

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**Syntéza a biologické hodnocení takrin-amantadinových
derivátů**

Diplomová práce

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

Konzultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Jan Král

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Jan Král

Práce byla vypracována s podporou SVV 260 183

Poděkování

Zde bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D., svému konzultantovi PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. a Mgr. Kataríně Špilovské za čas který mi věnovali při jejich odborném vedení, za cenné konzultace a připomínky a v neposlední řadě za jejich trpělivost.

Dále děkuji PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Bc. Anně Horové za pomoc při analytickém a biologickém hodnocení.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Jan Král

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

Konzultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza a biologické hodnocení takrin-amantadinových derivátů

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění mozku. Dnes je k terapii této nemoci k dispozici pouze paliativní léčba. Dělíme ji do dvou skupin na inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs) a antagonistu působícího na *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorech. Do skupiny AChEIs patří takrin, donepezil, rivastigmin a galantamin. Takrin byl kvůli jeho nežádoucím účinkům, zejména značné hepatotoxicitě stažen z trhu. V České republice byl vyvinut jeho derivát 7-methoxytakrin (7-MEOTA), který vykazuje nižší jaterní toxicitu.

Tato práce popisuje přípravu sérií takrin-amantadinových derivátů. V rámci biologického hodnocení byla stanovena jejich *in vitro* účinnost vůči acetylcholinesterase (AChE) a butyrylcholinesterase (BChE) za pomoci Ellmanovy metody. Dosažené inhibiční hodnoty byly porovnány se standardy (takrin, 7-MEOTA, amantadin). Všechny nově připravené deriváty svou inhibiční účinností vůči AChE i BChE překonaly 7-MEOTA i amantadin. Produkt **14** byl dokonce silnější inhibitor AChE než takrin. Žádná z testovaných látek nepřekonala inhibiční potenciál takrinu na BChE. Inhibiční hodnoty nových 7-MEOTA-amantadinových derivátů se pohybovaly v mikromolárních a submikromolárních hodnotách IC_{50} . Na závěr byly provedeny molekulární modelovací studie na humánní AChE a BChE, které se pokusily zracionalizovat dosažené výsledky z *in vitro* testování. Dle *in silico* studií u vybraných derivátů dochází pravděpodobně k vazbě 7-MEOTA-amantadinových hybridů do obou anionických částí aktivního místa AChE.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Jan Král

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

Consultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Title of diploma thesis: Synthesis and biological evaluation of tacrine-amantadine derivatives

Alzheimer's disease (AD) is a fatal neurodegenerative disorder of brain. Nowadays there is only paliative treatment available, which can be further subdivided into two groups: acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist. Donepezil, rivastigmine and galantamine represents AChEIs currently available for AD treatment. Tacrine is the first AChEIs to be approved for AD treatment, however, it was withdrawn from the market due to its side effects, especially due to its hepatotoxicity. 7-Methoxytacrine (7-MEOTA) is less toxic tacrine derivative preserving pharmacological profile of tacrine.

This diploma thesis describes synthesis of multifunctional 7-MEOTA-amantadine derivatives as potential drugs to confront AD. Using Ellman's method, we have established their efficacy to inhibit acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) *in vitro*. All new synthesized hybrids from 7-MEOTA-amantadine family proved to be better inhibitors compared to both reference compounds 7-MEOTA and amantadine. Derivative **14** was even more potent in inhibiting AChE than tacrine. None of the new derivatives overwhelmed BChE inhibitory potency of tacrine. Inhibitory values of new 7-MEOTA-amantadine derivatives were ranging in micromolar to submicromolar IC₅₀ values. Finally, molecular modeling studies on human AChE and BChE were performed in order to rationalize result from *in vitro* assays. According to *in silico* studies of chosen derivatives, 7-MEOTA-amantadine hybrids presumably bind to both anionic active sites of AChE.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
1 ÚVOD	3
2 TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1 Alzheimerova choroba	4
2.1.1 Prevalence	4
2.1.2 Rizikové faktory pro rozvoj AD	4
2.1.3 Klinický obraz onemocnění.....	5
2.1.4 Patofyziologie AD	5
2.2 Cholinerní teorie.....	8
2.3 Cholinerní neurotransmise	9
2.3.1 Acetylcholin (ACh)	9
2.3.2 Cholinesterasy (ChE)	10
2.4 Současná léčba AD.....	12
2.4.1 Antagonisté NMDA receptoru.....	12
2.4.2 Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs)	13
2.4.3 Inhibitory AChE používané v terapii AD.....	13
2.5 Multi-target directed ligands (MTDLs)	15
2.6 Deriváty Takrinu	16
2.6.1 7-methoxytakrin (7-MEOTA).....	16
2.6.2 Takrin-propidiový derivát	17
2.6.3 Takrin-indolové deriváty	17
2.6.4 Derivát takrinu s kyselinou lipoovou	18
2.6.5 Deriváty takrinu a melatoninu	18
2.6.6 Deriváty blokátorů kalciových kanálů.....	19

2.6.7	Dimery takrinu	19
2.6.8	Takrin-karbazolové deriváty	20
2.6.9	Takrin-silybinové deriváty	21
2.6.10	Deriváty s kanabinoidními CB ₁ antagonisty	22
2.7	Deriváty amantadinu	23
2.7.1	Galantamin-memantinové deriváty	23
3	Praktická část	24
3.1	Syntetická část.....	24
3.1.1	Cíl práce	24
3.1.2	Obecné údaje	24
3.2	Schéma syntézy.....	26
3.3	Biologické hodnocení	49
3.3.1	Ellmanova metoda.....	49
3.3.2	Postup	49
	Výsledky měření inhibice Ellmanovou metodou.....	51
3.4	Dokovací <i>in silico</i> studie.....	52
4	Diskuze.....	57
5	Závěr	59
	Seznam literatury	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-MEOTA	7-methoxytakrin
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
AChEIs	inhibitory acetylcholinesterasy
ALS	amyotrofická laterální skleróza
Apo-E	apolipoprotein E
APP	amyloid prekursor protein
$A\beta$	amyloid beta
BChE	butyrylcholinesterasa
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl-dikarbonát
CAS	katalytické aktivní místo
CNS	centrální nervová soustava
ER	endoplazmatické retikulum
EtOAc	ethyl-acetát
FDA	Food and Drug Administration
<i>h</i> AChE	lidská rekombinantní AChE
<i>h</i> BChE	lidská plasmatická BChE
HD	Huntingtonova choroba
ChE	cholinesterasa

MeOH	methanol
MNO	2,4,6-trimethylbenzotrilit- <i>N</i> -oxid
N _m	nikotinové receptory muskulární
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
N _n	nikotinové receptory neuronální
PAS	periferní anionické místo
PD	Parkinsonova choroba
PNS	periferní nervová soustava
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
<i>p</i> -TSA	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
<i>r</i> AChE	potkaní AChE
sAPP	rozpuštěný amyloidní prekurzorový protein
<i>Tc</i> AChE	AChE izolovaná z elektrického úhoře
TEA	triethylamin
THA	takrin
TLC	tenkovrstvá chromatografie

1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění. Typickými prvotními příznaky jsou zhoršená paměť, později i neschopnost provádět běžné denní činnosti, problémy s komunikací, dezorientace a deprese. Pozdní stádia této nemoci mají dokonce smrtelné následky. První tuto chorobou v roce 1906 popsal a charakterizoval německý psychiatr Alois Alzheimer. Od té doby bylo vytvořeno několik teorií vzniku a rozvoje choroby, avšak přesná příčina nebyla dosud objasněna. Mezi nejznámější hypotézy vzniku AD patří amyloidní teorie, cholinergní teorie, glutamátergní teorie, teorie oxidačního stresu nebo *tau* patologie. Přes všechna vědecká úsilí doposud nebyla objevena kauzální terapie pro toto onemocnění. Dostupná je pouze paliativní terapie zprostředkovaná inhibitory cholinesteras (ChEI)¹ a antagonistou *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů - memantinem.² Pomocí těchto skupin léčiv je možné progresi choroby částečně zpomalit, nikoliv však úplně zastavit. V raných stádiích AD se používá převážně monoterapie inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI), u středních, středně těžkých a těžkých stádií pak i kombinační terapie s memantinem. Jako první byl pro léčbu AD schválen takrin, který však byl z klinické praxe stažen z důvodu závažných nežádoucích účinků zejména v oblasti GIT a hepatotoxicitě.³

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Alzheimerova choroba

2.1.1 Prevalence

Dle odhadů World Alzheimer report v roce 2014 trpělo demencemi různého typu více než 44 milionů lidí. Předpoklady celosvětového výskytu tohoto onemocnění v blízké budoucnosti ukazují, že v letech 2030 se toto číslo téměř zdvojnásobí a v roce 2050 dosáhne více než trojnásobku uváděné hodnoty.⁴ AD je nejrozšířenějším typem, její podíl z celkového výskytu demencí se odhaduje na více než 75%. Svým rozšířením má obrovský vliv na jedince, společnost a zejména na zdravotnický systém.⁵

Odhaduje se, že v roce 2014 trpělo AD zhruba 5,2 milionů Američanů napříč všemi věkovými skupinami. Četnost tohoto onemocnění stoupá se vzrůstajícím věkem populace. U lidí starších 65-ti let je každý devátý Američan postižen AD, ve věku nad 85 let se udává, že je postižena až jedna třetina obyvatel. Tato choroba není vždy a správně diagnostikována, proto celkové číslo trpících AD může být řádově ještě vyšší. AD trpí větší množství žen než mužů. Tento fakt se přisuzuje průměrné délce života, jenž je u žen vyšší.^{6,7,8,9}

V Evropě je předpokládán výskyt demence typu AD u 7,3 milionů lidí, v ČR se odhaduje více než 120 000 obyvatel postižených AD.¹⁰

2.1.2 Rizikové faktory pro rozvoj AD

Podobně jako některá jiná chronická onemocnění, je dnes AD považována za multifaktoriální chorobu. Zda se nemoc projeví, či nikoliv, je podmíněno částečně geneticky, ale nezanedbatelný vliv má rovněž životní styl a prostředí, ve kterém se jedinec nachází. Přes všechna uvedená fakta však stále na prvním místě rizikových faktorů dominuje věk. Nutno podotknout, že AD není přirozenou součástí procesu stárnutí.⁶

Dnes jsou již známé některé rizikové faktory genetického původu. Jedná se především o mutace genů pro amyloidní prekurzorový protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2)^{11,12,13,14} Za pozdní nástup AD je zodpovědná ε4 alela genu pro apolipoprotein E (Apo-E ε4).¹⁵ V podezření jsou i geny pro klusterin (CLU)¹⁶, komplement receptor 1 (CR1)¹⁷, phosphatidylinositol binding klathrin assembly protein (PICALM)¹⁸ a sortilin-related receptor (SORL1).^{19,20}

Mezi další faktory zvyšující riziko vzniku a rozvoje AD patří onemocnění týkající se vaskulárního systému a metabolismu. Jedná se o hypertenzi²¹, diabetes mellitus²², vysoké hladiny cholesterolu²³ a přítomnost kardiovaskulárních onemocnění²⁴. Také nadměrné užívání alkoholu a kouření cigaret nepříznivě ovlivňuje kardiovaskulární systém a tím nepřímo zvyšuje riziko vzniku AD.²⁵ Naopak za pozitivní lze označit fyzickou aktivitu²⁶ a vyšší stupeň dosaženého vzdělání.^{27,28}

2.1.3 Klinický obraz onemocnění

Příznaky nemoci se vyvíjí pozvolna a často jsou podceňované nebo přisuzované jiným onemocněním. Mezi nejčastější prvotní projevy nemoci patří ztráta prostorové orientace a snížená schopnost zapamatování si nových informací. Následují problémy s plánováním a řešením základních úkonů v domácnosti nebo v práci. Postupně dochází ke snížené orientaci v čase a prostoru. Dále se objevují poruchy ve verbální komunikaci a potíže se psaním. Nemocní rovněž trpí sníženou schopností v rozhodování a bez pomoci nedokáží provádět běžné denní činnosti. V pozdních stádiích postižení trpí depresemi, jsou apatičtí a mění se jejich osobnost. Nakonec bývají odkázáni na pomoc svých nejbližších⁶

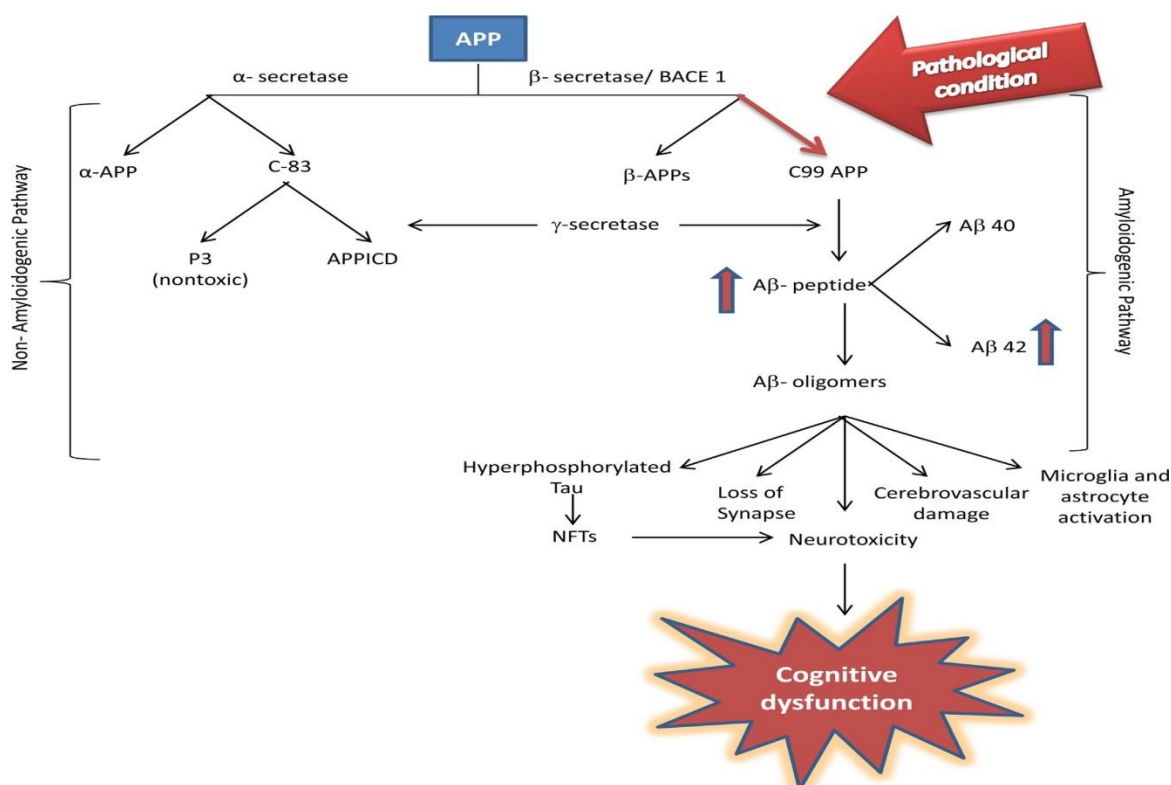
2.1.4 Patofyziologie AD

Ireverzibilní poškození a zánik neuronů je primární příčinou demence AD typu. Postiženy jsou zejména oblasti temporálních laloků, amygdaly, hipokampu a Meynertova jádra. Naopak motorická a sensorická jádra se zdají být nenarušena, i proto bývají motorické a sensorické funkce u pacientů s AD zachovány až do pozdních stádií choroby.²⁹ Dochází také k potlačení

cholinergních funkcí vlivem snížení hladin enzymů cholin-acetyltransferasy (ChAT)³⁰ a acetylcholinesterasy (AChE, E.C. 3.1.1.7) v hippocampu a temporální kůře.³¹ Tyto skutečnosti jsou základem cholinergní teorie.³²

Mikroskopické změny jsou pozorovatelné uvnitř i vně postižených buněk. Uvnitř neuronů se tvoří párovitá spirálovitě zatočená vlákna, známá jako neurofibrilární klubka. Za podjednotku tohoto klubka je považován *tau* protein, který patří do rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly. *Tau* protein je za normálních okolností dobře rozpustný, zatímco v klubkách se vyskytuje v nerozpustné, hyperfosforylované podobě neschopné plnit svou fyziologickou funkci.^{33,34,35} Za jeho fosforylaci je zodpovědný enzym označovaný jako glykogen-synthasakinasa-3 β (GSK-3 β). Fosforylovaná forma proteinu má pozměněnou konformaci, která není schopna vazby k mikrotubulům. Tím se značně zhoršuje stabilita a integrita cytoskeletu, navíc dochází k narušení dalších buněčných funkcí zprostředkovaných mikrotubuly. Jde především o funkce transportní a o šíření nervového vzruchu.^{36,37}

Dalším patofyziologickým znakem charakteristickým pro AD je přítomnost amyloidních plaků, které se hromadí extracelulárně. Vznikají z transmembránového APP proteolytickým štěpením dvěma sekretasami v literatuře označovanými jako β - a γ -sekretasa. APP se vyskytuje na povrchu plasmatické membrány, Golgiho aparátu, endoplazmatického retikula (ER), endosomu, lysosomu a mitochondrií.^{38,39} Za normálního stavu dochází ke štěpení APP pomocí α -sekretasy, tzv. neamyloidogenní cestou. Odštěpuje se fragment označovaný jako rozpustný APP (sAPP) (Obr.1).⁴⁰ V menší míře štěpí APP také β a γ -sekretasa, tzv. amyloidogenní cestou. Dochází k tvorbě krátkých amyloidních fragmentů (A β) o délce 38-43 aminokyselin, které se vyskytují v nízkých koncentracích v míšňní tekutině a v krvi také u zdravých jedinců bez kognitivních příznaků (Obr.1). Vzniklé fragmenty A β mohou samovolně agregovat za vzniku rozpustných A β oligomerů (difúzní plak), následně se tvoří shluk fibrilárních nerozpustných forem. Celý proces je zakončen formováním senilních plaků.^{41,40} Z fragmentů A β mají největší tendenci ke shlukování A β 40 a A β 42.^{38,39}



Obrázek 1. APP Schématické zobrazení dvou rozdílných cest proteolytického zpracování APP. Obrázek převzat z citace⁴⁰

V těsné blízkosti amyloidních depozit byla prokázána přítomnost aktivovaných mikrogliových buněk.⁴² V normálním mozku dochází k interakcím pomocí povrchových receptorů mezi neurony a gliovými buňkami. Tyto interakce slouží k potlačení aktivace gliových buněk a tedy i rozvoji prozánětlivé kaskády vedoucí k poškození neuronů.⁴³ Bylo dokázáno, že mikroglie starých zvířat reagují na A β výrazně jinak než mikroglie zvířat novorozených.⁴⁴ Aktivita a funkčnost mikroglíí klesá v průběhu stárnutí organismu.⁴⁵ V mozku s utvořenými amyloidními strukturami dochází ke vzniku antigenů pro mikroglie, které vedou k jejich aktivaci. Aktivovaná gliová buňka pak produkuje volné radikály a podporuje prozánětlivou reakci a imunitní odpověď. Jako vedlejší produkt této odpovědi může být poškození i fyziologicky zdravých tkání a neuronů.⁴⁶

Amyloidogenní cestou rovněž dochází ke zvýšenému vstupu extracelulárního Ca²⁺ do buňky a k senzitivaci jeho uvolnění z intracelulárních zásob. A β působí na receptory buněčného prionového proteinu (PrP^c) na vnější straně membrány buňky a tím ovlivňuje receptorové kanály, zejména NMDA

receptory. $A\beta$ může vstup Ca^{2+} ovlivnit i přímo tvorbou transmembránových kanálů. Uvolnění intracelulárního Ca^{2+} z ER může být usnadněno několika mechanismy. Mutovaný PSEN1 zvyšuje senzitivitu receptorů pro inositol-trifosfát ($InsP_3R$) a tím zajišťuje snadnější uvolnění vápníku z ER. Další možností je zvýšená exprese ryanodinových receptorů (RZR) které amplifikují signál pro uvolnění Ca^{2+} zprostředkovaný $InsP_3R$. Určitou roli v buněčné homeostáze Ca^{2+} hraje i intracelulární doména APP vznikající štěpením y sekretasy. Remodelace signálu zprostředkovaného Ca^{2+} negativně ovlivňuje paměť a učení, může dokonce indukovat buněčnou smrt.⁴⁷

2.2 Cholinergní teorie

Cholinergní neurotransmiterový systém je dodnes považován za jeden z hlavních systémů, které jsou v průběhu AD narušeny a které mají nezvratný vliv na kognitivní dysfunkce pacientů trpících touto chorobou. Teze cholinergní teorie byly poprvé vysloveny v roce 1976.^{48,49}

Základem této teorie byl poznatek, že v mozcích pacientů s AD dochází k poklesu aktivity cholin-acetyltransferasy (ChAT, E.C. 2.3.1.6) v jeho různých částech. ChAT je enzym zodpovědný za tvorbu acetylcholinu (ACh) z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). Mimo jiné byla rovněž pozorována degenerace neuronů v bazální části mozku. To vysvětlovalo sníženou aktivitu ChAT v kůře a hipokampu.^{50,51}

Experimentální studie na primátech a později na lidech ukázaly spojitost ACh s procesy učení a paměti. Blokádou cholinergních receptorů pomocí skopolaminu vznikaly u mladých organismů krátkodobé poruchy paměti podobné stavům pacientů s AD. Tyto projevy vymizely po aplikaci fysostigminu, pseudoireverzibilního inhibitoru AChE. Uvedené poznatky vedly ke klinickému testování dalších cholinergik – AChEIs.⁵² Registrované jsou v současnosti pouze tři látky ze skupiny AChEIs, a to galantamin, donepezil a rivastigmin. Účinnost všech těchto inhibitorů je zhruba stejná, avšak nejpředepisovanější je v současné době donepezil.⁵³

2.3 Cholinergní neurotransmise

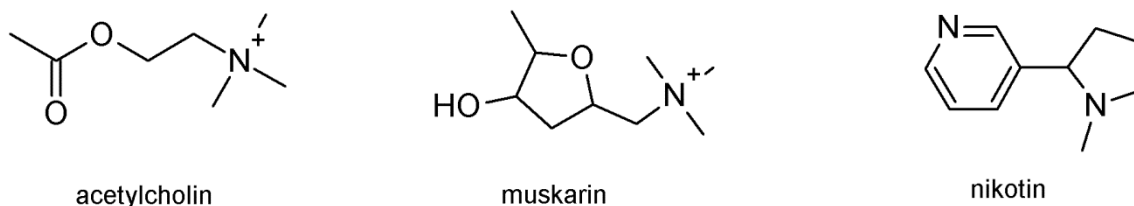
2.3.1 Acetylcholin (ACh)

ACh (Obr. 2) je neuromediátor na gangliových synapsích, nervosvalové ploténce a v některých oblastech centrální nervové soustavy (CNS). V autonomním nervovém systému slouží jako neuromediátor pregangliových sympatických a parasympatických neuronů. V periferní nervové soustavě (PNS) hraje nezbytnou roli při přenosu vzruchu mezi motorickými nervy a kosterním svalstvem na neuromuskulární ploténce. V CNS se nachází především v interneuronech.⁵⁴

ACh je syntetizován z acetyl-CoA a cholinu. Tato reakce je katalyzována enzymem ChAT. Oba prekurzory pro ACh se nachází uvnitř cytosolu neuronu a nejvyšších koncentrací dosahují v terminálních částech axonů. Přítomnost enzymu ChAT je pro cholinergní neurony specifická, můžeme je tedy pomocí tohoto znaku rozlišit.⁵⁴

Převážná většina ACh se skladuje ve vezikulách nervových zakončení, kde je chráněn před degradací AChE. Do vezikul se dostává vezikulárním ACh transportérem výměnou za proton. V nízkých koncentracích je však přítomen i v cytosolu nervové buňky. Uvolnění ACh probíhá výměnou za Ca^{2+} , kdy posléze dojde splynutí vezikula s membránou a vypuštění do synaptické štěrbině.⁵⁴

Nikotinové a muskarinové receptory jsou cílovými místy účinku ACh. Nazývají se podle svých vzorových agonistů – nikotinu a muskarinu (Obr. 2). Nikotinové receptory dále dělíme na muskulární (N_m) a neuronální (N_n). Muskarinové jsou rozděleny na základě interakcí s různými selektivními agonisty do pěti skupin – M_1 až M_5 . Každá tato skupina má odlišnou lokalizaci. M_1 receptory se nachází především v CNS, žaludku a periferních neuronech. Nejvyšší výskyt M_2 receptorů je v srdci. M_3 se pak nachází ve slinných žlázách a hladkých svalech. Význam receptorů M_4 a M_5 nebyl zatím zcela vyjasněn. M_4 receptor má podobné vlastnosti jako M_2 , a M_5 je podobný M_1 receptoru.⁵⁴



Obrázek 2. Agonisté cholinergních receptorů

2.3.2 Cholinesterasy (ChE)

Jedná se o enzymy ze skupiny serinových hydrolas, které katalyzují přeměnu cholinových esterů na cholin a odpovídající kyseliny. Největší význam má hydrolýza ACh na cholin a kyselinu octovou (Schéma 1) v synaptické štěrbině. Dobře známé jsou především AChE a butyrylcholinesterasa (BChE, E.C. 3.1.1.8) přítomné u obratlovců.^{55,32} AChE se vyskytuje v různých molekulárních formách, které lze rozdělit na asymetrické a globulární. Asymetrické jsou zabudovány do extracelulární matrix a jsou přítomny na nervosvalové ploténce. Globulární mohou být zakotveny v plazmatické membráně nebo se vyskytují jako rozpustné formy v podobě mono, di a tetramerů.⁵⁶

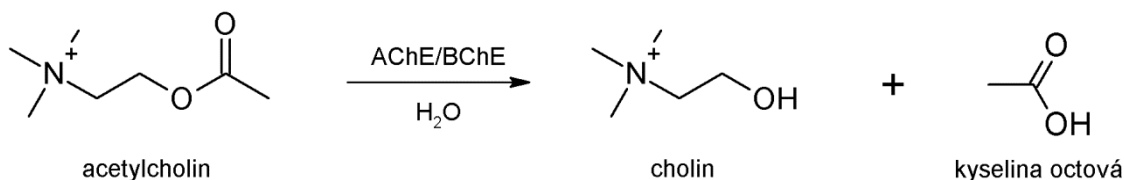


Schéma 1. Hydrolýza ACh

AChE byla nejprve izolována z elektrického úhoře (*Torpedo californica*), později se ukázalo, že tento typ zvířecího enzymu vykazuje vysokou strukturní homologii s AChE obratlovců. AChE patří do skupiny α/β proteinů. Skládá se ze 12-ti spletených β -skládáných listů obklopených 14-ti α -helixy. Nejvýraznějším strukturním znakem u AChE je centrální úzká kavita zasahující do jádra struktury enzymu. Toto místo je zhruba 20 Å hluboké a na svém dně je rozšířeno. Povrch dutiny je z větší části lemován 14 aromatickými rezidui. Aktivní místo (CAS) obsahuje esterovou část tvořenou u všech cholinesteras třemi aminokyselinami (Ser-His-Glu) označovanými jako katalytická triáda.

Uvnitř CAS se dále nachází acylová kapsa, oxanionové místo a anionická část. Anionická část interaguje s kvartérním dusíkem ACh. Oxanionové místo tvoří vodíkové vazby pomocí Gly121 a Gly122 s karbonylem ACh.⁵⁷ Na povrchu enzymu blízko vstupu do aktivního místa AChE se nachází vazebné místo pro ACh a jiné kvartérní ligandy. Bývá označováno jako periferní anionické místo (PAS). Navázání jakéhokoliv ligandu na PAS brání vstupu substrátu do aktivního místa dutiny anebo naopak výstupu hydrolytických štěpů z jádra enzymu ven.^{58,59,60}

Cholinesterasy jsou v lidském mozku zastoupeny na odlišných místech v různých koncentracích. Lidská AChE (*hAChE*) i lidská BChE (*hBChE*) jsou exprimovány v mnohačetných molekulárních formách. Mají podobu globulárních monomerů (G_1), dimerů (G_2) a tetramerů (G_4). Existují ale i jako asymetrické molekuly s jedním (A_4), dvěma (A_8) nebo třemi (A_{12}) tetramery. Jejich význam není zcela objasněn. Globulární G_4 forma nejspíše nejvíce přispívá k zajištění fyziologických funkcí v CNS. V daleko menší míře zde však můžeme narazit i na G_1 formu.⁶¹

U pacientů s AD byl v několika studiích shledán pokles hladiny G_4 forem AChE v kortikálních a subkortikálních oblastech mozku. Dále byla zjištěna přítomnost AChE v amyloidních depozitech a senilních placích. Následné *in vitro* a *in vivo* studie odhalily, že AChE podporuje agregaci amyloidních monomerů ve větší útvary amyloidních fibril. Za tento jev je zodpovědné PAS AChE. Komplexy AChE- $A\beta$ výrazně přispívají k neurotoxicitě.^{62,32}

AChE a BChE se na molekulární úrovni velice podobají. Jejich aminokyselinové sekvence sdílí 65 % homologie. Oba tyto enzymy mají aktivní místo v podobě hydrofobní kavity, ve kterém dochází k degradaci ACh. Liší se však v substrátové specifitě. Zatímco AChE je vysoce selektivní k ACh, BChE je kromě AChE schopna degradovat i substráty objemnější. Je to způsobeno rozdílnou sekvencí aminokyselin vyskytujících se v aktivní části tohoto enzymu. Další odlišnou vlastností je efektivita hydrolýzy ACh. AChE vykazuje vyšší katalytickou aktivitu při nižších koncentracích ACh. Při vyšších její aktivita klesá v důsledku substrátové inhibice. BChE je naopak efektivnější při vyšších koncentracích substrátu. BChE má na rozdíl od AChE ve svém PAS pouze dvě

aminokyseliny (Asp70, Tyr332 – počítáno v rámci hBChE), což vysvětluje odlišnou afinitu ke stejným ligandům.⁶³

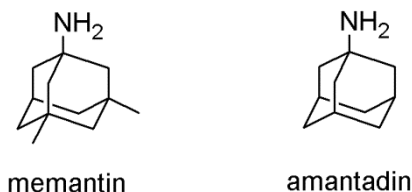
2.4 Současná léčba AD

2.4.1 Antagonisté NMDA receptoru

Memantin – 1-amino-3,5-dimethyladamantan, 3,5-dimethyltricyklo [3.3.1.1^{3,7}]dekan-1-amin, Ebixa[®], Axura[®], Namenda[®], AkatinoI[®], (Obr. 3). je schválen k léčbě AD středně těžkého až těžkého stádia progresu. Působí jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Váže se k NMDA receptoru blízko vazebného místa pro Mg²⁺, oproti hořčíku zde však působí déle. Memantin jako středně silný inhibitor potlačuje patologickou excitaci neuronů, způsobenou nadměrným vyplavováním glutamátu, fyziologické impulzy zůstávají zachovány. Potlačuje depolarizaci membrány neuronu, která vede k influxu Ca²⁺ do buňky. Homeostáza vápníku je pro buňku životně důležitá, její narušení by mohlo vést až k buněčné smrti. Experimenty na tkáňových kulturách navíc ukázaly, že memantin zřejmě snižuje fosforylaci *tau*-proteinu⁶⁴ a podporuje zpracování APP neamyloidogenní cestou.⁶⁵ Biodostupnost memantinu po perorálním podání je téměř 100%. Je metabolizován N-oxidací, hydroxylací a glukuronidací na inaktivní metabolity. Nevykazuje žádné lékové interakce s AChEIs, proto se s nimi často užívá v pokročilejších stádiích AD.²

Amantadin – 1-aminoadamantan, adamantylamin, tricyklo [3.3.1.1^{3,7}]dekan-1-amin, (Obr. 3) byl v roce 1966 schválen FDA k profylaxi Asijské chřipky. Dnes se používá především k mírnění symptomů Parkinsonovy nemoci (PD) a extrapyramidových nežádoucích účinků léčiv. Podobně jako memantin působí nekompetitivní antagonizací NMDA receptorů. Nejspíš také podporuje uvolňování dopaminu z nervových zakončení. V poslední době se intenzivně studují i jeho neuroprotektivní vlastnosti, které by se daly využít při léčbě AD a jiných neurodegenerativních nemocí. Zdá se, že inhibuje aktivitu mikrogliových buněk a tím tlumí jejich prozánětlivou odpověď.⁶⁶ Další studie na buněčných kulturách ukázaly schopnost amantadinu indukovat tvorbu neurotrofického faktoru odvozeného od gliových buněk (GDNF – Glial cell line-

derived neurotrophic factor). Tento faktor produkují zejména astroglie a chrání tím nervové buňky před poškozením.⁶⁷



Obrázek 3. Antagonisté NMDA receptorů

2.4.2 Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs)

Cholinergní teorie dala podnět pro výzkum a vývoj sloučenin této skupiny. AChEIs svým mechanismem účinku zvyšují koncentraci ACh v synaptické štěrbině a tím nepřímo zajišťují funkčnost cholinergní transmise. Tato léčiva byla schválena k symptomatické léčbě AD. Pomáhají stabilizovat neuropsychiatrické a kognitivní funkce pacientů u mírných až středně těžkých stádií nemoci.⁶³ V kombinační terapii s memantinem mohou být použity i při pozdních stádiích AD. Podle jejich selektivity je dělíme na selektivní (donepezil) a neselektivní (takrin, rivastigmin). Dále je můžeme rozdělit dle mechanismu účinku na reverzibilní inhibitory (donepezil, takrin, galantamin), pseudoireverzibilní inhibitory (rivastigmin) nebo jako kompetitivní (galantamin) či nekompetitivní inhibitory (takrin, donepezil).¹

2.4.3 Inhibitory AChE používané v terapii AD

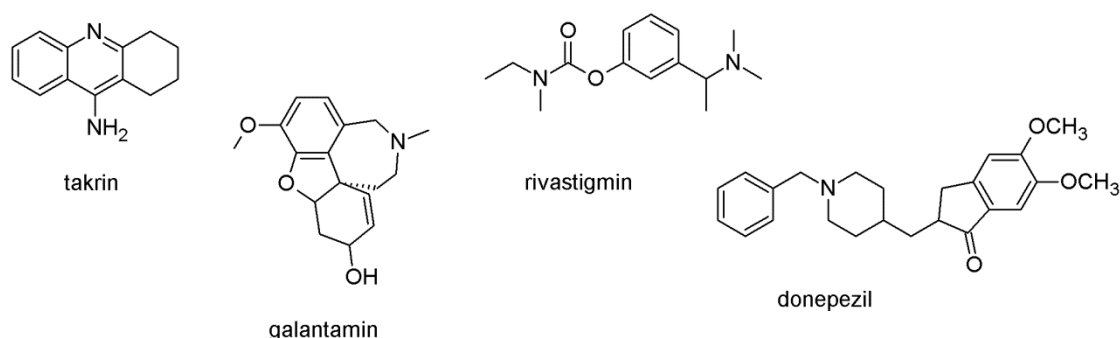
Donepezil – (RS)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on (Obr. 4) je schválen k paliativní léčbě mírného až středního stádia AD.⁶⁸ Bývá označován jako smíšený inhibitor AChE, protože vedle nekompetitivního působení vůči tomuto enzymu projevuje i působení kompetitivní.⁶⁹ Donepezil je díky farmakoforům benzylpiperidinu a indanonu v jeho struktuře mnohem selektivnější k AChE než k BChE. Po světě je v dnešní době distribuován pod názvem Aricept®.⁶⁸ Donepezil se téměř kompletně váže na plazmatické bílkoviny a stejně jako takrin podléhá efektu prvního průchodu játry. Pacienty je poměrně dobře snášen, nežádoucí účinky jsou většinou mírné a dočasné.⁶⁹

Rivastigmin – 3-[(1S)-1-(dimethylamino)ethyl]fenyl-*N*-ethyl-*N*-methylkarbamát (Obr. 4) působí na rozdíl od ostatních používaných AChEIs jako tzv. pseudoireverzibilní inhibitor. Patří do skupiny karbamátů. Váže se podobně jako ACh k anionickému a esteratickému místu zároveň. Stejně jako ACh je AChE hydrolyzován. V aktivním místě však zanechává karbamoylový zbytek, který oproti acetylu z ACh disociuje mnohem pomaleji. Tento efekt setrvává až 10 hodin. Rivastigmin inhibuje obě globulární formy AChE v mozku, G₁ formu však s výrazně vyšší preferencí. Nevykazuje žádnou afinitu k muskarinovým, dopaminergním ani opioidním receptorům. Jeho absorpce je téměř úplná, pouze zčásti se váže na plazmatické bílkoviny. Metabolizuje se velmi rychle, díky jeho hydrolýze se plazmatický poločas pohybuje okolo 1 hodiny. Užívá se ve dvou denních dávkách.⁷⁰

Galantamin – (4a*S*,6*R*,8a*S*)-3-methoxy-11-methyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4a*H*-[1]-benzofuro-[3a,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol, (Obr. 4) je původem přírodní terciární alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Poprvé byl tento alkaloid izolován z rodu *Galanthus*, konkrétně z rostlin *Galanthus nivalis* a *Galanthus woronowii*. V indikaci polyomyelitidy je registrován pod názvem Nivalin[®] již od roku 1958. K léčbě AD v západních zemích získal licenci až po roce 2000. Nejprve byl dostupný v injekční formě, později také v tabletách. Byl užíván při anestezii k antagonizaci účinku nedepolarizujících myorelaxancií. Galantamin působí na cholinergní systém dvojitým mechanismem účinku. Jednak působí jako kompetitivní a selektivní inhibitor AChE. V druhé řadě alostericky moduluje nikotinové receptory pro ACh (nAChR). Váže se na pre- a postsynaptické nAChR na odlišném místě než ACh. Pokud se naváže současně s ACh, dojde k výrazné potenciaci cholinergního účinku. Je metabolizován v játrech přes CYP450 na norgalantamin, epigalantamin a další metabolity. V dnešní době se získává i syntetickou cestou.⁷¹

Takrin – 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (Obr. 4) byl schválen FDA v roce 1993 jako první ze skupiny AChEIs pro léčbu AD. Je známý pod komerčním názvem Cognex[®], kvůli svým nežádoucím účinkům (zejména hepatotoxicitě) a špatné biodostupnosti byl však v roce 1998 stažen z trhu.

Jedná se o nekompetitivní inhibitor AChE.³ Jeho mechanismem účinku je neselektivní inhibice AChE a BChE.¹ Ve vyšších koncentracích může blokovat sodné a draselné kanály, působí na muskarinové receptory a zasahuje do metabolismu monoaminů. Podával se ve čtyřech denních dávkách s maximem 160 mg/den. Jeho biodostupnost je poměrně malá, protože ve značné míře podléhá efektu prvního průchodu játry. Metabolizuje se na aktivní metabolit velnakrin (1-hydroxytakrin). V plazmě se vyskytuje zhruba z 55 % vázán na bílkoviny. Mezi jeho nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení, a hlavně zvýšené hladiny alanin-aminotransferasy (ALT).³



Obrázek 4. AChEIs používané v léčbě AD

2.5 Multi-target directed ligands (MTDLs)

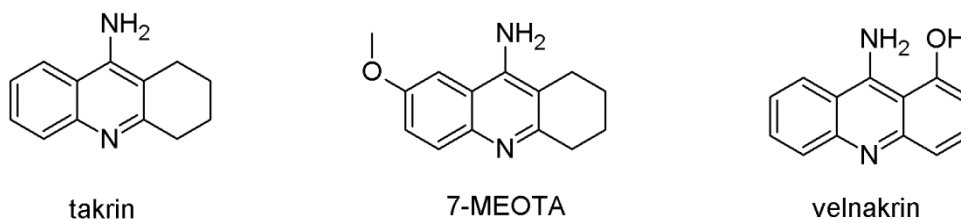
Alzheimerova choroba stejně jako jiná neurodegenerativní onemocnění (PD, Huntingtonova choroba, ALS) nejsou výsledkem pouze jedné příčiny. Jedná se o velice komplexní onemocnění s nejasnou etiopatogenezí. Má se za to, že jednotlivé patofyziologické pochody AD se navzájem potencují a způsobují tak výsledné neuronální poškození. Doposud se vyvíjela převážně léčiva cílená pouze na jeden patofyziologický prvek AD. V současné době se experimentálně rozvíjí další možné přístupy zásahu vedoucí k potlačení rozvoje AD. Komplexnost tohoto onemocnění dala podnět pro rozvoj tzv. multi-target directed ligands (MTDLs), tedy sloučenin, které mohou současně ovlivňovat několik patofyziologických aspektů onemocnění. Pro pacienta tato potenciální léčiva přinášejí benefit jak z pohledu snížení výskytu možných lékových interakcí a jednoduššího dávkovacího schématu, které může znamenat vyšší compliance pacienta (podávání jedné „tablety“), tak i vyšší účinnosti skupiny těchto léčiv.⁷²

Strategie designování těchto MTDLs spočívá v kombinování struktur molekul s požadovanými farmakologickými účinky. V praxi se hledá u sloučenin vysoce selektivních k určitému cíli případná další terapeuticky prospěšná interakce, která se následnými syntetickými úpravami zesiluje. Jeden z dalších způsobů je kombinace částí dvou vysoce selektivních ligandů do jedné molekuly.⁷³ Důležité je, aby si vzniklý hybrid zachoval vlastnosti molekul původních a byl schopen interagovat s více cílovými strukturami současně. Zajímavé jsou hybridní deriváty AChEIs kombinované např. s anti-A β agregačními, antioxidantními nebo chelatačními látkami. Známe jsou i kombinace s blokátory kalciových kanálů.⁷²

2.6 Deriváty Takrinu

2.6.1 7-methoxytakrin (7-MEOTA)

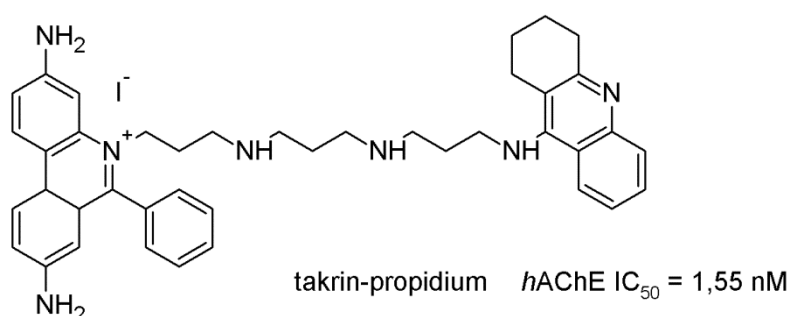
V době schvalování takrinu FDA probíhal v České republice výzkum a vývoj jeho derivátu 7-methoxytakrinu (7-MEOTA, Obr. 5). Stejně jako takrin je 7-MEOTA inhibítorem AChE s centrálním účinkem. Byl navíc zaveden v Armádě České republiky jako antidotum proti 3-chinuklidinyl-benzilátu (QNB). Další vývoj této látky byl bohužel z finančních důvodů ukončen. 7-MEOTA má podobné farmakologické vlastnosti jako takrin, jeho výhoda však spočívá v nižší toxicitě. Ukázalo se, že 7-MEOTA je slabším inhibítorem AChE ve srovnání s takrinem. Účinky jejich ekvitoxických koncentrací se ale zdají být srovnatelné. Při testování *in vitro* toxicity na buněčných kulturách lidských hepatocytů dopadl 7-MEOTA paradoxně hůře než takrin. Naopak *in vivo* testy prokázaly nižší toxicitu 7-MEOTA. Takrin i 7-MEOTA se metabolizují podobnou biotransformační cestou. Takrin se metabolizuje na některé metabolicky aktivní hydroxyderiváty s nízkou toxicitou, ale rovněž na reaktivní chinonové formy. Jeden z těchto derivátů je velnakrin (1-hydroxytakrin, Obr. 5). Tento metabolit se u 7-MEOTA vůbec nevyskytuje. Nižší toxicita 7-MEOTA v porovnání s takrinem je dána jeho metabolizací probíhající nejprve přes demetylací methoxy skupiny, vzniklý derivát může být následně konjugován a eliminován z organismu.⁷⁴



Obrázek 5. Derivát takrinu a jeho metabolit

2.6.2 Takrin-propidiový derivát

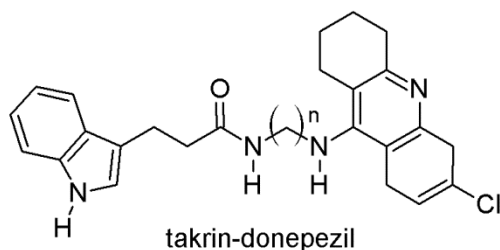
Vznikl spojením takrinu a propidium-jodidu přes polyaminový řetězec (Obr. 6). Obě tyto molekuly patří do skupiny AChEIs, přičemž takrin je schopen vazby do CAS AChE, zatímco propidium-jodid se orientuje do PAS. Tento derivát je srovnáním hodnot IC_{50} 20 000× silnější inhibitor AChE než propidium-jodid a 300× silnější než takrin. V PAS interaguje s Trp286 a tím zajišťuje dobré $A\beta$ -antiagregační vlastnosti.⁷⁵



Obrázek 6. Struktura takrin-propidiového derivátu

2.6.3 Takrin-indolové deriváty

Tyto deriváty vznikly připojením indolového jádra napodobujícího indanovou část donepezilu k takrinu (Obr. 7). Právě prostřednictvím indolového kruhu dochází k π - π interakci těchto inhibitorů s PAS AChE. S výsledky IC_{50} 20 pM a 70 pM se jedná o jedny z nejsilnějších inhibitorů AChE. Navíc vykazují velice silné antiagregační účinky vůči $A\beta$.⁷⁶



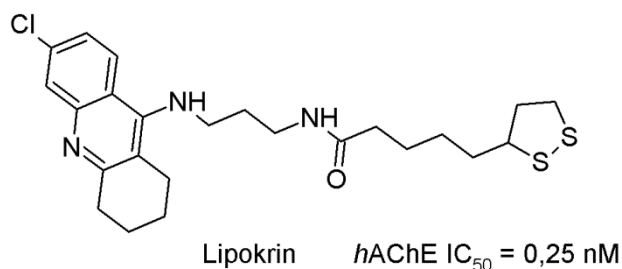
A $n = 6$ $hAChE$ $IC_{50} = 70$ pM

B $n = 7$ $hAChE$ $IC_{50} = 20$ pM

Obrázek 7. Takrin-indolové deriváty

2.6.4 Derivát takrinu s kyselinou lipoovou

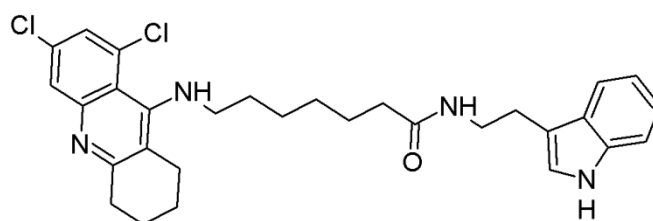
Bylo prokázáno, že oxidační stres přispívá k rozvoji AD.⁷⁷ K potlačení tohoto fenoménu byla připravena celá řada sloučenin se schopností „neutralizovat“ reaktivní kyslíkové formy. Jednou z takto připravených sloučenin byl lipokrin (Obr. 8). Ten ve své molekule kombinuje antioxidační vlastnosti (kyselina lipoová) a inhibiční potenciál vůči AChE (takrinová část). Kyselina lipoová byla vybrána nejen kvůli svým antioxidačním účinkům, ale také proto, že by její cyklická část mohla působit v PAS. Výsledný derivát vykázal silný inhibiční potenciál vůči $hAChE$, inhibici agregace $A\beta$ a antioxidační vlastnosti.⁷⁸



Obrázek 8. Lipokrin

2.6.5 Deriváty takrinu a melatoninu

Melatonin je neuroprotektivní a antioxidační hormon sekretovaný epifýzou, jehož úbytek byl zaznamenán v souvislosti se stárnutím. Dále bylo prokázáno, že má protektivní účinky proti $A\beta$ indukované apoptóze v mikroglíích potkanů.⁷⁹ Jeho kombinací s takrinem vznikla série MTDLs, z nichž nejsilnější inhibitor $hAChE$ je uveden na obrázku 9.⁸⁰

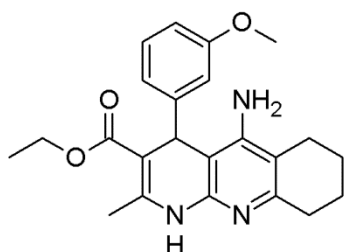


takrin-melatonin $hAChE IC_{50} = 8 \text{ pM}$

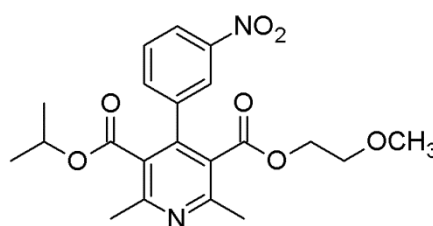
Obrázek 9. Heterodimer takrinu a melatoninu

2.6.6 Deriváty blokátorů kalciových kanálů

Zásadní roli v patogenezi AD hraje nejspíš i porušení homeostázy vápníku uvnitř buňky.⁸¹ V této souvislosti byly připraveny deriváty takrinu a středně silných blokátorů kalciových kanálů (BKK), které byly testovány pro svůj neuroprotektivní potenciál. Jedním z představitelů středně silných BKK je nimodipin. Tyto deriváty představují přímou kombinaci parentních molekul. Od takrinu a BKK nimodipinu jsou odvozeny tzv. takripyriny (Obr. 10).⁸²



Takripyrin $hAChE IC_{50} = 58 \text{ nM}$



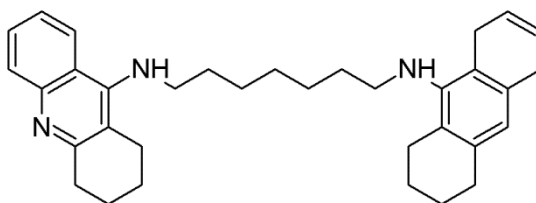
Nimodipin

Obrázek 10. Derivát takrinu a BKK

2.6.7 Dimery takrinu

Jedny z dalších zajímavých derivátů, jsou dimery takrinu. Bis(7)takrin označovaný také jako bis(7)cognitin (Obr. 11) spojuje dvě molekuly takrinu prostřednictvím heptamethylenového řetězce. Tento derivát je schopen současně se vázat do CAS a PAS AChE. Díky tomu je mnohem silnější inhibitor AChE (asi 1000×) ve srovnání s takrinem.⁸³ Jeho schopnost vázat se do PAS mu zajišťuje anti-A β agregační účinnost.⁶² Navíc u něj byl prokázán

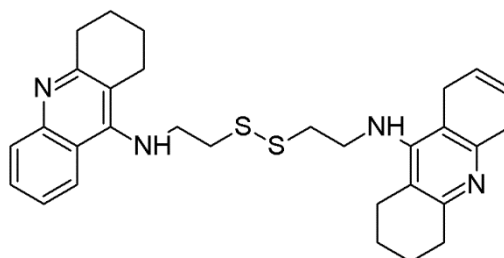
neuroprotektivní potenciál tím, že interaguje s NMDA, GABA_A receptory a inhibuje β -sekretasu.⁸⁴



bis(7)takrin *r*AChE IC₅₀ = 0,4 nM

Obrázek 11. Homodimer takrinu

Struktura a vlastnosti bis(7)takrinu inspirovaly k vytvoření dalšího MTDL (Obr. 12). Heptamethylenový řetězec byl vyměněn za cystamin, který obsahuje dva atomy síry ve své struktuře. Cystamin sám o sobě funguje jako antioxidant s neuroprotektivními vlastnostmi. Takrin-cystaminový dimer inhibuje AChE a BChE srovnatelně s jeho předchůdcem bis(7)takrinem. Označení MTDL si získal svými dalšími vlastnostmi jako je inhibice agregace A β , vychytávání volných kyslíkových radikálů a schopností aktivovat ochranné mechanismy v buňce.⁸⁵



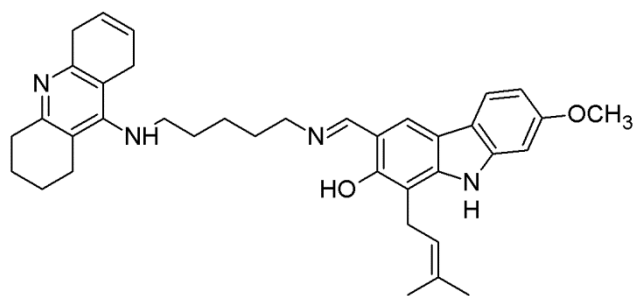
takrin-cystamin *h*AChE IC₅₀ = 5 nM

Obrázek 12. Dimer takrinu spojený cystaminem

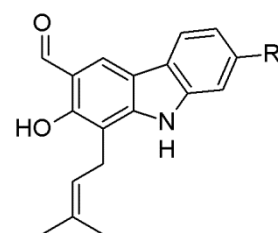
2.6.8 Takrin-karbazolové deriváty

Karbazoly jsou skupina látek běžně se vyskytujících v přírodě v řadě rostlin. Disponují schopností vychytávat volné radikály, fungují tak jako velmi silné antioxidanty. Karbazoly heptafylin a 7-methoxyheptafylin v kombinaci s takrinem byly použity k syntéze nových MTDL, spojovací můstky tvořily alkyldiaminy se

třemi až pěti uhlíky. Nejlepší inhibiční potenciál vůči AChE dosáhl derivát se spojovacím řetězcem C5 (Obr. 13). Deriváty odvozené od 7-methoxyheptafylinu byly účinnějšími inhibitory AChE v porovnání s heptafylinovými analogy. Podle molekulově modelovacích studií dochází k vazbě připravených ligandů současně do CAS i PAS AChE. *In vitro* studie rovněž prokázaly antioxidační potenciál a potlačení cytotoxického působení A β .⁸⁶



takrin-karbazol $TcAChE$ $IC_{50} = 0,48 \mu M$



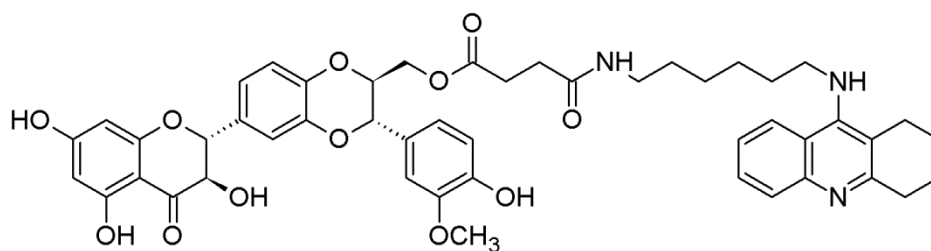
R = H heptafylin

R = OCH₃ 7-methoxyheptafylin

Obrázek 13. Derivát takrinu a 7-methoxyheptafylinu

2.6.9 Takrin-silybinové deriváty

Silybin je sloučenina přírodního charakteru patřící do skupiny flavonolignanů. Jedná se o hlavní součást silymarinového komplexu. Tento komplex se získává jako směs z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Silybin byl použit k přípravě nových takrinových derivátů pro svůj hepatoprotektivní potenciál. K *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)hexan-1,6-diaminu je připojen pomocí sukcinátového spojovacího řetězce (Obr. 14). Vlastnosti tohoto produktu byly porovnávány s ekvimolární směsí takrinu a silybinu. Výsledný produkt je o něco slabší inhibitor AChE než takrin samotný, avšak neindukuje jaterní enzymy a je v daleko menší míře hepatotoxický. Byly u něj rovněž pozorovány i určité neuroprotektivní vlastnosti.⁸⁷



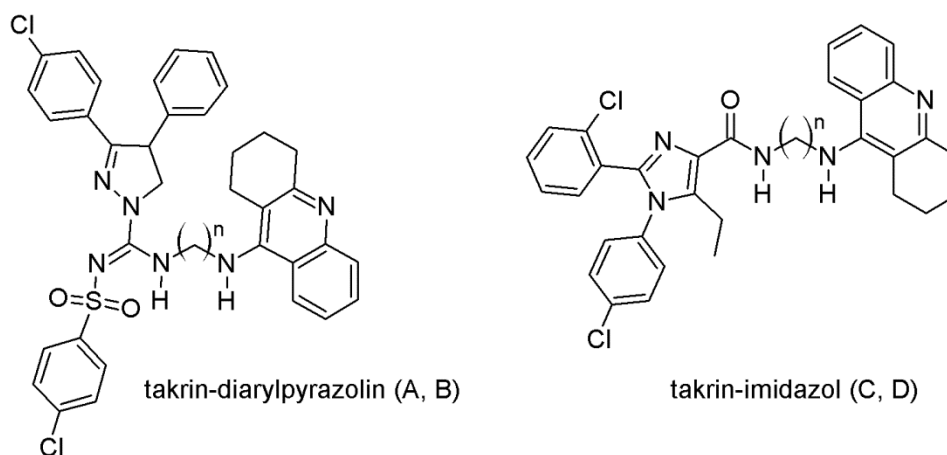
takrin-silybin

TcAChE IC₅₀ = 53,9 nM

Obrázek 14. Silybin spojený s takrinem

2.6.10 Deriváty s kanabinoidními CB₁ antagonisty

Antagonisté působící na CB₁ receptoru by mohli mít potenciální terapeutické využití v léčbě AD. Ukázalo se, že takovéto deriváty zvyšují uvolňování ACh v hipokampu a v kortikální oblasti. Toto zjištění dalo vznik derivátům, které spojují takrin s CB₁ antagonisty strukturně odvozenými od 3,4-diarylpyrazolinu a 1,2-diarylimidazolu (Obr. 15). Výsledné deriváty si zachovaly AChE inhibiční vlastnosti a současně působily jako antagonisté na CB₁ receptorech.⁸⁸



takrin-diarylpyrazolin (A, B)

takrin-imidazol (C, D)

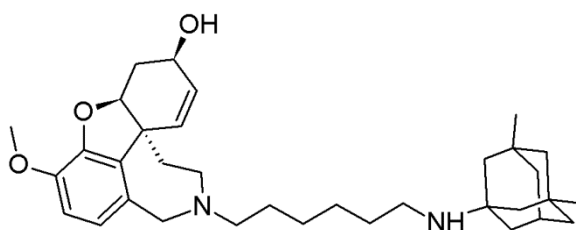
A	n = 4	hAChE IC ₅₀ = 3,698 mM	C	n = 4	hAChE IC ₅₀ = 1,503 mM
B	n = 7	hAChE IC ₅₀ = 2,479 mM	D	n = 7	hAChE IC ₅₀ = 2,739 mM

Obrázek 15. Heterodimery takrinu a CB₁ antagonistů

2.7 Deriváty amantadinu

2.7.1 Galantamin-memantinové deriváty

Další zajímavé MTDLs jsou hybridy odvozené od galantaminu a memantinu (Obr. 16). Obě tyto molekuly jsou schválené k použití v klinické praxi. Galantamin na rozdíl od ostatních AChEIs alostericky moduluje α podjednotku nikotinových receptorů. Navíc může aktivací $\alpha 7$ nikotinových receptorů na presynaptických glutamatergních neuronech zesílit účinek memantinu. Některé z těchto derivátů dosáhly velkého potenciálu. Memagal, derivát se 6-ti uhlíky ve spojovacím řetězci, vykazuje vedle subnanomolárních hodnot IC_{50} na potkaní AChE (*rAChE*) i schopnost vazby na NMDA receptory v mikromolárních koncentracích.⁸⁹



Memagal $rAChE IC_{50} = 0,28 \text{ nM}$

Obrázek 16. Galantamin-memantinový derivát

3 Praktická část

3.1 Syntetická část

3.1.1 Cíl práce

Cílem této práce je připravit série duálních inhibitorů AChE odvozením od méně toxického derivátu takrinu (7-MEOTA) a amantadinového derivátu memantinu. 7-MEOTA-amantadinové deriváty byly navrženy v souladu se strategií MTDLs. Racionální design tohoto spojení je postaven na představě, že by nově připravené 7-MEOTA-amantadinové hybridy měly disponovat schopností duální inhibice AChE, tj. dosažení místa účinku v obou anionických částech AChE. Navíc by takovéto deriváty mohly současně postihovat dvě patologické kaskády doprovázející AD, 7-MEOTA zajistí inhibici AChE a amantadinová část může bránit excitotoxicitě glutamátu ovlivněním NMDA receptorů.⁶⁷ Navíc by mohly interakcí s PAS působit anti-A β agregačně.³²

3.1.2 Obecné údaje

Chemikálie používané v průběhu následujících syntéz byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Česká republika) a před použitím nebyly dále přečišťovány. Rozpouštědla dodaná firmou Penta a.s. (Česká republika) byla v čistotě p.a. Monitorování průběhu reakcí bylo prováděno pomocí TLC na hliníkových silikagelem 60 F₂₅₄ potažených destičkách dodaných firmou Merck Millipore (Praha, Česká republika). Sloupcová chromatografie byla prováděna za normálního tlaku s využitím silikagelu 100 (velikost částic 0,063–0,200 mm) od firmy Fluka (Praha, Česká republika).

Hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) byla provedena s využitím přístroje kombinujícím HPLC (vysokoúčinný kapalinový chromatograf) a hmotnostní spektrometr. HPLC HP 1100 systém získaný od německého (Waldbronn) dodavatele Agilent Technologies je sestaven z vakuového plynovače G1322A, kvartérní pumpy G1311A, autosampleru G1313A a kvadrupolového hmotnostního spektrometru MSD1456 VL se zdrojem elektron-sprejové ionizace. Generátor Whatman 75-720 byl zdrojem dusíku k hmotnostnímu

spektrometru. Naměřená data byla odečtena sondou o napětí 4000 V v pozitivním iontovém módu. Průtok sušícího plynu byl 13l/min a jeho teplota byla 335°C. Tlak rozprašovaného plynu byl 35 psig.

Spektra ^{13}C NMR a ^1H NMR byla proměřena na spektrometru Varian S500 500 MHz pro ^1H NMR spektra a 125 MHz pro ^{13}C spektra. Chemický posun je udáván v ppm (δ) v poměru k signálu deuterovaného dimethylsulfoxidu (DMSO- d_6 , δ 2,50 pro ^1H NMR a δ 39,7 pro ^{13}C NMR) a deuterovaného chloroformu (CDCl_3 , δ 7.27 pro ^1H NMR a δ 77.2 pro ^{13}C NMR).

Teploty tání byly naměřeny na bodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul, Německo) a nebyly dále korigovány.

3.2 Schéma syntézy

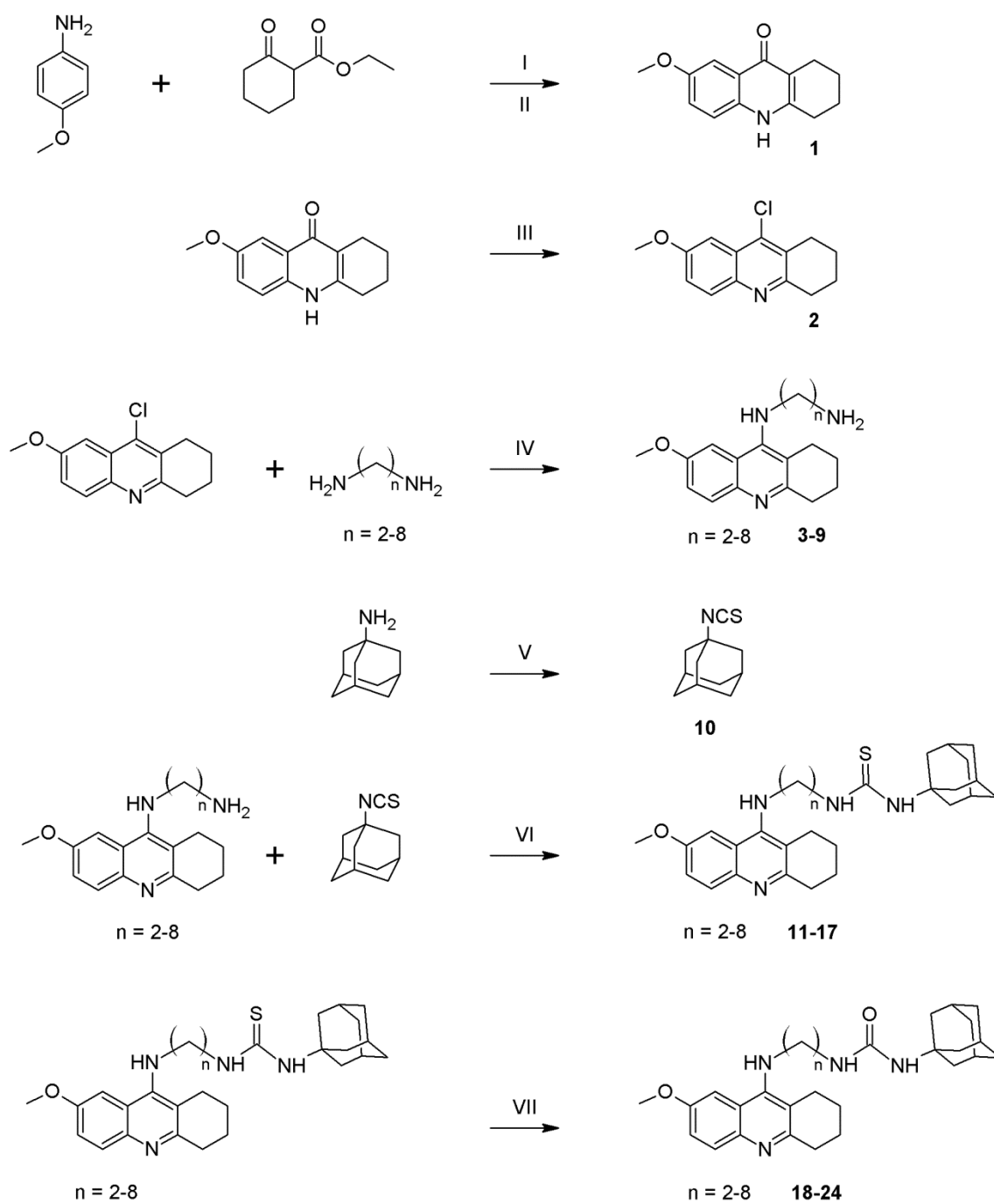
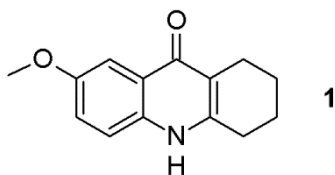


Schéma 2. Syntéza 7-MEOTA-amantadinových derivátů

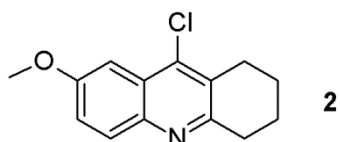
I) toluen, *p*-TSA Dean-Stark aparatura; II) difenylether, Dean-Stark aparatura; III) POCl₃; IV) fenol; V) aceton, CS₂, TEA, Boc₂O; VI) CHCl₃; VII) CH₂Cl₂, MNO

Syntéza 7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-onu (1)



4-Methoxyanilin (12,3 g; 0,1 mol) a ethyl-2-oxocyclohexanocarboxylátu (18,7 g; 0,11 mol) byly rozpuštěny ve 300 ml toluenu spolu s katalytickým množstvím monohydrátu *p*-toluensulfonové kyseliny (*p*-TSA). Reakční směs byla míchána za varu po dobu 8 h v baňce opatřené Dean-Starkovým aparátem sloužícím pro odstranění vody z reakce. Následně byl vakuově oddestilován toluen a k reakční směsi bylo přidáno 80 ml difenyletheru. Baňka byla opět opatřena Dean-Starkovým aparátem pro zachycení ethanolu. Reakční směs byla zahřívána na teplotu 220 °C a při této teplotě míchána po dobu 90 minut. Průběh reakce byl průběžně monitorován pomocí TLC. Reakční směs byla poté ochlazená na laboratorní teplotu a bylo přidáno 200 ml hexanu. Ochlazením vzniklá sraženina byla odfiltrována a promyta hexanem. Vznikl krystalický meziprodukt nažloutlé barvy s výtěžkem 78 % (17,9 g). NMR spektra a teplota tání souhlasily s literaturou.⁹⁰

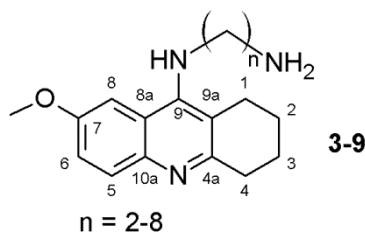
Syntéza 9-chlor-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinu (2)



7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-on (1) (1 g; 4,3 mmol) byl za chlazení přidán k fosforylchloridu (3,43 g; 22,4 mmol) a následně míchán při teplotě 130 °C po dobu 1 hodiny. Reakční směs byla poté ochlazená a přebytečný fosforylchlorid oddestilován za sníženého tlaku. Zbytek směsi se po smíchání s ledem (250 g) a chloroformem zneutralizoval 50 ml 25% roztoku amoniaku. Organická vrstva byla vytřepána 100 ml vody, poté vysušena pomocí CaCl₂. Směs se dále zfiltrovala a přebytečné rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Produkt reakce byl nakonec přečištěn sloupcovou chromatografií za použití silikagelu saturevaného triethylaminem. Jako mobilní fáze byla použita směs CH₂Cl₂-EtOAc v poměru 9:1. Produktem po přečištění

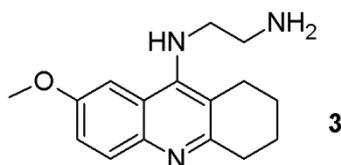
byly tmavě žluté krystaly s výtěžností 92 % (0,98 g). NMR spektra a teplota tání byly v souladu s literaturou.⁹⁰

Syntéza *N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)alkan-1, ω -diaminů (**3-9**)



Fenol (10,34 g; 109,9 mmol) a 9-chloro-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**2**) (0,5 g; 2 mmol) se míchaly v baňce při teplotě 80–90°C dokud nevznikla homogenní směs. Poté byl přidán příslušný 1, ω -alkyldiamin (8,1 mmol) a reakční teplota byla zvýšena na 125–130°C. Při této teplotě se reakce udržovala 2–4 h. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po ochlazení na laboratorní teplotu se reakční směs rozpustila v chloroformu a následně vytřepala 20 % hydroxidem sodným, pak nasyceným vodným roztokem NaCl a nakonec vodou. Organická vrstva byla sušena pomocí bezvodého síranu sodného, po odfiltrování sušidla byla organická vrstva odpařena za sníženého tlaku. Olejovitý produkt byl následně čištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze EtOAc-MeOH-NH₃ v poměru 6:2:0,2. Byl získán tmavě žlutý olejovitý produkt s vysokou viskozitou.

N-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)ethan-1,2-diamin (**3**)



Vzhled: žlutý olej

Výtěžek: 90 %

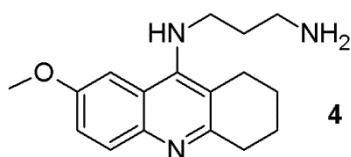
¹H-NMR (CDCl₃) δ 1,91 (m; 4H; 2 \times CH₂; H-2; H-3); 2,80 (m; 2H; CH₂; H-1); 2,95 (t; 2H; CH₂; H-2'; $J = 5,6$ Hz); 3,04 (m; 2H; CH₂; H-4); 3,43 (t; 2H; CH₂; H-1');

$J = 5,6$ Hz); 3,91 (s; 3H; OCH₃); 7,25 (ddd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 6,0; 2,4$ Hz); 7,32 (d; 1H; CH; H-8; $J = 2,8$ Hz); 7,84 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 22,9; 23,1 (C-2; C-3); 24,9 (C-1); 33,7 (C-4); 42,4 (C-2'); 50,8 (C-1'); 55,5 (OCH₃); 101,7 (C-8); 117,9 (C-9a); 120,3 (C-6); 121,5 (C-8a); 130,2 (C-5); 143,2 (C-10a); 150,0 (C-9); 156,0 (C-7); 156,2 (C-4a)

ESI-MS: m/z 270,1 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₁₆H₂₂N₃O]⁺ 270,2)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)propan-1,3-diamin (4)**



Vzhled: žlutý olej

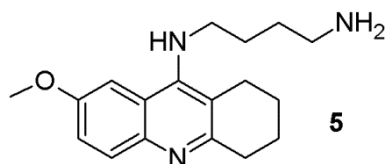
Výtěžek: 88 %

¹H-NMR (CDCl₃) δ 1,82 (m; 2H; CH₂; H-2'); $J = 6,4$ Hz); 1,89 (m; 4H; 2× CH₂; H-2; H-3); 2,74 (m; 2H; CH₂; H-1); 2,92 (m; 2H; CH₂; H-3'); $J = 6,8$ Hz); 3,04 (m; 2H; CH₂; H-4); 3,55 (t; 2H; CH₂; H-1'); $J = 6,4$ Hz); 3,90 (s; 3H; OCH₃); 5,44 (bs; 1H; NH); 7,23 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,8$ Hz); 7,28 (d; 1H; CH; H-8; $J = 2,8$ Hz); 7,85 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 22,6; 22,9 (C-2; C-3); 25,0 (C-1); 33,2 (C-2'); 33,8 (C-4); 40,4 (C-3'); 47,6 (C-1'); 55,4 (OCH₃); 101,8 (C-8); 116,8 (C-9a); 120,4 (C-6); 120,9 (C-8a); 129,4 (C-5); 142,5 (C-10a); 150,3 (C-9); 155,7 (C-7); 155,9 (C-4a)

ESI-MS: m/z 286,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₁₇H₂₄N₃O]⁺ 286,2)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)butan-1,4-diamin (5)**



Vzhled: žlutý olej

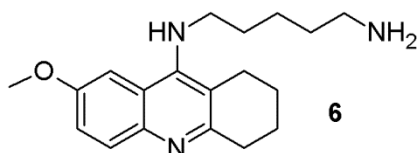
Výtěžek: 85 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,57 (m; 2H; CH_2 ; H-3'); 1,71 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,90 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 2,74 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-1;4'); 3,03 (m; 2H; CH_2 ; H-4); 3,43 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 6,4$ Hz); 3,91 (s; 3H; OCH_3); 5,75 (bs; 1H; NH); 7,24 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-6; H-8); 7,83 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 22,8; 23,1 (C-2; C-3); 24,8 (C-1); 29,1 (C-2'); 30,8 (C-3'); 33,6 (C-4); 41,7 (C-4'); 48,9 (C-1'); 55,5 (OCH_3); 101,7 (C-8); 117,2 (C-9a); 120,4 (C-6); 121,2 (C-8a); 130,0 (C-5); 143,0 (C-10a); 150,0 (C-9); 156,0 (C-7;4a)

ESI-MS: m/z 300,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}]^+$ 300,2)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)pentan-1,5-diamin (6)**



Vzhled: žlutý olej

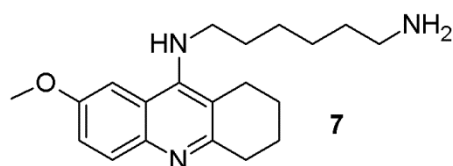
Výtěžek: 93 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,47 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-3'; H-4'); 1,68 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,91 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 2,71 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-1; H-5'); 3,04 (m; 2H; CH_2 ; H-4); 3,41 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 6,4$ Hz); 3,91 (s; 3H; OCH_3); 7,23 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-6; H-8); 7,83 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 22,8; 23,1 (C-2; C-3); 24,4 (C-3'); 24,8 (C-1); 31,7 (C-2'); 33,5 (C-4'); 33,8 (C-4); 42,0 (C-5'); 49,1 (C-1'); 55,5 (OCH_3); 101,7 (C-8); 117,4 (C-9a); 120,3 (C-6); 121,3 (C-8a); 130,3 (C-5); 143,4 (C-10a); 149,8 (C-9); 155,9 (C-7); 156,2 (C-4a)

ESI-MS: m/z 314,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}]^+$ 314,2)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)hexan-1,6-diamin (7)**



Vzhled: žlutý olej

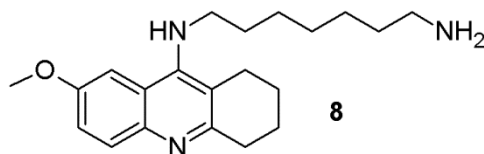
Výtěžek: 81 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,41 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-3'; H-4'; H-5'); 1,67 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,91 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 2,68 (t; 2H; CH_2 ; H-6'; $J = 7,2$ Hz); 2,73 (m; 2H; CH_2 ; H-1); 3,04 (m; 2H; CH_2 ; H-4); 3,41 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 7,2$ Hz); 3,90 (s; 3H; OCH_3); 7,24 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-6; H-8); 7,84 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 22,8; 23,1 (C-2; C-3); 24,7 (C-1); 26,7; 26,9 (C-3'; C-4'); 31,8 (C-2'); 33,4 (C-5'); 33,7 (C-4); 42,0 (C-6'); 49,1 (C-1'); 55,5 (OCH_3); 101,7 (C-8); 117,2 (C-9a); 120,3 (C-6); 121,2 (C-8a); 130,1 (C-5); 143,2 (C-10a); 150,0 (C-9); 155,9 (C-7); 156,1 (C-4a)

ESI-MS: m/z 328,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}]^+$ 328,2)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)heptan-1,7-diamin (8)**



Vzhled: žlutý olej

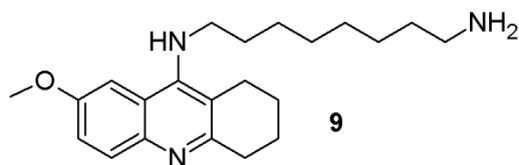
Výtěžek: 91 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,32 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-3'; H-4'; H-5'); 1,42 (m; 2H; CH_2 ; H-6'); 1,66 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,91 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 2,67 (t; 2H; CH_2 ; H-7'; $J = 7,2$ Hz); 2,73 (m; 2H; CH_2 ; H-1); 3,04 (m; 2H; CH_2 ; H-4); 3,40 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 7,2$ Hz); 3,91 (s; 3H; OCH_3); 7,25 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-6; H-8); 7,84 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 22,8; 23,1 (C-2; C-3); 24,7 (C-1); 26,8; 27,0; 29,3 (C-3'; C-4'; C-5'); 31,7 (C-2'); 33,4 (C-6'); 33,7 (C-4); 42,0 (C-7'); 49,2 (C-1'); 55,5 (OCH_3); 101,7 (C-8); 117,2 (C-9a); 120,3 (C-6); 121,2 (C-8a); 130,1 (C-5); 143,2 (C-10a); 150,0 (C-9); 155,9 (C-7); 156,1 (C-4a)

ESI-MS: m/z 342,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}]^+$ 342,3)

***N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)oktan-1,8-diamin (9)**



Vzhled: žlutý olej

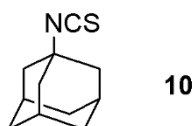
Výtěžek: 84 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1,35 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-3'; H-4'; H-5'); 1,51 (m; 2H; CH_2 ; H-6'); 1,73 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,91 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 2,50 (m; 2H; CH_2 ; H-7'); 2,62 (t; 2H; CH_2 ; H-8'; $J = 7,0$ Hz); 2,73 (m; 2H; CH_2 ; H-1); 3,04 (m; 2H; CH_2 ; H-4); 3,42 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 7,2$ Hz); 3,89 (s; 3H; OCH_3); 7,27 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-6; H-8); 7,80 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 22,9; 23,4 (C-2; C-3); 24,7 (C-1); 26,9; 27,0; 29,4 (C-3'; C-4'; C-5'); 31,5 (C-2'); 33,6 (C-6'); 33,8 (C-4); 42,0 (C-7'); 43,2 (C-8'); 49,2 (C-1'); 55,9 (OCH_3); 101,6 (C-8); 116,9 (C-9a); 120,1 (C-6); 121,2 (C-8a); 130,5 (C-5); 141,0 (C-10a); 150,8 (C-9); 155,9 (C-7); 156,0 (C-4a)

ESI-MS: m/z 356,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}]^+$ 356,3)

Syntéza 1-isothiokyanatoadamantanu (10)



Adamantylamin (1 g; 6,61 mmol) byl rozpuštěn v acetonu (50 ml) a do reakční směsi byl přidán postupně sirouhlík (3,97 ml; 66,1 mmol), triethylamin (TEA; 0,29 ml; 6,61 mmol) a di-*tert*-butyl-dikarbonát (Boc_2O ; 1,44 g; 6,61 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod dusíkem po dobu 15 hodin. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo vakuově oddestilováno za vzniku žlutého prášku s výtěžkem 95 % (1,21 g). NMR, IČ spektra a teplota tání byly v souladu s literaturou.⁹¹

Syntéza 1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]alkyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinátů (11–17)

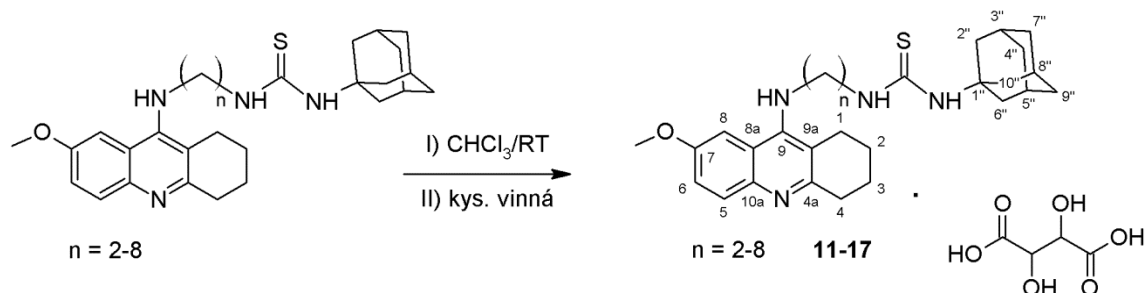
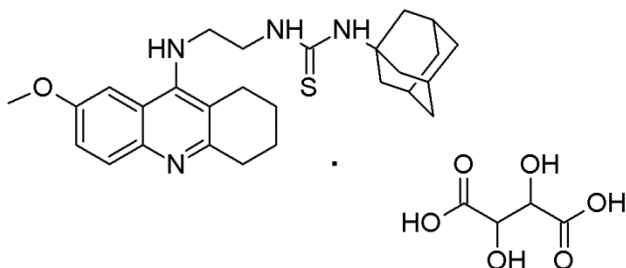


Schéma 3. Převedení 7-MEOTA-amantadinových derivátů na dihydroxysukcináty

1-isothiokyanatoadamantan (**10**) (10 mmol) a příslušný *N*-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)alkan-1, ω -diamin (**3–9**) (12 mmol) byly rozpuštěny CHCl_3 a míchány za laboratorní teploty po dobu 24 h. Reakční směs byla zbavena chloroformu destilací za sníženého tlaku a následně přečištěna sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fáze se použila směs CHCl_3 -MeOH v poměru 9:1. Výsledná báze byla následně rozpuštěna v 10 ml absolutního ethanolu a přidalo se ekvimolární množství kyseliny vinné. Směs byla míchána 24 h. za laboratorní teploty. Výsledný produkt měl konzistenci bíložlutého prášku.

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]ethyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (11)



11

Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 90,1–93,2 °C

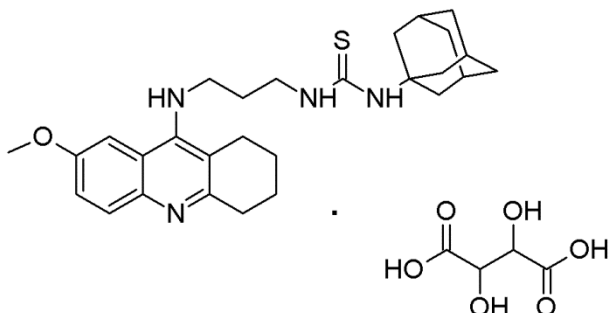
Výtěžek: 81,2 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,53 (m; 6H; 3 \times CH $_2$; H-4''; H-7''; H-9''); 1,79 (m; 4H; 2 \times CH $_2$; H-2; H-3); 1,97 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 2,05 (m; 6H; 3 \times CH $_2$; H-2''; H-6''; H-10''); 2,76 (t; 2H; CH $_2$; H-1; $J = 5,7$ Hz); 2,95 (t; 2H; CH $_2$; H-4; $J = 6,0$ Hz); 3,73 (m; 2H; CH $_2$; H-2''); 3,84 (m; 2H; CH $_2$; H-1''); 3,91 (s; 3H; OCH $_3$); 4,09 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 7,01 (bs; 1H; NH); 7,22 (bs; 1H; NH); 7,42 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,4$ Hz); 7,63 (m; 1H; CH; H-8); 7,78 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 21,1; 22,2 (C-2; C-3); 25,3 (C-1); 29,2 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,5 (C-4); 36,1 (C-4''; C-7''; C-9''); 41,2 (C-2''; C-6''; C-10''); 43,2 (C-2'); 47,6 (C-1'); 52,9 (C-1''); 56,0 (OCH $_3$); 72,0 (C-2'''; C-3'''); 103,2 (C-8); 113,3 (C-9a); 118,7 (C-8a); 123,0 (C-6); 123,6 (C-5); 135,5 (C-10a); 151,6 (C-4a); 153,9 (C-9); 156,4 (C-7); 174,1 (C-1'''; C-4'''); 181,1 (C=S)

ESI-MS: m/z 465,2 [M] $^+$ (vypočítáno pro: [C $_{27}$ H $_{37}$ N $_4$ OS] $^+$ 465,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]propyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (12)



Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 95,2–97,8 °C

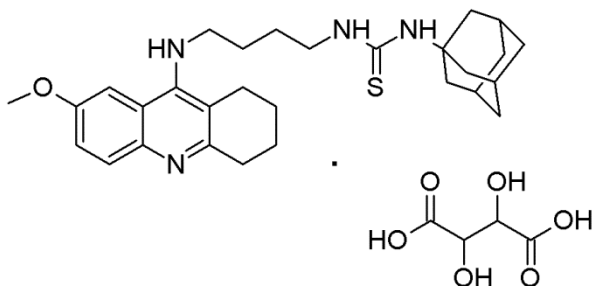
Výtěžek: 41,0 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,58 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-4''; H-7''; H-9''); 1,82 (m; 6H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3; H-2'); 1,99 (m; 3H; $3 \times \text{CH}$; H-3''; H-5''; H-8''); 2,07 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-2''; H-6''; H-10''); 2,73 (m; 2H; CH_2 ; H-1); 2,95 (t; 2H; CH_2 ; H-4; $J = 5,7$ Hz); 3,44 (m; 2H; CH_2 ; H-3'); 3,68 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 6,3$ Hz); 3,90 (s; 3H; OCH_3); 4,07 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-2'''; H-3'''); 7,00 (bs; 1H; NH); 7,47 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,4$ Hz); 7,59 (m; 1H; CH; H-8); 7,77 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 21,2; 22,2 (C-2; C-3); 25,1 (C-1); 29,2 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,7 (C-4); 30,7 (C-3'); 36,1 (C-4''; C-7''; C-9''); 40,2 (C-2''; C-6''; C-10''); 41,3 (C-2'); 44,7 (C-1'); 52,8 (C-1''); 56,0 (OCH_3); 71,9 (C-2'''; C-3'''); 103,0 (C-8); 113,3 (C-9a); 118,7 (C-8a); 122,9 (C-6); 123,9 (C-5); 135,9 (C-10a); 151,7 (C-4a); 153,4 (C-9); 156,4 (C-7); 174,0 (C-1'''; C-4'''); 180,8 (C=S)

ESI-MS: m/z 479,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{OS}]^+$ 479,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]butyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (13)



13

Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 80,3–84,2 °C

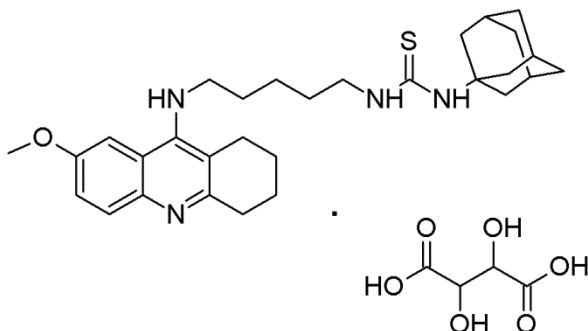
Výtěžek: 69,2 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,45 (m; 2H; CH_2 ; H-3'); 1,58 (m; 8H; $4 \times \text{CH}_2$; H-2'; H-4''; H-7''; H-9''); 1,80 (m; 4H; $2 \times \text{CH}_2$; H-2; H-3); 1,98 (m; 3H; $3 \times \text{CH}$; H-3''; H-5''; H-8''); 2,08 (m; 6H; $3 \times \text{CH}_2$; H-2''; H-6''; H-10''); 2,71 (t; 2H; CH_2 ; H-1; $J = 5,8$ Hz); 2,94 (t; 2H; CH_2 ; H-4; $J = 5,8$ Hz); 3,33 (m; 2H; CH_2 ; H-4'); 3,62 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 6,9$ Hz); 3,89 (s; 3H; OCH_3); 4,02 (m; 2H; $2 \times \text{CH}$; H-2'''; H-3'''); 6,72 (bs; 1H; NH); 6,91 (bs; 1H; NH); 7,38 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,4$ Hz); 7,56 (m; 1H; CH; H-8); 7,76 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 21,4; 22,3 (C-2; C-3); 25,0 (C-1); 26,3 (C-4'); 28,2 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,2 (C-4); 30,0 (C-3'); 36,1 (C-4''; C-7''; C-9''); 41,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 42,7 (C-2'); 47,0 (C-1'); 52,7 (C-1''); 55,9 (OCH_3); 71,8 (C-2'''; C-3'''); 102,9 (C-8); 113,7 (C-9a); 118,9 (C-8a); 122,5 (C-6); 124,6 (C-5); 136,7 (C-10a); 152,1 (C-4a); 153,0 (C-9); 156,2 (C-7); 174,2 (C-1'''; C-4'''); 180,8 (C=S)

ESI-MS: m/z 493,2 [M] $^+$ (vypočítáno pro: [$\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{OS}$] $^+$ 493,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]pentyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (14)



14

Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 79,5–82,1 °C

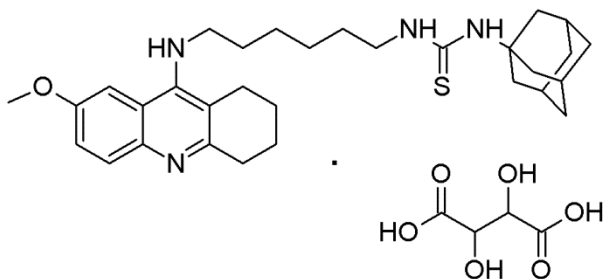
Výtěžek: 54,1 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,33 (m; 2H; CH_2 ; H-4'); 1,43 (m; 2H; CH_2 ; H-2'); 1,58 (m; 8H; 4 \times CH_2 ; H-3'; H-4''; H-7''; H-9''); 1,80 (m; 4H; 2 \times CH_2 ; H-2; H-3); 1,98 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 2,09 (m; 6H; 3 \times CH_2 ; H-2''; H-6''; H-10''); 2,70 (t; 2H; CH_2 ; H-1; $J = 5,4$ Hz); 2,93 (t; 2H; CH_2 ; H-4; $J = 5,7$ Hz); 3,29 (m; 2H; CH_2 ; H-5'); 3,59 (t; 2H; CH_2 ; H-1'; $J = 7,0$ Hz); 3,88 (s; 3H; OCH_3); 4,00 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 6,63 (bs; 1H; NH); 6,89 (bs; 1H; NH); 7,37 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,4$ Hz); 7,55 (m; 1H; CH; H-8); 7,76 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 21,4; 22,3 (C-2; C-3); 23,9 (C-4'); 25,0 (C-1); 28,6 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,2 (C-4); 30,2 (C-3'); 30,4 (C-5'); 36,2 (C-4''; C-7'' ; C-9''); 41,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 42,9 (C-2'); 47,3 (C-1'); 52,7 (C-1''); 55,9 (OCH_3); 71,8 (C-2'''; C-3'''); 102,9 (C-8); 113,8 (C-9a); 119,0 (C-8a); 122,4 (C-6); 124,8 (C-5); 137,0 (C-10a); 152,3 (C-4a); 152,8 (C-9); 156,2 (C-7); 174,3 (C-1'''; C-4'''); 180,8 (C=S)

ESI-MS: m/z 507,2 $[\text{M}]^+$ (vypočítáno pro: $[\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{OS}]^+$ 479,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]hexyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (15)



15

Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 91,8–94,4 °C

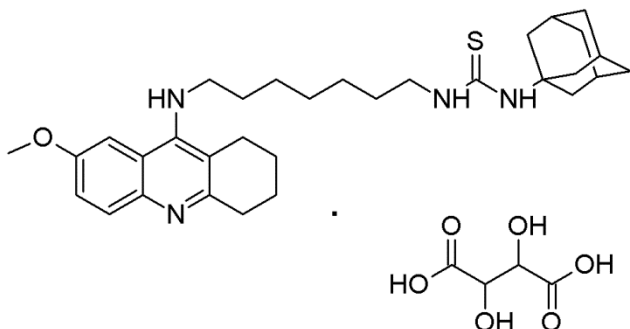
Výtěžek: 66,1 %

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1,25 (m; 4H; 2× CH₂; H-3'; H-4'); 1,38 (m; 2H; CH₂; H-2'); 1,58 (m; 8H; 4× CH₂; H-5'; H-4''; H-7''; H-9''); 1,79 (m; 4H; 2× CH₂; H-2; H-3); 1,98 (m; 3H; 3× CH; H-3''; H-5''; H-8''); 2,10 (m; 6H; 3× CH₂; H-2''; H-6''; H-10''); 2,70 (t; 2H; CH₂; H-1; *J* = 5,4 Hz); 2,93 (t; 2H; CH₂; H-4; *J* = 5,6 Hz); 3,27 (m; 2H; CH₂; H-6'); 3,56 (t; 2H; CH₂; H-1'; *J* = 7,0 Hz); 3,88 (s; 3H; OCH₃); 3,98 (m; 2H; 2× CH; H-2'''; H-3'''); 6,51 (bs; 1H; NH); 6,87 (bs; 1H; NH); 7,35 (dd; 1H; CH; H-6; *J* = 9,2; 2,4 Hz); 7,53 (m; 1H; CH; H-8); 7,74 (d; 1H; CH; H-5; *J* = 9,2 Hz)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 21,5; 22,4 (C-2; C-3); 25,1 (C-4'); 26,2 (C-1); 26,3 (C-6'); 28,8 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,2 (C-4); 30,5 (C-3'); 30,6 (C-5'); 36,2 (C-4''; C-7''; C-9''); 41,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 42,9 (C-2'); 47,3 (C-1'); 52,7 (C-1''); 55,8 (OCH₃); 71,8 (C-2'''; C-3'''); 102,8 (C-8); 114,1 (C-9a); 119,2 (C-8a); 122,1 (C-6); 125,3 (C-5); 137,5 (C-10a); 152,5 (C-4a); 152,6 (C-9); 156,1 (C-7); 174,3 (C-1''; C-4'''); 180,8 (C=S)

ESI-MS: *m/z* 521,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₃₁H₄₅N₄OS]⁺ 521,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]heptyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (16)



Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 100,1–102,9 °C

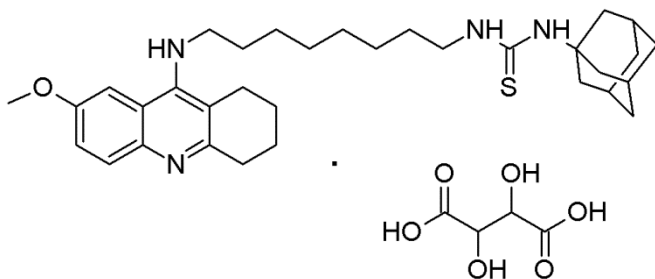
Výtěžek: 74,5 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,27 (m; 6H; 3 \times CH $_2$; H-3'; H-6'; H-7'); 1,38 (m; 2H; CH $_2$; H-4'); 1,58 (m; 8H; 4 \times CH $_2$; H-5'; H-4''; H-7''; H-9''); 1,80 (m; 4H; 2 \times CH $_2$; H-2; H-3); 1,98 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 2,10 (m; 6H; 3 \times CH $_2$; H-2''; H-6''; H-10''); 2,69 (t; 2H; CH $_2$; H-1; $J = 5,6$ Hz); 2,94 (t; 2H; CH $_2$; H-4; $J = 5,7$ Hz); 3,23 (m; 2H; CH $_2$; H-7'); 3,58 (t; 2H; CH $_2$; H-1'; $J = 7,0$ Hz); 3,88 (s; 3H; OCH $_3$); 3,98 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 6,52 (bs; 1H; NH); 6,88 (bs; 1H; NH); 7,35 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,5$ Hz); 7,54 (m; 1H; CH; H-8); 7,74 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 21,8; 22,7 (C-2; C-3); 25,4 (C-4'); 26,7 (C-1); 26,8 (C-6'); 29,0 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,1 (C-4); 29,5 (C-7'); 30,8 (C-3'); 30,9 (C-5'); 36,4 (C-4''; C-7''; C-9''); 41,7 (C-2''; C-6''; C-10''); 43,3 (C-2'); 47,6 (C-1'); 53,0 (C-1''); 56,1 (OCH $_3$); 72,0 (C-2'''; C-3'''); 103,1 (C-8); 114,3 (C-9a); 119,5 (C-8a); 122,5 (C-6); 125,6 (C-5); 137,8 (C-10a); 152,8 (C-4a); 152,9 (C-9); 156,4 (C-7); 174,6 (C-1'''; C-4'''); 181,1 (C=S)

ESI-MS: m/z 535,2 [M] $^+$ (vypočítáno pro: [C $_{32}$ H $_{47}$ N $_4$ OS] $^+$ 535,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]oktyl}thiomočovina-2,3-dihydroxysukcinát (17)



17

Vzhled: bíložlutý prášek

Teplota tání: 75,1–77,8 °C

Výtěžek: 84,0 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1,24 (m; 8H; 4 \times CH $_2$; H-2'; H-3'; H-4'; H-6'); 1,40 (m; 2H; CH $_2$; H-7'); 1,62 (m; 8H; 4 \times CH $_2$; H-5'; H-4''; H-7''; H-9''); 1,82 (m; 4H; 2 \times CH $_2$; H-2; H-3); 2,00 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 2,13 (m; 6H; 3 \times CH $_2$; H-2''; H-6''; H-10''); 2,71 (m; 2H; CH $_2$; H-1); 2,97 (m; 2H; CH $_2$; H-4); 3,28 (m; 2H; CH $_2$; H-8'); 3,68 (m; 2H; CH $_2$; H-1'); 3,90 (s; 3H; OCH $_3$); 4,07 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 6,91 (bs; 1H; NH); 7,43 (dd; 1H; CH; H-6; J = 9,2; 2,4 Hz); 7,61 (m; 1H; CH; H-8); 7,79 (d; 1H; CH; H-5; J = 9,2 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): 21,2; 22,2 (C-2; C-3); 25,0 (C-1); 26,3; 26,5 (C-4'; C-5'); 28,8 (C-3'; C-6'; C-7'); 29,2 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,6 (C-4); 30,6 (C-2'); 36,2 (C-4''; C-7''; C-9''); 41,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 43,0 (C-8'); 47,2 (C-1'); 52,7 (C-1''); 55,9 (OCH $_3$); 71,9 (C-2'''; C-3'''); 103,2 (C-8); 113,1 (C-9a); 118,5 (C-8a); 122,9 (C-6); 123,8 (C-5); 135,5 (C-10a); 151,6 (C-4a); 153,5 (C-9); 156,3 (C-7); 174,0 (C-1'''; C-4'''); 180,8 (C=S)

ESI-MS: m/z 549,3 [M] $^+$ (vypočítáno pro: [C $_{33}$ H $_{49}$ N $_4$ OS] $^+$ 549,4)

Syntéza 1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]alkyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinátů (18-24)

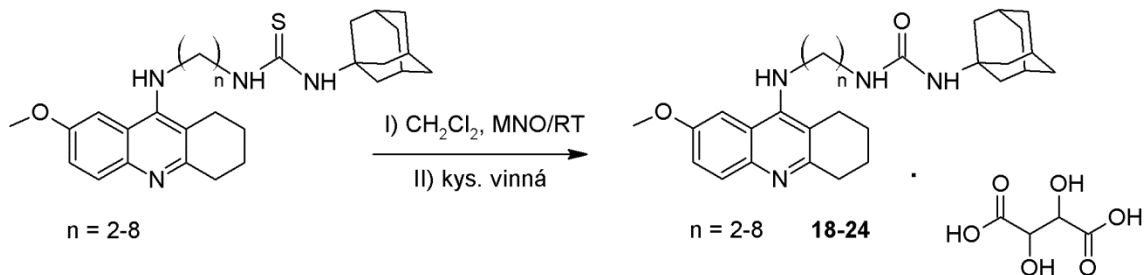
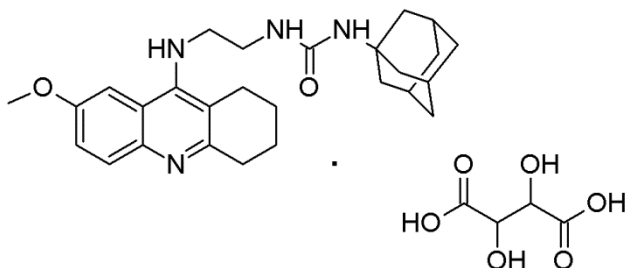


Schéma 4. Konverze 2,3-dihydroxysukcinátů thiomčovín na 2,3-dihydroxysukcináty močovín

7-MEOTA-amantadinové močoviny (18–24) byly připraveny z odpovídajících thiomčovínových derivátů (11–17; 10 mmol) rozpuštěním v dichlormethanu (5 ml) a přidáním 2,4,6-trimethylbenzonitril-*N*-oxidu (MNO; 11 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 h. Po dokončení reakce byl za sníženého tlaku oddestilován dichlormethan. Následně byl produkt čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHCl_3 -MeOH v poměru 9:1. Výsledná báze se po rozpuštění v absolutním ethanolu (10 ml) a přidání ekvimolárního množství kyseliny vinné míchala 24 hodin při laboratorní teplotě.

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]ethyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (18)



Vzhled: bílý prášek

Teplota tání: 60,4–63,3 °C

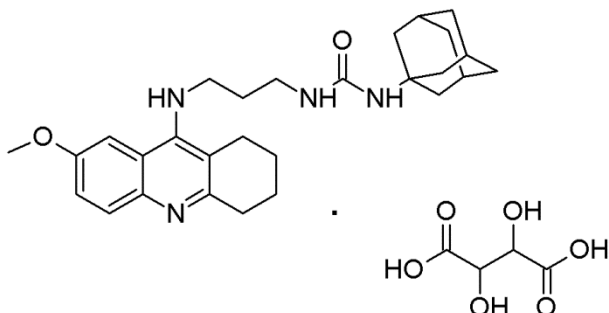
Výtěžek: 70,8 %

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,76 (m; 1H; CH; H-5); 7,72 (m; 1H; CH; H-8); 7,45 (m; 1H; CH; H-6); 4,07 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,94 (s; 3H; OCH₃); 3,81 (m; 2H; CH₂; H-1'); 2,95 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,77 (m; 2H; CH₂; H-1); 2,49 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2''; H-6''; H-10''); 1,97 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,82 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2; H-3; H-2'); 1,58 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9'')

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 173,9 (C-1'''; C-4'''); 158,8 (C=O); 156,4 (C-7); 154,4 (C-9); 151,0 (C-4a); 134,2 (C-10a); 123,3 (C-6); 122,8 (C-5); 118,0 (C-9a); 111,9 (C-8a); 103,4 (C-8); 71,8 (C-2'''; C-3'''); 55,9 (OCH₃); 50,3 (C-1'); 42,1 (C-2'); 40,2 (C-2''; C-6''; C-10''); 36,2 (C-4''; C-7''; C-9''); 29,1 (C-4); 28,3 (C-3''; C-5''; C-8''); 24,9 (C-1); 22,2; 21,0 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 448,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₂₇H₃₇N₄O₂]⁺ 448,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]propyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (19)



19

Vzhled: žlutý prášek

Teplota tání: 72,5–78,1 °C

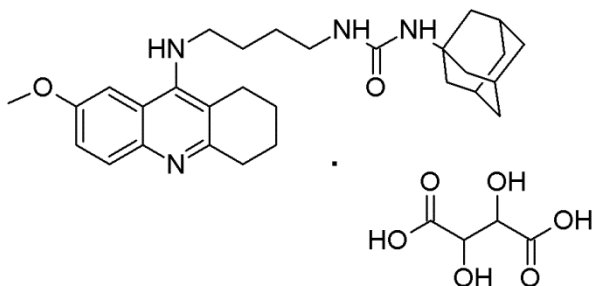
Výtěžek: 90,1 %

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,81 (d; 1H; CH; H-5; J = 8,1 Hz); 7,66 (m; 1H; CH; H-8); 7,45 (d; 1H; CH; H-6); 4,11 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,92 (s; 3H; OCH₃); 3,69 (m; 2H; CH₂; H-1'); 3,06 (m; 2H; CH₂; H-3'); 3,00 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,74 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,96 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2''; H-6''; H-10''); 1,82 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2; H-3; H-2'); 1,70 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,58 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9'')

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 174,0 (C-1'''; C-4'''); 158,1 (C=O); 156,5 (C-7); 154,1 (C-9); 151,0 (C-4a); 134,6 (C-10a); 123,4 (C-6); 122,8 (C-5); 118,2 (C-9a); 112,2 (C-8a); 103,0 (C-8); 72,0 (C-2'''; C-3'''); 55,9 (OCH₃); 44,3 (C-1'); 42,1 (C-2'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 35,6 (C-3'); 32,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 29,1 (C-2''; C-6''; C-10''); 29,0 (C-4); 25,0 (C-1); 22,2; 20,9 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 462,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₂₈H₃₉N₄O₂]⁺ 462,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]butyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (20)



Vzhled: bílý prášek

Teplota tání: 80,5–83,3 °C

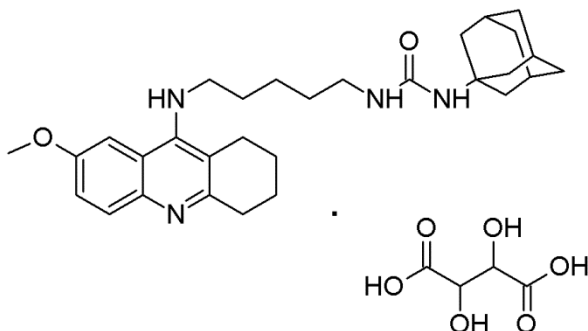
Výtěžek: 67,0 %

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,79 (d; 1H; CH; H-5; J = 8,5 Hz); 7,59 (m; 1H; CH; H-8); 7,45 (m; 1H; CH; H-6); 4,03 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,89 (s; 3H; OCH₃); 3,63 (m; 2H; CH₂; H-1'); 2,95 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,93 (m; 2H; CH₂; H-4'); 2,70 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,95 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,80 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-2; H-3; H-2'; H-3'); 1,57 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2''; H-6''; H-10''); 1,37 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9'')

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 174,3 (C-1'''; C-4'''); 157,3 (C = O); 156,3 (C-7); 153,2 (C-9); 151,8 (C-4a); 136,2 (C-10a); 124,1 (C-6); 122,7 (C-5); 118,7 (C-9a); 113,3 (C-8a); 103,0 (C-8); 71,9 (C-2'''; C-3'''); 55,9 (OCH₃); 49,5 (C-1'); 47,0 (C-2'; C-3'); 38,6 (C-4'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 29,8 (C-4); 29,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 27,6 (C-2''; C-6''; C-10''); 25,0 (C-1); 22,3; 21,3 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 476,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₂₉H₄₁N₄O₂]⁺ 476,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]pentyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (21)



21

Vzhled: bílý prášek

Teplota tání: 83,8–86,2 °C

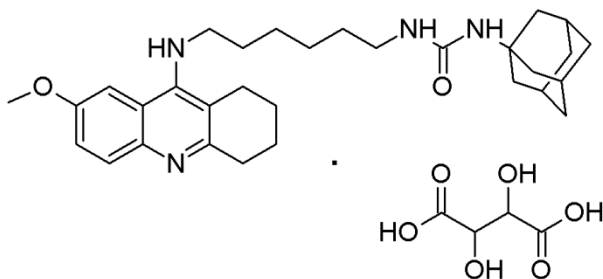
Výtěžek: 87,9 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7,79 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,2$ Hz); 7,60 (m; 1H; CH; H-8); 7,43 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,2; 2,1$ Hz); 4,08 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,89 (s; 3H; OCH₃); 3,67 (m; 2H; CH₂; H-1'); 2,96 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,89 (m; 2H; CH₂; H-5'); 2,70 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,95 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,80 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-2; H-3; H-3' H-4'); 1,65 (m; 2H; CH₂; H-2'); 1,56 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9''); 1,30 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-2''; H-6''; H-10'')

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 174,0 (C-1'''; C-4'''); 157,3 (C=O); 156,4 (C-7); 153,8 (C-9); 151,3 (C-4a); 135,2 (C-10a); 123,3 (C-6); 123,1 (C-5); 118,3 (C-9a); 112,7 (C-8a); 103,3 (C-8); 71,9 (C-2'''; C-3'''); 56,0 (OCH₃); 47,2 (C-1'); 42,2 (C-3'; C-4'); 38,8 (C-5'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 30,3 (C-2'); 29,3 (C-4); 29,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 24,9 (C-1); 23,8 (C-2''; C-6''; C-10''); 22,1; 21,0 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 490,2 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₃₀H₄₃N₄O₂]⁺ 490,3)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]hexyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (22)



22

Vzhled: žlutý prášek

Teplota tání: 84,0–86,8 °C

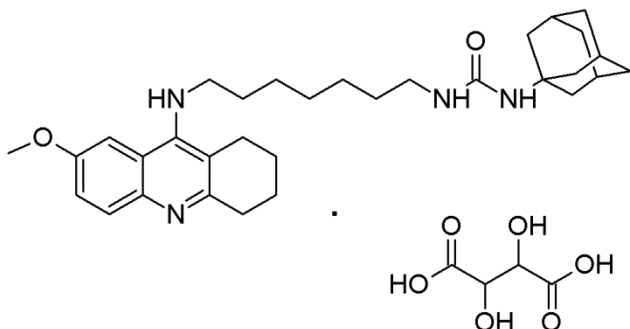
Výtěžek: 67,0 %

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7,80 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,1$ Hz); 7,60 (m; 1H; CH; H-8); 7,42 (dd; 1H; CH; H-6; $J = 9,1; 2,2$ Hz); 4,07 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,89 (s; 3H; OCH₃); 3,66 (t; 2H; CH₂; H-1'; $J = 6,1$ Hz); 2,96 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,87 (m; 2H; CH₂; H-6'); 2,70 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,95 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5'' H-8''); 1,81 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-2; H-3; H-4'; H-5'); 1,63 (m; 2H; CH₂; H-2'); 1,56 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9''); 1,31 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-3'; H-2''; H-6''; H-10'')

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 174,0 (C-1'''; C-4'''); 157,3 (C=O); 156,4 (C-7); 153,7 (C-9); 151,4 (C-4a); 135,4 (C-10a); 123,5 (C-6); 123,0 (C-5); 118,4 (C-9a); 112,8 (C-8a); 103,2 (C-8); 71,9 (C-2'''; C-3'''); 55,9 (OCH₃); 47,0 (C-1'); 42,2 (C-4'; C-5'); 38,7 (C-6'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 30,6 (C-2'); 30,2 (C-3'); 29,4 (C-4); 29,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 26,1 (C-2''; C-6''; C-10''); 25,0 (C-1); 22,2; 21,1 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 504,3 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₃₁H₄₅N₄O₂]⁺ 504,4)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]heptyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (23)



Vzhled: oranžový prášek

Teplota tání: 65,2–68,2 °C

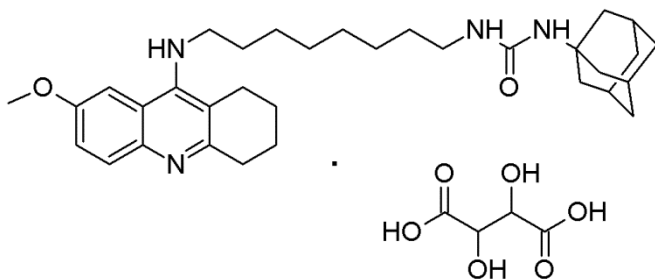
Výtěžek: 81,5 %

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7,80 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,1$ Hz); 7,62 (m; 1H; CH; H-8); 7,44 (m; 1H; CH; H-6); 4,10 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,89 (s; 3H; OCH₃); 3,68 (t; 2H; CH₂; H-1'; $J = 6,5$ Hz); 2,96 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,86 (m; 2H; CH₂; H-7'); 2,69 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,95 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,81 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-2; H-3; H-5' H-6'); 1,65 (m; 2H; CH₂; H-2'); 1,56 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9''); 1,23 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-3'; H-2''; H-6''; H-10'')

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 173,9 (C-1'''; C-4'''); 157,3 (C=O); 156,4 (C-7); 153,9 (C-9); 151,1 (C-4a); 135,0 (C-10a); 123,2 (C-6); 123,1 (C-5); 118,2 (C-9a); 112,6 (C-8a); 103,3 (C-8); 72,0 (C-2'''; C-3'''); 56,0 (OCH₃); 47,1 (C-1'); 42,2 (C-5'; C-6'); 38,9 (C-7'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 30,5 (C-2'); 30,1 (C-3'); 29,4 (C-4); 29,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 28,6 (C-4'); 26,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 24,9 (C-1); 22,1; 21,0 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 518,4 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₃₂H₄₇N₄O₂]⁺ 518,5)

1-(adamantan-1-yl)-3-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]oktyl}močovina-2,3-dihydroxysukcinát (24)



Vzhled: žlutohnědý prášek

Teplota tání: 57,3–60,0 °C

Výtěžek: 60,1 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 7,81 (d; 1H; CH; H-5; $J = 9,1$ Hz); 7,61 (m; 1H; CH; H-8); 7,44 (m; 1H; CH; H-6); 4,10 (m; 2H; 2 \times CH; H-2'''; H-3'''); 3,89 (s; 3H; OCH₃); 3,68 (t; 2H; CH₂; H-1' $J = 6,8$ Hz); 2,96 (m; 2H; CH₂; H-4); 2,86 (m; 2H; CH₂; H-8'); 2,69 (m; 2H; CH₂; H-1); 1,95 (m; 3H; 3 \times CH; H-3''; H-5''; H-8''); 1,81 (m; 8H; 4 \times CH₂; H-2; H-3; H-6'; H-7'); 1,65 (m; 2H; CH₂; H-2'); 1,56 (m; 6H; 3 \times CH₂; H-4''; H-7''; H-9''); 1,23 (m; 10H; 5 \times CH₂; H-3'; H-4'; H-2''; H-6''; H-10'')

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6) δ 174,0 (C-1'''; C-4'''); 157,3 (C=O); 156,4 (C-7); 153,9 (C-9); 151,2 (C-4a); 135,0 (C-10a); 123,2 (C-6); 123,1 (C-5); 118,2 (C-9a); 112,6 (C-8a); 103,3 (C-8); 72,0 (C-2'''; C-3'''); 56,0 (OCH₃); 47,1 (C-1'); 42,2 (C-6'; C-7'); 38,9 (C-8'); 36,3 (C-4''; C-7''; C-9''); 30,5 (C-2'); 30,2 (C-3'); 29,4 (C-4); 29,1 (C-3''; C-5''; C-8''); 28,8 (C-4'); 26,4 (C-2''; C-6''; C-10''); 24,9 (C-1); 22,1; 21,0 (C-2; C-3)

ESI-MS: m/z 532,4 [M]⁺ (vypočítáno pro: [C₃₃H₄₉N₄O₂]⁺ 532,5)

3.3 Biologické hodnocení

3.3.1 Ellmanova metoda

Inhibiční účinnost nových derivátů byla stanovena *in vitro* spektrofotometrickou metodou dle Ellmana pro lidskou rekombinantní AChE a lidskou plazmatickou BChE. Princip metody (Schéma 5) je založen na hydrolýze acetylthiocholinu/butyrylthiocholinu cholinesterasami za vzniku thiocholinu a příslušné kyseliny. Thiocholin pak reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) a dochází k uvolnění žlutě zbarveného chromoforu, 5-thio-2-nitrobenzoového aniontu, který je spektrofotometricky detekován.⁹²

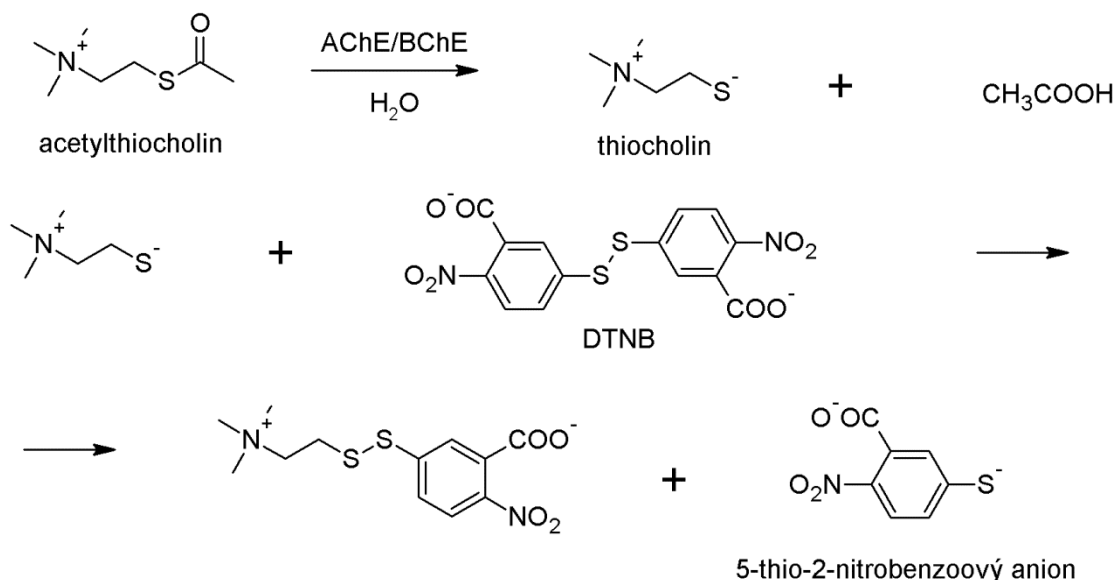


Schéma 5. Ellmanova metoda

3.3.2 Postup

Pro měření cholinesterasové aktivity byl použit multikanálový spektrofotometr Sunrise (Tecan, Salzburg, Rakousko) a 96 jamkové fotometrické mikroděstičky vyrobené z tvrzeného polystyrenu (Nunc Rockilde, Dánsko). Cholinesterasy byly suspendovány ve fosfátovém pufru (pH 7,4) na konečnou aktivitu 0,002 U/ μ l. Tento roztok cholinesterasy (5 μ l), roztok 0,4 mg/ml DTNB (40 μ l), 1 mM acetylthiocholin-chloridu ve fosfátovém pufru (20 μ l) byl smíchán v jamce s příslušným množstvím inhibitoru (1 mM–0,1 nM; 5 μ l).

Absorbance byla měřena při 412 nm po 5 minutové inkubaci a automatickém třepání mikrodestičky. Z naměřených dat byla vypočítána procentuální inhibice (I) dle následujícího vzorce:

$$I = 1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0}$$

ΔA_i změna absorbance vyvolaná ChE vystavenou působení inhibitoru

ΔA_0 změna absorbance vyvolaná ChE, kde místo inhibitoru byl použit fosfátový pufr

Hodnoty IC_{50} se stanovily za použití programu Prism GrapPad 6. (La Jolla, CA, USA). Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ze tří nezávislých měření.

Výsledky měření inhibice Ellmanovou metodou

Meziprodukty **3–9** byly testovány jako dihydrochloridy. IC₅₀ odpovídá koncentraci inhibitoru *in vitro* potřebné ke snížení aktivity *hAChE/hBChE* na 50 % její počáteční hodnoty. Data uvedená v tabulce jsou průměrem třech hodnot měření IC₅₀ se standartní odchylkou. Index selektivity (SI) k *hAChE* byl vypočítán z poměru IC₅₀ *hBChE*/IC₅₀ *hAChE*.

Tabulka 1. IC₅₀ hodnoty standardů, aminů a amantadinových derivátů

inhibitor	Délka spoj. řetězce	IC ₅₀ (μM)		SI
		<i>hAChE</i>	<i>hBChE</i>	
THA	/	0,5 ± 0,1	0,023 ± 0,003	0,05
7-MEOTA	/	10,50 ± 2,40	21,0 ± 3,4	2,0
amantadin	/	16,05 ± 3,13	102,60 ± 17,13	6,4
3	2	5,32 ± 1,04	64,45 ± 10,76	12,1
4	3	1,93 ± 0,38	49,77 ± 8,31	25,8
5	4	1,42 ± 0,28	9,22 ± 1,54	6,5
6	5	3,44 ± 0,67	29,63 ± 4,95	8,6
7	6	0,21 ± 0,04	10,84 ± 1,81	51,6
8	7	0,86 ± 0,17	7,26 ± 1,21	8,4
9	8	0,47 ± 0,09	10,08 ± 1,68	21,4
10	/	24,96 ± 4,87	96,90 ± 16,18	3,9
11	2	5,02 ± 0,98	6,02 ± 1,01	1,2
12	3	0,53 ± 0,10	1,39 ± 0,23	2,6
13	4	2,04 ± 0,39	0,98 ± 0,16	0,5
14	5	0,47 ± 0,09	0,11 ± 0,02	0,2
15	6	2,09 ± 0,40	0,33 ± 0,05	0,2
16	7	3,47 ± 0,67	0,15 ± 0,02	0,04
17	8	1,62 ± 0,31	0,26 ± 0,04	0,2
18	2	4,98 ± 0,97	2,82 ± 0,47	0,6
19	3	0,52 ± 0,10	2,18 ± 0,36	4,2
20	4	1,94 ± 0,38	1,79 ± 0,30	0,9
21	5	0,69 ± 0,13	0,22 ± 0,04	0,3
22	6	0,85 ± 0,17	1,01 ± 0,17	1,2
23	7	0,69 ± 0,14	0,44 ± 0,07	0,6
24	8	2,03 ± 0,40	18,82 ± 3,14	9,3

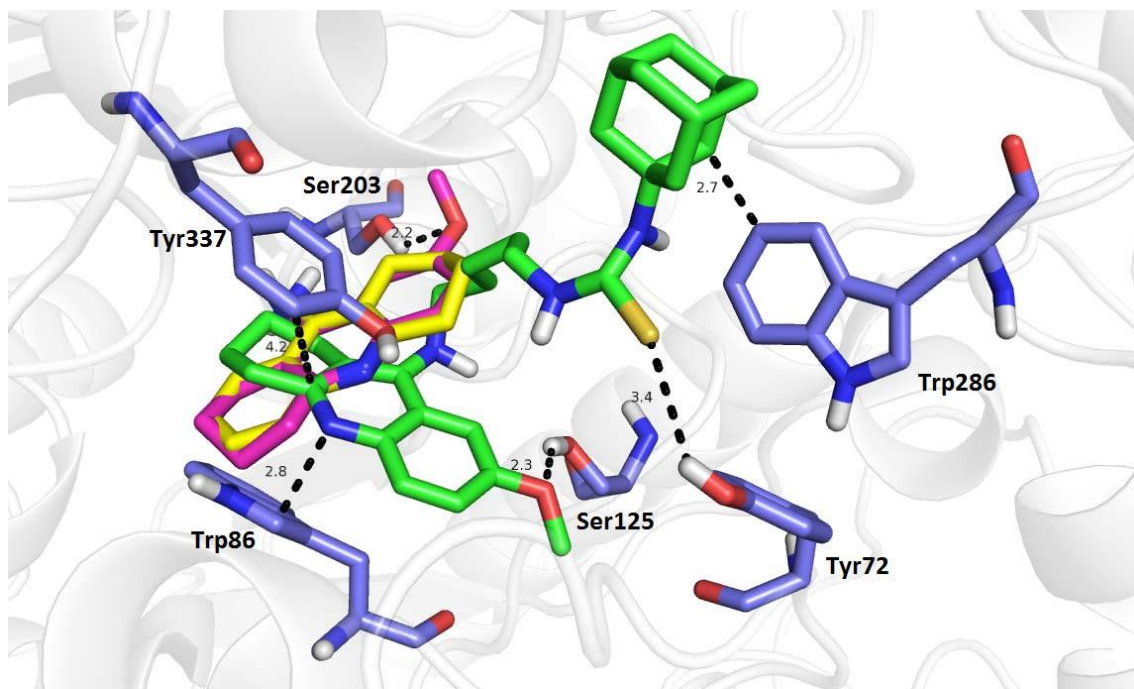
3.4 Dokovací *in silico* studie

Molekulárně modelovací studie představují jednu z klíčových metod v molekulární biologii. Je zejména používána při hledání nových potenciálních léčiv, slouží však také k racionalizaci dosažených výsledků z *in vitro* testování. Pomocí výpočetní techniky napomáhá popsat trojrozměrnou vizualizaci interakce protein-ligand. Tyto poznatky jsou velice užitečné při výzkumu a vývoji nových molekul. V dnešní době je celá řada proteinových makromolekul dostupných v rozsáhlých online databázích. Struktury těchto makromolekul se nejčastěji získávají pomocí rentgenové krystalografie. Pro následující studii byly použity *hAChE* a *hBChE* získané z Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>)

Výpočty molekulárního modelování byly provedeny prostřednictvím programu AutoDock Vina (Scripps Research Institute). Program UCSF Chimera 1.3 (Amber Force Field) byl použit k sestavení a minimalizaci modelu enzymu i ligandů. Oba enzymy (*hAChE*, PDB ID: 1B41; *hBChE*, PDB ID: 1P0I) byly získány z databáze Protein Data Bank (PDB). Sloučeniny v této studii spolu s enzymy byly připraveny v iontové formě programem AutoDock Tools 1.5.2. Oba modely byly naprotonovány a byly z nich odstraněny molekuly vody (z *hAChE* navíc i fascikulin 2). Pro *hAChE* byly nastaveny rozměry grid boxu v ose $x = 66$, $y = 66$, $z = 66$ se vzdáleností 0,253 Å, pro *hBChE* $x = 46$, $y = 60$, $z = 46$ a vzdálenost nastavena na 0,375 Å. Tyto grid boxy pak byly umístěny do modelu *hAChE* (v souřadnicích $x = 119,775$; $y = 117,597$; $z = -128,964$) a *hBChE* (v souřadnicích $x = 137,871$; $y = 115,156$; $z = 38,652$). V *hAChE* byla dále v programu AutoDock Tools 1.5.2 nastavena jako flexibilní aminokyselinová rezidua Trp86, Tyr72, Trp 286, Asp74, Tyr341 a Phe297 a pro *hBChE* rezidua Glu325, His438, Trp82, Asp70 a Tyr332. Vizualizace byla zpracována v programu Pymol 1.1. Nepolární vodíky byly pro lepší přehlednost odstraněny.

Na základě předchozích výsledků hodnot IC_{50} byl pro dokovací studii vybrán inhibitor **14**. Jako referenční inhibitory se použily THA a 7-MEOTA.

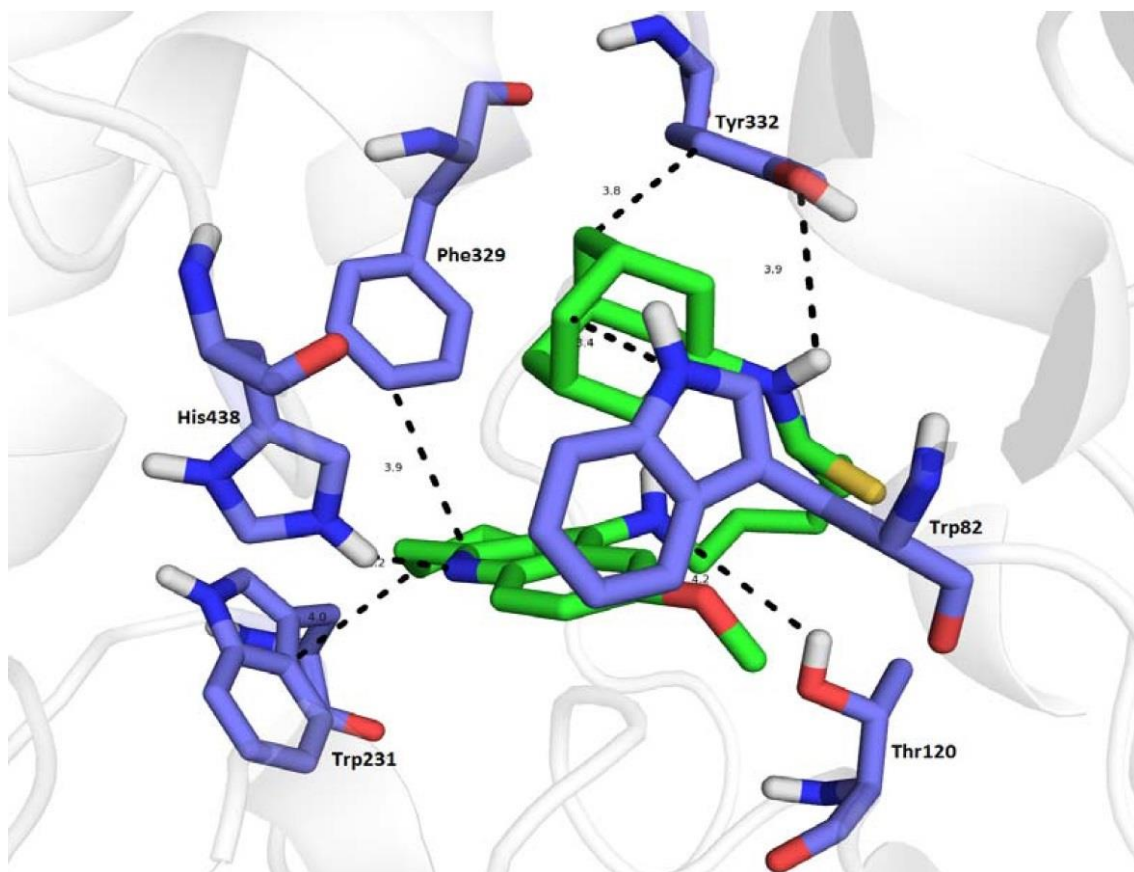
Na obrázku 17 je znázorněno předpokládané umístění inhibitorů v aktivním místě *hAChE*. Orientace 7-MEOTA v aktivní části *hAChE* je velice podobná THA. Jeho skelet je však oproti takrinu otočen o 180°, umístění aminoskupiny zůstalo zachováno. Zdá se, že 7-MEOTA tvoří vodíkovou vazbu se Ser203 (vzdálený 2,2 Å) a dále Gly122 (vzdálený 2,4 Å) pomocí své methoxyskupiny.



Obrázek 17. Model *hAChE*, interagující aminokyselinové zbytky s ligandem 14 (modrá), THA (žlutá), 7-MEOTA (fialová) a inhibitor 14 (zelená)

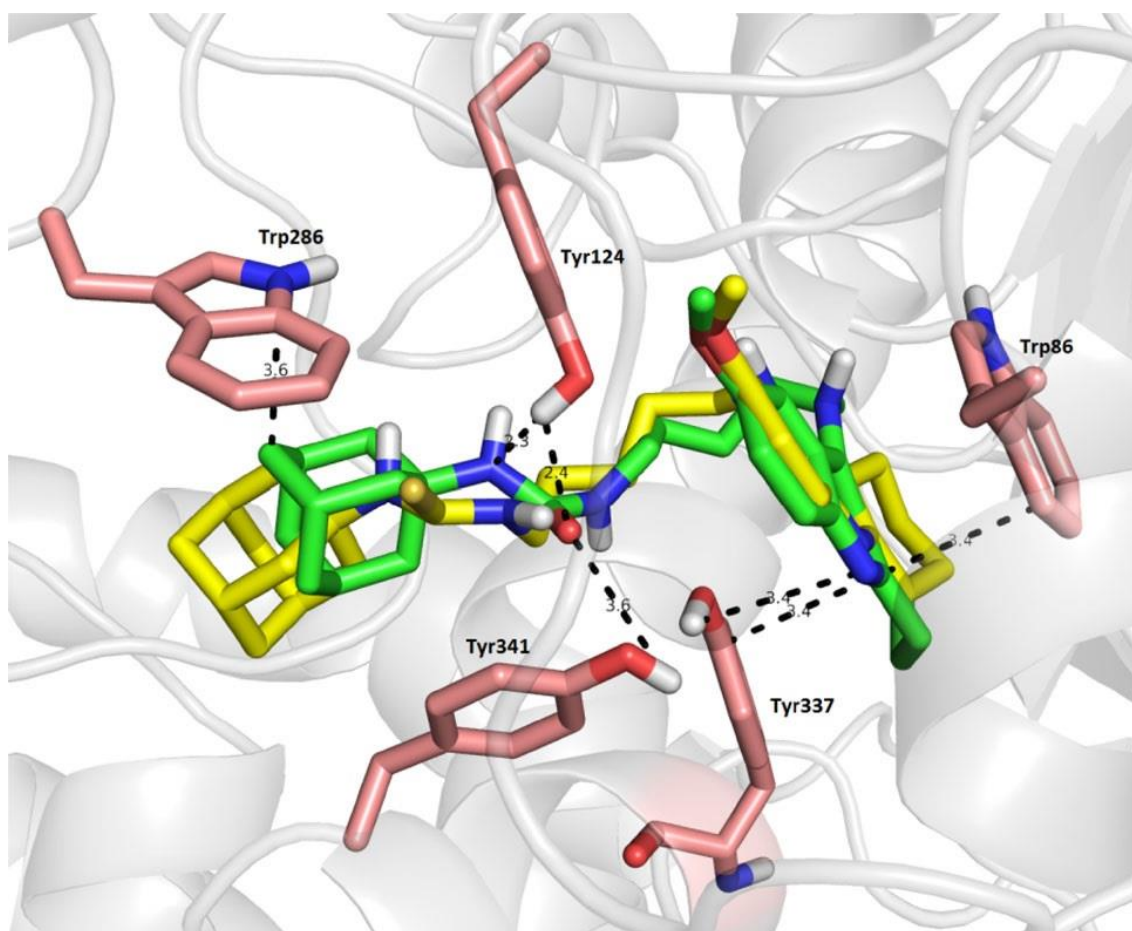
Výsledky dokovací studie inhibitoru **14** ukázaly jeho rozdílné uspořádání v aktivním místě enzymu v porovnání s THA a 7-MEOTA (Obr. 17). 7-Methoxytakrinová část je sendvičovitě uzavřena π - π interakcí mezi Tyr337 (4,2 Å) a Trp86 (2,8 Å). Methoxyskupina je stabilizována vodíkovou vazbou se Ser125 (2,3 Å). Alifatický spojovací řetězec prochází střední částí kavity enzymu a je obklopen aromatickými rezidui Tyr124 (3,7 Å), Phe297 (3,5 Å) a Phe338 (4,3 Å), které s tímto řetězcem tvoří nevazebné hydrofobní interakce. Při vstupu do aktivního místa v PAS tvoří thiomocovinová funkční skupina velice slabou vodíkovou vazbu s hydroxylem Tyr72 (3,4 Å). V periferní anionické části je dále umístěn adamantylový skelet, který je zde stabilizován slabými van der Walsovými silami a π -alifatickým kontaktem s Trp286 (2,7 Å).

V případě *hBChE* a takrinu jsou zřejmé π - π interakce s Tyr332 (3,3 Å), Trp430 (4,6 Å) Trp82 (2,4 Å) a také s Tyr440 vzdáleným 3,7 Å. Stejně tak jako v aktivním místě *hAChE* tvoří i u *hBChE* takrin několik vodíkových můstků. Tyto vazby spojují aminoskupinu takrinu s Trp430 (3,7 Å) a Ser79 (3,6 Å). 7-MEOTA je v aktivním místě *hBChE* usazena téměř identicky. 7-methoxyskupina 7-MEOTA však tvoří jednu vodíkovou vazbu s Trp82 (3,5 Å) navíc.



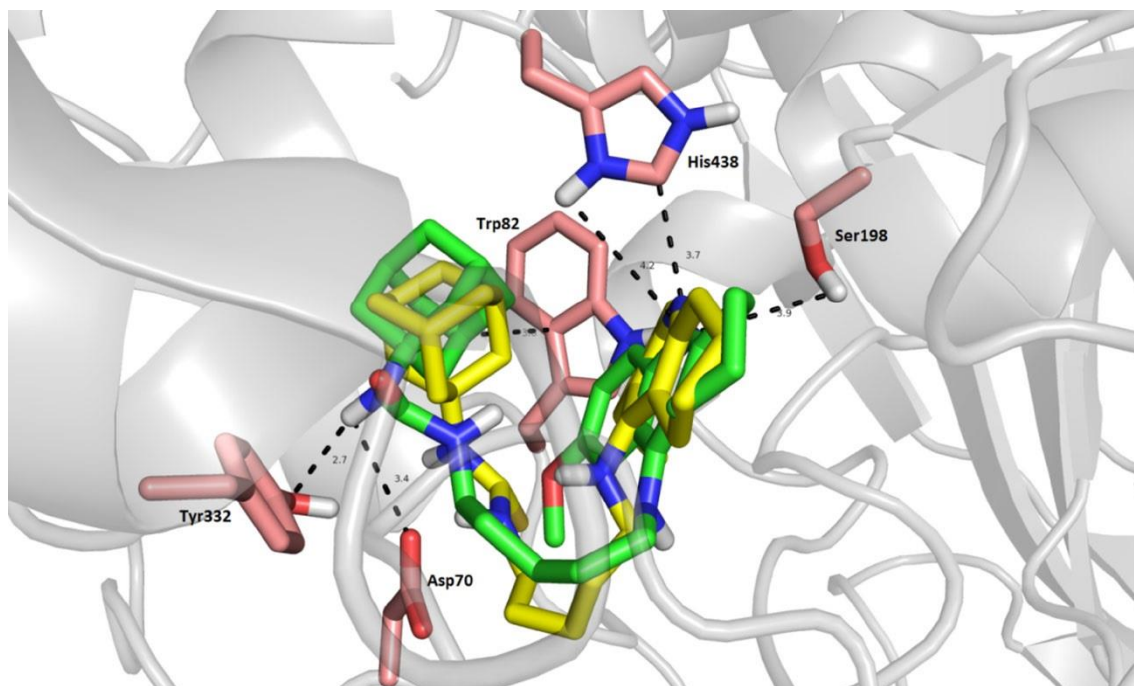
Obrázek 18. Model *hBChE*, aminokyselinová rezidua (modrá) a inhibitor 14 (zelená)

Takrinová část inhibitoru **14** (Obr. 18) je k *hBChE* poutána π - π interakcemi s Trp231 (4,0 Å) a Phe329 (3,9 Å). His438 poskytuje vodíkovou vazbu s atomem dusíku ve vzdálenosti 2,2 Å. Další vodíkový můstek tvoří sekundární aminoskupina inhibitoru s hydroxyskupinou Thr120 (4,2 Å). Adamantylová struktura je zachycena π -hydrofobní interakcí s Tyr332 (3,8 Å) a také Trp82 (3,4 Å).



Obrázek 19. Model hAChE - derivát 21 (zeleně), inhibitor 14 (žlutě) a aminokyselinová (světle hnědá)

7-methoxytakrinová část derivátu **21** je usazena π - π interakcí s Trp86 (3,4 Å) a kation- π kontaktem s Tyr337 (3,4 Å). Tyr337 navíc svou fenolickou hydroxyskupinou tvoří vodíkovou vazbu s dusíkem akridinové části. Adamantylovou strukturu zachycuje π -alifatickou interakcí Trp286 (3,6 Å), Phe297 (4,0 Å) a slabé van der Waalsovy síly. S močovinou funkční skupinou interagují tvorbou vodíkových můstků Tyr124 (2,3 Å; 2,4 Å) a Tyr341 (3,6 Å). Metylenový můstek poutají k aromatickým reziduíům hydrofobní interakce (Obr. 19).



Obrázek 20. Model hBChE - derivát **21** (zeleně), inhibitor **14** (žlutě) a aminokyselinová rezidua (tmavě hnědá).

Na obrázku 20 heterocyklický dusík inhibitoru **21** tvoří vodíkové vazby se Ser198 (3,9 Å) a His438 (4,2 Å) z katalytické triády. His438 se rovněž účastní π - π interakce tvaru T. Dále dochází prostřednictvím akridinové části k π - π interakci s Phe329 (4,3 Å; tvar T) a Trp231 (4,0 Å). Adamantylová část derivátu je zachycena v blízkosti Trp82 (3,6 Å), Tyr440 (4,1 Å) a Trp440 (4,9 Å) π -alifatickým kontaktem. Močovinná funkční skupina poskytuje vodíkovou vazbu Tyr332 (2,7 Å) a Asp70 (3,4 Å).

4 Diskuze

Hodnoty IC_{50} připravených derivátů a meziproductů byly porovnávány se standardy takrinem, 7-MEOTA a amantadinem (Tabulka 1). Ze standardů vykázal nejvyšší inhibiční potenciál takrin a to vůči oběma cholinesterasám dosahuje inhibičních hodnot $hAChE$ $IC_{50} = 0,5 \mu M$ a $hBChE = 0,023 \mu M$. Takrin je svými hodnotami v inhibici $hAChE$ přibližně 20× silnějším inhibitorem než 7-MEOTA a 32× silnějším než amantadin. Všechny standardy kromě takrinu inhibovaly selektivněji $hAChE$. Amantadin byl nejslabším inhibitorem cholinesteras v porovnání s ostatními standardy.

Celkově bylo testováno 14 nových 7-MEOTA-amantadinových ligandů (**11–17** a **18–24**) včetně diamino-7-methoxytakrinových intermediátů (**3–9**) s 1-isothiokyanatoadamantanem (**10**). Cílové sloučeniny obsahovaly spojovací řetězce o délce C2–C8 s thiomocovinovou nebo mocovinovou funkční skupinou. Diamino-7-methoxytakrinové intermediáty obsahovaly primární aminoskupinu na konci řetězce, kvůli špatné solubilitě musely být před testováním převedeny na dihydrochloridy. U všech nových hybridů (**11–24**) byly *in vitro* stanoveny hodnoty vůči oběma lidským cholinesterasám. U produktu **14** byla navíc provedena i molekulově modelovací studie na obou cholinesterasách.

Testované sloučeniny dosáhly inhibičních koncentrací v mikromolární oblasti, některé dokonce submikromolárních hodnotách. Thiomocovinové hybridy (**11–17**) dosahovaly vyššího inhibičního potenciálu vůči $hAChE$ než 7-MEOTA. Jeden z těchto derivátů (**14**, $hAChE$ $IC_{50} = 0,47 \mu M$) předčil dokonce i takrin. Co se týče inhibice $hBChE$ tyto deriváty opět překonaly IC_{50} 7-MEOTA, ne však takrinu. Většina hybridů (**13–17**) z této série inhibovala selektivněji $hBChE$. Nejselektivněji k $hBChE$ působil hybrid **16**.

Močovinná analoga (**18–24**) stejně jako thiomocoviny překonaly 7-MEOTA v inhibičních hodnotách $hAChE$ i $hBChE$. Nejvýrazněji inhiboval obě cholinesterasy opět hybrid disponující 5-ti uhlíkatým spojovacím můstkem. Selektivněji k $hBChE$ z této série působil deriváty **18**, **20**, **21** a **23**.

Vztah mezi strukturou a aktivitou odhalil pravidelný nárůst v závislosti se vzrůstající délkou řetězce u derivátů **11–17** na *hBChE*. Nejvyšší inhibiční potenciál na *hBChE* byl naměřen u hybridu **14** s 5-ti spojovacími uhlíky (0,11 μM). Vztah délky spojovacího řetězce k hodnotám *hAChE* se zdá být nepravidelný. V sérii thiomocovinových derivátů (**11–17**) měl nejlepší inhibiční schopnosti na *hAChE* hybrid **14** (0,47 μM). Rovněž v sérii analogů s močovinnou funkční skupinou (**18–24**) dosáhl nejlepších inhibičních hodnot jak na *hAChE*, tak na *hBChE* hybrid s 5-ti methylenovými můstky (**21**). Zdá se tedy, že pro dosažení nejvyšších inhibičních hodnot je ideální pět uhlíků ve spojovacím alifatickém řetězci mezi oběma částmi 7-MEOTA-amantadinových derivátů. Tato délka je nejspíše optimální pro interakci obou částí v PAS i CAS současně. Analoga **11–17** oproti sérii **18–24** byla celkově selektivnější k *hBChE* a dosahovala na *hBChE* lepších hodnot IC_{50} . V inhibici *hAChE* jsou tyto dvě série (výjimka **8**, **9** a **15**, **16**) srovnatelné. Z pozorování tohoto jevu můžeme vyvodit, že substitucí kyslíku v močovinné funkční skupině sírou se zvyšuje selektivita k *hBChE*.

Pro *in silico* studie byly vybrány deriváty **14** a **21** s nejlepšími hodnotami IC_{50} u obou cholinesteras. U derivátu **14** tyto studie potvrdily předpokládané usazení takrinového skeletu v aktivním místě *hAChE* a interakci adamantylaminové struktury v PAS. Takrinová část derivátu **14** je mírně vychýlena oproti THA a 7-MEOTA, ale přetrvávají společné π - π interakce s Tyr337 a Trp86. U *hBChE* je poloha takrinové části nového derivátu **14** poněkud odlišná v porovnání se standardy. Podobné usazení s nimi však sdílí amantadinový skelet svou interakcí s Tyr332 a Trp82. Derivát **21** dle *in silico* studie rovněž interaguje současně s CAS i PAS *hAChE*. Jeho umístění v modelu *hAChE* a *hBChE* je téměř identické s analogem **14** (Obr. 19, 20).

Schopnost interakce těchto molekul na dvou místech *hAChE* a dobré inhibiční vlastnosti vůči oběma cholinesterasám by mohly být důvodem k dalšímu testování a využití v oblasti AD. Vyšší selektivita derivátů k *hBChE* by byla výhodná v pozdějších stádiích AD, kdy se poměr koncentrací *hAChE/hBChE* mění ve prospěch *hBChE*.⁶³ Dále by bylo zajímavé zkoumat jejich schopnost ovlivňovat NMDA receptory, modulovat shlukování $\text{A}\beta$ interakcí s PAS a činnosti gliových buněk.

5 Závěr

V rámci diplomové práce bylo připraveno 14 nových 7-MEOTA-amantadinových derivátů se spojovacími řetězci o délce 2–8 uhlíků s thiomocovinovou a močovinnou funkční skupinou. Inhibiční potenciál byl stanoven *in vitro* s využitím Ellmanovy metody. Veškeré hodnoty IC_{50} (*hAChE* i *hBChE*) těchto látek se pohybovaly v mikromolární a submikromolární oblasti. Tyto výsledky byly porovnány se standardy takrinem, 7-MEOTA a amantadinem. Sloučenina číslo **14** z thiomocovinové série dosáhla lepších hodnot na *hAChE* v porovnání se standardy, vůči *hBChE* byl lepším inhibitorem pouze takrin. Z močovinnové série se svou inhibicí *hAChE* a *hBChE* nejvíce takrinu přiblížil derivát **21**. Ostatní sloučeniny svými hodnotami překonaly 7-MEOTA a amantadin. Molekulární *in silico* studie naznačují, že nově připravené deriváty **14** a **21** budou interagovat s oběma aktivními částmi enzymu.

Seznam literatury

- (1) Nordberg, A.; Svensson, A. L. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: A comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf.* **1998**, *19*, 465–480.
- (2) Robinson, D. M.; Keating, G. M. Memantine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* **2006**, *66*, 1515–1534.
- (3) Davis, K. L.; Powchick, P. Tacrine. *Lancet* **1995**, *345*, 625–630.
- (4) World Alzheimer Report 2014: Dementia and risk reduction. *Alzheimer's Dis. Int.* **2014**.
- (5) Qiu, C.; Kivipelto, M.; von Strauss, E. Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2009**, *11*, 111–128.
- (6) Fargo, K. Alzheimer's Association Report: 2014 Alzheimers disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **2014**, *10*, e47–e92.
- (7) Hebert, L. E.; Weuve, J.; Scherr, P. A.; Evans, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* **2013**, *80*, 1778–1783.
- (8) Seshadri, S.; Wolf, P. A.; Beiser, A.; Au, R.; McNulty, K.; White, R.; D'Agostino, R. B. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease: The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology* **1997**, *49*, 1498–1504.
- (9) Hebert, L. E. Is the Risk of Developing Alzheimer's Disease Greater for Women than for Men? *Am. J. Epidemiol.* **2001**, *153*, 132–136.
- (10) Česká alzheimerovská společnost <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/> (accessed úno 22, 2015).
- (11) Sorbi, S.; Forleo, P.; Tedde, A.; Cellini, E.; Ciantelli, M.; Bagnoli, S.; Nacmias, B. Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 1951–1960.
- (12) Schellenberg, G. D.; Anderson, L.; O'dahl, S.; Wisjman, E. M.; Sadovnick, A. D.; Ball, M. J.; Larson, E. B.; Kukull, W. A.; Martin, G. M.; Roses, A. D. APP717, APP693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* **1991**, *49*, 511–517.
- (13) Tanzi, R. E.; Vaula, G.; Romano, D. M.; Mortilla, M.; Huang, T. L.; Tupler, R. G.; Wasco, W.; Hyman, B. T.; Haines, J. L.; Jenkins, B. J. Assessment of amyloid beta-protein precursor gene mutations in a large set of familial

- and sporadic Alzheimer disease cases. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *51*, 273–282.
- (14) Bertram, L.; Tanzi, R. E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1449–1457.
 - (15) Bu, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 333–344.
 - (16) Calero, M.; Rostagno, A.; Matsubara, E.; Zlokovic, B.; Frangione, B.; Ghiso, J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.* **2000**, *50*, 305–315.
 - (17) Lambert, J.-C.; Heath, S.; Even, G.; Campion, D.; Sleegers, K.; Hiltunen, M.; Combarros, O.; Zelenika, D.; Bullido, M. J.; Tavernier, B.; et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1094–1099.
 - (18) Harold, D.; Abraham, R.; Hollingworth, P.; Sims, R.; Gerrish, A.; Hamshere, M. L.; Pahwa, J. S.; Moskvina, V.; Dowzell, K.; Williams, A.; et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1088–1093.
 - (19) Meng, Y.; Lee, J. H.; Cheng, R.; St George-Hyslop, P.; Mayeux, R.; Farrer, L. A. Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study. *Neuroreport* **2007**, *18*, 1761–1764.
 - (20) Bagyinszky, E.; Youn, Y. C.; An, S. S. a; Kim, S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 535–551.
 - (21) Skoog, I.; Lernfelt, B.; Landahl, S.; Palmertz, B.; Andreasson, L. A.; Nilsson, L.; Persson, G.; Odén, A.; Svanborg, A. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* **1996**, *347*, 1141–1145.
 - (22) Ott, A.; Stolk, R. P.; van Harskamp, F.; Pols, H. A.; Hofman, A.; Breteler, M. M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* **1999**, *53*, 1937–1942.
 - (23) Notkola, I. L.; Sulkava, R.; Pekkanen, J.; Erkinjuntti, T.; Ehnholm, C.; Kivinen, P.; Tuomilehto, J.; Nissinen, A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* **1998**, *17*, 14–20.
 - (24) Hofman, A.; Ott, A.; Breteler, M. M.; Bots, M. L.; Slooter, A. J.; van Harskamp, F.; van Duijn, C. N.; Van Broeckhoven, C.; Grobbee, D. E. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* **1997**, *349*, 151–154.

- (25) Breteler, M. M. . Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiol. Aging* **2000**, *21*, 153–160.
- (26) Larson, E. B.; Wang, L.; Bowen, J. D.; McCormick, W. C.; Teri, L.; Crane, P.; Kukull, W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann. Intern. Med.* **2006**, *144*, 73–81.
- (27) Evans, D. A.; Beckett, L. A.; Albert, M. S.; Hebert, L. E.; Scherr, P. A.; Funkenstein, H. H.; Taylor, J. O. Level of education and change in cognitive function in a community population of older persons. *Ann. Epidemiol.* **1993**, *3*, 71–77.
- (28) Mayeux, R.; Stern, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, 1–18.
- (29) Dekosky, S. T. Epidemiology and Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Clin. Cornerstone* **2001**, *3*, 15–26.
- (30) Perry, E. K.; Gibson, P. H.; Blessed, G.; Perry, R. H.; Tomlinson, B. E. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* **1977**, *34*, 247–265.
- (31) Perry, E. K.; Perry, R. H.; Blessed, G.; Tomlinson, B. E. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *4*, 273–277.
- (32) Talesa, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 1961–1969.
- (33) Goedert, M. The Neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Neurosci.* **1997**, *3*, 131–141.
- (34) Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 4913–4917.
- (35) Selkoe, D. J. Presenilins, β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clin. Neurosci. Res.* **2001**, *1*, 91–103.
- (36) Gendron, T. F.; Petrucelli, L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **2009**, *4*, 13.
- (37) Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C. M.; Magnaudeix, A.; Perrin, M. L.; Yardin, C.; Terro, F. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 289–309.

- (38) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185.
- (39) Sakono, M.; Zako, T. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J.* **2010**, *277*, 1348–1358.
- (40) Kumar, A.; Singh, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Reports* **2015**, *67*, 195–203.
- (41) Hardy, J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1129–1134.
- (42) Combs, C. K. Inflammation and microglia actions in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2009**, *4*, 380–388.
- (43) Cardona, A. E.; Pioro, E. P.; Sasse, M. E.; Kostenko, V.; Cardona, S. M.; Dijkstra, I. M.; Huang, D.; Kidd, G.; Dombrowski, S.; Dutta, R.; et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 917–924.
- (44) Floden, A. M.; Combs, C. K. Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4644–4648.
- (45) Streit, W. J.; Miller, K. R.; Lopes, K. O.; Njie, E. Microglial degeneration in the aging brain: Bad news for neurons? *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 3423–3438.
- (46) Cameron, B.; Landreth, G. E. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 503–509.
- (47) Berridge, M. J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Arch.* **2010**, *459*, 441–449.
- (48) Davies, P.; Maloney, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **1976**, *2*, 1403.
- (49) Dumas, J. a.; Newhouse, P. a. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: Cholinergic functional compensation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2011**, *99*, 254–261.
- (50) Whitehouse, P. J.; Price, D. L.; Struble, R. G.; Clark, A. W.; Coyle, J. T.; Delon, M. R. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **1982**, *215*, 1237–1239.
- (51) Kása, P.; Rakonczay, Z.; Gulya, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **1997**, *52*, 511–535.
- (52) Bartus, R. T. Evidence for a direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: Effects of concurrent

- administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1978**, 9, 833–836.
- (53) Craig, L. a.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, 35, 1397–1409.
- (54) Lincová, D.; Farghali, H. *Základní a aplikovaná farmakologie 2. dopl. a přeprac. vyd.*; Galén: Praha, 2007.
- (55) Massoulié, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F.-M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **1993**, 41, 31–91.
- (56) Atack, J. R.; Perry, E. K.; Bonham, J. R.; Perry, R. H.; Tomlinson, B. E.; Blessed, G.; Fairbairn, A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: Selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.* **1983**, 40, 199–204.
- (57) Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. Role of the Catalytic Triad and Oxyanion Hole in Acetylcholinesterase catalysis: An Ab Initio QM/MM Study. *Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10572–10577.
- (58) 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.
- (59) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253, 872–879.
- (60) Silman, I.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 175, 3–10.
- (61) Kasa, P.; Rakonczay, Z.; Gulyat, K. The Cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **1997**, 52, 511–535.
- (62) Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Pérez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **1996**, 16, 881–891.
- (63) Lane, R. M.; Potkin, S. G.; Enz, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2006**, 9, 101–124.
- (64) Li, L.; Sengupta, A.; Haque, N.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation

- of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 261–269.
- (65) Rogawski, M. A.; Wenk, G. L. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* **2003**, *9*, 275–308.
- (66) Kim, J.-H.; Lee, H.-W.; Hwang, J.; Kim, J.; Lee, M.-J.; Han, H.-S.; Lee, W.-H.; Suk, K. Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 2145–2159.
- (67) Ossola, B.; Schendzielorz, N.; Chen, S.-H.; Bird, G. S.; Tuominen, R. K.; Männistö, P. T.; Hong, J.-S. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: Reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected]. *Neuropharmacology* **2011**, *61*, 574–582.
- (68) Sugimoto, H.; Yamanishi, Y.; Iimura, Y.; Kawakami, Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 303–339.
- (69) Dooley, M.; Lamb, H. M. Donepezil: A Review of its use in Alzheimer's disease. *Adis Drug Eval.* **2000**, *16*, 199–226.
- (70) Polinsky, R. J. Clinical pharmacology of rivastigmine: A new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **1998**, *20*, 634–647.
- (71) Heinrich, M.; Lee Teoh, H. Galanthamine from snowdrop: The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *92*, 147–162.
- (72) 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.
- (73) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands: An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523–6543.
- (74) Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; et al. A resurrection of 7-MEOTA: A comparison with tacrine. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10*, 893–906.
- (75) Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Banzi, R.; Melchiorre, C. Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 24–27.
- (76) Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palomero, E.; Dorronsoro, I.; del Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usán, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.;

- Andrisano, V.; et al. Design, Synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: New disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7223–7233.
- (77) Perry, G.; Cash, A. D.; Smith, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol.* **2002**, *2*, 120–123.
- (78) Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C. Lipoic acid, a lead structure for multi-target-directed drugs for neurodegeneration. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1269–1274.
- (79) Jang, M.-H.; Jung, S.-B.; Lee, M.-H.; Kim, C.-J.; Oh, Y.-T.; Kang, I.; Kim, J.; Kim, E.-H. Melatonin attenuates amyloid beta₂₅₋₃₅-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci. Lett.* **2005**, *380*, 26–31.
- (80) Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459–462.
- (81) Mattson, M. P.; Chan, S. L. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: Bad genes and bad habits. *J. Mol. Neurosci.* **2001**, *17*, 205–224.
- (82) Marco-Contelles, J.; León, R.; de Los Ríos, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; López, M. G.; García, A. G.; Villarroya, M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607–7610.
- (83) Pang, Y. P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase: Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646–23649.
- (84) Fang, J. H.; Wang, X. H.; Xu, Z. R.; Jiang, F. G. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci.* **2010**, *11*, 31.
- (85) Minarini, A.; Milelli, A.; Tumiatti, V.; Rosini, M.; Simoni, E.; Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Motori, E.; Angeloni, C.; et al. Cystamine-tacrine dimer: A new multi-target-directed ligand as potential therapeutic agent for Alzheimer's disease treatment. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 997–1003.
- (86) Thiratmatrakul, S.; Yenjai, C.; Waiwut, P.; Vajragupta, O.; Reubroycharoen, P.; Tohda, M.; Boonyarat, C. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of novel tacrine-carbazole

hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 21–30.

- (87) Chen, X.; Zenger, K.; Lupp, A.; Kling, B.; Heilmann, J.; Fleck, C.; Kraus, B.; Decker, M. Tacrine-silibinin codrug shows neuro- and hepatoprotective effects in vitro and pro-cognitive and hepatoprotective effects in Vivo. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5231–5242.
- (88) Lange, J. H. M.; Coolen, H. K. A. C.; Neut, M. A. W. van der; Borst, A. J. M.; Stork, B.; Verveer, P. C.; Kruse, C. G. Design, synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel tacrine derivatives with a combination of Acetylcholinesterase Inhibition and cannabinoid CB1 receptor antagonism. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1338–1346.
- (89) Simoni, E.; Daniele, S.; Bottegoni, G.; Pizzirani, D.; Trincavelli, M. L.; Goldoni, L.; Tarozzo, G.; Reggiani, A.; Martini, C.; Piomelli, D.; et al. Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9708–9721.
- (90) Del Giudice, M. R.; Borioni, A.; Mustazza, C.; Gatta, F.; Meneguz, A.; Volpe, M. T. Synthesis and cholinesterase inhibitory activity of 6-, 7-methoxy-(and hydroxy-) tacrine derivatives. *Farmaco* **1996**, *51*, 693–698.
- (91) Munch, H.; Hansen, J. S.; Pittelkow, M.; Christensen, J. B.; Boas, U. A new efficient synthesis of isothiocyanates from amines using di-tert-butyl dicarbonate. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3117–3119.
- (92) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.