

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



***In silico* studium interakcí cholinesteras  
s jejich modulátory a návrh nových látek  
tohoto typu**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Mgr. Jiří Binder

Vedoucí disertační práce: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Konzultant disertační práce: doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

Doktorský studijní program: Farmaceutická chemie

HRADEC KRÁLOVÉ 2015

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 v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

Mgr. Jiří Binder

## Poděkování

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za odborné vedení, lidský přístup, bezmeznou trpělivost a významnou pomoc při zpracování této práce. Rád bych poděkoval prof. Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za uvedení do problematiky modulátorů cholinesteras, zajištění podmínek pro výzkum a odbornou pomoc při řešení disertační práce.

Můj dík patří Mgr. Jiřímu Wiesnerovi, Ph.D. a pracovníkům Národního centra pro výzkum biomolekul za uvedení do problematiky *in silico* metod výzkumu a počítačem asistovaného designu léčiv.

Dále bych chtěl poděkovat diplomantům a zaměstnancům Centra biomedicínského výzkumu, Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Upřímný dík patří PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D., PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. a PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za spolupráci na odborných publikacích.

Tato disertační práce vznikla za podpory Grantové agentury UK (117909/2009/BCH/FaF) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR SVV 2015 260 183 a výzkumného záměru MSM0021620822.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Jiří Binder

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

Název dizertační práce: *In silico* studium interakcí cholinesteras s jejich modulátory a návrh nových látek tohoto typu

Počítačové modelování je významným nástrojem současného vědeckého výzkumu. Umožňuje studovat strukturu, konformace, dynamiku a vzájemné ne vazebné interakce biologického systému. Hlavním cílem je nalezení energeticky nejvýhodnější konformace pomocí minimalizace energie systému. Z takto vypočtených hodnot můžeme předpovědět ztrátu aktivity pro určité analogické sloučeniny, což umožňuje snížit počet látek, které by bylo zapotřebí následně syntetizovat. Molekulové modelování se podílí na popisu interakcí ligandů s většími systémy a zlepšuje tak orientaci v milionech aktivních látek, které by mohly být využity jako potenciální léčivo. Stává se tak významnou součástí farmaceutického průmyslu.

Cílem této práce bylo ověřit vybranou metodiku počítačové predikce ligand-protein komplexů, pomocí molekulárního dockingu získat popis základních interakcí modulátorů cholinesteras s těmito enzymy a na základě těchto poznatků navrhnout strukturu nového účinného inhibitoru acetylcholinesterasy. Pro *in silico* testování byly použity modulátory syntetizované v rámci této práce, předcházející diplomové práce, sloučeniny připravené studenty ve spolupráci Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a také široce používané modulátory acetylcholinesterasy.

Validace metody byla provedena na několika krystalových strukturách. Získané výsledky byly využity k popisu základních vztahů mezi strukturou, způsobem interakce a afinitou k enzymu. Podle výsledných parametrů bylo navrženo několik potenciálních inhibitorů acetylcholinesterasy. Byla popsána jejich interakce s enzymem a vypočteny jejich fyzikální charakteristiky. Tyto látky je možné využít v profylaxi otrav nervově paralytickými látkami nebo léčbě Alzheimerovy choroby či

myasthenia gravis. Výsledky práce byly publikovány v odborných časopisech a prezentovány formou posterů na odborných konferencích v České Republice i v zahraničí.

## ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical analysis

Candidate: Mgr. Jiří Binder

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: *In silico* studies of cholinesterases interactions with their modulators and design of new compounds of this type

Computer modeling is an important tool of contemporary scientific research. It allows to study the structure, conformation, dynamics and mutual interaction of nonbinding interactions of a biological system. The main objective is to find the best energy conformations by minimizing the energy of the system. On the base of these calculated values, one can predict the loss of activity for certain analogous compounds, thus reducing the number of materials that would be needed to subsequently synthesize. A molecular modeling contributes to describe the interactions of ligands with larger systems and improves the orientation in millions of active substances that could be used as potential drug. It becomes an important part of the pharmaceutical industry.

The aim of this study was to verify the selected methodology of computer prediction of protein-ligand complexes, to obtain a description of the basic interactions of the modulators of cholinesterase enzymes by molecular modeling, and on the basis of this knowledge to design the structure of a new potent inhibitor of acetylcholinesterase. For the *in silico* testing, the modulators synthesized in the present thesis and in the previous diploma thesis, compounds prepared by students in collaboration with the Department of Pharmaceutical Chemistry Pharmaceutical and Pharmaceutical analysis, Faculty of Charles University and the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, and also widely used acetylcholinesterase modulators were used.

The method validation was performed at several crystal structures. The obtained results were used to describe the relationships between the basic structure and a manner of interaction and the affinity for the enzyme. According to endpoints some several potential inhibitors of acetylcholinesterase were obtained. Their interaction with the enzyme was described and their physical characteristics were

calculated, too. These substances can be used in the prophylaxis of nerve agent poisoning or treating Alzheimer's disease or myasthenia gravis. The results were published in scientific journals and presented as posters at scientific conferences in Czech Republic and abroad.

## Obsah

Poděkování.....	3
ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	6
Seznam použitých zkratk.....	10
1. Úvod.....	11
2. Cíle práce.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1 Acetylcholin .....	13
3.2 Receptory .....	14
3.2.1 Nikotinové receptory.....	15
3.2.2 Muskarinové receptory.....	16
3.3 Cholinesterasa .....	17
3.4 Struktura cholinesteras .....	19
3.5 Inhibitory acetylcholinesterasy .....	22
3.5.1 Organofosforové inhibitory (OFI).....	23
3.5.2 Pseudoireverzibilní inhibitory.....	27
3.5.3 Reverzibilní inhibitory .....	29
3.6 Alzheimerova choroba a reverzibilní inhibitory používané v klinické praxi.....	30
3.7 Myasthenia gravis .....	38
3.8 Molekulové modelování.....	41
3.8.1. Kvantová a molekulová mechanika .....	41
3.8.2 Energetická minimalizace molekuly .....	44
3.8.3 Metoda Monte Carlo a molekulová dynamika.....	46
3.8.4 Molekulový docking .....	48
4. Metodická část.....	52



4.1 Chemikálie a charakteristika připravených sloučenin .....	52
4.2 Princip stanovení aktivity modulátorů cholinesteras .....	53
4.2.1 Titrimetrická stanovení.....	53
4.2.2 Fotometrická stanovení .....	54
4.3 Molekulární modelování .....	56
5. Experimentální část.....	60
5.1 Syntéza inhibitorů cholinesteras .....	60
5.1.1 Příprava monokvartérních inhibitorů .....	60
5.1.2 Příprava biskvartérních inhibitorů .....	65
5.2 Molekulární modelování a biologické hodnocení modulátorů cholinesteras .....	77
5.2.1 Redocking .....	77
5.2.2 Porovnání krystalografických struktur.....	79
5.2.3 Molekulární modelování a biologické hodnocení reaktivátorů .....	82
5.2.4 Molekulové modelování a biologické hodnocení monokvartérních inhibitorů .....	89
5.2.5 Molekulové modelování a biologické hodnocení biskvartérních inhibitorů.....	91
5.2.6 Molekulové modelování a biologické hodnocení takrinových derivátů .....	101
5.2.7 Návrh nových struktur.....	105
6. Diskuse.....	120
7. Závěr.....	124
8. Seznam publikovaných prací.....	125
8.1 Publikace.....	125
8.2 Abstrakty z konferencí.....	126
9. Seznam použité literatury.....	128

## Seznam použitých zkratk

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
APP	prekurzor amyloidního proteinu
Asp	kyselina asparagová
BChE	butyrylcholinesterasa
His	histidin
GA	genetický algoritmus
Glu	kyselina glutamová
HEB	hematoencefalická bariera
HF	Hartree Fock
ChAT	cholinacetyltrasferasa
ChE	cholinesterasa
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
LD <sub>50</sub>	střední letální dávka
MC	metoda Monte Carlo
MD	molekulová dynamika
MG	myasthenia gravis
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
MM	molekulová mechanika
MP2	Mollerova-Plessetova poruchová teorie
nAChR	nikotinové acetylcholinové receptory
NCBR	National Centre for Biomolecular Research
N <sub>N</sub>	receptory nikotinové neuronální
N <sub>M</sub>	receptory nikotinové muskulární
NPL	nervově paralytické látky
OFI	organofosforové inhibitory
PDB	Protein Data Bank
PES	plocha potenciální energie
PAM	periferní anionické místo
Phe	fenylalanin
QM	kvantová mechanika
Ser	serin
SI	index selektivity
THA	takrin
TNF	tumor nekrotizující faktor
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Wat	molekula vody
7-MEOTA	7-methoxytakrin

## 1. Úvod

Výzkum Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany byl zaměřen hlavně na obranu proti bojovým chemickým látkám a pesticidům a na terapii jejich otrav. Zejména ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy byl projekt rozšířen o výzkum reverzibilních inhibitorů acetylcholinesterasy. Inhibitory lze krom profylaxe před otravou nervově paralytickými látkami využít i v terapii Alzheimerovy choroby či myasthenia gravis.

Množství sloučenin, syntetizovaných a testovaných v rámci výše uvedené spolupráce, utváří rozsáhlou knihovnu informací. Tu lze využít k analýze vztahu mezi strukturou a účinkem daného typu modulátoru.

Rozvoj výpočetní techniky je úzce spjat s využitím *in silico* metod pro popis biologických a chemických systémů. Molekulové modelování zlepšuje orientaci ve sloučeninách, které by bylo možné využít k modulaci enzymu. Popis jejich interakce s enzymem umožňuje odhadnout změnu aktivity analogických struktur a snížit tak množství syntetizovaných sloučenin.

## 2. Cíle práce

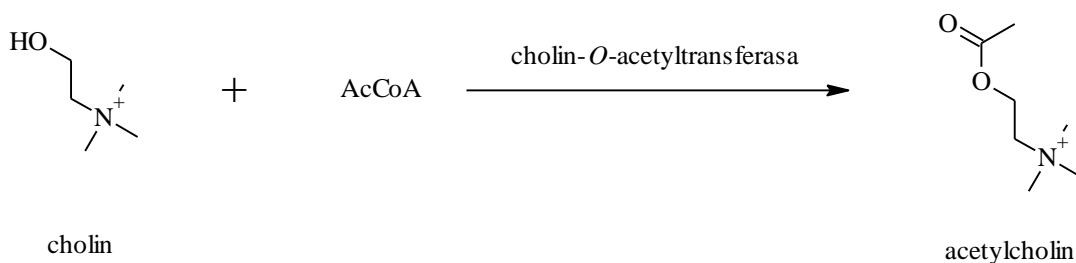
Cílem práce byla syntéza monokvartérních a biskvartérních inhibitorů cholinesteras za účelem doplnění knihovny informací, která bude využita pro další studium vztahů mezi strukturou modulátoru a jeho účinkem. U těchto sloučenin otestovat aktivitu pomocí standardních *in vitro* metod a porovnat s ostatními deriváty. Dalším cílem této práce bylo ověřit vybranou metodiku molekulárního dockingu a z dostupných krystalových struktur získat podstatné informace o struktuře a vlastnostech enzymu.

Hlavním cílem práce bylo získat z výsledků dockingových simulací informace o charakteru interakce jednotlivých modulátorů s rezidui enzymu. Tyto interakce popsat a případně vysvětlit neobvyklé výsledky pozorování. Na základě těchto poznatků pak navrhnou strukturu nového účinného inhibitoru acetylcholinesterasy.

### 3. Teoretická část

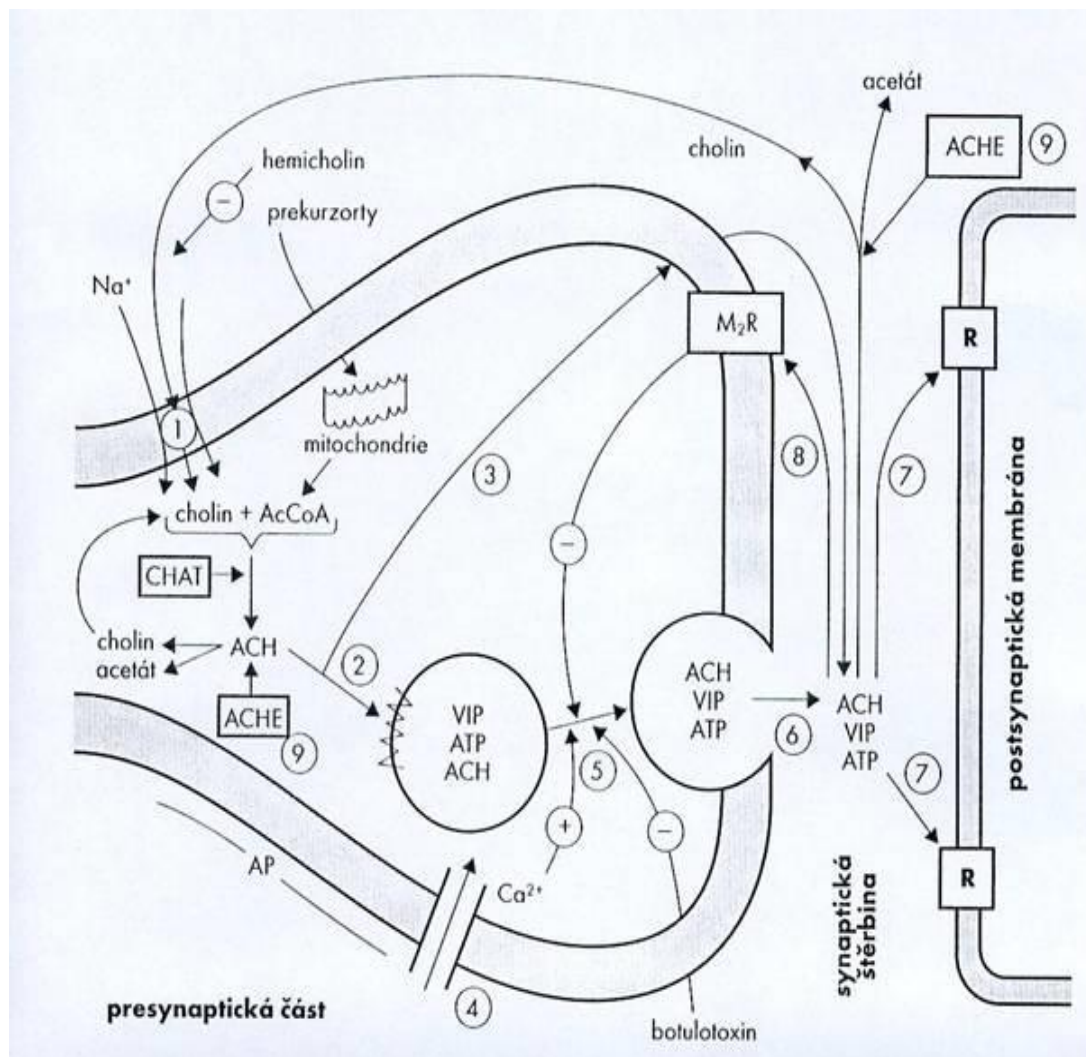
#### 3.1 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) je neuromediátor, který svým působením na nikotinové a muskarinové receptory přenáší signál v synapsích parasymptiku, gangliích sympatiku a v nervosvalovém spojení.(1) ACh je syntetizován v cytoplazmě neuronu za pomoci enzymu cholin-*O*-acetyltransferasy (ChAT; EC 2.3.1.6) z bazického alkoholu cholinu a acetylkoenzymu A, který vzniká v mitochondriích (schéma 1). Vzniklý ACh je transportován specifickými transportními proteiny do vezikul, ve kterých je skladován.(2)



**Schéma 1** Syntéza acetylcholinu.

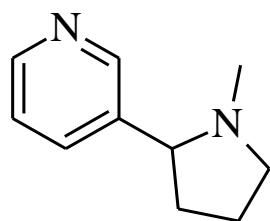
Při cholinergní transmisi dochází na základě akčního potenciálu (AP) ke vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do nervového zakončení napěťově řízenými kalciovými kanály.  $\text{Ca}^{2+}$  umožní splnutí membrány vezikul s membránou nervového zakončení a dochází ke „kvantálnímu“ výlevu ACh do synaptické štěrby (obr. 1). Zde ACh působí na postsynaptické receptory, kde vyvolává parasymptomimetické účinky, a na presynaptické „autoreceptory“ jejichž ovlivněním moduluje množství ACh uvolňovaného akčním potenciálem. ACh působí na receptory velmi krátce (cca 2 ms) a po jeho uvolnění je okamžitě hydrolyzován acetylcholinesterasou (AChE) na kyselinu octovou a cholin, který je aktivně přijímán zpět do nervového zakončení. Pomalá dekompozice může vést k cholinergní krizi, jejíž projevy jsou mioza, zvýšená sekrece žláz, gastrointestinální obtíže, bronchokonstrikce, bradykardie, křeče, kóma, smrt.(3) V centrálním nervovém systému pak ovlivňuje i ostatní neuromediátory (glutamát, dopamin).(4)



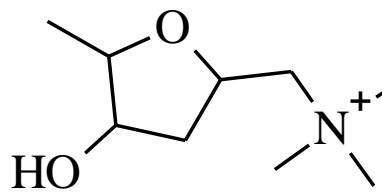
Obr. 1 Pochody cholinergní transmise (převzato z lit.(5)).

### 3.2 Receptory

Flexibilita vazeb ACh a přítomnost kvartérního dusíku umožňuje molekule působení na různé typy receptorů a tím vyvolává širokou škálu odpovědí. Muskarin a nikotin (obr. 2), jakožto selektivní agonisté, dali název základním typům receptorů: muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR). Receptory jsou přítomny zejména na postsynaptické části nervového spojení, kde vyvolávají cholinergní odpověď. Na presynaptické části spojení působí autoregulačně. Strukturně jsou mAChR a nAChR značně odlišné.



nikotin

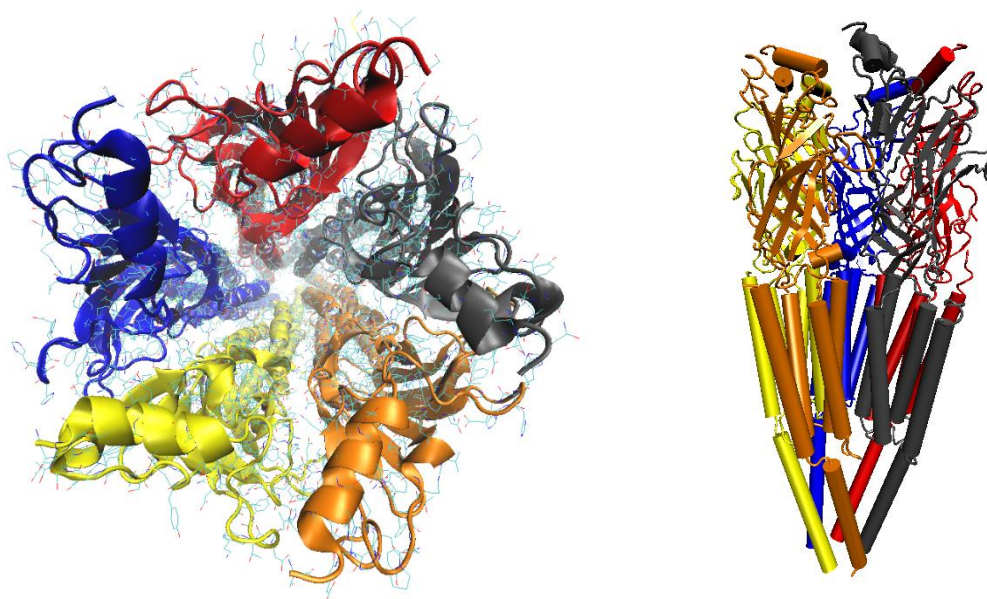


muskarin

**Obr. 2** Selektivní agonisté cholinergních receptorů.

### 3.2.1 Nikotinové receptory

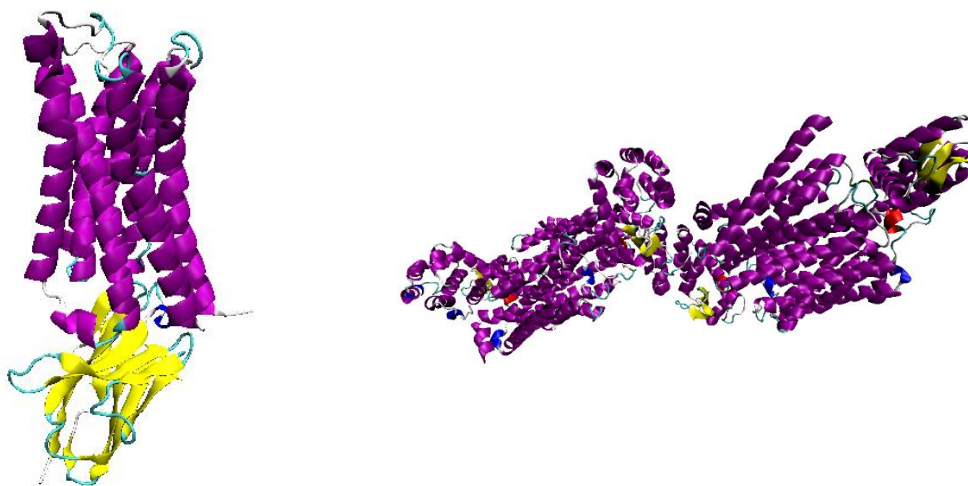
nAChR jsou ionotropní receptory, které obsahují dvě vazebná místa pro ACh. Po jejich obsazení se otvírá transmembránový kanál specificky propustný pro kladně nabitě ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), dojde k depolarizaci a rychlé excitační odpovědi. Receptory jsou složeny z pěti podjednotek uspořádaných do kruhu (obr. 3). Je známo pět základních typů podjednotek:  $\alpha$  1–10,  $\beta$  1–4,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ . Svou stavbou si jsou podobné a jejich zastoupení rozhoduje o tom, pro které ionty bude iontový kanál propustný.(6) Podle lokalizace rozdělujeme receptory na neuronální ( $\text{N}_\text{N}$ ), které se nacházejí v centrálním nervovém systému a periferních synapsích. Podílí se na fyziologických a kognitivních procesech v organismu (učení, paměť, pozornost). Druhým typem jsou receptory muskulární ( $\text{N}_\text{M}$ ), které jsou lokalizovány na nervosvalové ploténce. Narušení funkce nAChR vede k vážným poruchám činnosti nervového systému např. Alzheimerova choroba (AD), schizofrenie nebo Parkinsonova choroba.(7, 8)



**Obr. 3** Struktura nikotinového receptoru (PDB 4BOR).(9) Obrázek utvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.

### 3.2.2 Muskarinové receptory

Muskarinové receptory patří do skupiny metabotropních receptorů spřažených s G-proteinem. Odpověď může být jak inhibiční, tak excitační a je pomalejší než u receptorů nikotinových. Muskarin, alkaloid muchomůrky červené (*Amanita muscaria*), je typickým agonistou těchto receptorů. Pomocí dalších agonistů (arekolin, karchol, oxotremorin) a antagonistů (pirenzepin, atropin) bylo rozlišeno 5 základních typů muskarinových receptorů: M1, M2, M3, M4 a M5.(10) Strukturně jsou mAChR glykoproteiny uspořádané do sedmi transmembránových částí, propojených intracelulárními a extracelulárními smyčkami (obr. 4). M1, M3 a M5 podtypy jsou spojeny s aktivací fosfolipasy C prostřednictvím G-proteinu. M1 se nacházejí zejména v gangliích sympatiku, ovlivňují činnost slinných žláz či sekreci žaludeční kyseliny. M3 ovlivňují činnost hladkého svalstva trávicí soustavy, močových cest či exokrinních žláz. M5 jsou lokalizovány v CNS, zejména v cévách. Subtypy M2 a M3 jsou spojeny s inhibicí adenylátcyklasy a prodloužením otevření draselných kanálů. Aktivací M2 receptoru v kardiomyocytech dochází k negativně chronotropní, inotropní a dromotropní reakci. M4 mAChRs jsou široce rozšířené v plicích a mozku.(11, 12)

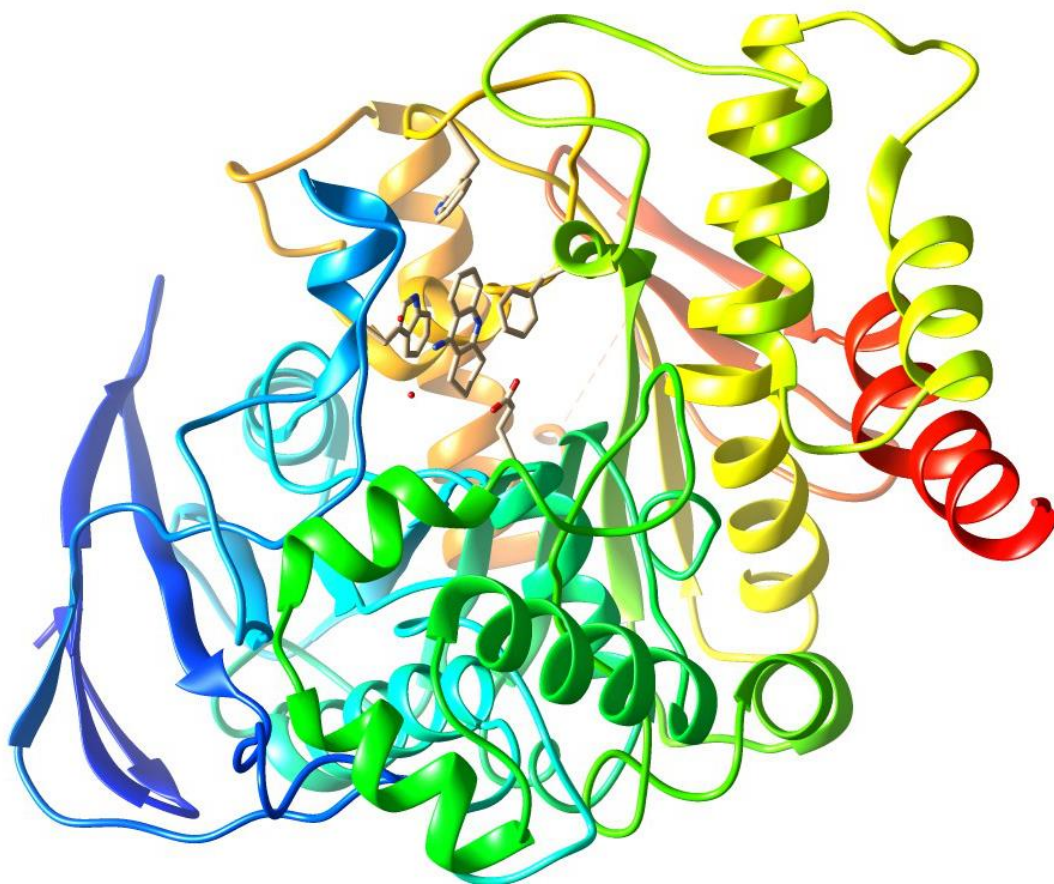


**Obr. 4** Struktura M2 (PDB 4MQM) (13) a M3 receptoru (PDB 4DAJ) (14). Obrázek utvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.



### 3.3 Cholinesterasa

Cholinesterasa (ChE) je obecný termín používaný pro rodinu přírodních enzymů, které patří do esterasové rodiny ve vyšších eukaryotech.(15) Serinové hydrolasy a proteasy jsou všude přítomnou skupinou enzymů, které se podílejí na mnoha životních funkcích. V lidském těle se nacházejí dva typy serinových hydrolas, které jsou si strukturně i funkčně velmi blízké: acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, obr. 5) a butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8).(16-18)



**Obr. 5** Acetylcholinesterasa s navázaným ligandem. Obrázek byl vytvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.

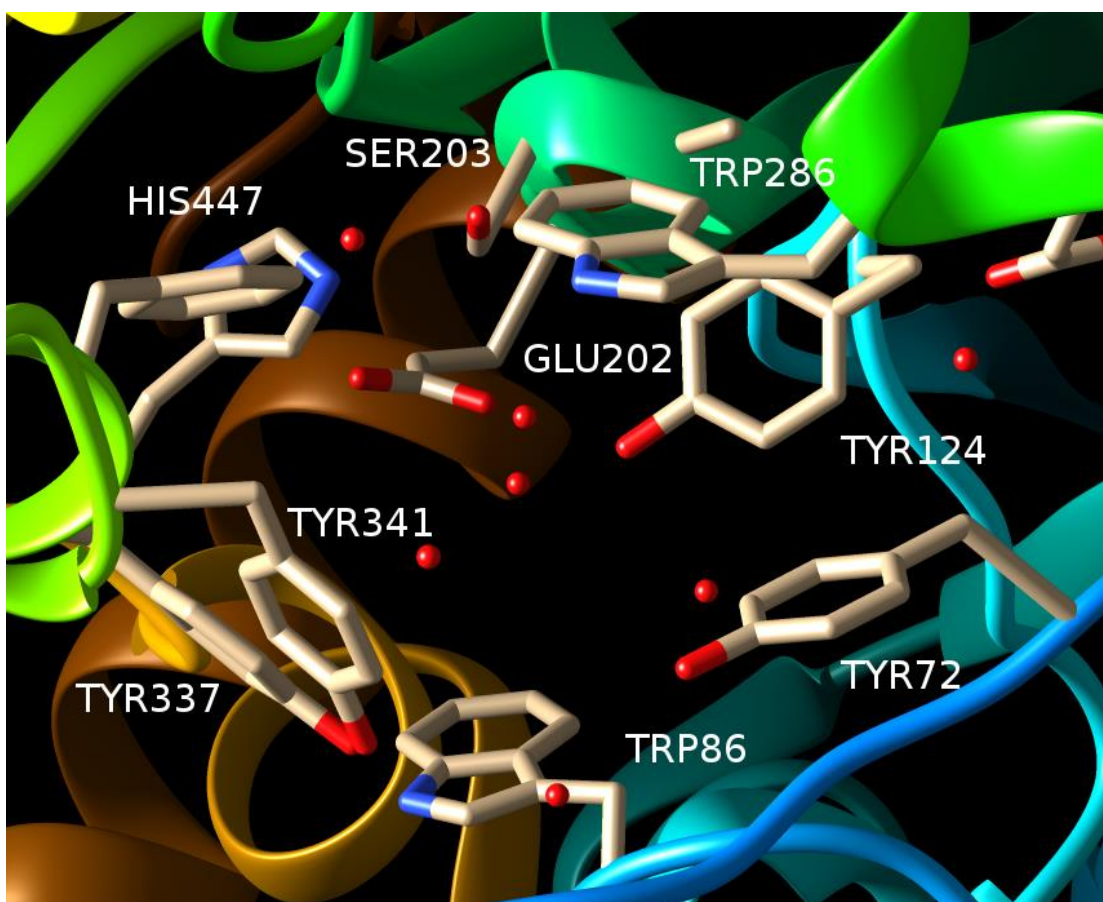
Oba katalyzují hydrolýzu acetylcholinu s podobně vysokou účinností, ale liší se distribucí v těle a afinitou k větším substrátům. BChE je sekreční enzym produkovaný jaterními buňkami. Vyskytuje se v krevní plazmě, ledvinách a játrech. Lépe hydrolyzuje estery s většími skupinami, jako je butyrylcholin nebo benzoylcholin. Její úloha v organismu není stále úplně jasná. Skládá se ze dvou dimerů, jejichž podjednotky jsou spojené disulfidickými můstky a nekovalentními

interakcemi. Je tvořena 574 aminokyselinami a její molekulová hmotnost je 348000.(19) Některé z genetických variant BChE vykazují nižší aktivitu, což se může projevit po podání určitých léků nebo při poklesu syntézy BChE v důsledku poškození jaterního parenchymu.

AChE se vyskytuje převážně v centrálním nervovém systému, neuromuskulárních spojeních a hematopoetickém systému obratlovců. Je vázána membránovým glykoproteinem a existuje v několika molekulárních formách. Hlavním úkolem AChE je ukončení přenosu impulsů na cholinergních synapsích rychlou hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu. Rychlost hydrolýzy je velmi vysoká. Jedna molekula enzymu je schopna degradovat  $10^5$ – $10^6$  molekul ACh za sekundu.(20) AChE je intenzivně studována pro své farmakologické funkce. Inhibice AChE vede ke kumulaci ACh a ovlivnění cholinergního přenosu. Hlavní klinické použití inhibitorů AChE je v léčbě myasthenia gravis, Alzheimerovy choroby či oftalmologii.(21)

### 3.4 Struktura cholinesteras

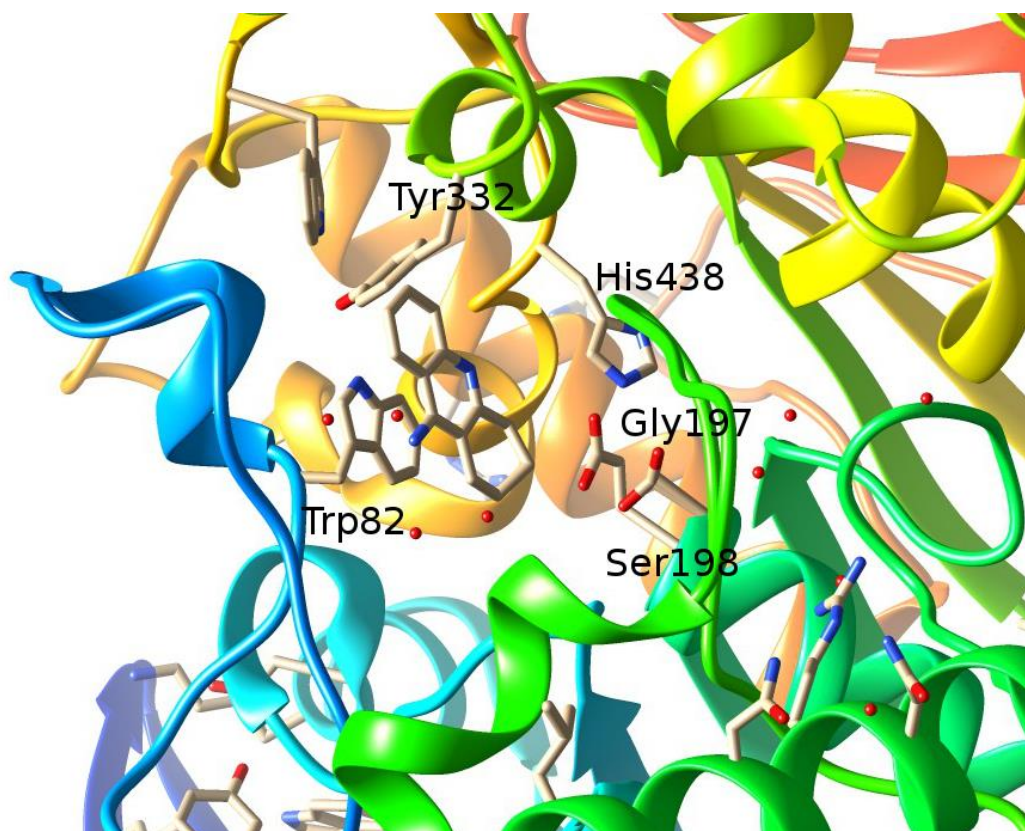
AChE je dlouhodobě studovaný enzym. První krystalografická struktura byla získána v roce 1991 (1ACJ).(22) V PDB databázi je v současné době více než 170 krystalografických struktur AChE z několika druhů organismů. 3D struktura je evolučně značně zachovalá navzdory většímu rozdílu v aminokyselinové sekvenci. Lidská (hAChE) a myší (mAChE) jsou z 88 % identické a z 97 % homologní. S acetylcholinesterasou z *Torpedo californica* (tcAChE) je identická z 57 %, ale homologní z 88 %. Základní strukturální podjednotky důležité pro funkci AChE jsou si velmi podobné (obr. 6).(23)



**Obr. 6** Prostorové rozložení aminokyselinových reziduí lidské AChE (PDB 2GYV). Obrázek byl vytvořen pomocí UCSF Chimera.

Aktivní místo enzymu je uloženo na dně asi 20 Å hluboké kavity, která proniká do poloviny enzymu. Vstup do kavity je překryt omega smyčkou (Cys69–Cys96) a je ohraničen periferním anionickým místem (PAS).(24) PAS se skládá z hydrofobních reziduí (Tyr72, Tyr124, Trp286, Tyr341) a anionického Asp74. PAS je podstatné pro interakci s modulátory AChE a koordinaci jejich vstupu

do kavity. Aminokyseliny v molekule AChE vytváří permanentní dipólový moment, který napomáhá orientaci kladně nabitých substrátů při pohybu kavitou. Povrch kavity je téměř z 60 % tvořen zbytky aromatických aminokyselin, které pomocí kation- $\pi$  interakcí napomáhají cestě substrátu k aktivnímu místu enzymu.(25) Jednotlivá rezidua mají s výjimkou Trp286 a Phe338 rigidní postavení. Jejich flexibilita má podstatný vliv na afinitu modulátorů. Absence Phe338 v BChE oproti AChE ovlivňuje afinitu k některým inhibitorům. Aktivní místo BChE není uloženo v úzké štěrbině a přístup k němu je tak podstatně snadnější (obr. 7).(26)



**Obr. 7** Prostorová orientace takrinu v kavitě BChE (4BDS).(27) Obrázek byl vytvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.

Aktivní místo AChE je tvořeno dvěma podjednotkami. Esteratické místo je tvořeno katalytickou triádou Ser203, His447, Glu202 (pro lidskou BChE Ser198, Glu325 a His438) a katalytické anionické místo Trp86 a Phe338. Role anionického místa je orientovat nabitě části substrátu pomocí kation- $\pi$  interakcí. Na stabilizaci karbonylového kyslíku acetylcholinu se podílejí Gly121, Gly122 a Ala204, které jsou v blízkosti katalytické triády. Část vzniklého komplexu ACh-AChE pak interaguje s Phe295, Phe297 a Phe338.(28) Z krystalových struktur je patrné, že rezidua Trp286

a Phe338 mohou zaujímat různé konformace v komplexu ligand-enzym. Orientace fenylového zbytku kontroluje otevření či zavření kavity. Asp74 a Tyr341 přitahují pozitivně nabitě části substrátu (kvartérní dusík). Interakce s těmito rezidui vyvolá konformační změny v monomeru AChE. Flexibilní ramena  $\Omega$  smyčky se k sobě přiblíží a zasunou substrát hlouběji do kavity směrem k aktivnímu místu enzymu.(29) Trp86 utváří kation- $\pi$  interakci s kvartérním dusíkem substrátu.(30, 31) Další rezidua společně nastaví substrát k nukleofilní substituci. Následně dochází k hydrolyze katalytickou triádou. Imidazolový kruh His447 přenáší elektrony z Glu202 na Ser203, nukleofilní atak hydroxylového kyslíku Ser203 na esterovou vazbu ACh vede k acylaci enzymu provázeného uvolněním cholinového zbytku. Vzniklá kovaletní vazba je rychle hydrolyzována (Schéma 2).(32, 33)

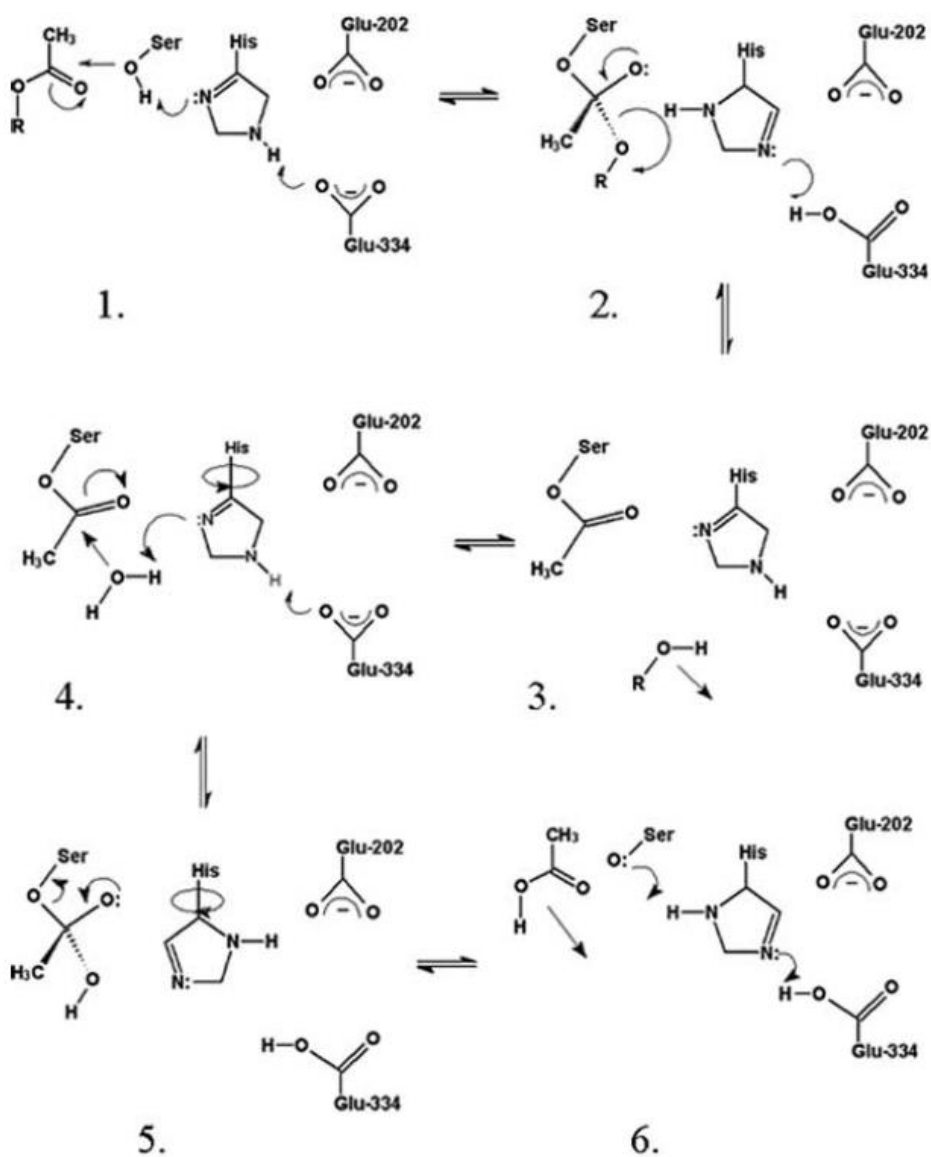
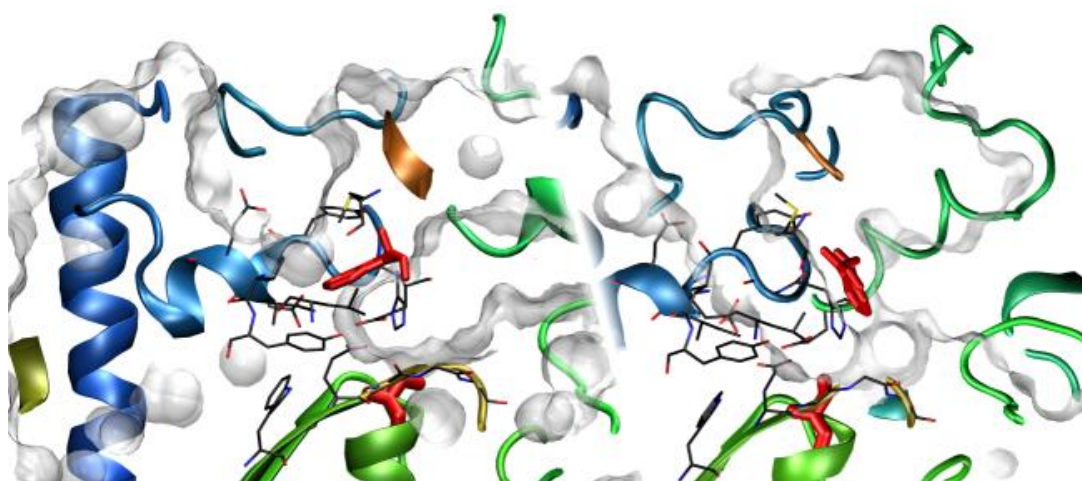


Schéma 2 Deacylace acetylcholinu (převzato z lit. (33)).



Studie z molekulové dynamiky, na rozdíl od krystalografických, předpokládají přítomnost vzniku kanálů v tranzitních stavech enzymu, které umožní odchod produktů enzymatické reakce, případně solventu. Ač v krystalografických studiích vypadá kavita rigidně, počítačová dynamika naznačuje otevírání 3.4 Å širokého kanálu (backdoor) v prostoru mezi Tyr442 a Trp84 (obr.8).(34, 35) Druhý kanál (side door) se zřejmě otvírá v okolí Thr 75, Leu76 a Thr83.(36, 37)



**Obr. 8** Otevírání “backdoor” kanálu v molekulové dynamice. Obrázek byl vytvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.

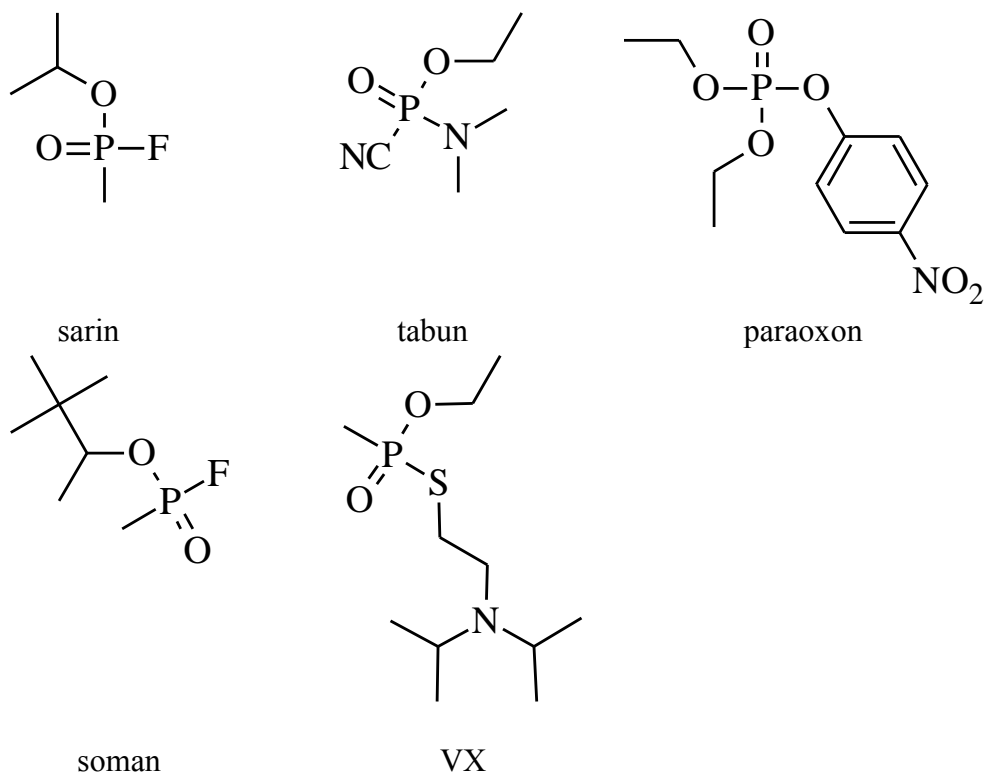
### 3.5 Inhibitory acetylcholinesterasy

Existuje mnoho látek, lišících se původem, strukturou či mechanismem působení, které jsou schopné ovlivňovat aktivitu AChE. Inhibitory AChE se liší chemickou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi.(38) Tyto vlastnosti jsou podstatné pro interakci s enzymem, schopnost pronikat hematoencefalickou bariérou (HEB) či přímo stimulovat či blokovat receptory pro ACh. Jedna skupina látek utváří kovalentní vazbu se Ser203 katalytické triády aktivního místa. Touto cestou inhibují AChE dvě nejvýznamnější podskupiny látek – organofosforové inhibitory a karbamátové inhibitory. Zásadní odlišnost je v rychlosti disociace vzniklého komplexu. Druhou skupinou jsou reverzibilní inhibitory, které utvářejí komplexy na základě nevazebných interakcí. Pro rozvoj ve skupině nepřímých cholinomimetik bylo důležité objasnění struktury a mechanismu účinku alkaloidu fysostigminu ve 20. až 30. letech 20. století. V poslední době byl vývoj ve skupině cholinergik oživen v souvislosti se zvýšeným výskytem různých typů demence, především AD.(39)

### 3.5.1 Organofosforové inhibitory (OFI)

Jedná se o synteticky připravené látky, které fosfonylují nebo fosforylují hydroxylovou skupinu aminokyseliny serinu v aktivním místě enzymu. Tato vazba je fyziologicky neodstranitelná. Při inhibici AChE dochází k nahromadění acetylcholinu na synapsích nervového systému a hyperstimulaci cholinergních receptorů v periferních orgánech i centrálním nervovém systému.(40) Bylo připraveno již několik tisíc OFI, které jsou používány zejména jako pesticidy (malathion, chlorpyrifos) nebo v průmyslu jako změkčovadla, plastifikátory či inhibitory hoření.(41) Jejich nebezpečnost je v možné kontaminaci potravin či zdrojů pitné vody. Každý rok je vyrobeno okolo 3 milionů tun pesticidů. Dle statistik WHO je jimi ročně intoxikováno až 2 miliony lidí a na následky otrav zemře až 200 000 lidí, zejména pak v zemích třetího světa.(42) OFI jsou dále používány v humánní či veterinární medicíně. Vysoce toxické OFI (obr. 9), označované jako nervově paralytické látky (NPL), jsou estery nebo amidy kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Zbývající hydroxyl bývá nahrazen kyanoskupinou (tabun) nebo fluorem (soman, sarin). VX obsahuje zbytek *N,N*-diisopropylethantiolu. Byly zneužívány ve válečných konfliktech diktátorskými režimy (Irán, Irák, Sýrie) a zřejmě se stále nacházejí v arsenálu některých zemí. Jedná se o látky, které lze relativně snadno a levně syntetizovat a existuje tak i riziko jejich zneužití radikálními skupinami. V tokijském metru bylo při teroristickém útoku zasaženo sarinem přes pět tisíc lidí a dvanáct jich zemřelo.(43)

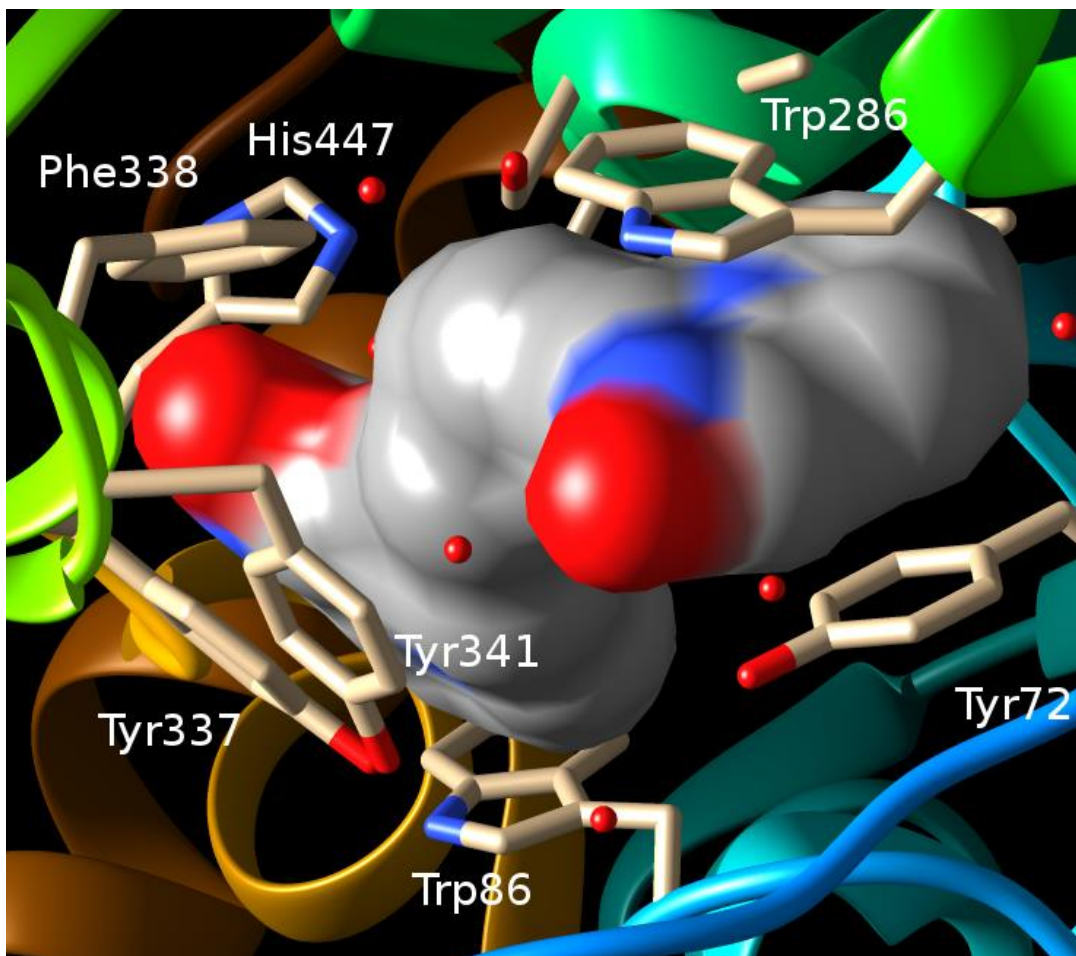
Terapii otrav po zasažení OFI je potřeba vzhledem k její závažnosti zahájit co nejdříve. Její součástí je potlačení příznaků otravy a obnovení funkce AChE. Krom antidotní terapie je využíváno podání antikonvulziv (diazepam), podpora dýchacích funkcí (oxygenoterapie) a případně podání centrálních stimulancií (efedrin).



**Obr. 9** Zástupci organofosforových inhibitorů.

I přesto, že je znám mechanismus, jakým tyto látky působí, není terapie intoxikací touto skupinou sloučenin dodnes uspokojivě vyřešena. Jako antidota jsou podávána anticholinergika (atropin, benaktyzin), která brání navázání nahromaděného acetylcholinu na cholinergní receptory, a tím zabraňují jejich nadměrné stimulaci. Dále jsou podány reaktivátory AChE (pralidoxim, obidoxim nebo asoxim známý také jako HI-6), které jsou silnější nukleofily než voda a jejich působení na komplex AChE-OFI vede k uvolnění enzymu (obr. 10).(44-46)





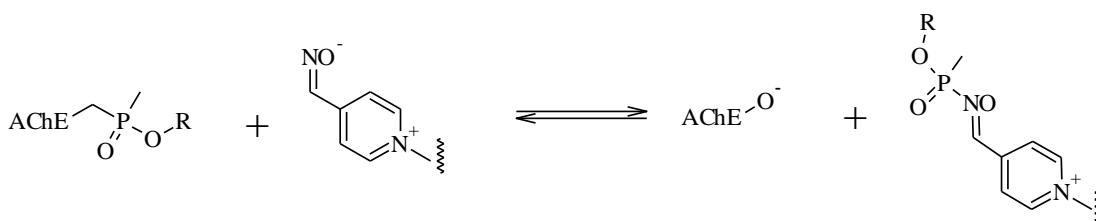
**Obr. 10** Reaktivátor HI-6 v kavitě AChE (PDB 2GYV). Obrázek byl vytvořen pomocí aplikace UCSF Chimera.

I rychlé podání antidot nemusí zabránit intoxikaci, post-expoziční paralýze, křečím, poruchám a trvalému poškození mozku. Aktivací NMDA receptorů dochází ke zvýšenému příjmu vápenatých iontů nervovými buňkami a jejich následnému odumírání. Hepatotoxické působení NPL, imunosuprese a mutagenita se mohou projevit i několik let po expozici.(47, 48)

Ochranu před těmito účinky je však možné zajistit podáním vhodného a účinného profylaktického prostředku, který zabrání toxickému působení uvedených látek po jejich průniku do organismu. Při podezření na použití OFI (detekce pomocí senzorů, klinické projevy otravy) je možná profylaktická aplikace reverzibilních inhibitorů AChE, které mají afinitu ke stejnému místu enzymu, jako látky vyvolávající intoxikaci, a tím zabrání vzniku ireverzibilní vazby mezi toxicky působící látkou a enzymem.(49) Tyto látky se spontánně po uplynutí určité doby od AChE odpoutají, a tak uvolní její aktivní místo, čímž obnovují i aktivitu AChE. Standardem v dnešní

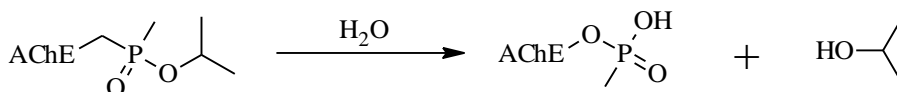
době je podání pyridostigminu. Pro toto využití byly testovány i další sloučeniny jako fysostigmin nebo huperzin A. Požadovanou vlastností je dostatečně selektivní inhibice AChE tak aby BChE mohla nadále vykonávat svou funkci bioscavengeru.

Druhou možností je podání reaktivátoru AChE před vlastní intoxikací. Tato skupina látek se vyznačuje afinitou a slabým inhibičním účinkem k AChE a u některých látek i BChE. Enzym s navázaným reaktivátorem je takto chráněn před účinky pesticidů a dalších organofosforových inhibitorů. Oximová skupina reaktivátorů je vysoce nukleofilní a OFI k ní mají vyšší afinitu než k AChE. Dochází k fosforylaci nebo fosfonylaci oximu a k uvolnění AChE (schéma 3). Reaktivátor je zároveň schopen, při vytvoření dostatečné plazmatické koncentrace, částečně reagovat s přítomnými OFI za vzniku sloučenin, které podléhají v organismu další metabolizaci. V současnosti je v armádě České republiky zaveden transdermální přípravek Transant, který jako účinnou látku obsahuje relativně širokospektrý reaktivátor oximového typu HI-6.(48, 50)



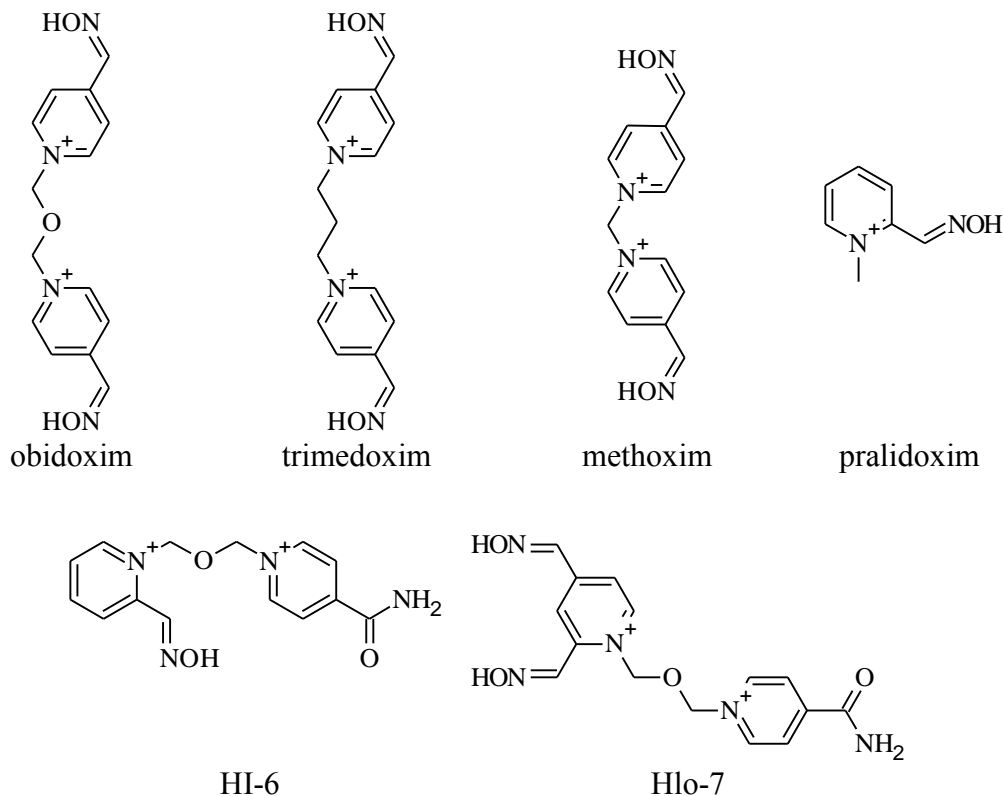
**Schéma 3** Reaktivace AChE.

Reaktivátory je nutné aplikovat co nejdříve po styku s NPL, protože dochází k tzv. stárnutí vazby AChE-OFI (schéma 4), kdy postupnou hydrolyzou vzniká komplex enzymu s kyselinou fosforečnou (fosfonovou) Komplex je již nereaktivovatelný a je potřeba syntézy *de novo*.(51) Poločasy stárnutí se pohybují v řádech minut až hodin.(52)



**Schéma 4** Stárnutí inhibovaného enzymu.

Společným strukturálním rysem reaktivátorů je molekula pyridinu s kvartérním dusíkem a navázanou oximovou skupinou (R-CH=NOH). Molekula reaktivátoru obsahuje jedno (pralidoxim) nebo dvě pyridinová jádra (obidoxim) a může obsahovat jednu až čtyři oximové skupiny (obr. 11). Účinnost reaktivátoru je dána typem NPL.(53, 54)



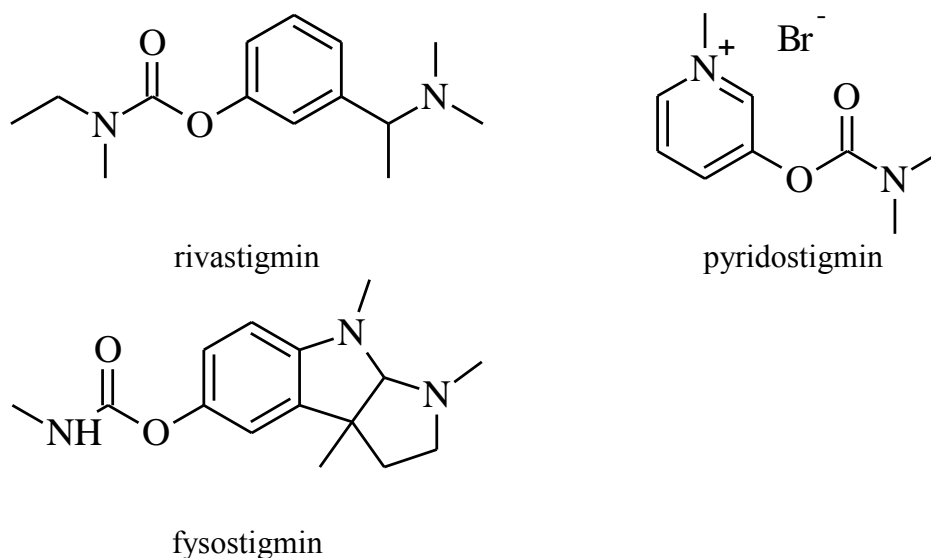
**Obr. 11** V současnosti nejpoužívanější reaktivátory.(47)

Dalším perspektivním řešením je použití tzv. bioscavengerů, což jsou biomolekuly, obvykle enzymy ze skupiny cholinesteras, které mají schopnost přímo vychytávat toxické OFI v krevním oběhu ještě předtím, než dosáhnou svých přirozených cílů (AChE). Jako nejperspektivnější cesta v oblasti bioscavengerů se v současnosti jeví využití lidské butyrylcholinesterasy (BChE), jejíž dostatečná účinnost byla potvrzena *in vivo* na primátech.(55, 56)

### 3.5.2 Pseudoireverzibilní inhibitory

Pseudoireverzibilní inhibitory jsou skupinou látek, které utvářejí kovalentní vazbu s enzymem stejně jako jeho přirozený substrát ACh. Nejvýznamnější skupinou látek jsou karbamáty. Funkčně jsou podobné OFI, ale jejich vazba na enzym

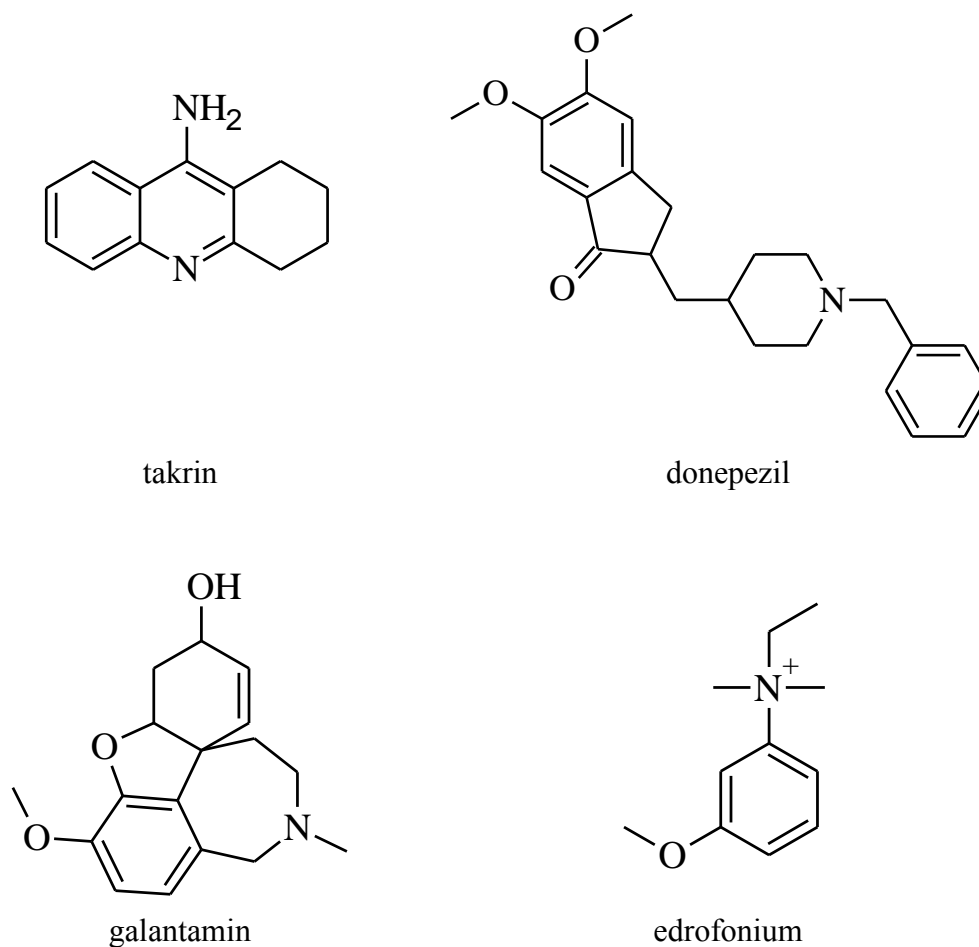
je fyziologicky hydrolyzovatelná a doba inhibice se pohybuje v řádech minut. Stabilita komplexu se prodlužuje s rostoucí délkou alkylu. Disubstituované deriváty jsou účinnější než monosubstituované. Karbamátové inhibitory s terciárním dusíkem se dobře vstřebávají, pronikají HEB a mají periferní i centrální účinky. Sloučeniny typu kvartérních bází působí především periferně. Navíc mají přímé účinky na nikotinové receptory, především na nervosvalovou ploténku, a jsou proto výhodné pro léčbu myastenia gravis (MG). Nejpoužívanějším karbamátovým inhibitorem v léčbě MG je pyridostigmin (Mestinon®).(57) Našel své uplatnění i v terapii otrav OFI.(58) Rivastigmin na rozdíl od pyridostigminu lépe prochází HEB a využívá se v terapii AD (Exelon®).(59) Aby se předešlo možným nežádoucím účinkům zejména na gastrointestinální trakt je nutné dávky titrovat. Rivastigmin ve studiích na potkanech inhibuje acetylcholinesterasu méně výrazně než fysostigmin (60), avšak na rozdíl od fysostigminu účinkuje selektivněji v hippocampu a kortexu. Pyridostigmin má menší gastrointestinální nežádoucí účinky a je lépe tolerován než neostigmin.(61, 62) Některé karbamáty, zejména lipofilní, našly uplatnění jako pesticidy (karbaryl, moban, dimetan, isolan). Další pak v humánní či veterinární medicíně.



**Obr. 12** Struktura vybraných karbamátů.

### 3.5.3 Reverzibilní inhibitory

Mechanismem působení reverzibilních inhibitorů je nevazebná interakce s aminokyselinovými rezidui kavity. Dle místa působení můžeme tyto látky rozdělit na kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní inhibitory inhibují aktivní centrum enzymu, kde stericky brání dekompozici substrátu (takrin, edrofonium). Nekompetitivní inhibitory působí na periferní anionické místo (galantamin). Biskvartérní látky jsou schopné působit na obě místa současně (dekamethonium). Z chemického hlediska se jedná o velmi různorodou skupinu (obr. 13).



**Obr. 13** Reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy.

Látky s vyšší lipofilitou dobře procházejí přes HEB a mají tedy centrální působení. Tyto látky jsou v současné době využívány v terapii AD. Při degenerativních procesech této choroby dochází k rapidnímu úbytku cholinergních neuronů a snížení produkce ACh.(63) Následně jsou narušeny všechny mediátorové systémy v CNS. Inhibicí AChE dochází k navýšení koncentrace ACh v synaptické štěrbině, což se projeví zlepšením kognitivních funkcí pacienta. Hlavním benefitem,

který inhibitory přináší, je zpomalení průběhu a oddálení těžkých stadií demence, která jsou spojena s nesoběstačností pacienta. Demenci nevyléčí, ale prodlužují dobu zachování základních aktivit běžného dne. Kvartérní látky procházejí přes HEB v menší míře.(64, 65) Jejich přímé působení na receptory je využíváno v terapii myasthenia gravis.

### **3.6 Alzheimerova choroba a reverzibilní inhibitory používané v klinické praxi**

Roku 1906 provedl Alois Alzheimer poprvé klinickou diagnostiku dnes velmi rozšířené choroby.(66) Spolu s vaskulární demencí je nejčastějším typem demence u lidí nad 80 let.(67) Při této chorobě dochází k patologické tvorbě  $\beta$ -amyloidních proteinů jako důsledku zvýšené exprese jejich prekursoru APP (amyloid precursor protein).(68) APP je štěpen proteasami na  $\beta$ -amyloidní proteiny o různé délce. Nejdůležitější pro rozvoj AD je fragment označovaný jako  $A\beta_{42}$  (42 aminokyselinových reziduí), který se při nedostatečné clearance v důsledku zvýšené exprese shlukuje do preamyloidních plaků. Později vznikají v okolí nervových buněk heterogenní plaky složené z různě dlouhých  $\beta$ -amyloidních proteinů.(69) Způsobují tak poškození nervových buněk a jejich odumírání. Současně je ovlivněna aktivita ChAT a AChE (70), tedy enzymů nutných pro syntézu a dekompozici acetylcholinu. Narušení cholinergního systému se nejprve projevuje zhoršením krátkodobé paměti, zmateností a problémy v rozhodování. Postupem času dochází k narušení kognitivních funkcí, změně chování, agresivitě, halucinacím a celkové změně osobnosti. Problémy s vykonáváním běžných činností, řečí, orientací v čase a prostoru vedou k tomu, že v konečných stádiích se pacient o sebe není schopen sám postarat. Od stanovení diagnózy dochází k úmrtí do deseti let. Celosvětově je AD již pátou nejčastější příčinou smrti. Příčiny vzniku tohoto onemocnění jsou stále neznámé. Většina pacientů je starší 65 let. Propuknutí této choroby před 40 rokem je pravděpodobně ovlivněno genetickými predispozicemi nejspíše v důsledku změn na 1., 14. a 21. chromozomu.(71)

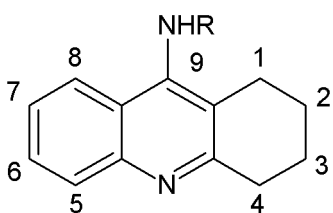
S AD je též spojována izoforma E4 Apolipoproteinu E (ApoE).(72) ApoE zajišťuje vazbu lipoproteinů na specifická vazebná místa. V mozku se podílí na reparaci a růstu dendritů. Na 19. chromozomu byly identifikovány 3 alely genu pro ApoE  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  a  $\epsilon_4$ . Ty kódují 3 izoformy ApoE2, ApoE3 a ApoE4.(73) V případě

přítomnosti dvou kopií alely ApoE4 je pro člověka osmkrát vyšší riziko vzniku AD ve srovnání s ApoE3.(74) ApoE2 má dokonce protektivní vliv na rozvoj AD.(75)

K dalším rizikovým faktorům patří poranění hlavy, prodělané infekční onemocnění, autoimunitní onemocnění či nezdravý životní styl.(76, 77) Na rozvoji se může podílet toxické působení hliníku, glutamátu či nedostatek některých živin (vitamíny skupiny B).(78) Zjištění, že při AD dochází k poklesu koncentrace ACh v synaptické štěrbině, vedlo k rozvoji farmaceutického výzkumu v této oblasti.

### Takrin

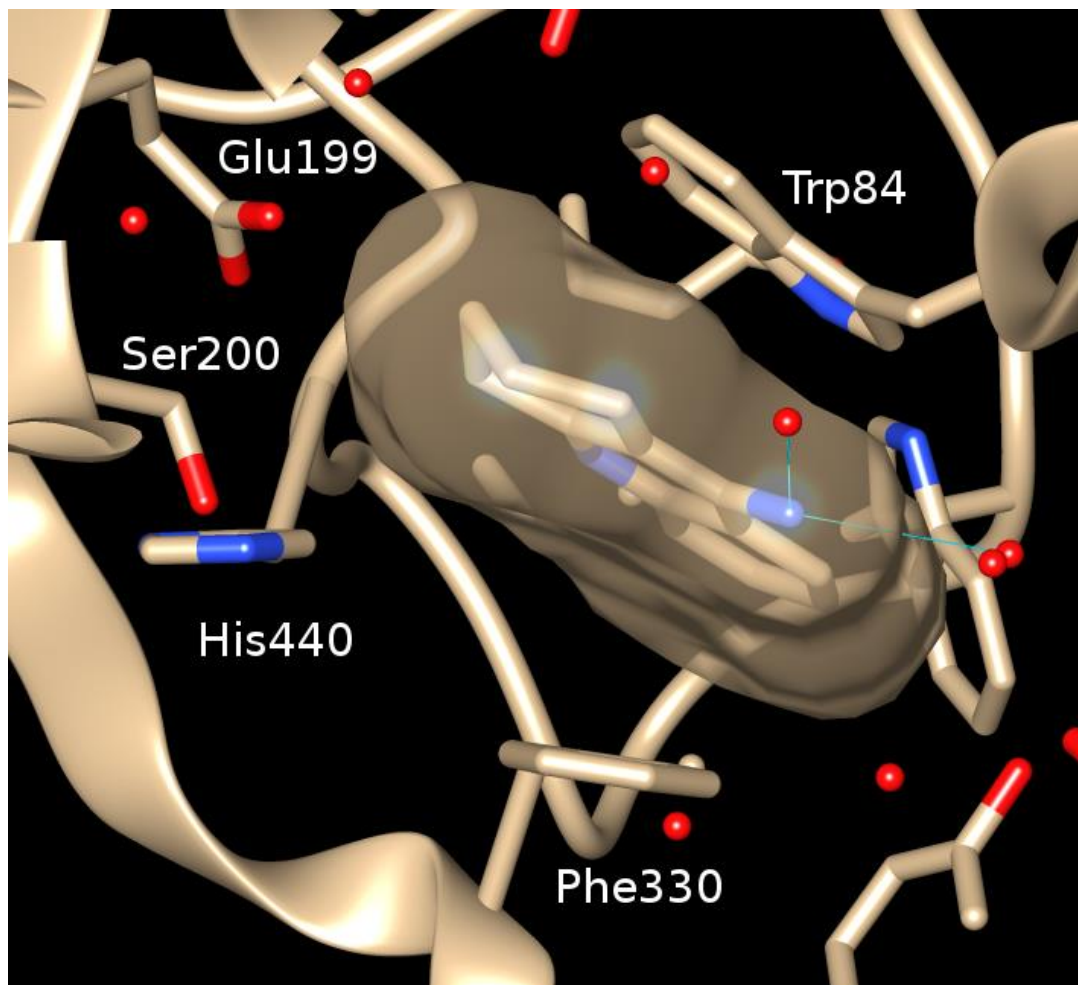
Takrin (THA, 1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin) byl prvním klinicky používaným inhibitorem při terapii AD. Syntetizován byl v roce 1945 a roku 1993 schválen pro užití k léčbě AD. Vedle inhibice AChE působí i na monoaminoxidasu (79), blokuje draslíkové kanály a zpětné vychytávání serotoninu a dopaminu (80) či interaguje s muskarinovými receptory.(81) Vzhledem k významným nežádoucím účinkům, zejména hepatotoxicitě, byl postupně nahrazen jinými sloučeninami, avšak vývoj takrinových analogů s výhodnějšími vlastnostmi stále pokračuje. Ve snaze získat derivát s výhodnějšími farmakodynamickými vlastnostmi a menšími nežádoucími účinky bylo syntetizováno a testováno mnoho molekul. Mnohé se dostaly až do klinických studií (velnakrin, amiridin).(82, 83) Nabízí se několik možností obměn – změna velikosti kruhů, otevření benzenového kruhu nebo začlenění heteroatomů (obr. 14).



**Obr. 14** Takrin a možnosti obměn.

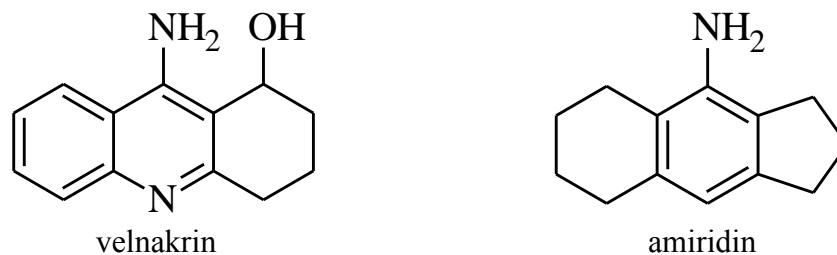
Pro účinek je důležitá heteroaromatická část molekuly, která pomocí  $\pi$ - $\pi$  a kation- $\pi$  interakcí utváří sendvičovou strukturu s Trp84 a Phe330. Dusík pyridinového kruhu utváří vodíkový můstek s His 440 a jeho náhrada vede ke ztrátě aktivity. Aminoskupina THA pak utváří vodíkové můstky s molekulami vody (obr. 15). Další možností je substituce na základním skeletu tetrahydroakridinu. Substituce v pozici 6 a 7 významně ovlivňuje biologickou aktivitu.





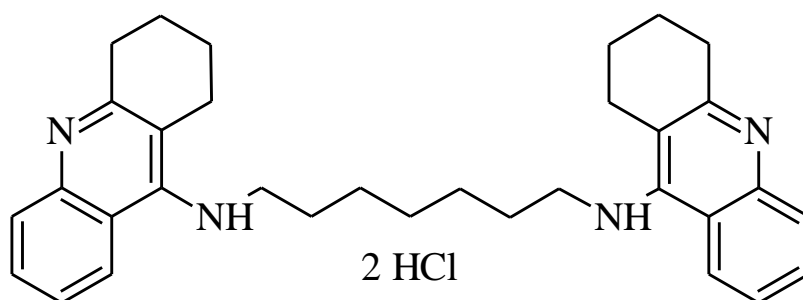
**Obr. 15** Krystalová struktura AChE z *Torpedo californica* s takrinem PDB (1ACJ)(22). Takrin se nachází v sendvičovém uspořádání mezi Trp84 a Phe330. Naznačené jsou vodíkové můstky aminoskupiny s molekulami vody. Obrázek byl vytvořen v aplikaci UCSF Chimera.

Monosubstituované deriváty (Cl, CH<sub>3</sub>,NO<sub>2</sub>) v pozici 6 mají vyšší aktivitu než monosubstituované v pozici 7 či disubstituované s výjimkou 6,7-difluoro derivátu.(84) Elektrondonorové substituenty v pozici 7 aktivitu snižují. Rovněž deriváty s objemnými substituenty vázanými na aminoskupinu v poloze 9 byly méně aktivní než THA. *N*-heptyl v této pozici aktivitu naopak zvyšuje.(85) Ze série 1-hydroxy analogů se do fáze klinických studií dostal velnakrin.(86) Jeho výrazná hepatotoxicita je jedním z důvodů, proč není klinicky užíván.(87) Podobný osud potkal i další nadějný derivát amiridin (obr. 16).(88)



**Obr. 16** Struktury takrinových derivátů.

Bylo připraveno i velké množství analogů s obměnou nasyceného kruhu, z nichž některé svou aktivitou převyšovaly THA, ale do klinické praxe se žádný nedostal.(89) Dockingové studie takrinu a jeho analogů, které mají dobrou shodu s krystalografickými strukturami, ukazují druhou možnost vazby derivátů v periferním anionickém místě. Výsledky byly inspirací pro syntézu látek, které by mohly interagovat s oběma místy současně. První takto připravenou skupinou látek byly deriváty bis-tetrahydroaminoakridinu (bis-THA).(90) Jako nejvýhodnější se ukázal derivát se sedmičlenným spojovacím řetězcem, který je 150krát účinnější a 250krát selektivnější než THA. U dimerních sloučenin lze předpokládat účinnost i na jiné enzymy, případně receptory. U bis-7-takrinu je prokázána inhibice  $\beta$ -sekretasy, NO synthasy a dále GABA a NMDA receptorů.(91-93)

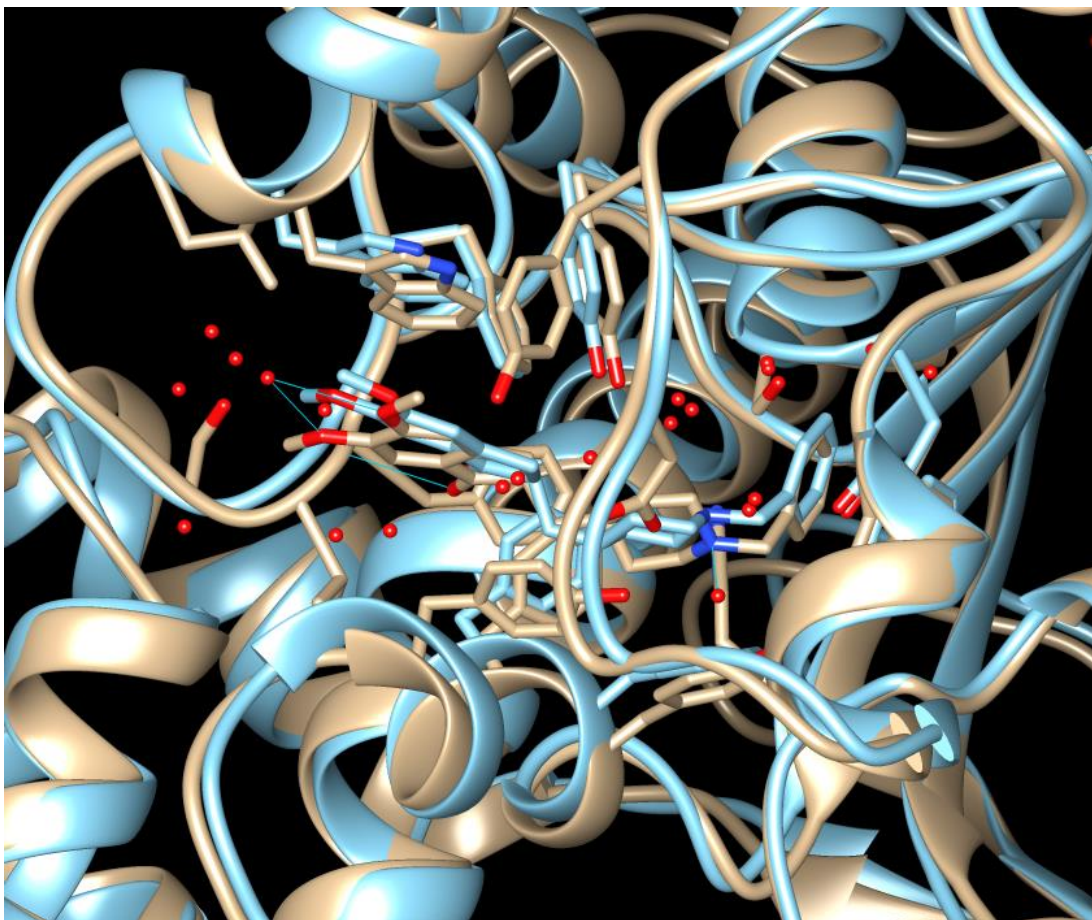


**Obr. 17** Bis-7-takrin.

V posledních letech zaznamenala největší pozornost skupina heterodimerů, kdy dochází ke spojení dvou látek s rozdílnou farmakologickou charakteristikou. Molekula THA byla spojena například s donepezilem, karvedilolem, melatoninem, niacinem či huperzinem. Vznikla tak obrovská škála látek, které příznivě ovlivňují nejen aktivitu AChE. (94-96)

## *Donepezil*

Donepezil ((*RS*)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on) byl druhou látkou schválenou k léčbě AD pod komerčním názvem Aricept<sup>®</sup>. Jedná se o syntetický derivát dihydroinden-1-onu, který byl původně syntetizován k léčbě arteriální sklerózy.(97) V porovnání s takrinem má nižší dávkování, lepší farmakokinetiku a hlavně méně nežádoucích účinků. Pro svou bezpečnost a účinnost je nejvíce používaným léčivem v terapii AD. Stejně jako takrin má vyšší selektivitu pro AChE (5.7 nM) než BChE (7000 nM). V praxi se používá racemická směs  $K_i = 3.35$  nM (*R*), 17.5 nM (*S*). (98) Donepezil se rozprostírá přes celou kavitu od anionického místa na dně kavity k perifernímu anionickému místu u jejího vstupu. (99) Z hlediska interakcí se dá molekula rozdělit na několik částí. Indenonový kruh vytváří  $\pi$ - $\pi$  interakci s indolovým kruhem Trp279 periferního anionického místa (obr. 18). Rozšíření kruhu vede k významnému snížení aktivity. Karbonylová skupina utváří vodíkové můstky s hydroxylovými skupinami Tyr121 a Tyr70. Pro účinek je podstatná. Její náhrada hydroxylem vede ke snížení aktivity (300 nM) a její odstranění snižuje aktivitu 1000krát. Substituce na aromatickém jádře methoxy skupinou zvyšuje aktivitu jako je tomu v případě 5,6-dimethoxy derivátu. Methoxyskupiny pomocí vodíkových vazeb interagují s Arg289 přes molekulu vody. Jako spojovací řetězec mezi indenonovou a piperazinovou částí je nejvhodnější alifatický řetězec s lichým počtem uhlíků (C1 = 5.7 nM, C2 = 30 nM, C3 = 1.5 nM, C4 = 35 nM, C5 = 14 nM).(100)



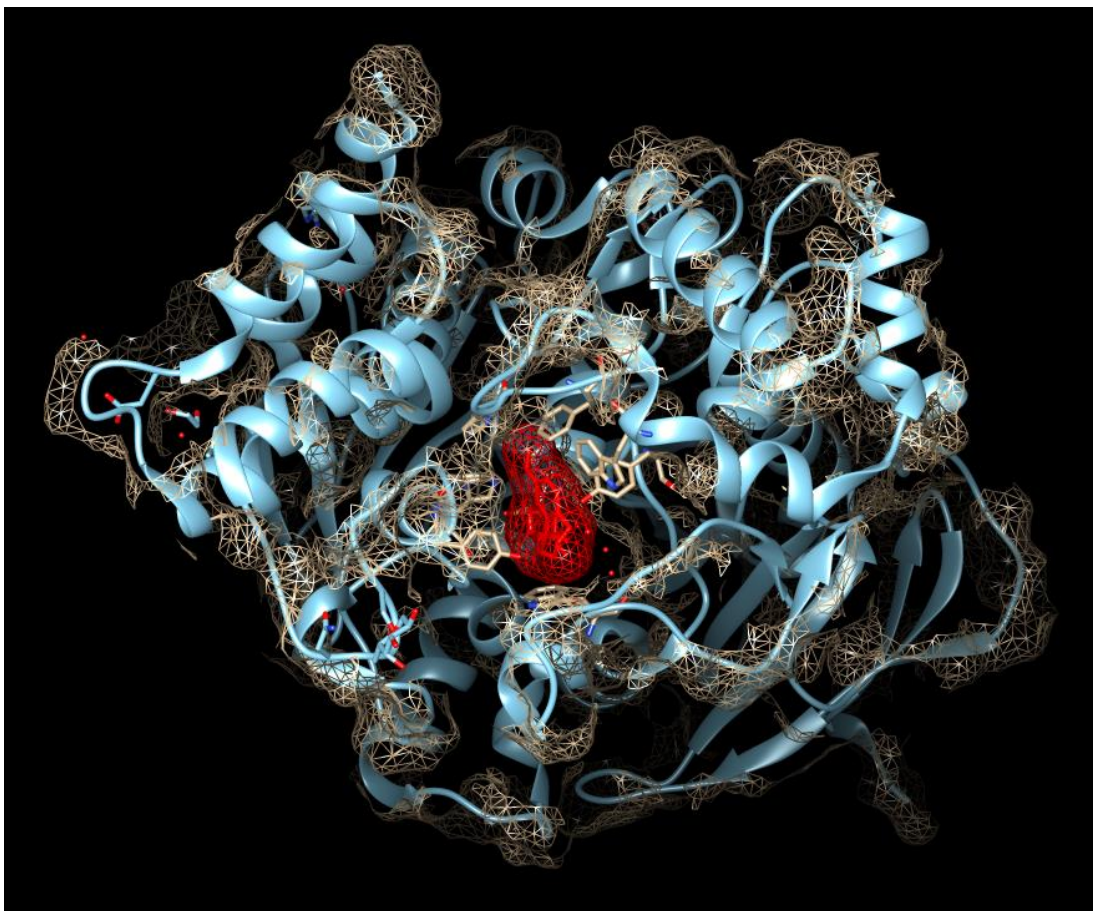
**Obr. 18** Překryv dvou krystalových struktur AChE s molekulou donepezilu. Lidská AChE vyznačena béžově (PDB 4EY7) (101) AChE z *Torpedo californica* vyznačena modře (PDB 1EVE) (99). Obrázek byl vytvořen pomocí UCSF Chimera.

Vzdálenost karbonylové skupiny od dusíku piperidinového kruhu je podstatná pro účinek. Náhrada benzylpiperidinu benzylpiperazinem (94 nM) nebo 4-benzylpiperidinem (480 nM) aktivitu snižuje.(100) Protonizovaný dusík utváří vodíkové vazby s karboxylovou skupinou Asp72 a hydroxylovou skupinou Tyr121 přes molekulu vody Wat1159 a podílí se na kation- $\pi$  interakci s benzenovým kruhem Phe330. Bazicitu piperidinového dusíku je pro inhibiční účinek zásadní. Benzyl utváří  $\pi$ - $\pi$  interakci s indolovým kruhem Trp84, což je vazebné místo pro kvartérní modulátory AChE.(22) Náhrada benzylu benzoylem nebo jeho úplné odstranění vede ke ztrátě aktivity. Naproti tomu substituce v poloze 3 methylem nebo nitroskupinou aktivitu mírně zvyšuje.(100, 102)

### *Galantamin*

Galantamin (4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-6*H*-benzofuro [3a,3,2-*e.f*][2]-benzazepin-6-ol) byl poprvé izolován v roce 1952 z cibulí sněženky *Galanthus woronowii*.(103) Tento terciární alkaloid byl následně izolován i z dalších rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Jeho výhodou oproti jiným inhibitorům AChE je přímé působení na nikotinové receptory. Toho bylo využíváno k antagonizaci neuromuskulární blokády a neurologických poruch. Hlavní uplatnění nachází v terapii AD. Galantamin je na trhu od roku 2001 pod komerční značkou Reminyl®. Dále je možné využít v léčbě MG. Působením na presynaptické N-receptory reguluje nejen uvolňování ACh, ale i dalších neuromediátorů (GABA, glutamová kyselina, serotonin a noradrenalin) ovlivňujících paměťové funkce, náladu a emoce.(104, 105) Krystalografická studie (1DX6) galantaminu v AChE z *Torpedo californica* ukazuje, že galantamin interaguje s aktivním místem enzymu.(106) Pro inhibiční aktivitu galantaminu je podstatná přítomnost dvojné vazby cyclohexenového kruhu, hydroxylové skupiny na cyclohexenovém kruhu, terciární aminoskupiny a methoxyskupiny. Jejich obměnou dochází k ovlivnění farmakodynamických a farmakokinetických vlastností. Dvojná vazba cyclohexenového kruhu je přitahována  $\pi$  systémem indolového kruhu Trp84. Hydroxylová skupina utváří vodíkovou vazbu jednak přímo s Glu199 (2.7 Å) a dále s dvěma molekulami vody. Přes jednu z nich interaguje s NH skupinami Gly118, Gly119 a Ala201. Druhá molekula vody pak umožňuje spojení s Tyr130 a Gly117. Methoxyskupina galantaminu je v blízkém kontaktu s Phe288 a Phe290 a dále tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou Ser200. Na interakci se nepodílí kvartérní dusík, jak je tomu u jiných inhibitorů, ale vysoká afinita rigidní struktury galantaminu je způsobena vyšším množstvím slabších interakcí (obr. 19).





**Obr. 19** Krystalová struktura lidské AChE s galantaminem 4EY6.(101) Enzym zobrazen ve stužkovém provedení s naznačeným povrchem. Galantamin zobrazen červeně. Obrázek byl vytvořen pomocí UCSF Chimera.

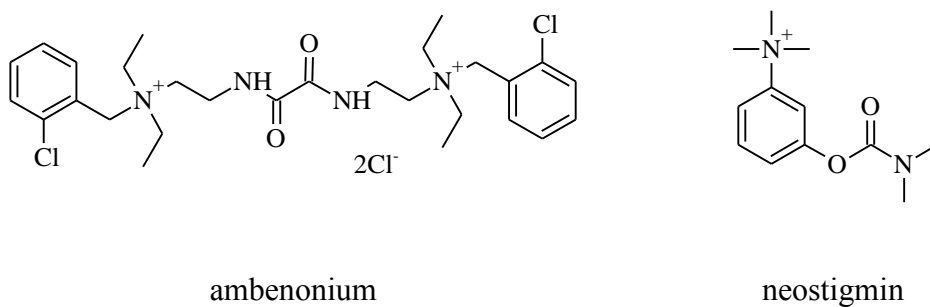
Účinné látky lze získat esterifikací hydroxylové skupiny v poloze 6.(107) Rovněž převedení terciární aminoskupiny na iminoskupinu zvyšuje aktivitu, čehož bylo využito při přípravě homo- a účinnějších heterodimerických derivátů interagujících i s PAS. *N*-substituované deriváty jsou účinnější než *O*-substituované a jako nejvýhodnější se jeví osmičlenný methylenový spojovací řetězec.(96, 108)

### 3.7 Myasthenia gravis

Myasthenia gravis (MG) je vzácné autoimunitní onemocnění s výskytem asi 100 případů na milion obyvatel. Jedná se o polygenní onemocnění, ale spouštěčem může být i infekce (herpetické viry, chlamydie). Postihuje více ženy hlavně mezi 25. a 35. rokem, a muže kolem padesáti let.(109, 110) Projevuje se svalovou ochablostí zejména po větší fyzické zátěži. Projevy obvykle začínají nesymetrickou ptózou

očních víček, postižením svalů obličeje, poklesem koutků, sníženou mimikou, poruchami polykání a artikulace. Následně mohou být postiženy svaly krku a končetin. Progrese nemoci vede k respirační insuficienci a selhání dechu.(111)

Při tomto onemocnění dochází k napadení struktur postsynaptické membrány receptoru nervosvalové ploténky protilátkami a následně k narušení nervosvalového přenosu. Dochází k postižení zejména nikotinových receptorů, blokování vazebných míst pro ACh a následné imunitní reakci proti těmto receptorům.(112) Protilátky jsou zjištělné v krevním séru a slouží tak v diagnostice MG. Ve více než 60 % případů jsou zjištěny patologické změny na brzlíku. Thymektomie je tedy jeden ze zvažovaných postupů terapie. Současná farmakoterapie je pro každého pacienta individuální. Bývá založena na inhibitech AChE, jejichž účinkem je jednak nahromadění ACh v synaptické šterbině v důsledku inhibice AChE a dále přímé působení na nikotinové receptory. V klinické praxi se používá pyridostigmin (Mestinon<sup>®</sup>), který je lékem první volby. Dále je možné využít odlišných farmakologických vlastností ambenonia (Mytelase<sup>®</sup>) a neostigminu (Syntostigmin<sup>®</sup>) (obr. 20).(113, 114) Pro inhibitory AChE používané v terapii MG je charakteristický kvartérní dusík, který snižuje možnost prostupu HEB a tím i centrální působení.(115)



**Obr. 20** Struktura sloučenin používaných při terapii myasthenia gravis.

Při nedostatečné odpovědi na léčbu inhibitory AChE, zejména v počátečních léčby, jsou nasazeny látky potlačující imunitu. Z kortikoidů je nejčastěji nasazen prednison, jehož dávky jsou obvykle titrovány. Nejpoužívanějším imunosupresivum je díky své dobré toleranci a nižším výskytem nežádoucích účinků azathioprin. Při špatné toleranci nebo nedostatečné účinnosti je využíváno cyklosporinu (Equoral<sup>®</sup>), cyklofosfamidu (Endoxan<sup>®</sup>) nebo takrolimu (Advagraf<sup>®</sup>).(116) Stále více nabývá na významu biologická léčba. Basiliximab (Simulect<sup>®</sup>) je monoklonální

protilátka proti receptoru pro interleukin 2 (IL-2).(117) Brzdí tak aktivaci dalších buněk imunitního systému a rozvoj nežádoucí imunitní reakce. Pro častý výskyt nežádoucích reakcí, zejména častých infekcí, je od jeho užívání ustupováno. T-buňky pacientů s MG nesou na svém povrchu více receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNF) než je tomu u zdravých jedinců. K vychytávání TNF je využíván fúzní protein etanercept (Enbrel®).(118) Zástupcem tzv. „antisense therapy“ je monarsen, který se nachází ve fázi klinického testování. Je to oligonukleotid, jehož mechanismus účinku je založen na navázání na mRNA kódující monomerní izoformu AChE, jejíž zvýšený výskyt byl pozorován u pokusných zvířat s navozenou MG. Nedochází tak k syntéze této rozpustné izoformy AChE, která u MG zvyšuje degradaci ACh.(119)



### 3.8 Molekulové modelování

Metody molekulového modelování používáme k pochopení funkce molekul, jejich struktury a interakcí.(120) Rozvoj výpočetní techniky, tvorba klastrů a superpočítačů nabízí jejich využití k rozsáhlému a výpočetně náročnějšímu *in silico* studiu interakcí potenciálního léčiva s cílovou molekulou. Cesta nového léčiva do praxe trvá více jak deset let a stojí okolo 2 miliard dolarů.(121) Je potřeba popsat cestu molekuly organismem od absorpce, přes distribuci a metabolismus až po vylučování. Počítačová simulace může přispět k výrazné úspoře finančních prostředků, ke kvalitnějšímu prozkoumání vlastností budoucího léčiva a lepší předpovědi jeho účinků. Molekulové modelování umožňuje též určit stereospecificitu látek. Může objasnit neobvyklé pozorování v průběhu studia vlastností enzymu. Má značnou předpovědní schopnost a vede k projektování nových, účinnějších sloučenin nebo úplně nových struktur, které nebyly odvozeny od strukturních rysů už známých sérií biologicky aktivních látek. Přes úvodní skepsi prokázala řada prací dobrou shodu mezi molekulovým modelováním a realitou. Svědčí o tom i velké množství odborných časopisů zabývajících problematikou počítačové chemie a molekulového modelování.

Techniky molekulového modelování se snaží pomocí zjednodušení fyzikálního modelu atomů popsat elektrostatické či dynamické chování molekul v mikroskopickém měřítku. Z farmaceutického hlediska jsou nejzajímavější makromolekuly proteinů a nukleových kyselin, kde je vzhledem k současnému výkonu počítačů nutná značná aproximace.

Podklady pro 3D strukturu jsou získány z rentgenografických struktur nebo z *ab initio* výpočtu kvantovou mechanikou. Získaná data se průměrují pro každý atomový typ nebo fragmenty molekul a jsou dále použity při výpočtu souřadnic celkové geometrie molekuly. Pro charakterizaci energie se používají dvě základní metody výpočtu, a to teoretické a empirické.

#### 3.8.1. Kvantová a molekulová mechanika

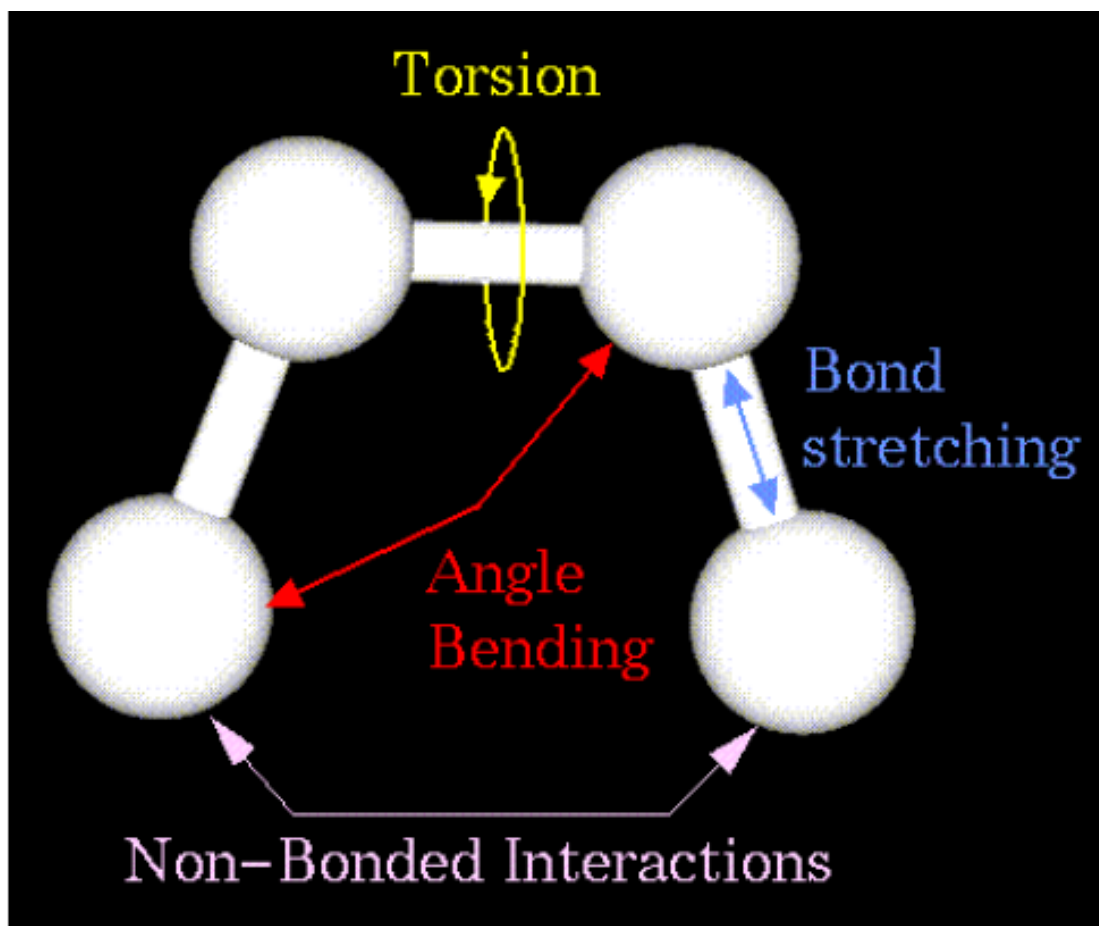
Teoretické metody výpočtu energie jsou založené na kvantové mechanice (QM). Krom geometrie a energie molekuly poskytuje i informaci o molekulových orbitalech – energeticky nejvýše obsazeném (HOMO) a nejnižše neobsazeném

(LUMO). Nejčastěji jsou používány dva základní modely. Prvním je model Hartreeho a Focka (HF), který nezahrnuje elektronovou korelaci, a druhým je Mollerova-Plessetova formulace poruchové teorie (MP2), která elektronovou korelaci zahrnuje a je výpočetně značně náročnější. Pro větší molekuly je HF nedostatečná a MP2 časově a hardwarově značně náročná, proto je používána jen na malé systémy. Výpočetní náročnost částečně řeší semi-empirické modely, které zahrnují jen valenční elektrony a příspěvky ostatních elektronů jsou nahrazeny empirickými parametry. Nejpoužívanějšími semi-empirickými metodami jsou AM1 (122) a PM3.(123)

Empirické metody, na rozdíl od kvantové mechaniky, využívají aproximace výpočtů na atomové úrovni, které jsou prováděny na úrovni elektronových struktur. Zjednodušeně si lze představit atomy v tomto systému jako nabitě kuličky o různé velikosti a tvrdosti dle atomového typu, které jsou spojené pružinami představujícími vazby a jejich torzní a vazebné úhly. Tato aproximace umožňuje sledovat rozsáhlejší systém. K výpočtu energií je využívána molekulová mechanika (MM), která charakterizuje molekuly pomocí potenciální energie.(124) Vychází z představy tzv. silového pole (*force field*), kdy je celková energie dána součtem příspěvků vazebných a nevazebných interakcí dané konformace. Vazebné příspěvky jsou dány odchylkou od rovnovážného stavu způsobenou změnou délky vazeb, vazebných úhlů a rotací vazeb (obr. 21). Na nevazebných příspěvcích se podílejí inter- a intramolekulární Coulombovy interakce, vodíkové můstky, Londonovy, van der Waalsovy a dipólové síly. Výpočet je vyjádřen rovnicí:

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{dih}} + E_{\text{elst}} + E_{\text{cros}}$$

kde  $E_{\text{tot}}$  je celková energie molekuly,  $E_{\text{stretch}}$  je příspěvek daný změnou délkou vazeb,  $E_{\text{bend}}$  odpovídá změnám vazebných úhlů,  $E_{\text{vdW}}$  příspěvek van der Waalsovských interakcí,  $E_{\text{dih}}$  příspěvek energie ze změn dihedrálních úhlů,  $E_{\text{elst}}$  příspěvky interakcí parciálních nábojů,  $E_{\text{cros}}$  společný příspěvek několika komponent k celkové energii (současná změna vazebného úhlu a délky vazby).(125)



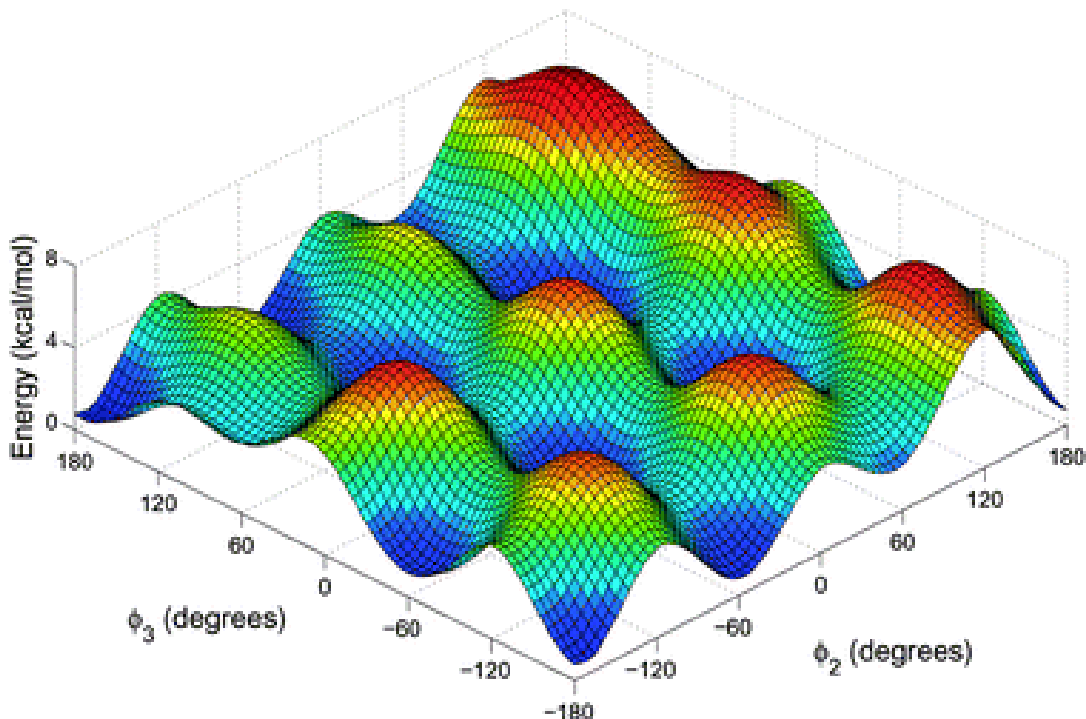
**Obr. 21** Vazebné příspěvky molekuly do celkové energie silového pole (převzato z webových stránek NCBR).

K výpočtům jednotlivých členů rovnice jsou používány matematické vztahy, jejichž parametry získáváme buď empiricky, nebo přesnými kvantově chemickými výpočty. Původ parametrů pro výpočet silového pole pro délky vazeb a vazebné úhly pochází z rentgenové krystalografie. Silové konstanty jsou získané z empirických dat. Tyto metody jsou vhodné zejména ke studiu konformačních změn větších molekul. Nejčastěji používaná silová pole jsou MM3 (malé organické molekuly)(126), OPLS (simulace v roztocích),(127) AMBER (128) a CHARMM (biopolymery).(129)

Zatímco u molekul větších jsme odkázáni na metody semi-empirické či empirické, tak u malých molekul si můžeme dovolit použít velmi přesné metody výpočtu. Nutnost dobré parametrizace je nevýhodou MM oproti QM. Je to časově náročná procedura, ale oproti QM nám umožňuje sledovat podstatně větší molekuly.

### 3.8.2 Energetická minimalizace molekuly

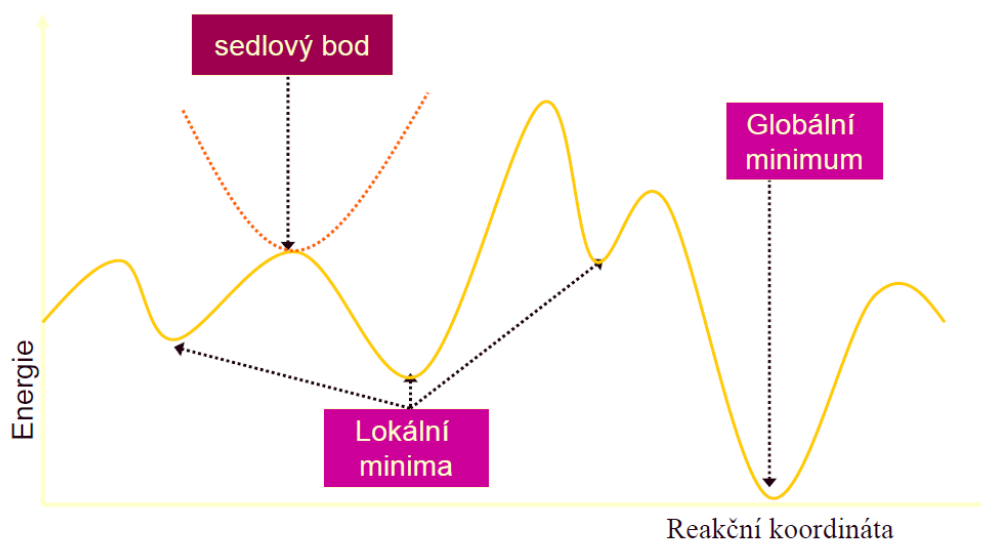
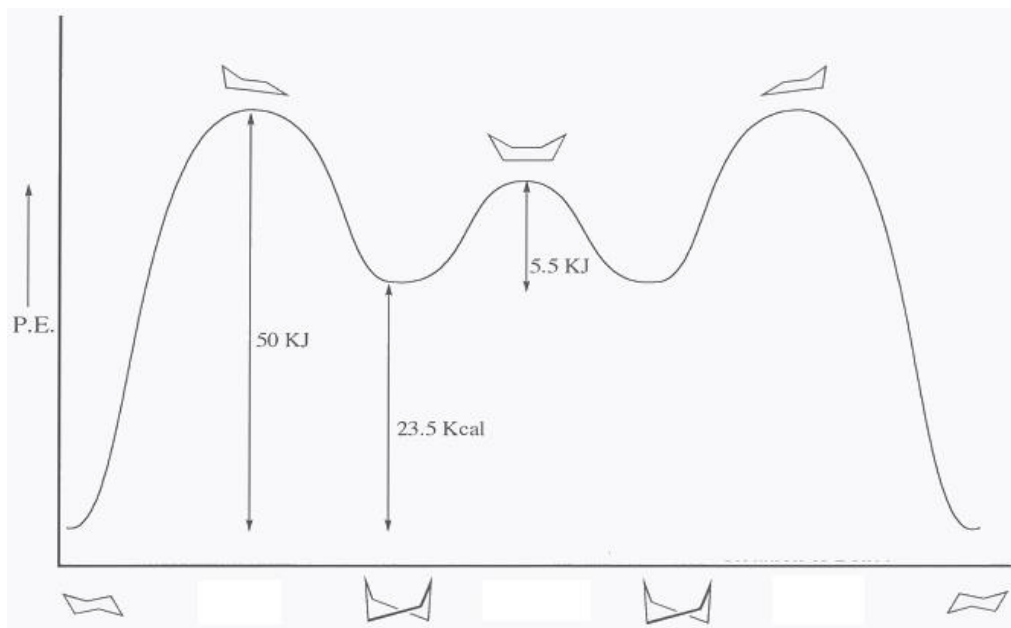
Na základě vztahu mezi geometrií a energickým stavem molekuly získáme hyperplochu potenciální energie (PES - Potential Energy Surface, obr. 22).



Obr. 22 Hyperplocha potenciální energie (převzato z lit.(130)).

Nelineární molekula má celkem  $3N - 6$  vnitřních souřadnic, kde  $N$  je počet atomů. S využitím Bornovy-Oppenheimerovy aproximace Schrödingerovy rovnice získáme  $3N - 6$  rozměrný prostor, ve kterém každý bod představuje geometrii molekuly s přiřazenou potenciální energií.(131)

Náročnost výpočtů je dána počtem volně rotovatelných vazeb a nastavením stupňů rotace. Pro dvě vazby a 10 stupňů rotace je to  $36 \times 36 = 1236$  bodů mřížky, které vytvářejí hyperplochu. Pro šest vazeb je to přes dvě miliardy bodů, což je za hranicí výkonu dnešních počítačů. Na hyperploše se nachází několik významných bodů (obr. 23). Jsou to lokální minima, která odpovídají stabilním polohám jader a geometrii molekuly. Nejnižší stav energie molekuly pak nazýváme minimem globálním. Naproti tomu sedlové body jsou koordináty s maximem energie, přes které molekula přechází do jiného lokálního minima.



**Obr. 23** Hyperplocha potenciální energie (převzato z webových stránek NCBR).

Pro další výpočty je podstatná optimalizace geometrie molekuly tj. minimalizace všech pnutí v molekule. K vyhledávání minim lze využít několika základních metod, z nichž nejpřesnější jsou první nebo druhé derivace energie podle souřadnic.

V současné době je nejvíce využíváno gradientových metod v kombinaci s druhou derivací.<sup>(132)</sup> Výpočetní náročnost stoupá s konformačně bohatšími molekulami. U biopolymerů je vzhledem k enormnímu množství lokálních minim vysoká pravděpodobnost, že výsledná optimalizace skončí daleko od globálního minima. Proto byly vyvinuty speciální metody, které pravděpodobnost nalezení

zvyšují. U simulovaného žíhání dochází k pomalému zahřívání molekuly a uvolnění všech pnutí v molekule a následnému ochlazení, které by mělo systém dovést do globálního nebo jiného reálného minima (obr. 24).<sup>(133)</sup> Tohoto procesu lze využít jen u malých a středně velkých molekul.



**Obr. 24** Simulované žíhání (převzato z webových stránek NCBR).

### 3.8.3 Metoda Monte Carlo a molekulová dynamika

U biomakromolekul je PES nahrazena simulační metodou, která poskytuje strukturní a termodynamickou charakteristiku studovaného systému. Tyto metody generují velké množství ne příliš odlišných konfigurací ( $10^5$  a více). Jednou z možností je molekulová dynamika (MD), která na základě výpočtu Newtonovy pohybové rovnice klasické mechaniky (obr. 25) popisuje reálné pohyby makromolekuly či systému v čase. <sup>(134)</sup>

$$\begin{array}{c}
 \frac{dE}{dr_i} \quad \xrightarrow{\quad} \quad F_i = m_i a_i \quad \xrightarrow{\quad} \quad \frac{dv_i}{dt} \quad \xrightarrow{\quad} \quad \frac{dr_i}{dt} \\
 \\
 - \frac{dE}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}
 \end{array}$$

**Obr. 25** Integrace Newtonových pohybových rovnic, kde  $m$  je hmotnost tělesa,  $a_i$  je zrychlení,  $r_i$  je vektor polohy,  $v_i$  je rychlost a  $t$  je čas. (převzato z webových stránek NCBR)

Při znalosti sil působících na jednotlivé atomy molekuly lze takto předpovědět chování systému v časových úsecích řádově desítek nanosekund. Při kroku 1 femtosekunda je k simulaci trvající 1 nanosekundu potřeba provést přes jeden milion výpočtů. Simulovaný úsek je dostatečně dlouhý k pozorování některých jevů, reakcí rozpouštědla s makromolekulou či například k přípravě vložení modulátoru do aktivního místa enzymu. MD je metoda přísně deterministická, což znamená, že jakýkoli stav systému v budoucnosti se principiálně dá najít z jeho současného stavu.

Další možností je metoda Monte Carlo (MC), což je metoda náhodného prohledávání, kdy makroskopické chování systému je statisticky předpovídáno na základě náhodně generovaných změn mikroskopických částí. Výsledkem velkého množství provedených experimentů je vysoká pravděpodobnost výskytu určitého jevu.(135) Při generování řetězce stavů metodou MC je často používáno Metropolisovo kritérium, podle něhož je následující stav systému automaticky akceptován, pokud je jeho energie nižší nebo shodná se stavem současným.(136) Simulací MC je použitím vysokých teplot pokryt konformační a konfigurační prostor, který je oddělen vysokými energetickými bariérami. U MD je vysoká teplota rizikem pro poškození a nevratnou deformaci molekuly. MD i MC využívají ve výpočtech principy MM. Pro studium enzymových reakcí nebo jiných acidobazických či redoxních dějů je potřeba využít hybridních QM/MM metod, jelikož MM nepočítá s možným přesunem elementárních částic. Výpočetně náročnější QM simuluje reakční centrum a substrát. Zbytek enzymu a rozpouštědlo je pak řešeno rychlejší MM.(137, 138) Struktura enzymu, jejímž zdrojem je například rentgenová krystalografie, je doplněn o molekuly rozpouštědla. Po minimalizaci výchozího stavu je pseudonáhodným algoritmem přidělena všem atomům rychlost a systém je zahřát na požadovanou teplotu pro danou simulaci, při které je pozorována energie komplexu, trajektorie atomů a další parametry interakce. Pravděpodobnost, že dojde k jevu, který chceme pozorovat, je však velmi malá. Můžeme ji zvýšit systémem tzv. řízené molekulové dynamiky, která spočívá v aplikaci síly v žádaném směru na část atomů.(139) Techniky MD jsou značně zdlouhavé a nákladné. Byly proto vyvinuty zjednodušené postupy MD pro interakci makromolekuly s nízkomolekulárními ligandy označované jako docking.(140)

### 3.8.4 Molekulový docking

Docking je jedna z velmi rozšířených počítačových metod, která nám umožňuje předvídat způsob interakce dvou molekul. Nejčastěji se jedná o ligand a biomakromolekulu (obr. 26). Tato metoda hledá uspořádání, v jakém spolu mohou tyto dvě molekuly interagovat. Pokud takové uspořádání existuje, najde nejvhodnější orientaci obou molekul z hlediska největší komplementarity a z hlediska maximálního počtu ne vazebných interakcí a nejmenší energie celého systému.(141) Pomocí metod molekulového modelování můžeme odhadnout ztrátu aktivity pro určité analogické sloučeniny, což umožňuje snížit počet látek, které by bylo zapotřebí následně syntetizovat při vývoji nových léčiv. Jedná se o statickou metodu, která na rozdíl od MD neumožňuje pohled na systém v čase.



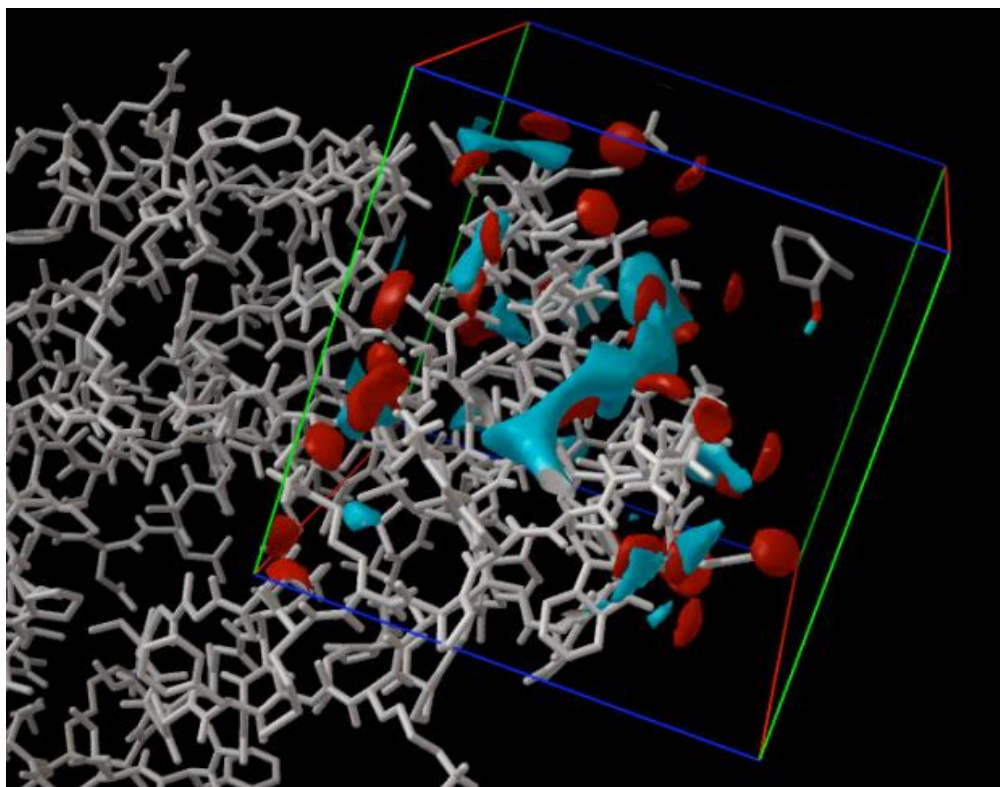
**Obr. 26** Možné vazebné pozice pro ligand v molekule AChE dle dockingové simulace. Obrázek utvořen v aplikaci UCSF Chimera.

Pro kvalitní dockingové studie je potřeba mít co nejkvalitnější trojrozměrnou strukturu systému. V současné době takové informace poskytuje rentgenová difrakce, nukleární magnetická rezonance nebo homologní modelování. Posuzujeme jeho relevantní geometrii, flexibilitu, schopnost interakce s ligandem nebo přítomnost



molekul vody ve vazebném místě. Pro zmenšení výpočetních nároků je potřeba identifikovat vazebné místo ligandu, což je v případě AChE a jejich modulátorů zejména aktivní místo a PAS. Protein Data Bank (PDB) je volně přístupná databáze 3D struktur malých i velkých rozměrů, která byla založena v roce 1970 v Brookhavenské národní laboratoři.(142) Zahrnuje zejména proteiny a nukleové kyseliny. V současné době je zde uloženo více než 170 krystalových struktur AChE z různých živočichů (*Mus musculus*, *Torpedo californica*, *Homo sapiens*, *Electrophorus electricus*) v čisté formě či s vázaným ligandem (galantamin, huperzin, HI-6). Pro srovnání v roce 2000 bylo těchto struktur 20.

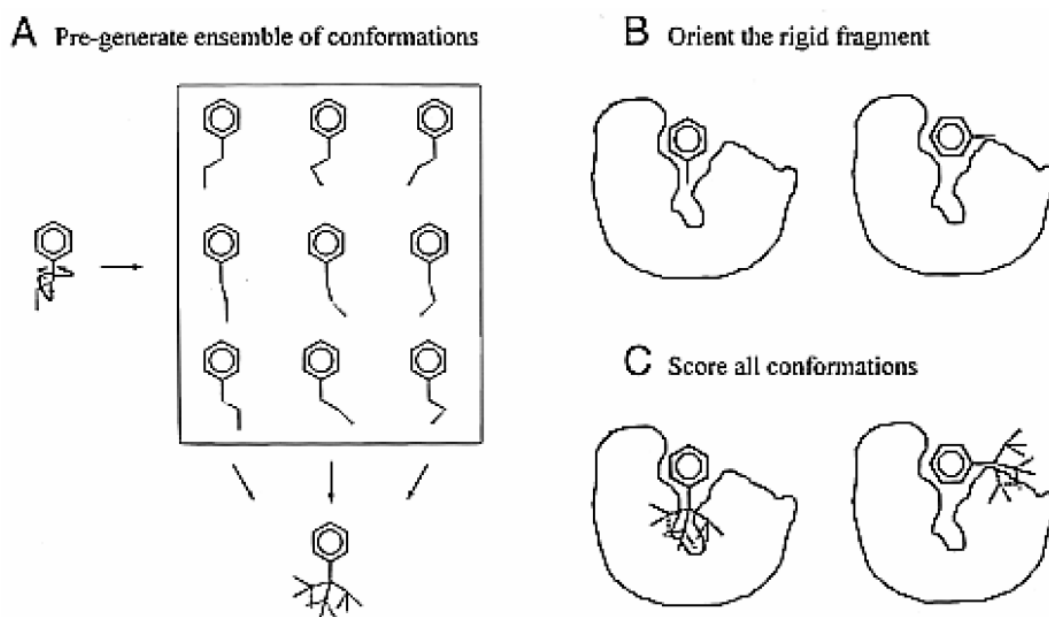
Náročnost této metody je ve flexibilitě interagujících molekul a neznalosti místa interakce. Existuje tedy několik milionů možných uspořádání, které je potřeba prozkoumat. Mezi metody dockování patří vkládání rigidního ligandu do rigidního receptoru, flexibilního ligandu do rigidního receptoru, flexibilního ligandu do flexibilního receptoru či dockování dvou proteinů.(141, 143) U rigidních struktur počítáme s šesti stupni volnosti (3 translační a 3 rotační). Konformační změny zvyšují výpočetní náročnost experimentu a vyžadují tedy jeho zjednodušení. Jedna z možností spočívá ve zmenšení prostoru prohledávání mřížkou. Pro interakce s ligandem je pak předpočítán tzv. grid (obr. 27).(144)



**Obr. 27** Zjednodušení prohledávání pomocí mřížky. Převzato v manuálu pro AutoDock 4.

O ligandu je uvažováno jako o molekule složené z rigidních částí spojených flexibilními můstky a konformační změny jsou prováděny stochastickými nebo systematickými metodami.(145) Systematické algoritmy prohledávají všechny stupně volnosti. Lze je rozdělit na konformační prohledávání, fragmentační metody a databázové metody (obr. 28). Zatímco konformační prohledávání generuje všechny možné kombinace a je tak výpočetně značně náročné, tak fragmentační metody nejprve dokují rigidní fragment ligandu do aktivního místa makromolekuly a následně jsou připojeny flexibilní části. Databázové metody pak dokují do aktivního místa rigidní struktury ligandu získané z databází s definovanými konformačními stavy ligandu.(146)

Stochastické metody prohledávají konformační prostor pomocí náhodných změn stavových proměnných. V současné době je nejvyužívanější metodou genetický algoritmus (GA) a jeho kombinovaná forma s lokálním prohledáváním (LGA – Lamarckian genetic algorithm).(147) GA popisuje konformaci pomocí genu a náhodným křížením genů je prohledáván konformační prostor. Vstupní populace má v chromozomech uloženy informace náhodných konformací a hodnoty jednotlivých proměnných. Nová generace vzniká křížením, mutací a selekcí původních genů za vzniku evolučně dokonalejších jedinců. Kvalita se generačně zvyšuje a k zastavení výpočtu dojde po získání dostatečné kvality řešení. Další stochastickou metodou je MC, která pro přijetí či odmítnutí konformace používá Boltzmannovu pravděpodobnostní funkci.(148)



**Obr. 28** K prohledávání prostoru jsou využity různé konformace, orientace a polohy ligandu.

Pro výpočet volné energie jsou používány skórovací funkce, které ohodnocují konkrétní pozici ligandu na základě zjištěných mezimolekulárních interakcí, jako jsou van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce, solvatační nebo sterické interakce.(149, 150) Volná energie je tak definována změnou enthalpie a entropie. Čím nižší má konformace energii, tím je stabilnější.(151)

Pro molekulový docking existuje velké množství programů volně dostupných či komerčních. Nejvíce používané programy pro docking jsou: AutoDock (152), DOCK (153), GOLD (154), FlexX (155) Vina (125). Spojení s počítačovou grafikou umožňuje vizualizaci intermolekulární interakce mezi ligandem a biomakromolekulou. Programy obsahují grafické rozhraní, případně lze využít k vizualizaci i jiný software jako Pymol, Chimera (156) či VMD.(157)

## 4. Metodická část

### 4.1 Chemikálie a charakteristika připravených sloučenin

Chemikálie a rozpouštědla použité v této práci byly zakoupeny od firmy Aldrich a Merck v kvalitě “čistý”. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách DC-Alufolien Cellulose F. Chromatogramy byly vyvíjeny vzestupným způsobem v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze, nejdříve dvě hodiny po nalití eluční soustavy. Složení mobilní fáze – butanol : kyselina octová : voda – 5 : 1 : 2. K detekci kvartérních látek bylo použito Dragendorfovo činidlo. TLC sloužilo k monitorování průběhu reakce, ověření čistoty nově syntetizovaných látek a ke stanovení retenčního faktoru (Rf).

Spektra NMR byla měřena na přístroji Varian Gemini 300 ( $^1\text{H}$  300 MHz,  $^{13}\text{C}$  75 MHz, Palo Alto CA, USA). Hodnoty chemických posunů jsou uvedeny v jednotkách ppm a jsou vztaženy dimethylsulfoxidu. Hodnoty interakčních konstant  $J$  jsou uvedeny v Hz. Spektra byla zpracována programem Mestrec (Mestrelab Research, verze 4.8.6.0, University of Santiago de Compostela, Španělsko). Signály jsou uvedené jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet). Teploty tání byly měřeny na bloku Boëtius PHMK 05 (VEB Kombinat Nagma, Radebeul, Německo). Jejich hodnoty nebyly korigovány. Elementární analýzy (C, H, N) byly provedeny na přístroji Perkin-Elmer 2400 (PerkinElmer, Waltham, USA).

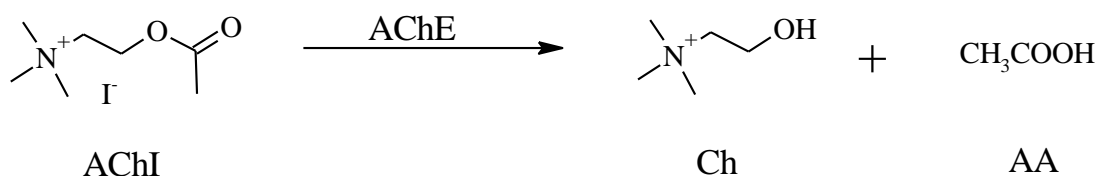
Při přípravě sloučenin byly použity postupy běžně používané v organické syntéze. V případě známých látek se jednalo o reprodukci již popsaných postupů, u látek nových bylo postupováno *per analogiam*.(158) Látky byly charakterizovány obvyklým způsobem, tj. teplotou tání,  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektry.

## 4.2 Princip stanovení aktivity modulátorů cholinesteras

Přesné stanovení aktivity modulátorů cholinesteras je nutné pro popsání vztahu mezi strukturou a účinkem a je základním předpokladem pro návrh nových substancí tohoto typu. Pro kvartérní inhibitory bylo použito titrimetrického stanovení. Pro takrinové deriváty a reaktivátory pak bylo využito fotometrických metod. Hodnoty  $\text{Log}P$ , molekulové hmotnosti a polárního povrchu molekuly byly vypočteny pomocí programu Molinspiration (Bratislava, Slovensko) a CS ChemOffice Ultra ver. 10.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).(159, 160)

### 4.2.1 Titrimetrická stanovení

Afinita syntetizovaných látek k enzymu (AChE) byla testována standardním *in vitro* pokusem.(161) Byl sledován vliv koncentrace testované látky v reakčním médiu na aktivitu AChE. Afinita připravených sloučenin k AChE je reprezentována disociační konstantou komplexu enzym-inhibitor ( $K_{\text{DIS}}$ ). Vyšší hodnota  $K_{\text{DIS}}$  odpovídá úbytku afinity ligandů k enzymu. Enzym AChE štěpí přidaný substrát – acetylcholin-jodid (AChI) za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (AA) (schéma 5).



**Schéma 5** Štěpení substrátu enzymem.

Pomocí titrátoru je udržováno pH reakční směsi na hodnotě 8 dotitrováváním uvolněné kyseliny octové roztokem NaOH. Spotřeba NaOH je úměrná množství kyseliny octové, která vznikla rozkladem AChI enzymem (AChE). Při reakci AChE s inhibitorem se snižuje aktivita enzymu. Je-li aktivita AChE snížena, sníží se i množství kyseliny octové vzniklé při rozkladu AChI a tím i spotřeba roztoku NaOH.

### *Chemikálie*

Jako zdroj enzymu byl použit 10% (w/v) homogenát mozku bílého laboratorního potkana (kmen Wistar). Uspaná zvířata byla usmrcena vykrcením z karotidy a mozek byl vyjmut a opláchnut studeným fyziologickým roztokem. Homogenizace byla provedena v destilované vodě pomocí Ultra-turrax homogenizéru při 20000 ot. / min. po dobu 1 min. 2 ml tohoto homogenátu byly vloženy do zkumavek a byly uchovány při  $-35^{\circ}\text{C}$ . Rozmrazeny byly až těsně před použitím. K měření byly připraveny roztoky 0.01 M NaOH na titraci kyseliny octové, 0.02 M roztok acetylcholin-jodidu (AChI) a 3 M roztok NaCl.

### *Vlastní postup měření*

K 0.200 ml roztoku heteroareniových solí o dané koncentraci (od  $10^{-7}$  do  $10^{-1}$  M) bylo přidáno 19.8 ml vody, 2.5 ml roztoku chloridu sodného a 0.5 ml homogenátu potkaního mozku. Potom byly přidány 2.0 ml roztoku substrátu – AChI. Enzymová aktivita byla zjištěna pomocí automatického titrátoru RTS 822 (Radiometer Copenhagen) složeného z pH metru, automatického titrátoru a zapisovače.

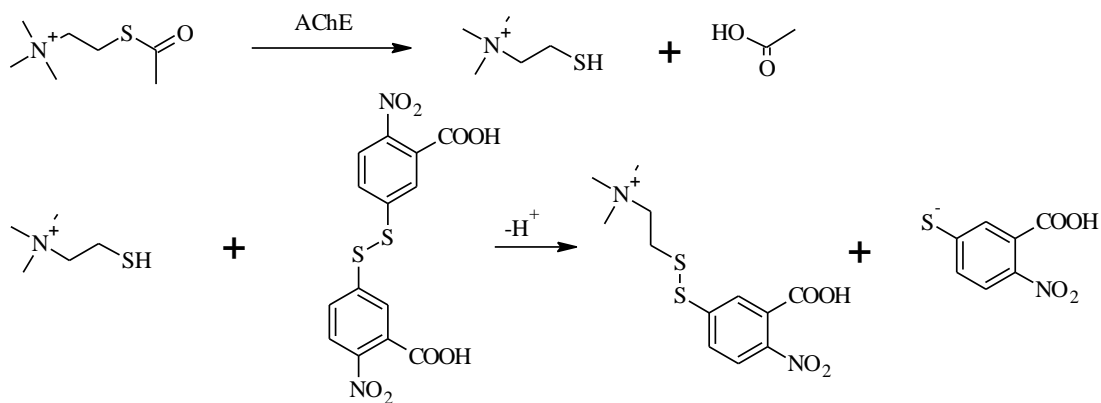
### *Výpočty*

Aktivity intaktního a kvartérní látkou inhibovaného enzymu byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného na čase, která je přímo úměrná titrované kyselině octové uvolněné hydrolyzou acetylcholinu. Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno procento inhibice AChE. Disociační konstanta ( $K_{\text{DIS}}$ ) byla získána nelineární regresi ze závislosti enzymové aktivity na koncentraci heteroareniových solí. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### **4.2.2 Fotometrická stanovení**

Pro stanovení aktivit byla použita Ellmanova metoda, kdy se ke kvantifikaci reakce používají produkty schopné interakce s viditelným světlem. Thiocholin, který je produktem hydrolytického štěpení substrátu, reaguje s 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou) kyselinou (DTNB). Produktem je krom směsného

disulfidu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoový aniont (TNB<sup>-</sup>), který poskytuje žluté zbarvení s absorpčním maximem při 412 nm (schéma 6).(162)



**Schéma 6** Princip fotometrického stanovení.

#### *Chemikálie a vlastní postup měření*

Pro stanovení byla použita lidská rekombinantní AChE a plazmatická BChE. Jako substrátu bylo použito acetylthiocholin-jodidu a bytyrylthiocholin-jodidu. Aktivita připravených modulátorů byla měřena pomocí vícekomorového spektrofotometru Sunrise (Tecan, Salzburg, Rakousko). K připravenému roztoku cholinesterasy bylo v kyvetě přidáno 20  $\mu$ l fosfátového pufru a čerstvě připravený roztok 0.4 mg/ml DTNB. Následně byl přidán testovaný modulátor (100 mM – 1 nM; 5  $\mu$ l) a celá směs byla inkubována 5 minut. Poté byl přidán příslušný thiocholin-chlorid (1 mM) ve fosfátovém pufru (20  $\mu$ l). Směs byla po dalších 5 minutách inkubace protřepána a odečtena absorbance při vlnové délce 412 nm.

#### *Výpočty*

Procento inhibice (I) bylo vypočítáno z naměřených hodnot jako poměr změny absorbance způsobenou aktivitou modulátoru ( $A_i$ ) vůči změně absorbance neinhibovaného enzymu po přidání fosfátového pufru ( $A_0$ ).

$$I = \left( \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0} \right) \times 100$$

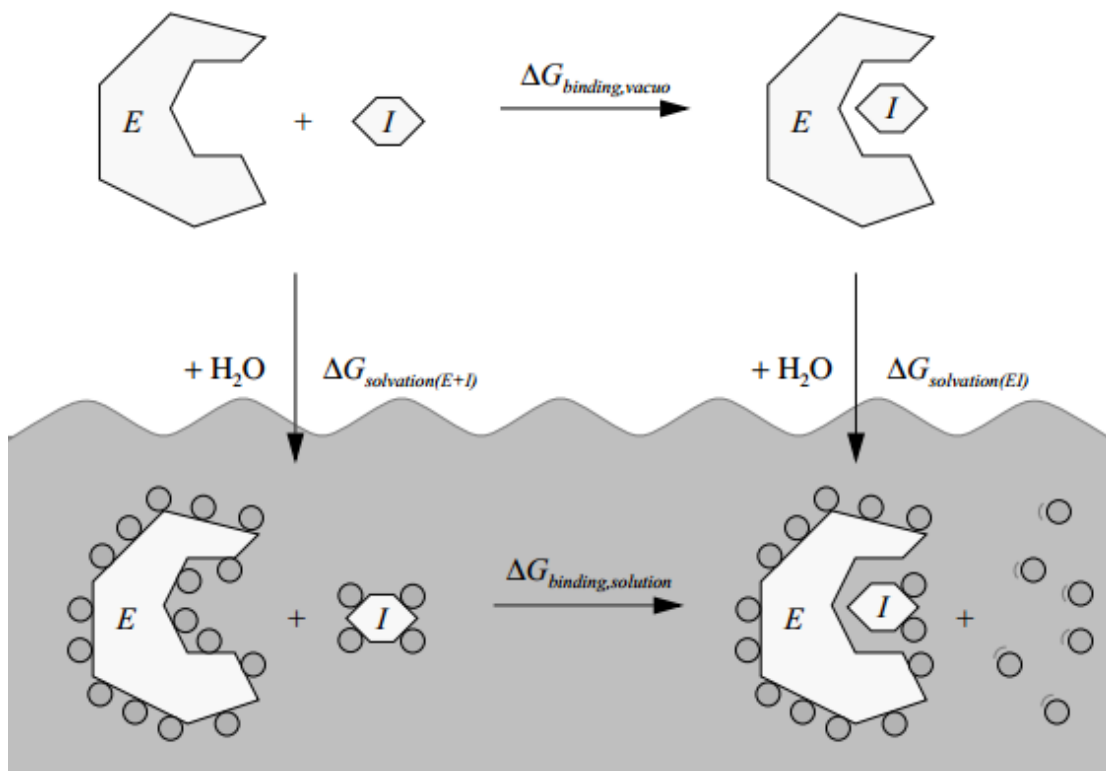
IC<sub>50</sub> byla určena za použití programu Origin 6.1 (Northampton, MA, USA).

### 4.3 Molekulární modelování

Docking je metoda, která predikuje interakce mezi ligandem a studovaným enzymem na základě vstupních dat a definovaných parametrů. Z volně dostupných programů byl pro docking využit AutoDock 3.0.5 a AutoDock 4.2 (MGL, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). (144, 163) Dockingové simulace využívají pro výpočet volné energie semi-empirických metod. Silové pole je definováno na základě velkého množství experimentálně popsanych interakcí ligand-enzym. Pro kvantitativní popis komplexace ligandu s enzymem je rozhodující výpočet Gibbsovy energie, která odpovídá asociaci v roztoku:

$$\Delta G_{\text{binding,solution}} = \Delta G_{\text{binding,vacuo}} + \Delta G_{\text{solvation}(EI)} - \Delta G_{\text{solvation}(E+I)},$$

kde  $\Delta G_{\text{binding,vacuo}}$  je získána z dockingových simulací a změna volné energie po solvataci ligandu, enzymu a jejich komplexu je odhadnuta z experimentálně popsanych interakcí (obr. 29).(164)



Obr. 29 Schéma metody pro výpočet Gibbsovy energie. Převzato z manuálu pro Autodock 3.0.5.



Vlastní proces můžeme rozdělit do několika kroků:

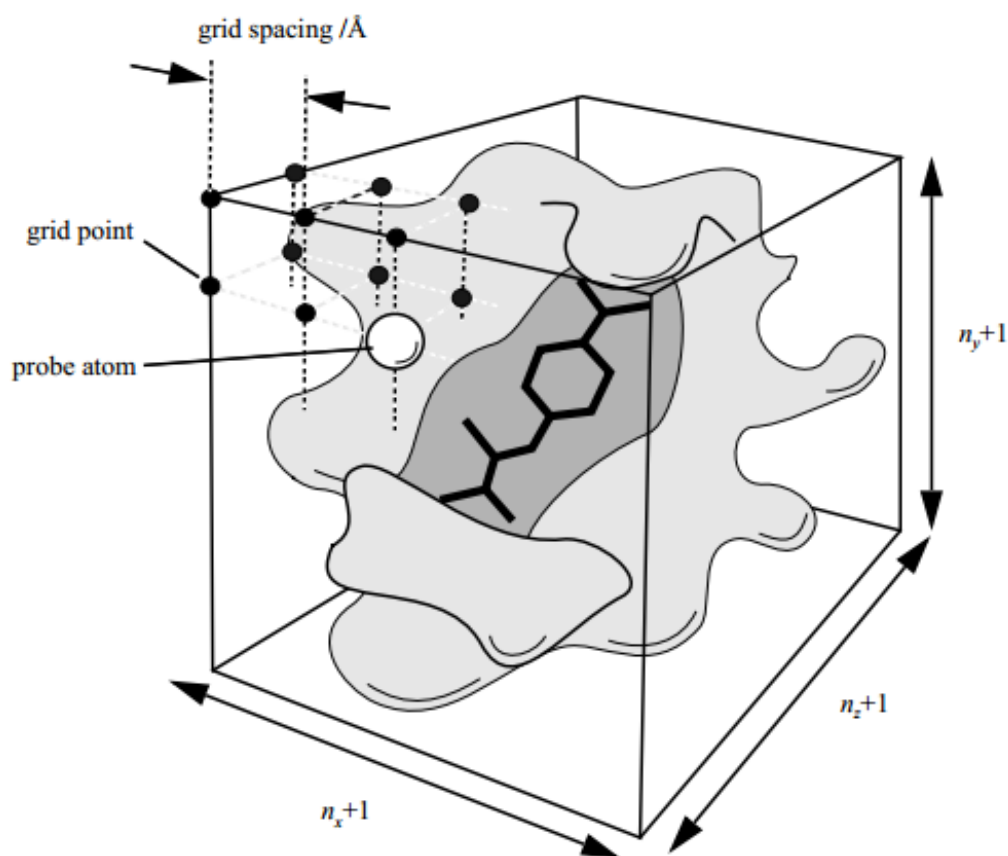
#### *Výběr a příprava enzymu a jeho modulátorů*

Zdrojem enzymu pro docking byla proteinová databáze PDB, které obsahuje více než 170 krystalových struktur AChE a 41 BChE. Krystaly jsou z několika druhů organismů – *Homo sapiens* (hAChE), *Mus musculus* (mAChE), *Torpedo californica* (tcAChE), *Electrophorus electricus* (eAChE). Mohou obsahovat navázané ligandy (takrin, donepezil, HI-6), kovalentně vázané inhibitory (OFI) či být ve volné formě. Dostupné jsou v různém rozlišení, resp. kvalitě. Enzym nebývá kompletní, některé části chybí a je nutné je pomocí softwaru domodelovat, přidat atomy vodíku, vypočítat náboje a strukturu následně minimalizovat. Nepolární vodíky jsou vymazány a jejich náboje sloučeny s příslušnými atomy uhlíku. Výstupní soubor je ve formátu PDBQT. Obsahuje tedy informaci o polárních vodících, atomových typech, parciálních nábojích a atomových koordinátech.

Pro docking byly nejčastěji použity krystalové struktury AChE 2GYU, 2GYV, 1N5M, 1ACJ a 2JEZ. (22, 165-167) Pro BChE pak 3DJY, 1P0I, 1P0M a 2PM8. (27, 167, 168) Jednotlivé ligandy byly připraveny v programu ChemOffice, kde byly i optimalizovány Hartree-Fockovou metodou s bází 6-31G\*. Pro výpočet nábojů pro jednotlivé atomy ligandu byl použit modul antechamber ze skupiny programů Amber (AMBER Software, University of California, San Francisco, USA). (169) Mezi testované modulátory byly zařazeny sloučeniny připravené v rámci této práce, která navazuje na práci diplomovou. Dále sloučeniny připravené na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Karlovy Univerzity a Katedře toxikologie Univerzity obrany. (170-175)

#### *Výpočet mřížky*

Rychlé hodnocení energie systému je ulehčeno předpočítáním potenciální energie pro každý bod předem definované mřížky (obr. 30). Mřížka je počítána pro definované atomové typy. Nastavení vzdálenosti mezi jednotlivými body se pohybuje mezi 0.2 a 1 Å a počet bodů se volí tak aby mřížka obsáhla všechna možná vazebná místa pro ligand. (176)



**Obr. 30** Grid pro zjednodušení výpočtu. Převzato z manuálu pro Autodock 3.0.5.

Pro výpočty byla zvolena mřížka zahrnující celou kavitu o rozměrech  $90 \times 90 \times 90$  bodů a vzdálenosti mezi body  $0.2\text{--}0.375$  Å pro různé typy výpočtů.

#### *Nastavení parametrů výpočtu*

Ideálně nastavený proces nalezne globální minimum interakční energie mezi ligandem a proteinem prohledáním všech stupňů volnosti daného systému. Ke konfiguračnímu prohledávání prostoru bylo použito metod LGA (Lamarckian Genetic Algorithm) a metody simulovaného žíhání (SA). Výpočet byl nastaven na 100–200 sérií, velikost populace 50–200, mutace 0.02, křížení 0.8 a RMSD 1.5 Å. Ostatní parametry byly ponechány na přednastavených hodnotách. AutoDock potřebuje tedy pro výpočet gridovou mapu, PDBQT soubor s ligandem a definované parametry výpočtu.

AutoDock 4 nabízí možnost volby flexibilních částí enzymu. Flexibilita je ve výpočtech omezena na rotamery aminokyselin v místě předpokládané vazby

ligandu. Vyšší počet zvolených flexibilních vazeb rozšiřuje prohledávaný konformační prostor a zvyšuje nároky na výpočetní techniku.

#### *Hodnocení výsledků*

Ligand nabízí různé stupně volnosti – posun, rotace, flexibilita vazeb. Pro každý krok je spočítána energie, která je porovnána s předcházející konfigurací. Hodnoty nejvýhodnějších pozic jsou zaznamenány a nejbližší pozice jsou uloženy podle předem definovaných parametrů do klastrů. Klastry s nejvyšším počtem členů a zároveň s vyšším energetickým ohodnocením by měly popisovat interakci věrněji než klastry s nižším počtem členů, avšak s nejvyšší energií. K analýze byl z každého klastru vybrán zástupce s nejlepším skóre.

K analýze výsledků lze použít program AutoDockTools, který obsahuje nástroje pro hodnocení klastrů, konformačních podobností a vizualizaci konformací a vazebných interakcí systému. Další programy použité pro hodnocení výsledků byly VMD a Chimera. Výsledky experimentů byly srovnávány s experimentálními daty z *in vitro* pokusů a literatury.

## 5. Experimentální část

### 5.1 Syntéza inhibitorů cholinesteras

#### 5.1.1 Příprava monokvartérních inhibitorů

Všechny monokvartérní deriváty byly připraveny dle uvedeného schématu 7. Substituovaný pyridin byl rozpuštěn v acetonu a následně přidán nadbytek methyljodidu. Směs byla nechána za stálého míchání pod refluxem. Produkt byl po vychladnutí vysrážen etherem, vyloučené krystaly byly odfiltrovány a překrystalizovány z *n*-butanolu.

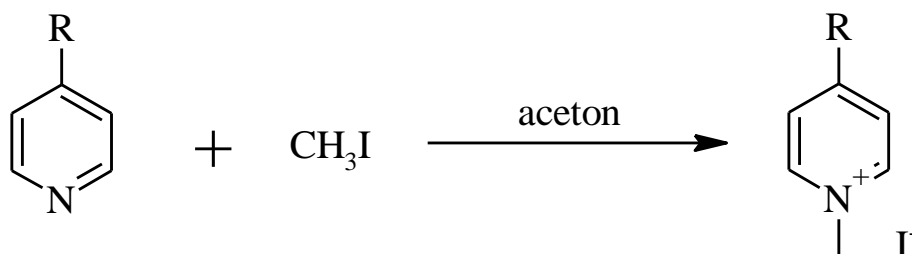
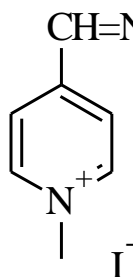


Schéma 7 Příprava monokvartérních derivátů pyridinu.

#### 4-[(hydroximino)methyl]-1-methylpyridinium-jodid (K024)



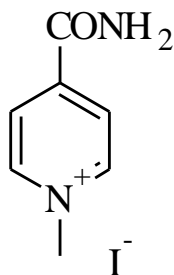
Výtěžek 45 %.

T. t. 179–180 °C.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.15 (d, 2H, *J* = 6.0, ArH), 8.65 (s, 1H, NOH), 8.39 (d, 2H, *J* = 6.0, ArH), 8.26 (s, 1H, Ar-CH), 4.39 (s, 3H, N<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 163.32, 147.73, 146.42, 125.31, 48.00.

#### 4-karbamoyl-1-methylpyridinium-jodid (K025)



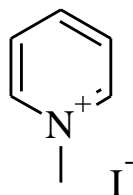
Výtěžek 68 %.

T. t. 269–270 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.07 (d,  $J = 6.00$  Hz, 2H, ArH), 8.43 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 8.23 (d,  $J = 6.00$  Hz, 2H, ArH); 4.60 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  163.32, 147.71, 146.42, 125.31, 48.03.

#### 1-methylpyridinium-jodid (K001)



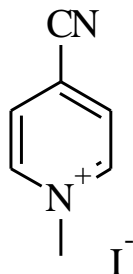
Výtěžek 71 %.

T. t. 117–118 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.98 (d,  $J = 5.57$  Hz, 2H, ArH), 8.57 (t,  $J = 7.82$  Hz, 1H, ArH), 8.12 (t,  $J = 7.09$  Hz, 2H, ArH), 4.34 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  146.25, 145.75, 128.37, 48.67.

#### 4-kyano-1-methylpyridinium-jodid (K143)



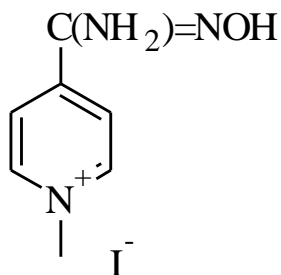
Výtěžek 48 %.

T. t. 198 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.26 (d,  $J = 6.62$  Hz, 2H, ArH), 8.67 (d,  $J = 6.33$  Hz, 2H, ArH), 4.40 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  146.88, 130.38, 114.73, 48.91.

#### 4-(*N'*-hydroxykarbamimidoyl)-1-methylpyridinium-jodid (K144)



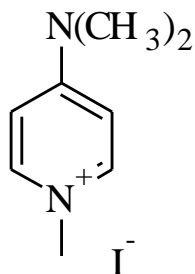
Výtěžek 67 %.

T. t. 197 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.90 (s, 1H, NOH), 8.93 (d,  $J = 6.84$  Hz, 2H, ArH), 8.26 (d,  $J = 6.93$  Hz, 2H, ArH), 6.41 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.30 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  147.36, 146.94, 145.26, 122.33, 47.34.

#### 4-(dimethylamino)-1-methylpyridinium-jodid (K146)



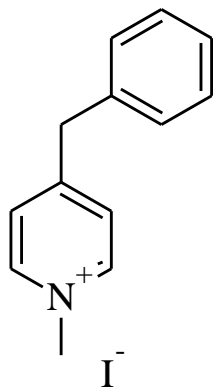
Výtěžek 98 %.

T. t. 248 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.22–8.18 (m, 2H, ArH), 7.03–6.99 (m, 2H, ArH), 3.89 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ), 3.16 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  146.28, 142.76, 107.39, 43.92.

#### 4-benzyl-1-methylpyridinium-jodid (K020)



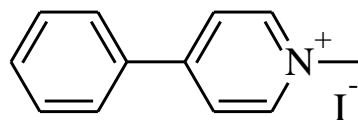
Výtěžek 56 %.

T. t. 181 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.19 (d,  $J = 6.57$  Hz, 2H, ArH), 8.34 (d,  $J = 6.45$  Hz, 2H, ArH), 7.63 (t,  $J = 7.82$  Hz, 2H, ArH), 7.85–7.81 (m, 2H, ArH), 7.79 (m, 1H, ArH), 4.44 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ), 3.33 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  151.19, 146.40, 134.75, 134.11, 130.16, 129.03, 127.23, 126.39, 48.11.

#### 4-fenyl-1-methylpyridinium-jodid (K017)



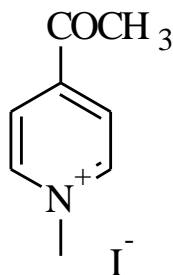
Výtěžek 81 %

T. t. 169 °C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.00 (d,  $J = 7.06$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 7.06$  Hz, 2H, ArH), 8.09–8.04 (m, 2H, ArH), 7.66 (t,  $J = 2.09$  Hz, 2H, ArH), 7.64 (d,  $J = 1.80$  Hz, 1H, ArH), 4.32 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  154.22, 145.55, 133.50, 132.02, 129.65, 128.00, 124.05, 47.03.

**4-acetyl-1-methylpyridinium-jodid (K147)**



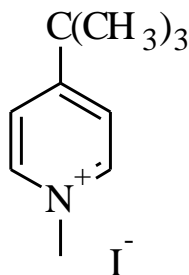
Výtěžek 66 %.

T. t. 179 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.17 (d,  $J$  = 6.61 Hz, 2H, ArH), 8.46 (d,  $J$  = 6.71 Hz, 2H, ArH), 4.40 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ), 2.73 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  195.63, 147.95, 146.96, 125.42, 48.15, 27.41.

**4-*tert*-butyl-1-methylpyridinium-jodid (K016)**



Výtěžek 80 %.

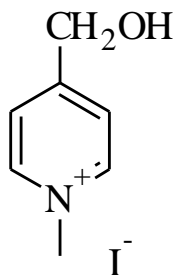
T. t. 123–124 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.87 (d,  $J$  = 7.08 Hz, 2H, ArH), 8.14 (d,  $J$  = 7.01 Hz, 2H, ArH), 4.28 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ), 1.33 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  169.26, 144.84, 124.57, 46.92, 36.10, 29.47.



#### 4-hydroxymethyl-1-methylpyridinium-jodid (K148)



Výtěžek 82 %.

T. t. 130 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 9.01 (d,  $J = 6.61$  Hz, 2H, ArH), 8.42 (d,  $J = 6.71$  Hz, 2H, ArH), 4.81 (s, 2H), 4.48 (s, 3H,  $\text{N}^+\text{-CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 162.01, 144.76, 123.85, 61.06, 47.24.

#### 5.1.2 Příprava biskvartérních inhibitorů

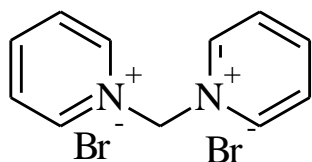
##### Pyridinové deriváty

Příprava pyridinových derivátů probíhala dle schématu 8. Pyridin byl rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) a přidán příslušný dibromid. Reakce probíhaly za stálého míchání pod refluxem několik hodin. Produkt byl vysrážen etherem, vzniklé krystaly byly odfiltrovány a překrystalizovány v acetonitrilu.



Schéma 8 Příprava pyridinových derivátů.

#### 1,1'-methandiylpyridinium-dibromid (K210)



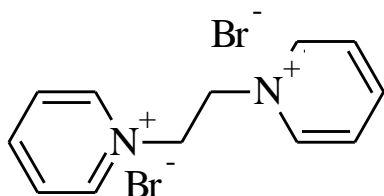
Výtěžek 34 %.

T. t. 270–272 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.64 (d,  $J = 5.58$  Hz, 4H, ArH), 8.80 (t,  $J = 7.82$  Hz, 2H, ArH), 8.40–8.27 (m, 4H, ArH), 7.45 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  148.89, 146.03, 128.80, 76.32.

### 1,1'-ethan-1,2-diylpyridinium-dibromide (K211)



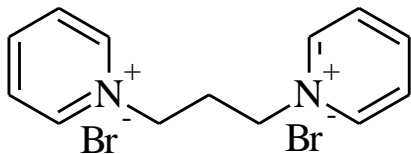
Výtěžek 38 %.

T. t. 302–303 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.12 (d,  $J = 5.78$  Hz, 4H, ArH), 8.68 (t,  $J = 7.82$  Hz, 2H, ArH), 8.21 (t,  $J = 6.74$  Hz, 4H, ArH), 5.32 (s, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  146.82, 145.53, 128.58, 59.54.

### 1,1'-propan-1,3-diylpyridinium-dibromid (K212)



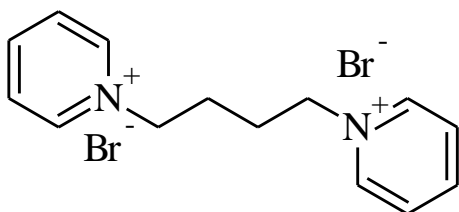
Výtěžek 71 %.

T. t. 245–247 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.98 (d,  $J = 5.64$  Hz, 4H, ArH), 8.46 (t,  $J = 7.81$  Hz, 2H, ArH), 8.02 (dd,  $J = 7.69, 6.70$  Hz, 4H, ArH), 4.58 (t,  $J = 7.40$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.49 (m, 2H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  146.05, 145.19, 128.40, 57.65, 31.98.

### 1,1'-butan-1,4-diylpyridinium-dibromid (K213)



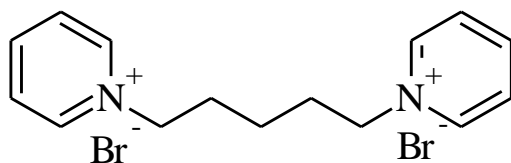
Výtěžek 64 %.

T. t. 244–246 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.16 (d,  $J = 5.54$  Hz, 4H, ArH), 8.62 (t,  $J = 7.81$  Hz, 2H, ArH) 8.17 (dd,  $J = 7.68, 6.74$  Hz, 4H, ArH), 4.71 (t,  $J = 5.71$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 1.96 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.82, 145.19, 128.34, 59.93, 27.37.

### 1,1'-pentan-1,5-diylidipyridinium-dibromid (K214)



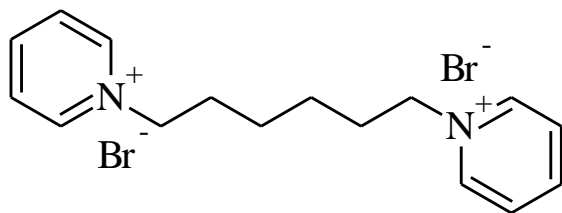
Výtěžek 17 %.

T. t. 198–199 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.17 (d,  $J = 5.72$  Hz, 4H, ArH), 8.62 (t,  $J = 7.76$  Hz, 2H, ArH), 8.26–8.12 (m, 4H, ArH), 4.64 (t,  $J = 7.39$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.06–1.90 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.29 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.74, 145.00, 128.28, 60.33, 30.12, 21.98.

### 1,1'-hexan-1,6-diylidipyridinium-dibromid (K215)



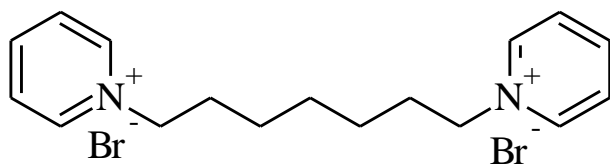
Výtěžek 54 %.

T. t. 244–246 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  9.18 (s, 4H, ArH), 8.61 (t,  $J = 6.84$  Hz, 2H, ArH), 8.17 (t,  $J = 6.18$  Hz, 4H, ArH), 4.63 (t,  $J = 6.48$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 1.91 (s, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.31 (s, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.69, 144.95, 128.24, 60.61, 30.55, 24.88.

### 1,1'-heptane-1,7-diylidipyridinium-dibromid (K341)



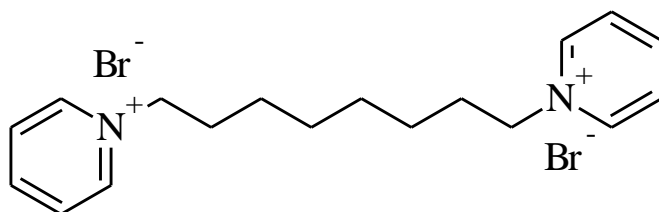
Výtěžek 24 %.

T. t. neměřena (amorfní).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.85 (d,  $J = 5.59$  Hz, 4H, ArH), 8.54 (t,  $J = 7.87$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.06$  Hz, 4H, ArH), 4.61 (t,  $J = 7.35$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.09-1.93 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.34 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.65, 144.91, 128.21, 60.95, 30.64, 27.21, 22.96.

### 1,1'-oktan-1,8-diylidipyridinium-dibromid (K342)



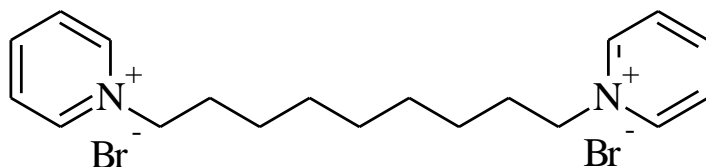
Výtěžek 47 %.

T. t. 195–196 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.84 (d,  $J = 5.91$  Hz, 4H, ArH), 8.59–8.50 (m, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.01$  Hz, 4H, ArH), 4.60 (t,  $J = 7.30$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.01 (t,  $J = 6.71$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.33 (s, 8H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.60, 144.89, 128.18, 60.31, 28.61, 27.35, 24.97.

### 1,1'-nonan-1,9-diylidipyridinium-dibromid (K343)



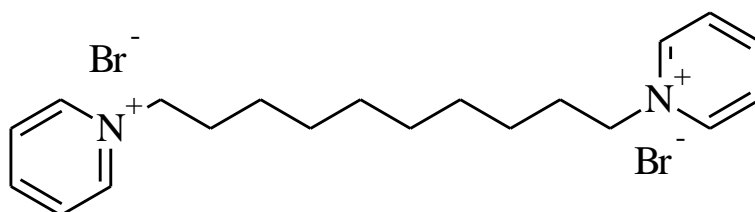
Výtěžek 63 %.

T. t. neměřena (amorfní).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.85 (d,  $J = 5.58$  Hz, 4H, ArH), 8.54 (t,  $J = 7.86$  Hz, 2H, ArH), 8.06 (t,  $J = 7.12$  Hz, 4H, ArH), 4.60 (t,  $J = 7.33$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.00 (t,  $J = 6.93$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.31 (s, 10H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.56, 144.86, 128.16, 60.32, 28.70, 27.76, 27.64, 24.98.

### 1,1'-dekan-1,10-diyldipyridinium-dibromid (K344)



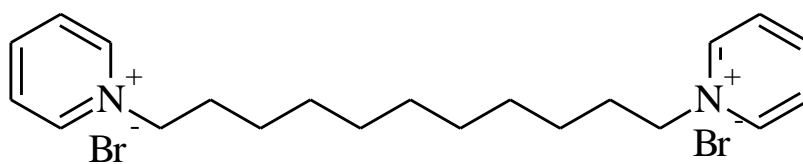
Výtěžek 60 %.

T. t. 196–198 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.85 (d,  $J = 5.79$  Hz, 4H, ArH), 8.53 (d,  $J = 7.87$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.02$  Hz, 4H, ArH), 4.61 (t,  $J = 7.30$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.01 (t,  $J = 6.70$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.28 (s, 12H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.48, 144.82, 128.11, 60.35, 28.71, 27.77, 27.65, 24.97.

### 1,1'-undekan-1,11-diyldipyridinium-dibromide (K345)



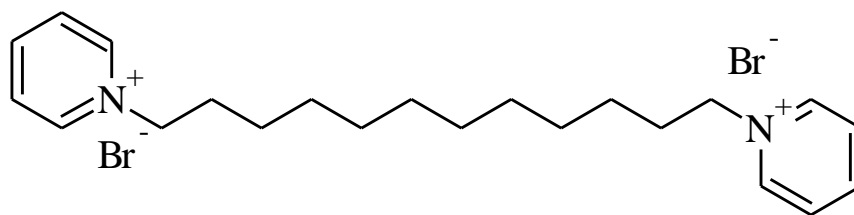
Výtěžek 76 %.

T. t. neměřena (amorfní).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.75 (d,  $J = 5.52$  Hz, 4H, ArH), 8.44 (t,  $J = 7.87$  Hz, 2H, ArH), 7.97 (t,  $J = 7.13$  Hz, 4H, ArH), 4.51 (t,  $J = 7.34$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 1.91 (dd,  $J = 9.67, 4.39$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.18 (s, 14H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.44, 144.79, 128.09, 60.35, 28.73, 27.87, 27.83, 27.59, 25.03.

### 1,1'-dodekan-1,12-diyldipyridinium-dibromid (K346)



Výtěžek 82 %.

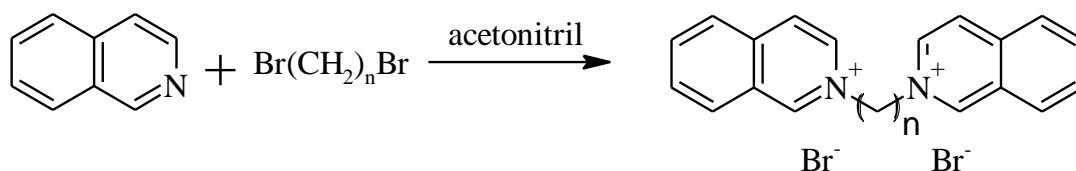
T. t. 140–141 °C.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  8.97–8.80 (m, 4H, ArH), 8.53 (d,  $J = 7.86$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.10$  Hz, 4H, ArH), 4.61 (t,  $J = 7.29$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.27 (d,  $J = 24.44$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.02 (s, 16H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  145.42, 144.77, 128.08, 60.45, 29.03, 28.86, 28.52, 28.48, 25.46.

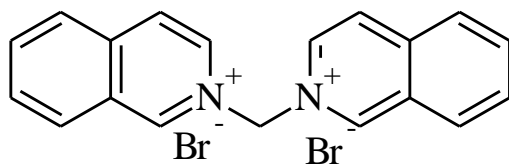
#### *Isochinolinové deriváty*

Příprava isochinolinových derivátů probíhala dle schématu 9. Isochinolin byl rozpuštěn v acetonitrilu a přidán příslušný dibromid. Reakce probíhaly za stálého míchání pod refluxem několik hodin. Produkt byl vysrážen etherem, vzniklé krystaly byly odfiltrovány a překrystalizovány v acetonitrilu.



**Schéma 9** Příprava biskvartérních isochinolinů.

### 2,2'-methandiidiisochinolinium-dibromid (K291)



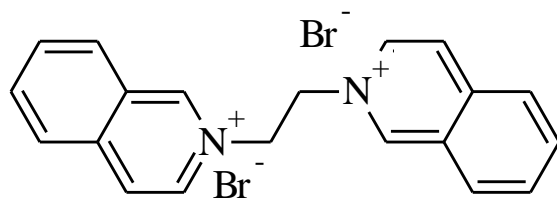
Výtěžek 15 %.

T. t. 257–258 °C.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 10.88 (s, 2H, ArH), 9.32 (d, *J* = 6.82 Hz, 2H, ArH), 8.81 (d, *J* = 6.81 Hz, 2H, ArH), 8.61 (d, *J* = 8.22 Hz, 2H, ArH), 8.55 (d, *J* = 8.21 Hz, 2H, ArH), 8.32 (m, 2H, ArH), 8.03 (m, 2H, ArH), 6.01 (s, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 150.00, 136.83, 136.73, 134.82, 131.05, 130.21, 127.12, 127.09, 125.68, 78.43.

### 2,2'-ethane-1,2-diydiisochinolinium-dibromid (K292)



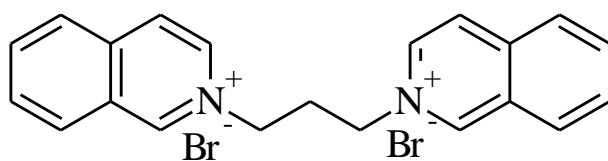
Výtěžek 21 %.

T. t. 282–283 °C.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 10.29 (s, 2H, ArH), 8.93 (d, *J* = 6.81 Hz, 2H, ArH), 8.69 (d, *J* = 6.79 Hz, 2H, ArH), 8.47 (d, *J* = 8.23 Hz, 2H, ArH), 8.29 (d, *J* = 7.60 Hz, 2H, ArH), (t, *J* = Hz, 2H), 8.05 (t, *J* = 7.60 Hz, 2H, ArH), 5.22 (s, 4H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 149.97, 136.81, 136.71, 134.80, 131.01, 130.20, 127.11, 127.10, 125.67, 61.43.

### 2,2'-propane-1,3-diydiisochinolinium-dibromid (K293)

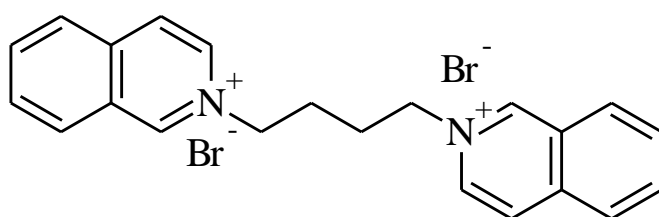


Výtěžek 58 %.

T. t. 244–246 °C.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.28 (s, 2H, ArH), 8.91 (d,  $J = 6.81$  Hz, 2H, ArH), 8.64 (d,  $J = 6.78$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.23$  Hz, 2H, ArH), 8.26 (t,  $J = 7.59$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.60$  Hz, 2H, ArH), 4.96 (d,  $J = 7.13$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.91 (d,  $J = 7.13$  Hz, 2H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ).  
 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO  $d_6$ ):  $\delta$  149.98, 136.81, 136.70, 134.79, 131.03, 130.19, 127.13, 127.11, 125.69, 61.30, 34.85.

### 2,2'-butan-1,4-diyldiisochinolinium-dibromid (K294)

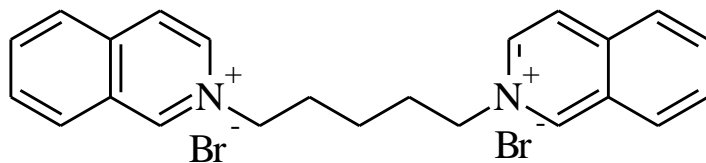


Výtěžek 1.11 g (60 %).

T. t. 263 °C.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.25 (s, 2H, ArH), 8.86 (dd,  $J = 6.78, 0.97$  Hz, 2H, ArH), 8.62 (d,  $J = 6.80$  Hz, 2H, ArH), 8.49 (d,  $J = 8.25$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.19$  Hz, 2H, ArH), 8.29–8.21 (m, 2H, ArH), 8.10–8.03 (m, 2H, ArH), 4.84 (s, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ) 2.14 (s, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ).  
 $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.93, 136.83, 136.71, 134.80, 131.05, 130.20, 127.14, 127.09, 125.71, 61.31, 34.89.

### 2,2'-pentan-1,5-diyldiisochinolinium-dibromid (K295)



Výtěžek 16 %.

T. t. 207–209 °C.

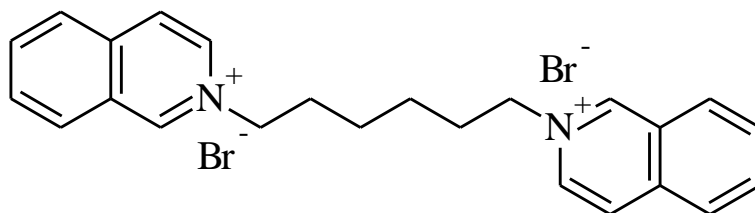
$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.29 (s, 2H, ArH), 8.89 (d,  $J = 6.79$  Hz, 2H, ArH), 8.61 (d,  $J = 6.80$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2H, ArH), 8.35 (d,  $J = 8.22$  Hz, 2H, ArH), 8.25 (dd,  $J = 8.03, 7.12$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.59$  Hz,



2H, ArH), 4.78 (t,  $J = 7.24$  Hz, 4H,  $N^+-CH_2$ ), 2.19–2.07 (m, 4H,  $N^+-CH_2-CH_2$ ), 1.39 (td,  $J = 7.13$  Hz, 2H,  $N^+-CH_2-CH_2-CH_2$ ).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.97, 136.92, 136.75, 134.85, 131.10, 130.25, 127.14, 127.13, 125.75, 60.32, 34.92, 31.90.

### 2,2'-hexan-1,6-diyl-diisochinolinium-dibromid (K296)



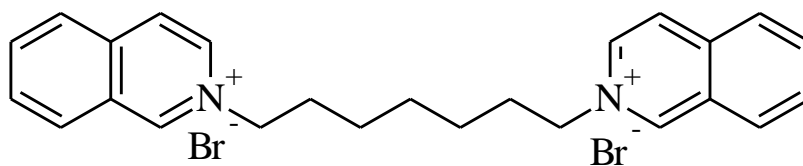
Výtěžek 40 %.

T. t. 233–235 °C.

$^1H$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.26 (s, 2H, ArH), 8.87 (dd,  $J = 6.79, 1.07$  Hz, 2H, ArH), 8.61 (d,  $J = 6.79$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.22$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.23$  Hz, 2H, ArH), 8.29–8.21 (m, 2H, ArH), 8.07 (dd,  $J = 11.19, 4.03$  Hz, 2H, ArH), 4.76 (t,  $J = 7.35$  Hz, 4H,  $N^+-CH_2$ ), 2.11–1.97 (m, 4H,  $N^+-CH_2-CH_2$ ), 1.40 (s, 4H,  $N^+-CH_2-CH_2-CH_2$ ).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.89, 136.81, 136.69, 134.81, 131.04, 130.20, 127.13, 127.09, 125.71, 60.49, 34.91, 31.91.

### 2,2'-heptan-1,7-diyl-diisochinolinium-dibromid (K297)



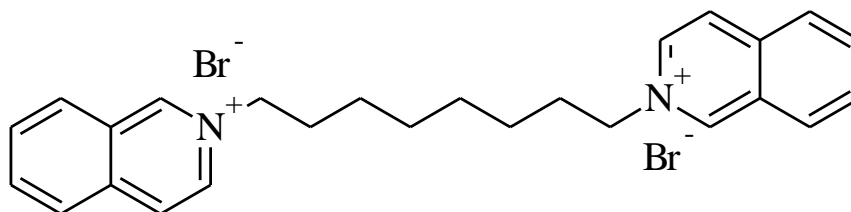
Výtěžek 26 %.

T. t. 205–207 °C.

$^1H$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.26 (s, 2H, ArH), 8.87 (d,  $J = 6.78$  Hz, 2H, ArH), 8.61 (d,  $J = 6.78$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.18$  Hz, 2H), 8.28–8.21 (m, 2H, ArH), 8.07 (dd,  $J = 11.22, 3.97$  Hz, 2H, ArH), 4.74 (t,  $J = 7.31$  Hz, 4H,  $N^+-CH_2$ ), 2.03 (dd,  $J = 12.61, 6.07$  Hz, 4H,  $N^+-CH_2-CH_2$ ), 1.34 (m, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  150.31, 137.17, 136.99, 134.33, 131.22, 131.20, 127.77, 127.00, 126.21, 61.21, 33.90, 32.35, 31.67.

**2,2'-oktan-1,8-diyl-diisochinolinium-dibromid (K298)**



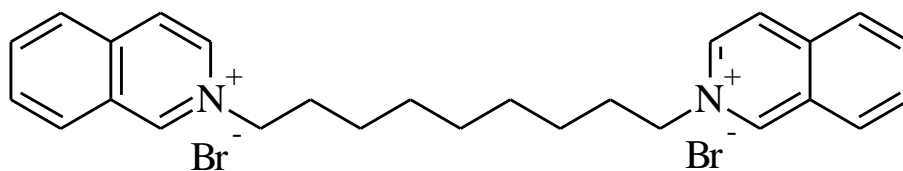
Výtěžek 53 %.

T. t. 221–223°C.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.23 (s, 2H, ArH), 8.86 (d,  $J = 6.80$  Hz, 2H, ArH), 8.61 (d,  $J = 6.79$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.28$  Hz, 2H, ArH), 8.25 (dd,  $J = 8.03, 7.18$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.61$  Hz, 2H, ArH), 4.73 (t,  $J = 7.37$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.04 (dd,  $J = 7.95, 7.32$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.31 (m, 8H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.83, 136.81, 136.72, 134.81, 131.04, 130.21, 127.15, 127.09, 125.71, 60.55, 35.09, 32.00, 30.31.

**2,2'-nonan-1,9-diyl-diisochinolinium-dibromid (K299)**



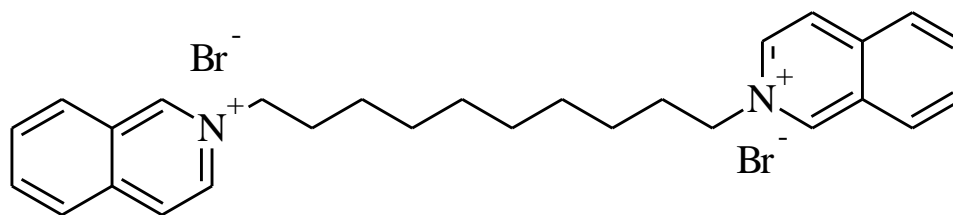
Výtěžek 30 %.

T. t. 160–162 °C.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.23 (s, 2H, ArH), 8.86 (d,  $J = 6.73$  Hz, 2H, ArH), 8.61 (d,  $J = 6.77$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.23$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.21$  Hz, 2H, ArH), 8.25 (t,  $J = 7.57$  Hz, 2H, ArH), 8.07 (t,  $J = 7.59$  Hz, 2H, ArH), 4.73 (t,  $J = 7.33$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.00 (s, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.29 (m, 10H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.82, 136.77, 136.66, 134.81, 131.03, 130.21, 127.13, 127.11, 125.71, 60.57, 35.09, 32.03, 30.31, 28.44.

**2,2'-dekan-1,10-diyldiisochinolinium-dibromid (K300)**



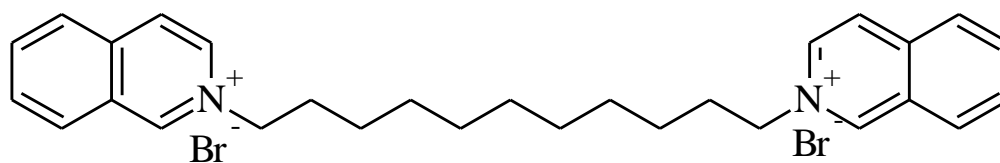
Výtěžek 45 %.

T. t. 221–224 °C.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 10.22 (s, 2H, ArH), 8.86 (dd, *J* = 6.79, 1.10 Hz, 2H, ArH), 8.62 (d, *J* = 6.80 Hz, 2H, ArH), 8.50 (d, *J* = 8.22 Hz, 2H, ArH), 8.36 (d, *J* = 8.20 Hz, 2H, ArH), 8.29–8.21 (m, 2H, ArH), 8.11–8.03 (m, 2H, ArH), 4.73 (t, *J* = 7.37 Hz, 4H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 2.00 (s, 4H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.26 (m, 12H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 149.61, 138.17, 137.69, 134.63, 132.01, 130.63, 128.31, 127.88, 127.07, 62.33, 36.00, 32.65, 28.80, 28.75.

**2,2'-undekan-1,11-diyldiisochinolinium-dibromid (K301)**



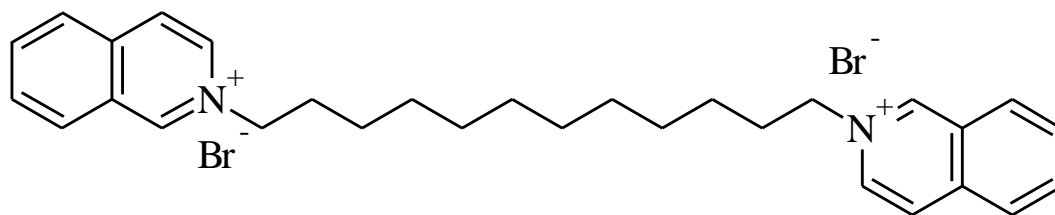
Výtěžek 51 %.

T. t. 180–182 °C.

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, DMSO): δ 10.22 (s, 2H, ArH), 8.86 (dd, *J* = 6.80, 1.12 Hz, 2H, ArH), 8.62 (d, *J* = 6.81 Hz, 2H, ArH), 8.50 (d, *J* = 8.18 Hz, 2H, ArH), 8.36 (d, *J* = 8.22 Hz, 2H, ArH), 8.30–8.21 (m, 2H, ArH), 8.11–8.03 (m, 2H, ArH), 4.73 (t, *J* = 7.37 Hz, 4H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>), 2.01 (dd, *J* = 9.23, 3.43 Hz, 4H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.25 (m, 14H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ 150.37, 137.19, 136.96, 134.24, 131.25, 131.20, 127.73, 126.95, 126.17, 61.45, 34.13, 32.66, 31.84, 29.25, 29.19.

**2,2'-dodekan-1,12-diyldiisochinolinium-dibromid (K302)**



Výtěžek 52 %.

T. t. 225–227 °C.

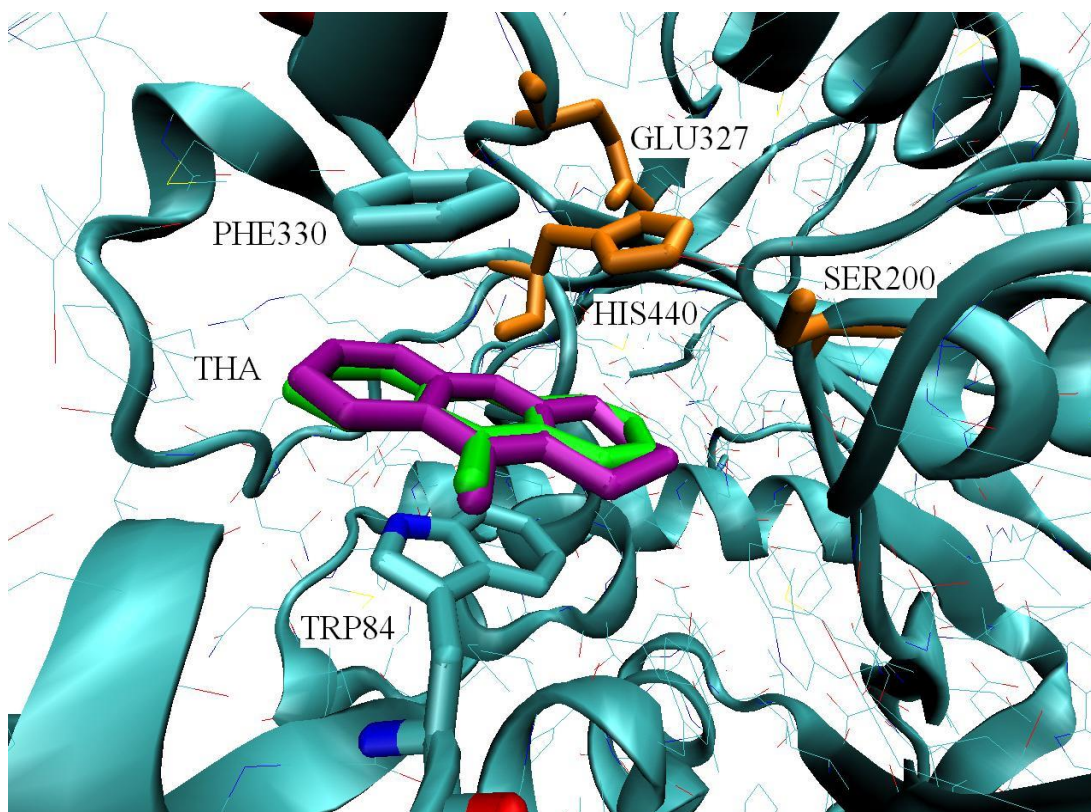
$^1\text{H}$  NMR spektrum (300 MHz, DMSO):  $\delta$  10.22 (s, 2H, ArH), 8.86 (dd,  $J = 6.79, 1.05$  Hz, 2H, ArH), 8.62 (d,  $J = 6.80$  Hz, 2H, ArH), 8.50 (d,  $J = 8.24$  Hz, 2H, ArH), 8.36 (d,  $J = 8.22$  Hz, 2H, ArH), 8.29–8.22 (m, 2H, ArH), 8.07 (dd,  $J = 11.19, 4.03$  Hz, 2H, ArH), 4.73 (t,  $J = 7.37$  Hz, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2$ ), 2.07–1.95 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.24 (m, 16H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  149.82, 136.77, 136.68, 134.80, 131.04, 130.21, 127.11, 127.08, 125.70, 60.61, 35.08, 32.07, 30.30, 28.69, 28.59.

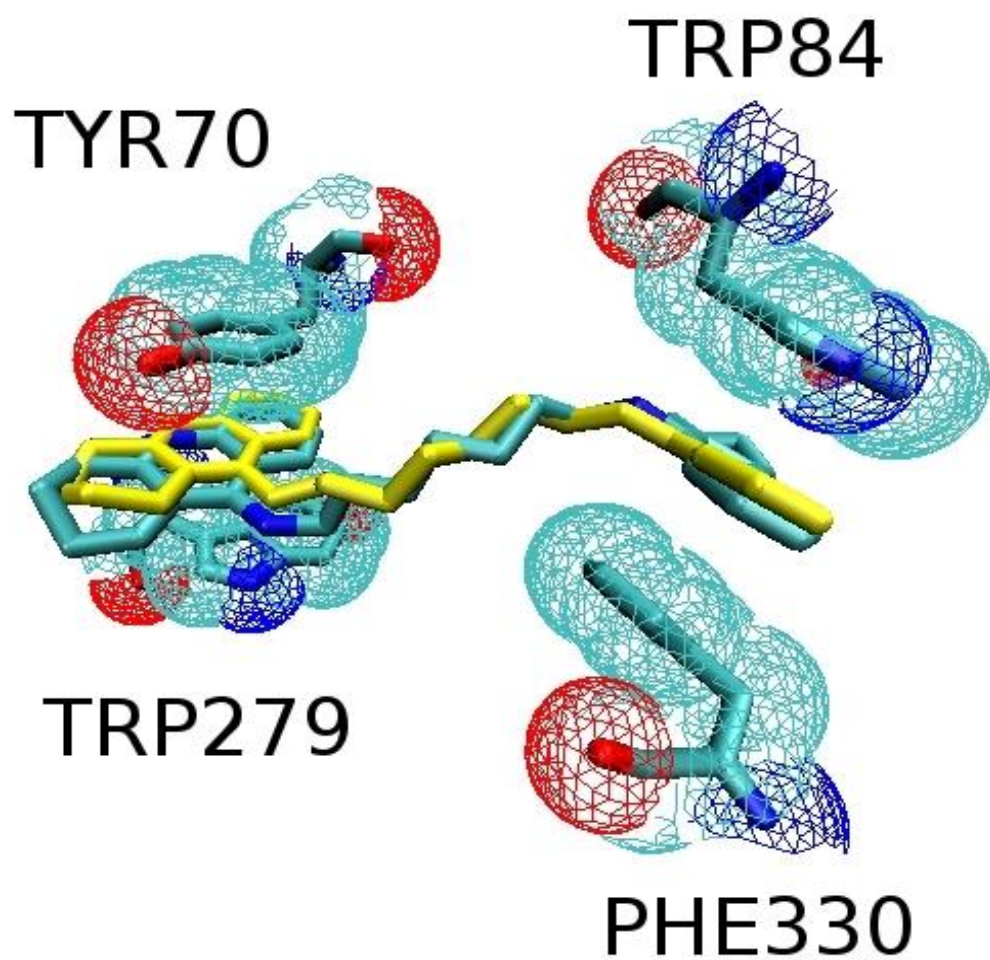
## 5.2 Molekulární modelování a biologické hodnocení modulátorů cholinesteras

### 5.2.1 Redocking

Redocking slouží k ověření metodiky nastavené pro *in silico* studium interakcí modulátor-enzym. Z PDB databáze je vybrána krystalová struktura s navázaným ligandem. V našem případě jde o struktury s takrinem (1ACJ) a biskvartérním bis-7-takrinem (2CKM).(177) Enzym je připraven pro simulace dle výše uvedeného postupu (str. 57). Totožný ligand je připraven pro docking pomocí ChemOffice. Výsledkem správně nastavené metodiky by měla být významná shoda mezi rentgenovou strukturou a nejlépe energeticky ohodnoceným konformerem nejpočetnějšího klastru dockingové simulace (obr. 31 a 32).



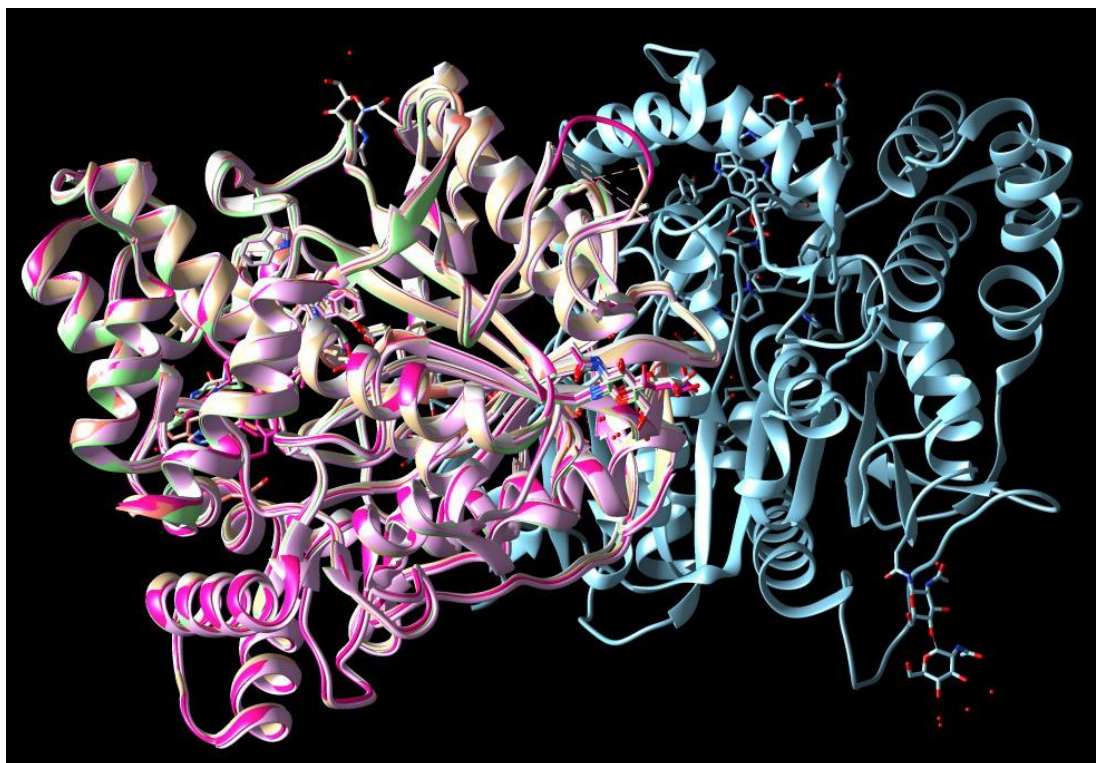
**Obr. 31** Metodika byla ověřena na molekule takrinu. Energeticky nejvýhodnější pozice z klastru zobrazena fialově. Enzym je ve stužkovém zobrazení, významná rezidua jsou zvýrazněna a takrin zobrazen zeleně.



**Obr. 32** Redocking bis-7-takrinu ukázal dobrou shodu. Energeticky nevýhodnější pozice z klastru zobrazena žlutě. Významné aminokyseliny a bis-7takrin z rentgenové krystalografie v trubicovitém zobrazení v barevném provedení dle atomových typů.

### 5.2.2 Porovnání krystalografických struktur

Sofwarová vizualizace nám umožňuje vzájemně porovnat krystalové struktury obsažené v PDB databázi. Můžeme například porovnávat rozdíly v 3D struktuře enzymu mezi jednotlivými organismy či orientaci a pohyblivost reziduí ve vztahu k vázanému ligandu (obr. 33). Se získanými poznatky tak můžeme vybrat pro simulace vhodnou strukturu enzymu. V případě flexibilního dockingu pak usnaňuje výběr pohyblivých vazeb makromolekuly.



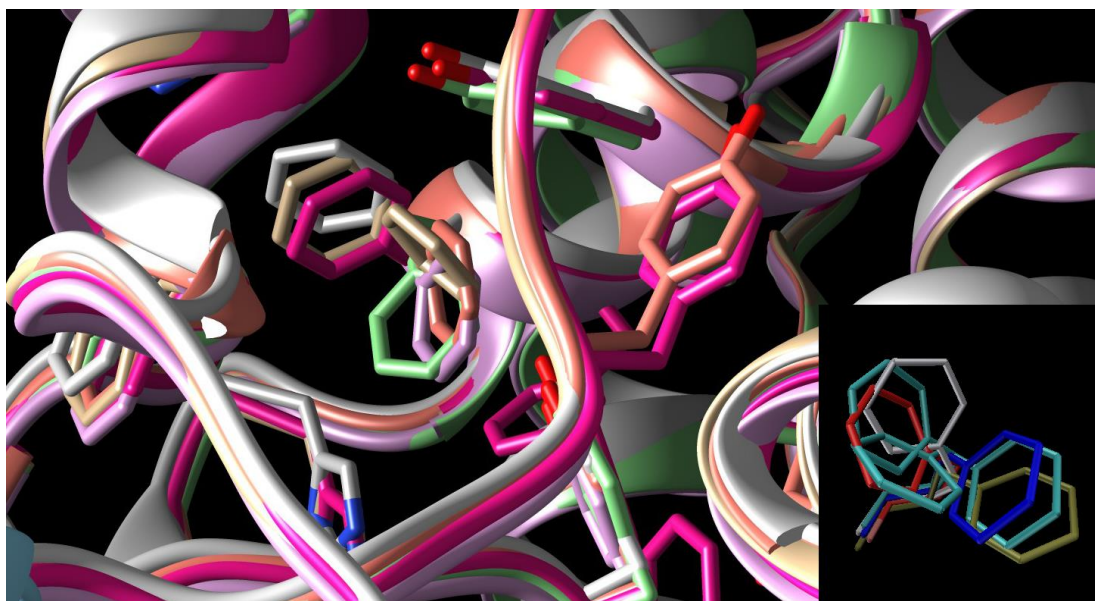
**Obr. 33** Vizualizace překryvu šesti vybraných struktur tcAChE (1ZGB, 1UT6, 2CKM, 2W6C, 1U65, 3IGZ, 1GPN).

Při porovnání několika vybraných struktur tcAChE zjistíme, že většina ze 14 aromatických reziduí tvořících kavitu je dle předpokladů rigidních. Jedná se o Phe120, Trp233, Tyr70, Trp432, Tyr121, Phe331, Phe288 a Phe290. Pohyblivost reziduí Trp84, Tyr130, Tyr442 a Tyr334 zjištěná v simulacích molekulární dynamiky nebyla v žádné krystalové struktuře pozorována.(178) Naproti tomu obrovskou flexibilitou disponují rezidua Phe330 a Trp279.

Phe330 tvoří s Tyr121 hrdlo kavity. Změna konformace otevírá nebo uzavírá vstup k jejímu dnu. Ve všech krystalových strukturách je Tyr121 ve stejné pozici a bude tedy strukturou rigidní. Naproti tomu Phe330 je díky své flexibilitě rozhodující



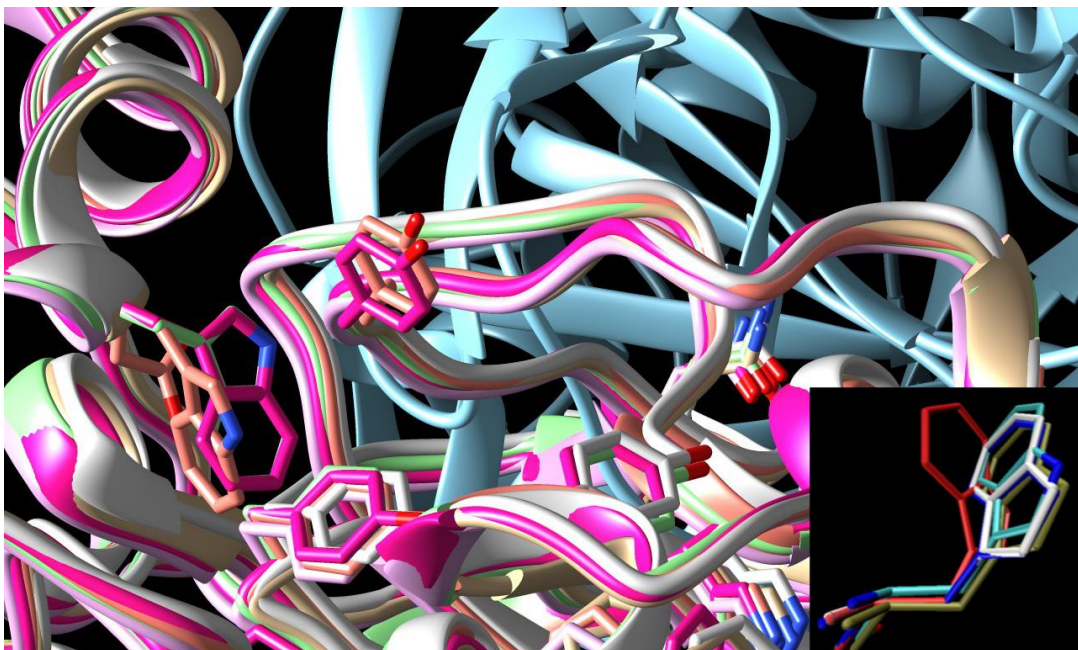
pro vstup substrátu k aktivnímu místu enzymu. Za rozdílné konformace jsou zodpovědné  $\pi$ - $\pi$  a kation- $\pi$  interakce, které utváří Phe330 s různými ligandy (obr. 34).



**Obr. 34** Překryv krystalových struktur enzymů se zaměřením na flexibilitu Phe330.

Trp279 formuje s Tyr70 periferní anionické místo, které hraje klíčovou roli v přitažení a vsunutí substrátu do kavity a odstranění produktů z ní. Flexibilita Trp279 je podstatná pro stabilizaci ligandů, které interagují současně s CAS i PAS (donepezil, bis-7-takrin) pomocí  $\pi$ - $\pi$  a kation- $\pi$  interakcí (obr. 35). Aromatická jádra jsou nositelem silného kvadrupólového momentu, který je důsledkem oddělení  $\pi$ -elektronového oblaku pod a nad rovinu jádra.  $\pi$ - $\pi$  interakce si tak lze představit jako vzájemné působení dipólů dvou aromatických jader. Kation- $\pi$  interakce je elektrostatická interakce mezi kvadrupólem aromátu a příslušným kationtem, na které se podílí i další jevy jako indukované dipóly, polarizovatelnost, disperzní síly atd.(179)

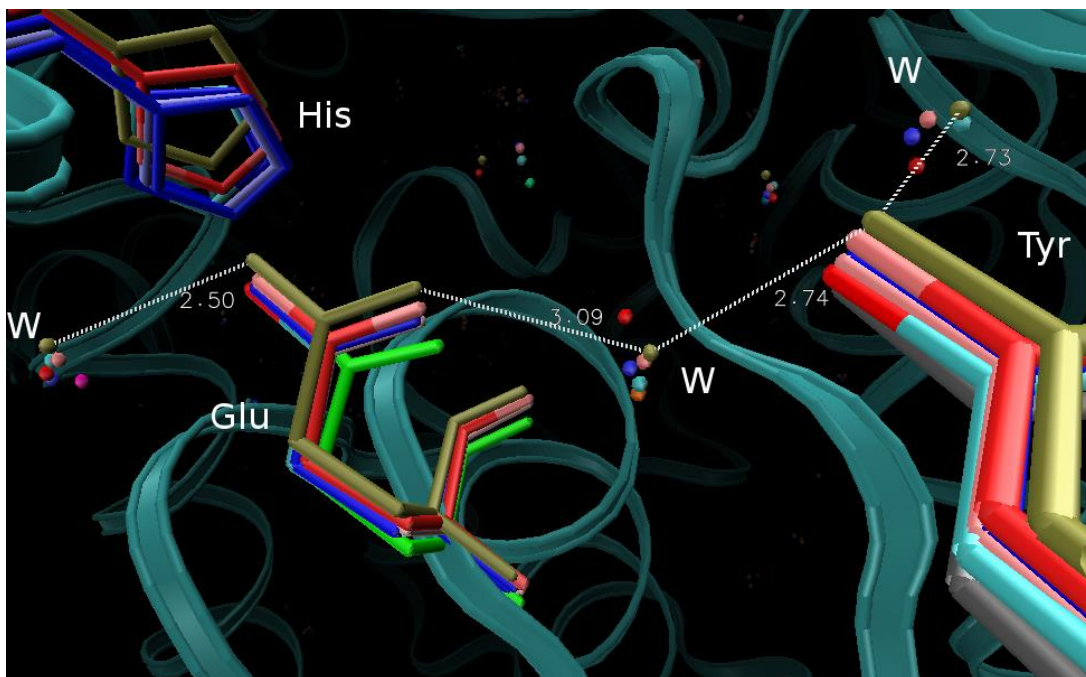




**Obr. 35** Překryv krystalových struktur enzymů se zaměřením na flexibilitu Trp279.

Flexibilitu jednotlivých reziduí v rámci simulací lze řešit dockingem ligandu do několika různých struktur AChE lišících se pozicí těchto reziduí nebo volbou rotamerů v Autodocku 4.2.

Krystalová struktura krom enzymu a případného ligandu obsahuje molekuly vody. Voda je klíčový faktor mnoha chemických a biologických pochodů v organismu. Při porovnání krystalových struktur můžeme zjistit, že molekuly vody se v určitém prostoru kavity vyskytují vždy a jejich maximální odchylka od středové hodnoty je 0.5 Å (obr. 36). Takové molekuly vody můžeme označit jako strukturální a lze se domnívat, že se svými interakcemi podílí na 3D struktuře enzymu a hrají klíčovou roli při stabilizaci komplexu ligand-enzym. V dockingových simulacích je třeba s touto vodou počítat nejen kvůli interakcím s ligandem, ale i kvůli nezanedbatelnému sterickému bránění.

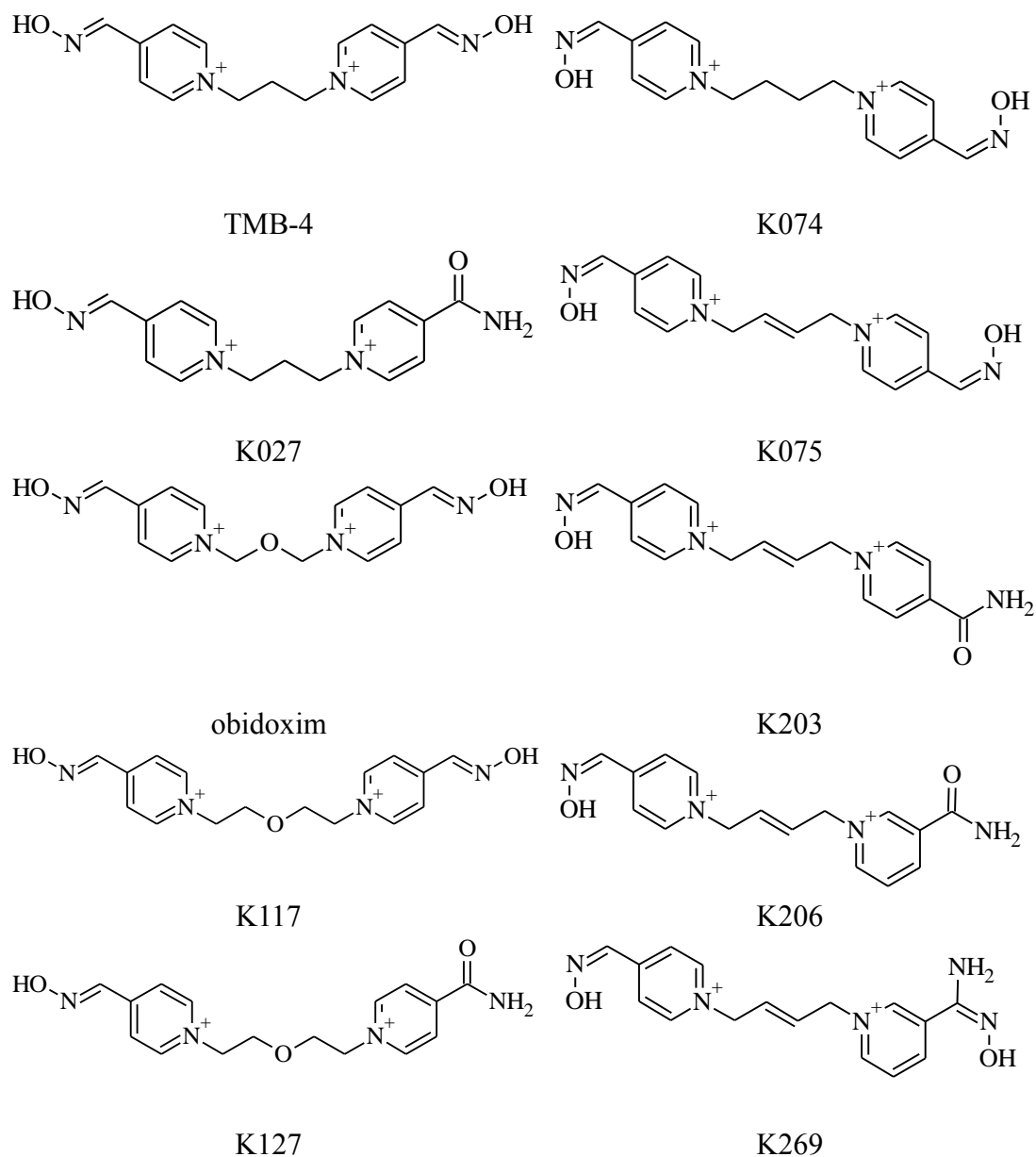


**Obr. 36** Vizualizace porovnání krystalografických struktur v zaměření na molekuly vody.

### 5.2.3 Molekulární modelování a biologické hodnocení reaktivátorů

Oximové reaktivátory se ve spojení s atropinem využívají jako účinná antidota při otravě NPL. Pro jejich účinek je nezbytná dostatečná afinita k enzymu. Jejich slabšího inhibiční účinku a vazbě na dosud neinhibovaný enzym lze využít k profylaxi před otravou OFI.

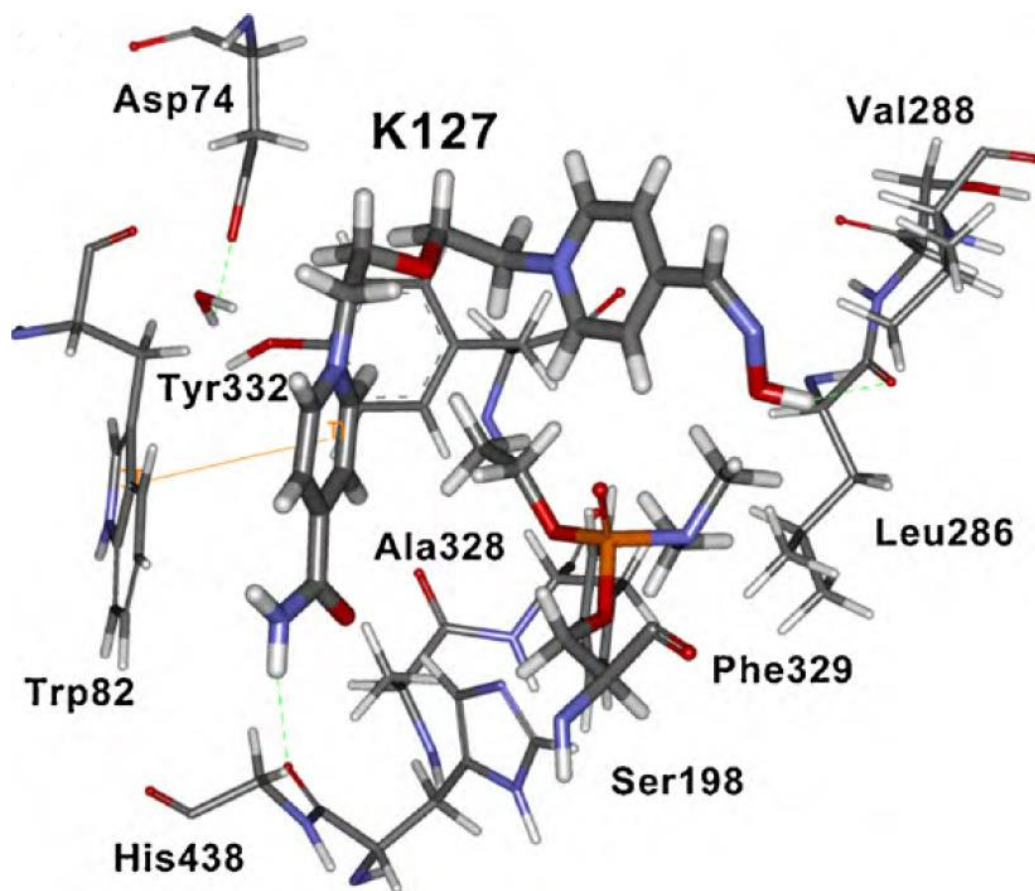
V rámci společného řešení grantu NATO (CBP.EAP.CLG 983024) KTOX a Institute of Medical Research and Occupational Health (Záhřeb, Chorvatsko) bylo zkumáno několik nových reaktivátorů AChE a BChE (obr. 37). Význam BChE při otravách je ve vychytávání a neutralizaci molekul NPL dříve, než se dostanou k AChE v nervových synapsích. BChE tak lze využít jako bioscavenger, kdy podání čistého enzymu zvyšuje LD<sub>50</sub> OFI.(180) Reaktivátory pak uvolňují BChE pro přijetí další molekuly OFI.



**Obr. 37** Struktury studovaných oximů.

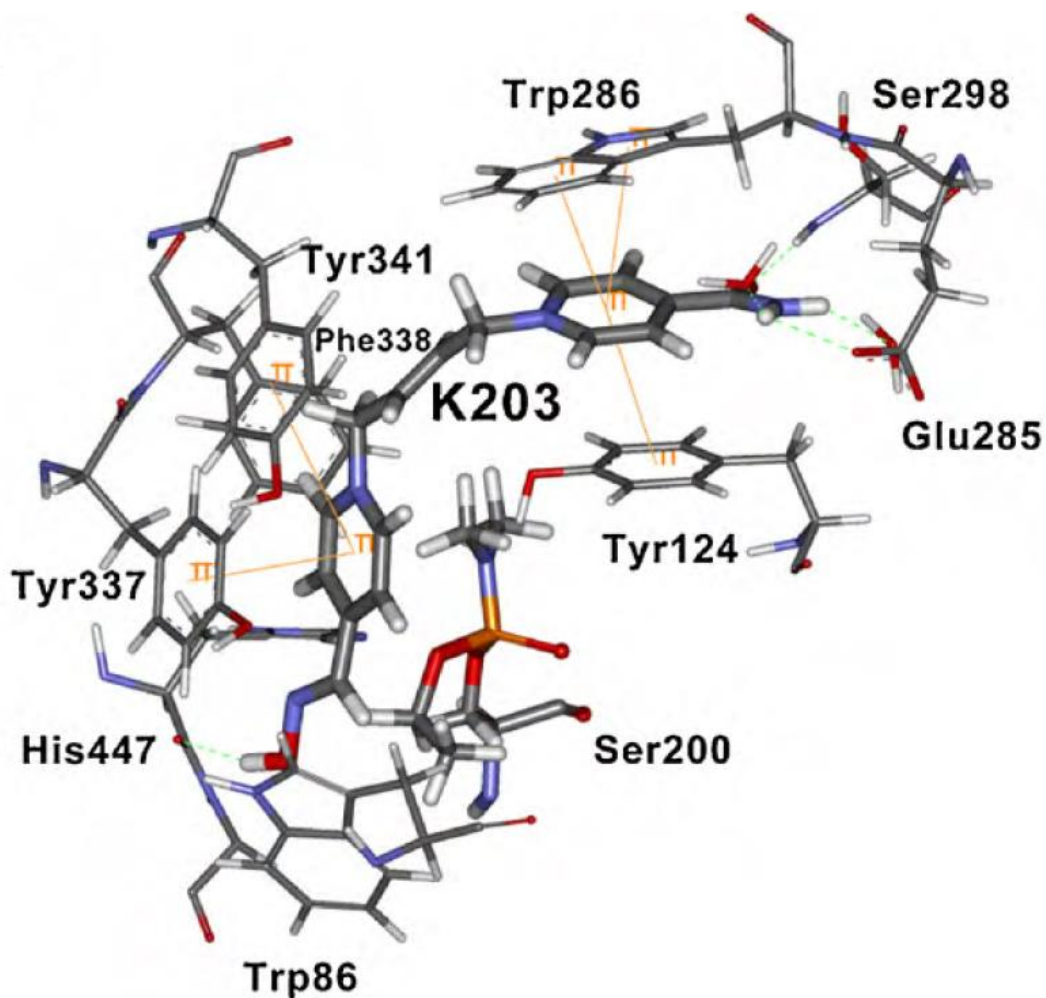
V rámci práce byla testována schopnost oximů reaktivovat AChE a BChE inhibovanou tabunem a paraoxonem. Zdrojem BChE byla lidská plazma a pro AChE erythrocyty. Ke stanovení enzymových aktivit byla použita Ellmanova metoda.(162) Z velkého množství získaných pozic v dockingové simulaci byly vybrány ty, v nichž se oximová skupina nachází 5–6 Å od fosforylovaného aktivního místa enzymu. Předpokládáme, že tato pozice vede dále k vytvoření tranzitního stavu mezi oximem a fosforylovaným enzymem. Všechny oximy utvářely velmi podobné interakce v BChE i AChE. V inhibované BChE utváří oximy  $\pi$ - $\pi$  interakci s Trp82 a vodíkové

můstky s His438 a Leu286. Vzdálenost oximové skupiny od fosforylovaného ser198 se pohybovala okolo 5 Å (obr. 38).



**Obr. 38** Vizualizace interakce oximu K127 a aktivním místem tabunem inhibované BChE.

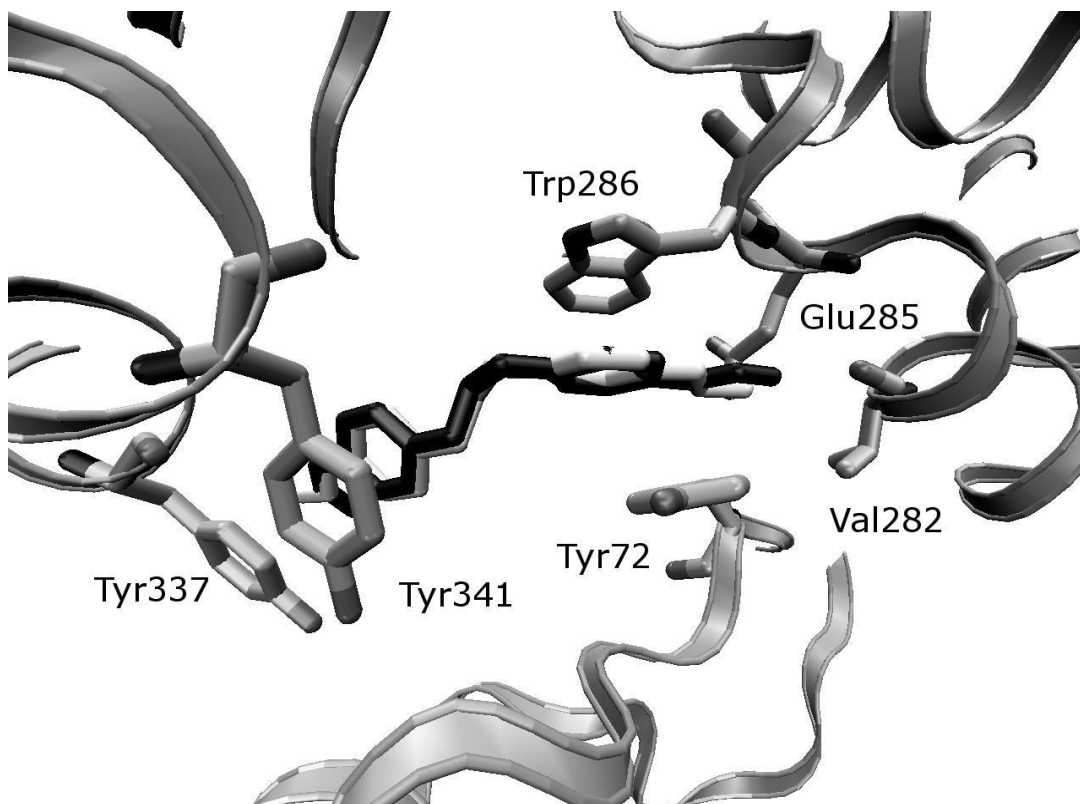
V inhibované AChE pak utváří jedno z jader oximu tzv. sendvičové uspořádání s Trp286 a Tyr124, kde mezi jádry působí kationt- $\pi$  interakce. Ty stabilizují i druhé z jader mezi Tyr337 a Phe338. Jádra s amidoskupinou jsou vázána v PAS a aminoskupina utváří vodíkové můstky s Glu285 a Ser298. Oximová skupina pak tvoří vodíkové můstky s His447 (obr. 39).



Obr. 39 Oxim K203 v tabunem inhibované AChE.

Při porovnání molekulárních modelů oximů v inhibované BChE a AChE je patrné, že pro stabilizaci druhého jádra oximu jsou podstatná aromatická jádra PAS, která jsou v BChE nahrazena alifatickými rezidui. Prostorové umístění oximů je tedy v BChE jiné a snižuje se tak pravděpodobnost vytvoření tranzitního stavu nukleofilním atakem na fosforylovaný serin. Kavita BChE je mnohem větší a ke správné orientaci oximové skupiny by bylo vhodné zavedení objemnějších substituentů nebo skupin utvářejících silnější ne vazebné interakce se strukturami BChE.

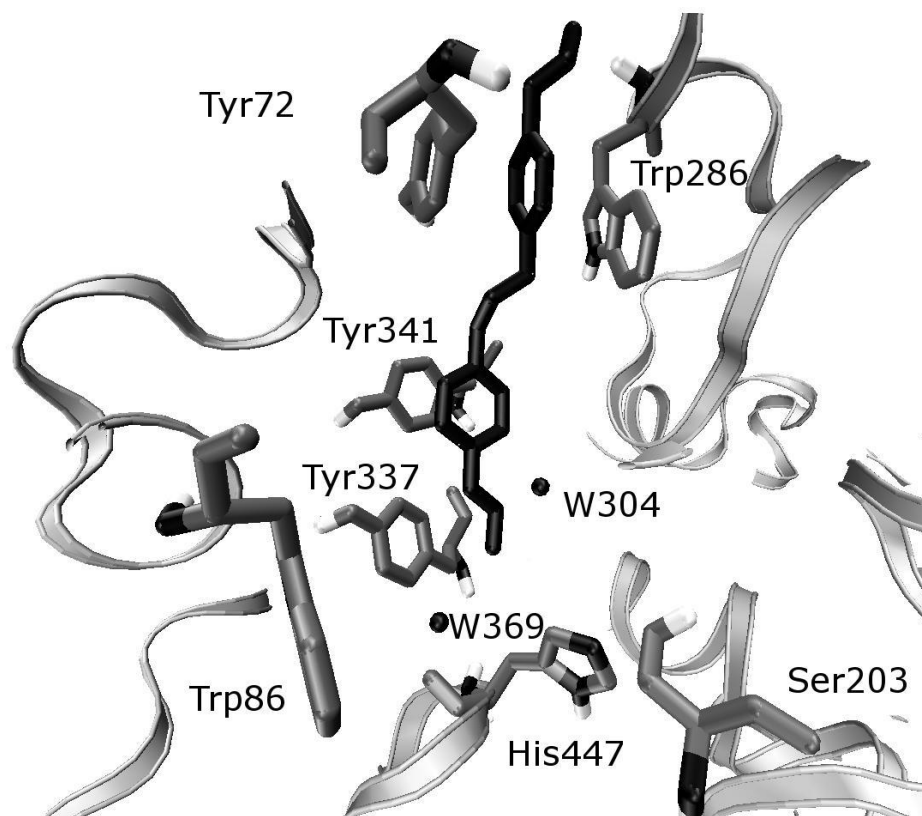
Trimedoxim je účinný reaktivátor AChE a díky své afinitě k enzymu i slabší inhibitor. Strukturně je velmi podobný obidoximu. Ellmanovou metodou byla afinita trimedoximu stanovena na přibližně 82 mM. Krystalová struktura silnějšího inhibitoru obidoximu je dostupná v PDB databázi (obr. 40).



**Obr. 40** Porovnání dockingové simulace trimedoximu a krystalové struktury obidoximu.

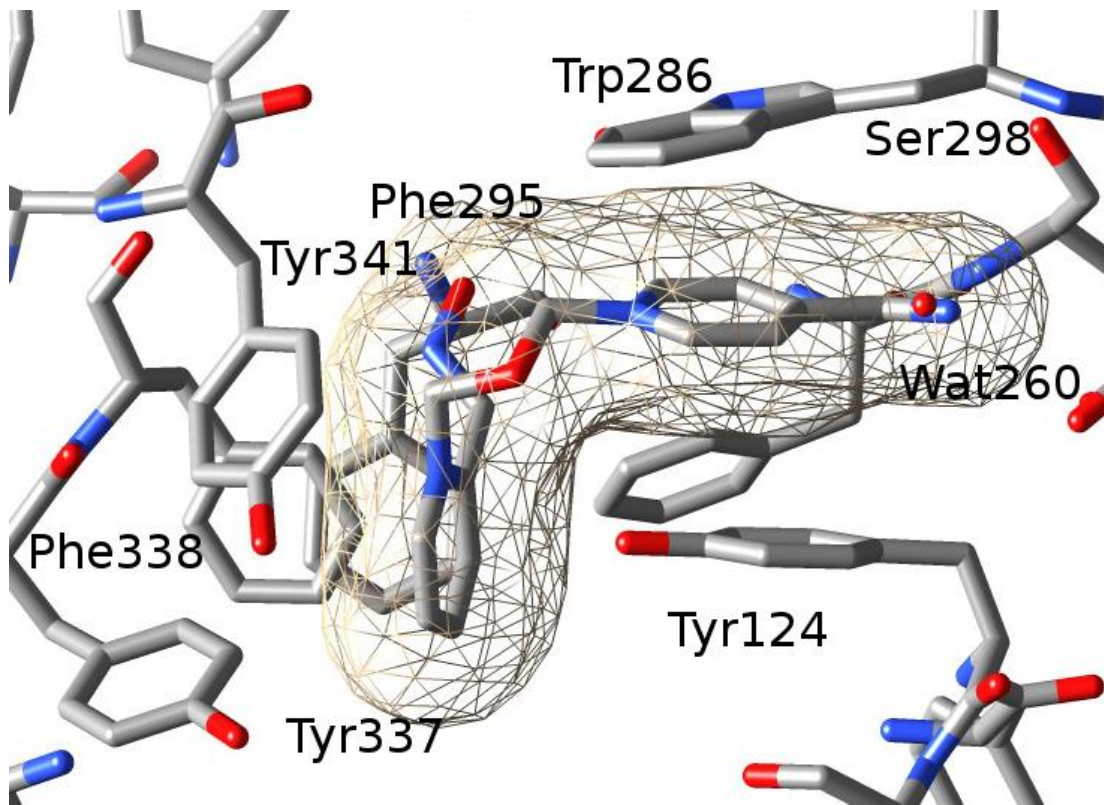
Jedno z pyridinových jader je stabilizováno kationt- $\pi$  interakcemi mezi jádra Trp286 a Tyr72 a oximová skupiny utváří vodíkový můstek (3.2 Å) s karbonylovým kyslíkem Val282. Druhé z jader utváří kationt- $\pi$  interakce s aromatickým povrchem Tyr337 a Tyr341. Kyslík oximové skupiny pak tvoří vodíkový můstek s molekulou vody Wat368 (obr. 41).





**Obr. 41** Vizualizace trimepoximu v kavitě enzymu. Jedno z jader je sevřeno mezi Trp286 a Tyr72 a druhé interaguje s elektronovým systémem aromatických struktur kavity a dále utváří vodíkové vazby s molekulou strukturní vody.

Naproti tomu reaktivátor HI-6 utváří sendvičové uskupení s Tyr124 místo Tyr72. Dusík 4-karboxamidové skupiny tvoří vodíkový můstek s molekulou vody Wat260 (2.8 Å) a karboxylový kyslík této skupiny pak s dusíkem Ser298 (2.9 Å). Druhé jádro pak utváří slabší interakce s Tyr337, Phe338 a Tyr341. Kvartérní dusík tvoří slabší vodíkový můstek s Tyr124 a kyslík oximové skupiny pak silnější vodíkový můstek s dusíkem Phe295 (obr. 42). Pozice druhého jádra a hlavně oximové skupiny je odlišná od trimepoximu a obidoximu, což může být vysvětlením, proč HI-6 není schopná významně reaktivovat AChE inhibovanou tabunem.



Obr. 42 Vizualizace interakce HI-6 s rezidui kavity.



#### 5.2.4 Molekulové modelování a biologické hodnocení monokvartérních inhibitorů

Nově syntetizované pyridinové deriváty mají schopnost inhibovat AChE. Inhibiční účinnost je v porovnání s biskvartérními deriváty nižší. Jejich inhibiční aktivity a vypočtené vlastnosti jsou uvedené v tabulce (tab. 1).

**Tabulka 1** Struktura, *in vitro* biologická aktivita a fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných monokvartérních inhibitorů.

No	Označení	AChE IC <sub>50</sub> [mM]	log P <sup>‡</sup>	log P <sup>*</sup>	TPSA <sup>*</sup>	MW <sup>*</sup>
1	K024	2.254	-4.016	-1.725	36.477	130.958
2	K025	3.981	-5.206	-4.532	46.979	129.952
3	K001	0.197	-4.199	-3.252	3.885	99.68
4	K143	0.902	-4.766	-3.734	27.677	116.54
5	K144	2.060	-5.317	-4.792	62.5	142.247
6	K146	0.033	-3.546	-3.130	7.123	145.586
7	K020	0.622	-2.132	-2.560	3.885	187.89
8	K017	0.449	-2.311	-2.276	3.885	171.089
9	K147	0.258	-4.544	-3.526	20.956	135.224
10	K016	0.169	-2.373	-2.815	3.885	165.867
11	K148	N	-5.537	-4.168	24.113	124.5

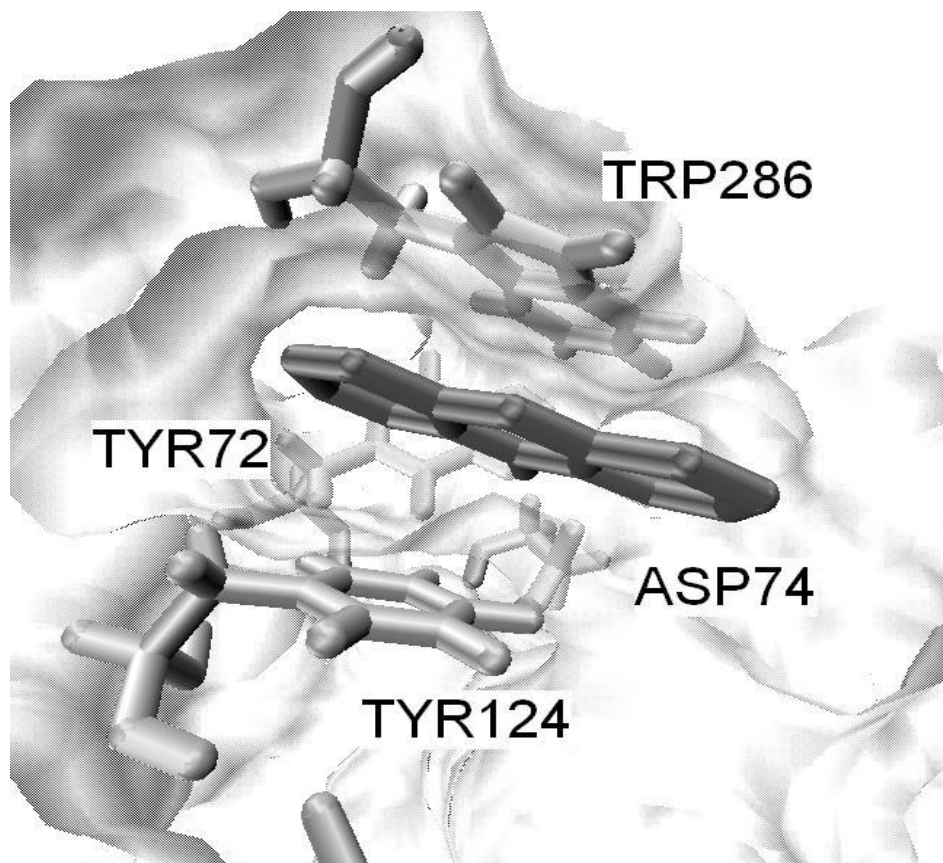
‡ počítáno v ChemOffice

\* počítáno v Molinspiration

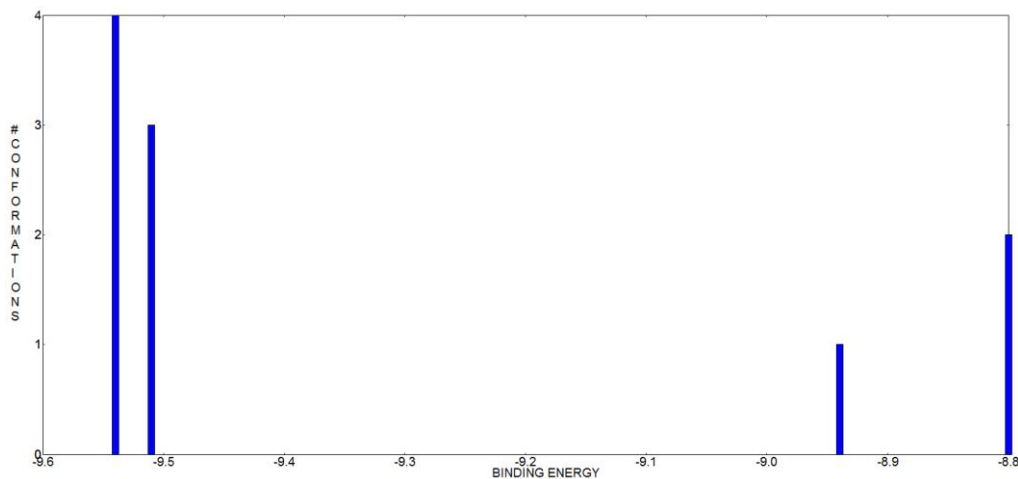
Do dockingových simulací byly zařazeny monokvartérní deriváty syntetizované v rámci této práce a sloučeniny připravené na pracovišti KTOX. Způsob interakce je u všech monokvartérních derivátů dle dockingových simulací obdobný. Aromatické jádro utváří s Trp286 a Tyr72, případně Tyr124, sendvičové uspořádání pomocí kationt- $\pi$  interakcí – graficky znázorněno na případu 10-methylakridinium-jodidu (obr. 43). Pozice na dně kavity je energeticky méně výhodná a počet jedinců v takovém klastru je velmi malý (graf 1).

IC<sub>50</sub> pro 10-methylakridinium-jodid (MA) byla 1.68  $\mu$ M pro AChE a 3.54  $\mu$ M pro BChE. MA je tedy neselektivní inhibitor. Díky svým fyzikálně-chemickým

vlastnostem ( $\log P = -0.32$ ,  $PSA = 3.88 \text{ \AA}^2$ ) má nízký průnik HEB a jeho možné využití je tak v profylaxi otravy NPL či jako součást léčby MG. V profylaxi se uplatňuje i afinita kvartérních inhibitorů k muskarinovým receptorům a jejich antagonistické působení.(181) Testování inhibiční schopnosti MA na M receptorech bylo provedeno podle zavedeného postupu.(182) MA byl shledán alosterickým nekompetitivním inhibitorem s  $IC_{50} = 1.90 \text{ \mu M}$  pro M2 receptor.(183)



**Obr. 43** Orientace MA v PAS enzymu. MA tvoří sendvičové uspořádání s Trp286 (3.45 Å) a Tyr124 (3.48 Å).



**Graf 1** Četnost klastřů a jejich energetické ohodnocení pro MA.

### 5.2.5 Molekulové modelování a biologické hodnocení biskvartérních inhibitorů

Syntetizované biskvartérní deriváty mají schopnost inhibovat AChE ve větší míře než inhibitory monokvartérní. Jejich inhibiční aktivity a vypočtené vlastnosti jsou uvedené v tabulkách (tab. 2 a 3). Biskvartérní pyridinové a isochinolinové inhibitory mají vypočtenou hodnotu polárního povrchu  $5.4 \text{ \AA}^2$ .

**Tabulka 2** Struktura, *in vitro* biologická aktivita a fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných biskvartérních pyridinových derivátů.

n	Označení	AChE IC <sub>50</sub> [μM]	log P <sup>‡</sup>	log P <sup>*</sup>	MW <sup>*</sup>
1	K210	407.9	-5.231	-5.836	170.405
2	K211	187.9	-7.034	-5.834	187.207
3	K212	128.16	-7.191	-5.790	204.009
4	K213	69.15	-8.034	-5.744	220.810
5	K214	49.56	-7.501	-5.651	237.612
6	K215	27.59	-6.976	-5.549	254.414
7	K341	15.36	-6.447	-5.161	271.216
8	K342	1.77	-5.918	-5.307	288.018
9	K343	0.89	-5.389	-5.161	304.819
10	K344	0.272	-4.862	-4.988	321.621
11	K345	0.076	-4.331	-4.780	338.423
12	K346	0.15	-3.802	-4.516	326.528

‡ počítáno v ChemOffice

\* počítáno v Molinspiration

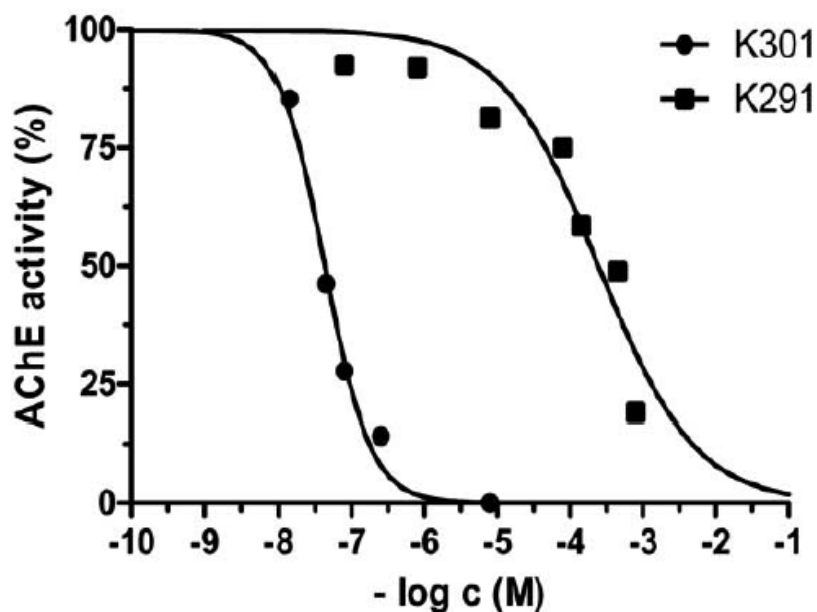
**Tabulka 3** Struktura, *in vitro* biologická aktivita a fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných biskvartérních isochinolinových derivátů.

n	Označení	IC <sub>50</sub> [μM]	log P <sup>‡</sup>	log P <sup>*</sup>	MW <sup>*</sup>
1	K291	244.832	-2.883	-4.725	258.389
2	K292	97.213	-4.686	-4.719	275.19
3	K293	74.657	-4.843	-4.578	291.992
4	K294	15.86	-5.686	-4.413	308.794
5	K295	10.99	-5.157	-4.006	325.596
6	K296	0.817	-4.628	-3.501	342.398
7	K297	0.151	-4.099	-2.996	359.199
8	K298	0.176	-3.57	-2.490	376.001
9	K299	0.051	-3.041	-1.985	392.803
10	K300	0.051	-2.512	-1.480	409.605
11	K301	0.043	-1.983	-0.975	426.407
12	K302	0.076	-1.454	-0.470	443.208

‡ počítáno v ChemOffice

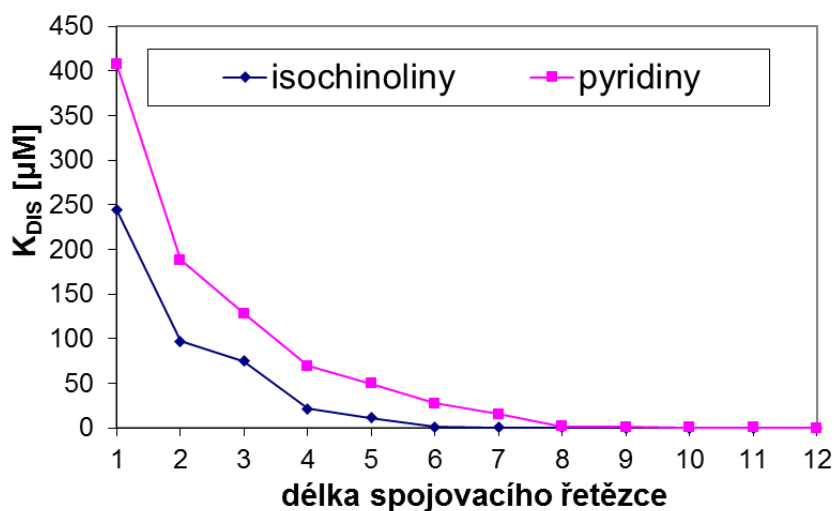
\* počítáno v Molinspiration

Všechny testované heteroareniové deriváty jsou středně silnými reverzibilními inhibitory acetylcholinesterasy. Jejich disociační konstanty reprezentují jejich afinity k enzymu. Ve všech případech byly získány *sigmoidal dose-response* křivky (graf 2).



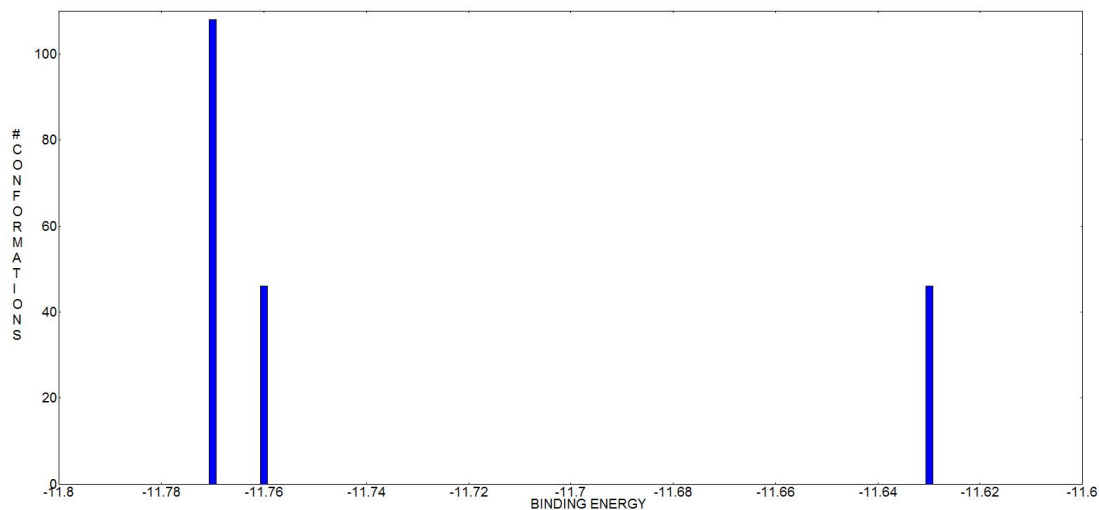
Graf 2 Závislost aktivity AChE na koncentraci testovaných isochinolinových derivátů.(160)

Pro molekulové simulace byly použity deriváty syntetizované v rámci této práce a sloučeniny syntetizované na pracovišti KTOX. Byl sledován vliv spojovacího řetězce a charakteru dusíkatého heterocyklu na afinitu k enzymu. Při sledování závislosti inhibiční aktivity na počtu členů řetězce pozorujeme nízkou afinitu u jedno až tří členného řetězce. Afinita s délkou řetězce pak roste k cca jedenácti členům, kde dosahuje nejvyšší hodnoty a s dále rostoucím řetězcem se již nezvyšuje (graf 3). Na výsledcích molekulového modelování isochinolinových derivátů lze vysvětlit toto pozorování.

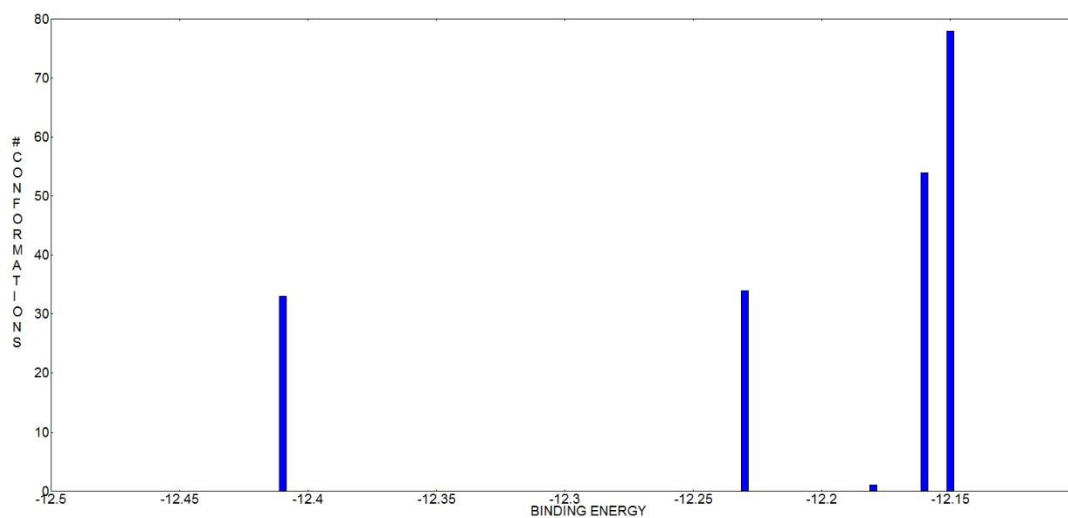


Graf 3 Závislost afinity na délce spojovacího řetězce syntetizovaných biskvartémních derivátů.

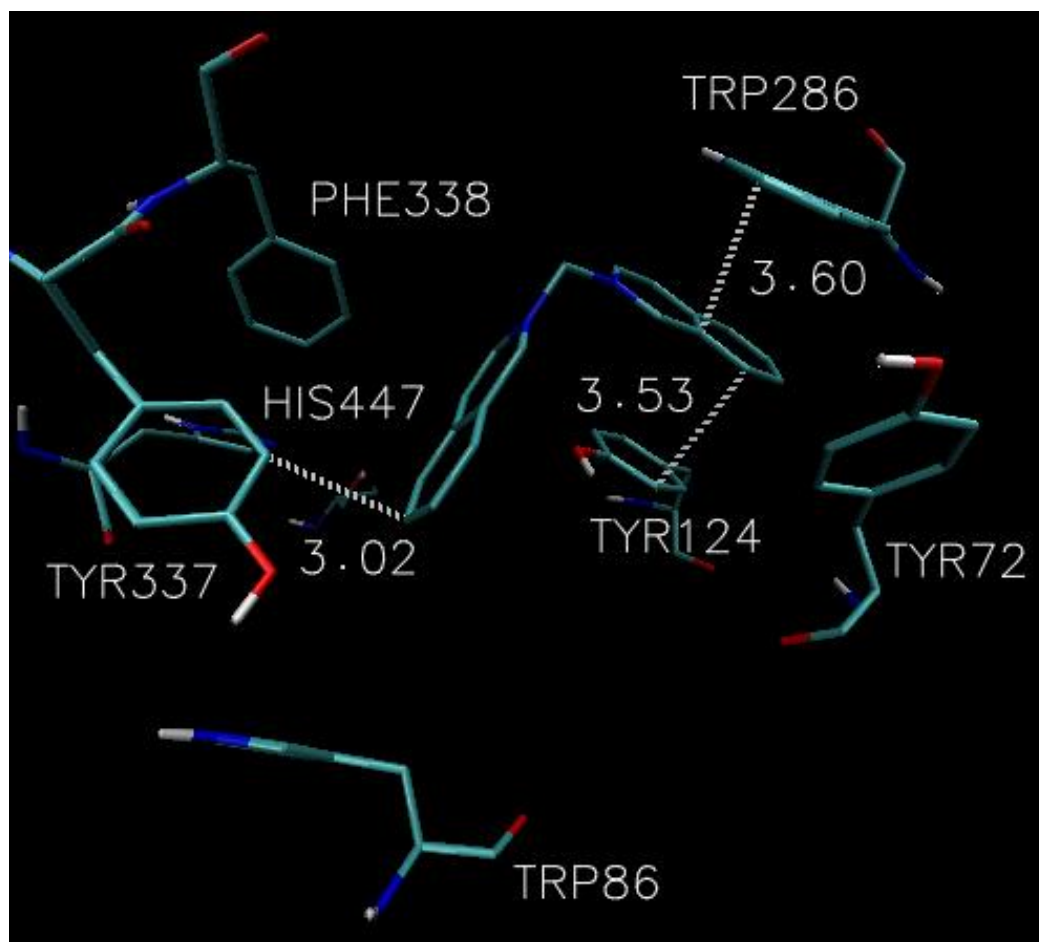
V případě jedno až tří uhlíkatého spojovacího řetězce je jedno z aromatických jader poutáno pomocí kationt- $\pi$  interakcí mezi Trp 286 a Tyr124 PAS a tvoří sendvičovou strukturu. Řetězec směřuje do kavity a druhé jádro interaguje s aromatickým systémem Tyr337 a Tyr341 (obr. 44). Pravděpodobnost této pozice je velmi vysoká (graf 4 a 5).



**Graf 4** Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro isochinolinový derivát K291.

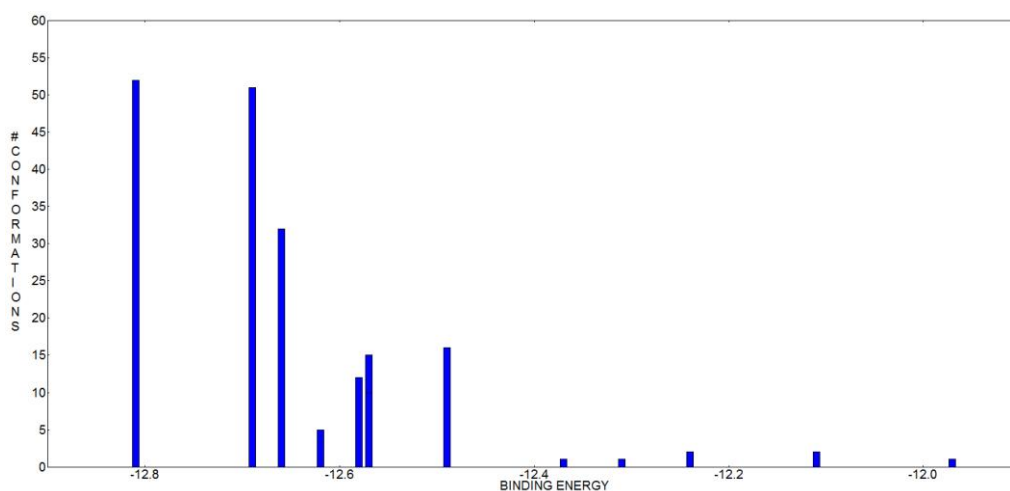


**Graf 5** Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro isochinolinový derivát K292.

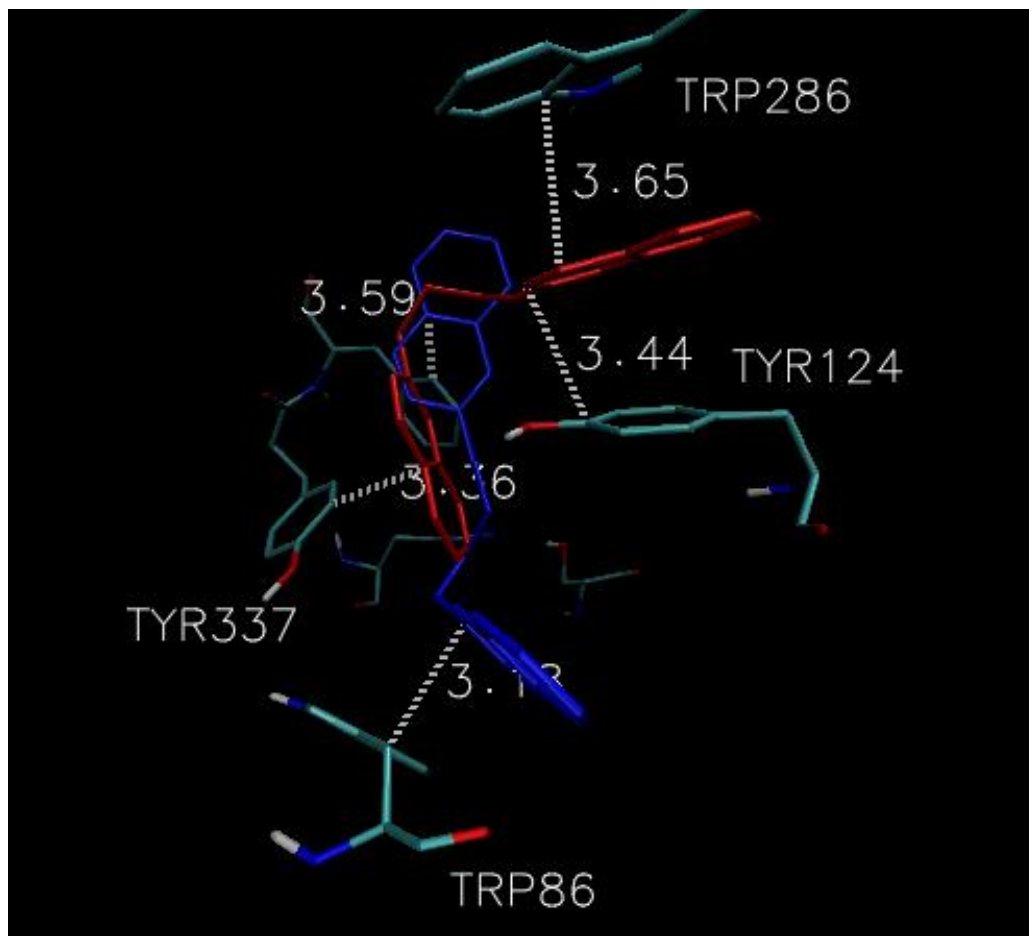


**Obr. 44** Interakce derivátu K291 s enzymem.

Bis-isochinolinový derivát se čtyř uhlíkatým řetězcem poskytuje v nejčetnějším a energeticky výhodnějším klastru obdobné interakce jako deriváty s kratším spojovacím řetězcem. Druhý nejčetnější klastr pak je jedním z jader přitahován kationt- $\pi$  interakcemi k Trp86 (obr. 45, graf 6). To může vysvětlovat skokový rozdíl v aktivitách v souvislosti s rostoucím spojovacím řetězcem.

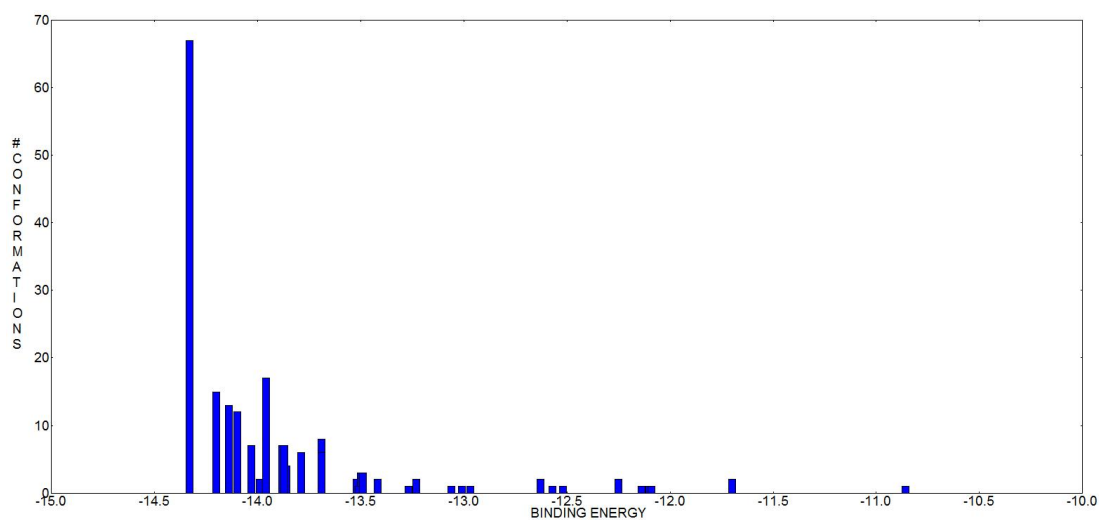


**Graf 6** etnost klastru a jejich energeticke ohodnocenı pro isochinolinovy derivat K294.



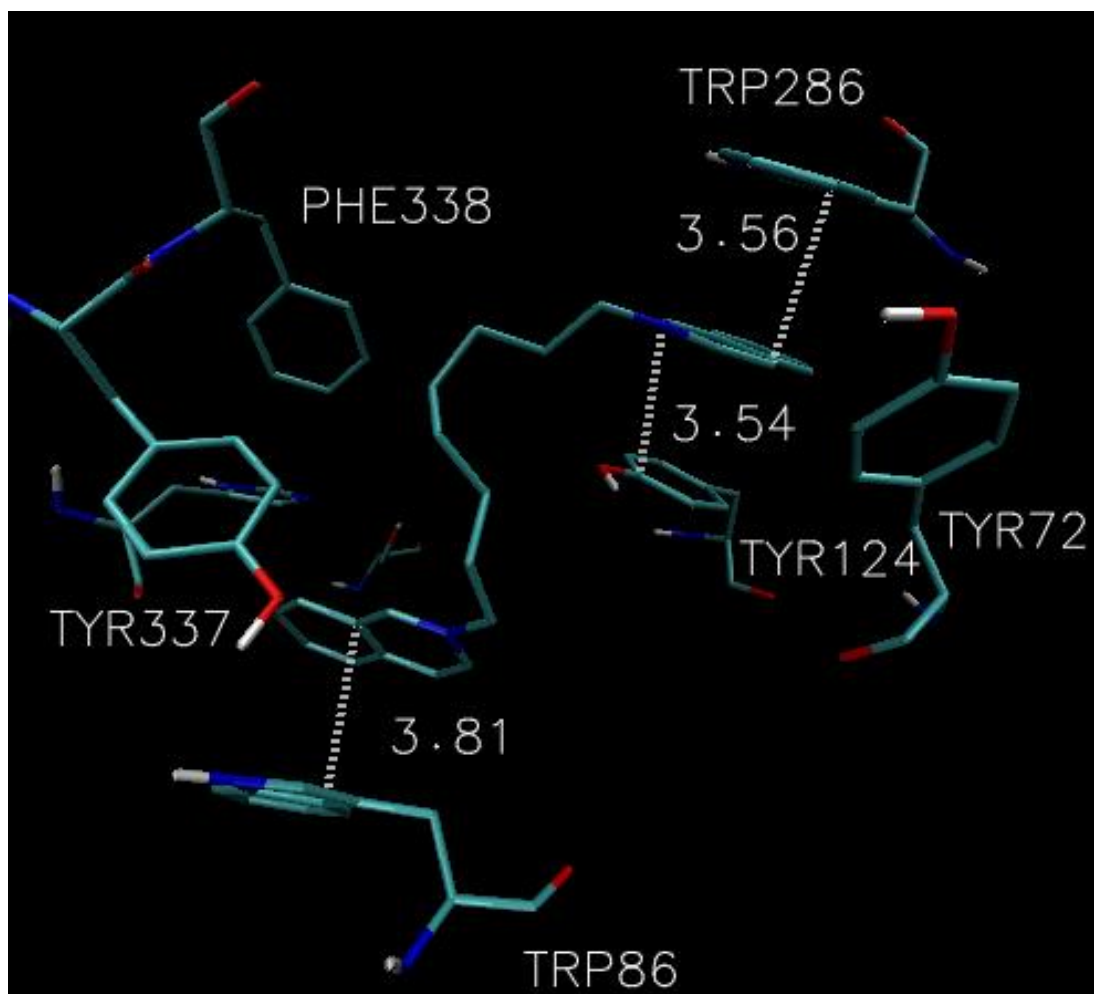
**Obr. 45** Vizualizace dockingové simulace derivátu K294. Červeně je nejlepší výsledek z nejčetnějšího klastru. Modře nejlepší výsledek z druhého nejčetnějšího klastru.

Již od pětiuhlíkatého spojovacího řetězce jsou isochinolinové deriváty schopné kationt- $\pi$  interakcí s oběma anionickými místy současně (obr. 46). S rostoucí délkou řetězce je pak umožněna výhodnější orientace aromatických částí derivátu vůči enzymu (graf 7).



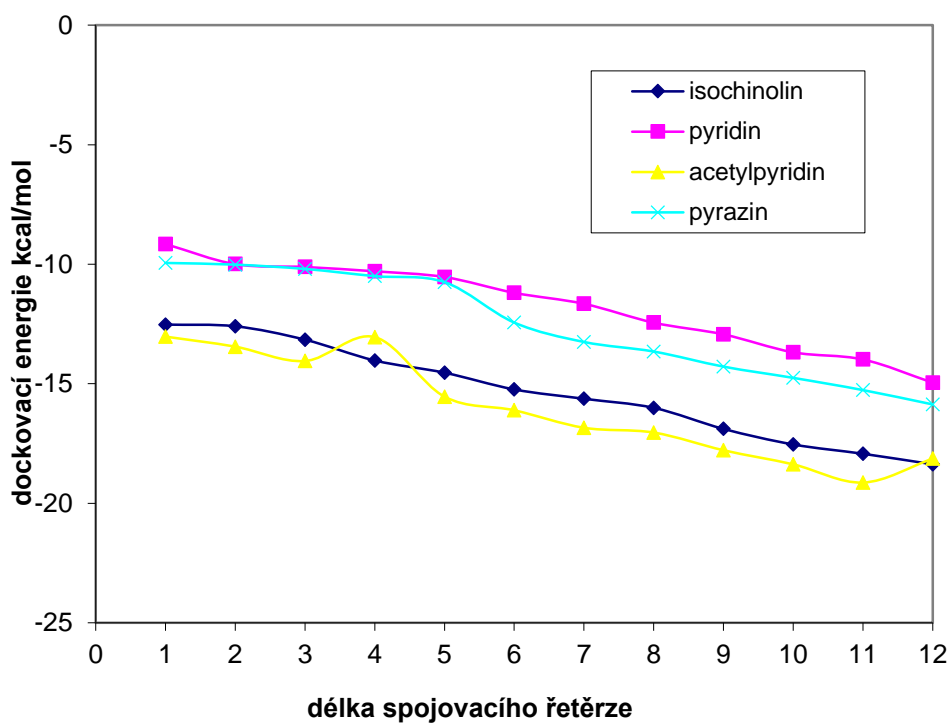
**Graf 7** Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro isochinolinový derivát K295.



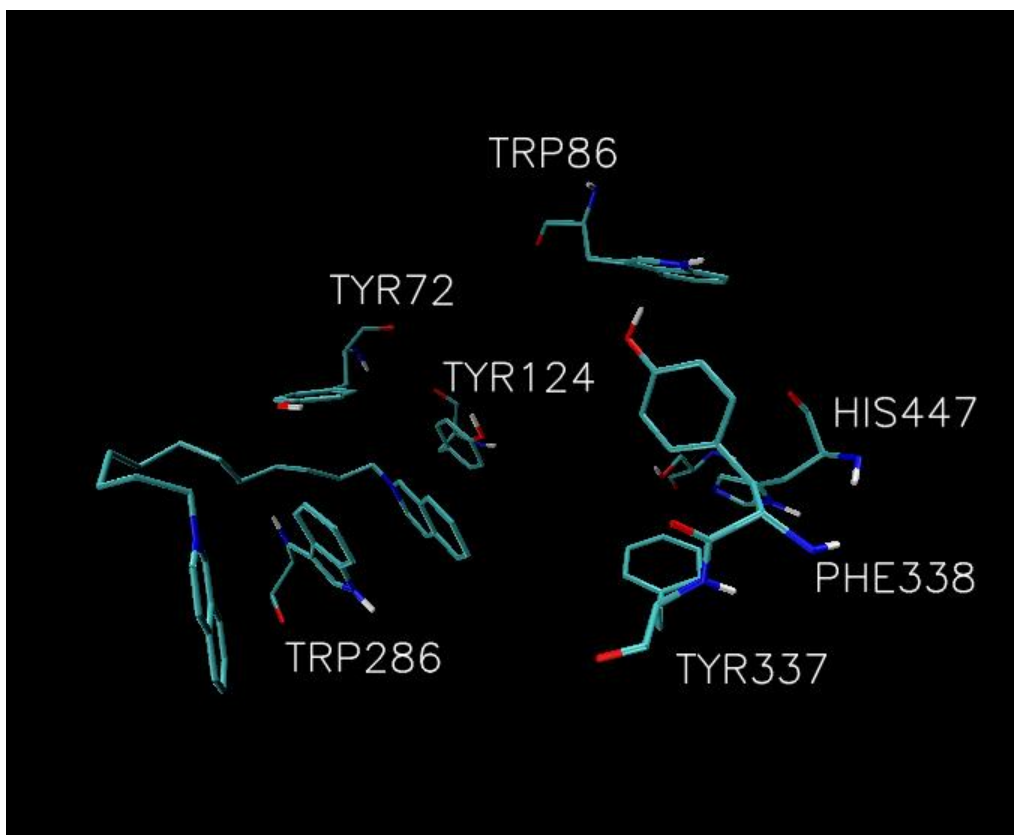


**Obr. 46** Předpokládaná orientace biskvartérních derivátů s delším řetězcem v kavitě enzymu.

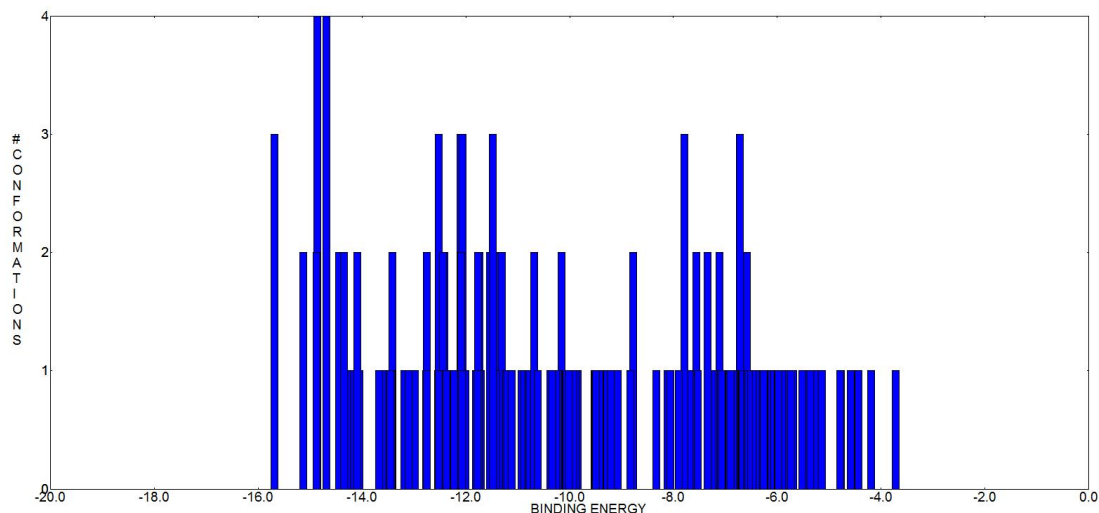
S délkou spojovacího řetězce sice volná vazebná energie nadále roste (graf 8), avšak od určité velikosti klesá četnost energeticky nejvýhodnějšího klastru. Od jedenáctiuhlíkatého spojovacího řetězce výše pak pozorujeme větší četnost výsledků (graf 9), kdy je jedno z jader umístěno v PAS a druhé je mimo kavitu (obr. 47). Derivát už je natolik rozměrný, že jeho celé umístění v kavitě je méně pravděpodobné. Tímto lze vysvětlit úbytek inhibiční aktivity s dále rostoucím řetězcem.



Graf 8 Závislost dockovací energie na délce spojovacího řetězce.

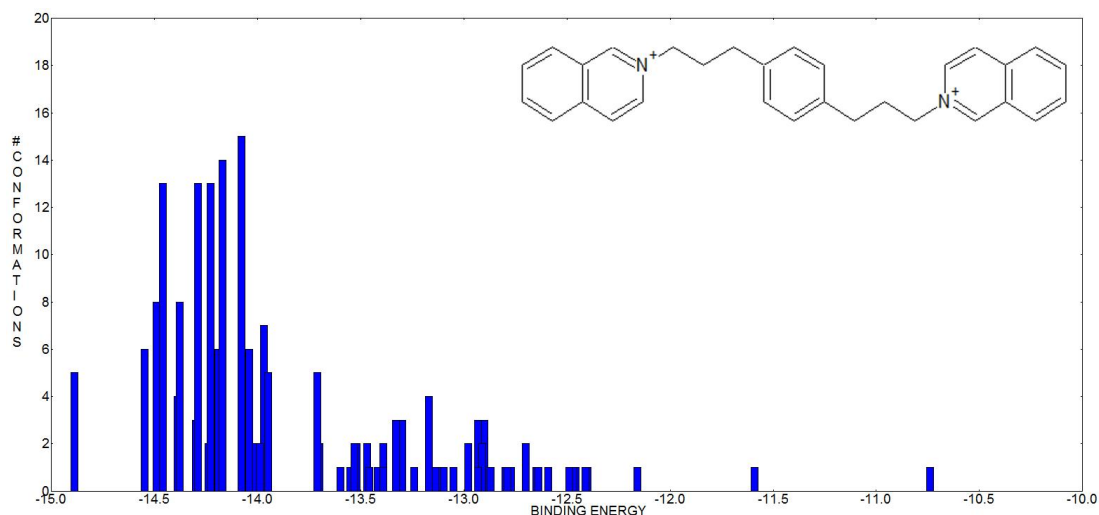


Obr. 47 Vizualizace dockingové simulace derivátu K302. Pozice Trp286 je mezi dvěma jádry isochinolinového derivátu, kdy jedno z jader je umístěno mimo kavitu.

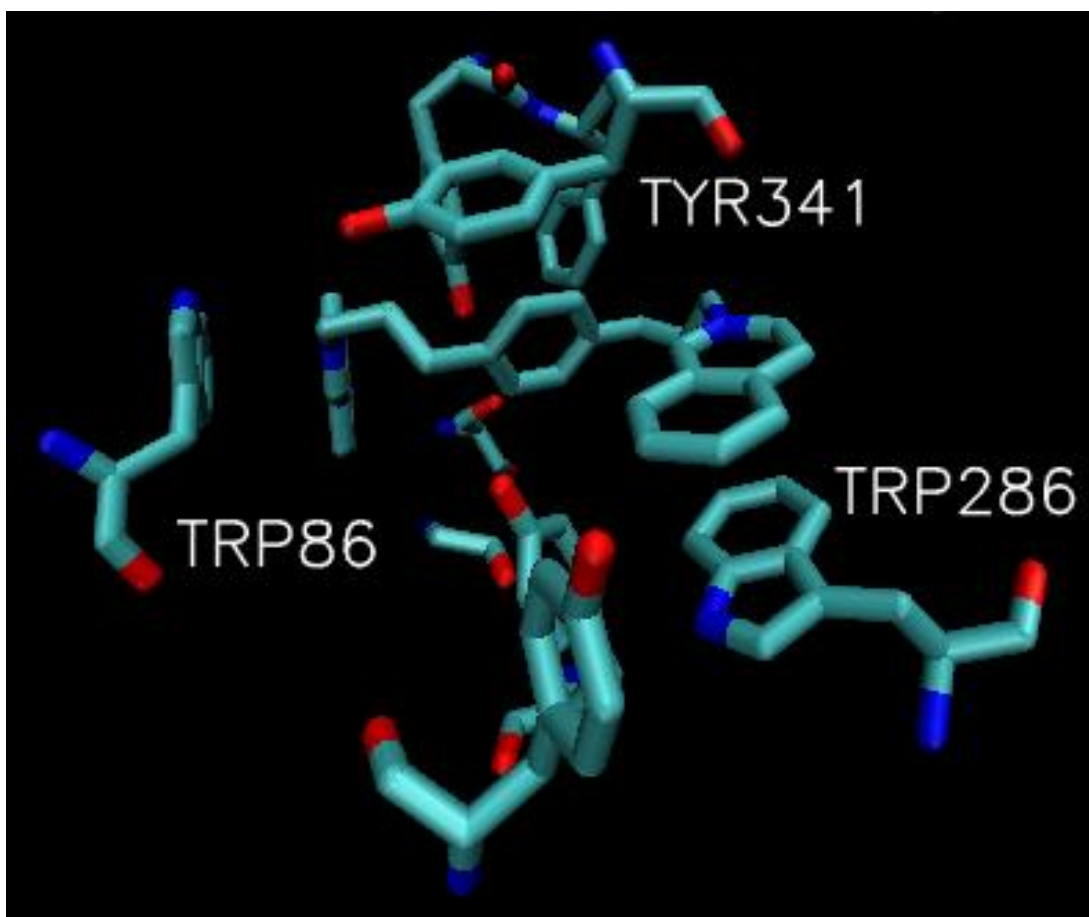


**Graf 9** etnost klastrů a jejich energetick ohodnocení pro isochinolinov derivát K302.

Jednou ze strukturních obmen je zaveden alternativních len do spojovacího řetězce – zaveden heterocyklů, nhraza uhlíku kyslíkem či dusíkem atd. U aromatického cyklu zavedeného do spojovacího řetězce předpokládáme tvorbu  $\pi$ - $\pi$  interakcí zejména „edge-to-face“ charakteru (obr. 48). Omezen flexibility spojovacího řetězce se projeví tvorbou většího množství vícečetných klastrů (graf 10). Z provedených simulací lze předpokládat, že tato obmena se stejn jako zaveden dvojných vazeb projeví na afinitě negativn.



**Graf 10** Klastrov analýza isochinolinového derivátu JBCH57.



**Obr. 48** Vizualizace energeticky nejvýhodnější pozice isochinolinového derivátu JBCH57 v enzymové struktuře.

### 5.2.6 Molekulové modelování a biologické hodnocení takrinových derivátů

Takrin byl první látkou používanou v terapii AD, ale kvůli častému výskytu nežádoucích reakcí bylo od jeho užívání upuštěno. Cílem mnoha pracovišť je připravit derivát takrinu s dostatečnou účinností a potlačenými nežádoucími účinky. Jednou z takových sloučenin je 7-MEOTA.(184)

V dalším experimentu bylo syntetizováno a testováno několik derivátů s alkylovým řetězcem připojeným přes amino skupinu. 7-MEOTA byla alkylována příslušnými bromalkany v prostředí KOH/DMSO (schéma 10). Vzniklé báze byly probubláváním chlorovodíku převedeny na hydrochloridy a krystalizovány z acetonitrilu s výtěžkem 16 až 63 %.(185)

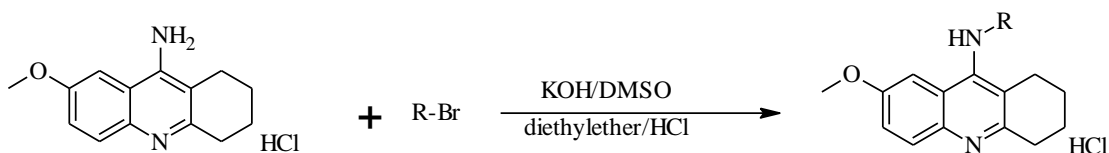


Schéma 10 Příprava derivátů 7-MEOTA.

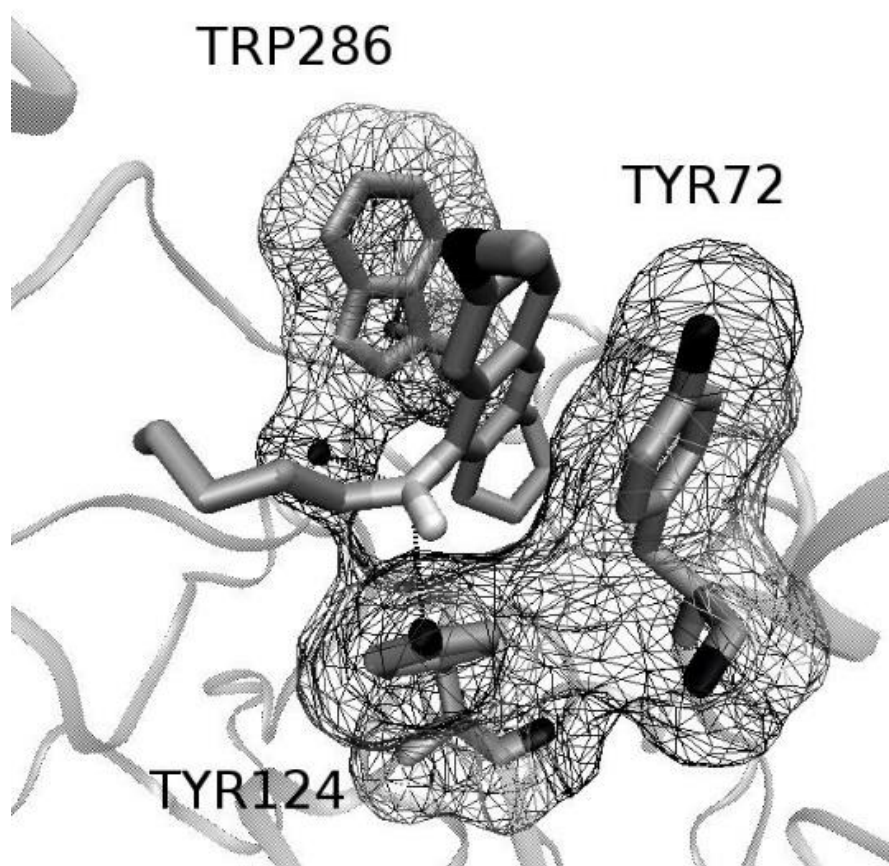
Inhibiční schopnosti derivátů byly testovány Ellmanovou metodou na rekombinantní hAChE a plazmatické BChE (tab. 4). Derivát **5** z této série má díky dostatečnému inhibičnímu působení a vysoké selektivitě nejvýhodnější parametry pro využití v terapii AD. Deriváty 5–8 jsou účinnější inhibitory než takrin nebo 7-MEOTA. Jejich rozdělovací koeficienty jsou ale vyšší než 5.

**Tabulka 4** Stanovené hodnoty IC<sub>50</sub> pro AChE a BChE.

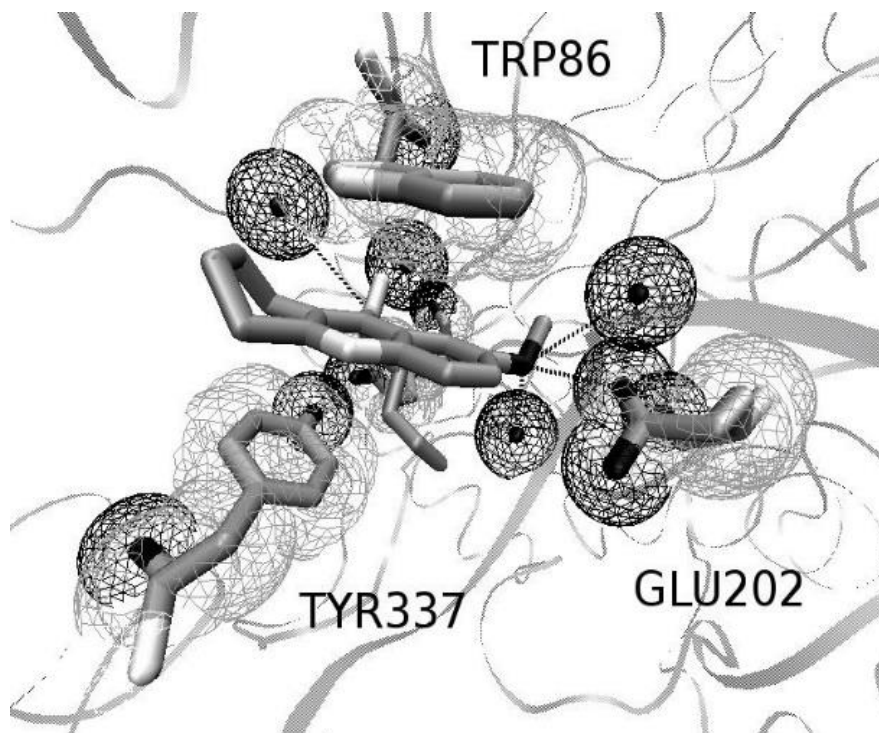
Označení	R	AChE IC <sub>50</sub> μM	BChE IC <sub>50</sub> μM	SI (BChE IC <sub>50</sub> / AChE IC <sub>50</sub> )
<b>1</b>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	66.05	97.07	1.47
<b>2</b>	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	9.24	69.7	7.54
<b>3</b>	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	21.2.	63.84	3.01
<b>4</b>	-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	6.65	16.43	2.47
<b>5</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	0.10	1.03	10.30
<b>6</b>	-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	0.27	0.04	0.15
<b>7</b>	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	0.36	0.12	0.33
<b>8</b>	-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	1.56	0.36	0.23
<b>9</b>	-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	a	a	a
<b>10</b>	-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	a	a	a
<b>11</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	1.01	a	a
<b>12</b>	-C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	99.91	a	a
<b>13</b>	-C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	45.53	a	a
<b>14</b>	-C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	a	a	a
<b>THA</b>		0.5	0.023	0.05
<b>7-MEOTA</b>		15.0	21.0	1.40

a inhibice nebyla pozorována

Dockingové simulace nabízejí, obdobně jako takrin či 7-MEOTA, dva velmi početné klastry. U energeticky výhodnější pozice dochází k  $\pi$ - $\pi$  interakcím s Trp86 a Tyr337. Orientaci nenasyceného kruhu nesoucího methoxyskupinu určují vodíkové můstky mezi touto skupinou, molekulami vody a Glu202 (obr. 50). V porovnání s takrinem jsou tak nasyčený a aromatický kruh orientovány obráceně. Ve druhém klastru je pak pozorováno sendvičové uspořádání s Trp286 a Tyr72 v PAS (obr. 49).

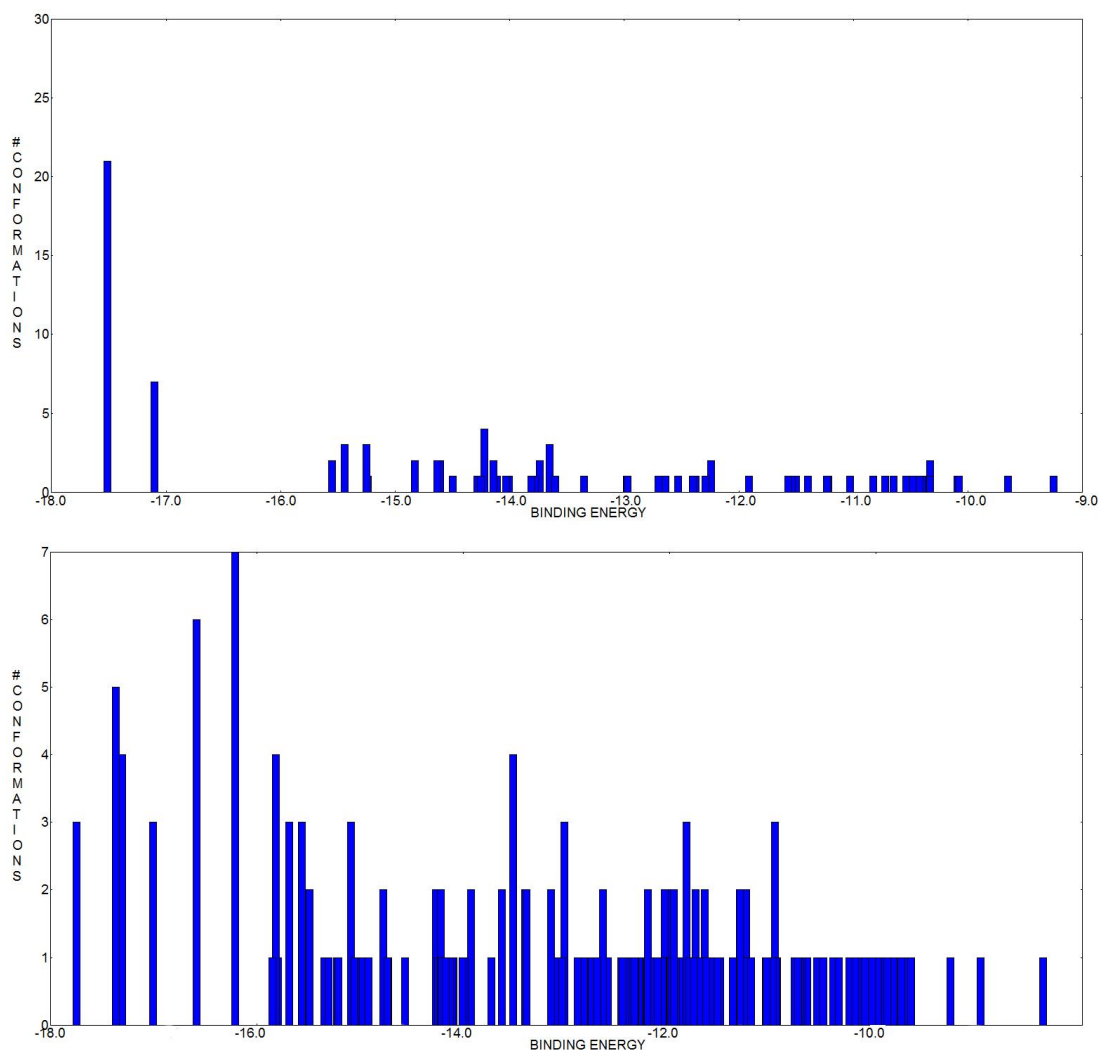


**Obr. 49**  $\pi$ - $\pi$  interakce s Trp286 a Tyr72 v PAS.



**Obr. 50** Prostorové uspořádání v aktivní části mAChE.

Při porovnání klastrové analýzy dimerů 7-MEOTA a THA spojených sedmičlenným methylenovým řetězcem zjistíme, že THA derivát dává vzhledem k četnosti energeticky nejvýhodnějšího klastru jednoznačnou orientaci v kavitě enzymu (graf 11). Větší množství méně početných klastrů u 7-MEOTA derivátu způsobuje methoxy skupina, která poskytuje molekule alternativní možnosti interakce s enzymem.



**Graf 11** Porovnání klastrové analýzy THA a 7-MEOTA homodimerických derivátů.



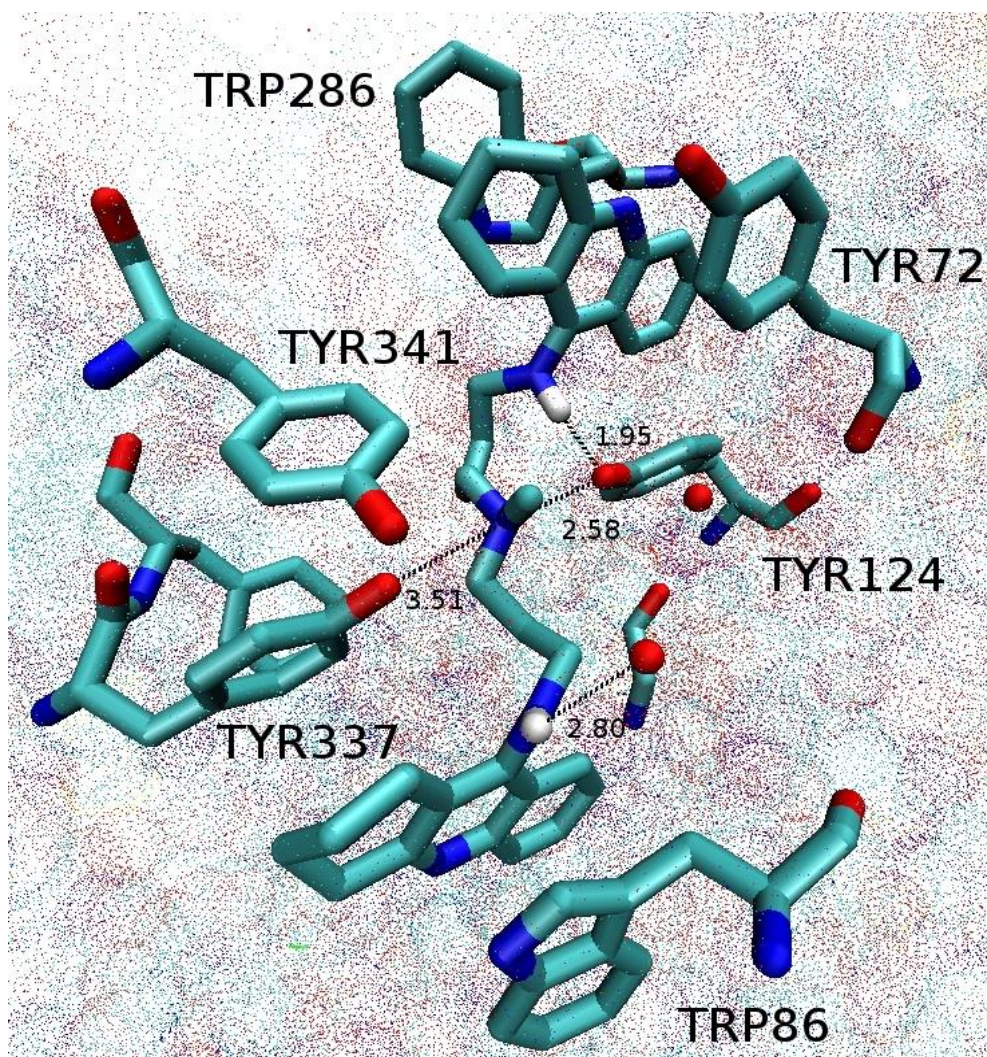
### 5.2.7 Návrh nových struktur

Pomocí softwarových nástrojů můžeme vypočítat nebo předpovědět vlastnosti sloučenin, aniž bychom je syntetizovali. V případě návrhu nových reverzibilních inhibitorů AChE vycházíme z dosud získaných poznatků o závislosti inhibiční aktivity z *in vitro* testů na struktuře inhibitoru a jeho způsobu interakce s enzymem z dockingových simulací. Při konstrukci nových látek, o kterých uvažujeme jako o potenciálních léčivech použitelných v humánní medicíně, je nutné předpovídat jejich vstřebávání z gastrointestinálního traktu a schopnost procházet přes HEB. Tyto vlastnosti formuluje Lipinského pravidlo pěti a jeho dodatečná rozšíření.(186-188) Molekulová hmotnost by neměla překročit 500,  $\log P \leq 5$ , počet akceptorů vodíkových můstků by neměl být větší než 10, počet jejich donorů by neměl přesáhnout 5, počet volně otáčivých vazeb 10 a polární plocha by neměla být větší než  $140 \text{ \AA}^2$ .(189) V případě, že uvažujeme jen o fragmentu účinné látky nebo o základním skeletu, je tato predikce zúžena na pravidlo tří ( $\log P \leq 3$ ,  $MW \leq 300$ , akceptory i donory vodíkových můstků  $\leq 3$  a  $PSA \leq 60 \text{ \AA}^2$ ). (190)

Z *in vitro* i *in silico* testů vyplývá, že deriváty schopné interakce s oběma anionickými místy současně jsou výrazně účinnější. Na míru afinity má vliv charakter interakce a délka spojovacího řetězce mezi jádry. Obecný návrh struktury můžeme tedy vyjádřit jako X-R-Z, kde Y a Z jsou aromatické systémy a R je spojovací řetězec. Pro potřeby této práce bylo *in silico* testováno několik set struktur navržených na základě tohoto obecného vzorce a doposud získaných poznatků. Test byl vždy proveden na minimálně čtyřech výchozích krystalových strukturách a proveden třikrát s různým nastavením parametrů pro docking.

Na základě modelovacích studií lze předpokládat, že délka spojovacího řetězce u těchto sloučenin koreluje se vzdáleností dvou anionických míst (PAS a CAS) enzymu. Vzdálenost mezi aromatickými jádry byla stanovena na přibližně  $16 \text{ \AA}$ , což odpovídá 8–11 členům spojovacího řetězce. Jednou z možností studovaných obměn je tedy spojovací řetězec. Testováno bylo zavedení heteroatomů schopných tvorby vodíkových můstků s rezidui kavity, aromatických struktur pro tvorbu  $\pi$ - $\pi$  interakcí či zavedení dvojně vazby. Dvojně vazby sice nabízejí nové možnosti interakce s aromatickými rezidui stěny kavity, ale je tomu na úkor flexibility celé molekuly, která je pro afinitu k enzymu podstatná.

Z již syntetizovaných takrinových homodimerů se na základě závislosti aktivity na struktuře jako optimální jeví derivát se sedmi uhlíkatým řetězcem ( $IC_{50} = 1.5$  nM). V případě nahrazení prostředního uhlíku spojovacího řetězce dusíkem snížíme  $\log P$  na 6.5 z původních 8.5 (počítáno v Molinspiration).<sup>(191)</sup> Jedno takrinové jádro je  $\pi$ - $\pi$  interakcemi umístěno mezi Trp86 a Tyr337 a dusík tohoto jádra tvoří vodíkový můstek s molekulou strukturní vody (2.8 Å), druhé jádro je v sendvičovém uspořádání s Trp286 a Tyr72 a dusík tohoto jádra tvoří vodíkový můstek s Tyr124 (1.94 Å). Dusík spojovacího řetězce pak tvorbou vodíkových můstku dusíku s hydroxylovými skupinami Tyr337 (3.51 Å) a Tyr124 (2.58 Å) zesiluje afinitu k enzymu (obr. 51). Vypočítaná volná vazebná energie je -18.25 kcal/mol, což v porovnání s takrinem (-9.7 kcal/mol) naznačuje perspektivní inhibitor AChE. Molekulová hmotnost je 493 a PSA 61.8 Å<sup>2</sup>.



**Obr. 51** Předpokládaná orientace účinného inhibitoru REF31 (tab. 5). Zobrazena významná rezidua a naznačeny vodíkové můstky.

Při porovnání dockingových simulací si můžeme všimnout, že stejně jako takrin, tak i ostatní deriváty tvoří dva četné klastry. V případě takrinu a jeho derivátu je energeticky výhodnější ten, kde se deriváty vyskytují v aktivním místě enzymu přitahované  $\pi$ - $\pi$  interakcemi k Trp86. Naproti tomu kvartérní deriváty upřednostňují vazbu pomocí kationt- $\pi$  do PAS. Bylo proto zkoumáno několik hybridních struktur, kdy je různým spojovacím řetězcem propojeno takrinové jádro s heteroaromatickou sloučeninou. Můžeme je označit obecným vzorcem takrin-R-Y. Některé deriváty a jejich vypočtené a predikované vlastnosti jsou uvedeny v následujících tabulkách (tab. 5 a 6) či grafické prezentaci výsledků simulací.

**Tabulka 5** Experimentální hodnoty získané dockingovou simulací a vypočtené hodnoty vlastností derivátů. BE – volná vazebná energie (kcal/mol).

Označení	R	Y	BE	MW <sup>‡</sup>	log P <sup>*</sup>	PSA <sup>‡</sup>	clog P <sup>‡</sup>
takrin			-9,79	198.26	3.05	34.2	3.274
bis-7-takrin	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	takrin	-17.52	492.70	8.465	48.2	10.095
REF27	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(Me)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	takrin	-17,91	507.71	7.1	50.9	9.192
REF31	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(Me)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	takrin	-18.24	521.74	7.378	50.9	9.041
REF43	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	takrin	-17,11	526.71	8.418	48.2	10.046
JBT127	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	isochinolin	-16.24	424.60	2.799	26.8	2.938
JBT95	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	pyrazin	-15.53	375.53	1.73	38.1	0.567
JBT114	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	pyridin	-15.41	374.54	0.695	26.8	1.824
JBT128	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -	isochinolin	-16.79	438.29	3.304	26.8	3.527
JBT96	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -	pyrazin	-15.84	389.56	2.235	38.1	1.096
JBT115	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -	pyridin	-15.65	388.57	1.201	26.8	2.353
JBT129	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -	isochinolin	-17.25	452.65	3.809	26.8	4.056
JBT97	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -	pyrazin	-16.47	403.59	2.74	38.1	1.625
JBT116	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -	pyridin	-16.36	402.59	1.706	26.8	2.882

<sup>‡</sup> počítáno v ChemOffice

<sup>\*</sup> počítáno v Molinspiration

**Tabulka 6** Experimentální hodnoty získané dockingovou simulací a vypočtené hodnoty vlastností derivátů. BE – valná vazebná energie (kcal/mol).

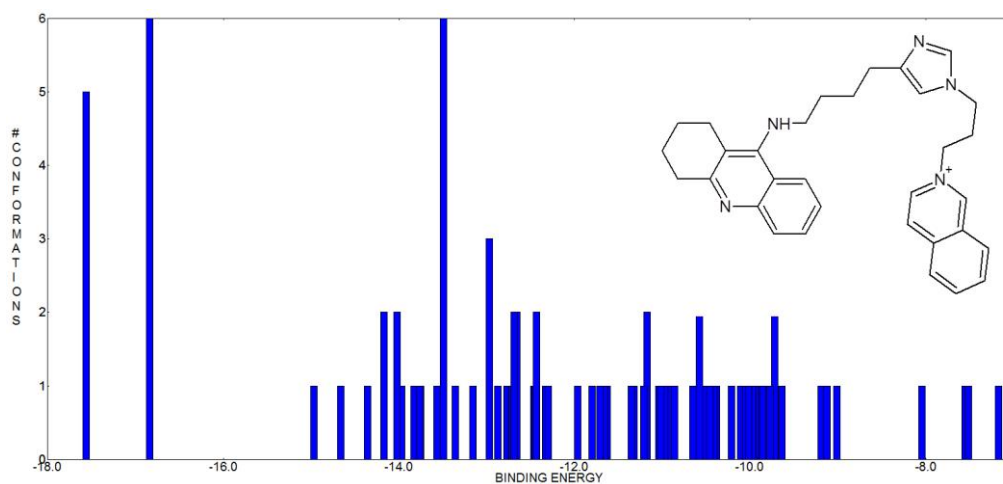
Označení	Y	R	BE	MW <sup>‡</sup>	log P *	PSA <sup>‡</sup>	clog P <sup>‡</sup>
JBT48	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	isochinolin	-17.73	500.70	4.031	26.8	4.386
JBT57	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	pyrazin	-17.42	451.63	2.963	38.1	1.955
JBT61	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	pyridin	-17.03	450.64	1.928	26.8	3.212
JBT45	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	isochinolin	-15.92	472.64	3.243	26.8	3.478
JBT59	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	pyrazin	-14.61	423.57	2.174	38.1	1.047
JBT74	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	pyridin	-14.36	422.58	1.14	26.8	2.304
JBT43	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	isochinolin	-16.58	486.67	3.761	26.8	3.857
JBT73	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	pyrazin	-15.32	437.60	2.692	38.1	1.426
JBT 65	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	pyridin	-15.01	436.61	1.658	26.8	2.683
JBT 88	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	isochinolin	-15,66	458.62	2.725	26.8	2.949
JBT 83	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	pyrazin	-14,36	409.55	1.656	38.1	0.518
JBT 81	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1,4-Ph)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	pyridin	-14,25	408.56	0.622	26.8	1.775
JBT146	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	isochinolin	-17.47	439.61	1.313	29.5	2.799
JBT 151	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	pyrazin	-16.23	390.54	0.244	40.8	0.3685
JBT 163	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	pyridin	-16.09	389.56	-0.76	29.5	1.626
JBT 148	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	isochinolin	-18.32	453.64	1.584	29.5	1.944
JBT 153	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	pyrazin	-17.16	404.57	0.515	40.8	-0.487
JBT 161	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	pyridin	-16.91	403.58	-0.52	29.5	0.77

<sup>‡</sup> počítáno v ChemOffice

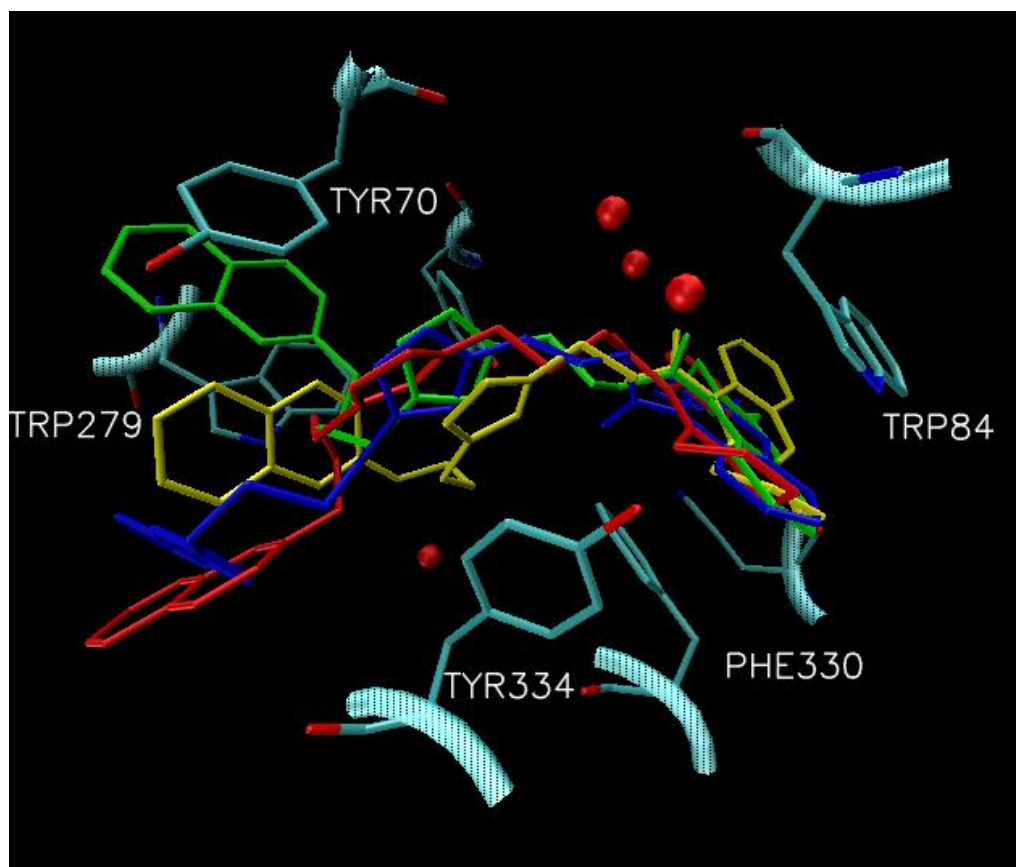
\* počítáno v Molinspiration

## Výsledky dockingové simulace JBT316

Výsledkem simulace je velké množství klastrů (graf 12). Takrinové jádro je uloženo v sendvičové struktuře mezi Phe330 a Trp84. Zatímco chinolinové jádro poskytuje značné množství pozic (obr. 52). Vypočtené fyzikální hodnoty jsou v požadovaném rozmezí  $-\log P = 1.654$ ,  $PSA = 46.63 \text{ \AA}^2$  a  $MW = 490.675$ .



Graf 12 Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro takrinový derivát JBT316.

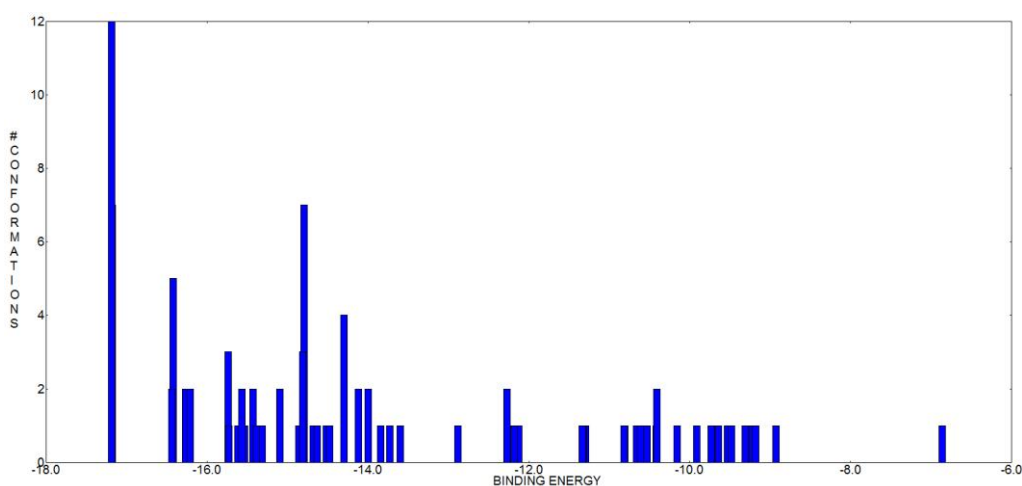


Obr. 52 Vizualizace simulace JBT316. Barevně zobrazeny nejlepší zástupci z klastrů.

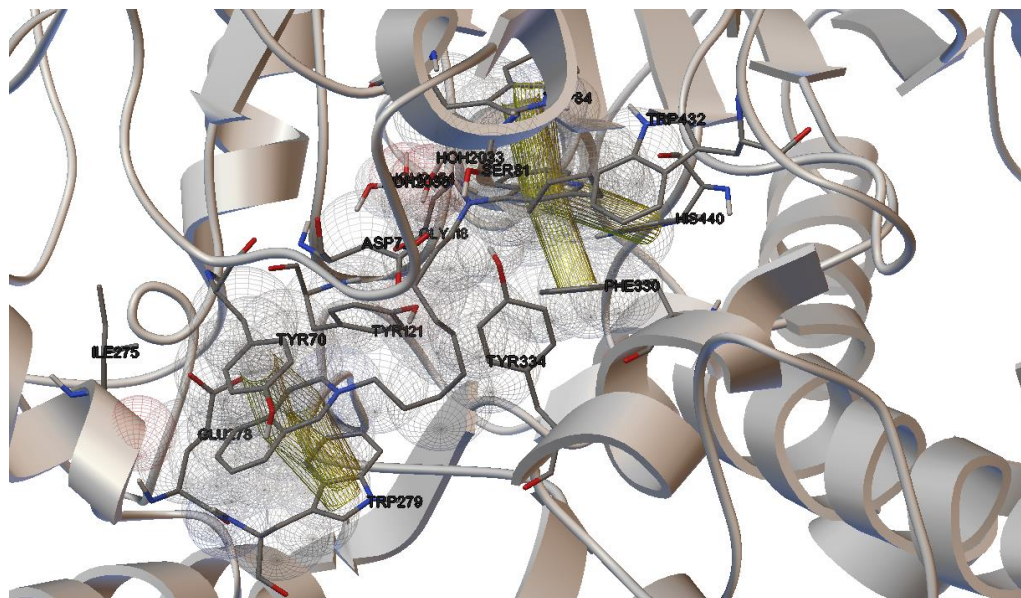


## Výsledky dockingové simulace JBT129

JBT129 spojuje THA a isochinolin devítiuhlíkatým řetězcem (obr. 53). Pozice obou jader je u všech těchto derivátů stejná. THA část je uložena na dně kavity mezi Trp84 (3.45 Å) a Phe330 (2.90 Å). Pozorován je i početný klastř s opačnou orientací jádra než je tomu v krystalové struktuře enzymu s takrinem (graf 13). Isochinolinové jádro je umístěno mezi Trp279 (3.55 Å) a Tyr70 (3.38 Å). Svými vlastnostmi ( $\log P = 3.8$ , MW = 352.62, PSA = 26.8 Å<sup>2</sup>) je JBT129 vhodnou předlohou pro strukturální obměny.



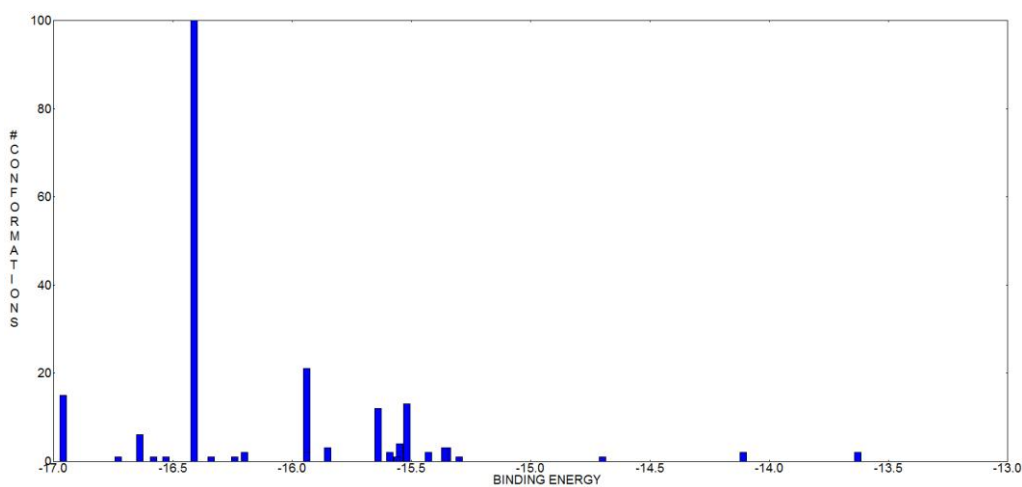
Graf 13 Četnost klastřů a jejich energetické ohodnocení pro takrinový derivát JBT129.



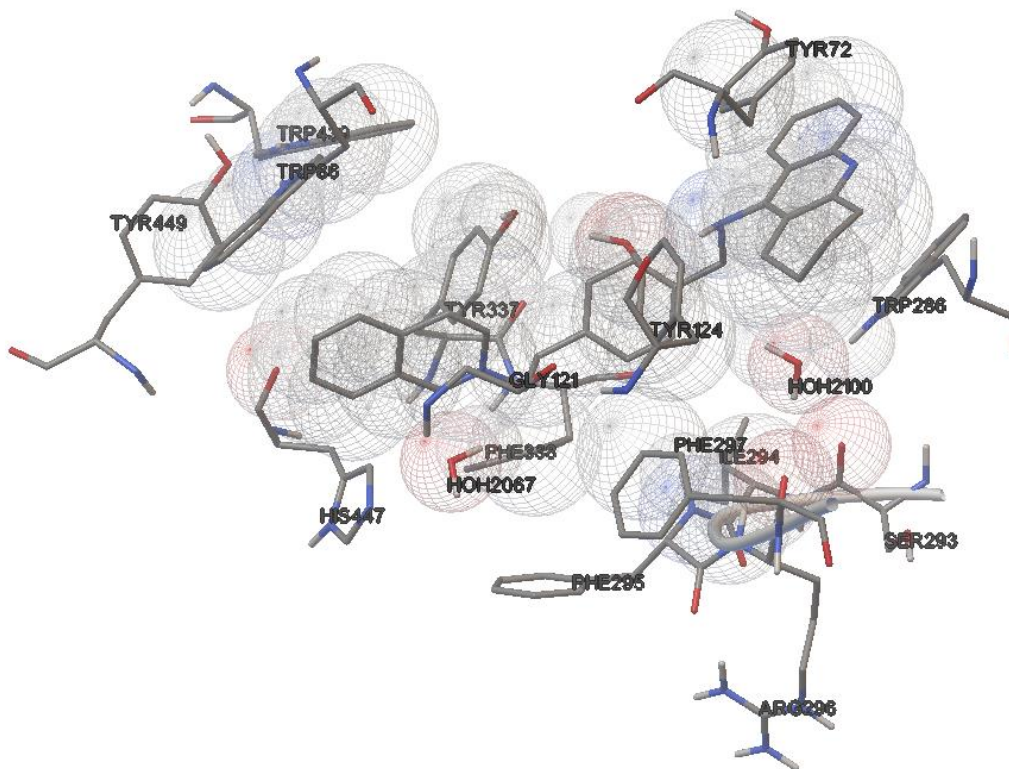
Obr. 53 Vizualizace předpokládané orientace derivátu JBT129 v kavitě enzymu.

## Výsledky dockingové simulace JBT41

Takrinové jádro JBT41 nejpočetnějšího klastru (graf 14) utváří pomocí  $\pi$ - $\pi$  interakcí sendvičovou strukturu s Trp286 (3.49 Å) a Tyr72 (3.62 Å) v PAS. Aminokupina pak utváří vodíkové můstky s Tyr124 (2.95 Å) a molekulou vody Wat2100 (3.02 Å). Benzenové jádro spojovacího řetězce utváří  $\pi$ - $\pi$  interakce „edge to face“ charakteru s Tyr124. Isochinolinové jádro pak tvoří obdobné interakce s Tyr337 (obr. 54).



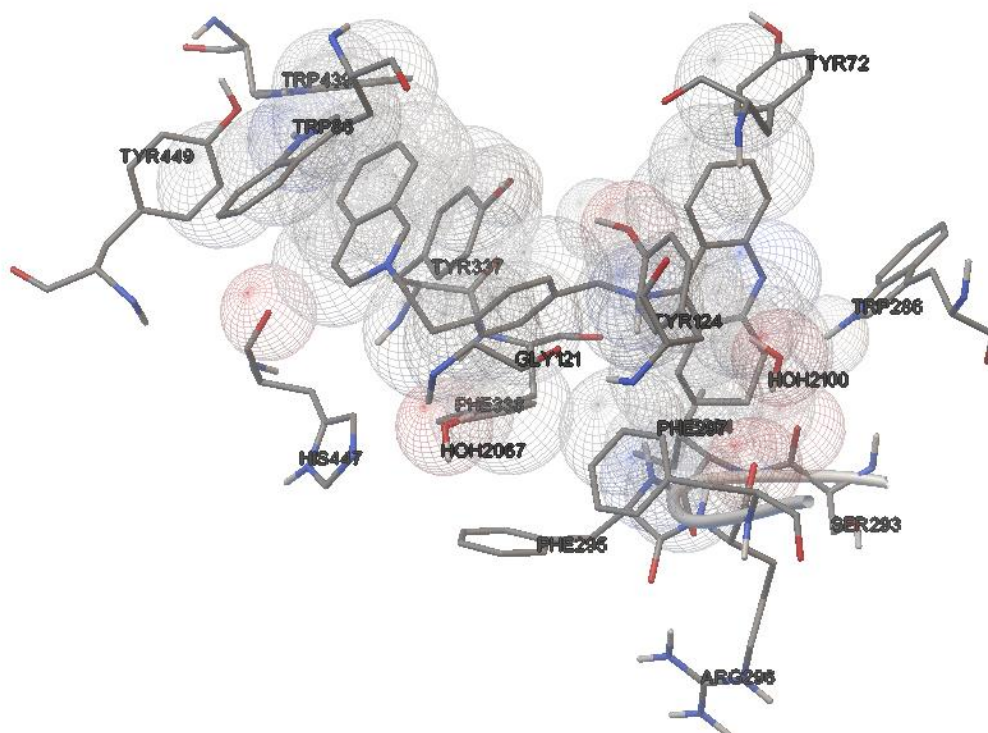
Graf 14 Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro takrinový derivát JBT41.



Obr. 54 Vizualizace nejlepší pozice JBT41 nejpočetnějšího klastru.



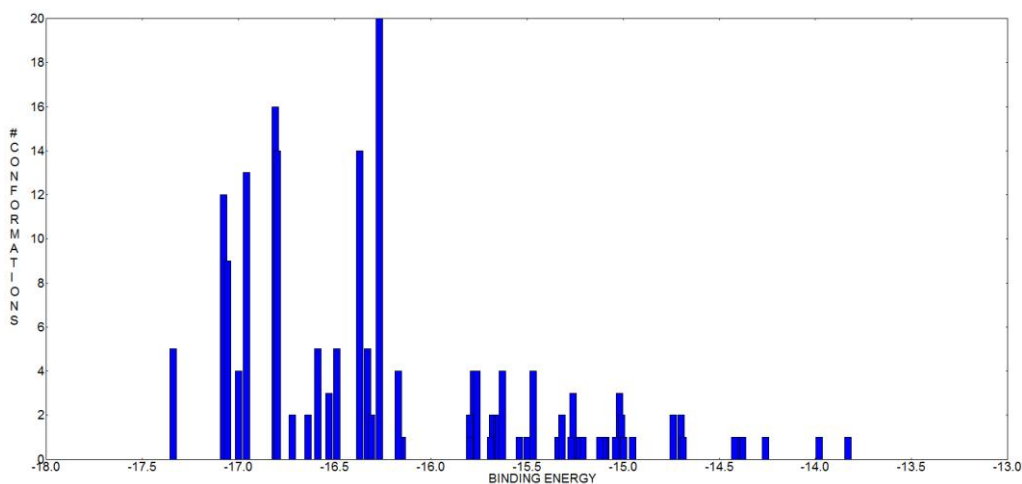
V případě energeticky nejvýhodnějšího klastru jsou jeho zástupci isochinolinovým jádrem umístěny pomocí kation- $\pi$  interakcí mezi Trp86 (3.26 Å) a Tyr337 (3.35 Å). Benzenové jádro spojovacího řetězce utváří  $\pi$ - $\pi$  interakce „edge to face“ charakteru s Tyr124 (obr. 55). Takrinové jádro je staženo do kavity a jeho aminoskupina utváří vodíkové můstky s Tyr121 (2.88 Å). Vypočetné fyzikální hodnoty pro tento derivát jsou  $\log P = 3.486$ , MW = 446.618 a PSA = 29.355 Å<sup>2</sup>.



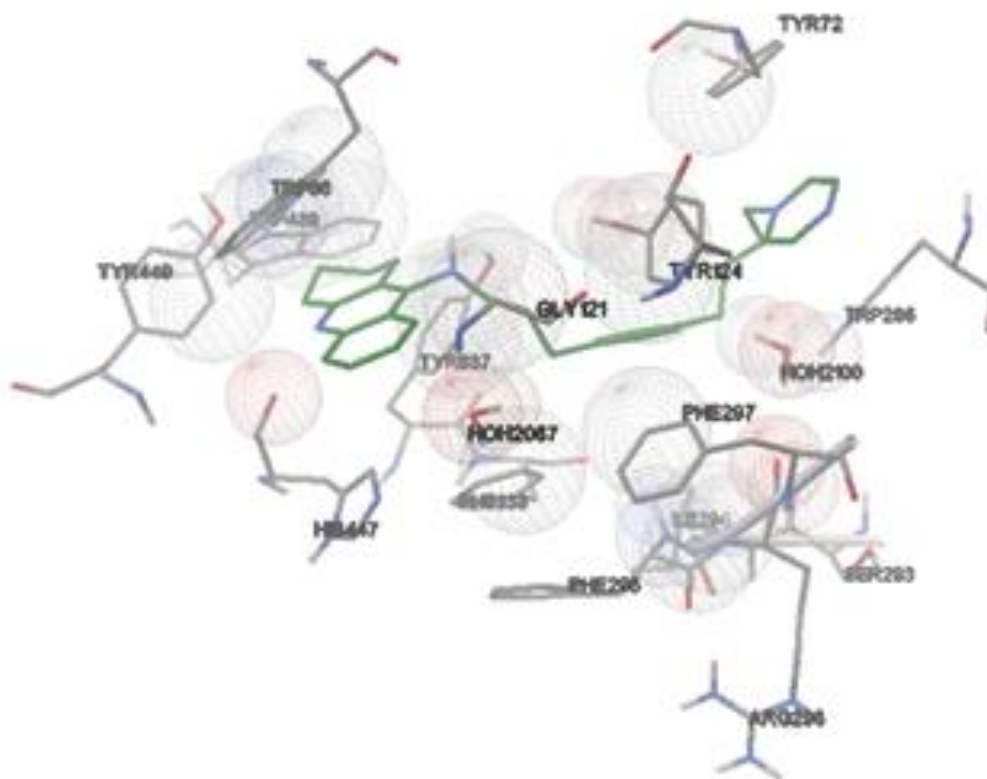
**Obr. 55** Vizualizace nejlepší pozice JBT41 energeticky nejvýhodnějšího klastru.

## Výsledky dockingové simulace JBT57

V případě derivátu JBT57 pozorujeme obdobně jako u JBT41 dva typy klastrů (graf 15), kdy jeden má takrinové jádro umístěno v PAS a pyrazinové v CAS a druhý naopak. Další četné klastry pak mají jako JBT316 takrinovou část v CAS a pyrazinová utváří značné množství pozic pomocí  $\pi$ - $\pi$  a kation- $\pi$  interakcí s různými rezidui kavity (obr. 56).



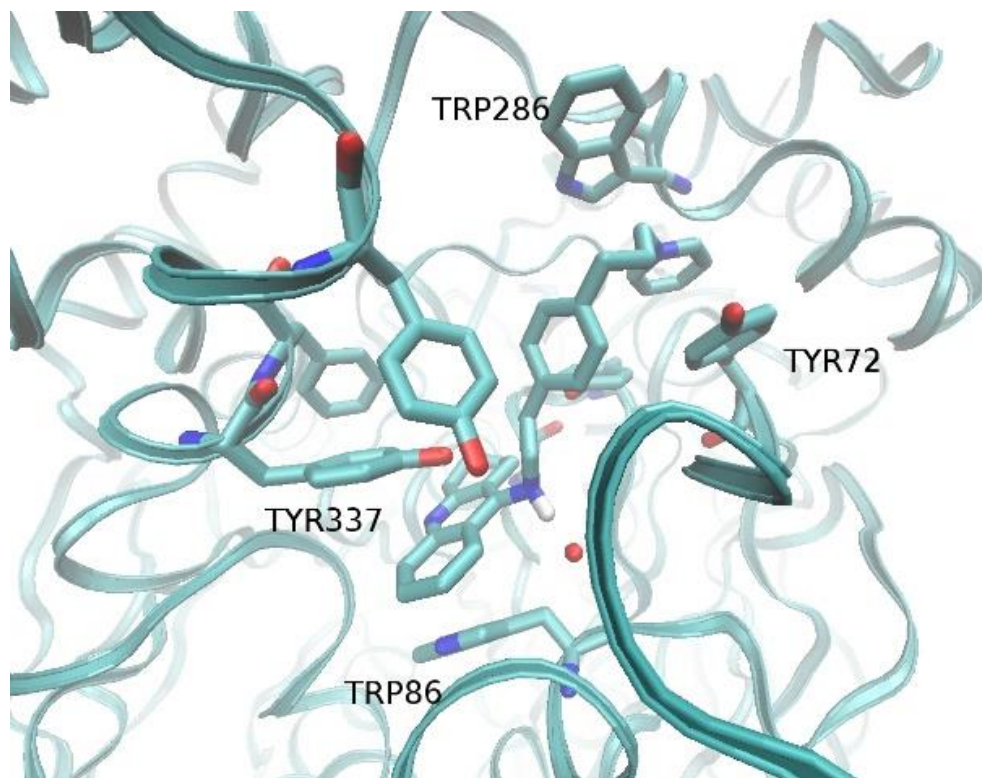
**Graf 15** Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro takrinový derivát JBT57.



**Obr. 56** Jedna z možných pozic derivátu JBT57 v kavitě enzymu.

Vlastnostmi (MW = 451.62, log  $P$  = 2.963, PSA = 38.1 Å<sup>2</sup>) splňuje požadované parametry, ale jeho aktivita bude zřejmě nižší.

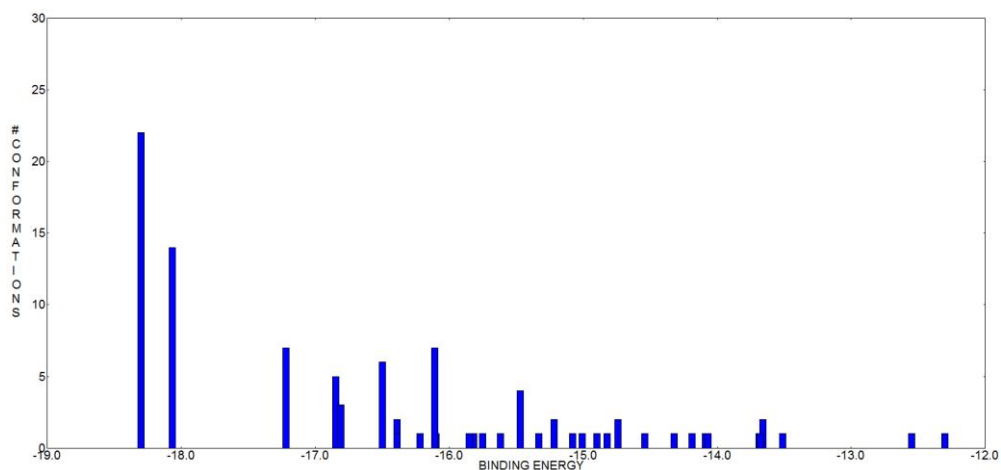
Podobné výsledky dockingových simulací pozorujeme i u ostatních derivátů, které mají do spojovacího řetězce zařazen aromatický člen (obr. 57).



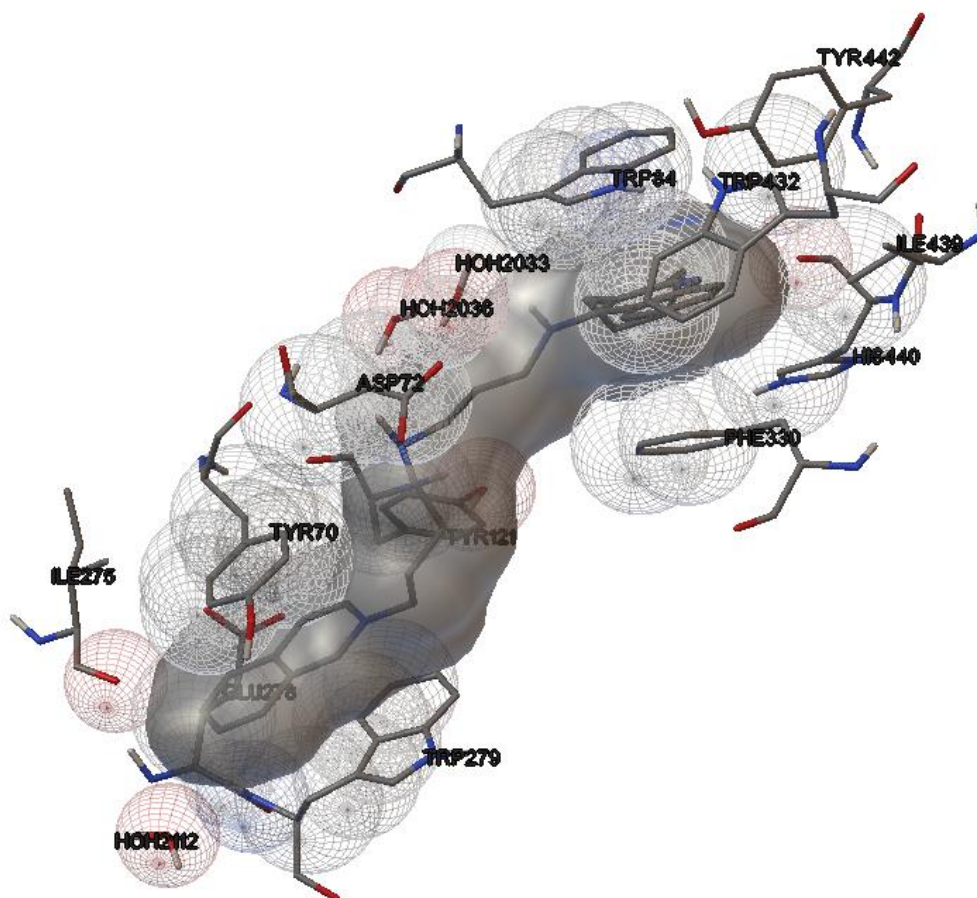
**Obr. 57** Interakce takrinového derivátu JBT71 s enzymem.

## Výsledky dockingové simulace JBT148

Derivát JBT148 přináší strukturální změnu v řetězci náhradou jednoho atomu uhlíku dusíkem. Výsledkem dockingové simulace je oproti derivátům s aromatickým členem řetězce jednoznačná orientace derivátu v kavitě enzymu (obr. 58 a 59, graf 16).

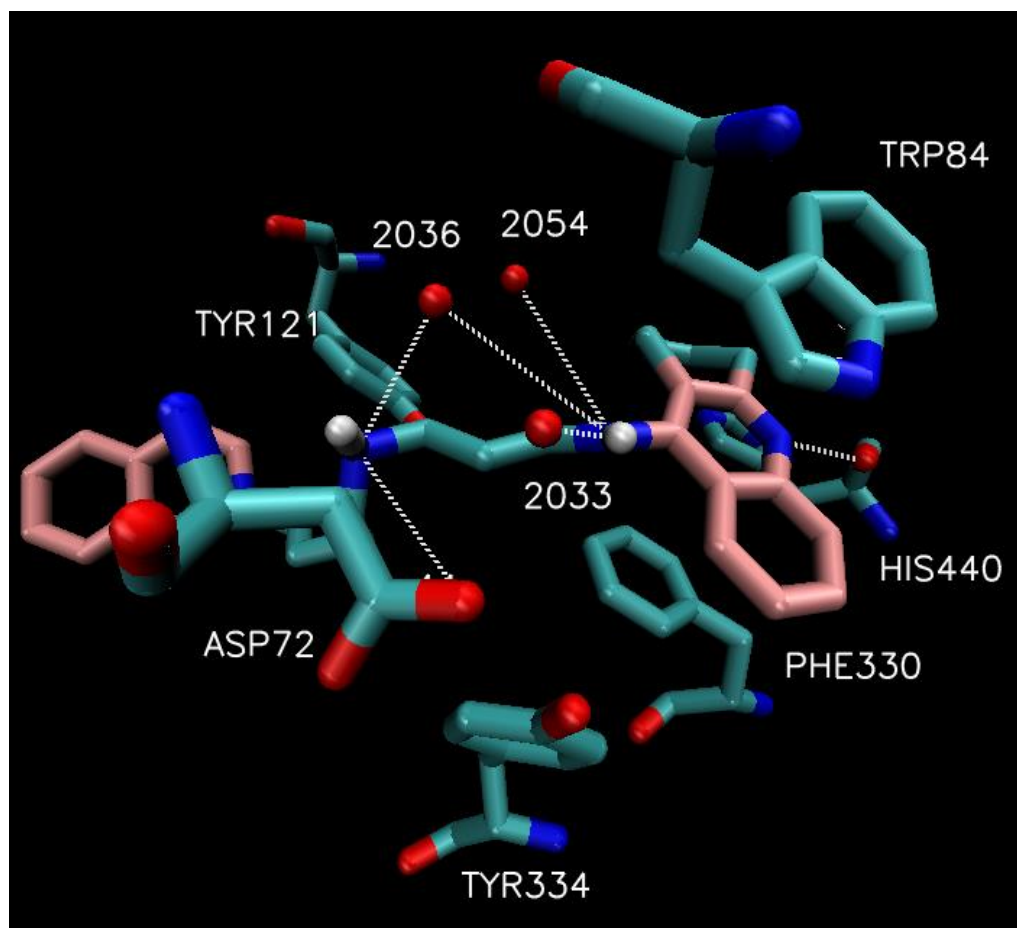


Graf 16 Četnost klastrů a jejich energetické ohodnocení pro isochinolinový derivát JBT148.



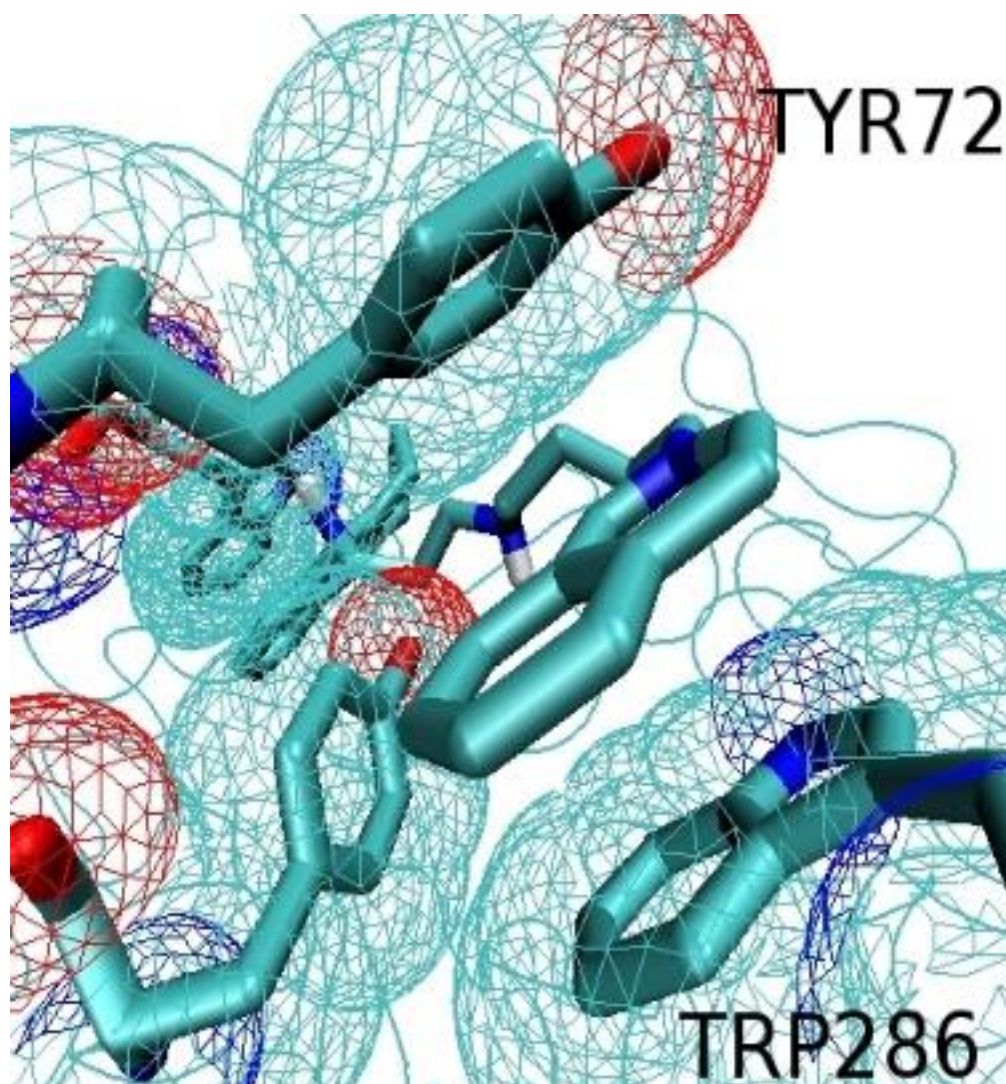
Obr. 58 Vizualizace předpokládané orientace derivátu JBT148 v kavitě enzymu.

Pozice dusíku v řetězci umožňuje tvorbu vodíkových můstků s několika partnery a podstatně se podílí na afinitě k enzymu. Takrinová část je přitahována mezi Trp84 (3.32 Å) a Phe330 (3.48 Å). Aromatický dusík tvoří vodíkové můstky s His440. Dusík aminoskupiny takrinové části stabilizuje pozici jádra pomocí tvorby vodíkových můstků s molekulami vody W2054 (2.86-3.82 Å), Wat2033 (2.92-4.05 Å) a Wat2036 (3.41-4.18 Å). Isochinolinová část je poutána mezi Trp279 (3.54 Å) a Tyr70 (3.48 Å). Zatímco atomy obou jader v rámci klastru svou pozici příliš nemění, tak dusík se pohybuje mezi jednotlivými partnery, s kterými utváří vodíkové můstky – Wat2036 (3.44 Å), Tyr121 (2.49 Å), dusík Asp72 (3.87 Å) a kyslík Asp72 (3.03 Å).



**Obr. 59** Orientace takrinové části ve dně kavity. Naznačené vodíkové můstky mezi ligandem a strukturou enzymu.





**Obr. 60** Předpokládaná orientace derivátu JBT148 v PAS enzymu.

Výsledky simulací potvrzují předpoklady o způsobu interakcí jednotlivých částí hybridních ligandů. Takrinová část je obvykle lokalizována na dně kavity v sendvičovém uspořádání mezi Trp a Phe (Tyr) a kvartérní část pak mezi Trp a Tyr v PAS (obr. 60). Charakter spojovacího řetězce ovlivňuje nejen afinitu k enzymu, ale i fyzikálně-chemické vlastnosti. Deriváty JBT148, JBT146 a JBT57 nejlépe vyhovují výše uvedeným předpokladům pro bezpečné a účinné léčivo. Výsledky byly též publikovány ve formě publikací či posterového sdělení.

## 6. Diskuse

V rámci řešení této práce bylo zkoumáno velké množství sloučenin s předpokládanou schopností ovlivňovat aktivitu cholinesteras. Byly syntetizovány a testovány na pracovištích Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Postup syntézy jednotlivých sloučenin vycházel z již dříve popsáných postupů. Reakce probíhaly v řádech desítek hodin s uspokojivou výtěžností (monokvartérní deriváty přes 50 %, biskvartérní 16–85 %). Produkty byly následně charakterizovány obvyklým způsobem.

Pro testování *in vitro* byla použita myší nebo lidská rekombinantní AChE a lidská plazmatická BChE. Všechny testované deriváty měly dostatečnou afinitu k enzymu.

Při studiu vztahů mezi strukturou a účinkem byl hodnocen vliv heteroaromatických cyklů, substituentů na těchto cyklech a dále vliv délky a charakteru spojovacího řetězce na afinitu k enzymu. Modulátory byly charakterizovány i z pohledu fyzikálně-chemických vlastností podstatných pro průnik bariérami. Optimální hodnotou  $\log P$  pro průchod HEB pasivní difúzí leží mezi 1.5–2.7. Hodnoty  $\log P$  byly vypočteny pomocí programů molinspiration a ChemOffice. Ze získaných hodnot pak můžeme usuzovat o smysluplnosti využití daného derivátu jako profylaktiku před otravou NPL nebo o přípravku pro léčbu MG či AD. Hodnoty pro látky obsahující kvartérní dusík bývají výrazně mimo toto rozmezí a jejich průnik přes HEB by měl být prakticky nulový. Avšak v několika publikacích byl popsán průnik těchto látek přes HEB. V případě biskvartérních derivátů je to 1.5 % a u monokvartérních až 10 %.(192, 193)

Rentgenová krystalografie nabízí stále více zajímavých makromolekul využitelných jako potenciálních cílů pro nová léčiva. V současné době si lze z proteinové databáze vybrat cholinesterasy například z myši, rejnoka či úhoře. Jsou uloženy v čisté formě, případně s vázaným ligandem (takrin, galantamin, HI-6). Studie umístění tohoto ligandu nám poskytuje důležité informace o interakcích těchto látek s enzymem.



Docking je metoda, která hledá uspořádání, v jakém spolu mohou tyto dvě molekuly interagovat a jako taková nabízí i výsledky dříve nepozorované či dokáže vysvětlit neočekávané nebo neobvyklé výsledky *in vitro* experimentů. Na základě dockingu byla například odhalena možnost interakce molekuly takrinu s PAS, která je jen nepatrně méně energeticky výhodná než pozice v aktivním místě enzymu prezentovaná v krystalografických studiích.

Do *in silico* studie byly zahrnuty nově i dříve syntetizované deriváty. Těchto několik set sloučenin bylo doplněno o významné modulátory aktivity AChE (takrin, donepezil). K vybudování navržených ligandů byly použity programy ChemDraw, Chimera a Antechamber. K samotnému dockování byl vybrán program AutoDock 3.0.5 a AutoDock 4.2.

Prvním cílem bylo ověření vybrané *in silico* metody. Redockingem ligandů do původní krystalové struktury bylo dosaženo žádaných výsledků. Rovněž tak byla pozorována možnost vazby takrinu v PAS, jakožto druhého nejpočetnějšího klastru. Vazebná energie je jen o 1 kcal/mol nižší, ale v krystalografických studiích nebyla nikdy pozorována.

Při porovnání krystalových struktur můžeme zjistit, že kavita se skládá z téměř rigidních reziduí, které utvářejí tuto úzkou, asi 20 Å hlubokou štěrbinu. Značnou flexibilitu vykazují jen dvě aminokyseliny – Trp286 a Phe330. Jejich flexibilita je podstatná pro vstup substrátu do kavity a jeho orientaci v ní. Ve všech strukturách lze nalézt několik molekul vody, které mají svůj význam pro stabilitu enzymu a jeho reakci se substrátem, a jejichž pozice se nemění. Nelze je tak při simulacích opomenout.

Monokvartérní inhibitory byly připraveny jednoduchou syntézou s vysokou výtěžností. Jejich afinita k enzymu je v porovnání s biskvartérními menší. Dockingové výpočty poskytují zajímavý výsledek, kdy oproti takrinovým derivátům je energeticky výhodnější pozice v PAS. Větší pozornost byla věnována 10-methylakridinium-jodidu jakožto potenciálnímu profylaktiku. Byl vyhodnocen jako slabší neselektivní inhibitor cholinestaras s nekompetitivním antagonistickým působením na M2 receptory. Vazba pomocí kationt- $\pi$  interakcí mezi Trp286 a Tyr72 utváří sendvičové uspořádání.

Biskvartérní sloučeniny byly připraveny reakcí dibromalkanů s příslušnými heteroaromáty. Ze vztahů závislosti aktivit na struktuře byl

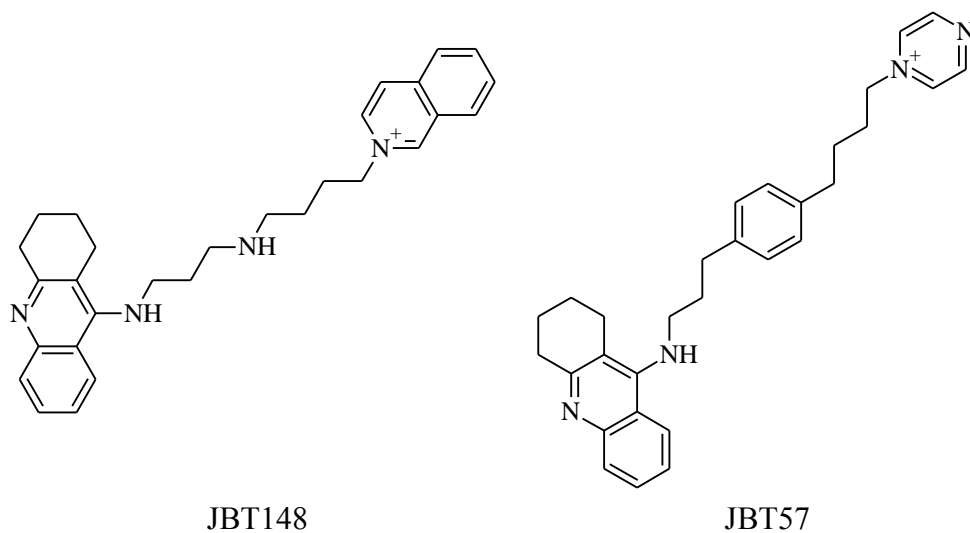
sledován vliv velikosti aromátu a délka spojovacího řetězce na afinitu k enzymu. Při porovnání *in vitro* a *in silico* experimentu lze říci, že sloučeniny s objemnějším jádrem mají vyšší afinitu k enzymu. Při návrhu nového inhibitoru je ale nutno počítat s celkovou molekulovou hmotností a vlivem jádra na další parametry. Dockingové simulace poskytují možné vysvětlení závislosti délky spojovacího řetězce na afinitu k enzymu. Deriváty s jedno až tří členným řetězcem pomocí kationt- $\pi$  interakcí poutají jedno z jader mezi Trp286 a Tyr72 a druhé pak utváří slabší interakce s aromatickými rezidui kavity. Od pěti uhlíkatého spojovacího řetězce jsou deriváty schopny obsadit celou kavitu a interagovat s oběma anionickými místy současně. Optimální délka řetězce se zdá být 16 Å (8–11 členů). Ligandy s delším řetězcem již mají nižší afinitu, což si lze vysvětlit výsledkem simulace. S rostoucím řetězcem sice nadále roste volná vazebná energie, ale četnost tohoto energeticky nejvýhodnějšího klastru se snižuje. Převládá klastr energeticky méně výhodný, kdy se jedno z jader nachází v PAS a druhé je mimo kavitu. V reálném procesu se tak zřejmě druhé jádro ke dnu kavity ani nedostane.

V této studii nelze opomenout takrin a jeho deriváty. Na katedře KTOX již bylo syntetizováno a biologicky testováno několik set sloučenin vycházejících z tohoto inhibitoru. 7-MEOTA je derivát s nižšími nežádoucími účinky a srovnatelnou účinností. Alkylací aminoskupiny byly získány deriváty s vyšší inhibiční schopností a výraznější selektivitou v poměru k BChE než má předlohou struktura. V dockingových simulacích pozorujeme obdobné interakce, jako je tomu u takrinu. Energeticky výhodnější je pozice na dně kavity, kdy derivát utváří  $\pi$ - $\pi$  interakce s elektronovým systémem jádra Trp86. Druhá pozice je pak mezi Trp286 a Tyr72 v PAS enzymu. Aminoskupina umožňuje tvorbu vodíkových můstků. V případě dimerních sloučenin se pak molekula roztáhne přes celou kavitu a obsazuje obě anionická místa současně. Nejvýhodnější se jeví sedmiuhlíkatý řetězec. Derivát však má vysokou hodnotu  $\log P$  (8.5). Navrženou obměnou spojovacího řetězce bylo dosaženo jednak snížení této hodnoty, a díky tvorbě vodíkových můstků s aminokyselinami hrdla kavity i zvýšení afinity k enzymu.

Spojovací řetězec nabízí velké množství obměn, z nichž největší význam má zavedení atomů či funkčních skupin schopných utvářet vodíkové můstky

přímo či přes molekuly vody s rezidui kavity. Zavedením aromatického jádra do spojovacího řetězce lze rovněž ovlivnit aktivitu, protože u takových derivátů se mohou uplatnit  $\pi$ - $\pi$  interakce, za předpokladu, že mezi aromatickými systémy bude alespoň tříčlenný spojovací řetězec.

Ze získaných údajů lze vyvodit závěr, že kvartérní deriváty preferují kation- $\pi$  interakci s Trp v PAS. Naproti tomu takrinové deriváty utvářejí  $\pi$ - $\pi$  interakce s Trp v aktivním místě. Navržena byla proto hybridní struktura, kdy jedno z jader je takrinové a druhé kvartérní. Volbou spojovacího řetězce je pak možné ovlivnit nejen afinitu, ale i fyzikálně chemické vlastnosti. Optimální vlastnosti vykazují navržené struktury JBT148 a JBT57 (obr. 61).



**Obr. 61** Deriváty JBT148 a JBT57.

## 7. Závěr

V této disertační práci byl podán přehled o současném stavu problematiky modulátorů cholinesteras. V úvodu jsou zmíněny poznatky o struktuře enzymů. Popsána jsou rezidua enzymu podstatná pro interakci se substrátem a interakce s modulátory používanými v současné medicíně.

Byla ověřena metodika predikce pro ligand-enzymové komplexy. Celkem bylo *in silico* testováno několik set struktur pravděpodobných modulátorů cholinesteras. Nově syntetizované deriváty byly popsány standardními metodami a pomocí softwarových metod byly vypočteny nebo predikovány jejich fyzikálně chemické vlastnosti.

Do studie vztahů mezi strukturou a mechanismem interakce s enzymem bylo zařazeno i několik hypotetických enzymových modulátorů, jejichž struktura byla navržena na základě dříve získaných poznatků. Jednalo se o analoga již syntetizovaných a popsáných derivátů, ale i o úplně nové substance. Všechny studované deriváty jsou schopné významně ovlivňovat aktivitu enzymu. Byl popsán mechanismus jejich interakce s enzymem a vliv obměn struktury ligandu na jeho aktivitu.

Bylo navrženo několik struktur tak, aby splňovaly předpoklady o prostupu tělními bariérami, potlačenými nežádoucími účinky a dostatečnou afinitou k enzymu. Výsledky práce byly publikovány v odborných časopisech a prezentovány formou posterů na odborných konferencích v České Republice i v zahraničí.

## 8. Seznam publikovaných prací

### 8.1 Publikace

1. SOUKUP, O.; PROSKA, J.; BINDER, J.; KARASOVA, J. Z.; TOBIN, G.; JUN, D.; MAREK, J.; MUSILEK, K.; FUSEK, J.; KUČA, K., Methylacridinium and its cholinergic properties. *Neurotoxicity research* 2009, 16 (4), 372–7.
2. POHANKA, M., BINDER, J., KUČA, K.: Sarin assay using acetylcholinesterases and electrochemical sensor strip. *Def. Sci. J.* 2009, 59, 300–304.
3. JUN, D., PAAR, M., BINDER, J., MAREK, J., POHANKA, M., STODŮLKA, P., KUČA, K. Preparation and in vitro evaluation of monoquarternary inhibitor of brain cholinesterase. *Lett. Org. Chem.* 2009, 6, 500–503.
4. SOUKUP, O., HOLAS, O., BINDER, J., KILLY, K., TOBIN, G., JUN, D., FUSEK, J., KUČA, K. The effect of trimedoxime on acetylcholinesterase and on the cholinergic system of the rat bladder. *J. Appl. Biomed.* 2010, 8, 87–92.
5. BINDER, J., PAAR, M., JUN, D., POHANKA, M., HRABINOVÁ, M., OPLETALOVÁ, V., KUČA, K. New bisquarternary isoquinolinium inhibitors of brain cholinesterases – synthesis and anticholinesterase activity. *Lett. Drug Des. Discov.* 2010, 7, 1–4.
6. KOVARIK, Z., KATALINIĆ, M., ŠINKO, G., BINDER, J., HOLAS, O., JUNG, Y.-S., MUSILOVÁ, L., JUN, D., KUČA, K. Pseudo-catalytic scavenging: searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 2010, 187, 167–171.

7. SOUKUP, O., TOBIN, G., KUMAR, U. K., BINDER, J., PROŠKA, J., JUN, D., FUSEK, J., KUČA, K. Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic system. *Curr. Med. Chem.* 2010, *17*, 1708–1718.

8. KORÁBEČNÝ, J., MUSÍLEK, K., HOLAS, O., BINDER, J. et al. 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.

## 8.2 Abstrakty z konferencí

1. BINDER, J., KUČA, K., JUN, D., WIESNER, J., OPLETALOVÁ, V.: *In silico* studium inhibitorů acetylcholinesterasy, Sborník 7. Konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČSL JEP, Hradec Králové, 24. - 25. října 2007. [CD-ROM ed.] Hradec Králové, FVZ UO, 2007; ISBN 987-80-7231-324-2

2. BINDER, J., KUČA, K., JUN, D., WIESNER, J., OPLETALOVÁ, V.: Studium inhibitorů acetylcholinesterasy. Sborník abstraktů 42. konference „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii“ Nymburk, 16. - 19. listopadu 2007. In: *Chem. Listy* **2007**, *101*, 931; ISSN 1213-7103 (*electronic*), 0009-2770 (*printed*); *IF*<sub>2007</sub> = 0,683

3. BINDER, J., KUČA, K., JUN, D., OPLETALOVÁ, V.: Studium inhibitorů acetylcholinesterasy. Sborník abstraktů 37. Konference „Syntéza a analýza léčiv“, Brno, 8. - 10. září 2008. In: *Chem. Listy* **2008**, *102*, s211; ISSN 1213-7103 (*electronic*), 0009-2770 (*printed*); *IF*<sub>2007</sub> = 0,683

4. BINDER, J.; HOLAS, O.; OPLETALOVÁ, V.; KUČA, K.; MUSÍLEK, K.; KORÁBEČNÝ, J.; JUN, D. Design, synthesis and biological evaluation of new effective acetylcholinesterase inhibitors. 10th International Meeting on Cholinesterases Sibenik (Croatia) 20. - 25. září 2009, Book of abstracts, P3–5, p. 92.

5. BINDER, J.; KUČA, K.; JUN, D.; KORÁBEČNÝ, J.; OPLETALOVÁ V. Design, syntéza a biologické testování nových inhibitorů acetylcholinesterasy. 38. konference Syntéza a analýza léčiv Hradec Králové (Česká republika) 14. - 16. září 2009, Sborník p. 68.

6. KORÁBEČNÝ, J.; HOLAS, O.; BINDER, J.; ZEMEK, F.; MAREK, J.; MUSÍLEK, K.; POHANKA, M.; OPLETALOVÁ, V.; DOHNAL, V.; KUČA, K. Syntéza a in vitro hodnocení duálních inhibitorů cholinesteras se strukturálním základem 7-MEOTA. 39. konference Syntéza a analýza léčiv Modra-Harmónia (Slovenská republika) 2. - 4. září 2010 sborník, p. 84.

7. KORÁBEČNÝ, J.; HOLAS, O.; MUSÍLEK, K.; OPLETALOVÁ, V.; BINDER, J.; POHANKA, M.; ZDAROVA-KARASOVÁ J.; KUČA, K. Syntéza a in vitro evaluace centrálně účinných inhibitorů acetylcholinesterasy odvozených od struktury 7-MEOTA. 9. konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČLS JEP Hradec Králové (Česká republika) 26. - 27. listopadu 2009, Sborník příspěvků, p. 80-83.

## 9. Seznam použité literatury

1. Beers WH, Reich E. Structure and activity of acetylcholine. *Nature*. 1970;228(5275):917-22. 1970/12/05.
2. Birks RI, Macintosh FC. Acetylcholine metabolism at nerve-endings. *Br Med Bull*. 1957;13(3):157-61. 1957/09/01.
3. Sarter M, Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(1):48-56. 2004/12/22.
4. Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacology*. 2009;60(1):3-21. 2009/05/15.
5. Lincová D, Farghali H. Základní a aplikovaná farmakologie. 2nd ed. Praha: Galén; 2007.
6. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol*. 2005;346(4):967-89. 2005/02/11.
7. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci*. 1993;16:403-43. 1993/01/01.
8. McGehee DS, Role LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:521-46. 1995/01/01.
9. Zuber B, Unwin N. Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10622-7. 2013/06/12.
10. Eglen RM, Nahorski SR. The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol*. 2000;130(1):13-21. 2000/04/26.
11. Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, et al. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci*. 2003;17(7):1403-10. 2003/04/26.
12. Levey AI. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life sci*. 1993;52(5-6):441-8. 1993/01/01.
13. Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2013;504(7478):101-6. 2013/11/22.
14. Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, et al. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2012;482(7386):552-6. 2012/02/24.



15. Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, et al. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*. 1986;319(6052):407-9. 1986/01/05.
16. Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1975;43:103-218. 1975/01/01.
17. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*. 1989;260(3):625-34. 1989/06/15.
18. Patocka J, Kuca K, Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2004;47(4):215-28. 2005/04/22.
19. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem*. 1987;262(2):549-57. 1987/01/15.
20. Berry WK. The turnover number of cholinesterase. *Biochem J*. 1951;49(5):615-20. 1951/10/01.
21. Taylor P. Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998;51(1 Suppl 1):S30-5; discussion S65-7. 1998/07/23.
22. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):9031-5. 1993/10/01.
23. Wiesner J, Kriz Z, Kuca K, Jun D, Koca J. Acetylcholinesterases: the structural similarities and differences. *J Enzyme Inhib*. 2007;22(4):417-24. 2007/09/13.
24. Leszczynski JF, Rose GD. Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure. *Science*. 1986;234(4778):849-55. 1986/11/14.
25. Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(11):5128-32. 1993/06/01.
26. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(3):293-302. 2005/05/24.
27. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41141-7. 2003/07/19.
28. Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed

with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2000;56(Pt 11):1385-94. 2000/10/29.

29. Wiesner J, Kriz Z, Kuca K, Jun D, Koca J. Influence of the acetylcholinesterase active site protonation on omega loop and active site dynamics. *J Biomol Struct Dyn*. 2010;28(3):393-403. 2010/10/06.

30. Masson P, Xie W, Froment MT, Lockridge O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the Omega loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1544(1-2):166-76. 2001/05/09.

31. Masson P, Legrand P, Bartels CF, Froment MT, Schopfer LM, Lockridge O. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*. 1997;36(8):2266-77. 1997/02/25.

32. Taylor P. The cholinesterases. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4025-8. 1991/03/05.

33. Lushington GH, Guo JX, Hurley MM. Acetylcholinesterase: molecular modeling with the whole toolkit. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(1):57-73. 2006/02/04.

34. Kronman C, Ordentlich A, Barak D, Velan B, Shafferman A. The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 1994;269(45):27819-22. 1994/11/11.

35. Sanson B, Colletier JP, Xu Y, Lang PT, Jiang H, Silman I, et al. Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Sci*, 2011;20(7):1114-8. 2011/05/20.

36. Tai K, Shen T, Henchman RH, Bourne Y, Marchot P, McCammon JA. Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *J Am Chem Soc*. 2002;124(21):6153-61. 2002/05/23.

37. Van Belle D, De Maria L, Iurcu G, Wodak SJ. Pathways of ligand clearance in acetylcholinesterase by multiple copy sampling. *J Mol Biol*. 2000;298(4):705-26. 2000/05/02.

38. Yan A, Wang K. Quantitative structure and bioactivity relationship study on human acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(9):3336-42. 2012/03/31.

39. Suh GH, Ryu SH, Lee DW, Han C, Ju YS, Kee BS, et al. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer disease: do they provide more than symptomatic benefits? *Am J Geriatr Psychiatry*. 2011;19(3):266-73. 2010/09/03.

40. Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem*. 2004;38:151-216. 2004/11/04.

41. Jun D, Musilova L, Musilek K, Kuca K. In vitro ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci.* 2011;12(3):2077-87. 2011/06/16.
42. Eddleston M, Phillips MR. Self poisoning with pesticides. *Br Med J.* 2004;328(7430):42-4. 2004/01/03.
43. Yokoyama K, Araki S, Murata K, Nishikitani M, Okumura T, Ishimatsu S, et al. Chronic neurobehavioral and central and autonomic nervous system effects of Tokyo subway sarin poisoning. *J Physiol Paris.* 1998;92(3-4):317-23. 1998/10/28.
44. Kovarik Z, Calic M, Sinko G, Bosak A, Berend S, Vrdoljak AL, et al. Oximes: Reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. *Chem Biol Interact.* 2008;175(1-3):173-9. 2008/05/27.
45. Shrot S, Markel G, Dushnitsky T, Krivoy A. The possible use of oximes as antidotal therapy in organophosphate-induced brain damage. *Neurotoxicology.* 2009;30(2):167-73. 2009/01/20.
46. Sudarsanam TD, Pichaimuthu K, Zachariah A, John G. Oximes in acute organophosphate poisoning. *Crit Care Med.* 2006;34(8):2265. 2006/08/03.
47. Soukup O, Tobin G, Kumar UK, Binder J, Proska J, Jun D. Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic systems. *Curr Med Chem.* 2010;17(16):1708-18. 2010/03/30.
48. Bajgar J, Fusek J, Kuca K, Bartosova L, Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Rev Med Chem.* 2007;7(5):461-6. 2007/05/17.
49. Pohanka M, Binder J, Kuca K. Sarin Assay using Acetylcholinesterases and Electrochemical Sensor Strip. *Def Sci J.* 2009;59:300-4.
50. Kassa J, Jun D, Kuca K, Bajgar J. Comparison of reactivating and therapeutic efficacy of two salts of the oxime HI-6 against tabun, soman and cyclosarin in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;101(5):328-32. 2007/10/04.
51. Reiner E, Plestina R. Regeneration of cholinesterase activities in humans and rats after inhibition by O,O-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979;49(3):451-4. 1979/07/01.
52. Wilson IB, Bergmann F, Nachmansohn D. Acetylcholinesterase. X. Mechanism of the catalysis of acylation reactions. *J Biol Chem.* 1950;186(2):781-90. 1950/10/01.
53. Kuca K, Hrabínova M, Soukup O, Tobin G, Karasova J, Pohanka M. Pralidoxime: the gold standard of acetylcholinesterase reactivators – reactivation in vitro efficacy. *Bratisl Lek Listy.* 2010;111(9):502-4. 2010/12/25.

54. Kuca K, Musilek K, Jun D, Karasova J, Soukup O, Pejchal J. Structure-activity relationship for the reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agent VX. *Med Chem*. 2013;9(5):689-93. 2012/07/12.
55. Doctor BP, Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem Biol Interact*. 2005;157-158:167-71. 2005/11/19.
56. Rochu D, Chabriere E, Masson P. Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology*. 2007;233(1-3):47-59. 2006/09/30.
57. Andersen JB, Engeland A, Owe JF, Gilhus NE. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *Eur J Neurol*. 2010;17(12):1445-50. 2010/05/25.
58. Haigh JR, Adler M, Apland JP, Deshpande SS, Barham CB, Desmond P, et al. Protection by pyridostigmine bromide of marmoset hemi-diaphragm acetylcholinesterase activity after soman exposure. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):416-20. 2010/02/11.
59. Weintraub D, Somogyi M, Meng X. Rivastigmine in Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia: an ADAS-cog factor analysis. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2011;26(6):443-9. 2011/10/20.
60. Spencer CM, Noble S. Rivastigmine. A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs aging*. 1998;13:391-411.
61. Juel VC, Massey JM. Autoimmune Myasthenia Gravis: Recommendations for Treatment and Immunologic Modulation. *Curr Treat Options Neurol*. 2005;7(1):3-14. 2004/12/22.
62. Anderson DR, Harris LW, Woodard CL, Lennox WJ. The effect of pyridostigmine pretreatment on oxime efficacy against intoxication by soman or VX in rats. *Drug Chem Toxicol*. 1992;15(4):285-94. 1992/01/01.
63. Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-14. 1982/07/30.
64. Okuno S, Sakurada K, Ohta H, Ikegaya H, Kazui Y, Akutsu T, et al. Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227(1):8-15. 2007/10/30.
65. Lorke DE, Kalasz H, Petroianu GA, Tekes K. Entry of oximes into the brain: a review. *Curr Med Chem*. 2008;15(8):743-53. 2008/04/09.
66. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996;46(1):130-5. 1996/01/01.

67. Weuve J, Hebert LE, Scherr PA, Evans DA. Prevalence of Alzheimer disease in US states. *Epidemiology*. 2015;26(1):e4-6. 2014/12/02.
68. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120(3):885-90. 1984/05/16.
69. Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1991;12(4):295-312. 1991/07/01.
70. Frolich L. The cholinergic pathology in Alzheimer's disease: discrepancies between clinical experience and pathophysiological findings. *J Neural Transm*. 2002;109(7-8):1003-13. 2002/07/12.
71. Arlt S, Demiralay C, Tharun B, Geisel O, Storm N, Eichenlaub M, et al. Genetic risk factors for depression in Alzheimer's disease patients. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(1):72-81. 2012/11/20.
72. Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, et al. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet*. 1998;7(12):1887-92. 1998/11/13.
73. Huang W, Qiu C, von Strauss E, Winblad B, Fratiglioni L. APOE genotype, family history of dementia, and Alzheimer disease risk: a 6-year follow-up study. *Arch Neurol*. 2004;61(12):1930-4. 2004/12/15.
74. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med*. 1996;47:387-400. 1996/01/01.
75. Folin M, Baiguera S, Conconi MT, Di Liddo R, De Carlo E, Parnigotto PP, et al. Apolipoprotein E as vascular risk factor in neurodegenerative dementia. *Int J Mol Med*. 2004;14(4):609-13. 2004/09/18.
76. Vilalta-Franch J, Lopez-Pousa S, Calvo-Perxas L, Garre-Olmo J. Psychosis of Alzheimer disease: prevalence, incidence, persistence, risk factors, and mortality. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the Am J Geriatr Psychiatry*. 2013;21(11):1135-43. 2013/04/10.
77. Sato N. [Alzheimer disease and non-genetic risk factors]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 2012;49(3):311-3. Japanese. 2012/12/28.
78. Jones KR, Black MJ, Oorschot DE. Do aluminium and/or glutamate induce Alzheimer PHF-like formation? An electron microscopic study. *J Neurocytol*. 1998;27(1):59-68. 1998/04/08.
79. Kaul PN. Enzyme inhibiting action of tetrahydroaminoacridine and its structural fragments. *J Pharm Pharmacol*. 1962;14:243-8. 1962/04/01.

80. Drukarch B, Leysen JE, Stoof JC. Further analysis of the neuropharmacological profile of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci.* 1988;42(9):1011-7. 1988/01/01.
81. Perry EK, Smith CJ, Court JA, Bonham JR, Rodway M, Atack JR. Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding in vitro. *Neurosci Lett.* 1988;91(2):211-6. 1988/08/31.
82. Zemlan FP. Velnacrine for the treatment of Alzheimer's disease: a double-blind, placebo-controlled trial. The Mentane Study Group. *J Neural Transm.* 1996;103(8-9):1105-16. 1996/01/01.
83. Roshchina IF, Kolykhalov IV, Selezneva ND, Zharikov GA, Gerasimov NP, Gavrilova SI. [The influence of cerebrolysin on the efficiency of subsequent therapy with amiridine++ in Alzheimer's disease patients (neuropsychological investigation)]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 1999;99(12):43-6. Russian 2000/01/12.
84. Proctor GR, Harvey AL. Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* 2000;7(3):295-302. 2000/01/19.
85. Recanatini M, Cavalli A, Belluti F, Piazzini L, Rampa A, Bisi A, et al. SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J Med Chem.* 2000;43(10):2007-18. 2000/05/23.
86. Hardiman S, Miller K, Murphy M. Clinical trials with velnacrine: (PROPP) the physician reference of predicted probabilities – a statistical model for the estimation of hepatotoxicity risk with velnacrine maleate. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1993;149:46-52. 1993/01/01.
87. Murphy MF, Hardiman ST, Nash RJ, Huff FJ, Demkovich JJ, Dobson C, et al. Evaluation of HP 029 (velnacrine maleate) in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;640:253-62. 1991/01/01.
88. Ishii Y, Sumi T. Evaluation of a cholinomimetic drug, 9-amino-2,3,5,6,7,8-hexahydro-1H-cyclopenta [b] quinoline (NIK-247), as an enhancer of endogenous efflux of acetylcholine from brain slices. *Neuropharmacology.* 1992;31(1):61-6. 1992/01/01.
89. dos Santos Pisoni D, Sobieski da Costa J, Gamba D, Petzhold CL, de Amorim Borges AC, Ceschi MA, Lunardi P, Saraiva Gonçalves CA. Synthesis and AChE inhibitory activity of new chiral tetrahydroacridine analogues from terpenic cyclanones. *Eur J Med Chem.* 2010;45:526–35.
90. Pang YP, Quiram P, Jelacic T, Hong F, Brimijoin S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 1996;271(39):23646-9. 1996/09/27.

91. Li W, Xue J, Niu C, Fu H, Lam CS, Luo J, et al. Synergistic neuroprotection by bis(7)-tacrine via concurrent blockade of N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Mol Pharmacol.* 2007;71(5):1258-67. 2007/02/15.
92. Li C, Carlier PR, Ren H, Kan KK, Hui K, Wang H, et al. Alkylene tether-length dependent gamma-aminobutyric acid type A receptor competitive antagonism by tacrine dimers. *Neuropharmacology.* 2007;52(2):436-43. 2006/10/24.
93. Zhou L, Liu YW, Peoples RW, Yang M, Tian X, Ai YX, et al. Mechanism of bis(7)-tacrine inhibition of GABA-activated current in cultured rat hippocampal neurons. *Neuropharmacology.* 2009;57(1):33-40. 2009/04/28.
94. Alonso D, Dorronsoro I, Rubio L, Munoz P, Garcia-Palomero E, Del Monte M, et al. Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(24):6588-97. 2005/10/19.
95. Carlier PR, Du DM, Han Y, Liu J, Pang YP. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(16):2335-8. 1999/09/07.
96. Munoz-Torrero D, Camps P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Med Chem.* 2006;13(4):399-422. 2006/02/16.
97. Kawakami Y, Inoue A, Kawai T, Wakita M, Sugimoto H, Hopfinger AJ. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorg Med Chem.* 1996;4(9):1429-46. 1996/09/01.
98. Inoue A, Kawai T, Wakita M, Iimura Y, Sugimoto H, Kawakami Y. The simulated binding of (+/-)-2,3-dihydro-5,6-dimethoxy-2-[[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]methyl]-1H-inden-1-one hydrochloride (E2020) and related inhibitors to free and acylated acetylcholinesterases and corresponding structure-activity analyses. *J Med Chem.* 1996;39(22):4460-70. 1996/10/25.
99. Kryger G, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure.* 1999;7(3):297-307. 1999/06/16.
100. Sugimoto H, Yamanishi Y, Iimura Y, Kawakami Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2000;7(3):303-39. 2000/01/19.
101. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem.* 2012;55(22):10282-6. 2012/10/06.
102. Kaur J, Zhang MQ. Molecular modelling and QSAR of reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2000;7(3):273-94. 2000/01/19.

103. Proskurnina NF, Yakovleva, A. [Alkaloids of galanthus woronowi. II. Isolation of a new alkaloid] *Zhurnal Obshchei Khimii*. 1952(22):1899-902. Russian
104. Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM, Albuquerque EX. Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J Neurosci*. 2000;20(1):66-75. 2000/01/11.
105. Levin ED, Simon BB. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*. 1998;138(3-4):217-30. 1998/09/02.
106. Greenblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett*. 1999;463(3):321-6. 1999/12/22.
107. Han S, Sweeney, J., Bachman, E., et al. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease? *Eur J Med Chem*. 1992;27:673-87.
108. Mary A, Renko DZ, Guillou C, Thal C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. *Bioorg Med Chem*. 1998;6(10):1835-50. 1998/12/05.
109. Phillips LH, 2nd, Torner JC. Epidemiologic evidence for a changing natural history of myasthenia gravis. *Neurology*. 1996;47(5):1233-8. 1996/11/01.
110. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol*. 2010;10:46. 2010/06/23.
111. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2006;116(11):2843-54. 2006/11/03.
112. Vincent A. Autoantibodies in neuromuscular transmission disorders. *Ann Indian Acad Neurol*. 2008;11(3):140-5. 2008/07/01.
113. Hodge AS, Humphrey DR, Rosenberry TL. Ambenonium is a rapidly reversible noncovalent inhibitor of acetylcholinesterase, with one of the highest known affinities. *Mol Pharmacol*. 1992;41(5):937-42. 1992/05/01.
114. Barohn RJ. Treatment and clinical research in myasthenia gravis: how far have we come? *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:225-32. 2008/06/24.
115. Komloova M, Musilek K, Dolezal M, Gunn-Moore F, Kuca K. Structure-activity relationship of quaternary acetylcholinesterase inhibitors - outlook for early myasthenia gravis treatment. *Curr Med Chem*. 2010;17(17):1810-24. 2010/03/30.



116. Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M, Saida T. Long-term treatment of generalised myasthenia gravis with FK506 (tacrolimus). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(3):448-50. 2005/02/18.
117. Du J, Yang H, Zhang D, Wang J, Guo H, Peng B, et al. Structural basis for the blockage of IL-2 signaling by therapeutic antibody basiliximab. *J Immunol*. 2010;184(3):1361-8. 2009/12/25.
118. Rowin J, Meriggioli MN, Tuzun E, Leurgans S, Christadoss P. Etanercept treatment in corticosteroid-dependent myasthenia gravis. *Neurology*. 2004;63(12):2390-2. 2004/12/30.
119. Sussman JD, Argov Z, McKee D, Hazum E, Brawer S, Soreq H. Antisense treatment for myasthenia gravis: experience with monarsen. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:283-90. 2008/06/24.
120. Hopfinger AJ. Computer-assisted drug design. *J Med Chem*. 1985;28(9):1133-9. 1985/09/01.
121. Adams CP, Brantner VV. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood)*. 2006;25(2):420-8. 2006/03/09.
122. Dewar M. J. S. ZEG, Healy E. F., Stewart J. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc*. 1985;107.
123. Lipkowitz KB, Boyd DB., editors. *Reviews in Computational Chemistry*. New York: VCH Publishers; 1990–.
124. Doucet J-P, Weber J. *Computer-aided molecular design: theory and applications*. London ; San Diego: Academic Press; 1996.
125. Morris GM, Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comp Chem*. 2009;16:2785-91.
126. Allinger NL, Chen, K. and Lii, J-H. An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons. *J Comput Chem*. 1996(17).
127. Jorgensen A. Optimized Intermolecular Potential Functions for Liquid Alcohols. *J Phys Chem*. 1986;90.
128. Pearlman BA. AMBER: a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and freeenergy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp Phys Commun*. 1995;91.

129. Brooks BR, Brooks CL, 3rd, Mackerell AD, Jr., Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem.* 2009;30(10):1545-614. 2009/05/16.
130. Sturdy YK, Clary DC. Torsional anharmonicity in the conformational analysis of tryptamine. *Phys Chem Chem Phys.* 2007;9(17):2065-74. 2007/04/28.
131. Born M, Oppenheimer R. [Quantum theory of the molecules]. *Ann Phys. (Berlin, Ger.)* 1927, 84: 457-84. German
132. Leach AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications.* 2nd ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Pearson Prentice Hall; 2001.
133. Kirkpatrick S, Gelatt CD, Jr., Vecchi MP. Optimization by simulated annealing. *Science.* 1983;220(4598):671-80. 1983/05/13.
134. Leach AR. *Molecular Modeling. Principles and Applications.* 1st ed Harlow, UK: Longman; 1996.
135. Metropolis N, Ulam S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc.* 1949;44(247):335-41. 1949/09/01.
136. Chen Y, Roux B. Generalized Metropolis acceptance criterion for hybrid non-equilibrium molecular dynamics: Monte Carlo simulations. *J Chem Phys.* 2015;142(2):024101. 2015/01/17.
137. van Gunsteren WF, Bakowies D, Baron R, Chandrasekhar I, Christen M, Daura X, et al. Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006;45(25):4064-92. 2006/06/09.
138. König G, Hudson PS, Boresch S, Woodcock HL. Multiscale Free Energy Simulations: An Efficient Method for Connecting Classical MD Simulations to QM or QM/MM Free Energies Using Non-Boltzmann Bennett Reweighting Schemes. *J Chem Theory Comput.* 2014;10(4):1406-19. 2014/05/08.
139. Genchev GZ, Kallberg M, Gursoy G, Mittal A, Dubey L, Perisic O, et al. Mechanical signaling on the single protein level studied using steered molecular dynamics. *Cell Biochem Biophys.* 2009;55(3):141-52. 2009/08/12.
140. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol.* 1996;6(3):402-6. 1996/06/01.
141. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(11):935-49. 2004/11/03.
142. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-42. 1999/12/11.

143. Wei BQ, Weaver LH, Ferrari AM, Matthews BW, Shoichet BK. Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. *J Mol Biol.* 2004;337(5):1161-82. 2004/03/30.
144. Morris GM, Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. . Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *J Comput Chem.* 1998;19:1639-62.
145. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins.* 2006;65(1):15-26. 2006/07/25.
146. Ewing TJ, Makino S, Skillman AG, Kuntz ID. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J Comput Aided Mol Des.* 2001;15(5):411-28. 2001/06/08.
147. Fuhrmann J, Rurainski A, Lenhof HP, Neumann D. A new Lamarckian genetic algorithm for flexible ligand-receptor docking. *J comput chem.* 2010;31(9):1911-8. 2010/01/19.
148. Reddy AS, Pati SP, Kumar PP, Pradeep HN, Sastry GN. Virtual screening in drug discovery: a computational perspective. *Curr Protein Pept Sci.* 2007;8(4):329-51. 2007/08/19.
149. Takahashi O, Masuda Y, Muroya A, Furuya T. Theory of docking scores and its application to a customizable scoring function. *SAR QSAR Environ Res.* 2010;21(5-6):547-58. 2010/09/08.
150. Muryshev AE, Tarasov DN, Butygin AV, Butygina OY, Aleksandrov AB, Nikitin SM. A novel scoring function for molecular docking. *J Comput Aided Mol Des.* 2003;17(9):597-605. 2004/01/10.
151. Kuchař M. Výzkum a vývoj léčiv. 1st ed. Praha: VŠCHT Praha; 2008.
152. Goodsell DS, Olson AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins.* 1990;8(3):195-202. 1990/01/01.
153. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol.* 1982;161(2):269-88. 1982/10/25.
154. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 1997;267(3):727-48. 1997/04/04.
155. Kramer B, Rarey M, Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins.* 1999;37(2):228-41. 1999/12/03.

156. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-12. 2004/07/21.
157. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-8, 27-8. 1996/02/01.
158. Ayers JT, Dwoskin LP, Deaciuc AG, Grinevich VP, Zhu J, Crooks PA. Bis-Azaaromatic quaternary ammonium analogues: ligands for  $\alpha_4\beta_2^*$  and  $\alpha_7^*$  subtypes of neuronal nicotinic receptors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12(21):3067-71. 2002/10/10.
159. Jun D, Paar M.; Binder, J.; Marek, J.; Pohanka, M.; Stodulka, P.; Kuca, K. Preparation and in vitro evaluation of monoquaternary inhibitors of brain cholinesterases. *Lett Org Chem.* 2009;6:500-3.
160. Binder J, Paar M, Jun D., Pohanka M., Hrabínova M, Opletalova V. and Kuca K. New bisquaternary isoquinolinium inhibitors of brain cholinesterases - Synthesis and Anticholinesterase Activity. *Lett Drug Des Discov.* 2010;7(1):1-4.
161. Kuca K, Cabal J, Patocka J., Dohnal V. Quarternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Lett Drug Des Discov.* 2004;1:35-44.
162. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95. 1961/07/01.
163. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785-91. 2009/04/29.
164. Morris GM, Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J Comput Chem.* 1998;19:1639-62.
165. Ekstrom F, Pang YP, Boman M, Artursson E, Akfur C, Borjegen S. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(5):597-607. 2006/08/01.
166. Bourne Y, Taylor P, Radic Z, Marchot P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.* 2003;22(1):1-12. 2002/12/31.
167. Ekstrom FJ, Astot C, Pang YP. Novel nerve-agent antidote design based on crystallographic and mass spectrometric analyses of tabun-conjugated acetylcholinesterase in complex with antidotes. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(3):282-93. 2007/04/20.

168. Ngamelue MN, Homma K, Lockridge O, Asojo OA. Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2007;63(Pt 9):723-7. 2007/09/05.
169. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem.* 2004;25(9):1157-74. 2004/04/30.
170. Musilek K, Komloova M, Zavadova V, Holas O, Hrabanova M, Pohanka M, et al. Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage-initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(5):1763-6. 2010/02/09.
171. Kuca K, Cabal J, Musilek K, Jun D, Bajgar J. Effective bisquaternary reactivators of tabun-inhibited AChE. *J Appl Toxicol.* 2005;25(6):491-5. 2005/08/11.
172. Marek J, Stodulka P, Cabal J, Soukup O, Pohanka M, Korabecny J, et al. Preparation of the pyridinium salts differing in the length of the N-alkyl substituent. *Molecules.* 2010;15(3):1967-72. 2010/03/26.
173. Korabecny J, Musilek K, Holas O, Nepovimova E, Jun D, Zemek F, et al. Synthesis and in vitro evaluation of N-(Bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules.* 2010;15(12):8804-12. 2010/12/04.
174. Musilek K, Komloova M, Holas O, Hrabanova M, Pohanka M, Dohnal V, et al. Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage: implications for early Myasthenia gravis treatment. *Eur J Med Chem.* 2011;46(2):811-8. 2011/01/18.
175. Kuca K, Cabal J, Patocka J., Dohnal V. Quaternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase. *Lett Drug Des Discov.* 2004;1:35-44.
176. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem.* 1985;28(7):849-57. 1985/07/01.
177. Rydberg EH, Brumshtein B, Greenblatt HM, Wong DM, Shaya D, Williams LD, et al. Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: Binding of Bis-5-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J Med Chem.* 2006;49(18):5491-500. 2006/09/01.
178. Xu Y, Colletier JP, Weik M, Jiang H, Moulton J, Silman I, et al. Flexibility of aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. *Biophys J.* 2008;95(5):2500-11. 2008/05/27.
179. Dougherty DA. Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science.* 1996;271(5246):163-8. 1996/01/12.

180. Cerasoli DM, Griffiths EM, Doctor BP, Saxena A, Fedorko JM, Greig NH, et al. In vitro and in vivo characterization of recombinant human butyrylcholinesterase (Protexia) as a potential nerve agent bioscavenger. *Chem Biol Interact.* 2005;157-158:363-5. 2006/01/24.
181. Loke WK, Sim MK, Go ML. O-Substituted derivatives of pralidoxime: muscarinic properties and protection against soman effects in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;442(3):279-87. 2002/06/18.
182. Giglio D, Aronsson P, Eriksson L, Tobin G. In vitro characterization of parasympathetic and sympathetic responses in cyclophosphamide-induced cystitis in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100(2):96-108. 2007/01/25.
183. Soukup O, Proška J, Binder J, Karasova JZ, Tobin G, Jun D, et al. Methylacridinium and its cholinergic properties. *Neurotox Res.* 2009;16(4):372-7. 2009/07/01.
184. Pohanka M, Kuca K, Kassa J. New performance of biosensor technology for Alzheimer's disease drugs: in vitro comparison of tacrine and 7-methoxytacrine. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(5):755-8. 2008/11/07.
185. Korabecny J, Musilek K, Holas O, Binder J, Zemek F, Marek J, et al. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(20):6093-5. 2010/09/08.
186. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):337-41. 2004/12/01.
187. Cruciani G, Pastor M, Guba W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11 Suppl 2:S29-39. 2000/10/18.
188. Bergstrom CA, Strafford M, Lazorova L, Avdeef A, Luthman K, Artursson P. Absorption classification of oral drugs based on molecular surface properties. *J Med Chem.* 2003;46(4):558-70. 2003/02/07.
189. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26. 2001/03/22.
190. Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discov Today.* 2003;8(19):876-7. 2003/10/14.
191. Butini S, Campiani G, Borriello M, Gemma S, Panico A, Persico M, et al. Exploiting protein fluctuations at the active-site gorge of human cholinesterases: further optimization of the design strategy to develop extremely potent inhibitors. *J Med Chem.* 2008;51(11):3154-70. 2008/05/16.

192. Sakurada K, Matsubara K, Shimizu K, Shiono H, Seto Y, Tsuge K, et al. Pralidoxime iodide (2-pAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem Res.* 2003;28(9):1401-7. 2003/08/27.

193. Lorke DE, Hasan MY, Nurulain SM, Sheen R, Kuca K, Petroianu GA. Entry of two new asymmetric bipyridinium oximes (K-27 and K-48) into the rat brain: comparison with obidoxime. *J Appl Toxicol.* 2007;27(5):482-90. 2007/02/20.

