

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA SENIČAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ZAVIRALCEV AGREGACIJE
IN OZNAČEVALCEV FIBRILOV AMILOIDA- β**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA SENIČAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE ZAVIRALCEV AGREGACIJE
IN OZNAČEVALCEV FIBRILOV AMILOIDA- β**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF AGGREGATION
INHIBITORS AND PROBES OF β -AMYLOID FIBRILS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v laboratorijih na Aškerčevi cesti 7 in Tržaški cesti 32, Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom dr. Borisa Brusa, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Centru za masno spektrometrijo v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. ter somentorju dr. Borisu Brusu, mag. farm. za strokovne nasvete pri eksperimentalnem delu in pri pisanju magistrske naloge.

Posebna zahvala gre mojim staršem, sestri in vsem prijateljem, ki so me podpirali skozi leta študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja dr. doc. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorja dr. Borisa Brusa, mag. farm.

Tanja Seničar

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1. UVOD	1
1.1. Znaki in simptomi Alzheimerjeve bolezni.....	1
1.2. Možni vzroki nastanka Alzheimerjeve bolezni	1
1.3. Patofiziološke spremembe pri Alzheimerjevi bolezni	3
1.3.1. Peptidi amiloida- β	3
1.3.2. Nevrofibrilarne pentlje	5
1.4. Diagnoza Alzheimerjeve bolezni	6
1.4.1. Označevalci fibrilov amiloida- β za nuklearno slikanje.....	6
1.4.2. Označevalci fibrilov amiloida- β za optično slikanje.....	8
1.4.3. Tioflavin T.....	10
1.5. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni	12
1.5.1. Zaviralci holin-esteraz z antiagregacijskimi lastnostmi	13
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. Materiali	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Kromatografske metode	17
3.2.2. Spektroskopske metode.....	18
3.2.3. Risanje in poimenovanje spojin	18
3.2.4. Določevanje tališča	18
3.2.5. Biokemijsko testiranje.....	18
3.2.5.1. Vrednotenje označevalcev fibrilov amiloida- β	22
3.2.5.2. Vrednotenje zaviralcev agregacije amiloida- β	25
4. EKSPERIMENTALNO DELO	27
4.1. Dvostopenjska sinteza dimetilaminfeniloksazol aromatskih analogov – označevalcev fibrilov amiloida- β	27
4.1.1. Sinteza <i>N,N</i> -dimetil-4-(oksazol-5-il)anilina (<i>a</i>)	27
4.1.2. Neuspešen poskus sinteze 1-(5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)tiofen-2-il)etan-1-ona (<i>b</i>).....	28

4.1.3. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)benzoni-trila (<i>b</i>).....	28
4.2. Petstopenjska sinteza arilnega 2-aminoetanona.....	29
4.2.1. Sinteza 1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>a</i>).....	29
4.2.2. Neuspešen poskus sinteze 2-bromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>b</i>)...	30
4.2.3. Sinteza 2,2-dibromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>c</i>).....	30
4.2.4. Sinteza 2-bromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>d</i>).....	31
4.2.5. Sinteza 2-azido-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>e</i>).....	31
4.2.6. Sinteza 2-amino-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (<i>f</i>).....	32
4.3. Sinteza sulfamoilov.....	33
4.3.1. Sinteza 4-(klorosulfonyl)benzojske kisline (<i>a</i>).....	33
4.3.2. Sinteza 4-sulfamoilbenzojske kisline (<i>b</i>).....	33
4.3.3. Sinteza 4-(<i>N</i> -metilsulfamoil)benzojske kisline (<i>c</i>).....	34
4.4. Sinteza 2-metil-1,3-dioksa-5-isoindolinkarboksilne kisline.....	34
4.5. Zadnje tri stopnje sinteze dimetilaminfeniloksazol aromatskih analogov – označevalcev fibrilov amiloida- β	35
4.5.1. Sinteza aromatskih acil kloridov.....	37
4.5.1.1. Sinteza 4-(<i>N</i> -metilsulfamoil)benzoil klorid (<i>a</i>).....	37
4.5.1.2. Sinteza 4-sulfamoilbenzoil klorida (<i>a</i>).....	37
4.5.1.3. Sinteza 2-metil-1,3-dioksa-5-isoindolin-5-karbonil klorida (<i>a</i>).....	37
4.5.1.4. Sinteza 5-metiltiofen-2-karbonil klorida (<i>a</i>).....	38
4.5.2. Sinteza 2-acilaminoketonov.....	38
4.5.2.1. Sinteza <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-(<i>N</i> - metilsulfamoil)benzamid (<i>b</i>).....	38
4.5.2.2. Sinteza <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-sulfamoilbenzamida (<i>b</i>)	39
4.5.2.3. Sinteza <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-2-metil-1,3- dioksa-5-isoindoli-5-karboksamida (<i>b</i>).....	39
4.5.2.4. Sinteza <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-5-metiltiofen-2- karboksamida (<i>b</i>).....	40
4.5.3. Dvostopenjska sinteza Burgessovega reagenta.....	40
4.5.3.1. Sinteza metil(klorosulfonyl)karbamata (<i>c</i>).....	40
4.5.3.2. Sinteza Burgessovega reagenta (<i>d</i>).....	40
4.5.4. Sinteza 2,5-disubstituiranih oksazolov z Burgessovim reagentom.....	41
4.5.4.1. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)- <i>N</i> - metilbenzensulfonamida (<i>e</i>).....	41

4.5.4.2. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)benzensulfonamida (<i>e</i>) ..	42
4.5.4.3. Sinteza 5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-2-metilisoindolin-1,3-diona (<i>e</i>).....	42
4.5.4.4. Neuspešen poskus sinteze <i>N,N</i> -dimetil-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)oksazol-5-il)anilina (<i>e</i>)	43
4.5.5. Sinteza 2,5-disubstituiranih oksazolov s POCl ₃	43
4.5.5.1. Neuspešen poskus sinteze 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)- <i>N</i> -metilbenzensulfonamida.....	43
4.5.5.2. Neuspešen poskus sinteze 5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-2-metilisoindolin-1,3-diona	44
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1. Komentarji sinteznih postopkov	45
5.1.1. Van Leusenova sinteza oksazolov in njihova direktna C-2 arilacija	45
5.1.2. Sinteza arilnega 2-aminoetanona	46
5.1.3. Sinteza sulfonamidov	48
5.1.4. Reakcija kondenzacije do imida.....	48
5.1.5. Zadnji trije koraki sinteze dimetilaminoksazol aromatov in sinteza Burgessovega reagenta.....	49
5.2. Rezultati in komentar vrednotenja označevalcev fibrilov amiloida-β.....	52
5.3. Rezultati in komentar vrednotenja zaviralcev agregacije amiloida-β.....	61
ZAKLJUČEK.....	67
LITERATURA.....	69

KAZALO SLIK

Slika 1: Proteolitični poti APP. Prirejeno in povzeto po Tian Qiu in sod. (33).	4
Slika 2: Del fibrila, ki ustreza zloženki 7 dimerov. Prirejeno in povzeto po Matthias Schmidt in sod. (44).	5
Slika 3: Derivati stilbena kot označevalci fibrilov A β (povzeto po 61, 62, 66, 67).	7
Slika 4: Označevalec [^{18}F]florbetapir (64).	7
Slika 5: Označevalca tioflavin T in PIB (54).	8
Slika 6: Model kanala in nakazana smer vezave ThT. Prirejeno in povzeto po Matthew Biancalana in sod. (79).	11
Slika 7: Karakteristična ojačitev fluorescence ThT ob vezavi na amiloidne fibrile. Prirejeno in povzeto po Matthew Biancalana in sod. (79).	11
Slika 8: Osnovna struktura sintetiziranih označevalcev.	16
Slika 9: Shema dvostopenjske sinteze označevalcev.	27
Slika 10: Shema sinteze arilnega 2-aminoetanona.	29
Slika 11: Shema sinteze sulfamoilov.	33
Slika 12: Shema zadnjih stopenj sinteze označevalcev z Burgessovim reagentom.	36
Slika 13: Tozilmetilizocianid (povzeto po 113).	45
Slika 14: Reakcijska shema mehanizma Van Leusenove sinteze oksazola iz aldehida (povzeto po 114).	45
Slika 15: Reakcijska shema mehanizma paladij-katalizirane arilacije oksazola (povzeto po 116).	46
Slika 16: Možen mehanizem redukcije <i>gem</i> bromidov z dietilfosfitom ob TEA (povzeto po 120).	47
Slika 17: Reakcijske shema mehanizma Staudingerjeve redukcije (povzeto po 123).	48
Slika 18: Reakcijska shema mehanizma kloriranja sulfonske kisline (povzeto po 122).	48
Slika 19: Reakcijska shema tvorbe imida preko dvojne soli (povzeto po 127).	49
Slika 20: Reakcijska shema mehanizma nastanka Vilsmeier-Haackovega reagenta (povzeto po 128).	49
Slika 21: Reakcijska shema mehanizma sinteze kislinskih kloridov in regeneracija DMF (povzeto po 128).	49
Slika 22: Reakcijska shema mehanizma Robinson-Gabrielove sinteze 2,5-disubstituiranih oksazolov (povzeto po 130).	50
Slika 23: Reakcijska shema sinteze Burgessovega reagenta (povzeto po 131).	50
Slika 24: Reakcijska shema mehanizma dehidracije alkoholov z Burgessovim reagentom (povzeto po 132).	51
Slika 25: Reakcijska shema mehanizma dehidracije alkoholov s POCl $_3$ (povzeto po 117).	52
Slika 26: Intenziteta fluorescence pri različnih valovnih dolžinah emisije za spojino <u>3</u> ob t $_4$. Modra krivulja predstavlja vzorec, rdeča krivulja predstavlja reagenčno slepo.	56
Slika 27: Intenziteta fluorescence pri različnih valovnih dolžinah emisije za spojino <u>29</u> ob t $_2$. Modra krivulja predstavlja vzorec, rdeča krivulja predstavlja reagenčno slepo.	57
Slika 28: Intenziteta fluorescence v odvisnosti od koncentracije za spojino <u>3</u> . F $_{av1}$ predstavlja reagenčno slepo. F $_{av2}$ predstavlja vzorec.	59

Slika 29: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino <u>25</u>	60
Slika 30: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino <u>29</u>	60
Slika 31: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino <u>31</u>	61
Slika 32: Strukture potencialnih zaviralcev agregacije, ki smo jih testirali.	62
Slika 33: Kontinuirano spremljanje agregacije peptidov A β s ThT pri 1. meritvi pri sobni temperaturi. Modra krivulja predstavlja eno od paralelk slepe vzorčne raztopine, rdeča krivulja predstavlja eno od paralelk vzorčne raztopine <u>AM26</u>	66

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Nekateri NIRF označevalci fibrilov A β (povzeto po 52, 53, 74-76).	10
Preglednica II: Zdravila za zdravljenje AB (87).	12
Preglednica III: Inhibitorji fibrilacije številnih proteinov (96, 98, 100).	13
Preglednica IV: Inhibitorji esteraz in zaviralci agregacije A β (87, 103, 111).	14
Preglednica V: Fluorescenčni označevalci fibrilov A β , ki smo jih testirali.	19
Preglednica VI: Potencialni zaviralci agregacije, ki smo jih testirali.	20
Preglednica VII: ThT test za ugotovitev stanja peptidov.	23
Preglednica VIII: Test vezave označevalcev fibrilov.	24
Preglednica IX: ThT test delovanja zaviralcev agregacije pri sobni temperaturi.	25
Preglednica X: Različni substituenti končnih označevalcev.	36
Preglednica XI: Povprečja fluorescence za vzorec, slepo vzorčno in slepo reagenčno raztopino ob različnih časih. Čas (h:min:s), Fav (RFU).	52
Preglednica XII: Valovne dolžine maksimuma absorbance ter ustrezne ekscitacije.	53
Preglednica XIII: Rezultati testa vezave. $F_{\max 1}$ je največja fluorescenca slepe reagenčne raztopine. $F_{\max 2}$ je največja fluorescenca vzorca. $k_{F\max} = F_{\max 2} / F_{\max 1}$. $\Delta F_{\max} = F_{\max 2} - F_{\max 1}$	54
Preglednica XIV: Rezultati testa vezave pri različnih koncentracijah OF. $F_{av 1}$ je povprečje vseh $F_{\max 1}$ ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. $F_{av 2}$ je povprečje vseh $F_{\max 2}$ ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. k_{av} je povprečje vseh $k_{F\max}$ ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. $\Delta F_{av} = F_{av 2} - F_{av 1}$	58
Preglednica XV: Rezultati vrednotenja zaviralcev agregacije s fluorometričnim testom s ThT pri sobni temperaturi. $\Delta F = F_2 - F_1$	63
Preglednica XVI: Rezultati vrednotenja zaviralcev agregacije s fluorometričnim testom s ThT pri 37 °C. $\Delta F = F_2 - F_1$	64
Preglednica XVII: Vrednosti absorbance ZA pri različnih valovnih dolžinah.	65

POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je zaradi staranja prebivalstva v porastu. Bolezen je še neozdravljiva, zato je iskanje novih zdravilnih učinkovin in tudi diagnostičnih sredstev izjemno pomembno. Razvoj Alzheimerjeve bolezni še ni natančno opredeljen in obstajajo številne hipoteze. Klasična amiloidna hipoteza pravi, da ključno vlogo pri razvoju bolezni igrajo toksični fibrili amiloida- β . S specifičnimi označevalci fibrilov amiloida- β bi omogočili zgodnje diagnosticiranje in spremljanje razvoja Alzheimerjeve bolezni.

Sintetizirali smo tri analoge 2-aril-5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazola, kot potencialne označevalce fibrilov amiloida- β . Spojine smo skupaj s 5 drugimi potencialnimi označevalci, z enakim skeletom, biokemijsko ovrednotili, tako da smo določili njihovo ojačitev fluorescence po vezavi na agregate amiloida- β . Pri 10 μ M amiloida- β je do ugodne fluorescenčne odzivnosti prišlo pri spojinah **3**, **24**, **25**, **29**, **30** in **31**. Spojine z isoindolin-1,3-dionom kot heterociklom so bile neučinkovite (**26**, **28**). Pri 1 μ M amiloida- β je bila edina uspešna spojina **29**. Ojačitev fluorescence je bila nižja od številnih preizkušenih označevalcev v literaturi. Glede na spekter emisije bi testirane spojine za uporabo *in vivo* potrebovale dodatno optimizacijo. V območju pod 650 nm je namreč avtofluorescenca možganskega tkiva prevelika. Okno transparentnosti možganskega tkiva se pojavi šele pri višjih valovnih dolžinah. Za uporabo na tkivnih rezinah je najprimernejša spojina **29**.

Pri iskanju novih zdravil za zdravljenje in lajšanje simptomov Alzheimerjeve bolezni so uspeli identificirati številne tarče. Kompleksnost bolezni favorizira učinkovine, ki bi delovale na več bioloških tarč hkrati. V okviru magistrske naloge smo ovrednotili 22 potencialnih zaviralcev agregacije, ki so analogi donepezila. Spojine hkrati ciljajo tudi aktivno mesto holin-esteraz. Z zaviranjem agregacije bi lahko upočasnili ali celo preprečili nastanek Alzheimerjeve bolezni, medtem ko bi z zaviranjem holin-esteraz lajšali simptome bolezni. S fluorescenčno spektroskopijo smo kontinuirano spremljali proces agregacije amiloida- β . S primerjavo emisije tioflavina T ob prisotnosti spojin in brez njih, smo določili obseg zaviranja agregacije peptidov. Pri sobni temperaturi je 11 spojin zavrlo agregacijo za več kot 80%; med njimi je bila najuspešnejša spojina **JRR6**. Pri 37 °C so bili rezultati nekoliko slabši, za najuspešnejšo pa se je izkazala spojina **AM26**. Temperatura je močno vplivala tudi na povezavo med strukturo spojin in njihovo učinkovitostjo.

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen, amiloid- β , označevalci fibrilov, tioflavin T, zaviralci agregacije

ABSTRACT

Alzheimer's disease is on the rise due to an aging population. The disease is still incurable, so it is extremely important to find more effective drugs and diagnostic agents. The development of Alzheimer's disease is not yet fully defined and many hypotheses exist. Classical amyloid hypothesis claims that a key role in the development of Alzheimer's disease belongs to toxic amyloid- β fibrils. By using specific probes of amyloid- β fibrils, we could enable early diagnosis and monitoring of the development of Alzheimer's disease.

We synthesized three analogues of the 2-aryl-5-(4-(dimethylamino)phenyl)oxazole as potential probes of amyloid- β fibrils. We biochemically evaluated these compounds and 5 other potential markers with the same scaffold, by measuring their amplification of fluorescence after binding to aggregates of amyloid- β . At 10 μ M of amyloid- β the fluorescent response was favourable in the case of the compounds **3**, **24**, **25**, **29**, **30** and **31**. Compounds with isoindolin-1,3-dione as heterocyclic were ineffective (**26**, **28**). At 1 μ M amyloid- β only compound **29** was successful. Amplification of fluorescence was still lower than other tested probes in literature. In view of the spectrum of the emission, tested compounds would require further optimization for *in vivo* usage. In the range lower than 650 nm the autofluorescence of brain tissue is too large. Window of transparency of brain tissue occurs at higher wavelengths. For use on tissue slices compound **29** is preferred.

A number of targets have been identified in the search for new drugs to treat and relieve the symptoms of Alzheimer's disease. The complexity of the disease favours the substances, which would act on multiple biological targets simultaneously. We evaluated 22 potential aggregation inhibitors, which are analogues of donepezil. Compounds are also targeting the active site of choline-esterases. By inhibiting the aggregation we could slow down or even prevent the onset of Alzheimer's disease, while the inhibition of choline-esterases would alleviate the symptoms of the disease. With fluorescence spectroscopy we continuously monitored the process of aggregation of amyloid- β . By comparing emission of thioflavin T in the presence of compounds and without them, we determined the extent of inhibition of aggregation. At room temperature 11 compounds inhibited aggregation by more than 80%; among them the most effective compound was **JRR6**. At 37 °C the results were somewhat lower and the most successful compound was **AM26**. Temperature also had a strong influence on structure-activity relationship.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- β , fibril probes, thioflavin T, aggregation inhibitors

SEZNAM OKRAJŠAV

2,5-DMF	2,5-dimetilfuran
AB	Alzheimerjeva bolezen
A β	amiloid- β
A β 40	izoforma amiloida- β s 40 aminokislinami
A β 42 oz. A β ₁₋₄₂	izoforma amiloida- β z 42 aminokislinami
ACh	acetilholin
AChE	acetilholin-esteraza
APCI	ionizacija z razprševanjem pri atmosferskem pritisku
APOE	apolipoprotein E
APP	amiloidni prekuzorski protein
Br ₂	dibromid, bromovica
bs	široki singlet
BuChE	butirilholin-esteraza
C	ogljik
CDCl ₃	devteriran kloroform
CH ₃ COOH	ocetna kislina
CH ₃ NH ₂	metilamin
ClSO ₃ H	klorosulfonska kislina
(COCl) ₂	oksalil klorid
CTF	karboksilni terminalni fragment
d	dublet
DCM	diklorometan
dd	dublet dubleta
DMF	dimetilformamid

DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetilsulfoksid
eq	ekvivalent
ESI	elektrosprej ionizacija
(EtO) ₂ PO	dietilfosfit
F ₁	fluorescenca ob času t ₁
F ₂	fluorescenca ob času t ₂
F _{av}	povprečje fluorescence
F _{av1}	povprečje F _{max1} ob različnih časih za isto koncentracijo OF
F _{av2}	povprečje F _{max2} ob različnih časih za isto koncentracijo OF
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila
F _{max1}	maksimalna emisija slepe reagenčne raztopine OF ob določenem času
F _{max2}	maksimalna emisija vzorčne raztopine OF ob določenem času
H ₂ SO ₄	žveplova (VI) kislina
HBr	bromovodikova kislina
HCl	klorovodikova kislina
HEB	hematoencefalna bariera, žilnomožganska pregrada
HI	jodovodikova kislina
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IUPAC	Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo
K ₂ CO ₃	kalijev (II) karbonat
k _{av}	povprečje vseh k _{Fmax}
k _{Fmax}	koeficient med F _{max2} in F _{max1}
m	multiplet

MAO	monoamin oksidaza
MeI	jodometan
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MRI	slikanje z magnetno resonanco
MW	mikrovalovni reaktor
Na ₂ SO ₄	natrijev (VI) sulfat
NaCl	natrijev klorid
NaHCO ₃	natrijev hidrogenkarbonat
NaN ₃	natrijev azid
NH ₃	amonijak
NIRF	fluorescenca v območju bližnje infrardeče svetlobe
NMM	<i>N</i> -metil morfolin
NMR	nuklearna magnetna resonanca
OF	označevalci fibrilov
Pd(OAc) ₂	paladijev (II) acetat
PET	pozitronska emisijska tomografija
pH	negativni desetiški logaritem molarne koncentracije oksonijevih ionov
PIB	Pittsburgh spojina B
POCl ₃	fosforil klorid
PPh ₃	trifenilfosfin
ppm	število delcev na milijon
pTSK	<i>para</i> -toluensulfonska kislina
q	kvartet

Rf	retencijski faktor
RFU	relativna fluorescenčna enota
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RuPhos	2-dicikloheksilfosfino-2',6'-diisopropoksibifenil
s	singlet
SOCl ₂	tionil klorid
SPECT	enofotonska emisijska računalniška tomografija
STD	standardna deviacija
TEA	trietilamin
THF	tetrahidrofuran
ThT	tioflavin T
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
TosMIC	tozilmetilizocianid
ZA	zaviralci agregacije
δ	kemijski premik
ΔF_{av}	razlika med F_{av2} in F_{av1}
ΔF_{max}	razlika med F_{max2} in F_{max1}
ΔF_{sl}	sprememba fluorescence vzorčne slepe raztopine ZA v času t_1 do t_2
ΔF_{vz}	sprememba fluorescence vzorčne raztopine ZA v času t_1 do t_2
λ_{Amax}	valovna dolžina absorpcijskega maksimuma
λ_{exc}	valovna dolžina ekscitacije

1. UVOD

Alzheimerjeva bolezen (AB) je ireverzibilna nevrodegenerativna motnja centralnega živčnega sistema in najpogostejši vzrok demence (okoli 60% vseh primerov) (1, 2). V možganih poteka počasna, kronična in progresivna degeneracija nevronov, ki povzroči upad kognitivnih funkcij. Incidenca AB se veča s starostjo; približno 95% od 35 milijonov obolelih je bilo diagnosticiranih po 65. letu starosti. Zaradi staranja prebivalstva predvidevajo, da bo leta 2050 že 115 milijonov obolelih z AB (3, 4). Številni znanstveniki zato svoje delo usmerjajo v iskanje učinkovitejših zdravil v boju proti AB ter boljših diagnostičnih sredstev, ki so specifične za patološke spremembe AB.

1.1. Znaki in simptomi Alzheimerjeve bolezni

Eden prvih znakov zmanjševanja kognitivnih funkcij je slabljenje spomina. Gre za blag kognitivni upad, ki že lahko kaže na razvoj AB, oziroma je velik dejavnik tveganja za pojav AB. Ljudje z blagim kognitivnim upadom lahko normalno opravljajo vsakdanja opravila. Diagnoza AB je večinoma postavljena v fazi blage oblike AB. V tem stadiju bolezni se stopnjuje slabljenje spomina, pokažejo pa se tudi druge spremembe kognitivnih funkcij. Pojavijo se težave z orientacijo v prostoru, načrtovanjem in presojo, spremembe v razpoloženju, agresija in/ali anksioznost. S širitvijo sprememb na področja možganske skorje za govor, sklepanje, obdelavo senzoričnih informacij in zavestno razmišljanje, se prične zmerne oblike AB. Predhodno omenjeni simptomi postanejo bolj izraziti. Težave se pojavijo tudi pri pisanju in branju, govor in gibi postanejo nekoherentni, pojavijo se halucinacije, paranoja in napadi panike. Nadzor in oskrba bolnikov v tem stadiju bolezni sta nujna. Zadnji stadij predstavlja težka oblika AB. Intelektualne funkcije so skoraj popolnoma odsotne in bolniki ne prepoznajo niti članov družine. Pogosti simptomi so izguba telesne teže, vnetja kože, hudo okrnjena motorika, inkontinenca in huda utrujenost. Zaradi težav s požiranjem, je za bolnike z AB največkrat usodna aspiracijska pljučnica (5).

1.2. Možni vzroki nastanka Alzheimerjeve bolezni

Alzheimerjeva bolezen je izjemno kompleksna, zato natančnega vzroka za njen razvoj ne poznamo. Izjema so nekateri primeri Alzheimerjeve bolezni, ki se razvije med 30. in 60. letom. Gre za familiarne oblike z avtosomnim dominantnim dedovanjem okvarjenih genov za APP (na kromosomu 21), presenilin 1 in/ali presenilin 2. Mutacije teh genov imajo vpliv na količino amiloida- β (poveča se razmerje peptidov A β 42/A β 40 in plazemska koncentracija

A β 42) (6, 7, 8). Pri pogostejši obliki AB, ki se pojavi po 60. letu, pa gre verjetno za preplet genetskih dejavnikov, dejavnikov okolja in življenjskega sloga (5). Najbolj znan genetski faktor tveganja je gen APOE, ki modulira sintezo apolipoproteina E. Obstaja v 3 oblikah, kjer alel APOE ϵ 4 poveča verjetnost za nastanek AB. Prisoten je pri 40% primerov vseh bolnikov z AB (9, 10).

Na molekularni ravni pri AB pride do akumulacije nepravilno zvitih proteinov, ki pripeljejo do oksidativnega stresa in vnetnih procesov. Končni rezultat je okvara osrednjega živčnega sistema. Med napredovanjem AB se manjša število nevronov (predvsem v holinergičnem sistemu), ekstracelularno se odlagajo peptidi A β , ki se povezujejo v amiloidne fibrile, intracelularno pa pride do akumulacije hiperfosforiliziranega proteina *tau*, ki oblikuje neurofibrilarne pentlje. Zaradi zapletene narave AB so bile predlagane številne teorije o nastanku AB (11-13). Najstarejša je holinergična hipoteza, ki demenco in upad drugih kognitivnih funkcij pripisuje pomanjkanju nevrottransmitterja acetilholina (11). Na tej teoriji temelji delovanje večine zdravil proti AB, ki so danes v uporabi (t. i. inhibitorji acetilholin-esteraz) (14). Po amiloidni hipotezi naj bi peptidi A β v možganih povzročali vnetje, oksidativni stres in hiperfosforilizacijo proteina *tau*, s čimer bi prevzeli odgovornost za razvoj AB. Hipotezo podpira dejstvo, da je potrjeni vzrok za nastanek familiarne oblike AB mutacija genov, ki vplivajo na količino A β . Klasična hipoteza toksičnost pripisuje zrelim amiloidnim fibrilom (12). Ker zmanjševanje koncentracije fibrilov ni zaustavilo napredovanja bolezni, je danes v ospredju prepričanje, da so glavni nosilci toksičnosti oligomeri A β (15,16). Oligomeri A β z insercijo v membrano nevronov ali z akumulacijo v določenih sinapsah povzročijo prerazporeditev sinaptičnih proteinov in hiperaktivnost glutamatnih receptorjev. Posledica je povečan dotok kalcijevih ionov v celico, oksidativni stres in izguba sinaps. Okrnjena komunikacija v končni fazi povzroči smrt nevronov (17-19). Obstaja tudi teorija, ki poškodbe nevronov pripisuje proteinu *tau*. Nastanek neurofibrilarnih pentelj naj bi onemogočil normalno delovanje nevronov, a po amiloidni hipotezi se pentlje pojavijo za agregacijo peptidov A β (12, 20).

Pomemben dejavnik tveganja je tudi starost. Vpletenost v patogenezo AB pojasnjujejo z vnetnimi procesi, višjimi koncentracijami radikalov in zmanjšano količino rasnih hormonov, odgovornih za obnovo nevronov (5). Kompleksnost AB kaže na vpletenost številnih drugih faktorjev tveganja kot so kardiovaskularne bolezni, travmatične poškodbe glave, hormonske motnje, hiperlipidemija, hiperglikemija idr. (1).

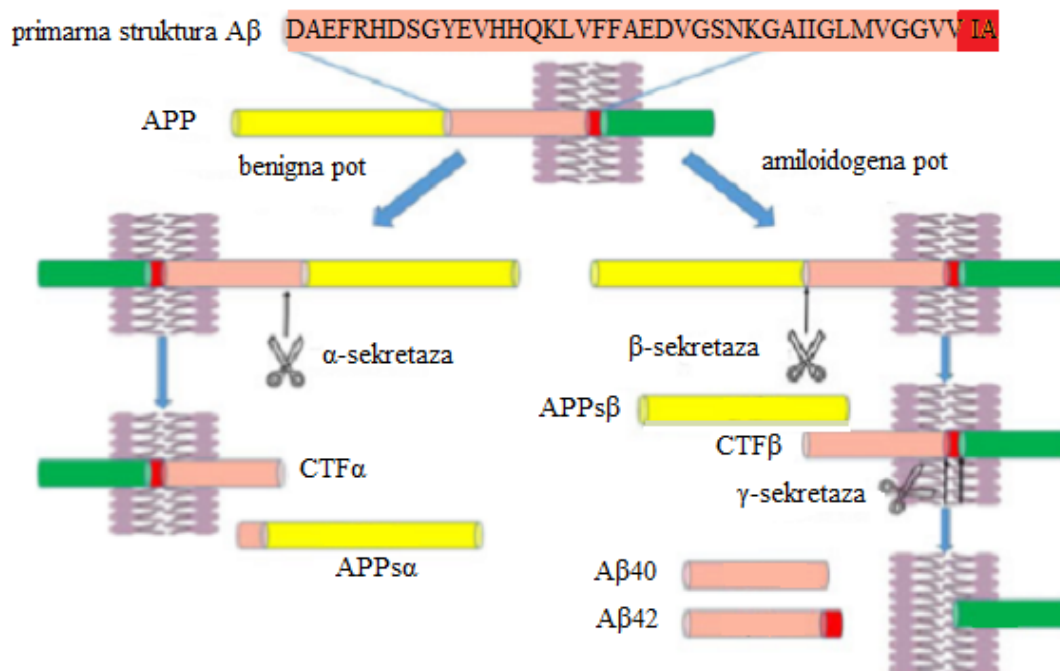
1.3. Patofiziološke spremembe pri Alzheimerjevi bolezni

Alzheimerjevo bolezen opredeljujejo številne patofiziološke spremembe: plaki iz agregatov A β , neurofibrilarne pentlje, masivna izguba celic (predvsem holinergičnih nevronov, a prizadeti so tudi drugi nevrottransmiterski sistemi), nižja koncentracija acetilholina, ekscitotoksičnost, porušena homeostaza kalcija in kovinskih ionov (baker, železo, cink), vnetje nevronov, višje vrednosti ROS in poškodbe mitohondrijev (21, 22).

1.3.1. Peptidi amiloida- β

Nenormalna ekstracelularna akumulacija peptidov A β je ena glavnih patoloških značilnosti Alzheimerjeve bolezni. Do nalaganja peptidov A β v možganih pride zaradi porušenega ravnovesja med sintezo in odstranjevanjem tega peptida, ki je verjetno posledica mutacije genov (geni za APP in sekretaze). A β je agregaciji podvržen polipeptid z 39-43 aminokislinami dolgo verigo (23, 24). Nahaja se v plazemskih membranah, krvi in cerebrospinalni tekočini. Pod fiziološkimi pogoji je topen pri zelo nizkih koncentracijah (10^{-12} - 10^{-10} M) (25, 26). V nizkih koncentracijah mu pripisujejo vlogo rasti nevronov, protimikrobno aktivnost pri prirojenem imunskem odzivu, aktivacijo fosfokinaze in vpletenost v transport holesterola (27-29). A β nastane po amiloidogeni poti proteolize APP s sekretazami (24). Običajno se odstrani iz centralnega živčnega sistema in razgradi na periferiji, pri čemer sodelujejo številne proteaze (30).

APP je transmembranski protein, ki se nahaja predvsem v sinapsah nevronov. Po benigni poti α -sekretaza razreže APP v predelu peptida A β . Sprosti se fragment APP α , C-terminalni ostanek CTF α pa se obdrži v membrani. CTF α razgradi γ -sekretaza, pri čemer se sprosti topni peptid p3, ki nima tendence po agregaciji. Večji del ostane v membrani, kjer interagira z jedrnimi faktorji. Po amiloidogeni poti β -sekretaza odcepi APP β z N-terminalnega konca APP. V membrani ostane C-terminalni fragment CTF β , od katerega γ -sekretaza odcepi amiloid- β (Slika 1). Ker so mesta cepitve različna, nastanejo različno veliki peptidi oziroma izoforme A β (31, 32).



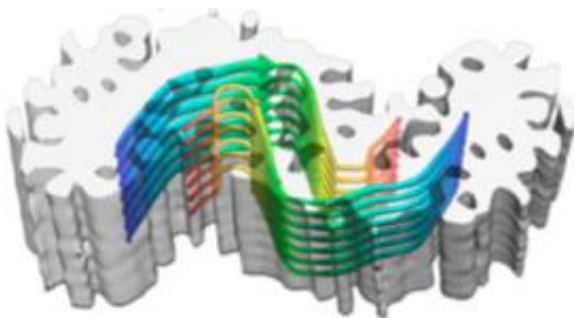
Slika 1: Proteolitični poti APP. Prirejeno in povzeto po Tian Qiu in sod. (33).

Med vsemi izoformami sta najpomembnejši A β 40 in A β 42. V cerebrospinalni tekočini je normalno 50-70% A β v obliki A β 40 in 10% v obliki A β 42 (36). Kljub temu, da se peptida razlikujeta le v 2 aminokislinah, imata različen metabolizem, fiziološke funkcije, toksičnost in agregacijski mehanizem. Peptid A β 42 kaže večjo težnjo k agregiranju, fibrile tvori hitreje, ima večjo toksičnost in je bolj vpleten v patogenezo AB. Je glavna komponenta amiloidnih plakov pri bolnikih z AB (35-37). Zanimivo je, da peptid A β 40 zavira agregacijo peptida A β 42. Določili so, da bi bila za preprečitev citotoksičnih koncentracij fibrilov potrebna vsaj $10 \times$ višja koncentracija A β 40 (38). Kljub temu, da je proces agregacije peptidov A β 40 in A β 42 različen, imajo fibrili obeh vrst izomerov A β primerljivo strukturo. Fiziološko predpostavljajo fibrile, v katerih se mešajo peptidi A β 40 in A β 42, pri čemer prevladuje daljša oblika peptida (39, 40).

Do agregacije peptidov pride zaradi nestabilnosti monomernih oblik A β in vplivov okolja. Ker natančna struktura peptidov A β (razen primarne) ni popolnoma določena, je agregacijski mehanizem težko razumljiv. Dvig koncentracije monomerov A β ali spremembe dejavnikov okolja vplivajo na sekundarno strukturo A β . Ta preide iz naključne konformacije tuljave v intermediat z α -vijačnico (oligomeri) in na koncu do β -ravnine (fibrili). Združevanje oligomerov A β do protofibrilov in fibrilov je posledica hidrofobnih interakcij, vodikovih vezi in nalaganja aromatom (41, 42). Agregati najprej nastajajo s homogeno nukleacijo, katere hitrost je odvisno izključno od koncentracije monomerov. Ko se akumulira nizka, a

kritična koncentracija amiloidnih fibrilov, pa začnejo agregati dominantno nastajati preko s fibrili-katalizirane sekundarne nukleacije. Ta proces je odvisen od koncentracije monomerov in fibrilov, rezultat pa je hitrejša agregacija peptidov A β . Koncentracija agregatov narašča eksponentno do porabe monomerov, oziroma dokler koncentracija agregatov predstavlja majhen delež celotne količine peptidov. Tudi če obvelja hipoteza o nevrotoksičnosti oligomerov, so fibrili tisti, ki katalizirajo njihov nastanek (43). Ko se amiloidnim fibrilom pridružijo še drugi proteini in celični material, nastanejo za AB karakteristični amiloidni plaki. Plaki so normalen proces staranja, a pri AB najdemo večje koncentracije in v specifičnih območjih možganov (entorialna skorja, hipokampus) (5).

Vzdolžno je fibril dvojno simetričen in ima 110 nm dolg spiralni zavoj. Prečno je fibril sestavljen iz dimerov A β , pri katerih so C-terminalni konci v centralnem delu fibrila, kjer oblikujejo β -ravnino (Slika 2). Prameni β -ravnin se nalagajo pravokotno na dolgo os fibrila in oblikujejo prečno β -strukturo fibrila. N-terminalni deli peptidov prečno sestavljajo periferna dela, na katerih specifično urejene stranske verige aminokislin oblikujejo kanal, paralelen na dolgo os fibrila (44-46).



Slika 2: Del fibrila, ki ustreza zloženki 7 dimerov. Prirejeno in povzeto po Matthias Schmidt in sod. (44).

1.3.2. Nevrofibrilarne pentlje

Nevrofibrilarne pentlje so skupki zviti proteinski niti, ki ležijo znotraj nevronov. Glavna sestavina je protein *tau*. V nepatoloških razmerah ima *tau* nalogo stabilizacije mikrotubulov, ki omogočajo učinkovit celični transport. Pri AB toksični peptidi A β spodbujajo aktivnost kinaz, ki so udeležene pri fosforilizaciji proteina *tau*. Ta postane hiperfosforiliziran, zaradi česar se odcepi od mikrotubulov in začne povezovati z drugimi proteini *tau*. Nastanejo nitaste strukture, ki se med seboj pomešajo v nevrofibrilarne pentlje. Med procesom lahko pride do razgradnje mikrotubulov, s čimer se podre intracelularni transport in komunikacija z drugimi nevroni (12, 20).

1.4. Diagnoza Alzheimerjeve bolezni

Absolutna diagnoza A β je možna samo z dokazovanjem prisotnosti amiloidnih plakov pri histopatološkem pregledu možganov bolnika *post mortem*. Klinično se AB diagnosticira s številnimi spominskimi in vedenjskimi testi ter pregledom pacientove zgodovine. Tovrstna diagnoza ima slabo občutljivost in natančnost ter je možna šele ob izraženih simptomih (47, 48).

Trenutno se za diagnozo AB priporoča kombinacija KPSS testa (kratek preizkus spoznavnih sposobnosti), testa cerebrospinalne tekočine za *tau* in A β , pozitronska emisijska tomografija (PET) za plake A β in metabolizem glukoze v možganih ter magnetno resonančno slikanje (MRI) za volumen možganov. Laboratorijski testi, nuklearno slikanje in MRI pri diagnozi AB večinoma služijo izključitvi ostalih vzrokov demence in ne iskanju za AB značilnih patofizioloških sprememb. Možgansko slikanje je še vedno na nivoju raziskovalnih tehnik, pri laboratorijskih preiskavah pa iščejo pomembne biomarkerje AB (5, 48).

Ker napredovala agregacija A β pri AB pripelje do slabšanja kognitivnih funkcij, lahko detekcija amiloidnih plakov pomeni odkritje bolezni pred pojavom simptomov. S specifičnimi označevalci plakov A β je možna zgodnja diagnoza, spremljanje poteka bolezni in uspešnosti terapije (12, 49).

1.4.1. Označevalci fibrilov amiloida- β za nuklearno slikanje

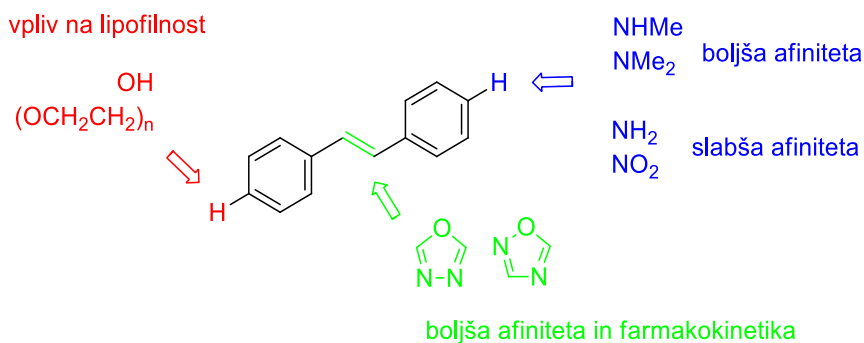
Označevalci fibrilov A β morajo za uporabo *in vivo* imeti naslednje lastnosti (50-53):

- odsotnost naboja,
- nizka molekulska masa (< 650),
- ustrezna lipofilnost ($\log P = 1-3$),
- visoka selektivnost in afiniteta do fibrilov A β ,
- visoka metabolna stabilnost,
- hitra kinetika eliminacije iz možganov in
- nizka toksičnost.

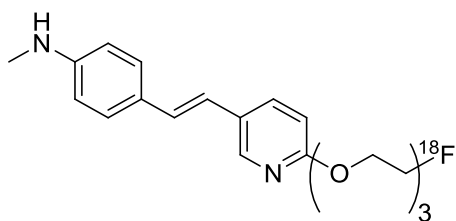
S tem je omogočena penetracija v možgane. Pri previsoki lipofilnosti bi bil prehod skozi HEB še vedno omogočen, a spojina bi vstopala v številne nespecifične interakcije (54).

Osnovo večine označevalcev fibrilov A β predstavljajo močno konjugirana barvila. Barvila tioflavin T, kongo rdeče in krisamin G so fluorescenčno obarvala amiloidne plake, do katerih izkazujejo visoko afiniteto. Njihov naboj jim preprečuje prehod skozi HEB, zaradi česar so te spojine za detekcijo plakov *in vivo* neuporabne (55-57). Trenutno najbolj obetavna metoda detekcije amiloidnih plakov *in vivo* je nuklearno slikanje (PET, SPECT) (58). Označevalce fibrilov, s katerimi je omogočeno nuklearno slikanje *in vivo*, najdemo med derivati halkona, stilbena in tioflavina T (54).

Vključitev terciarnega amina v strukturo halkona in flavona poveča afiniteto do amiloidnih plakov, medtem ko mono- in nemetilirani amini izkazujejo nižjo afiniteto (59, 60). Za derivate stilbena je za vezavo na amiloidne plake ugodna elektron-donorska skupina na obeh koncih stilbenskega ogrodja (Slika 3) (61). Mono- in dimetiliran amin ugodno vpliva na afiniteto, prosti amin in nitro skupina pa jo zmanjšata. Z dodatnimi hidroksilnimi skupinami in etilenoksidnimi enotami lahko kontroliramo lipofilnost spojin s sprejemljivim padcem afinitete do amiloidnih fibrilov (62). Dobro občutljivost, selektivnost in visoko afiniteto, iz družine stilbenskih analogov, izkazujejeta spojini florbetaben ter njegov piridinski analog, florbetapir (63, 64). Florbetapir (Slika 4) je prvo s strani FDA odobreno diagnostično sredstvo (65). Učinkovitost označevalca in farmakokinetične lastnosti se izboljšajo ob zamenjavi etilenskega mostu stilbena s heterociklom (1,2,4- in 1,3,4-oksadiazolom) (66, 67).

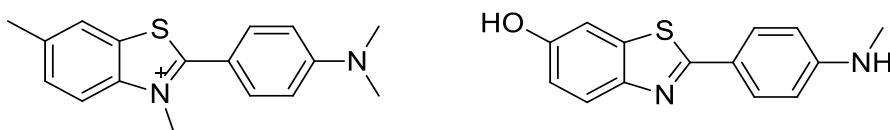


Slika 3: Derivati stilbena kot označevalci fibrilov A β (povzeto po 61, 62, 66, 67).



Slika 4: Označevalec [^{18}F]florbetapir (64).

Z odstranitvijo naboja molekuli tioflavina T (Slika 5) povečamo lipofilnost, s čimer dosežemo permeabilnost skozi HEB. Benzotiazoli sodijo med najbolj obetavne in najbolj raziskane označevalce agregatov A β . Vpeljava sekundarnega ali terciarnega amina izboljša vezavo na fibrile A β , s pripenjanjem hidroksilne skupine pa dosežemo nižjo lipofilnost in s tem boljšo farmakokinetiko (hitrejša eliminacija in manj nespecifičnih vezav). V primeru sekundarnega amina je spojina, zaradi upočasnjene metabolizma, bolj stabilna in manj lipofilna kot pri terciarnem aminu (68). Spojina PIB (Slika 5) velja za enega najuspešnejših označevalcev amiloidnih plakov (69). Potencial kažejo tudi drugi analogi tioflavina T: benzoksazoli, benzofurani, imidazopiridini in benzimidazoli (54).



Slika 5: Označevalca tioflavin T in PIB (54).

Nuklearno slikanje je omogočeno s funkcionalizacijo spojine z radionuklidom. Najpogosteje uporabljena radioaktivna izotopa za PET/SPECT slikanje plakov A β *in vivo* sta ^{11}C ter ^{18}F . Radioaktivni izotopi lahko vplivajo na farmakokinetiko označevalcev in njihovo afiniteto do amiloidnih plakov (54). PET je trenutno najpogosteje uporabljena metoda detekcije amiloidnih plakov. Njeno uporabo omejujejo negativne lastnosti nuklearnega slikanja: kratka življenjska doba in slaba dostopnost radioizotopov, zahtevna sinteza z radioizotopom označenih spojin, visoki stroški, potreba po visoko usposobljenem osebju, dolgotrajna obdelava podatkov in izpostavljenost pacientov radioaktivnosti. Alternativne metode *in vivo* iščemo med tehnikami optičnega slikanja (70).

1.4.2. Označevalci fibrilov amiloida- β za optično slikanje

Uporaba optičnega slikanja postaja vse pogostejša. Pri slikanju lahko uporabimo UV, VIS in IR svetlobo. Za detekcijo agregatov A β so favorizirani označevalci, ki fluorescirajo v območju bližnje IR svetlobe (NIRF označevalci). Emisija v NIR območju (650 - 900 nm) izrazito odstopa od avtofluorescence biološkega materiala, kar je zelo zaželeno pri meritvah *in vivo*. NIRF označevalci imajo tudi globljo penetracijo v tkiva. Optično slikanje ima v primerjavi z nuklearnim manjše stroške, ni izpostavljanja radioaktivnosti, obdelava podatkov je manj zahtevna, resolucija je višja in omogočena je detekcija plakov v realnem času (70, 71).

Poleg splošnih lastnosti označevalca fibrilov *in vivo* (glej podpoglavje 1.4.1.), mora idealni fluorescenčni označevalec fibrilov A β izpolnjevati tudi naslednje pogoje (50-53):

- visok kvantni izkoristek,
- signifikantna sprememba v intenziteti in/ali valovni dolžini fluorescence po vezavi na agregate A β ,
- ustrezna valovna dolžina emisije (valovna dolžina višja od 450 nm minimalizira fluorescenco ozadja možganskega tkiva; za merjenja *in vivo* so idealne vrednosti 650 – 900 nm) in
- enostavna sinteza.

Fluorescenčni označevalci večinoma vsebujejo elektrondonorsko skupino v konjugaciji z elektronakceptorsko, kar imenujemo D- π -A motiv. Motiv je značilen za molekularne rotorje. Fotoekscitaciji spojin z D- π -A motivom sledi relaksacija z emisijo fluorescence in/ali relaksacijo z notranjo molekularno rotacijo, pri kateri ne pride do izstopa fotona. Do rotacije pride okoli σ -vezi, ki povezujejo z elektroni bogate π -sisteme. Te vezi lahko modificiramo s spreminjanjem kemijske strukture in okolja. Če notranjo rotacijo onemogočimo, glavna pot relaksacije postane emisija fluorescence in njena intenziteta se poveča. Predpostavimo lahko, da do ojačitve fluorescence označevalcev ob vezavi na amiloidne fibrile pride zaradi preprečitve ali oviranja proste rotacije molekul (72, 73).

Tudi za nuklearno slikanje primerni označevalci so fluorescenčni označevalci, a ker imajo prenizko valovno dolžino emisije, brez konjugacije z radioaktivnim izotopom niso uporabni za detekcijo fibrilov A β *in vivo*. Nekonjugirane jih lahko uporabimo pri detekciji fibrilov *in vitro* ali *ex vivo*. Večinoma NIRF označevalce iščemo med označevalci z neprimerno valovno dolžino emisije (70). Rdeči premik emisije označevalcev lahko dosežemo z daljšim vmesnim π sistemom spojine z D- π -A motivom (74).

Pri derivatih tioflavina T, stilbena in halkona še niso dosegli ustrezne valovne dolžine fluorescence (70). Ustrezno valovno dolžino emisije imajo nekateri derivati kurkumina, alkatriena, barvila BODIPY in oksazina (Preglednica I) (53, 74-76). Neustrezna valovna dolžina emisije in neprehodnost skozi HEB sta glavna razloga za neuspešnost NIRF označevalcev *in vivo* (70).

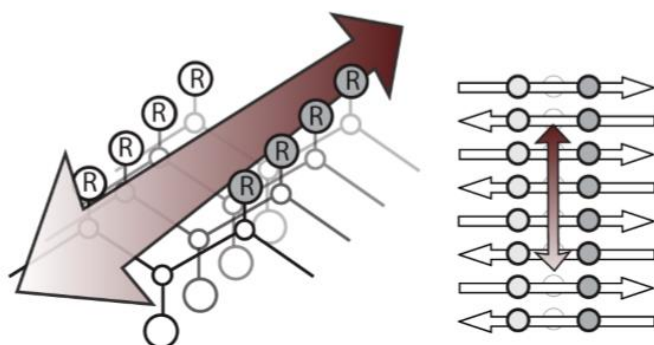
Preglednica I: Nekateri NIRF označevalci fibrilov A β (povzeto po 52, 53, 74-76).

Tipi označevalcev	Struktura	F _{Aβ} /F ₀	logP	λ_{em} (nm)
kurkumini		70	3	805
tiofeni		400	1-3	612
alkatrieni		12	3,37	665
		26	1-3	> 685
analogi BODIPY		visoko	previsok	648
oksazini		nizko	previsok	> 650

1.4.3. Tioflavin T

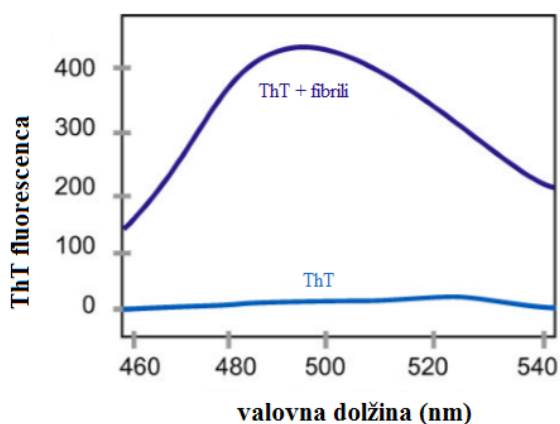
Tioflavin T je zlati standard med fluorescenčnimi označevalci amiloidnih fibrilov. Ob vezavi na amiloidne fibrile se signifikantno ojača fluorescenca in pojavi karakteristični rdeči premik (ekscitacijski maksimum od 385 nm na 450 nm; emisijski maksimum od 445 nm na 482 nm) (55, 77). Za izrazito povečanje fluorescence je odgovorna selektivna imobilizacija določenih konformerov ThT. ThT se obnaša kot molekularni rotor, kjer se v raztopini benzilaminski in benzotiazolski obroč prosto sučeta okoli njune skupne C-C vezi (78). Fotonski ekscitaciji sledi kratkotrajno ekscitirano stanje molekule, zaradi česar je fluorescenčna emisija prostega ThT nizka. Ob vezavi pa je rotacija onemogočena, ekscitacijsko stanje ohranjeno dalj časa, kvantni izkoristek fluorescence pa posledično višji. Vezavno mesto na fibrilih mora zato sterično zakleniti strukturo ThT, da pride do višje emisije (79).

Vezava barvila je povezana s prečno β -strukturo fibrilov (glej podpoglavje 1.3.1.). Barvilo se veže paralelno na dolgo os vlaken, v kanal, ki ga poudarjajo stranske verige aminokislin (Slika 6). Primarno mesto vezave ThT je površina kanalov, bogata z aromatskimi aminokislinami, kjer pride do hidrofobnih interakcij (46, 80). ThT se veže tudi na nefibrilarni material, če ta vsebuje kanalom podobne strukture, z aromatskimi ostanki (79, 81). Do vezave na predfibrilane oblike $A\beta$ ne pride. ThT se strukturno ujema s številnimi zaviralci agregacije $A\beta$, zato je možno, da tudi sam vpliva na formacijo fibrilov (79).



Slika 6: Model kanala in nakazana smer vezave ThT. Prirejeno in povzeto po Matthew Biancalana in sod. (79).

Pri fluorometričnem testu s ThT se z večanjem koncentracije agregatov $A\beta$, večja intenziteta fluorescence ThT (Slika 7). Fluorescenca naraste nad ozadje šele, ko je prisotnih dovolj protofibrilov in fibrilov, torej do detekcije majhnih, prehodnih intermediatov ne pride. Občutljivost metode zmanjša izrazita fluorescenca nevezanega barvila ThT (82, 83). Prednost označevalca je dobra topnost v vodi ter dobra afiniteta do fibrilov. Poleg tega se ThT z enako učinkovitostjo veže na sintetične in biološke fibrile (77, 84).

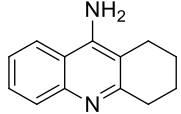
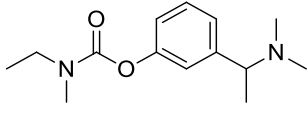
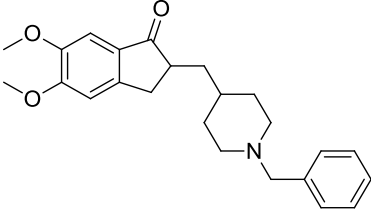
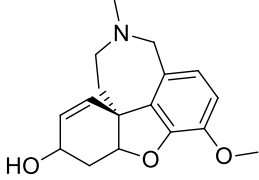


Slika 7: Karakteristična ojačitev fluorescence ThT ob vezavi na amiloidne fibrile. Prirejeno in povzeto po Matthew Biancalana in sod. (79).

1.5. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

Trenutno terapija AB obsega simptomatsko zdravljenje, ki temelji na holinergični hipotezi (Preglednica II) (12). Prva FDA odobrena učinkovina je bil takrin, ki so ga zaradi hepatotoksičnosti umaknili iz klinične uporabe (85). Danes so na voljo trije drugi zaviralci acetilholin-esteraz (donepezil, rivastigmin in galantamin), ki z dvigom acetilholina začasno zaustavijo vpad kognitivnih funkcij. V uporabi je tudi memantin, ki varuje nevrone pred glutamatno ekscitotoksičnostjo. Priporoča se hkratna terapija z memantinom in inhibitorjem acetilholinesteraze. Zaradi pričakovanega dviga v številu obolelih za AB, je razvoj učinkovite terapije izrednega pomena (14, 86).

Preglednica II: Zdravila za zdravljenje AB (87).

Zdravilo	Struktura	Zdravilo	Struktura
takrin		rivastigmin	
donepezil		galantamin	

Kljub zapleteni in nepopolno raziskani patogenezi AB so identificirali številne biološke tarče potencialnih učinkovin: A β protein, protein *tau*, holinergični, glutamatni, serotoninski, histaminski, dopaminski in noradrenalinški sistem ter številne encime (AChE, BuChE, sekretaze, MAO-A, MAO-B). Poleg tega so pri AB prisotni tudi številni procesi: ekscitotoksičnost, oksidativni stres, porušena homeostaza kalcija in težkih kovin, vnetje nevronov in poškodbe mitohondrijev (87-89).

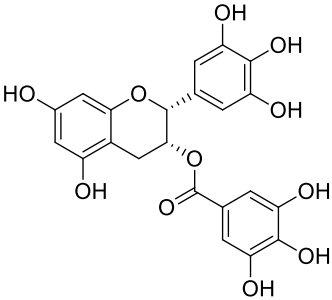
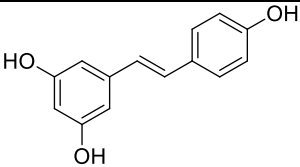
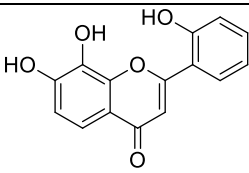
Najobetavnejše smeri v iskanju novih, učinkovitih zdravil za zdravljenje AB vključujejo učinkovine z vplivom na A β (pasivna imunizacija, zaviralci ali modulatorji γ - in β -sekretaz, zaviralci agregacije), protein *tau* (zaviralci fosforilacije, stabilizatorji mikrotubulov, povečana razgradnja *tau*) in antagonistev neurotransmiterskih sistemov (antagonisti 5-HT₆ in H₃ receptorjev) (90). Razvoj učinkovitih zdravil z vplivom na centralni živčni sistem je zapleten, dolgotrajen in v primeru AB poln spodrseljajev. V 10 letih je bilo opravljenih 413

kliničnih raziskav, s strani FDA pa je bil odobren le memantin. Rezultati kliničnih raziskav so večinoma slabše obetavni kot rezultati študij *in vitro*. AB ostaja neozdravljiva (90, 91).

1.5.1. Zaviralci holin-esteraz z antiagregacijskimi lastnostmi

S formacijo fibrilov je povezanih veliko bolezni. Kljub temu, da so za različne bolezni odgovorni različni proteini, jih povezuje z β -ravninami bogata struktura in tvorba fibrilom podobnih agregatov (92, 93). Med najbolj znanimi zaviralci formacije fibrilov je epigalokatehin-3-galat (EGCG), ki je deloval pri β -amiloidu, α -sinukleinu, inzulinu, proteinu *tau*, paratiroidnem hormonu in drugih (94-97). Pri različnih proteinih (tudi $A\beta$) so bili uspešni tudi resverastrol in derivati flavona (Preglednica III) (98-100).

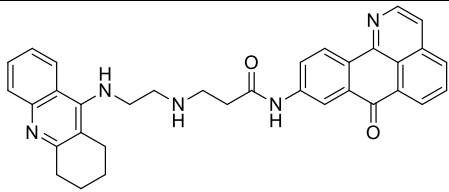
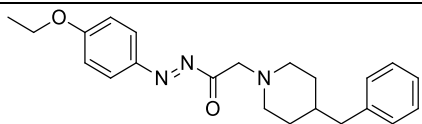
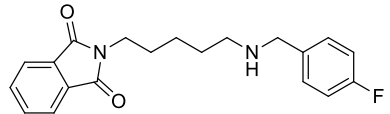
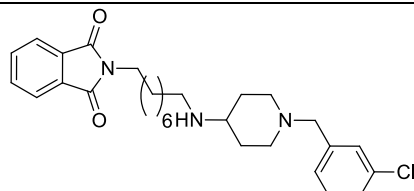
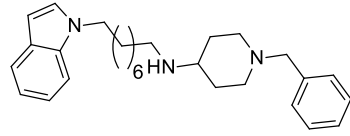
Preglednica III: Inhibitorji fibrilacije številnih proteinov (96, 98, 100).

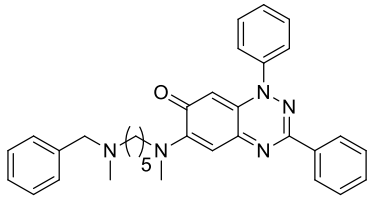
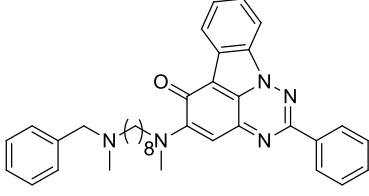
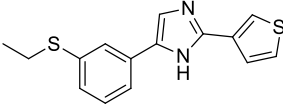
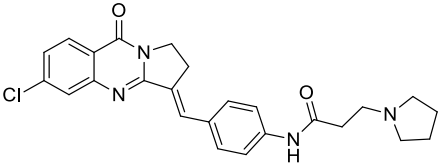
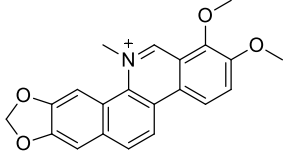
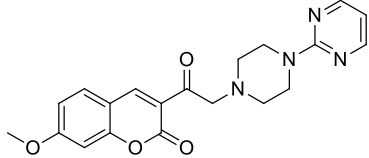
Ime spojine	Struktura
EGCG	
resveratrol	
7,8,2'-trihidroksiflavon	

Zaradi pestre etiologije AB, so najbolj zaželeni učinkovine, ki bi delovale na več bioloških tarč (101, 102). V ospredju so zaviralci holin-esteraz z dodatnimi ugodnimi lastnostmi (antiagregacijske, nevroprotektivne idr.) (103). Za hidrolizo ACh sta odgovorna 2 encima: AChE in BuChE. Sprva je za edino holinergetično tarčo veljala AChE. Številne študije so pokazale, da imata AChE in BuChE tudi nehidrolitične funkcije. Encima regulirata aktivnost drugih proteinov, regionalni cerebralni pretok, fosforilacijo proteina *tau* in formacijo amiloidnih fibrilov. AChE ima normalno večjo vlogo pri hidrolizi ACh. Pri AB njena

aktivnost močno upade, aktivnost BuChE pa se statistično značilno poveča (104-107). AChE ima periferno anionsko (PAS) in katalitično vezavno mesto. Z vezavo A β na PAS nastane kompleks, ki spodbuja agregacijo peptidov A β (108). Spojine, ki interagirajo z obema mestoma, so potencialni zaviralci tega encima ter zaviralci agregacije A β (109, 110). Struktura multifunkcionalnih učinkovin je heterodimerna in vsebuje kombinacijo originalnih ali že obstoječih farmakoforov. Obetavni so derivati takrina, donepezila, benzotriazinona, diarilimidazola idr. (Preglednica IV) (87). Pri donepezilskih derivatih daljši vmesnik med arilalkilaminom in heterocikličnim fragmentom ugodno vpliva na zaviranje holin-esteraz in zaviranje agregacije. Verjetno se je spojina lažje prilegala obema vezavnima mestoma encima (111).

Preglednica IV: Inhibitorji esteraz in zaviralci agregacije A β (87, 103, 111).

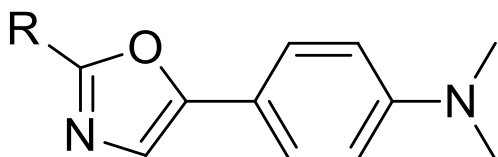
Tip spojine	Struktura	Zaviranje holin-esteraz	Zaviranje agregacije
derivati takrina		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ = 3,4 nM <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 110 nM	spontana A β ₁₋₄₂ = 79,8% pri 10 μ M AChE-ind. A β ₁₋₄₀ = 83,3% pri 100 μ M
derivati donepezila		<i>hAChE</i> IC ₅₀ = 53,1 μ M <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 67,3 μ M	spontana A β ₁₋₄₀ = 80% pri 100 μ M
		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ = 0,2 μ M <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ (pri 10 μ M inh. < 50%)	spontana A β ₁₋₄₂ = 66,0% pri 10 μ M
		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ (pri 100 μ M inh. < 60%) <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 0,7 μ M	spontana A β ₁₋₄₂ = 72, 5% pri 10 μ M
		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ = 29,6 μ M <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 0,93 μ M	spontana A β ₁₋₄₂ = 76,5% pri 10 μ M

benzotriazinoni		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ = 1,5 μM <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 1,9 μM	Aβ ₁₋₄₀ IC ₅₀ = 1,4 μM
diazafluorantetroni		<i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 0,025 μM	Aβ ₁₋₄₀ IC ₅₀ = 1,4 μM
diarilimidazoli		<i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 0,10 μM	Aβ ₁₋₄₀ IC ₅₀ = 5,8 μM
isaindigotoni		<i>EeAChE</i> IC ₅₀ = 41 nM <i>EqBuChE</i> IC ₅₀ = 3,82 μM	spontana Aβ ₁₋₄₀ = 62,3% pri 10 μM
isokinolini		<i>hAChE</i> IC ₅₀ = 1,54 μM <i>hBuChE</i> IC ₅₀ = 10,34 μM	spontana Aβ ₁₋₄₀ IC ₅₀ = 79,8% pri 10 μM AChE-ind. Aβ ₁₋₄₀ = 65% pri 10 μM
kumarini		<i>EeAChE</i> = 29% pri 2 μM <i>EqBuChE</i> = 11% pri 10 μM	spontana Aβ ₁₋₄₂ IC ₅₀ = 1 μM

2. NAMEN DELA

Cilj naše magistrske naloge je sinteza novih fluorescenčnih označevalcev fibrilov A β ter vrednotenje potencialnih označevalcev A β in zaviralcev agregacije A β .

Najprej bomo sintetizirali nove fluorescenčne označevalce, katerih struktura bo temeljila na označevalcih, ki so jih sintetizirali raziskovalci Fakultete za farmacijo. Gre za označevalce dimetilaminfeniloksazol aromatskih analogov (Slika 8).



Slika 8: Osnovna struktura sintetiziranih označevalcev.

Celotno serijo novih potencialnih označevalcev bomo ovrednotili, tako da bomo spojinam najprej posneli absorpcijske spektre in emisijske spektre pri različnih valovnih dolžinah ekscitacije, kjer nas zanima optimalna ekscitacijska valovna dolžina. Nato bomo preverili ali se spojine vežejo na fibrile A β . Ob vezavi pričakujemo signifikantno ojačitev fluorescence glede na fluorescenco spojine same. Določili bomo povezavo med strukturo in učinkovitostjo testiranih označevalcev. Fluorescenčno odzivnost bomo določili tudi v odvisnosti od koncentracije označevalca. Glede na del spektra, v katerem bodo spojine fluorescirale, bomo lahko napovedali možnosti njihove uporabe (*in vivo*, *in vitro*).

Testirali bomo tudi 22 potencialnih zaviralcev agregacije A β , sintetiziranih na Fakulteti za farmacijo v Krakovu. Izhajali bomo iz monomerov A β in z uporabo že znanega označevalca fibrilov ThT kontinuirano spremljali proces agregacije. Vrednosti emisije bomo primerjali s fluorescenco ob prisotnosti potencialnih zaviralcev in nato izračunali obseg zaviranja agregacije. Glede na rezultate bomo poskusili ugotoviti povezavo med strukturo zaviralcev in njihovim delovanjem.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Pri opravljanju eksperimentalnega dela v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Merck, Carlo Erba reagents, Sigma-Aldrich). Pri izvajanju nekaterih sinteznih reakcij smo jih predhodno sušili z aktiviranimi siti, oziroma prepihali z argonom. Pri vrednotenju označevalcev fibrilov in zaviralcev agregacije A β smo uporabljali sveže pripravljeno raztopino fibrilarnega pufra, monomere A β ₁₋₄₂, sveže pripravljeno raztopino tioflavina T ter 100% DMSO.

Pri sintezi spojin in biokemijskem vrednotenju smo uporabljali naslednji laboratorijski pribor: laboratorijsko steklovino različnih proizvajalcev, kovinske spatule in žličke, tipse različnih volumnov Sartorius, avtomatske pipete različnih proizvajalcev (Sartorius, Biohit), črne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinami Greiner bio-one in centrifugirke različnih volumnov Eppendorf.

Uporabljene aparature: laboratorijska tehtnica Mettler toledo, rotavapor Büchi B-480 in B-490, magnetno mešalo z gretnjem IKA RCT basic, UV svetilka Lamag cabinet ($\lambda = 254 \text{ nm} / 366 \text{ nm}$), regulator temperature ETS-D4 fuzzy IKA-werke, mikrovalovni reaktor Discover, pH meter MP 220 Mettler toledo, inkubator Vortemp 56 Labnet, mešalo Vibromix 10 in čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4 Biotek.

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali za spremljanje organskih reakcij, za kvalifikacijo produktov ter pri izbiri mobilne faze za kolonsko kromatografijo. Kot stacionarna faza so nam služile TLC plošče proizvajalca Merck, Silica gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na inertnem aluminijastem nosilcu velikosti 20 × 20 cm in z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze so bile različne in so navedene pri posameznih spojinah pri eksperimentalnem delu. Za detekcijo spojin na TLC ploščah smo uporabljali UV-svetlobo pri 254 nm in 366 nm ter različne orositvene reagente, ki so navedeni pri posameznih spojinah.

Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za izolacijo produktov. Stacionarna faza je bil Silikagel 60, z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm, proizvajalca Merck. Kadar produkt ni

bil topen v mobilni fazi smo uporabili metodo suhega nanosa; pred ločbo smo surov produkt raztopili v ustreznem topilu, dodali silikagel (na količino je vplivala masa surovega produkta) in uparili topilo pod nižanim tlakom. Na silikagel adsorbiran surov produkt smo nato prenesli na pripravljeno kromatografsko kolono in izvedli ločbo. Ustrezna topila in mobilne faze, uporabljene pri eluciji, so navedeni pri posameznih spojinah pri eksperimentalnem delu. Da bi izboljšali in pospešili ločbo, smo se posluževali tudi gradientne elucije.

3.2.2. Spektroskopske metode

Spektre jedrske magnetne resonance (NMR) smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo raztapljali v devteriranih topilih DMSO-*d*₆, aceton-*d*₆ in CDCl₃. Uporabljen je bil interni standard TMS. Spektre smo analizirali s programom MestReC 4.7.0.0 proizvajalca Mestrelab Reserch S.L. Oblike vrhov so podane s standardnimi oznakami (s, d, dd in druge), kemijski premiki (δ) v ppm (parts per million), sklopitvene konstante (*J*) pa so podane v Hz (hertzih).

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG Analytical AutoSpec Q mass proizvajalca Micromass z ESI – HRMS ter APCI – HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Pri biokemijskem vrednotenju označevalcev plakov amiloida- β in zaviralcev agregacije tega peptida smo uporabljali mikrotitrski čitalec Synergy H4 Biotek, za obdelavo podatkov pa računalniški program Gen5 ter Excel.

3.2.3. Risanje in poimenovanje spojin

Pri risanju spojin in reakcijskih shem smo uporabili računalniški program ChemDraw Pro 12.0 proizvajalca CambridgeSoft. Za IUPAC poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft. Za iskanje sinteznih postopkov smo uporabljali programsko orodje SciFinder.

3.2.4. Določevanje tališč

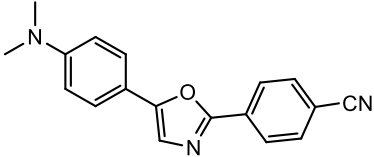
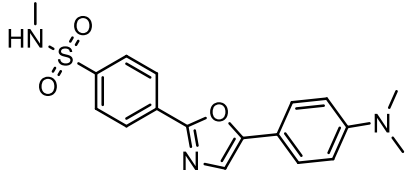
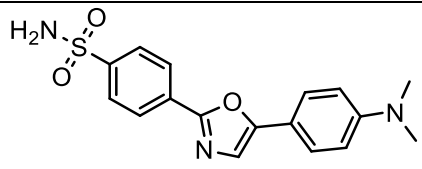
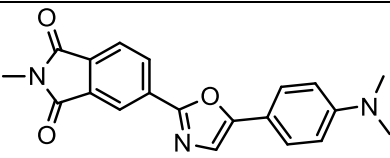
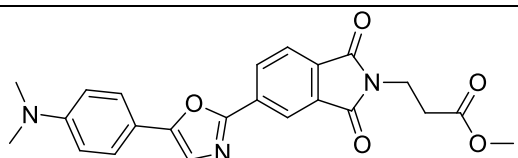
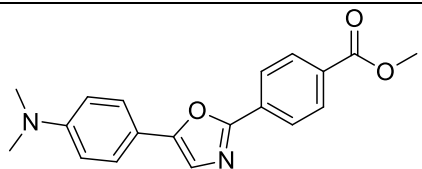
Tališča sintetiziranih spojin smo določili s Koflerjevim mikroskopom. Vrednosti smo podali na interval z obsegom 3 °C natančno.

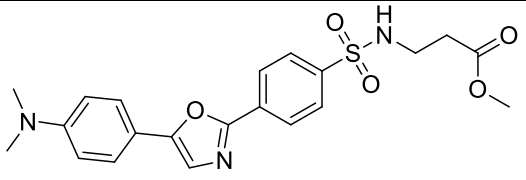
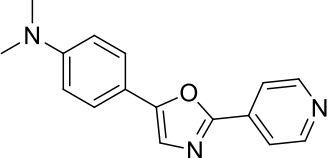
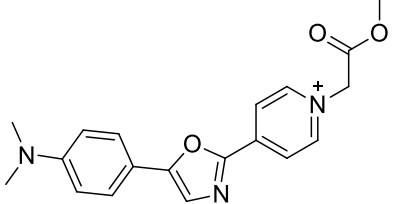
3.2.5. Biokemijsko testiranje

Pri vrednotenju označevalcev fibrilov (OF) in zaviralcev agregacije (ZA) A β smo uporabljali fibrilarni pufer, monomere A β ₁₋₄₂, delno agregirane peptide A β ₁₋₄₂, raztopino ThT ter

DMSO. Za pripravo fibrilarnega pufru (150 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) smo v 1 L destilirane vode raztopili 35,75 g HEPES in 8,77 g NaCl. Dobljeno raztopino smo očistili s filtracijo. Peptide A β smo shranjevali v 500 μ L centrifugirkah v zamrzovalniku. Vsaka centrifugirka je vsebovala 100 μ L 100 μ M A β ₁₋₄₂ v 100% DMSO. Raztopino ThT smo pripravili večkrat z raztapljanjem ustrezne količine ThT v fibrilarnem pufru. Pripravili smo 15 μ M, 12,5 μ M in 14,3 μ M raztopino ThT. Označevalci fibrilov (Preglednica V) so bili v praškasti obliki. Pripravili smo 10 mM raztopine v 100% DMSO. Označevalce fibrilov **28-32** je na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo sintetiziral doc. dr. Stane Pajk, mag. farm.

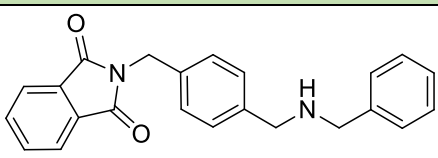
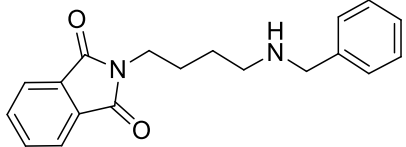
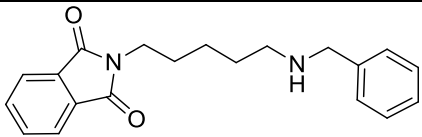
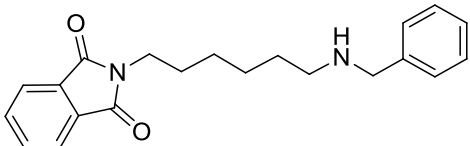
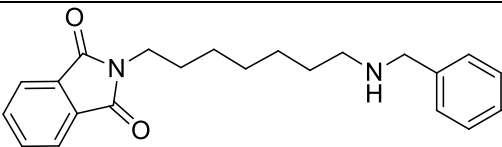
Preglednica V: Fluorescenčni označevalci fibrilov A β , ki smo jih testirali.

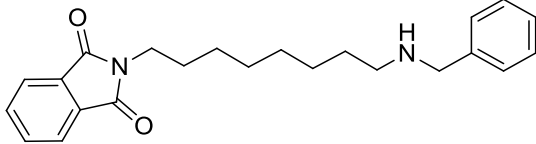
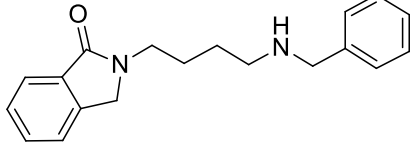
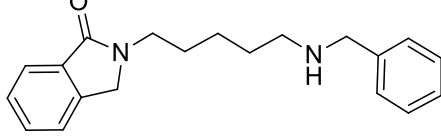
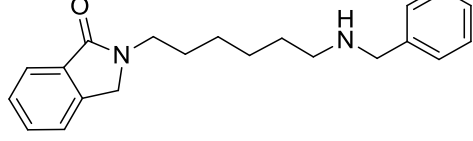
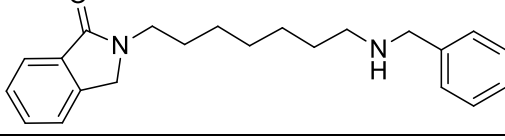
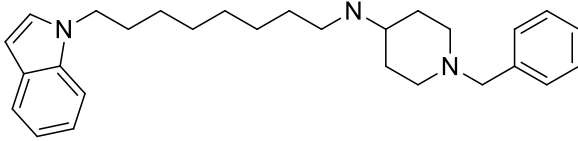
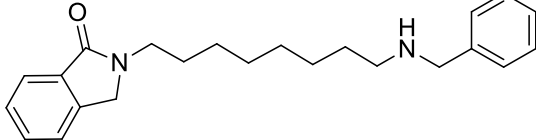
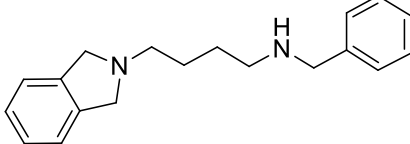
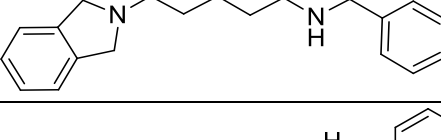
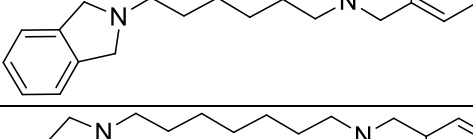
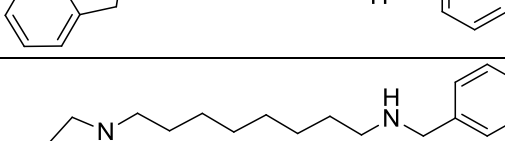
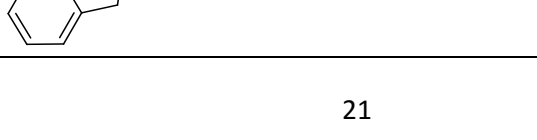
Oznaka OF A β	Strukturna formula	Bruto formula	M (g/mol)
<u>3</u>		C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O	289,33
<u>24</u>		C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	357,43
<u>25</u>		C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	343,40
<u>26</u>		C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	347,37
<u>28</u>		C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₅	419,43
<u>29</u>		C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃	322,36

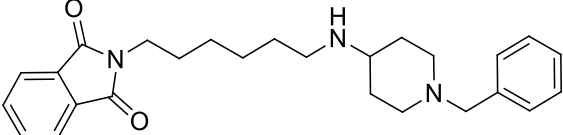
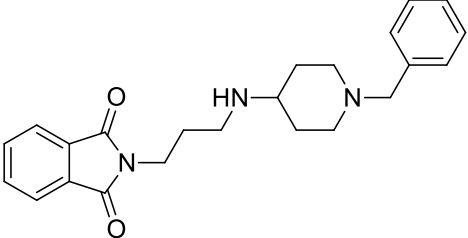
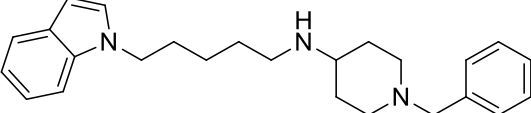
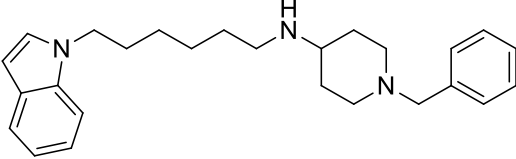
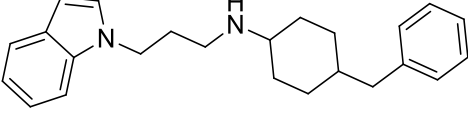
<u>30</u>		$C_{21}H_{23}N_3O_5S$	429,49
<u>31</u>		$C_{16}H_{15}N_3O$	265,31
<u>32</u>		$C_{19}H_{20}N_3O_3$	338,38

Ovrednotili smo tudi 22 potencialnih zaviralcev agregacije A β (Preglednica VI), ki smo jih prejeli v praškasti obliki. Sintetizirali so jih raziskovalci na Fakulteti za farmacijo v Krakovu. Pripravili smo 1 mM raztopine v 100% DMSO.

Preglednica VI: Potencialni zaviralci agregacije, ki smo jih testirali.

Oznaka ZA A β	Strukturna formula	Bruto formula	M (g/mol)
<u>MFR1</u>		$C_{23}H_{20}N_2O_2$	356,42
<u>JRR6</u>		$C_{19}H_{20}N_2O_2$	308,37
<u>JRR10</u>		$C_{20}H_{22}N_2O_2$	322,40
<u>JRR7</u>		$C_{21}H_{24}N_2O_2$	336,43
<u>JRR9</u>		$C_{22}H_{26}N_2O_2$	350,45

<u>JRR8</u>		$C_{23}H_{28}N_2O_2$	364,48
<u>NGR52</u>		$C_{19}H_{22}N_2O$	294,39
<u>NGR62</u>		$C_{20}H_{24}N_2O$	308,42
<u>NGR57</u>		$C_{21}H_{26}N_2O$	322,44
<u>NGR63</u>		$C_{22}H_{28}N_2O$	336,47
<u>AM26</u>		$C_{28}H_{39}N_3$	417,63
<u>NGR64</u>		$C_{23}H_{30}N_2O$	350,50
<u>NGR72</u>		$C_{19}H_{24}N_2$	280,41
<u>NGR67</u>		$C_{20}H_{26}N_2$	294,43
<u>NGR75</u>		$C_{21}H_{28}N_2$	308,46
<u>NGR73</u>		$C_{22}H_{30}N_2$	322,49
<u>NGR76</u>		$C_{23}H_{32}N_2$	336,51

<u>AM1</u>		$C_{26}H_{33}N_3O_2$	419,56
<u>AM5A</u>		$C_{23}H_{27}N_3O_2$	377,48
<u>AM17</u>		$C_{25}H_{33}N_3$	375,55
<u>AM19</u>		$C_{26}H_{35}N_3$	389,58
<u>AM21A</u>		$C_{24}H_{30}N_2$	346,51

Pri vrednotenju smo uporabljali čitalec Synergy H4 Biotek, ki omogoča spremljanje sprememb vzorcev na mikrotitrskih ploščah. Združuje dva optična sistema, zaradi česar je omogočena uporaba filtrov in monokromatorjev. Omogoča detekcijo fluorescence, fluorescenčne polarizacije, časovno zamaknjene fluorescence, luminiscence in absorbance. Sprejema širok spekter modelov plošč. Dva injektorja omogočata dodajanje reagentov brez odpiranja mizice. Pripravi vzorcev služi robot Precision XS, ki na mikrotitrski plošče pipetira avtomatsko (112).

3.2.5.1. Vrednotenje označevalcev fibrilov amiloida- β

Najprej smo izvedli fluorometrični test s ThT za ugotovitev stanja peptidov. Odmrznili smo epico z raztopino 100 μ L 100 μ M A β , ki se je v zmrzovalniku nahajal 6 mesecev. Dodali smo 900 μ L fibrilarnega pufra in tako dobili 1 mL 10 μ M A β v 10% DMSO. Končni volumen vzorčne, slepe vzorčne in slepe reagenčne raztopine v vdolbinah mikrotitrski plošče je znašal 100 μ L. Priprava raztopin in končne koncentracije A β , ThT ter DMSO so podani v Preglednici VII. Zapisane volumne smo odpipetirali direktno na mikrotitrsko ploščo. Pogoji meritve so bili sobna temperatura, srednje močno kontinuirano tresenje, valovna dolžina ekscitacije pri 440 nm in meritev fluorescence 12 h pri 490 nm na 3 minutne intervale.

Preglednica VII: ThT test za ugotovitev stanja peptidov.

	VZOREC	REAGENČNA SLEPA	VZORČNA SLEPA
priprava raztopin	10 μ L A β v 10% DMSO 10 μ L 10% DMSO 80 μ L 15 μ M ThT	10 μ L A β v 10% DMSO 10 μ L 10% DMSO 80 μ L fibrilarnega pufra	20 μ L 10% DMSO 80 μ L 15 μ M ThT
končne koncentracije	1 μ M A β 12 μ M ThT 2% DMSO	1 μ M A β 2% DMSO	12 μ M ThT 2% DMSO
število paralelek	24	8	4

Sledila je določitev optimalne ekscitacijske valovne dolžine. V vdolbine mikrotitrne plošče smo odpipetirali 1 μ L 1 mM OF v 100% DMSO ter 99 μ L fibrilarnega pufra, za slepo vzorčno raztopino pa 10 μ L 10% DMSO ter 90 μ L fibrilarnega pufra. Na plošči smo imeli po 1 paralelko vzorca za vsak OF v končni koncentraciji 10 μ M in 1% DMSO ter 4 paralelke slepe vzorčne raztopine z 1% DMSO. Pripravljenim raztopinam smo posneli absorpcijske spektre v območju 250 – 700 nm. Nato smo posneli še emisijske spektre pri različnih valovnih dolžinah ekscitacije (280 – 440 nm v intervalu po 20 nm).

Sledil je test vezave označevalcev na fibrile A β . Test temelji na primerjavi intenzitete fluorescence raztopin z označevalcem fibrilov z raztopinami označevalca ob fibrilih. Pripravljene 10 mM raztopine označevalcev smo 10 \times redčili z DMSO. Centrifugirko z delno agregiranimi peptidi A β ₁₋₄₂ smo vzeli iz zamrzovalnika in jo 12 h stresali v inkubatorju pri sobni temperaturi. Priprava mikrotitrne plošče je opisana v Preglednici VIII. Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo pomerili ob različnih časih ($t_0 = 0$ min, $t_1 = 30$ min, $t_2 = 60$ min, $t_3 = 90$ min, $t_4 = 24$ h). Raztopinam smo izmerili emisijske spektre pri predhodno določeni ekscitacijski valovni dolžini, v območju od $\lambda_{ex} + 20$ nm do 700 nm. Fluorescenčno intenziteto smo merili s spektralnim skeniranjem, optično z monokromatorji in pri sobni temperaturi. Postopek smo ponovili na 2 mikrotitrskih ploščah, spojine **3**, **24**, **25** in **26** ločeno od spojin **28-32**. Označevalce smo ovrednotili na podlagi koeficienta (k_{Fmax}) in razlike (ΔF_{max}) med največjo fluorescenco vzorčne raztopine (F_{max2}) in največjo fluorescenco slepe reagenčne raztopine (F_{max1}).

Preglednica VIII: Test vezave označevalcev fibrilov.

	VZOREC	REAGENČNA SLEPA	TOPILO	VZORČNA SLEPA
priprava raztopin	10 μ L 100 μ M A β v 100% DMSO 1 μ L 1 mM OF v 100% DMSO 89 μ L fibrilarnega pufra	1 μ L 1 mM OF v 100% DMSO 99 μ L fibrilarnega pufra	10 μ L 10% DMSO 90 μ L fibrilarnega pufra	10 μ L 100 μ M A β v 100% DMSO 10 μ L 10% DMSO 80 μ L fibrilarnega pufra
končne koncentracije	10 μ M A β 10 μ M OF 11% DMSO	10 μ M OF 1% DMSO	1% DMSO	10 μ M A β 11% DMSO
število paralelek	1 za vsak OF	1 za vsak OF	1	1

Za označevalce, ki so bili pri testu vezave uspešni ($k_{F_{max}} > 1$ ter $\Delta F_{max} > 0$), smo test ponovili z nižjo koncentracijo A β ter z raztopinami označevalcev v različnih koncentracijah. Pripravljene 10 mM raztopine označevalcev smo s 100% DMSO redčili do raztopin s končnimi koncentracijami 3 mM, 1 mM, 300 μ M, 100 μ M, 30 μ M in 10 μ M. Na ploščo smo odpipetirali 1 μ L vsake od 7 raztopin z različnimi koncentracijami posameznega označevalca. Testirali smo spojine **3**, **24**, **25**, **29**, **30** in **31**. Dodali smo tudi 10 μ L 10% DMSO in 89 μ L fibrilarnega pufra, s čimer smo dobili slepo reagenčno raztopino z različnimi končnimi koncentracijami posameznega označevalca (100 μ M, 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 300 nM ali 100 nM) in 2% DMSO. Vzorčnim raztopinam smo namesto 10 μ L 10% DMSO dodali 10 μ L 10 μ M A β v 10% DMSO, katerega končna koncentracija na plošči je bila 1 μ M. Za kontrolo smo na ploščo nanesti tudi samo topilo (20 μ L 10% DMSO in 80 μ L fibrilarnega pufra) in slepo vzorčno raztopino (10 μ L 10 μ M A β v 10% DMSO, 10 μ L 10% DMSO in 80 μ L fibrilarnega pufra). Vsako raztopino smo na mikrotitrsko ploščo nanesti v 1 paralelki. Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo pomerili ob različnih časih ($t_0 = 0$ min, $t_1 = 30$ min, $t_2 = 60$ min, $t_3 = 90$ min). Raztopinam smo pomerili emisijske spektre pri predhodno določeni ekscitacijski valovni dolžini, v območju od $\lambda_{ex} + 20$ nm do 700 nm. Fluorescenčno intenziteto smo merili s spektralnim skeniranjem, optično z monokromatorji in pri sobni temperaturi. Postopek priprave peptidov A β in pogoji merjenja fluorescence so

bili enaki, kot pri predhodno opisanem testu vezave. Rezultate smo podali kot k_{av} in ΔF_{av} . Izračunali smo jih po naslednjem postopku:

1. določitev maksimalne emisije za vzorce in reagenčne slepe pri merjenju ob vsakem času (dobili smo F_{max2} in F_{max1} ob različnih časih),
2. izračun koeficientov (k_{Fmax}) med največjo fluorescenco vzorčne raztopine (F_{max2}) in največjo fluorescenco slepe reagenčne raztopine (F_{max1}) ob različnih časih ter izračun povprečja F_{max1} in F_{max2} ob različnih časih (dobili F_{av1} in F_{av2}),
3. določitev povprečja vseh k_{Fmax} (k_{av}) ter izračun ΔF_{av} po formuli $F_{av2} - F_{av1}$.

3.2.5.2. Vrednotenje zaviralcev agregacije amiloida- β

Delovanje zaviralcev agregacije smo določili s fluorometričnim testom s ThT. Merili smo intenziteto fluorescenco kontinuirane agregacije monomerov $A\beta_{1-42}$ ob prisotnosti zaviralcev in brez njih. Izvedli smo več neodvisnih meritev emisije pri 490 nm za vse zaviralce agregacije. Fluorescenco smo merili pri sobni temperaturi 24 h ter z valovno dolžino ekscitacije 440 nm. Mikrotitrsko ploščo smo vsakič pripravili znova. Odmrznili smo epico s 100 μ L 100 μ M $A\beta$. Dodali smo 4,9 mL fibrilarnega pufra in dobljeno raztopino s pomočjo pipete previdno premešali. Dobljena raztopina je vsebovala 2 μ M $A\beta$ v 2% DMSO. Pripravljene raztopine zaviralcev agregacije smo 10 \times redčili s fibrilarnim pufrom. Dobljene raztopine so vsebovale 100 μ M ZA v 10% DMSO. Nadaljnja priprava mikrotitrskih plošč je opisana v Preglednici IX.

Preglednica IX: ThT test delovanja zaviralcev agregacije pri sobni temperaturi.

	VZOREC	VZORČNA SLEPA
priprava raztopin	10 μ L 100 μ M ZA v 10% DMSO 50 μ L 2 μ M $A\beta$ v 2% DMSO 40 μ L 15 μ M ThT	10 μ L 10% DMSO 50 μ L 2 μ M $A\beta$ v 2% DMSO 40 μ L 15 μ M ThT
končne koncentracije	10 μ M ZA 1 μ M $A\beta$ 6 μ M ThT 2% DMSO	1 μ M $A\beta$ 6 μ M ThT 2% DMSO

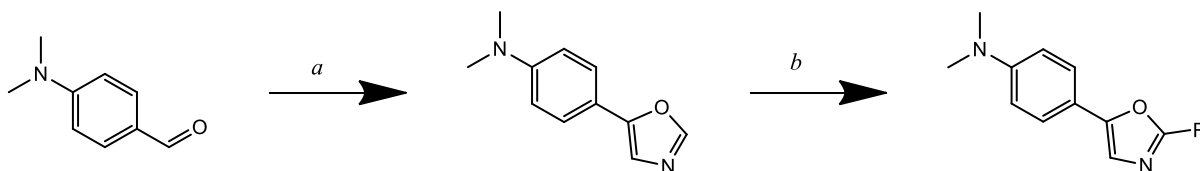
število paralelk	4 za vsak ZA	8
---------------------	--------------	---

Izvedli smo tudi več neodvisnih meritev za vse zaviralce agregacije pri 37 °C. Priprava mikrotitrskih plošč se je razlikovala le v tem, da smo dodajali po 40 µL 12,5 µM ThT, zato so končne raztopine vsebovale 5 µM ThT. Rezultate smo podali kot obseg zavrte agregacije. Do rezultatov smo prišli po naslednjem postopku:

1. izračun povprečja intenzitete fluorescence vseh paralelk za vzorce in vzorčno slepo ob času t_1 (čas, ko je intenziteta fluorescence najnižja; nastajanje fibrilov je v začetnih fazah) in času t_2 (čas, ko je intenziteta fluorescence najvišja; dosežena je končna koncentracija fibrilov),
2. določitev razlike med povprečno intenziteto fluorescence ob času t_2 in povprečno intenziteto fluorescence ob času t_1 za vzorce in vzorčno slepo po formulah $\Delta F_{vz} = F_{vz2} - F_{vz1}$ ter $\Delta F_{sl} = F_{sl2} - F_{sl1}$,
3. izračun obsega zavrte agregacije po formuli $\left(1 - \frac{\Delta F_{vz}}{\Delta F_{sl}}\right) \times 100\%$.

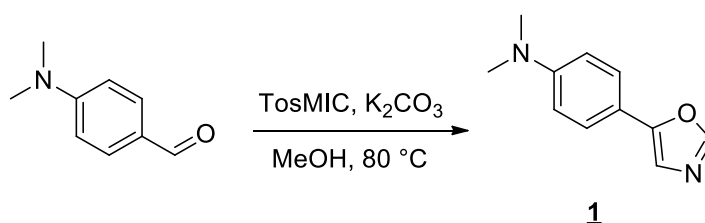
4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Dvostopenjska sinteza dimetilaminfeniloksazol aromatskih analogov – označevalcev fibrilov amiloida- β



Slika 9: Shema dvostopenjske sinteze označevalcev.

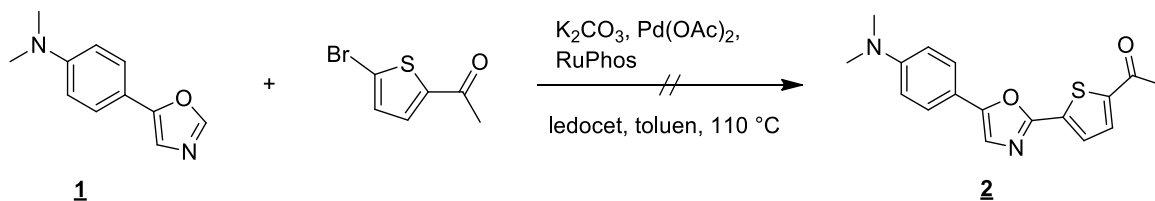
4.1.1. Sinteza *N,N*-dimetil-4-(oksazol-5-il)anilina (*a*)



4-(dimetilamino)benzaldehyd (5,0 g; 33,5 mmol) smo raztopili v 150 ml metanola in dodali tozilmetilizocianid (7,2 g; 36,9 mmol) in kalijev karbonat (9,2 g; 67,0 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 3 ure pod pogoji refluxa (80 °C). Nato smo pri znižanem tlaku uparili MeOH, preostanek zmesi pa ohladili na ledeni kopeli ter po dodatku vode (100 mL) mešali 20 minut. Nastalo oborino smo filtrirali z odsesavanjem ter posušili v sušilniku.

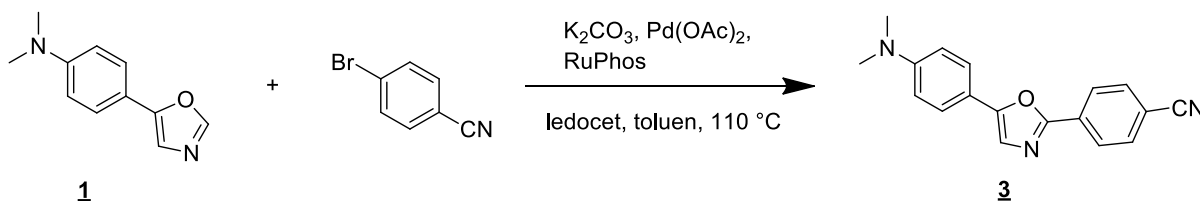
IUPAC ime: <i>N,N</i> -dimetil-4-(oksazol-5-il)anilin	
IZGLED	rumeno-rjavi kristali
IZKORISTEK	89%
TALIŠČE	119-122 °C
R _f	0,38 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)
OROSITVENI REAGENT	fosfomolibdenska kislina
¹ H - NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 2,95 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,75 – 6,80 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,39 (s, 1H, H-4' oksazol), 7,50 – 7,55 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,29 (s, 1H, H-2' oksazol)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₁₁ H ₁₂ ON ₂ : 188,09 izmerjena vrednost [M + (H)] ⁺ (m/z): 189,04

4.1.2. Neuspešen poskus sinteze 1-(5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)tiofen-2-il)etan-1-ona (b)



V visokotlačno vialo smo natehtali oksazol **1** (0,56 g; 3,0 mmol), 2-acetil-5-bromotiofen (0,31 g; 1,5 mmol), K_2CO_3 (0,62 g; 4,5 mmol), katalizator Pd(OAc)_2 (0,0017 g; 0,075 mmol), ligand RuPhos (0,070 g; 0,15 mmol) in aktivirana uprašena molekularna sita (0,5 g; 4 Å). Vialo smo 15 min prepihovali z argonom ter nato dodali brezvodno očetno kislino (34 μL , 0,6 mmol) in toluen (7 mL). Vialo smo zatesnili in jo potopili v oljno kopel, predhodno ogreto na 110 °C, za 12 h. Reakcijski zmesi smo po končani reakciji odfiltrirali usedlino ter uparili toluen pri znižanem tlaku. TLC analiza (MF: etilacetat/heksan = 1/2) reakcijske zmesi je pokazala kompleksno mešanico produktov, zaradi česar z izolacijo nismo nadaljevali.

4.1.3. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)benzonitrila (b)

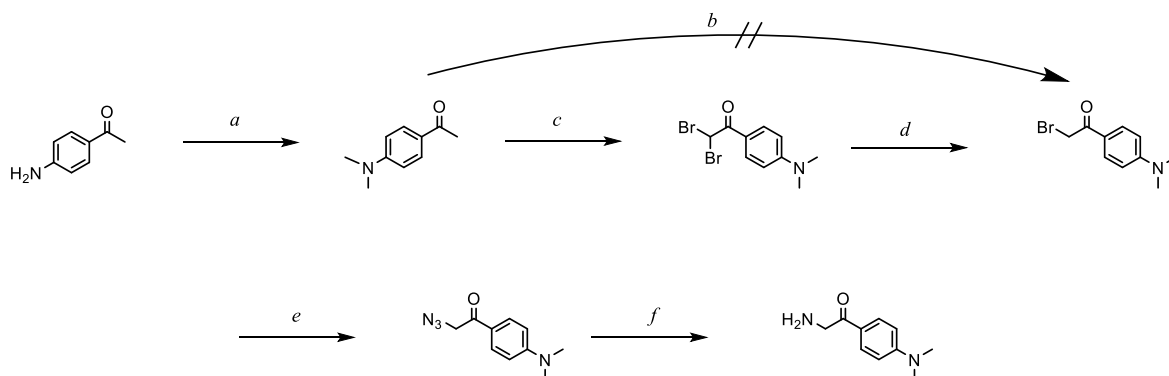


V visokotlačno vialo smo natehtali oksazol **1** (0,56 g; 3,0 mmol), 4-bromobenzonitril (0,27 g; 1,5 mmol), K_2CO_3 (0,62 g; 4,5 mmol), katalizator Pd(OAc)_2 (0,0017 g; 0,075 mmol) in ligand RuPhos (0,070 g; 0,15 mmol). Vialo smo prepihali z argonom, dodali ledocet (34 μL , 0,6 mmol), aktivirana uprašena molekularna sita (0,5 g; 4 Å) in toluen (7 mL). Zatesnjeno vialo smo potopili v oljno kopel, predhodno ogreto na 110 °C, za 24 h. Nato smo reakcijsko zmes filtrirali in filtratu uparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan, od 1/6 do 1/3).

IUPAC ime:	
<i>4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)benzonitril</i>	
IZGLED	rumeni kristali
IZKORISTEK	43%
TALIŠČE	118-121 °C
Rf	0,17 (MF: etilacetat/heksan = 1/4)

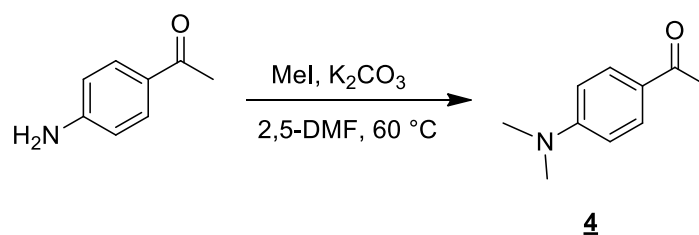
¹H - NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 2,94 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,60 – 6,73 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,21 (s, 1H, H-4' oksazol), 7,45 – 7,52 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,61 – 7,67 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,02 – 8,09 (m, 2H, 2 × Ar-H)
ESI - HRMS	izračunano za C ₁₈ H ₁₆ N ₃ O [M + (H)] ⁺ (m/z): 290,1293 izmerjena vrednost (m/z): 290,1300

4.2. Petstopenjska sinteza arilnega 2-aminoetanona



Slika 10: Shema sinteze arilnega 2-aminoetanona.

4.2.1. Sinteza 1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (a)

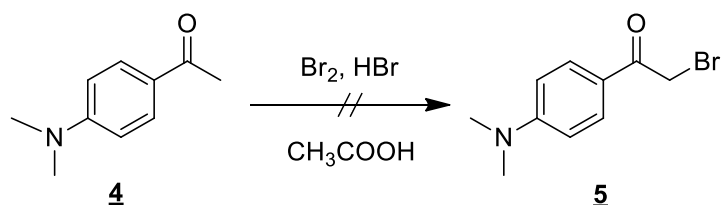


1-(4-aminofenil)etan-1-on (25,0 g; 184,97 mmol) smo raztopili v 2,5-DMF (150 mL). Dodali smo K₂CO₃ (56,2 g; 406,9 mmol), zatesnili bučko ter jo prepihali z argonom. Nato smo po kapljicah dodali MeI (25,3 mL; 406,93 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na oljni kopeli 48 h pri 60 °C. Zmes smo zlili v hladno vodo (150 mL) ter jo 30 minut hladili na ledeni kopeli. Nastalo oborino smo filtrirali z odsesavanjem in jo sprali z vodo (30 mL). Produkt smo sušili v sušilniku do konstantne mase.

IUPAC ime: <i>1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-on</i>	
IZGLED	svetlo rumeni prašek
IZKORISTEK	61%
TALIŠČE	100-103 °C; literatura 105 °C (118)
Rf	0,30 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)

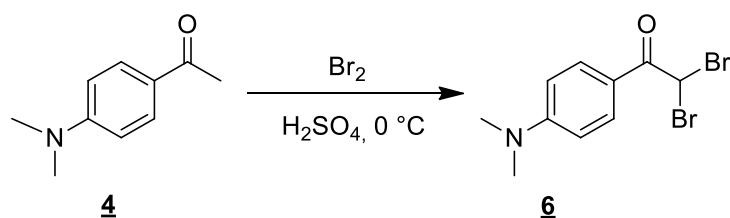
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 2,43 (s, 3H, CH ₃ CO), 3,02 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,70 – 6,74 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,77 – 7,82 (m, 2H, 2 × Ar-H)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₁₀ H ₁₃ NO: 163,10 izmerjena vrednost [M + (H)] ⁺ (m/z): 164,03

4.2.2. Neuspešen poskus sinteze 2-bromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (b)



Spojino **4** (6,0 g; 36,8 mmol) smo raztopili v CH₃COOH, dodali 30% raztopino HBr v očetni kislini (6 mL; 110,4 mmol) ter počasi po kapljicah Br₂ (2,3 mL; 44,1 mmol). Reakcijsko zmes smo nato pustili mešati 16 h pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo zlili v vodo, izpadlo oborino filtrirali z odsesavanjem ter oborino sprali z vodo (3 × 30 mL). Glede na TLC analizo smo dobili kompleksno zmes produktov. Poskusili smo z drugim postopkom sinteze spojine **5**, opisanem v naslednjih dveh podpoglavjih (4.2.3. in 4.2.4.).

4.2.3. Sinteza 2,2-dibromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (c)

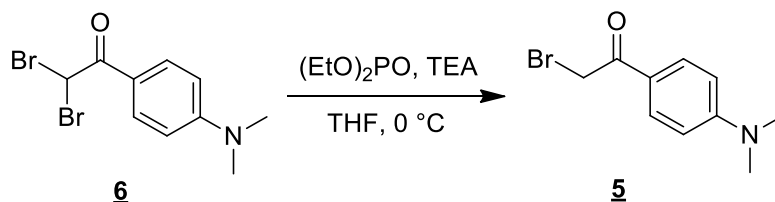


Spojino **4** (19,7 g; 120,8 mmol) smo raztopili v 100% H₂SO₄ (120 mL) ter ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo dodali Br₂ (6,4 mL; 124,42 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 24 h. Reakcijsko zmes smo zlili na mešanico ledu in vode in nastalo oborino filtrirali z odsesavanjem.

IUPAC ime: <i>2,2-dibromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-on</i>	
IZGLED	rumeni kristali
Rf	0,30 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)
TALIŠČE	147-150 °C; literatura 155-156 °C (119)

¹H - NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ (ppm) = 3,10 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,65 – 6,71 (m, 2H, 2 × Ar-H), 6,70 (s, 1H, COCHBr ₂), 7,96 – 8,00 (m, 2H, 2 × Ar-H)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₁₀ H ₁₁ NOBr ₂ : 318,92 ustrezna ni bila nobena izmerjena vrednost

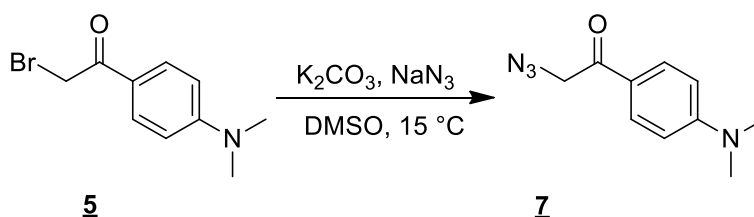
4.2.4. Sinteza 2-bromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (d)



Spojino **6** (22,2 g; 160,1 mmol) smo raztopili v THF (100 mL) in ohladili na ledeni kopeli. Ob mešanju reakcijske zmesi smo z odmernim kapalnikom po kapljicah dodajali raztopino (EtO)₂PO (9,4 mL; 72,8 mmol) in TEA (10,1 mL; 72,8 mmol) v THF (100 mL). Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi pustili mešati 16 h. Pri znižanem tlaku smo nato uparili približno polovico THF, preostalo raztopino pa zlili v vodo ohlajeno na ledeni kopeli. Izpadli produkt smo filtrirali z odsesavanjem.

IUPAC ime: <i>2-bromo-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-on</i>	
IZGLED	temno oranžni kristali
Rf	0,26 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)
TALIŠČE	126-129 °C
OROSITVENI REAGENT	ninhidrin
¹H - NMR (400 MHz, CDCl ₃):	δ (ppm) = 3,08 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 4,36 (s, 2H, COCH ₂ Br), 6,63 – 6,68 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,86 – 7,91 (m, 2H, 2 × Ar-H)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₁₀ H ₁₂ NOBr: 241,01 ustrezna ni bila nobena izmerjena vrednost

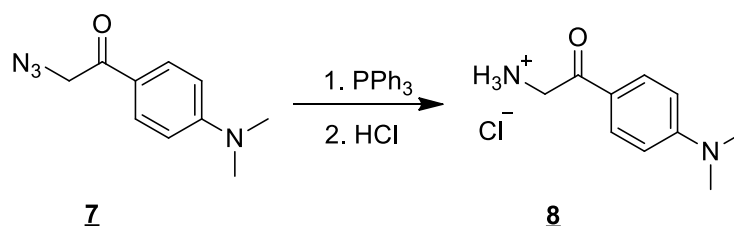
4.2.5. Sinteza 2-azido-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (e)



Spojino **5** (6,9 g; 28,49 mmol) smo raztopili v DMSO (50 mL) ter dodali K₂CO₃ (5,8 g; 42,09 mmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na 15 °C in med mešanjem počasi dodajali NaN₃ (3,7 g; 56,9 mmol). Po 30 minutah smo dodali vodo (100 mL) in ekstrahirali produkt z etilacetatom (2 × 50 mL). Združeni organski fazi smo sprali z vodo (2 × 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 50 mL), sušili nad Na₂SO₄ ter uparili topilo pri znižanem tlaku.

IUPAC ime: <i>2-azido-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-on</i>	
IZGLED	rumenkast prašek
IZKORISTEK	43%
Rf	0,30 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃):	δ (ppm) = 3,07 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 4,44 (s, 2H, COCH ₂ N ₃), 6,62 – 6,68 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,76 – 7,82 (m, 2H, 2 × Ar-H)

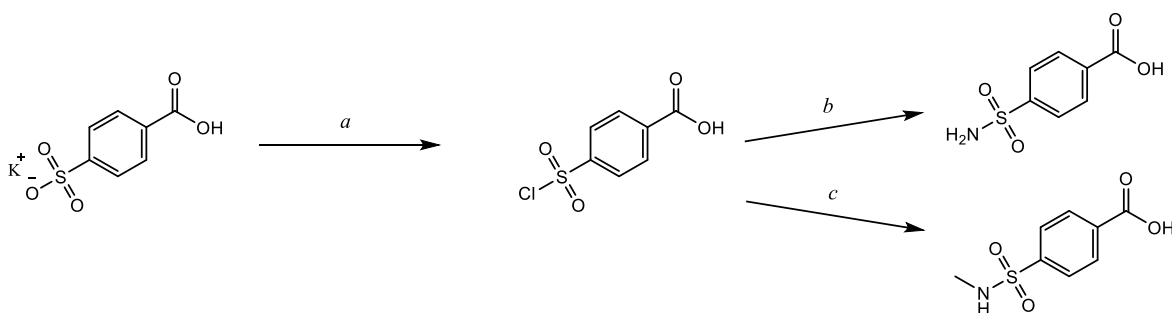
4.2.6. Sinteza 2-amino-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-ona (*f*)



Azid **7** (2,4 g; 11,8 mmol) smo raztopili v THF (50 mL) in med mešanjem dodali PPh₃. Reakcijsko zmes smo nato segreli na 50 °C za 30 min, nato pa dodali vodo (30 mL) in 1 M HCl (23,5 mL; 23,5 mmol). Po 30 minutah smo pri znižanem tlaku uparili približno polovico topila, ostanek pa sprali z etilacetatom (3 × 30 mL). Vodno fazo smo uparili in surov produkt uporabili v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

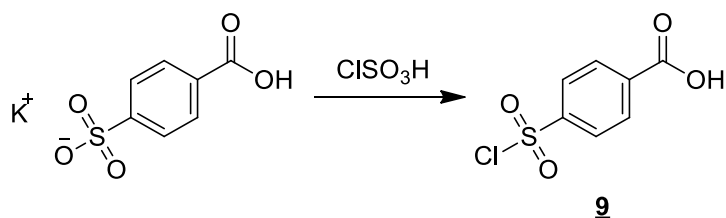
IUPAC ime: <i>2-amino-1-(4-(dimetilamino)fenil)etan-1-on</i>	
IZGLED	rdeče-rjavi kristali
IZKORISTEK	96%
TALIŠČE	234-237 °C
Rf	0,58 (MF: diklorometan/metanol = 9/1 + nekaj kapljic Et ₃ N)
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃):	δ (ppm) = 3,04 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 4,34 – 4,41 (q, J = 5,6 Hz, 2H, NH ₃ ⁺ NH ₂ CO), 6,73 – 6,78 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,80 – 7,06 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,32 – 8,39 (m, 3H, NH ₃ ⁺ CH ₂ CO)

4.3. Sinteza sulfamoilov



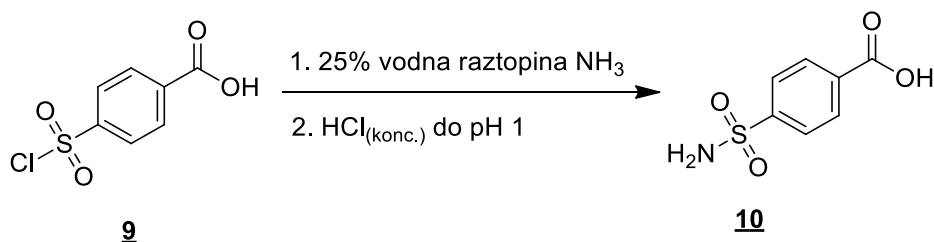
Slika 11: Shema sinteze sulfamoilov.

4.3.1. Sinteza 4-(klorosulfonil)benzojske kisline (a)



V bučko smo odmerili klorosulfonsko kislino (40 mL) in jo ohladili na ledu. Med mešanjem smo nato dodali kalijevo sol 4-sulfobenzojske kisline (6 g; 25,0 mmol) in pustili mešati 12 h. Zmes smo zlili na led ter izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem. Surov produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

4.3.2. Sinteza 4-sulfamoilbenzojske kisline (b)

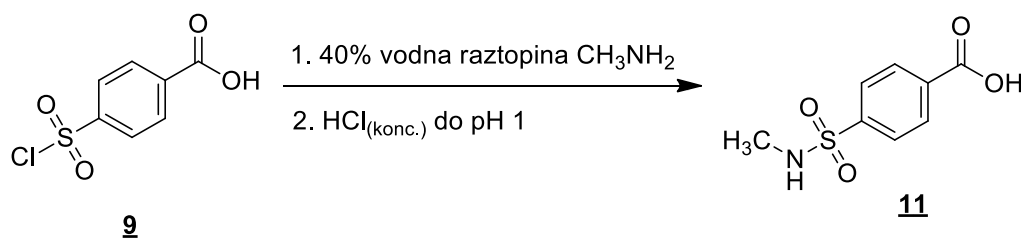


Spojino **9** (6,3 g oz. približno 1/2 neposušenega produkta predhodne stopnje, opisane v podpoglavju 4.3.2., prisotnost vode smo zanemarili; 29,0 mmol) smo dodali k 25% vodni raztopini NH_3 (15,8 mL; 232,0 mmol) ter dobljeno raztopino mešali 30 minut na ledeni kopeli. Reakcijsko zmes smo nakisali s koncentrirano HCl do pH 1 ter jo ohladili na ledeni kopeli. Produkt smo filtrirali z odsesavanjem, oborino sprali z vodo in posušili v sušilniku.

IUPAC ime: <i>4-sulfamoilbenzojska kislina</i>	
IZGLED	beli prašek

IZKORISTEK	33%
TALIŠČE	242-245 °C
Rf	0,29 (MF: diklorometan/metanol = 20:1)
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 7,57 (s, 2H, NH ₂ SO ₂), 7,91 – 7,97 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,06 – 8,13 (m, 2H, 2 × Ar-H), 12,70 – 14,00 (bs, 1H, COOH)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₇ H ₇ NO ₄ S: 201.01 izmerjena vrednost [M - (H)] ⁻ (m/z): 199,95

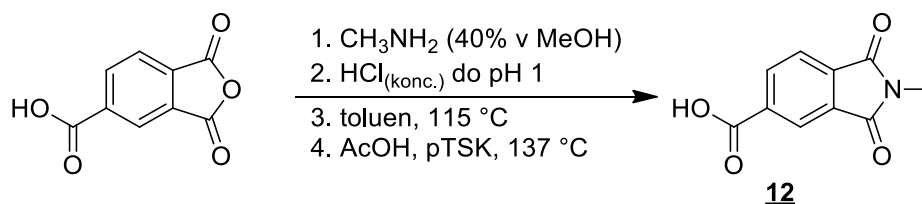
4.3.3. Sinteza 4-(*N*-metilsulfamoil)benzojske kisline (*c*)



Spojino **9** (6,4 g oz. približno 1/2 neposušenega produkta predhodne stopnje, opisane v podglavju 4.3.2., prisotnost vode smo zanemarili; 29,0 mmol) smo dodali k 40% vodni raztopini CH₃NH₂ (18 mL; 232,0 mmol) ter dobljeno raztopino mešali na ledeni kopeli. Po 30 minutah smo s koncentrirano HCl uravnali pH na 1. Nato smo izpadlo oborino filtrirali z odsesavanjem, oborino sprali z vodo ter posušili v sušilniku.

IUPAC ime: <i>4-(N-metilsulfamoil)benzojska kislina</i>	
IZGLED	beli prašek
IZKORISTEK	39%
TALIŠČE	227-230 °C
Rf	0,31 (MF: diklorometan/metanol = 20:1)
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 2,44 (d, 3H, CH ₃ NHSO ₂), 7,60 – 7,67 (q, <i>J</i> = 4,8 Hz, 1H, CH ₃ NHSO ₂), 7,86 – 7,91 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,11 – 8,17 (m, 2H, 2 × Ar-H), 12,60 – 13,90 (bs, 1H, COOH)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₈ H ₉ NO ₄ S: 215,03 izmerjena vrednost [M - (H)] ⁻ (m/z): 214,07

4.4. Sinteza 2-metil-1,3-diokso-5-isoindolinkarboksilne kisline



V bučko smo odmerili 40% metanolno raztopino CH₃NH₂ (7 mL; 90,15 mmol), jo ohladili na ledeni kopeli in med mešanjem dodali 4-karboksiftalanhidrid (3,46 g; 18,03 mmol). Topilo smo nato uparili pod znižanim tlakom, produkt pa nakisali s koncentrirano HCl do pH 1 ter ohladili na ledeni kopeli. Nastalo oborino smo filtrirali z odsesavanjem, oborino sprali z vodo (2 × 20 mL) in posušili v sušilniku. Oborino smo nato suspendirali v toluenu (50 mL) in pustili mešati 24h pri pogojih refluxa pri 115 °C. Topilo smo uparili pri znižanem tlaku.

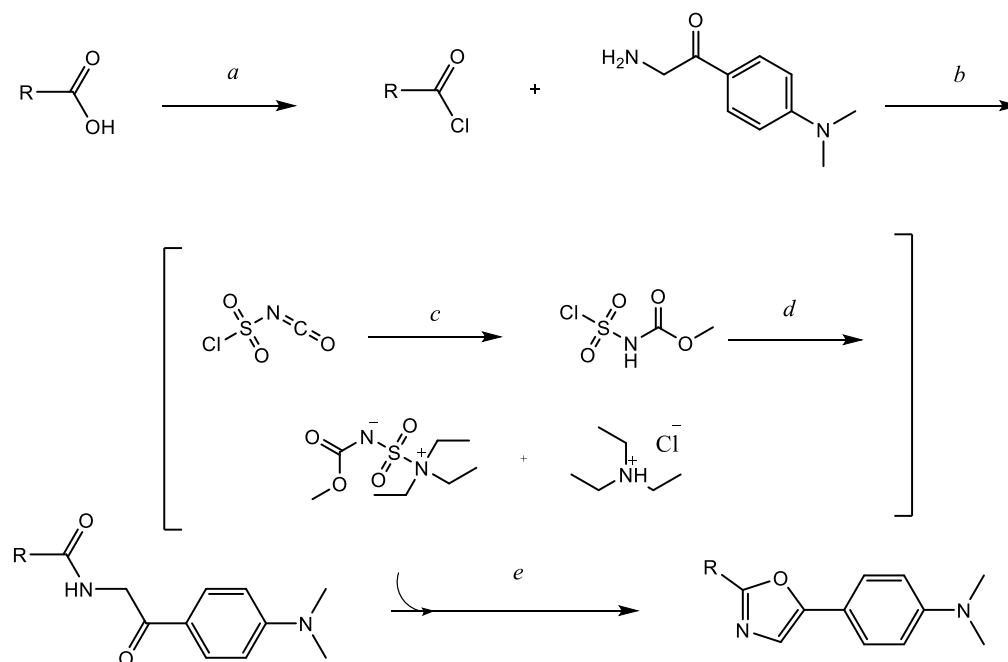
Glede na NMR analizo je bilo prisotnega več kot 60% produkta z odprtim obročem. Produkt smo zato raztopili v CH₃COOH (10 mL) ter dodali katalitično količino *para*-toluensulfonske kisline (10 mg). Reakcijsko mešanico smo mešali pri pogojih refluxa (137 °C) 20 h. Reakcijsko zmes smo ohladili, dodali vodo (30 mL), pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem.

IUPAC ime:	
<i>2-metil-1,3-diokso-5-isoindolinkarboksilna kislina</i>	
IZGLED	beli kristali
IZKORISTEK	67% (pred sekundarnim ciklanjem -4)
TALIŠČE	218-221 °C
Rf	0,14 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 3,05 (s, 3H, CON(CH ₃)CO), 7,93 – 7,98 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,8 Hz, 1H, Ar- <u>H</u>), 8,17 – 8,20 (dd, <i>J</i> ₁ = 1,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,8 Hz, 1H, Ar- <u>H</u>), 8,30 – 8,35 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, 1H, Ar- <u>H</u>), 12,90 – 14,40 (bs, 1H, COOH)
APCI - HRMS	izračunana monoizotopska masa za C ₁₀ H ₇ NO ₄ : 205,04 izmerjena vrednost [M + (H)] ⁺ (m/z): 205,94

4.5. Zadnje tri stopnje sinteze dimetilaminfeniloksazol aromatskih analogov – označevalcev fibrilov amiloida-β

Zadnje tri stopnje sinteze končnih spojin **24-27** smo izvedli po enakem postopku (Slika 12, Preglednica X). V predhodnih stopnjah pridobljenim spojinam **10-12** in 5-metiltofен-2-karboksilni kislini smo aktivirali karboksilno skupino na arilnem obroču, nato smo tvorili

amide z aminom **8** ter pretvorili dobljene β -ketoamide v oksazolske derivate (uspešni z Burgessovim reagentom, neuspešni s POCl_3).



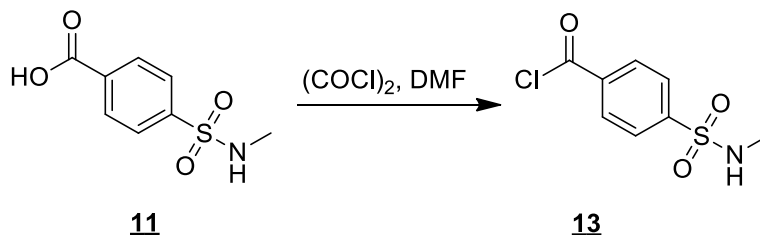
Slika 12: Shema zadnjih stopenj sinteze označevalcev z Burgessovim reagentom.

Preglednica X: Različni substituenti končnih označevalcev.

R	Oznaka spojina	Struktura končnih spojin
	<u>24</u>	
	<u>25</u>	
	<u>26</u>	
	<u>27</u>	

4.5.1. Sinteza aromatskih acil kloridov

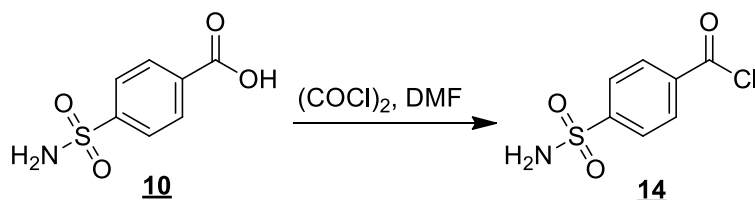
4.5.1.1. Sinteza 4-(*N*-metilsulfamoil)benzoil klorid (*a*)



Spojino **11** (0,5 g; 2,33 mmol) smo suspendirali v DCM (10 mL) in dodali kapljico DMF. Suspenzijo smo ohladili na ledeni kopeli in po kapljicah dodali še oksalil klorid (0,3 mL; 3,5 mmol.). Na ledeni kopeli smo pustili mešati 10 minut, nato 10 minut pri sobni temperaturi ter 10 minut pri pogojih refluxa (50 °C). DCM in presežen oksalil klorid smo uparili pri znižanem tlaku. Surov produkt smo takoj porabili v naslednji stopnji.

IUPAC ime: <i>4-(N-metilsulfamoil)benzoil klorid</i>	
IZGLED	rjavkasta voskasta snov
IZKORISTEK	v naslednji stopnji upoštevamo 100%

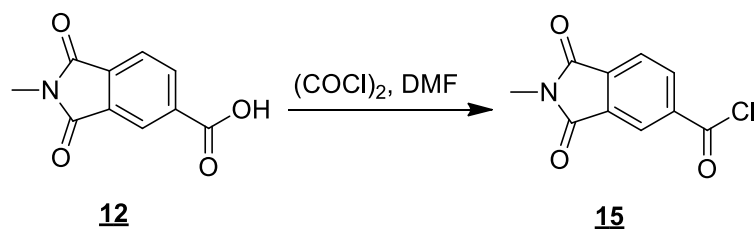
4.5.1.2. Sinteza 4-sulfamoilbenzoil klorida (*a*)



Postopek je enak sintezi spojine **13** (glej 4.5.1.1.).

IUPAC ime: <i>4-sulfamoilbenzoil klorid</i>	
IZGLED	rjava voskasta snov
IZKORISTEK	v naslednji stopnji upoštevamo 100%

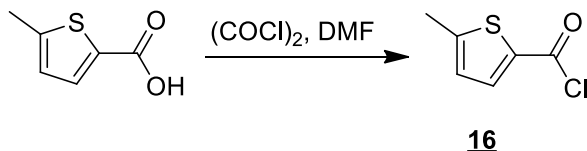
4.5.1.3. Sinteza 2-metil-1,3-dioksoisindolin-5-karbonil klorida (*a*)



Postopek je enak sintezi spojine **13** (glej 4.5.1.1.).

IUPAC ime: <i>2-metil-1,3-dioksoisindolin-5-carbonil klorid</i>	
IZGLED	bel prašek
IZKORISTEK	v naslednji stopnji upoštevamo 100%

4.5.1.4. Sinteza 5-metiltiofen-2-karbonil klorida (a)

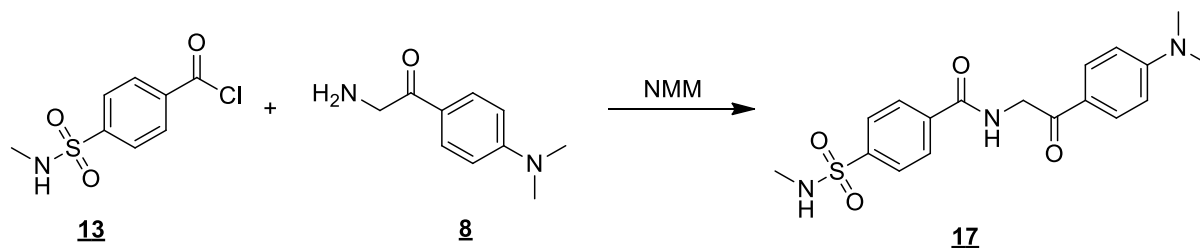


Postopek je enak sintezi spojine **13** (glej 4.5.1.1.).

IUPAC ime: <i>5-metiltiofen-2-karbonil klorid</i>	
IZGLED	beli prašek
IZKORISTEK	v naslednji stopnji upoštevamo 100%

4.5.2. Sinteza 2-acilaminoketonov

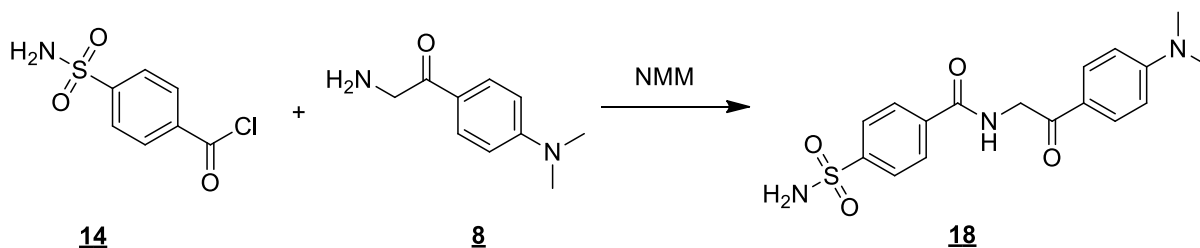
4.5.2.1. Sinteza *N*-(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-(*N*-metilsulfamoil)benzamid (b)



Spojino **8** (0,34 g; 1,92 mmol) smo raztopili v DCM (10 mL), dodali *N*-metilmorfolin (0,63 ml; 5,75 mmol) ter močno stresali. Med mešanjem na ledeni kopeli smo dodali v DCM (10 mL) raztopljen kislinski klorid **13** (0,54 g; 2,3 mmol; ob predpostavki, da je bil izkoristek sinteze spojine **13** 100%). Po 5 minutah mešanja na ledeni kopeli smo reakcijsko zmes pustili mešati preko noči na sobni temperaturi. Organsko fazo smo nato spirali z vodo (2 × 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 50 mL), 0,5M HCl (2 × 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 50 mL) ter jo sušili nad Na₂SO₄. Po filtraciji smo filtrat uparili pri znižanem tlaku. Surov produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

IUPAC ime: <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-(<i>N</i> -metilsulfamoil)benzamid	
IZGLED	rjavkasta nehomogena voskasta snov
IZKORISTEK	75%
Rf	0,65 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)

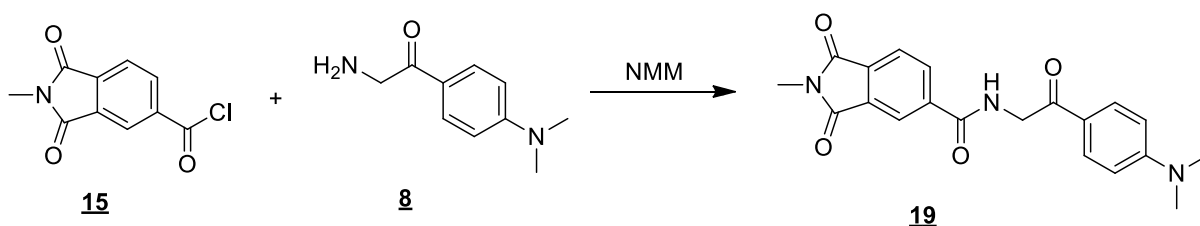
4.5.2.2. Sinteza *N*-(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-sulfamoilbenzamida (b)



Postopek je enak sintezi spojine **17** (glej 4.5.2.1.).

IUPAC ime: <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-4-sulfamoilbenzamid	
IZGLED	sivo-rjavi kristali
IZKORISTEK	48%
Rf	0,66 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)

4.5.2.3. Sinteza *N*-(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-2-metil-1,3-dioksoisindoli-5-karboksamida (b)

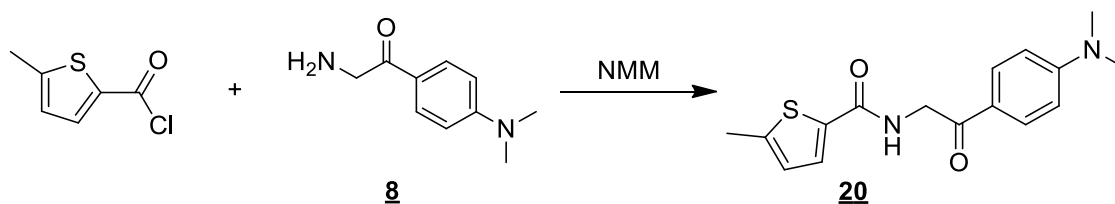


Postopek je enak sintezi spojine **17** (glej 4.5.2.1.).

IUPAC ime: <i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-2-metil-1,3-dioksoisindolin-5-karboksamid	
IZGLED	sivo-rjavi kristali
IZKORISTEK	84%
Rf	0,73 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)

4.5.2.4. Sinteza *N*-(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-5-metiltiofen-2-karboksamida

(b)

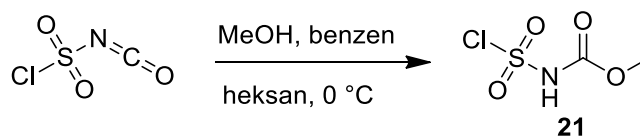


Postopek je enak sintezi spojine **17** (glej 4.5.2.1.).

IUPAC ime:	
<i>N</i> -(2-(4-(dimetilamino)fenil)-2-oksoetil)-5-metiltiofen-2-karboksamid	
IZGLED	rjava voskasta spojina
IZKORISTEK	33%
Rf	0,51 (MF: diklorometan/metanol = 20/1)

4.5.3. Dvostopenjska sinteza Burgessovega reagenta

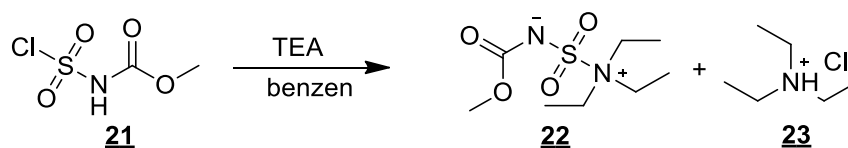
4.5.3.1. Sinteza metil(klorosulfonil)karbamata (c)



Klorosulfonilizocianat (3,65 mL; 40,0 mmol) smo raztopili v benzenu (20 mL) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Med mešanjem smo dokopavali raztopino MeOH (2,04 mL; 50,4 mmol) v benzenu (3 mL). Po 30 minutah mešanja na ledeni kopeli smo dodali heksan (50 mL), zmes ohladili ter uparili topilo pri znižanem tlaku.

IUPAC ime:	
<i>metil(klorosulfonil)karbamat</i>	
IZGLED	brezbarvni kristali
IZKORISTEK	v naslednji stopnji upoštevamo 100%

4.5.3.2. Sinteza Burgessovega reagenta (d)



Spojino **21** (6,9 g; 40,0 mmol; ob predpostavki, da je bil izkoristek sinteze spojine **21** 100%) smo raztopili v benzenu (60 mL) ter ji počasi dokopavali v benzenu (30 mL) raztopljen TEA

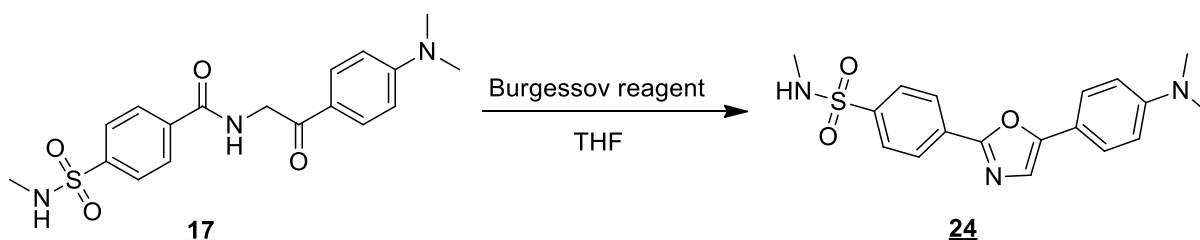
(12,45 mL; 90,0 mmol). Po 30 minutah mešanja smo reakcijsko zmes filtrirali, filtrat pa uparili pri znižanem tlaku. Produkt smo prepihali z argonom in ga v zatesnjeni bučki hranili v zamrzovalniku.

IUPAC ime: <i>metil(karboksisulfamoil)trietilamonijev hidroksid</i>	
IZGLED	sivi kristali (oblika iglic)
IZKORISTEK	62%
TALIŠČE	literatura 70-72 °C (132)

4.5.4. Sinteza 2,5-disubstituiranih oksazolov z Burgessovim reagentom

4.5.4.1. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-*N*-metilbenzensulfonamida

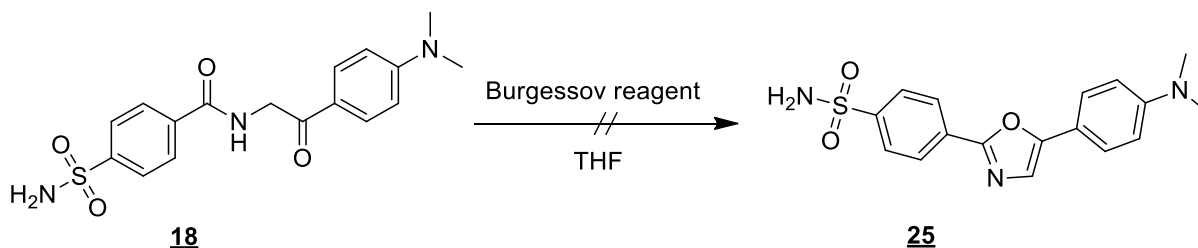
(e)



V visokotlačno vialo smo natehtali **17** (0,40 g; 1,07 mmol), brezvoden THF (7 mL) ter Burgessov reagent (spojina **22**; 0,51 g; 2,13 mmol). Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in vstavili v mikrovalovni reaktor za 20 minut pri 90 °C. Po končani reakciji smo zmes prenesli v bučko ter uparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan 1/2 proti 1/1).

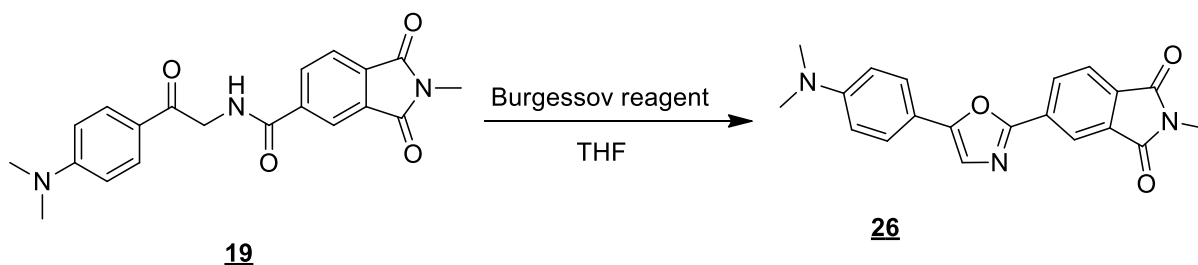
IUPAC ime: <i>4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-N-metilbenzensulfonamid</i>	
IZGLED	rumeni kristali
IZKORISTEK	21%
R_f	0,23 (MF: etilacetat/heksan = 1/2)
TALIŠČE	164-167 °C
¹H - NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 2,60 – 2,67 (d, J = 5,2 Hz, 3H, CH ₃ NHSO ₂), 2,97 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 4,58 – 4,67 (q, J = 5,3 Hz, 1H, CH ₃ NHSO ₂), 6,67 – 6,79 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,15 (s, 1H, H-4' oksazol), 7,50 – 7,57 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,85 – 7,92 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,11 – 8,17 (m, 2H, 2 × Ar-H)
ESI - HRMS	izračunano za C ₁₈ H ₂₀ N ₃ O ₃ S [M + (H)] ⁺ (m/z): 358,1225 izmerjena vrednost (m/z): 358,1235

4.5.4.2. Sinteza 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)benzensulfonamida (e)



Postopek je enak sintezi spojine **24** (glej 4.5.4.1.). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/heksan 2/1 do samega etilacetata). Strukture izoliranemu produktu z analizama NMR in APCI-HRMS nismo uspeli potrditi.

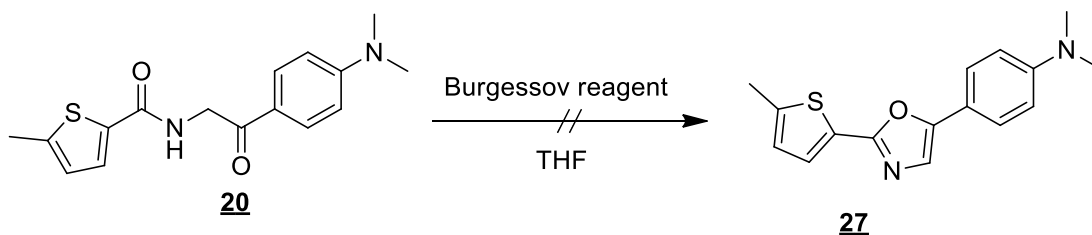
4.5.4.3. Sinteza 5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-2-metilisoindolin-1,3-diona (e)



Postopek je enak sintezi spojine **24** (glej 4.5.4.1.). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan 1/3 proti 1/2).

IUPAC ime:	
<i>5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-2-metilisoindolin-1,3-dion</i>	
IZGLED	oranžni kristali
IZKORISTEK	22%
Rf	0,20 (MF: etilacetat/heksan = 1/3)
TALIŠČE	179-182 °C
¹H - NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) =	δ (ppm) = 3,03 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 3,19 (s, 3H, CH ₃ N(CO) ₂), 6,72 – 6,79 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,30 (s, 1H, H-4' oksazol), 7,57 – 7,61 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,87 – 7,91 (d, J = 8 Hz, 1H, isoindoliondion-H), 8,35 – 8,40 (dd, J ₁ = 0.8 Hz, J ₂ = 8 Hz, 1H, isoindoliondion-H), 8,45 – 8,49 (d, J = 0.8 Hz, 1H, isoindoliondion-H),
ESI - HRMS	izračunano za C ₂₀ H ₁₈ N ₃ O ₃ [M + (H)] ⁺ (m/z): 348,1348 izmerjena vrednost (m/z): 348,1347

4.5.4.4. Neuspešen poskus sinteze *N,N*-dimetil-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)oksazol-5-il)anilina (*e*)

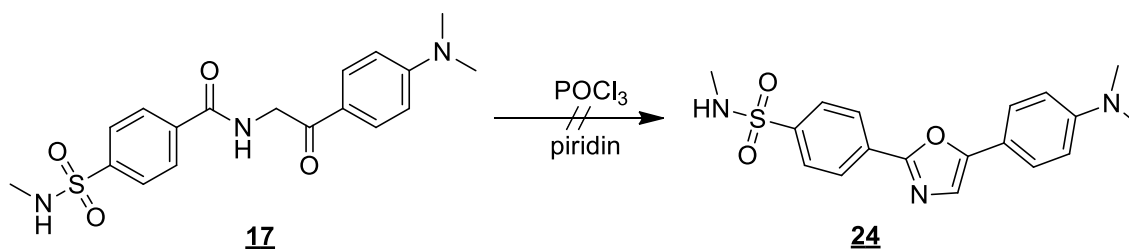


V visokotlačno vialo smo natehtali spojino **20** (0,18 g; 0,760 mmol), **22** (0,28 g; 1,19 mmol) ter brezvoden THF (7 mL). Vialo smo prepihali z argonom, zatesnili in dali v mikrovalovni reaktor za 20 minut pri 90 °C. Zmes smo nato prenesli v bučko in THF uparili pri znižanem tlaku. Glede na TLC analizo smo dobili kompleksno mešanico produktov.

IUPAC ime:	
<i>N,N</i> -dimetil-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)oksazol-5-il)anilin	
Rf	0,58 (MF: etilacetat/heksan = 1/1)

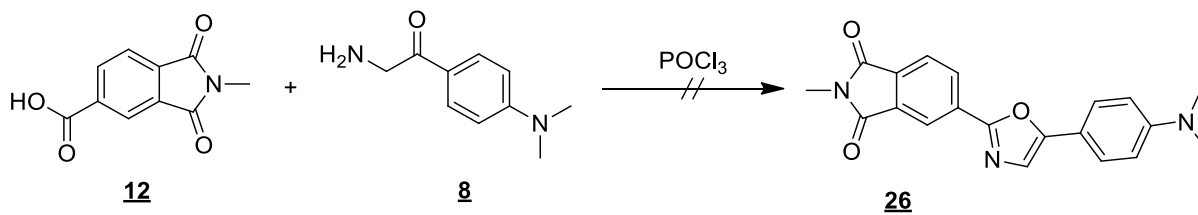
4.5.5. Sinteza 2,5-disubstituiranih oksazolov s POCl₃

4.5.5.1. Neuspešen poskus sinteze 4-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-*N*-metilbenzensulfonamida



V bučko smo natehtali **17** (0,54 g; 1,52 mmol), POCl₃ (0,76 mL; 8,2 mmol) in piridin (4 mL). Bučko smo pokrili in vsebino pri sobni temperaturi mešali 1,5 h. TLC pokazal, da reakcija še ni popolnoma potekla. Dodali smo POCl₃ (0,76 mL; 8,2 mmol) in mešali 45 minut pri 60 °C. Nato smo dodali etilacetat (15 mL) in nasičeno raztopino NaHCO₃ (35 mL). Produkt smo ekstrahirali v etilacetat (3 × 20 mL). Združene organske faze smo spirali z vodo (2 × 50 mL), 1 M HCl (2 × 50 mL) in nasičeno raztopina NaCl (2 × 50 mL) ter sušili nad Na₂SO₄. Po filtraciji smo uparili topilo pri znižanem tlaku in naredili TLC. Ta je pokazal, da imamo prisotnih več spojin, zato smo spiranje organskih faz ponovili. Produkt smo poskusili izolirati s kristalizacijo v etru in v etil acetatu, vendar neuspešno.

4.5.5.2. Neuspešen poskus sinteze 5-(5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazol-2-il)-2-metilisoindolin-1,3-diona



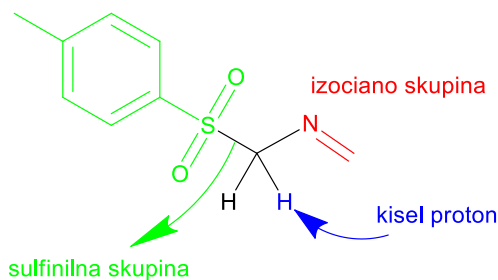
Spojino **21** (0,9 g; 4,4 mmol) smo v POCl₃ (2,15 mL; 23,1 mmol) mešali 20 minut na ledeni kopeli. Nato smo dodali spojino **8** (0,53 g; 3,0 mmol) in 20 h mešali pri pogojih refluksa pri 95 °C. Reakcijsko zmes smo zlili na led in izpadlo oborino filtrirali z odsesavanjem. Ker je produkt ostal v matičnici, smo poskusili s kristalizacijo v etil acetatu, vendar neuspešno.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

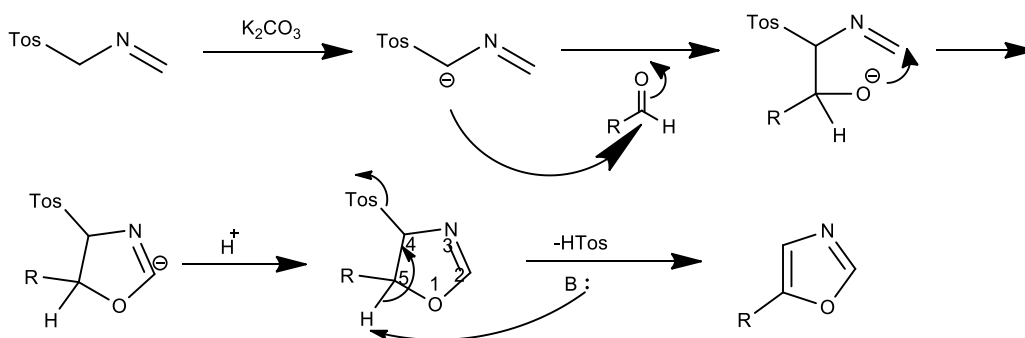
5.1. Komentarji sinteznih postopkov

5.1.1. Van Leusenova sinteza oksazolov in njihova direktna C-2 arilacija

Najprej smo z Van Leusenovo reakcijo sintetizirali oksazolni obroč. Pri klasični Van Leusenovi reakciji pretvorimo ketone v nitrile, v našem primeru pa smo aldehyd ob prisotnosti tozilmetilizocianida (TosMIC) (Slika 13) pretvorili v oksazol (Slika 14). TosMIC vsebuje elektron akceptorsko sulfinilno skupino (Tos), zato se ob prisotnosti K_2CO_3 zlahka deprotonira in napade karbonilni ogljik aldehyda. Nato sledi tvorba intramolekularne vezi med hidroksi ter izociano skupino ter nastanek oksazolina. Na C-5 mestu oksazolina se nahaja kisel proton, ki po odcepitvi sproži eliminacijo sulfinilne skupine in tvorbo oksazola (113, 114).



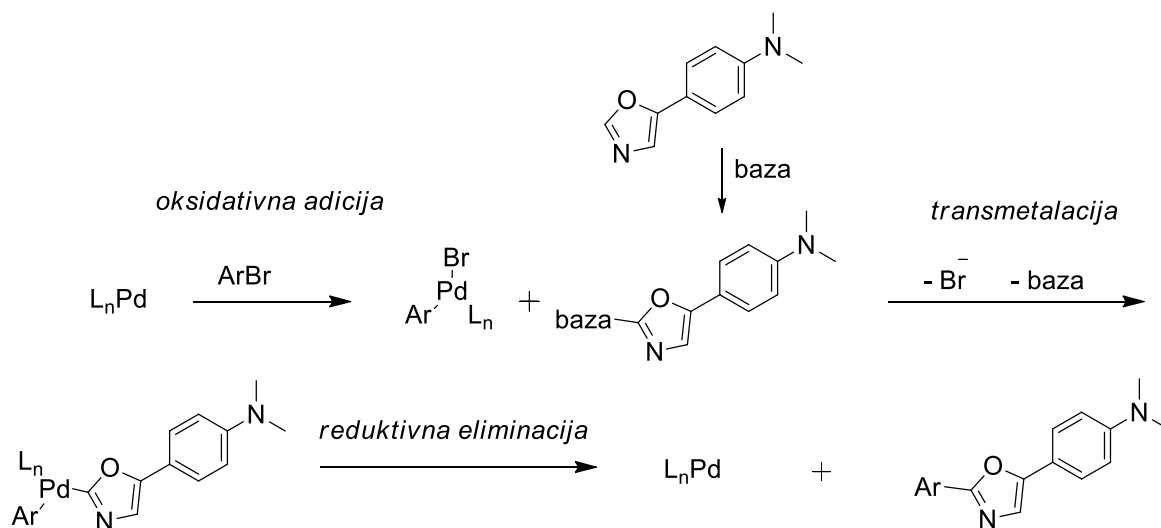
Slika 13: Tozilmetilizocianid (povzeto po 113).



Slika 14: Reakcijska shema mehanizma Van Leusenove sinteze oksazola iz aldehyda (povzeto po 114).

TLC analiza reakcijske zmesi je pokazala, da se izhodni aldehyd ni porabil v celoti, zato smo dodali večji prebitek TosMIC in K_2CO_3 glede na izhodiščni aldehyd in podaljšali čas reakcije. Na ta način smo dosegli boljši izkoristek (89%) kot v referenčnem članku (86%) (115).

V naslednji reakcijski stopnji je sledila uvedba aromatskega obroča na C-2 ogljik oksazola spojine **1**. Glede na predviden mehanizem reakcije (Slika 15) najprej poteče oksidativna adicija aril bromida na paladijev kompleks (le ta nastane *in situ* v reakcijski zmesi), nato pa sledi transmetalacija, kjer je na paladijev kompleks vezan tako oksazol kot arilni del aril bromida. Nazadnje poteče reduktivna eliminacija, pri čemer se tvori C-C vez med oksazolom in aromatom, izstopi pa regeneriran katalizator, ki vstopi v ponoven reakcijski cikel (116).



Slika 15: Reakcijska shema mehanizma paladij-katalizirane arilacije oksazola (povzeto po 116).

Regioselektivnost arilacije obroča je težko doseči, a v našem primeru je bil oksazol že substituiran na mestu 5. Kljub temu smo uporabili reakcijske pogoje, ki so, glede na literaturo, primernejši za arilacijo na mestu 2 (116).

Pri sintezi spojine **2** smo glede na TLC analizo dobili kompleksno zmes produktov, zato nismo nadaljevali z izolacijo posameznega produkta. Možnih vzrokov za neuspeh je lahko več; acetilna skupina 2-acetil-5-bromotiofena lahko vstopa v reakcijo aldolne kondenzacije, produkti katere lahko naprej reagirajo v reakciji s paladijem katalizirane arilacije. Prav tako je znano, da lahko žveplo v tiofenu »zastruplja« paladij, tako da je motena tvorba kompleksa, ki katalizira reakcijo.

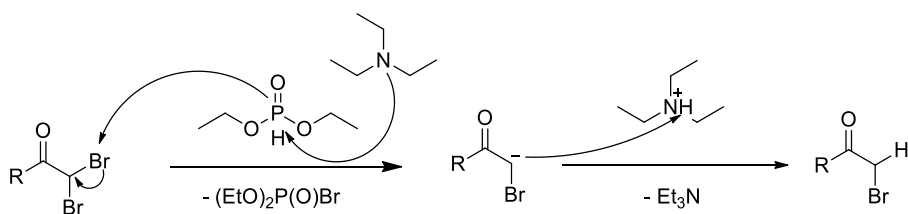
5.1.2. Sinteza arilnega 2-aminoetanona

Na primarnem arilnem aminu 1-(4-aminofenil)etan-1-on smo najprej uvedli dve metilni skupini. Primarni amin, v vlogi nukleofila, napade ogljik MeI, pri čemer izstopi HI, ki ga nevtralizira K₂CO₃. Sekundarni amin, ki nastane po prvi reakciji in je še boljši nukleofil, nato reagira s še eno molekulo MeI (117). Najprej smo poskusili izvesti reakciji pri nekoliko

nižji temperaturi (45 °C) kot je predpisana v literaturi (60 °C). Čisti jodometan ima vrelišče že pri 42 °C, zato smo želeli reakciji izvesti pri čim nižji temperaturi, da bi karseda omejili izhlapevanje toksičnega MeI. Vendar tudi s podaljševanjem reakcijskega časa, pretvorba ni potekla kvantitativno in je bil v reakcijski zmesi glede na TLC analizo še vedno prisoten nezreagirani primarni in sekundarni amin. Reakcija je potekla kvantitativno, ko smo temperaturo dvignili na 60 °C, kakor je predpisana v referenčnem članku (118).

Sledilo je bromiranje na α mestu arilmetilketona. Sprva smo monobromiran produkt poskusili sintetizirati tako, da smo spojino **4** raztopili v 30% raztopini HBr v očetni kislini in nato dodali brom. Po tem postopku poleg bromiranja na α keto mesto, poteka še bromiranje aromatskega obroča na orto mesto glede na dimetilamino skupino. Omenjena stranska reakcija poteka kljub temu, da smo reakcijo izvedli v zelo kislih pogojih, pri katerih bi morala biti dimetilamino skupina povsem protonirana in kot takšna deaktivirala aromatski obroč za elektrofilne aromatske substitucije. Reakcijo smo ponovili, pri čemer smo zamenjali 30% HBr v očetni kislini za koncentrirano H₂SO₄. Pri teh pogojih nismo zasledili bromiranja na aromatskem obroču, poteče pa bromiranje na acetilni skupini dvakrat, tako smo izolirali le α,α -dibromoarilmetilketon, ob enem ekvivalentu dodanega Br₂. Natančnega mehanizma dibromiranja niso pojasnili niti avtorji, ki so opisali omenjeno reakcijo, niti ni pojasnjen v drugi nam dostopni literaturi (119).

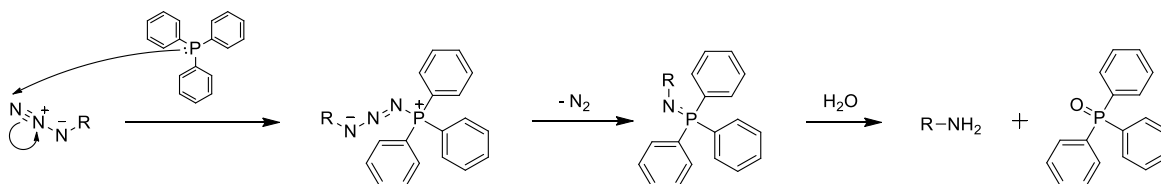
Selektivno debromiranje smo izvedli z dietilfosfitom ob trietilaminu (119). Možen mehanizem redukcije *gem* bromidov (Slika 16) je ta, da TEA deprotonira dietilfosfit, ki nato odcepi Br. Po odcepi broma, TEA⁺H donira proton, tako da dobimo monobromiran produkt (120)



Slika 16: Možen mehanizem redukcije *gem* bromidov z dietilfosfitom ob TEA (povzeto po 120).

Nadalje smo izvedli pretvorno bromida v azid z NaN₃ v vlogi nukleofila (121, 122). Azid smo nato reducirali do amina s PPh₃. Reakcija je znana kot Staudingerjeva redukcija (Slika 17). Nukleofilnemu napadu na terminalni dušik sledi odcep N₂ in nastanek iminofosforana. S hidrolizo dobimo amin in fosfin oksid (121, 123). Produkt reakcije je α -aminoketon, ki

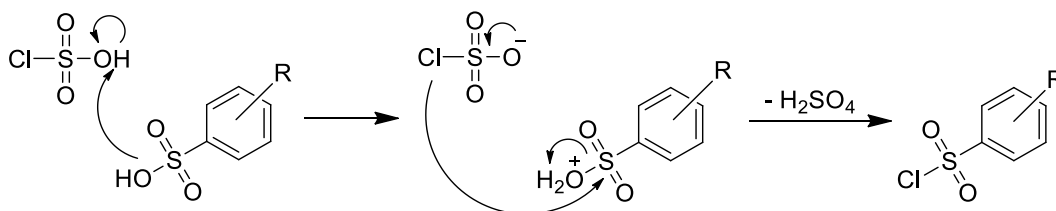
smo ga z dodatkom HCl pretvorili v kloridno sol. α -Aminoketoni so v prosti obliki nestabilni, poleg tega nam je bila bistveno olajšana izolacija z ekstrakcijo kloridne soli α -aminoketona v vodo, medtem ko se je trifenilfosfoksid porazdelil predvsem v organsko fazo.



Slika 17: Reakcijske shema mehanizma Staudingerjeve redukcije (povzeto po 123).

5.1.3. Sinteza sulfonamidov

Sol 4-sulfobenzojske kisline smo najprej s ClSO_3H pretvorili v sulfonil klorid, pri čemer karboksilna kislina ostane nespremenjena (Slika 18). 4-Sulfobenzojska kislina ima na benzenovem obroču sulfonsko in karboksilno skupino, ki deaktivirata obroč za dodatno (kloro)sulfoniranje (122, 124).

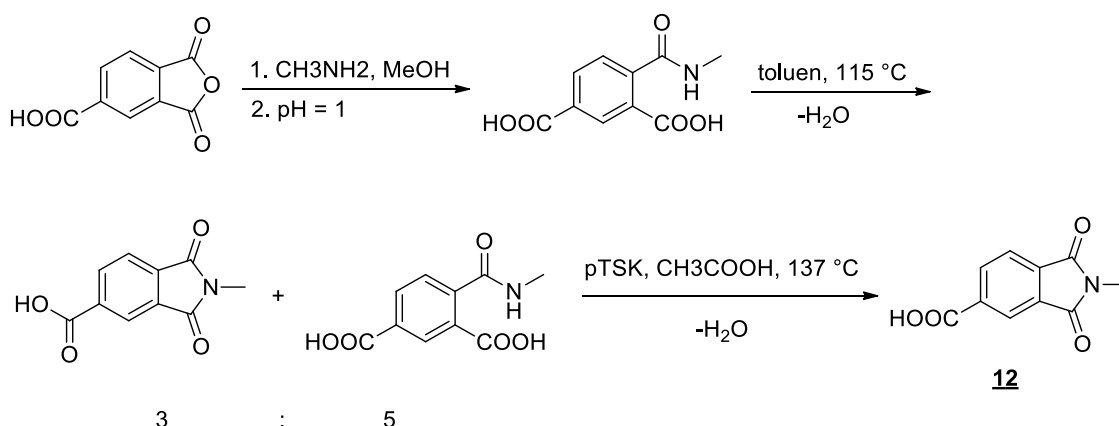


Slika 18: Reakcijska shema mehanizma kloriranja sulfonske kisline (povzeto po 122).

Na klorosulfonilni skupini je ob amonijaku/primarnem aminu potekla nukleofilna substitucija do sulfonamida. Pri sintezi spojin **10** in **11** smo k spojini **9** dodali 8 eq amonijaka/amina (125, 126), tako je le-ta poleg vloge nukleofila prevzel tudi vlogo baze in nevtraliziral nastalo HCl.

5.1.4. Reakcija kondenzacije do imida

Obroč anhidridov se ob prisotnosti nukleofilov (npr. voda, alkoholi, amini,...) hitro odpira. V našem primeru je kot nukleofil služil metilamin, ki je v prvi stopnji s ftalanhidridom tvoril amid, katerega smo izolirali z obarjanjem v kislem mediju. Ciklizacija do imida potече pri povišani temperaturi, v našem primeru smo izoliran amid segrevali v toluenu pri pogojih refluxa, vendar glede na analizo NMR reakcija ni potekla kvantitativno (127). Nadalje smo toluen zamenjali z očetno kislino, ki ima višje vrelišče in dodali katalitično količino *para*-toluensulfonske kisline. Reakcija je pod temi pogoji potekla kvantitativno (Slika 19).



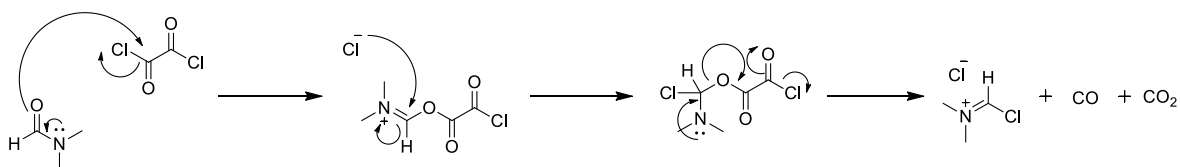
Slika 19: Reakcijska shema tvorbe imida preko dvojne soli (povzeto po 127).

5.1.5. Zadnji trije koraki sinteze dimetilaminoksazol aromатов in sinteza

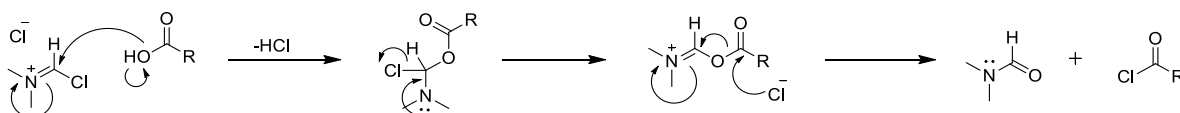
Burgessovega reagenta

Do sinteze oksazolovega obroča so nas ločili še 3 sintezni koraki. Sintetizirane smo imeli 4 različne aromatske spojine s prosto karboksilno skupino (spojine **10-12** in 5-metiltofен-2-karboksilna kislina) ter α -aminoketon **8**.

Sledila je tvorba kislinskega klorida iz karboksilne kisline z oksalil kloridom ((COCl)₂) ob katalitični količini DMF (Slika 21) (125). Oksalil klorid in DMF tvorita Vilsmeier-Haackov reagent (Me₂N⁺=CHCl), ki je v reakciji nukleofilne substitucije reaktivnejši od samega oksalil klorida (Slika 20) (128). Dobljeni kislinski kloridi so izjemno reaktivni. Čiščenju produkta se zato nismo posvečali.



Slika 20: Reakcijska shema mehanizma nastanka Vilsmeier-Haackovega reagenta (povzeto po 128).

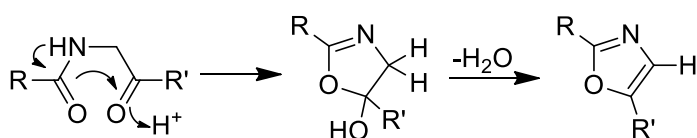


Slika 21: Reakcijska shema mehanizma sinteze kislinskih kloridov in regeneracija DMF (povzeto po 128).

Na dobljenih kislinskih kloridih smo izvedli nukleofilno substitucijo z našim α -aminoketonom ali Schotten-Baumanovo reakcijo. Pri tem je nastajala HCl, ki smo jo nevtralizirali z NMM (129). 2-Acilaminoketone smo kot surove produkte (nismo čistili s

kolonsko kromatografijo) uporabili v naslednji stopnji, to je tvorbi oksazola z Robinson-Gabrielovo reakcijo.

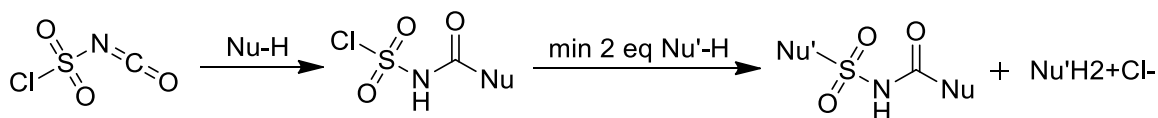
Robinson-Gabrielova sinteza 2,5-disubstituiranih oksazolov poteka v 2 stopnjah (Slika 22). Reakcijo smo izvajali v THF, ki smo ga predhodno posušili z aktiviranimi uprašenimi molekularnimi siti (4 Å) in prepihali z argonom. Na 2-acilaminoketonu je najprej potekla intramolekularna cikloadicija amidnega kisika na karbonilni ogljik. Pri tem je dušik oddal proton, ki je tvoril hidroksilno skupino na C-5 mestu nastalega oksazolina. Kisik amida je boljša Lewisova baza od kisika ketona, zato je amidni kisik tisti, ki ostane v obroču, ketonski pa izstopi v molekuli vode (130).



Slika 22: Reakcijska shema mehanizma Robinson-Gabrielove sinteze 2,5-disubstituiranih oksazolov (povzeto po 130).

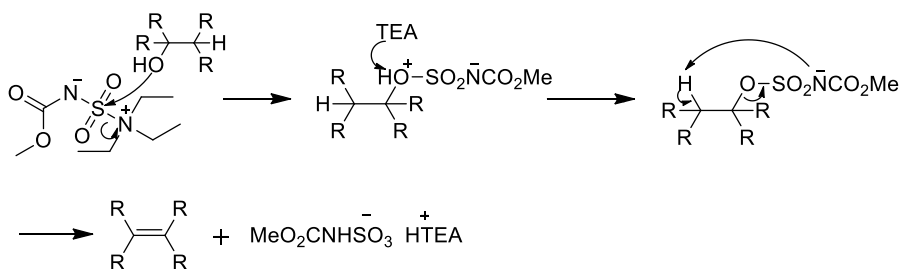
Pri stopnji intramolekularne ciklodehidracije lahko uporabimo različne reagente, npr. koncentrirano H₂SO₄, polifosforno kislino, SOCl₂, POCl₃, Burgessov reagent,... Reakcijo smo uspešno izvedli z Burgessovim reagentom in neuspešno s POCl₃ (130).

Burgessov reagent smo pripravili sami (Slika 23). Klorosulfonilizocianat ima 2 elektrofilna centra. V 1. stopnji je potekla nukleofilna adicija MeOH na izocianatno skupino. Po originalnem predpisu reakcijo izvajajo v benzenu in po dodatku heksana naj bi izpadla oborina, vendar v našem primeri ni. Z dobljenim produktom smo vseeno nadaljevali sintezo reagenta. V 2. stopnji je na klorosulfonilni skupini prišlo do nukleofilne substitucije s TEA. Pri tem je nastal tudi trietilamonijev klorid, ki je v benzenu netopen in smo ga odstranili s filtracijo. Višjo čistost produkta bi dosegli še s prekristalizacijo produkta v THF, vendar se tega nismo poslužili (131). Ob prisotnosti vode lahko poteče hidroliza izhodnega izocianata in/ali karbamata (produkt 1. stopnje), zato je reagent občutljiv na vlago in smo ga po uporabi vedno prepihali z argonom ter dobro zaprtega shranili v zamrzovalniku.



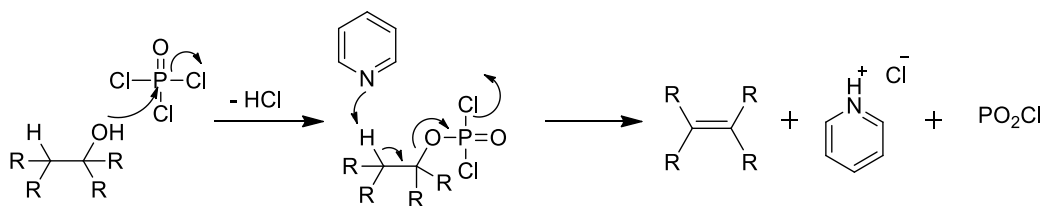
Slika 23: Reakcijska shema sinteze Burgessovega reagenta (povzeto po 131).

Burgessov reagent je selektiven in uspešno pretvori alkohole v alkene (Slika 24). Nahaja se v obliki soli, a je topen tudi v nepolarnih topilih. Vodo odcepi po principu periciklične *syn* eliminacije, pri kateri 2 vicinalna substituenta simultano izstopita iz molekule preko cikličnega intermediata. Najprej nastane sulfamatni ester, pri pogojih mikrovalovnega reaktorja (90 °C) pa poteče njegova piroliza. Pirolizo omogočajo nukleofilne in elektronakceptorske lastnosti izstopajoče skupine. Ko sulfamat skupaj z vicinalnim protonom zapusti alkohol, nastane alken (v našem primeru oksazol) (132). Sinteza z Burgessovim reagentom je uspešno potekla, razen v primeru spojin **25** in **27**. Pri prvi nastopi težava najverjetneje že pri tvorbi kislinskega klorida ali α -acilaminoketona, ker po reakciji z Burgessovim reagentom ne zasledimo nobenega produkta, ki bi fluorescirala ob obsevanju s svetlobo z valovno dolžino 366 nm, kar je bilo značilno za vse ostale produkte. Nasprotno smo dobili več produktov, ki so fluorescirali v primeru spojine **27**, vendar nam iz kompleksne mešanice produktov ni uspelo izolirati željenega produkta.



Slika 24: Reakcijska shema mehanizma dehidracije alkoholov z Burgessovim reagentom (povzeto po 132).

Ciklodehidracijo do oksazola smo poskusili izvesti tudi s POCl_3 (Slika 25) (133). V tem primeru je elektrofilni center predstavljal fosfor, vlogo baze in nukleofila pa je prevzel piridin. K spojini **24** smo dodali 5,4 eq POCl_3 . Ker je TLC analiza pokazala še nezreagiran α -acilaminoketon, smo dodali še 5,4 eq POCl_3 in dvignili temperaturo iz sobne na 60 °C. Produkt smo nato nevtralizirali z nasičeno raztopino NaHCO_3 ter ga ekstrahirali v etilacetat. Sol piridina smo ekstrahirali v vodo, prebitni piridin pa v 0,5 M HCl (122). Po sušenju je TLC analiza še vedno pokazala, da imamo v zmesi več spojin. Poskusili smo s ponovnim spiranjem organske faze in s kristalizacijo v etru ter etilacetatu. Ker je bila reakcija z Burgessovim reagentom uspešnejša, reakcije s POCl_3 nismo optimizirali.



Slika 25: Reakcijska shema mehanizma dehidracije alkoholov s POCl_3 (povzeto po 117).

Zanimalo nas je tudi, če lahko iz spojine s prosto karboksilno skupino in našega α -aminoketona direktno sintetiziramo oksazolov obroč. Spojini **12** smo dodali 5,2 eq POCl_3 , pri čemer naj bi nastal kislinski klorid ter HCl . Po dodatku 1,5 eq spojine **8** naj bi potekla nukleofilna substitucija med kislinskim kloridom in aminom. V zadnji fazi bi morala poteči ciklodehidacija s POCl_3 do oksazolnega obroča. Glede na TLC analizo smo produkt zasledili v matičnici. Možno je, da reakcija ni potekla do konca, saj smo imeli premalo amina. Amin je nevtraliziral sproščeno HCl in ni moral kot nukleofil reagirati s kislinskim kloridom oziroma je reagiral v manjši meri. V primeru optimizacije bi bilo smiselno dodati večji prebitek amina ali bazo (npr. piridin).

5.2. Rezultati in komentar vrednotenja označevalcev fibrilov amiloida- β

Peptidi $\text{A}\beta$ so se v zmrzovalniku nahajali 6 mesecev, zato smo domnevali, da so deloma že agregirali in da v raztopini niso več prisotni le monomeri peptidov $\text{A}\beta_{1-42}$. Rezultati testa s tioflavinom T za ugotovitev stanja peptidov $\text{A}\beta$ so zbrani v Preglednici XI.

Preglednica XI: Povprečja fluorescence za vzorec, slepo vzorčno in slepo reagenčno raztopino ob različnih časih. Čas (h:min:s), F_{av} (RFU).

čas	F_{av} vzorca	F_{av} slepe reagenčne	F_{av} slepe vzorčne
0:02:40	7324,78	1100,62	6544,50
1:02:40	6729,21	1121,25	5867,00
2:02:40	6760,73	1118,87	5886,75
4:02:40	6583,21	1095,62	5873,75
6:02:40	6560,65	1110,25	5782,75
10:02:40	6464,04	1137,37	5726,75
12:02:40	6795,91	1105,62	5781,75

Tioflavin T je pogosto uporabljen označevalec fibrilov amiloida- β . S ThT lahko spremljamo postopek agregacije monomerov A β . Na začetku se ThT nahaja v prosti obliki, saj do monomerov ne izkazuje nobene signifikantne afinitete. Postopoma se začnejo monomeri združevati in nastanejo fibrili s strukturno značilnimi β -ravninami. Plasti β -ravnin obdajajo specifično urejene stranske verige. Skupaj oblikujejo kanal, ki poteka paralelno glavni osi fibrilov in v katerega se veže ThT. Ob vezavi je prosta rotacija aromatskih obročev ThT okoli skupne C-C vezi onemogočena, zato se spojina v ekscitacijskem stanju nahaja dalj časa. Rezultat je večja emisija fluorescence (79). S koncem agregacije se koncentracija fibrilov ustali in dosežen je plato fluorescence. Fibrilarni pufer je prevzel vlogo topila, hkrati pa je služil imitaciji fiziološkega stanja, pri katerem pride do agregacije monomerov A β do fibril.

V našem primeru se intenziteta fluorescence v 12 h ni značilno spremenila. Razlog bi lahko bil nedelujoč reagent ThT, a vrednosti slepe vzorčne raztopine so bile ustrezno visoke. Fluorescenca vzorca je bila v povprečju za 822,19 RFU višja od slepe vzorčne raztopine ob enakem času, torej so bili fibrili v raztopini prisotni že na začetku. Majhno razliko fluorescence med vzorčno slepo in vzorcem lahko pripišemo nizki koncentraciji dodanega A β . Sklepamo lahko, da se peptidi našega A β niso nahajali le v monomerni obliki, pač pa jih je del že agregiral. Zaradi tega jih nismo mogli uporabiti pri vrednotenju zaviralcev agregacije. Nadaljevali smo z vrednotenjem označevalcev fibrilov, pri katerem so bili delno agregirani peptidi uporabni.

Pred vrednotenjem OF v prisotnosti fibrilov A β smo morali določiti optimalno ekscitacijsko valovno dolžino za vsak označevalec. Ustrezna ekscitacijska valovna dolžina je pomembna pri detekciji, saj vpliva na intenziteto emisije. Najvišji vrhovi absorbančnih spektrov so nam pokazali v katerem območju naj bi se merila emisija. Pri emisijskih spektrih z različno ekscitacijsko valovno dolžino pa smo glede na intenziteto fluorescence lahko določili ustrezno ekscitacijsko valovno dolžino posameznega označevalca. Rezultati so podani v Preglednici XII.

Preglednica XII: Valovne dolžine maksimuma absorbance ter ustrezne ekscitacije.

oznaka OF A β	λ_{Amax} (nm)	λ_{exc} (nm)
<u>3</u>	300	305
<u>24</u>	360	350
<u>25</u>	360	370

<u>26</u>	X	X (335)
<u>28</u>	X	X (310)
<u>29</u>	330	360
<u>30</u>	360	340
<u>31</u>	360	380
<u>32</u>	X	X (310)
slepa vzorčna	340	350

Spojine 26, 28 in 32 v preučevanem območju merjenja niso imele izrazite absorbance, njihovi emisijski spektri pa so skoraj sovpadali s spektrom slepe vzorčne raztopine. Tem spojinam smo glede na posnete spektre določili poskusno λ_{exc} in jih vseeno preizkusili v 1. fazi testiranja s fibrili.

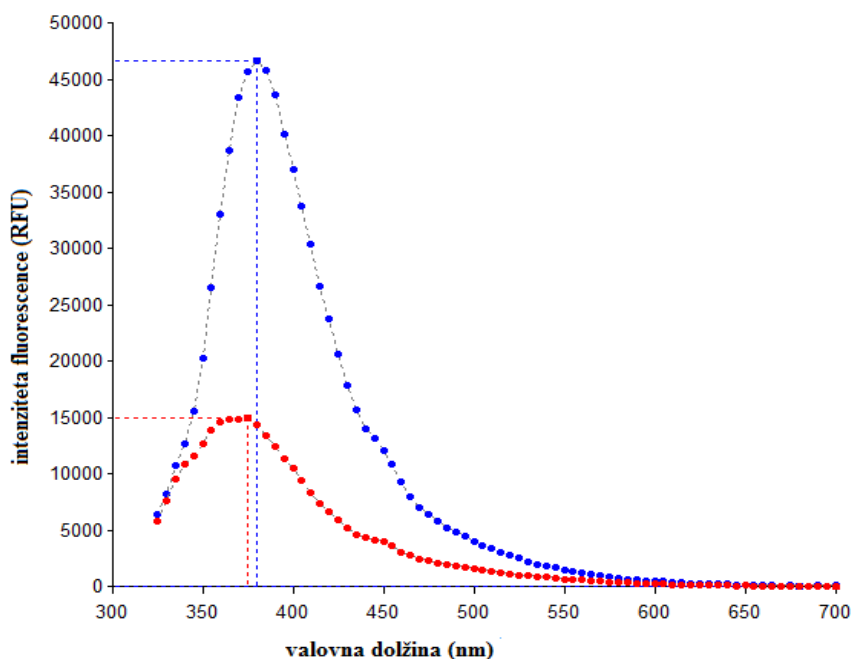
Dobljene ekscitacijske valovne dolžine smo uporabili pri snemanju emisijskih spektrov pri testu vezave označevalcev na fibrile. Ključna je bila primerjava intenzitete fluorescence 10 μ M raztopine OF (F_{max1}) z raztopino 10 μ M OF in 10 μ M A β (F_{max2}). Njuna razmerje (k_{Fmax} – koeficient fluorescenčne odzivnosti) in razlika (ΔF_{max} - razlika fluorescenčne odzivnosti) sta podana v Preglednici XIII. Isto mikrotitrsko ploščo smo pomerili takoj po pripravi, nato vsakih 30 min, zadnjo meritev pa po 24 h. Pri testu smo uporabili delno agregirane peptide A β . Kljub dokazani agregiranosti A β , smo epico 12 h stresali pri sobni temperaturi. S tem smo želeli doseči popolno agregiranost peptidov.

Preglednica XIII: Rezultati testa vezave. F_{max1} je največja fluorescenca slepe reagenčne raztopine. F_{max2} je največja fluorescenca vzorca. $k_{Fmax} = F_{max2} / F_{max1}$. $\Delta F_{max} = F_{max2} - F_{max1}$.

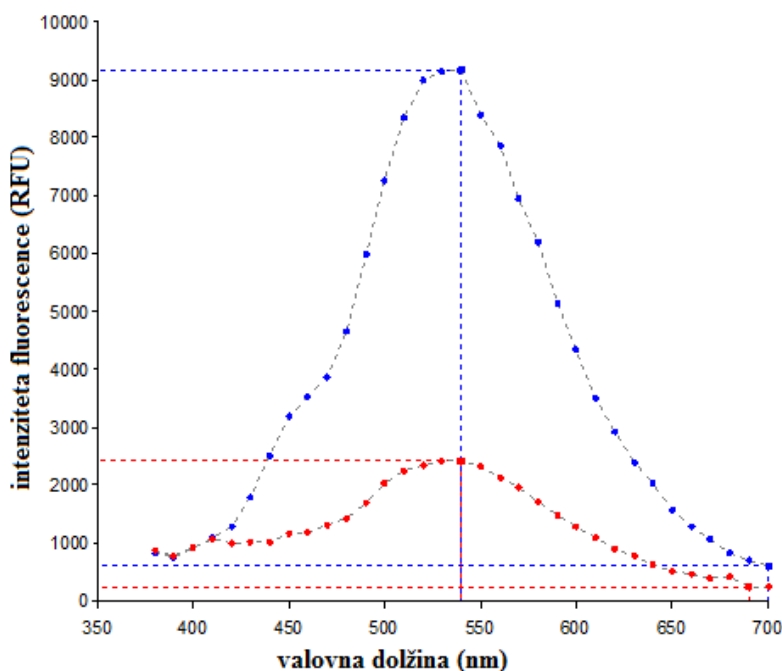
oznaka OF	<u>3</u>	<u>24</u>	<u>25</u>	<u>26</u>	topilo
čas	t_0				
F_{max1} (RFU)	20542	1320	1021	1978	1162
F_{max2} (RFU)	29950	1611	1545	1955	1115
k_{Fmax}	1,46	1,22	1,51	0,99	0,96
ΔF_{max} (RFU)	9408	291	524	-23	-47
čas	t_1				
F_{max1} (RFU)	21633	1885	1037	1958	1077
F_{max2} (RFU)	39255	1868	1460	1931	1078
k_{Fmax}	1,81	0,99	1,41	0,99	1,00
ΔF_{max} (RFU)	17622	-17	423	-27	1
čas	t_2				
F_{max1} (RFU)	18247	1333	947	1861	1105
F_{max2} (RFU)	45776	2151	1377	1828	1020

$k_{F_{max}}$	2,51	1,61	1,45	0,98	0,92
ΔF_{max} (RFU)	27529	818	430	-33	-85
čas	t₃				
F_{max1} (RFU)	17335	1379	963	1988	1180
F_{max2} (RFU)	46930	2153	1328	1952	1105
$k_{F_{max}}$	2,71	1,56	1,38	0,98	0,94
ΔF_{max} (RFU)	29595	774	365	-36	-75
čas	t₄				
F_{max1} (RFU)	15047	2008	909	3770	1004
F_{max2} (RFU)	46737	1341	2544	5135	993
$k_{F_{max}}$	3,11	0,67	2,80	1,36	0,99
ΔF_{max} (RFU)	31690	-667	1635	1365	-11
k_{AV}	2,32	1,21	1,71	1,06	0,96
ΔF_{AV} (RFU)	23189	240	675	249	-43
oznaka OF	<u>28</u>	<u>29</u>	<u>30</u>	<u>31</u>	<u>32</u>
čas	t₀				
F_{max1} (RFU)	7315	1968	2160	1182	6466
F_{max2} (RFU)	6914	6888	3773	2164	6420
$k_{F_{max}}$	0,95	3,5	1,75	1,83	0,99
ΔF_{max} (RFU)	-401	4920	1613	982	-46
čas	t₁				
F_{max1} (RFU)	7099	2462	2324	1201	6219
F_{max2} (RFU)	6924	8781	3632	2198	6423
$k_{F_{max}}$	0,98	3,57	1,56	1,83	1,03
ΔF_{max} (RFU)	-175	6319	1308	997	204
čas	t₂				
F_{max1} (RFU)	6771	2430	2200	1130	6057
F_{max2} (RFU)	6634	9170	3821	2152	6237
$k_{F_{max}}$	0,98	3,77	1,74	1,90	1,03
ΔF_{max} (RFU)	-137	6740	1621	1022	180
čas	t₃				
F_{max1} (RFU)	6725	2897	2266	1113	5960
F_{max2} (RFU)	6368	8911	3724	2208	6095
$k_{F_{max}}$	0,95	3,08	1,64	1,98	1,02
ΔF_{max} (RFU)	-357	6014	1458	1095	135
čas	t₄				
F_{max1} (RFU)	6322	2523	2250	1153	5648
F_{max2} (RFU)	6243	8481	3491	2032	5873
$k_{F_{max}}$	0,99	3,36	1,55	1,76	1,04
ΔF_{max} (RFU)	-79	5958	1241	879	225
k_{AV}	0,97	3,46	1,65	1,86	1,02
ΔF_{AV} (RFU)	-230	5990	1448	995	140

Najuspešnejši sta bili spojini **3** ($k_{av} = 2,32$; $\Delta F_{av} = 23169$ RFU) in **29** ($k_{av} = 3,46$; $\Delta F_{av} = 5990$ RFU). Ob vsaki meritvi sta bila $k_{Fmax} > 1$ ter $\Delta F_{max} > 0$, zato lahko sklepamo, da je prišlo do vezave omenjenih spojin na fibrile A β . Fluorescenca vezane oblike spojine **3** je bila še po 24 h izjemno visoka, medtem ko je fluorescenca proste spojine s časom upadala (Slika 26). Posledično sta bila k_{Fmax} in ΔF_{max} ob t_4 najvišja. Sklepamo lahko, da je spojina v prosti obliki s časom razpadala, v kompleksu s fibrili, pa do tega procesa v 24 h ni prišlo. Pri spojini **29** (Slika 27) so bile vrednosti k_{Fmax} in ΔF_{max} zelo konstantne. Relativno konstantne vrednosti k_{Fmax} in ΔF_{max} smo dobili tudi pri spojinah **30** in **31**.



Slika 26: Intenziteta fluorescenca pri različnih valovnih dolžinah emisije za spojino **3** ob t_4 . Modra krivulja predstavlja vzorec, rdeča krivulja predstavlja reagenčno slepo.



Slika 27: Intenziteta fluorescence pri različnih valovnih dolžinah emisije za spojino **29** ob t_2 . Modra krivulja predstavlja vzorec, rdeča krivulja predstavlja reagenčno slepo.

Intenziteta fluorescence spojine **25** se je ves čas ohranjala, do največje ojačitve fluorescence ob prisotnosti fibrilov A β pa je prišlo ob zadnji meritvi, po 24 h ($k_{Fmax} = 2,8$). Pri spojini **24** je bila fluorescenca proste oblike najvišja po 24 h, ob fibrilih pa je bila emisija takrat že nižja. Sklepamo lahko, da so bili kompleksi spojine s fibrili manj stabilni od prostega označevalca.

Spojina **26** je imela vse do zadnje meritve $k_{Fmax} < 1$ ter negativno ΔF_{max} . Intenziteta fluorescence spojine je bila ob prisotnosti fibril in brez njih primerljiva. Po 24 h pa se je emisija povečala in določili smo $k_{Fmax} = 1,36$ ter $\Delta F_{max} = 1365$ RFU. Sklepamo lahko, da spojina **26** do fibrilov izkazuje nizko afiniteto, zato je do vezave na fibrile ter ojačitve fluorescence prišlo z zakasnitvijo. Spojina **28** je po vsaki meritvi dosegla $k_{Fmax} < 1$ ter negativno ΔF_{max} . Slabe rezultate smo dobili tudi pri testiranju spojine **32**. Za obe spojini lahko sklepamo, da do fibrilov A β ne izkazujejo nobene afinitete. Ker bi bilo delovanje fluorescenčnega označevalca s 24 h zakasnitvijo za pacienta zelo neugodno, smo poleg spojin **28** in **32** iz nadaljnega testiranja izločili tudi spojino **26**.

Glede na rezultate testa vezave (k_{AV} , Preglednica XIII), sta na afiniteto testiranih dimetilaminfeniloksazol aromatov do fibrilov A β najbolj ugodno vplivala metil benzoat (**29**) in benzonitril (**3**). Dobre rezultate je dosegla tudi spojina z nesubstituiranim piridinom (**31**),

medtem ko je bil njen *N*-substituiran analog neučinkovit (**32**). Pri benzensulfonamidih je bila najučinkovitejša spojina z nesubstituiranim amidom (**25**). Za neugodno se je izkazala vpeljava isoindolin-1,3-diona (**26**, **28**). Slabše rezultate je dala spojina z daljšim *N*-substituentom (**28**).

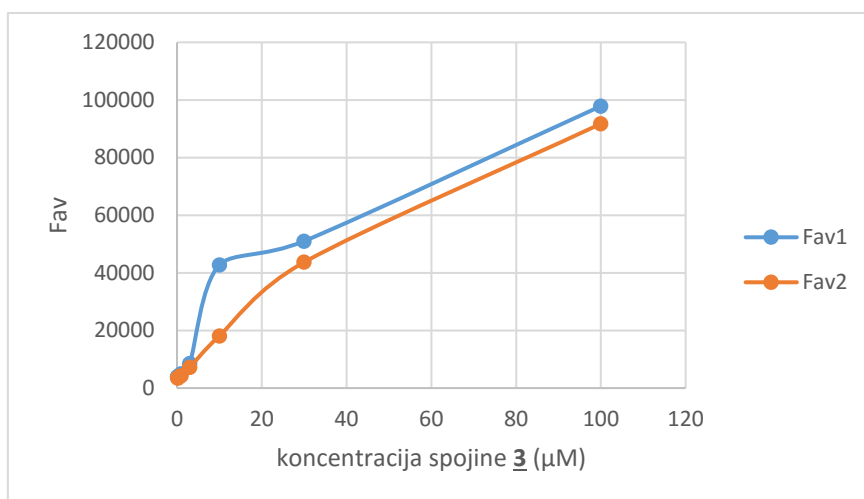
Nadaljevali smo s titracijo spojin **3**, **24**, **25**, **29**, **30** in **31**. Ovrednotili smo fluorescenčno odzivnost označevalcev pri 7 različnih koncentracijah. Koncentracija A β je bila tokrat 1 μ M. Priprava agregatov A β in pogoji merjenja so ostali nespremenjeni. Rezultati so podani v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Rezultati testa vezave pri različnih koncentracijah OF. F_{av1} je povprečje vseh F_{max1} ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. F_{av2} je povprečje vseh F_{max2} ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. k_{av} je povprečje vseh k_{Fmax} ob različnih časih, za isto koncentracijo OF. $\Delta F_{av} = F_{av2} - F_{av1}$.

koncentracija	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M	1 μ M	300 nM	100 nM
oznaka OF	<u>3</u>						
F_{av1} (RFU)	9788	51028	42730	8540	4987	4121	4009
F_{av2} (RFU)	91746	43696	18122	7188	4293	3547	3560
k_{av}	0,94	0,86	0,42	0,84	0,86	0,86	0,89
ΔF_{av} (RFU)	-6126	-7332	-24608	-1352	-694	-574	-449
oznaka OF	<u>24</u>						
F_{av1} (RFU)	2899	2104	821	964	776	777	782
F_{av2} (RFU)	2984	1102	803	704	688	692	690
k_{av}	1,03	0,52	0,98	0,76	0,89	0,89	0,88
ΔF_{av} (RFU)	85	-1001	-17	-259	-87	-84	-92
oznaka OF	<u>25</u>						
F_{av1} (RFU)	1832	749	491	454	453	448	549
F_{av2} (RFU)	1798	952	827	459	669	406	404
k_{av}	0,98	1,27	1,69	1,01	1,48	0,91	0,74
ΔF_{av} (RFU)	-34	203	336	5	216	-42	-145
oznaka OF	<u>29</u>						
F_{av1} (RFU)	4405	635	798	878	1074	668	669
F_{av2} (RFU)	4919	1811	1123	970	617	603	618
k_{av}	1,30	2,85	1,41	1,11	0,63	0,90	0,92
ΔF_{av} (RFU)	514	1176	325	92,25	-457	-65	-50
oznaka OF	<u>30</u>						
F_{av1} (RFU)	1793	1637	1461	980	1006	1030	1035
F_{av2} (RFU)	1954	1588	1394	908	935	928	944

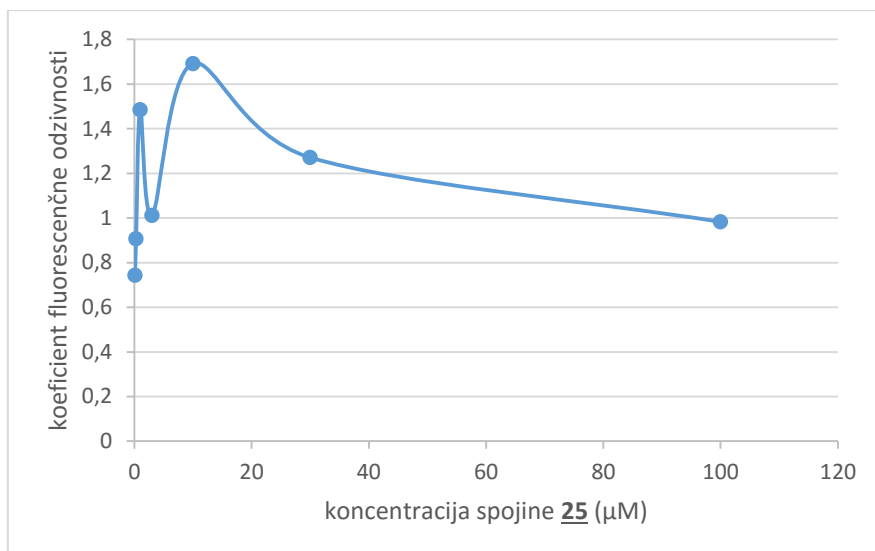
k_{av}	1,09	0,97	0,95	0,93	0,93	0,90	0,91
ΔF_{av} (RFU)	161	-49	-66	-72	-70	-101	-91
oznaka OF	<u>31</u>						
F_{av1} (RFU)	811	501	499	835	441	723	415
F_{av2} (RFU)	656	533	556	724	452	667	1225
k_{av}	0,81	1,07	1,11	0,87	1,03	1,05	2,95
ΔF_{av} (RFU)	-155	33	57	-111	11	-56	810

Spojini **3** smo pri vseh koncentracijah določili negativno razliko fluorescenčne odzivnosti (Slika 28) in $k_{av} < 1$. Spojina pri koncentraciji 1 μM $\text{A}\beta$ ni bila učinkovita. Intenziteta fluorescence te spojine je bila tudi pri tem testu najvišja.



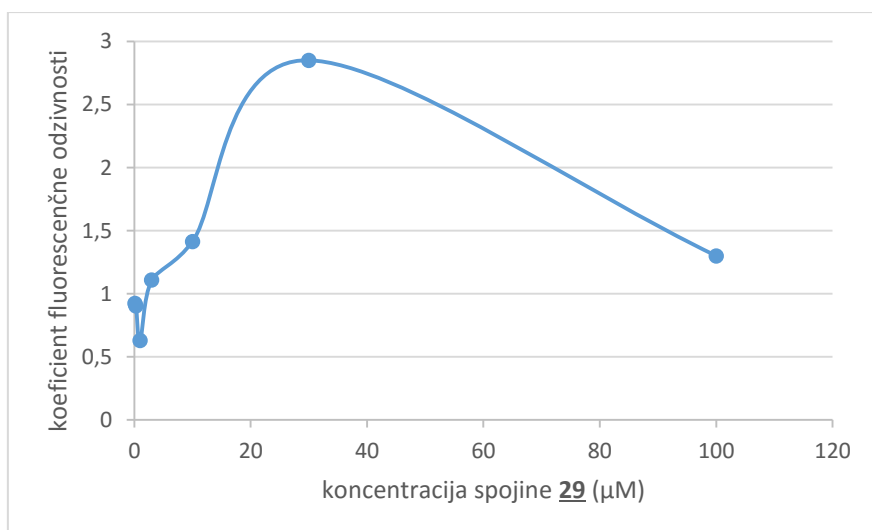
Slika 28: Intenziteta fluorescence v odvisnosti od koncentracije za spojino **3**. F_{av1} predstavlja reagenčno slepo. F_{av2} predstavlja vzorec.

Tudi spojina **24** je imela slabo fluorescenčno odzivnost. Ob prisotnosti fibrilov smo določili največ 1,03-kratno ojačitev fluorescence, in sicer pri 100 μM . Spojina **25** je presenetila z dobrimi koeficienti fluorescenčne odzivnosti (Slika 29), a intenziteta fluorescence je bila nizka pri vzorčni in slepi reagenčni raztopini. Tako je že majhna sprememba v intenziteti fluorescence pomenila velik delež pri računanju k_{av} . Glede na rezultate sklepamo, da je do vezave na fibrile prišlo pri vzorcih s 30 μM , 10 μM , 3 μM in 1 μM spojine **25**. Pri nižjih koncentracijah spojina ni bila več učinkovita. Neučinkovitost pri 100 μM pa lahko razložimo s problemom topnosti.



Slika 29: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino **25**.

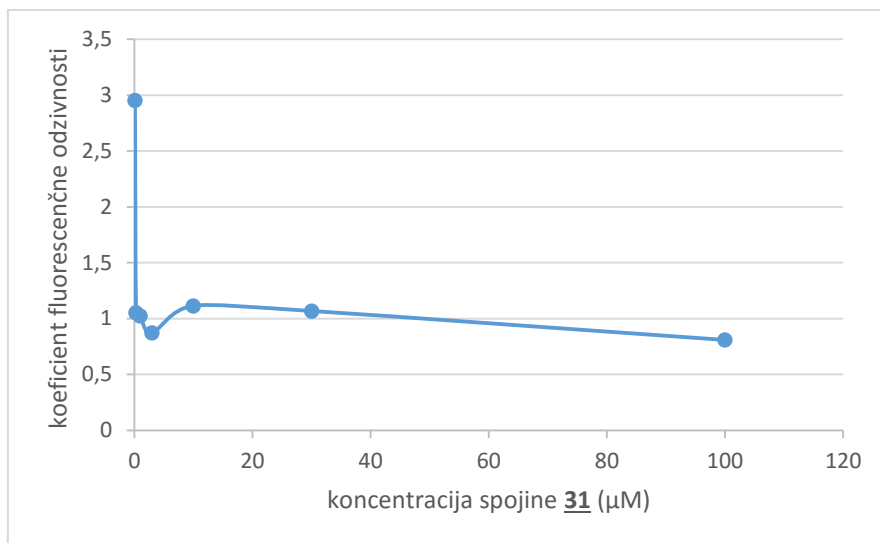
Intenziteta fluorescence je bila pri spojini **29** signifikantno nižja kot pri spojini **3**, fluorescenčna odzivnost pa je bila bolj ugodna. Do ojačitve fluorescence ob prisotnosti fibrilov je prišlo pri vzorcih s 100 μM , 30 μM , 10 μM in 3 μM spojine **29**. Spojina se je pri nižji koncentraciji A β izkazala za najuspešnejšo. Pri 30 μM je koeficient fluorescenčne odzivnosti znašal 2,85 (Slika 30).



Slika 30: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino **29**.

Pri spojini **30** je ob prisotnosti fibrilov prišlo do zanemarljive ojačitve fluorescence le pri vzorcu s koncentracijo 100 μM . Spojina **31** je imela zelo nizko intenziteto fluorescence. Njeni koeficienti fluorescenčne odzivnosti so bili zanemarljivi pri vseh koncentracijah spojine, razen pri 100 nM (Slika 31). Pri tej koncentraciji je v vzorčni raztopini prišlo do

2,95-kratne ojačitve fluorescence, a ker je bila intenziteta fluorescence tako nizka, temu rezultatu ne smemo pripisati prevelike teže.

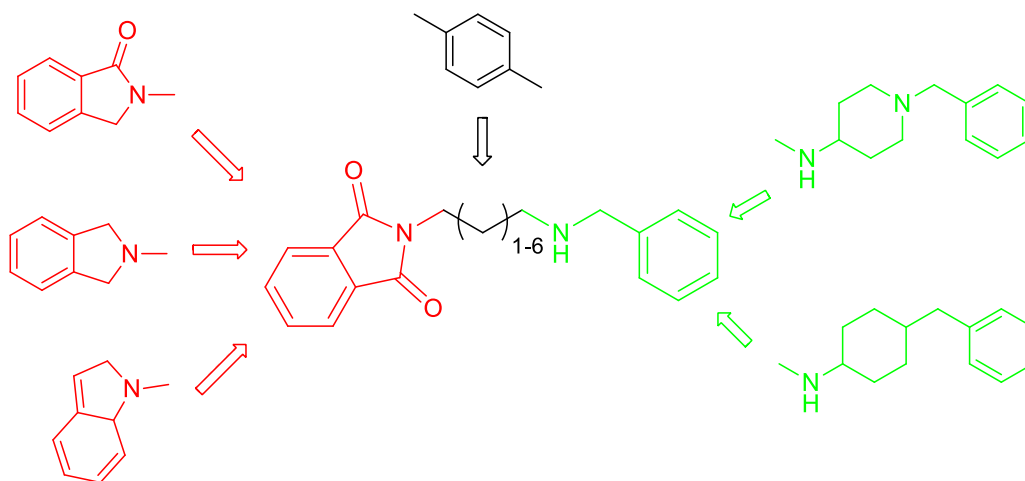


Slika 31: Koeficient fluorescenčne odzivnosti v odvisnosti od koncentracije za spojino **31**.

Valovna dolžina emisijskih maksimumom je bila za vse spojine v območju od 350-460 nm. Izjema je bila spojina **29**, ki je fluorescirala pri 540 nm. Valovna dolžina je še vedno prenizka za uporabo *in vivo*. Spojine so primerne za testiranja *in vitro* in na tkivnih rezinah (predvsem spojina **29**), ob ustrezni funkcionalizaciji z radionuklidi pa tudi za *in vivo* PET slikanje.

5.3. Rezultati in komentar vrednotenja zaviralcev agregacije amiloida- β

Ovrednotili smo 22 spojin, sintetiziranih na Fakulteti za Farmacijo v Krakovu. Spojine naj bi zavirale proces agregacije A β , kot tudi delovanje holin-esteraz. Strukturno so podobne učinkovini donepezil, ki zavira delovanje acetilholin-esteraz in omeji obseg spontane agregacije A β (96, 114). Njihov benzilaminski, benzilpiperidinamski oz. benzilcikloheksanaminski fragment je z različno dolgim vmesnikom povezan s heterociklom (Slika 32).



Slika 32: Strukture potencialnih zaviralcev agregacije, ki smo jih testirali.

Rezultate vrednotenja zaviralcev agregacije smo podali kot obseg zavrte agregacije, ki ga opiše enačba $\left(1 - \frac{\Delta F_{vz}}{\Delta F_{sl}}\right) \times 100\%$. ΔF_{vz} pomeni spremembo fluorescence vzorca, ΔF_{sl} pa spremembo fluorescence slepe vzorčne raztopine, pri čemer smo upoštevali povprečne vrednosti fluorescence vseh paralelk ob času t_1 in t_2 . Predvidevali smo, da so ob času t_1 fluorescirale proste molekule ThT, saj se je sinteza fibrilov šele pričela. Ob odsotnosti fibrilov $A\beta$ z značilnimi β -ravninami do vezave ThT ni prišlo. Za t_2 smo izbrali vrednosti, pri katerih je bila intenziteta fluorescence tako pri vzorčnih kot pri slepih vzorčnih raztopinah že del platoja. Koncentracija fibrilov se je takrat ustalila in dosežena je bila najvišja fluorescenca ThT. Plato je bil pri nekaterih raztopinah dosežen že po 2,5 h.

Pri nekaterih meritvah pri slepi vzorčni raztopini ni prišlo do značilne ojačitve fluorescence s časom ($F_{sl2} - F_{sl1} < 0$), kar pomeni, da proces agregacije $A\beta$ ni potekel, oz. ga nismo zaznali. Pri teh meritvah nismo mogli izračunati obsega zavrte agregacije, zato le-teh rezultatov nismo vključili. Upoštevali smo le tiste poskuse, pri katerih smo zaznali kinetiko agregacije, kot je opisana v literaturi (43, 83, 100).

Težave smo imeli tudi s ponovljivostjo intenzitete emisije, tako pri slepi vzorčni raztopini, kot pri vzorcu samem. Med procesom agregacije namreč obstajajo različne zvrsti $A\beta$. Sam potek je izredno kompleksen, zaporedje dogodkov pa še ni popolnoma pojasnjeno. Homogenost vzorca je najverjetneje dosežena s koncem agregacije, a le v primeru, ko so nastali fibrili stabilni (134). Poleg tega na potek agregacije močno vpliva koncentracija peptidov, temperatura, ionska moč, vrednost pH in ThT. Optimizacija pogojev in nadzor številnih dejavnikov sta zato izrednega pomena (79, 134). Dvoumnost metod za vrednotenje zaviralcev agregacije se večkrat pojavlja v literaturi (99, 100). Pri ThT testu se srečujejo z

velikim deležem lažno pozitivnih rezultatov. Le-tem so se uspešno izognili s primerjanjem polovičnih časov agregacije, namesto z upoštevanjem maksimalnih intenzitet fluorescence. Polovični časi so se izkazali za bolj ponovljive (99).

Rezultati 2 neodvisnih meritev pri sobni temperaturi so zbrani v Preglednici XV, rezultati 2 neodvisnih meritev pri 37 °C pa v Preglednici XVI. Pri izračunu povprečja obsega zavrte agregacije smo namesto negativnih vrednosti upoštevali 0%, namesto vrednosti višjih od 100% pa 100%.

Preglednica XV: Rezultati vrednotenja zaviralcev agregacije s fluorometričnim testom s ThT pri sobni temperaturi. $\Delta F = F2 - F1$.

meritev	1. meritev		2. meritev		povprečje obsega zavrte agregacije (%) +/- STD (%)	
	čas	$t_1 = 5 \text{ min}; t_2 = 6 \text{ h}$	$t_1 = 5 \text{ min}; t_2 = 6 \text{ h}$	$t_1 = 5 \text{ min}; t_2 = 6 \text{ h}$		
oznaka ZA A β	ΔF (RFU)	obseg zavrte agregacije (%)	ΔF (RFU)	obseg zavrte agregacije (%)		
MFR1	1643	96	-443	108	98	1,98
JRR6	429	99	-459	108	99	0,52
JRR7	659	98	-496	109	99	0,80
JRR8	2447	94	-357	106	97	2,95
JRR9	2455	94	-239	104	97	2,96
JRR10	2389	94	5	100	97	2,84
NGR52	1579	96	-866	115	98	1,90
NGR57	1900	95	-438	108	98	2,29
NGR62	9609	77	2644	54	65	11,59
NGR63	3624	91	1562	72	82	9,32
NGR64	1034	98	3198	44	71	26,79
NGR67	5854	86	4442	22	54	31,88
NGR72	610	99	-173	103	99	0,74
NGR73	19017	54	2108	63	59	4,46
NGR75	9478	77	2200	61	69	7,85
NGR76	17858	57	8928	-57	28	28,46
AM1	14479	65	11971	-110	33	32,53
AM5A	9331	77	163	97	87	9,83
AM17	21303	49	16735	-193	24	24,30
AM19	31127	25	15051	-164	12	12,45
AM21A	43914	-6	2186	62	31	30,84
AM26	18590	55	16134	-183	28	27,57
VZ. SL.	41445	0	5704	0	0	0

Preglednica XVI: Rezultati vrednotenja zaviralcev agregacije s fluorometričnim testom s ThT pri 37 °C. $\Delta F = F_2 - F_1$.

meritev	1. meritev		2. meritev		povprečje obsega zavrtne agregacije (%) +/- RSD (%)	
čas	t1 = 50 min; t2 = 2,5 h		t1 = 10 min; t2 = 12 h			
oznaka ZA A β	ΔF (RFU)	obseg zavrtne agregacije (%)	ΔF (RFU)	obseg zavrtne agregacije (%)		
MFR1	226	91	8624	-28	45	64,08
JRR6	929	61	8575	-27	31	43,43
JRR7	-787	133	5023	26	63	52,56
JRR8	-1765	173	8033	-18	50	70,71
JRR9	502	79	5881	13	46	46,80
JRR10	441	82	6362	6	44	53,63
NGR52	-891	137	7556	-12	50	70,71
NGR57	832	65	8286	-23	33	46,28
NGR62	-271	111	6101	10	55	63,84
NGR63	-883	137	5714	15	58	59,79
NGR64	-650	127	4998	26	63	52,30
NGR67	-85	104	6271	7	54	65,62
NGR72	-103	104	5823	14	57	60,93
NGR73	116	95	5174	23	59	50,73
NGR75	-146	106	3784	44	72	39,59
NGR76	830	66	5281	22	44	30,91
AM1	-744	131	6618	2	51	69,25
AM5A	-427	118	6782	0	50	70,71
AM17	-1130	147	6398	5	53	66,95
AM19	367	85	4652	31	58	37,90
AM21A	-538	122	4606	32	66	48,20
AM26	45	98	1053	84	91	9,70
VZ. SL.	2409	0	6757	0	0	0

Naša interpretacija rezultatov je bila naslednja:

1. $\Delta F_{vz} < \Delta F_{sl}$ in $\Delta F_{vz} > 0 \rightarrow 0\% < \% \text{ inhibicije} < 100\% \rightarrow$ spojina je delujoč zaviralec agregacije,
2. $\Delta F_{vz} \geq \Delta F_{sl}$ in $\Delta F_{vz} > 0 \rightarrow \% \text{ inhibicije} \leq 0\% \rightarrow$ agregacija A β ni zavirta,
3. $\Delta F_{vz} \leq 0$ in/ali $\Delta F_{sl} \leq 0 \rightarrow \% \text{ inhibicije} \geq 100\% \rightarrow$ procesa agregacije nismo mogli spremljati oz. le-ta ni potekel.

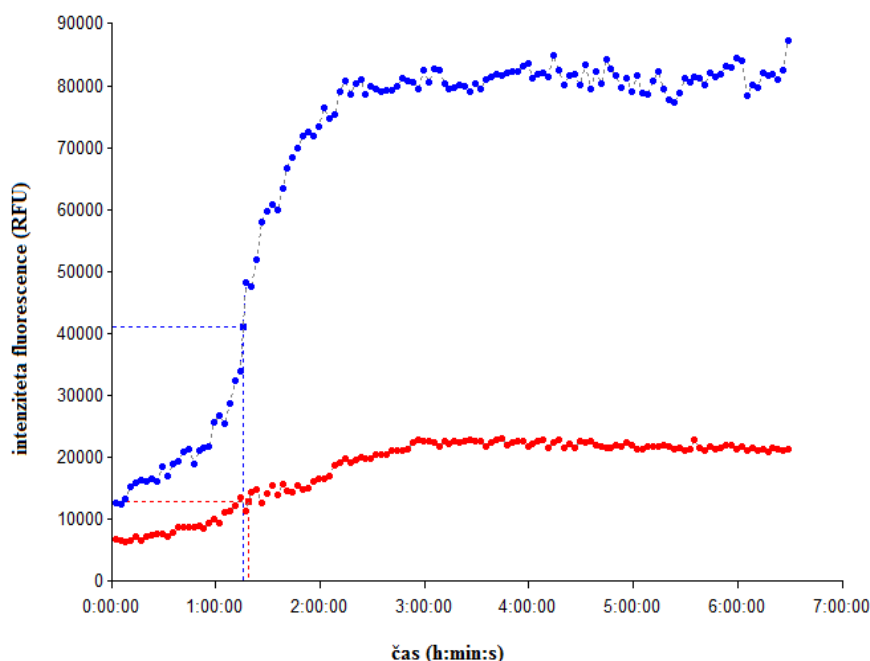
Možne razlage za 3. točko so nedelujoč označevalec fibrilov ThT, uporaba že agregiranih peptidov, uporaba neagregabilnih peptidov in/ali prenizka koncentracija peptidov (uporabili smo 1 μM A β). Nezmožnost spremljanja agregacije je lahko tudi posledica absorbance zaviralcev pri valovni dolžini ekscitacije, zaradi česar smo posneli absorbančne spektre 10 μM raztopinam ZA v 1% DMSO s končnim volumnom 250 μL . Absorbance smo merili pri valovnih dolžinah od 400 nm do 510 nm, z ekscitacijo pri 440 nm (Preglednica XVII). Če bi zaviralec agregacije maksimalno absorbiral pri valovni dolžini, ki smo jo uporabili kot ekscitacijsko pri vrednotenju (440 nm), bi njegova emisija lahko prekrila emisijo ThT. ThT tako ne bi moral signifikantno ojačati fluorescence po vezavi na fibrile. Vrednosti vseh zaviralcev so bile ustrezno nizke.

Preglednica XVII: Vrednosti absorbance ZA pri različnih valovnih dolžinah.

oznaka ZA A β	400 nm	450 nm	500 nm
MFR1	0,045	0,041	0,038
JRR6	0,048	0,043	0,039
JRR7	0,046	0,041	0,038
JRR8	0,048	0,043	0,040
JRR9	0,050	0,044	0,041
JRR10	0,049	0,042	0,040
NGR52	0,048	0,044	0,040
NGR57	0,048	0,043	0,039
NGR62	0,052	0,046	0,041
NGR63	0,051	0,046	0,042
NGR64	0,049	0,044	0,040
NGR67	0,045	0,041	0,038
NGR72	0,047	0,042	0,039
NGR73	0,047	0,042	0,038
NGR75	0,046	0,041	0,037
NGR76	0,047	0,042	0,038
AM1	0,050	0,044	0,041
AM5A	0,052	0,045	0,042
AM17	0,053	0,047	0,043
AM19	0,048	0,043	0,039
AM21A	0,051	0,044	0,040
AM26	0,052	0,047	0,044

Rezultati meritev pri sobni temperaturi so zelo dobri. 11 spojin je zavrlo proces agregacije za več kot 80%. Najuspešnejše so bile spojine **JRR6**, **NGR72** in **JRR7**, ki so proces agregacije skoraj popolnoma zaustavile (obseg zavrte agregacije > 99%). Vseh 22 spojin se je izkazalo za zaviralce agregacije. Najslabši rezultat so dosegle spojine z

benzilpiperidinaminskim fragmentom in indolom (**AM19**, **AM17** in **AM26**) (Slika 33). Od heterociklov je bila najbolj ugodna vpeljava isoindolin-1,3-diona. Od aaminskih fragmentov so največji delež agregacije zavrle spojine z benzilaminom. Pri teh se je vmesnik s 4-6 C izkazal za bolj učinkovitega od analogov z daljšim vmesnikom.



Slika 33: Kontinuirano spremljanje agregacije peptidov A β s ThT pri 1. meritvi pri sobni temperaturi. Modra krivulja predstavlja eno od paralelk slepe vzorčne raztopine, rdeča krivulja predstavlja eno od paralelk vzorčne raztopine **AM26**.

Pri 37 °C so bili rezultati nekoliko slabši, a zopet je učinkovalo vseh 22 spojin. Več kot 80% agregacije je tokrat zavrle le spojina **AM26**, ki je bila pri sobni temperaturi med najslabšimi. Najmanjši obseg agregacije je zavrle spojina **JRR6**. Zanimivo je, da je bila uspešnost uporabljenih heterociklov ravno obratna; po padajoči učinkovitosti so si sledile spojine z indolom, isoindolinom, isoindolin-1-onom in isoindolin-1,3-dionom. Očitno je višjo temperaturo najboljše prenesel indolni obroč. Dolžino vmesnika in vrsto aaminskega fragmenta pri meritvah z višjo temperaturo žal nismo uspeli povezati z učinkovitostjo ZA. Zaviranje agregacije bi bilo potrebno oceniti še pri različnih koncentracijah ZA in A β . Učinkovitost zaviralcev agregacije bi morali preveriti tudi z drugimi testi.

ZAKLJUČEK

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove potencialne označevalce fibrilov amiloida- β , z 2-aril-5-(4-(dimetilamino)fenil)oksazolom kot osnovnim skeletom, pri čemer označevalcev, pri katerih aromatska sistema povezuje oksazol, še ni opisanih v literaturi. Uspešno smo sintetizirali 3 spojine (**3**, **24** in **26**). Spojina **3** je bila pripravljena po ustrezno modificiranem literaturnem postopku s paladij-katalizirano transmetalacijo. Pri sintezi spojin **25** in **27** nismo bili uspešni. Kaj točno je šlo narobe ne moremo vedeti, ker smo pri zadnjih treh korakih v naslednjo stopnjo, zaradi visoke reaktivnosti produktov, vstopali s surovim produktom. Pri Robinson-Gabrielovi sintezi 2,5-disubstituiranih oksazolov se je Burgessov reagent izkazal za uspešnejšega od POCl_3 . Težave nam je povzročalo tudi selektivno bromiranje na α mestu arilmetilketona (sinteza spojine **5**), vendar smo brom na α mesto arilmetilketona nazadnje uvedli v dveh stopnjah preko intermediata α,α -dibromoarilmetilketona s sledečim selektivnim debromiranjem z dietilfosfitom ob trietilaminu.

Dobljene spojine smo skupaj s 5 drugimi potencialnimi označevalci, z istim skeletom, ovrednotili s fluorometričnim testom s tioflavinom T. Spojine **26**, **28** in **32** do fibrilov niso izkazovale signifikantne afinitete. Pri $10\ \mu\text{M}$ $\text{A}\beta$ so bile najučinkovitejše spojine **29**, **3** in **31**. Najboljšo fluorescenčno odzivnost je tudi pri nižji koncentraciji amiloida- β imela spojina **29**, z metil benzoatom kot aromatom. Spojina je imela tudi najvišjo valovno dolžino emisijskega maksimuma, zato je najprimernejša za uporabo na tkivnih rezinah. Spojine bi bilo pri različnih koncentracijah potrebno testirati ob višjih koncentracijah amiloida- β , kar bi verjetno pripomoglo k bolj ponovljivim in konsistentnim eksperimentalnim rezultatom. Da bi lahko označevalce primerjali z že znanimi, bi bilo v prihodnjih eksperimentih potrebno vzporedno opraviti test še s ThT. Označevalci z visoko afiniteto in selektivnostjo do amiloida- β bi bili kljub slabši fluorescenčni odzivnosti še vedno uporabni za PET slikanje, zato se nadaljnje modifikacije skeleta označevalcev splačajo.

Pri vrednotenju zaviralcev agregacije smo imeli težave s kontinuiranim spremljanjem agregacije, saj ThT pri nekaterih meritvah ob vezavi ni povzročil signifikantnega povečanja fluorescence. Pri eksperimentih s proteini se pojavijo tudi težave s ponovljivostjo, saj je proces agregacije zelo kompleksen. Pogoje meritev bi morali optimizirati in izvajati poskuse z večjim številom ponovitev. Ne glede na težave pri testiranju, so bili pri sobni temperaturi in $37\ ^\circ\text{C}$ učinkoviti vsi zaviralci agregacije. Pri sobni temperaturi je bila najuspešnejša spojina **JRR6**, v splošnem pa spojine z isoindolin-1,3-dionom, benzilaminom ter

vmesnikom s 4-6 C. Pri 37 °C so spojine v večini slabše zavirale agregacijo. Pri višji temperaturi se je zaporedje učinkovitosti zaviralcev agregacije signifikantno spremenilo. Tokrat se je za najbolj uspešnega v vlogi heterocikla izkazal indol. Aktivnost spojin bi morali potrditi še z uporabo alternativnih testov.

LITERATURA

1. Anand R, Gill KD, Mahdi AA: Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology* 2014; 76 (Part A): 27–50.
2. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366 (9503): 2112–2117.
3. Wimo A, Jonsson L, Bond J, Prince M, Winblad B, Alzheimer Disease international: The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement* 2013; 9 (1): 1–11.
4. Reitz C, Brayne C, Mayeux R: Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011; 7 (3): 137–152.
5. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute on Aging: Alzheimer's disease, Unraveling the mystery. 2008; str.: 21-25, 27-32, 36-38.
6. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al.: Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1–42/1–40 ratio *in vitro* and *in vivo*. *Neuron* 1996; 17 (5): 1005–1013.
7. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al.: A new pathogenic mutation in the APP gene (1716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum Mol Genet* 1997; 6 (12): 2087–2089.
8. Mayeux R, Tang MX, Jacobs DM, Manly J, Bell K, Merchant C, et al.: Plasma amyloid β -peptide 1–42 and incipient Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 46 (3): 412–416.
9. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak VM, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD: Apolipoprotein E: high avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type ϵ 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1977-1981.
10. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al.: Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 1467-1472.
11. Davies P, Maloney AJF: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2 (8000): 1403.

12. Hardy J, Allsop D: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 383-388.
13. Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-356.
14. Van Marum RJ: Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 265-274.
15. Saez-Orellana F, Godoy PA, Bastidas CY, Silva-Grecchi T, Guzman L, Aguayo LG, et al.: ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of beta-amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 2015; 100: 116-123.
16. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT: Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1(1): a006189.
17. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (11): 6448–6453.
18. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, et al.: Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2004; 24 (45): 10191–10200.
19. Klein WL, Krafft GA, Finch CE: Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 2001; 24 (4): 219–224.
20. Garcia ML, Cleveland DW: Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13 (1): 41–48.
21. Castellani RJ, Perry G: The complexities of the pathology–pathogenesis relationship in Alzheimer disease. *Biochem Pharmacol* 2014; 88 (4): 671–676.
22. Hardy J, Bogdanovic N, Winblad B, Portelius E, Andreasen N, Cedazo-Minguez A, et al.: Pathways to Alzheimer's disease. *J Intern Med* 2014; 275 (3): 296–303.
23. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ: Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248: 1122–1124.

24. Hardy JA, Higgins GA: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184–185.
25. Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB, Haass C: The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid β -protein. *Ann. NY Acad Sci* 1996; 777: 57–64.
26. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, et al.: Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359: 325–327.
27. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA: Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 1990; 250: 279–282.
28. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al.: The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 2010; 5: e9505.
29. Hardy J: Does A β 42 have a function related to blood homeostasis? *Neurochem Res* 2007; 32: 833–835.
30. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al.: Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* 2007; 13: 1029–1031.
31. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, et al.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733 – 736.
32. Nunan J, Small DH: Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Letters* 2000; 483: 6-10.
33. Qiu T, Liu Q, Chen Y-X, Zhao Y-F, Li Y-M: A β 42 and A β 40: similarities and differences. *J Pept Sci* 2015; 21: 522-529.
34. Murphy MP, Hickman LJ, Eckman CB, Uljon SN, Wang R, Golde TE: γ - Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid β peptides of varying length. *J Biol Chem* 1999; 274: 11914–11923.

35. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT: The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693–4697.
36. Barz B, Urbanc B: Dimer formation enhances structural differences between amyloid β -protein (1–40) and (1–42): an explicit-solvent molecular dynamics study. *PLoS One* 2012; 7: e34345.
37. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB: Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 330–335.
38. Viet MH, Li MS: Amyloid peptide $A\beta$ 40 inhibits aggregation of $A\beta$ 42: evidence from molecular dynamics simulations. *J Chem Phys* 2012; 136: 245105.
39. Török M, Milton S, Kaye R, Peng Wu, McIntire T, Glabe CG, Langen R: Structural and dynamic features of Alzheimer's $A\beta$ peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem* 2002; 277: 40810–40815.
40. Tycko R: Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q Rev Biophys* 2006; 39: 1–55.
41. Fukuma T, Mostaert AS, Serpell LC, Jarvis SP: Revealing molecular-level surface structure of amyloid fibrils in liquid by means of frequency modulation atomic force microscopy. *Nanotechnology* 2008; 19: 384010.
42. Zhang S, Iwata K, Lachenmann MJ, Peng JW, Li S, Stimson ER, et al.: The Alzheimer's peptide $A\beta$ adopts a collapsed coil structure in water. *J Struct Biol* 2000; 130: 130–141.
43. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, et al.: Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *PNAS* 2013; 110 (24): 9758-9763.
44. Schmidt M, Rohou A, Lasker K, Yadav JK, Schiene-Fischer C, Fändrich M, Grigorieff N: Peptide dimer structure in an $A\beta$ (1-42) fibril visualized with cryo-EM. *PNAS* 2015; 112 (38): 11858-11863.
45. Nelson R, Eisenberg D: Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16: 260–265.

46. Biancalana M, Makabe K, Koide A, Koide S: Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of beta-rich peptide self-assembly mimics. *J Mol Biol* 2008; 383: 205–213.
47. Ono M, Saji H: Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: Novel PET/SPECT imaging probes for diagnosis of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* 2012; 118: 338-344.
48. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al.: Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007; 6: 734–746.
49. Selkoe DJ: Imaging Alzheimer's amyloid. *Nat Biotechnol* 2000; 18 :823–824.
50. Chang WM, Dakanali M, Capule CC, Sigurdson CJ, Yang J, Theodorakis EA: ANCA: A family of fluorescent probes that bind and stain amyloid plaques in human tissue. *ACS Chem Neurosci* 2011; 2: 249–55.
51. Weissleder R, Ntziachristos V: Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003; 9: 123–8.
52. Nesterov EE, Skoch J, Hyman BT, Klunk WE, Bacskai BJ, Swager TM: *In vivo* optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44: 5452–6.
53. Ran C, Xu X, Raymond SB, Ferrara BJ, Neal K, Bacskai BJ, et al.: Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for *in vivo* detection of amyloid- β deposits. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 15257–15261.
54. Eckroat TJ, Mayhoub AS, Garneau-Tsodikova S: Amyloid- β probes: Review of structure-activity and brain-kinetics relationships. *Beilstein J Org Chem* 2013; 9: 1012-1044.
55. Vassar OS, Culling CF: Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* 1959; 68: 487-498.
56. Klunk WE, Debnath ML, Pettegrew JW: Chrysamine-G binding to Alzheimer and control brain: autopsy study of a new amyloid probe. *Neurobiol Aging* 1995; 16(4): 541-548.

57. Puchtler H, Sweat F: Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem* 1965; 13(8): 693-694.
58. Klohs J, Rudin M: Unveiling molecular events in the brain by noninvasive imaging. *Neuroscientist* 2011; 17 (5): 539-559.
59. Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M: Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2009; 52 (20): 6394-6401.
60. Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, et al.: ^{18}F -labeled flavones for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Med Chem* 2009; 17 (5): 2069-2076.
61. Zhang W, Oya S, Kung M-P, Hou C, Maier DL, Kung HF: F-18 Polyethyleneglycol stilbenes as PET imaging agents targeting A β aggregates in the brain. *Nucl Med Biol* 2005; 32 (8): 799-809.
62. Ono M, Wilson A, Nobrega J, Westaway D, Verhoeff P, Zhuang Z-P, et al.: ^{11}C -labeled stilbene derivatives as A β -aggregate-specific PET imaging agents for Alzheimer's disease. *Nucl Med Biol* 2003; 30 (6): 565-571.
63. Barthel H, Sabri OJ: Florbetaben to Trace Amyloid- β in the Alzheimer Brain by Means of PET. *Alzheimer's Dis* 2011; 26 (3): 117-121.
64. Choi SR, Golding G, Zhuang Z, Zhang W, Lim N, Hefti F, et al.: Preclinical properties of 18F-AV-45: A PET agent for A β plaques in the brain. *J Nucl Med* 2009; 50 (11): 1887-1894.
65. Yang L, Rieves D, Ganley C: Brain amyloid imaging — FDA approval of Florbetapir F18 injection. *N Engl J Med* 2012; 367:885-887.
66. Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M: Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain. *Bioorg Med Chem* 2009; 17 (17): 6402-6406.
67. Ono M, Haratake M, Saji H, Nakayama M: Development of novel β -amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole. *Bioorg Med Chem* 2008; 16 (14): 6867-6872.

68. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang G-F, Debnath ML, Klunk WE: Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* 2003; 46 (13): 2740-2754.
69. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55 (3): 306-319.
70. Xu M, Ren W, Tang X, Hu Y, Zhang H: Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid- β aggregates. *Acta Pharmacologica Sinica* 2016; 37: 719–730.
71. Zhou M, Wang X, Liu Z, Yu L, Hu S, Chen L, et al.: Advances of molecular imaging probes for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2014; 11: 221–231.
72. Grabowski ZR, Rotkiewicz K, Rettig W: Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chem Rev* 2003; 103: 3899–4031.
73. Haidekker MA, Theodorakis EA: Molecular rotors--fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Org Biomol Chem* 2007; 5: 1669–1678.
74. Cui M, Ono M, Watanabe H, Kimura H, Liu B, Hideo Saji: Smart near-infrared fluorescence probes with donor-acceptor structure for in vivo detection of β -amyloid deposits. *J Am Chem Soc* 2014; 136: 3388-3394.
75. Ono M, Watanabe H, Kimura H, Saji H: BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral β -amyloid plaques. *ACS Chem Neurosci* 2012; 3: 319–324.
76. Hintersteiner M, Enz A, Frey P, Jatton AL, Kinzy W, Kneuer R, et al.: In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 577–583.
77. Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T: Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 1989; 177: 244–249.
78. Voropai ES: Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *Journal of Applied Spectroscopy* 2003; 70: 868–874.
79. Biancalana M, Koide S: Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804 (7): 1405-1412.

80. Krebs MR, Bromley EH, Donald AM: The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* 2005; 149: 30–37.
81. Groenning M, Olsen L, van de Weert M, Flink JM, Frokjaer S, Jorgensen FS: Study on the binding of thioflavin T to beta-sheet-rich and non-beta-sheet cavities. *J Struct Biol* 2007; 158: 358–369.
82. Guan Y, Cao KJ, Cantlon A, Elbel K, Theodorakis EA, Walsh DM, et al.: Real-time monitoring of Alzheimer's-related amyloid aggregation via probe enhancement-fluorescence correlation spectroscopy. *ACS Chem Neurosci* 2015; 6: 1503-1508.
83. Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y: Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 16462-16465.
84. LeVine H 3rd: Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 1993; 2:404–410.
85. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW: Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* 1994; 271 (13): 992-998.
86. Rodda J, Carter J: Cholinesterase inhibitors and memantine for symptomatic treatment of dementia. *BMJ* 2012; 344: e2986.
87. Guzior N, Więckowska A, Panek D, Malawka B: Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry* 2015; 22: 373-404.
88. Martinez A: *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease. Volume 1: Beta-Amyloid, Tau Protein and Glucose Metabolism*; RSC: Cambridge, UK, 2010.
89. Martinez A: *Emerging Drugs and Targets for Alzheimer's Disease. Volume 2: Neuronal Plasticity*. RSC: Cambridge, UK, 2010.
90. Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B: Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports* 2016; 68: 127-138.
91. Cummings JL, Morstorf T, Zhong K: Alzheimer's disease drug development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6: 37.

92. Bieschke J: Natural compounds may open new routes to treatment of amyloid diseases. *Neurotherapeutics* 2013; 10(3): 429-439.
93. Chiti F, Dobson CM: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* 2006; 75: 333–366.
94. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, et al.: EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology* 2008; 15: 558–566.
95. Wang SH, Dong XY, Sun Y: Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human insulin fibrillation/aggregation kinetics. *Biochemical Engineering Journal* 2012; 63: 38–49.
96. Wobst HJ, Sharma A, Diamond MI, Wanker EE, Bieschke J: The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Letters* 2015; 589: 77–83.
97. Gopalswamy M, Kumar A, Adler J, Baumann M, Henze M, Kumar ST, et al.: Structural characterization of amyloid fibrils from the human parathyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1854 (4): 249-257.
98. Feng Y, Wang XP, Yang SG, Wang YJ, Zhang X, Du XT, et al.: Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neuro Toxicology* 2009; 30: 986–995.
99. Malisauskas R, Botyriute A, Cannon JG, Smirnovas V: Flavone derivatives as inhibitors of insulin amyloid-like fibril formation. *PLoS ONE* 2015; 10 (3): e0121231.
100. Šneideris T, Baranauskienė L, Cannon JG, Rutkienė R, Meškys R, Smirnovas V: Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives. *PeerJ* 2015; 24 (3): e1271.
101. Morphy R, Rankovic Z: Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* 2005; 48: 6523-6543.
102. Espinoza-Fonseca LM: The benefits of the multi-target approach in drug design and discovery. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 896-897.
103. Guzior N, Bajda M, Skrok M, Kurpiewska K, Lewiński K, Brus B, et al.: Development of multifunctional, heterodimeric isoindoline-1,3-dione derivatives as cholinesterase and β -

amyloid aggregation inhibitors with neuroprotective properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 92: 738-749.

104. Lane RM, Potkin SG, Enz A: Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006; 9: 101-124.

105. Alvarez A, Alarcon R, Opazo C, Campos EO, Munoz FJ, Calderon FH, et al.: Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J Neurosci* 1998; 18: 3213-3223.

106. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C: Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 131-138.

107. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O: Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002; 110: 627-639.

108. Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, et al.: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-b-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996; 16: 881-891.

109. Giacobini E: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res* 2004; 50: 433-440.

110. Pepeu G, Giovannini MG: Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res* 2009; 6: 86-96.

111. Więckowska A, Więckowski K, Bajda M, Brus B, Sałat K, Czerwińska P, et al.: Synthesis of new N-benzylpiperidine derivatives as cholinesterase inhibitors with β -amyloid anti-aggregation properties and beneficial effects on memory in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015; 23: 2445-2457.

112. <http://www.ffa.uni-lj.si/o-fakulteti/katedre/katedra-za-farmacevtsko-kemijo/oprema-in-storitve/>, dostopano 14.5.2016.

113. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/van-leusen-reaction.shtm>, dostopano 8.2.2016.

114. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/van-leusen-oxazole-synthesis.shtm>, dostopano 8.2.2016.
115. Yamamuro D, Uchida R, Ohtawa M, Arima S, Futamura Y, Katane M, et al.: Synthesis and biological activity of 5-(4-methoxyphenyl)-oxazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 313-316.
116. Strotman NA, Chobanian HR, Guo Y, He J, Wilson JE: Highly regioselective palladium-catalyzed direct arylation of oxazole at C-2 or C-5 with aryl bromides, chlorides and triflates. *Organic Letters* 2010; 12 (16): 3578-3581.
117. Bojan Verček, zapiski s predavanj pri predmetu Organska kemija, 2010/11.
118. Herbivo C, Comel A, Kirsch G, Manuela M, Raposo M: Synthesis of 5-aryl-5'-formyl-2,2'-bithiophenes as new precursors for nonlinear optical (NLO) materials. *Tetrahedron* 2009; 65: 2079-2086.
119. Diwu Z, Beachdel C, Klaubert DH: A facile protocol for the convenient preparation of amino-substituted α -bromo- and α,α -dibromo arylmethylketones. *Tetrahedron Letters* 1998; 39: 4987-4990.
120. Mitova V, Koseva N, Troev K: Study of Atherton-Todd reaction mechanism. *RCS Advances* 2014; 4: 64733-64736.
121. Holub JM, O'Toole-Colin K, Getzel A, Argenti A, Evans MA, Smith DC, et al.: Lipid-lowering effects of ethyl 2-phenacyl-3-aryl-1H-pyrrole-4-carboxylates in rodents. *Molecules* 2004; 9: 135-157.
122. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmaceutvska kemija III, Vaje in Seminarji, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.
123. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/staudinger-reaction.shtm>, dostopano 9.3.2016.
124. Yan L, Müller CE: Preparation, properties, reactions and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: toward the development of sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *J Med Chem* 2004; 47: 1031-1043.

125. Kruse CH, Holden KG, Pritchard ML, John A. Feild JA, Rieman DJ, et al.: Synthesis and evaluation of multisubstrate inhibitors of an oncogene-encoded tyrosine-specific protein kinase. *J Med Chem* 1988; 31: 1762-1767.
126. Khodarahmi GA, Chen CS, Hakimelahi GH, Tseng CT, Chern JW: Design, synthesis and cytotoxicity of 4-sulfonamide substituted benzamidobenzimidazolones and an acyl benzimidazolone. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2005; 2 (2): 124-134.
127. Verbicky Jr. JW, Williams L: Thermolysis of *N*-alkyl-substituted phthalamic acids. Steric inhibition of imide formation. *J Org Chem* 1981; 46 (1): 175-177.
128. Li JJ: Name reactions, A Collection of Detailed Reaction Mechanisms, Vilsmeier mechanism for acid chloride formation, Springer Berlin Heidelberg. 3. izdaja, 2006, str. 605.
129. Min J, Lee JW, Ahn Y-H, Chang Y-T: Combinatorial dapsone dye library and its application to site selective probe for human serum albumin. *J Comb Chem* 2007; 9: 1079-1083.
130. Brain CT, Paul JM: Rapid synthesis of oxazoles under microwave conditions. *Synlett* 1999; 10: 1642-1644.
131. Burgess EM, Penton Jr. HR, Taylor EA, Williams WA: Conversion of primary alcohols to urethanes via the inner salt of methyl(carboxysulfamoyl)triethylammonium hydroxide: methyl *N*-hexylcarbamate. *Organic Syntheses* 1977; 56: 40.
132. Khapli S, Dey S, Mal D: Burgess reagent in organic synthesis. *J Indian Inst Sci* 2001; 81: 461-476.
133. Kandemir H, Ma C, Kutty SK, Black DS, Griffith R, Lewis PJ, Kumar N: Synthesis and biological evaluation of 2,5-di(7-indolyl)-1,3,4-oxadiazoles, and 2- and 7-indolyl 2-(1,3,4-thiadiazolyl)ketones as antimicrobials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2014; 22: 1672-1679.
134. Broersen K, Rousseau F, Schymkowitz J: The culprit behind amyloid beta peptide related neurotoxicity in Alzheimer's disease: oligomer size or conformation? *Alzheimers Res Ther* 2010; 2 (4): 12.