

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
KATEDRA FARMACEUTICKEJ CHÉMIE A FARMACEUTICKEJ ANALÝZY

Propargyltakríny – inhibítory acetylcholinesterázy s anti-MAO aktivitou

(Diplomová práca)



Školiteľ: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eugenie Nepovimová, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Lenka Nemčíková

Vyhlasujem, že táto práca je pôvodným autorským dielom, spracovaným mojou osobou. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú správne citované. Táto diplomová práca nebola zneužitá na získanie rovnakého alebo iného akademického titulu.

Diplomová práca vznikla za podpory projektu SVV 260 401.

.....

Lenka Nemčíková

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať školiteľke PharmDr. Marte Kučerovej, Ph.D. za užitočné rady a odporúčenia pre vypracovanie kvalifikačnej práce.

Moja úprimná vďaka patrí aj konzultantke Mgr. Eugenií Nepovimovej, Ph.D. za jej vedenie a usmerňovanie, nápady a neoceniteľné rady v priebehu laboratórnej práce a za množstvo času, ktorý vynaložila odpovedaním na moje dotazy formou rozhovoru, správ či e-mailov. Jej nadšenie a priateľský prístup sa stali pre mňa hnacím motorom pri písaní tejto práce. Za ochotu a láskavosť jej týmto ešte raz ďakujem.

Nakoniec ďakujem svojim najbližším, rodine a priateľom, za vytvorenie vhodných podmienok, povzbudenie a podporu počas celého štúdia na Farmaceutickej fakulte.

Lenka Nemčíková

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1 SKRATKY</b> .....	<b>10</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>11</b>
2.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA .....	11
2.1.1 Etiológia choroby.....	11
2.1.1.1 Amyloidná hypotéza .....	11
2.1.1.2 Tau hypotéza .....	12
2.1.1.3 Cholinergná hypotéza.....	12
2.1.1.4 Oxidačný stres .....	14
2.1.2 Výskyt.....	14
2.1.3 Symptómy .....	15
2.1.3.1 Predklinické štádium.....	15
2.1.3.2 Stredné štádium.....	15
2.1.3.3 Ťažké štádium .....	16
2.1.4 Liečba.....	16
2.1.4.1 Inhibítory acetylcholinesterázy .....	17
2.1.4.1.1 Takrín .....	18
2.1.4.1.2 Donepezil.....	19
2.1.4.1.3 Galantamín .....	20
2.1.4.1.4 Rivastigmín.....	20
2.1.4.2 Antagonisti NMDA receptorov.....	21
2.1.4.2.1 Memantín.....	21
2.2 CHOLÍNESTERÁZY .....	22
2.2.1 Acetylcholinesteráza .....	22
2.2.2 Butyrylcholinesteráza .....	23
2.2.3 Štruktúra.....	23
2.2.3.1 Periférne aniónové miesto.....	23

2.2.3.2	Aktívne miesto.....	24
2.3	MONOAMÍNOOXIDÁZY .....	24
2.3.1	Charakteristika .....	24
2.3.1.1	Monoamínooxidáza A .....	25
2.3.1.2	Monoamínooxidáza B.....	25
2.3.2	MAO a ich úloha v AD .....	26
2.3.3	Funkcia MAO.....	26
2.3.4	Štruktúra .....	27
2.3.4.1	C-koncová oblasť .....	27
2.3.4.2	Miesta viažuce FAD .....	27
2.3.4.3	Doména viažuca substráty a inhibítory .....	28
2.3.5	Inhibítory monoamínooxidáz vo vzťahu k Alzheimerovej chorobe .....	28
2.4	MULTI-TARGET-DIRECTED-LIGANDS .....	29
2.4.1	MTDLs v terapií Alzheimerovej choroby .....	29
2.4.2	Takrín ako MTDLs.....	30
2.4.3	Selegilín ako MTDLs .....	30
2.5	LADOSTIGIL .....	30
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>32</b>
3.1	DESIGN PROPARGYL-TAKRÍNOVÝCH DERIVÁTOV .....	32
3.2	SYNTÉZA PROPARGYL-TAKRÍNOVÝCH DERIVÁTOV .....	35
3.3	VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	60
<b>4</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCIE .....</b>	<b>63</b>

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Študent: Lenka Nemčíková

Školiteľ: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Názov práce: Propargyltatríny – inhibítory acetylcholinesterázy s anti-MAO aktivitou

Alzheimerova choroba (AD) patrí medzi závažné neurodegeneratívne ochorenia, ktoré postihujú predovšetkým osoby staršieho veku. Neurodegeneratívne choroby sa väčšinou prejavujú postupným rozvojom demencie. Demencia však nie je súčasťou starnutia, je vždy dôsledkom patologického procesu. Ako prvý ju opísal Alois Alzheimer. Príčiny vzniku tejto choroby nie sú jasné. Na druhej strane, jednotlivé patologické mechanizmy ochorenia a rizikové faktory sú známe. Z vyššie uvedeného dôvodu neexistuje liek, ktorý by vyliečil Alzheimerovu chorobu. Kombináciou farmakologických a nefarmakologických postupov môžeme zmierniť príznaky, prípadne spomaliť rozvoj demencie, čím sa zlepši kvalita života ľudí, ktorí chorobou trpia.

Liečba využíva inhibítory enzýmu acetylcholinesterázy (AChE) a antagonistu *N*-methyl-D-aspartátových receptorov (NMDA). Medzi inhibítory AChE patrí donepezil, rivastigmín a galantamín. Znížením aktivity AChE sa zaistí rovnováha cholinergnej transmisie, ktorá je narušená už v skorých štádiách ochorenia. Takrín bol prvým liečivom, ktoré bolo uvedené na trh k liečbe AD. V súčasnej terapii sa však nevyužíva kvôli nežiaducim účinkom, hlavne hepatotoxicite. Je však ľahko dostupný, preto sa spoločne s ostatnými inhibítormi AChE stáva základom pre vznik nových zlúčenín vo forme hybridov a multi-target-directed ligands (MTDLs).

V dôsledku patologických procesov v priebehu AD vzniká oxidačný stres, ktorý môže poškodiť neuróny. Príznakom choroby v neskorších štádiách je aj zmena nálady až depresia. Predpokladá sa, že produkty vznikajúce oxidáciou amínov (aldehydy, peroxid vodíka ai.) sú jednou z príčin oxidačného stresu. Inhibícia monoamínoxidázy (MAO), ktorá katalyzuje oxidáciu amínov, by mohla viesť k zmierneniu depresívnych stavov a oxidačného poškodenia nervových buniek.

Využitím designovej stratégie MTDLs vo svojej práci som sa zamerala na syntézu nových molekúl spájajúcich takrínovú časť s propargylamínovou časťou selegilínu (komerčne dostupný MAO inhibítor). Tieto zlúčeniny by mali potenciálne inhibovať enzýmy AChE a MAO, čím by sa mohla zabezpečiť dostatočná koncentrácia neuromediátorov (acetylcholínu a katecholamínov) v mozgoch pacientov trpiacich AD.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Lenka Nemčíková

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Title of Thesis: Propargyltacrine – acetylcholinesterase inhibitors with anti-MAO activity

Alzheimer's disease (AD) is a serious neurodegenerative disorder that affects mainly aged people. Neurodegenerative disorders lead to dementia. However, dementia is not a part of normal aging. It is the result of pathological process. Alois Alzheimer was the first who described AD. The causes of this disease are not clear, however partial pathological mechanisms and the risk factors are known. There is no drug for casual treatment of AD. Nowadays, we can only slow down the symptoms or development of dementia by combining pharmacological and non-pharmacological techniques. Such approach could improve the quality of life of affected people.

The treatment of AD involves acetylcholinesterase (AChE) inhibitors and *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist (NMDA). Donepezil, rivastigmine and galantamine belong to AChE inhibitors. Decrease in AChE activity leads to balance in acetylcholine transmission, which is disturbed in early stages of the disease. Tacrine was the first drug launched on the market for the treatment of Alzheimer's disease. However, a few years later it was withdrawn due to the side effects, especially hepatotoxicity. Tacrine is easily available, so it has become a key scaffold used in anti-AD drugs development, especially in the form of hybrids or multi-target-directed ligands (MTDLs).



An oxidative stress can evolve from various pathological processes and can damage the neurons. The change of mood and depression also belong to the symptoms of the AD in later stages. It is believed, that the products of amine oxidation (aldehydes, hydrogen peroxide etc.) are the causes of oxidative stress. So, the inhibition of monoamine oxidase (MAO) that catalyzes amine oxidation could relieve from the symptoms like depression and overall oxidative damage of nerve cells.

By using MTDLs design strategy with-in my work, I have focused on the synthesis of new molecules combining the tacrine moiety and propargylamine scaffold of selegiline (commercially available MAO inhibitor). Potentially, these compounds should inhibit both enzymes, AChE and MAO, ensuring thus sufficient concentration of neuromediators (acetylcholine and catecholamines) for proper cholinergic and monoaminergic neuro-transmission.

## 1 SKRATKY

7-MEOTA	7-metoxytakrín
$A\beta$	$\beta$ -amyloidný proteín
Acetyl-CoA	acetyl-koenzým A
AChE	acetylcholínesteráza
AD	Alzheimerova choroba
ADP	adenín-dinukleotid-fosfát
APP	amyloidný prekurzorový proteín
BuChE	butyrylcholínesteráza
ChE	cholínesteráza
FAD	flavín-adenín-dinukleotid
GIT	gastrointestinálny trakt
MAO	monoamínooxidáza
MAO-A	monoamínooxidáza A
MAO-B	monoamínooxidáza B
MTDLs	multi-target-directed ligands
NMDA	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspartát
PAS	periférne aniónové miesto

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je najčastejšiu formu demencie. Ide o vekovo-závislé chronické neurodegeneratívne ochorenie charakterizované prítomnosťou amyloidných plakov, neurofibrilárnych uzlov, synaptickou dysfunkciou a smrťou nervových buniek v mozgu [1, 2].

#### 2.1.1 Etiológia choroby

Príčina vzniku tohto ochorenia nie je presne známa. Existuje však niekoľko hypotéz, ktoré vysvetľujú vznik tejto choroby [3].

##### 2.1.1.1 Amyloidná hypotéza

V priebehu času sa celková veľkosť mozgu u ľudí s AD znižuje [4]. Mikroskopickým pozorovaním mozgovej tkane pacientov s AD sa zistila prítomnosť amyloidných plakov [5].

Amyloidné plaky sú zhluky, ktoré vznikajú hromadením amyloidného proteínu ( $A\beta$ ) v extracelulárnom priestore. Takto vytvorené zhluky potom zasahujú do komunikácie medzi neurónmi na úrovni synapsí, čím spôsobia ich smrť [5].

$A\beta$  sú prirodzené produkty metabolizmu (36–43 aminokyselín). Monoméry  $A\beta_{40}$  sú zastúpené viac ako  $A\beta_{42}$ , ktoré majú väčšiu tendenciu k agregáciám. Oba dva typy monomérov vznikajú z amyloidného prekursorového proteínu (APP) pôsobením sekvenčných účinkov enzýmov  $\alpha$ -sekretázy,  $\beta$ -sekretázy a  $\gamma$ -sekretázy. Neamyloidné spracovanie APP iniciuje intracelulárna  $\alpha$ -sekretáza. Produktom je ektodoména (83-aminokyselinový fragment) a zvyšok APP. Ektodoménový fragment sa štiepi  $\gamma$ -sekretázou. Uvoľní sa extracelulárna p3 doména a amyloidná intracelulárna doména, ktorá nie je schopná spustiť amyloidnú kaskádu. Amyloidné spracovanie APP iniciuje intracelulárna  $\beta$ -sekretáza. Produktom je kratší zvyšok APP a ektodoména (99-aminokyselinový fragment). Táto doména sa tiež štiepi  $\gamma$ -sekretázou. V tomto prípade sa však uvoľní toxický  $A\beta$  a amyloidná intracelulárna doména [6].

$A\beta$  samovoľne agreguje vo viacerých formách, ktoré pozostávajú z rozpustných oligomérov. Niekedy môžu tieto oligoméry narásť do formy nerozpustných vlákien a usporiadať tak  $\beta$ -skladané listy. Tie sú základom pre vznik amyloidných plakov [6].

Proteáza neprilysin sa podieľa na degradácii monomérov a oligomérov  $A\beta$ . Inzulín-degradujúci enzým tiež rozkladá malé peptidy ako inzulín a monomérene  $A\beta$ . Zvýšená aktivita týchto enzýmov zníži hladinu  $A\beta$  a zabráni tak tvorbe amyloidných plakov. Na druhú stranu, ich zníženou expresiou dochádza ku akumulácii  $A\beta$  v mozgu.  $A\beta$  je náchylný k agregácii aj vplyvom oxidačných podmienok a prítomnosťou katiónov kovu [6].

#### 2.1.1.2 Tau hypotéza

Okrem prítomnosti amyloidných plakov sa v mikroskopickom preparáte našli aj štruktúry označené ako neurofibrilárne kľbka. Obe štruktúry vznikajú aj niekoľko rokov predtým, než sa objavia prvé príznaky choroby [5].

Neurofibrilárne kľbka sú uzly, ktoré vznikajú hromadením abnormálnej hyperfosforylovanej formy proteínu tau v intracelulárnom priestore nervových buniek [5].

Tau proteín je rozpustná bielkovina, ktorá sa viaže na tubuly cytoskeletu prostredníctvom svojich domén viažucich mikrotubuly. Podporí sa tým zostavenie a stabilita mikrotubulov. Tau fosforylácia je regulovaná rovnováhou medzi kinázami a fosfatázami. Dochádza k nej na zvyškoch serínu, treonínu a tyrozínu v proteíne tau [6]. U pacientov s AD je tau proteín prítomný v hyperfosforylovanej forme. Táto forma tau proteínu je nerozpustná. Chýba jej afinita k mikrotubulám, ktoré sa kvôli tomu destabilizujú. Hyperfosforylovaný tau proteín vytvára párové helikálne vlákna až neurofibrilárne uzly. Tieto procesy znemožnia axonálny prenos, prenos živín a esenciálnych molekúl, potrebných pre mozgové bunky, čo môže viesť k ich smrti [5, 6].

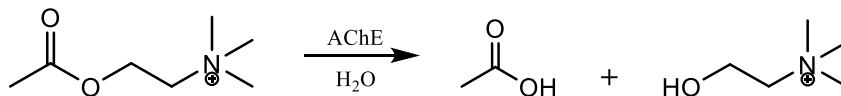
#### 2.1.1.3 Cholinergná hypotéza

Cholinergná teória vychádza z predpokladu zníženej syntézy neurotransmitera acetylcholínu, pretože u pacientov s AD bola preukázaná jeho nízka koncentrácia v mozgu [7].

Z presynaptických neurónov a neuromuskulárnych spojov sa acetylcholín uvoľňuje z vezikúl pôsobením určitých impulzov. Acetylcholín, prítomný v synaptickej štrbine, sa viaže na receptory postsynaptického neurónu alebo svalovej bunky. Väzba na patričný receptor spôsobí aktiváciu daného proteínu, čo umožní výmenu iónov vedúcu k depolarizácii [8].

Aby cholinergný neurón dostal impulz a podieľal sa na rýchlom prenose informácií, musí byť acetylcholín po depolarizácii odstránený z receptora a inaktivovaný, aby nedošlo ku konštantnej stimulácii receptora [9, 10].

Inaktivácia acetylcholínu (Obr. 1) je umožnená enzýmom acetylcholinesteráza (AChE, E. C. 3.1.1.7), ktorý je umiestnený v synaptickej štrbine či na postsynaptickej membráne [9]. AChE hydrolyticky preruší esterovú väzbu v acetylcholíne, čím sa uvoľní cholín a acetát [8]. Cholín je spätne vychytávaný presynaptickým neurónom, kde sa za prítomnosti acetyl-koenzýmu A (acetyl-CoA) a cholín acetyltransferázy resyntetizuje [9].



**Obrázok 1.** Hydrolýza acetylcholínu

Cholinergná transmisia je umožnená väzbou acetylcholínu na nikotínové a muskarínové acetylcholinové receptory. Presynaptické  $\alpha 7$  nikotínové receptory sú nevyhnutné pre kognitívne spracovanie. Ich počet sa však v priebehu AD znižuje. Experimentálne štúdie ukázali, že  $A\beta$  sa viaže na tieto receptory, čo vedie k zhoršenému uvoľňovaniu acetylcholínu a udržiavaniu dlhodobej potenciácie. Postsynaptické muskarínové receptory  $M_1$  spojené s G-proteínom aktivujú proteínkinázu C. Tá zníži aktivitu enzýmu fosforylujúceho tau proteín a vedie k neamyloidnému spracovaniu APP. V mozgu pacientov s AD je množstvo  $M_1$  receptorov spojených s G-proteínom redukované. Výsledkom týchto zmien dochádza k tvorbe  $A\beta$  a hyperfosforylovaného tau proteínu [6].

Alzheimerova choroba sa vyznačuje degeneráciou cholinergného systému predného mozgu so stratou neurónov, depléciou neurotransmiteru acetylcholínu a zvýšenej aktivity AChE a butyrylcholinesterázy (BuChE, E. C. 3.1.1.8), ktorá sa tiež zdá byť spojená s prítomnosťou plakov [11]. Vznik depozít proteínu  $\beta$ -amyloidu je

navyše urýchlený jeho interakciou s periférnym aniónovým miestom (PAS) acetylcholinesterázy [12].

#### 2.1.1.4 Oxidačný stres

U ľudí s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou je narušená rovnováha niektorých kovových iónov. Nerovnováha iónov medi, železa a zinku môžu viesť k zmene štruktúry APP, proteínu tau a apolipoproteínu E [7].

Zvýšené hladiny iónov vedú k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka. Podporujú agregáciu, zmeny konformácie a fosforyláciu proteínu tau.  $A\beta$  sa aktívne viaže na katióny kovov, prispieva k poškodeniu mitochondrií a urýchľuje tvorbu amyloidných vláken, čím sa stáva náchylný k agregácií [6].

Táto iónová dysregulácia môže spôsobiť vznik oxidačného stresu a následné poškodenie mozgových buniek [7].

V dôsledku patologických procesov v priebehu AD vzniká oxidačný stres, ktorý môže poškodiť neuróny. Príznakom choroby v neskorších štádiách je aj zmena nálady až depresia. Predpokladá sa, že produkty vznikajúce oxidáciou amínov (aldehydy, peroxid vodíka at.) sú jednou z príčin oxidačného stresu [13]. Inhibícia monoaminoxidázy (MAO), ktorá katalyzuje oxidáciu amínov, by mohla viesť k zmierneniu depresívnych stavov a oxidačného poškodenia nervových buniek [14].

#### 2.1.2 Výskyt

Vyšší vek patrí medzi jeden zo základných rizikových faktorov daného ochorenia. Väčšina ľudí trpiacich Alzheimerovou chorobou má 65 rokov a viac [15]. AD postihuje až 6 % populácie tejto vekovej kategórie [3]. Na druhej strane sú aj mladší pacienti so skorým nástupom AD. Tento podtyp ochorenia sa vyskytuje hlavne u ľudí s genetickými mutáciami v amyloidnom proteíne [15].

Viac žien ako mužov trpí touto chorobou a inými demenciami. Až dve tretiny Američanov s AD sú ženy. Existuje niekoľko vysvetlení tohto javu. Jedným z nich je, že ženy žijú v priemere dlhšie ako muži a vyšší vek je najväčším rizikovým faktorom. Iné vysvetlenie vychádza z biologických a genetických variabilít, ba dokonca z rozdielnych životných skúseností [5].

### 2.1.3 Symptómy

Alzheimerova choroba je šiestou najčastejšou príčinou úmrtnosti ľudí v Spojených Štátoch Amerických. Súčasná liečba nedokáže zastaviť vývoj ochorenia ale len dočasne spomaliť zhoršenie symptómov demencie a zlepšiť tak kvalitu života pacientov [15].

Jedná sa o ochorenie, v ktorom sa symptómy postupom času zhoršujú. Včasná diagnostika by sa preto mohla stať kľúčom k prevencii a spomaleniu jej progresie [5].

Prvé symptómy začínajú byť pozorovateľné až v neskorších fázach choroby. Tieto znepokojujúce príznaky sú tiež najčastejším dôvodom pre vyhľadanie odbornej lekárskej starostlivosti. Lekár zhodnotí kognitívne alebo behaviorálne zmeny u pacienta [4]. Medzi vyššie spomenuté symptómy patrí postupná strata schopnosti zapamätať si nové informácie a schopnosti komunikácie, čo sa odzrkadlí v ich možnosti začleniť sa do každodenného života [5].

Podľa závažnosti sa symptomatológia AD delí na niekoľko štádií: predklinické štádium, stredná fáza a ťažká fáza [16]. Je potrebné si uvedomiť, že jednotlivé príznaky sa vo fázach môžu prekrývať, preto je ťažké zaradiť osobu s týmto ochorením do určitého štádia [15].

#### 2.1.3.1 Predklinické štádium

Predklinické štádium sa začína niekoľko rokov pred stanovením diagnózy a súvisí so vznikajúcimi patologickými procesmi v mozgu. Počas tohto obdobia ľudia nemajú takmer žiadne príznaky alebo známky ochorenia [15, 16].

#### 2.1.3.2 Stredné štádium

U ľudí trpiacimi AD sa začínajú objavovať prvé klinické príznaky, ktoré súvisia s poruchami koncentrácie a pamäte (znížená schopnosť zapamätať si nové informácie, zhoršené krátkodobá pamäť, neistota pri rozhodovaní a plánovaní) [17].

Stredné štádium býva najdlhšou fázou a môže trvať až niekoľko rokov. Rozvíjajúce sa poškodenie nervových buniek sťažuje vyjadrovanie myšlienok a vykonávanie činností. Osoby sú frustrované a zlostné. Vyžadujú si vyššiu starostlivosť od okolia [15]. Príznaky zahŕňujú zhoršenú dlhodobú pamäť, zabúdanie mien a adries,

problémy s jazykom, čítaním, písaním, impulzívne pohyby a svalové zášklby [16], zmeny v spánku, v osobnosti a v správaní (výkyvy nálady, strata záujmu, bludy, depresia, podráždenosť a agresivita) [17].

#### 2.1.3.3 Ťažké štádium

V záverečnej fáze ochorenia sa pamäť a kognitívne vlastnosti naďalej zhoršujú. Dochádza k významným zmenám osobnosti, kedy sú jednotlivci úplne závislí na pomoc od ostatných [15]. Stráca sa schopnosť reagovať na svoje prostredie. Telo prestáva spolupracovať a pacienti sú odkázaní väčšinu času stráviť v posteli [16]. Symptómy sa stupňujú a môžu vyústiť k úmrtiu (zánik komunikácie, strata vedomia, záchvaty, spavosť, neschopnosť kontroly pohybu močového mechúra a čriev, zmeny vo fyzických schopnostiach zahrňujúce chôdzu, sedenie, prehĺtanie, náchylnosť k infekciám) [15, 16].

V súčasnosti sú k dispozícii len lieky spomaľujúce rozvoj symptómov AD. Lieky na kauzálnu liečbu neexistujú. Život pacientov sa preto končí smrťou, ktorej najčastejšou príčinou je aspiračná pneumónia [18].

#### 2.1.4 Liečba

Súčasnú dostupnú liečebnú postupu umožňujú len spomaliť progresiu príznakov ochorenia. Obecne, tieto liečivá majú jeden veľký nedostatok v tom, že pôsobia len obmedzenú dobu [19] tým, že ovplyvnia neuromediátory, ktoré sa podieľajú na prenose informácií medzi nervovými bunkami v mozgu [15].

Väčšina liekov najlepšie účinkuje v skorom až strednom štádiu. Môžu poskytnúť pacientom pohodlie, dôstojnosť a nezávislosť na určité časové obdobie [19].

Ako symptomatická liečba kognitívnych príznakov je schválené užívanie dvoch skupín liekov a to inhibítorov enzýmu acetylcholinesterázy a antagonistov *N*-metyl-*D*-aspartátových (NMDA) receptorov.

V rámci AD nedochádza len k dysregulácií cholinergnej neurotransmisie, ale postihnuté sú aj ďalšie systémy: serotonergný, adrenergý, glutaminergný [20].

Niekedy sa na zmiernenie symptómov správania používajú aj iné lieky. Tie by sa mali užívať s opatrnosťou kvôli závažným nepriaznivým účinkom [21]:



- antipsychotika (kvetiapín, olanzapín, aripiprazol) – znižujú agresiu, nepokoj a psychózy. Môžu však spôsobiť mŕtvicu, ťažkosti s pohybom, pády, kognitívny pokles [7],
- sedatíva, hypnotika (zolpidem, eszopiklón) – pomáhajú s nespavosťou, no zvyšujú riziko pádu a zmätenosti [21],
- antidepresíva (citalopram, sertralín, imipramín) – zlepšujú depresívne stavy, no u pacientov s AD majú malý prínos [20].

V liečbe sa skúmajú i nové terapeutické prístupy zamerané na rôzne štruktúry súvisiace s patológiou tejto choroby [22]. V štádiu výskumu môžeme nájsť napríklad inhibítory agregácie amyloidného proteínu, inhibítory agregácie proteínu tau, modulátory medi a zinku, imunoterapia, prírodné produkty a vitamíny [20].

#### 2.1.4.1 Inhibítory acetylcholinesterázy

Používanie inhibítorov AChE v terapii AD vychádza z cholinergnej hypotézy vzniku tohto ochorenia [23].

Acetylcholín, chemický posol dôležitý pre pamäť a učenie, podporuje komunikáciu medzi nervovými bunkami [15]. Jeho degradácia na cholín a kyselinu octovú je katalyzovaná enzýmom AChE, ktorá je prítomná v synapsiách [22]. Inhibíciou tohto enzýmu sa zabráni rozkladu neuromediátoru, čím sa zvýši jeho dostupnosť v synaptickej štrbine alepší sa prenos informácií [22, 23].

Inhibítory AChE sa viažu na aktívne miesto tohto enzýmu, čo znižuje schopnosť acetylcholínu viazať sa a obmedzuje tak rýchlosť jeho rozkladu. Tým sa neurotransmitter hromadí v synapsiách a zvyšuje sa jeho cholinergná aktivita na postsynaptických receptoroch [8]. Vo výskume sa postupne navrhuje aj posun od inhibície AChE k BuChE, kde mechanizmus duálnej inhibície môže priniesť výhody v symptomatických účinkoch a menšieho hromadenia  $A\beta$  [24, 25].

Reverzibilné inhibítory schválené Food and Drug Administration zlepšujú kognitívne funkcie u ľudí s AD [9]. Tieto ligandy pre AChE obsahujú vo svojej molekule atóm dusíka, ktorý je schopný zúčastniť sa interakcie v aktívnom mieste enzýmu [26]. Podľa mechanizmu inhibície ich delíme na:

- inhibítory viažuce sa na esteratickú časť aktívneho miesta

- inhibítory viažuce sa na aniónovú časť aktívneho miesta
- inhibítory interagujúce s aromatickou dolinou
- inhibítory PAS [12].

Inhibítory AChE, ktoré sú schválené k liečbe u skorého a stredného štádia Alzheimerovej choroby, vedú len k malému a dočasnému zmierneniu kognitívnych príznakov [25]. Ako choroba postupuje, mozog produkuje menej acetylcholínu, preto tieto inhibítory v ťažkom štádiu strácajú svoju účinnosť [19]. Všeobecne sú tieto liečivá dobre tolerované [15]. Vedľajšie účinky sú obmedzené na gastrointestinálne symptómy (nevoľnosť, zvracanie, hnačky, strata chuti k jedlu). Tie môžu byť znížené slabším začiatkom liečby alebo súčasným podávaním s jedlom [25].

#### 2.1.4.1.1 Takrín



**Obrázok 2.** Takrín a jeho derivát

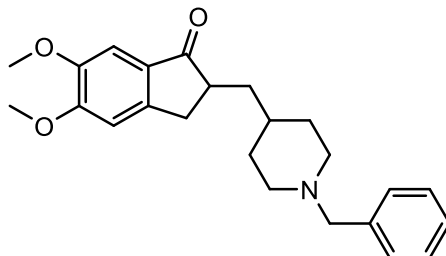
Takrín (Obr. 2) bol prvý schválený liek pre liečbu Alzheimerovej choroby v roku 1993 [22, 27]. Má nízku biologickú dostupnosťou [22] a nutnosťou dávkovania 4-krát denne kvôli krátkemu biologickému polčasu [28]. Takrín pomerne ľahko prekonáva hematoencefalickú bariéru a inhibuje centrálnu AChE. Takrín navyše inhibuje aj plazmatickú BuChE. Metabolizuje sa v pečeni pomocou enzýmov cytochrómu P450 na hydroxylované deriváty, ktoré sú toxické (hepatotoxicita, karcinogenita). Výskyt toxických metabolitov viedlo k stiahnutiu takrínu z trhu [27].

Vzhľadom k nežiaducim účinkom takrínu, bol v Českej republike vyvinutý jeho 7-metoxyderivát (7-metoxytakrín, 7-MEOTA, Obr. 2). 7-MEOTA sa vyznačuje rovnakým farmakologickým účinkom, menšou toxicitou, lepšou znášateľnosťou a odlišnou metabolickou degradáciou ako takrín [22].

Takrín sa viaže na aniónovú časť enzýmu prostredníctvom aromatických jadier a dusíku vo forme heteroatómu [12]. Tetrahydroakridínový kruh interaguje s aromatickými kruhmi tryptofánu 84 a fenylalanínu 330 v blízkosti katalytickej triády aktívneho miesta AChE [29]. Dochádza tak k vzniku interakcií medzi elektrónovými

oblakmi aromatických jadier takrínu a enzýmu, čo zabraňuje väzbe substrátu na enzým [12].

#### 2.1.4.1.2 Donepezil



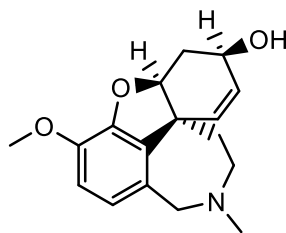
Obrázok 3. Donepezil

Donepezil (Obr. 3) je selektívny inhibítor acetylcholinesterázy (špecificky inhibuje AChE a neúčinkuje na BuChE) schválený na liečbu príznakov skorého, stredného a ťažkého štádia AD [19, 23]. Donepezil sa metabolizuje v pečeni enzýmami cytochrómu P450 CYP2D6 a CYP3A4, preto môže interagovať s liekmi, ktoré sú metabolizované týmito enzýmami [23]. Donepezil tiež blokuje excitotoxicitu glutamátu, zmiernuje oxidačný stres a znižuje množstvo zápalových cytokínov [28]. Donepezil má 100% biologickú dostupnosť s polčasom 70 hodín [28].

Tento inhibítor interaguje aj s PAS acetylcholinesterázy, čím sa zabráni naviazaniu A $\beta$  a následnému vzniku amyloidných depozít [12]. Donepezil má vplyv aj na zvyšné miesta tohto enzýmu:

- benzylová skupina vytvára kontakt s pí elektrónmi indolu v tryptofáne 84, čím obsadzuje miesto pre kvartérne ligandy. Zároveň donepezil vytvára vodíkovú väzbu cez molekuly rozpúšťadla s oxyaniónovým miestom.
- nabitý dusík piperidínového kruhu vytvára kation- $\pi$  interakciu s fenylovým kruhom fenylalanínu 330 v strede štrbiny enzýmu.
- dimetoxindanónový kruh vytvára  $\pi$ - $\pi$  interakciu s indolom v tryptofáne 279. Karbonylová skupina indanónu vytvára van der Waalsovú väzbu s aromatickými kruhmi fenylalanínov [30].

#### 2.1.4.1.3 Galantamín

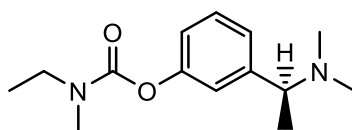


Obrázok 4. Galantamín

Galantamín (Obr. 4) je selektívny inhibítor acetylcholinesterázy s alosterickou moduláciou presynaptických nikotínových receptorov [23] používaný u skorého až stredného štádia AD [19]. Metabolizuje sa v pečeni enzýmami cytochrómu P450 CYP2D6 a CYP3A4, preto môže interagovať s liekmi, ktoré sú metabolizované týmito enzýmami [23]. Má 80–100% biologickú dostupnosť po orálnom podaní s lineárnou farmakokinetikou a biologickým polčasom 7 hodín [28].

Vo svojej molekule galantamín obsahuje aromatické jadro a terciárny amín, ktorý býva pri neutrálnom pH protonizovaný [31]. V aktívnom mieste enzýmu sa viaže na aniónovú časť prostredníctvom tryptofánu 84 a s acylovou kapsou prostredníctvom fenylyalanínu 288 a fenylyalanínu 290. Hydroxylová skupina inhibítora tvorí silnú vodíkovú väzbu s kyselinou glutámovou 199 a terciárny amín cez *N*-metylovú skupinu s kyselinou asparágovou 72 [29].

#### 2.1.4.1.4 Rivastigmín



Obrázok 5. Rivastigmín

Rivastigmín (Obr. 5) je neselektívny inhibítor AChE a BuChE [23] predpisovaný na liečbu príznakov skorého až stredného štádia AD [19]. Rivastigmín sa nemetabolizuje v pečeni, má slabú väzbu na bielkoviny plazmy (40 %) a polčas eliminácie 10 hodín. Ide o malú molekulu s výraznými nežiaducimi účinkami na gastrointestinálny trakt (GIT) po orálnom podaní. Vzhľadom k častým nežiaducim účinkom po perorálnom podaní, sa začal vyrábať vo forme transdermálnych náplastí s vyššou toleranciou [28].

Tento inhibítor viažuci sa do esteratického miesta AChE je zo skupiny karbamátových derivátov. Kovalentnou väzbou sa viaže na hydroxylovú skupinu serínu v aktívnom mieste cholínesterázy (ChE) a vytvára tak stabilný ester [12]. Odbúrava sa enzýmami, ktoré sám blokuje, teda mechanizmom hydrolýzy pomocou cholínesteráz [32].

#### 2.1.4.2 Antagonisti NMDA receptorov

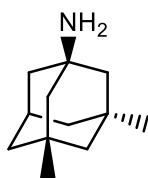
Excitotoxicita glutamátu, spôsobená nadmernou aktiváciou *N*-metyl-D-aspartátových receptorov, súvisí s patológiou AD [33].

Táto aminokyselina sa uvoľňuje do synaptickej štrbiny pomocou glutamínergných neurónov, kde buď aktivuje postsynaptické receptory, alebo sa zo synapsie vylučuje presynaptickými a gliovými transportermi. V gliových bunkách sa glutamát stáva substrátom pre glutamínsyntetázu [34].

Ukazuje sa, že prítomnosť oxidačného stresu modifikuje glutamínsyntetázu a znižuje jej aktivitu. V kôre pacientov s AD bola zaznamenaná aj znížená aktivita glutamátového transportéru. Tieto patologické zmeny môžu stáť za zvýšenou hladinou glutamátu v synaptickej štrbine [34].

Glutamát, hlavný excitačný posol v mozgu, je dôležitý pri učení, pamäťových a adaptačných procesoch [23, 34]. Jeho produkcia vo zvýšenom množstve môže cez extrémnu stimuláciu NMDA receptorov viesť k neuronálnemu poškodeniu až ku smrti mozgových buniek [19]. Blokovaním týchto receptorov sa zabráni ich aktivácií glutamátom a rozvoju excitotoxicity [23].

##### 2.1.4.2.1 Memantín



Obrázok 6. Memantín

Memantín (Obr. 6) je nekompetitívny antagonist NMDA receptorov predpisovaný na liečbu symptómov stredného až ťažkého štádia AD [15]. Má malý prínos na zlepšenie pamäti, pozornosti, komunikácie [7] a tiež nezabráni stratám

neurónov [33]. Blokádou NMDA receptorov memantín reguluje hladinu glutamátu, čím chráni mozgové bunky pred excitotoxicitou [23]. Antagonizmom na NMDA receptoroch sa zníži dlhodobá stimulácia glutaminergných neurónov a celkové poškodenie neurónov. Memantín je dobre znášaný s malým množstvom nežiaducich účinkov ako bolesť hlavy, zápcha, zmätenosť, závrat [34].

Memantín má trojkruhovú adamantánovú štruktúru s primárnym amínom, ktorý pri fyziologickom pH nesie kladný náboj. Kanály NMDA sú otvorené niekoľko milisekúnd a memantín nie je schopný sa v nich dostatočne hromadiť. Pri predĺžení aktivácie receptorov (excitotoxicita) sa preto stáva memantín vysoko účinným blokátorom [34].

Keďže antagonisti NMDA receptorov pôsobia iným mechanizmom účinku ako inhibítory acetylcholinesterázy, môžu byť tieto dve skupiny liekov predpísané v kombinácií [19]. Memantín v kombinácii s donepezilom vykazuje pozitívnejší efekt na symptómy strednej až ťažkej fázy AD než samotný donepezil [23].

## 2.2 CHOLÍNESTERÁZY

Cholinesterázy sú enzýmy zo skupiny karboxylesteráz. Ide o serín hydrolázy, ktoré katalyzujú hydrolýzu esterov cholínu (acetylcholín, butyrylcholín, succinylcholín), ale aj niektorých esterov karboxylových kyselín [11, 12].

V priebehu hydrolýzy acetylcholínu vytvorí cholín esterovú väzbu s aktívnym miestom enzýmu. Hydroxylová skupina serínu a dusík imidazolu v histidíne tvoria prechodnú vodíkovú väzbu, ktorá podporí nukleofilnú reakciu. Uľahčí sa tým prenos acetylu na serín za uvoľnenia cholínu. Rýchlou hydrolýzou acylovaného enzýmu sa obnoví esterová časť enzýmu za vzniku kyseliny octovej [35].

ChE delíme na acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu [11, 12].

### 2.2.1 Acetylcholinesteráza

Hlavnou biologickou úlohou AChE je ukončenie prenosu impulzov pri cholinergnej transmisii rýchlou hydrolýzou prirodzeného substrátu, neurotransmitera acetylcholínu, na cholín a kyselinu octovú [26].

AChE je prítomná na membráne červených krviniek, neuromuskulárnych spojov a v nervových synapsiach (hlavne u neurónov a axónov) [36, 37].

### 2.2.2 Butyrylcholinesteráza

BuChE je pomenovaná podľa preferencie pre umelý substrát butyrylcholín. Je však schopná hydrolyzovať aj iné estery cholínu a veľké množstvo exogénnych látok (sukcinylcholín, prokaín, kokaín, kyselina acetylsalicylová). Má biologický polčas okolo 10–14 dní [12].

BuChE je produkovaná v pečeni a nachádza sa predovšetkým v krvnej plazme [36]. V centrálnom nervovom systéme je viac rozšírená v hypokampe, thalame a amygdale (v gliách a endoteliálnych bunkách). Má podpornú funkciu pri odstraňovaní centrálneho acetylcholínu, hlavne pri nedostatočnej aktivite AChE [37].

### 2.2.3 Štruktúra

Cholinesteráza je glykoproteín elipsovitého tvaru [26]. Komplexné sacharidy sú kovalentne viazané pri troch aminokyselinových zvyškoch u AChE a na deviatich asparagínoch u BuChE, čo prispieva k jeho dlhšiemu polčasu rozpadu BuChE [11].

Trojrozmerná štruktúra ľudskej AChE vychádzala z poznatkov získaných pozorovaním AChE u elektrického úhora (*Torpedo californica*) [12]. V súčasnosti je známa už aj štruktúra ľudskej AChE. Kinetické štúdie poukázali na prítomnosť periférneho aniónového miesta a aktívneho katalytického miesta [26].

#### 2.2.3.1 Periférne aniónové miesto

PAS je väzbové miesto lokalizované na povrchu AChE [12]. Je bohaté na aromatické aminokyseliny. Tie hydrofóbnymi interakciami viažu substrát s nízkou afinitou a prenášajú ho hlbšie do dutiny, na ktorej dne sa nachádza katalytické miesto [38].

Toto aromatické elektrostatické miesto poskytuje hnaciu silu, aby priviedla acetylcholín na miesto jeho metabolizácie [26].

### 2.2.3.2 Aktívne miesto

Katalytické miesto sa nachádza v dutine dlhej 20 angstrómov, ktorá sa tiahne až do polovice proteínu [9]. Je tvorená aniónovým miestom, ktoré sa nachádza hneď vedľa esteratického miesta [12].

Samotná dutina, ako nenabité a lipofilné miesto, obsahuje malé množstvo kyslých zvyškov aminokyselín [26]. Na povrchu je však tvorená 14 zvyškami aromatických aminokyselín (tyrozín, tryptofán, fenylalanín) [39], ktoré sú umiestnené v slučkách medzi vláknami  $\beta$ -listu [26]. Prítomnosť  $\pi$  elektrónov aromatických jadier interaguje s acetylcholínovým kvartérnym amóniovým atómom a zodpovedá za jeho správnu orientáciu a penetráciu [12].

Esteratické miesto sa nachádza na dne tejto hlbkej dutiny [11]. Jeho súčasťou je doména s katalitickou triádou aminokyselín serín 200, histidín 440 a glutamát 327 [12]. Tieto tri zvyšky aminokyselín tvoria rovinné pole, ktoré sa podobá katalytickej trojici iných serínových proteáz (glutamát býva nahradený aspartátom, trojica má opačnú chiralitu) [26].

Serín je aktivovaný pomocou histidínu a glutamátu, čo umožní acyláciu medzi hydroxylovou skupinou serínu a kyslíkom acetylcholínu. Táto kovalentná väzba medzi enzýmom a substrátom vytvorí oxyanión, ktorý reaguje s dvoma glycínmi za vzniku vodíkovej väzby [38].

Hydrolýza esteru vedie k tvorbe acetylovaného enzýmu a voľného cholínu. Molekuly vody potom nukleofilne napadnú komplex acetyl-enzým pomocou histidínového zvyšku v esteratickom mieste. Uvoľní sa acetát a regeneruje sa voľný enzým [9].

## 2.3 MONOAMÍNOOXIDÁZY

### 2.3.1 Charakteristika

Monoamínooxidázy sú enzýmy zo skupiny amino-oxidoreduktáz. Ide o flavoproteíny, ktoré obsahujú kovalentne viazaný kofaktor flavín-adenín-dinukleotid (FAD) cez zvyšok cysteínu 8 $\alpha$ -(*S*-cysteinyl)-riboflavínovej väzby. Ich hlavnou funkciou je katalýza oxidačnej deaminácie neurotransmitterov a ďalších monoamínov prijímaných



z potravy [40]. Monoamínooxidázy sú viazané na vonkajšiu mitochondriálnu membránu nervových buniek, no nájdeme ich aj mimo centrálného nervového systému (koža, pečeň, placenta, pľúca). U ľudí sú prítomné dva typy: monoamínooxidáza A (MAO-A) a monoamínooxidáza B (MAO-B) [41].

#### 2.3.1.1 Monoamínooxidáza A

Hlavnou biologickou úlohou MAO-A je katabolizmus neurotransmiterov serotonínu, epinefrínu, norepinefrínu a dopamínu [13]. V menšej miere je schopná metabolizovať aj tyramín (prekurzor dopamínu) a tryptamín po ich absorpcii z GIT [40].

Okrem prítomnosti v nervových bunkách v mozgu sa MAO-A nachádza aj v pečeni, črevách, placente a v koži [42]. Z hľadiska centrálnej nervovej sústavy je jej zvýšená koncentrácia v telách a v dendritoch dopaminergných a noradrenergných neurónoch [13].

S vekom sa aktivita tohto enzýmu len mierne zvyšuje [40]. Pri poklese neuronálnej hustoty sa účinnosť zníži na 50 %. Počas dospelosti zostáva MAO-A pomerne stabilná [13].

#### 2.3.1.2 Monoamínooxidáza B

MAO-B je zodpovedná za katabolizmus fenyletylamínu, benzylamínu a dopamínu. Rovnako ako aj MAO-A metabolizuje tyramín a tryptamín po ich absorpcii [40].

Tento typ monoamínooxidázy je produkovaný nervovými bunkami v mozgu, krvnými doštičkami a aj lymfocytmi. Z hľadiska centrálnej nervovej sústavy je najviac lokalizovaný v serotonergných a histaminergných neurónoch a v gliových bunkách [42].

V mozgu dočiat je MAO-B takmer nedetekovateľná [40]. Postnatálnou proliferáciou astrocytov sa jej aktivita zvýši a u dospelých ostáva nemenná [13]. Veľké zvýšenie koncentrácie tohto typu enzýmu je spôsobené práve proliferáciou gliových buniek [13]. To môže prispieť k nadmernému zníženiu hladín monoamínov v mozgu počas staroby [40].

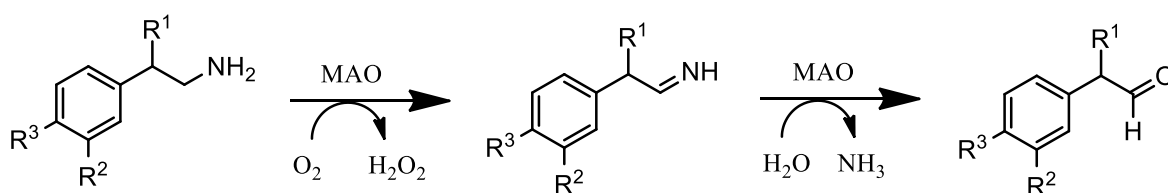
### 2.3.2 MAO a ich úloha v AD

U pacientov s Alzheimerovou chorobou sa potvrdila zvýšená aktivita MAO v mozgu. MAO cez oxidáciu amínov produkuje aldehydy, amoniak a peroxid vodíka. Práve peroxid vodíka je zahrnutý v neurodegeneratívnom procese, ktorý spôsobí oxidačný stres poškodením mitochondrií. Aktivácia MAO je zodpovedná aj za zvýšenie expresie  $\beta$ -sekterázy a  $\gamma$ -sekretázy. Tieto enzýmy sa podieľajú na tvorbe  $A\beta$  z amyloidného prekursorového proteínu. Diskutuje sa aj o možnosti zapojenia MAO vo vzniku neurofibrilárnych kľbiek [43].

### 2.3.3 Funkcia MAO

Úloha monoamínooxidáz spočíva v metabolizme amínov a v regulácií hladín neurotransmitterov a intracelulárnych amínových zásob. Taktiež má ochrannú funkciu reguláciou hladín exogénnych, diétnych amínov v GIT, v obehovej sústave a v pečeni. Predpokladá sa, že v hematoencefalickej bariére bráni vstupu potenciálne toxickým falošným neurotransmitterom [13].

Monoamínooxidáza (Obr. 7) katalyzuje rozklad amínov na odpovedajúce imíny [44]. Oxidované produkty sa neenzymaticky hydrolyzujú na aldehydy alebo ketóny, pričom sa uvoľní amoniak [14]. Počas katalytickej reakcie sa FAD redukuje na  $FADH_2$  prijatím dvoch elektrónov a dvoch protónov zo substrátu. Sám enzým sa regeneruje na aktívnu formu molekulárnym kyslíkom, ktorý sa redukuje na peroxid vodíka [44].



Obrázok 7. Oxidácia amínov

Katabolizmus bioamínov vedie k produkcii neurotoxických zlúčenín peroxidu vodíka, amoniaku a aldehydu. To môže spôsobiť oxidačné poškodenie nervových buniek v mozgu [13].

Aldehydový medziprodukt sa rýchlo metabolizuje oxidáciou aldehyddehydrogenázou na karboxylovú kyselinu alebo redukciou aldehydreduktázou na príslušný alkohol, poprípade glykol [44].

#### 2.3.4 Štruktúra

Medzi izoenzýmami MAO sa predpokladá prítomnosť konzervatívnych oblastí:

- C-koncová oblasť tvoriaca transmembránový  $\alpha$ -hélix,
- miesto kovalentného pripojenia FAD,
- doména viažuca substráty a inhibítory,
- jednotka viažuca adenín-dinukleotid-fosfát (ADP) [13].

##### 2.3.4.1 C-koncová oblasť

Monoamínooxidázy sa pomocou C-koncovej špirály viažu na vonkajšiu membránu mitochondrií [14].  $\alpha$ -Hélix, zakotvený v lipidovej dvojvrstve membrány, tvorí transmembránovú štruktúru ako kotva enzýmu. K pripojeniu tiež prispievajú ďalšie hydrofóbne vedľajšie reťazce (prolín 109, izoleucín 110) [45].

Táto oblasť enzýmu je dôležitá pre jeho biologickú funkciu a vytváranie nerozpustnej formy, ktorá je účinnejšou ako rozpustná. Skrátčením C-konca sa katalytická aktivita MAO-B zníži, špecifickosť inhibítora však ostáva nezmenená [46].

N-koncová oblasť sa nachádza v prostredí prístupnom pre rozpúšťadlo [47].

##### 2.3.4.2 Miesta viažuce FAD

Každý monomér monoamínooxidázy má kovalentne viazaný vlastný kofaktor FAD cez zvyšok cysteínu 8 $\alpha$ -(S-cysteiny)-riboflavínovej väzby. Molekula kofaktoru pomáha pri viazaní substrátov a inhibítorov, pričom je umiestnená na opačnom konci aktívneho miesta ďaleko od vstupu do dutiny [45].

V aminokyselinových sekvenciách MAO existuje deväť cysteínových zvyškov. V každom type enzýmu je prítomný jeden zvyšok, ktorý viaže cez tioéterovú väzbu 8 $\alpha$ -methylénFAD (cysteín 406 v MAO-A a cysteín 397 v MAO-B). Osem cysteínových zvyškov je potom prítomných vo forme voľných tiolov alebo sú viazané v disulfidových väzbách [47].

Tieto cysteíny nie sú nutné pre enzymatickú aktivitu, no postupným zmutovaním cysteínov na serín sa zistilo, že dva cysteínové zvyšky v MAO-A (374 a 406) a tri cysteínové zvyšky v MAO-B (156, 365 a 397) sú potrebné pre katalytickú aktivitu tohto enzýmu [13].

### 2.3.4.3 Doména viažuca substráty a inhibítory

Väzbové miesta monoamínoxidáz sú hydrofóbne kvôli prítomným aromatickým a alifatickým zvyškom. Tieto zvyšky viažu substráty s aminoskupinou [14].

Vstup substrátov a inhibítorov do dutiny väzbového miesta reguluje pohyb slučky aminokyselín 99–112 na povrchu proteínu. Zároveň táto slučka zabraňuje vstupu molekúl rozpúšťadla do aktívneho miesta. MAO-B má zvyškový okraj tvorený izoleucínom 199, ktorý môže rotovať a tvoriť otvorenú a zatvorenú konformáciu. Otvorený stav zväčší miesto pre prienik substrátu a to zvýši variabilitu veľkosti inhibítorov. V MAO-A je prítomný fenylalanín 208, ktorý netvorí otvorenú a zatvorenú konformáciu [14, 45].

Na konci dutiny aktívneho miesta enzýmu je kovalentne viazaný FAD. Flavín sa atómom uhlíka v polohe 4 a atómom dusíka v polohe 5, oblasť C<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>, podieľa na vzniku aromatickej kletky spoločne s dvoma tyrozínovými zvyškami (407 a 444 v MAO-A, 398 a 435 v MAO-B). Tieto zvyšky pomáhajú orientovať substráty pre katalytickú oxidáciu v aktívnom mieste [44]. Prítomnosť lyzínu (305 v MAO-A a 296 v MAO-B) zodpovedá za viazanie atómu N<sub>5</sub> FAD a to premostením cez molekulu vody [14].

### 2.3.5 Inhibítory monoamínoxidáz vo vzťahu k Alzheimerovej chorobe

Nepomer koncentrácií neurotransmitterov v mozgu sa spája s neurogénymi poruchami, depresiami, Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou [42].

Depresia býva spojená s poklesom katecholamínov (norepinefrínu a dopamínu) a serotonínu v limbickom systéme, ktoré umožňujú lepšiu komunikáciu medzi bunkami [48].

Monoamínoxidáza je enzým, ktorý metabolizuje vyššie uvedené neurotransmitery a spôsobuje zníženie ich koncentrácie. Inhibíciou MAO nedôjde k degradácii monoamínov v mozgu, čím sa zlepši komunikácia mozgových buniek a zároveň aj nálada [49]. Zablockovaním tohto enzýmu nebude ani dochádzať k tvorbe toxických produktov, ktoré sa zúčastňujú neurotoxických účinkov na mozgové bunky [42].

V mozgu je MAO-B zastúpená vo väčšej miere ako MAO-A. Jej aktivita sa s vekom zvyšuje. To môže byť jedno z vysvetlení stúpajúcej prevalencie depresie u starších ľudí [50].

AD je charakterizovaná prítomnosťou symptómov, ktoré zahŕňujú zmeny v osobnosti a v správaní. Ide o výkyvy nálady, sociálne stiahnutie [5], depresia, úzkosť, podráždenosť a agresivita [17]. Na zmiernenie a zlepšenie depresívnych stavov sa u Alzheimerových pacientov užívajú antidepressíva zo skupiny inhibítorov MAO. Je však nutné zhodnotiť prínosy a riziká tejto liečby [20].

## 2.4 MULTI-TARGET-DIRECTED-LIGANDS

Alzheimerova choroba patrí k neurodegeneratívnym ochoreniam s multifaktoriálnou etiopatológiou. Liečivá pôsobiace na jeden cieľ (one-target) môžu byť kvôli tomu nedostatočné pre terapiu multifaktoriálnych ochorení [51]. Vznikajúca alternatíva sa obracia k vývinu jednotnej chemickej entity, ktorá by bola schopná zasiahnuť viacero cieľov súčasne, a to ku multi-target-directed ligands (MTDLs) [25].

### 2.4.1 MTDLs v terapii Alzheimerovej choroby

Prístup MTDLs vychádza zo syntetických hybridných zlúčenín, racionálne navrhnutých tak, aby v jednej molekule zahŕňali dva alebo viacero farmakofórov schopných modulovať vlastné ciele. Ich použitie má byť výhodné pre zníženie rizika liekových interakcií a pre zlepšenie farmakokinetických a farmakodynamických parametrov. Preto tieto hybridné zlúčeniny by mohli byť účinné v liečbe komplexných chorôb [25, 52]. Každý farmakofór by si mal udržať vlastnosť interakcie s cieľovou molekulou a produkcie špecifickej odpovede s ohľadom na prebiehajúce neurodegeneratívne procesy [53].

Znížený cholinergný a glutaminergný prenos (kognitívny pokles), ako aj znížený serotonergný a monoaminergný prenos (zmena správania) vytvárajú príležitosť pre možný vznik kombinovanej molekuly MTDLs v terapii proti Alzheimerovej chorobe. Modelovanie hybridov je v tomto prípade založené na kombinácii farmakofórov pochádzajúcich z inhibítorov ChE s farmakofórmami pochádzajúcimi z inhibítorov MAO [51, 53]. Spojením týchto účinkov by sa mohla spomaliť progresia ochorenia a zároveň

sa získa aj neuroprotektívny účinok pred vznikajúcim oxidačným poškodením buniek [54].

#### 2.4.2 Takrín ako MTDLs

Najčastejšie používaným štruktúrnym základom v procese dizajnu MTDLs sú inhibítory AChE [55].

Takrín, prvý klinicky užívaný inhibítor ChE, bol kvôli svojej hepatotoxicite stiahnutý z trhu. V porovnaní s ostatnými inhibítormi AChE vykazuje veľmi dobrú inhibičnú aktivitu voči ChE, má nízku molekulovú hmotnosť, ľahko prešupuje cez hematoencefalickú bariéru a je synteticky dostupný [56, 57]. Vďaka všetkým týmto vlastnostiam je takrínový skelet najviac využívaný farmakofór vo vývoji nových MTDLs [58].

#### 2.4.3 Selegilín ako MTDLs

Inhibítory MAO-B vykazujú neuroprotektívne účinky s terapeutickým potenciálom pre Alzheimerovu chorobu. Inhibícia MAO-B u pacientov trpiacich AD je dôležitá kvôli vyššej koncentrácii MAO-B v mozgu. Inhibícia MAO-A, ktorá je zastúpená vo väčšej miere na periférii a v menšej miere aj v mozgu, sa využíva k zmierneniu príznakov depresie [54, 57].

Inhibítory MAO-B znižujú množstvo peroxidu vodíka a aldehydov, ako toxických medziproduktov, ktoré môžu spôsobiť oxidačné poškodenie buniek. Neuroprotektivita by mohla byť daná aj prítomnosťou reaktívnej propargylamínovej skupiny v štruktúre ireverzibilných inhibítorov MAO-B rasagilínu a selegilínu [54, 57].

Pri hľadaní multifunkčných zlúčenín ako potenciálnych liečiv AD sa čoraz viac začína používať propargylová/propargylamínová funkčná skupina [59]. Predpokladá sa, že prítomnosť nenasýtenej väzby propargylu nesie ochranné vlastnosti.

### 2.5 LADOSTIGIL

Design MTDLs viedol k syntéze ladostigilu, duálneho inhibítora ChE a MAO (Schéma 1). Táto chimerická molekula vychádza z karbamátovej zložky rivastigmínu a propargylamínovej skupiny rasagilínu, selektívny inhibítor monoamínooxidázy B [60]. Oba farmakofóry sú spojené pomocou indánovej molekuly rasagilínu.

Propargylová skupina interaguje s kofaktorom FAD v MAO-B, čím zabráni oxidácií amínov a tvorbe reaktívnych foriem kyslíka. To všetko prispieva k anti-apoptotickej neuroprotektívnej aktivite tejto skupiny. Rasagilín tiež reguluje neamyloidné spracovanie APP. U hlodavcov sa preukázalo, že perorálne podanie ladostigilu inhibuje mozgovú ChE. Z toho možno usudzovať, že je schopný prenikať cez hematoencefalickú bariéru. Jeho inhibícia je 100-krát silnejšia u AChE ako u BuChE. Značí to, že môže byť účinný pri liečení Alzheimerovej choroby [43].

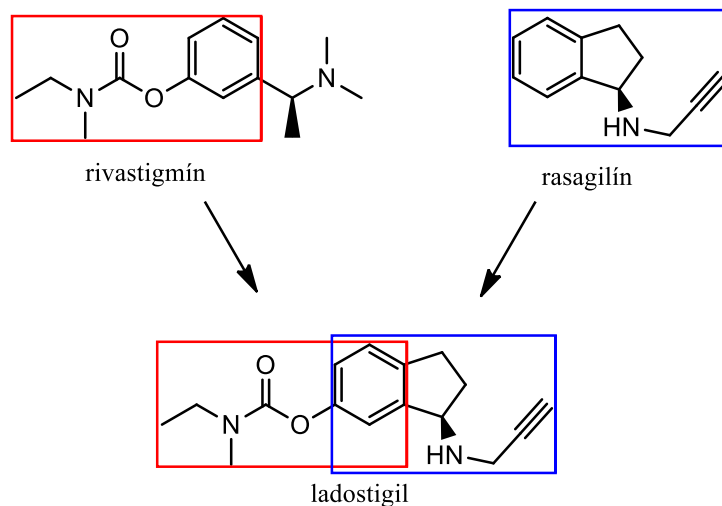


Schéma 1. Design ladostigilu využívajúci MTDLs stratégiu

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 DESIGN PROPARGYL-TAKRÍNOVÝCH DERIVÁTOV

Alzheimerova choroba je ochorenie, u ktorého okrem narušenia cholinergnej transmisie bola zistená aj prítomnosť ďalších patologických procesov. Primárnou funkciou ChE je hydrolýza acetylcholínu, avšak neskôr bolo zistené, že tieto enzýmy sa podieľajú aj na agregácií toxického  $A\beta$ , ktorý tvorí základ senilných plakov [43]. Potvrdila sa aj zvýšená aktivita MAO. Produkty oxidačnej deaminácie tohto enzýmu (aldehydy, amoniak a peroxid vodíka) vedú k oxidačnému poškodeniu mitochondrií. Aktivácia MAO je zodpovedná aj za abnormálnu expresiu  $\beta$ -sekterázy a  $\gamma$ -sekretázy. Tie štiepia APP za vzniku  $A\beta$  [43].

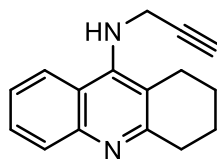
Syntéze propargyl-takrínových derivátov sa venoval Mao *et al.*. V procese designu molekúl vychádzali z molekúl takrínu, 6-chlór takrínu a *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)etán-1,2-diamínu. Zavádzaním propargylovej skupiny do vyššie uvedených takrínových skeletov sa dopracovali k zlúčeninám (Obr. 8):

- *N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín,
- 6-chlór-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín,
- 6-chlór-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín,
- *N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-*N*-(prop-2-ín-1-yl)etán-1,2-diamín,
- *N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)etán-1,2-diamín [59].

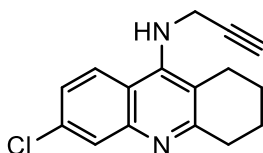
Na vyhodnotenie inhibície enzýmovej aktivity bola použitá AChE z elektrického úhora, ľudská AChE a BuChE z konského séra. Aktivita propargyl-takrínových derivátov sa porovnávala s takrínom ako referenčným štandardom. Prítomnosť propargylovej skupiny zvýšila inhibíciu oproti takrínu, no zavedenie dvoch propargylových skupín do molekuly takrínu malo za následok slabšiu inhibíciu v porovnaní s monopropargylovým analógom. Neurotoxicita pripravených derivátov sa skúmala s použitím bunkovej línie ľudského neuroblastómu SH-SY5Y. Zlúčeniny s etylénovým mostíkom vykazovali vyššiu toxicitu voči nervovým bunkám v porovnaní s ostatnými zlúčeninami. Tento jav sa dá zjednodušene vysvetliť nárastom lipofily skúmanej molekuly. Na vyhodnotenie hepatotoxicity sa využili ľudské stelátové bunky pečene (HSC). V testovaných koncentráciách syntetizované deriváty neporušili bunky



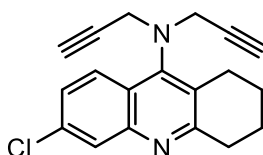
pečene, preto možno tvrdiť, že novo pripravené zlúčeniny vykazujú nižšiu hepatotoxicitu než takrín [59].



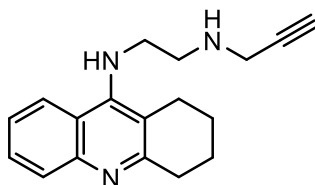
*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín



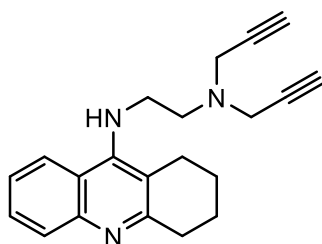
6-chlór-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín



6-chlór-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín



*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-*N*-(prop-2-ín-1-yl)etán-1,2-diamín

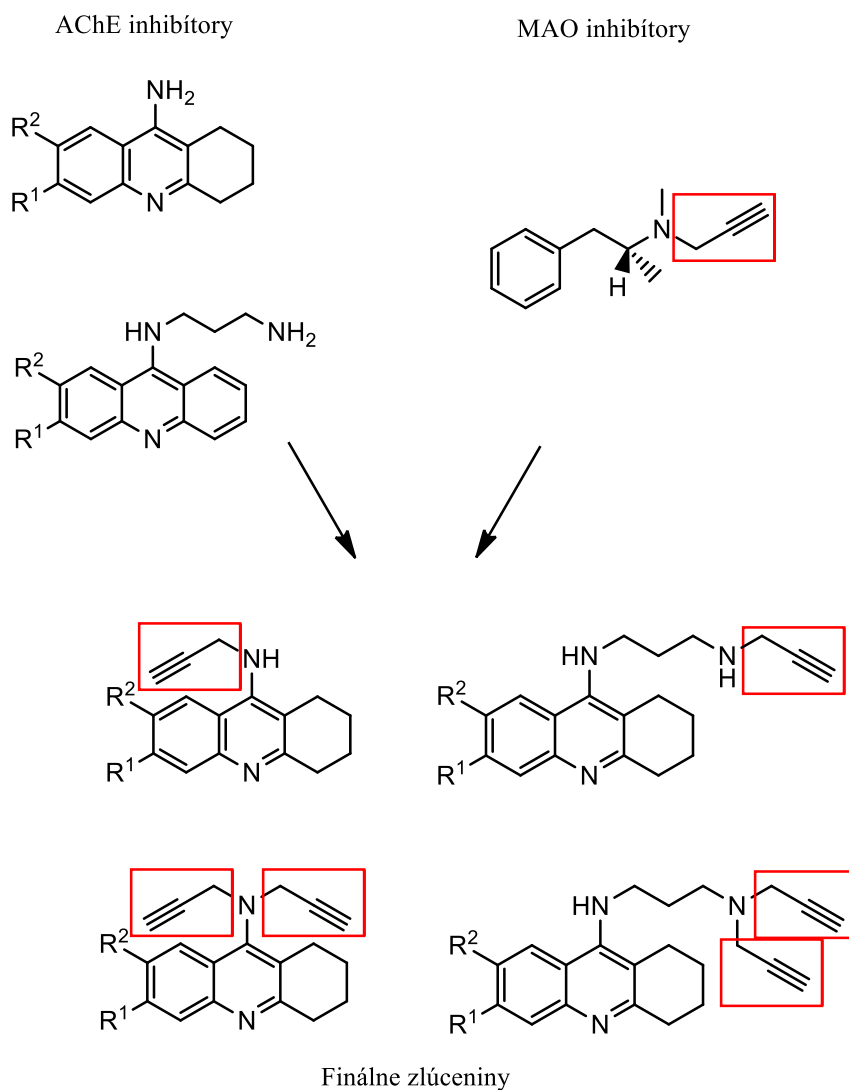


*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)etán-1,2-diamín

**Obrázok 8.** Propargyl-takrínové deriváty pripravené Maoem [59]

V mojej diplomovej práci sme sa zamerali na syntézu propargyl-takrínových derivátov (Schéma 2). Okrem už známych derivátov takrínu a 6-chlórtakrínu, sme vychádzali aj z menej toxického derivátu 7-MEOTA a 7-fenoxytakrínu. V rámci tejto práce sme pripravili nielen mono- a bispropargylované deriváty takrínových skeletov, ale aj propargylované analógy takrínových skeletov nesúcich 1,3-propándiamín.

Spojovací reťazec o dĺžke 3 uhlíkov bol zvolený zámerné. V predchádzajúcich štúdiách vypracovaných našou vedeckou skupinou bolo zistené, že optimálna dĺžka alkylového reťazca sa nachádza v rozmedzí medzi 6 až 8 uhlíkmi [27, 61]. U takýchto derivátov možno očakávať vyšší inhibičný potenciál voči ChE [56]. S ohľadom na inhibíciu MAO, boli tiež pripravené deriváty nesúce allylovú skupinu pre porovnanie vplyvu dvojitej a trojitej väzby na inhibíciu monoamínoxidáz.



**Schéma 2.** Designová stratégia propargyltakrínových hybridov

## 3.2 SYNTÉZA PROPARGYL-TAKRÍNOVÝCH DERIVÁTOV

### Obecné chemické metódy

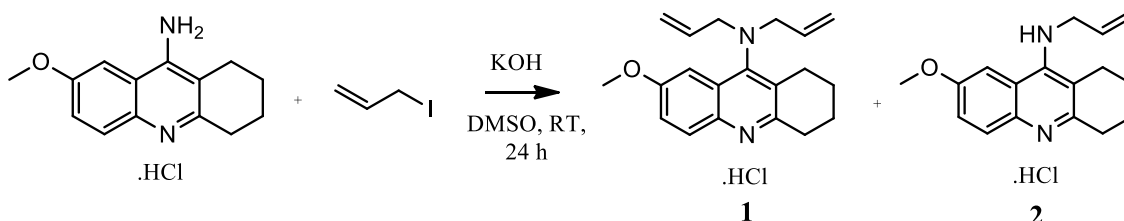
Všetky chemikálie, ktoré boli použité pre syntézu, boli dodané firmou Sigma-Aldrich (Česká Republika). Reakcie boli monitorované pomocou tenkovrstvej chromatografie (TLC) na hliníkových doskách potiahnutých silikagélom 60 F254 (Merck, Česká Republika). Stĺpcová chromatografia sa prevádzala na silikagélu 0,063–0,200 mm s pórozitou 60 (Merck, Česká Republika).

K nameraniu jednotlivých teplôt topenia bol použitý bodotávok PHMK 05 (VEB Kombinant Nagema, Radebeul, Nemecko) bez korektúr hodnôt. Nekalibrovaná čistota bola stanovená za použitia LC-UV systému pri vlnovej dĺžke 254 nm a reverznej kolóny C18.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrá boli merané na spektrometre Varian S500 pri frekvenciách 500 MHz pre  $^1\text{H}$  spektrá a 126 MHz pre  $^{13}\text{C}$  spektrá na Katedre organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej. Chemické posuny  $\delta$  sú udávané v ppm a sú nepriamo vzťahované k tetrametylsilánu prostredníctvom signálov rozpúšťadiel deuterovaného metanolu ( $\text{MeOH-}d_4$ ) a deuterovaného dimetylsulfoxidu ( $\text{DMSO-}d_6$ ). Hmotnostná spektrometria ESI-MS bola nameraná pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie HPLC a hmotnostnej spektrometrie. HP1100 HPLC systém (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko) sa skladal z vákuového splynovača G1322A, kvartérnej pumpy G1311A, autosampléra G1313A a kvadrupólového hmotnostného spektrometra MSD1456VL, ktorý bol vybavený zdrojom elektropray-ionizácie. Dusík pre hmotnostný spektrometer sa získaval z dusikového generátora Whatman 75-720. Dáta boli odčítané v pozitívnom iónovom módu ESI sondou o napätia 4000 V. Tlak rozprašovaného plynu bol nastavený na 35 psi a teplota sušiacieho plynu bola 335 °C s prietokom 13 l/min.

## Syntéza finálnych zlúčenín

### 7-metoxy-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid

#### (1) a 7-metoxy-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (2)



7-Metoxytakrín–hydrochlorid (1,00 g, 3,78 mmol) sa rozpustil v DMSO (25 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,64 g, 11,33 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal allyljodid (0,69 ml, 7,55 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylaminom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (1:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **1** ako žltú pevnú látku (130 mg) a produkt **2** ako béžovú pevnú látku (470 mg).

### 7-metoxy-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid

#### (1)

Vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 344,89

Výťažok: 10 %

Teplota topenia: 168,9–171,8 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

m/z: 309,19

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 309,1943 (vypočítané pre: [C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 309,1918)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,29 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,61 (dd, *J* = 9,2, 2,7 Hz, 1H), 7,29 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 5,90–5,85 (m, 1H), 5,85–5,80 (m, 1H), 5,30–5,23 (m, 2H), 5,23–5,18 (m, 2H), 4,06 (d, *J* = 6,5 Hz, 4H), 3,95 (s, 3H), 3,29–3,20 (m, 2H), 2,85–2,77 (m, 2H), 1,92–1,84 (m, 2H), 1,84–1,75 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159,74, 158,25, 153,86, 134,86, 133,79, 127,88, 126,48, 125,06, 122,20, 119,27, 104,37, 56,30, 55,23, 28,59, 26,41, 22,00, 20,81.

### **7-metoxy-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (2)**

Vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 304,82

Výtťažok: 41 %

Teplota topenia: 240,0–243,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

*m/z*: 269,16

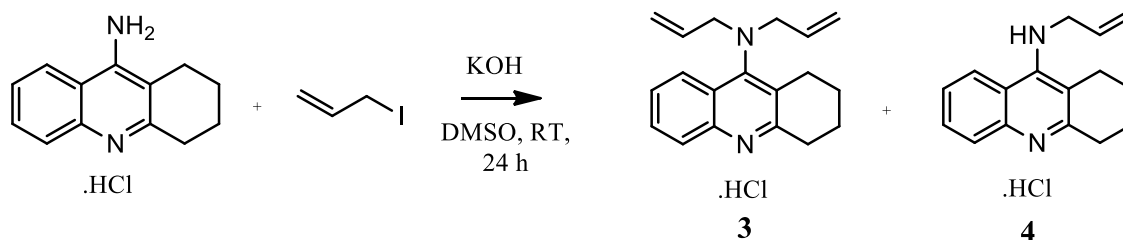
HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 269,1631 (vypočítané pre: [C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 269,1602)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7,74 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,66 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,49 (dd, *J* = 9,2, 2,6 Hz, 1H), 6,26–6,17 (m, 1H), 5,47–5,34 (m, 2H), 4,54 (dd, *J* = 4,0, 2,0 Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,07–2,98 (m, 2H), 2,81–2,72 (m, 2H), 2,02–1,90 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 157,09, 156,29, 149,13, 135,03, 133,18, 124,35, 120,26, 116,86, 115,79, 111,71, 103,70, 55,25, 48,63, 27,85, 23,77, 21,67, 20,46.

***N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (3)**

**a *N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (4)**



Takrín–hydrochlorid (1,00 g, 4,26 mmol) sa rozpustil v DMSO (25 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,72 g, 12,78 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal allyljodid (0,78 ml, 8,52 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (1:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **3** ako hnedú pevnú látku (150 mg) a produkt **4** ako žltú pevnú látku (200 mg).

***N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (3)**

Vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 314,86

Výtťažok: 11 %

Teplota topenia: 174,3–178,1 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

m/z: 279,18

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 279,1811 (vypočítané pre: [C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 279,1831)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  8,03–7,94 (m, 2H), 7,60–7,55 (m, 1H), 7,45–7,39 (m, 1H), 5,88–5,83 (m, 1H), 5,82–5,78 (m, 1H), 5,19–5,13 (m, 2H), 5,13–5,07 (m, 2H), 3,88 (d,  $J = 6,6$ , 4H), 3,13 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 2,90 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 1,99–1,92 (m, 2H), 1,88–1,82 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  160,30, 152,85, 147,90, 135,48, 128,85, 128,39, 128,10, 126,39, 124,78, 124,37, 117,25, 55,56, 33,97, 26,69, 22,94, 22,91.

#### ***N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (4)**

Vzorec:  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClN}_2$

Molekulová hmotnosť: 274,79

Výtťažok: 17 %

Teplota topenia: 223,7–226,1 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

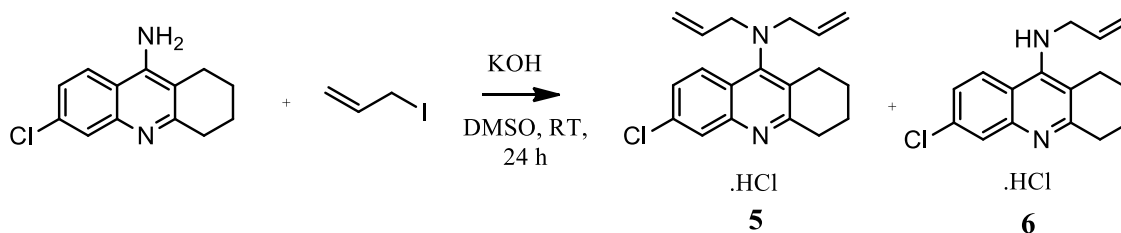
$m/z$ : 239,15

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 239,1520 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2]^+$  239,1544)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  8,35 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,86–7,75 (m, 2H), 7,57–7,49 (m, 1H), 6,21–6,10 (m, 1H), 5,42–5,30 (m, 2H), 4,60–4,50 (m, 2H), 3,03 (t,  $J = 5,9$  Hz, 2H), 2,72 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 2,02–1,90 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Metanol- $d_4$ )  $\delta$  158,31, 151,72, 139,64, 135,57, 134,08, 126,61, 126,23, 120,03, 117,41, 116,72, 112,97, 50,33, 29,32, 24,82, 22,94, 21,81.

**6-chlór-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (5)**  
**a 6-chlór-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (6)**



6-Chlórtakrétin (1,00 g, 4,30 mmol) sa rozpustil v DMSO (25 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,72 g, 12,89 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal allyljodid (0,79 ml, 8,59 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (1:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **5** ako žltú pevnú látku (120 mg) a produkt **6** ako hnedú pevnú látku (640 mg).

**6-chlór-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (5)**

Vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 349,30

Výtťažok: 8 %

Teplota topenia: 131,2–133,9 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

m/z: 314,14

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 314,1386 (vypočítané pre: [C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 314,1428)



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,35 (d,  $J$  = 9,3 Hz, 2H), 8,06 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H), 7,38–7,29 (m, 1H), 6,13–6,07 (m, 2H), 5,29–5,05 (m, 4H), 4,32–4,10 (m, 4H), 3,02 (t,  $J$  = 5,5 Hz, 2H), 2,48 (t,  $J$  = 5,6 Hz, 2H), 1,81–1,73 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  157,55, 150,13, 145,48, 137,20, 128,56, 125,19, 123,12, 118,63, 114,44, 112,88, 110,70, 48,34, 27,64, 21,90, 21,03, 20,09.

### **6-chlór-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (6)**

Vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 309,23

Výtťažok: 48 %

Teplota topenia: 173,9–177,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

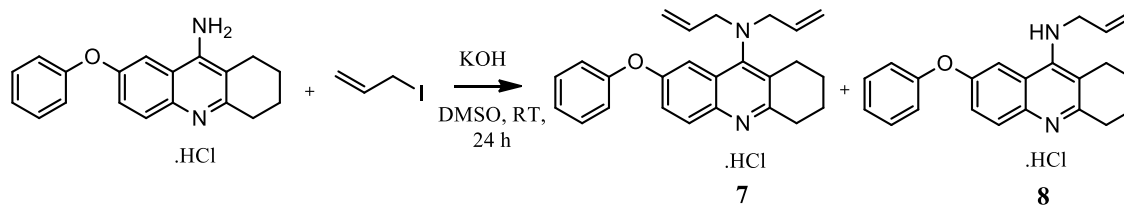
$m/z$ : 274,11

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 274,1053 (vypočítané pre: [C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 274,1100)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,33 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 8,11 (d,  $J$  = 2,2 Hz, 1H), 7,52 (dd,  $J$  = 9,3, 2,2 Hz, 1H), 6,14–6,02 (m, 1H), 5,30–5,19 (m, 2H), 4,54–4,40 (m, 2H), 3,02–2,96 (m, 2H), 2,65 (t,  $J$  = 5,6 Hz, 2H), 1,81 (dd,  $J$  = 6,9, 4,1 Hz, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  155,76, 151,19, 138,77, 137,11, 134,89, 127,79, 125,26, 118,00, 116,69, 113,89, 111,73, 45,44, 28,05, 23,91, 21,47, 20,32.

**7-fenoxy-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (7) a 7-fenoxy-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (8)**



7-Fenoxytakrín–hydrochlorid (1,00 g, 3,06 mmol) sa rozpustil v DMSO (25 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,52 g, 9,18 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal allyljodid (0,56 ml, 8,54 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylaminom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (1:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **7** ako žltú pevnú látku (810 mg) a produkt **8** ako hnedé kryštáliky (260 mg).

**7-fenoxy-*N,N*-di(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (7)**

Vzorec: C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 406,96

Výt'azok: 65 %

Teplota topenia: 97,8–100,7 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

m/z: 371,21

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 371,2106 (vypočítané pre: [C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 371,2131)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,40 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,76 (dd,  $J = 9,2, 2,6$  Hz, 1H), 7,53–7,47 (m, 2H), 7,34 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H), 7,32–7,26 (m, 1H), 7,22–7,17 (m, 2H), 5,71–5,66 (m, 1H), 5,66–5,61 (m, 1H), 5,17–5,10 (m, 4H), 3,88 (d,  $J = 6,5$  Hz, 4H), 3,27 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 2,79 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 1,92–1,84 (m, 2H), 1,83–1,75 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160,05, 156,46, 155,70, 155,29, 134,73, 134,31, 130,89, 127,99, 126,32, 125,95, 125,37, 123,03, 120,27, 119,34, 110,82, 55,06, 28,77, 26,32, 21,93, 20,78.

### **7-fenoxy-*N*-(prop-2-én-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (8)**

Vzorec:  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}$

Molekulová hmotnosť: 366,89

Výtťažok: 23 %

Teplota topenia: 47,6–50,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

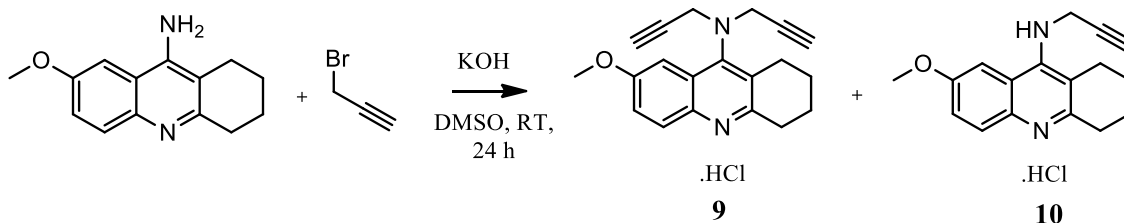
$m/z$ : 331,18

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 331,1806 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}]^+$  331,1802)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,13 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 8,01 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,65 (dd,  $J = 9,2, 2,3$  Hz, 1H), 7,48–7,39 (m, 2H), 7,24–7,18 (m, 1H), 7,11–7,05 (m, 2H), 5,81–5,71 (m, 1H), 5,11–5,01 (m, 2H), 4,31–4,23 (m, 2H), 3,03 (t,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 2,65 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 1,86–1,75 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,43, 155,68, 154,13, 150,42, 135,18, 134,80, 130,79, 125,87, 124,69, 121,92, 119,59, 116,54, 116,49, 111,99, 111,71, 48,67, 28,26, 24,26, 21,86, 20,72.

**7-metoxy-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (9) a 7-metoxy-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (10)**



7-Metoxytakrín (1,00 g, 4,38 mmol) sa rozpustil v DMSO (20 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,49 g, 8,76 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal propargylbromid (80%, 0,94 ml, 8,76 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylaminom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **9** ako nahnedlú pevnú látku (135 mg) a produkt **10** ako nahnedlú pevnú látku (490 mg).

**7-metoxy-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (9)**

Vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 340,85

Výt'azok: 9 %

Teplota topenia: 217,9–220,2 °C

Nekalibrovaná čistota: 97 %

m/z: 305,16

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 305,1553 (vypočítané pre: [C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 305,1601)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 8,00 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 9,1, 2,5 Hz, 1H), 4,49–4,42 (m, 4H), 4,03 (s, 3H), 3,29 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,08 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 3,02 (t, *J* = 2,2 Hz, 2H), 2,08–2,00 (m, 2H), 1,98–1,91 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Metanol-*d*<sub>4</sub>) δ 151,33, 151,29, 145,78, 125,72, 120,63, 118,76, 117,92, 113,23, 95,62, 70,34, 66,87, 47,70, 33,04, 20,35, 18,15, 13,62, 12,53.

### **7-metoxi-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín-hydrochlorid (10)**

Vzorec: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 302,80

Výtťažok: 37 %

Teplota topenia: 237,7–240,1 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

*m/z*: 325,26

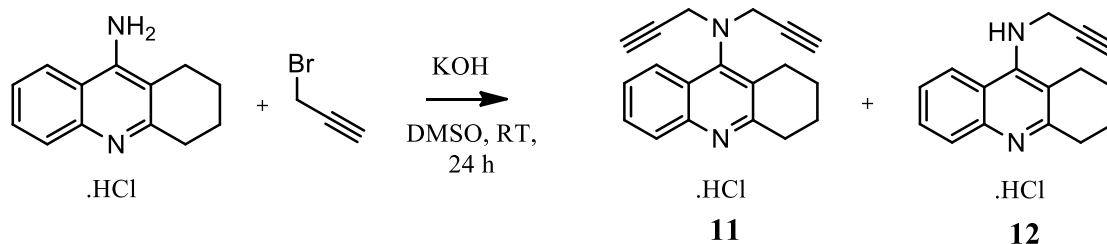
HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 325,2595 (vypočítané pre: [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 325,2610)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 7,86 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,28–7,24 (m, 1H), 7,22 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 4,12 (d, *J* = 2,6 Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,09–3,01 (m, 2H), 2,84 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,29 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 1,96–1,88 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 156,49, 156,37, 148,25, 143,38, 130,45, 121,74, 120,73, 119,66, 100,93, 81,46, 72,34, 55,50, 37,97, 33,74, 24,65, 22,94, 22,78.

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (11)**

**a *N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (12)**



Takrín–hydrochlorid (1,00 g, 4,26 mmol) sa rozpustil v DMSO (20 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,72 g, 12,78 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal propargylbromid (80%, 0,92 ml, 8,52 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylaminom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtla sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **11** ako žltú pevnú látku (225 mg) a produkt **12** ako nahnedlú pevnú látku (650 mg).

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (11)**

Vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 310,83

Výtťažok: 17 %

Teplota topenia: 198,1–201,0 °C

Nekalibrovaná čistota: 96 %

m/z: 275,15

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 275,1497 (vypočítané pre: [C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 275,1515)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,37 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 8,17 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 8,03–7,94 (m, 1H), 7,83–7,75 (m, 1H), 4,48–4,32 (m, 4H), 3,55–3,43 (m, 2H), 3,39–3,26 (m, 2H), 2,99–2,88 (m, 2H), 1,96–1,86 (m, 2H), 1,85–1,76 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159,66, 157,21, 138,22, 133,40, 128,43, 128,33, 125,85, 125,02, 120,59, 79,46, 77,27, 42,19, 28,98, 26,04, 21,80, 20,70.

### ***N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (12)**

Vzorec:  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClN}_2$

Molekulová hmotnosť: 272,78

Výťažok: 56 %

Teplota topenia: 222,6–225,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 97 %

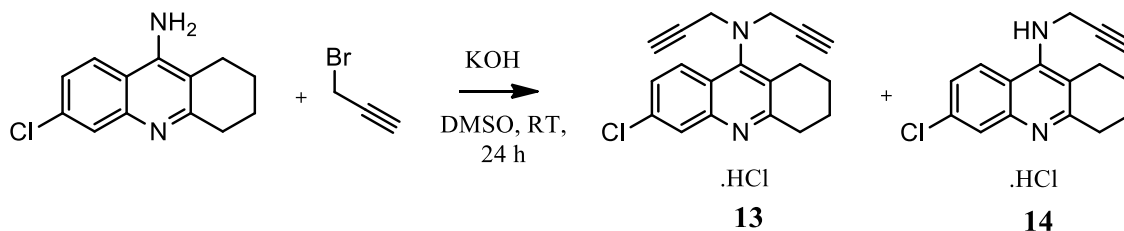
$m/z$ : 237,13

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 237,1310 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2]^+$  237,1279)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,58 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 8,42 (bs, 1H), 8,06 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,92–7,80 (m, 1H), 7,66–7,52 (m, 1H), 4,71–4,56 (m, 2H), 3,53–3,40 (m, 1H), 3,12–2,99 (m, 2H), 2,81–2,66 (m, 2H), 1,92–1,72 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,56, 151,86, 138,13, 133,10, 125,70, 125,44, 119,65, 116,13, 112,20, 80,84, 76,73, 36,47, 28,43, 24,33, 21,85, 20,66.

**6-chlór-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (13) a 6-chlór-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (14)**



6-Chlórtaakrín (1,00 g, 4,30 mmol) sa rozpustil v DMSO (20 ml). Potom sa pridal rozdrobený KOH (0,48 g, 8,59 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal propargylbromid (80%, 0,93 ml, 8,59 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylaminom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **13** ako žltú pevnú látku (445 mg) a produkt **14** ako nahnedlú pevnú látku (330 mg).

**6-chlór-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (13)**

Vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 345,27

Výtťažok: 30 %

Teplota topenia: 199,8–202,7 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

m/z: 346,08



HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 346,0843 (vypočítané pre: [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 346,0819)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,48–8,42 (m, 1H), 8,17 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,82 (dd, *J* = 9,1, 1,9 Hz, 1H), 4,45–4,34 (m, 4H), 3,54–3,46 (m, 2H), 3,30 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 2,92 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,93–1,85 (m, 2H), 1,85–1,77 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159,38, 158,37, 139,02, 137,62, 128,75, 128,66, 128,16, 123,80, 119,67, 79,33, 77,43, 42,23, 29,26, 26,06, 21,76, 20,66.

### **6-chlór-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (14)**

Vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Molekulová hmotnosť: 306,07

Výtťažok: 25 %

Teplota topenia: 218,4–220,8 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

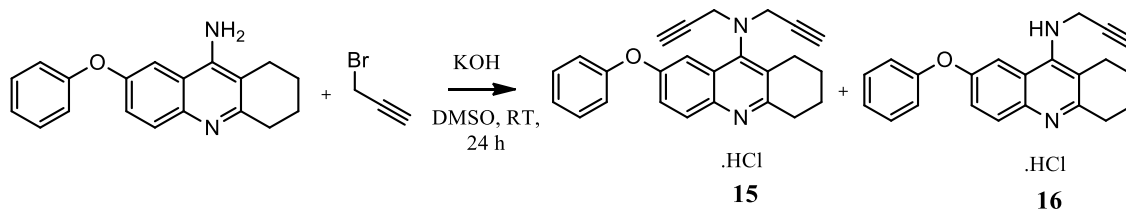
*m/z*: 272,09

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 272,0944 (vypočítané pre: [C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 272,0918)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,57 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 8,54 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 8,14 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,61 (dd, *J* = 9,3, 2,2 Hz, 1H), 4,68–4,61 (m, 2H), 3,50 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 3,04 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 2,73–2,67 (m, 2H), 1,86–1,77 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 155,31, 152,31, 138,88, 137,58, 128,00, 125,88, 118,39, 114,58, 112,64, 80,47, 77,05, 36,45, 28,43, 24,25, 21,71, 20,56.

**7-fenoxy-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (15) a 7-fenoxy-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (16)**



7-Fenoxytakrín (1,00 g, 3,44 mmol) sa rozpustil v DMSO (20 ml). Potom sa pridal KOH (0,39 g, 6,89 mmol). Suspenzia sa miešala počas 2 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Potom sa pridal propargylbromid (80%, 0,74 ml, 6,89 mmol) a miešalo sa ďalších 24 hodín za rovnakých podmienok. Výsledná zmes sa zriedila vodou (100 ml) a extrahovala sa štyrikrát s etyl–acetátom (75 ml). Zozbierané organické vrstvy sa vysušili pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nadbytok rozpúšťadla sa odparil. Surový produkt sa čistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1). Čistá báza sa rozpustila v dietyléteru a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Rozpúšťadlo sa odparilo. Zrážanie pomocou MeOH/dietyléter poskytlo konečný produkt **15** ako hnedú pevnú látku (210 mg) a produkt **16** ako tmavú hnedú pevnú látku (325 mg).

**7-fenoxy-*N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (15)**

Vzorec: C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 402,92

Výtťažok: 15 %

Teplota topenia: 168,9–173,9 °C

Nekalibrovaná čistota: 97 %

m/z: 367,18

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 367,1817 (vypočítané pre: [C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 367,1795)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,42 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 9,2, 2,6 Hz, 1H), 7,52–7,45 (m, 3H), 7,30–7,24 (m, 1H), 7,22–7,16 (m, 2H), 4,28–4,15 (m, 4H), 3,34–3,27 (m, 4H), 2,90 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,93–1,85 (m, 2H), 1,84–1,76 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 157,87, 156,43, 155,49, 155,31, 134,62, 130,64, 128,91, 126,35, 125,90, 125,08, 122,95, 119,94, 110,20, 78,92, 76,71, 41,30, 28,57, 25,64, 21,47, 20,46.

### **7-fenoxy-*N*-(prop-2-ín-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín–hydrochlorid (16)**

Vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O

Molekulová hmotnosť: 364,87

Výtťažok: 26 %

Teplota topenia: 177,1–180,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

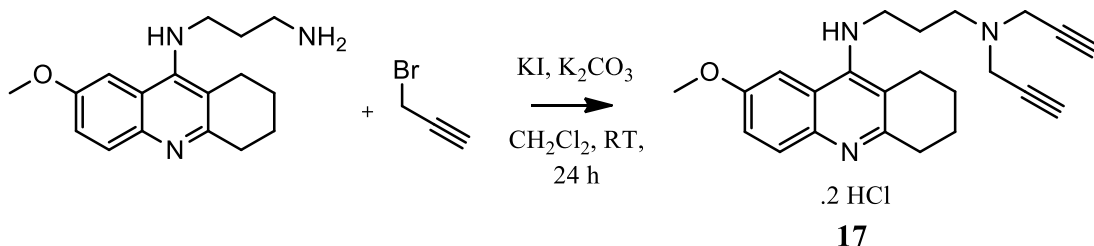
m/z: 329,16

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: 329,1635 (vypočítané pre: [C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 329,1629)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,26 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,19–8,12 (m, 2H), 7,65 (dd, *J* = 9,2, 2,4 Hz, 1H), 7,45–7,38 (m, 2H), 7,21–7,15 (m, 1H), 7,12–7,05 (m, 2H), 4,54–4,44 (m, 2H), 3,30 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 3,10–3,02 (m, 2H), 2,78–2,69 (m, 2H), 1,88–1,75 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 156,51, 154,62, 153,67, 151,07, 134,49, 130,45, 126,00, 124,16, 121,80, 118,77, 116,97, 112,50, 112,10, 80,23, 76,35, 35,95, 28,07, 24,11, 21,56, 20,37.

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (17)**



*N*-(7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín (1,00 g, 3,50 mmol) sa rozpustil v 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Potom sa pridali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,97 g, 7,01 mmol) a KI (0,06 g, 0,35 mmol). Do reakčnej zmesi sa zaviedol inertný plyn. Nakoniec sa po kvapkách pridal propargylbromid (80%, 0,41 ml, 3,85 mmol). Reakčná zmes sa miešala 24 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Následne sa surový produkt prefiltraval a nezreagované anorganické zvyšky sa premyli MeOH (30 ml). Filtrát sa odparil a prečistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1 → 1:1). Čistá báza sa rozpustila v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Odparením rozpúšťadla sa získal konečný produkt **17** ako svetlá oranžová pevná látka (820 mg).

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)-propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (17)**

Vzorec: C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnosť: 434,41

Výtťažok: 54 %

Teplota topenia: 170,6–173,0 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

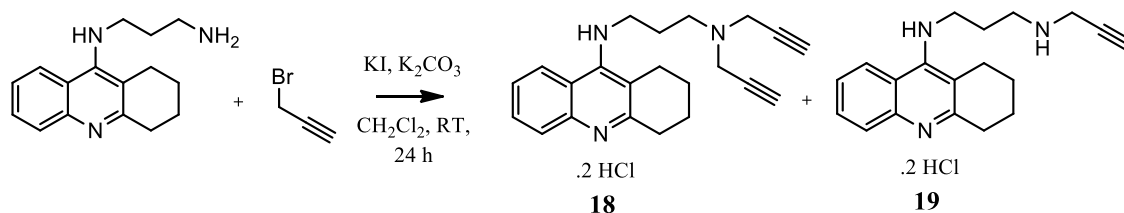
m/z: 363,49

HRMS [M+2H]<sup>2+</sup>: 363,4904 (vypočítané pre: [C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>2+</sup> 363,4948)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,99 (bs, 1H), 7,97 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,79 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 7,50 (dd,  $J = 9,2, 2,4$  Hz, 1H), 4,15–4,00 (m, 4H), 3,95 (s, 3H), 3,93–3,88 (m, 2H), 3,79–3,71 (m, 2H), 3,23–3,14 (m, 2H), 3,02 (t,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 2,75 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 2,22–2,12 (m, 2H), 1,86–1,75 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  156,82, 154,84, 150,08, 132,62, 124,14, 120,97, 117,68, 111,51, 103,65, 81,16, 73,41, 56,45, 49,46, 43,81, 41,79, 28,07, 25,29, 24,98, 21,89, 20,39.

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–  
dihydrochlorid (18) a *N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-  
yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (19)**



*N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín (1,00 g, 3,92 mmol) sa rozpustil v 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Potom sa pridali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,08 g, 7,83 mmol) a KI (0,07 g, 0,39 mmol). Do reakčnej zmesi sa zaviedol inertný plyn. Nakoniec sa po kvapkách pridal propargylbromid (80%, 0,46 ml, 4,31 mmol). Reakčná zmes sa miešala 24 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Následne sa surový produkt prefiltraval a nezreagované anorganické zvyšky sa premyli MeOH (30 ml). Filtrát sa odparil a prečistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1 → 1:1). Čistá báza sa rozpustila v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Odparením rozpúšťadla sa získal konečný produkt **18** ako hnedá pevná látka (300 mg) a produkt **19** ako béžová pevná látka (200 mg).

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–  
dihydrochlorid (18)**

Vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>

Molekulová hmotnosť: 404,38

Výťažok: 19 %

Teplota topenia: 104,2–106,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

m/z: 333,48

HRMS [M+H]<sup>2+</sup>: 333,4795 (vypočítané pre: [C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> 333,4779)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,52 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 8,13 (dd,  $J = 8,6, 1,2$  Hz, 1H), 8,07 (bs, 1H), 7,93–7,87 (m, 1H), 7,65–7,58 (m, 1H), 4,17 (s, 4H), 4,02 (q,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 3,94–3,82 (m, 2H), 3,38–3,22 (m, 2H), 3,09 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 2,76 (t,  $J = 5,6$  Hz, 2H), 2,36–2,20 (m, 2H), 1,95–1,80 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,06, 151,47, 138,25, 132,97, 125,74, 125,48, 119,64, 116,23, 111,89, 81,98, 73,31, 49,71, 44,60, 42,05, 28,46, 25,07, 24,74, 22,01, 20,73.

***N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–  
dihydrochlorid (19)**

Vzorec:  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3$

Molekulová hmotnosť: 366,33

Výtťažok: 14 %

Teplota topenia: 151,4–154,3 °C

Nekalibrovaná čistota: 98 %

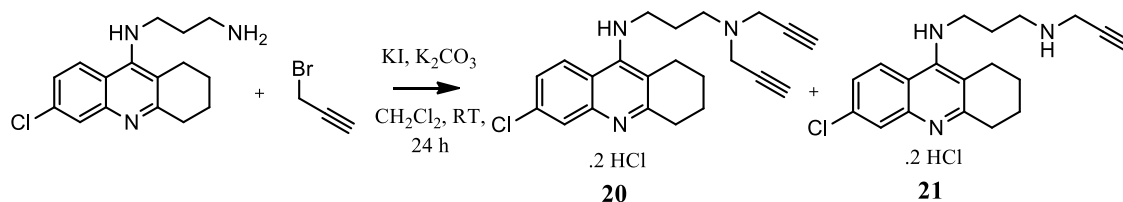
$m/z$ : 295,43

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ : 295,4291 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3]^{2+}$  295,4306)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,90 (bs, 2H), 8,55 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 8,09 (dd,  $J = 8,6, 1,2$  Hz, 1H), 8,05 (bs, 1H), 7,96–7,86 (m, 1H), 7,69–7,57 (m, 1H), 4,06 (q,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 3,98–3,89 (m, 2H), 3,74 (t,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 3,18–3,02 (m, 4H), 2,77 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 2,30–2,13 (m, 2H), 1,95–1,80 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,05, 151,35, 138,24, 133,03, 125,78, 125,55, 119,62, 116,17, 111,90, 79,92, 75,48, 44,29, 43,57, 35,86, 28,47, 26,73, 24,78, 22,01, 20,75.

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(6-chlór-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (20) a *N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(6-chlór-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (21)**



*N*-(6-chlór-1.2.3.4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín (1,00g, 3,45 mmol) sa rozpustil v 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Potom sa pridali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,95 g, 6,90 mmol) a KI (0,06 g, 0,35 mmol). Do reakčnej zmesi sa zaviedol inertný plyn. Nakoniec sa po kvapkách pridal propargylbromid (80%, 0,41 ml, 3,80 mmol). Reakčná zmes sa miešala 24 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Následne sa surový produkt prefiltraval a nezreagované anorganické zvyšky sa premyli MeOH (30 ml). Filtrát sa odparil a prečistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1 → 1:1). Čistá báza sa rozpustila v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a nasýtla sa pomocou plynného HCl. Odparením rozpúšťadla sa získal konečný produkt **20** ako hnedá pevná látka (167 mg) a produkt **21** ako béžová pevná látka (345 mg).

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(6-chlór-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (20)**

Vzorec: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>

Molekulová hmotnosť: 438,82

Výt'azok: 11 %

Teplota topenia: 181,2–183,5 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

m/z: 367,92

HRMS [M+H]<sup>2+</sup>: 367,9235 (vypočítané pre: [C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> 367,9210)



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,48 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 8,18 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 8,15 (bs, 1H), 7,56 (dd,  $J = 9,2, 2,2$  Hz, 1H), 4,11 (s, 4H), 3,96 (q,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 3,85–3,78 (m, 2H), 3,30–3,19 (m, 2H), 3,02 (t,  $J = 5,1$  Hz, 2H), 2,67 (t,  $J = 5,2$  Hz, 2H), 2,29–2,15 (m, 2H), 1,88–1,75 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,85, 151,86, 139,00, 137,35, 128,04, 125,81, 118,34, 114,73, 112,32, 81,89, 73,32, 49,65, 44,63, 42,01, 28,40, 24,85, 24,57, 21,82, 20,58.

***N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(6-chlór-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–  
dihydrochlorid (21)**

Vzorec:  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{N}_3$

Molekulová hmotnosť: 400,77

Výtťažok: 25 %

Teplota topenia: 183,5–185,2 °C

Nekalibrovaná čistota: 96 %

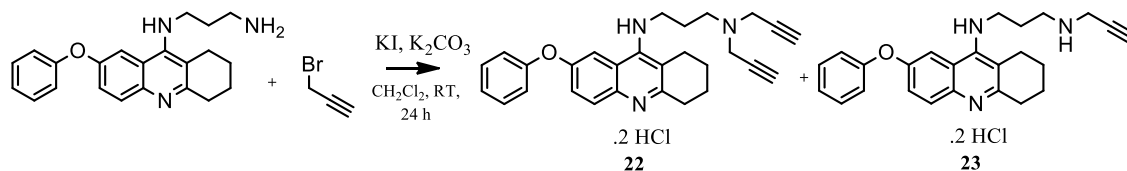
$m/z$ : 329,87

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ : 329,8678 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{ClN}_3]^{2+}$  329,8674)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,86 (bs, 2H), 8,49 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 8,19–8,05 (m, 2H), 7,55 (dd,  $J = 9,2, 2,3$  Hz, 1H), 3,98 (q,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,68 (t,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 3,12–2,91 (m, 4H), 2,68 (t,  $J = 5,0$  Hz, 2H), 2,23–2,08 (m, 2H), 1,91–1,72 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155,78, 151,70, 138,98, 137,35, 128,11, 125,82, 118,29, 114,60, 112,30, 79,85, 75,42, 44,32, 43,48, 35,80, 28,39, 26,48, 24,60, 21,81, 20,59.

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (22) a *N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (23)**



*N*-(7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín (1,00 g, 2,88 mmol) sa rozpustil v 30 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Potom sa pridali K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,80 g, 5,76 mmol) a KI (0,05 g, 0,29 mmol). Do reakčnej zmesi sa zaviedol inertný plyn. Nakoniec sa po kvapkách pridal propargylbromid (80%, 0,34 ml, 3,17 mmol). Reakčná zmes sa miešala 24 hodín pri teplote miestnosti za inertných podmienok. Následne sa surový produkt prefiltraval a nezreagované anorganické zvyšky sa premyli MeOH (30 ml). Filtrát sa odparil a prečistil stĺpcovou chromatografiou s použitím silikagélu, ktorý sa predbežne sýtil trietylamínom. Ako mobilná fáza bola zvolená hexán/etyl–acetát (3:1 → 1:1). Čistá báza sa rozpustila v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a nasýtila sa pomocou plynného HCl. Odparením rozpúšťadla sa získal konečný produkt **22** ako žltá pevná látka (515 mg) a produkt **23** ako hnedá pevná látka (210 mg).

***N,N*-di(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (22)**

Vzorec: C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O

Molekulová hmotnosť: 496,48

Výt'azok: 36 %

Teplota topenia: 175,3–177,7 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

m/z: 425,57

HRMS [M+H]<sup>2+</sup>: 425,5719 (vypočítané pre: [C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>2+</sup> 425,5731)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,15 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 8,00–7,94 (m, 1H), 7,90 (bs, 1H), 7,62 (dd,  $J = 9,2, 2,3$  Hz, 1H), 7,47–7,39 (m, 2H), 7,23–7,16 (m, 1H), 7,09 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 4,00 (s, 4H), 3,81 (q,  $J = 6,0$  Hz, 2H), 3,77–3,70 (m, 2H), 3,16–3,07 (m, 2H), 3,07–2,99 (m, 2H), 2,77–2,66 (m, 2H), 2,09–2,01 (m, 2H), 1,87–1,77 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,57, 155,05, 153,55, 150,92, 134,44, 130,47, 125,68, 124,17, 121,78, 118,77, 117,20, 112,30, 111,75, 81,00, 73,60, 49,43, 44,17, 41,71, 28,10, 24,95, 24,61, 21,71, 20,37.

***N*-(prop-2-ín-1-yl)-*N'*-(7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-yl)propán-1,3-diamín–dihydrochlorid (23)**

Vzorec:  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$

Molekulová hmotnosť: 458,43

Výt'azok: 16 %

Teplota topenia: 177,6–180,0 °C

Nekalibrovaná čistota: 99 %

$m/z$ : 387,53

HRMS  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ : 387,5317 (vypočítané pre:  $[\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}]^{2+}$  387,5309)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,75 (bs, 2H), 8,10 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,99 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,87 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 7,61 (dd,  $J = 9,2, 2,3$  Hz, 1H), 7,47–7,40 (m, 2H), 7,22–7,17 (m, 1H), 7,11–7,06 (m, 2H), 3,88–3,84 (m, 2H), 3,84–3,80 (m, 2H), 3,67 (t,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 3,08–3,01 (m, 2H), 2,95 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 2,76–2,68 (m, 2H), 2,05–1,94 (m, 2H), 1,86–1,76 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,52, 155,06, 153,63, 150,88, 134,37, 130,48, 125,68, 124,21, 121,75, 118,81, 117,18, 112,27, 111,80, 79,58, 75,08, 43,61, 43,17, 35,52, 28,12, 26,37, 24,74, 21,73, 20,38.

### 3.3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Experimentálna časť tejto diplomovej práce bola zameraná na syntézu propargyl-takrínových hybridných zlúčenín.

Pripravili sme allylové a propargylové deriváty takrínu, substituovaného takrínu (7-MEOTA, 6-chlórtakrín, 7-fenoxytakrín) a propargylové deriváty s trojuhlíkatým diamínovým reťazcom. Zvolili sme substituenty chlór a fenoxyskupinu, ktoré by mali vykazovať vyššiu inhibičnú aktivitu a lepšiu priepustnosť cez hematoencefalickú bariéru, metoxyskupinu kvôli nižšej toxicite a diamínový reťazec pre zvýšenie afinity k ChE [56].

Výsledkom týchto jednokrokových reakcií boli mono- a dialkylované produkty. Vzhľadom k tomu, že nám v priebehu jednej syntézy vznikli dva produkty, tak sa výťažnosť líšila v širokom rozmedzí.

Pri syntéze allylových derivátov nám primárne vznikal monoalkylovaný produkt s výťažkami 17–48 %, ale u 7-fenoxytakrínu prevládal dialkylovaný produkt s výťažkom 65 %. Výťažnosť zvyšných dialkylovaných produktov sa pohybovala od 8 do 11 %.

Pri syntéze propargylových derivátov nám primárne vznikal monoalkylovaný produkt s výťažkami 25–56 %, ale u 6-chlórtakrínu prevládal dialkylovaný produkt s výťažkom 30 %. Výťažnosť zvyšných dialkylovaných produktov sa pohybovala od 9 do 17 %.

Pri syntéze propargylových derivátov propán-1,3-diamínu nám primárne vznikal dialkylovaný produkt s výťažkami 11–54 %, ale u 6-chlórtakrínového derivátu prevládal monoalkylovaný produkt s výťažkom 25 %. Výťažnosť zvyšných monoalkylovaných produktov sa pohybovala od 0 do 16 %.

Pri syntéze allylových/propargylových derivátov takrínu sme vychádzali z dvoch ekvivalentov allyljodidu/propargylbromidu, zatiaľ čo u propargylových derivátov propán-1,3-diamínu sme vychádzali z 1,1 ekvivalentu propargylbromidu. Táto skutočnosť a zároveň aj prítomnosť diamínového reťazca mohli mať vplyv na výťažnosť produktov v prospech mono- a dialkylovaných derivátov, pretože v tretej sérii reakcií sa nám výťažnosť zvýšila na stranu dialkylovaných produktov.

Podarilo sa nám pripraviť 23 derivátov. Päť derivátov z nasyntetizovaných 23 už boli popísané v literatúre. Ide o zlúčeniny **4**, **6**, **12**, **13** a **14**. Zvyšných 18 derivátov sú novými zlúčeninami.

Všetky deriváty boli charakterizované teplotou topenia, NMR spektrami, hmotnostnou spektrometriou. Všetky pripravené zlúčeniny vykazovali čistotu v rozmedzí 96–99 % pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Vďaka prítomnosti tetrahydroakridínového skeletu by mohli inhibovať cholinesterázy, zatiaľ čo allylový/propargylový fragment by mohol mať vplyv na monoamínooxidázy a tým pádom aj nepriamy neuroprotektívny účinok. Všetky vyššie uvedené tvrdenia budeme môcť povedať s istotou až po prijatí výsledkov biologického testovania inhibičných aktivít.

## 4 ZÁVER

V súčasnej dobe nastáva situácia, kedy sa postupne predlžuje dĺžka života ľudí. Predlžovanie dĺžky života so sebou nesie i niektoré úskalia ako je napr. nárast populácie starších ľudí. Prirodzenou súčasťou starnutia je aj postupné zabúdanie informácií, čo sa dostáva do konfliktu s príznakmi Alzheimerovej choroby.

V súčasnej dobe neexistuje vhodná diagnostická metóda ani kauzálna terapia AD. Je preto dôležité informovať verejnosť potrebnými vedomosťami na včasný záchyt správnych príznakov. Čím skôr sa začne terapia, tým skôr sa dosiahne zmiernenie príznakov, lepšia kvalita života a predĺženie jeho trvania.

Od definovania AD uplynulo niekoľko desiatok rokov. Zatiaľ sa nenašla príčina jej vzniku. Veda nepozná cieľ, ktorý by mala farmakologicky zasiahnuť. Dostupná terapia len zmierni a spomalí progresiu symptómov sprevádzajúcich túto formu demencie.

Každým rokom pribúdajú výskumné články o syntéze a biologickom testovaní nových potenciálnych terapeutík Alzheimerovej choroby. Kvôli veľkému počtu hypotéz vysvetľujúcich vznik tejto choroby sa postupne zvyšuje aj tendencia vo vývoji a výskume zamerať sa na design zlúčenín, ktoré obsahujú viacero farmakofórov v jednej molekule. Ide o komplexnejší prístup liečby zasahujúci viac štruktúr súčasne. Okrem zníženia počtu užívaných liečiv pacientmi s AD by sa mala zlepšiť i compliance pacienta, ktorú so sebou prináša MTDLs (jedno klinické testovanie a zjednodušenie farmakokinetických a farmakodynamických štúdií, nižšie riziko interakcie medzi liečivami, nižšie riziko nežiaducich účinkov ai.).

## 5 REFERENCIE

1. Musiek, E. S.; Holtzman, D. M. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat. Neurosci.*, **2015**, *18*, 800-806.
2. Selkoe, D. J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.*, **2016**, *8*, 595-608.
3. Burns, A.; Iliffe, S. Alzheimer's disease. *BMJ*, **2009**, *338*, 158.
4. MacGill, M. *What's to know about Alzheimer's disease?* [online], **2018** [cit. 2017-11-04]. Dostupné z:  
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/159442.php>
5. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Association/Alzheimer's & Dementia*, **2016**, *12*, 459-509.
6. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.*, **2010**, *362*, 329-344.
7. *Alzheimer's disease* [online], [cit. 2017-11-04]. Dostupné z:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Alzheimer%27s\\_disease](https://en.wikipedia.org/wiki/Alzheimer%27s_disease)
8. *Acetylcholinesterase: A Representative Inactivation Enzyme* [online], **1998** [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:  
<https://web.williams.edu/imput/synapse/pages/IVA1.html>
9. *Acetylcholinesterase* [online], [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>
10. Goodsell, D. S. *Acetylcholinesterase* [online], **2004** [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:  
<http://pdb101.rcsb.org/motm/54>
11. Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, Ch. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2003**, *4*, 131-138.
12. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub.*, **2011**, *155*, 219-229.

13. Shih, J. C.; Chen, K.; Ridd, M. J. Monoamine oxidase: From Genes to Behavior. *Annu. Rev. Neurosci.*, **1999**, *22*, 197-217.
14. Gaweska, H.; Fitzpatrick, P. F. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *BioMol. Concepts*, **2011**, *2*, 365-377.
15. *What Is Alzheimer's?* [online], **2012** [cit. 2017-11-04]. Dostupné z: [https://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_what\\_is\\_alzheimers.asp](https://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp)
16. *What Are the Signs of Alzheimer's Disease?* [online], **2017** [cit. 2017-11-05]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/what-are-signs-alzheimers-disease>
17. *Alzheimer's disease* [online], **2017** [cit. 2017-11-05]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447>
18. Ganguli, M.; Dodge, H. H.; Shen, Ch.; Pandav, R. S.; Dekosky, S. T. Alzheimer Disease and Mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch. Neurol.*, **2005**, *62*, 779-784.
19. *How Is Alzheimer's Disease Treated?* [online], **2017** [cit. 2017-11-06]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/health/how-alzheimers-disease-treated>
20. Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E. Alzheimer's disease. *Lancet*, **2011**, *377*, 1019-1031.
21. *Alzheimer's disease* [online], **2017** [cit. 2017-11-07]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/diagnosis-treatment/drc-20350453>
22. Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr. Alzheimer Res.*, **2013**, *10*, 893-906.
23. Blennow, K.; de Leon, M. J.; Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet*, **2006**, *368*, 387-403.



24. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem.-Biol. Interact.*, **2010**, *187*, 10-22.
25. Rampa, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A. Hybrid-Based Multi-Target Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011**, *11*, 2716-2730.
26. Sussman, J. L.; Silman, I. Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Struct. Biol.*, **1992**, *2*, 721-729.
27. Korabecny, J.; Andrs, M.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Horova, A.; Malinak, D.; Mezeiova, E.; Gorecki, L.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*, **2015**, *20*, 22084-22101.
28. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.*, **2012**, *2012*, 1-8.
29. *AChE inhibitors and substrates* [online], **2013** [cit. 201711-12]. Dostupné z: <http://www.proteopedia.org/w/AChE%inhibitors%20and%20substrates%26oldid=1727122>
30. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, **1999**, *7*, 297-307.
31. *Galantamine* [online], [cit. 2017-11-12]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Galantamine>
32. *Rivastigmine* [online], [cit. 2017-11-12]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rivastigmine>
33. Hung, Shih-Ya.; Fu, Wen-Mei. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.*, **2017**, *24*.
34. Olivares, D.; Deshpande, V. K.; Shi, Y.; Lahiri, D. K.; Greig, N. H.; Rogers, J. T.; Huang, X. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine

Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **2012**, *9*, 746-758.

35. Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2005**, *5*, 293-302.

36. *Cholinesterase* [online], [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cholinesterase>

37. Brunovský, M. Inhibitory Cholinesteráz v léčbě Alzheimerovej nemoci. *Neurologie pro praxi*. **2007**, *2*, 112-117.

38. Erasmus, H.; Fauvel, B.; Jaeg, T. *Human Acetylcholinesterase* [online], **2009** [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:

[http://proteopedia.org/wiki/index.php/Human\\_Acetylcholinesterase](http://proteopedia.org/wiki/index.php/Human_Acetylcholinesterase)

39. *Structural Biochemistry/Enzyme/Acetylcholinesterase* [online], [cit. 2017-11-12]. Dostupné z:

[https://en.wikibooks.org/wiki/Structural\\_Biochemistry/Enzyme/Acetylcholinesterase](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Acetylcholinesterase)

40. *Monoamine oxidase* [online], [cit. 2017-11-23]. Dostupné z:

[https://en.wikipedia.org/wiki/Monoamine\\_oxidase](https://en.wikipedia.org/wiki/Monoamine_oxidase)

41. Maďa, P.; Fontana, J. *Funkce buněk a lidského těla* [online], [cit. 2017-11-23]. Dostupné z:

<http://fbt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/5-neurotransmisni-systemy/>

42. De Monte, C; D'Ascenzio, M.; Guglielmi, P.; Mancini, V.; Carradori, S. Opening New Scenarios for Human MAO Inhibitors. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **2016**, *16*, 98-104.

43. Korábečný, J.; Nepovimová, E.; Cikánková, T.; Špilovská, K.; Vašková, L.; Mezeiová, E.; Kuča, K.; Hroudová, J. Newly Developed Drugs for Alzheimer's Disease in Relation to Energy Metabolism, Cholinergic and Monoaminergic Neurotransmission. *Neurosci.*, **2018**, *370*, 191-206.

44. Vianello, R.; Domene, C.; Mavri, J. The Use of Multiscale Molecular Simulations in Understanding a Relationship between the Structure and Function of Biological

Systems of the Brain: The Application to Monoamine oxidase Enzymes. *Front. Neurosci.*, **2016**, *10*, 327.

45. *Monoamine oxidase b* [online], [cit. 2017-11-27]. Dostupné z:

[http://proteopedia.org/wiki/index.php/Monoamine\\_oxidase\\_b](http://proteopedia.org/wiki/index.php/Monoamine_oxidase_b)

46. Son, S.-Y.; Ma, J.; Kondou, Y.; Yoshimura, M.; Yamashita, E.; Tsukihara, T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, *105*, 5739-5744.

47. Hubálek, F.; Pohl, J.; Edmondson, D. E. Structural Comparison of Human Monoamine Oxidase A and B. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 28612-28618.

48. *Antidepresiva* [online], [cit. 2017-11-28]. Dostupné z:

<http://www.wikiskripta.eu/w/Antidepresiva>

49. Carter, A. *What Are MAO Inhibitors?* [online], **2017** [cit. 2017-11-28]. Dostupné z:

<https://www.healthline.com/health/depression/what-are-mao-inhibitors#suicide-risk8>

50. *Inhibitory monoaminoxidázy se vracejí do hry* [online], **2013** [cit. 2017-11-28]. Dostupné z:

<https://www.tribune.cz/clanek/29088-inhibitory-monoaminoxidazy-se-vraceji-do-hry>

51. Weinreb, O.; Mandel, S.; Bar-Am, O.; Yogev-Falach, M.; Avramovich-Tirosh, Y.; Amit, T.; Youdim, M. B. Multifunctional Neuroprotective Derivates of Rasagiline as Anti-Alzheimer's Disease Drugs. *Neurotherapeutics*, **2009**, *6*, 163-174.

52. Unzeta, M.; Esteban, G.; Bolea, I.; Fogel, W. A.; Ramsay, R. R.; Youdim, M. B. H.; Tipton, K. F.; Marco-Contelles, J. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.*, **2016**, *10*, 205.

53. Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 347-372.

54. Pisani, L.; Catto, M.; Leonetti, F.; Nicolotti, O.; Stefanachi, A.; Campagna, F.; Carotti, A. Targeting Monoamine Oxidases with Multipotent Ligands: An Emerging Strategy in the Search of New Drugs Against Neurodegenerative Diseases. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, *18*, 4568-4587.

55. Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C. From Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors to Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs): A Step Forward in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2008**, *8*, 960-967.
56. Korábečný, J.; Spilovská, K.; Benek, O.; Musílek, K.; Soukup, O.; Kuča, K. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Čes. slov. Farm.*, **2012**, *61*, 210-221.
57. Wu, W. Y.; Dai, Y. Ch.; Li, N. G.; Dong, Z. X.; Gu, T.; Shi, Z. H.; Xue, X.; Tang, Y. P.; Duan, J. A. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2017**, *32*, 572-587.
58. Guzior, N.; Wieckowska, A.; Panek, D.; Malawska, B. Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, *22*, 373-404.
59. Mao, F.; Li, J.; Wei, H.; Huang, L.; Li, X. Tacrine-propargylamine derivatives with improved acetylcholinesterase inhibitory activity and lower hepatotoxicity as a potential lead compound for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2014**, *30*, 995-1001.
60. Sameem, B.; Saeedi, M.; Mahdavi, M.; Shafiee, A. A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *128*, 332-345.
61. Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabanova, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 8985-9003.