



DOMEN KUTOŠA

NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH *N*-ALKIL
NAFTALENSULFONAMIDOV KOT POTENCIALNIH ZAVIRALCEV HOLIN-
ESTERAZ

THE DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW *N*-ALKYL
NAPHTHALENESULPHONAMIDES AS POTENTIAL INHIBITORS OF
CHOLINESTERASES

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljal na katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm.. Spektroskopske meritve, ^{13}C -NMR in ^1H -NMR spektri, IR spektri ter kromatografije so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo. Masni spektri so bili posneti na VG – Analytical Auspec Q spektrometru v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Kristalne strukture zaviralcev v kompleksu z butirilholin-esterazo so bile posnete na Inštitutu Biologie Structurale v Grenoblu.

Zahvala

Iskreno zahvalo izrekam prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm., za dodelitev zanimive teme magistrske naloge in njegovo pomoč ter nasvete pri pisanju. Posebna zahvala gre Urbanu Košaku, mag. farm., za strokovno pomoč pri delu, pisanju magistrske naloge in čas, ki ga je skupaj z menoj prebil v kemijskem laboratoriju. Zahvaljujem se tudi dr. Borisu Brusu, mag. farm., za pomoč pri razreševanju kristalnih struktur, izvedbi zaviralnih testov in pri pisanju magistrske naloge.

Ob tej priložnosti se zahvaljujem tudi vsem sodelavcem na katedri za farmacevtsko kemijo s katerimi smo si delili laboratorij, moji družini za nesebično podporo na moji študijski poti ter vsem mojim priateljem – Hvala.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelal samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm..

Domen Kutoša

Ljubljana, 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

KAZALO

POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1 UVOD	1
1.1 Alzheimerjeva bolezni.....	1
1.2 Hipoteze o nastanku Alzheimerjeve bolezni	2
1.2.1 Amiloidna hipoteza.....	2
1.2.2 Holinergična hipoteza.....	3
1.3 Holin-esteraze	4
1.3.1 Acetilholin-esteraza	5
1.3.2 Butirilholin-esteraza	5
1.4 Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni.....	7
1.5 Strukturno podprto rešetanje in optimizacija zadetkov.....	8
2 NAČRT DELA	10
2.1 Retrosinteza načrtovanih spojin	11
2.1.1 Retrosinteza novih <i>N</i> – alkil sulfonamidov	11
2.2 Farmakološko testiranje	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Materiali	14
3.2 Sinteza	14
3.3 Analitske metode	15
3.4 Farmakološko testiranje	17
4 EKSPERIMENTALNO DELO	18
4.1 Shema sinteze naftalensulfonamidov 3 - 7	18
4.2 Sinteza 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13)	19
4.3 Sinteza (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12)	21
4.4 Sinteza spojine <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3)	22
4.5 Alkiliranje sulfonamidnega dušika <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil) naftalen-2-sulfonamida (3)	24
4.6 Sinteza <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)- <i>N</i> -metilnaftalen-2-sulfonamida (4)	24
4.7 Sinteza <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)- <i>N</i> -etilnaftalen-2-sulfonamida (5)	25
4.8 Sinteza <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)- <i>N</i> -propilnaftalen-2-sulfonamida (6)	26
4.9 Sinteza spojine <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)- <i>N</i> -butilnaftalen-2-sulfonamid (7)	29
4.10 Farmakološko testiranje zaviralcev AChE in BChE.....	30
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	31
5.1 Pregled sinteze novih <i>N</i> -alkil naftalensulfonamidov.....	31
5.1.1 Reakcijski mehanizem sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13)	31
5.1.2 Reakcijski mehanizem sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12)	32
5.1.3 Reakcijski mehanizem sinteze spojine <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3)	33
5.1.4 Reakcijski mehanizem alkiliranja sulfonamidnega dušika <i>N</i> -((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3)	33
5.2 Razprava in rezultati farmakoloških testov sintetiziranih spojin	34

5.3 Kristalna struktura spojine vodnice (2) in novih <i>N</i> – alkil sulfonamidov (3, 4) vezanih v huBChE	35
5.3.1 Spojina vodnica (2)	37
5.3.2 Spojina <i>N</i> –((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamid (3)	38
5.3.3 Spojina <i>N</i> –((1-benzilpiperidin-3-il)metil)- <i>N</i> -metilnaftalen-2-sulfonamida (4)	39
5.4 Analiza farmakokinetičnih lastnosti.....	40
5.4.1 Krvno možganska bariera	40
5.4.2 Fizikalno-kemijske lastnosti zdravilnih učinkovin z delovanjem v CŽS	41
5.4.3 Predvidene farmakokinetične lastnosti zaviralcev BChE (3-7)	41
6 ZAKLJUČEK.....	43
7 LITERATURA.....	44
8 PRILOGE	47

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Shematski prikaz kopičenja nevrofibrilarnih zank in amiloidnih plakov.</i>	4
<i>Slika 2: Shematski prikaz aktivnega mesta encima humane BChE.</i>	6
<i>Slika 3: Strukturni prikaz zaviralcev ChEl.</i>	8
<i>Slika 4: Kristalna struktura spojine vodnice 2</i>	9
<i>Slika 5: Načrtovani derivati N – alkil naftalensulfonamidov.</i>	10
<i>Slika 6: Shematski prikaz retrosinteze novih N – alkil naftalensulfonamidnih zaviralcev BChE (3-7).</i>	12
<i>Slika 7: Shematski prikaz sinteze novih N – alkil naftalensulfonamidov (4-7).</i>	18
<i>Slika 8: Shematski prikaz sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13).</i>	19
<i>Slika 9: Shematski prikaz sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12).</i>	21
<i>Slika 10: Shematski prikaz sinteze N-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3).</i>	22
<i>Slika 11: Shematski prikaz alkiliranje sulfonamidnega dušika N-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3).</i>	24
<i>Slika 12: Predlagan reakcijski mehanizem sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13).</i>	31
<i>Slika 13: Predlagan reakcijski mehanizem sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12).</i>	32
<i>Slika 14: Predlagan reakcijski mehanizem sinteze spojine N-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3)</i>	33
<i>Slika 15: Predlagan reakcijski mehanizem alkiliranje sulfonamidnega dušika N-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3).</i>	33
<i>Slika 16: Prikaz kristalne strukture spojine 2 vezane v huBChE (PDB ID 5DYW).</i>	37
<i>Slika 17: Prikaz kristalne strukture spojine 3 vezane v huBChE (PDB ID 5DYY).</i>	38
<i>Slika 18: Prikaz kristalne strukture spojine 4 vezane v huBChE (PBD ID 5DYT).</i>	39
<i>Slika 19: Prikaz distribucije spojin iz krvnega obtoka v možganske celice.</i>	40

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Prikaz vpliva odstranitve -(CH₂)₂-OMe verige spojini vodnici 2 in zamenjave z alkilnimi verigami..</i>	35
<i>Tabela 2: Prikaz povprečnih razdalj [Å] med posameznimi strukturnimi deli spojine vodnice 2 in huBChE. ..</i>	37
<i>Tabela 3: Prikaz povprečnih razdalj [Å] med posameznimi strukturnimi deli spojine vodnice 3 in huBChE. ..</i>	38
<i>Tabela 4: Prikaz povprečnih razdalj [Å] med posameznimi strukturnimi deli spojine vodnice 4 in huBChE. ..</i>	39
<i>Tabela 5: Prikaz izračunanih fizikalno-kemijskih lastnosti spojine vodnice 2 in sintetiziranih novih N – alkil sulfonamidnih zaviralcev huBChE (3-7).</i>	42

POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je oblika demence značilna za starejšo populacijo. Zdravila, ki bi odpravila Alzheimerjevo bolezen vse do danes ne poznamo. S staranjem svetovne populacije in posledično vedno večjim ekonomskim bremenom, raziskovanje novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni oziroma njenih simptomov pridobiva na pomenu.

V magistrski nalogi smo se usmerili v sintezo novih *N* – alkil naftalensulfonamidov, ki zavirajo delovanje humanega encima butirilholin-esteraze. Encim butirilholin-esteraza, katerega aktivnost in koncentracija z razvojem Alzheimerjeve bolezni rasteta, hidrolizira številne estre, med njimi tudi živčni prenosalec acetilholin. Zaviralce smo načrtovali na podlagi strukture spojine vodnice (2). Želeli smo raziskati vpliv odstranitve verige –(CH₂)₂-OMe in zamenjavo le-te z alkilnimi verigami -Me, -Et, -nPr, -nBu na zaviralno aktivnost. Sintetizirali smo pet novih spojin, ki imajo v primerjavi s spojino vodnico (2) predvidene boljše farmakokinetične lastnosti. Izboljšane farmakokinetične lastnosti omogočajo boljše prehajanje možgansko krvne pregrade in povečajo koncentracijo spojine na mestu delovanja. Vse spojine so zavirale butirilholin-esterazo v nanomolarnem koncentacijskem območju. Vse sintetizirane spojine so izkazovale primerljivo zaviralno jakost. Najmočnejši zaviralec v skupini petih sintetiziranih spojin je spojina 4 s 24,97 nM srednjo zaviralno koncentracijo. Encimski testi in razrešena kristalna struktura nakazujejo, da –(CH₂)₂-OMe veriga stabilizira spojino na vhodu v aktivno mesto. Kisik eterske skupine tvori vodikovo vez z aminokislinskim preostankom Asn698 preko molekule vode, kar se odraža v boljši jakosti zaviranja encima. Sintetizirane spojine s spremenjeno metoksietilno verigo sicer izkazujejo malenkost slabše zaviralno delovanje, imajo pa zaradi nižje molekulske mase in vrednosti logP napovedane boljše farmakokinetične lastnosti. S pridobljenimi rezultati smo določili odnos med strukturo in delovanjem *N* – alkil sulfonamidov, ki bodo služili kot podlaga za nadaljnjo optimizacijo spojine vodnice 2.

Ključne besede: Alzheimerjeva bolezen; zaviralci butirilholin-esteraze; strukturna optimizacija

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a form of dementia, which is typical for the older population. There is no medication available up to this day capable of healing the disease. With aging of the world's population and the increasing economical burden, inflicted by the widespread of the disease, research in the field of Alzheimer's disease and its symptoms is gaining interest.

We have focused towards the synthesis of novel *N* – alkyl naphthalenesulphonamides, which are capable of inhibiting human butyrylcholinesterase. Butyrylcholinesterase hydrolyses many esters, amongst others also the neurotransmitter acetylcholine. Its concentration is increased with the development of Alzheimer's disease. Inhibitors were designed and developed on the basis of the structure of the lead compound (**2**). Our aim was to gain an understanding about the importance of the side chain $-(CH_2)_2\text{-OMe}$ and the effect of its removal or replacement with other alkyl chains, such as -Me, -Et, -nPr, -nBu, on the butyrylcholinesterase inhibitory potency. We synthesised five novel compounds with predictably better pharmacokinetic characteristics if compared with the lead compound (**2**), and a better capability to penetrate the blood-brain barrier, which increases compound's concentration at the active site. Synthesised compounds showed inhibitory potencies in the nanomolar range and similar inhibitory capabilities. Compound **4** proved to be the most potent synthesised inhibitor, with the IC_{50} value of 24,97 nM. Gathered enzyme test results and a solved crystal structure suggest that $-(CH_2)_2\text{-OMe}$ chain stabilises the compound at the entry into the active site, while a bond is observed between the ether oxygen of the compound **2** *N* – alkyl chain and structural water, which forms a H-bond with Asn698. The result is a better inhibitory potency. Synthesised compounds with replaced *N* – alkyl chain show slightly weaker inhibitory capabilities. However, due to the lower molecular mass and logP values, they have predictably better pharmacokinetic characteristics.

We were able to determine the relationship between the structure and potency of novel *N* – alkyl naphthalenesulphonamides that will provide a foundation for further optimisation of the lead compound **2**.

Keywords: Alzheimer's disease; Butyrylcholinesterase inhibitors; Structural optimisation

SEZNAM OKRAJŠAV

Et	alkilna veriga –CH ₂ CH ₃
Me	alkilna veriga –CH ₃
nBu	alkilna veriga –(CH ₂) ₃ CH ₃
nPr	alkilna veriga –(CH ₂) ₂ CH ₃
Å	angstrom - merska enota (1 Å = 0,1 nm)
AB	Alzheimerjeva bolezen
ACh	acetilholin
AChE	acetilholin-esteraza
APOE	apolipoprotein E
APP	amiloidni prekurzorski protein
ATCI	acetiltioholin-jodid
Aβ	amiloid β
bd	široki dublet
bs	široki singlet
BTCI	butiriltioholin-jodid
BChE	butirilholin-esteraza
ChE	holin-esteraza
ChEI	zaviralec holin-esteraz
cLogP	merilo hidrofobnosti
CST	cerebrospinalna tekočina
CŽS	centralni živčni sistem
d	doublet
dd	doublet doubleta
DMSO	dimetil sulfoksid
DTNB	5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzojska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
HTS	visoko zmogljivo rešetanje
huBChE	humana rekombinantna butirilholin-esteraza
Hz	herz
IC₅₀	srednja zaviralna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija

J	sklopitvena konstanta
KMB	krvno možganska bariera
m	multiplet
mAChE	mišja acetilholin-esteraza
MES	2-(<i>N</i> -morfolino) etansulfonska kislina
MF	mobilna faza
MM	molekulska masa
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PAS	periferno anionsko mesto
ppm	število delcev na milijon (parts per million)
q	kvartet
RA	rezidualna encimska aktivnost (razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in ob njegovi odsotnosti)
Rf	retencijski faktor
s	singlet
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija
tPSA	merilo polarnosti površine molekul

1 UVOD

1.1 Alzheimerjeva bolezen

Demenca je skupno ime za vsa bolezemska stanja, katerih najočitnejša posledica je izguba spomina. Demenco delimo na reverzibilno in ireverzibilno. Alzheimerjeva bolezen (AB) spada med slednje in predstavlja kar 70 % delež vseh oblik demenc. Demenco lahko povzročijo tudi nekatera druga obolenja kot na primer možganska kap, Parkinsonova bolezen, alkoholizem, Downov sindrom in travmatska poškodba možganov [1]. Reverzibilne demence so manj pogoste in deloma ozdravljive z odstranitvijo vzročnih dejavnikov, ireverzibilne demence pa so progresivne in do danes neozdravljive [2].

AB je dobila ime po nemškemu psihiatru dr. Aloisu Alzheimerju, ki je leta 1906 opisal primer te bolezni po histopatološki preiskavi vzorca možganov pacientke [3]. V zadnjih letih smo bili priča velikim napredkom diagnostičnih tehnik. Skupaj z izboljšano tehnologijo so raziskovalci dognali, da v mnogih primerih ne gre za »sklerozo možganov«, ampak za bolezen poznano kot Alzheimerjeva bolezen. Kriteriji, s katerimi lahko klinično ovrednotimo AB, so demenca (ugotovljena z dvema nevropsihiatričnima testoma), najmanj dve prizadeti kognitivni področji, progresivno pešanje spomina, motnje zavesti ter pričetek bolezni v starosti od 40 do 90 let (najpogosteje po 65. letu). Klinična diagnoza je dovolj, da sumimo na AB, vendar pa je dokončna diagnoza mogoča le s histopatološko potrditvijo [4]. AB delimo na družinsko obliko, ki paciente prizadene med 40. in 50. letom in sporadično, ki se pojavi med 70. in 80. letom starosti [5]. Približno 5 % primerov AB je družinskih z mutacijo v genu za amiloidni prekurzorski protein (APP) ali v genu za presenilin. Večina mutacij v obeh genih spremeni presnovo APP. Rezultat spremenjene presnove je največkrat večja količina amiloida β z daljšo verigo (A β 42), ki je podvržena večji agregaciji t.j. večji tvorbi amiloidnih leh. Omenjene lehe najdemo tudi pri pacientih s sporadično obliko AB [6]. Pri vseh treh oblikah AB je bil apolipoprotein E (APOE) prepoznan kot dejavnik tveganja. Natančnejša spoznanja, ob dejstvu, da je E4 alel APOE gena dejavnik tveganja, predpostavlja, da ima holesterol vlogo v patogenezi bolezni [7]. Kot dejavniki tveganja so bili prepoznavni tudi poškodbe glave, sladkorna bolezen, menopavza, virusne okužbe, staranje, kap, kajenje, depresija, alkoholizem idr., vendar iz rezultatov raziskav še vedno ni moč predpostaviti jasnih etioloških zaključkov [8].

Glavni patološki značilnosti bolezni sta prisotnost zunajceličnih amiloidnih leh, ki se tvorijo z agregacijo peptida A β , ter znotrajcelično tvorjenje nevrofibrilarnih pentelj, ki so posledica odlaganja hiperfosforiliranega proteina Tau (Slika 1). Poleg omenjenih, se pri AB značilno zmanjša število možganskih celic (predvsem holinergičnih nevronov) ter količina živčnega prenašalca acetilholina (ACh). Rezultat se odraža v holinergični disfunkciji značilni za AB [9]. Amiloidne lehe se sprva pojavijo v frontalnem delu možganov in se kasneje razširijo po celotnih možganih. Hiperfosforiliran protein Tau in nevrofibrilarne pentlje pa se pojavijo v limbičnem sistemu (hipotalamusu) in napredujejo proti zunanjemu delu možganov [6]. Nastanek amiloidnih leh in nevrofibrilarnih pentelj sprembla tudi oksidativni stres in vnetne reakcije, kar zaznamo kot upad kognitivnih funkcij in pešanje spomina [8].

1.2 Hipoteze o nastanku Alzheimerjeve bolezni

Od leta 1906, ko je Alois Alzheimer prvič predstavil obolenje, do leta 1950 ni bilo zaradi 2. svetovne vojne nobenega večjega napredka pri razvoju teorij in zdravljenju obolenja. V petdesetih letih 20. stoletja pa se je zanimanje za obolenje začelo povečevati. V letu 1959 je prevladovalo mnenje, da je AB redka pre-senilna bolezen. Omenjena trditev je bila ovržena v letu 1976, ko je dr. Robert Katzman primerjal prevalenco s smrtnostjo obolenja AB. Zaključil je da zaradi visoke smrtnosti in vse večjega števila pacientov, ki bolehajo za AB, obolenje potrebuje večjo pozornosti, več energije ter sredstev vloženih v raziskovanje AB. [8]. Rezultat so nova dognanja in hipoteze, ki so jih skozi leta postavili različni raziskovalci [10]. V sklopu magistrske naloge sta prikazani dve prevladujoči hipotezi za nastanek AB; amiloidna in holinergična hipoteza. Obe omenjeni hipotezi imata svoje nasprotnike. Predpostavljajo namreč, da sta zastavljeni napačno, saj doumevata, da eno patološko stanje povzroči drugo navkljub dejству, da je kopičenje amiloidnih plakov in nevrofibrilarnih zank pri AB prostorsko ločeno [11].

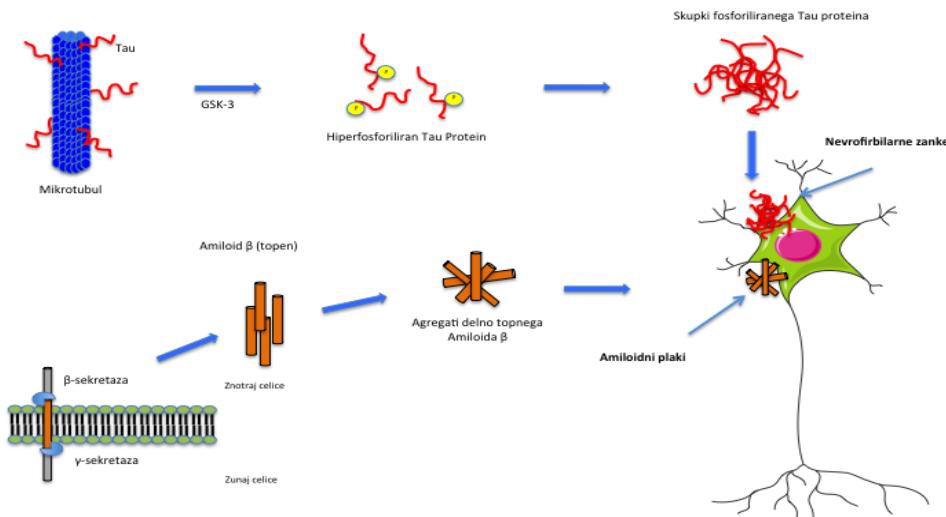
1.2.1 Amiloidna hipoteza

Amiloidna hipoteza pravi, da je za nastanek AB primarno odgovorno kopičenje A β , ki tvori amiloidne fibrile v amiloidnih plakih ter kasnejši nastanek nevrofibrilarnih zank, ki vodi v izgubo sinaps in smrt nevralnih celic [12]. Amiloidna hipoteza predvideva, da se skupki A β odlagajo v možganih in spodbujajo apoptozo s perforacijo celične membrane. Odlaganje amiloidnih plakov ali delno agregiranih, topnih A β spodbudijo nevrotoksično kaskado in povzročijo nevrodegeneracijo, ki vodi v AB. Oksidativno neravnovesje,

oksidativni stres in funkcionalne spremembe v tvorjenju A β so prvi kazalci bolezni. Nenormalen metabolizem A β je odgovoren za nastanek nevrotoksičnih zvrsti, ki so posledica mutacij v amiloidni kaskadi. Mutacije v proteinih APP, APOE4, presenilin-1 in presenilin-2 so odgovorni za avtosomalno - dominantno družinsko obliko AB [5]. Iz tega vidika so zaviralci agregacije zanimivi kandidati za zdravljenje AB v začetnih fazah bolezni [8].

1.2.2 Holinergična hipoteza

Holinergične nevronske poti, ki izvirajo iz sprednjega bazalnega možganskega debla in projecirajo v možgansko skorjo ter hipokampus, igrajo veliko vlogo pri kognitivnih funkcijah možganov [13]. Raziskave bolnikov z napreovalo AB v preteklih 20. letih kažejo na abnormalnosti v omenjenih poteh, predvsem v sprednjih bazalnih možganih. Hipoteza opisuje, da izguba holinergične funkcije v centralnem živčnem sistemu močno prispeva k upadu kognitivnih funkcij, ki so povezane z napreovalimi stopnjami AB [14]. V letu 1981 je bilo s testi na miših dokazano, da se biosinteza ACh pri mladih in starejših miših razlikuje za 75 %, pri pacientih z AB pa se aktivnost acetilholin-esteraze (AChE) dokazano poveča, kar vodi v povečano razgradnjo nevrotransmitora ACh, ki ga zaradi smrti holinergičnih nevronov in starosti pacienta nastaja vedno manj [15]. Študije domnevajo, da AChE poleg razgradnje ACh med drugim spodbuja agregacijo A β [8]. Dokazano je bilo, da AChE spodbuja agregacijo fragmentov peptida A β s tem, da tvori kompleks z rastocimi fibrili. Omenjeni kompleksi so bolj toksični kot sam A β . Struktorna domena AChE, ki naj bi bila odgovorna za to delovanje je periferno anionsko mesto encima (PAS) [8]. Hipoteza zaključuje, da vplivanje na holinergično funkcijo, z rezultatom povečanja koncentracije ACh, izboljša kognitivne funkcije v AB.



Slika 1: Shematski prikaz kopičenja nevrofibrilarnih zank in amiloidnih plakov.

1.3 Holin-esteraze

AChE ima specifično in dobro definirano fiziološko vlogo: izniči delovanje nevrotransmitorja ACh v sinapsi. Po drugi strani butirilholin-esteraza (BChE), znana tudi kot psevdoholin-esteraza, nima jasne funkcije. Ljudje z zmanjšano količino BChE so asimptomatski. Skupna jim je povečana občutljivost na mišični relaksant sukcinilholin; substrat AChE in BChE [16]. Z novimi in izboljšanimi analitskimi metodami je bilo dokazano, da AChE prevladuje v mišicah in možganih, v drugih tkivih pa prevladuje BChE. Hkrati je bilo dokazano, da je BChE sposobna nadomestiti delovanje AChE. Encima BChE in AChE sta identična v 52 % aminokislinske sestave, vendar ju kodirata različna gena [17]. Oba omenjena encima spadajo v alfa / beta družino hidrolaz. V to družino, skupaj s holin-esterazami, spadajo tudi lipaze in karboksil-esteraze. Vsem je skupna terciarna struktura ter njihova hidrolitska funkcija. Aktivno mesto oziroma acilni vezavni žepek karboksil-esteraz in holin-esteraz sestavlja triada Ser200, His440, Glu327, ki leži blizu dna aktivnega mesta encima (približno 20 Å od površine encima) [18]. Holin-esteraze imajo poleg acil-vezavnega žepeka še holin-vezavni žepek, ki je odgovoren za vezavo holinskega dela ACh ter za pravilno umeščanje esterske vezi za nukleofilni napad Ser200. V primeru AB koncentracija AChE v začetnih stopnjah naraste. Dokazi namigujejo, da sta koncentraciji obeh holin-esteraz regulirani sorazmerno, v nekaterih primerih pa celo obratno sorazmerno. Recipročno razmerje je dobro vidno ob različnih

obolenjih, med drugim tudi pri AB, kjer se koncentracija BChE v kasnejših fazah AB kompenzacijsko poveča tudi za dvakrat ob sočasnem padcu koncentracije AChE [16].

1.3.1 Acetilholin-esteraza

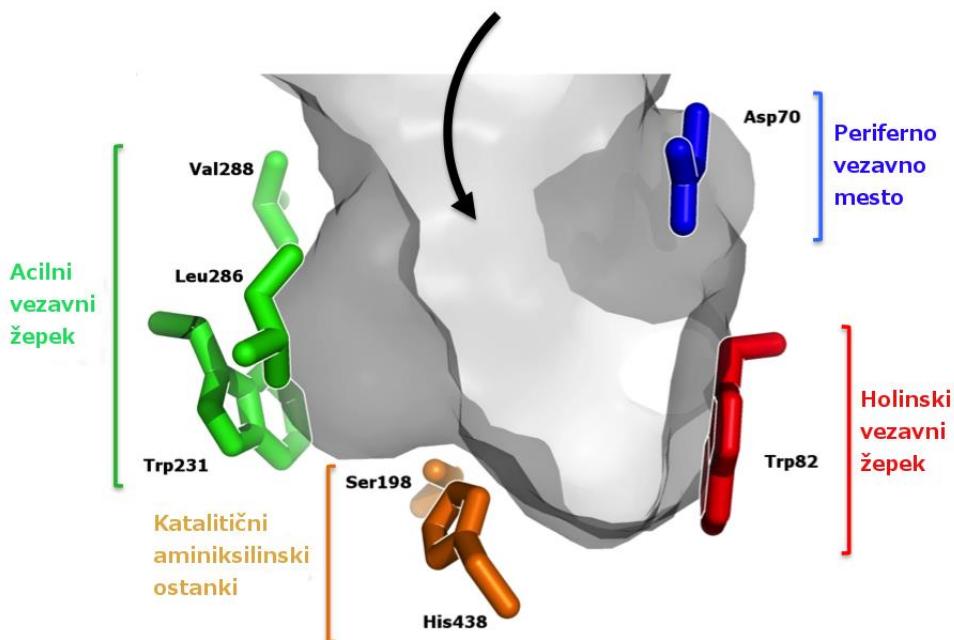
AChE je sestavljena iz holinskega vezavnega žepka in acilnega žepka, ki je sestavljen iz dveh ostankov fenilalanina (Phe288 in Phe290). Relativno velike stranske aromatske verige v acilnem žepku omejujejo dostop do aktivnega mesta večjim substratom, medtem ko se ACh in ostali manjši substrati lahko vežejo brez težav. 14 aromatskih aminokislinskih ostankov je razporejenih po celotnem lijaku. Vključeni so v holinsko vezavno mesto (Trp84, Tyr130 in Phe330), acilni žepek (Phe288 in Glu290) in periferno anionsko mesto (Tyr70, Tyr121, Trp279 in Tyr334). Preostalih pet aminokislin razporejenih po lijaku naj bi sodelovalo pri prehajanju pozitivno nabitih substratov do aktivnega mesta s pomočjo π -kationskih interakcij. AChE ima poleg holinskega vezavnega mesta tudi periferno vezavno mesto, ki lahko veže različne substrate (poleg ACh tudi druge). Nahaja se blizu roba lijaka. Sestavljen je iz enega kislinskega ostanka (Asp72) in štirih aromatskih ostankov (Tyr70, Tyr121, Trp279 in Tyr334). PAS sodeluje pri vezavi in usmerjanju kationskih substratov v encim s pomočjo π -kationskih interakcij. AChE ne prikazuje Michaelisove kinetike in izkazuje substratno inhibicijo pri fiziološkem pH. Ta se izkazuje pri visokih koncentracijah substrata, ko se substratna molekula veže v PAS, medtem ko je ena molekula substrata v aktivnem mestu [16]. Z vezavo dveh molekul ACh se omeji dostop vode, kar oteži deacetilacijo encima in vodi v substratno inhibicijo [19].

1.3.2 Butirilholin-esteraza

BChE podrobneje raziskujejo od leta 1940. Po uvedbi mišičnega relaksanta sukcinilholina so ugotovili, da imajo nekateri ljudje obliko BChE, ki ni zmožna hidrolizirati sukcinilholina. Nadaljnje raziskave so pokazale, da lahko ljudje živijo v polni odsotnosti delovanja BChE. Omenjeno odkritje je bilo podlaga za razmislek, ali je BChE sploh potrebna. Kasneje je bilo dokazano, da prisotnost BChE pri opicah poveča odpornost na živčne strupe organofosfate, kar je odpravilo dvome o BChE. Danes velja spoznanje, da je povišana koncentracija BChE prednost, ker višek le-te ne vpliva na nobeno življenjsko funkcijo [20]. BChE ima med drugim pomembno toksikološko vlogo, saj lahko deluje profilaktično in razgradi toksine kot sta fiziostigmin in kokain, kakor tudi organofosfatne estre, pesticide in anatoksine [18]. Glavna farmakološka razlika med obema omenjenima holin-esterazama (BChE in AChE) je v reakcijah s substrati in zaviralci ter encimska

kinetika. BChE namreč prikazuje substratno aktivacijo in ne substratnega zaviranja, kot v primeru AChE. BChE je sposobna hidrolizirati večje substrate v primerjavi z AChE (na primer butirilholin, po katerem je dobila tudi svoje ime). Strukturne razlike med AChE in BChE so odgovorne za razlike v aktivnosti in kinetiki. BChE je namreč v 52 % strukturno identična AChE. Aktivno mesto in oksanionska luknja v BChE sta skoraj identična kot v AChE. V holinskem vezavnem mestu BChE je Phe330 zamenjan z Ala328. Omenjena substitucija je vzrok za spremenjeno encimsko kinetiko. Ta zamenjava v povezavi z zmanjšanjem števila aminokislinskih ostankov v PAS BChE, je najverjetneje odgovorna za značilno substratno aktivacijo BChE. Ostanki fenilalanina v acilnem žepku AChE so zamenjeni z manj voluminoznimi alifatskimi ostanki Leu286 in Val288 v BChE. To poveča volumen žepka, kar omogoča vstopanje večjih substratov v aktivno mesto (Slika 2). Število aromatskih ostankov v lijaku je pri BChE zmanjšano na 8, kar poveča volumen le-tega za približno 200 Å.

BChE je prisotna tudi v serumu, kar je najverjetneje tudi vzrok za večjo glikozilacijo BChE kot AChE. BChE ima namreč vezanih 9 glikanskih verig, ki podaljšajo razpolovni čas BChE v plazmi [16].



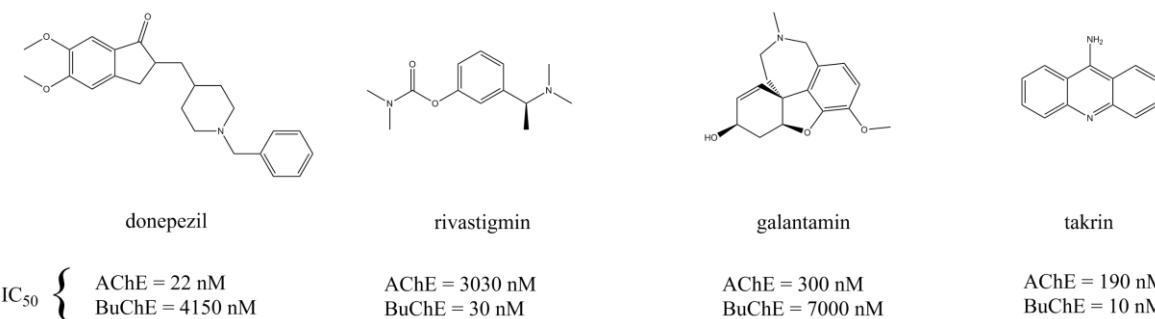
Slika 2: Shematski prikaz aktivnega mesta encima humane BChE. Črna puščica prikazuje smer vstopa v aktivno mesto, kjer je prikazano anionsko periferno vezavno mesto (Asp70, modro), holinski vezavni žepek (Trp82, rdeče), acilni vezavni žepek (Trp231, Leu286 in Val288, zeleno) in katalitična serin ter histidin (Ser198 in His438, oranžno) [21].

1.4 Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

Za zdravljenje AB imamo trenutno na voljo terapijo z antagonisti NMDA-receptorja in z zaviralci holin-esteraz (ChEI), ki modulirajo koncentracijo nevrotransmitorja ACh, ne zavrejo pa širjenja amiloidnih leh in nevrotibrilarnih zank (Slika 3). Signifikanten učinek terapije s ChEI je stabilizacija kognitivne funkcije za obdobje enega leta ali več pri najmanj 50 % bolnikov z AB. Veliko število kliničnih študij dokazuje, da se s ChEI kognitivno funkcijo stabilizira do obdobja dveh let. Prav tako je dokazano, da pri pacientih, ki se ne odzovejo na terapijo z eno vrsto ChEI, po zamenjavi le-teh opazimo izboljšave pri 50 % bolnikov [1]. Do danes odkriti ChEI, ki se uporabljajo v terapiji, so donepezil, rivastigmin, galantamin in takrin, ki je bil zaradi hepatotoksičnih neželenih učinkov umaknjen iz trga [22]. Takrin, donepezil, rivastigmin in galantamin zavirajo ChE. Galantamin izboljša holinergični nevrotransport z delovanjem na nikotinske acetilholinske receptorje in s tem poveča presinaptično sproščanje ACh in postsinaptični nevrotransport. Rivastigmin poleg delovanja na AChE zavira tudi BChE, kar je pomembno ob dejstvu, da se z napredovanjem AB koncentracija AChE zmanjša, koncentracija BChE pa se predvidoma na račun proliferacija celic glije poveča [23]. Donepezil, rivastigmin in galantamin se farmakološko in farmakokinetično razlikujejo. Donepezil, ki je derivat piperidina, nekompetitivno reverzibilno zavira AChE, je selektiven in se veže na plazemske proteine (96 %) ter ima dolg razpolovni čas (70 ur). Rivastigmin je počasno vezič, reverzibilen zaviralec, ki tvori kovalentno vez [24]. V nizkih koncentracijah se veže na plazemske proteine in ima kratek razpolovni čas. Galantamin je selektiven, reverzibilen inhibitor AChE in predstavlja pozitivni alosterični modulator nikotinskih receptorjev na piramidalnih nevronih. Slabo se veže na plazemske proteine in ima kratko razpolovno dobo. Kljub velikim razlikam v farmakokinetiki je bilo dokazano, da imajo vse zgoraj omenjene zdravilne učinkovine podoben učinek na bolnike z AB [23].

Poleg terapije z ChEI, poznamo tudi terapijo z antagonisti NMDA-receptorjev. NMDA receptorji so receptorji za glutamat, ki je glavni ekcitatorni nevrotransmitor v centralnem živčnem sistemu. V primeru AB je zunajcelična koncentracija glutamata povečana na račun povečanega presinaptičnega sproščanja glutamata in zmanjšanega privzema, kar vodi v aktivacijo NMDA receptorja in ekscitotoksičnost [22]. Memantin je ne-kompetitivni NMDA antagonist, ki zaščiti nevrone pred glutamatno ekscitotoksičnostjo, ne da bi preprečil fiziološko aktivacijo NMDA receptorja [23].

Glavni problem AB je njena neozdravljivost. Z obstoječimi terapijami lahko delujemo zgolj simptomatsko, torej upočasnimo napredovanje bolezni ter omilimo že nastale kognitivne poškodbe. S to vrsto terapije pa žal ne preprečimo propadanja živčnih celic in postopnega upadanja koncentracije ACh. S tem razlogom je znanost začela poglobljeno raziskovati možnosti novih tarčnih terapij, ki bodo ciljale predvsem glavne krivce za nastanek AB. Raziskujejo se možnosti na področju zaviranja agregacije A β , povečanje izločanja A β , imunoterapija, delovanje na protein Tau in še številne druge možnosti [22]. V letu 2010 je bilo v III fazi kliničnih študij kar nekaj zdravil, kot na primer: Semagecestat, ki naj bi zmanjšal sintezo A β z inhibicijo gama sekretaze; Bapineuzumab in Solanezumab - humanizirani monoklonski protitelesi, ki se vežeta na A β in preko večjega očistka zmanjšata njegovo koncentracijo v možganih ter intravenozni imunoglobulin G (Intravenous immunoglobulin G), ki naj bi prav tako znižal koncentracijo A β [25].

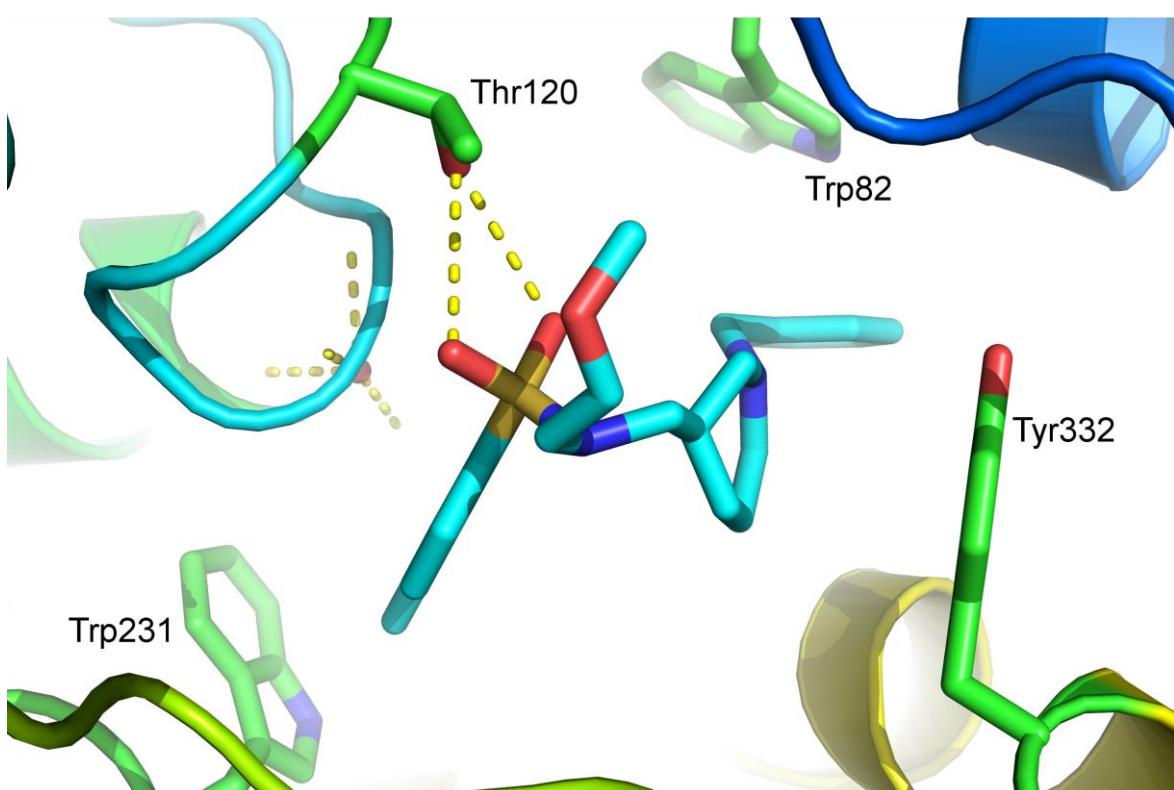


Slika 3: Strukturni prikaz zaviralcev ChEI, ki se uporablja v terapiji AB. Aktivnost je podana kot srednja zavirala koncentracija (IC_{50}).

1.5 Strukturno podprt rešetanje in optimizacija zadetkov

Rešetanje visoke zmogljivosti oziroma »high-throughput screening« (HTS) je najpogosteje uporabljeni tehnika za iskanje novih spojin vodnic v farmaciji. Z uporabo HTS dobimo veliko zadetkov, ki pa so v velikem številu lažno pozitivni. Z uporabo različnih filterov, kot je pravilo petic po Lipinskem, lahko filtriramo spojine in dosežemo manjše število kvalitetnih spojin vodnic [26] [27]. Enakega procesa so se poslužili tudi raziskovalci na Fakulteti za farmacijo, ki so virtualno rešetanje dodatno optimizirali z namenom skrajšanja časa, ki je potreben za izvedbo rešetanja. Z dobrim poznanjem strukture ChE so določili nujno potreben strukturni element (aminska skupina) za vezavo v aktivno mesto encima. Z vpeljavo kriterijev in filterov so uspeli knjižnico spojin zmanjšati na 1.5 milijona zadetkov. Nadaljnjo virtualno rešetanje z uporabo dodatnih omejitvenih kriterijev na podlagi analiz aktivnega mesta huBChE je zmanjšalo število spojin na zgolj 40, ki so bile ovrednotene s pomočjo encimskih testov *in vitro*. Zaviranje je bilo ugotovljeno pri 7. zadetkih, od katerih

je najboljše zaviranje izkazovala spojina **1**. Z določitvijo kristalne strukture encima BChE v kompleksu s spojino **1** so raziskovalci uspeli odkriti vzroke za nizko nanomolarno aktivnost spojine, ki so služili kot smernice za nadaljnjo optimizacijo spojin. Ugotovljeno je bilo, da spojina zadetek **1** tvori s protoniranim dušikom piperidina močne kation – π interakcije s Tyr332, z naftalenskim obročem pa popolnoma zasede acilni – vezavni žepek, kjer tvori $\pi - \pi$ interakcije z aminokislinskim ostankom Trp231 [21]. Ugotovitve so služile kot podlaga za načrtovanje in sintezo spojine vodnice **2** (Slika 4), ki je močnejši zaviralec huBChE kot spojina zadetek **1**.



Slika 4: Kristalna struktura spojine vodnice **2** modre barve, vezane v encim huBChE. Aminokislinski ostanki, pomembni za vezavo in za nadaljnjo optimizacijo v našem raziskovalnem delu, so obarvani zeleno.

2 NAČRT DELA

Spojina vodnica (**2**) ima v primerjavi s spojino zadetka (**1**) na dušik piperidinskega obroča vezan benzilni fragment ter v skeletu karboksamidno skupino zamenjano s sulfonamidno skupino. S pomočjo pridobljenih kristalnih struktur in zaviralnih testov je bilo ugotovljeno, da je za boljše zaviralno delovanje nujen benzilni substituent vezan na piperidinski dušik in naftalenski fragment vezan na sulfonamidno skupino.

Nadalje je bilo iz kristalne strukture spojine zadetka (**1**) ugotovljeno, da se veriga $(CH_2)_2$ -OMe usmerja proti katalitični triadi (Ser198 in His438) encima BChE, medtem ko se veriga $-(CH_2)_2$ -OMe spojine vodnice (**2**), vezane na dušik sulfonamidne skupine, usmerja stran od katalitične triade. Spojina vodnica (**2**) ima kljub temu boljše zaviralno delovanje. To spoznanje je bilo povod za globlje raziskovanje pomena verige $-(CH_2)_2$ -OMe za jakost zaviralnega delovanja.

V diplomski nalogi bomo raziskali vpliv odstranitve verige $-(CH_2)_2$ -OMe in zamenjavo le-te z verigami -Me, -Et, -nPr, -nBu na zaviralno aktivnost. Z uvedbo različnih dolžin verig pričakujemo spremembo interakcij spojin z encimom in posledično spremembo jakosti zaviralnega delovanja.

Vsem spojinam bomo določili jakost zaviranja delovanja ChE (AChE in BChE) *in vitro* in s pomočjo pridobljenih kristalnih struktur poglobili razumevanje pomena verige $-(CH_2)_2$ -OMe pri vezavi v aktivno mesto encima in odnosa med strukturo spojine in njenim delovanjem.

2: R = $(CH_2)_2$ -OMe

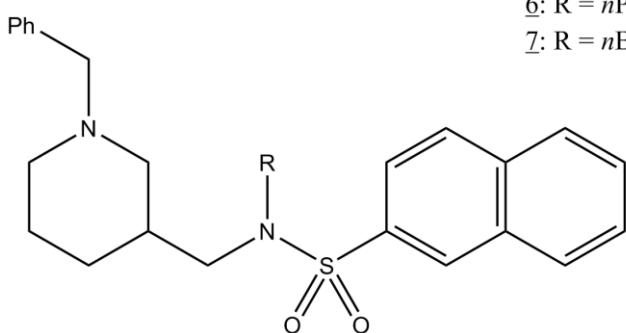
3: R = H

4: R = Me

5: R = Et

6: R = nPr

7: R = nBu



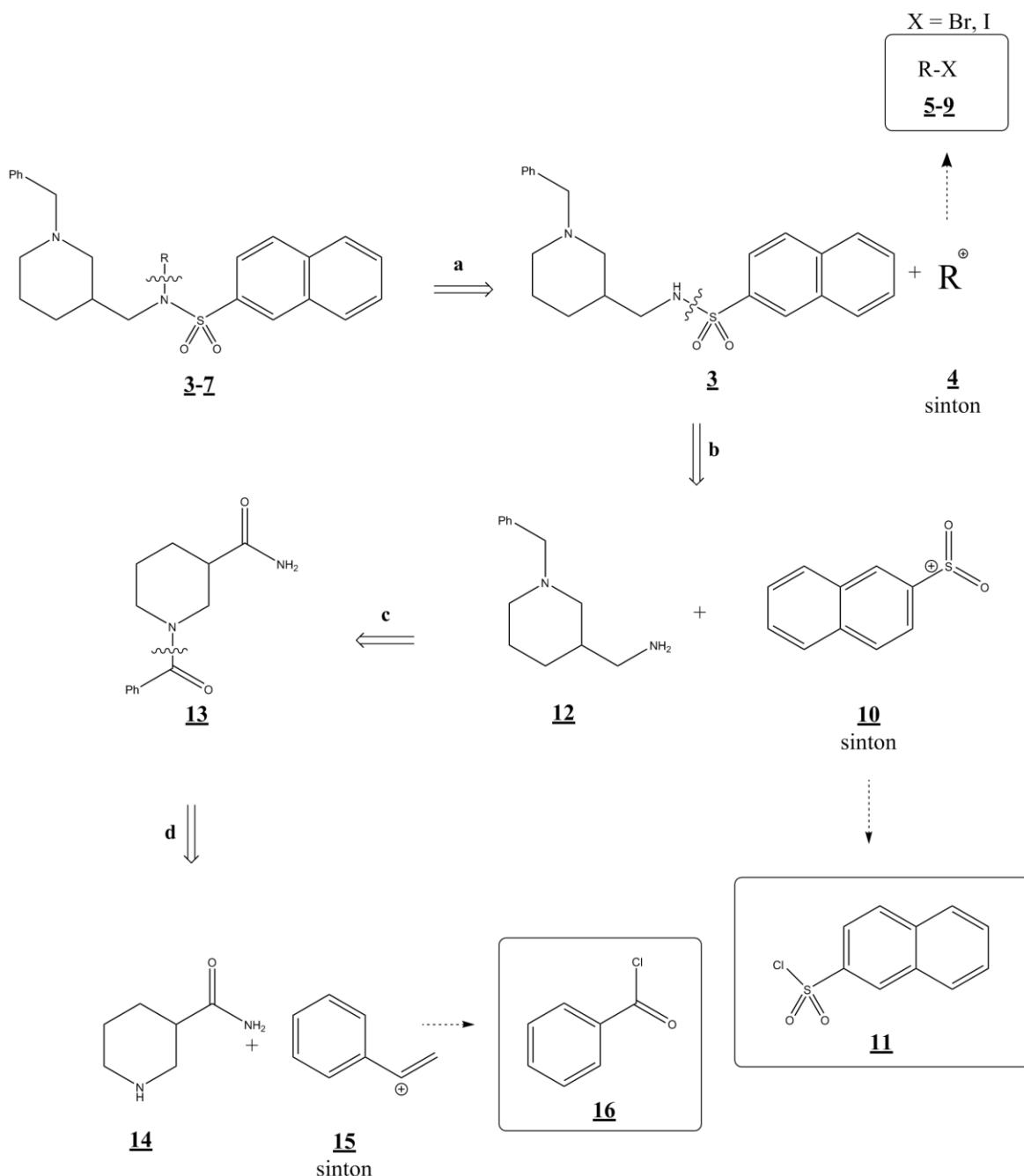
Slika 5: Načrtovani derivati *N* – alkil naftalensulfonamidov.

2.1 Retrosinteza načrtovanih spojin

Pri načrtovanju sinteze se bomo poslužili retrosintezne analize. Že samo ime napeljuje, da sintezo načrtujemo nazaj, od končne spojine proti začetnim izhodnim spojinam, ki jih bomo uporabili v sintezi ciljne spojine. Molekulo cepimo na mestu, ki ustreza znani reakciji, za katero vemo, da je zanesljiva. S cepitvijo molekule dobimo dva sintona, ki predstavlja idealiziran reagent. Sinton je največkrat nabita molekula, ki predstavlja ustrezen sintezni reagent uporabljen v sintezi. Glavni namen retrosinteze je, da končno molekulo cepimo do komercialno dostopnih reagentov, ki med seboj reagirajo po znanih in zanesljivih reakcijah [28].

2.1.1 Retrosinteza novih *N* – alkil sulfonamidov

Ob pregledu spojin **3-7** vidimo alkilno verigo pripeto na sulfonamid. S transformom *a* cepimo vez med sulfonamidnim dušikom ter alkilno metilensko skupino spojin **3-7**. S tem korakom dobimo sekundarni sulfonamid ter sinton **4**, ki je ekvivalent alkil halogenidom (**5-9**). Načrtovane *N*-alkil sulfonamide bomo tvorili z ustrezeno reakcijo med alkil halogenidi (**5-9**) in *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamidom (**3**). S transformom *b* cepimo sulfonamidno vez, s čimer bomo dobili sinton (**10**) ter primarni amin 1-benzilpiperidin-3-il)metanamin (**12**). Najbolj primeren in komercialno dostopen ekvivalent sintonu (**10**) je naftalen-2-sulfonil klorid (**11**). S transformom *c* bomo izvedli redukcijo spojine **13** ter tako pridobili spojino **12**. Pri spojini **12** bomo s transformom *d* cepili vez med benzoilno skupino ter piperidinskim dušikom, in tako dobili nipekotamid (**14**) in sinton (**15**), ki je sintezni ekvivalent benzoil kloridu (**16**). Retrosinteza je shematsko prikazana na sliki 6.

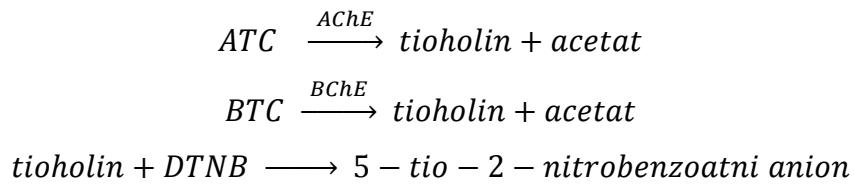


Slika 6: Shematski prikaz retrosinteze novih *N* – alkil naftalensulfonamidnih zaviralcev BChE (3-7).

2.2 Farmakološko testiranje

Za določanje zaviralne aktivnosti spojin bomo uporabili Ellmanovo reakcijo. Kot produkt Ellmanove reakcije med substratom ter encimom, bomo določali tiolne skupine tiololina. Meritve bomo izvajali na dveh encimih: huBChE ter mAChE. Pri zavirnem testu s huBChE bomo kot substrat uporabili butiriltioholin-jodid (BTCl), medtem ko bomo acetiltioholin-jodid (ATCl) uporabili za določevanje zaviralne aktivnosti mAChE. Nastali tioholin reagira z DTNB (5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojska kislina)) in tvori končni produkt

reakcije (5,5-ditio-2bitrobenoatnega anion), ki se obarva rumeno. Koncentracijo nastalega produkta bomo določili spektrofotometrično pri valovni dolžini 412 nm, po spodaj opisani reakcijski shemi [29].



Zbrane podatke bomo računalniško obdelali in določili vrednosti IC₅₀ za vse sintetizirane končne spojine v okviru te magistrske naloge. Glede na rezultate analiz bomo podali tudi končno oceno zaviralne sposobnosti huBChE in mAChE vseh spojin, kar bo skupaj s kristalnimi strukturami spojin vezanih v aktivno mesto encima, razkrilo informacije o strukturnih elementih, pomembnih za delovanje spojine.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Reagenti in topila so bili naročeni pri Acros Organics, Alfa Aesar, Eurisio-Top, Fluka, Merck, Sigma Aldrich in TCI Europe.

3.2 Sinteza

Mešanje in segrevanje reakcijske zmesi

V vseh reakcijskih postopkih, kjer je bilo zahtevano mešanje ali segrevanje, smo le-to izvedli z magnetnim mešalom – grelnikom in teflonskim magnetom (v nadaljevanju mešanje).

Odstranjevanje topil pri znižanem tlaku

Uporabili smo rotavapor Rotavapor R-200, regulator tlaka Vakuum Controller V-800 in membransko črpalko Vac V-500 proizvajalca Büchi. Podtlak smo nastavljali po potrebi, glede na topilo, ki smo ga odstranjevali. Temperatura vodne kopeli je bila nastavljena na 40 °C (v nadaljevanju uparevanje).

Filtriranje s presesavanjem

Pri filtriranju s presesavanjem smo uporabili vodno črpalko.

Risanje in poimenovanje struktur

Za namene poimenovanja in risanja kemijskih strukturnih formul spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 14.0.

Obdelava kristalnih struktur

Za pomoč pri razreševanju in urejanju pridobljenih kristalnih struktur smo uporabili računalniški program MacPyMOL.

Izračun fizikalno-kemijskih lastnosti struktur

Za namene določevanje fizikalno-kemijskih lastnosti spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 14.0.

3.3 Analitske metode

Infrardeča spektroskopija

IR spektri so bili posneti na spektrofotometru Perkin-Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Izmerjena valovna dolžina je podana v cm^{-1} .

Jedrska magnetna resonanca

^{13}C -NMR in ^1H -NMR spektri so bili posneti na Perkin – Elmer 1600 FT – IR spektrofotometru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Meritve so bile izvedene v topilu CDCl_3 . Kemijski premiki so izraženi v »parts per million« (ppm). Nanašajo se na uporabljeno devterirano topilo. Sklopitvene konstante (J) so podane Hertzih (Hz).

Masna spektroskopija

Masni spektri so bili posneti na VG – Analytical Auspec Q spektrometru; proizvajalec Micromass, Manchester. Uporabili smo ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

»Flash« kolonska kromatografija

Uporabili smo Silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm, velikost delcev 230 – 400 proizvajalca Merck. Pri ločevanju smo uporabili različne mobilne faze. Posamezne mobilne faze so navedene pri rezultatih posamezne spojine.

Tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC)

Za analizo smo uporabili plošče Silikagel 60 F254 proizvajalca Merck. Na aluminijastem nosilcu je 0,20 mm debel nanos silikagela z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabili smo različne mobilne faze, ki so navedene pri posameznih rezultatih spojin. Spojine na kromatografskih ploščicah smo detektirali z UV svetlobo ($\lambda = 254 \text{ nm}$ in $\lambda = 366 \text{ nm}$), ter z raztopino vizualizacijskega reagenta ninhidrina (15 mg/ml ninhidrina v 96 % EtOH/AcOH = 5/1).

Analitska reverznofazna HPLC

Uporabili smo modularni sistem Agilent 1100 LC opremljenim z avtomatskim vzorčevalcem, G1365B UV – VIS detektorjem (210,8, 254,16, 280,16 nm), kvarterno črpalko, prostorom za termostatiranje kolone in podatkovnim sistemom ChemStation. Uporabljena kolona je bila Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 150 mm, 5 μm . Uporabljena predkolona je bila Phenomenex Security Guard Cartridge C18 CODS, Octadecyl 4 mL x 3,0 mm ID. Analitsko reveznofazno HPLC smo izvajali po treh različnih metodah:

Metoda A: V kolono smo injicirali 10 µL raztopine vzorca (0,1 mg/mL v MeCN), ter eluirali z 1 mL/min pretokom. Za eluiranje smo uporabili linearni gradient acetonitrila in vodne raztopine fosfatnega pufra (20 mM, pH = 8,00); uporabljen gradient: 0-15 minut, 30 % - 70 %; 15-20 minut, 70 %; 20-25 minut, 70 % - 30 %.

Metoda B: V kolono smo injicirali 10 µL raztopine vzorca (0,1 mg/mL v MeCN), ter eluirali z 1 mL/min pretokom. Za eluiranje smo uporabili linearni gradient acetonitrila in vodne raztopine fosfatnega pufra (20 mM, pH = 8,00); uporabljen gradient: 0-5 minut, 30 % - 70 %; 5-20 minut, 70 %; 20-25 minut, 70 % - 30 %.

Metoda C: V kolono smo injicirali 10 µL raztopine vzorca (0,1 mg/mL v MeCN), ter eluirali z 1 mL/min pretokom. Za eluiranje smo uporabili linearni gradient acetonitrila in vodne raztopine fosfatnega pufra (20 mM, pH = 8,00); uporabljen gradient: 0-5 minut, 50 % - 70 %; 5-25 minut, 70 %; 25-30 minut, 70 % - 50 %.

Za izvedbo *metode D* smo uporabili binarni Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation LC sistem, opremljenim z avtomatskim vzorčevalcem, fotodiodnim detektorjem, binarno črpalko, prostorom za termostatiranje kolone in podatkovnim sistemom Chromeleon Chromatography Data System. Uporabljena kolona je bila Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 150 mm, 5 µm. Uporabljena predkolona je bila Phenomenex Security Guard Cartridge C18 CODS, Octadecyl 4 mL x 3,0 mm ID

Metoda D: V kolono smo injicirali 10 µL raztopine vzorca (0,1 mg/mL v MeCN), ter eluirali z 1 ml/min pretokom. Za eluiranje smo uporabili linearni gradient mobilne faze A (70 % vodna raztopina fosfatnega pufra (5 mM, pH = 8,00; v/v in MeCN) in mobilne faze B (30 % vodna raztopina fosfatnega pufra (5 mM, pH = 8,00; v/v in MeCN). Uporabljen gradient: 0-7 minut, 0 % - 100 %; 7-20 minut, 100 %.

Vodne raztopine pufrov in vzorcev spojin smo pripravili z bidestilirano vodo pridobljeno z napravo Millipore Advantage A10 sistema.

Določevanje tališča

Temperaturo tališča spojin smo določali z mikroskopom Leica hot-stage.

3.4 Farmakološko testiranje

UV – VIS Spektrofotometrija

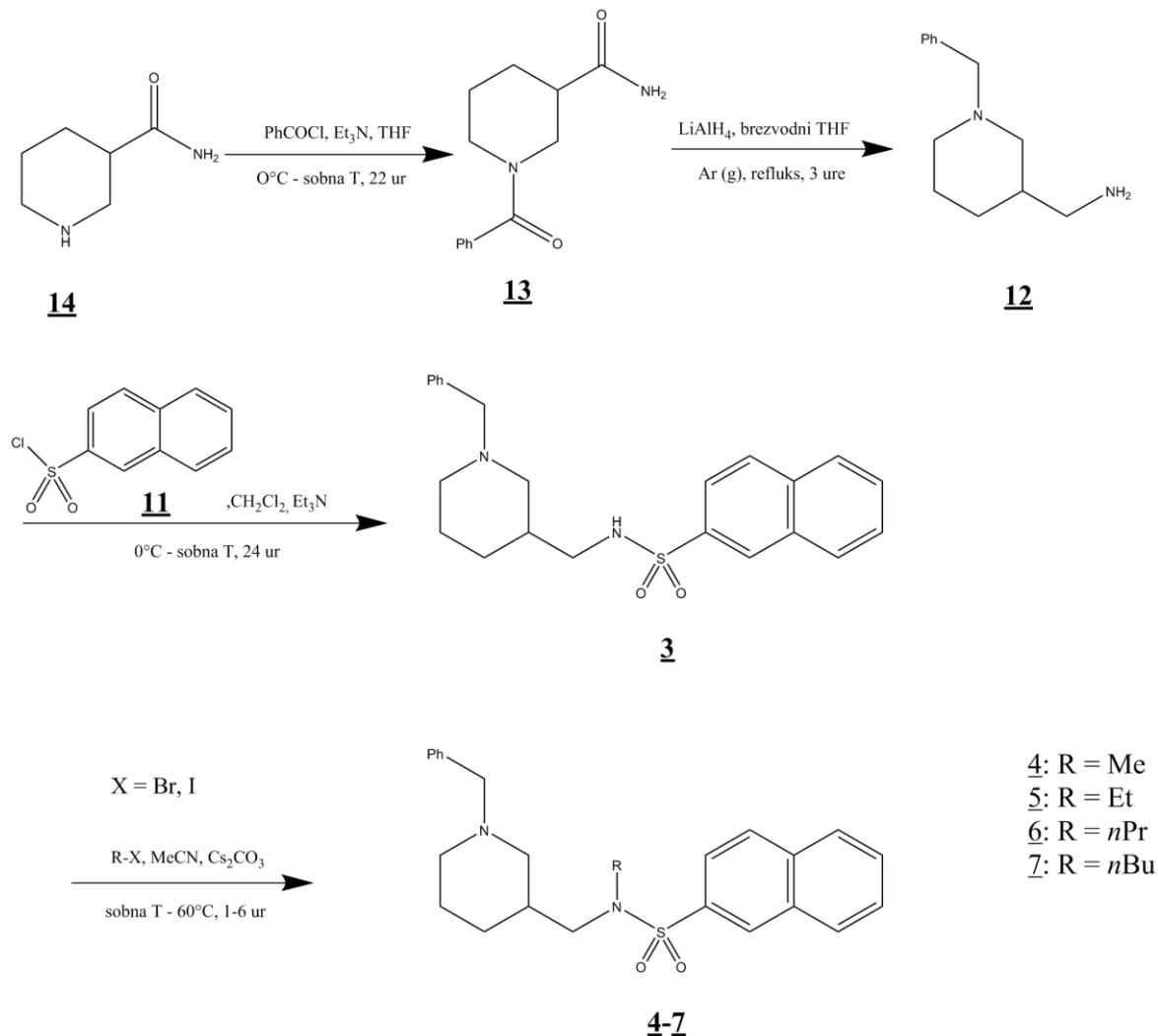
Za odčitavanje smo uporabili čitalec mikrotiterskih ploščic SynergyTM, BioTek Instruments USA. Odčitavali smo pri valovni dolžini 412 nm. Vzorce in reference smo nanašali na mikrotiterske ploščice z 96 vdolbinicami. Dimetilsulfoksid (DMSO) je bil uporabljen za referenčni vzorec.

Priprava vzorcev in reagentov za namene farmakološkega vrednotenja

Reagenta BTCl in ATCl sta bila kupljena pri Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). mAChE in rekombinantna huBChE v koncentracijah 4,6 mg/mL v 10 mM MES pufru (pH = 6,5) sta bila podarjena. Raztopine encima so bile pripravljene z redčitvijo koncentriranih vzorcev v fosfatnem pufru (0,1 M, pH = 8,0). Reakcija je bila izvedena v končnem volumnu 300 µL, ki je vseboval 0,1 M fosfatnega pufra pH 8,0; $3,7 \times 10^{-3}$ M DTNB, 5×10^{-4} M substrata BTCl ali ATCl in 1×10^{-9} M huBChE v kolikor smo dodali BTCl ali 5×10^{-11} M mAChE, v kolikor smo dodali ATCl. Aktivnost encima v tako pripravljenih raztopinah je bila približno 500 mAU/min. Reagente smo pripravili z redčenjem v pufru, vzorce spojin pa z redčenjem v DMSO.

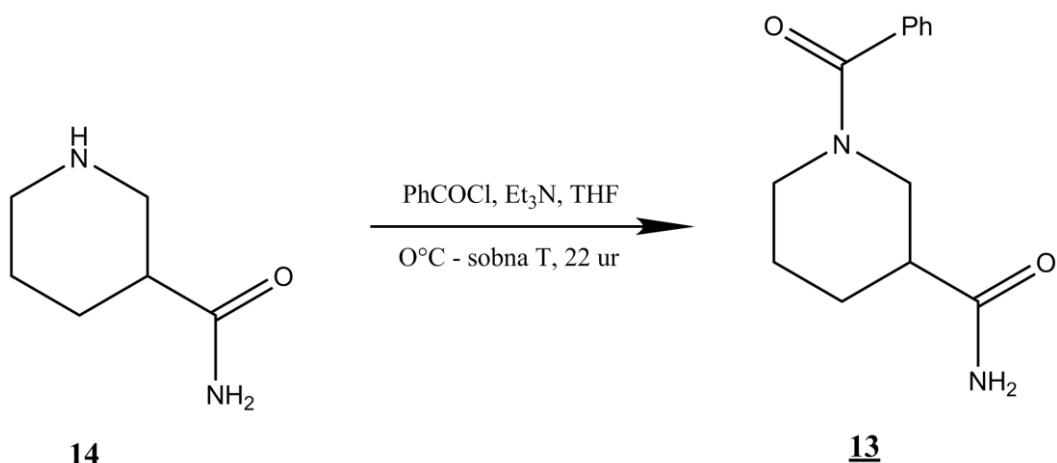
4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Shema sinteze naftalensulfonamidov 3 - 7.



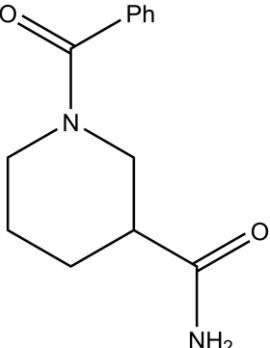
Slika 7: Shematski prikaz sinteze novih *N* – alkil naftalensulfonamidov (4-7).

4.2 Sinteza 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13)

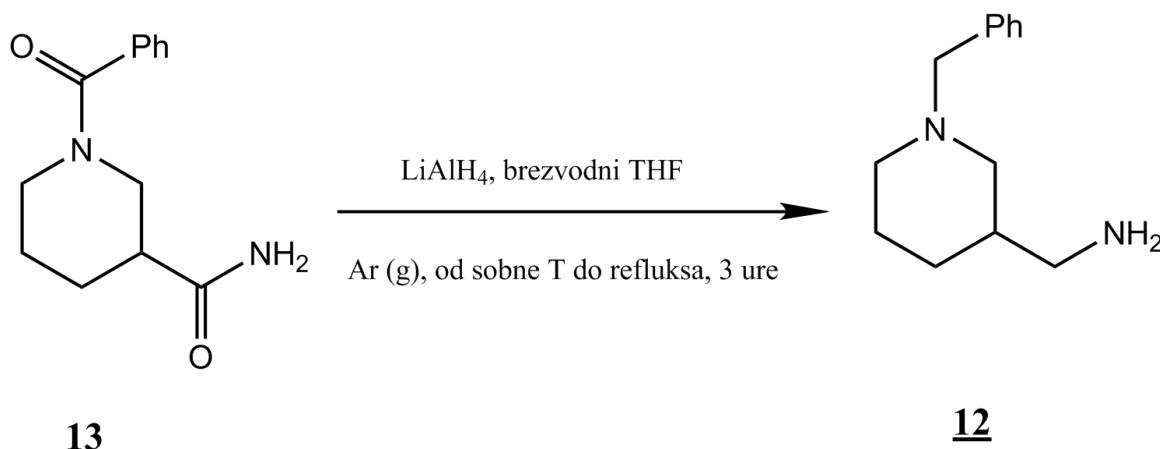


Slika 8: Shematski prikaz sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (13).

500 mL bučko smo napolnili z magnetom za mešanje, nipekotamidom (**14**) (10,000 g, 78,020 mmol, 1,0 mol. ekv.) in THF (260 mL). Suspenzijo smo ohladili na 0 °C in ob mešanju po kapljicah dodali Et₃N (10,875 mL, 78,020 mmol, 1,0 mol. ekv.) in nato še raztopino benzoil klorida (9,049 mL, 78,020 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (30 mL). Po 22 urah mešanja pri sobni temperaturi smo uparili topilo. Uparek smo raztopili v H₂O (200 mL), prenesli v rij ločnik (500 mL) ter ekstrahirali z CH₂Cl₂ (3 x 300 mL). Organske faze smo združili, sušili z Na₂SO₄, suspenzijo filtrirali in uparili topilo. Dobili smo 17,809 g spojine **13**.

 <p>13</p>	Izgled: rahlo rumena trdna snov Izkoristek reakcije: 98 % TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5/1, \text{v/v}$) = 0,58 Temperatura tališča: 171 – 173 °C				
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d6)	δ [ppm] = 1,38 (1 H, bs), 1,53–1,75 (2 H, m), 1,91 (1 H, bs), 2,30 (1 H, bs), 2,78–3,08 (2 H, m), 3,49–3,55 (1 H, m), 4,5–4,46 (1 H, m), 6,85–6,90 (1 H, m), 7,29–7,52 (6 H, m)				
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d6)	δ [ppm] = 23,98, 24,80, 27,54, 27,79, 41,59, 41,60, 42,23, 43,99, 47,33, 49,35, 126,61, 128,36, 129,32, 136,20, 169,01, 174,52, 174,64				
HRMS (ESI+)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Izračunana vrednost za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $([M+\text{H}]^+)$</td> <td style="width: 50%; text-align: right;">233,1290</td> </tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td> <td style="text-align: right;">233,1296</td> </tr> </table>	Izračunana vrednost za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $([M+\text{H}]^+)$	233,1290	Izmerjena vrednost	233,1296
Izračunana vrednost za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $([M+\text{H}]^+)$	233,1290				
Izmerjena vrednost	233,1296				
IR (ATR)	ν [cm^{-1}] = 3339, 3139, 2938, 2360, 1670, 1617, 1442, 1271, 1102, 936, 855, 670, 577 cm^{-1}				

4.3 Sinteza (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12)

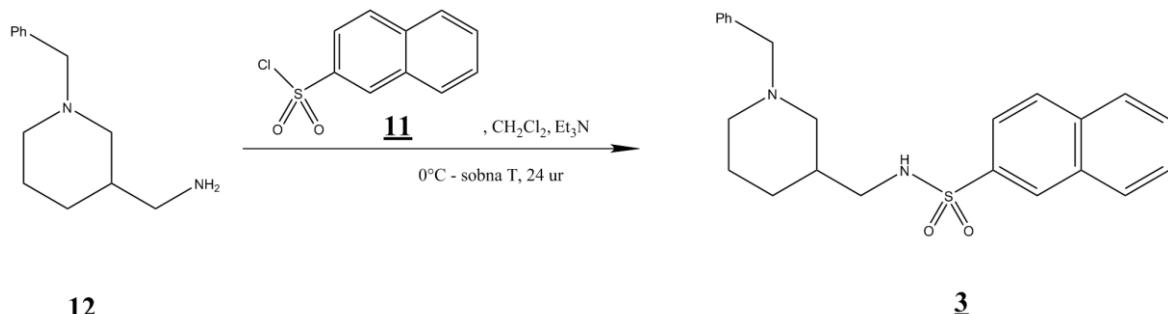


Slika 9: Shematski prikaz sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12).

V bučko (250 mL) s tremi vratovi smo dodali magnetno mešalo in namestili refluksni kondenzator. LiAlH_4 (2,879 g, 75,863 mmol, 5,0 mol. ekv.) smo dodali v bučko z že ustvarjeno argonsko atmosfero. S kanilo smo dodali brezvodni THF (približno 150 mL). V razponu 1 ure smo suspenziji ob mešanju pri sobni temperaturi po majhnih odmerkih dodali amid **13** (3,524 g, 15,171 mmol, 1,0 mol. ekv.) Reakcijsko zmes smo po 3 urah mešanja ob vrenju ohladili na 0 °C. Prebitni LiAlH_4 smo nevtralizirali z dodatkom vode (dodajali po kapljicah) (2,879 mL) nato 15 % raztopino NaOH (2,879 mL) in s H_2O (8,637 mL). Suspenzijo smo pustili mešati eno uro pri sobni temperaturi. Zmes smo filtrirali s presesavanjem skozi Büchnerjev lij (poroznost št. 4). Belo oborino na Büchnerjevem liju smo dobro sprali s THF (5 x 60 mL). Združene filtrate smo uparili in dobili 3,085 g spojine **12**.

 12	Izgled: rahlo zlata tekočina
	Izkoristek reakcije: 99,5 % (surov produkt)
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₁₃ H ₂₁ N ₂ ([M+H] ⁺)
	Izmerjena vrednost

4.4 Sinteza spojine *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**)

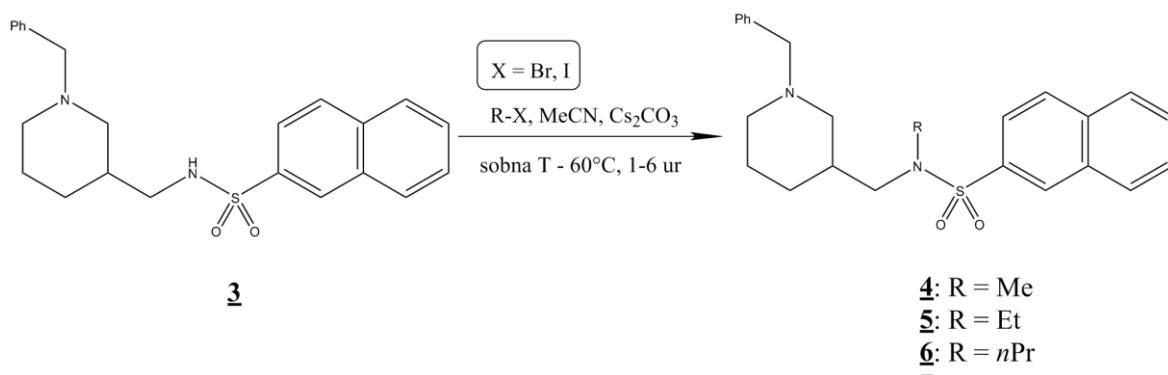


Slika 10: Shematski prikaz sinteze *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**).

50 mL bučko smo napolnili z magnetom za mešanje in spojino **12** (1,555 g, 7,579 mmol, 1,0 mol. ekv.). Dodali smo CH₂Cl₂ (30 mL) ter nastalo raztopino ob mešanju ohladili na 0 °C in po kapljicah dodali Et₃N (1,057 mL, 7,579 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 15 minutah smo dodali naftalen-2-sulfonil klorid (**11**) (1,718 g, 7,579 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 24 urah mešanja pri sobni temperaturi smo reakcijsko zmes prenesli v lij ločnik (100 mL) in bučko v kateri je potekala reakcija, sprali z CH₂Cl₂ (20 mL) v lij ločnik. CH₂Cl₂ fazo smo ekstrahirali s H₂O (40 mL) in nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (40 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in suspenzijo filtrirali ter uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 20/1, v/v). Dobili smo 1,288 g spojine **3**.

<p>3</p>	Izgled: bela trdna snov Izkoristek reakcije: 43% TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10/1, \text{ v/v}$) = 0,43
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 1,02–1,11 (1 H, m), 1,45–1,55 (1 H, m), 1,60–1,71 (2 H, m), 1,76–1,90 (2 H, m), 2,09–2,15 (1 H, m), 2,52–2,67 (2 H, m), 2,85–2,97 (2 H, m), 3,38–3,46 (2 H, m), 5,20 (1 H, bs), 7,22–7,31 (5 H, m), 7,59–7,67 (2 H, m), 7,78 (1 H, dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz), 7,90–7,97 (3 H, m), 8,41 (1 H, t, $J = 0.9$ Hz)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 24,07, 28,06, 35,36, 47,02, 53,78, 57,14, 63,23, 122,23, 126,95, 127,41, 127,80, 128.,1, 128,26, 128,60, 129,05, 129,12, 129,38, 132,03, 134,62, 136,64, 137,77
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[M+\text{H}]^+$) 395,1793
	Izmerjena vrednost 395,1784
IR (ATR)	ν [cm^{-1}] = 3062, 2938, 2816, 2769, 1467, 1452, 1328, 1159, 1068, 972, 817, 759, 701, 658, 640, 614
HPLC	Čistost spojine 99 % pri 254,16 nm ($t_R = 10,35$ min) (Metoda E)

4.5 Alkiliranje sulfonamidnega dušika *N*-(*(1-benzilpiperidin-3-il)metil*)naftalen-2-sulfonamida (**3**)

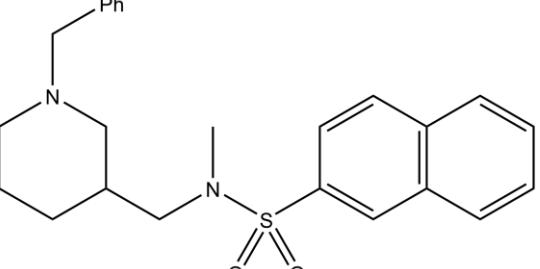


Slika 11: Shematski prikaz alkiliranje sulfonamidnega dušika *N*-(*(1-benzilpiperidin-3-il)metil*)naftalen-2-sulfonamida (**3**).

Spojino **3** (1,0 mol ekv.) smo raztopili v MeCN pri sobni temperaturi ter prepihali z argonom. Pripravljeni raztopini smo ob mešanju dodali Cs_2CO_3 (1,5 mol. ekv.), NaI (katalitična količina) ter alkil halogenid (6,0 mol. ekv.). Suspenzijo smo 1-6 ur mešali pri 60 °C. Reakcijsko zmes smo uparili, uparek suspendirali v etil acetatu (EtOAc), prenesli v lij ločnik, esktrahirali z vodo in nato še z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 . Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , suspenzijo filtrirali in uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo.

4.6 Sinteza *N*-(*(1-benzilpiperidin-3-il)metil*)-*N*-metilnaftalen-2-sulfonamida (**4**)

Spojina je bila sintetizirana iz *N*-(*(1-benzilpiperidin-3-il)metil*)naftalen-2-sulfonamida in metil jodida, po postopku opisanem v poglavju »Alkiliranje *N*-(*(1-benzilpiperidin-3-il)metil*)naftalen-2-sulfonamida (**3**)«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kromatografijo ($\text{MF} = \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 24/1, \text{v/v}$).

 <p>4</p>	Izgled: bela trdna snov Izkoristek reakcije: 70 % TLC: Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20:1, \text{ v/v}$) = 0,29	
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 1,00–1,10 (1 H, m), 1,66–1,77 (3 H, m), 1,82–2,04 (3 H, m), 2,74 (4 H, s), 2,84–2,97 (3 H, m), 3,43–3,60 (2 H, m), 7,21–7,25 (1 H, m), 7,30 (4 H, d, $J = 4,4$ Hz), 7,60–7,67 (2 H, m), 7,74 (1 H, dd, $J_1 = 8,6, J_2 = 1,8$ Hz), 7,90–7,99 (3 H, m), 8,34–8,35 (1 H, s)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 24,48, 28,12, 34,20, 35,23, 53,78, 57,68, 63,38, 122,63, 126,88, 127,43, 127,81, 128,08, 128,53, 128,60, 120,09, 129,17, 132,11, 134,33, 134,63, 138,13	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[M+\text{H}]^+$)	409,1950
	Izmerjena vrednost	409,1939
IR (ATR)	ν [cm^{-1}] = 2937, 2809, 1453, 1334, 1155, 1132, 1070, 960, 889, 740, 653	
HPLC	Čistost spojine 99 % pri 254,16 nm ($t_R = 21,57$ min) <i>(Metoda A)</i>	

4.7 Sinteza *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)-*N*-etilnaftalen-2-sulfonamida (5)

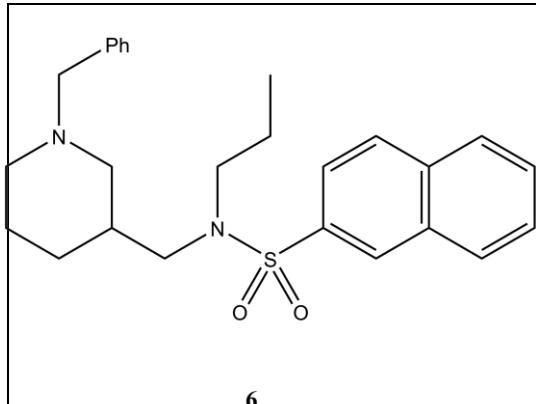
Spojina je bila sintetizirana iz *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida in etil bromida, po postopku opisanem v poglavju »Alkiliranje *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (3)«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo ($\text{MF} = \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 25/1, \text{ v/v}$).

 5	<p>Izgled: brezbarvno olje, ki se je po ohlajanju pretvorilo v belo oborino</p> <p>Izkoristek reakcije: 73 %</p> <p>TLC: Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20/1, \text{v/v}$) = 0,30</p>	
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 0,97–1,06 (4 H, m), 1,65–1,81 (4 H, m), 1,92–2,01 (2 H, m), 2,78 (2 H, bd), 3,02–3,14 (2 H, m), 3,24 (2 H, q, $J = 7,2$ Hz), 3,42–3,53 (2 H, m), 7,21–7,25 (1 H, m), 7,27–7,32 (4 H, m), 7,59–7,66 (2 H, m), 7,74 (1 H, dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz), 7,89–7,97 (3 H, m), 8,36–8,37 (1 H, m)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 13,74, 24,53, 28,27, 34,78, 43,02, 51,26, 53,82, 57,70, 63,35, 122,43, 126,86, 127,36, 127,77, 128,05, 128,19, 128,49, 129,07, 129,18, 132,09, 134,52, 136,84, 138,13	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[M+\text{H}]^+$)	423,2106
	Izmerjena vrednost	423,2103
IR (ATR)	ν [cm^{-1}] = 2937, 2808, 1329, 1292, 1151, 1109, 995, 887, 749, 724, 652	
HPLC	Čistost spojine 99 % pri 254,16 nm ($t_R = 23,63$ min) (Metoda A)	

4.8 Sinteza *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)-*N*-propilnaftalen-2-sulfonamida (6)

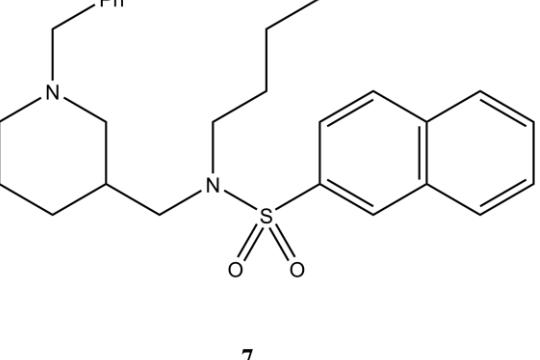
Spojina je bila sintetizirana iz *N*-(1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida in propil bromida, po postopku opisanem v poglavju »Alkiliranje *N*-(1-benzilpiperidin-3-

il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**)». Surovi produkt smo očistili s »flash« kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 25/1, v/v).

 <p>6</p>	Izgled: zlato-rumena viskozna tekočina Izkoristek reakcije: 82 % TLC: Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20/1, \text{ v/v}$) = 0,32
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 0,81 (3 H, t, $J = 7,4$ Hz), 0,94–1,04 (1 H, m), 1,46–1,55 (3 H, m), 1,63–1,75 (3 H, m), 1,94–1,99 (2 H, m), 2,71–2,83 (2 H, m), 3,01–3,11 (4 H, m), 3,41–3,50 (2 H, m), 7,21–7,25 (1 H, m), 7,29–7,32 (4 H, m), 7,59–7,66 (2 H, m), 7,74 (1 H, dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz), 7,89–7,98 (3 H, m), 8,36–8,37 (1 H, m)
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3)	δ [ppm] = 11,16, 21,85, 24,51, 28,30, 34,87, 50,50, 52,14, 53,81, 57,67, 63,33, 122,45, 126,85, 127,34, 127,75, 128,03, 128,18, 128,46, 129,06, 129,08, 129,14, 132,06, 134,49, 136,67, 138,05
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[M+\text{H}]^+$) 437,2263 Izmerjena vrednost 437,2255
IR (ATR)	ν [cm^{-1}] = 2934, 2805, 1453, 1330, 1152, 1130, 1071, 966, 866, 747, 652, 614
HPLC	Čistost spojine 99 % pri 254,16 nm ($t_R = 20,13$ min) (<i>Metoda B</i>)

4.9 Sinteza spojine *N*-(**(1-benzilpiperidin-3-il)metil**)*-N***-butilnaftalen-2-sulfonamid** (**7**)

Spojina je bila sintetizirana iz *N*-(**(1-benzilpiperidin-3-il)metil**)naftalen-2-sulfonamida in butil bromida, po postopku opisanem v poglavju »Alkiliranje *N*-(**(1-benzilpiperidin-3-il)metil**)naftalen-2-sulfonamida (**3**)«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 25/1, v/v).

 7	Izgled: zlato-rumeno viskozna tekočina Izkoristek reakcije: 83 % TLC: Rf (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 20/1, v/v) = 0,33	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0.85 (3 H, t, <i>J</i> = 7.3 Hz), 0.94–1.03 (1 H, m), 1.22 (2 H, h, <i>J</i> = 7.4 Hz), 1.42–1.50 (2 H, m), 1.62–1.75 (4 H, m), 1.90–1.99 (2 H, m), 2.76 (2 H, bd), 3.00–3.13 (4 H, m), 3.40–3.49 (2 H, m), 7.21–7.25 (1 H, m), 7.28–7.32 (4 H, m), 7.59–7.66 (2 H, m), 7.74 (1 H, dd, <i>J</i> ₁ = 8.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1.8 Hz), 7.89–7.98 (3 H, m), 8.35–8.36 (1 H, m)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 13,63, 19,95, 24,53, 28,31, 30,62, 34,86, 48,59, 52,10, 53,83, 57,70, 63,35, 122,48, 126,87, 127,35, 127,77, 128,05, 128,22, 128,47, 129,07, 129,09, 129,14, 132,08, 134,51, 136,65, 138,05	
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₇ H ₃₅ N ₂ O ₂ S ([M+H] ⁺)	451,2419
	Izmerjena vrednost	451,2413
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2931, 2871, 1454, 1335, 1154, 1130, 1072, 746, 699, 652, 615	
HPLC	Čistost spojine 99 % pri 254,16 nm (<i>t_R</i> = 23,99 min) <i>(Metoda C)</i>	

4.10 Farmakološko testiranje zaviralcev AChE in BChE

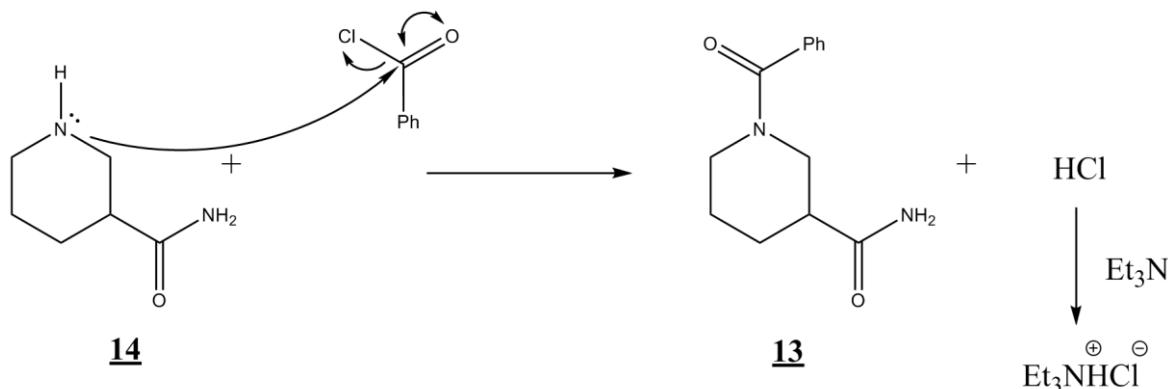
Sposobnost zaviranja holin-esteraz naših spojin smo določili z napravo SynergyTM H4, ki je spektrofotometrično merila spremembo absorbance v razponu 1 minute. Za namene testiranja smo uporabili mikrotitersko ploščico z 96 vdolbinicami, v katere smo vnesli 0,1 M fosfatnega pufra s pH = 8,0, $3,7 \times 10^{-3}$ M DTNB, 5×10^{-4} M substrata BTCl ali ATCl in 1×10^{-9} M huBChE v kolikor smo dodali BTCl ali 5×10^{-11} M mAChE v kolikor smo dodali ATCl s končnim volumnom 300 µL. Tako pripravljene vzorce spojin smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi z namenom vzpostavitve ravnotežja v kompleksu med encimom in zavircem. Reakcija je bila sprožena po dodatku substrata (BTCl ali ATCl) pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali 1 minuto. Opazovali smo spremembo absorbance kot posledice nastajanja 5-tio-2-nitrobenzoatnega aniona, produkta reakcije med DTNB in tioholinom ter organoleptično spremembo barve iz brezbarvne v rumeno, kot posledica nastajanja 5-tio-2-nitrobenzenoatnega aniona. Vse spojine smo testirali v treh paralelah, v končnih koncentracijah 10 µM, 3 µM, 1 µM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM ter 1 nM. Pri testiranju slepega vzorca smo delež spojine nadomestili z DMSO. S primerjavo hitrosti encimske reakcije slepega vzorca in vzorca z dodanim zavircem smo izračunali rezidualno encimsko aktivnost (RA). Vrednosti IC₅₀ smo določili z določevanjem aktivnosti spojine pri različnih koncentracijah, katere smo z uporabo Gnuplot programa in lastne Phyton kode pretvorili v vrednosti IC₅₀.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Pregled sinteze novih *N*-alkil naftalensulfonamidov

Sintezno pot smo začeli z izhodnim nipekotamidom (**14**) in ga pretvorili v primarni amin (1-benzilpiperidin-3-il)metanamin (**12**). Primarni amin **12** smo z naftalen-2-sulfonil kloridom (**11**) v prisotnosti Et₃N in CH₂Cl₂ pretvorili v sulfonamid (**3**). Sulfonamidni dušik spojine **3** smo v naslednjem koraku alkilirali z različnimi alkil halidi (**5** - **9**) v prisotnosti Cs₂CO₃ pri 60 °C in sintetizirali *N*-alkil naftalensulfonamide (**4** - **7**).

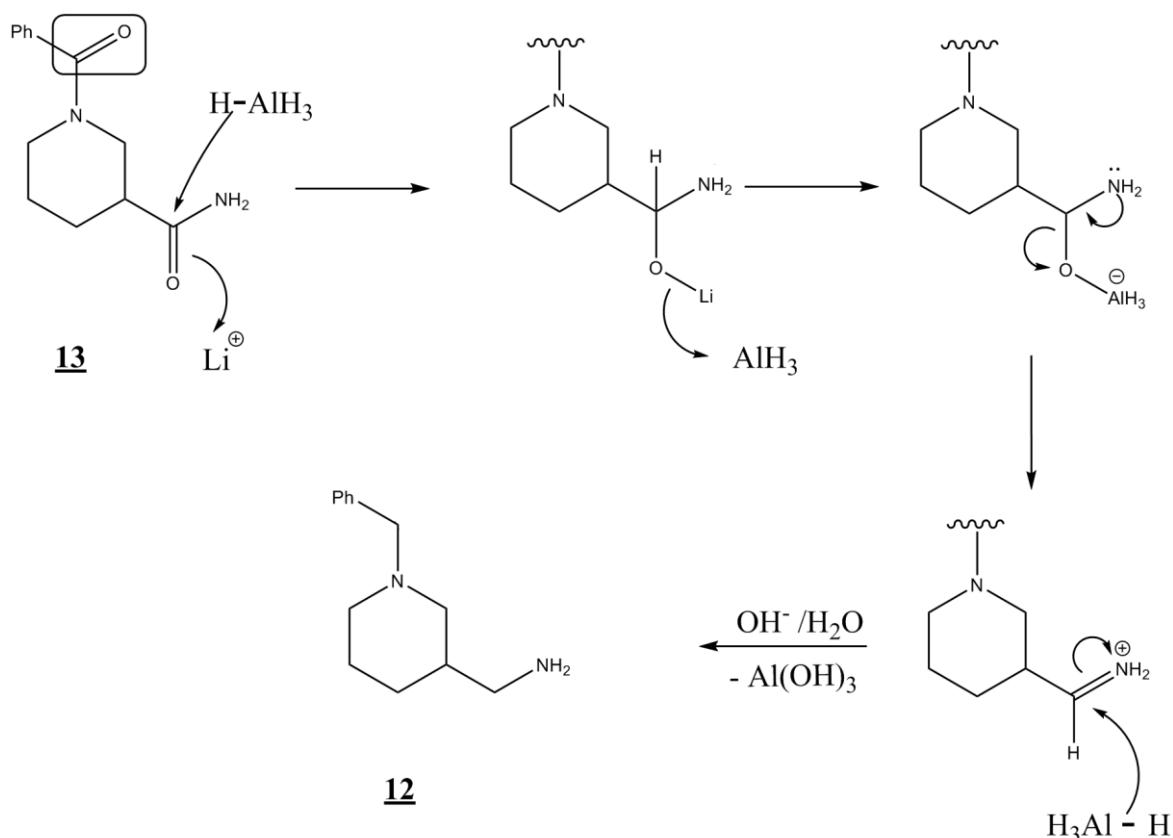
5.1.1 Reakcijski mehanizem sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (**13**)



Slika 12: Predlagan reakcijski mehanizem sinteze 1-benzoilpiperidin-3-karboksamida (**13**).

V prvi stopnji sinteze novih *N*-alkil naftalensulfonamidov (**3** - **7**) smo tvorili amid. Pri tej reakciji nukleofilni amin **14** napade elektrofilni benzoil klorid (**16**). HCl, ki se tvori pri reakciji, nevtralizira Et₃N in pri tem nastane trietylaminijev klorid (Et₃N⁺HCl⁻) [30].

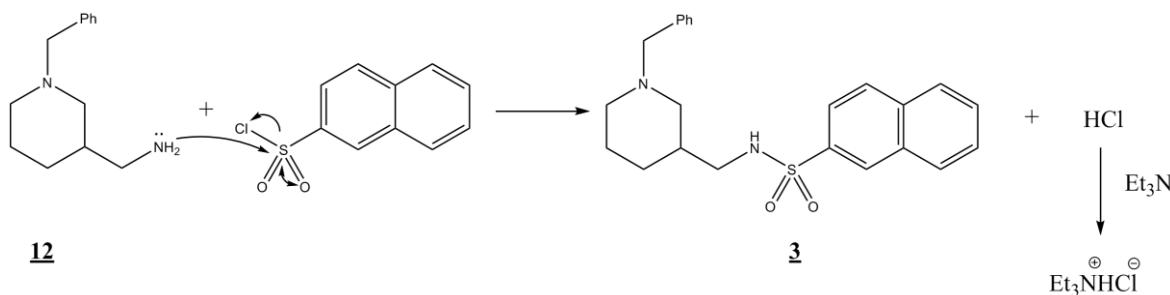
5.1.2 Reakcijski mehanizem sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12)



Slika 13: Predlagani reakcijski mehanizem sinteze (1-benzilpiperidin-3-il)metanamina (12).

V drugi stopnji smo izvedli redukcijo obeh karbonilnih skupin spojine **13** (v shemi mehanizem prikazuje redukcijo primarnega amida, mehanizem redukcije je enak pri benzoilnem substituentu). LiAlH₄ je zelo reaktivien donor hidridnega iona, ki je zaradi prostega elektronskega para zelo dober nukleofil. Hidridni ion napade amidni ogljik, hkrati amidni kisik tvori kompleks s preostankom AlH₃. Nastali oksialuminijev kompleks se izloči, kar iz amida tvori iminijev ion. Iminijev ion je elektrofilen. Oksialuminijev kompleks, ki se je izločil iz reakcije, na tem mestu kot donor H⁻ napade imin. Produkt reakcije je primarni amin. Preostanek oksialuminijevega kompleksa hidroliziramo do Al(OH)₃ z dodatkom vode [31].

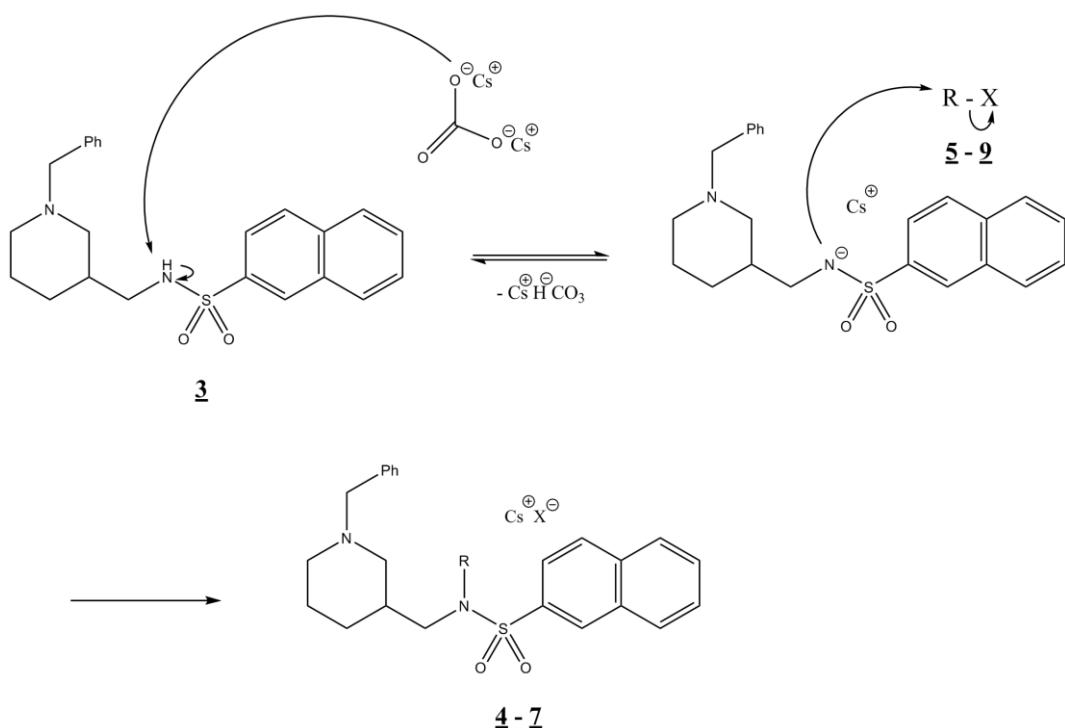
5.1.3 Reakcijski mehanizem sinteze spojine *N*-(**1**-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**)



Slika 14: Predlagan reakcijski mehanizem sinteze spojine *N*-(**1**-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**)

V tretji stopnji sinteze smo iz amina **12** in sulfonil klorida **11** tvorili sulfonamid **3**. Pri tej reakciji primarni amin **12** napade elektrofilni sulfonil klorid **11**. HCl, ki se tvori pri reakciji, nevtralizira Et₃N in pri tem nastane trietilaminijev klorid (Et₃N⁺HCl⁻) [30].

5.1.4 Reakcijski mehanizem alkiliranja sulfonamidnega dušika *N*-(**1**-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**)



Slika 15: Predlagan reakcijski mehanizem alkiliranje sulfonamidnega dušika *N*-(**1**-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamida (**3**).

V četrti stopnji naše sinteze smo izvedli alkiliranje spojine **3**. Vodik na dušiku sulfonamidne skupine je rahlo kisel. Z dodatkom baze Cs_2CO_3 smo odcepili proton in dobili cezijevo sol sulfonamida, ki reagira z elektrofilnim alkil halidom (**5** - **9**). Halogeni atom, ki je dobra izstopajoča skupina, izstopi iz reakcije v obliki cezijeve soli [32].

5.2 Razprava in rezultati farmakoloških testov sintetiziranih spojin

Za namene testiranja in ovrednotenja zaviralnih sposobnosti spojin za encim huBChE in mAChE smo sintetizirali pet spojin. Vsaka spojina (**4** - **7**) ima na sulfonamidni dušik vezano alkilno verigo različne dolžine z izjemo spojine **3**, kjer sulfonamidni dušik ostaja ne-alkiliran. Zaviralni testi so pokazali visoko zaviralno sposobnost in selektivnost za huBChE vseh sintetiziranih spojin. Vrednosti srednjih zaviralnih koncentracij (IC_{50}) se gibljejo od 25 nM do 57 nM (Tabela 1). Popolna odstranitev *N* – alkilne verige (**3**) v primerjavi s spojino vodnico (**2**) znatno zmanjša jakost zaviranja huBChE ($\text{IC}_{50} = 56,9 \pm 9,80$ nM). Spojina **4**, ki ima namesto vodika na sulfonamidno skupino pripeto $-\text{Me}$ ima v primerjavi s spojino **3** več kot 2x močnejšo jakost zaviranja ($\text{IC}_{50} = 24,97 \pm 3,84$ nM). Nadaljnje podaljševanje alkilne verige jakost zaviranja zmanjša. Spojina **5** z $-\text{Et}$ ima jakost zaviranja $\text{IC}_{50} = 37,97 \pm 2,57$ nM, spojina **6** s $-\text{Pr}$ ima jakost zaviranja $\text{IC}_{50} = 42,78 \pm 6,39$ nM in spojina **7**, ki ima $-\text{Bu}$ vezano na sulfonamidno skupino z jakostjo zaviranja $\text{IC}_{50} = 35,53 \pm 4,42$ nM. Zamenjava kisikovega atoma v $(\text{CH}_2)_2\text{-OMe}$ verigi spojine vodnice (**2**) jakost zaviranja huBChE zmanjša za več kot sedem krat.

Iz pridobljenih rezultatov jakosti zaviranja novih *N*-alkil naftalensulfonamidov (**3** - **7**) in pridobljenih kristalnih struktur razberemo, da pri vezavi v aktivno mesto encima veliko vlogo igra $-(\text{CH}_2)_2\text{-OMe}$ veriga, ki stabilizira spojino na vhodu v aktivno mesto, s kisikom eterske skupine pa tvori vodikovo vez z aminokislinskim preostankom Asn698 preko molekule vode, kar se odraža v boljši jakosti zaviranja encima. Omenjeno trditev potrjuje primerjava aktivnosti spojine **4** ($\text{IC}_{50} = 24,97 \pm 3,84$ nM), spojine **7** ($\text{IC}_{50} = 35,53 \pm 4,42$ nM) in spojine **3** ($\text{IC}_{50} = 56,9 \pm 9,80$ nM). Spojina **4** z $-\text{Me}$ ima višjo jakost zaviranja kot spojina **7** z $-\text{Bu}$, kar dokazuje da podaljševanje dolžine verige brez kisikovega atoma zmanjšuje jakost zaviranja. Jakost zaviranja spojine **3** brez vezane alkilne verige je izmed vseh sintetiziranih spojin najnižja, kar potrjuje predvidevanje, da pri vezavi spojine v aktivno mesto huBChE alkilna veriga vezana na sulfonamidno skupino igra vidno vlogo.

Določena razmerja med aktivnostjo encima mAChE ob dodatku zaviralca in aktivnostjo ob odsotnosti zaviralca izkazujejo delež RA nad 75%, kar pomeni da se zaviralci selektivno vežejo v huBChE.

Tabela 1: Prikaz vpliva odstranitve -(CH₂)₂-OMe verige spojini vodnici **2** in zamenjave z alkilnimi verigami različnih dolžin na zaviralo aktivnost huBChE in mAChE.

Spojina		huBChE	mAChE
		IC ₅₀ ± SD [nM]	% RA pri 10 µM ± SD
2	(CH ₂) ₂ -OMe	4,92 ± 0,33	n.z.
3	H	56,9 ± 9,80	n.z.
4	Me	24,97 ± 3,84	n.z.
5	Et	37,97 ± 2,57	n.z.
6	<i>n</i> Pr	42,78 ± 6,39	n.z.
7	<i>n</i> Bu	35,53 ± 4,42	n.z.

n.z. = ni zaviranja, RA ≥ 75 %.

5.3 Kristalna struktura spojine vodnice (**2**) in novih *N* – alkil sulfonamidov (**3**, **4**) vezanih v huBChE

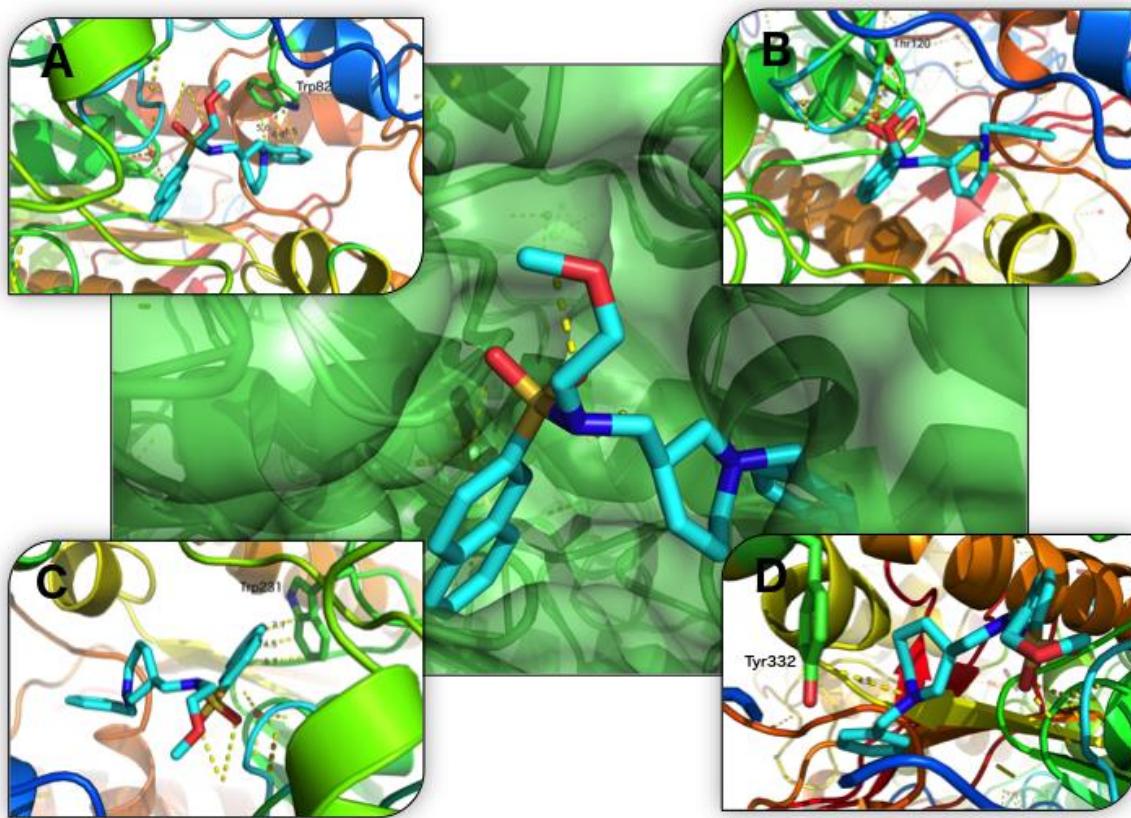
Za pomoč pri razreševanju načina vezave novih *N*-alkil naftalensulfonamidov v aktivno mesto BChE so bile pridobljene kristalne strukture spojin **3** (PDB ID 5DYY) in **4** (PDB ID 5DYT). Kristalni strukturi sta bili pridobljeni iz kristalov namočenih v matično raztopino, kateri je bilo dodanih 100 µL raztopine izbranega zaviralca BChE. Primerjava pridobljenih kristalnih struktur spojin **3** in **4** s kristalno strukturo spojine vodnice **2** (PDB ID 5DYW) razkriva podoben način vezave zaviralcev v vezavno mesto encima BChE.

Spojini **3** in **4** se, enako kot spojina **2**, z naftalenskim obročem vežeta v acilni vezavni žepek, kjer tvorita π – π interakcije s Trp231. Pozitivno nabit dušik piperidinskega obroča interagira s Tyr332, kjer tvori kation – π interakcije. V holinski vezavni žepek encima BChE se pri spojinah **2**, **3** in **4** umešča benzilni fragment in s Trp82 vzpostavi π – π interakcije. Med kisikoma sulfonamidne kisline, ki sta akceptorja vodikove vezi in donorjem -OH skupino aminokislinskega ostanka Thr120, se ustvari vodikova vez, ki še

dodatno učvrsti vsidrano spojino zaviralca v encim BChE. Veriga -(CH₂)₂-OMe vezana na sulfonamidni dušik spojine **2** je usmerjena izven aktivnega mesta encima, enako velja tudi za -Me verigo spojine **4**.

Z merjenjem razdalje med posameznimi deli molekul zaviralcev in Trp231, Thr120, Trp82, Tyr332 aminokislinskimi ostanki, pomembnimi za vezavo liganda v encim, smo ugotovili, da imata spojina **3** brez vezane verige in spojina **4** z vezano -Me alkilno verigo enak način vezave kot spojina vodnica (**2**) z vezano -(CH₂)₂-OMe, z malenkostnimi razlikami v končni konformaciji zaviralca v vezavnem mestu huBChE. Spojina vodnica (**2**) se glede na meritve s svojo konformacijo najbolj prilega površini encima huBChE. Najboljše prileganje, v primerjavi s spojino **3** in **4**, doseže v holinskem vezavnem žepku, kjer se Trp82 aminokislinskemu preostanku približa na 4,83 Å, kar je za 0,2 Å bližje kot spojina **3** oziroma 0,4 Å bližje kot pri spojni **4**. Spojina vodnica **2** se prav tako z naftalenskim fragmentom molekule najbolje prilega v acilni vezavni žepki (Trp231). Prileganje spojin in interakcije z Thr120 in Tyr332 je primerljivo. Iz pridobljenih meritev lahko ugotovimo, da se spojina vodnica (**2**) najbolje prilega površini encima huBChE in potrdimo naša predvidevanja, da veriga vezana na sulfonamidni dušik vpliva na končno konformacijo vezanega liganda v huBChE.

5.3.1 Spojina vodnica (2)

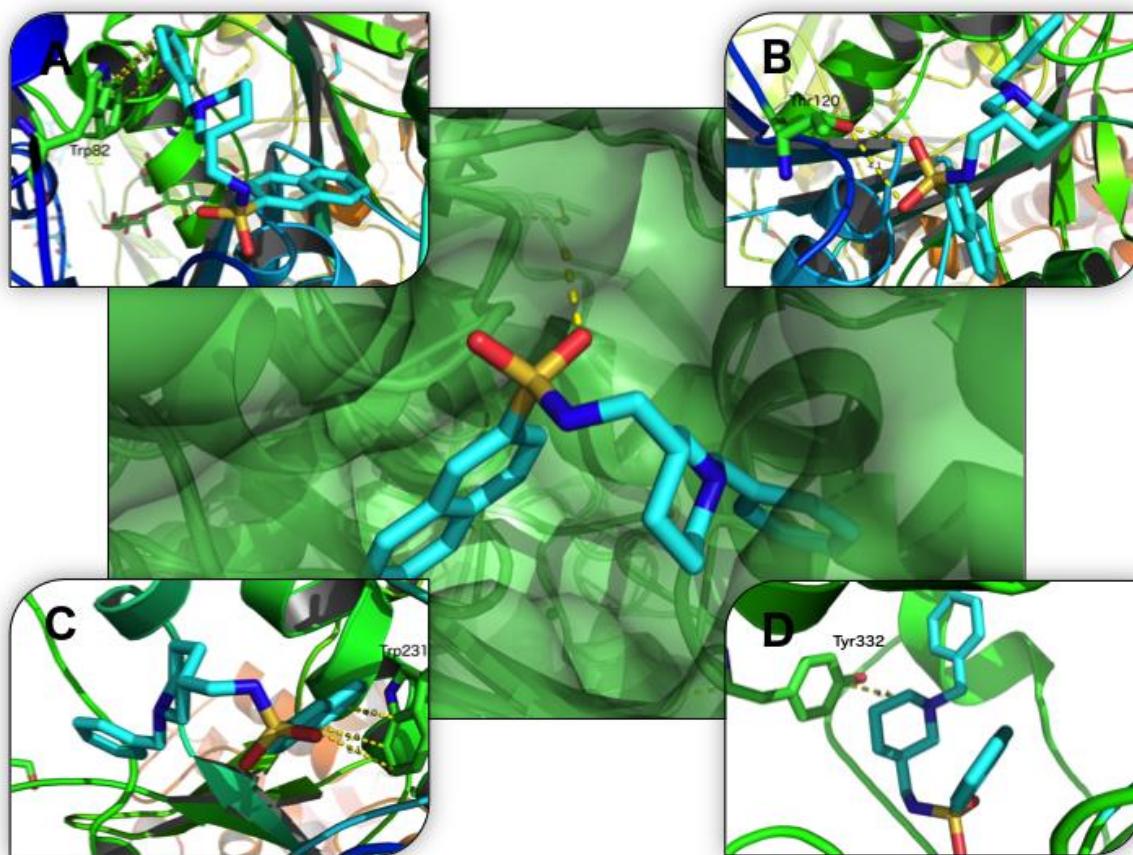


Slika 16: Prikaz kristalne strukture spojine 2 vezane v huBChE (PDB ID 5DYW). Slika prikazuje spojino 2 v modri barvi, vezano na površino huBChE obarvani v svetlo zeleno. V slikah od A – D je protein prikazan v »Cartoon« obliki, spojina 2 je modre barve. (A) prikaz interakcij spojine 2 s Trp82, (B) prikaz interakcij spojine 2 s Thr120, (C) prikaz interakcij spojine 2 s Thr231 in (D) prikaz interakcij spojine 2 s Tyr332.

Tabela 2: Prikaz povprečnih razdalj [\AA] med posameznimi strukturnimi deli spojine vodnice 2 in huBChE.

Aminokislinski preostanek	Del molekule zaviralca	Tip interakcije	Povprečna razdalja [\AA] (n meritev)
Trp231	naftalenski substituent	$\pi - \pi$	4,63 (3)
Thr120	kisik sulfonamidne skupine	H - vez	3,40 (2)
Trp82	benzilni substituent	$\pi - \pi$	4,83 (3)
Tyr332	<i>N</i> - piperidin	kation - π	4,50 (1)

5.3.2 Spojina *N*-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)naftalen-2-sulfonamid (3)

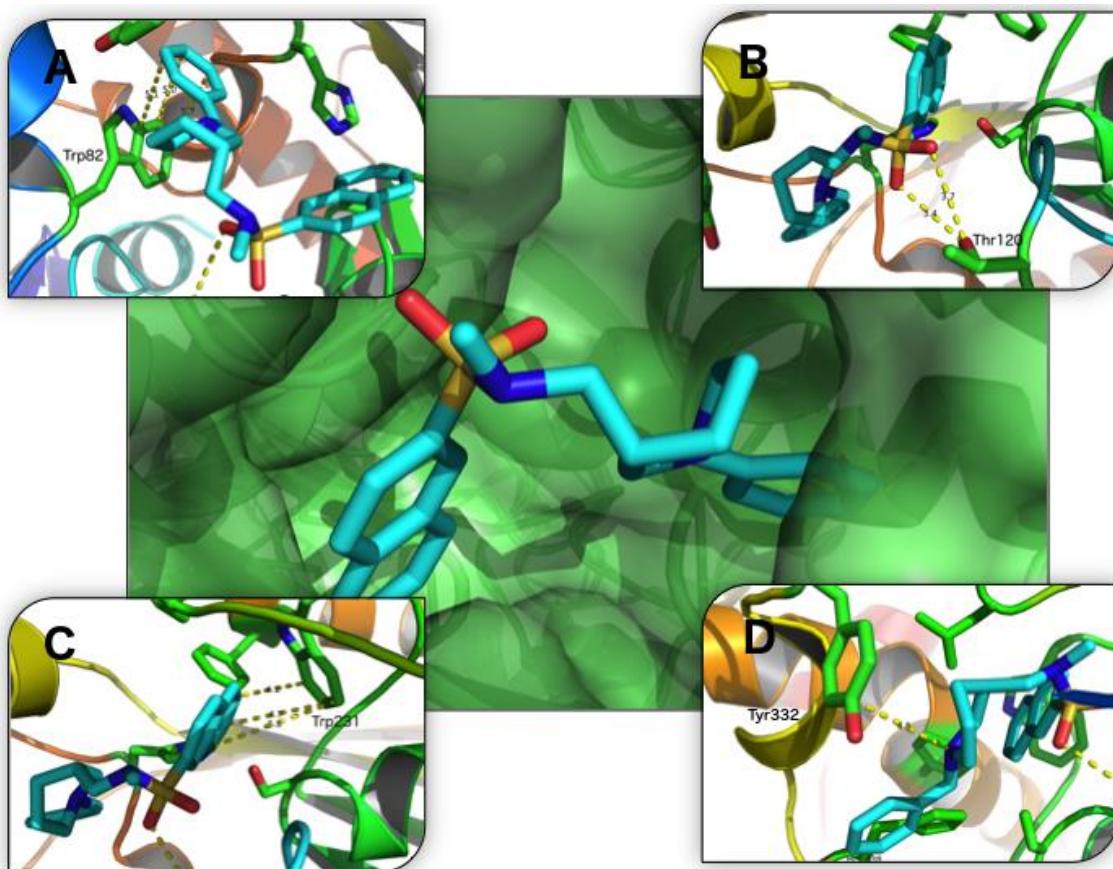


Slika 17: Prikaz kristalne strukture spojine 3 vezane v huBChE (PDB ID 5DYY). Slika prikazuje spojino 3 v modri barvi, vezano na površino huBChE obarvani v svetlo zeleno. V slikah od A – D je protein prikazan v »Cartoon« obliki, spojina 3 je modre barve. (A) prikaz interakcij spojine 3 s Trp82, (B) prikaz interakcij spojine 3 s Thr120, (C) prikaz interakcij spojine 3 s Thr231 in (D) prikaz interakcij spojine 3 s Tyr332.

Tabela 3: Prikaz povprečnih razdalj [\AA] med posameznimi strukturnimi deli spojine 3 in huBChE.

Aminokislinski preostanek	Del molekule zaviralca	Tip interakcije	Povprečna razdalja [\AA] (n meritev)
Trp231	naftalenski substituent	$\pi - \pi$	5,03 (3)
Thr120	kisik sulfonamidne skupine	H - vez	3,45 (2)
Trp82	benzilni substituent	$\pi - \pi$	5,07 (3)
Tyr332	<i>N</i> - piperidin	kation – π	4,40 (1)

5.3.3 Spojina *N*-((1-benzilpiperidin-3-il)metil)-*N*-metilnaftalen-2-sulfonamida (**4**)



Slika 18: Prikaz kristalne strukture spojine **4** vezane v huBChE (PBD ID 5DYT). Slika prikazuje spojino **4** v modri barvi, vezano na površino huBChE obarvani v svetlo zeleno. V slikah od A – D je protein prikazan v »Cartoon« obliki, spojina **4** je modre barve. (A) prikaz interakcij spojine **4** s Trp82, (B) prikaz interakcij spojine **4** s Thr120, (C) prikaz interakcij spojine **4** s Thr231 in (D) prikaz interakcij spojine **4** s Tyr332.

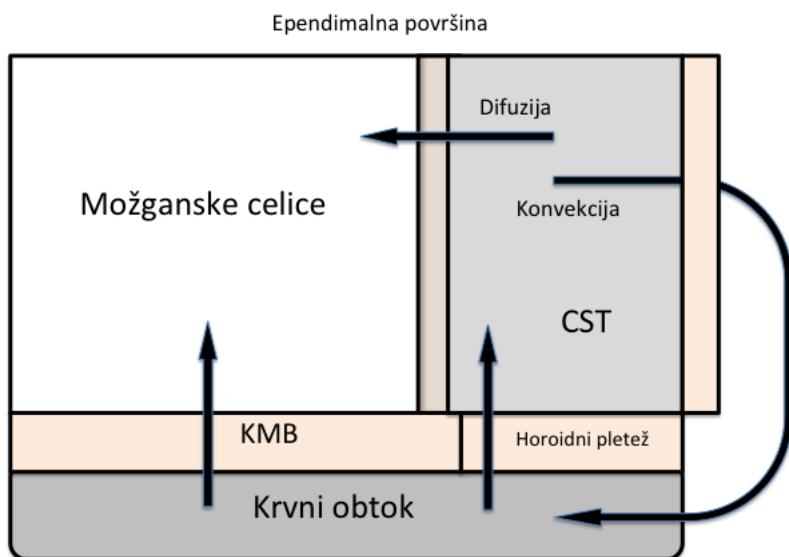
Tabela 4: Prikaz povprečnih razdalj [\AA] med posameznimi strukturnimi deli spojine **4** in huBChE.

Aminokislinski preostanek	Del molekule zaviralca	Tip interakcije	Povprečna razdalja [\AA] (n meritev)
Trp231	naftalenski substituent	$\pi - \pi$	4,87 (3)
Thr120	kisik sulfonamidne skupine	H - vez	3,55 (2)
Trp82	benzilni substituent	$\pi - \pi$	5,26 (3)
Tyr332	<i>N</i> - piperidin	kation - π	4,50 (1)

5.4 Analiza farmakokinetičnih lastnosti

5.4.1 Krvno možganska bariera

Krvno možganska bariera (KMB) je pletež kapilar, ki močno ovira prehajanje učinkovin iz krvi v možgane in predstavlja največji izziv pri načrtovanju zdravil za zdravljenje bolezni centralnega živčnega sistema [33]. Možgani imajo dve barieri. KMB predstavlja ločnico med krvjo in intersticijsko tekočino, ki obdaja sinaptične povezave znotraj možganskih celic. Ločnico med cerebrospinalno tekočino (CST), ki obdaja možgane ter krvjo pa predstavlja horoidni pletež. V možgane in na mesto delovanja učinkovine lahko prehajajo neposredno skozi KMB ali preko CST z difuzijo iz možganskih ventriklov preko ependimalne površine v intersticijsko tekočino do možganskih celic [34].



Slika 19: Prikaz distribucije spojin iz krvnega obtoka v možganske celice direktno preko KMB oziroma posredno preko horoidnega pleteža v CST in z difuzijo preko ependimalne površine v možganske celice [34].

Za ciljano dostavo učinkovin v možgane je boljša KMB, ker ima večjo površino. Prav tako je pretok oziroma konvekcija CST nazaj v krvni obtok, v primerjavi s hitrostjo difuzije iz CST v možganske celice preko ependimalne površine prehiter in hitro odplavi učinkovino v sistemski krvni obtok. Kapilare KMB imajo za razliko od perifernih kapilar tesne stike med endotelijskimi celicami, kar prepreči paracelularni transport. Minimalna pinocitoza in odsotnost intracelularnih por preprečuje nespecifično transcelularno izmenjavo med krvjo in možgani. Kombinacija vseh treh preprečuje dostop velikemu številu spojin in daje

veliko selektivnost KMB [35]. Kljub omejitvam obstajajo načini za prehod učinkovin preko KMB. Poznamo lipidno uravnnavani transport, receptorsko uravnnavan transport in transport preko prenašalcev, med katerimi je lipidno uravnnavana pasivna difuzija najpogosteji način prehajanja KMB majhnih zdravilnih učinkovin [34].

5.4.2 Fizikalno-kemijske lastnosti zdravilnih učinkovin z delovanjem v CŽS

Pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin z mestom delovanja v možganskih celicah moramo upoštevati več različnih fizikalno-kemijskih zakonitosti. Uspešna učinkovina z mestom delovanja v CŽS s ciljano dostavo preko pasivnega prehoda KMB mora ustrezati spodnjim zahtevam:

Aktivnost v nizkih koncentracijah - nanomolarne koncentracije

Visoka selektivnost

Molekularna masa < 450 Da

Minimalna hidrofobnost, cLogP < 5

Število donorjev H – vezi < 3

Število akceptorjev H – vezi < 7

Skupno število H vezi < 8

Število vrtečih vezi < 8

pKa nevtralni ali bazični 7,5 – 10,5

Polarna površina molekule $< 60 – 70 \text{ \AA}^2$

Zgoraj opisane zahteve nakazujejo, da so zdravilne učinkovine z mestom delovanja v CŽS manjše, bolj kompaktne in manj fleksibilne. Molekularna površina ima manjše število funkcionalnih skupin za tvorbo vodikovih vezi. Prav tako je polarna površina spojin v primerjavi s celotno površino molekule zmanjšana.

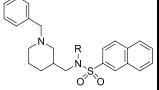
5.4.3 Predvidene farmakokinetične lastnosti zaviralcev BChE (3-7)

Zamenjava ali popolna odstranitev $-(\text{CH}_2)_2-\text{OMe}$ se je za nove *N*-alkil sulfonamide (3 - 7) glede na napovedane farmakokinetične lastnosti izkazala za ugodno. Spojina 3, ki je brez verige, ima ugodno vrednost cLogP, ki znaša 4,56 in ustreza minimalnim predpisanim cLogP vrednostim. Spojina 3 je edina, ki ima v svoji strukturi poleg akceptorjev H – vezi tudi donor H – vezi. Molekulska masa pa je nižja od 400 Da. Spojine 4 - 7 imajo primerljive fizikalno-kemijske lastnosti. Vrednosti tPSA se s podaljševanjem alkilne verige ne spreminja, prav tako enaka ostaja tudi vrednosti pKa in skupno število H – vezi. Omenjene spojine se razlikujejo v vrednosti cLog in številu vrtljivih vezi. Spojina 4, z

vezano –Me verigo, izkazuje najboljše fizikalno-kemijske lastnosti in edina izmed vseh sintetiziranih novih *N* – alkil sulfonamidnih derivatov ustreza vsem predpisanim vrednostim, ki so pogoj za dobro prehajanje KMB.

Na podlagi izračunanih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko sklepamo, da bo spojina **4** bolje prehajala KMB kot spojina vodnica **2**, ki ima veliko molekulsko maso, višji cLogP in tPSA vrednosti ter večje celokupno število vrtljivih vezi.

Tabela 5: Prikaz izračunanih fizikalno-kemijskih lastnosti spojine vodnice **2** in sintetiziranih novih *N* – alkil sulfonamidnih zaviralcev huBChE (**3-7**).

Spojina		cLogP	tPSA [Å²]	pKa	MM [Da]	Število vrtljivih C - vezi	Število donorjev/akceptorjev H - vezi
2	(CH ₂) ₂ -OMe	5,251	49,85	8,792	453,2212	9	0/8
3	H	4,56	49,41	8,760	395,1784	6	1/6
4	Me	4,976	40,62	8,807	409,1939	6	0/6
5	Et	5,505	40,62	8,815	423,2103	7	0/6
6	<i>n</i> Pr	6,034	40,62	8,824	437,2255	8	0/6
7	<i>n</i> Bu	6,563	40,62	8,816	451,2413	9	0/6

6 ZAKLJUČEK

Načrtovali, sintetizirali in ovrednotili smo pet *N* – alkil naftalensulfonamidnih zaviralcev BChE, s katerimi smo želeli izboljšati jakost zaviranja ter raziskati odnos med strukturo in delovanjem spojine vodnice **2**. Vse sintetizirane spojine so imele jakost delovanja v nanomolarnem območju, vendar slabše kot spojina vodnica **2** ($IC_{50} = 4,92 \pm 0,33$ nM). Za spojino z najmanjšo zaviralno jakostjo se je izkazala spojina **3** ($IC_{50} = 56,9 \pm 9,80$ nM); spojine **5** ($IC_{50} = 37,97 \pm 2,57$ nM), **6** ($IC_{50} = 42,78 \pm 6,39$ nM) in **7** ($IC_{50} = 35,53 \pm 4,42$ nM) so imele primerljivo jakost delovanja. Najboljšo jakost zaviralne aktivnosti je imela spojina **4** ($IC_{50} = 24,97 \pm 3,84$ nM). Razlika v jakosti zaviralne aktivnosti med spojino **3** in spojino **4** razkriva, da stranska veriga vpliva na način vezave v aktivno mesto BChE. Prav tako je razlika v jakosti delovanja med spojino vodnico **2** in spojino **7**, ki sta si kemijsko najbolj podobni, razkrila, da je za močnejše interakcije zaviralca z encimom potrebno v stransko verigo vključiti akceptor vodikove vezi. V nadalnjih raziskavah bi bilo zanimivo v alkilne stranske verige sintetiziranih spojin vključiti tudi kisik ter s primerjavo jakosti aktivnosti zaviranja ugotoviti optimalno mesto za vezan kisik na alkilni verigi. Z vpeljevanjem novih alkilnih substituentov nam ni uspelo izboljšati jakosti zaviranja encima BChE, vendar smo z optimizacijo strukture spojine vodnice **2** uspeli sintetizirati spojine s predvideno boljšim prehajanjem krvno možganske bariere. Rezultati in spoznanja našega dela lahko služijo kot smernice za nadaljnji razvoj in optimizacijo spojine vodnice **2**, kjer bo potrebno najti kompromis med farmakokinetičnimi lastnostmi, ki bodo zagotavljal dobro biološko uporabnost spojine ter jakostjo zaviranja huBChE *in vitro*.

7 LITERATURA

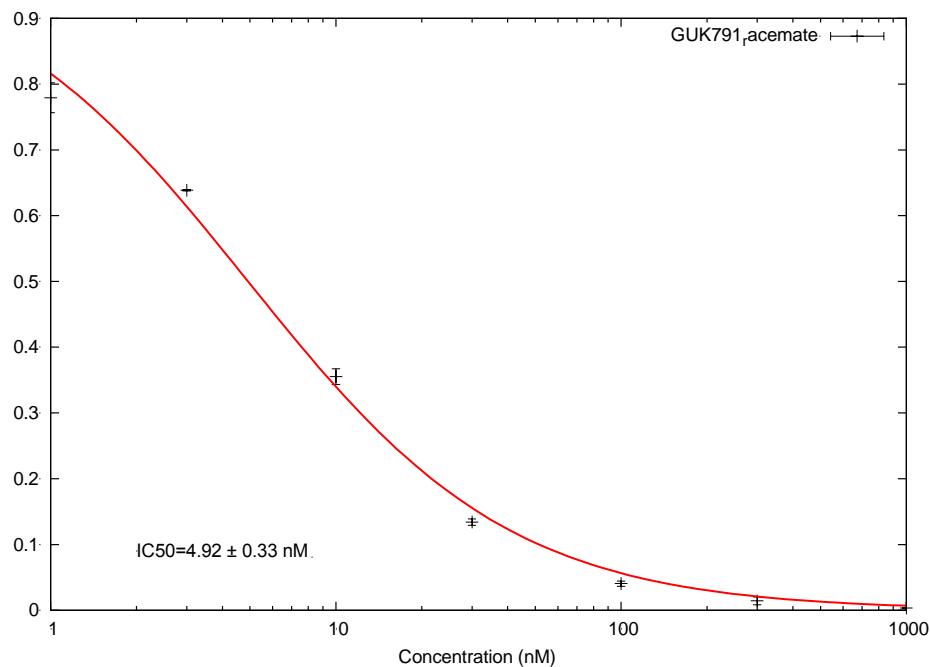
1. Giacobini E: Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* 2004;50:433-440.
2. Marko Živin D S: Temelji Patološke Fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011;2:293-297.
3. Stelzmann R, Schnitzlein H N, Murtagh F R: An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin Anat.* 1995;8(6):429-431.
4. Praprotnik D: Alzheimerjeva bolezen - Uganka staranja. *MED RAZGL.* 1995;34:211-223.
5. Karan E, Mercken M, Strooper B D: The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):698-712.
6. Pimplikar S W; Reassessing the Amyloid Cascade Hypotehsis of Alzheimer's Disease. *J Biochem Cell Biol.* 2012;41(6):997-1003.
7. Li Y, Chu L W, Wang B, et al: CYP46A1 functional promoter haplotypes decipher genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 2010;21:1311-1323.
8. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D: Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem.* 2013;70:165-188..
9. Darvesh S: Butyrylcholinesterase radioligands to image Alzheimer's disease brain. *Chem Biol Interact.* 2013;203(1):354-357.
10. Mullane K, Williams M: Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis - But what lies beyond? *Biochem Pharmacol.* 2013;85(3):289-305.
11. Mudher A, Lovestone S: Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* 2002;25(1):22-26.
12. Tanzi R E, Bertram L: Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell.* 2005;120(4):545-555.
13. Contestabile A: The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):334-340.
14. Bartus R T: On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.* 2000;163:495-529.
15. Terry Jr, Buccafusco J J: The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer ' s Disease- Related Cognitive Deficits : Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):821-827.

16. Johnson G, Moore S W: Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem Int.* 2012;61(5):783-797.
17. Hartmann J, Kiewert C, Duysen E G, Lockridge O, Greig N H, Klein J: Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *J Neurochem.* 2007;100:1421-1429.
18. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps J C, Nachon F: Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41141-41147.
19. Colletier J-P, Fournier D, Greenblatt H M, et al: Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* 2006;25(12):2746-2756.
20. Lockridge O: Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther.* 2014;148:34-46.
21. Brus B, Kos U: Discovery, Biological Evaluation, and Crystal Structure of a Novel Nanomolar Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor. *Med. Chem.* 2014;57:8167-8179
22. Anand R, Gill K D, Mahdi A A: Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology.* 2014;76:27-50.
23. Scarpini E, Scheltens P, Feldman H: Review Treatment of Alzheimer's disease : current status and new perspectives. *Neurology.* 2003;2:539-547.
24. Baro-On P, Millard C. B, Harel M, Dvir H, Enz A, Sussman J L, Silman I: Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochemistry.* 2002; 41:3555-3564.
25. Citron M: Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(5):387-398.
26. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B W, Feeney P J: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26.
27. Feng B Y, Simeonov A, Jadhav A, et al: A high-throughput screen for aggregation-based inhibition in a large compound library. *J Med Chem.* 2007;50(10):2385-2390.
28. Clayden, J. in drugi: *Organic Chemistry*, Oxford University Press New York, 2001:771-802.
29. Ellman G L, Courtney K D, Andres V, Featherstone R M: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88-95.
30. Clayden, J. in drugi: *Organic Chemistry*, Oxford University Press New York, 2001:405.

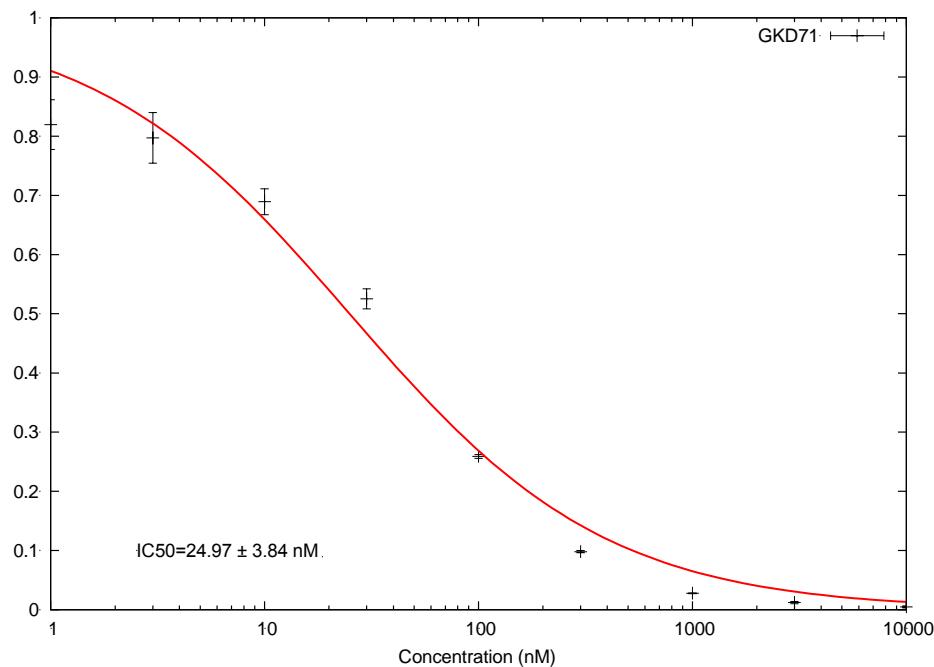
31. Clayden J. in drugi: *Organic Chemistry*, Oxford University Press New York, 2001:618.
32. Salvatore R N, Nagle A S, Kyung W J: Cesium effect: High chemoselectivity in direct N-alkylation of amines. *J Org Chem.* 2002;67(3):674-683.
33. Pajouhesh H, Lenz G R: Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx.* 2005;2(4):541-553.
34. Pardridge W M: Drug transport across the blood–brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(11):1959-1972.
35. Bendich A. Nutrients: Stress and Medical Disorders, Humana Press, New Jersey, 2006:84.

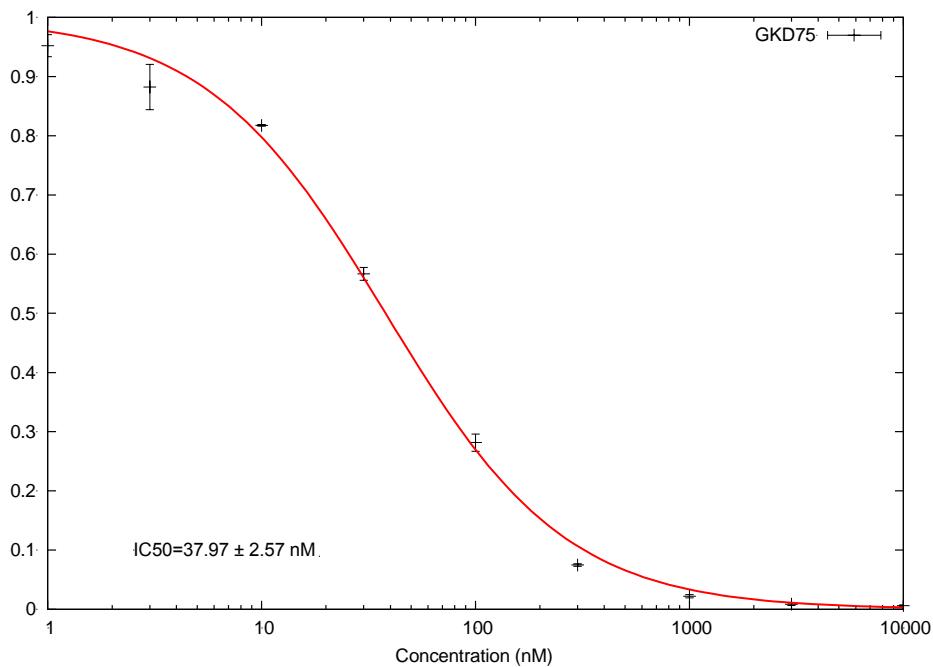
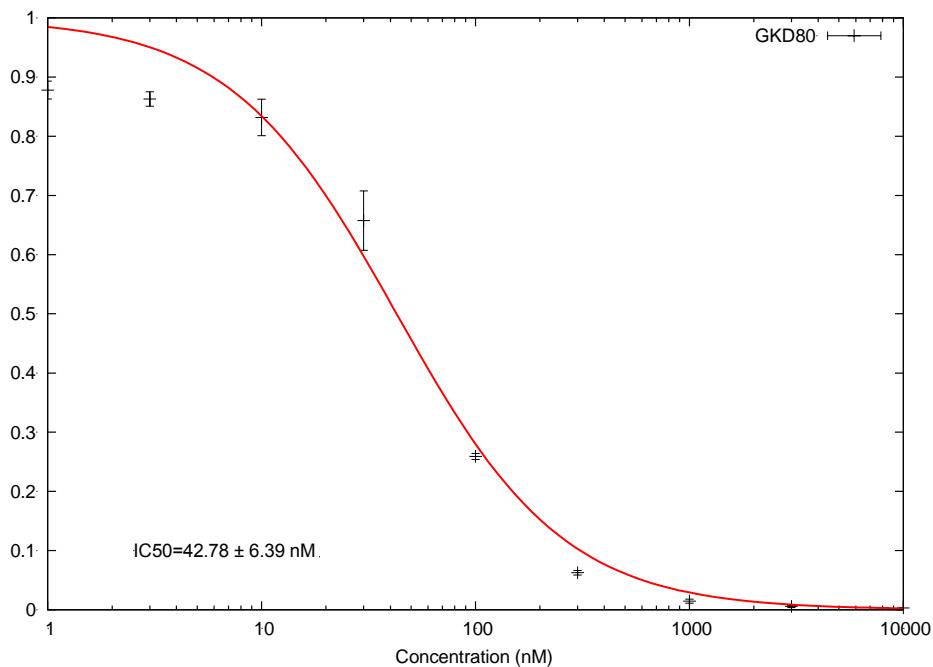
8 PRILOGE

Spojina vodnica (2)



Spojina 4



Spojina 5**Spojina 6**

Spojina 7

