

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



SYNTÉZA TETRAHYDROAKRIDINOVÝCH INHIBITORŮ

ACETYLCHOLINESTERASY

Disertační práce

Mgr. Jan Korábečný

Školitel: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Poděkování

Rád bych poděkoval konzultantovi práce doc. Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. a doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytli v průběhu doktorského studia a při vypracování disertační práce. Zároveň děkuji všem pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze a kolegům Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za odbornou pomoc při řešení disertační práce a při zpracování výsledků. Děkuji i za finanční podporu grantu SVV-265-001, Grantové agentuře České republiky (GAP 303/11/1907 – Nové inhibitory acetylcholinesterasy odvozené od látky 7-MEOTA – potenciální léčivo pro Alzheimerovu nemoc) a projektu Ministerstva Obrany (OVUOFVZ200805 – INHIBITOR – Výzkum nových inhibitorů acetylcholinesterasy jako profylaxe intoxikací nervově-paralytickými látkami). Dále děkuji doc. PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D. a RNDr. Ladislavu Janovcovi, Ph.D. za pomoc při vyhodnocování molekulově modelovacích studií, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za stanovení NMR spektroskopie, Věnceslave Hronové za provedení CHNS analýzy, Mgr. Ondřeji Holasovi a Bc. Anně Horové za stanovení biologických aktivit a doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. za vyhotovení hmotnostní spektrometrie. Zvláštní poděkování patří i pracovišti Organické chemie Přírodovědecké fakulty UPJŠ v Košicích, kde jsem vykonával tříměsíční stáž v rámci fondu mobility finančně podpořeným Univerzitou Karlovou.

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

V Hradci Králové.....

Mgr. Jan Korábečný

Abstrakt

Inhibitory cholinesteras mají příznivý vliv na kognitivní, funkční i behaviorální projevy Alzheimerovy choroby (AD) a v současné době představují téměř výhradně jedinou linii léčiv používaných pro terapii tohoto onemocnění. Tři z nich jsou schváleny k užívání americkou agenturou Food and Drug Administration – donepezil, rivastigmin a galantamin. Kromě inhibitorů cholinesteras se dále používá memantin, který je představitelem *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) antagonistů.

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) se stal prvním schváleným inhibitorem cholinesteras pro léčbu AD. Jeho nežádoucí účinky, zejména hepatotoxicita a gastrointestinální potíže, však limitují jeho širší využití. Nové deriváty takrinu jsou intenzivně zkoumány ve snaze najít látky s nižší toxicitou a postihující více patologických mechanismů účastnících se AD.

V této souvislosti byl připraven v ČR 7-methoxytakrin (7-MEOTA), méně toxický derivát takrinu při zachování jeho farmakologického profilu.

V rámci této práce byly syntetizovány nové deriváty takrinu a 7-MEOTA, u kterých byla hodnocena jejich schopnost inhibovat dva klíčové enzymy – acetylcholinesterasu (AChE, E.C. 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasu (BChE, E.C. 3.1.1.8). Z každé série byl dále vybrán nejperspektivnější inhibitor, který byl podroben molekulovému modelování na zmíněných enzymech.

U připravených sérií látek je kromě biologických dat a molekulového modelování dále diskutována závislost mezi strukturou inhibitorů a jejich biologickým účinkem. V případě série močovinných/thiomočovinných derivátů odvozených od takrin-7-MEOTA duálních inhibitorů byla pro nejúčinnější látky stanovena aktivita vůči monoaminoxidasám, NADH dehydrogenase a ovlivnění agregace/depolymerace beta-amyloidních proteinů (insulin, lysozym a A β ₁₋₄₀). Nejlepší látky v této sérii budou dále navrženy na *in vivo* toxicitní studii na zvířatech.

Abstract

Cholinesterase inhibitors have beneficial effects on cognitive, functional, and behavioural symptoms of Alzheimer's disease (AD). Up to date, they represent the only drugs approved by U.S: Food and Drug Administration for AD treatment. These include donepezil, rivastigmine and galantamine. Apart from the above mentioned cholinesterase inhibitors memantine is used for AD treatment as well, acting as *N*-methyl-D-aspartate antagonist drug.

Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine) was the first cholinesterase inhibitor to obtain a marketing authorisation in symptomatic treatment of AD. However, its several side effects (hepatotoxicity and gastrointestinal discomfort) limited tacrine broader usage. Novel tacrine derivatives are extensively investigated in endeavour to find less toxic compounds with „multi-target directed ligand“ profile affecting more pathological mechanisms.

As a part of these research efforts, 7-methoxytacrine (7-MEOTA) has been prepared as a less toxic derivate compared to tacrine with the same pharmacological profile.

Within this doctoral thesis, novel derivatives of tacrine and 7-MEOTA were synthesized, biologically evaluated for their cholinergic potential towards both cholinesterases – acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8). To rationalize findings from *in vitro* assay, the plausible orientation of the most perspective compounds in the active site of cholinesterases were computed and visualized.

Besides biological data and molecular modelling studies, the structure-activity relationships are also discussed. For the most promising analogues in the series of urea/thiourea derived from tacrine-7-MEOTA conjugates, we deal with *in vivo* toxicity assessments on animals, monoaminoxidase and NADH dehydrogenase activity as well as with determination of anti-amyloid activities (tested on insulin, lysozyme and A β ₁₋₄₀).

Seznam publikací

Předkládaná disertační práce vychází z níže uvedených publikací, které jsou uvedeny v textu arabskými číslicemi 1. – 11.

1. Špilovská, K.; **Korábečný, J.**; Kuča, K.; Musílek, K. Inhibitory gamma-sekretázy v terapii Alzheimerovej choroby. *Ceska Slov. Farm.* **2012**, *61*, accepted manuscript.
2. **Korábečný, J.**; Hrubá, E.; Soukup, O.; Zemek, F.; Musílek, K.; Nepovímová, E.; Opletalová V.; Kuča K. Zvažované farmakoterapeutické přístupy léčby Alzheimerovy choroby. *Ceska Slov. Farm.* **2012**, *61*, 4–10.
3. Soukup, O.; Žďárová-Karasová, J.; Patočka, J.; Jun, D.; Musílek, K.; Mandíková, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; **Korábečný, J.**; Krůšek, J.; Kaniaková, M.; Šepsová, V.; Pavlík, M.; Tobin, G.; Kuča, K. A resurrection of 7-MEOTA? The comparison with tacrine. *Curr. Alz. Res.* **2012**, *9*, under revision
4. Hroudová, J.; Fišar, Z.; **Korábečný, J.**; Kuča K. *In vitro* effects of acetylcholinesterase inhibitors and reactivators on Complex I of electron transport chain. *Neuroendocrinol. Lett.* **2011**, *32*, 259–263. (IF₂₀₁₀ = 1.621)
5. **Korábečný, J.**; Holas, O.; Musílek, K.; Pohanka, M.; Opletalová, V.; Dohnal, V.; Kuča, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene-linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 327–331. (IF₂₀₁₀ = 0.785)
6. **Korábečný, J.**; Musílek, K.; Holas, O.; Nepovímová, E.; Jun, D.; Zemek, F.; Opletalová, V.; Patočka, J.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Hroudová, J.; Fišar, Z.; Kuča, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of *N*-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules.* **2010**, *15*, 8804–8812. (IF₂₀₁₀ = 1.988)
7. **Korábečný, J.**; Musílek, K.; Zemek, F.; Horová, A.; Holas, O.; Nepovímová, E.; Opletalová, V.; Hroudová, J.; Fišar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuča, K. Synthesis and in

vitro evaluation of 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – new tacrine derivative with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6563–6566 + supporting information. (IF₂₀₁₀ = 2.661)

- 8.** **Korábečný, J.;** Janovec, L.; Musílek, K.; Zemek, F.; Horová, A.; Nepovímová, E.; Opletalová, V.; Hroudová, J.; Fišar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuča, K. Comparison of novel tacrine and 7-MEOTA derivatives with aromatic and alicyclic residues: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Lett. Org. Chem.* **2012**, *9*, under revision.
- 9.** **Korábečný, J.;** Musílek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalová, V.; Dohnal, M.; Kuča, K. Synthesis and in vitro evaluation of *N*-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6093–6095 + supporting information. (IF₂₀₁₀ = 2.661)
- 10.** **Korábečný, J.;** Nepovímová, E.; Janovec, L.; Horová, A.; Zemek, F.; Musílek, K.; Špilovská, K.; Opletalová, V.; Kuča, K. Novel and re-evaluated activities in the series of *N*-alkylated tacrine derivatives: synthesis, biological evaluation and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, under revision.
- 11.** **Korábečný, J.;** Hamuláková, S.; Janovec, L.; Hroudová, J.; Fišar, Z.; Babková, K.; Horová, A.; Gazova, Z.; Šipošová, K.; Kuča, K.; Musílek, K., Opletalová, V. Synthesis, anti-cholinesterase properties, β -amyloid inhibition assessment, monoamine oxidase and NADH dehydrogenase *in vitro* effects and molecular modeling studies of tacrine-7-methoxytacrine heterodimers for Alzheimer disease treatment. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, under revision.

OBSAH

1	ÚVOD	10
1.1	ALZHEIMEROVA CHOROBA - HISTORICKÝ NÁHLED.....	10
1.2	SOUČASNÝ STAV A PREVALENCE AD.....	11
1.3	RIZIKOVÉ FAKTORY AD.....	11
1.4	PATOLOGICKÉ NÁLEZY.....	12
1.4.1	<i>Neuritické plaky</i>	12
1.4.2	<i>Neurofibrilární klubka</i>	13
1.5	CHOLINERGNÍ TEORIE.....	14
1.6	CHOLINESTERASY.....	15
1.7	SOUČASNÁ TERAPIE.....	19
1.7.1	<i>Látky používané v klinické praxi</i>	19
1.7.2	<i>Zvažované terapeutické přístupy</i>	26
1.8	TAKRINOVÉ DERIVÁTY.....	27
1.8.1	<i>Monotakrinové inhibitory</i>	27
1.8.2	<i>Takrinové homodimery</i>	30
1.8.3	<i>Takrinové heterodimery</i>	32
1.9	7-MEOTA.....	40
2	CÍL PRÁCE	41
3	KOMENTÁŘ K PŘÍLOHÁM	42
3.1	SYNTÉZA A <i>IN VITRO</i> EVALUACE NOVÝCH TAKRINOVÝCH DERIVÁTŮ ODVOZENÝCH OD 7-MEOTA SPOJENÝCH DVĚMA UHLÍKOVÝMI ŘETĚZCI (PŘÍLOHA Č. 5).....	42
3.2	SYNTÉZA A <i>IN VITRO</i> HODNOCENÍ <i>N</i> -(BROMOBUT-3-EN-2-YL)-7-METHOXY-1,2,3,4-TETRAHYDROAKRIDIN-9-AMINU JAKO INHIBITORU CHOLINESTERAS V TERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY (PŘÍLOHA Č. 6).....	47
3.3	SYNTÉZA A <i>IN VITRO</i> EVALUACE 7-METHOXY- <i>N</i> -(PENT-4-ENYL)-1,2,3,4-TETRAHYDROAKRIDIN-9-AMINU – NOVÝ DERIVÁT TAKRINU S CHOLINERGNÍMI VLASTNOSTMI (PŘÍLOHA Č. 7)	52
3.4	SROVNÁNÍ NOVÝCH TAKRINOVÝCH A 7-MEOTA DERIVÁTŮ S AROMATICKÝMI A ALICYKlickými RESIDUI: SYNTÉZA, BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ (PŘÍLOHA Č. 8).....	58
3.5	SYNTÉZA A <i>IN VITRO</i> STANOVENÍ <i>N</i> -ALKYL-7-METHOXYTAKRIN HYDROCHLORIDŮ JAKO POTENCIÁLNÍCH INHIBITORŮ CHOLINESTERAS V ALZHEIMEROVĚ CHOROBĚ (PŘÍLOHA Č. 9).....	65
3.6	NOVÉ A RE-EVALUOVANÉ HODNOTY AKTIVIT V SÉRII <i>N</i> -ALKYL-TAKRINOVÝCH DERIVÁTŮ: SYNTÉZA, BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ STUDIE (PŘÍLOHA Č. 10).....	70
3.7	SYNTÉZA, ANTICHOLINERGNÍ VLASTNOSTI, STANOVENÍ INHIBICE AGREGACE B-AMYLOIDU, VLIV NA MONOAMINOXIDASU A NADH DEHYDROGENASU A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ STUDIE TAKRIN-7-METHOXYTAKRIN HETERODIMERŮ PRO LÉČBU ALZHEIMEROVY CHOROBY (PŘÍLOHA Č. 11)	79
4	ZÁVĚR	91
5	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	92
5.1	PUBLIKACE	92
5.2	ABSTRAKTY Z KONFERENCÍ	94
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	100

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (z angl. Alzheimer's disease)
AChE	acetylcholinesterasa
ChE	cholinesterasa
APP	prekurzor amyloidního proteinu
A_{dep}	depolymerizační aktivita
A_{inh}	inhibiční aktivita
BChE	butyrylcholinesterasa
$A\beta$	beta-amyloid
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
THA	takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin)
7-MEOTA	7-methoxytakrin
NMDA antagonist	antagonista působící na <i>N</i> -methyl-D-aspartátových receptorech
MAO	monoaminoxidas
IC_{50}	koncentrace testované sloučeniny, která způsobí pokles aktivity enzymu na 50% původní hodnoty
DC_{50}	koncentrace testované sloučeniny, která způsobí pokles množství testovaného amyloidního proteinu na 50% jeho původní hodnoty
SI	index selektivity

1 ÚVOD

1.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA - HISTORICKÝ NÁHLED

V roce 1906 německý psychiatr Alois Alzheimer poprvé diagnostikoval a definoval klinicko-patologický syndrom, který byl později nazván Alzheimerovou chorobou (Alzheimer's disease; AD). Při diagnostice onemocnění u jeho čtyřicetileté pacientky, Alois Alzheimer popsal její příznaky jako vzácnou presenilní demenci vyskytující se před 65 rokem života. Ani on a jeho kolegové však nerozlišili tuto novou chorobu od dobře známé a popsané senilní demence. Alzheimer doložil několik symptomatických příznaků tohoto onemocnění, které můžeme pozorovat dodnes u většiny pacientů s AD: progresivní ztráta paměti, narušené kognitivní funkce, změny v chování, narušení integrity jedince, halucinace, narušené sebeovládání a nakonec úpadek až ztráta mluveného i psaného projevu.¹

Až vynález elektronového mikroskopu v 60. letech 20. století vedl k objasnění histologických změn v mozku, které jsou fundamentální pro toto onemocnění: neuritické plaky a neurofibrilární klubka.² Jejich formování bylo popsáno až v polovině 70. let. Zjistilo se, že mají nepříznivý vliv na neurony vytvářející a uvolňující acetylcholin (ACh). Detailnější pozorování vedlo k závěrům, že tento nepříznivý vliv se týká přímo i enzymů, které mají úzký vztah k ACh. Zejména úbytek hladiny a aktivity cholin-acetyltransferasy (ChAT, EC 2.3.1.6), enzymu důležitého pro syntézu neuromediátoru ACh, a opačně působícího enzymu acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) v limbickém systému a mozkové kůře, byly spojovány se ztrátou cholinergních neuronů vybíhajících do subkortikální oblasti.³ Tato zjištění nastartovala farmakologický výzkum ve snaze zvýšit mozkové hladiny ACh v synaptických štěrbinách, předně inhibicí AChE, která degraduje ACh. Výzkum těchto látek na bázi inhibitorů AChE byl natolik úspěšný, že vedl k zavedení několika z nich do klinické praxe: takrin (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmin (Exelon®) a galantamin (Reminyl®).⁴

1.2 SOUČASNÝ STAV A PREVALENCE AD

AD patří mezi nejčastější formu demence. Její nepředvídatelnost a dosud neznámá etiologie ji činí stále palčivějším problémem lidstva, nejen po stránce zdravotní, ale i po stránce sociální či ekonomické. AD končí po 3 - 10 letech od stanovení diagnózy letálně.

Celosvětově zaujímá AD pátou nejrozšířenější příčinu úmrtí u lidí starších 65 let. Ačkoliv většiny běžných příčin úmrtí ubývá, případy smrti zapříčiněné AD dramaticky narůstají. Mezi lety 2000 a 2008 bylo zaznamenáno 66 % případů úmrtí způsobených AD. Pro srovnání, případů smrti kvůli srdečnímu selhání bylo okolo 13 %, mozkových mrtvic 20 % a úmrtí v důsledku rakoviny prostaty okolo 8 %.^{5,6}

V Americe je odhadováno 5,4 milionů pacientů s AD, přičemž 200 000 z nich je mladších 65 let (AD s časným začátkem), celkový počet demencí ve světě je v současné době odhadován ke 35,6 milionu lidí. Do roku 2050 se předpokládá nárůst až na 115,4 milionů pacientů.⁵ Nejrizikovější populací jsou osoby starší 85 let (více než 50 % případů AD). V České republice je odhadováno, že touto chorobou trpí přibližně 125 000 obyvatel; v rámci Evropské unie je to pak 6 milionů a toto číslo se s největší pravděpodobností do roku 2050 zdvojnásobí.⁷⁻¹⁰ Hlavní příčinou je zejména stárnoucí populace. Všechna výše zmíněná data podtrhují závažnost AD, přičemž dosud nebyla plně vyvinuta efektivní terapie. Hlavním důvodem proč se tak děje, jsou omezené znalosti základní patofysiologie AD. Ačkoliv v posledních 30 letech byl udělán obrovský pokrok na úrovni biologické, biochemické, toxikologické i v oblasti farmaceutického výzkumu, různě zvažované terapeutické postupy selhávají nebo přichází až příliš pozdě v průběhu nemoci.⁵

1.3 RIZIKOVÉ FAKTORY AD

Příčiny vzniku AD nejsou doposud zcela plně objasněny, je však známa celá řada rizikových faktorů přispívající k rozvoji AD. Nejvíce zatížená je zejména stárnoucí populace, ačkoliv je důležité podotknout, že AD není běžnou složkou stárnutí. Za hraniční je považován 65. rok života, po kterém dochází k největšímu nárůstu

incidence tohoto onemocnění. Na druhou stranu, i u lidí pod touto věkovou hranicí se může vyvinout AD, pak hovoříme o AD s časným začátkem (early-onset AD).⁵

Důležitou roli hraje genetické zatížení, rodinná historie a dědičnost. Bylo prokázáno, že jedinci s blízkým příbuzným (bratr, sestra, rodiče), u kterého byla diagnostikována AD, mají větší pravděpodobnost rozvoje AD než ti, u kterých se vyskytuje pouze u vzdálených příbuzných s AD.¹¹

AD je geneticky vázaná na přítomnost alely apolipoproteinu E ϵ 4 (ApoE ϵ 4). Ta se může vyskytovat ve třech isoformách, ϵ 2, ϵ 3 a ϵ 4, ale pouze ϵ 4 zvyšuje riziko vzniku AD v pozdějším věku a v některých sporadických případech AD, zatímco přítomnost ϵ 2 alely snižuje riziko rozvoje AD.¹²⁻¹⁴

Mezi další rizikové faktory patří kardiovaskulární choroby, poškození mozku traumatem, deprese, nízký stupeň dosaženého vzdělání jedince, kouření, nízké hladiny folátu a vitamínu B12, zvýšená koncentrace homocysteinu v plazmě, vysoké hladiny cholesterolu, diabetes 2. typu, vysoký krevní tlak, fyzická inaktivita a obezita. Všechny tyto výše zmíněné faktory podporují nejen vznik a rozvoj AD, ale podílí se i na etiopatogenezi jiných demencí a dalších onemocnění.¹⁵⁻²⁷

Na druhé straně je potřeba zmínit i faktory ochranné, které naopak riziko vzniku AD snižují. Mezi ně patří vyšší stupeň vzdělání jedince, pravidelné užívání protizánětlivých látek a látek snižujících hladiny cholesterolu (statiny), substituční terapie estrogenem v post-menopauzálním období, léčba antihypertenzivy a strava bohatá na ryby. S velkým otazníkem zůstává užití látek s antioxidačními vlastnostmi (vitamíny C a E).²⁸⁻³¹

1.4 PATOLOGICKÉ NÁLEZY

1.4.1 NEURITICKÉ PLAKY

Jeden z nejdůležitějších objevů v etiologii AD byl ten, že komponenty neuritických plaků v mozcích pacientů s AD se skládají z přibližně 40 aminokyselin. Tyto komponenty jsou dnes známé jako beta-amyloidní proteiny (A β). Jsou uloženy v podobě extracelulárních deposit ve tvaru hvězdicovitých fibrilárních shluků. Další

studie ve vztahu k A β podnítily rychlý vývoj ve výzkumu směřovaném k lepšímu pochopení podstaty AD a stanovení dalších potenciálních přístupů ve vývoji léčiv cílených na AD. Následné vědecké práce zjistily, že A β je produkt proteolytického štěpení prekursoru označovaného jako APP (amyloid precursor protein), který je postupně štěpen proteasami pojmenovanými jako β - a γ - sekretasa.^{32,33} APP, stejně jako trisomie u Downova syndromu, je kódován chromosomem 21 a vykazuje rovněž podobné histologické změny u pacientů s AD. Dochází ke zvýšené expresi mající za následek vzestup hladin A β .^{35,36} Štěpení APP se ukazuje jako heterogenní; vede ke vzniku A β o různé délce. Z nich jsou nejdůležitější 40 a 42 aminokyselinová residua (označovaná jako A β_{40} a A β_{42} , liší se v C-terminální části). Za fyziologických podmínek se převážně tvoří kratší varianta A β_{40} a přibližně okolo 5 – 15 % A β_{42} a jiných různě dlouhých A β . Oba dva fragmenty A β mají tendenci shlukovat se do různých tvarů.³⁷ V průběhu AD nejprve dochází k tvorbě rozptýlených plaků, nazývaných také jako preamyloidní, které jsou výhradně tvořeny z A β_{42} , později vzniká heterogenní směs plaků složených z různě dlouhých A β . Clearance A β je díky zvýšené expresi β -APP přetížena až dochází ke kumulaci neuritických plaků. Tyto agregáty A β pak působí přímo toxicky na buňky neuronů. Byla nalezena široká skupina látek schopná zabránit A β agregaci nebo dokonce rozpouštět oligomery, fibrily nebo plaky A β . Ty zpravidla působí přímo na shluky A β nebo nepřímo inhibicí β - a γ - sekretasy.³⁸⁻⁴⁰ Použití inhibitorů γ - sekretasy v klinické a preklinické praxi se nachází v Příloze 1.

1.4.2 NEUROFIBRILÁRNÍ KLUBKA

Neurofibrilární klubka jsou vedle neuritických plaků dalším charakteristickým znakem AD.⁴¹ Formování těchto klubek není nutně spojeno s výskytem neuritických plaků, ale u většiny případů jsou pozorovány obě histologické změny. Tato klubka se skládají z τ -proteinu, který je fyziologicky spřažen s mikrotubuly.⁴² τ -protein podporuje shlukování tubulinu v mikrotubuly a udržuje strukturu mikrotubulů pohromadě. Patří do skupiny fosfoproteinů a je tedy regulován mechanismem fosforylace. Hyperfosforylovaný τ -protein se v průběhu AD odděluje od mikrotubulů a dochází ke zvýšení jeho koncentrace v cytosolu. Následným dosažením kritické koncentrace polymerizuje v neurofibrilární klubka.⁴³ Přesná účast v patogenetickém

působení τ -proteinu není dosud přesně známa, jeho tvorba však, jak se zdá, působí zvýšení hladin $A\beta_{42}$ doprovázené tvorbou neuritických plaků.⁴⁴

1.5 CHOLINERGNÍ TEORIE

Cholinergní hypotéza představuje první a dodnes prakticky jedinou teorii vysvětlující podstatu vzniku AD a téměř všechna současně používaná léčiva k mírnění symptomatických projevů středně těžké a těžké formy AD se o ni opírají.^{45,46} Tato teorie vychází z poznatků ztráty cholinergní aktivity pozorované u pacientů s AD a z experimentálních studií na lidech a primátech, které našly úzkou souvislost mezi rolí neuromediátoru ACh a schopností učení a pamatování si.⁴⁷ Z blokády centrálního cholinergního systému skopolaminem u mladých jedinců lze vypočítat podobné příznaky demence jako v populaci jedinců zasažených AD. Tento paměťový deficit může být navrácen do normálního stavu použitím inhibitorů cholinesteras, např. fysostigminem.⁴⁸ Celá tato experimentální studie vedla ke klinickým studiím jiného typu látek, reversibilních inhibitorů cholinesteras, které zaznamenaly největší příslib pro léčbu deficitních paměťových funkcí u pacientů s AD (viz kapitola 1.7.1. Látky používané v klinické praxi).

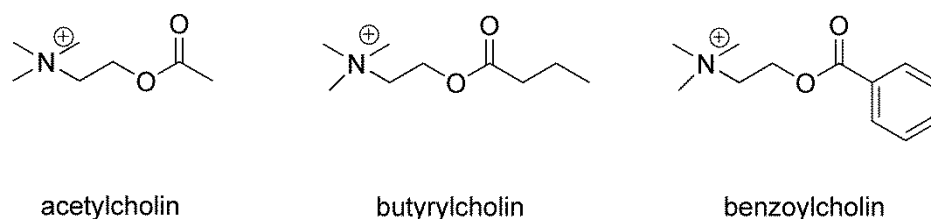
Při detailnějším pohledu na deficitní cholinergní systém při AD, byla pozorována narušená signalizace z populace neuronů vycházející z basální části předního mozku a Meynertova jádra do mozkové kůry a hippocampu. Rovněž koncentrace a aktivita ChAT zodpovědné za tvorbu ACh se v průběhu AD významně snižuje v oblastech mozkové kůry a hippocampu.⁴⁹⁻⁵¹ Ve stejných částech mozku pak bylo také potlačeno uvolňování ACh navozené depolarizací a dále byl snížen uptake cholinu do nervových zakončení, který je potřebný k doplnění syntetických zásob na přípravu nového ACh. Pokud vezmeme v úvahu, že prvotním ukazatelem AD jsou narušené paměťové funkce, pak výše zmíněná role ACh při cholinergní transmissi a jeho důležitost pro kognitivní funkce podporuje tyto závěry u AD.⁵² Všechna tato pozorování položila základ cholinergní teorii, kterou shrnul v roce 1982 ve své práci Bartus a kol.⁵³ Tato práce dodnes plně reflektuje vztah mezi cholinergní hypotézou, věkově závislou cholinergní dysfunkcí a demencí typu AD.

1.6 CHOLINESTERASY

Cholinesterasy (ChE) jsou skupinou esenciálních enzymů, které můžeme rozdělit do dvou podskupin na základě katalytických vlastností.

Enzym, který upřednostňuje rozklad (hydrolýzu) malých substrátů, jako je např. ACh (obr. 1) je nazýván acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7)

Enzym, který je schopný přizpůsobit se objemnějším substrátům jako je butyrylcholin nebo benzoylcholin (obr. 1) a katalyzovat jejich rozklad, je pojmenován jako butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8). BChE stejně jako AChE katalyzuje i hydrolýzu ACh (schéma 1).^{54,55}



Obr. 1 Některé substráty cholinesteras.

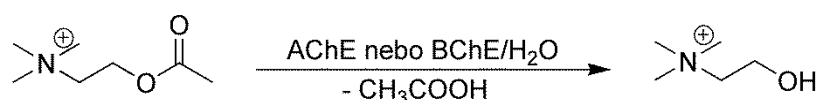
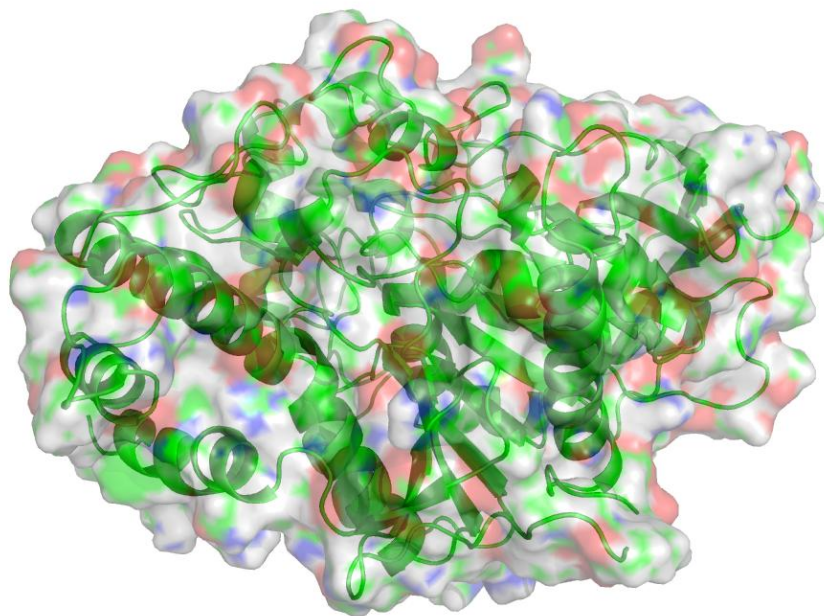


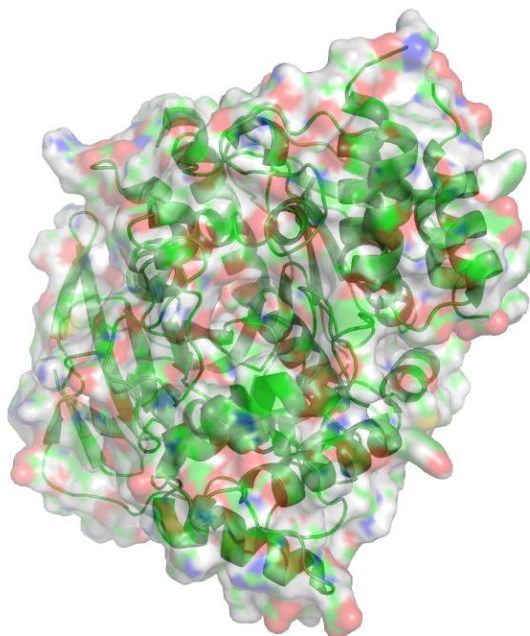
Schéma 1 Hydrolýza ACh katalyzovaná AChE nebo BChE.

Při zjišťování sekvence aminokyselin ChE se dospělo k závěru, že patří do velké skupiny obsahující ve své struktuře α/β -hydrolasové uskupení. To je např. společné pro různé lipasy, peptidasy, dehalogenasy a dokonce i adhesní proteiny. AChE i BChE (obr. 2, obr. 3) jsou si natolik podobné, že je prakticky neodmyslitelné popsat strukturu jedné bez odkázání se na druhý enzym. Obě cholinesterasy mají tři pevně zakotvené disulfidické můstky. Sekvence aminokyselin je dokonce pro lidskou BChE a AChE izolovanou z paúhoře elektrického (lat. *Electrophorus electricus*) z 54 % stejná. Hlavní rozdíl mezi oběma ChE je tvořen mírou *N*-glykosylace; AChE je méně glykosylována než BChE. Glykosylace ovlivňuje stabilitu a farmakokinetické

vlastnosti, nikoliv však katalytické schopnosti enzymu. Rozdíly v afinitě k jednotlivým substrátům jsou dány prostorovým uspořádáním aktivního místa obou výše zmíněných enzymů.⁵⁶



Obr. 2 Celkový náhled na lidskou AChE (PDB code: 1b41) v stužkovém vyobrazení (zeleně) a s lehce zvýrazněným povrchem. Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).



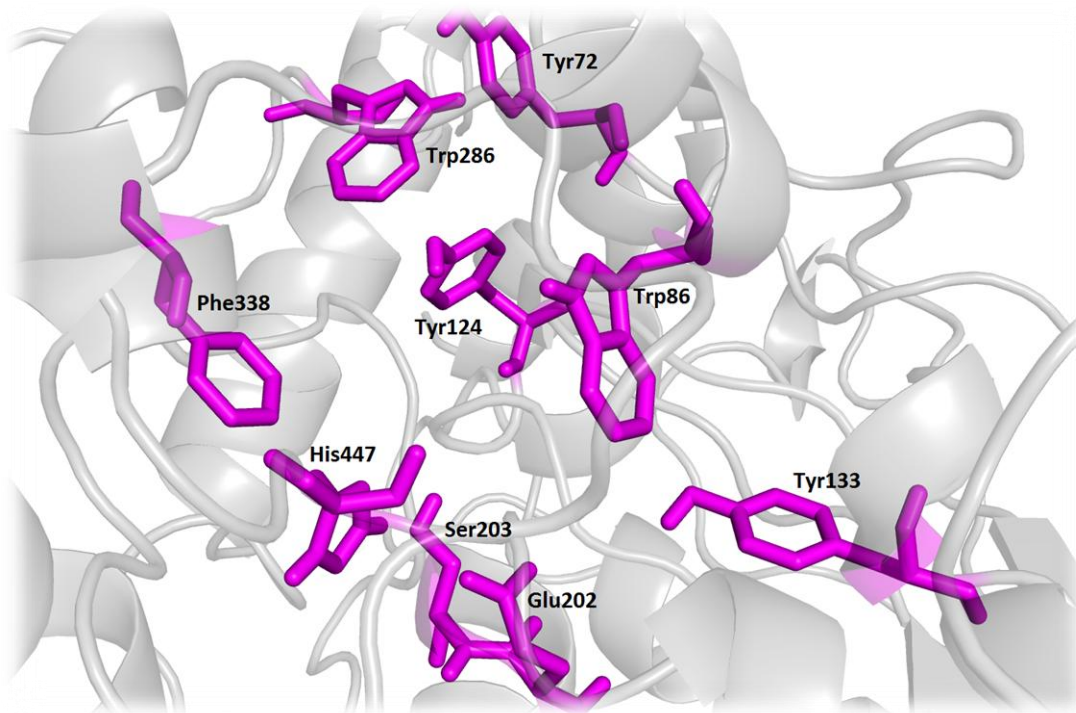
Obr. 3 Celkový náhled na lidskou BChE (PDB code: 1P01) v stužkovém vyobrazení (zeleně) a s lehce zvýrazněným povrchem. Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).

Aktivní místo obou enzymů se nachází v přibližně 20 nm hluboké, rovné kavitě a je tvořeno třemi základními uskupeními – tzv. acylačním, kation- π a periferním anionickým (aromatickým) místem.^{55,56}

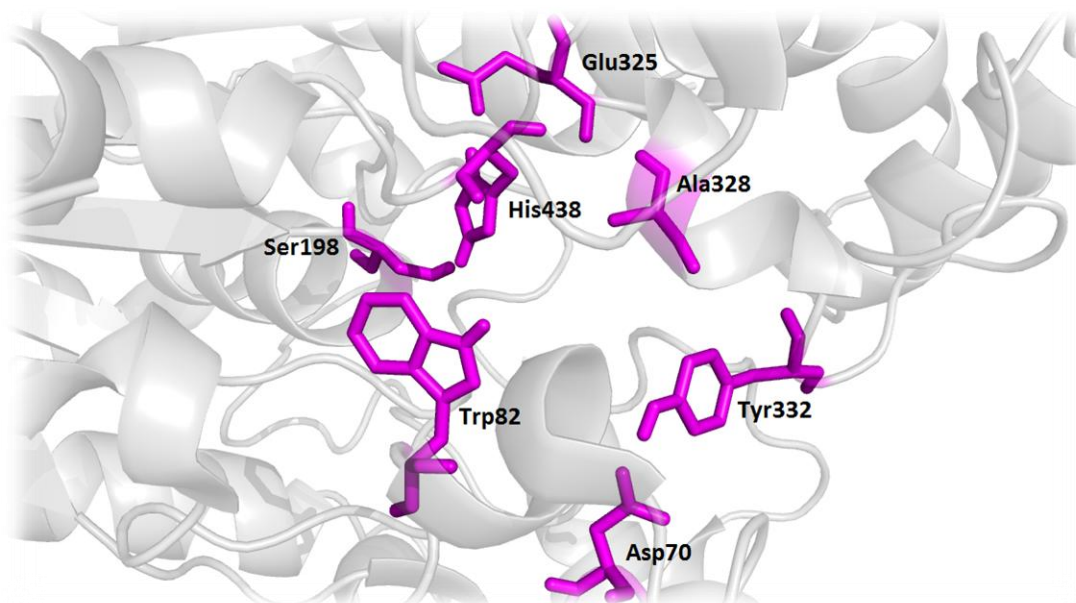
K hydrolýze substrátu dochází v acylačním místě, které je tvořeno katalytickou triádou aminokyselin; pro lidskou AChE Ser203, Glu202 a His447, pro lidskou BChE Ser198, Glu325 a His438.⁵⁷ Vstup do aktivního místa je lemován četnými aromatickými residui.

Kation- π místo pro AChE je tvořeno Trp86 a Phe338 a je zodpovědné za ne vazebné interakce typu Coulombických sil mezi aromatickým systémem této části a kladným nábojem kvartérní dusíkové skupiny. Důležitou roli v této oblasti enzymu hraje i Tyr133, který přímo interaguje s Trp86 a podílí se na stabilizaci kation- π konformace po navázání substrátu. V lidské BChE je tato část zastoupena Trp82 a Ala328. Absence Phe v BChE oproti AChE ovlivňuje afinitu k některým inhibitorům.^{58,59} S kation- π místem mohou reagovat i ligandy bez kladného náboje, není určeno pouze pro nabité ligandy.⁶⁰

Klíčovými aminokyselinovými zbytky pro periferní anionické místo v AChE jsou Tyr72, Tyr124 a Trp286. Všechny tři jsou situovány při okraji kavity, tedy vstupu do aktivní části enzymu. V periferním anionickém místě u BChE tato tři aromatická rezidua chybí, dá se přímo říci, že toto místo není vůbec přítomno. To vysvětluje i slabší afinitu specifických AChE substrátů, jako je např. fascikulin (hadí jed) nebo propidium (selektivní inhibitor periferního anionického místa AChE) k perifernímu anionickému místu BChE. Další studie odhalily, že toto místo v BChE je tvořeno Asp70 a Tyr332. Důležitá, výše zmíněná aminokyselinová rezidua pro AChE a BChE jsou znázorněna na obrázcích 4 a 5.⁵⁸⁻⁶⁰



Obr. 4 Prostorové rozložení aminokyselinových reziduí lidské AChE (označena fialově), enzym je vyobrazen ve stužkové orientaci (šedivě). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).



Obr. 5 Prostorové rozložení aminokyselinových reziduí lidské BChE (označena fialově), enzym je vyobrazen ve stužkové orientaci (šedivě). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).

S ohledem na katalytickou funkci, jsou ChE cílem různých reversibilních, ireversibilních nebo pseudo-ireversibilních inhibitorů. Mezi reversibilní inhibitory můžeme zařadit aromatické terciární aminy, např. takrin nebo donepezil (viz dále), pseudo-ireversibilní mohou interagovat silnou vazebnou interakcí s katalytickým serinem (např. fysostigmin, rivastigmin) a skupina ireversibilních inhibitorů je zastoupena organofosforovými sloučeninami, jejichž působení na ChE a celý organismus je život ohrožující (např. nervově paralytické látky sarin, soman, tabun nebo VX či pesticid paraoxon).⁵⁴

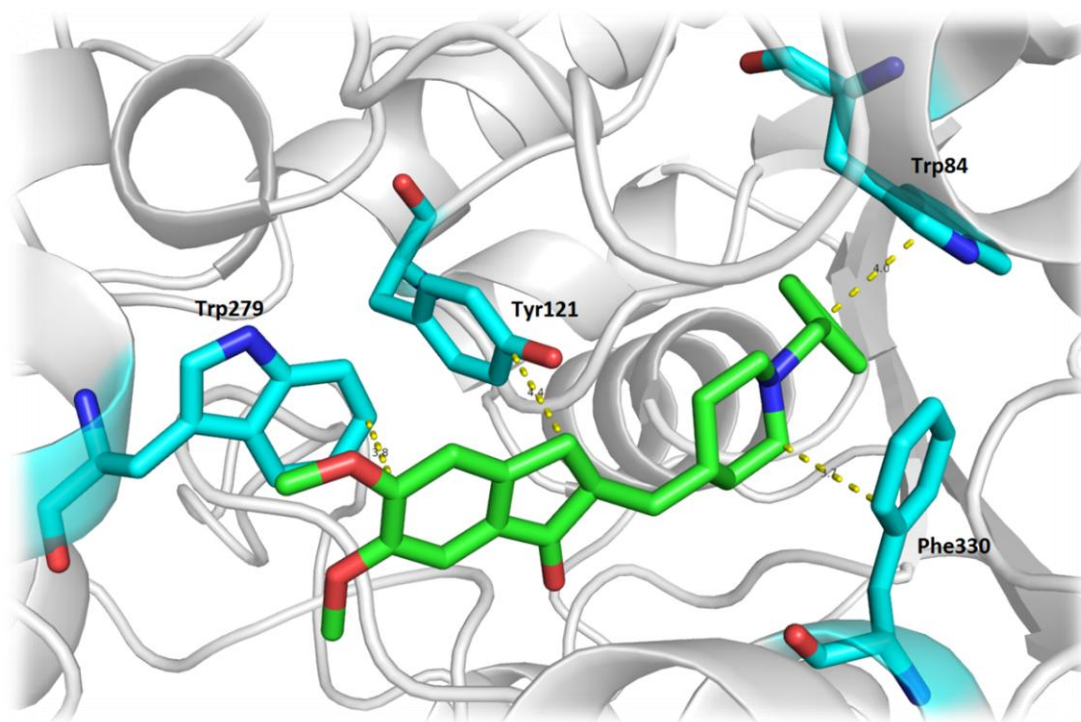
1.7 SOUČASNÁ TERAPIE

1.7.1 LÁTKY POUŽÍVANÉ V KLINICKÉ PRAXI

Donepezil

Donepezil ((*RS*)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on, tab. 1) je dodnes považován za jedno z nejúčinnějších a nejbezpečnějších léčiv zavedených pro boj s AD. Jedná se o selektivní inhibitor AChE používaný k léčbě lehkých a středně těžkých forem AD. Stejně jako ostatní inhibitory AChE zpomaluje průběh onemocnění a do jisté míry léčí symptomy, ale nedokáže zcela zastavit progresi AD.^{61,62} Kromě výše zmíněného inhibičního působení na AChE, donepezil zmírňuje příznaky neurotoxicity navozené A β a pozitivně ovlivňuje proces štěpení APP.⁶³ Donepezil vstupuje do kortikálních neuronů a tím narušuje mechanismus, který vede k tvorbě A β .⁶⁴ Tato látka up-regulací ovlivňuje nikotinové receptory v kůře, dochází tak ke zvýšení jejich exprese, čímž je alespoň částečně zabráněno progresi AD. Současně je díky účinkům donepezilu redukována i hladina glutamátu, důležitého neurotransmiteru, který při patologických stavech jako je AD, působí neurotoxicky.⁶⁵ Donepezil má dále vliv i na expresi AChE, kdy zvyšuje tvorbu isoformy AChE-S, zatímco syntéza isoformy AChE-R je potlačena. I tento proces pozitivně ovlivňuje neuroprotektci.⁶⁶ Mezi jeho další vlastnosti patří i antioxidantní působení, tedy schopnost ničit ROS, a zlepšení reologických vlastností krve.⁶⁷⁻⁶⁹ Na trhu je od roku 1996 známý např. pod komerční značkou Aricept®. Mezi nežádoucí účinky lze zařadit pouze gastrointestinální potíže, které však jen v ojedinělých případech vyústí v přerušení léčby. Další vlastnosti donepezilu jsou shrnuty v tabulce

1 a jeho prostorová orientace v AChE z *Torpedo californica* (PDB code: 1e3q; pacifický elektrický úhoř) je znázorněna na obrázku č. 6.⁷⁰

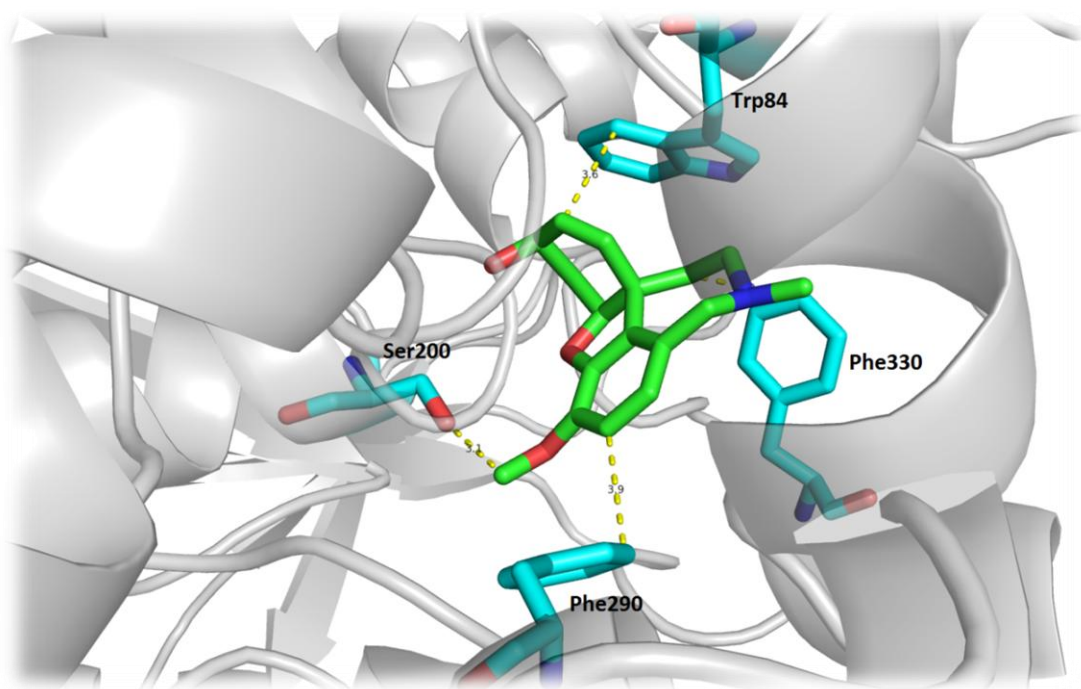


Obr. 6 Prostorová orientace donepezilu v AChE z *Torpedo californica* a významné interakce s aminokyselinovými rezidui (PDB code: 1e3q). Převažují interakce typu π - π vazeb. Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).⁷⁰

Galantamin

Galantamin ((4a*S*,6*R*,8a*S*)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-4a*H*-[1]-benzofuro-[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol, tab. 1) je selektivní, reversibilní inhibitor AChE. Jedná se o přírodní alkaloid, který byl poprvé izolován ze sněženky (*Galanthus woronowii*) a jeho přítomnost byla potvrzena v cibulkách různých druhů čeledi *Amaryllidaceae*.⁷¹ Kromě zmíněného inhibičního působení vůči AChE, galantamin taktéž působí jako alosterický modulátor na N-receptorech. Váže se na opačnou stranu receptoru než ACh a způsobuje tak konformační změny na tomto receptoru.⁷² Celý proces potencuje N-receptory a výsledkem je zesílená postsynaptická odpověď.⁷³ Presynaptické N-receptory mají důležitou roli nejen na potenciaci uvolňování ACh, ale regulují i hladiny dalších transmiterů jako jsou např. γ -aminomáselná kyselina, glutamová kyselina, serotonin a noradrenalin; všechny

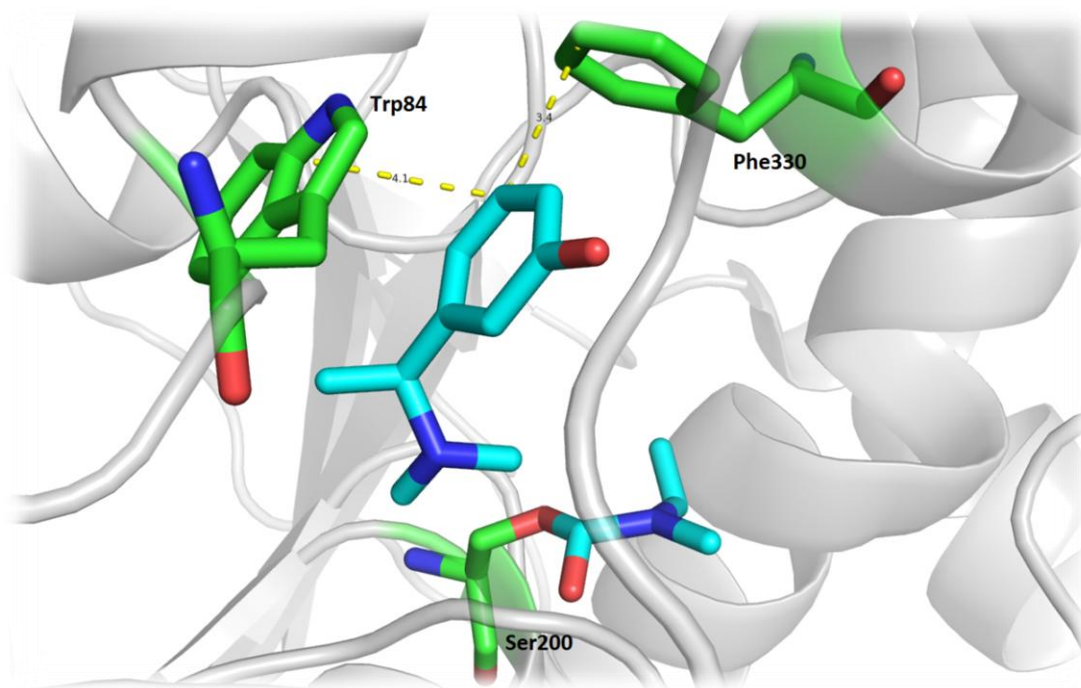
tyto neuromediátory jsou důležité pro kontrolu nad paměťovými funkcemi a mají i značný vliv na náladu a emoce.^{74,75} V průběhu AD mohou snížené hladiny glutamátu vyústit v poruchy učení a paměti, zatímco patologicky nižší koncentrace serotoninu přispívá k narušené emoční rovnováze (pozn. většina pacientů s AD trpí depresivními stavy). Pro výše zmíněné výhody je v současné době pro terapii AD nejvíce preferován právě galantamin. Absorpce galantaminu po perorálním podání je 100%. Současný příjem potravy nemá vliv na míru absorpce, pouze ji zpomalí. Podobně jako většina ostatních inhibitorů AChE má velký distribuční objem a tudíž i tendenci zadržovat se v tkáních lidského organismu. Stejně jako donepezil, galantamin má zejména gastrointestinální nežádoucí účinky, vedle toho vykazuje i anorektické působení, které však zřídka zabráni dlouhodobějšímu terapeutickému využití.⁷⁶ Na obrázku 7 je vyznačena prostorová orientace v aktivní části AChE izolované z *Torpedo californica* (PDB code: 1dx6).⁷⁷ Galantamin je na trhu od roku 2001 pod komerční značkou Reminyl®.



Obr. 7 Prostorová orientace galantaminu v AChE z *Torpedo californica* a významné interakce s aminokyselinovými rezidui (PDB code: 1dx6). Vedle π - π interakce (aromatická část galantaminu s Phe290) je k vidění vodíkový můstek mezi Ser200 a hydroxy skupinou galantaminu a alifatická- π interakce s Phe330 a Trp84. Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).⁷⁷

Rivastigmin

Rivastigmin ((*S*)-3-[1-(dimethylamino)ethyl]fenyl-*N*-ethyl-*N*-methylkarbamát, tab. 1) je reversibilní inhibitor cholinesteras určený pro symptomatickou léčbu středně těžkých až těžkých stádií AD. Používá se formě rozpustného tartarátu. Oproti všem ostatním inhibitorům AChE je neselektivní vůči oběma cholinesterasám, což je výhodné zejména v pozdějších stádiích AD, kdy hladina BChE vzrůstá, zatímco koncentrace AChE klesá.^{78,79} Patří do skupiny karbamátů a má acylační účinek v aktivní části enzymu. Rovněž i u této látky se podobně jako u předchozích dvou objevují zejména gastrointestinální nežádoucí účinky (zvracení, nevolnost, průjem, anorexie), které však mohou být redukovány častějším dávkovacím schématem.⁸⁰ Obrázek 8 znázorňuje prostorové uspořádání rivastigminu v AChE z *Torpedo californica* (PDB code: 1gqr).⁸¹ Na trhu se rivastigmin nachází od roku 2000 pod značkou Exelon®.



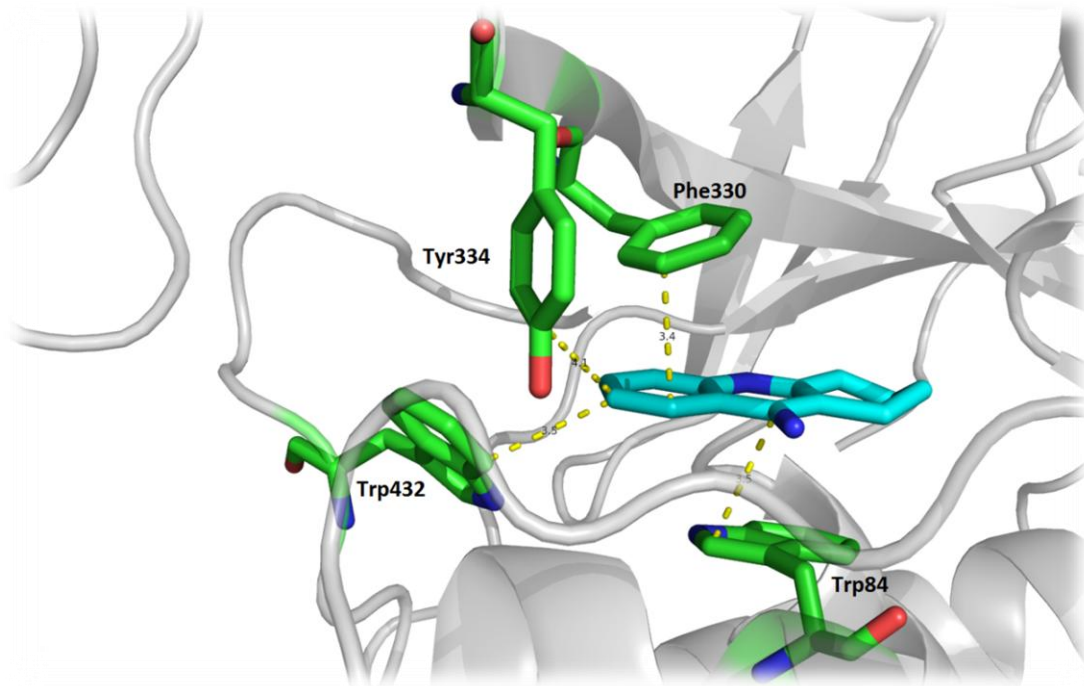
Obr. 8 Prostorová orientace rivastigminu v AChE z *Torpedo californica* a významné interakce s aminokyselinovými rezidui (PDB code: 1gqr). Ser200 je acylován karbamátovou částí rivastigminu, zatímco zbytek molekuly inhibitoru zůstává v kavitě stabilizován π - π interakcemi s Trp84 a Phe330. Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).⁸¹

Takrin

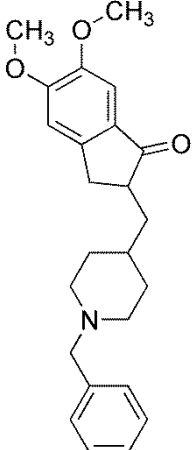
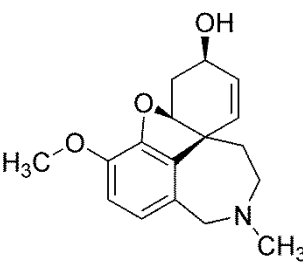
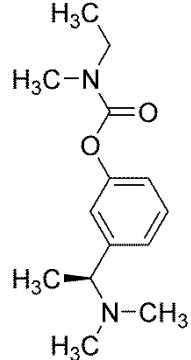
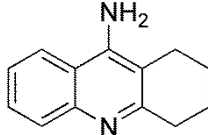
Takrin (1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin, tab. 1) je reversibilní, střednědobě působící inhibitor obou cholinesteras, který je známý více než 60 let.⁸² Původně byl vyvinutý jako antibakteriální agens z řady akridinových derivátů, později se však ukázalo, že je velmi slabé baktericidum s jinými vystupňovanými účinky.⁸³ První farmakologické studie popisují analeptické účinky takrinu na morfinizovaných zvířatech.⁸⁴ Jeho cholinergní vlastnosti byly rozpoznány až roku 1961 pracovní skupinou Heilbronna. Ti došli mimo jiné k závěru, že takrin je silnější inhibitor BChE než AChE. Byl často používán jako antidotum kurare a pro tlášení neústupné bolesti. Mezi jeho další ať už zvažované nebo dříve používané indikace patří myasthenia gravis, antidepresivní působení (podobnost s tricyklickými antidepresivy), tardivní dyskineze nebo předávkování anticholinergiky.⁸⁵

Jedná se o první inhibitor AChE zavedený do klinické praxe v roce 1993. Často se používal v kombinaci s lecitinem.^{86,87} Krystalografické studie vazby takrinu s AChE ukázaly interakci takrinu s katalytickým místem AChE.⁸⁸ Mezi jeho důležité vlastnosti patří schopnost interagovat s muskarinovými (M) receptory s afinitou 100 × větší než k N receptorům. Takrin tak zvyšuje uvolňování ACh stimulací M₁ receptorů.⁸⁹ Dále působí inhibičně i vůči oběma isoformám monoaminoxidasy (MAO). Jak bylo později prokázáno, inhibicí MAO-A lze zabránit depresivním stavům a stejným působením na MAO-B lze zabránit tvorbě ROS.⁹⁰ Takrin dále inhibuje re-uptake dopaminu a serotoninu na nervových zakončeních. I tyto efekty přispívají k antidepresivnímu působení.⁹¹

Používání takrinu vyžaduje častější dávkovací schéma (tabulka 1), dlouhodobější titraci hladin v krvi a monitorování hladin jaterních enzymů.⁹² Takrin se dnes pro svůj nízký terapeutický index daný zejména častými případy hepatotoxicity a vážnými gastrointestinálními potížemi nepoužívá.^{93,94} Na obrázku 9 je naznačena prostorová konfigurace takrinu v aktivní části AChE z *Torpedo californica* (PDB code: 1acj).⁹⁵ Na trhu byl znám pod chráněným názvem Cognex®.



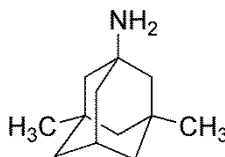
Obr. 9 Prostorová orientace takrinu v AChE z *Torpedo californica* a významné interakce s aminokyselinovými rezidui. Takrinový skelet se nachází v periferní anionické části mezi Trp84 a Phe330. Amino skupina v poloze 9 je stabilizována vazbou ke dvěma molekulám vody (není zobrazeno). Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.) (PDB code: 1acj).⁹⁵

Název	Donepezil	Galantamin	Rivastigmin	Takrin
Struktura				
Chemická klasifikace	Piperidinový derivát	Isochinolinový alkaloid	Karbamát	Akridinový derivát
Cílový enzym	AChE	AChE	AChE i BChE	AChE i BChE
Typ inhibice	Nekompetitivní, rychle reversibilní	Nekompetitivní, rychle reversibilní	Nekompetitivní, pomalu reversibilní	Nekompetitivní, rychle reversibilní
Metabolismus	CYP2D6 a 3A4	CYP2D6 a 3A4	AChE a BChE	CYP1A2
Dostupné lékové formy	Tablety	Tablety, roztok, tablety s řízeným uvolňováním	Transdermální náplasti, roztok, kapsle	Kapsle
Plasmatický poločas	70 h	7 h	3h (náplast), 1h (kapsle)	6 h

Tab. 1 Inhibitory AChE v klinické praxi a jejich vlastnosti.

Memantin

Memantin (3,5-dimethyladamantan-1-amin, obr. 10) se zcela vymyká ostatním látkám svým mechanismem působení. Jedná se o nekompetitivního antagonistu *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů se střední afinitou. Při normálních hladinách glutamátu inhibuje receptor pouze slabě, při zvýšených hladinách glutamátu inhibuje receptor výrazněji. Celý jeho mechanismus účinku lze označit za neuroprotektivní. Kromě AD se zvažuje i k léčbě Parkinsonovy choroby, epilepsie, traumat CNS, amyotrofní laterální sklerózy, drogové závislosti a chronické bolesti.⁹⁶⁻⁹⁸ Na trhu je od roku 2002 pod názvem Ebixa®.



Obr. 10 Memantin zastupující skupinu NMDA antagonistů v léčbě AD.

1.7.2 ZVAŽOVANÉ TERAPEUTICKÉ PŘÍSTUPY

Další sloučeniny testované jako potenciální léčiva k terapii AD jsou shrnuty v Příloze 2.

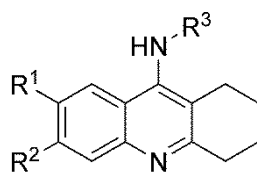
1.8 TAKRINOVÉ DERIVÁTY

Od první syntézy takrinu (1945) bylo připraveno velké množství takrinových analogů, které byly testovány nejen pro svůj potenciál v léčbě AD.⁸³ Současně připravované deriváty s ohledem na AD lze rozdělit do tří skupin. První je zastoupena monotakrinovými deriváty, kde je různě modifikován základní skelet. Druhou, početnější skupinu prezentují homodimery takrinu, látky mající převážně pouze inhibiční působení na ChE, zpravidla složené na jedné i druhé straně ze stejného základu. Třetí skupinou, která v posledních letech zaznamenala největší nárůst je představována heterodimery takrinu. Zejména poslední jmenovaná sdružuje látky s různým farmakologickým účinkem, zpravidla výhodným pro léčbu AD. Homodimery i heterodimery jsou shodně připravovány na podkladě poznatků o duální inhibici AChE. Ta je výhodná zejména díky zesílenému účinku na AChE (nM hodnoty IC_{50}) a zpravidla i dlouhodobějšímu působení. Další výhodou přímo související s duální inhibicí těchto látek je schopnost zamezit formování fibril proteinu A β indukovaného prostřednictvím periferní anionické části AChE. Spojení dvou látek s rozdílným farmakologickým profilem má však i další nesporné výhody. Předně vzniká nová entita schopná rozpoznat další cíle, které ovlivňují patologii dané nemoci, což je výhodné u multifaktoriálních onemocnění tedy i u AD. Design takových léčiv není jednoduchou záležitostí. Často je připravena látka, která ovlivňuje jiné části organismu a vyvstanou tak nové nežádoucí účinky. V úvahu je třeba brát i dávkovací schéma.

1.8.1 MONOTAKRINOVÉ INHIBITORY

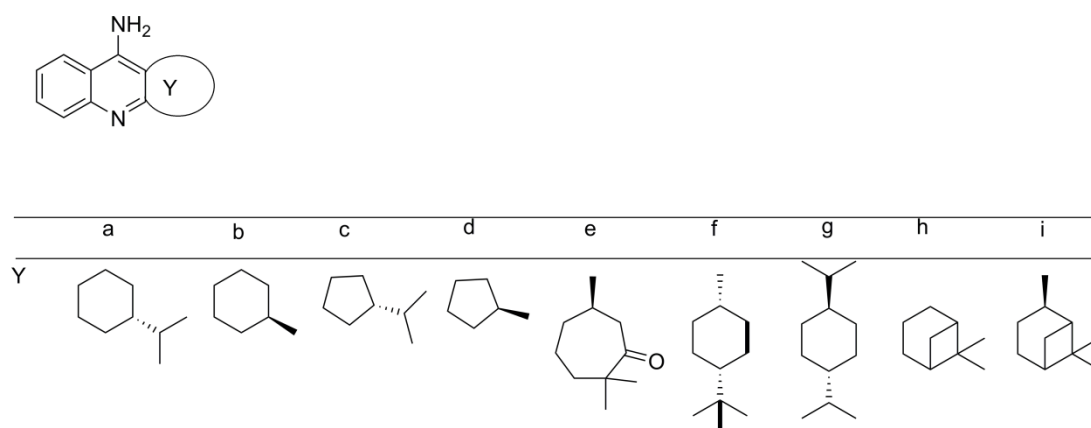
Velká srovnávací studie monotakrinových inhibitorů byla provedena Recanatinim a kol. Deriváty se lišily substitucí v poloze 6, 7 a 9 takrinového skeletu. Nejvyšší afinitu k AChE ukázala analoga substituovaná v poloze 6 CH_3^- , NO_2^- nebo Cl skupinami (nejvyšší 6-Cl: $IC_{50} = 0.0099 \mu M$). Zavedení Cl do obou poloh základního skeletu (6 i 7) vedlo k látkám s nízkou účinností. Objemné substituenty v poloze 9, jako je např. benzyl, rovněž snižují afinitu k AChE; naopak *n*-heptyl v této poloze zvyšuje účinnost.⁹⁹ Pro polohy 6 a 7, elektronakceptorové substituenty zvyšovaly

účinnost, zatímco elektrondonorové substituenty snižují inhibiční potenciál (obr. 11).



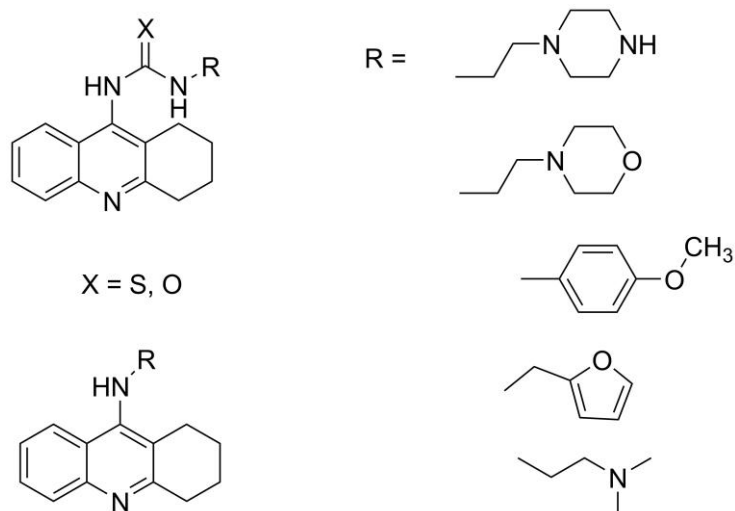
Obr. 11 Monotakrinové deriváty podrobené SAR studii.⁹⁹ R^1 , R^2 = CH_3 ; H; Cl; NO_2 ; R^3 = H, benzyl, heptyl.

Chirálními terpenickými monotakriny a jejich aktivitou se zabýval Pisoni a kol. (obr. 12).¹⁰⁰ Výchozí látkou pro syntézu byl keton v opticky aktivní formě. Objemnější substituenty v poloze 1 vyústily v méně účinné inhibitory AChE. Zajímavý inhibiční potenciál vykázal sedmičlenný derivát s karbonylovou funkcí **e** (derivát **e**: IC_{50} = 0.288 μM), látka **d** dokonce převýšila inhibiční schopnost takrinu (IC_{50} = 0.061 μM).



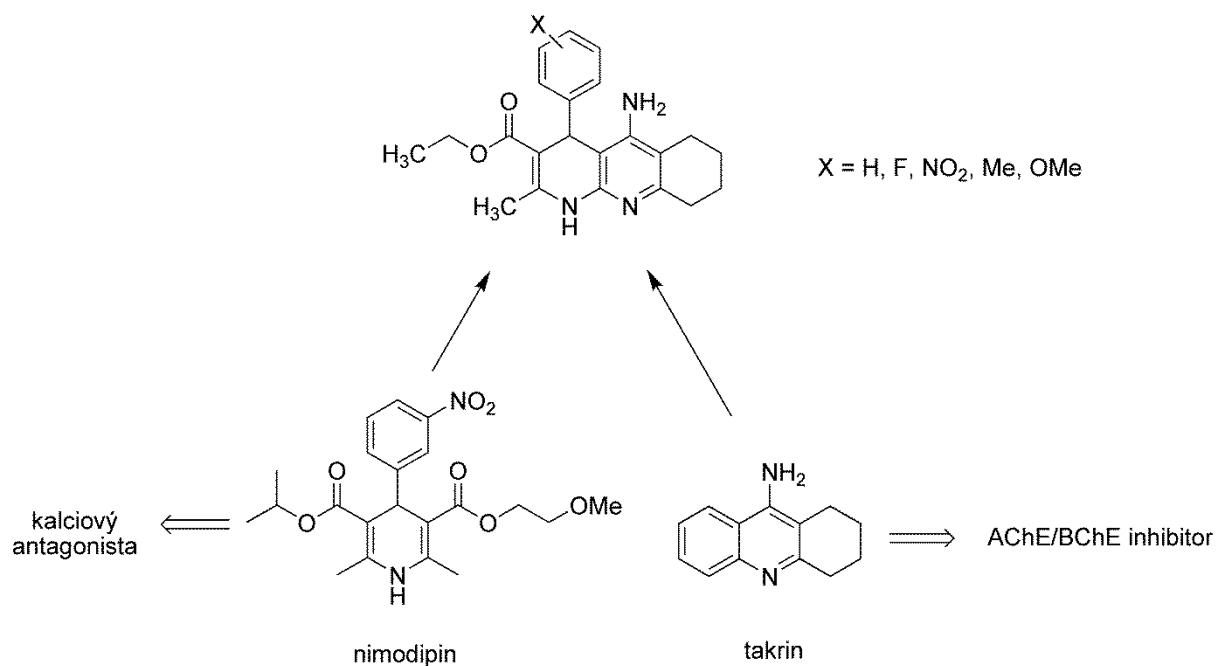
Obr. 12 Monotakriny připravené z chirálních terpenických cyklanonů.

Další sérií látek, připravených slovenským pracovištěm v Košicích, jsou monotakrinové deriváty lišící se substitucí v poloze 9.¹⁰¹ Porovnávány jsou thiomocovinové nebo mocovinové deriváty vázané na základní skelet takrinu. Sledován je rovněž vliv připojeného heterocyklického systému nebo dimethylaminoskupiny (obr. 13). Nejvyšší afinitu k AChE prokázal morfolinový derivát navázaný přes mocovinovou funkční skupinu (IC_{50} = 0.972 μM) k takrinovému základu; furanový derivát vázaný přes methylenový můstek k amino skupině takrinu vykázal nejlepší hodnotu IC_{50} k BChE (0.0204 μM).



Obr. 13 Takrinová analoga připravená substitucí v poloze 9.

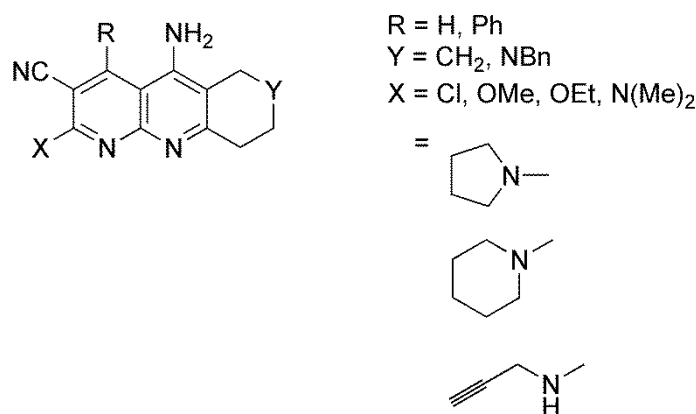
Takrindihydropyridinovou řadu (zkráceně takripyriny) lze považovat za přechod od monotakrinů k duálně působícím inhibitorům AChE. Jak již název těchto sloučenin napovídá, jedná se o sérii látek sdružující jak inhibičně působící část molekuly vůči ChE (takrin), tak i dihydropyridinové uskupení antagonisticky působící na kalciovém kanálu (obr. 14). Blokátory kalciového kanálu mají silný neuroprotektivní účinek, který zůstává zachován i v molekule takripyrinů.^{102,103}



Obr. 14 Takrindihydropyridiny – látky připravené spojením takrinu a 1,4-dihydropyridinu.

Takripyriny mající na benzenovém jádře v poloze 3 methoxy skupinu prokázaly nejvyšší účinnost vůči AChE ($IC_{50} = 58 \text{ nM}$). Všechny inhibitory v této sérii shodně vykazovaly vysokou selektivitu k AChE.^{102,103}

Další početnou skupinu takrinových látek představují inhibitory AChE s nitrilovou skupinou v poloze 7 (obr. 15). Vysokou účinnost i selektivitu k AChE měl derivát s dimethylaminovým uskupením v poloze 6 ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$). Podobně jako předchozí série takripyrinů, i tyto látky byly testovány pro svůj neuroprotektivní potenciál.¹⁰⁴



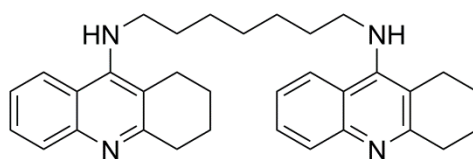
Obr. 15 Monotakriny s nitrilovou skupinou v poloze 7.

Bezesporu nejzajímavější sérií v oblasti monotakrinových látek jsou hupriny (obr. 19). V jejich struktuře můžeme nalézt jak takrinový, tak i huperzinový fragment (více o huperzinu dále). V rámci studie vztahů mezi strukturou a účinkem byla připravena velká řada derivátů lišící se v substituci v takrinové i huperzinové části molekuly. Tato analoga předčila referenční látky (huperzin A, takrin) nejen v inhibičních vlastnostech vůči AChE a BChE, ale i dalších biologických vlastnostech (inhibice agregace A β , antioxidační vlastnosti, chelatace těžkých kovů aj.).¹⁰⁵⁻¹⁰⁹

1.8.2 TAKRINOVÉ HOMODIMERY

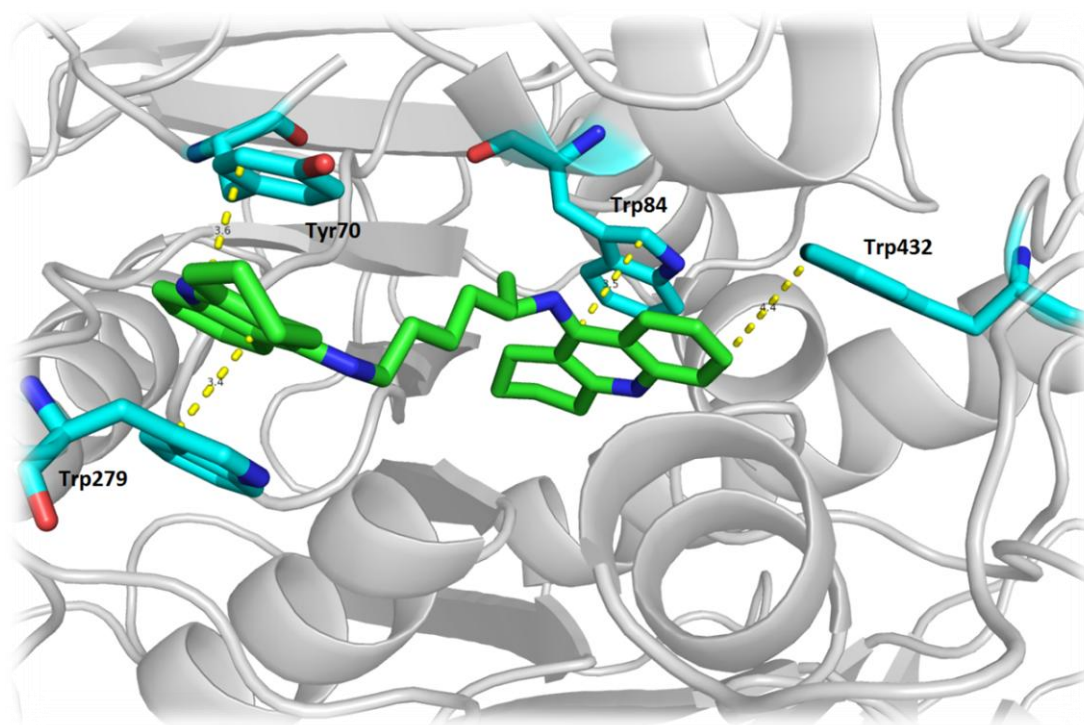
První homodimery takrinu byly nejprve navrženy a následně i připraveny Pangem a kol. v roce 1996.¹¹⁰ Předlohou strukturou se stal bis-7-takrin ($IC_{50/AChE} = 0.81 \text{ nM}$, $IC_{50/BChE} = 5.66 \text{ nM}$) (obr. 16). Metodou molekulového modelování byla simulována jeho prostorová orientace v AChE z *Torpedo californica* (obr. 17).¹¹¹ Preklinické studie odhalily nízkou perorální dostupnost bis-7-takrinu kvůli špatnému přechodu

přes intestinální bariéru a vysokou míru hepatální transformace. Po i. m. aplikaci dosáhl maxima plasmatické koncentrace za 15 minut a snadno prostoupil hematoencefalickou bariérou. Bis-7-takrin splňuje předpoklad duální inhibice – váže se v periferním anionickém místě i katalytickém místě AChE (obr. 17).¹¹¹ Z dalších účinků lze zmínit i slabé neuroprotektivní vlastnosti docílené inhibicí NMDA receptorů a neuronální NO synthasy. Mezi jeho pozitivní účinky lze zařadit i inhibici β -sekretasy (BACE-1) a antagonismus na GABAerních receptorech typu A.¹¹²⁻¹¹⁴



bis-7-takrin

Obr. 16 Bis-7-takrin – první duální inhibitor AChE připravený v roce 1996.

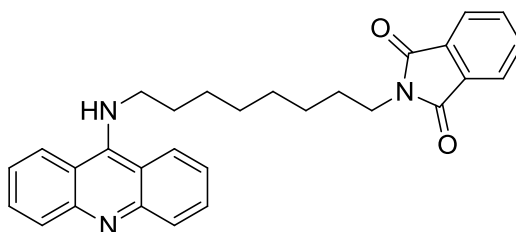


Obr. 17 Prostorová orientace bis-7-takrinu v AChE z *Torpedo californica* (PDB code: 2ckm) a významné interakce s aminokyselinovými rezidui. Látka působí v periferním anionickém místě (Trp279, Tyr70) i katalytické části enzymu (Trp84, Trp432) a svou délkou mezi oběma takrinovými částmi dává látce charakter duálního inhibitoru. Vzdálenost je udávána v angstromech (Å). Obrázek byl vytvořen pomocí PyMol viewer (v. 1.3.).¹¹¹

1.8.3 TAKRINOVÉ HETERODIMERY

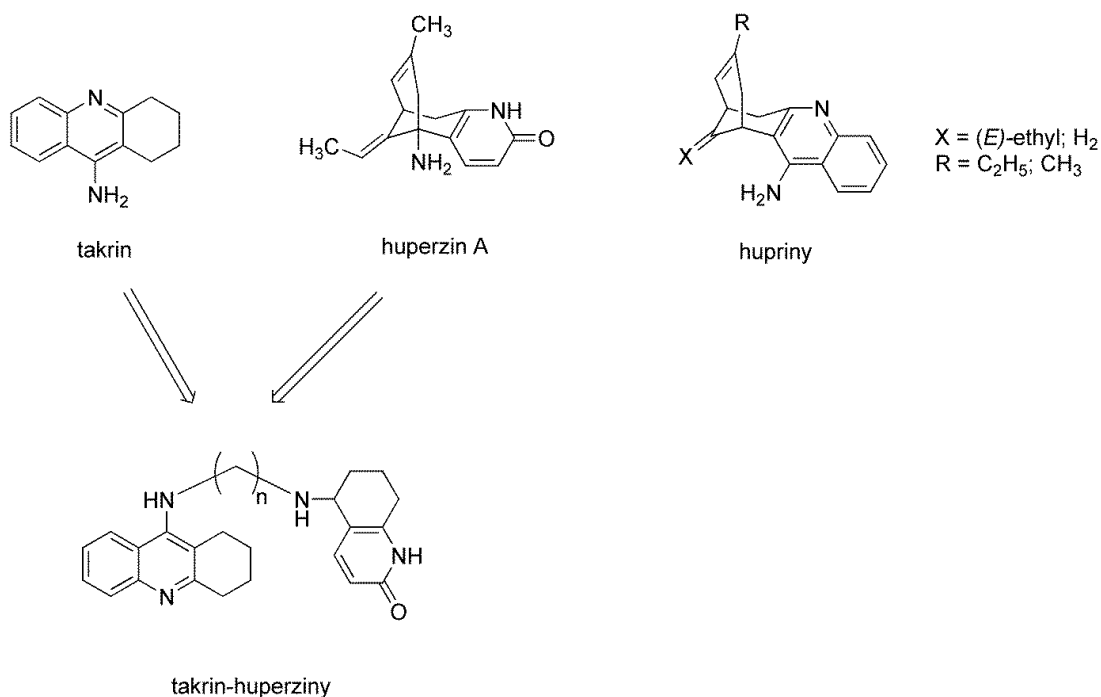
Takrinové heterodimery představují nejširší a v současnosti nejvíce studovanou skupinu látek. Podnět k jejich výzkumu přinesla syntéza a následně zjištěné biologické vlastnosti bis-7-takrinu. Základní skelet takrinu bývá u některých derivátů v této skupině nahrazen 6-chlortakrinem, který výrazněji inhibuje AChE ($IC_{50} = 8.32$ nM).^{115,116}

Na průkopnickou studii s bis-7-takrinem navázaly další práce, v kterých dochází k pozvolnému přechodu k takrinovým heterodimerům.¹¹⁷⁻¹²² Donepezil-takriny byly publikovány Alonsem D. v roce 2005.¹¹⁷ Tyto hybridy se liší v délce spojovacího řetězce, nasyceností takrinového kruhu i v charakteru spojovací funkční skupiny (obr. 18). Nejlepší výsledek v této sérii vykazala látka s akridinovým základem připojená k donepezilové části (prezentované ftalimidem) přes osm methylenových skupin.



Obr. 18 Nejúčinnější sloučenina ze série takrin-donepezilových hybridů.

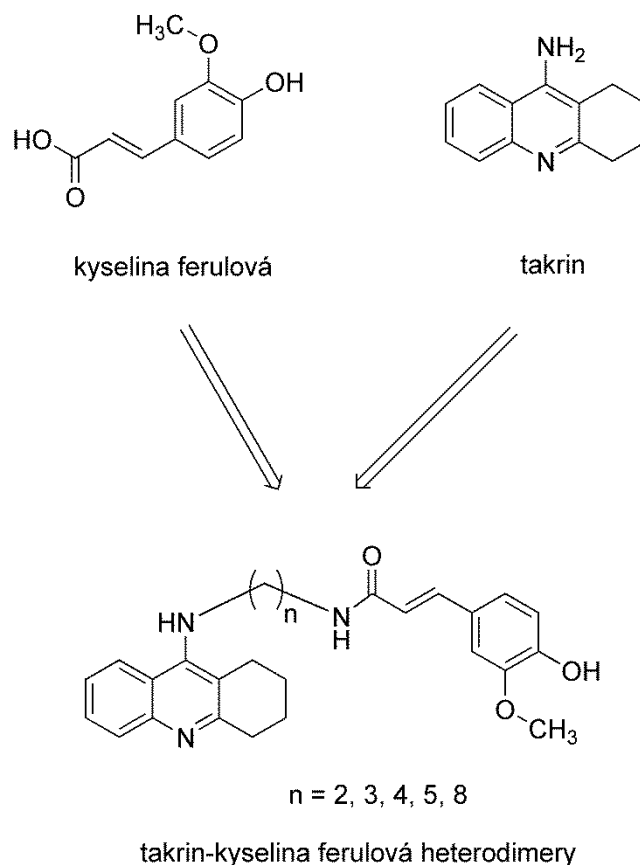
První heterodimery takrinu s huperzinem byly připraveny již v roce 1999 a navázaly tak na úspěšnou sérii huprinů (hybridní sloučeniny takrinu s huperzinem; obr 19). Huperzin je přírodní látka izolovaná z plavuně *Huperzia serrata*, která byla odedávna využívána v čínském lidovém léčitelství (obr. 19). V některých oblastech světa dosáhla již klinické praxe, zejména v asijských státech, ve zbytku světa se nachází ve druhé fázi klinického testování. Svou pozornost přitahuje díky mnohočetným příznivým vlivům na organismus – působí protizánětlivě, antioxidantně, $A\beta$ -antiagregačně aj. V sérii takrin huperzinů všechna nová analoga předčila ve své aktivitě předlohou strukturu huperzinu A na AChE a dosáhla inhibičních koncentrací v řádu nM. Nejslibnější látka měla ve spojovacím řetězci 10 methylenových skupin.¹²³



Obr. 19 Takrin-huperzinové deriváty a hupriny.

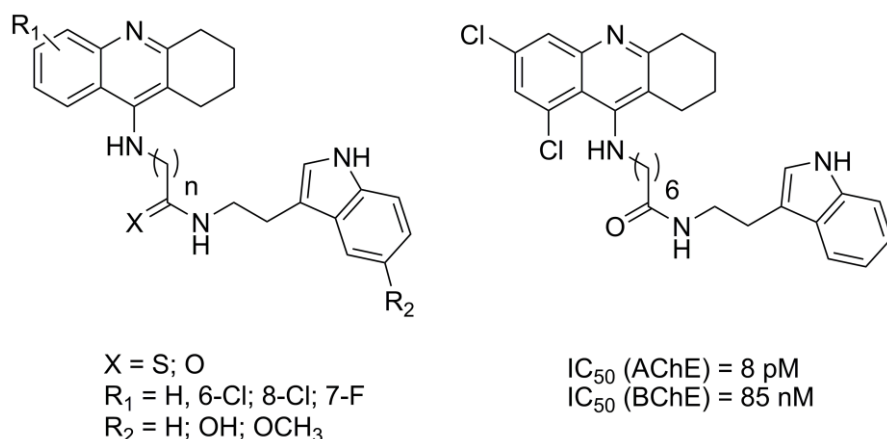
Takrinové heterodimery představují nejširší a v současnosti nejvíce studovanou skupinu látek. Podnět k jejich výzkumu přinesla syntéza a následně zjištěné biologické vlastnosti bis-7-takrinu. Základní skelet takrinu bývá u některých derivátů v této skupině nahrazen 6-chlortakrinem, který má vyšší inhibiční potenciál k AChE ($IC_{50} = 8.32 \text{ nM}$).^{124,125}

První větší připravená série látek je představována heterodimerem na bázi takrin-ferulové kyseliny (obr. 20). Spojení takrinu v tomto případě přineslo nejen očekávané zvýšení inhibičního potenciálu vůči ChE, ale i zavedení výrazných antioxidantních schopností (dáno vlastnostmi kyseliny ferulové) a A β antiagregační schopnosti vyplývající z duální inhibice AChE.¹²⁶⁻¹²⁹ Nejvyšší anti-AChE aktivitu projevila látka s pěti uhlíky ve spojovacím řetězci, která více než desetkrát překonala takrin v jeho účinnosti na AChE ($IC_{50} = 4.4 \text{ nM}$).



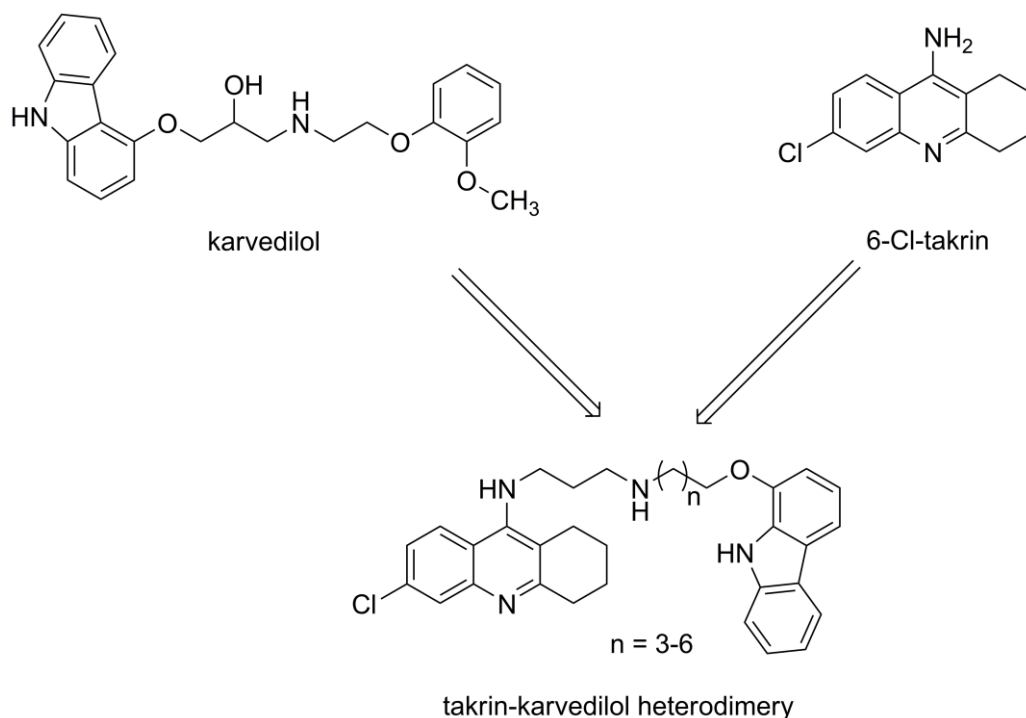
Obr. 20 Heterodimery takrin-ferulové kyseliny jako silné antioxidanty a duální inhibitory v terapii AD.

Další zajímavou skupinou jsou takrin-melatoninové heterodimery (obr. 21).¹³⁰ V průběhu AD ubývají antioxidační schopnosti celého organismu; nervový systém je tak náchylný k neurodegeneraci.¹³¹ Současný výzkum odhalil důležitou účast hormonu melatoninu v antioxidačních pochodech v průběhu AD. Jedná se o epifyzární hormon jehož hladina s progresí onemocnění klesá.¹³² Melatonin rovněž stimuluje endogenní antioxidační enzymy, zlepšuje energetickou bilanci mitochondrií, snižuje míru hyperfosforylace a má neuroprotektivní vlastnosti působením proti A β .¹³³ V připravené sérii je řada látek s duálním mechanismem účinku na AChE (sub-nM koncentrace IC₅₀), všechny shodně vykazaly silné antioxidační vlastnosti a A β antiagregační schopnosti.



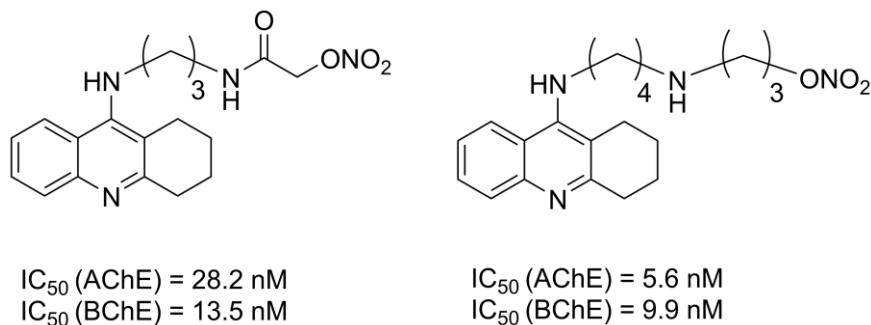
Obr. 21 Obecná struktura takrin-melatoninových inhibitorů (vlevo) a nejúčinnější látky z této série (vpravo).

Karvedilol je látkou používanou k hypertenzní léčbě. Kromě toho disponuje i neuroprotektivními vlastnostmi dané slabou afinitou k NMDA receptorům.¹³⁴ Kombinace karbazolové části karvedilolu s 6-chlortakrinem dala vznik tzv. karvedilol-takrinové skupině látek (obr. 22). Všechny připravené látky z této série inhibují selektivně AChE, největší potenciál demonstrovala látka s pěti methylenovými můstky ve spojovací řetězci ($IC_{50} = 1.54 \text{ nM}$). Tyto látky rovněž inhibují agregaci $A\beta$ a to jak indukovanou AChE, tak i autoagregační pochody tohoto proteinu. Za zmínku stojí i antioxidační působení a již zmiňované antagonistické působení na NMDA receptory.¹³⁵



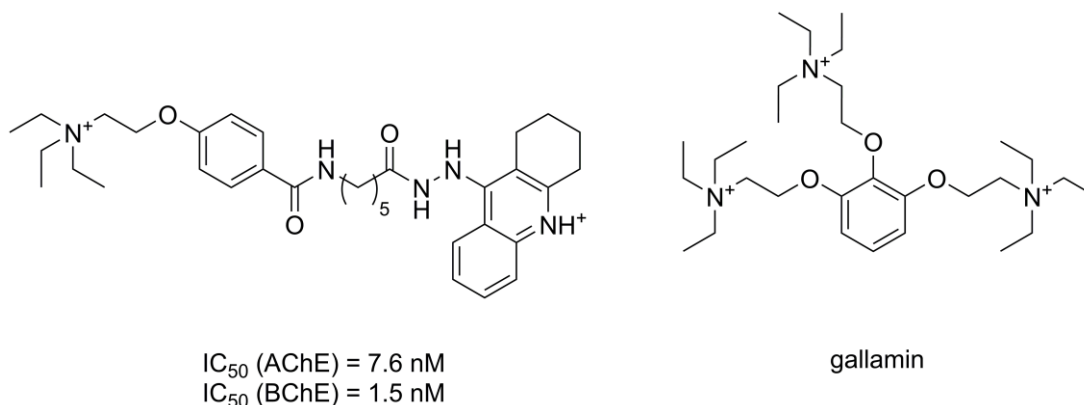
Obr. 22 Designová strategie takrin-karvedilol heterodimerů.

Oxid dusnatý (NO) má důležitou fyziologickou funkci v CNS; působí jako mediátor v imunitním systému, vasomotorice i neurotransmisi.¹³⁶ Při narušení jeho rovnováhy v organismu v průběhu AD hovoříme o tzv. nitrooxidativním stresu. V roce 2008 byla připravena série takrin-NO donátorů (obr. 23). Všechny testované látky této řady prokázaly silnější inhibiční působení oproti takrinu na oba cholinesterasové enzymy. Nejúčinnější z nich jsou vyznačeny na obr. 23. Při dalších studiích se ukázalo, že zmírňují skopolaminem navozené poruchy paměti, nezatěžují jaterní metabolismus a interagují s oběma částmi AChE.¹³⁷



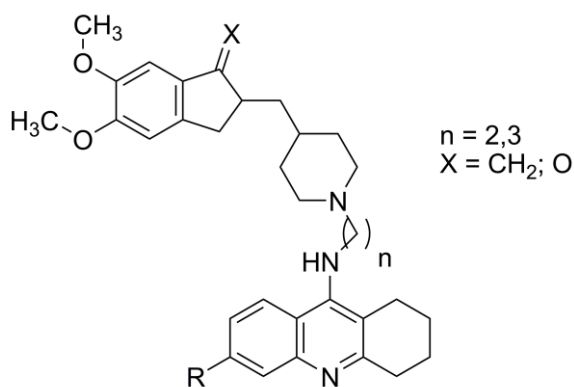
Obr. 23 Látky s nejlepším profilem v sérii takrin-NO donátorů.

Design další série látek vzešel ze spojení gallaminu, typického alosterického agens M_2 receptorů, s takrinem (obr. 24). Gallamin je rovněž schopný inhibovat AChE v její periferní anionické části. Všechny deriváty ukázaly inhibiční potenciál v řádu nM koncentrací i vyšší alosterickou afinitu k M_2 receptorům než parentní látky takrin a gallamin.¹³⁸



Obr. 24 Takrin-gallaminová série; pro ilustraci je zobrazena i struktura samotného gallaminu.

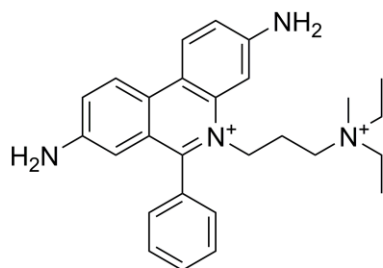
Záměnou benzylové části ve struktuře donepezilu takrinem vznikly takrin-donepezily (obr. 25). Donepezil se váže na periferii AChE, zatímco takrin je inhibitor aktivního místa. Nové látky tak rezultovaly v duální mechanismus účinku a vysokou selektivitu k AChE. Oproti práci uvedené v předchozí kapitole, tato série látek zachovává většinu z donepezilové skeletu (ta je prezentována 5,6-dimethoxy-2-[(4-piperidinyl)methyl]-1-indanonem).¹¹⁷ U nových heterodimerů byla hodnocena i schopnost inhibovat AChE indukovanou tvorbu A β fibril.¹³⁹



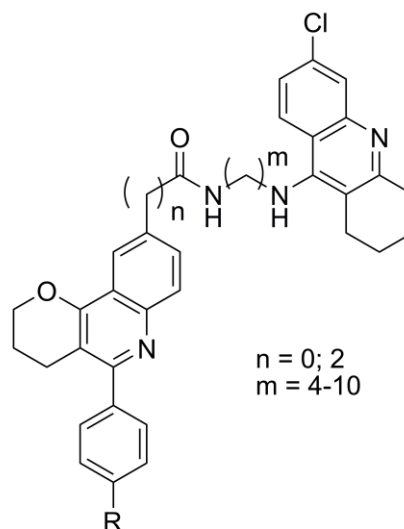
takrin-donepezily

Obr. 25 Takrin-donepezilová řada. Nejvyšší afinitu k AChE demonstroval derivát s dvěma methylenovými můstky ($n = 2$) a kyslíkovým atomem v indanové části.

Propididum je prototypem periferního inhibitoru AChE (obr. 26). Jeho struktura zahrnuje kvartérní dusíkové uskupení a aromatickou část, obě z nich mohou interagovat na periférii AChE pomocí kation- π a π - π interakcí. Spojení propidia, resp. jeho derivátu 5-phenylpyrano[3,2-c]chinolinu, s 6-chlortakrinem přineslo zvýšení inhibiční účinnosti, poměrně vysokou selektivitu k AChE, zabránění formování A β fibril indukovaných AChE a μ M až nM hodnoty IC₅₀ vůči β -sekretase (obr. 26).¹⁴⁰



propidium

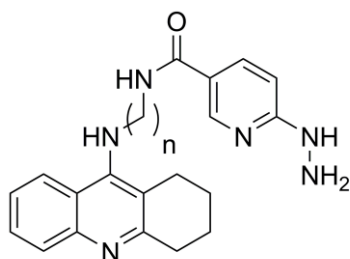


propidium-takrin hybridy

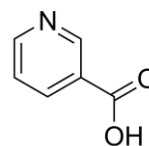
IC_{50} (AChE) = 7 - 19.2 nM
 IC_{50} (BChE) = 218 - 1931 nM

Obr. 26 Deriváty propidia s 6-chlortakrinem.

V poslední době se objevují nové práce poukazující na souvislost mezi AD a insuficiencí některých vitamínů, zejména řady B.¹⁴¹ Jedním z nich je i niacin (B₃), u kterého byla prováděna rozsáhlá klinická studie v souvislosti s demencí typu AD. Studie naznačila možný protektivní vliv niacinu v rozvoji AD nebo jiného typu demence.¹⁴² V návaznosti na tyto poznatky byla připravena série takrin-niacinových derivátů (obr. 27). U nich se opět předpokládá duální AChE-působení. Látky byly dosud testovány pouze pro své cholinergní vlastnosti, žádná z nich však nepřekonalala aktivitu takrinu pro obě testované ChE, pravděpodobně proto, že se jedná o neucelenou sérii látek s ohledem na délku spojovacího řetězce.¹⁴³



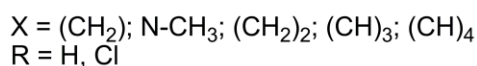
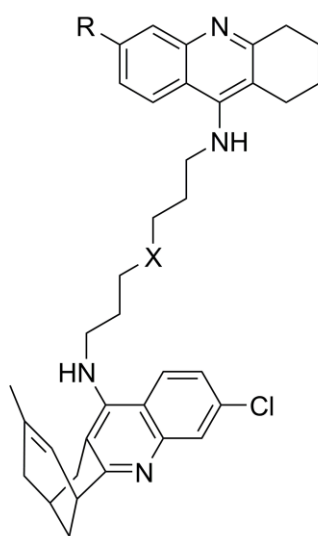
$n = 4, 5, 7, 9$



niacin

Obr.27 Takrin-niacinové deriváty.

Nejnovější a zároveň nejvíce prostudovanou sérií látek z hlediska preklinického testování je skupina heterodimerů vzniklá spojením takrinu nebo 6-chlortakrinu s huprinem Y (derivát huperzinu a takrinu, obr. 28). Takrin-hupriny blokují aktivní i periferní místo, prakticky zcela zamezují agregaci A β a to přímým vlivem na tento peptid nebo skrze inhibici periferního místa ACh, působí taktéž inhibičně i vůči β -sekretase a na základě modelu umělé membrány (PAMPA-BBB test) prostupují snadno hematoencefalickou bariérou.¹⁴⁴



Obr. 28 Takrin-hupriny.

1.9 7-MEOTA

7-methoxytakrin (7-MEOTA, 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin) byl vyvinut v ČR jako méně toxický derivát takrinu při zachování farmakologického profilu. Nižší toxicita 7-MEOTA je vysvětlována pomocí hlavního metabolitu, 7-hydroxytakrinu, rovněž farmakologicky účinného, který vzniká demethylací. 7-hydroxytakrin je následně konjugován s kyselinou glukuronovou a exkretován močí.¹⁴⁵ Srovnání vybraných biologických účinků s takrinem a jeho potenciál pro AD je diskutován v Příloze 3 a v Příloze 4.

2 CÍL PRÁCE

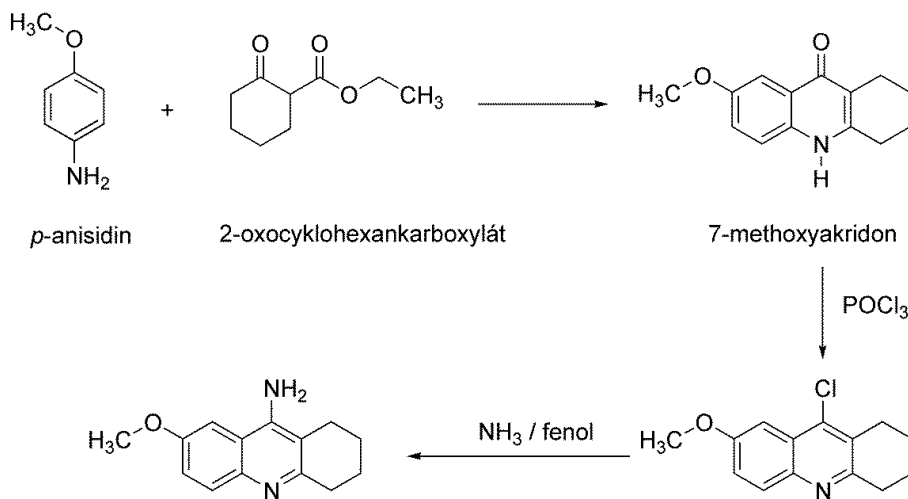
- 1) V úvodu shrnout současnou problematiku a stav AD. Podat přehled o možnostech farmakoterapie i zvažovaných farmakoterapeutických přístupech v oblasti AD. Rovněž vyhledat literární údaje o připravovaných takrinových derivátech a rozčlenit je v závislosti na -strukturních vlastnostech. Srovnat biologické účinky 7-MEOTA s takrinem.
- 2) Syntéza nových derivátů odvozených od méně toxického takrinového derivátu 7-MEOTA, jakožto potenciálních analog pro terapii AD. Tyto látky následně porovnat se stejně substituovanými takrinovými deriváty. Prozkoumat vliv aromatických, alicyklických a alifatických residuí v postranním řetězci takrinového a 7-MEOTA skeletu na aktivitu vůči testovaným cholinesterásám. U všech testovaných látek stanovit *in vitro* inhibiční parametry vůči AChE a BChE.
- 3) Pro nejúspěšnější látky z každé série provést molekulově modelovací studii a odvodit *in silico* možné interakce připraveného inhibitoru s daným enzymem.
- 4) Pro vybrané deriváty stanovit účinnost vůči amyloidním proteinům (insulin, lysozym, $A\beta_{1-40}$), ovlivění monoaminoxidas (MAO-A a MAO-B) a NADH dehydrogenasy (komplex I).
- 5) Doporučit dvě látky pro *in vivo* studie (stanovení toxicitních a farmakokinetických parametrů).

3 KOMENTÁŘ K PŘÍLOHÁM

3.1 SYNTÉZA A *IN VITRO* EVALUACE NOVÝCH TAKRINOVÝCH DERIVÁTŮ ODVOZENÝCH OD 7-MEOTA SPOJENÝCH DVĚMA UHLÍKOVÝMI ŘETĚZCI (PŘÍLOHA Č. 5)

Spojování dvou molekul se stejným či rozdílným farmakologickým účinkem je jedním z běžných přístupů ve vývoji nových léčiv. Takto připravené látky vykazují mnohdy vyšší lipofilitu, díky které snadněji penetrují přes hematoencefalickou bariéru a dosahují tak žádaného centrálního účinku. V případě inhibitorů AChE mohou působit mechanismem duální inhibice, potlačovat agregaci A β a v neposlední řadě u nich mohou být eliminovány nežádoucí účinky, prodloužen biologický poločas a mohou disponovat dalšími biologickými vlastnostmi.

V naší první studii jsme se zaměřili na syntézu nových, potenciálně duálních inhibitorů AChE na bázi méně toxického derivátu takrinu, tedy 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). 7-MEOTA byla připravena na Katedře toxikologie v Hradci Králové FVZ UO podle dříve popsaného syntetického postupu Bielavského a kol. (Schéma 2).¹⁴⁶



9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (7-MEOTA) 9-chlor-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin

Schéma 2 Cyklokondenzační reakce *p*-anisidinu s 2-oxocyklohexankarboxylátem poskytne 7-methoxyakridon, který je následně konvertován pomocí fosforyl-chloridu na 9-chlor-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin, který zavedením plynného amoniaku v prostředí fenolu a teploty 180 °C poskytne 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (7-MEOTA).

Naše práce vycházela z průkopnické studie Panga a kol., kteří jako první připravili jednoduchou syntézou typu nukleofilní substituce bis-7-takrin a to spojením dvou takrinových molekul alkylenovým řetězcem. Syntetický postup a podmínky reakce byly částečně modifikovány.¹¹⁰

Obecný postup pro syntézu 9,9'-di-(alkan-1,ω-diyl-diimino)-di-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinů)

Rozdrcený hydroxid draselný (1272 mg, 22.6 mmol) by přidán do roztoku 7-MEOTA (2000 mg, 7.55 mmol) a DMSO (30 ml). Reakční směs byla intenzivně míchána za laboratorní teploty 3h. Poté byly přidány postupně 2 ekvivalenty příslušného α,ω-diiodoalkanu a míchání pokračovalo dalších 48h za laboratorní teploty pod dusíkovou atmosférou. Průběh reakce byl sledován tenkovrstvou chromatografií na triethylaminem saturovaných silikagelových deskách s použitím hexan:ethyl-acetátu (1:1) jako mobilní fáze. Po skončení reakce bylo přidáno 100 ml vody a vodná fáze byla extrahována s ethyl-acetátem (3 × 100 ml). Spojená organická vrstva byla sušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a rozpouštědlo vakuově oddestilováno. Po odpaření zůstal olejovitý zbytek, který byl čištěn sloupcovou chromatografií na triethylaminem saturovaném silikagelu s použitím hexan:ethylacetátu (1:1) jako mobilní fáze. Čistý produkt byl izolován v podobě žlutých krystalů (Schéma 3).

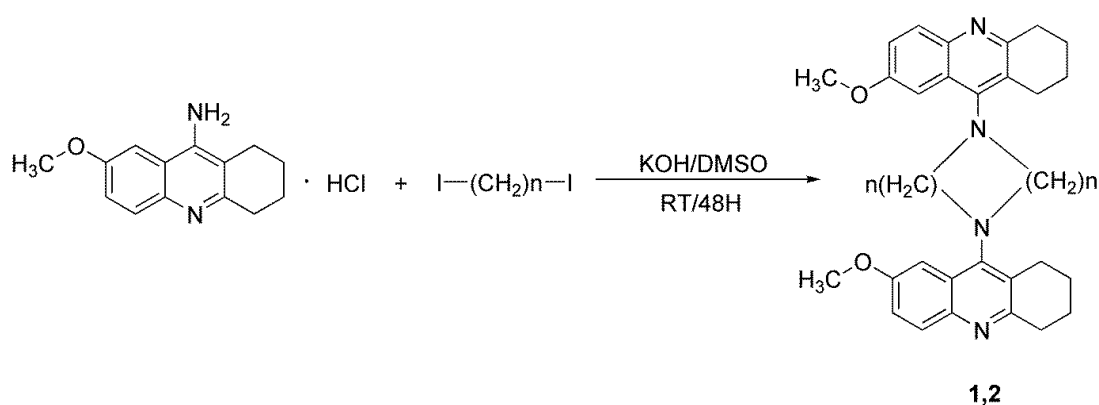


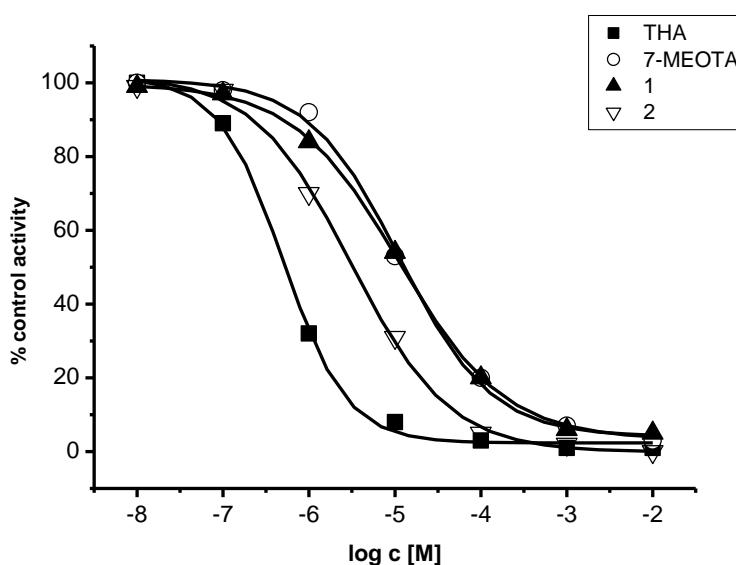
Schéma 3 Obecný postup vedoucí k syntéze 9,9'-di-(alkan-1,ω-diyl-diimino)-di-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinů); n=4 (**1**), 5(**2**).

Výsledky a diskuze

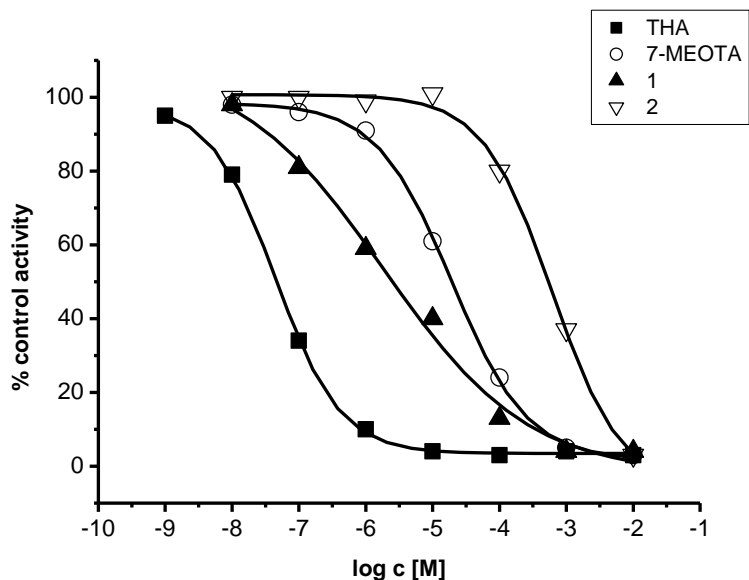
Nově připravené látky (schéma 3) byly testovány *in vitro* pro svou schopnost inhibovat AChE a BChE. Stanovení probíhalo použitím Ellmanovy metody.¹⁴⁷ Výsledek jednotlivých měření je pak vyjádřen jako IC_{50} , což je hodnota, která reprezentuje hodnotu koncentrace zkoušené látky potřebné k 50% inhibici testovaného enzymu *in vitro*. K experimentům byla použita AChE izolovaná z lidských erytrocytů a lidská sérová BChE. Vedle hodnot IC_{50} je brán v potaz i tzv. index selektivity (SI) pro AChE, který je vyjádřen podílem IC_{50} BChE/ IC_{50} AChE a reflektuje tak selektivitu dané látky pro AChE (tabulka 2). Na obrázcích 29 a 30 jsou znázorněny průběhy inhibic testovaných látek vůči oběma enzymům (AChE na obr. 29; BChE na obr. 30) v závislosti na jejich koncentraci (log c; souřadnice x) vztažená ke kontrolní aktivitě enzymu (souřadnice y).

Označení	IC ₅₀ (nM)		Selektivita k AChE
	AChE izolovaná z lidských erytrocytů	Plazmatická BChE	
THA	501	2.30	0.005
7-MEOTA	10500	21000	2
1	22600	138	0.06
2	4570	656000	143.55

Tabulka 2 Hodnoty IC_{50} pro AChE, BChE a index selektivity pro AChE.



Obr. 29 Závislost koncentrace testovaných látek vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.



Obr. 30 Závislost koncentrace testovaných látek vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

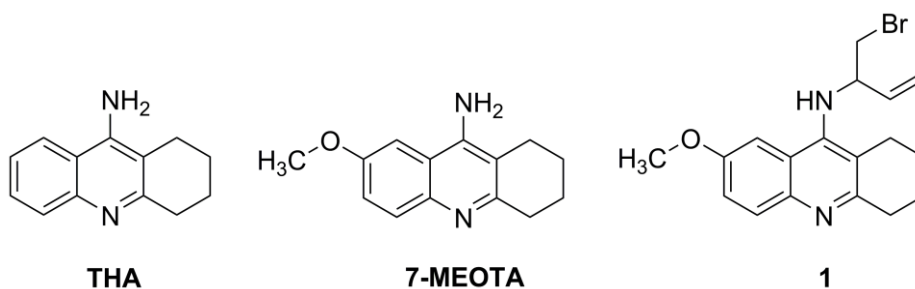
Inhibiční potenciál obou nově připravených látek byl porovnán s referenčními sloučeninami takrinem a 7-MEOTA (tabulka 2). Derivát **1** je více než 150 × účinnější inhibitor BChE než 7-MEOTA. To je pravděpodobně dáno velikostí **1**, kdy se předpokládá jeho lepší orientace do aktivní části BChE. Analog **2** má přibližně 2 × vyšší účinnost k AChE než 7-MEOTA. Ani jedna z obou připravených látek nepřekročila inhibiční potenciál takrinu na AChE i BChE. S přihlédnutím k hodnotám SI, derivát **2** vykazuje téměř 145 × vyšší inhibiční potenciál k AChE než k BChE. Porovnáním obou látek lze usoudit, že vyšší míra selektivity je vázána k 7-MEOTA spojené delším uhlíkovým řetězcem.

Oproti práci Panga a kol. došlo ke zdvojení 7-MEOTA přes dva methylenové můstky, což je do jisté míry dáno reaktivitou α,ω -diiodoalkanů (pozn. Pang a kol. použili ke zdvojení takrinu α,ω -dibromalkany).¹¹⁰ V první fázi reakce dojde nejprve k navázání jednoho methylenového řetězce za vzniku sekundárního aminu zdvojené 7-MEOTA, která je v případě nadbytku α,ω -diiodoalkanu náchylná pro další reakci typu nukleofilní substituce a poskytuje zdvojený analog 7-MEOTA přes dva methylenové můstky.

Obě látky inhibují oba testované enzymy, což je výhodné zejména s progresí AD, kdy v pozdějších stádiích přebírá BChE dominantní úlohu nad klesajícími hladinami AChE. S velkou mírou pravděpodobnosti rovněž můžeme usuzovat na jejich nižší toxicitu v porovnání s takrinem, protože se jedná o látky odvozené od méně toxické 7-MEOTA. Tato domněnka bude předmětem dalšího studia.

3.2 SYNTÉZA A IN VITRO HODNOCENÍ *N*-(BROMOBUT-3-EN-2-YL)-7-METHOXY-1,2,3,4-TETRAHYDROAKRIDIN-9-AMINU JAKO INHIBITORU CHOLINESTERAS V TERAPII ALZHEIMEROVY CHOROBY (PŘÍLOHA Č. 6)

V rámci této studie jsme se zabývali syntézou, biologickým hodnocením a molekulově modelovací studií *N*-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu (**1**) (obr. 31). Tato látka byla izolována při pokusu o zdvojení molekuly 7-MEOTA použitím (*E*)-1,4-dibromobut-2-enu jako alkylačního činidla. Struktura **1** byla potvrzena analytickými metodami.



Obr. 31 Struktury testovaných standardů (takrin, 7-MEOTA) a izolované látky **1** v této studii.

Výsledky a diskuze

Syntéza **1** proběhla mechanismem nukleofilní substituce, průběh této syntézy je popsán na schématu 4. V první fázi reakce dojde vlivem silně bazického prostředí (hydroxid draselný v DMSO) k deprotonaci 7-MEOTA na volnou bázi. Tato syntéza však nevedla k předpokládanému zdvojenému aduktu 9,9'-((*E*)-but-2-ene-1,4-diyl-diimino)-di-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine). Po přidání (*E*)-1,4-dibrombut-2-enu dojde v prostředí báze k β -eliminaci za vzniku transitního karbokationtu. Tento aktivovaný karbokation je následně spojen se 7-MEOTA mechanismem nukleofilní substituce a vzniká tak derivát **1** s dvojnou vazbou v postranním řetězci (2% výtěžek).

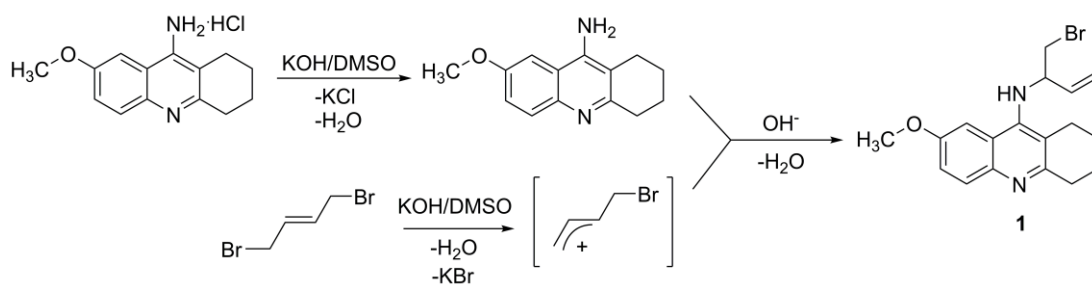
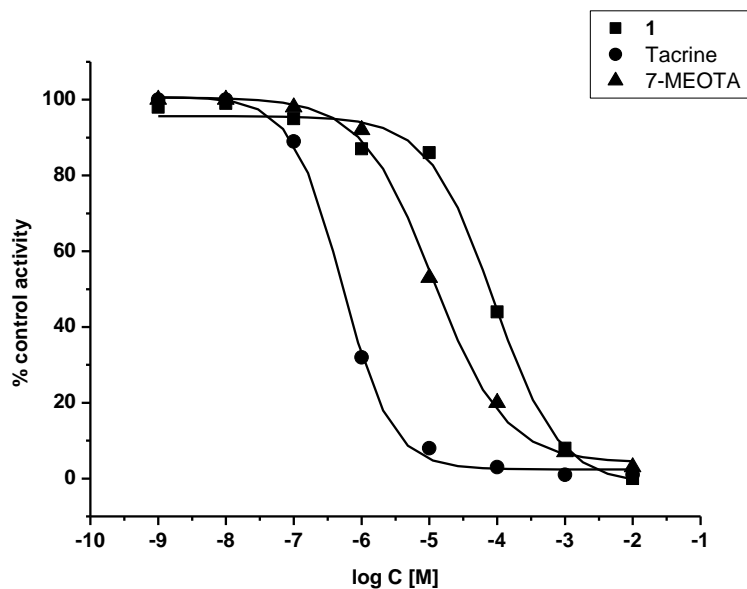


Schéma 4 Mechanismus syntézy *N*-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu (**1**).

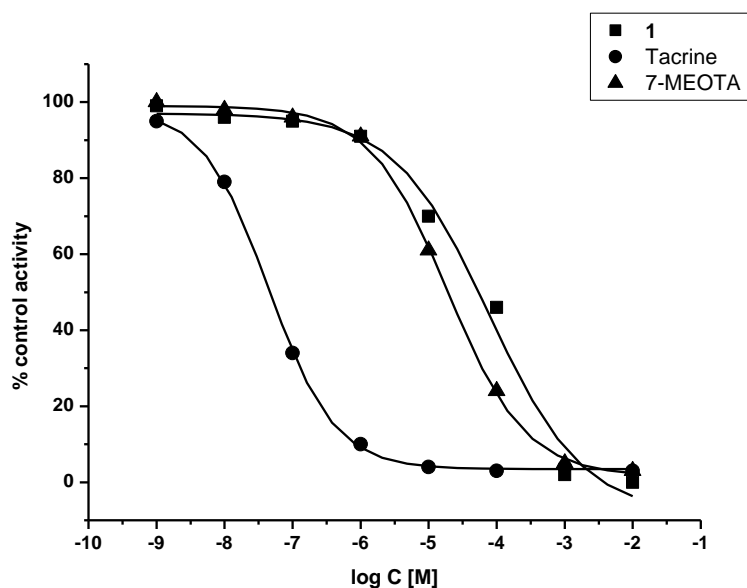
Derivát **1** byl podroben *in vitro* testování vůči AChE a BChE Ellmanovou metodou a tyto výsledky jsou porovnány s referenčními látkami 7-MEOTA a takrinem. Zjistilo se, že **1** je slabší inhibitor AChE i BChE v porovnání s oběma standardy. Oproti takrinu se jedná o dva řády horší inhibitor AChE a o tři řády horší inhibitor BChE. Rovněž 7-MEOTA rezultovala jako účinnější inhibitor v porovnání s **1**. Látka **1** je 18 × selektivnější k AChE než takrin, ale zároveň nepřekročila selektivitu 7-MEOTA. V celkovém pohledu lze považovat **1** za neselektivní ($SI = \pm 1$) (tabulka 4). Na obrázcích 32 a 33 jsou pak zaznamenány průběhy stanovení inhibičních hodnot IC_{50} pro AChE, resp. BChE.

Označení	AChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	BChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	SI IC_{50} BChE/ IC_{50} AChE
THA	0.5 ± 0.1	0.02 ± 0.003	0.05
7-MEOTA	15.0 ± 2.4	21.0 ± 3.4	1.4
1	89.1 ± 17.3	78.8 ± 12.8	0.88

Tabulka 4 Hodnoty IC_{50} a SI testované látky **1** a referenčních látek (takrin, 7-MEOTA).



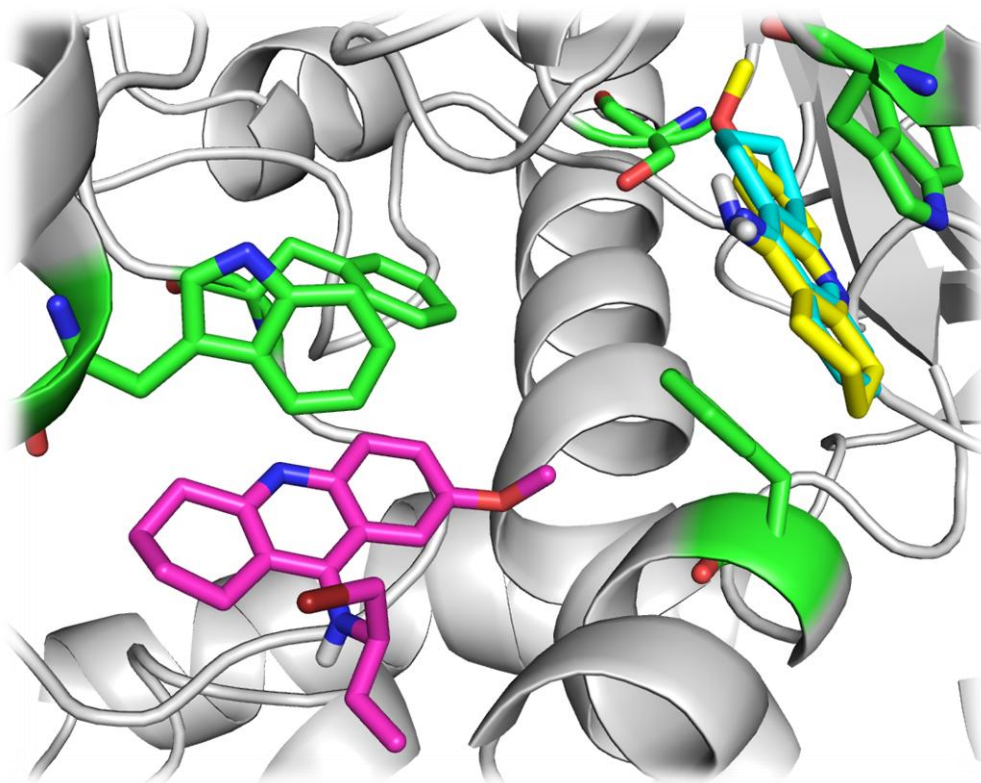
Obr. 32 Závislost koncentrace testované látky **1** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.



Obr. 33 Závislost koncentrace testované látky **1** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

Na základě *in vitro* testování byla učiněna molekulově modelovací studie, která se snaží racionalizovat tyto poznatky. K této studii byla využita krystalová struktura enzymu AChE z *Torpedo Californica* (PDB code: 1acj), která je podobná lidské

rekombinantní AChE (obr. 34). Podobná prostorová orientace byla získána pro molekulu takrinu (modře) a 7-MEOTA (žlutě). Obě látky se vážou kation- π vazbou v aktivním místě AChE. Takrin leží mezi Trp84 (3.6 Å) a Phe330 (3.8 Å) a dále interaguje s Tyr334 (3.7 Å), Trp432 (3.5 Å), His440 (4.3 Å) a Tyr442 (3.8 Å). Amino skupina v poloze 9 je připojena vodíkovými vazbami ke dvěma molekulám vody (2.1 Å a 2.2 Å). Podobné vazby a orientaci molekuly 7-MEOTA (-8.24 kcal/mol) lze pozorovat v aktivní části AChE; zaznamenány byly zejména π - π interkace s Trp84 (3.6 Å) a Phe330 (3.8 Å). Zajímavostí však je, že se 7-MEOTA orientuje o 180° oproti takrinu, vodíková vazba k oběma molekulám vody však zůstává zachována (2.2 Å). Methoxy skupina v poloze 7- je stabilizována vodíkovým můstkem s Gly118 (3.3 Å). Tato obrácená orientace 7-MEOTA vysvětluje nižší afinitu k AChE v porovnání s takrinem, kde aromatická část 7-MEOTA zůstává více vzdálena od důležitých aromatických residuí (Trp334, Trp432, Tyr442). Derivát **1** (-5.60 kcal/mol; obr 34; fialově) ukázal vazbu v periferním anionickém místě AChE (rozdíl oproti takrinu a 7-MEOTA) a je vázán nejbližší k Trp279 (3.6 Å) a Phe290 (3.7 Å) pomocí π - π interakcí. Aromatický dusík a sekundární amino skupina interagují vodíkovými vazbami se dvěma molekulami vody (2.0 a 2.3 Å). Vazba **1** k AChE tak probíhá při okraji aktivního místa, což koresponduje do jisté míry s výsledky z *in vitro* testování ($IC_{50} = 89 \mu M$), kdy **1** není schopná uzavřít kavitu AChE a zamezit tak rozkladu substrátu (acetylthiocholinu).



Obr. 34 Vazba takrinu (modře) a 7-MEOTA (žlutě) v aktivní části AChE. Stranou v periferním anionickém místě pak leží derivát **1** (fialově).

3.3 SYNTÉZA A *IN VITRO* EVALUACE 7-METHOXY-*N*-(PENT-4-ENYL)-1,2,3,4-TETRAHYDROAKRIDIN-9-AMINU – NOVÝ DERIVÁT TAKRINU S CHOLINERGNÍMI VLASTNOSTMI (PŘÍLOHA Č. 7)

V průběhu syntézy 9,9'-di-(pentan-1,5-diyldiimino)-di-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinu) byla pozorována konkurenční eliminační reakce vedoucí k 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu (Schéma 5). Tato látka se stala předmětem dalšího studia.

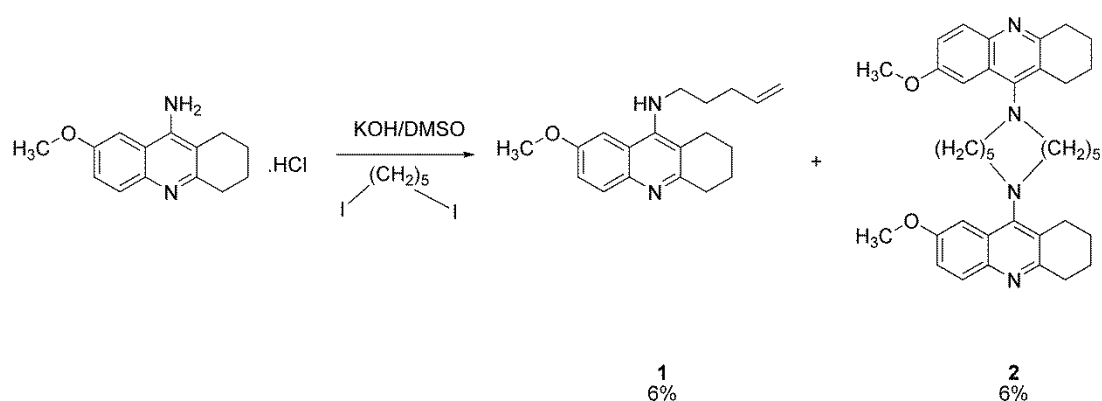
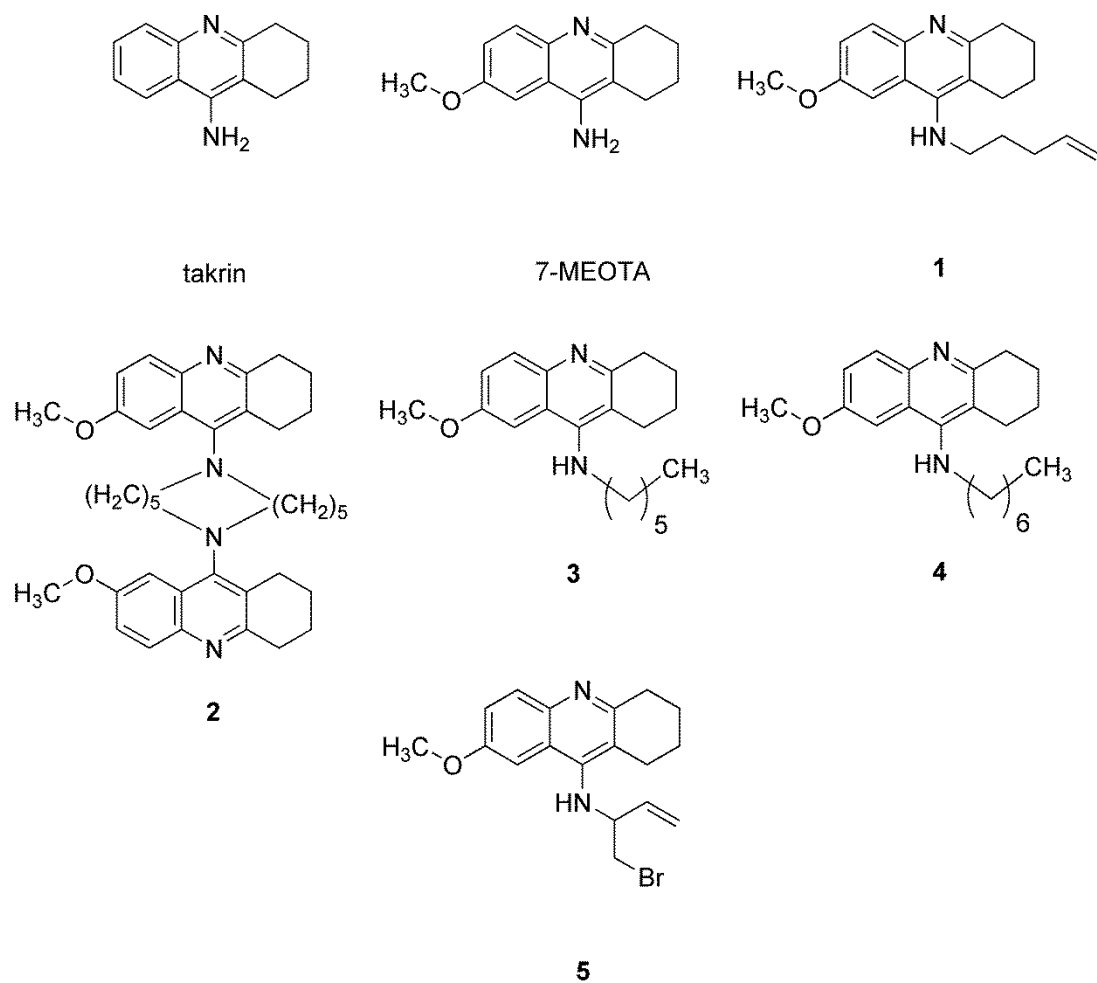


Schéma 5 Syntéza 9,9'-di-(pentan-1,5-diyldiimino)-di-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinu) (**2**) a vedlejšího produktu 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu (**1**).

Výsledky a diskuze

Reaktivita α,ω -diiodoalkanů, konkrétně 1,5-dijodpentanu, dává v silně bazickém prostředí, které bylo v průběhu reakce zajištěno přítomností hydroxidu draselného v nadbytku, vznik nejen zdvojenému derivátu **2**, ale i eliminačnímu produktu **1**. Struktura **1** byla následně potvrzena spektrálními analýzami.

Podobně jako u předchozí studie, derivát **1** byl podroben *in vitro* testování na lidské rekombinantní AChE a lidské plasmatické BChE Ellmanovou metodou. Účinnost **1** byla porovnána se standardy ilustrovanými na obrázku 35.

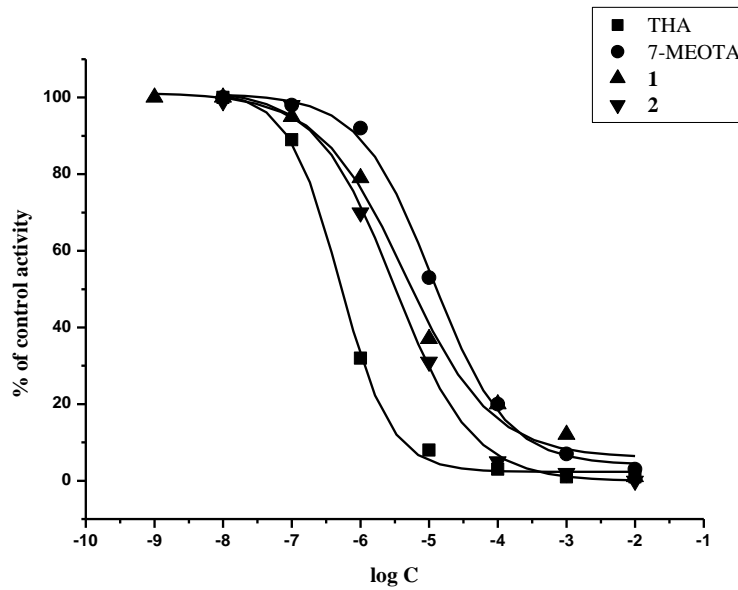


Obr. 35 Strukturní vzorce nově testovaných sloučenin pro AD terapii a srovnávací standardy (takrin, 7-MEOTA).

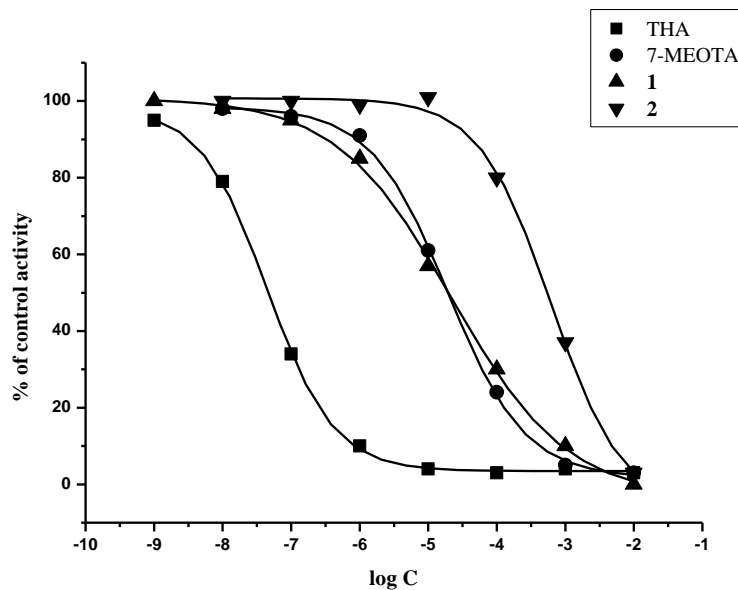
Výsledky *in vitro* testování jsou shrnuty v tabulce 5 a jsou vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} pro oba testované enzymy. Následně byly dopočítány SI. Na obrázku 36 je znázorněn průběh inhibice pro AChE, na obrázku 37 pro BChE pro testované a srovnávané látky.

Označení	AChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	BChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	SI $IC_{50} BChE / IC_{50} AChE$
THA	0.5 ± 0.1	0.023 ± 0.003	0.05
7-MEOTA	10.5 ± 2.0	21 ± 3	2
1	2.2 ± 0.4	1.10 ± 0.16	0.5
2	4.6 ± 0.9	656 ± 93	143
3	0.10 ± 0.02	1.0 ± 0.2	10
4	0.27 ± 0.05	0.040 ± 0.007	0.15
5	89.1 ± 17.3	78.8 ± 12.8	0.88

Tabulka 5 Hodnoty IC_{50} a SI pro AChE nově připravené látky 1 a srovnání jejich hodnot se standardy testovanými v terapii AD (2-5) a referenčními látkami (takrin, 7-MEOTA).



Obr. 36 Závislost koncentrace testovaných látek vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.

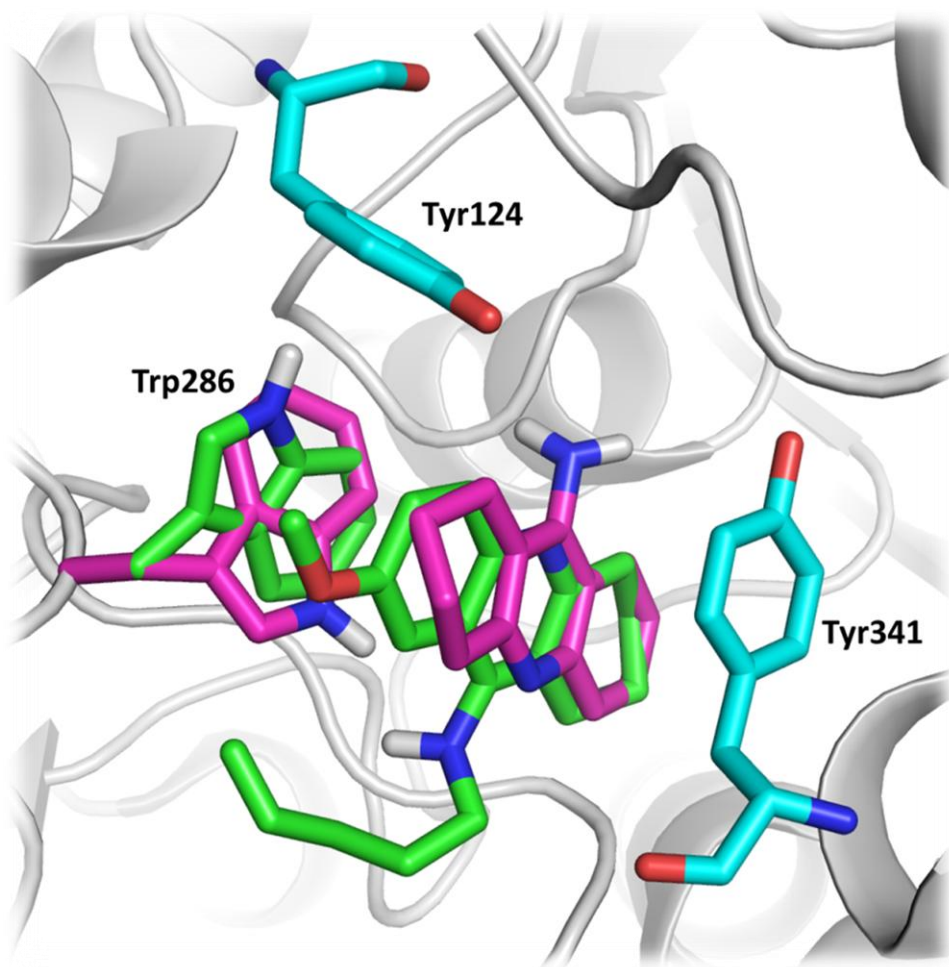


Obr. 37 Závislost koncentrace testovaných látek vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

Z výsledků měření inhibičních parametrů IC_{50} lze vyčíst, že standardy (takrin, 7-MEOTA) vykázaly inhibiční působení v mikromolárních koncentracích, přičemž takrin se profiloval jako silnější inhibitor BChE než AChE o dva řády. 7-MEOTA má menší afinitu a vyšší selektivitu k AChE v porovnání s takrinem. Látka **1**

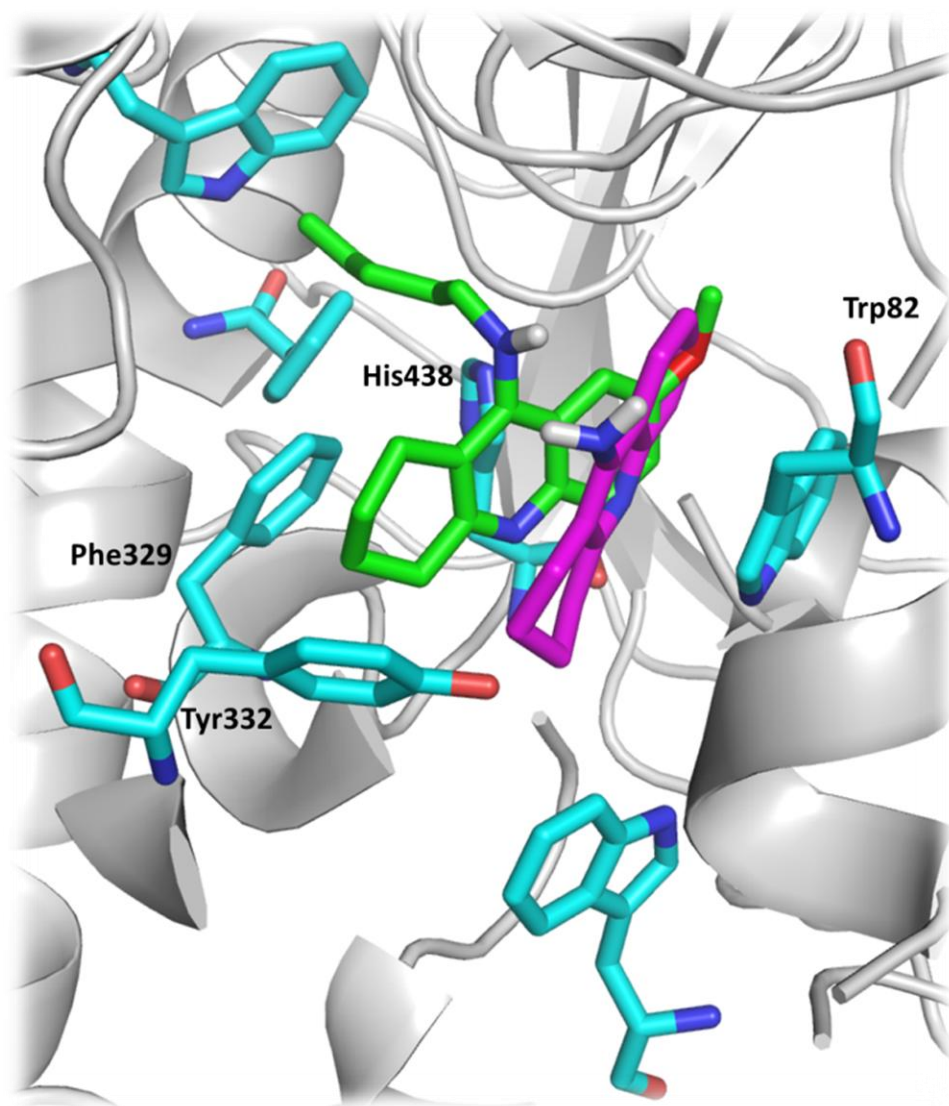
demonstrovala 10 × vyšší selektivitu pro AChE než takrin. S ohledem na 7-MEOTA je **1** čtyřikrát méně selektivní, zatímco látka **2** vykazala nejvyšší hodnotu SI. Derivát **1** nepřekonal inhibiční potenciál takrinu ani vůči jednomu z testovaných enzymů, ale je pětikrát silnější inhibitor AChE v porovnání s 7-MEOTA. Analog **1** vykázal o jeden řád vyšší inhibiční působení na BChE než 7-MEOTA. Porovnáním **1** a **2** lze říci, že eliminační produkt je dvakrát účinnější inhibitor AChE než **2** a dokonce látka **1** rezultovala jako silnější inhibitor BChE o dva řády. Účinnost jiných 7-MEOTA derivátů (**3** a **4**) zůstala nepřekonána. Eliminační produkt **1** je rovněž silnější inhibitor obou testovaných enzymů než látka **5**. Slabé cholinergní vlastnosti **5** lze vysvětlit jeho vazbou při okraji vstupu do AChE (viz dále), kde není schopen dosáhnout katalytické triády a tím není zcela znemožněna schopen zabránit štěpení substrátu – acetylthiocholinu.

Vedle *in vitro* studie byly provedeny i *in silico* experimenty, které se snaží racionalizovat výsledky cholinergního působení **1** v AChE (PDB code: 1b41) a BChE (PDB code: 1p0i) v porovnání s takrinem. Na obrázku 38 je vyznačena nejvhodnější konformace takrinu (-8.8 kcal/mol) v AChE, který je orientován mezi Trp286 (3.4 Å) a Tyr341 (3.5 Å) v periferním anionickém místě. Trp286 je v tomto případě deformován ze své původní polohy. Orientace **1** s nejnižší energií (-5.1 kcal/mol) ukázala velmi podobnou vazbu jako u takrinu v periferním anionickém místě AChE, kde vzdálenost od Trp286 byla 3.8 Å a od Tyr341 3.5 Å. N-alkylová část **1** je umístěna na druhou stranu než se nachází katalytická triáda a Trp286 je více vzdálený ve srovnání s krystalovou strukturou takrinu. Menší afinitu **1** k AChE tak lze pravděpodobně vysvětlit slabší vazbou k perifernímu anionickému místu AChE v porovnání s takrinem (-5.1 < -8.8 kcal/mol) a trochu rozdílnou orientací vůči aminokyselinovým residuím v periferním anionickém místě.



Obr. 38 Interakce takrinu (fialově) a látky **1** (zeleně) v periferním anionickém místě AChE.

S ohledem na BChE, orientace takrinu s nejnižší energetickou bilancí (-9.1 kcal/mol) odhalila důležité interakce s Trp82 (3.6 Å), Tyr332 (3.8 Å), Trp430 (3.7 Å) a His438 (3.9 Å) (obr. 39). Na druhou stranu, látka **1** (-8.4 kcal/mol) je více vzdálena od Trp82 (3.9 Å) a nachází se blíže k Phe329 (3.2 Å), Tyr332 (3.7 Å) a His438 (3.7 Å). Dvojná vazba na *N*-alkylové části **1** směřuje k Trp321 (3.7 Å). Všechny tyto změny mohou být zodpovědné za rozdílnou inhibiční aktivitu takrinu a **1** vůči BChE, přičemž slabší interakce k Trp82 a vazba k Trp231 zapříčiňují nižší aktivitu **1** o dva řády.

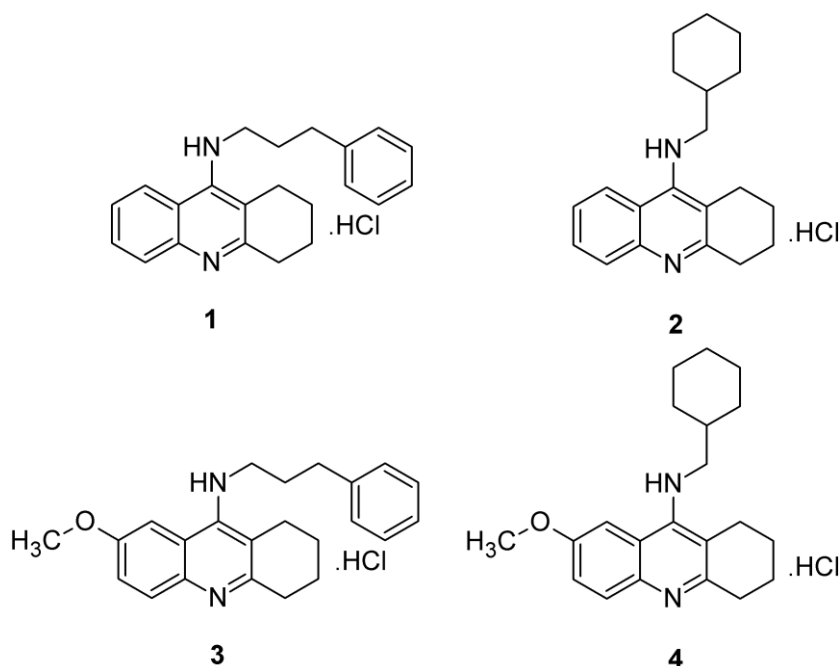


Obr. 39 Interakce takrinu (fialově) a látky **1** (zeleně) ve vazebné části BChE.

Předkládaná studie potvrzuje, že je důležité věnovat pozornost i případným vedlejším produktům při syntéze, které mohou resultovat v látky s vyšší účinností než cílené molekuly. Látka **1** prokázala cholinergní vlastnosti proti oběma testovaným enzymům a je pravděpodobné, že bude disponovat nižší toxicitou než takrin, protože se jedná o derivát méně toxického takrinového derivátu 7-MEOTA. Tento vedlejší eliminační produkt **1** bude v nadcházejících experimentech dalším předmětem studia.

3.4 SROVNÁNÍ NOVÝCH TAKRINOVÝCH A 7-MEOTA DERIVÁTŮ S AROMATICKÝMI A ALICYKlickÝMI RESIDUI: SYNTÉZA, BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ (PŘÍLOHA Č. 8)

V další části práce jsme se zaměřili na studium vlivu postranního řetězce na cholinergní aktivitu vztaženou na dva klíčové enzymy v AD – AChE a BChE. Za předlohou struktury byly zvoleny deriváty nesoucí alicyklický nebo aromatický cyklus, jejichž základ tvořil buď takrinový skelet nebo 7-MEOTA. Látky použité v tomto experimentu jsou ilustrovány na obrázku 40.



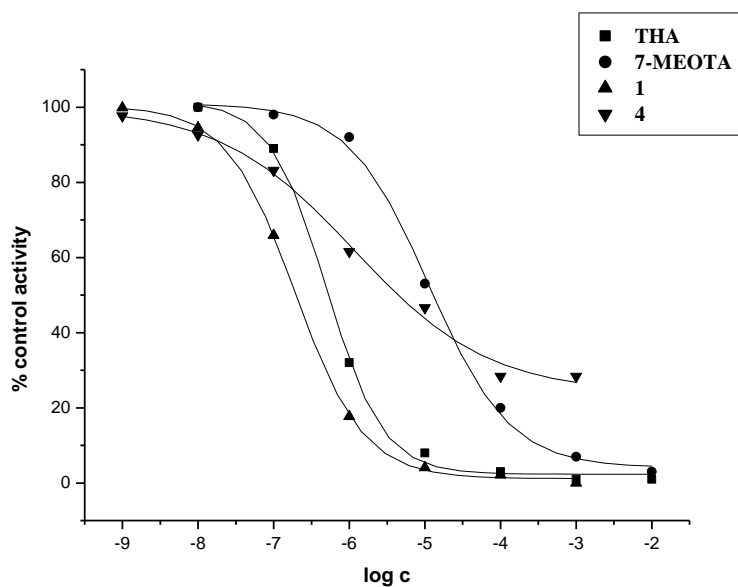
Obr. 40 Strukturální vzorce látek (1-4) použitých ve studii vlivu postranního řetězce na aktivitu vůči cholinesterasám. Základ molekul je tvořen takrinovým skeletem nebo 7-MEOTA.

Výsledky a diskuze

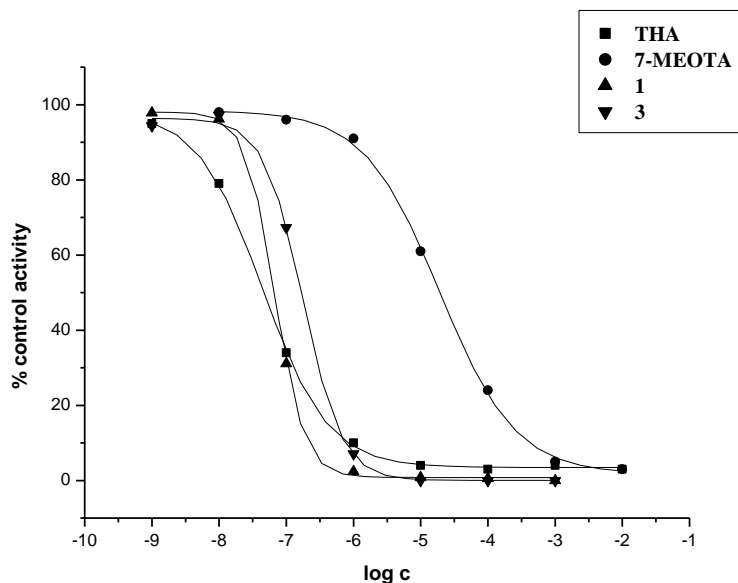
U nově připravených látek (1-4) byly stanoveny inhibiční parametry IC_{50} vůči oběma testovaným cholinesterasám (lidská rekombinantní AChE a lidská erytrocytární BChE) a byly vypočítány indexy selektivity k AChE (SI) (tabulka 6). Průběh inhibice AChE a BChE v závislosti na koncentraci látky pro nejúčinnější 7-MEOTA a takrinové deriváty se nachází na obrázcích 41 a 42, vždy v porovnání s referenčními látkami 7-MEOTA a takrinem.

Označení	AChE IC ₅₀ ± SD (μM)	BChE IC ₅₀ ± SD (μM)	SI (IC ₅₀ BChE/ IC ₅₀ AChE)
1	0.19±0.04	0.06±0.01	0.31
2	1.09±0.21	0.12±0.02	0.11
3	3.21±0.63	0.17±0.03	0.05
4	1.13±0.22	3.34±0.56	2.96
takrin	0.50 ± 0.10	0.023 ± 0.003	0.05
7-MEOTA	10.50 ± 2.0	21.0 ± 3.0	2

Tabulka 6 Hodnoty IC₅₀ a SI stanovených látek. Takrin a 7-MEOTA byly použity jako srovnávací standardy.



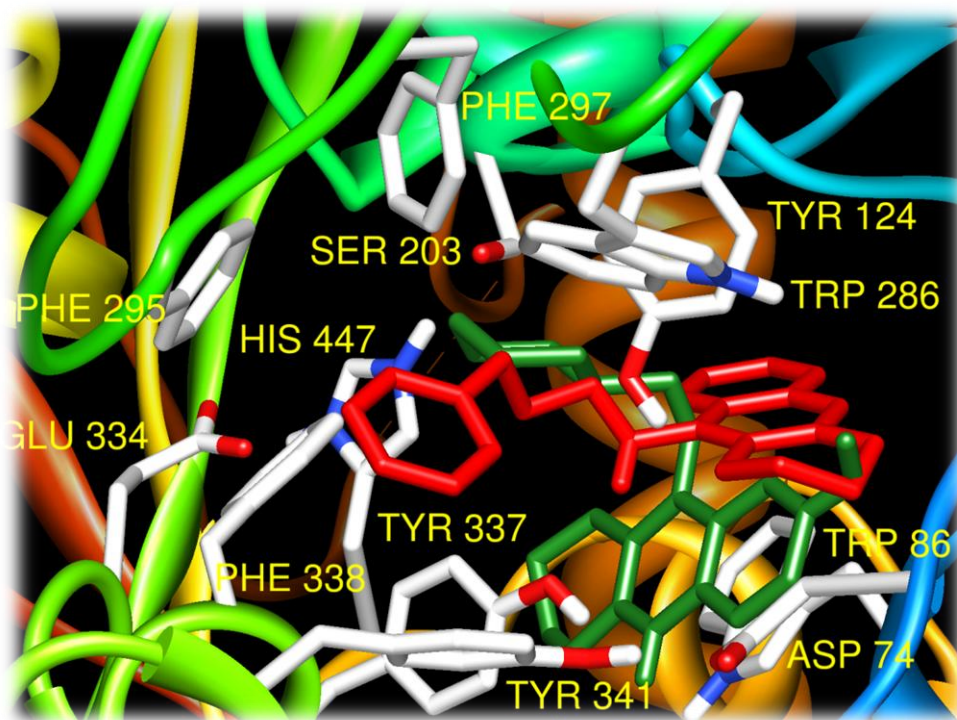
Obr. 41 Závislost koncentrace testovaných látek **1**, **4** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.



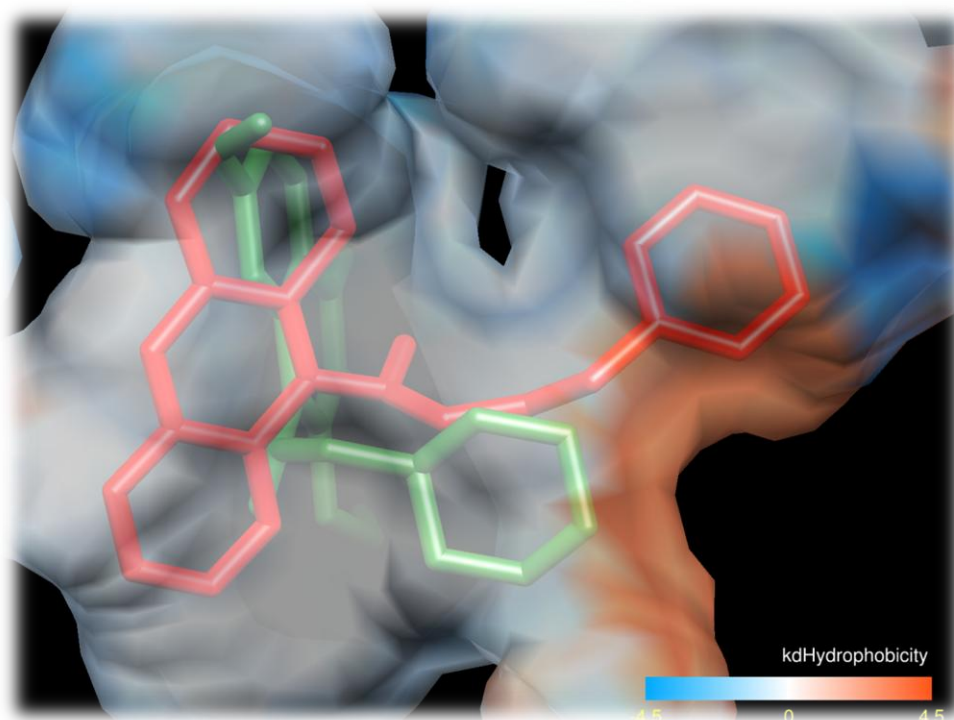
Obr. 42 Závislost koncentrace testovaných látek **1**, **3** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

Takrinové deriváty vykazaly vyšší afinitu k oběma cholinesterásám než látky odvozené od 7-MEOTA. Nejúčinnějším inhibitorem AChE byla látka **1**, která je 2,5 × účinnější ve srovnání s takrinem a dokonce 55 × účinnější než 7-MEOTA. Deriváty odvozené od méně toxické 7-MEOTA (**3**, **4**) nepřekonal inhibiční potenciál takrinu na AChE, vykazaly však vyšší inhibiční potenciál než 7-MEOTA. Žádná z nových látek nepřekonal hodnotu IC_{50} takrinu na BChE, avšak všechny nové deriváty disponují vyšším inhibičním potenciálem v porovnání se 7-MEOTA. Vztaženo na 7-MEOTA, analog **1** je o dva řády silnějším inhibitorem AChE a o tři řády účinnější na BChE. Látka **4**, derivát méně toxické 7-MEOTA, vykazala nejvyšší stanovený index selektivity, je 9 × účinnější na AChE a 6 × silnější inhibitor BChE než 7-MEOTA.

Molekulově modelovací studie byla provedena u látek s nejvyšším inhibičním potenciálem; látky **1** a **4** byly podrobeny *in silico* sledování na lidské AChE, deriváty **1** a **3** byly dockovány v aktivní části BChE. Nejpravděpodobnější orientace analogů **1** a **4** v kavitě enzymu AChE jsou ukázány na obrázcích 43 a 44.



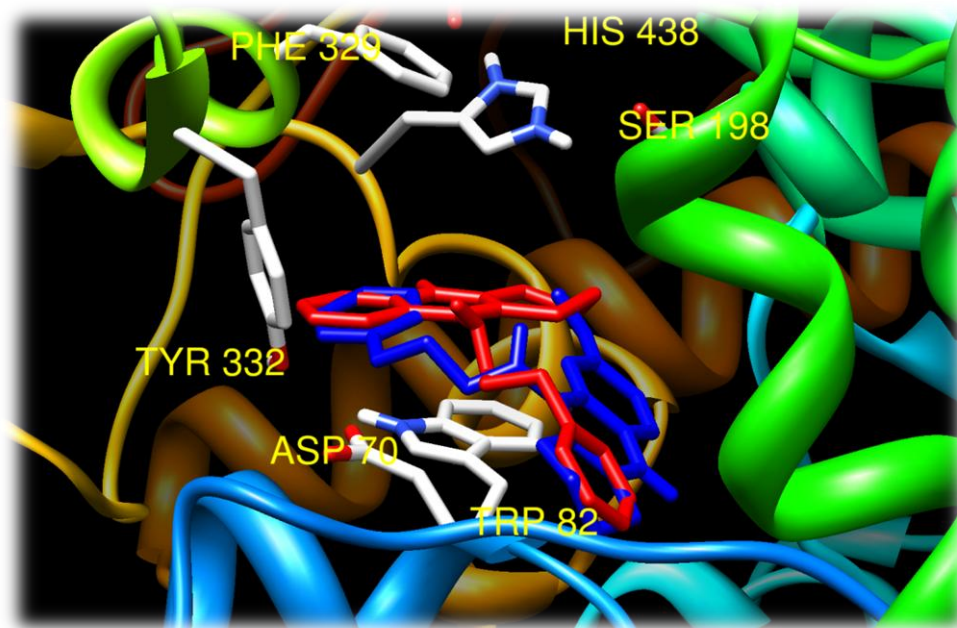
Obr. 43 Předpokládaná orientace látek **1** (červeně) a **4** (zeleně) v aktivní části AChE. Enzym je zobrazen ve stužkové konformaci, bíle jsou znázorněna aminokyselinová rezidua.



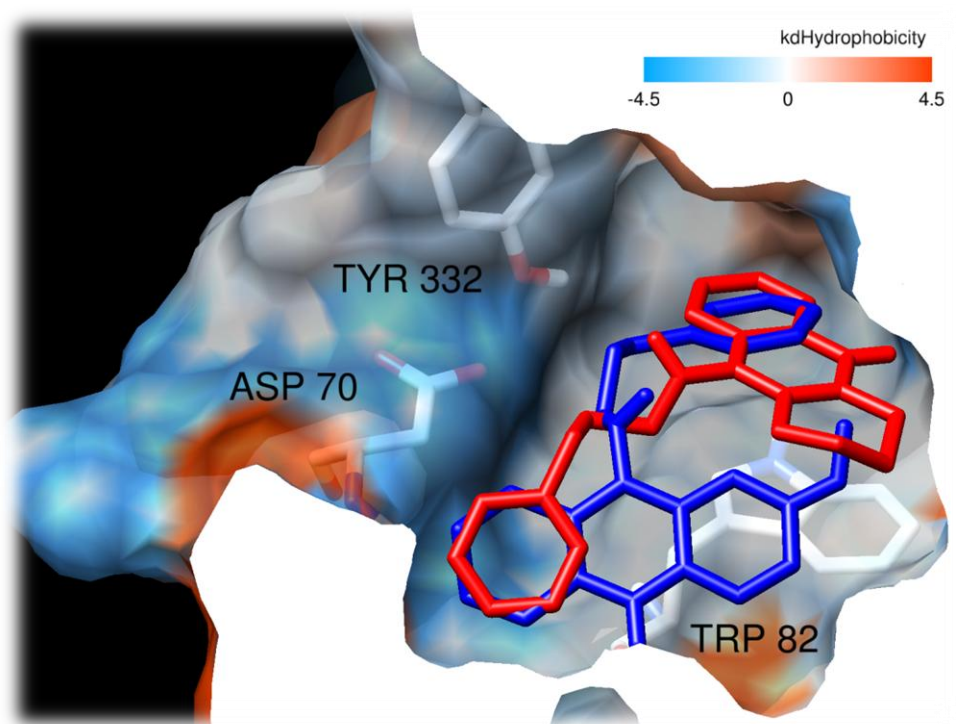
Obr. 44 Deriváty **1** (červeně) a **4** (zeleně) a jejich orientace v kavitě AChE, která je zobrazená pouze jako hydrofobní povrch.

Takrinový skelet obou derivátů **1** a **4** interaguje kation- π interakcí s Trp86 v katalytické části enzymu mimo katalytickou triádu. Komplex látky **1** s enzymem je pravděpodobně stabilizován vodíkovými můstky mezi heterocyklickým dusíkem takrinového základu a karbonylovou skupinou Trp86 (2.5 Å) stejně jako exocyklická aminoskupina **1** interaguje s hydroxylem Tyr337 (2.3 Å). Rozdílná je pak orientace u látky **4**; ta interaguje s Asp74 (3.3 Å) svou methoxy skupinou, zatímco aminoskupina je vázána slabými vodíkovými můstky s kyslíkovým atomem Trp83.

U analogů **1** a **3** byla provedena molekulově modelovací studie na BChE a je zobrazena na obrázcích 45 a 46. Obě látky jsou vůči sobě zrcadlově obrácené v aktivní části BChE. Derivát **1** tvoří vodíkové vazby mezi svou amino skupinou a karbonylovou funkcí His438 (2.1 Å) s možnou nevazebnou π - π resp. kation- π interakcí k Trp82. Látka **3** interaguje svou methoxy skupinou s Tyr128 (2.6 Å) za vzniku vodíkové vazby. Takrinový skelet je pravděpodobně dále stabilizován elektrostatickými nevazebnými interakcemi s Trp82, Thr120 a Gly121.



Obr. 45 Předpokládaná orientace látek **1** (červeně) a **3** (modře) v aktivní části BChE. Enzym je zobrazen ve stužkové konformaci, bíle jsou znázorněna aminokyselinová rezidua.



Obr. 46 Deriváty **1** (červeně) a **3** (modře) a jejich orientace v kavitě BChE, která je zobrazená pouze jako hydrofobní povrch se zbytky aminokyselin (bíle).

Všechna výše uvedená data vyzdvihují potenciál látky **4**, která se stane v budoucnu předmětem dalšího studia (stanovení toxicitních parametrů, farmakokinetické parametry, ovlivnění agregace A β a další).

3.5 SYNTÉZA A IN VITRO STANOVENÍ *N*-ALKYL-7-METHOXYTAKRIN HYDROCHLORIDŮ JAKO POTENCIÁLNÍCH INHIBITORŮ CHOLINESTERAS V ALZHEIMEROVĚ CHOROBĚ (PŘÍLOHA Č. 9)

V dalších experimentech jsme se zaměřili na syntézu a biologické hodnocení vlivu různě dlouhých alkylových řetězců připojených k 7-MEOTA přes amino skupinu. Série byla připravena alkylací 7-MEOTA příslušnými 1-bromalkany v prostředí KOH/DMSO za vzniku daných sekundárních bází *N*-alkyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinaminů (schéma 6). Čisté báze byly převedeny na hydrochloridové soli probubláním plynného chlorovodíku a ty pak krystalizovány z acetonitrilu. Celkové výtěžky reakcí se pohybovaly mezi 16 a 63 %.

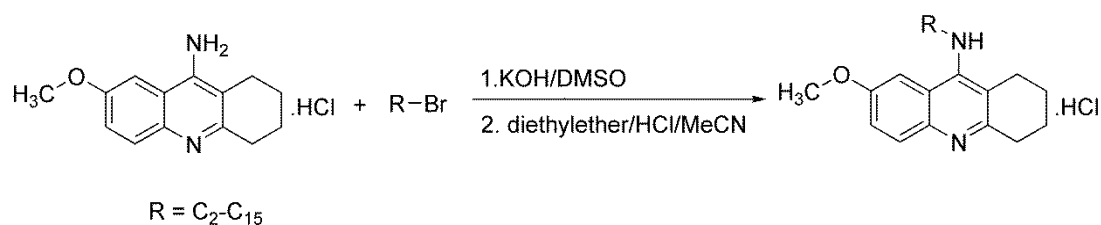


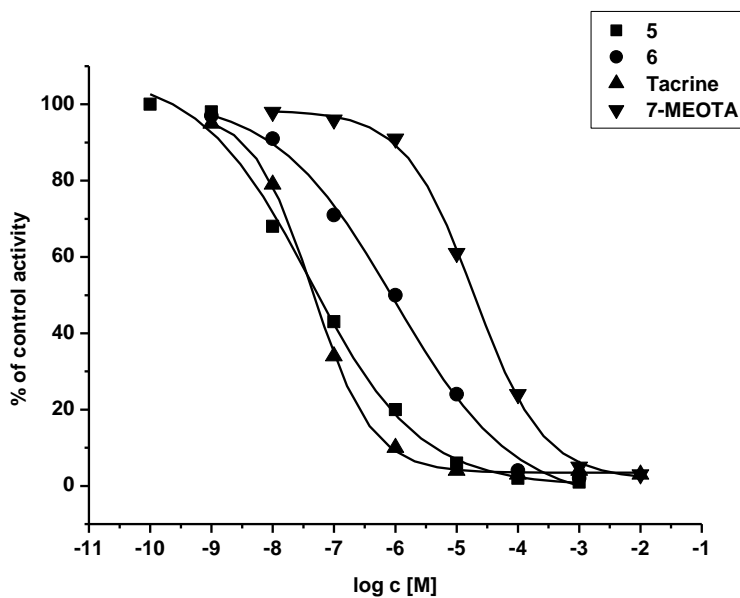
Schéma 6 Syntéza *N*-alkyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinamin hydrochloridů.

Výsledky a diskuze

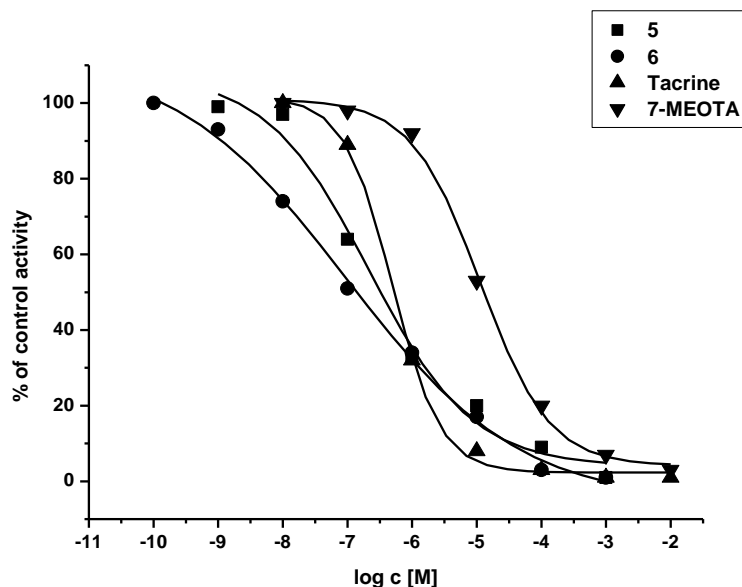
Inhibiční schopnost nově připravených látek byla otestována Ellmanovou metodou na lidské rekombinantní AChE a plazmatické sérové BChE a následně byly dopočítány hodnoty SI (tabulka 7).¹⁴⁷ Na obrázcích 47 a 48 je znázorněn průběh stanovení IC_{50} na AChE resp. BChE pro takrin, 7-MEOTA a dva nejlepší inhibitory (**5**, **6**).

Označení	R ^c	AChE IC ₅₀ ± SD μM	BChE IC ₅₀ ± SD μM	SI (IC ₅₀ BChE/ IC ₅₀ AChE)
1	C ₂	66.05 ± 12.9	97.07 ± 15.8	1.47
2	C ₃	9.24 ± 1.80	69.7 ± 11.4	7.54
3	C ₄	21.2 ± 4.13	63.84 ± 10.4	3.01
4	C ₅	6.65 ± 1.29	16.43 ± 2.68	2.47
5	C ₆	0.10 ± 0.02	1.03 ± 0.16	10.30
6	C ₇	0.27 ± 0.05	0.04 ± 0.007	0.15
7	C ₈	0.36 ± 0.07	0.12 ± 0.02	0.33
8	C ₉	1.56 ± 0.3	0.36 ± 0.06	0.23
9	C ₁₀	a	a	-
10	C ₁₁	a	a	-
11	C ₁₂	1.01 ± 0.2	a	-
12	C ₁₃	99.91 ± 19.5	a	-
13	C ₁₄	45.53 ± 8.90	a	-
14	C ₁₅	a	a	-
THA		0.5 ± 0.1	0.023 ± 0.003	0.05
7-MEOTA		15.0 ± 2.40	21.0 ± 3.4	1.40

Tabulka 7 Stanovené hodnoty IC₅₀ a SI. U látek s označením ^a nebyla pozorováno inhibiční působení v testovaném koncentračním rozmezí.



Obr. 47 Závislost koncentrace testovaných látek **5**, **6** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.



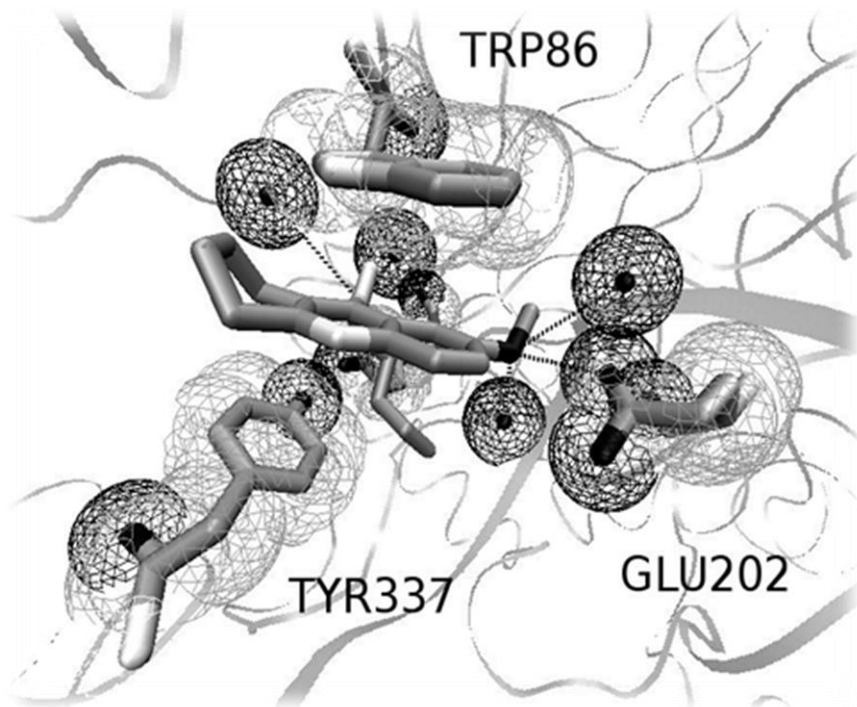
Obr. 48 Závislost koncentrace testovaných látek **5**, **6** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

Několik nově připravených látek prokázalo silnější inhibiční působení vůči oběma testovaným enzymům v porovnání s referenčními látkami - takrinem a 7-MEOTA. Deriváty **5 - 7** jsou lepšími inhibitory AChE ve srovnání s takrinem a 7-MEOTA. Zejména látka **5** je pětikrát účinnější inhibitor AChE než takrin a dokonce má o dva řády silnější afinitu k AChE než parentní 7-MEOTA. Na druhou stranu, některé látky neinhibují AChE (**9 - 10**, **14**). Žádný z testovaných derivátů nepřekonal inhibiční působení takrinu na BChE. Analoga **6 - 8** působí inhibičně na BChE řádově v sub- μ M koncentracích. Pouze o něco málo slabším inhibitorem BChE je derivát **6** mající hodnotu IC_{50} v řádu nM; svou parentní molekulu 7-MEOTA však **6** překonala dokonce o tři řády. Látky **9 - 14** v testovaném koncentračním rozmezí neinhibovaly. S ohledem na hodnoty SI, látka **5** resultovala v inhibitor s největší selektivitou k AChE. Za zajímavé můžeme považovat deriváty **11 - 13**, které inhibují pouze AChE v μ M koncentracích IC_{50} . Nejlepší stanovenou látkou s ohledem na AD byla látka **5**, která disponuje vysokou selektivitou k AChE a inhibičním působením proti oběma testovaným enzymům v μ M resp. sub- μ M koncentracích IC_{50} .

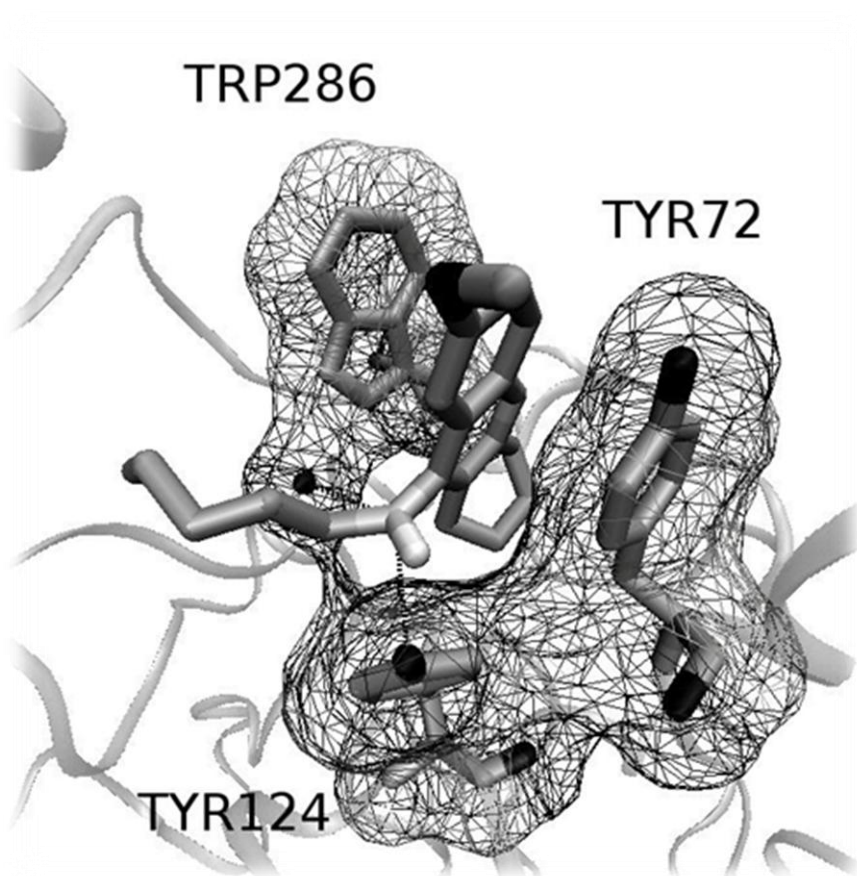
Alkylace 7-MEOTA přinesla zajímavé výsledky s ohledem na inhibiční potenciál nových derivátů. Zatímco délka navázaného řetězce mezi $C_2 - C_4$ a $C_{10} - C_{15}$ vedla

k méně účinným analogům 7-MEOTA, zvýšení účinnosti přinesly deriváty s C₅ až C₉, které překonaly inhibiční potenciál parentní sloučeniny 7-MEOTA. Mezi těmito novými molekulami rezultovala sloučenina s C₆ jako nejlepší inhibitor AChE. Obdobné biologické výsledky můžeme nalézt i mezi stanovenými hodnotami na BChE, kde nejlépe inhibovala látka s C₇. Zajímavou aktivitou se profilují látky nesoucí C₁₂ - C₁₄. Ty shodně působí na AChE, zatímco BChE neinhibují.

Na základě *in vitro* výsledků byla provedena molekulově modelovací studie látky **5** na AChE z *Mus musculus* (myš domácí). Takrinový základ derivátu **5** je orientován při okraji vstupu AChE přivázaný π - π interkacemi k Trp86 a Tyr337 v periferním anionickém místě (obr. 49, 50). Dusík amino skupiny tvoří vodíkovou vazbu s dvěma molekulami vody a Glu202. Šestičlenný uhlíkový řetězec je orientován dovnitř kavity AChE, což pravděpodobně vysvětluje vyšší inhibiční potenciál nejen **5**, ale i látek **4**, **6 - 8**, které nesou C₅-C₉ a mohou tak dostatečně vyplnit kavitu vstupu AChE. Na druhé straně pak stojí látky s kratším řetězcem (**1 - 3**) nebo naopak delším (**9 - 14**), které se ne zcela dobře orientují pro svou délku do AChE. Trochu stranou pak stojí látky **11 - 13**, jejichž vliv na AChE lze vysvětlit rozdílnou vazbou na aminokyselinová rezidua při okraji AChE, zatímco tyto v BChE chybí.



Obr. 49 Prostorové uspořádání 5 v aktivní části *Mus musculus* AChE.



Obr. 50 π - π interakce 5 s Trp286 a Tyr72.

3.6 NOVÉ A RE-EVALUOVANÉ HODNOTY AKTIVIT V SÉRII *N*-ALKYL-TAKRINOVÝCH DERIVÁTŮ: SYNTÉZA, BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ STUDIE (PŘÍLOHA Č. 10)

Další část práce je zaměřena na syntézu, biologické hodnocení a molekulově modelovací studii *N*-alkylovaných takrinů. Syntéza některých látek z této série vycházející z 9-chlortakrinu je popsána v dřívější práci W. P. Brianem a kol.¹⁴⁸ Některé z těchto analogů vykazaly zajímavou lokálně anestetickou aktivitu, která úzce koreluje s charakterem postranního alkylového řetězce. Zatímco délka ovlivňuje takovou aktivitu pozitivně, větvení naopak snižuje lokálně anestetický index.¹⁴⁹ Další studie odhalily schopnost těchto látek interkalovat DNA a působení proti amébám.¹⁵⁰ Nejnovější práce v této oblasti jsou zaměřeny na syntézu nových *N*-alkylových takrinů s využitím katalyzátorů na bázi Pd sloučenin.¹⁵¹⁻¹⁵² Syntéza a cholinergní vlastnosti *N*-alkyltakrinů byly částečně publikovány v roce 1997.¹⁵³ Tyto byly testovány na AChE izolované z *Electrophorus electricus*. V naší práci rozšiřujeme výsledky studie o testování na lidské rekombinantní AChE a zcela nově i na lidské sérové BChE. Céla série byla navíc rozšířena o další analoga, byla udělána molekulově modelovací studie nejlépe působících derivátů na AChE i BChE a nakonec byly tyto výsledky srovnány s předchozí sérií *N*-alkylovaných-7-MEOTA derivátů.

Výsledky a diskuze

V této studii je zahrnuto celkově 25 látek. Ty byly připraveny reakcí probíhající za podmínek nukleofilní substituce, kde takrin-hydrochlorid reagoval s příslušným 1-bromalkanem nebo 1,5-dijodpentanem (**3**, **8** - **25**) (schéma 7). Analogickým postupem pak byly připraveny i deriváty 7-MEOTA (**1**, **2**, **4** - **7**) (obr. 51). Výtěžky reakcí pro takrinové deriváty se pohybovaly mezi 7 – 53 %, což je srovnatelné s výtěžnostmi reakcí pro 7-MEOTA deriváty (6 – 56 %).

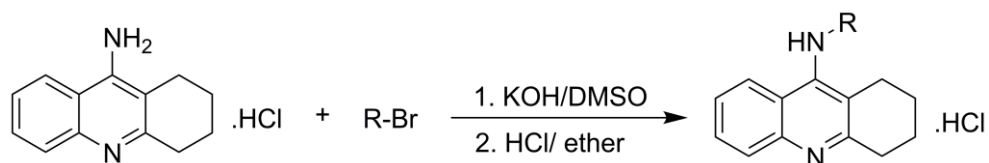
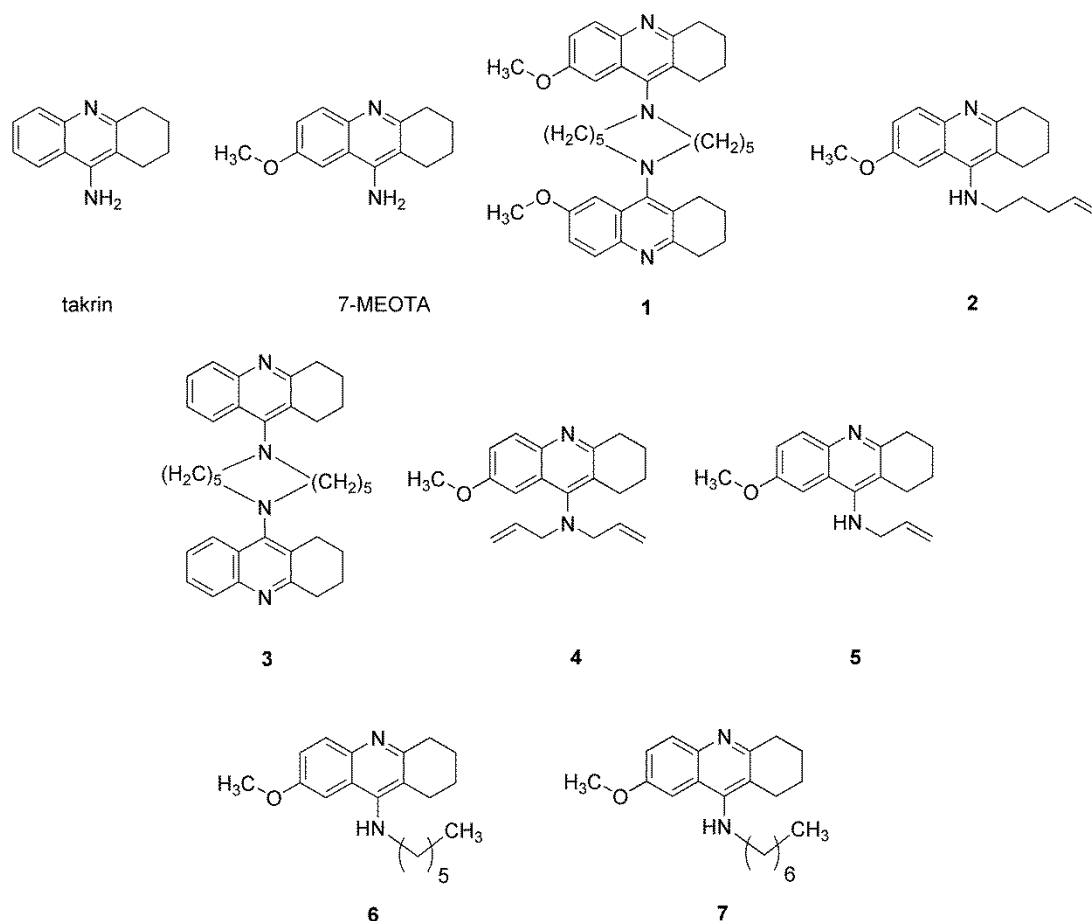


Schéma 7 Syntéza takrinových analogů **8 - 24**. Obdobný postup byl využit pro přípravu **3** a **25** za použití 1,5-dijodpentanu jako alkylačního činidla a dále pro alkylationi 7-MEOTA (**1**, **2**, **4** - **7**).

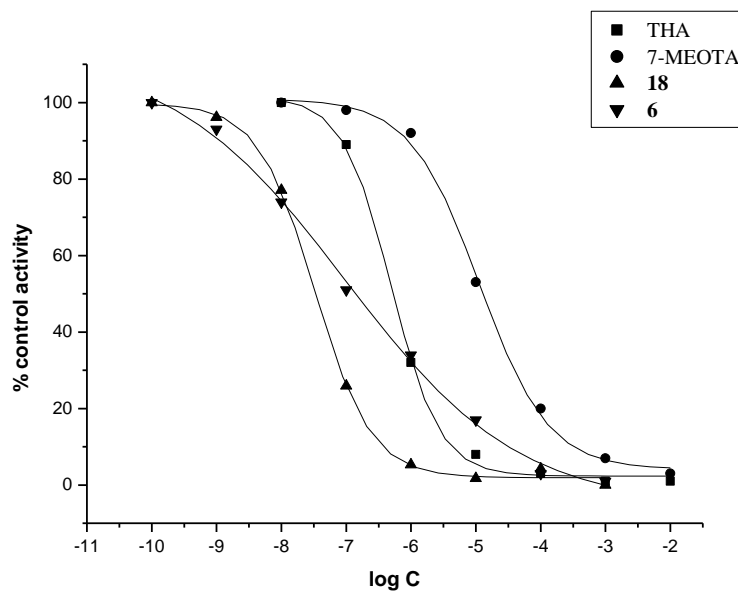


Obr. 51 Některé nové látky a standardy použité ve studii *N*-alkylovaných takrinů.

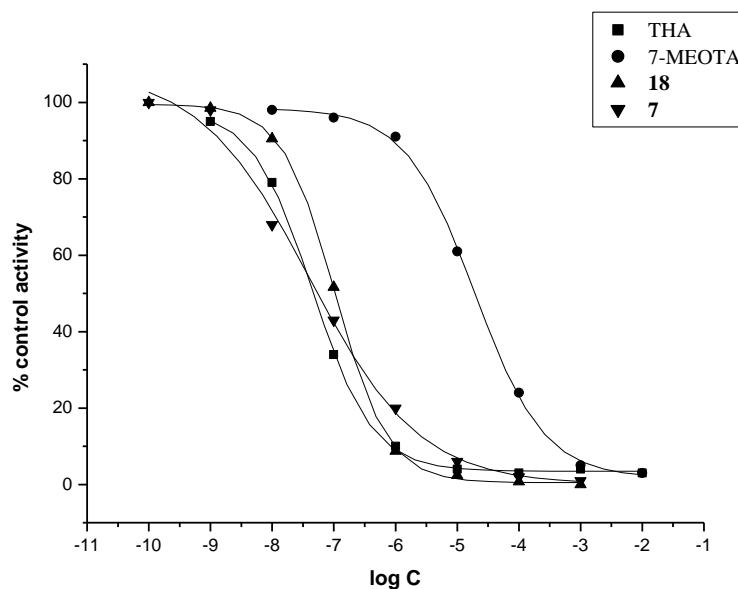
Inhibiční potenciál nových *N*-alkyltakrinů (**8 - 25**) byl stanoven pomocí Ellmanovy metody a porovnán s takrinem, 7-MEOTA a látkami **1 - 7**. Získaná data jsou shrnuta v tabulce 8. Průběh stanovení inhibičních parametrů IC_{50} pro nejslibnější inhibitory AChE a BChE je ilustrován na obrázcích 52 a 53.

Označení	AChE IC ₅₀ ± SD μM	BChE IC ₅₀ ± SD μM	SI (IC ₅₀ BChE/ IC ₅₀ AChE)
1	4.57 ± 0.87	656 ± 93	143
2	2.2 ± 0.4	1.10 ± 0.16	0.5
3	0.37 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.6
4	13.3 ± 2.6	16.9 ± 2.8	1.3
5	2.8 ± 0.5	33.7 ± 5.6	12
6	0.10 ± 0.02	1.0 ± 0.2	10
7	0.27 ± 0.05	0.040 ± 0.007	0.2
8	0.313 ± 0.061	0.959 ± 0.160	3
9	0.518 ± 0.101	0.916 ± 0.153	1.7
10	0.504 ± 0.098	0.289 ± 0.048	0.6
11	0.166 ± 0.032	0.194 ± 0.032	1.2
12	0.147 ± 0.029	0.180 ± 0.030	1.2
13	0.106 ± 0.021	0.144 ± 0.024	1.4
14	0.094 ± 0.018	0.227 ± 0.038	2.4
15	0.043 ± 0.008	0.215 ± 0.036	5
16	0.044 ± 0.009	0.207 ± 0.034	4.7
17	0.036 ± 0.007	0.169 ± 0.028	4.7
18	0.033 ± 0.006	0.104 ± 0.017	3.2
19	0.119 ± 0.023	0.227 ± 0.034	1.9
20	1.423 ± 0.277	0.969 ± 0.161	0.7
21	3.657 ± 0.713	2.483 ± 0.414	0.7
22	42.99 ± 8.38	66.79 ± 11.15	1.6
23	1.01 ± 0.19	3.02 ± 0.50	3
24	0.19 ± 0.04	0.42 ± 0.07	2.2
25	0.19 ± 0.04	1.68 ± 0.28	8.8
THA	0.50 ± 0.10	0.023 ± 0.003	0.05
7-MEOTA	10.50 ± 2.0	21.0 ± 3.0	2

Tabulka 8 Hodnoty IC₅₀ a SI testovaných standardů a *N*-alkyltakrinů.



Obr. 52 Závislost koncentrace testovaných látek **6**, **18** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě AChE.



Obr. 53 Závislost koncentrace testovaných látek **7**, **18** a standardů (takrin, 7-MEOTA) vztažených ke kontrolní aktivitě BChE.

Z uvedených hodnot v tabulce 8 lze vyvodit, že látky **14** - **18** mají afinitu v řádech nM IC_{50} k AChE. Nejúčinnějším inhibitorem byla látka **18** ($IC_{50} = 33$ nM), která nese

v poloze 9 C₁₂. Další prodlužování řetězce vedlo k látkám s nižší aktivitou, avšak v porovnání s *N*-alkyl-7-methoxytakrinovou řadou se inhibiční potenciál látek zcela nevytratil. K rozdílným závěrům došel Pomponi a kol., který stanovil za nejúčinnější derivát **14** nesoucí C₈ alkylový řetězec. Rozdíl je dán pravděpodobně v jiné sekvenci aminokyselin na testovaném enzymu (lidská AChE vs. AChE z *Electrophorus electricus*). V porovnání s takrinem je analog **18** 15 × účinnějším inhibitorem, nárůst aktivity o jeden řád lze pak pozorovat mezi nejúčinnějšími deriváty ze série *N*-alkyl-7-methoxytakrinů ve prospěch *N*-alkyltakrinů (zejména **14** - **18**). Implementace dvojnásobné vazby do postranního řetězce vyústila v slabý nárůst aktivity; to lze vysvětlit pravděpodobnou π-π nebo kation-π interakcí v aktivní části enzymu. Dvojitá substituce vedoucí k terciárním aminům měla naopak negativní vliv, vznikly deriváty s nižší účinností. S výjimkou **22**, všechny testované látky překonaly inhibiční potenciál 7-MEOTA. Látka **1** má nízkou aktivitu k BChE, je tedy poměrně výrazně selektivním inhibitorem AChE.

Z tabulky 8 *N*-alkyltakrinů na BChE lze vyčíst, že nejvyšší afinitu prokázala látka **18** (IC₅₀ = 104 nM) nesoucí C₁₂, zatímco nejnižší aktivita byla zaznamenána pro derivát **22**. V sérii *N*-alkyl-7-methoxytakrinů prokázala nejvyšší inhibiční potenciál látka **7** s C₇, která je třikrát účinnější a o jeden řád lepším inhibitorem než **18**. Dvojnásobná vazba v postranním řetězci má pozitivní vliv na zvýšení aktivity v případě krátkého řetězce, u delších dochází k poklesu aktivity (platí pro **2**, **5**, **24** a **25**). Ani jedna z testovaných látek nepřekonalala inhibiční parametry takrinu, na druhou stranu všechny vykazovaly vyšší inhibiční působení ve srovnání se 7-MEOTA s výjimkou **1** a **22**.

Z hodnot indexů selektivity se nejlépe profilovala látka **25**, která je 9 × selektivnější k AChE než k BChE.

Abychom mohli považovat látky za centrálně působící inhibitory AChE, tzn. takové, které procházejí hematoencefalickou bariérou, je nutné znát jejich fyzikálně chemické vlastnosti. Pro nově připravené *N*-alkyltakriny (**8** - **25**) a standardy (takrin, 7-MEOTA, **1** - **7**) byly vypočítány hodnoty rozdělovacího koeficientu mezi oktanol a vodu (log P) za pomoci on-line software (<http://www.vcclab.org>) (tabulka 9). Hansch a Leo zjistili, že optimální pro průchod přes hematoencefalickou bariéru pasivní

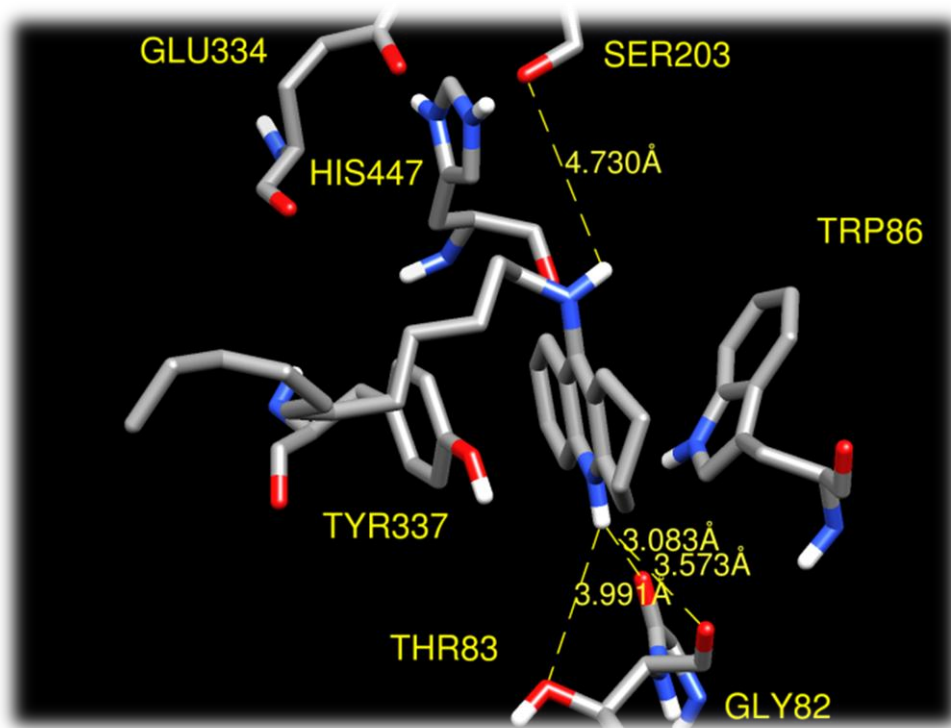
difuzí jsou takové hodnoty látky, jejichž log P leží mezi 1,5 – 2,7. Z tohoto pohledu, pouze látky **5**, **8** - **10**, **24** a **25** jsou v souladu s těmito představami, lze tak u nich usuzovat centrální působení.¹⁵⁴

Označení	R	Log P
1	-	8.38 ± 1.99
2	-	3.03 ± 1.90
3	-	8.53 ± 1.76
4	-	4.77 ± 0.89
5	-	2.35 ± 1.69
6	-	3.69 ± 2.13
7	-	4.14 ± 2.24
8	-CH ₂ -CH ₃	1.83 ± 0.78
9	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	2.25 ± 0.86
10	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	2.66 ± 0.93
11	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	3.10 ± 1.03
12	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	3.55 ± 1.13
13	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	3.99 ± 1.23
14	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	4.57 ± 2.08
15	-(CH ₂) ₈ -CH ₃	5.01 ± 2.19
16	-(CH ₂) ₉ -CH ₃	5.46 ± 2.29
17	-(CH ₂) ₁₀ -CH ₃	5.90 ± 2.40
18	-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	6.20 ± 2.38
19	-(CH ₂) ₁₂ -CH ₃	6.61 ± 2.47
20	-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	7.04 ± 2.59
21	-(CH ₂) ₁₄ -CH ₃	7.44 ± 2.69
22	-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	7.88 ± 2.81
23	-(-CH ₂ -CH=CH ₂) ₂	4.78 ± 0.73
24	-CH ₂ -CH=CH ₂	2.10 ± 0.76
25	-(CH ₂) ₃ -CH=CH ₂	2.86 ± 0.81
THA	-	2.71
7-MEOTA	-	2.67 ± 0.45

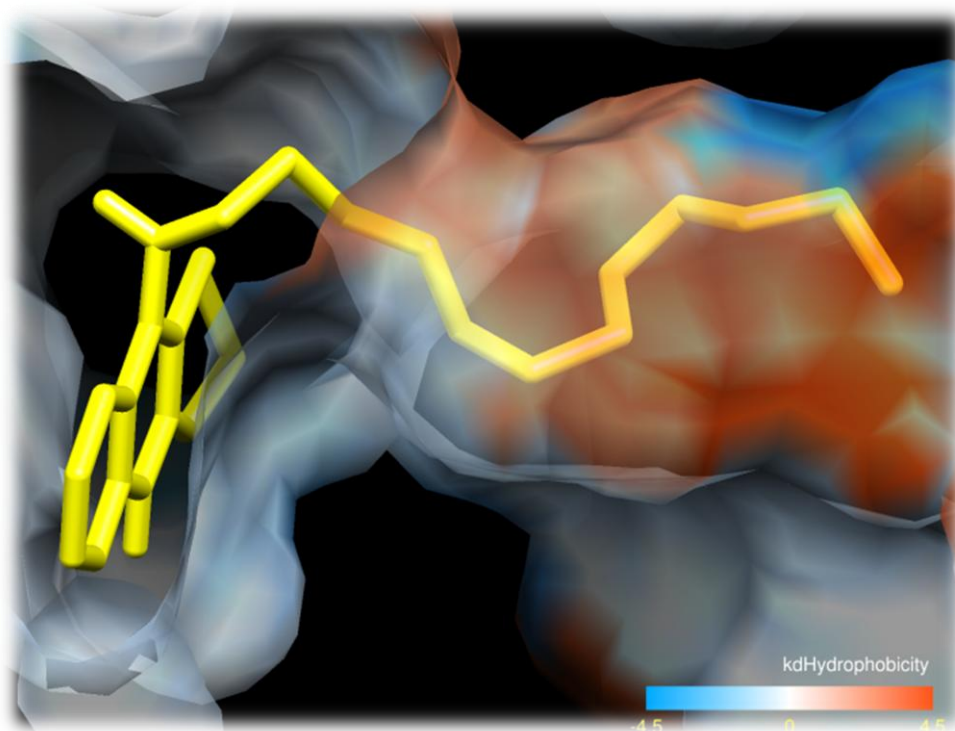
Tabulka 9 Vypočítané hodnoty log P.

Molekulově modelovací studie se zaměřila na objasnění interakcí mezi látkou **18** jakožto nejlepšího inhibitoru AChE a BChE. Předpokládaná orientace látky **18** v aktivním místě AChE je ilustrována na obrázcích 54 a 55. Derivát **18** je stabilizován π - π interakcemi s Trp86 a Tyr337. Aminoskupina **18** tvoří slabou vodíkovou vazbu se Ser203 (4.7 Å) v katalytické části enzymu. Protonovaný dusík, který je součástí takrinového heterocyklu, je vázán vodíkovými můstky k hydroxyly Thr83 (3.9 Å) a ke karbonylovým funkčním skupinám Trp86 (3.6 Å) a Trp82 (3.1 Å). Alkylový řetězec

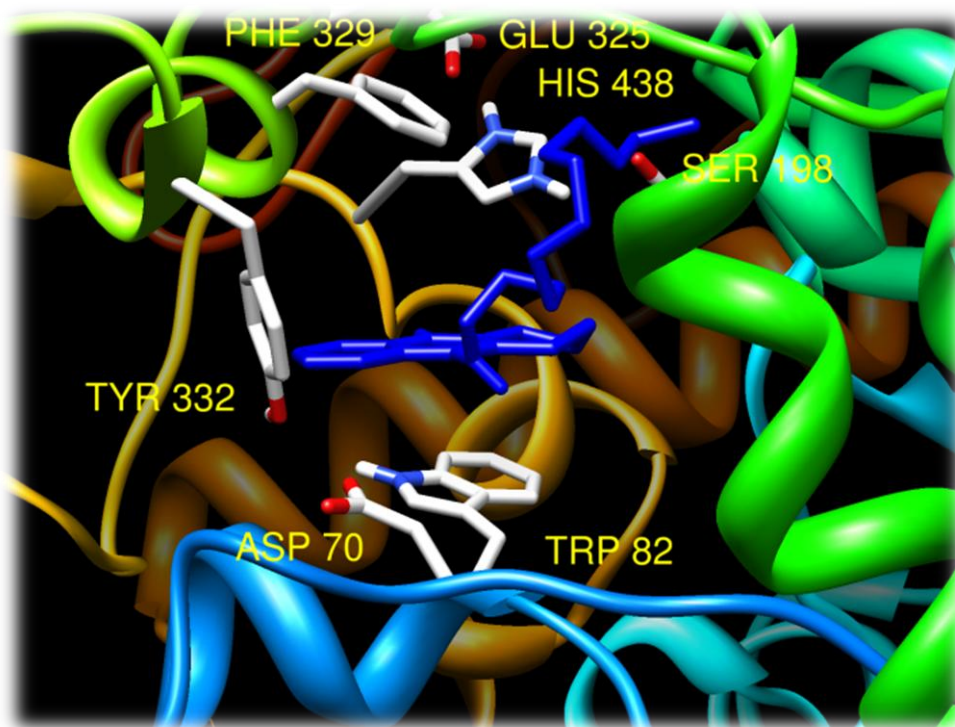
vyplňuje kavitu vstupu do enzymu AChE a přispívá tak ke stabilitě tvorbou hydrofobních interakcí. K podobným výsledkům došla i studie prováděná u *N*-alkyl-7-methoxytakrinů na AChE z *Mus musculus*. Na obrázcích 56 a 57 je zobrazena interakce **18** s BChE. Ta je vázána k Trp82 pomocí π - π interakcí. Karbonylová funkce His438 (2.1 Å) pak interaguje vodíkovou vazbou s aminoskupinou takrinového derivátu **18**.



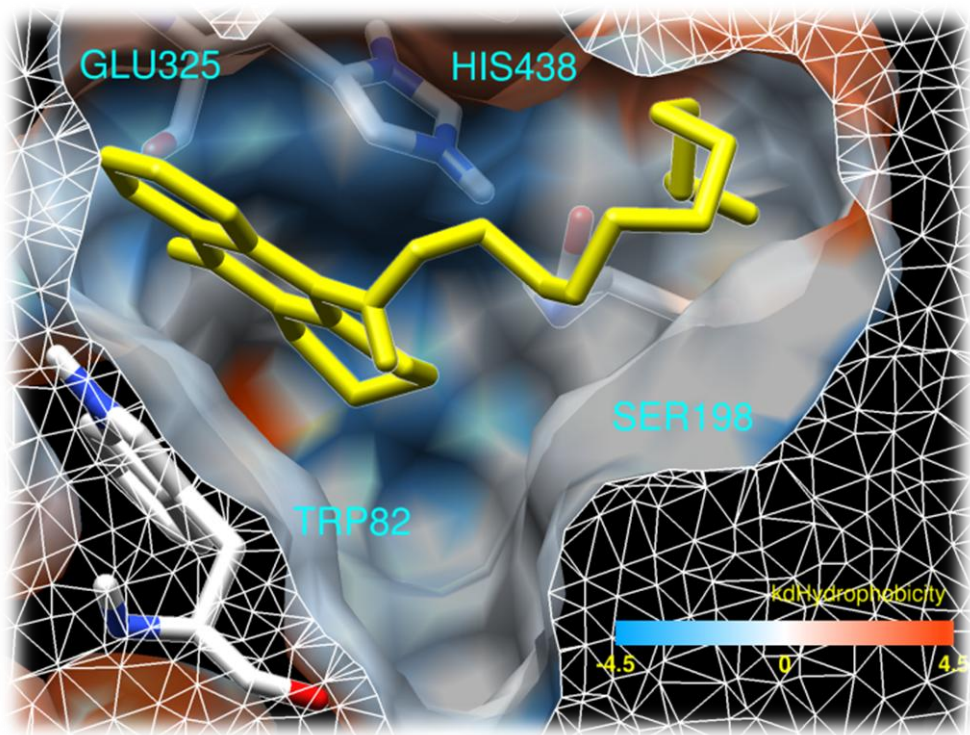
Obr. 54 Předpokládaná orientace látky **18** v aktivní části AChE. Vyznačena jsou důležitá aminokyselinová rezidua.



Obr. 55 Derivát **18** a jeho orientace v kavitě AChE, která je zobrazená pouze jako hydrofobní povrch.



Obr. 56 Předpokládaná orientace látky **18** (modře) v aktivní části BChE. Vyznačena jsou důležitá aminokyselinová rezidua, zbytek enzymu je ve stužkové konformaci.



Obr. 57 Derivát **18** a jeho orientace v kavitě BChE. Enzym je zobrazený pouze jako hydrofobní povrch.

3.7 SYNTÉZA, ANTICHOLINERGNÍ VLASTNOSTI, STANOVENÍ INHIBICE AGREGACE B-AMYLOIDU, VLIV NA MONOAMINOXIDASU A NADH DEHYDROGENASU A MOLEKULOVĚ MODELOVACÍ STUDIE TAKRIN-7-METHOXYTAKRIN HETERODIMERŮ PRO LÉČBU ALZHEIMEROVY CHOROBY (PŘÍLOHA Č. 11)

V rámci této série jsme připravili nové duální heterodimery AChE spojující takrin a 7-MEOTA do jediné molekuly. Tyto látky měly zvýšenou inhibiční účinnost ve srovnání s výše prezentovanými monotakriny nebo homodimerními deriváty. Dva nejúčinnější inhibitory byly následně podrobeny dalšímu testování pro inhibiční potenciál vůči oběma isoformám MAO, NADH dehydrogenasy a dále testovány pro možnost inhibovat agregaci A β ₁₋₄₀, insulinu nebo lysozymu do fibril nebo obráceně podporovat depolymeraci již vytvořených spletců amyloidních proteinů. Tyto dvě nejúčinnější látky byly rovněž navrženy k *in vivo* testování.

Výsledky a diskuze

Schéma 8 ilustruje syntetický postup vedoucí k hybridním sloučeninám takrin-7-MEOTA. Výchozí látkou pro syntézu byl zvolen 7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-10*H*-9-on (**1**), který byl získán popsanou cyklokondenzační reakcí 4-methoxyanilinu s ethyl-2-oxocyklohexankarboxylátem za katalytického působení *p*-toluensulfonové kyseliny v 71% výtěžku.¹⁵⁵ **1** byla následně kvantitativně převedena reakcí s POCl₃ na 9-chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**2**). Reakcí s α,ω -diaminy v prostředí fenolu byly získány příslušné *N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)alkan-1, ω -diaminy **3 - 8** (71 – 93 %). Syntéza 1,2,3,4-tetrahydroakridin-10*H*-9-onu (**9**, 65 %) probíhala analogicky jako pro **1**, výchozími látkami byly zvoleny cyklohexanon s *N*-methylantranilátem. 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**10**) byl získán obdobně jako **2** reakcí s POCl₃, který byl následně konvertován na 9-isothiokyanáto-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**11**) pomocí AgSCN za refluxu v bezvodém toluenu bez přístupu světla. Takrin-7-MEOTA thiomočoviny (**12-17**) byly získány reakcí příslušného aminu **3 - 8** s **11** (65 – 78 %). Převod thiomočoviny na močovinové deriváty (**18 - 23**, 88 – 95 %) byl realizován pomocí mesitylnitril oxidu (MNO).

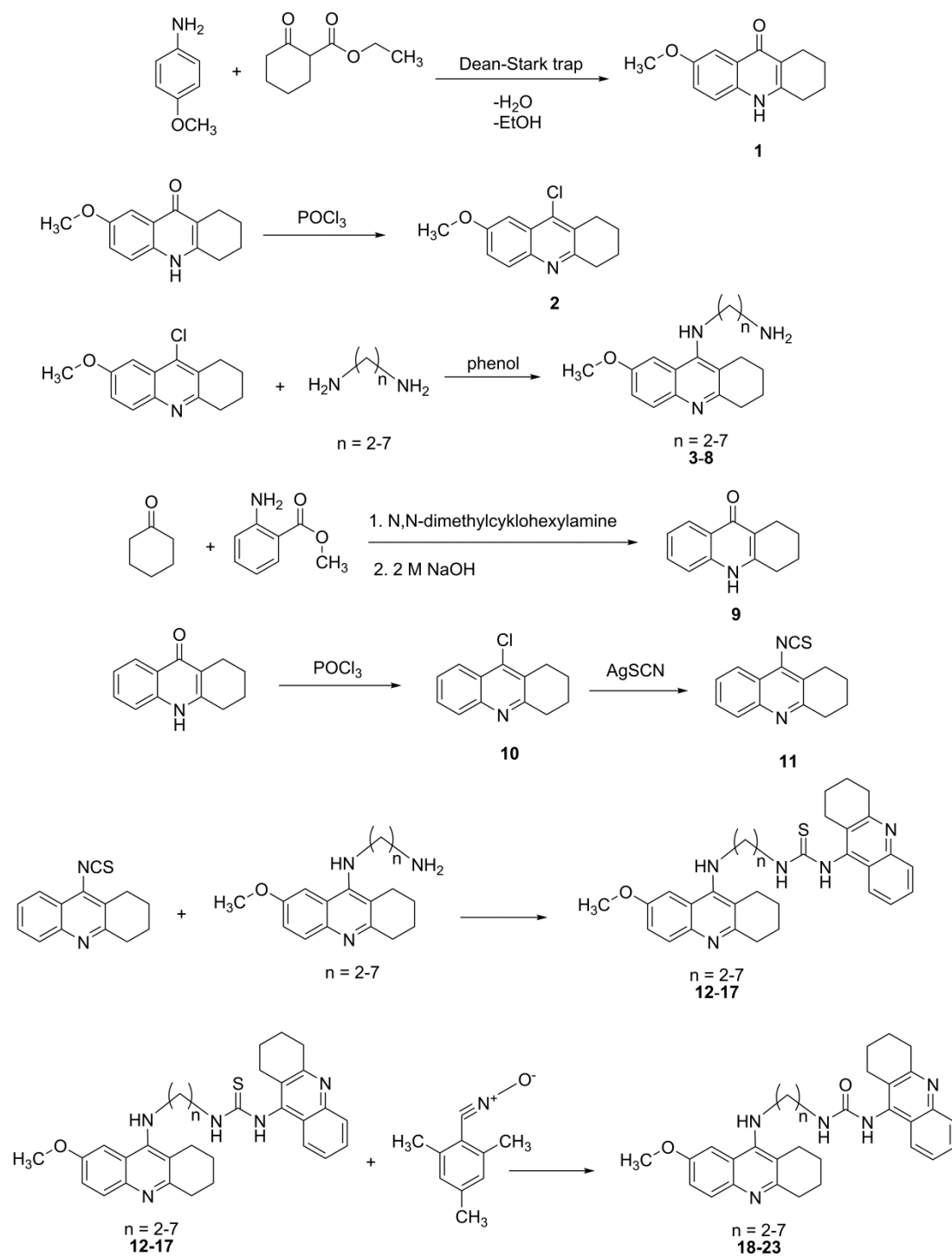


Schéma 8 Syntetický postup přípravy 7-MEOTA-takrin thimočovín (**12 - 17**) a močovín (**18 - 23**).

K potvrzení nově vzniklých struktur thimočovín **12 - 17** a močovín **18 - 23** byla použita kombinace běžných ^1H a ^{13}C NMR experimentů. Jednoznačné určení struktury a přiřazení jednotlivých atomů bylo provedeno pomocí homo- a heterokorelovaných 2D metod NMR (H,H-COSY , H,C-HSQC , H,C-HMBC).

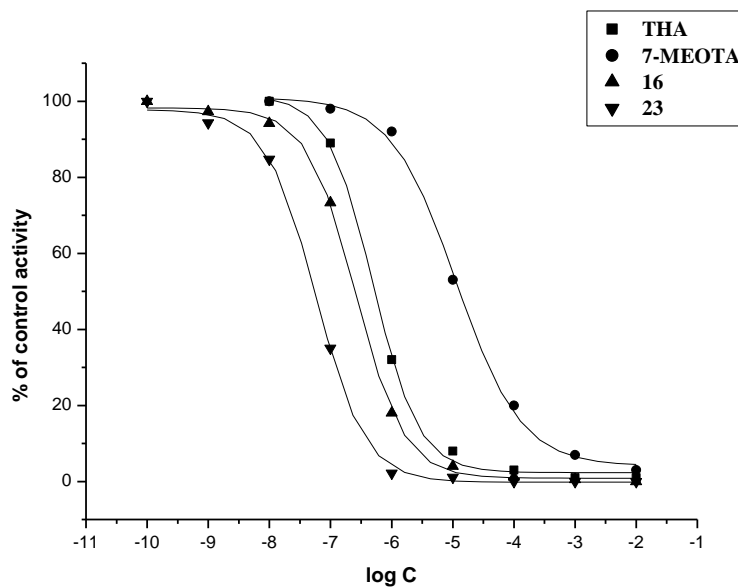
Infračervená spektroskopie byla využita pouze u látky **11** k pozorování vibrací isothiokyanátové funkční skupiny.

Cílové struktury 7-MEOTA-takrin thimočoviny (**12 - 17**), močoviny (**18 - 23**) a intermediáty s navázanými diaminy (**3 - 8**) byly podrobeny *in vitro* testování vůči AChE a BChE pomocí Ellmanovy metody. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10.

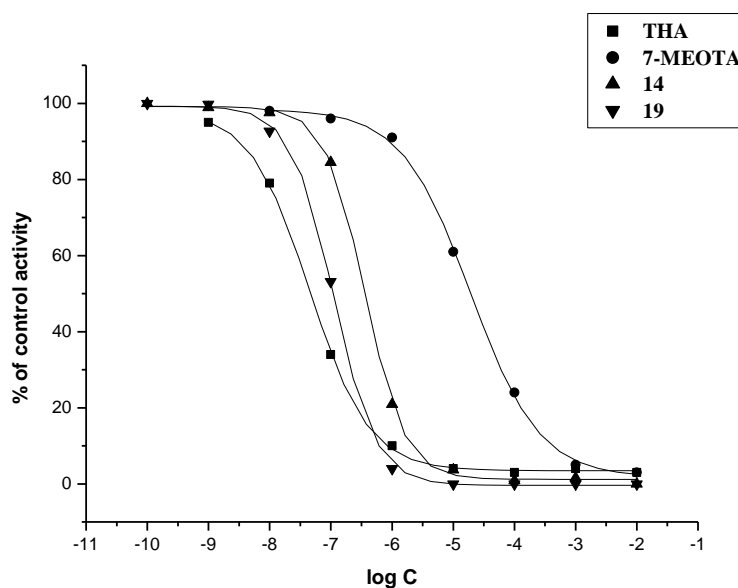
Označení	n	AChE IC ₅₀ ± SD (μM)	BChE IC ₅₀ ± SD (μM)	SI (IC ₅₀ BChE/ IC ₅₀ AChE)
3.2HCl	2	5.32 ± 1.04	64.45 ± 10.76	12.1
4.2HCl	3	1.93 ± 0.38	49.77 ± 8.31	25.8
5.2HCl	4	1.42 ± 0.28	9.22 ± 1.54	6.5
6.2HCl	5	3.44 ± 0.67	29.63 ± 4.95	8.6
7.2HCl	6	0.21 ± 0.04	10.84 ± 1.81	51.6
8.2HCl	7	0.86 ± 0.17	7.26 ± 1.21	8.4
12	2	1.97 ± 0.38	1.72 ± 0.29	0.9
13	3	4.08 ± 0.80	1.12 ± 0.19	0.3
14	4	0.52 ± 0.10	0.29 ± 0.05	0.6
15	5	0.32 ± 0.06	0.48 ± 0.08	1.5
16	6	0.21 ± 0.04	0.32 ± 0.05	1.5
17	7	0.56 ± 0.11	0.38 ± 0.06	0.7
18	2	4.04 ± 0.79	0.13 ± 0.02	0.03
19	3	1.19 ± 0.23	0.11 ± 0.02	0.09
20	4	0.17 ± 0.04	0.45 ± 0.08	2.5
21	5	0.15 ± 0.03	0.66 ± 0.11	4.2
22	6	0.10 ± 0.02	0.39 ± 0.07	3.7
23	7	0.057 ± 0.011	0.26 ± 0.04	4.6
THA	-	0.50 ± 0.10	0.023 ± 0.003	0.05
7-MEOTA	-	10.50 ± 2.0	21.0 ± 3.0	2

Tabulka 10 Výsledky inhibičního testování vůči AChE a BChE vyjádřené jako hodnoty IC₅₀ a hodnoty selektivity (SI). "n" označuje počet uhlíků ve spojovacím řetězci.

Závislost průběhu inhibičního stanovení na AChE i BChE pro nejlepší inhibitory ze série thimočoviny a močoviny jsou vyobrazeny na obrázcích 58 a 59.



Obr. 58 Závislost koncentrace testovaných látek (**16**, **23**) a referenčních látek (takrin a 7-MEOTA) na inhibici AChE.



Obr. 59 Závislost koncentrace testovaných látek (**14**, **19**) a referenčních látek (takrin a 7-MEOTA) na inhibici BChE.

Intermediáty **3** - **8** byly testovány jako dihydrochloridové soli. Všechny testované látky vykazaly AChE inhibiční potenciál v μM , resp. sub- μM koncentracích od $0.057 \mu\text{M}$ (**23**) po $4.08 \mu\text{M}$ (**13**). Látka **23** nesoucí 7 methylenových skupin ve

spojovacím řetězci jako jediná inhibovala v řádu nM. Ta je 8,8 × účinnější než takrin a dokonce 184,2 × účinnější v porovnání se 7-MEOTA. Všechny cílové produkty včetně intermediátů překonaly AChE aktivitu referenční 7-MEOTA; látky **7**, **15** - **16** a **20** - **23** překonali afinitu takrinu k AChE. Thiomočovinná série (**12** - **17**) měla všeobecně nižší inhibiční potenciál ve srovnání s močovinnými analogy (**18** - **23**), nejméně účinnými pak byly intermediáty diaminů (**3** - **8**).

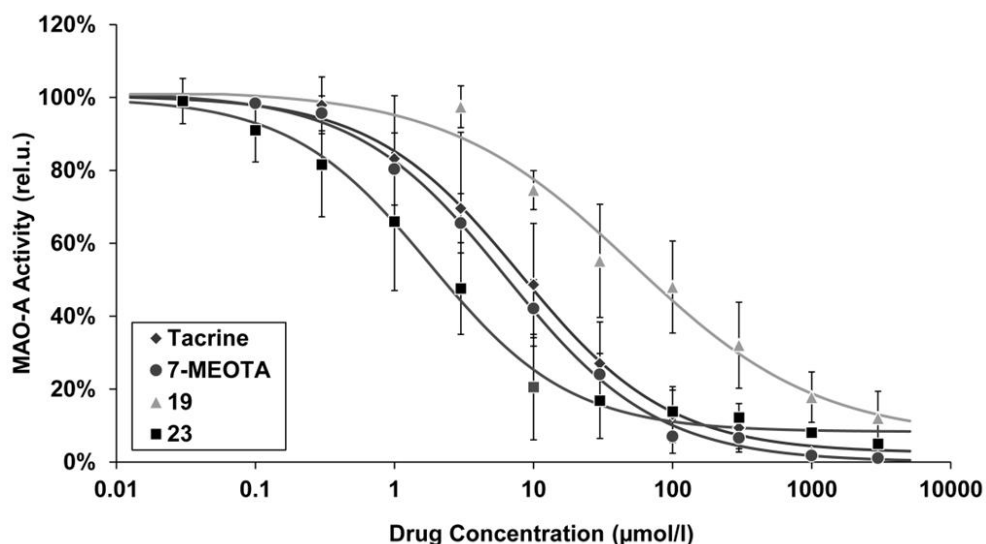
Všechny testované látky byly rovněž testovány na BChE. Hodnoty IC₅₀ se pohybovaly v μM až sub-μM koncentracích; nejúčinnější byl derivát **19** (0.11 μM), nejméně pak **3** (64.45 μM). Největší rozdíl v účinnosti můžeme pozorovat od diaminů **3** - **8**, které jsou minimálně o jeden až dva řády slabšími inhibitory BChE ve srovnání s takrin-7-MEOTA konjugáty. Rovněž močovinné deriváty (**18** - **23**) vyústily v látky s vyšším inhibičním potenciálem oproti thiomočovinné sérii. Inhibiční potenciál takrinu nebyl překonán ani jednou z nově připravených látek. Na druhou stranu, většina (**5**, **8**, **12** - **23**) derivátů v této studii překonala aktivitu 7-MEOTA vůči BChE. Močovinný analog **19** překonal aktivitu 7-MEOTA dokonce 190,9 ×. Celkový vliv délky spojovacího řetězce mezi takrinem a 7-MEOTA v sérii thiomočovinných a močovinných neměl patrný vliv na aktivitu vůči BChE.

Paradoxně, intermediáty **3** - **8** mají vyšší hodnoty SI v porovnání s cílovými produkty thiomočovinných a močovinných. Na druhou stranu, jistá míra neselektivity v thiomočovinné a močovinné sérii může být jistou výhodou zejména v pozdějších fázích onemocnění, kdy hladina AChE klesá a koncentrace BChE vzrůstají.^{156,157}

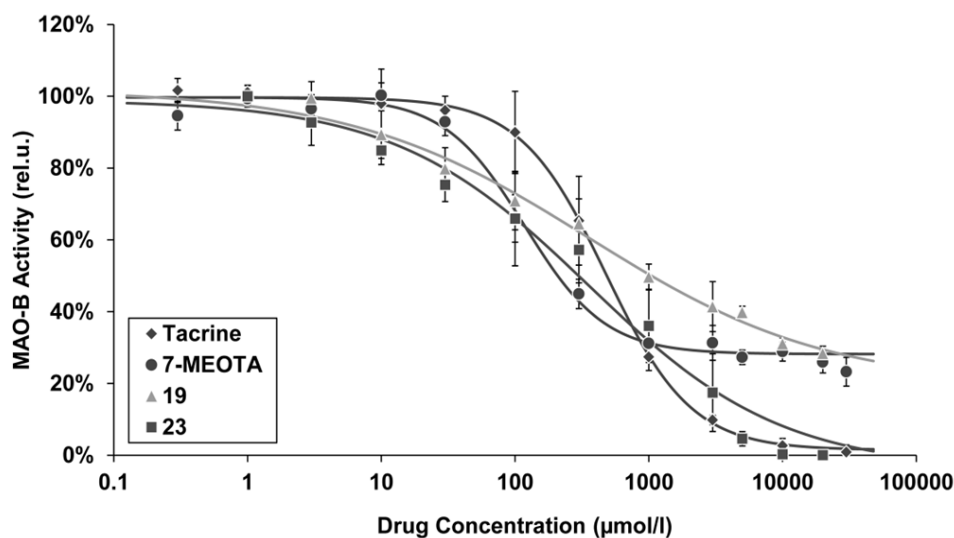
Pro nejúspěšnější látky z *in vitro* testování na cholinesterásách bylo provedeno stanovení na monoaminoxidásách (MAO, isoformy A a B). Výsledky měření se nachází v tabulce 11 a průběh tohoto stanovení je vyobrazen na obr. 60 a 61.

Označení	MAO-A IC ₅₀ ± SD (μM)	MAO-B IC ₅₀ ± SD (μM)
THA	8.05 ± 1.83	477 ± 40
7-MEOTA	6.35 ± 0.54	118 ± 7
19	51.6 ± 18.6	357 ± 105
23	1.80 ± 0.27	352 ± 34

Tabulka 11 Výsledky stanovení inhibic pro MAO-A a MAO-B.



Obr. 60 Inhibice basální MAO-A takrinem, 7-MEOTA, **19** a **23** v mitochondriální frakci izolované z kůry prasečích mozků. Křivka naznačuje průběh stanovení inhibice MAO-A v závislosti na koncentraci testované látky.

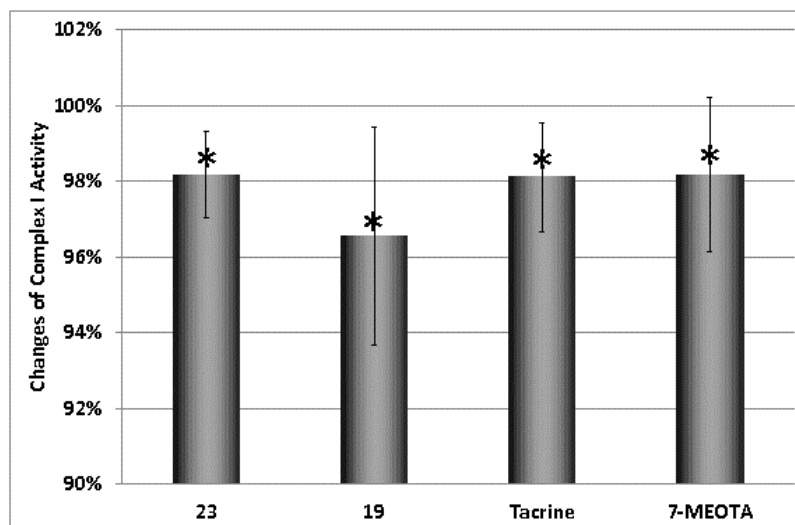


Obr. 61 Inhibice basální MAO-B takrinem, 7-MEOTA, **19** a **23** v mitochondriální frakci izolované z kůry prasečích mozků. Křivka naznačuje průběh stanovení inhibice MAO-B v závislosti na koncentraci testované látky.

Z výsledků stanovení lze říci, že takrin i 7-MEOTA jsou účinné a spíše selektivní inhibitory MAO-A. Močovinový analog **19** vykázal neselektivní inhibici obou MAO v poměrně vysokých koncentracích, zatímco látku **23** lze považovat za selektivní a vysoce účinný inhibitor MAO-A. Hodnotou IC_{50} na MAO-A se derivát **23** přiblížil neselektivnímu inhibitoru MAO iproniazidu a dokonce převýšil inhibiční potenciál

některých antidepresiv, antipsychotik a endokanabionidů.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Z hlediska ovlivnění MAO-A lze považovat **23** za relativně nebezpečnou a silně ovlivňující monoaminergní neurotransmisi. Naproti tomu však může přispívat k antidepresivnímu působení, což může být v průběhu AD vítanou vlastností léčiva.¹⁶¹ Rovněž inhibice MAO-B může vést k pozitivnímu vlivu v průběhu AD, kdy takové inhibitory MAO-B potlačují proces astrogliosis (pozn. abnormální zvýšení astrocytů v důsledku odumírání okolních neuronů).¹⁶² Navíc je diskutována i role neselektivních inhibitorů MAO v souvislosti s tvorbou neurotoxických částic jako jsou reaktivní aldehydy nebo peroxid vodíku, které podporují následnou tvorbu dalších reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species) a mohou tak přispívat k neurodegenerativním procesům.¹⁶³

Z dalšího testování na ovlivnění NADH dehydrogenasy (komplex I) jsme zjistili možné ovlivnění buněčné energetické bilance v periférii a mozku. Výsledky jsou shrnuty na obr. 62. Toto testování vedlo k zjištění, že všechny testované látky, tj. takrin, 7-MEOTA, **19** a **23** ovlivňují energetickou bilanci buňky a mohou tak ovlivňovat energetické pochody v buňce. Míra inhibice komplexu I testovanými inhibitory AChE je však v porovnání s běžně užívanými antipsychotiky malá a tudíž lze soudit, že toto ovlivnění nebude mít klinicky významný efekt.¹⁶⁴



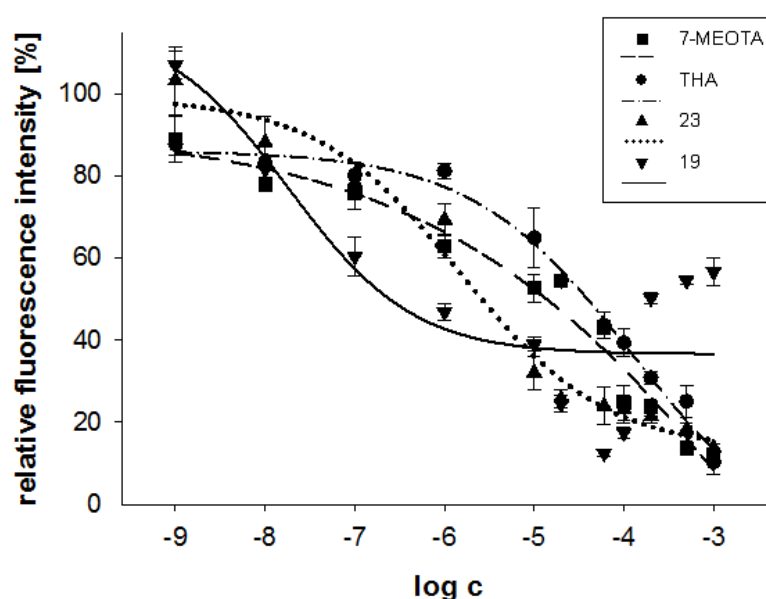
Obr. 62 Látkami navozené změny v aktivitě NADH dehydrogenasy (komplex I).

Pro nejperspektivnější látky (**19**, **23**) a standardy takrin a 7-MEOTA jsme prověřili jejich ovlivnění tvorby amyloidních fibril *in vitro* pomocí thioflavin T testu (ThT test). Všechny látky byly testovány při fixní koncentraci 200 μ M v přítomnosti 10 μ M amyloidního proteinu ($A\beta_{1-40}$, insulin nebo lysozym). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12 a jsou vyjádřeny jako inhibiční aktivity (A_{inh} , vypočítané jako rozdíl fluorescenční intenzity získané pro amyloidní shluky a fluorescence detekované po inkubaci látky s amyloidními proteiny pomocí ThT) a hodnotami IC_{50} (obr. 63). V porovnání s referenčními látkami (takrin, 7-MEOTA) nově připravené močovinné deriváty (**19**, **23**) výrazněji inhibovaly tvorbu fibril $A\beta_{1-40}$ od 52 % (**19**) po 79 % (**23**). **23** je rovněž nejúčinnějším inhibitorem v této studii. Naše zjištění potvrzuje i následná molekulově modelovací studie, která ukázala, že látka **23** je schopná současně interagovat s periferním anionickým místem i aktivním místem. Tudíž můžeme **23** považovat za látku schopnou zpomalit AChE-navozenou agregaci $A\beta_{1-40}$. Hodnoty IC_{50} naopak vyzdvihují derivát **19**, který vystupuje jako silnější inhibitor agregace $A\beta_{1-40}$ o jeden řád v porovnání se 7-MEOTA a **23** a dokonce o dva řády ve srovnání

s takrinem. Pro srovnání jsou uvedeny v tabulce 12 další hodnoty A_{inh} pro insulin a lysozym jako další amyloidní proteiny.

Označení	$IC_{50} A\beta_{1-40}$ (μM)	$A_{inh} A\beta_{1-40}$ (%)	A_{inh} insulin (%)	A_{inh} lysozym (%)
THA	34.8	69.1 ± 1.5	6.8 ± 3.0	14.6 ± 2.9
7-MEOTA	9.7	76.4 ± 2.0	2.5 ± 1.6	-14.6 ± 0.8
19	0.25	51.6 ± 6.2	41.9 ± 1.2	11.5 ± 4.1
23	2.6	78.6 ± 1.7	56.0 ± 9.9	50.6 ± 1.2

Tabulka 12 Inhibiční aktivity (A_{inh}) a hodnoty IC_{50} pro $A\beta_{1-40}$.



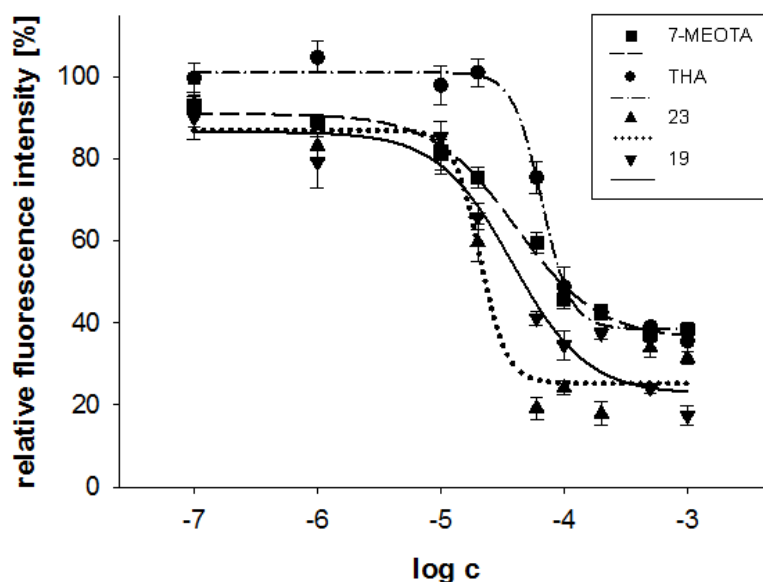
Obr. 63 Průběh inhibice agregace $A\beta_{1-40}$ testovaných (**19**, **23**) a referenčních látek (takrin, 7-MEOTA).

V souvislosti s ovlivněním $A\beta_{1-40}$ byl učiněn vedle inhibičního stanovení i depolymerizační test, který byl vyhodnocen ThT testem. Všechny látky byly testovány při fixní koncentraci 200 μM v přítomnosti 10 μM $A\beta_{1-40}$. Výsledky jsou vyjádřeny v tabulce 13 jako depolymerizační aktivity (A_{dep} , označuje schopnost látky redukovat množství předvytvořených fibrilárních spletenců $A\beta_{1-40}$) a jako DC_{50} (polovina depolymerizační koncentrace testované látky). Průběh stanovení je ilustrován na obr. 64. Všechny testované látky podporují depolymerizaci fibril $A\beta_{1-40}$ řádově v μM koncentracích. Pohledem na hodnoty DC_{50} , nejlépe působící depolymerizační látkou je **23**, která je o jeden řád účinnější než takrin a 7-MEOTA.

Hodnoty A_{dep} pro všechny stanovené amyloidní proteiny shodně vyzdvihují oba nové deriváty (**19**, **23**).

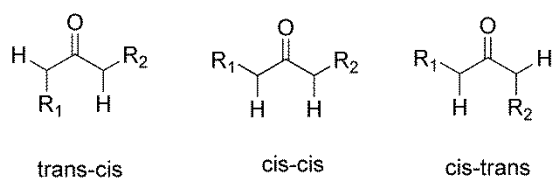
Označení	DC_{50} $A\beta_{1-40}$ (μM)	A_{dep} $A\beta_{1-40}$ (%)	A_{dep} insulin (%)	A_{dep} lysozym (%)
THA	131.3	57.3 ± 1.9	34.3 ± 0.9	12.4 ± 1.9
7-MEOTA	149.5	57.4 ± 1.9	29.7 ± 2.7	3.8 ± 3.3
19	54.3	62.5 ± 1.3	40.5 ± 0.7	25.1 ± 3.9
23	22.8	82.1 ± 2.9	46.3 ± 3.5	47.0 ± 3.2

Tabulka 13 Hodnoty depolymerizační aktivity (A_{dep}) pro $A\beta_{1-40}$, insulin a lysozym, a poloviny depolymerizační koncentrace (DC_{50}).



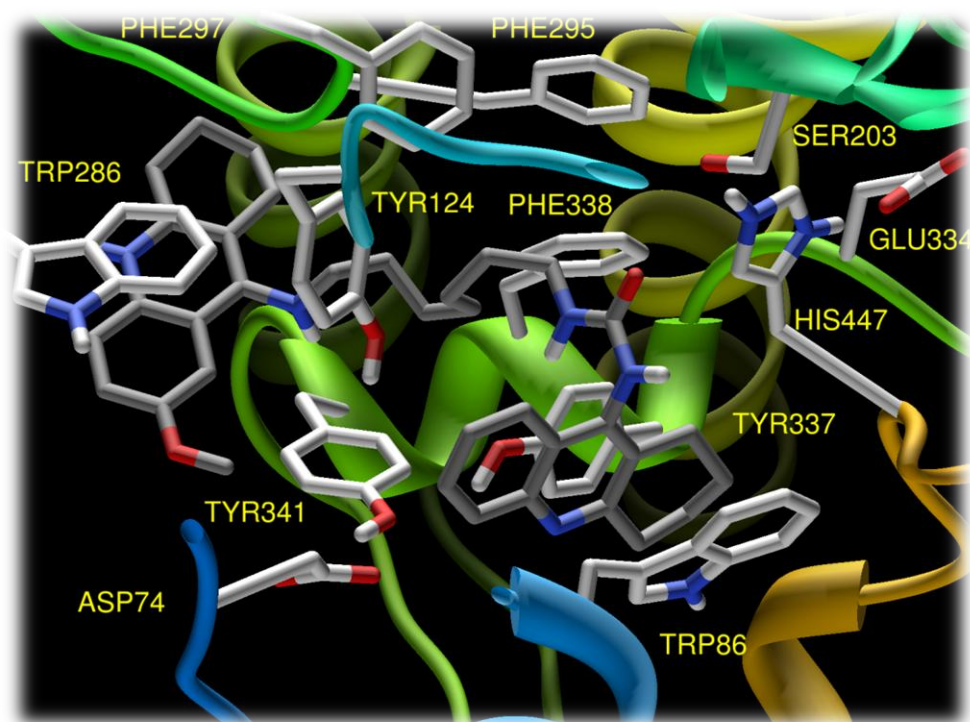
Obr. 64 Průběh depolymerizace fibril $A\beta_{1-40}$ nových močovinných derivátů (**19**, **23**) a referenčních látek (takrin, 7-MEOTA).

Na obrázku 65 jsou vyobrazeny zkoumané prostorové orientace látek **19** a **23** v molekulově modelovací studii v aktivní části obou cholinesterás. Jako nejvýhodnější orientace v AChE se ukázala trans-cis konfigurace (obr. 66). Z pravděpodobných důležitých interakcí **23** interferuje s Trp86 a Tyr337 pomocí π - π interakcí. Vodíkový můstek je tvořen mezi Ser203 a kyslíkem substituované močoviny.



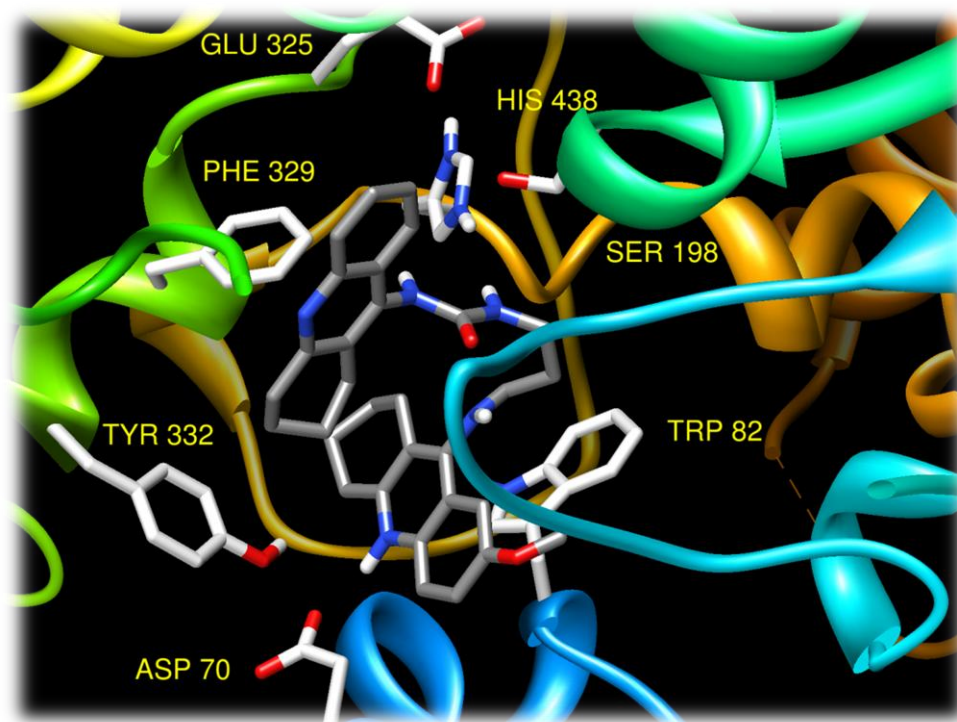
19 : R₁ = 1,2,3,4-tetrahydroacridine; R₂ = 7-methoxy-9-propylenamino-1,2,3,4-tetrahydroacridine
23 : R₁ = 1,2,3,4-tetrahydroacridine; R₂ = 7-methoxy-9heptylenamino-1,2,3,4-tetrahydroacridine

Obr. 65 Testované orientace látek **19** a **23** v molekulově modelovací studii nových duálních inhibitorů na bázi 7-MEOTA-takrin močovín.



Obr. 66 Nejvýhodnější prostorové uspořádání (trans-cis) močovinného derivátu **23** v aktivní části AChE a jeho interakce s aminokyselinovými rezidui.

Pro BChE se ukázala jako nejvýhodnější orientace látky **19** cis-cis. Umístění látky **19** v aktivní části BChE a interakce v tomto enzymu jsou ukázány na obrázku 67. Za zmínku stojí, že testovaný derivát interaguje se všemi aminokyselinovými rezidui katalytické triády.



Obr. 67 Nejvýhodnější prostorové uspořádání (cis-cis) močovinného derivátu **19** v aktivní části BChE a jeho interakce s aminokyselinovými rezidui.

4 ZÁVĚR

V rámci této disertační práce byl podán přehled o současném stavu problematiky AD. V úvodu jsou zmíněny používané terapeutické přístupy včetně zvažovaných farmakoterapeutických přístupů. Práce dále podává přehled o vývoji syntéz takrinových derivátů. Na základě struktury jsou následně tyto deriváty rozděleny do tří skupin, diskutovány jsou jejich farmakologické výhody a rovněž naznačen další trend vývoje v oblasti syntéz takrinů.

Velká pozornost byla věnována látce 7-MEOTA. Její struktura byla různými syntetickými postupy modifikována, přičemž byly hledány deriváty s vyšší účinností na testovaných enzimech (AChE, BChE) a ty byly porovnávány s takrinem a 7-MEOTA. V každé sérii je pak diskutována biologická účinnost nových derivátů a pro neúčinnější z nich je *in silico* vyhotovena molekulově modelovací studie, která se snaží popsat dané strukturní vlastnosti látky na aktivitu a orientaci v aktivní části testované cholinesterasy. Pro srovnání jsou uvedeny i syntézy a biologická data stejně substituovaných takrinových derivátů. Rovněž u nich je diskutována závislost struktury na aktivitě vůči cholinesterásám a provedena molekulově modelovací studie.

Dvě nejúčinnější látky z poslední uvedené série takrin-7-MEOTA thiomocovin a močoviny byly rovněž hodnoceny na schopnost inhibovat agregaci $A\beta_{1-40}$ ve fibrilární spletnice, podporovat depolymerizační pochody fibril tvořených $A\beta_{1-40}$ případně dalšími amyloidními proteiny (insulin, lysozym), ovlivňovat obě isoformy MAO a NADH dehydrogenasu.

Obě nejúčinnější látky z poslední série takrin-7-MEOTA močoviny jsou v současné době testovány *in vivo* v oblasti AD (toxická studie a stanovení farmakokinetických parametrů).

5 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

5.1 PUBLIKACE

1. Pohanka, M.; Zdarova Karasova, J.; Kuca, K.; Pikula, J.; Holas, O.; Korabecny, J.; Cabal, J. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*. **2010**, *81*, 621-624.
2. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of *N*-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6093-6095.
3. Kuca, K.; Marek, J.; Zdarova Karasova, J.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Kalasz, H. Novel Acetylcholinesterase reactivator – oxime K048 – reactivation activity in vitro. *Med. Chem.* **2010**, 1-5.
4. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 327-331.
5. Marek, J.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of the pyridinium salts differing in the length of the *N*-alkyl substituent. *Molecules* **2010**, *15*, 1967-1972.
6. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Zemek, F.; Opletalova, V.; Patocka, J.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of *N*-(bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules* **2010**, *15*, 8804-8812.
7. Fisar, Z.; Hroudova, J.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. In vitro effects of acetylcholinesterase reactivators on monoamine oxidase activity. *Toxicol. Lett.* **2011**, *201*, 176-180.

8. Jun, D.; Musilek, K.; Kassa, J.; Cabal, J.; Zdarova-Karasova, J.; Pohanka, M.; Bajgar, J.; Marek, J.; Komloova, M.; Soukup, O.; Holas, O.; Korabecny, J.; Dolezal, B.; Kuca, K. Vývoj univerzálního antidota otrav nervově paralytickými látkami na bázi reaktivátorů cholinesteráz: Od substance k autoinjektoru. *Urgentní medicína* **2010**, 4, 15-19.
9. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Korabecny, J.; Kuca, K. *In vitro* effects of acetylcholinesterase inhibitors and reactivators on Complex I of electron transport chain. *Neuroendocrinol. Lett.* **2011**; 32, 259-263.
10. Korabecny, J.; Musilek, K.; Horova, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y. S.; Kuca, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine - new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**; 21, 6563-6566.
11. Korabecny, J.; Janovec, L.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y. S.; Kuca, K. Comparison of novel tacrine and 7-MEOTA derivatives with aromatic and alicyclic residues: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Lett. Org. Chem.* **2012**; *under revision*.
12. Zdarova-Karasova, J.; Korabecny, J.; Pohanka, M.; Zemek, F.; Sepsova, V.; Kuca, K. Acetylcholinesterase inhibitors used or tested in Alzheimer Disease therapy; their passive diffusion through blood brain barrier: In vitro study. *Exp. Biol. M.* **2011**, *under revision*.
13. Korabecny, J.; Hrubá, E.; Soukup, O.; Zemek, F.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Spilovska, K.; Opletalova, V.; Kuca, K. Zvažovane farmakoterapeutické přístupy léčby Alzheimerovy choroby. *Česk. slov. Farm.* **2012**, 61, 4-10.
14. Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Janovec, L.; Horova, A.; Zemek, F.; Musilek, K.; Yung, Y.-S.; Spilovska, K.; Cabelova, P.; Babkova, K.; Andrs, M.; Opletalova, V.; Kuca, K. Novel and re-evaluated activities in the series of *N*-alkylated tacrine

derivatives: synthesis, biological evaluation and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, under revision.

15. Soukup, O.; Karasova-Zdarova, J.; Patocka, J.; Jun, D.; Musilek, K.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A resurrection of 7-MEOTA? The comparison with tacrine. *Curr. Alz. Res.* **2012**, under revision.
16. Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Musilek, K. Inhibitory gammasekretázy v terapii Alzheimerovej choroby. *Ceska Slov. Farm.* **2012**, accepted manuscript.
17. Korabecny, J.; Hamulakova, S.; Janovec, L.; Hroudova, J., Fisar, Z.; Gazova, Z., Siposova, K.; Gala, L.; Valko, M.; Kassa, J.; Babkova, K., Horova, A.; Opletalova, V.; Kuca, K. Synthesis, anti-cholinesterase properties, β -amyloid inhibition assessment, monoamine oxidase and NADH dehydrogenase *in vitro* effects and molecular modelling of tacrine-7-methoxytacrine heterodimers for Alzheimer disease treatment. *J. Med. Chem.* **2012**, under revision.

5.2 ABSTRAKTY Z KONFERENCÍ

1. Korabecny, J.; Kuca, K.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Karasova, J.; Pohanka, M. Synthesis and evaluation of bis-7-MEOTA compounds as reversible acetylcholinesterase inhibitors. **9th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Prague (Czech Republic) 11.-15.3.2009, *Neurodegenerative Diseases 2009, 6 (S1)*, p. 2109, ISBN 978-3-8055-9118-8.
2. Pohanka, M.; Musilek, K.; Zdarova-Karasova, J.; Korabecny, J.; Drtinova, L.; Kassa, J.; Kuca, K. In vitro evaluation of two Alzheimer's disease drugs tacrine and 7-methoxytacrine using electrochemical biosensor with immobilized acetylcholinesterase. **9th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Prague (Czech Republic) 11.-15.3.2009, *Neurodegenerative Diseases 2009, 6 (S1)*, p. 2149, ISBN 978-3-8055-9118-8.
3. Stodulka, P.; Pohanka, M.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Zdarova--Karasova, J. In vitro study of passive drug transport through blood-brain

- barrier using HPLC techniques. **9th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Prague (Czech Republic) 11.-15.3.2009, *Neurodegenerative Diseases 2009, 6 (S1), p. 2112, ISBN 978-3-8055-9118-8.*
4. Binder, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Jun, D. Design, synthesis and biological evaluation of new effective acetylcholinesterase inhibitors. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20.-25.9.2009, Book of abstracts, P3-5, p. 92.
 5. Korabecny, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Musilek, K.; Zdarova-Karasova, J.; Synthesis and evaluation of various *N*-methyl quaternary salts of 7-methoxytacrine compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20.-25.9.2009, Book of abstracts, P3-21, p. 100.
 6. Pohanka, M.; Drobik; Krenkova; Zdarova-Karasova, J.; Holas, O.; Kasalova; Korabecny, J.; Marek, J.; Kuca, K.; Musilek, K. Electrochemical evaluation of acetylcholinesterase activity and construction of biosensor suitable for anticholinergic compounds assay. **The 104th National Meeting of the Korean Chemical Society** Daejeon (Korea) 28.-30.10.2009, Abstract book p 255.
 7. Binder, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Korabecny, J.; Opletalova V. Design, syntéza a biologické testování nových inhibitorů acetylcholinesterasy. **38. konference Syntéza a analýza léčiv** Hradec Králové (Česká republika) 14.-16.9.2009, Sborník p. 68.
 8. Korabecny, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Musilek, K.; Kuca, K. Syntéza a in vitro stanovení sekundárních alkyl-aminoderivátů odvozených od 7-MEOTA. **38. konference Syntéza a analýza léčiv** Hradec Králové (Česká republika) 14.-16.9.2009, Sborník p. 102.
 9. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Binder, J.; Pohanka, M.; Zdarova-Karasova J.; Kuca, K. Syntéza a in vitro evaluace centrálně účinných inhibitorů acetylcholinesterázy odvozených od struktury 7-MEOTA. **9.**

konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČLS JEP Hradec Králové (Česká republika) 26.-27.11.2009, Sborník příspěvků, p. 80-83.

10. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Pohanka, M.; Kuca, K. Nově připravené deriváty látky 7-MEOTA. **52. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 6.-10.1.2010, Supplementum 1, 2010, p. 45.
11. Korabecny, J.; Holas, O.; Patocka, J.; Zdarova-Karasova J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Musilek, K.; Kuca, K. Syntéza a in vitro testování strukturně odlišných alkyl-aminoderivátů odvozených od látky 7-MEOTA. **52. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 6.-10.1.2010, Supplementum 1, 2010, p. 45.
12. Zdarova-Karasova, J.; Komloova, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Hodnocení schopnosti prostupu léčiv, inhibitorů acetylcholinesterázy, přes hematoencefalickou bariéru pomocí in vitro metodiky. **52. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 6. -10. 1. 2010, Supplementum 1, 2010, p. 47.
13. Korabecny, J.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Syntéza a in vitro hodnocení duálních inhibitorů cholinesteras se strukturním základem 7-MEOTA. **39. konference Syntéza a analýza léčiv** Modra-Harmónia (Slovenská republika) 2. -4. 9. 2010 zborník, p. 84.
14. Korabecny, J.; Holas, O.; Zemek, F.; Marek, J.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Syntéza a hodnocení biologické účinnosti nových takrinových derivátů jako potenciálních agens pro Alzheimerovu chorobu. **53. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 5. -9. 1. 2010, Supplementum 1, 2011, p. 55

15. Kuca, K.; Korabecny, J.; Holas, O.; Zemek, F.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V. Syntéza a in vitro hodnocení N-alkyl-7-methoxytakrin hydrochloridů jako potenciálních inhibitorů cholinesteras při Alzheimerově chorobě. **53. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 5. -9. 1. 2010, Supplementum 1, 2011, p. 56
16. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Korabecny, J.; Kuca, K. In vitro účinky takrinu, 7-MEOTA a oximů na aktivitu MAO-A, MAO-B a komplexu I dýchacího řetězce. **53. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 5. -9. 1. 2010, Supplementum 1, 2011, p. 55
17. Musilek, K.; Korabecny, J.; Holas, O.; Horova, A.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA – cholinesterase inhibitor with valuable pharmacological profile. **10th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Barcelona (Spain) 9. -13.3.2011, p. 73.
18. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Hroudova, J.; Jun, D.; Fisar, Z.; Karasova, J.; Patocka, J.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential anti-Alzheimer's disease agents. **10th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Barcelona (Spain) 9. -13.3.2011, p. 74.
19. Pohanka, M.; Novotny, L.; Sobotka, J.; Korabecny, J.; Kuca, K. Metrifonate (trichlorfon), an inhibitor of acetylcholinesterase is implicated in cerebral cortex oxidative stress modulation. **10th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Barcelona (Spain) 9. -13.3.2011, p. 72.
20. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA derivatives based human cholinesterase inhibitors. **12th Annual Network Conference Alzheimer's Research UK** Leeds (United Kingdom) 16. – 17. 3. 2011, p. 36.

21. Musilek, K.; Korabecny, J.; Holas, O.; Horova, A.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA – cholinesterase inhibitor with improved pharmacological properties. **12th Annual Network Conference Alzheimer's Research UK** Leeds (United Kingdom) 16. – 17. 3. 2011, p. 46.
22. Korabecny, J.; Marek, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Development of new 7-MEOTA compounds: molecular modelling, synthesis and in vitro data. **Twelfth Tetrahedron Symposium** Sitges (Spain) 21. -24. 6. 2011.
23. Korabecny, J.; Janovec, L.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuca, K. Comparison of novel tacrine and 7-MEOTA derivatives with aromatic and alicyclic residues: synthesis, biological evaluation and docking studies. **63. Zjazd Chemikov** Vysoké Tatry, Tatranské Matliare (Slovenská republika) 5. – 9. 9. 2011, Erratum.
24. Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Pohanka, M.; Zdarova-Karasova, J.; Soukup, O.; Marek, J.; Korabecny, J.; Hrabinovala, M.; Kassa, J. Vývoj nových reaktivátorů acetylcholinesterázy – antidot pro případ otrav organofosforovými pesticidy. **63. Zjazd Chemikov** Vysoké Tatry, Tatranské Matliare (Slovenská republika) 5. – 9. 9. 2011, p 225.
25. Marek, J.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Cabal, J.; Kuca, K. Development of novel quaternary detergents as part of decontamination and disinfection means. **63. Zjazd Chemikov** Vysoké Tatry, Tatranské Matliare (Slovenská republika) 5. – 9. 9. 2011, p 228.
26. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jirak, R.; Korabecny, J.; Kuca, K.; Raboch, J. Changes of cellular respiration in patients with Alzheimer's disease. **20. Evropský psychiatrický kongres** Praha (Česká republika) 3. 3. – 6. 3. 2012.
27. Korabecny, J.; Janovec, L.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuca, K. Comparison of novel tacrine and 7-MEOTA derivatives with aromatic and alicyclic residues:

- synthesis, biological evaluation and docking studies. **11. Konference Odborné společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČLS** Hradec Králové (Česká republika) 18. – 19. 10. 2011, Blok V : Postery.
28. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jirak, R.; Korabecny, J.; Raboch, J. Změny buněčného dýchání u pacientů s Alzheimerovou chorobou a osob v depresivní episodě. **54. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 4. -8. 1. 2012.
29. Korabecny, J.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – new tacrine derivative with cholinergic properties. **54. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 4. -8. 1. 2012.
30. Korabecny, J.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Nepovimova, A.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuca, K. Monosubstitued N-alkylated-tacrine derivatives: synthesis, biological evaluation and molecular modeling. **54. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 4. -8. 1. 2012.
31. Spilovska, K.; Hamuľakova, S.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K.; Imrich, J. Synthesis and biological evaluation of tacrine-coumarine heterodimers as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease therapy. **54. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 4. -8. 1. 2012.
32. Hroudova, J.; Fisar, Z.; Kitzlerova E., Zverova, M.; Korabecny, J.; Kuca, K., Raboch, J. Changes of cellular respiration in patients with depression. **World Psychiatric Association International Congress 2012**. Praha (Česká republika) 17. – 21. 10. 2012.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Mega, M. S.; Cummings, J. L.; Fiorello, T.; Gornbein, J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* **1996**, *46*, 130–135.
2. Price, J. L.; Davis, P. B.; Morris, J. C.; White, D. L. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **1991**, *12*, 295–312.
3. Frölich, L. The cholinergic pathology in Alzheimer's disease-discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J. Neural. Transm.* **2002**, *109*, 1003–1013.
4. Birks, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, *25*, CD005593.
5. Alzheimer's Association. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2012**, *8*, 131–168.
6. Chopra, K.; Misra, S.; Kuhad, A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Pharmacother.* **2011**, *12*, 335–350.
7. Launer, L. J.; Fratiglioni, L.; Andersen, K.; Breteler, M. M. B.; Copeland, R. J. M.; Dartiques, J. F.; Lobo, A.; Martinez-Lage, J.; Soininen, H.; Hofman, A. Regional differences in the incidence of dementia in Europe: EURODEM collaborative analyses 1999. Collective authors of Alzheimer Europe organization: *Dementia in Europe Yearbook*: **2008**, *20*, 1–178.
8. Weiner, M. W.; Aisen, P. S.; Clifford, R. J. Jr.; Jagust, W. J.; Trojanowski, J. Q.; Shaw, L.; Saykin, A. J.; Morris, J. C.; Cairns, N.; Beckett, L. A.; Toga, A.; Green, R.; Walter, S.; Soares, H.; Snyder, P.; Siemers, E.; Potter, W.; Cole, P. E.; Schmidt, M. The Alzheimer's disease neuroimaging initiative: Progress report and future plans. *Alzheimers Dement.* **2010**, *6*, 202–211.
9. Green, R. C.; Cupples, L. A.; Go, R.; Benke, K. S.; Edeki, T.; Griffith, P. A.; Williams, M.; Hipps, Y.; Graff-Radford, N.; Bachman, D.; Farrer, L. A.; MIRAGE Study Group. Risk of dementia among white and African-American relatives of patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 329–336.
10. Drtinova, L.; Pohanka, M. Alzheimerova demence: aspekty současné farmakologické léčby. *Ceska Slov. Farm.* **2011**, *60*, 219–228.
11. Lautenschlager, N. T.; Cupples, L. A.; Rao, V. S.; Auerbach, S. A.; Becker, R.; Burke, J.; Chui, H.; Duara, R.; Foley, E. J.; Glatt, S. L.; Green, R. C.; Jones, R.; Karlinsky, H.; Kukull, W. A.; Kurz, A.; Larson, E. B.; Martelli, K.; Sadovnick, A. D.; Volicer, L.; Waring, S. C.; Growdon, J. H.; Farrer, L. A. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: what is in store for the oldest-old? *Neurology* **1996**, *46*, 641–650.

12. Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. Gene dose apolipoproteine E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset-families. *Science* **1993**, *261*, 921–923.
13. Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F.; Crapper-MacLachlan, D. R.; Alberts, M. J. Association of apolipoprotein E allele 4 with late onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **1993**, *43*, 1467–1472.
14. Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Risch, N. J.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C. Jr.; Rimmler, J. B.; Locke, P. A.; Conneally, P. M.; Schmechel, K. E.; Protective effect of apolipoproteine E allele 2 for late onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 180–184.
15. Clarke, R.; Smith, A. D.; Jobst, K. A.; Refsum, H.; Sutton, L.; Ueland, P. M. Folate, vitamin B12, and total homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **1998**, *55*, 1449–1455.
16. Green, R. C.; Cupples, L. A.; Kurz, A.; Auerbach, S.; Go, R.; Sadovnick, D.; Duara, R.; Kukull, W. A.; Chui, H.; Edeki, T.; Griffith, P. A.; Friedland, R. P.; Bachman, D.; Farrer, L. Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: the MIRAGE study. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 753–759.
17. Launer, L. J.; Andersen, K.; Dewey, M. E.; Letenneur, L.; Ott, A.; Amaducci, L. A.; Brayne, C.; Copeland, J. R.; Dartigues, J. F.; Kragh-Sorensen, P.; Lobo, A.; Martinez-Lage, J. M.; Stijnen, T.; Hofman, A. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer's disease: results from EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group and Work Groups. European Studies of Dementia. *Neurology* **1999**, *52*, 78–84.
18. Kivipelto, M.; Ngandu, T.; Fratiglioni, L.; Viitanen, M.; Kareholt, I.; Winblad, B.; Helkala, E. L.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Nissinen, A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **2005**, *62*, 1556–1560.
19. Yaffe, K. Metabolic syndrome and cognitive decline. *Curr. Alzheimer Res.* **2007**, *4*, 123–126.
20. Whitmer, R. A.; Gustafson, D. R.; Barrett-Connor, E.; Haan, M. N.; Gunderson, E. P.; Yaffe, K. Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* **2008**, *71*, 1057–1064.
21. Wu, W.; Brickman, A. M.; Luchsinger, J.; Ferrazzano, P.; Pichiule, P.; Yoshita, M.; Brown, T.; DeCarli, C.; Barnes, C. A.; Mayeux, R.; Vannucci, S. J.; Small, S. A. The brain in the age of old: the hippocampal formation is targeted differentially by diseases of late life. *Ann. Neurol.* **2008**, *64*, 698–706.
22. Tsivgoulis, G.; Alexandrov, A. V.; Wadley, V. G.; Unverzagt, F. W.; Go, R. C.; Moy, C. S.; Kissela, B.; Howard, G. Association of higher diastolic blood pressure levels with cognitive impairment. *Neurology* **2009**, *73*, 589–595.

23. Solomon, A.; Kivipelto, M.; Wolozin, B.; Zhou, J.; Whitmer, R. A. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**, *28*, 75–80.
24. Pendlebury, S. T.; Rothwell, P. M. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 1006–1018.
25. Raji, C. A.; Ho, A. J.; Parikshak, N. N.; Becker, J. T.; Lopez, O. L.; Kuller, L. H.; Hua, X.; Leow, A. D.; Toga, A. W.; Thompson, P. M. Brain structure and obesity. *Hum. Brain Mapp.* **2010**, *31*, 353–364.
26. Rusanen, M.; Kivipelto, M.; Quesenberry, C. P.; Zhou, J.; Whitmer, R. A. Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Arch. Intern. Med.* **2010**, *171*, 333–339.
27. Anstey, K. J.; von Sanden, C.; Salim, A.; O'Kearney, R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* **2007**, *166*, 367–738.
28. Solomon, A.; Kivipelto, M.; Wolozin, B.; Zhou, J.; Whitmer, R. A. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2009**, *28*, 75–80.
29. Veld, B. A.; Ruitenberg, A.; Hofman, A.; Launer, L. J.; van Duijn, C. M.; Stijnen, T.; Breteler, M. M.; Stricker, B. H. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *325*, 1515–1521.
30. Cummings, J. L.; Cole, G. Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2335–2338.
31. Qiu, C.; Winblad, B.; Fastbom, J.; Fratiglioni, L. Combined effects of APOE genotype, blood pressure, and antihypertensive drug use on incident AD. *Neurology* **2003**, *61*, 655–660.
32. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741–766.
33. Selkoe, D. J. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron.* **2001**, *32*, 177–180.
34. Lemere, C. A.; Blusztajn, J. K.; Yamaguchi, H.; Wisniewski, T.; Saido, T. C.; Selkoe, D. J. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Dis.* **1996**, *3*, 16–32.
35. Glenner, G. G.; Wong, C. W. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.

36. Glenner, G. G.; Wong, C. W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122*, 1131–1135.
37. Pawar, A. P.; Dubay, K. F.; Zurdo, J.; Chiti, F.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 379–392.
38. Re, F.; Airoidi, C.; Zona, C.; Masserini, M.; La Ferla, B.; Quattrocchi, N.; Nicotra, F. Beta amyloid aggregation inhibitors: small molecules as candidate drugs for therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2990–3006.
39. Imbimbo, B. P.; Giardina, G. A. γ -secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1555–1570.
40. Antosova, A.; Chelli, B.; Bystrenova, E.; Siposova, K.; Valle, F.; Imrich, J.; Vilkova, M.; Kristian, P.; Biscarini, F.; Gazova, Z. Structure-activity relationship of acridine derivatives to amyloid aggregation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1810*, 465–474.
41. Mirra, S. S.; Hart, M. N.; Terry, R. D. Making the diagnosis of Alzheimer's disease: A primer for practicing neuropathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1993**, *117*, 132–144.
42. Kosik, K. S.; Joachim, C. L.; Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 4044–4048.
43. Alonso, A. D.; Zaidi, T.; Novak, M.; Barra, H. S.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Interaction of tau isoforms with Alzheimer's disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37967–37973.
44. Götz, J.; Schild, A.; Hoerndli, F.; Pennanen, L. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2004**, *22*, 453–465.
45. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, *217*, 408–414.
46. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Goas, J. A.; Lippa, A. S. Age-related changes in passive avoidance retention: modulation with dietary choline. *Science* **1980**, *209*, 301–303.
47. Perry, E. K.; Tomlinson, B. E.; Blessed, G.; Perry, R. H.; Cross, A. J.; Crow, T. T. Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet* **1981**, *2*, 8238–8249.
48. Drachman, D. A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* **1977**, *27*, 783–790.

49. Bowen, D. M.; Smith, C. B.; White, P.; Davison, A. N. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. **1976**, *99*, 459–496.
50. Davies, P.; Maloney, A. J. F. Selective loss of central cholinergic neurones in Alzheimer's disease. *Lancet* **1976**, *2*, 1403.
51. Perry, E. K.; Gibson, P. H.; Blessed, G.; Perry, R. H.; Tomlinson, B. E. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* **1977**, *34*, 247–265.
52. Drachman, D. A.; Leavitt, J. Human memory and the cholinergic system. *Arch. Neurol.* **1974**, *30*, 113–121.
53. Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982**, *217*, 408–417.
54. Giacobini, E. *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors: Basic Preclinical and Clinical Aspects*. 1st ed. Martin Dunitz: London, GB, **2000**, 270 pp.
55. Buphendra, P. D. Butyrylcholinesterase: its use for prophylaxis for organophosphate exposure. In *Butyrylcholinesterase: Its Function and Inhibitors*. 1st ed; Giacobini, E. (Ed.); Martin Dunitz: London, GB, **2003**, 163–178.
56. Nachon, F.; Masson, P.; Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Fontecilla-Camps, J. C. Comparison of the structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. In *Butyrylcholinesterase: Its Function and Inhibitors*. 1st ed; Giacobini, E. (Ed.); Martin Dunitz: London, GB, **2003**, 39–54.
57. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic-Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo-Californica - A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* **1991**, *253*, 872-879.
58. Masson, P.; Legrand, P.; Bartels, C. F.; Froment, M. T.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylcholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2266–2277.
59. Nachon, F.; Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Colas, C.; van Dorsselaer, A.; Goeldner, M. Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10507–10513.
60. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9031–9035

61. Sabbagh, M. N.; Richardson, S.; Relkin, N. Disease-modifying approaches to Alzheimer's disease: challenges and opportunities- lessons from donepezil therapy. *Alzheimers Dement.* **2008**, *4*, S109–S118.
62. Sabbagh, M. N.; Farlow, M. R.; Relkin, N.; Beach, T. G. Do cholinergic therapies have disease-modifying effects in Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement.* **2006**, *2*, 118–125.
63. Jacobson, S. A.; Sabbagh, M. N.; Donepezil: potential neuroprotective and disease-modifying effects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1363–1369.
64. Beach, T. G.; Potter, P. E.; Kuo, Y. M.; Emmerling, M. R.; Durham, R. A.; Webster, S. D.; Walker, D. G.; Sue, L. I.; Scott, S.; Layne, K. J.; Roher, A. E. Cholinergic deafferentation of the rabbit cortex: a new animal model of A β deposition. *Neurosci. Lett.* **2000**, *283*, 9–12.
65. Takada-Takatori, Y.; Kume, T.; Sugimoto, M.; Katsuki, H.; Sugimoto, H.; Akaike, A. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 474–486.
66. Nordberg, A. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2006**, *20*, S12–S18.
67. Saxena, G.; Singh, S. P.; Agrawal, R.; Nath, C. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin- induced model of dementia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *581*, 283–289.
68. Tsukada, H.; Sato, K.; Kakiuchi, T.; Nishiyama, S. Age-related impairment of coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response was restored by cholinesterase inhibition: PET study with microdialysis in the awake monkey brain. *Brain Res.* **2000**, *857*, 158–164.
69. Chen, X.; Magnotta, V. A.; Duff, K.; Boles Ponto, L. L.; Schultz, S. K. Donepezil effects on cerebral blood flow in older adults with mild cognitive deficits. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2006**, *18*, 178–185.
70. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **1999**, *7*, 297–307.
71. Irwin, R. L.; Smith, H. J. Cholinesterase inhibition by galanthamine and lycoramine. *Biochem. Pharmacol.* **1960**, *3*, 147–148.
72. Samochocki, M.; Zerlin, M.; Jostock, R.; Groot Kormelink, P. J.; Luyten, W. H.; Albuquerque, E. X.; Maelicke, A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human alpha4/beta2 nAChR. *Acta Neurol. Scand.* **2000**, *176*, 68–73.

73. Maelicke, A.; Albuquerque, E. X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 165–170.
74. Alkondon, M.; Pereira, E. F.; Eisenberg, H. M.; Albuquerque, E. X. Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: A mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 66–75.
75. Levin, E. D.; Simon, B. B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl.)* **1998**, *138*, 217–230.
76. Raskind, M. A.; Peskind, E. R.; Wessel, T.; Yuan, W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* **2000**, *54*, 2261–2268.
77. Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T. T.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321–326.
78. Cutler, N. R.; Polinsky, R. J.; Sramek, J. J.; Enz, A.; Jhee, S. S.; Mancione, L.; Hourani, J.; Zolnouni, P. Dose-dependent CSF acetylcholinesterase inhibition by SDZ ENA 713 in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **1998**, *97*, 244–250.
79. Ballard, C. G. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: Benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur. Neurol.* **2002**, *47*, 64–70.
80. Birks, J.; Grimley Evans, J.; Iakovidou, V.; Tsolaki, M.; Holt, F. E. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, *2*, CD001191.
81. Bar-on, P.; Millard, C. B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J. L.; Silman, I.; Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3555–3564.
82. Adem, A.; Mohammed, A.; Nordberg, A.; Winblad, B. Tetrahydroaminoacridine and some of its analogues: effects on the cholinergic system. In: Basic, Clinical, and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Nagatsu, T.; Fisher, A.; Yoshida, M. (eds.). Plenum Press: New York, USA. **1990**, 387–393.
83. Albert, A. The chemical and biological properties of acridines. *Sci. Prog.* **1949**, *37*, 418–434.
84. Shaw, H.; Bentley, G. Some aspect of the pharmacology of morphine with special reference to its antagonism by 5-aminoacridine and other chemically related compounds. *Med. J. Aust.* **1949**, *2*, 868–875.
85. Heilbronn, E. Inhibition of cholinesterase by tetrahydroaminoacric. *Acta Chem. Scand.* **1961**, *15*, 1386–1390.

86. Summers, W. K.; Majorski, L. V.; Marsh, H. M.; Tachiki, K.; Kling, A. Oral tetrahydroaminoacridine in long term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *New Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 1241–1245.
87. Egger, S. A.; Levy, R.; Sahakian, B. J. Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet* **1991**, *337*, 989–992.
88. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9031–9035.
89. Perry, E. K.; Smith, C. J.; Court, J. A.; Bonham, J. R.; Rodway, M. Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding in vitro. *Neurosci. Lett.* **1988**, *91*, 211–216.
90. Adem, A.; Jossan, S. S.; Oreland, L. Tetrahydroaminoacridine inhibits human and rat brain monoamino oxidase. *Neurosci. Lett.* **1989**, *107*, 313–317.
91. Stenstrom, A.; Oreland, L.; Hardy, J.; Wester, P.; Winblad, B. The uptake of serotonin and dopamine by homogenates of frozen rat and human brain tissue. *Neurochem. Res.* **1985**, *10*, 591–599.
92. Knapp, M. J.; Knopman, D. S.; Solomon, P. R.; Pendlebury, W. W.; Davis, C. S.; Gracon, S. I. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *271*, 985–991.
93. Gracon, S. I.; Knapp, M. J.; Berghoff, W. G.; Pierce, M.; DeJong, R.; Lobbestael, S. J.; Symons, J.; Dombey, S. L.; Luscombe, F. A.; Kraemer, D. Safety of tacrine: clinical trials, treatment IND, and postmarketing experience. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1998**, *12*, 93–101.
94. Patocka, J.; Jun, D.; Kuca, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Drug. Metab.* **2008**, *9*, 332–335.
95. Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9031–9035
96. Koch, H. J.; Uyanik, G.; Fischer-Barnicol, D. Memantine: a therapeutic approach in treating Alzheimer's and vascular dementia. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.* **2005**, *4*, 499–506.
97. Sonkusare, S. K.; Kaul, C. L.; Ramarao, P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: memantine, a new hope. *Pharmacological Research.* **2005**, *51*, 1–17.

98. Herrmann, N.; Chau, S. A.; Kircanski, I.; Lanctôt, K. L. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review. *Drugs* **2011**, *71*, 2031–2065.
99. Recanatini, M.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Valenti, P.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cavrini, V. SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2007–2018.
100. dos Santos Pisoni, D.; Sobieski da Costa, J.; Gamba, D.; Petzhold, C. L.; de Amorim Borges, A. C.; Ceschi, M. A.; Lunardi, P.; Saraiva Gonçalves, C. A. Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526–535.
101. Hamuľakova, S.; Kristian, P.; Jun, D.; Kuca, K.; Imrich, J.; Danihel, I.; Böhlm, S.; Klika, K. D. Synthesis, structure, and cholinergic effect of novel neuroprotective compounds bearing the tacrine pharmacophore. *Heterocycles* **2008**, *76*, 1219–1235.
102. Marco-Contelles, J.; León, R.; de Los Ríos, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; López, M. G.; García, A. G.; Villarroya, M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607–7610.
103. Marco-Contelles, J.; León, R.; de los Ríos, C.; Samadi, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Huertas, O.; Barril, X.; Luque, F. J.; Rodríguez-Franco, M. I.; López, B.; López, M. G.; García, A. G.; Carreiras, Mdo. C.; Villarroya, M. Tacripyrines, the first tacrine-dihydropyridine hybrids, as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2724–2732.
104. Samadi, A.; Valderas, C.; de los Ríos, C.; Bastida, A.; Chioua, M.; González-Lafuente, L.; Colmena, I.; Gandía, L.; Romero, A.; Del Barrio, L.; Martín-de-Saavedra, M. D.; López, M. G.; Villarroya, M.; Marco-Contelles, J. Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-carbonitriles. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 122–133.
105. Defaux, J.; Sala, M.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Taylor, M. C.; Alobaid, W. A.; Kelly, J. M.; Wright, C. W.; Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. Huprines as a new family of dual acting trypanocidal-antiplasmodial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1702–1707.
106. Vanlaer, S.; Voet, A.; Gielens, C.; De Maeyer, M.; Compennolle, F. Bridged 5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naphthyridines, analogues of huperzine A: Synthesis, modelling studies and evaluation as inhibitors of acetylcholinesterase. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 643–654.

107. Camps, P.; Contreras, J.; Font-Bardia, M.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Solans, X. Enantioselective synthesis of tacrine–huperzine A hybrids. Preparative chiral MPLC separation of their racemic mixtures and absolute configuration assignments by X-ray diffraction analysis. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9*, 835–849.
108. Ronco, C.; Jean, L.; Renard, P.-Y. Improved synthetic pathway for the derivatization of huprine scaffold. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7399–7404.
109. Camps, P.; El Achab, R.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Baños, J. E.; Vivas, N. M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F. J. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): Highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer’s disease *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4657–4666.
110. Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer’s disease. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646–23649.
111. Rydberg, E. H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H. M.; Wong, D. M.; Shaya, D.; Williams, L. D.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Sussman, J. L. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of bis5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491–5500.
112. Li, W.; Xue, J.; Niu, C.; Fu, H.; Lam, C. S.; Luo, J.; Chan, H. H.; Xue, H.; Kan, K. K.; Lee, N. T.; Li, C.; Pang, Y.; Li, M.; Tsim, K. W.; Jiang, H.; Chen, K.; Li, X.; Han, Y. Synergistic neuroprotection by bis(7)-tacrine *via* concurrent blockade of *N*-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 1258–1267.
113. Li, C.; Carlier, P. R.; Ren, H.; Kan, K. K.; Hui, K.; Wang, H.; Li, W.; Li, Z.; Xiong, K.; Clement, E. C.; Xue, H.; Liu, X.; Li, M.; Pang, Y.; Han, Y. Alkylene tether-length dependent gamma aminobutyric acid type A receptor competitive antagonism by tacrine dimers. *Neuropharmacology* **2007**, *52*, 436-443.
114. Zhou, L.; Liu, Y. W.; Peoples, R. W.; Yang, M.; Tian, X.; Ai, Y. X.; Pang, Y. P.; Li, Z. W.; Han, Y. F.; Li, C. Y. Mechanism of bis(7)-tacrine inhibition of GABA: activated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacology* **2009**, *57*, 33–40.
115. Wlodek, S. T.; Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Straatsma, T. P.; Gilson, M. K.; Briggs, J. M.; Humblet, C.; Sussman, J. L. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers* **1996**, *38*, 109–117.
116. Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont, D. W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Mellor, I. R.; Melchiorre, C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA

- receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381–4384.
117. Alonso, D.; Dorronsoro, I.; Rubio, L.; Muñoz, P.; Garcia-Palomo, E.; Del Monte, M.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Castro, A.; Medina, M.; Martinez, A. Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6588–6597.
118. Muñoz-Torrero, D.; Camps, P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 399–422.
119. Carlier, P. R.; Du, D. M.; Han, Y.; Liu, J.; Pang, Y. P. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2335–2338.
120. Musial, A.; Bajda, M.; Malawska, B. Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2654–2679.
121. Decker, M. Recent advances in the development of hybrid molecules/ designed multiple compounds with anti-amnesic properties. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 221–229.
122. Li, W. M.; Kan, K. K.; Carlier, P. R.; Pang, Y. P.; Han, Y. F. East meets West in the search for Alzheimer's therapeutics - novel dimeric inhibitors from tacrine and huperzine A. *Curr. Alzheimer Res.* **2007**, *4*, 386–396.
123. Jiang, H.; Luo, X.; Bai, D. Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: a drug of traditional Chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2231–2252.
124. Wlodek, S. T.; Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Straatsma, T. P.; Gilson, M. K.; Briggs, J. M.; Humblet, C.; Sussman, J. L. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase. *Biopolymers* **1996**, *38*, 109–117.
125. Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont, D. W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Mellor, I. R.; Melchiorre, C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381–4384.
126. Fang, L.; Kraus, B.; Lehmann, J.; Heilmann, J.; Zhang, Y.; Decker, M. Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multipotent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2905–2909.
127. Heilmann, J.; Calis, I.; Kirmizibekmez, H.; Schuhly, W.; Harput, S.; Sticher, O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human

- polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med.* **2000**, *66*, 746–748.
128. Yan, J. J.; Cho, J. Y.; Kim, H. S.; Kim, K. L.; Jung, J. S.; Huh, S. O.; Suh, H. W.; Kim, Y. H.; Song, D. K. Protection against beta-amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *133*, 89–96.
129. Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54.
130. Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Campillo, N. E.; Páez, J. A.; González-Muñoz, G. C.; Usán, P.; García-Palomero, E.; López, M. G.; Villarroya, M.; García A. G.; Martínez, A.; Rodríguez-Franco, M. I. Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *ChemMedChem.* **2009**, *4*, 828–841.
131. Nunomura, R. J.; Castellani, X.; Zhu, P. I.; Moreira, G.; Perry, M. A.; Smith, J. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 631–641.
132. Reiter, R. J.; Tan, D.-X.; Manchester, L. C.; Terron, M. P.; Flores, L. J.; Koppisepi, S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv. Med. Sci.* **2007**, *52*, 11–28.
133. Masilamoni, J. G.; Jesudason, E. P.; Dhandayuthapani, S.; Ashok, B. S.; Vignesh, S.; Jebaraj, W. C.; Paul, S. F.; Jayakumar, R. The neuroprotective role of melatonin against amyloid beta peptide injected mice. *Free Radical. Res.* **2008**, *42*, 661–673.
134. Lysko, P. G.; Lysko, K. A.; Webb, C. L.; Feuerstein, G.; Mason, P. E.; Walter, M. F.; Mason, R. P. Neuroprotective activities of carvedilol and a hydroxylated derivative: role of membrane biophysical interactions. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1645–1656.
135. Rosini, M.; Simoni, E.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Ceccarini, L.; Pascu, N.; McClymont, D. W.; Tarozzi, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Andrisano, V.; Mellor, I. R.; Melchiorre, C. Inhibition of acetylcholinesterase, beta-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: a promising direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4381–4384.
136. Malinski, T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2007**, *11*, 207–218.
137. Fang, L.; Appenroth, D.; Decker, M.; Kiehnopf, M.; Lupp, A.; Peng, S.; Fleck, C.; Zhang, Y.; Lehmann, J. NO-donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7666–7669.

138. Elsinghorst, P. W.; Cieslik, J. S.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Gütschow, M. First gallamine-tacrine hybrid: design and characterization at cholinesterases and the M2 muscarinic receptor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5685–5695.
139. Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Gómez, T.; Muñoz-Torrero, D.; Scarpellini, M.; Viayna, E.; Badia, A.; Clos, M. V.; Camins, A.; Pallàs, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Estelrich, J.; Lizondo, M.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J. Novel donepezil-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3588–3598.
140. Camps, P.; Formosa, X.; Galdeano, C.; Muñoz-Torrero, D.; Ramírez, L.; Gómez, E.; Isambert, N.; Lavilla, R.; Badia, A.; Clos, M. V.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Arce, M. P.; Rodríguez-Franco, M. I.; Huertas, O.; Dafni, T.; Luque, F. J. Pyrano[3,2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and beta-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5365–5379.
141. Morris, M. C.; Schneider, J. A.; Tangney, C. C. Thoughts on B-vitamins and dementia. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, *9*, 429–433.
142. Morris, M. C.; Evans, D. A.; Bienias, J. L.; Scherr, P. A.; Tangney, C. C.; Hebert, L. E.; Bennett, D. A.; Wilson, R. S.; Aggarwal, N. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **2004**, *75*, 1093–1099.
143. Szymański, P.; Markowicz, M.; Mikiciuk-Olasik, E. Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 138–142.
144. Galdeano, C.; Viayna, E.; Sola, I.; Formosa, X.; Camps, P.; Badia, A.; Clos, M. V.; Relat, J.; Ratia, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Salmona, M.; Minguillón, C.; González-Muñoz, G. C.; Rodríguez-Franco, M. I.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D. Huprine-tacrine heterodimers as anti-amyloidogenic compounds of potential interest against Alzheimer's and prion diseases. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 661–669.
145. Patocka, J.; Jun, D.; Kuca, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Drug. Metab.* **2008**, *9*, 332–335.
146. Bielavsky, J. Analogues of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *Collect. Czech Chem. Commun.* **1977**, *42*, 2802–2808.
147. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, B. J.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
148. Brian, W. P.; Souther, B. L. New derivatives of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 143–144.

149. Bindra, J. S.; Rastogi, S. N.; Patnaik, G. K.; Anand, N.; Gurudath, R. G. K.; Dwivedi, P. C.; Rao, C. N. R. Synthesis, pharmacological activities and physiochemical properties of 4-(substituted amino/N4-arylpiperazinyl/aminocarbonyl) 2, 3-polymethlenequinolines. *Indian J. Chem.* **1987**, *26B*, 318–326.
150. Asthana, P.; Rastogi, S. N.; Ghosal, S.; Das, R. Synthesis of O- and N-(Epoxypropyl and 3-Substituted-amino-2- hydroxypropyl) Derivatives of 11-Hydroxy-6H-tetrahydrocyclohepta(b) quinoline and 7-Chloro-9-hydroxytetrahydroacridine as Potential Antiamoebic Agents. *Indian J. Chem.* **1987**, *26B*, 330–334.
151. Ma, M.; Mehta, J.; Williams, L. D.; Carlier, P. R. Pd-catalyzed amination as an alternative to nucleophilic aromatic substitution for the synthesis of N-alkyltacrine and analogues. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 916–919.
152. Ronco, C.; Jean, L.; Outaabout, H.; Renard, P.-Y. Palladium-catalyzed preparation of *N*-alkylated tacrine and huprine compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2*, 302–310.
153. Pomponi, M.; Marta, M.; Colella, A.; Sacchi S.; Patamia, M.; Gatta, F.; Capone, F.; Oliverio, A.; Pavone, F. Studies on a new series of THA analogues: Effects of the aromatic residues that line the gorge of ACHE. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 155–160.
154. Hansch, C.; Leo, A. J. In *Substituent constant for correlation analysis in chemistry and biology*. New York: Wiley, **1979**.
155. Del Giudice, M. R.; Borioni, A.; Mustazza, C.; Gatta, F.; Meneguz, A.; Volpe, M. T. Synthesis and cholinesterase inhibitory activity of 6-, 7-methoxy-(and hydroxy)- tacrine derivatives. *Farmaco* **1996**, *51*, 693–698.
156. Giacobini, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* **2003**, *28*, 515–522.
157. Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159–165.
158. Fisar, Z. Inhibition of monoamine oxidase activity by cannabinoids. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2010**, *381*, 563–572.
159. Youdim, M. B.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295–309.
160. Suzuki, O.; Seno, H.; Kumazawa, T. In vitro inhibition of human platelet monoamine oxidase by phenothiazine derivatives. *Life Sci.* **1988**, *42*, 2131–2136.
161. Youdim, M. B.; Buccafusco, J. J. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 27–35.

162. Riederer, P.; Danielczyk, W.; Grünblatt, E. Monoamine Oxidase-B Inhibition in Alzheimer's Disease. *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 271–277.
163. Bach, A. W.; Lan, N. C.; Johnson, D. L.; Abell, C. W.; Bembenek, M. E.; Kwan, S. W.; Seeburg, P. H.; Shih, J. C. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 4934–4938.
164. Prince, J. A.; Yassin, M. S.; Oreland, L. Neuroleptic-induced mitochondrial enzyme alterations in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 261–267.