při terapii Alzheimerovy choroby (AD), neurodegenerativního onemocnění, jehož prevalence neustále narůstá a které se v současné době stává závažným socioekonomickým problémem zejména ve vyspělých zemích. Zástupci této skupiny reverzibilních AChEI jsou donepezil, rivastigmin, galantamin a ve fázi klinického testování je také huperzin A (Obr. 20).

Terapeutické využití AChEI u AD vyplývá z poznatků, že přestože degenerativními procesy bývají při nemoci narušeny všechny mediátorové systémy v centrální NS, je to právě cholinergní přenos, který podléhá největším patologickým změnám<sup>77</sup>. K úbytku cholinergních neuronů se přidružuje snížená tvorba ACh, která je důsledkem nižší aktivity cholinacetyltransferasy, pozorované u pacientů s AD. Inhibicí AChE je tedy zajištěna vyšší koncentrace ACh v synapsi, což se klinicky projevuje zlepšením kognitivních funkcí pacienta<sup>78</sup>.

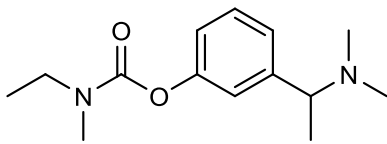
V současné době stojí v popředí zájmu také role BChE v rozvoji AD. Bylo totiž zjištěno, že zatímco s progresí choroby aktivita AChE klesá, BChE přebírá její dominantní úlohu v hydrolýze ACh a její aktivita narůstá<sup>77, 79, 80</sup>. BChE navíc zřejmě přispívá svou peptidázovou aktivitou k tvorbě neurotoxických beta-amyloidních proteinů, které se shlukují do beta-amyloidních plaků hromadících se v tkáni centrální NS pacientů<sup>81</sup>. Na základě těchto poznatků jsou do popředí stavěny především inhibitory působící neselektivně na AChE i BChE a současně probíhá intenzivní výzkum zabývající se inhibitory selektivními pro BChE<sup>82</sup>.



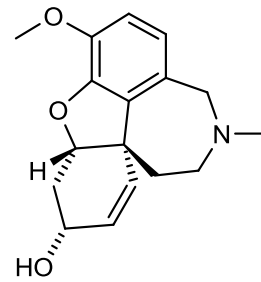
donepezil



huperzin



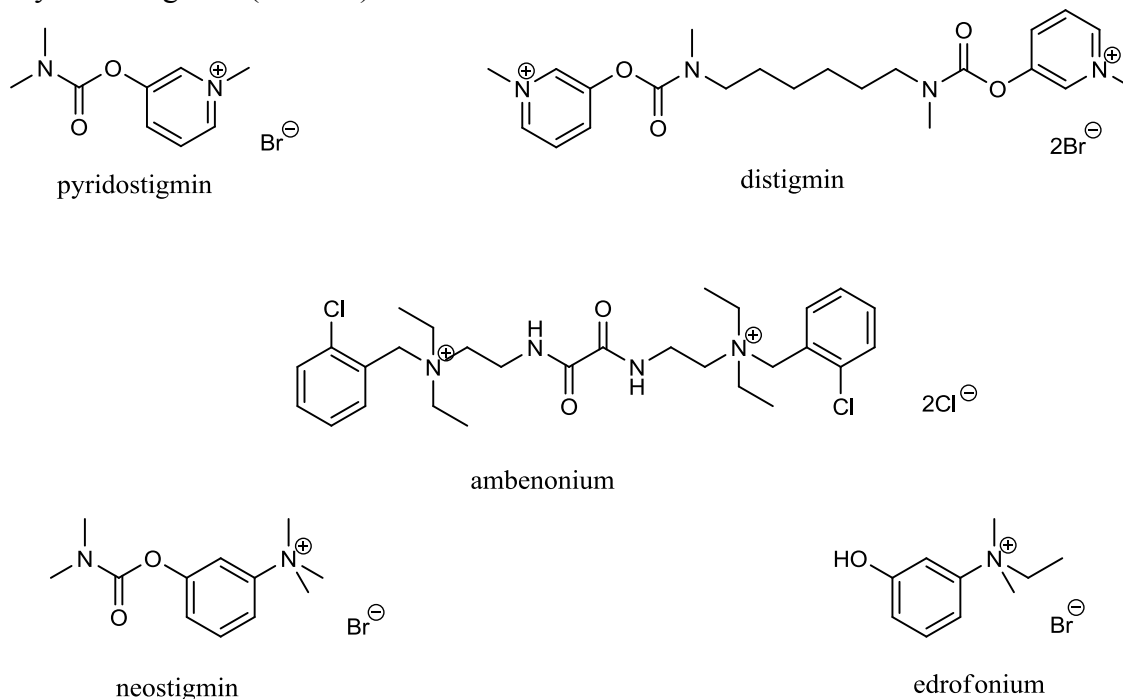
rivastigmin



galantamin

**Obrázek 20** Struktura centrálně působících reversibilních inhibitorů AChE<sup>6</sup>

Periferně působící AChEI obsahují ve své molekule kvartérní dusík, jež omezuje jejich schopnost pronikat HEB. Patří sem karbamátové inhibitory (pyridostigmin bromid, neostigmin bromid, distigmin dibromid, Obr. 21), kvartérní amoniové soli (ambenonium dichlorid, Obr. 21) a jednoduché alkoholy (edrophonium bromid, Obr. 21). Účinek periferních AChEI se projeví stimulací receptorů vegetativního NS (působí jako nepřímá parasymptomimetika) a na nervosvalové ploténce. Používají se k terapii či prevenci pooperačních atonií střev a močového měchýře. Významnou indikací je také svalové autoimunitní onemocnění myasthenia gravis (MG). Přípravou nových periferně účinných inhibitorů AChE jako potenciálních léčiv v terapii myasthenia gravis se zabývá praktická část této práce a proto je jim věnovaná samostatná kapitola nazvaná Myasthenia gravis (viz níže).



**Obrázek 21** Struktura periferně působících reversibilních inhibitorů AChE<sup>6</sup>

Jedním z dalších možných využití reverzibilních AChEI je jejich profylaktické podání před hrozícím zasažením ireverzibilními inhibitory. Jelikož zástupci OP sloučenin (NPL) jsou jedny z nejnebezpečnější chemických sloučenin připravených člověkem a jejich syntéza je poměrně snadná a nenákladná, je hrozba zneužití těchto látek poměrně vysoká. Současná antidotní terapie není univerzální a toxické působení některých OP sloučenin je nemožné zvrátit pomocí dostupných reaktivátorů. Jejich použití je komplikováno špatným průnikem přes HEB a také rychlým stárnutím fosforylované části enzymu. Proto je stále třeba hledat nové efektivní přístupy jak pro terapii po zasažení toxickou látkou, tak pro profylaxi před zasažením.

Indikace reverzibilních inhibitorů coby profylaktik, přesněji jako tzv. pre-treatment, je založena na předpokladu, že aktivní místo enzymu je reverzibilním inhibitorem obsazeno a tedy chráněno před působením ireverzibilního inhibitoru. Po čase pak dojde ke spontánnímu obnovení aktivity AChE. Mezitím by však měla být většina OP z těla eliminována pomocí vlastních eliminačních procesů, popř. externě podávaných scavengerů. Předpokládá se, že použití pre-treatment poslouží k zefektivnění následné antidotní terapie.

Možnost použití karbamátů v této indikaci je známa již od poloviny 50. let 20. stol.<sup>83, 84</sup>. Bylo provedeno množství *in vitro* a *in vivo* studií, v kterých byl sledován

protektivní účinek karbamových sloučenin na AChE při intoxikaci různými OP sloučeninami<sup>85, 86</sup>. Velmi účinný byl především pyridostigmin<sup>87</sup> a tato látka byla také některými armádami zavedena do praxe jako profylaktikum<sup>88</sup>. Pyridostigmin je však látka poměrně toxická a pro vyšší účinnost je zapotřebí vyšších dávek, což s sebou přináší riziko rozvoje nežádoucích účinků<sup>89</sup>. Navíc díky nízkému průniku přes HEB je schopen chránit pouze periferní AChE. OP jsou však sloučeniny značně lipofilní, snadno pronikající do centrální NS. Jako výhodná se v tomto případě ukázala kombinace pyridostigminu s anticholinergní látkou, popř. látkami, které by blokovaly účinek přebytku ACh přímo na receptorech a to jak periferních, tak centrálních. Profylaktická směs PANPAL obsahuje kromě pyridostigminu anticholinergika benaktyzin a trihexyfenidyl (Obr. 14), umožňující nejen zvýšení dávky pyridostigminu bez obav z výskytu nežádoucích účinků, ale zároveň blokující působení ACh v centrálním NS při průniku OP do organismu<sup>90-93</sup>.

Značná toxicita pyridostigminu a jeho špatná prostupnost přes HEB vede k hledání efektivnějších zástupců i mezi inhibitory s centrálním účinkem. Z doposud testovaných látek se jako nadějně profylaktikum centrální AChE jeví huperzin, jehož výhodou je dlouhotrvající efekt a nízká toxicita<sup>94</sup>.

## 1.4 Myasthenia gravis

Podrobná charakteristika nemoci, zahrnující etiopatogenezi, epidemiologii, symptomatologii, diagnostiku a terapii je obsahem rešeršní práce „Myasthenia gravis – současné terapeutické možnosti a nové trendy“, publikované v časopise Česká a Slovenská farmacie, a kapitoly v knize A Look into Myasthenia gravis, vydané nakladatelstvím InTech. V pracích jsou podrobně zaznamenány současné terapeutické přístupy s pozorností věnovanou použití reverzibilních inhibitorů AChE. Jsou součástí práce jako přílohy 8 a 9.

**Příloha 8: Komlóová, M.;** Musílek, K.; Kuča, K. Myasthenia gravis – současné terapeutické možnosti a nové trendy. *Česká a Slovenská Farmacie*, **2011**, 60, 47-53.

**Příloha 9:** Musílek, K.; **Komloova, M.;** Holas, O.; Horova, A.; Zdarova-Karasova, J.; Kuca, K. Myasthenia Gravis – Current Treatment Standards and Emerging Drugs, A Look into Myasthenia Gravis, Dr. Joseph A. Pruitt (Ed.), ISBN: 978-953-307-821-2, InTech **2012**.

Další rešeršní práce, která se zabývá vývojem nových periferních inhibitorů AChE, je obsahem přílohy 10. Jsou zde shrnuty výsledky některých výzkumných skupin, jejichž záměrem bylo obměnit struktury již známých a účinných inhibitorů s cílem získat sloučeniny s vyšší účinností a odhadnout vztahy mezi strukturou a účinkem.

**Příloha 10: Komloova, M.;** Musílek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors – Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, **2010**, 17, 1810-1824.





## 2 Cíl práce

Cílem práce je příprava periferně působících inhibitorů acetylcholinesterasy jako potenciálních léčiv v terapii myasthenia gravis. *In vitro* bude hodnocena jejich inhibiční účinnost vůči lidské AChE a BChE. Na základě získaných výsledků budou odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem. Sloučeniny s nejvyšší afinitou k AChE budou podrobeny dalším kinetickým testům pro určení typu inhibice a molekulově modelovacím studiím pro odhalení možných interakcí mezi inhibitorem a enzymem. Na vybraných látkách bude také *in vivo* stanovena jejich akutní toxicita a schopnost působit profylakticky před otravou ireverzibilním inhibitorem AChE. Dále bude hodnocen vliv těchto sloučenin na efektivitu následné antidotní terapie.



### 3 Komentář dosažených výsledků a jejich diskuze

V rámci praktické části této práce bylo připraveno šest sérií inhibitorů AChE, každá obsahující 18 - 20 látek. Strukturně se jedná o jednoduché biskvartérní sloučeniny, ve většině případů se symetrickou molekulou. Biskvartérní struktura byla volena pro zajištění periferního působení inhibitorů, jelikož byly jejich molekuly navrhovány za cílem získání nových účinných inhibitorů periferní AChE, vhodných pro léčbu myasthenia gravis či k nasazení jako pre-treatment při hrozbě intoxikace NPL. U těchto inhibitorů je zamezení pronikání do CNS vhodné pro zabránění rozvoje centrálních nežádoucích účinků. Pro snížení výskytu nežádoucích účinků je dále výhodou selektivní působení inhibitorů vůči AChE a minimální inhibice nespecifické BChE. Zachování aktivity BChE je navíc důležité při profylaxi před zasažením organismu NPL, neboť má schopnost působit jako scavenger, vázající na sebe molekuly toxického OP a vyřazující ho tak z oběhu. Tato selektivita je vyjádřena jako index selektivity (SI), což je poměr  $IC_{50}$  BChE/  $IC_{50}$  AChE.

Všechny nově připravené látky byly podrobeny *in vitro* testování inhibiční účinnosti proti lidské erytrocytální popř. rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE pomocí modifikované Ellmanovy metody<sup>95</sup>. Inhibiční aktivita byla vyjádřena jako  $IC_{50}$  a porovnávána se standardy, používanými běžně v klinické praxi (pyridostigmin bromid, neostigmin bromid, edrofonium bromid, ambenonium bromid a další). U sloučenin s nejvyšší inhibiční účinností byly dále provedeny kinetické testy pro zjištění typu inhibice a molekulově modelovací studie pro odhalení interakcí inhibitoru s aminokyselinovými residui v aktivních místech obou enzymů. Na základě *in vitro* a molekulově modelovacích studií byly sloučeniny dále hodnoceny z hlediska analýzy vztahu mezi strukturou a účinkem.

U tří nadějných inhibitorů byla navíc *in vivo* stanovena akutní toxicita a byly podrobeny testu profylaktické účinnosti proti zasažení organismu somanem. Dále byl u těchto látek sledován vliv na efektivitu antidotní terapie podané po expozici somanem.

Většina výsledků byla v průběhu studia publikována v tuzemských a zahraničních časopisech s impakt faktorem. Podkapitoly komentáře dosažených výsledků odpovídají jednotlivým sériím připravených látek; publikované výsledky jsou součástí konkrétních příloh.



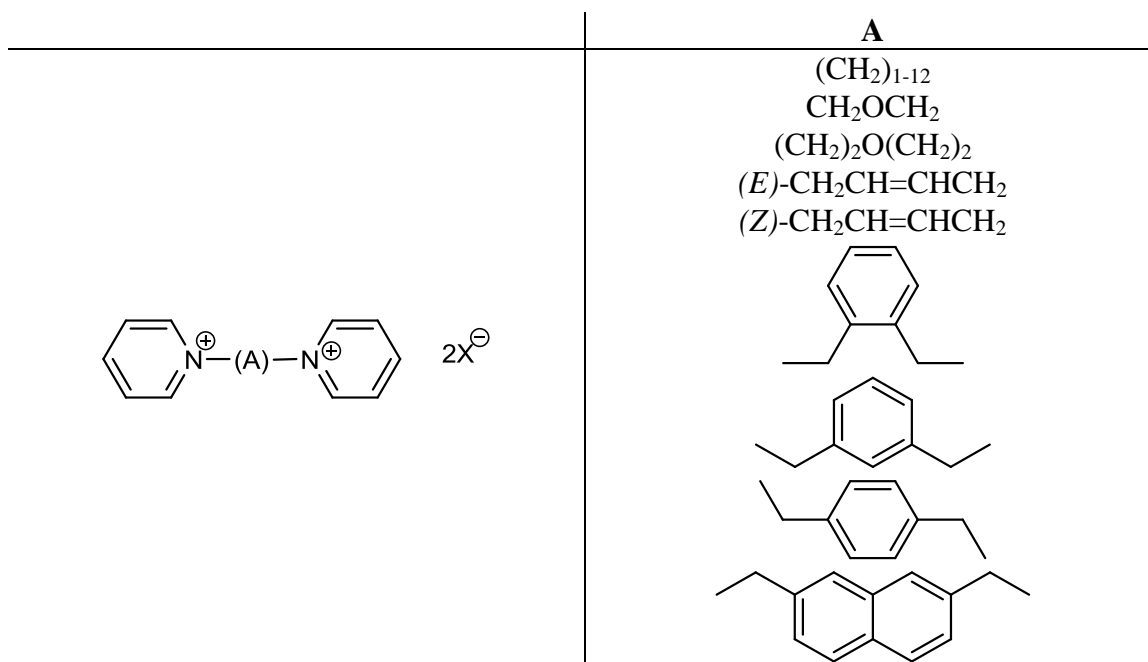
### 3.1 Příprava a testování periferně působících inhibitorů AChE jako potenciálních terapeutik myasthenia gravis

#### 3.1.1 Příprava a hodnocení bispyridinových inhibitorů AChE

##### -komentář publikovaných výsledků tvořících přílohu 1

**Příloha 1:** Musilek, K.; **Komloova, M.**; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y. S. Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage-initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 1763-1766.

Série bispyridinových inhibitorů je tvořena 20 sloučeninami, které se od sebe liší spojovacími řetězci mezi dvěma pyridiniovými kruhy (Tab. 2). Struktura připravovaných sloučenin byla navržena s ohledem na známé uspořádání aminokyselinových residuí v aktivním místě enzymu, na přítomnost periferního anionického místa (PAS) při vstupu do kavity a druhého anionického místa (IAS) uvnitř kavity poblíž místa esteratického. Vycházeli jsme z předpokladu, že dva pyridiniové kruhy jsou schopné interagovat kation- $\pi$  interakcemi s těmito anionickými místy a právě spojovací řetězec je hlavní faktor, ovlivňující intenzitu těchto interakcí. Pozorovali jsme vliv délky spojovacího řetězce (různě dlouhé methylenové spojovací řetězce), vliv heteroatomu ve spojovacím řetězci (2-oxopropanový a 3-oxopentanový spojovací řetězec), přítomnosti  $\pi$ -elektronů (but-2-enové, xylenové a naftylenové spojovací řetězce) a celkového prostorového uspořádání molekuly na afinitu inhibitoru k AChE.



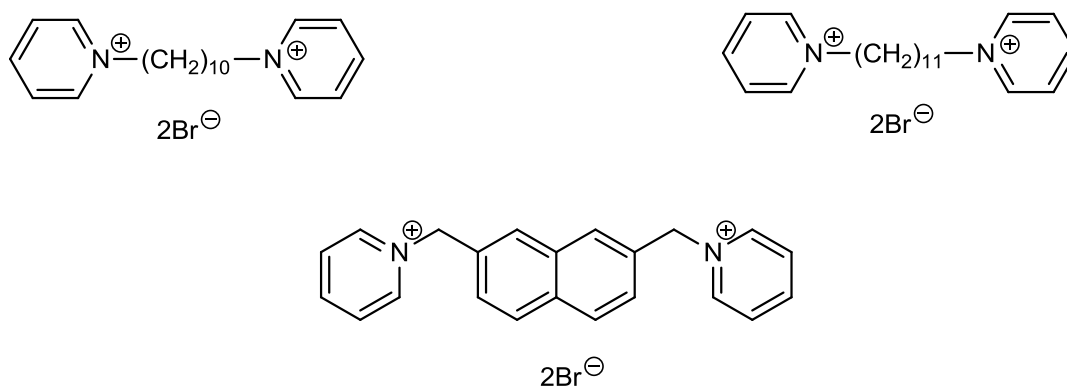
**Tabulka 2** Obecná struktura sloučenin pyridinové série a použité spojovací řetězce

U připravených sloučenin byla *in vitro* stanovena schopnost inhibovat lidskou erytrocytální AChE a lidskou plazmatickou BChE s použitím Ellmanovy metody<sup>95</sup>. Získané hodnoty IC<sub>50</sub> byly porovnány se standardy pyridostigmin bromidem a neostigmin bromidem, karbamátovými sloučeninami používanými v terapii MG.

Nejúčinnějšími inhibitory AChE i BChE v sérii byly sloučeniny s naftylenovým a 10ti a 11tičlenným methylenovým spojovacím řetězcem (Obr. 22). Hodnoty IC<sub>50</sub> (0.2 μM pro sloučeninu s naftylenovým spojovacím řetězcem a 0.4 μM pro 10tičlenný methylenový spojovací řetězec) překonaly výrazně standard pyridostigmin bromid (40 μM) a byly srovnatelné s hodnotami získanými pro neostigmin bromid (0.1 μM). U těchto látek byly dále provedeny kinetické testy, které potvrdily nekompetitivní typ inhibice.

Molekulově modelovací studii na AChE byla podrobena látka s naftylenovým a 10tičlenným methylenovým spojovacím řetězcem a u obou sloučenin byl potvrzen předpoklad kation-π interakce dvou pyridiniových cyklů s aminokyselinovými residui v PAS (Trp286) i IAS (Trp86). Studie na BChE kromě kation-π interakcí obou sloučenin s tryptofanovými residui ukázaly u sloučeniny s naftylenovým spojovacím řetězcem další interakci s Phe329 v blízkosti aktivního místa BChE, čímž si vysvětlujeme nižší hodnoty IC<sub>50</sub> pro tuto sloučeninu (0.8 μM vs. 5 μM pro 10tičlenný methylenový spojovací řetězec).

Na základě výsledků *in vitro* a molekulově modelovací studie pak byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem (SAR). Význam pyridiniových cyklů pro afinitu sloučenin je dán jejich schopností tvořit kation-π interakce s aminokyselinovými residui v PAS a IAS. Jako optimální se pro umožnění vzniku těchto interakcí ukázaly naftylenový a polymethylenové spojovací řetězce obsahující 8-12 methylenových jednotek, což zřejmě koresponduje se vzdáleností PAS a IAS. Jako nevýhodná se jevila přítomnost násobné vazby, heteroatomu a různých izomerů xylenu. Není však jasné, zda je to způsobeno nevhodným prostorovým uspořádáním molekul, nebo zde hraje roli především nedostatečná vzdálenost pyridiniových cyklů, která tak neumožňuje vznik interakcí s oběma anionickými místy.



**Obrázek 22** Struktury nejučinnějších sloučenin pyridinové série

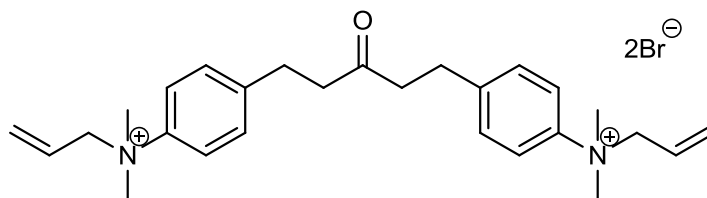
### 3.1.2 Příprava a hodnocení bisochinolinových a bischinolinových inhibitorů AChE

#### -komentář publikovaných výsledků tvořících přílohu 2 a 3

*Příloha 2:* Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K. Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage e Implications for early Myasthenia gravis treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, *46*, 811-818.

*Příloha 3:* **Komloova, M.**; Musilek, K.; Horova, A.; Holas, O.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical bis-quinolinium cholinesterase inhibitors - implications for early Myasthenia gravis treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2011**, *21*, 2505–2509.

V návaznosti na předchozí bispyridinovou sérii inhibitorů byly posléze navrženy série bisochinolinových a bischinolinových sloučenin (Tab. 3). Struktury nově připravených látek se od původní série lišily pouze heterocykly, spojovací řetězce byly shodné jako v případě pyridinových inhibitorů. *In vitro* testování probíhalo na lidské rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE a jako srovnávací standardy byly zvoleny BW284C51 (Obr. 23) a ambenonium dichlorid, látky strukturálně bližší nově připraveným sloučeninám, než původně zvolené karbamáty, a s podobným typem inhibice, kdy nedochází k acylaci esteratického místa enzymu, nýbrž je interakce založena na vzniku  $\pi$ - $\pi$  a kation- $\pi$  interakcí. BW284C51 je navíc selektivním inhibitorem AChE a sloužil tak i jako standard pro srovnání selektivity AChE/BChE. Dalším selektivním standardem, tentokrát pro BChE, byl etopropazin.



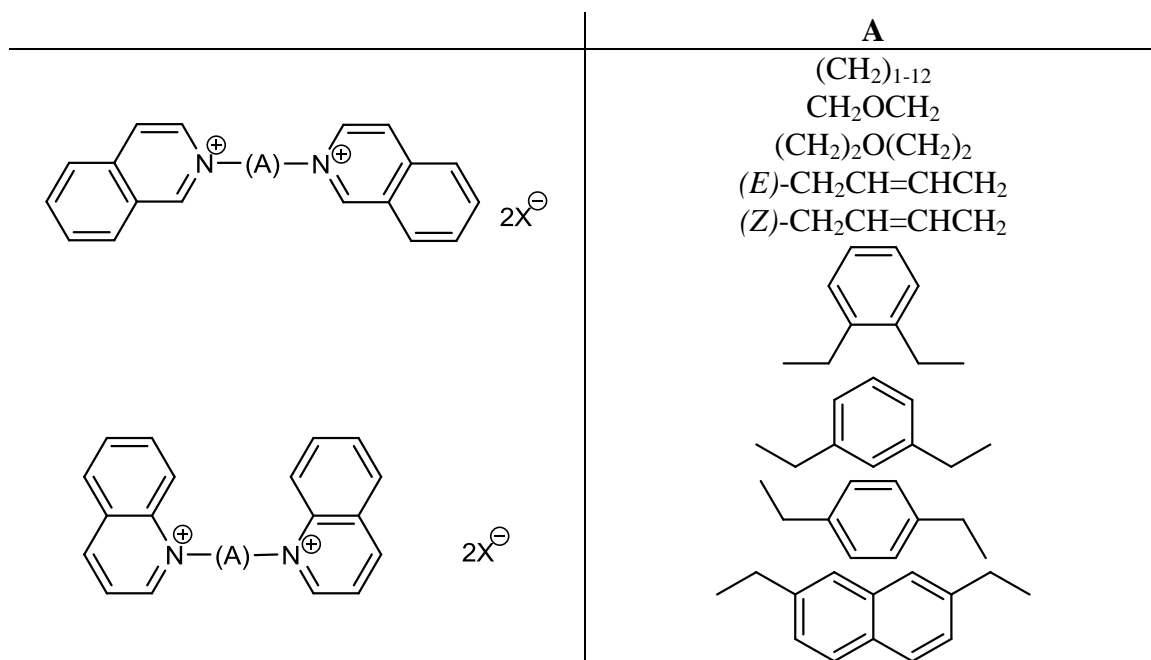
BW284C51

**Obrázek 23** Struktura selektivního inhibitoru BW284C51

Náhrada pyridinu většími heterocykly byla podmíněna molekulově modelovacími studii vybraných sloučenin předchozí série a předpokladem, že u větších heterocyklů může dojít k zesílení  $\pi$ - $\pi$  interakcí s aminokyselinovými residui.

V bisochinolinové sérii (20 látek) se jako nejnadějnější inhibitory ukázaly sloučeniny s 6-11tičlenným methylenovým spojovacím řetězcem, nejnižší hodnoty  $IC_{50}$  pak vykazovala látka s 8 uhlíky ve spojovacím řetězci (0.005  $\mu$ M). U bischinolinové série (18 látek) byla zjištěna vysoká afinita k AChE u látek s 7-12 methylenovými jednotkami, nejlepším inhibitorem v této sérii pak byla sloučenina s 10tičlenným methylenovým spojovacím řetězcem (0.001  $\mu$ M). Tato látka navíc vykazovala poměrně uspokojivou selektivitu vůči AChE. Dostatečně účinnými inhibitory se ukázaly i sloučeniny s naftylenovým spojovacím řetězcem v obou nových sériích. Zatímco však jejich aktivita zůstala srovnatelná s pyridinovými analogy, účinnost inhibitorů

s polymylenovým spojovacím řetězcem pyridinovou sérii překonala, přičemž chinolinová série o něco více, než isochinolinová.



**Tabulka 3** Obecná struktura isochinolinové a chinolinové série a použité spojovací řetězce

U dvou isochinolinových (naftylenový a 8mičlenný methylenový spojovací řetězec) a dvou chinolinových (naftylenový a 10tičlenný spojovací řetězec) byly opět provedeny kinetické studie pro potvrzení nekompetitivního charakteru inhibice a dále molekulově modelovací studie k odhalení možných nových interakcí s enzymem.

Především u dvou polymethylenových analogů bylo možné pozorovat rozdíl při obsazení aktivního místa enzymu inhibitorem. Zatímco u bischinolinového analogu byly sledovány interakce obou isochinolinových cyklů s Trp286 v PAS, kdy se sloučenina jakoby sendvičově obtočila kolem aminokyselinového residua, chinolinový inhibitor interagoval s Trp286 pouze jedním chinolinovým cyklem. Všechny dockované sloučeniny však obsadili pouze vstup do kavity v místě PAS a nezasahovaly hlouběji do enzymu k esteratickému místu se Ser203. Jako u pyridinové série byly u inhibitorů s naftylenovým spojovacím řetězcem pozorovány ještě další  $\pi$ - $\pi$  interakce naftylenů s Trp286. Vyšší aktivita methylenových inhibitorů, které jsou o tyto interakce ochuzeny nepřítomností  $\pi$ -elektronů ve spojovacím řetězci je možná kompenzována vyšší flexibilitou molekuly a tudíž i jejím snazším uspořádáním v enzymu.

V obou nově připravených sériích byly nalezeny látky s uspokojivou schopností inhibovat AChE. Tři látky z každé série měly hodnoty IC<sub>50</sub> srovnatelné se standardem BW284C51, žádný z nově připravených inhibitorů však nepřekonal standard ambenonium dichlorid. Ze tří sérií symetrických biskvarterních inhibitorů se jako nejnadějnější ukázala série chinolinová.



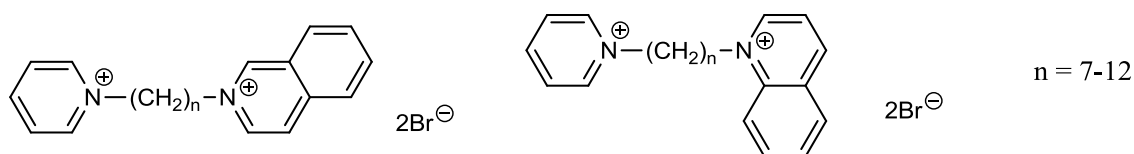
### 3.1.3 Příprava nesymetrických inhibitorů AChE

#### -komentář v době odevzdání práce ještě nepublikovaných výsledků

Série látek uvedená v této kapitole nebyla v době odevzdání práce ještě publikována. Bude zde uveden pouze stručný komentář *in vitro* hodnocení sloučenin a vztahů mezi strukturou a účinkem. Úplné výsledky inhibiční aktivity jsou součástí přílohy 4.

Při navrhování struktury sloučenin v rámci této série bylo přihlédnuto k již známým vztahům mezi strukturou a účinkem. Molekula těchto nesymetrických biskvartérních inhibitorů je proto tvořena pyridinovým cyklem spojeným s isochinolinovým, popř. chinolinovým cyklem přes 7mi až 12tičlenný methylenový spojovací řetězec, který se v předchozích sériích ukázal jako optimální.

*In vitro* hodnocení bylo provedeno na lidské rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE a získané hodnoty  $IC_{50}$  byly porovnány se standardy ambenonium dichloridem, edrofonium bromidem a selektivním BW284C51. Všechny testované látky vykazovaly dobrou inhibiční účinnost v řádu desetin až tisícín  $\mu M$ . Ze dvou použitých heterocyklických sloučenin připojených k pyridinu byly účinnější inhibitory s chinolinovým cyklem. Nejvyšší afinita k AChE pak byla nalezena u chinolinových inhibitorů s 10ti a 12tičlenným methylenovým spojovacím řetězcem.



**Obrázek 24** Obecná struktura sloučenin série nesymetrických inhibitorů AChE



## 3.2 Příprava a testování vybraných periferních inhibitorů AChE jako profylaktik před zasažením NPL

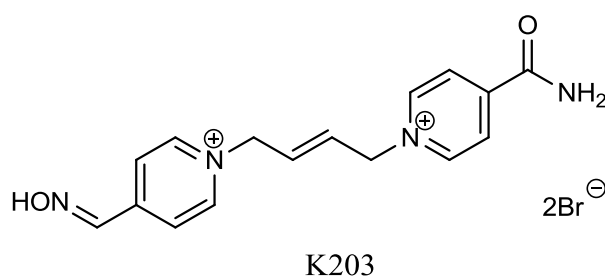
### 3.2.1 Příprava a testování symetrických periferních inhibitorů AChE obsahujících but-2-enový spojovací řetězec

#### -komentář publikovaných výsledků tvořících přílohu 5

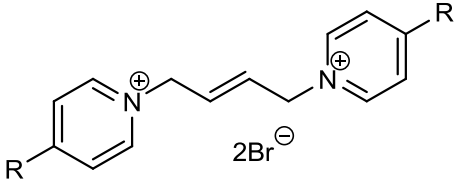
*Příloha 5:* Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2011**; 26, 245–253.

Jak bylo řečeno výše, dalším možným použitím periferních inhibitorů AChE je jejich nasazení jako profylaktik před hrozcí expozicí organismu organofosforovým ireverzibilním inhibitorům - nervově paralytickým látkám. U inhibitorů s touto indikací je výhodné, když selektivně inhibují AChE a zanechají nespécifickou cholinesterasu intaktní, schopnou plnit úlohu plazmatického scavengeru vychytávajícího OP. V praxi byl dosud nasazen pouze karbamátový inhibitor pyridostigmin. Pro zvýšení jeho účinnosti je vhodné výrazně zvýšit dávkování, a protože v takovém případě hrozí rozvoj nežádoucích účinků, je pyridostigmin kombinován s anticholinergními látkami (benaktyzin), které navíc zamezují účinkům OP v centrálním NS<sup>96</sup>.

Byla připravena série 17 symetrických biskvarterních sloučenin, jejichž molekula vychází ze struktury reaktivátoru K203 (Obr. 22), u kterého byla dříve *in vitro* a *in vivo* potvrzena schopnost chránit AChE před účinky OP. Obsahují ve své struktuře (*E*) but-2-enový spojovací řetězec mezi dvěma pyridiniovými jádry, substituovanými v poloze 4 různými zástupci hydrofilních (-COOH, -OH) a hydrofobních (methyl, *tert*-butyl, fenyl) substituentů.



**Obrázek 25** Struktura reaktivátoru K203, který byl předlohou pro sloučeniny série s but-2-enovým spojovacím řetězcem

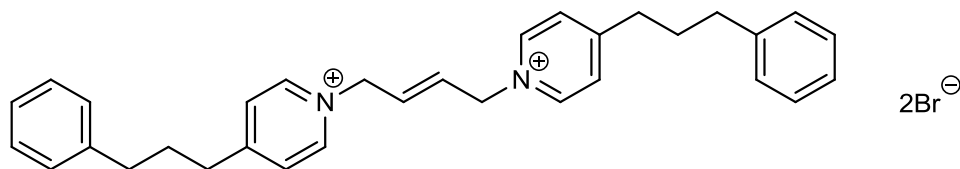
	<b>R</b>
	Me
	Et
	<i>terc.</i> -Bu
	fen
	ben
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -fen
	4-NO <sub>2</sub> -ben
	OH
	CH <sub>2</sub> OH
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH
	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	CH=NOH
	COCH <sub>3</sub>
	COOH
	COOCH <sub>3</sub>
	CONH <sub>2</sub>
CN	

**Tabulka 4** Obecná struktura sloučenin série s but-2-enovým spojovacím řetězcem a použité substituenty

U látek byla hodnocena inhibiční účinnost proti lidské erytrocytální AChE a lidské plazmatické BChE a byla porovnána se standardy pyridostigminem, neostigminem a látkou K203. Na základě získaných hodnot byl shrnut vliv jednotlivých substituentů na afinitu k oběma enzymům.

Mezi testovanými inhibitory byly nalezeny tři sloučeniny, které vykázaly vyšší inhibiční účinnost než standard pyridostigmin a K203. Jedna z nich, inhibitor substituovaný fenylpropylovým zbytkem, navíc překonala IC<sub>50</sub> druhého standardu neostigminu (0.05 μM vs. neostigmin 0.1 μM). Na základě *in vitro* výsledků bylo odvozeno, že vyšší afinitu k enzymu vykazují inhibitory s hydrofobními substituenty. U sloučenin s alifatickými hydrofobními substituenty měl nejvyšší účinnost inhibitor substituovaný metylem, mezi aromatickými fenylpropylem. Mezi látkami s hydrofilními substituenty měla nejnižší IC<sub>50</sub> sloučenina s dimethylamino skupinou.

S nejúčinnější sloučeninou (s fenylpropylovým zbytkem) byly navíc provedeny kinetické testy, které potvrdily nekompetitivní typ inhibice, a molekulově modelovací studie, při kterých byly nalezeny interakce s aromatickými residui v IAS i PAS.



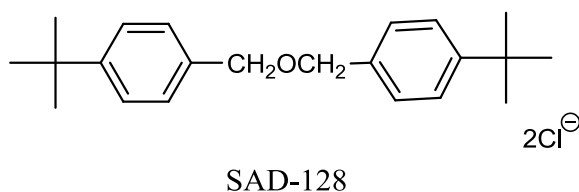
**Obrázek 26** Struktura nejúčinnějšího inhibitoru s fenylpropylovým substituentem

### 3.2.2 Příprava a testování periferních inhibitorů AChE s *tert*-butylovým substituentem

#### -komentář publikovaných výsledků tvořících přílohu 6

*Příloha 6:* Musilek, K.; Roder, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Jung, Y-S. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical 4-*tert*-butylpyridinium cholinesterase inhibitors-Analogues of SAD-128. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, *21*, 150-154.

Další série látek zamýšlených jako pre-treatment zasažení NPL vycházela ze struktury SAD-128 (Obr. 24)<sup>97</sup>, inhibitoru AChE, který byl vyvinut při hledání nových reaktivátorů. Jde o analog obidoximu, který však ve své molekule místo oximových skupin obsahuje *tert*-butylový substituent v poloze 4 pyridinových cyklů. Při testování SAD-128 bylo kromě schopnosti působit jako reverzibilní inhibitor AChE zjištěno i jeho inhibiční působení na muskarinové a nikotinové AChR. Při *in vivo* testování se látka projevila jako nadějně profylaktikum, chránící testovaná zvířata před vlivem násobků LD<sub>50</sub> různých OP<sup>98-101</sup>.



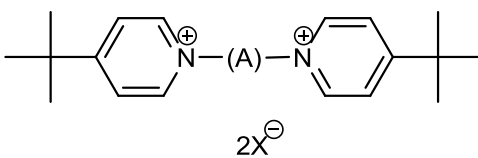
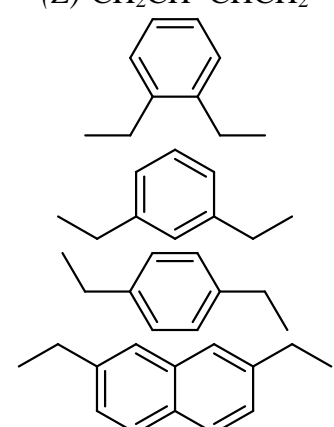
**Obrázek 27** Struktura reaktivátoru SAD-128<sup>97</sup>

Bylo připraveno 19 látek, které obsahovaly dva 4-*tert*-butylpyridiniové cykly a různé spojovací řetězce. Ty byly vybrány s ohledem na již dříve připravené série látek (Příloha 1-3), u nichž se osvědčily především polymethylenové a naftylenový spojovací řetězec. Kratší spojovací řetězce, obsahující heteroatom, násobnou vazbu a xylenové izomery se zase ukázaly slibné při vývoji nových reaktivátorů AChE<sup>102-105</sup>.

*In vitro* testování probíhalo na lidské rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE a jako standardy byly vybrány dva reaktivátory (pralidoxim, obidoxim) a selektivní inhibitory BW284C51 a etopropazin. Výsledné hodnoty IC<sub>50</sub> potvrdily již dříve sledovanou závislost aktivity na struktuře. Nejúčinnější látky obsahovaly naftylenový a 6-12tičlenný methylenový spojovací řetězec. Nejnižší hodnota IC<sub>50</sub> pak byla nalezena u látek s 8, 10 a 12-ti methylenovými jednotkami (5 nM, 12 nM a 7 nM). Celkem 5 připravených látek překonalo aktivitu nejúčinnějšího ze standardů BW284C51, žádné z látek se však nepodařilo překonat její vysokou selektivitu vůči AChE.

Molekulově modelovací studie ukázaly, že zatímco sloučeniny obsahující ve struktuře polymetylenové řetězce pronikají hluboko do kavity enzymu blízko residua Ser203, inhibitor s naftylenovým řetězcem zůstává na povrchu enzymu. Kromě předpokládaných kation- $\pi$  interakcí pyridiniových cyklů s aminokyselinovými residui v PAS i IAS byly nalezeny ještě CH- $\pi$  interakce *tert*-butylové skupiny s Trp86, Tyr337

a His447 v IAS a CH-CH interakce druhé *tert*-butylové skupiny s Leu289 a Glu292 v PAS.

	A
	<p> <math>(\text{CH}_2)_{1-12}</math>  <math>\text{CH}_2\text{OCH}_2</math>  <math>(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2</math>  <math>(E)\text{-CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2</math>  <math>(Z)\text{-CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2</math> </p> 

**Tabulka 5** Přehled struktur obsažených v sérii přílohy

### 3.2.3 Testování účinnosti reversibilních inhibitorů AChE jako farmakologické pre-treatment u somanem intoxikovaných myší

#### -komentář publikovaných výsledků tvořících přílohu 7

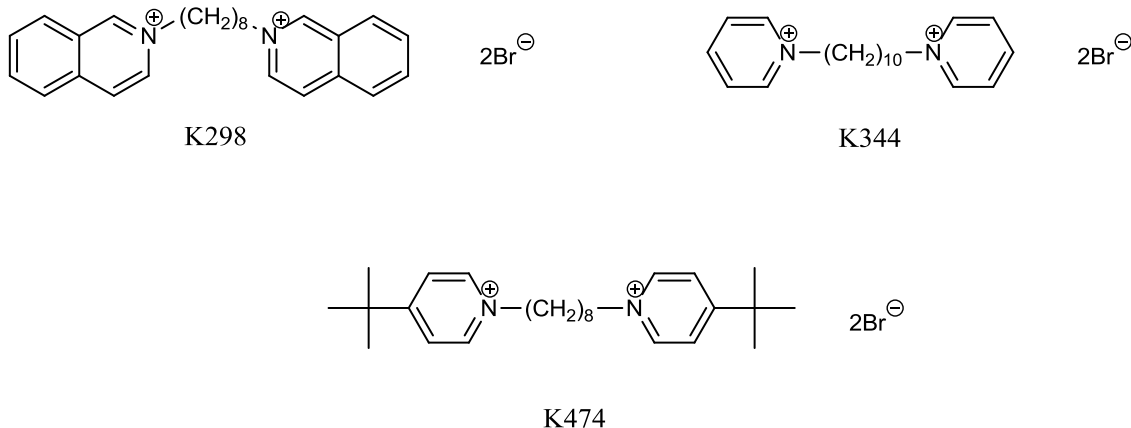
*Příloha 7: Kassa, J.; Musilek, K.; Komloova, M.; Bajgar, J. A Comparison of the Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase with Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pre-Treatment of Soman-Poisoned Mice. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2012, 4, 322–326.*

Jedním z nejvíce rezistentních NPL vůči antidotní terapii je soman, protože podléhá velmi rychle procesu dealkylace<sup>52</sup>. Nasazení farmakologické pre-treatment právě při hrozbě zasažení tímto OP by mohlo nejen zmírnit prvotní rozvoj klinických příznaků intoxikace, ale i významně zefektivnit působení následně podaných antidot.

Pyridostigmin, jako dosud jediné profylaktikum uvedené do praxe, je charakteristický poměrně vysokou toxicitou. Cílem této *in vivo* studie bylo porovnat mezi sebou účinnost a toxicitu tří námi nově připravených reversibilních inhibitorů a pyridostigminu a dále zhodnotit vliv jednotlivých reversibilních inhibitorů na terapeutický efekt následné antidotní terapie.

Testované inhibitory jsou vybraní zástupci z již dříve popsanych sérií (*Přílohy 1, 2, 6*), konkrétně se jednalo o [1,8-bis(isochinolinium)-okt-1,8-diyl dibromid], [1,10-bis(pyridinium) dekan dibromid] a [1,8-bis(4-*tert*-butylpyridinium)-okt-1,8-diyl dibromid] (Obr. 24). Jejich akutní toxicita byla stanovena na myších jako LD<sub>50</sub>. Profylaktická účinnost byla testována po i.m. podání 2% LD<sub>50</sub> inhibitoru následovaném po 30 minutách i.m. podáním somanu. Byla vyjádřena jako poměr LD<sub>50</sub> somanu u předlěčených myší ku LD<sub>50</sub> somanu u myší, kterým nebyla podána žádná profylaxe. Dále probíhalo hodnocení vlivu profylaxe na terapeutickou účinnost antidotní terapie, kterou představoval reaktivátor HI-6 kombinovaný s atropinem nasazené i.m. po minutě působení somanu, vyjádřené jako poměr LD<sub>50</sub> somanu u předlěčených myší s následnou antidotní terapií ku LD<sub>50</sub> somanu u nepředlěčených myší s následnou antidotní terapií.

U všech námi připravených inhibitorů byla ve srovnání s pyridostigminem nalezena nižší akutní toxicita. Nicméně profylaktická účinnost pyridostigminu nebyla překonána a žádná z použitých látek nebyla schopna zásadně snížit akutní toxicitu somanu. Vyšší efektivita antidotní terapie byla pozorována pouze u pre-treatment pomocí pyridostigminu a K474, avšak nebyla nijak výrazná.



**Obrázek 28** Struktura biskvartérních inhibitorů vybraných pro *in vivo* studii





## 4 Závěr

Bylo připraveno celkem šest sérií biskvartérních sloučenin. Čtyři série jsou si svou strukturou velmi blízké, dva heterocyklické substituenty (pyridin, chinolin, isochinolin a 4-*terc*-butylpyridin) jsou zde spojeny plejádou různých spojovacích řetězců a tvoří tak symetrickou biskvartérní strukturu. Další symetrická série obsahuje but-(2*E*)-en-1,4-diyl-1,1'-bispyridiniový skelet a jednotlivé sloučeniny se liší substitucí na pyridinových jádrech. Poslední série je pak tvořena nesymetrickými molekulami, obsahujícími methylenovým spojovacím řetězcem o 7 až 12 členech spojená jádra pyridinu s chinolinem či isochinolinem.

Sloučeniny v rámci každé série byly podrobeny *in vitro* testování inhibiční účinnosti proti lidské erytrocytální, popř. rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE. Byla také sledována selektivita inhibitorů vůči AChE, která byla vyjádřena jako index selektivity ( $SI = IC_{50} \text{ BChE} / IC_{50} \text{ AChE}$ ).

Při studiu vztahů mezi strukturou a účinkem byl hodnocen vliv kvarternizovaných heteroaromatických cyklů, substituentů na těchto cyklech a dále vliv různých spojovacích řetězců na afinitu sloučenin k enzymům.

U čtyř sérií, které se lišily pouze heterocykly za použití stejných spojovacích řetězců, se jako nejúčinnější inhibitory ukázaly sloučeniny s chinolinovým cyklem. Nejméně účinné byly pyridinové sloučeniny, pokud byl ovšem pyridin substituován *terc*-butylem v poloze 4, vzrostla významně aktivita až na úroveň chinolinové série.

Dále byl sledován vliv spojovacího řetězce, kde se délka ukázala jako nejvíce rozhodujícím faktorem při formování interakcí mezi enzymem a inhibitorem. Nejvyšší aktivitou se projevovaly sloučeniny se spojovacími řetězci polymetylenového typu, obsahující 8-12 metylenových jednotek. Významnou, avšak nižší aktivitu vykazovaly také sloučeniny s naftylenovým spojovacím řetězcem. Na základě molekulově modelovacích studií lze předpokládat, že délka spojovacího řetězce u těchto sloučenin koreluje se vzdáleností dvou anionických míst (PAS a IAS) enzymu a je proto výhodná pro tvorbu kation- $\pi$  interakcí s kvartérními dusíky. Sloučeniny s násobnou vazbou, heteroatomem ani izomery xylenu ve spojovacím řetězci neprojevily významnou inhibiční účinnost, což však může být způsobeno právě faktem, že tyto sloučeniny nemají mezi heterocykly požadovanou vzdálenost. Vliv těchto strukturních prvků by proto měl být sledován na řetězcích s optimální délkou.

Na sérii s but-(2*E*)-en-1,4-diyl-1,1'-bispyridiniovým skeletem byl sledován efekt různých hydrofilních a hydrofobních substituentů vázaných v poloze 4 pyridinových cyklů. Nižší hodnoty  $IC_{50}$  byly naměřeny u látek s lipofilními substituenty, jako nejúčinnější inhibitor se projevil sloučenina s fenypropylovým substituentem.

Tři sloučeniny byly vybrány pro *in vivo* stanovení akutní toxicity a hodnocení schopnosti působit jako pre-treatment u somanem intoxikovaných myší. Žádný z inhibitorů však nedokázal v porovnání s pyridostigminem dostatečně snížit akutní toxicitu somanu ani zvýšit efektivitu následně podané antidotní terapie.



## 5 Abstrakt

Práce se zabývá přípravou periferně působících inhibitorů acetylcholinesterasy jako potenciálních léčiv onemocnění myasthenia gravis. Tyto látky mohou být použity také jako profylaktika před otravou ireverzibilními inhibitory AChE. Dokáží obsadit aktivní místo enzymu a zabránit tak přístupu ireverzibilního inhibitoru. Požadavky na vlastnosti těchto látek byly dostatečná inhibiční účinnost (k porovnání byly vybrány standardy používané v současné době v terapii myasthenia gravis), dostatečně selektivní působení proti AChE a nesnadná prostupnost hematoencefalickou bariérou pro snížení případných nežádoucích účinků.

Bylo připraveno celkem šest sérií biskvartérních sloučenin. *In vitro* byla stanovena jejich inhibiční účinnost proti lidské erytrocytální popř. rekombinantní AChE a lidské plazmatické BChE. V rámci každé série byla na základě získaných hodnot provedena studie vztahů mezi strukturou a účinkem. Podařilo se připravit několik sloučenin, které prokázaly nezanedbatelný inhibiční potenciál. Tyto neúčinnější inhibitory byly dále podrobeny kinetickým testům a byl u nich potvrzen nekompetitivní typ inhibice. Při molekulově modelovacích studiích se podařilo objasnit množství interakcí sloučenin s aminokyselinovými residui v aktivní kavitě enzymu. Tři sloučeniny byly dále vybrány k *in vivo* stanovení akutní toxicity a byla u nich hodnocena schopnost působit jako profylaktika před otravou somanem. Ve srovnání s profylakticky podávaným pyridostigminem však tyto látky neprokázaly významnou schopnost ochránit AChE před účinky ireverzibilního inhibitoru, ani se nepodařil prokázat vliv na zvýšení účinnosti následně podané antidotní terapie.



## 6 Abstract

This work focuses on the preparation of peripherally acting AChE inhibitors as a potential treatment of myasthenia gravis. These compounds could also be used as a pre-treatment of poisoning by organophosphorus AChE inhibitors. They can occupy the active site of an enzyme making it inaccessible for irreversible inhibitors. Compounds used in this indication should fulfil these requirements: inhibit efficiently AChE (standards currently used in the treatment were chosen for the comparison of the inhibitory efficacy), have selective effect on AChE and not to cross the blood-brain barrier in order to lower the possible side effects.

Six series of bisquaternary compounds were prepared. Their inhibitory ability was determined *in vitro* against human erythrocyte or recombinant AChE and human plasmatic BChE. According to inhibitory ability values acquired, a structure - activity relationships were investigated in every series. A few compounds with significant affinity towards AChE were found. These most promising compounds were further examined in kinetic tests and a non-competitive type of inhibition was confirmed. In the docking studies, many interactions of the compounds and amino acid residues in the active site of the enzyme were observed. Three compounds were also chosen for *in vivo* determination of the acute toxicity and the ability to work as a pre-treatment against soman poisoning. Compared to prophylactic efficacy of pyridostigmine, these compounds however showed no significant tendency to protect AChE against organophosphorus inhibitor. No influence on the efficacy of the subsequent antidote treatment was either observed.



## 7 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

### Práce publikované v odborné literatuře:

2009:

1. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O. Small quaternary AChE inhibitors—Implication for pretreatment of OP poisoning or MG treatment. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, S209-S209. IF<sub>2009</sub> = 3.479.
2. Musilek, K., Holas, O., **Komloova, M.** Development of promising oximes against nerve agent and/or pesticide intoxication. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **2009**, *238*, 443-INOR.

2010:

3. Musilek, K.; Holas, O.; **Komloova, M.** Development of promising oximes against nerve agent and/or pesticide intoxication. *Main Group Chem.* **2010**, *9*, 355-361. IF<sub>2010</sub> = 0.642.
4. Musilek, K.; **Komloova, M.**; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y.S. Preparation and *in vitro* screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage—initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763-1766. IF<sub>2010</sub> = 2.661.
5. **Komloova, M.**; Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors – Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1810-1824. IF<sub>2010</sub> = 4.708.

2011:

6. Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K. Preparation and *in vitro* screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage - Implications for early Myasthenia gravis treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 811-818. IF<sub>2011</sub> = 3.346.
7. **Komloova, M.**; Musilek, K.; Horova, A.; Holas, O.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Preparation, *in vitro* screening and molecular modelling of symmetrical bis-quinolinium cholinesterase inhibitors—implications for early Myasthenia gravis treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2505-2509. IF<sub>2011</sub> = 2.554.
8. Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, *in vitro* screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2011**, *26*, 245-253. IF<sub>2011</sub> = 1.617.
9. Musilek, K.; Roder, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Jung, Y-S. Preparation, *in vitro* screening and molecular modelling of symmetrical 4-tert-butylpyridinium cholinesterase inhibitors—Analogues of SAD-128. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 150-154. IF<sub>2011</sub> = 2.554.
10. **Komloova, M.**; Musilek, K.; Kuca, K. Myasthenia gravis – současné terapeutické možnosti a nové trendy. *Čes. Slov. Farm.* **2011**, *60*, 47-53.

11. Musilek, K.; Holas, O.; **Komloova, M.** Mono-oxime bisquaternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage-Preparation, in vitro screening and molecular docking. *Bioorgan. Med. Chem.* **2011**, *19*, 754-762. IF<sub>2011</sub> = 2.921.

2012:

12. Kassa, J.; Musilek, K.; **Komloova, M.**; Bajgar, J. A Comparison of the Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase with Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pre-Treatment of Soman-Poisoned Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *4* (110): 322-326. IF<sub>2012</sub> = 2.179.
13. Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Horova, A.; Zdarova-Karasova, J.; Kuca, K. Myasthenia Gravis – Current Treatment Standards and Emerging Drugs, A Look into Myasthenia Gravis, Dr. Joseph A. Pruitt (Ed.), ISBN: 978-953-307-821-2, InTech **2012**.

### Konferenční sdělení:

2009:

1. Musilek Kamil, prezentace výsledků formou ústního sdělení: Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Pohanka, M.; Dolezal, M.; Nachon, F.; Kuca, K. Interactions of bisquaternary molecules with cholinesterases. **9. konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČSL JEP**, Hradec Králové 26.-27.11.2009, Sborník příspěvků, str. 91, ISBN 978-80-254-5956-0.
2. **Komlóová Markéta**, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Komloova M., Holas O., Musilek K., Kuca K., Dolezal M., Opletalova V.: Synthesis and *in vitro* screening of AChE bisquaternary inhibitors as potential compounds for Myasthenia Gravis treatment. Programme and Abstracts **10th International Meeting on Cholinesterases**. Šibenik, Chorvatsko, 20. – 25. 9. 2009. Vydala Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology 2009. ISBN 978-953-95551-3-7.
3. **Komlóová Markéta**, prezentace výsledků formou ústního sdělení: Komlóová M., Holas O., Musilek K., Dolezal M.: Příprava a *in vitro* testování periferních inhibitorů acetylcholinesterasy. Sborník **9. konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČSL JEP**. Hradec Králové 26. – 27. listopadu 2009. Vydala Zdravotní a sociální akademie Hradec Králové 2009. ISBN 978-80-254-5956-0.
4. **Komlóová Markéta**, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Komlóová M., Holas O., Musilek K., Dolezal M.: Syntéza a *in vitro* testování bispyridiniových inhibitorů acetylcholinesterasy. Sborník **38. konference Syntéza a analýza léčiv**. Hradec Králové 14. – 16. září 2009. Vydala Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2009. ISBN 978-80-7305-078-8.
5. Musilek Kamil, prezentace výsledků formou ústního sdělení: Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Small quaternary AChE inhibitors—Implication for pretreatment of OP



poisoning or MG treatment. **46th Congress of European Societies of Toxicology** Dresden 13.-16.9.2009, Toxicol. Lett. 2009, 189S, Z06, p. S209, ISSN 0378-4274. IF2008 = 3.249.

6. Musílek Kamil, prezentace výsledků formou ústního sdělení: Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Pohanka, M.; Dolezal, M.; Opletalova, V.; Nachon, F.; Kuca, K. Non-covalent interactions of quaternary heteroaromatic compounds with cholinesterases. **Chemical and Biological Defense Science and Technology Conference**, Dallas (USA) 16.-20.11.2009, Book of abstracts, p. 151-152.

2010:

7. Musílek, Kamil, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Musilek, K.; Pavlikova, R.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Preparation, *in vitro* screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors bearing but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. **Bioscience Review** 2010 Hunt Valley (USA) 23.5.-27.5.2010, Abstract book, p. 32.
8. Musílek, Kamil, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Horova, A.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Small quaternary AChE inhibitors for MG treatment – synthesis, *in vitro* screening and molecular docking. **21st International Symposium on Medicinal Chemistry Brussels** (Belgium) 5.9.-9.9.2010, Drug. Future. 2010, 35, PC.050 p. 71, ISSN 0377-8282. IF2009 = 0.500.
9. **Komlóová, Markéta**, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Komlóová M., Holas O., Musílek K., Doležal M. Příprava a *in vitro* testování periferních inhibitorů acetylcholinesterasy. **39. konference Syntéza a analýza léčiv** 2010, Modra-Harmónia (Slovensko) 2. 9. -4. 9. 2010, Sborník.

2011:

10. **Komlóová, Markéta**, prezentace výsledků formou ústního sdělení: Komloova, M., Musilek, K., Holas, O., Dolezal, M.: Preparation and *in vitro* evaluation of peripheral acetylcholinesterase inhibitors intended for early Myasthenia gravis treatment. Book of abstracts **1st Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network** (7th Meeting of the European Network of Doctoral Studies in Pharmaceutical Sciences) Madrid, Spain, 13. - 15. 7. 2011.
11. **Komlóová, Markéta**, prezentace výsledků formou posterového sdělení: Komlóová, M.; Holas, O.; Musílek, K.; Doležal, M. Syntéza a *in vitro* testování inhibitorů acetylcholinesterasy. **53. Česko-slovenská psychofarmakologická konference** (Jeseník) 5. - 9. 1. 2011, Psychiatrie, vol. 15, supp.1, s. 58, ISSN 1211-7579.



## 8 Seznam použité literatury

1. Vogt, M. Sir Henry Hallett Dale, O. M., F. R. S. *Int. J. Neuropharmacol.* **1969**, 8 (2): 83-84.
2. Feldberg, W. S. Henry Hallett Dale. 1875-1968. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* **1970**, 16, 77-174.
3. Raju, T. N. The Nobel chronicles. 1936: Henry Hallett Dale (1875–1968) and Otto Loewi (1873–1961). *Lancet.* **1999**, 353 (9150), 416-417.
4. Sarter, M.; Parikh, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, 6, 48-56.
5. Lincova, D.; Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2<sup>nd</sup> eds., Galén: Praha, 2007.
6. O'Neil, M. J. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 14<sup>th</sup> eds - version 14.9. Merck Sharp & Dohme Corp. 2012.
7. Tobin, G.; Giglio, D.; Lundgren, O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary track. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, 60, 3-21.
8. Watson, S.; Arkininstall, S. *The G-Protein-linked Receptor Factsbook*, Academic Press: London, 1994.
9. Dohlman, H. G.; Thorner, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 653-688.
10. Strader, C. D.; Fong, T. M.; Tota, M. R.; Underwood, D.; Dixon, R. A. F. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 101-132.
11. Hirota, S. A. A quick guide to muscarinic acetylcholine receptors. *BioPharm. J.* **2001**, 5, 6-8.
12. Felder, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* **1995**, 9, 619-625.
13. Tata, A. M. Muscarinic acetylcholine receptors: new potential therapeutic targets in antinociception and in cancer therapy. *Recent. Pat. CNS Drug Discov.* **2008**, 3, 94-103.
14. Gavaldà, A.; Miralpeix, M.; Ramos, I.; Otal, R. Characterization of Acclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 331, 740-751.
15. Broadley, K. J.; Kelly, D. R. Muscarinic receptor agonists and antagonists. *Molecules.* **2001**, 6, 142-193.

16. Millar, N. S. A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 766-776.
17. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967-989.
18. *The PyMOL*, Molecular Graphics System; Version 1.1 Schrödinger, LLC: USA; 2008.
19. Chatonnet, A.; Lockridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625-634.
20. Wilson, I. B.; Harrison, M. A. Turnover number of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236* (8), 2292-2295.
21. Sangyun, L.; Ji-Hyun, K.; Sangyoub, L. Internal diffusion-controlled enzyme reaction: The acetylcholinesterase kinetics. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (2), 715-723.
22. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J. L.; Verschueren, K. H. G.; Goldman, A. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng.* **1992**, *5* (3), 197-211.
23. Cousin, X.; Hotelier, T.; Giles, K.; Lievin, P.; Toutant, J. P.; Chatonnet, A. The alpha/beta fold family of proteins database and the cholinesterase gene server ESTHER. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (1), 143-146.
24. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1993**, *90*, 5128-5132.
25. Johnson, G.; Moore, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 217-225.
26. Massoulié, J.; Bon, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **1982**, *5*, 57-106.
27. Massoulié, J.; Anselmet, A.; Bon, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Morel, N.; Simon, S. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem. Biol. Interact.* **1999**, *119-120*, 29-42.
28. Massoulié, J. The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *Neurosignals.* **2002**, *11*, 130-143.

29. Bon, S.; Vigny, M.; Massoulie, J. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1979**, *76* (6), 2546-2550.
30. Krejci, E.; Legay, C.; Thomine, S.; Sketelj, J.; Massoulie, J. Differences in Expression of Acetylcholinesterase and Collagen Q Control the Distribution and Oligomerization of the Collagen-Tailed Forms in Fast and Slow Muscles. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (24), 10672-10679.
31. Massoulié, J.; Anselmet, A.; Bon, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Morel, N.; Simon, S. Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J. Physiol. Paris.* **1998**, *92* (3-4), 183-190.
32. Soreq, H.; Gnatt, A.; Loewenstein, Z.; Seville, L. F. Excavations into the active site gorge of AChE. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 353-358.
33. Augustinsson, K.-B. *Cholinesterases and anticholinesterase agents*, Springer-Verlag: Berlin, 1963; pp. 89-128.
34. Hartmann, J.; Kiewert, C.; Duysen, E. G.; Lockridge, O.; Greig, N. H.; Klein, J. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *J. Neurochem.* **2007**, *100*, 1421-1429.
35. Dave, K. R.; Syal, A. R.; Katyare, S. S. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z. Naturforsch.* **2000**, *55c*, 100-108.
36. Prody, C. A.; Zevin-Sonkin, D.; Gnatt, A.; Goldberg, O.; Soreq, H. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1987**, *84*, 3555-3559.
37. Kolarich, D.; Weber, A.; Pabst, M.; Stadlmann, J.; Teschner, W.; Ehrlich, H.; Schwarz, H. P.; Altmann, F. Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma. *Proteomics.* **2008**, *8*, 254-263.
38. Zelinski, T.; Coghlan, G.; Mauthe, J.; Triggs-Raine, B. Molecular basis of succinylcholine sensitivity in a prairie Hutterite kindred and genetic characterization of the region containing the BCHE gene. *Mol. Genet. Metab.* **2007**, *90*, 210-216.
39. Duysen, E. G.; Li, B.; Carlson, M.; Li, Y. F.; Wieseler, S.; Hinrichs, S. H.; Lockridge, O. Increased hepatotoxicity and cardiac fibrosis in cocaine-treated butyrylcholinesterase knockout mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *103*, 514-521.
40. Yuan, J.; Yin, J.; Wang, E. Characterization of procaine metabolism as probe for the butyrylcholinesterase enzyme investigation by simultaneous determination of procaine and its metabolite using capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1154*, 368-372.

41. Saxena, A.; Sun, W.; Luo, C.; Myers, T. M.; Koplovitz, I.; Lenz, D. E.; Doctor, B.P. Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J. Mol. Neurosci.* **2006**, *30*, 145-148.
42. Raveh, L.; Grauver, E.; Grunwald, J.; Cohen, E.; Ashani, Y. The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1997**, *145*, 43-53.
43. Lockridge, O.; Bartels, C. F.; Vaughan, T. A.; Wong, C. K.; Norton, S. E.; Johnson, L. L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 549-557.
44. Saxena, A.; Redman, A. M. G.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, P. Differences in active site gorge dimension of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry.* **1997**, *36*, 14642-14651.
45. Harel, M.; Sussman, J. L.; Krejci, E.; Bon, S.; Chanal, P.; Massoulie, J.; Silman, I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1992**, *89*, 10827-10831.
46. Masson, P.; Xie, W.; Froment, M. T.; Lockridge, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with  $\Omega$  loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1544*, 166-176.
47. Bourne, Y.; Taylor, P.; Radić, Z. A.; Marchot, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.* **2003**, *22*, 1-12.
48. Sussmann, J. L.; Harel, M.; Frolov, F. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* **1991**, *253*, 872-874.
49. Bajgar, J. Prophylaxis against organophosphorus poisoning. *J. Med. Chem. Def.* **2004**, *1*, 1-6.
50. Jun, D.; Musilova, L.; Musilek, K.; Kuca, K. In vitro ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2077-2087.
51. Eddleston, M.; Phillips, M.R. Self poisoning with pesticides. *Br. Med. J.* **2004**, *328*, 42-44.
52. Patocka, J. *Vojenská toxikologie*, Grada publishing: Praha, 2004.
53. Jokanovic, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology.* **2001**, *166*, 139-160.

54. Ford, M. D.; Delaney, K. A.; Ling, L. J.; Erickson, T. *Clinical toxicology: Organophosphates and carbamates*. W.B.Saunders Company: Philadelphia, 2001, pp. 819-828.
55. Dart, R. C. *Medical toxicology*. 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2004.
56. Goldfrank, L. R.; Flomenbaum, N. *Goldfrank's Toxicological Emergencies*. 7th ed.; McGraw-Hill Professional: New York, 2002.
57. Geller, R. J.; Singleton, K. L.; Tarantino, M. L. Nosocomial poisoning associated with emergency department treatment of organophosphate toxicity - Georgia, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep*. **2001**, *49*, 1156-1158.
58. Little, M.; Murray, L. Consensus statement: Risk of nosocomial organophosphate poisoning in emergency departments. *Emerg. Med. Australasia*. **2004**, *16*, 456-458.
59. Ram, J. S.; Kumar, S. S.; Jayarajan, A.; Kuppaswamy, G. Continuous infusion of high doses of atropine in the management of organophosphorus compound poisoning. *J. Assoc. Physicians India*. **1991**, *39*, 190-193.
60. Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Checketts, H.; Senarathna, L.; Mohamed, F.; Sheriff, M. H. R.; Dawson, A. H. Speed of initial atropinisation in significant organophosphorus pesticide poisoning - a systematic comparison of recommended regimens. *J. Toxicol. Clin. Toxicol*. **2004**, *42*, 865-875.
61. Ballantyne, B.; Marrs, T. C. *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*, Butterworth Heinemann: Oxford, 1992.
62. Stojiljkovic, M. P.; Jokanovic, M. Selection of pyridinium oximes as antidotes. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. **2006**, *57*, 435-443.
63. Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A. Crystal structures of agent phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry*. **1999**, *38*, 7032-7039.
64. Wilson, I. B.; Ginsburg, S. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1955**, *18*, 168-170.
65. Thompson, D. F.; Thompson, G. D.; Greenwood, R. B.; Trammel, H. L. Therapeutic dosing of pralidoxim chloride. *Drug Intell. Clin. Pharm*. **1987**, *21*, 590-593.
66. Gupta, R. C. *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, 1<sup>st</sup> edn.; Academic Press: London, 2009
67. Wadia, R. S.; Sadagopan, C.; Amin, R. B.; Sardesai, H. V. Neurological manifestations of organophosphate insecticide poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psych*. **1974**, *37*, 841-847.

68. Murphy, M. R.; Blick, D. W.; Dunn, M. A. Diazepam as a treatment for nerve agent poisoning in primates. *Aviat. Space Environ. Med.* **1993**, *64*, 110-115.
69. Doctor, B. P.; Raveh, L.; Wolfe, A. D.; Maxwell, D. M.; Ashani, Y. Enzymes as pretreatment drugs for organophosphate toxicity. *Neurosci. Behav. Rev.* **1991**, *15*, 123-128.
70. Allon, N.; Raveh, L.; Gilat, E.; Cohen, E.; Grunwald, J.; Ashani, Y. Prophylaxis against soman inhalation toxicity in guinea pigs by pretreatment alone with human serum butyrylcholinesterase. *Toxicol. Sci.* **1998**, *43*, 121-128.
71. Ashani, Y.; Shapira, S.; Levy, D.; Wolfe, A. D.; Doctor, B. P.; Raveh, L. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 37-41.
72. Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Eyer, P.; Dawson, A.H. Medical management of acute organophosphorus pesticide self- poisoning. *Lancet.* **2008**, *371*, 597-607.
73. Raushel, F. M. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **2002**, *5*, 288-295.
74. Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Carrera, V. Future applications of phosphotriesterases in the prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicol. Lett.* **2004**, *151*, 219-233.
75. Li, W. F.; Furlong, C. E.; Costa, L.G. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol. Lett.* **1995**, *76*, 219-226.
76. Raveh, L.; Segall, Y.; Leader, H.; Rothschild, N.; Levanon, D.; Henis, Y.; Ashani, Y. Protection against tabun toxicity in mice by prophylaxis with an enzyme hydrolyzing organophosphate esters. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 397-400.
77. Perry, E.; Perry, R.; Blessed, G.; Tomlinson, B. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1978**, *4*, 273-277.
78. Geula, C.; Mesulam, M. M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1995**, *9*, 23-28.
79. Arendt, T.; Bruckner, M. K.; Lange M.; Bigl V. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* **1992**, *21*, 381-396.
80. Giacobini, E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **2003**, *18*, S1-S5.
81. Guillozet, A.; Smiley, J. F.; Mash, D. C.; Mesulam, M. M. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 909-918.



82. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Ingram, D. K.; Wang, Y.; Pepeu, G.; Scali, C. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **2005**, *102*, 17213-17218.
83. Koelle, G. B. Protection of cholinesterase against irreversible inactivation by DFP in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1946**, *88*, 323-327.
84. Koster, R. Synergisms and antagonisms between physostigmine and diisopropyl fluorophosphate in cats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1946**, *88*, 39-46.
85. Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R. *Chemical warfare agents. Toxicology and treatment*. John Wiley and Sons: New York, 1996.
86. Patocka, J. Effect of pyridostigmine and syntostigmine pretreatment on the inhibition of acetylcholinesterase by O-pinacolyl-methylphosphonofluoridate. In vitro experiments with rat tissues. *Biomed. Biochim. Acta*. **1989**, *48*, 715-720.
87. Anderson, D. R.; Harris, L. W.; Woodard, C. L.; Lennox, W. I. The effect of pyridostigmine pretreatment on oxime efficacy against intoxication by soman and VX in rats. *Drug Chem. Toxicol.* **1992**, *15*, 285-294.
88. Wenger, B.; Quigley, M. D.; Kokla, M. A. Seven-day pyridostigmine administration and thermoregulation during rest and exercise in dry heat. *Aviat. Space Environ. Med.* **1993**, *64*, 905-911.
89. Abou-Donia, M. B.; Goldstein, L. B.; Jones, K. H.; Abdel-Rahman, A. A.; Damodaran, T. V.; Dechkovskaia, A. M. Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicol. Sci.* **2001**, *60*, 305-314.
90. Kassa, J.; Bajgar, J. The influence of pharmacological pretreatment on efficacy of HI-6 oxime in combination with benactyzine in soman poisoning in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **1996**, *15*, 383-388.
91. Kassa, J.; Fusek, J. The positive influence of a cholinergic-anticholinergic pretreatment and antidotal treatment on rats poisoned with supralethal doses of soman. *Toxicology*. **1998**, *128*, 1-7.
92. Kassa, J.; Fusek, J. The influence of of anticholinergic drug selection on the efficacy of antidotal treatment of soman poisoned rats. *Toxicology*. **2000**. *154*, 67-73.
93. Kassa, J.; Vachek, J. A comparison of the efficacy of pyridostigmine alone and in the combination of pyridostigmine with anticholinergic drugs as pharmacological pretreatment of tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology*. **2002**, *177*, 179-185.

94. Grunwald, J.; Raveh, L.; Doctor, B. P. Huperzine A as a pretreatment candidate drug against nerve agent toxicity. *Life Sci.* **1994**, *54*, 991-997.
95. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K. Improvement of acetylcholinesterase based assay for organophosphates in way of identification by reactivators. *Talanta.* **2008**, *77*, 451-454.
96. Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jun, D. Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning. *Curr Med Chem.* **2009**, *16*, 2977-2986.
97. Hagedorn, I.; Gundel, W. H.; Hoose, J.; Jenter, C. Synthesis and quaternation of pyridine-aldoxim alkylethers. *Arzneimitt. Forsch.* **1976**, *26*, 1273-1275.
98. Harris, L. W.; Heyl, W. C.; Stitche, D.L.; Broomfield, C. A. Effects of 1,1'-oxydimethylene bis-(4-tert-butylpyridinium chloride) (SAD-128) and decamethonium on reactivation of soman- and sarin-inhibited cholinesterase by oximes. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 757-761.
99. Lundy, P. M.; Tremblay, K. P. Ganglion blocking properties of some bispyridinium soman antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, *60*, 47-53.
100. Kloog, Y.; Sokolovsky, M. Bisquaternary pyridinium oximes as allosteric inhibitors of rat brain muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **1985**, *27*, 418-428.
101. Alkondon, M.; Albuquerque, E. X. The nonoxime bispyridinium compound SAD-128 alters the kinetic properties of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel: a possible mechanism for antidotal effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**, *250*, 842-852.
102. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V. 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.
103. 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.
104. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of a novel series of non-symmetrical bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 425-432.
105. Musilek, K.; Holas, O.; Misik, J.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K. Monooxime-monocarbamoyl bispyridinium xylene-linked reactivators of acetylcholinesterase-synthesis, in vitro and toxicity evaluation, and docking studies. *Chem. Med. Chem.*, **2010**, *5*, 247-254.

## 9 Seznam příloh

**Příloha 1:** Musilek, K.; **Komloova, M.**; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y.S. Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage—initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763-1766.

**Příloha 2:** Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K. Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage - Implications for early Myasthenia gravis treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 811-818.

**Příloha 3:** **Komloova, M.**; Musilek, K.; Horova, A.; Holas, O.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical bis-quinolinium cholinesterase inhibitors—implications for early Myasthenia gravis treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2505-2509.

**Příloha 4:** *In vitro* hodnocení inhibiční účinnosti série nesymetrických inhibitorů (Kapitola 3.1.3)

**Příloha 5:** Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2011**; *26*, 245-253.

**Příloha 6:** Musilek, K.; Roder, J.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Jung, Y-S. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical 4-tert-butylpyridinium cholinesterase inhibitors - analogues of SAD-128. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 150-154.

**Příloha 7:** Kassa, J.; Musilek, K.; **Komloova, M.**; Bajgar, J. A Comparison of the Efficacy of Newly Developed Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase with Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pre-Treatment of Soman-Poisoned Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *4*, 322-326.

**Příloha 8:** **Komloova, M.**; Musilek, K.; Kuca, K. Myasthenia gravis – současné terapeutické možnosti a nové trendy. *Čes. Slov. Farm*, **2011**, *60*, 47-53.

**Příloha 9:** Musilek, K.; **Komloova, M.**; Holas, O.; Horova, A.; Zdarova-Karasova, J.; Kuca, K. Myasthenia Gravis – Current Treatment Standards and Emerging Drugs, A Look into Myasthenia Gravis, Dr. Joseph A. Pruitt (Ed.), ISBN: 978-953-307-821-2, InTech 2012.

**Příloha 10:** **Komloova, M.**; Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors – Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1810-1824.



## **10 Přílohy**