

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

BIOCHEMIE

Vypracováno na
KATEDŘE ANORGANICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PRIONOVÉ NEMOCI – ÚLOHA IONTŮ PŘECHODNÝCH KOVŮ
PRION BASED DISEASES – ROLE OF TRANSITION METAL IONS

Zuzana Malová

Vedoucí práce/školitel:
Prof. RNDr. Ivan Lukeš, CSc.

Konzultanti: Prof. RNDr. Jiří Hudeček CSc., Doc. RNDr. Jan Kotek CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem zadanou závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.05.2018

Podpis:

Zuzana Malová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat mému školiteli prof. Ivanovi Lukešovi za nespočetně mnoho času, který mi věnoval během konzultací. Zároveň bych ráda poděkovala konzultantům mé bakalářské práce, a to doc. Janu Kotkovi a prof. Jiřímu Hudečkovi, kteří se mnou taktéž proseděli spoustu hodin při opravě této práce.

Největší poděkování patří mým rodičům, kteří mě podporovali během celého vzdělávání a motivovali mě k dokončení této práce i bakalářského studia. Mamince, která nesčetněkrát vyslechla můj nárek, ale i radosti, a vždy mě podpořila. Tatínkovi zejména za jeho humor a neustálé vylepšování nálady. Také děkuji mým sourozencům za projevy obdivu během mého studia chemie, obzvláště ráda bych poděkovala mé sestře Aniče, která se mnou v laboratoři strávila hodiny a fascinována chemií na mě čekala, dokud neskončím a nepůjdeme domů.

V neposlední řadě mockrát děkuji mému příteli Jeníkovi, který se mnou nejenže opravoval gramatické chyby a celkově kontroloval můj psaný projev po jazykové stránce, ale také mi byl celou dobu nejlepší oporou.

Skvělou náladu při syntetické práci mi činila celá skupina laboratoře č. 19. Jmenovitě děkuji Luce za naslouchání k mým stížnostem a radostem, Kubovi, Marcelovi, Mišce a mnoha dalším. Za měření spekter a konzultací syntetické práce patří poděkování Davidovi Hurnému a Ondřejovi Zemkovi.

Na závěr bych chtěla poděkovat osobě, která ve mně vzbudila lásku k chemii natolik, že jsem se rozhodla pro obor Biochemie, a to mému učiteli ze střední školy – Radimovi Ondrovi.

Abstrakt

Prionová onemocnění jsou hojně rozšířené nemoci, které jsou charakteristické změnou struktury prionového proteinu PrP^C (cellular, nativní forma) na PrP^{Sc} (scrapie, forma typická pro prionové onemocnění). Jedná se o změnu ze sekundární struktury α -helixu na β -skládaný list, který tvoří agregáty v mozku. Jednou z možností, proč dochází ke změně struktury je zvýšená koncentrace přechodných iontů (Zn(II), Cu(II), Fe(III)) v mozku, které se pak vážou na PrP^C a ovlivňují jeho strukturu. Cílem této práce je syntéza jednoho potencionálního léčiva na bázi 2-aminothiazolů jeho modifikace k navázání fluorescenčních nebo radiochemických značek a v budoucnosti studium jeho možné interakce s ionty přechodných kovů.

Klíčová slova:

komplexy; makrocyclické ligandy; měď; prionová onemocnění

Abstract

Prion diseases are widely spread diseases among mammals. They are characterized by a change of prion protein structure PrP^C (cellular, native state) to PrP^{Sc} (scrapie, structure typical for prion diseases). It is a change at secondary structure of protein from α -helical to β -sheet structure, which aggregates in brain. One possibility, why it happens is higher transitional metal ions concentration (Zn(II), Cu(II), Fe(III)) in the brain, which bind to PrP^C and affects its structure. Aim of this thesis is a synthesis one of protentional drugs based on 2-aminothiazole and its modification to bind fluorescent or radiochemical markers and in future study of its possible interaction with transition metal ions.

Key words:

complexes; macrocyclic ligands; copper; prion diseases

Seznam zkratek

A β	amyloid- β -peptid
AD	Alzheimerova nemoc
ADAM	disintegriny a metaloproteinasy
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxayolepropionová kyselina
AMPA	receptor pro AMPA
APP	transmembránový prekurzorový protein pro A β
ATP7A	Menkeho protein
ATP7B	měď-transportní protein ATPáza 2
BBB	hematoencefalická bariéra
(Boc) ₂ O	di(<i>terc</i> -butyl)-dikarbonát
BSE	nemoc šílených krav
CJD	Creutzfeldt-Jakobova nemoc
CNS	centrální nervová soustava
Ctrl	apikální transportér iontů kovů
EC ₅₀	koncentrace látky, která způsobí určitý efekt u 50 % testovaných organismů
EtOH	ethanol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova nemoc
HD	Huntingtonova nemoc
MeOH	methanol
Me ₂ CO	aceton
M _r	molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MT	metalothionein
NMDA	<i>N</i> -methyl D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
nvCJD	nová varianta Creutzfeldt-Jakobovy nemoci
OR	čtyřikrát se opakující sekvence osmi aminokyselin
PD	Parkinsonova nemoc
PrD	prionové nemoci
PrP ^C	prion v α -helikální konformaci
PrP ^{Sc}	prion v β -struktúře

R_f	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAR	vztah mezi strukturou a reaktivitou látky
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
THF	tetrahydrofuran
ZnTs	transportéry zinku
ZIP	protein importující zinek

Obsah

1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	8
1.1 ÚVOD DO NEURODEGENERATIVNÍCH NEMOCÍ	8
1.1.1 Alzheimerova nemoc (AD).....	8
1.1.2 Parkinsonova nemoc (PD)	8
1.1.3 Huntingtonova nemoc (HD)	9
1.1.4 Prionové nemoci (PrD)	9
1.1.4.1 Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD).....	9
1.1.4.2 Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova nemoc (GSS)	10
1.1.4.3 Fatální rodinná nespavost	10
1.2 IONTY PŘECHODNÝCH KOVŮ V LIDSKÉM MOZKU.....	11
1.2.1 Vápník.....	11
1.2.2 Zinek.....	12
1.2.3 Měď.....	12
1.2.4 Železo	13
1.2.5 Ionty interagující s PrP	13
1.3 PRP ^C	15
1.3.1 PrP ^C a jeho funkce.....	15
1.3.2 AMPA a α -štěpení.....	16
1.4 SMĚRY PRO TERAPII PRIONOVÝCH NEMOCÍ.....	18
1.5.1 2-aminothiazoly.....	19
1.5.1.1 C-kruh.....	20
1.5.1.2 A-kruh	21
1.5.1.3 B-kruh.....	21
1.4 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	22
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
2.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ.....	23
2.2 METODY CHARAKTERIZACE LÁTEK.....	23
2.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	23
2.2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	23
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)	23
2.3 SYNTETICKÁ ČÁST	24
2.3.1 Schéma syntézy 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu (6).....	24

2.3.2 Schéma syntézy modifikované látky 4 z obrázku 4 – <i>tert</i> -butyl(2-(2-((4-(3,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)(pyridin-2-yl)amino)ethoxy)ethyl)karbamátu (11)	25
2.3.3 Syntéza 3,4 -dimethoxybenzoylbromidu (2).....	26
2.3.4 Syntéza 1-(pyridin-2-yl)thiomočoviny (5).....	27
2.3.5 Syntéza 4-(3,4-dimethoxyfenyl)- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu (6)	29
2.3.6 Syntéza 2-(2-((<i>tert</i> -butoxykarbonyl)amino)ethoxyl)methansulfonátu (8)	30
2.3.7 Syntéza <i>tert</i> -butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamátu (9).....	32
2.3.8 Pokusy o syntézu <i>tert</i> -butyl(2-(2-(1-(pyridin-2-yl)thioureido)ethoxy)-ethyl)karbamátu (10)	34
2.3.8.1 Reakce v acetonu	34
2.3.8.2 Reakce v pyridinu	35
2.3.8.3 Reakce v dioxanu.....	36
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	38
3.1 REPRODUKCE SYNTÉZY 2-AMINOTHIAZOLŮ	38
3.2 SYNTÉZA LÁTKY (9)	39
3.3 POKUSY O SYNTÉZU LÁTKY (10)	40
4 ZÁVĚR	41
5 SEZNAM LITERATURY	42

1 Teoretický úvod

1.1 Úvod do neurodegenerativních nemocí

Většina neurodegenerativních nemocí je charakterizována intracelulární akumulací β -skládaných listů, které vznikají z původních α -helixů. Tyto útvary mohou být popsány jako tzv. plaky (angl. „*plaques*“), klubka (angl. „*tangles*“) nebo Lewyho útvary. Nachází se v neuronech a dalších mozkových buňkách. Pro tyto nemoci je charakteristická dlouhá inkubační doba, pomalé objevování symptomů a pozdní nástup nemoci ^{[1][2]}. To je patrné i z následujícího krátkého přehledu neurodegenerativních nemocí, přičemž hlavní důraz je kladen na prionové nemoci, na které je bakalářská práce zaměřena.

1.1.1 Alzheimerova nemoc (AD)

Alzheimerova nemoc je nejrozsáhlejší formou demence, která postihuje téměř 20 milionů lidí na světě. Charakteristická pro tuto nemoc je tvorba velkého množství amyloidních plaků, které jsou obklopeny mrtvými nebo umírajícími neurony ^{[1][3][4]}. Amyloidní plaky obsahují amyloid- β -peptid ($A\beta$), což je 40- až 42- aminokyselinových zbytků dlouhý zbytek proteinu, který je segmentem 770- aminokyselinových zbytků transmembránového prekursorového proteinu APP ^[2], jehož funkce je neznámá. $A\beta$ vzniká z APP pomocí dvou membránově vázaných proteolytických enzymů, β - a γ - sekretasou ^{[3][5][6]}.

Nemoc se obvykle začne projevovat v pozdním věku, avšak existují mutace APP v $A\beta$ oblasti, což vede k nástupu nemoci již kolem čtyřiceti let věku. Další příčinou brzkého nástupu nemoci je odlišná varianta cholesterolu-transportního proteinu – apolipoproteinu E (apoE), který ve variantě apoE4 představuje velké riziko pro vývoj i brzký nástup Alzheimerovy nemoci ^[3].

1.1.2 Parkinsonova nemoc (PD)

Jedná se o druhou nejrozšířenější neurodegenerativní nemoc na světě po Alzheimerově nemoci. Napadá kolem 1 % populace pozdního věku. Projevuje se chvěním, neovladatelností svalů a samovolnou pohyblivostí brady. Jako příčina se uvádí ztráta neuronů bohatých na dopamin v černé hmotě, kde se také objevují proteinové agregáty. Jedná se zejména o Lewyho útvary s α -synucleinem, což je protein o velikosti 140 aminokyselin, jako hlavním komponentem ^{[1][4][7]}.

1.1.3 Huntingtonova nemoc (HD)

Huntingtonova nemoc je příkladem plně dědičné neurodegenerativní nemoci [2]. Nachází se na chromosomu 4p16.3 v lidském genomu, kde jsou meioticky nestabilní sekvence CAG opakovány v exonu 1 daného chromozomu. Exon 1 je zodpovědný za syntézu proteinu huntingtin s molekulovou hmotností 350 kDa (3100 aminokyselin) [4]. Při přenášení nestabilní sekvence CAG, která je náchylná k tvorbě patologické elongace během meiózy, se tvoří abnormálně dlouhý řetězec polyglutamátových vláken přítomných při mutovaném huntingtin proteinu, kdy délka polyglutamátového vlákna je více než 28 glutamátových aminokyselin [1][2][8].

Počátečním symptomem je zhoršení motoriky, dále pak dochází ke změnám chování nebo k neuropsychologickým symptomům. Dalším z nejběžnějších počátečních symptomů je zhoršení pohybu oka [8].

Huntingtin protein se nachází v cytoplazmě, axonech a synapsích. Interaguje s více než 200 ostatními buněčnými proteiny a účastní se v regulaci transkripce. Mutace proteinu může způsobit změny v jeho konformaci, čímž se sníží rozpustnost. Mutovaný protein má tendenci tvořit agregáty v různých odděleních postižené nervové buňky [8].

1.1.4 Prionové nemoci (PrD)

Tato bakalářská práce je zaměřena na prionové nemoci. Původně si vědci mysleli, že prionové nemoci způsobují tzv. „pomalé viry“, protože trvá měsíce nebo i roky, než se nemoc rozvine. Mezi tyto nemoci patří klusavka (angl. „*scrapie*“) u ovcí, chronické chřadnutí jelenovitých a losů (angl. „*chronic wasting disease*“), nemoc šílených krav (BSE, z angl. „*bovine spongiform encephalopathy*“), kuru, Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova nemoc (GSS) a fatální rodinná nespavost (angl. „*fatal familial insomnia*“) [2]. Na příčinu prionových nemocí panuje řada názorů, mezi nimi je často uváděna a také široce diskutována úloha iontů přechodných kovů [9].

1.1.4.1 Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD)

Jedná se o chorobu, která ovlivňuje centrální nervový systém a je charakteristická typickými lézemi v mozku, třebaže příznaky mohou být i v jiných orgánech. CJD způsobuje progresivní demenci, poruchy koordinace a smrt [1][10]. CJD může být buď zděděná (10-20%), anebo transmisní, tj. spojená s infekcí bílkovinnými molekulami prionů [2]. Tato nemoc postihuje lidi ve věku 55 až 70 let a symptomy jsou často viditelné již čtyři měsíce před propuknutím nemoci [11]. Dědičná forma CJD může být přenesena z matky na

potomstvo během porodu nebo již v děloze ^[2]. Mezi běžné symptomy patří úzkost, nespavost, později demence a pacienti často zemřou již v průběhu prvního roku od nástupu nemoci ^[11].

Jedna z forem CJD je tzv. nová varianta CJD (nvCJD), která byla poprvé popsána v Británii v roce 1996 a postihuje mladé lidi (ve věku 16-39 let). Symptomy jsou podobné jako u BSE (také známá jako nemoc šílených krav) a vyskytuje se často v zemích, kde je BSE pozorována. Další forma CJD byla kuru, což je transmisní nemoc spojená s kanibalistickými rituály na Papue Nové Guinee. Její symptomy byly stejné a oběť zemřela do dvou let od nástupu nemoci. Nemoc vymizela z ostrova až spolu s rituály ^[11].

1.1.4.2 Gerstmann-Sträussler-Scheinkerova nemoc (GSS)

GSS je dědičné neurodegenerativní onemocnění charakteristické ataxií, demencí a neuropatologickým ukládáním amyloidních plaků, které jsou tvořeny prionovým proteinem ^[12]. U této choroby bylo poprvé zjištěno spojení s mutací prionů v lidském genu, a to nejčastěji na kodonu 102, která plyne ze substituce prolinu na leucin. Jiné mutace se mohou vyskytovat na kodonu 105, 117, 145, 198 a 217 ^[10].

1.1.4.3 Fatální rodinná nespavost

Fatální rodinná nespavost patří do skupiny prionových neurodegenerativních poruch. Jedná se o rapidně progresivní nemoc, která je charakterizovaná postupní permanentní únavou, za kterou následuje až kóma a smrt. Charakteristikou je mutace na 129. kodonu lidského prionového proteinu ^[10].

1.2 Ionty přechodných kovů v lidském mozku

V lidském mozku se nachází mnoho iontů, které jsou nezbytné pro jeho funkci. Jejich vliv na vývoj nemocí centrální nervové soustavy (CNS) je dokládán řadou publikací ^{[13][14][15][16][17]}. Pro pochopení patologických procesů probíhajících v buňkách mozku je potřeba také znát homeostázi iontů kovů, jejich transport a interakce s ostatními biomolekulami. Samotná homeostáze zahrnuje velký počet proteinů včetně metalothioneinů, které kontrolují jejich koncentraci, distribuci a funkci. Porucha této homeostáze může vést k vážným poruchám, jako jsou neurodegenerativní nemoci ^{[13][18]}.

Ionty kovů mají svou úlohu při intramolekulárních interakcích, které jsou nezbytné pro vznik proteinových agregátů ^[18]. Příkladem mohou být ionty železa, zinku a mědi, které jsou součástí metaloproteinů, například Cu/Zn superoxiddismutasa a cytochrom c oxidasa, a hrají velkou roli v regulaci nervové aktivity.

Jejich koncentrace musí být striktně regulovaná, protože výkyvy koncentrace mohou vést k buněčné smrti a mnoha onemocněním ^[13]. Pokud v mozku nastane nerovnováha fyziologické koncentrace iontů kovů, zvyšuje se náchylnost buňky k zahájení apoptózy, což je běžný faktor neurodegenerativních onemocnění ^[18]. A je obecně přijímáno, že ionty přechodných kovů mají význam při Alzheimerově nemoci (AD), Parkinsonově nemoci (PD) a prionových nemocích (PrD). Koncentrace iontů mědi a zinku jsou vyšší v mozku za přítomnosti amyloidů AD a v cerebrospinální tekutině v případě jak AD, tak i PD. Také akumulace iontů železa je spojena s oběma typy nemocí – AD a PD ^{[7][13]}.

I když je případná škodlivá role měďnatých iontů v prionových nemocích stále neznámá, bylo prokázáno, že prionové proteiny mají důležitou roli při regulaci metabolismu mědi. Vzniklá interakce PrP-Cu(II) brání přístupu dalších Cu(II) ^{[13][18]}.

1.2.1 Vápník

Vápenaté ionty (Ca(II)) jsou všudypřítomné při nervovém přenosu, jelikož plní funkci modulátorů uvolňování neurotransmiterů. Při nervovém vzruchu akční potenciál aktivuje otevírání iontových kanálků pro vstup Ca(II). Proto jeho koncentrace musí být striktně regulována. Obecně se předpokládá, že aktivace amyloidní kaskády mění cestu Ca(II) v nervové soustavě ^[19]. Na druhé straně, koncentrace Ca(II) nacházejících se v cytoplazmě je zvýšená v určitých částech dopaminergní dráhy i v černé hmotě (lat. *substantia nigra*), kde se objevují první symptomy PD ^[18].

1.2.2 Zinek

Zinečnaté ionty (Zn(II)) jsou součástí stovek enzymů a proteinů. Jeho množství musí být striktně regulováno ^[20]. Zn(II) spolu s Cu(II) ovlivňuje aktivitu receptorů extrasynaptické *N*-methyl-D-aspartátu (NMDA) a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxayolepropionové kyseliny (AMPA), které regulují aktivitu glutamaterických synapsí ^[13]. Zn(II) moduluje neurotransmisi a funkci synapsí, zároveň reguluje mnoho signálních drah, a proto jeho koncentrace musí být striktně regulována transportéry zinku ZnT. ZnT snižují intracelulární koncentraci Zn(II), a zinek importujících proteinů (ZIP), které importují Zn(II) z extracelulárního prostoru anebo lumenu organel do cytoplazmy a metalothioneinů (MT) ^{[18][21]}. Zn(II) vstupují do buňky prostřednictvím Ca kanálů, nebo přes ionotropní glutamátové receptory do neuronů. Toxicita Cu(II), Zn(II) a Fe(III) způsobují oxidativní stres, Zn(II) dále hraje roli v agregaci A β ^[13].

Pokud je změněná koncentrace Zn(II) (výsledná akumulace postihuje především mitochondrie), dochází k narušení systému buněčné energie a spustí se produkce ROS a s tím spojené následující oxidativní poškození buňky. Abnormálně vysoké koncentrace volných Zn(II) byly zaznamenány v šedé kůře (neokortexu) u pacientů AD, kde se selektivně tvoří deposity A β amyloidů, i když se A β amyloidy tvoří v celém mozku. Odchytky od fyziologické koncentrace Zn(II) byly shledány i v případě PD ^[18].

1.2.3 Měď

Měď je v organismu přítomná ve dvou oxidačních číslech, +I a +II. Je vázána na různé biologické ligandy jako jsou donorové atomy dusíku v imidazolu, amidech a aminech, kyslík v karboxylové skupině a síra v cysteinu a methioninu. Koncentrace Cu(I) a Cu(II) je regulována transportními proteiny Ctr1, ATP7A, ATP7B napříč buněčnou membránou dovnitř nebo ven z cytosolu. Nedávné studie poukazují na to, že uvolňování Cu(I) a Cu(II) je ochranou proti buněčné smrti pomocí regulace aktivity NMDA receptorů ^[13].

Cu(II) a Zn(II) ionty jsou v organizmech transportovány tzv. metalothioneiny (MT). Jsou to malé metaloproteiny, které jsou bohaté na obsah aminokyseliny cystein, a neobsahují žádnou aromatickou aminokyselinu, jako je tyrozin, tryptofan a fenylalanin. U savců jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem z 61 až 68 aminokyselinových zbytků, které se mohou vázat přes atom síry na ionty kovů ^[20]. Metalothioneiny mají dvě podjednotky: stabilní α -doménu, která obsahuje C-konec a může vázat celkem až čtyři divalentní ionty, a dále reaktivní β -doménu, která je složená z N-konce a může vázat celkem tři divalentní

ionty. Známe čtyři formy metalothioneinů, od MT-1 po MT-4. MT-1 a MT-2 jsou inducibilní a vyskytují se poměrně hojně v lidském těle. MT-3 obsahuje navíc sedm aminokyselin a nachází se zejména v centrální nervové soustavě a MT-4, který se skládá z 62 aminokyselin, se vyskytuje v stratifikovaných dlaždicových epitelálních buňkách ^{[13][20][21]}.

1.2.4 Železo

Železo se vyskytuje v buňkách ve dvou oxidačních číslech, +II a +III. Fyziologická koncentrace Fe(II) a Fe(III) závisí na oblasti mozku, ve které se vyskytují. Obecně obsahují více iontů železa mozkové oblasti zodpovědné za motorické funkce než oblasti s nemotorickými aktivitami. S postupem věku se koncentrace Fe(II) a Fe(III) stejně jako Cu(I) a Cu(II) zvyšuje. Fe(II) je v mozku vázáno na proteiny L-ferritin a H-ferritin. L-ferritin je zásobárna Fe(II) a H-ferritin je spojován se stresovou odpovědí, která je katalyzována oxidací Fe(II)/Fe(III) pomocí ferroxidasového centra ^[13].

1.2.5 Ionty interagující s PrP

Jak je uvedeno výše, Zn(II) hraje roli i v agregaci A β ^[13] a dále může vytvářet můstky mezi prionovými molekulami, což opět směřuje k tvorbě neurotoxických agregátů ^[18]. Dále může vést k inhibici PrP^C fibrilace. Má sice menší schopnost komplexace než Cu(II), nicméně může dále ovlivnit strukturu komplexu Cu(II)-PrP^C bez substituce Cu(II) ^[22].

Molekula PrP^C může vázat jeden až čtyři Cu(II). Pokud je koncentrace Cu(II) vysoká, PrP^C přechází konformační změnou na konformaci β -skládaného listu (PrP^{Sc}), která je rezistentní vůči proteasám. Cu(II) inhibují fibrilaci a vedou k vylučování těchto agregátů ^{[13][18]}. Cu(II) se váží na fibrilová vlákna proformy prionů a zajišťují ochranu před proteolytickou degradací. Význam Cu(II) při spuštění agregace prionů je podporován faktem, že chelatace Cu(II) zpomaluje vznik PrP^{Sc} u infikovaných myší. Lze předpokládat, že za zabránění vytvoření jádra amyloidu β -skládaného listu může specifické lokální skládání indukované Cu(II)-PrP^C, které působí na nestrukturovanou N-terminální doménu ^[18].

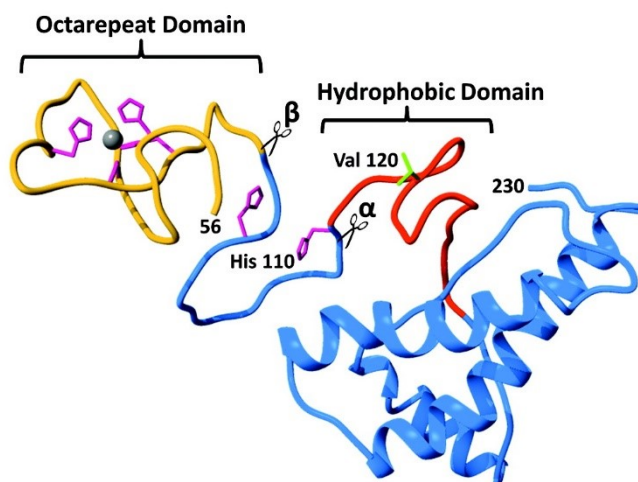
V místech výskytu oxidativního stresu spojeného s Fe(II) a Fe(III) indukují tyto ionty formaci PrP^{Sc}. Účinnost Fe(II) může být založena na hojně deformaci čtyřikrát se opakující sekvence osmi aminokyselin. V každé části se nachází jeden histidin (OR z angl. „octarepeat“). Zapojení těchto iontů v neurodegenerativních onemocněních nezávisí pouze na koncentraci, ale spíše závisí na mechanismu homeostáze a na proteinech, které váží dané

ionty. Proto je důležité porozumět strukturním a funkčním interakcím mezi ionty kovů a intracelulárními a extracelulárními komponenty v CNS ^[13].

1.3 PrP^C

1.3.1 PrP^C a jeho funkce

PrP^C (z angl. „cellular prion protein“) je přibližně 210 aminokyselin dlouhý membránově ukotvený glykoprotein s helikální C-terminální doménou a částečně strukturovanou N-terminální doménou. N-terminální doména obsahuje OR segment (obrázek 1), který může vázat Zn(II) a Cu(II) [23][24]. Mezi těmito dvěma doménami se nachází vysoce hydrofobní segment, který je zapojen do formování PrP^{Sc} (z angl. „scrapie prion protein“) [18]. Dvě rozdílné studie poukazují na to, že odnětí segmentu spojujícího N- a C-terminální doménu v transgenních myších, způsobuje embryonální letální fenotypy [23]. Zkoumání struktury pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) ukázalo, že N-terminální doména stabilizuje strukturu helixů v C-terminální doméně [23].



Obrázek 1: Struktura PrP^C, přejato z [22]

Zleva doprava: žlutá část naznačuje OR segment, za ním následuje modrá část N-terminálního konce, který je částečně strukturovaný, červená část je hydrofobní jádro proteinu a modrá část vpravo dole je C-terminální α -konec.

Stále není jasné, jak PrP^C ovlivňuje lidské tělo. Dosud jsou jeho fyziologické funkce jenom předpokládány. PrP^C je zapojen do transmembránové signalizace, redoxní regulace iontů kovů, adhezi buněk, neuronové myelinace a apoptózy [2][24]. Jeho štěpením se produkují bioaktivní fragmenty, které interagují s glutamátovými receptory na regulaci transportu zinečnatých iontů [3].

Bioaktivita PrP^C vychází z enzymatického α -štěpení v přibližné oblasti K109↓H110 (myší sekvence), která produkuje N1 a C1 terminální fragmenty. Toto α -štěpení je způsobeno některými členy enzymové skupiny ADAM (disintegriny a metaloproteinasy),

hlavně pak ADAM8, ADAM10 a ADAM17^[24]. Toto α -štěpení uvolňuje pro-domény, které vykazují potenciální aktivity. N1 fragment má antiapoptotické aktivity – inhibuje kaspasu-3, zatímco C1 fragment podporuje apoptickou aktivitu prostřednictvím dependentní kaspasy-3 lokalizované na p53. PrP^C podléhá také β -štěpení, které vychází z domény OR a produkuje N2 a C2 fragmenty. Tyto fragmenty nevykazují žádnou aktivitu. Experimenty ukazují, že hladina C2 je vyšší, pokud je přítomen H₂O₂. Proto se předpokládá, že proteolýza je způsobena reaktivními kyslíkovými formami (ROS), které vznikají koordinací Cu(II) v N-terminální OR. β -štěpení se objevuje ve zdravé mozkové tkáni, ale v případě prionové infekce je hladina C2 vyšší^[3].

Helikální C-koncová a částečně strukturovaná N-koncová doména ovlivňují obě α -štěpení a β -štěpení PrP^C a také patologické sbalení proteinu (angl. „*misfolding*“). Nyní je známo, že při fyziologické koncentraci Cu(II) a Zn(II) dochází ke koordinaci OR domény. Pro Cu(II) jsou dva způsoby vazby. Již při nízkých koncentracích se váže s vysokou afinitou ke čtyřem histidinovým imidazolům v doméně OR^[3].

Další funkcí PrP^C je neuronová reabsorpce iontů Zn(II), která probíhá přes AMPA receptory (členy rodiny glutamátových receptorů), které interagují s OR a polybazickou N-koncovou doménou PrP^C. Tato interakce probíhá přes membránu s využitím sekvence 23-26 (Lys-Lys-Arg-Pro; u myši). Tak se PrP^C zaklíňuje do AMPA a k transportu skrze AMPA kanály využívá oblast OR N-koncové domény, která váže Zn(II)^[22].

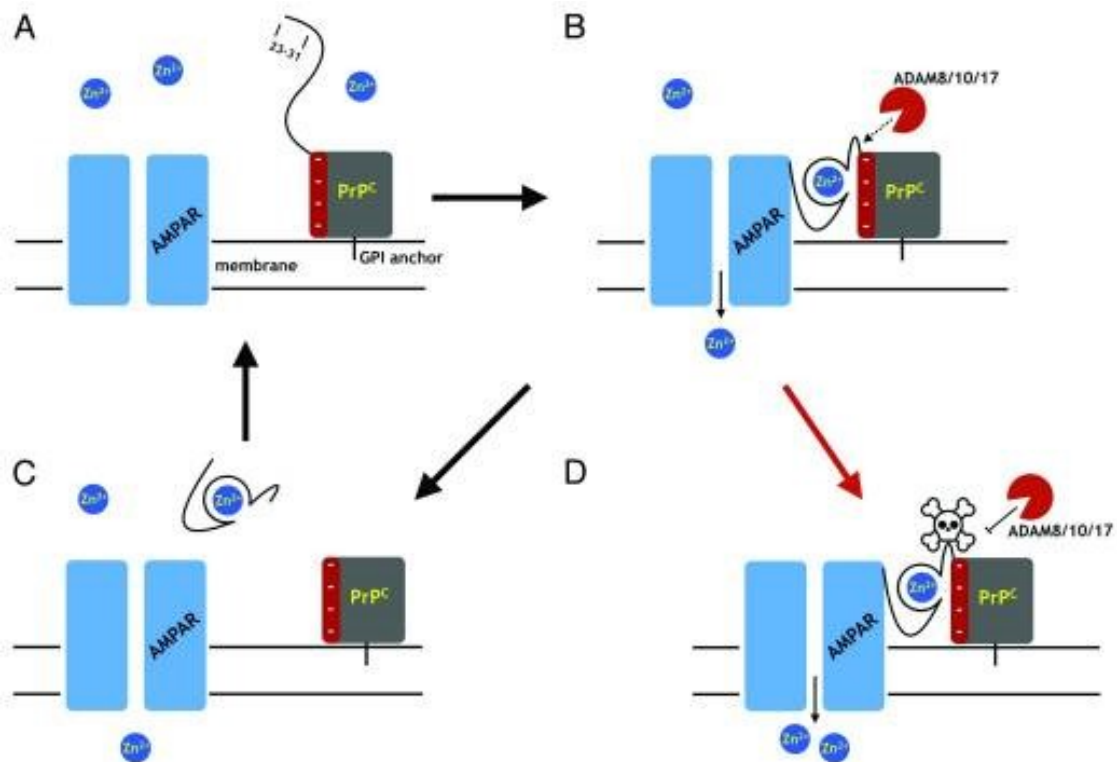
Expres PrP^C se zvyšuje se stoupající koncentrací Cu(II) a Zn(II). Z toho vyplývá, že PrP^C má jednu z klíčových rolí při homeostázi iontů mědi a zinku a chrání buňky před buněčným stresem^[23]. Pokud koncentrace iontů Cu(II) a Cu(I) není regulovaná, může to vést k produkci radikálů a reaktivních forem kyslíku^[4]. Také byla nalezena korelace mezi expanzí OR a její agregací s Cu(II) s nástupem nemoci^{[22][25]}. To bylo potvrzeno i v dalších pracích, které prezentovaly vliv množství OR na počátek vzniku Creutzfeldt-Jakobovy nemoci (CJD)^{[26][27]}.

1.3.2 AMPA a α -štěpení

Cu(II) a Zn(II) jsou koordinovány na PrP^C odlišně. Na jedné straně Cu(II) interagují s OR, na sekvenci 60-91, ale i na segmentu His96 a His111^[25]. Na druhé straně Zn(II) jsou vázány omezeně na doménu OR, kde se jeden ion váže na čtyři histidiny^[23]. Zn(II) je reabsorbován pomocí AMPA, jehož mechanismus je nezávislý na endocytóze PrP^C, avšak využívá doménu OR. Navíc mutace proteinu spojené s prionovým onemocněním inhibuje

transportní mechanismus zinečnatých iontů. To vysvětluje, proč jsou snížené koncentrace Zn(II) v mozku při prionových chorobách [23].

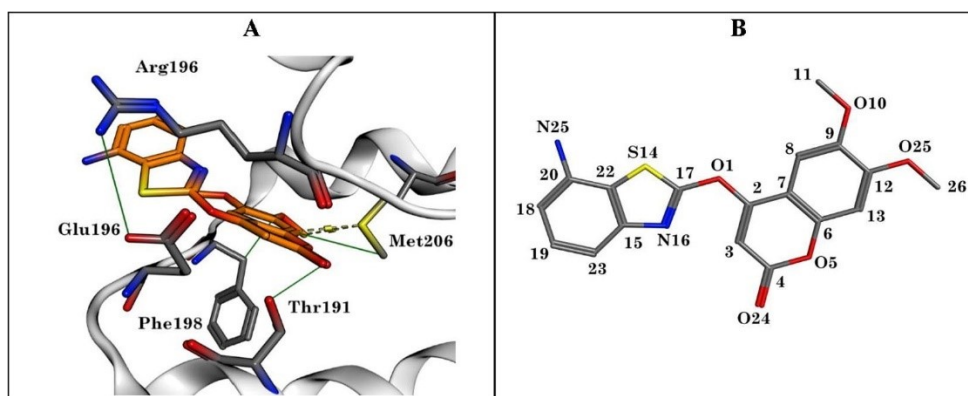
Nedávné výzkumy vedou k fyziologické důležitosti proteolýzy vedoucí k N1 a C1 terminální fragmentům spolu s nadbytečnými místy štěpení na úseku 109 až 120. Bylo zaznamenáno, že plná délka PrP^C moduluje aktivitu jedné nebo více společných membránových proteinů, jako je například AMPA receptor, kterého regulace aktivity je tímto štěpením snížena. Příklad je uveden na *obrázku 2* [22].



Obrázek 2: Návrh regulace pomocí α -štěpení přejato z [22]. (A) popisuje AMPA receptor (AMPAR), který slouží jako kationtový kanál. Složený PrP^C protein je navázán na vnější straně membrány buňky a jeho N-terminální konec neobsahuje Zn(II). V (B) části vidíme navázané Zn(II) na OR část domény, která pak interaguje s negativní částí C-terminální helikální domény. Úsek 23-31 aminokyselinových zbytků pak reaguje s AMPAR a umožňuje tím transport Zn(II). Na druhé straně ale v takovém uspořádání dochází k odkrytí tohoto α -štěpení pro ADAM (8,10 17) proteasou. To vede k uvolnění N1 domény (C) a snížení schopnosti PrP^C regulovat transport Zn(II). C1 fragment je pak degradován a zaměněn za nový protein PrP^C. (D) poukazuje na to, že pokud dochází k okluzi α -štěpení PrP^{Sc}, zůstává daný PrP^C v aktivním místě, čímž dochází k nerovnováze homeostáze [22].

1.4 Směry pro terapii prionových nemocí

Tvorba struktury látek, které mají antiprionovou aktivitu, se dělí do několika kategorií: (I) blokáce tvorby PrP^{Sc}, (II) stabilizace nativní konformace PrP^C, (III) zvýšení degradace PrP^{Sc} v mozku, (IV) zrušení vazby PrP^C na PrP^{Sc} [28][29][30]. Z těchto možností se jako nejslibnější ukazuje právě stabilizace nativní konformace PrP^C, kdy je uchráněna normální funkce PrP^C [30]. Mechanismus nesprávného skládání je zatím neznámý. Je jen potvrzeno, že infekční formy se rozšiřují v buněčné kultuře myšního neuroblastomu (ScN2a). Existuje mnoho imunologických metod pro měření množství prionů v těchto buňkách, které pomohly k vyhodnocování, jaké molekuly mají potenciální antiprionovou aktivitu. Ačkoli bylo testováno velké množství sloučenin, jen u několika typů bylo zjištěno, že významně prodlužují přežití u zvířat. Jednou z možností, proč malé molekuly mají tak malou účinnost, je, že v první řadě nebyly připravované proti prionům anebo nejsou schopny projít hematoencefalickou bariérou (BBB) [31]. Mezi známé malé molekuly, které mají antiprionovou aktivitu, patří kongo červen, akridiny, difenylloxazoly a difenylthiazoly, pyrazolony, indol-3-glyoxylamid a zejména 2-aminothiazoly [30][32]. Jedním z prvních pokusů na přípravu potenciálních léků byl quanakrin, o kterém je známo, že projde BBB a byl používán i v dřívějších dobách na léčení jiných nemocí [33]. U všech potenciálních léčiv není znám mechanismus jejich působení. Není ani známo jestli je látka účinná i na buňky ve fázi dělení věc, nebo jen buňky v stacionární fázi [28]. Byly provedeny pouze výpočetní simulace [32]. Z těchto studií vyplynulo, že uvedené látky mohou stabilizovat α -helix a byly nalezeny možné oblasti interakce léčivo-helix (obrázek 3).



Obrázek 3: Interakce ligandu s PrP^C pro stabilizaci α -helixu [34]

Na druhé straně prakticky všechna studovaná potenciální léčiva obsahují dusíkové atomy aminových a iminových skupin a atomy síry, které jsou schopny koordinace iontů přechodných kovů, jako je Cu(II) a Zn(II). Jak bylo zmíněno, výše uvedené ionty kovů jsou

vázané na PrP^C, ale studium interakce navržených léčiv s těmito kovy zatím studováno nebylo.

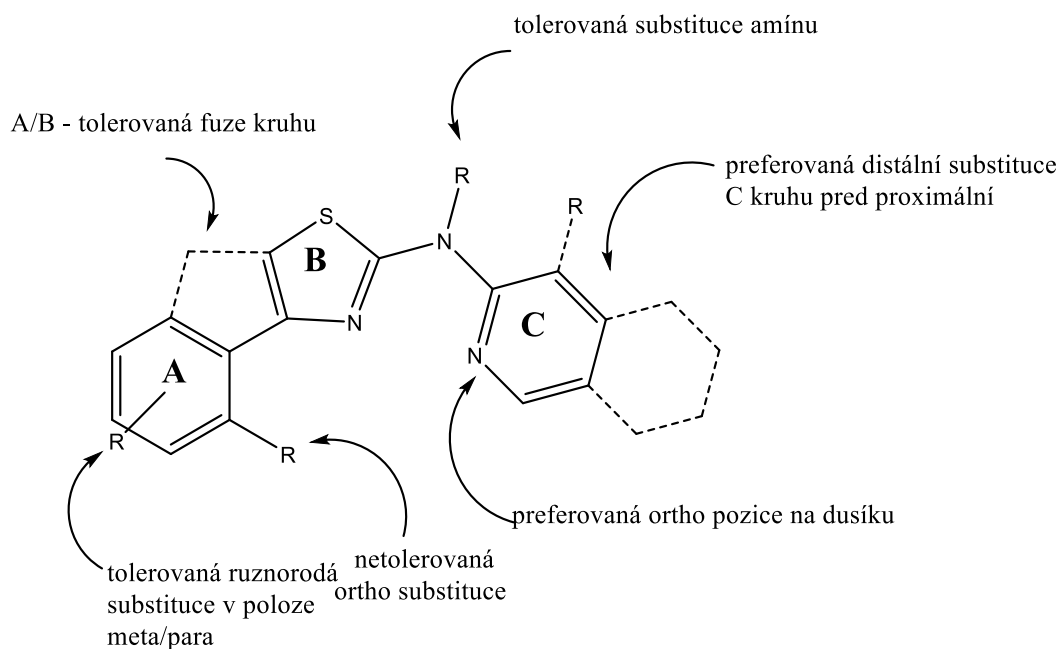
1.5.1 2-aminothiazoly

2-aminothiazoly jsou malé molekuly s antiprionovou aktivitou v neuroblastomových buňkách, které jsou postižené prionovými nemocemi. Nesnižují expresi PrP^C ani nedenedaturují PrP^{Sc}, ale jejich efektivnost je v ovlivňování formace PrP^{Sc} anebo odstraňování PrP^{Sc} [29]. Mohou inhibovat pomocné makromolekuly, které pořád nejsou identifikovány a pomáhají při replikaci prionů. Druhou možností je asistence proteinům, které usnadňují odstraňování PrP^{Sc} [31]. 2-aminothiazoly dokonce zvyšují stabilitu sekundární struktury PrP^C [34].

Výzkum skupiny Gallardo-Godoy na klonu 3 buněk ScN2a poukazuje na slibné výsledky, kdy autoři používali 2-aminothiazoly jako terapeutika pro léčbu prionových nemocí. Tyto látky jsme také použili v této práci [31].

Sloučenina obsahující 2-aminothiazolový kruh stojí na vztazích mezi strukturou a aktivitou látky (SAR) a EC těchto sloučenin musí být též bráno v potaz. První studie SAR poukázaly na to, že antiprionovou aktivitu mají 2-aminothiazoly, které mají koplanární konformaci A-B kruhu. Výhodou je sp² hybridizace atomů uhlíku a dusíku tak, aby molekula vykazovala koplanární konformaci v neutrálním pH. Terminální C-kruh v kyselém pH je protonizován a tak si molekula osvojí konformaci, kde B- a C- kruh nejsou v koplanárním uspořádání [32].

SAR studie ukazují na pozice 2-aminothiazolové struktury, které jsou nebo nejsou citlivé na změnu (*obrázek 4*) [31].



Obrázek 4: Možnosti změny struktury v 2-aminothiazolech pro zachování antiprionové aktivity ^[29]^[31]

Hodnoty EC₅₀ pro sloučeniny s antiprionovou aktivitou dosahují hodnoty ~10 nebo více v buňkách vysoce exprimujících PrP^C. Buňky ScN2a, které byly použity, reprezentují přísný test pro sloučeniny s antiprionovou aktivitou, protože nutné EC₅₀ je ~10. I když 2-aminothiazoly nejsou toxické pro buňky ScN2a, neredukují PrP^{Sc} v nedělicí se buňce ScN2a-cl3 ^[31].

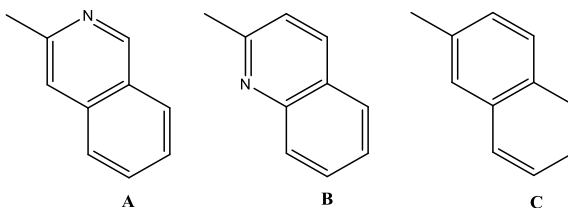
Hledání nových látek pro terapii je založeno na informaci ze SAR a Lipinského pravidla, které definují účinnou látku jako látku s relativní molekulovou hmotností pod 500 Da, polární oblastí méně než 90 Å², distribučním koeficientem mezi oktanolem a vodou mezi 2 až 5 a počtem donorů vodíkových vazeb méně než 3 ^[31].

Syntéza analogů 2-aminothiazolů využívala Hantzschův model kondenzace bromomethylketonů s thioureásemi. Nejdříve se musel modifikovat katechelový kruh tak, aby jeho funkčnost byla v mozku maximální a aby byla snížena jeho předpokládaná toxicita ^[32].

1.5.1.1 C-kruh

Obsazení C kruhu 2-pyridylovými substituenty je výhodnější než použití arylových substituentů. Tato substituence je výhodnější pro distální interakci B-C kruhů. Takto substituované látky byly shledány jako nejvíce potenciální látky s antiprionovou aktivitou a

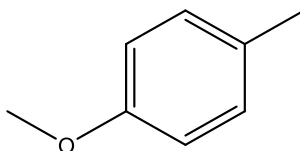
EC_{50} je malé natolik, aby splňovalo požadavky. Stejně tak jsou výhodné bicyklické C-kruhy, jako je chinolin, isochinolin a naftalen (obrázek 5) [31].



Obrázek 5: Výhodné bicyklické C-kruhy $EC_{50} = 0,11 \mu M$ (A); $EC_{50} = 0,43 \mu M$ (B); $EC_{50} = 0,39 \mu M$ (C)

1.5.1.2 A-kruh

A-kruh je na pozici C-4 aminothiazolového kruhu. Katecholový kruh musel být modifikovaný, aby bylo zamezeno jeho toxicitě. Také byly použity bicyklické látky jako u C-kruhu. Heteroatomické kruhy jsou tolerovány, ale analoga obsahující malé alkylové skupiny v této pozici byla neaktivní nebo méně účinná. Jeden z nejlepších substituentů, který byl vyzkoušen, byl *para*-methoxyfenyl s $EC_{50} = 0,34 \mu M$ (obrázek 6). Výsledky různých umístění substituentů naznačují, že tolerance na *para* a *meta* substituci na A-kruhu je větší než tolerance v *ortho* pozici. Další důležitý prvek je koplanární uspořádání A-kruhu a B-kruhu na antiprionovou aktivitu sloučenin [31].



Obrázek 6: Výhodný *para*-methoxyfenyl pro A-kruh s $EC_{50} = 0,34 \mu M$

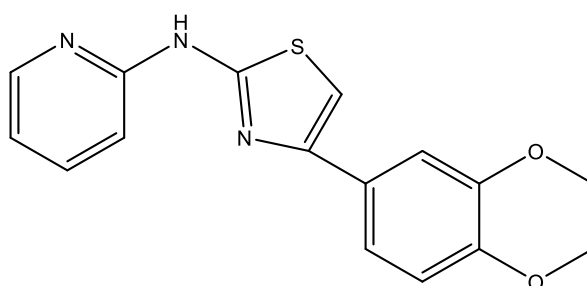
1.5.1.3 B-kruh

Poslední otázkou je úprava B-kruhu. Ve srovnání se SAR byla snaha o vložení amidové skupiny, která vedla ke srovnatelné účinnosti, třebaže vložení dodatečného donoru vodíkové vazby bylo nežádoucí pro vlastnosti CNS. Dále výsledky ukazují, že správná vzdálenost B-kruhu a C-kruhu je nezbytná pro antiprionovou aktivitu, zatímco přítomnost další vodíkové vazby není nutná [31].

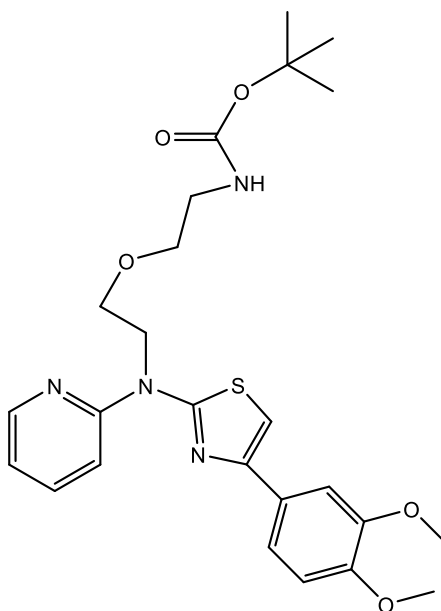
1.4 Cíl bakalářské práce

Tento projekt je zaměřen na studium možné interakce uvedených iontů s potenciálním léčivem na bázi 2-aminothiazolů a k posouzení vlivu této interakce.

Cílem bakalářské práce u je nalézt látku na bázi potenciálního léčiva, který by mohla být dále modifikována fluorescenční anebo radiochemickou značkou. Pro tento účel byla vybrána látka na *obrázku 7* a její modifikace (4-(3,4-dimethoxyfenyl)-*N*-(pyridin-2-yl)thiazol-2-amin, látka 6). Po osvojení syntetického postupu k látce (6) následovalo hledání cest k její bifunkční modifikaci. Jako postranní skupina umožňující potenciální konjugaci byl zvolen [(2-aminoethyl)-2-oxoethyl]-ový řetězec, viz látka (11), *obrázek 8*.



Obrázek 7: vybraná 2-aminothiazolová sloučenina, (4-(3,4-dimethoxyfenyl)-*N*-(pyridin-2-yl)thiazol-2-amin)



Obrázek 8: modifikovaná vybraná 2-aminothiazolová sloučenina, *tert*-butyl (2-(2-((4-(3,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)(pyridin-2-yl)amino)ethoxy)ethyl)karbamát (látka 11)

2 Experimentální část

2.1 Seznam použitých chemikálií

Použité chemikálie a rozpouštědla byly zakoupené u komerčních prodejců – Sigma-Aldrich, Fluka, Penta, Lach-Ner a CheMaTech. Chemikálie ani rozpouštědla nebyly dále čištěné ani sušené, pokud není uvedeno přímo v experimentu.

2.2 Metody charakterizace látek

2.2.1 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na stacionární fázi tvořenou hliníkovými destičkami, pokrytými silikagelem od značky Merck – *TLC Silica gel 60 F₂₅₄*. Jako mobilní fáze sloužil roztok CH₂Cl₂:MeOH 95:5, pokud není uvedeno jinak. Detekce stop byla prováděna pomocí UV záření na vlnové délce 254 nm.

2.2.2 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektra NMR látek (¹H a ¹³C) produktů syntetické části této práce byla měřena na zařízení Varian VNMRS 300. K přípravě vzorků byly použity 5 mm kyvety. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C. Spektra byla následně zpracována v programu MestReNova. Pro referencování byly použity chemické posuny zbytkových rozpouštědel ^[35].

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na zařízení Bruker ESQUIRE 3000, jako ionizátor byl použit elektrosprej. Analýza byla prováděna iontovou pastí. Vzorky v rozmezí 1–10 mg byly rozpuštěné v MeOH, pokud není uvedeno jinak. Měření bylo provedeno Mgr. Ondřejem Zemkem.

2.3 Syntetická část

2.3.1 Schéma syntézy 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu (6)

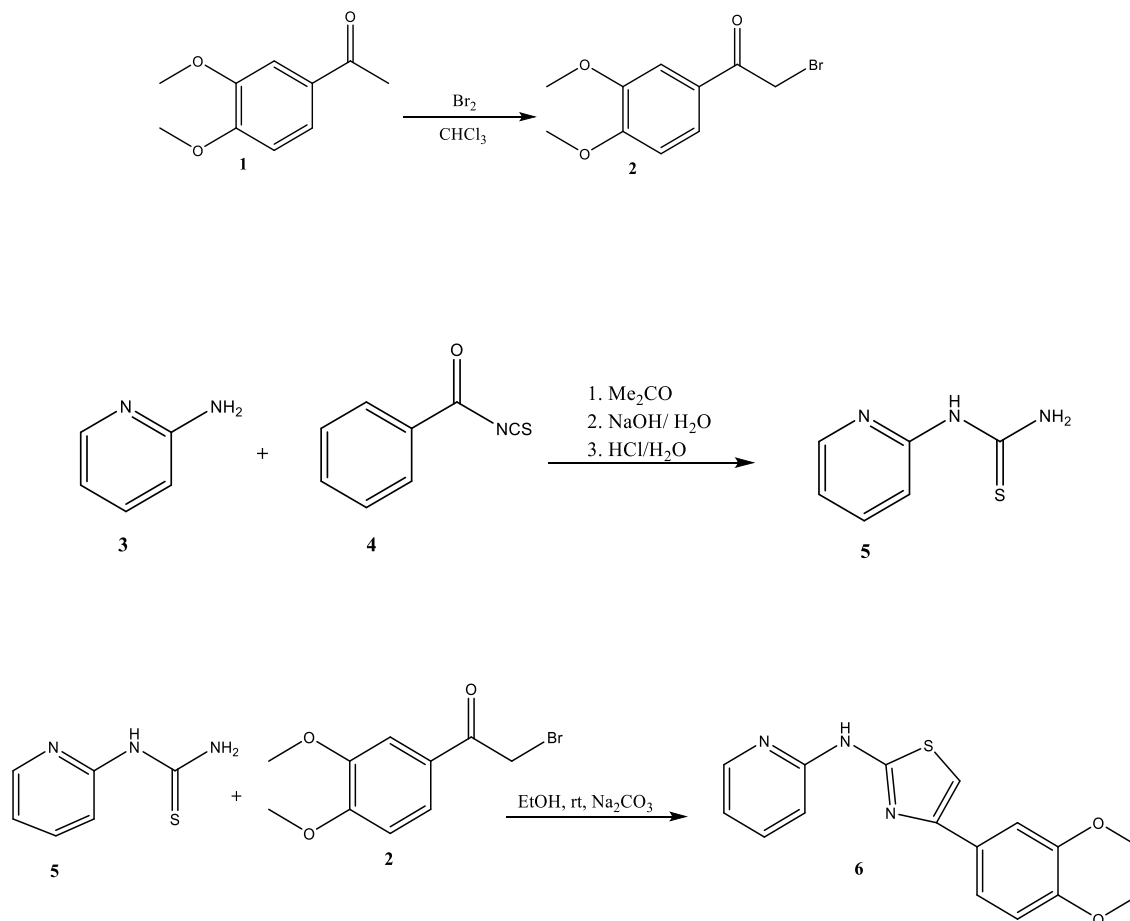


Schéma 1 – souhrnná schéma syntézy 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu.

Příprava 3,4-dimethoxybenzoylbromidu (látka (2)) přejata z ^[36],
přípravy 1-(pyridin-2-yl)thiomocoviny (látka (5)) a 4-(3,4-dimethoxyfenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu (látka (6)) přejaty z ^[31].

2.3.2 Schéma syntézy modifikované látky 4 z obrázku 4 – *tert*-butyl(2-(2-((4-(3,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)(pyridin-2-yl)amino)ethoxy)ethyl)karbamátu (11)

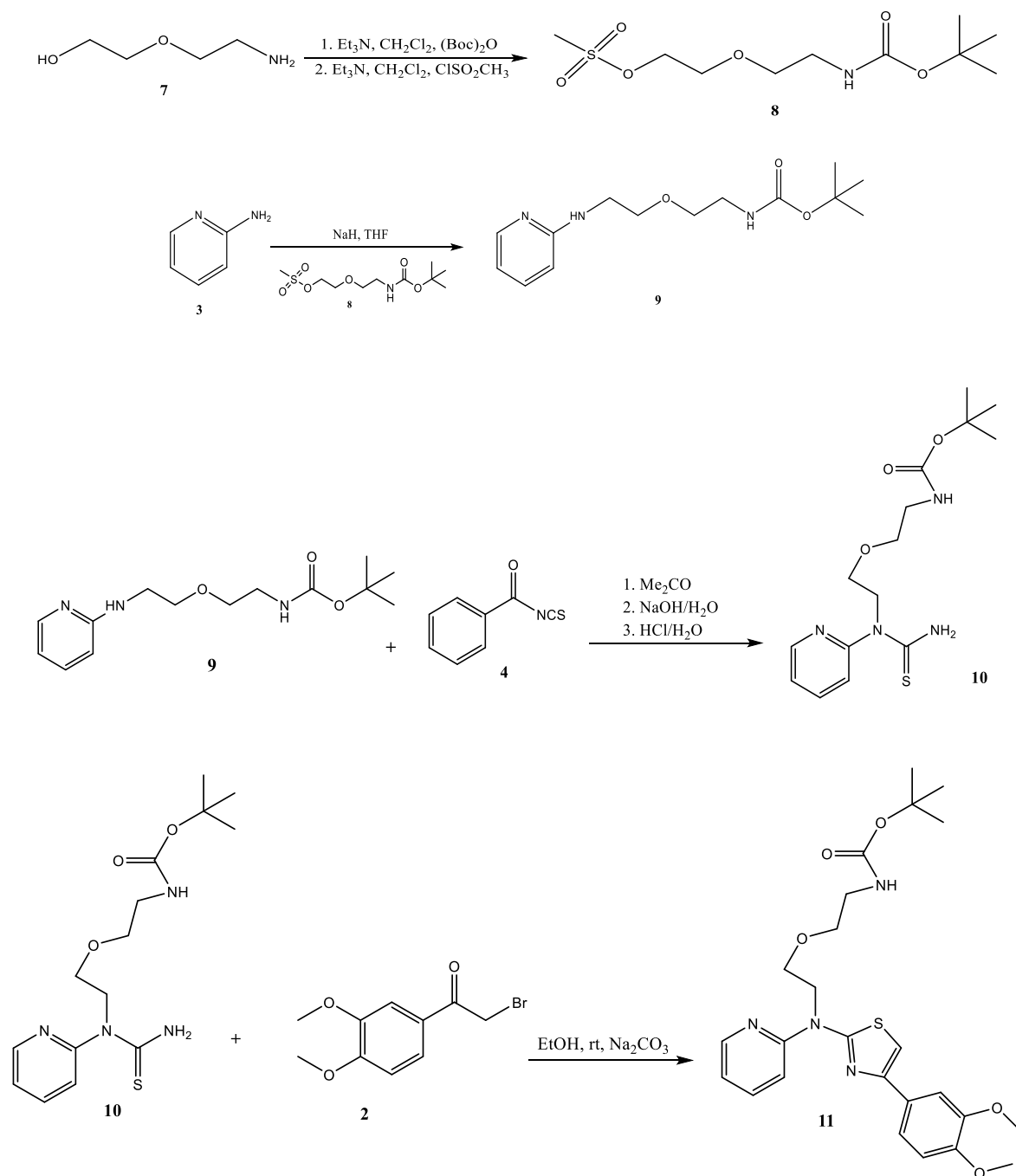
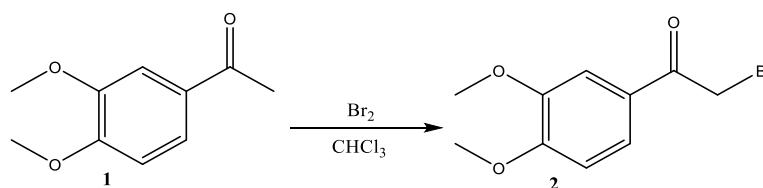


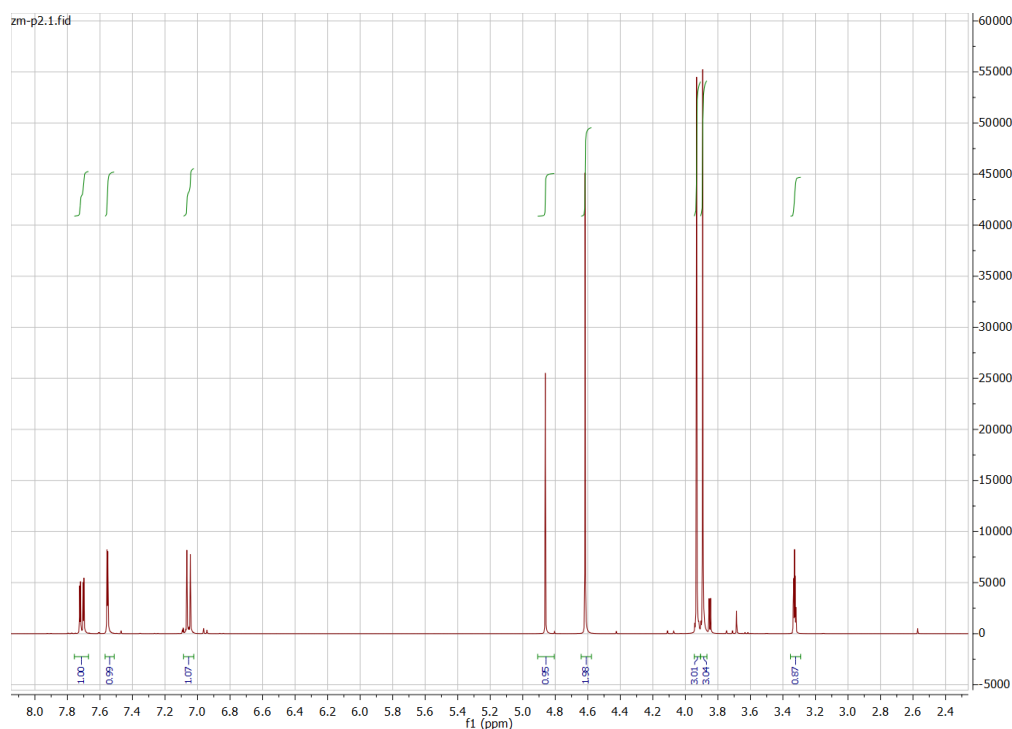
Schéma 2 – plánované schéma pro syntézu látky *tert*-butyl(2-(2-((4-(3,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)(pyridin-2-yl)amino)ethoxy)ethyl)karbamátu (11)

2.3.3 Syntéza 3,4 -dimethoxybenzoylbromidu (2)



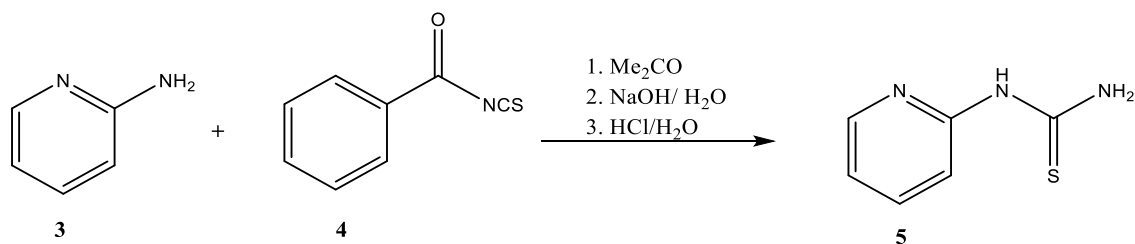
1-(3,4-dimethoxyfenyl)ethenon (11,5 mmol, 1,86 g) byl rozpuštěn v kulaté baňce v 50 ml chloroformu. Baňka, s vloženým míchadlem, byla postavena na magnetické míchače a připevněna na stojan. Následně byl po kapkách přikapáván roztok bromu (1,05 ekv., 11 mmol, 1,99g) rozpuštěný v 50 ml chloroformu. Reakční směs byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 5 hodin od posledního přikapání bromu. Následně byla reakční směs extrahována 100 ml nasyceného roztoku thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Izolovaná organická fáze byla pak extrahována nasyceným roztokem NaCl (100 ml). Následně byla organická fáze sušená bezvodým MgSO_4 a přefiltrována. Filtrát byl odpařen a látka rekrystalizovaná v malém množství ethanolu (10 ml). Následně byla změřena NMR ^1H spektra (obrázek 9). Získaný výsledný produkt vážil 0,81 g, což je 30 %.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7,73 – 7,69 (dd, 1H), 7,56 – 7,54 (d, 1H), 7,07 – 7,04 (d, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,61 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,89 (s, 1H)



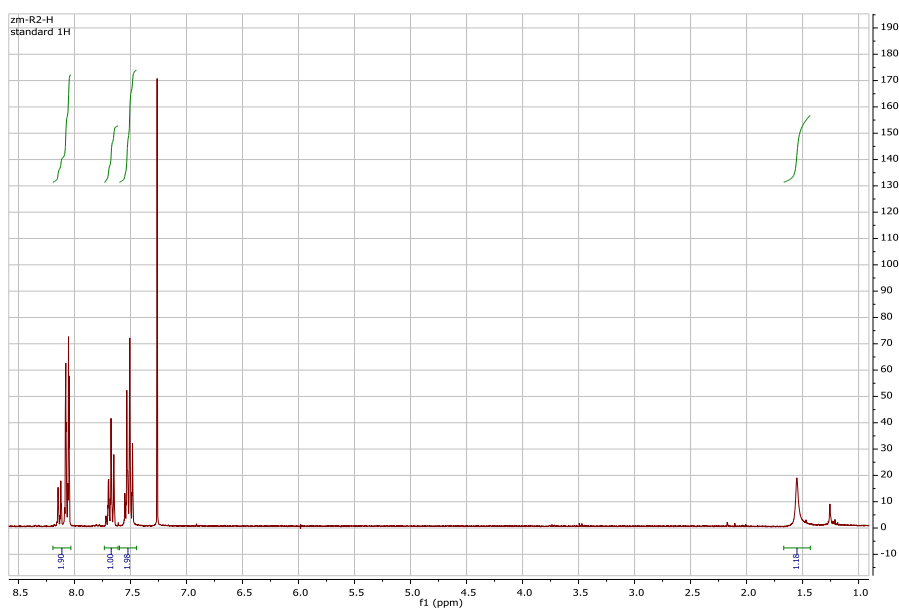
Obrázek 9: NMR spektrum 3,4 -dimethoxybenzoylbromidu

2.3.4 Syntéza 1-(pyridin-2-yl)thiomocoviny (5)



Nejdříve byla připravena látka (4). Jedná se o reakci benzoylchloridu s izothiokyanátem draselným. Ve vícedílné baňce (objem 100 ml) s vloženým míchadlem byl nejdříve rozpouštěn izothiokyanát draselný (1,0 ekv., 2,36 mmol, 333 mg) v acetonu (14 ml). Vícedílná baňka, přichycena na stojanu, byla postavena do olejové lázně na magnetické míchačce. V jednom hrdle byl zavedený chladič a v druhém septum. Pak se po kapkách pomocí injekční stříkačky přidával benzoylchlorid (1 ekv., 2,36 mmol, 0,27 ml), který byl rozpouštěn v 7 ml acetonu. Reakce probíhala 30 min za zvýšené teploty ($t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pak bylo odebráno 0,1 ml reakční směsi, ze které bylo následně odpařeno rozpouštědlo na rotační vakuové odparce a byl přidán deuteriochloroform (CDCl₃) a změřeno NMR spektrum (obrázek 10).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8,16 – 8,04 (dd, 2H), 7,72 – 7,64 (t, 1H), 7,56 – 7,46 (dd, 2H)

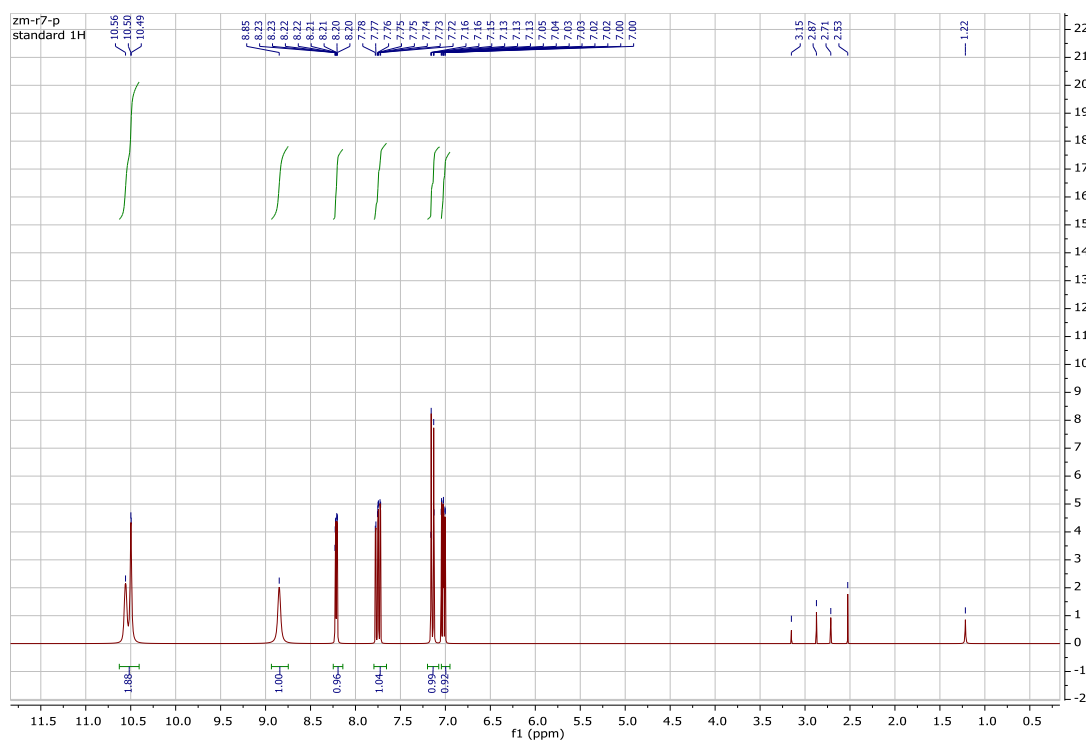


Obrázek 10: NMR spektrum látky 7 - benzoylizothiokyanát

Poté byl do reakční směsi pomocí injekční stříkačky přidával 2-aminopyridin (1 ekv., 4,68 mmol, 440 mg), který byl rozpouštěný v 25 ml acetonu. Reakční směs byla míchána po

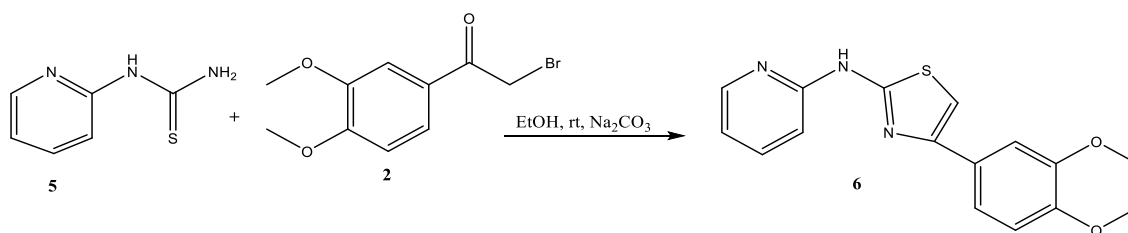
dobu dvou dní při teplotě 40 °C. Následně byla reakční směs ochlazena v lázni voda – led a zastavena přidáním 10 ml studené destilované vody pomocí injekční stříkačky. V této lázni byla reakční směs míchána po dobu 30 minut. Z reakční směsi bylo pomocí rotační vakuové odparky odpařeno přibližně 60 % rozpouštědla a reakční směs byla přefiltrována a meziprodukt byl promyt destilovanou vodou. Následně byl meziprodukt rozpuštěn ve vícehrdlé baňce, opatřené magnetickým míchadlem, v 100 ml methanolu. Na jedno hrdlo byl připevněn chladič a na druhé bylo nasazeno septum. Reakční směs byla postavena do olejové lázně na magnetické míchačce, a pomocí injekční stříkačky se pomalu přidávalo 20 ml 1 M roztoku NaOH přes septum. Reakční směs se zahřívala na teplotu 80 °C a míchala se do doby kdy proběhla hydrolyza (přibližně jednu hodinu). Hydrolyza byla monitorována pomocí TLC. Po proběhnutí hydrolyzy byla olejová lázeň zaměněna za lázeň voda – led na ochlazení reakční směsi. Přes septum bylo pomocí injekční stříkačky přidáno přibližně 25 ml 1 M roztoku HCl tak, aby reakční směs dosáhla pH ~ 7. Poté bylo z reakční směsi opět odpařeno přibližně 60 % rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky. Zbytek byl pak přefiltrován a vysušen. Produktem byly světle žluté krystalky ve výtěžku 69 % (0,49 g) s výsledným NMR spektrem na *obrázku 11*.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ : 10,62 – 10,42 (d, 2H), 8,85 (s, 1H), 8,25 – 8,17 (dd, 1H), 7,79 – 7,71 (td, 1H), 7,17 – 7,13 (dt, 1H), 7,06 – 7,00 (qd, 1H)



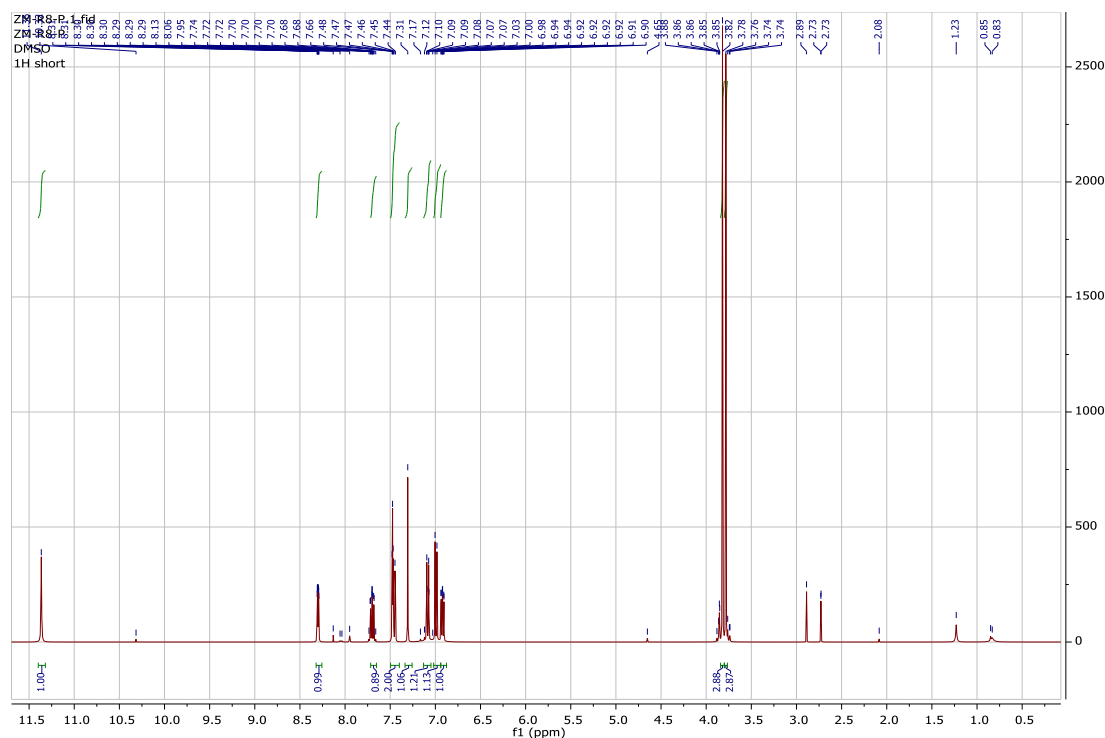
Obrázek 11: NMR spektrum látky (5) - 1-(pyridin-2-yl)thiomocovina

2.3.5 Syntéza 4-(3,4-dimethoxyfenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminu (6)



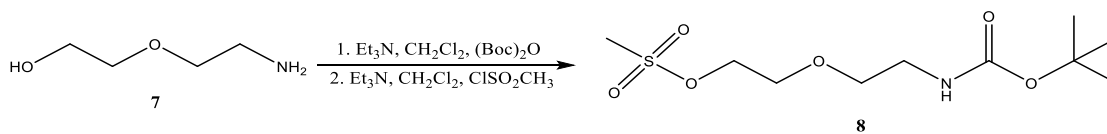
Ve vícedrdlé baňce opatřené míchadlem byla rozpuštěna látka (5) (1,0 ekv., 1,30 mmol, 0,20 g) spolu s látkou (2) (1,0 ekv., 1,30 mmol, 0,338 g). Byl přidán ethanol o objemu 13,0 ml. Na baňku byl nasazen chladič a septum. Baňka byla zahřívána v olejové lázni při teplotě 40 °C po dobu 48 hodin, reakce byla monitorována pomocí TLC. Po 48 hodinách byla reakce zastavena pomocí 26 ml destilované vody, s kterou byla reakční směs míchána ještě jednu hodinu. Následně bylo pH roztoku upraveno z původního pH 6 na hodnotu pH 8 pomocí 1 M vodního roztoku uhlíčitanu sodného (Na₂CO₃). Z baňky bylo následně odpařeno asi 60 % rozpouštědla rotační vakuovou odparkou a vzniknuté nažloutlé krystalky byly přefiltrovány a promyté vodou. Bylo získáno 70 % hmotnostního výtěžku (0,285 g).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 11,37 (s, 1H), 8,27 – 8,33 (m, 1H), 7,66 – 7,74 (m, 1H), 7,43 – 7,50 (m, 2H), 7,31 (s, 1H), 7,07 – 7,10 (d, 1H), 6,98 – 7,01 (d, 1H), 6,90 – 6,94 (ddd, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,78 (s, 3H) (obrázek 12)



Obrázek 12: NMR spektrum látky (6) – 4-(3,4-dimethoxyfenyl)-N-(pyridin-2-yl)thiazol-2-amin

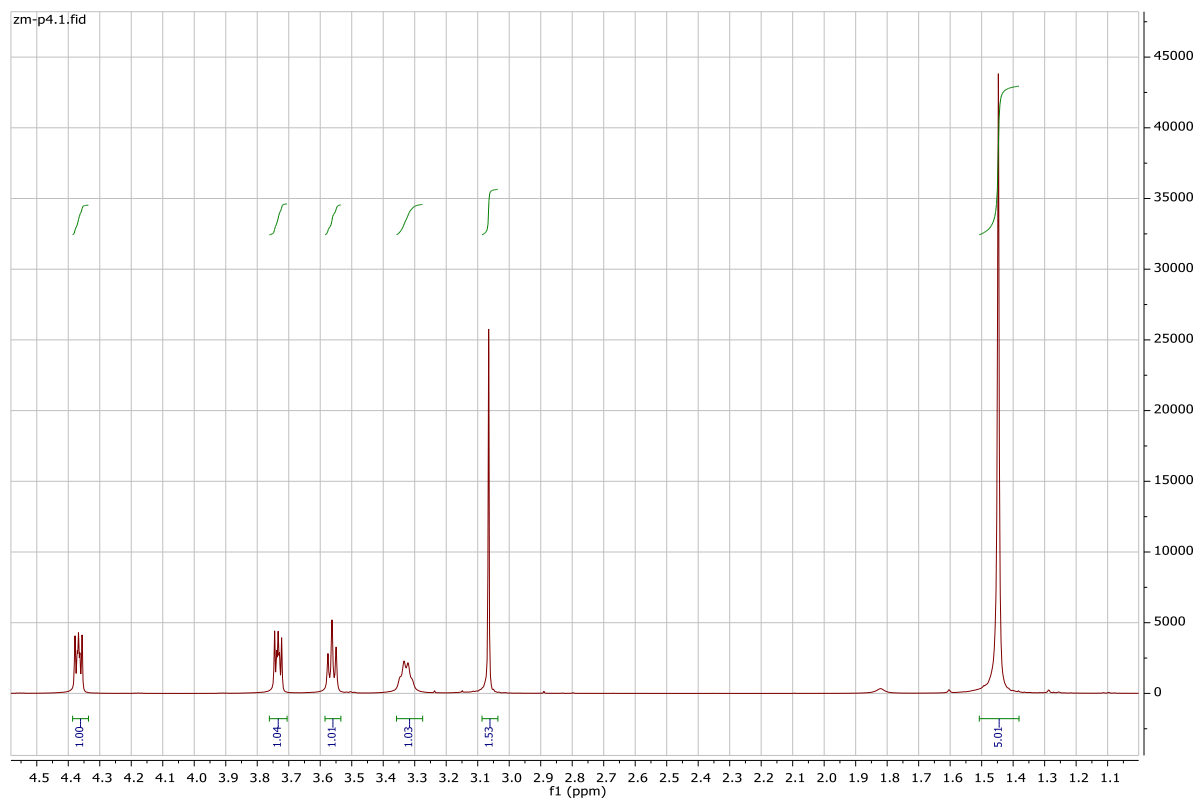
2.3.6 Syntéza 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethoxy)methansulfonátu (8)



Příprava 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethoxy)methansulfonátu byla vedena ve dvou krocích. První část zahrnovala přípravu *tert*-butyl(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)karbamátu. Tato reakce probíhala rozpuštěním 2-(2-aminoethoxy)ethanolu (1,0 ekv., 5,0 g, 47,8 mmol) v kulaté baňce v 20 ml triethylaminu a v 100 ml dichlormethanu. Baňka, s vloženým míchadlem, byla postavená na magnetické míchačce a připevněna na stojan. Na baňku byla připevněna příkapávačka, ve které byl rozpuštěn di(*tert*-butyl)-dikarbonát (1,0 ekv., 10,38 g, 47,8 mmol) v 50 ml dichlormethanu. Z příkapávačky byl po kapkách příkapáván do reakční směsi. Reakční směs byla míchána pod refluxem po dobu 3 hodin od doby posledního příkapání, při teplotě 0°C. Pak byla reakční směs extrahována pomocí nasyceného roztoku NaCl (2x 50ml) a posbíraná organická fáze byla prosušena pomocí bezvodého síranu sodného (Na₂SO₄), přefiltrována a z filtrátu bylo pak odpařeno rozpouštědlo pomocí rotační vakuové odparky. Výtěžek první části byl 44 % (4,3g)

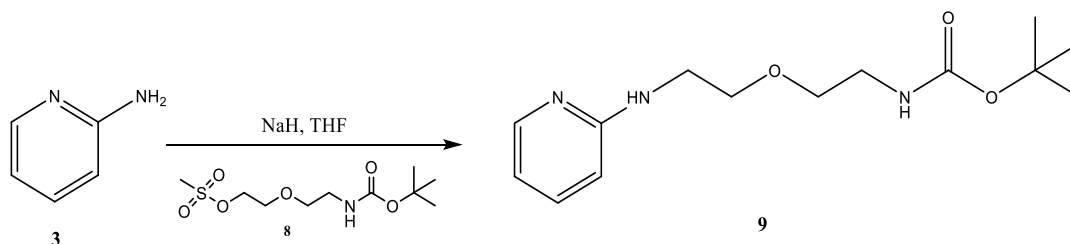
Druhá část zahrnovala pomalé přidávání methansulfonylchloridu (1,2 ekv., 1,76 ml, 22,8 mmol) pomocí injekční stříkačky do roztoku *tert*-butyl (2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)karbamátu (1,0 ekv., 4,0 g, 19,0 mmol), triethylaminu (1,5 ekv., 4 ml, 28,6 mmol) v 100 ml dichlormethanu. Tento roztok byl umístěn v kulaté vícedrdlé baňce, která byla připevněná na stojan s magnetickou míchačkou a opatřená magnetickým míchadlem. Na jedno hrdlo byl připevněn chladič, kterým protékala voda, a na druhé hrdlo bylo nasazené septum, pro jehlu s methansulfonylchloridem. Baňka byla na míchačce v lázni voda-led, ochlazená na teplotu 0°C. Po přidání veškerého methansulfonylchloridu byla reakční směs míchána 80 minut a pak ještě 30 minut bez lázně při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs extrahována 50 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové, organická fáze byla dále pak extrahována 50 ml destilované vody, pak 50 ml 10 % vodního roztoku uhličitanu sodného (Na₂CO₃) a nakonec byla organická fáze promyta 50 ml nasyceného roztoku NaCl. Nakonec byla organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným (Na₂SO₄), roztok byl zfiltrován a z filtrátu bylo dále odpařeno rozpouštědlo. Výtěžek produktu byl 63 % (3,4 g), výsledné NMR spektrum na *obrázku 13*.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 4,39 – 4,35 (t, 2H), 3,75 – 3,71 (t, 2H), 3,58 – 3,54 (t, 2H), 3,36 – 3,29 (m, 2H), 3,06 (s, 3H), 1,45 (s, 9H)



Obrázek 13: NMR spektrum 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethoxyl)methansulfonátu

2.3.7 Syntéza *tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamátu (9)



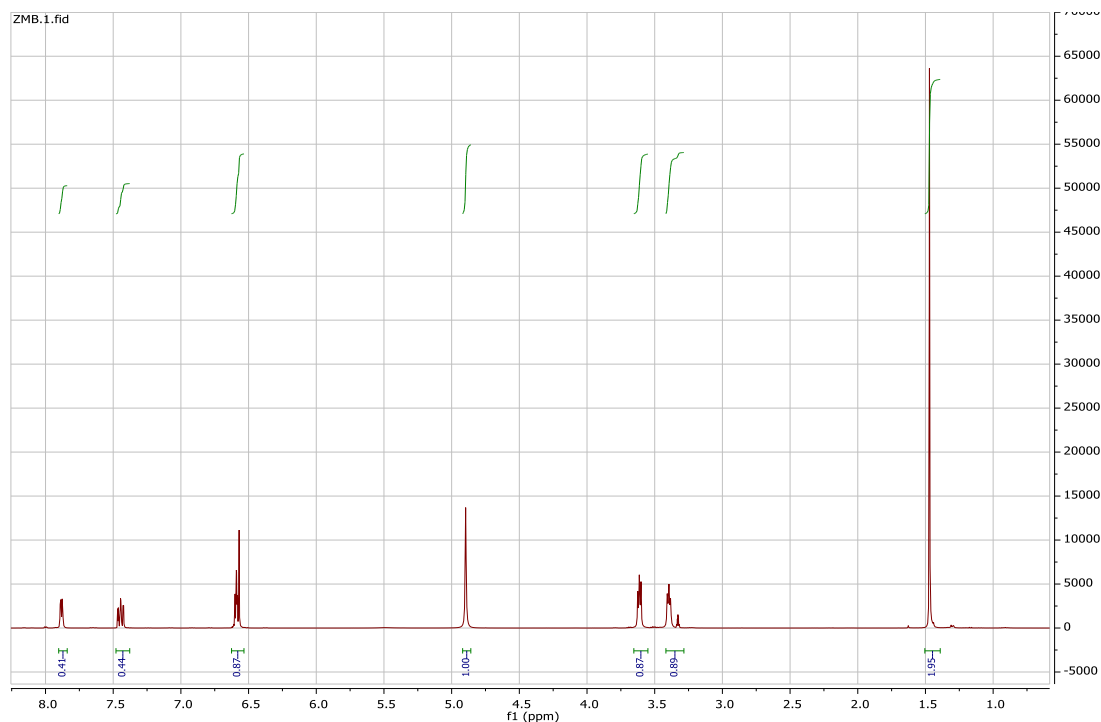
Reakce probíhala pod argonem ve vícerhldé baňce opatřené míchadlem, septem a chladičem a jako rozpouštědlo byl použit suchý THF (tetrahydrofuran). Nejdříve se navázil 2-aminopyridín (1 ekv., 10,62 mmol, 1,0 g). Poté byl navážen 60 % hydrid sodný (NaH, 1,1 ekv., 11,69 mmol, 0,47 g), septum bylo na několik vteřin odebráno, aby byly hydrid sodný a 2-aminopyridin vloženy do baňky. Baňka byla poté ještě jednou profouknuta argonem. Nakonec byl napuštěn balónek argonem a nasazen na chladič. Vícerhldá baňka byla zachycena na stojanu v olejové lázni na míchačce a následně byl přidán suchý THF (20 ml). Na to dvě injekční stříkačky (profouknuté argonem) byly zavedené přes septum do baňky. Jedna sloužila k přidávání THF ze zásobní láhve k 2-aminopyridinu a 60 % hydridu sodnému. Po zavedení suchého THF do vícerhldé baňky, byla olejová lázeň zahřátá na 40 °C a reakční směs se míchala 30 minut. Po třiceti minutách byla olejová lázeň zaměněna za lázeň voda-led a reakční směs byla ochlazená na 0 °C. Mezitím byl 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethoxyl)methansulfonát v jiné baňce rozpuštěn v suchém THF (10ml) pod argonem. Po rozpuštění 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)ethoxyl)-methansulfonát v THF se tento roztok pomocí druhé injekční stříkačky převedl do reakční směsi ve vícerhldé baňce. Reakce byla monitorována pomocí TLC a nechána míchat do následujícího dne.

Další den byla reakce ukončena přidáním 5 ml studené destilované vody. Následně byla reakční směs extrahována 50 ml dichlormethanu a postup se opakoval se zbylou vodní fází. Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem hořečnatým (MgSO₄). Po odfiltrování sušidla bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Následně byla reakční směs rozdělena pomocí sloupcové chromatografie.

Na sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze CH₂Cl₂:MeOH 95:5, ve které má *tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamát $R_f = 0,4$ (podle TLC). Na přípravu chromatografické kolony bylo použito 200 g silikagelu. Jednotlivé frakce byly sbírány po přibližně 10 ml a monitorovány pomocí TLC. Nakonec byly frakce se stejným R_f spojeny do tří baněk, u kterých zbytky mobilní fáze byly odpařeny na rotační vakuové

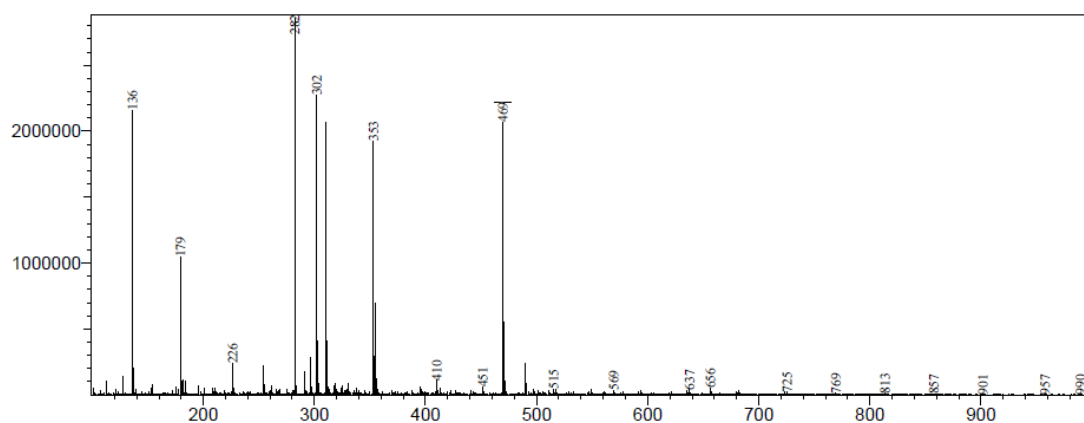
odparce a získaný produkt byl charakterizován pomocí NMR (obrázek 14) a hmotnostním spektrem (obrázek 15). Hmotnostní výtěžek byl 11 % (0,33g). Reakce proto byla opakována ve větším množství pro další syntézy.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7,9 – 7,86 (dd, 2H), 7,47 – 7,42 (td, 2H), 6,6 – 6,56 (m, 1H), 4,9 (s, 1H), 3,63 – 3,59 (t, 4H), 3,42 – 3,37 (t, 4H), 1,47 (s, 9H)



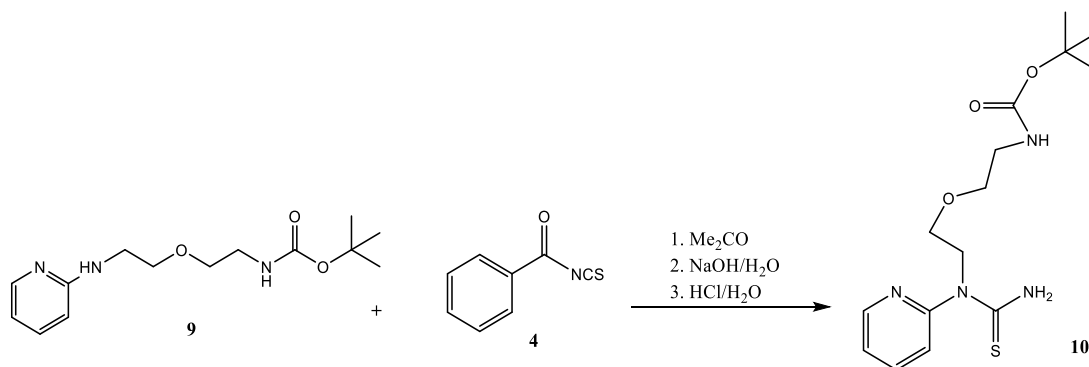
Obrázek 14: Spektrum NMR *tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamátu

Pak bylo změřeno ještě spektrum MS (obrázek 15) v pozitivním módu, ve kterém M_r *tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamát je 281.



Obrázek 15: MS spektrum měřené v pozitivním módu. *Tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamát, nejvyšší pík poukazuje na 282, což je molekulární hmotnost této látky +1

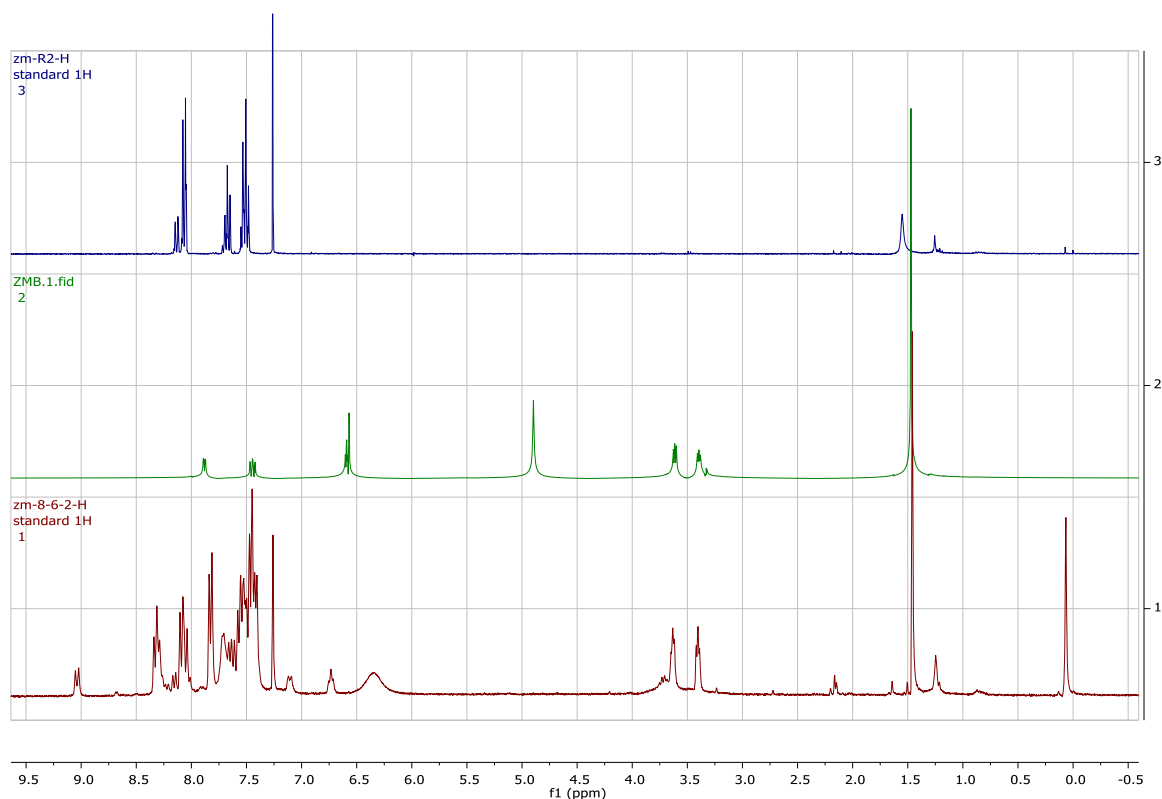
2.3.8 Pokusy o syntézu *tert*-butyl(2-(2-(1-(pyridin-2-yl)thioureido)ethoxy)ethyl)karbamátu (10)



Pro tento krok syntézy bylo nutno připravit benzoylizothiokyanát (4). Jedná se o reakci benzoylchloridu s izothiokyanátem draselným. Ve vialce s vloženým míchadlem byl nejdříve rozpuštěn izothiokyanát draselný (1,0 ekv., 0,35 mmol, 34,0 mg) v acetonu (2,2 ml). Za stálého míchání se do roztoku po kapkách injekční stříkačkou přidával benzoylchlorid (1 ekv., 0,35 mmol, 0,04 ml). Reakce probíhala 30 min za zvýšené teploty ($t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Výtěžek byl 58 % (33,1 mg).

2.3.8.1 Reakce v acetonu

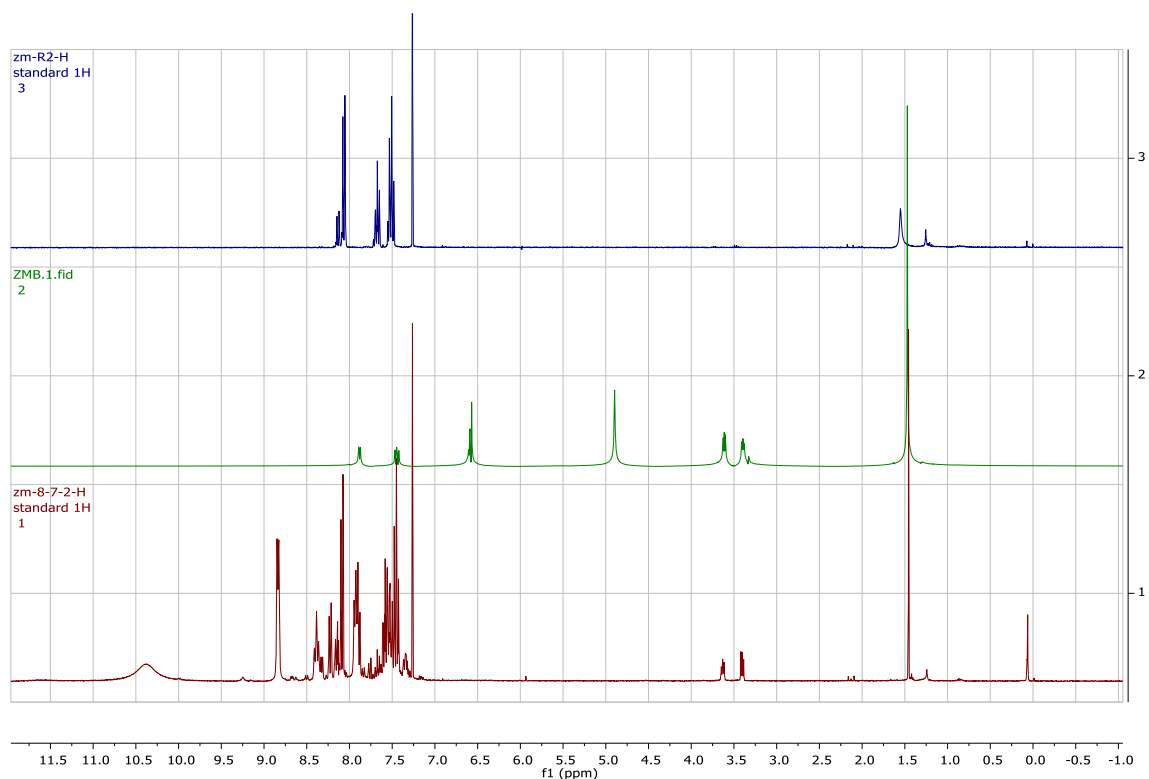
Následně byl takto připraven benzoylizothiokyanát použitý v syntéze látky 10. *Tert*-butyl(2-(2-(pyridin-2-ylamino)ethoxy)ethyl)karbamát (1 ekv., 0,18 mmol, 50 mg) byl rozpuštěn ve vialce s magnetickým míchadlem v acetonu (1,5 ml). Za stálého míchání byl po kapkách přidáván benzoylizothiokyanát (1,1 ekv., 0,20 mmol, 33 mg), který byl rozpuštěn v acetonu (1,5 ml). Reakce byla míchaná po dobu jednoho týdne při zvýšené teplotě ($t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následně bylo ze směsi odpařeno rozpouštědlo na rotační vakuové odparce. Odebráno bylo 5 mg produktu, a to bylo rozpuštěno v 5 mm kyvetě v CDCl₃. Naměřené NMR spektrum poukazovalo na přítomnost směsi produktů i přítomnosti výchozích reaktantů (obrázek 16). Proto byla reakce opakována pomocí jiných rozpouštědel – pyridin, dioxan.



Obrázek 16: Srovnání spekter reaktantů a reakční směsi v acetonu – modrá část zobrazuje látku (4), zelená část látku (9) a červená reakční směs

2.3.8.2 Reakce v pyridinu

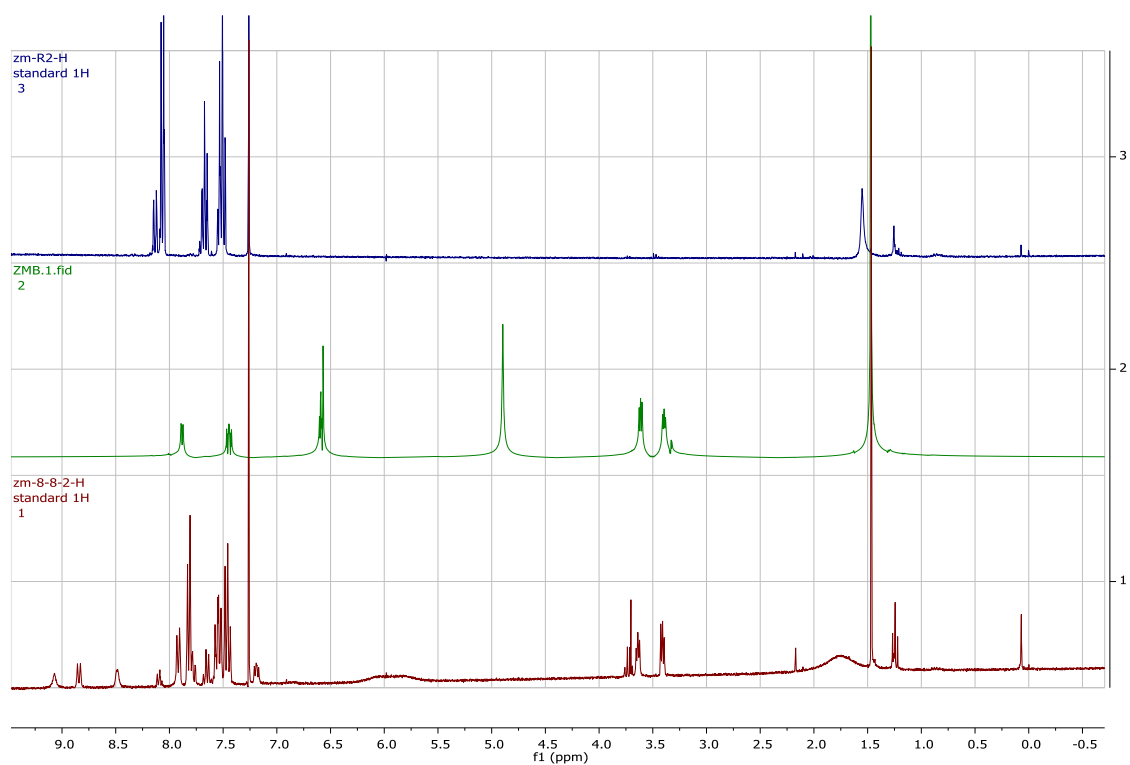
Při reakci s pyridinem byl postup přípravy látky (4) stejný, ale v 1,5násobném množství. Látka (9) (1 ekv., 0,144 mmol, 40 mg) byla rozpuštěna ve vialce s magnetickým míchadlem v 1,5 ml pyridinu. Reakce byla po celou dobu zahřívána na 40 °C a míchána. Do reakční směsi byl po kapkách přes injekční stříkačku přidán benzylozothiokyanát (2 ekv., 0,288 mmol, 47 mg) rozpuštěn v 1 ml pyridinu. Reakční směs byla monitorována pomocí TLC a ponechána reagovat 3 dny. Pak bylo odebráno 0,1 ml reakční směsi, ze které bylo odpařeno rozpouštědlo na rotační vakuové odparce, k odparku bylo přidáno 0,5 ml CDCl_3 a vloženo do 5 mm kyvety na měření NMR spekter, která poukázala na nepřítomnost látky (10) (obrázek 17).



Obrázek 17: Srovnání spekter reaktantů a reakční směsi v pyridinu - modrá část zobrazuje látku (4), zelená část látku (9) a červená reakční směs

2.3.8.3 Reakce v dioxanu

Další možností bylo použít rozpouštědlo dioxan. Opět byla příprava látky (4) podle výše popsaného postupu. Následně byla rozpuštěna látka (9) (1 ekv., 0,18 mmol, 40 mg) v 1,5 ml dioxanu a reakční směs po celou dobu zahřívána na teplotu 40 °C za stálého míchání. Do reakční směsi byla přidávána přes injekční stříkačku látka (4) (1,5 ekv., 0,27 mmol, 44 mg) rozpuštěná v 1,0 ml dioxanu. Reakční směs se míchala 4 dny, kdy byla monitorována pomocí TLC a pak bylo odebráno 0,1 ml reakční směsi, ze které bylo odpařeno rozpouštědlo na rotační vakuové odparce, a k tomu přidáno 0,5 ml CDCl_3 a vloženo do 5 mm kyvety na měření NMR spekter (obrázek 18). Reakční směs obsahovala směs reaktantů a produktů.

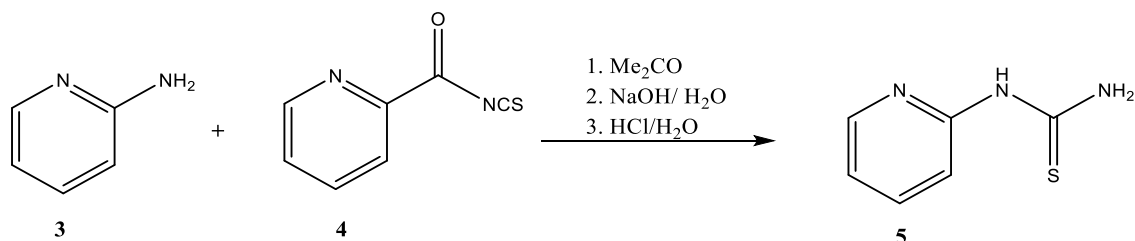


Obrázek 18: Srovnání reaktantů a reakční směsi v dioxane - modrá část zobrazuje látku (4), zelená část látku (9) a červená reakční směs

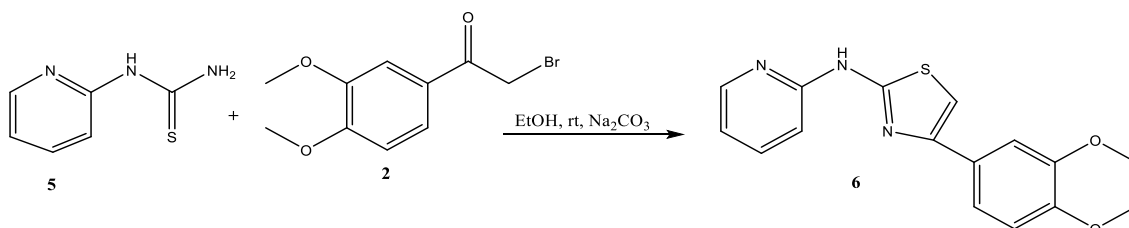
3 Výsledky a diskuse

Syntetická část byla navržena podle syntézy 2-aminothiazolů skupiny Gallardo-Godoy a kol.^[31] v roce 2011. Byla úspěšně zreprodukována syntéza vybraného derivátu 6, a zavedená metodika byla použita při pokusech o získání N-alkylového analogu 11. Tyto pokusy však byly neúspěšné, neboť se nepodařilo připravit klíčový meziprodukt (10).

3.1 Reprodukce syntézy 2-aminothiazolů

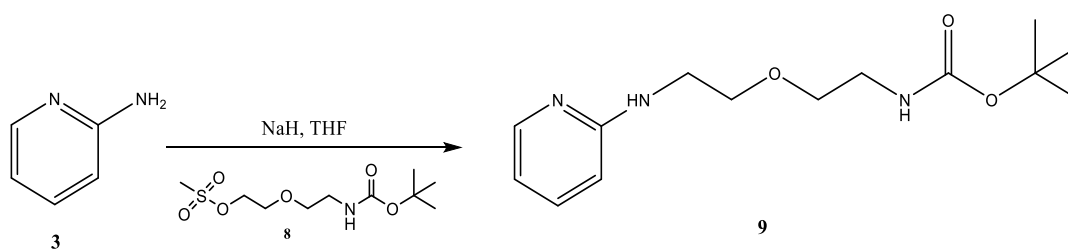


Tento krok syntézy nenesl s sebou žádné komplikace. První část reakce, a to příprava látky (4) nevykazovala žádné potíže. Výtěžek ve formě bílého krystalického prášku byl 58 %. Následná adice 2-aminopyridinu probíhala za stálého míchání po dobu 48 hodin. Produkt byl získán po hydrolýze, výtěžek činil 0,49 g, což bylo 69 %. NMR spektrum poukazovalo na čistou látku, a proto nebylo potřebné následné čištění.



Pro další krok bylo potřebné připravit látku (2). 3,4 -dimethoxybenzoyl-bromid byl připraven po rekrystalizaci jako červenohnědá krystalická látka, kdy výtěžek byl 30 %. Následně byla látka (2) a látka (5) míchána po dobu 48 hodin a monitorována pomocí TLC. Při tomto kroku nenastaly žádné komplikace. Při přidání vody se začal srážet produkt. Po částečném odpaření rozpouštědla byl získán další podíl látky. Produkt, ve formě nažloutlých krystalků, byl izolován ve výtěžku 70 % (0,285 g). NMR spektrum poukazovalo na čistou látku, a proto nebylo potřebné následné čištění.

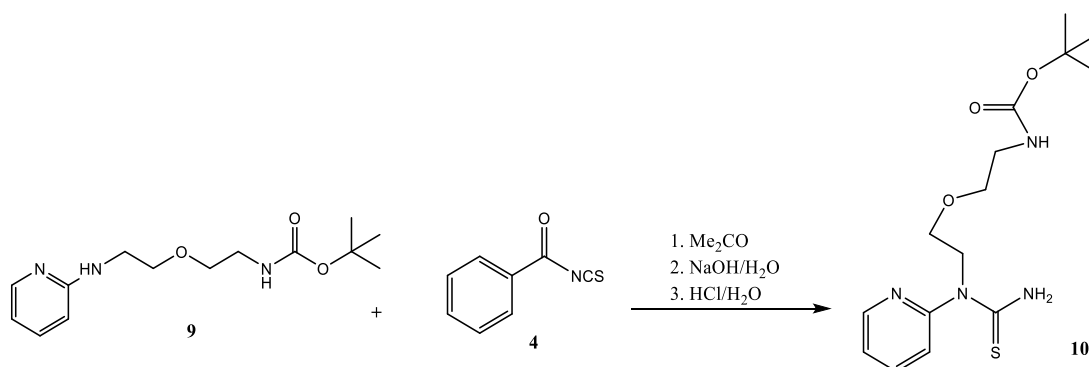
3. 2 Syntéza látky (9)



Pro přípravu látky (9) bylo potřeba syntetizovat 2-(2-((*tert*-butoxykarbonyl)amino)-ethoxyl)methansulfonát (8), která byla získána jako nažloutlý olej v procentuálním hmotnostním výtěžku 63 %. Látku nebylo nutno čistit, protože na TLC byla viditelná jenom jedna skvrna, která odpovídala produktu ($R_f = 0,7$).

Samotná příprava látky (9) nenesla sebou žádné komplikace. Při ukončování reakce byly přítomné 3 skvrny na TLC ($R_f = 0,2; 0,4; 0,7$) v mobilní fázi $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH } 95:5$ (v/v). Výsledná reakční směs byla proto zbavena rozpouštědel pomocí rotační vakuové odparky a ve formě hnědého oleje byla nanesená na chromatografickou sloupcovou kolonu tvořenou silikagelem. Nejdříve se promývala mobilní fází $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH } 98:2$ (v/v). Po získání frakcí obsahujících látku s $R_f = 0,7$ byla mobilní fáze upravena na $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH } 95:5$ (v/v) a po získání frakcí obsahujících látku s $R_f = 0,4$ byla kolona promytá jenom methanolem pro získání frakcí obsahujících látku s $R_f = 0,2$. Látky (9) odpovídaly frakce s $R_f = 0,4$, které byly získány v hmotnostním výtěžku 11 % ve formě nažloutlého oleje, který krystalizuje v chladu. Nízký výtěžek je patrně důsledkem krátké reakční doby, neboť koncentrace použitých vzorků pro TLC byla patrně nevhodná, kdy skvrna výchozích látek v reakční směsi byla daleko hůře viditelná než skvrna produktu. Výtěžek také mohl být závislý na stabilitě látky (8), která byla připravená předem, po dobu týdne. Možností by bylo použití lépe odstupující skupiny než methansulfonylu (například triflát).

3.3 Pokusy o syntézu látky (10)



Při adici látky (9) na látku (4) došlo k tvorbě mnoha produktů, které nebylo možné detekovat na žádné ze zvolených metod, protože data nebylo možné porovnat s jinými – jednalo se o reakci, kdy k syntéze 2-aminothiazolů byl použit sekundární amin. Díky tomu je možná sterická zábrana pro adici. Druhou možností je, že při použití báze NaOH mohlo dojít k hydrolýze látky (4) a následné konjugaci s látkou (4), nebo k odštěpení (Boc)₂O a konjugaci modifikované látky (9). V pyridinu dokonce reakční směs nevykazovala změnu na TLC – přítomnost výchozích látek byla stále na koncentraci a nebyly zaznamenány jiné skvrny na TLC nežli výchozích látek. Reakce v dioxanu a acetonu byly ponechány reagovat déle, přičemž byly sledována pomocí TLC testy každých 24 – 48 hod. Po týdnu byly odebrány vzorky na NMR. Spektrum ukazovalo stále na přítomnost jak reaktantů, tak produktů různého neidentifikovaného množství a struktury. Vzhledem na to, že reakce probíhaly v malém množství (látky (9), 1 ekv., 0,18 mmol, 50 mg), při počítání s určitou ztrátou hmotnostního výtěžku by dělení produktů nebylo možné – protože výtěžek, pokud nějaký, by byl v tak malé hmotnosti, že by se mohl rozmýt na chromatografické sloupcové koloně. Nakonec byla na TLC viditelná řada skvrn s podobným *R_f* (v případě použití acetonu jako mobilní fáze). Tudíž by bylo lepší zvolit jinou variantu přípravy.

Možností je použít bezvodou organickou bázi, aby nedocházelo k odstoupení terciárního aminu. V úvahu přichází též možnost použití silnější báze (NaH), pro zvýšení úspěšnosti adice terciárního aminu.

4 Závěr

V rámci této bakalářské práce byl připraven 4-(3,4-dimethoxyfenyl)-*N*-(pyridin-2-yl)thiazol-2-amin. Tato látka, která patří do skupiny 2-aminothiazolů, byla připravená v miligramové škále, ale v poměrně velkém hmotnostním výtěžku, podle publikovaného postupu. Reprodukce syntézy základního skeletu 2-aminothiazolů tedy proběhla úspěšně.

Problém nastává při pokusu zavést alifatický substituent na dusík pojící B- a C-kruh, kdy je obtížná reakce výchozího sekundárního aminu. Modifikace základního skeletu 2-aminothiazolů tedy byla zatím neúspěšná.

5 Seznam literatury

- [1] J. R. Sundaram, I. C. J. Lee, and S. Shenolikar, “Translating protein phosphatase research into treatments for neurodegenerative diseases,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 45, no. 1, p. 101 LP-112, 2017.
- [2] S. B. Prusiner, “Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals,” *Biologicals*, vol. 18, no. 4, pp. 247–262, 2013.
- [3] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*, 4th edition, John Wiley & Sons, 2010.
- [4] M. Chattopadhyay, E. D. Newell, D. J. Jackson, P. J. Aronoff-Spencer, E. Peisach, J. Gerfen, G. J. Bennett, B. Antholine, W. E. Millhauser, L. Glenn, “The Octarepeat Domain of the Prion Protein Binds Cu(II) with Three Distinct Coordination Modes at pH 7.4,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 36, pp. 12647–12656, Sep. 2005.
- [5] H. Eraña, V. Venegas, J. Moreno, and J. Castilla, “Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 483, no. 4, pp. 1125–1136, 2017.
- [6] G. Di Natale, A. Sinopoli, Á. Grenács, D. Sanna, I. Sóvágó, and G. Pappalardo, “Copper(II) coordination properties of the A β (1–16)₂ peptidomimetic: experimental evidence of intermolecular macrochelate complex species in the A β dimer,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 12, pp. 10274–10284, 2016.
- [7] C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia, and C. Orvig, “The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no. 19–20, pp. 2308–2332, 2012.
- [8] U. Rüb, K. Seidel, H. Heinsen, J. P. Vonsattel, W. F. den Dunnen, and H. W. Korf, “Huntington’s disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain,” *Brain Pathol.*, vol. 26, no. 6, pp. 726–740, 2016.
- [9] G. De Chiara, G. De Marcocci, M. E. Sgarbanti, R. Civitelli, L. Ripoli, C. Piacentini, R. Garaci, E. Grassi, C. Palamara, A. Teresa, “Infectious Agents and Neurodegeneration,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 46, pp. 614–638, 2012.
- [10] P. Parchi, S. G. Chen, P. Brown, W. Zou, S. Capellari, H. Budka, J. Hainfellner, P. F. Reyes, G. T. Golden, J. J. Hauw, D. C. Gajdusek and P. Gambetti, “Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in

- P102L Gerstmann – Sträussler – Scheinker disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 8322–8327, 1998.
- [11] J. L. Robinson Ph.D., “Creutzfeldt-Jakob disease (CJD),” *Magill’s Medical Guide (Online Edition)*. Salem Press, 2013.
- [12] K. D. Deters, S. L. Risacher, K. K. Yoder, A. L. Oblak, F. W. Unverzagt, J. R. Murrell, F. Epperson, E. F. Tallman, K. A. Quaid, M. R. Farlow, J. Andrew, “[11 C] PiB PET in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease,” *Am J Nucl Med Mol Imaging*, vol. 6, no. 1, pp. 84–93, 2016.
- [13] H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, and D. Valensin, “Copper , zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer ’ s , Parkinson ’ s and prion diseases),” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no. 19–20, pp. 2129–2141, 2012.
- [14] M. A. Telpoukhovskaia and C. Orvig, “ Werner coordination chemistry and neurodegeneration,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, pp. 1836–1846, 2013.
- [15] E. Urso and M. Maffia, “Behind the Link between Copper and Angiogenesis : Established Mechanisms and an Overview on the Role of Vascular Copper Transport Systems,” *Journal of Vascular Research*, vol. 52, pp. 172–196, 2015.
- [16] K. I. Silva, B. C. Michael, S. J. Geib, and S. Saxena, “ESEEM Analysis of Multi-Histidine Cu(II)-Coordination in Model Complexes, Peptides, and Amyloid - β ,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, pp. 8935-8944, 2014.
- [17] T. N. Shamsi, T. Athar, R. Parveen, and S. Fatima, “A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 993–1000, 2017.
- [18] S. S. Leal, H. M. Botelho, and C. M. Gomes, “Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 256, no. 19–20, pp. 2253–2270, 2012.
- [19] M. Berridge, “ Calcium signalling and Alzheimer's disease,” *Neurochemical Research*, vol. 36., pp. 1149-1156, 2011.
- [20] M. V. R. Kumari, M. Hiramatsu, and M. Ebadi, “Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II Free Radical Scavenging Actions of Metallothionein Isoforms I and II,” *Free Rad. Res.*, vol. 29, pp. 93-101, 2009.
- [21] E. Atrián-Blasco, A. Santoro, D. L. Pountney, G. Meloni, C. Hureau, and P. Faller, “Chemistry of mammalian metallothioneins and their interaction with amyloidogenic peptides and proteins,” *Chem. Soc. Rev.*, pp. 7683–7693, 2017.

- [22] A. J. McDonald and G. L. Millhauser, "PrP overdrive," *Prion*, vol. 8, no. 2, pp.183-191, 2016.
- [23] A. R. Spevacek, E. G. B. Evans, J. L. Miller, H. C. Meyer, J. G. Pelton, and G. L. Millhauser, "Zinc drives a tertiary fold in the prion protein with familial disease mutation sites at the interface," *Structure*, vol. 21, no. 2, pp. 236–246, 2013.
- [24] G. Di Natale, I. Turi, G. Pappalardo, I. Sóvágó, and E. Rizzarelli, "Cross-talk between the octarepeat domain and the fifth binding site of prion protein driven by the interaction of copper(II) with the N-terminus," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 21, no. 10, pp. 4071–4084, 2014.
- [25] A. K. Thakur, A. K. Srivastava, V. Srinivas, K. V. R. Chary, and C. M. Rao, "Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 44, pp. 38533–38545, 2011.
- [26] E. Croes, J. Theuns, J. Houwing, B. Dermaut, K. Sleegers, G. Roks, M. Van den Broeck, B. Van harten, Barbera J. C. Van Swieten, M. Cruts, Ch. Van Broeckhoven, C. M. van Duijn, " Octapeptide repeat insertions in the prion protein gene and early onset dementia," *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 75, pp. 1166-1170, 2004.
- [27] D. J. Stevens, E. D. Walter, A. Rodríguez, D. Draper, P. Davies, D. R. Brown, G. L. Millhauser, "Early Onset Prion Disease from Octarepeat Expansion Correlates with Copper Binding Properties," *PLOS Pathog.*, vol. 5, no. 4, Apr. 2009.
- [28] B. M. Silber, J. R. Gever, Z. Li, A. Gallardo-Godoy, A. R. Renslo, K. Widjaja, J. J. Irwin, S. Rao, M. O. Jacobson, S. Ghaemmaghami, S. Prusiner, "Bioorganic & Medicinal Chemistry Antiprion compounds that reduce PrP Sc levels in dividing and stationary-phase cells," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 24, pp. 7999–8012, 2013.
- [29] S. Ghaemmaghami, B. C. H. May, A. R. Renslo, and S. B. Prusiner, "Discovery of 2-Aminothiazoles as Potent Antiprion Compounds" *Journal of Virology*, vol. 84, no. 7, pp. 3408–3412, 2010.
- [30] S. Zhou, X. Liu, X. An, X. Yao, and H. Liu, "Molecular Dynamics Simulation Study on the Binding and Stabilization Mechanism of Antiprion Compounds to the 'hot Spot' Region of PrPC," *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 8, no. 11, pp. 2446–2456, 2017.

- [31] A. Gallardo-Godoy, J. Gever, K. L. Fife, B. M. Silber, S. B. Prusiner, and A. R. Renslo, "2-Aminothiazoles as Therapeutic Leads for Prion Diseases," *J. Med. Chem.*, vol. 54, pp. 1010–1021, 2011.
- [32] Z. Li, B. M. Silber, S. Rao, J. Gever, C. Bryant, A. Gallardo-Godoy, E. Dolgih, K. Widjaja, M. Elepano, M. P. Jacobson, B. Stanley and A. R. Renslo, "2-Aminothiazoles with Improved Pharmacotherapeutic Properties for Treatment of Prion Disease," *Chem. Med. Chem.*, vol. 8, no. 5, pp. 847–857, 2013.
- [33] C. Korth, B. C. H. May, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner, "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease," *PNAS*, vol. 98, no. 17, pp. 9836-9841, 2001.
- [34] N. S. Pagadala, T. C. Bjorndahl, M. Joyce, D. S. Wishart, K. Syed, and A. Landi, "The compound (3-{5-[(2,5-dimethoxyphenyl)amino]-1,3,4-thiadiazolidin-2-yl}-5,8-methoxy-2H-chromen-2-one) inhibits the prion protein conversion from PrP^C to PrP^{Sc} with lower IC₅₀ in ScN2a cells," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 25, no. 20, pp. 5875–5888, 2017.
- [35] G. R. Fulmer, A. M. J. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, R. Gan, "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities : Common Laboratory Solvents , Organics , and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist," *Organometallics*, vol 29, pp. 2176–2179, 2010.
- [36] M. V. Galkin, Ch. Dahlstrand, and S. M. J. Samec, "Mild and Robust Redox-Neutral Pd/C-Catalyzed Lignol β-O-4' Bond Cleavage Through a Low-Energy-Barrier Pathway," *ChemSusChem*, vol. 8, no. 13, pp. 2187–2192, Apr. 2015.

