

Dizajn, sinteza i biološka evaluacija biskarbamata kao potencijalnih selektivnih inhibitora butirilkolinesteraze

Matošević, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:838768>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ana Matošević

**DIZAJN, SINTEZA I BIOLOŠKA EVALUACIJA
BISKARBAMATA KAO POTENCIJALNIH
SELEKTIVNIH INHIBITORA
BUTIRILKOLINESTERAZE**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: dr.sc. Anita Bosak, v. zn.sur.

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ana Matošević

**DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL
EVALUATION OF BISCARBAMATES AS POTENTIAL
SELECTIVE INHIBITORS OF
BUTYRYLCHOLINESTERASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr Anita Bosak, Senior Scientific Associate

Zagreb, 2023.

*Ovaj rad izrađen je
u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu
pod vodstvom dr. sc. Anite Bosak u sklopu poslijediplomskog
sveučilišnog studija Kemija pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-
matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

Zahvale

Veliko, najveće HVALA mentorici dr. sc. Aniti Bosak na ukazanom povjerenju i podršci tijekom izrade doktorske disertacije te što je u svakom trenutku bila tu za mene. Hvala za riječi ohrabrenja u svim trenucima, i onda kad stvari ne bi išle po planu. Hvala na prenesenom znanju, stručnom vodstvu i pomoć tijekom izrade ove disertacije.

Hvala dr. sc. Zrinki Kovarik, voditeljici projekta HrZZ-IP-01-7683, u sklopu kojeg je izveden dio istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji, na ukazanom povjerenju, podršci i stručnim savjetima tijekom izrade ove disertacije.

Hvala dr. sc. Anamariji Knežević (Institut Ruđer Bošković) na pomoći u razradi detaljnog plana sinteze spojeva, savjetima i uputama kod optimiziranja reakcijskih uvjeta njihove sinteze te što je uvijek bila tu za sva pitanja i ideje.

Hvala dr. sc. Nikoli Marakoviću na pomoći s molekulskim modeliranjem i hvala dr. sc. Antoniju Zandoni na pomoći oko eksperimenata na staničnim linijama.

Hvala prof. dr. sc. Ines Primožič i dr. sc. Almi Ramić na pomoći s određivanjem čistoće spojeva.

Hvala svim kolegicama i kolegama Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći kad god je trebalo.

Hvala svim kolegicama i kolegama Laboratorija za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu (Institut Ruđer Bošković) na iskazanoj gostoljubivosti i susretljivosti, a posebno dr. sc. Mladenki Jurin.

Hvala svim djelatnicima Centra za NMR (Institut Ruđer Bošković) na pravovremeno i kvalitetno snimljenim spektrima sintetiziranih spojeva.

Hvala ekipi iz jutarnje smjene na druženju i pretresanju svakodevice.

Hvala mojim cimericama Dori, Ana-Mariji i Mariji na podršci i svakodnevnom čavrljanju.

Hvala mojim curama Ani, Jeleni, Luciji, Mateji i Tatjani što su uvijek tu za mene.

Veliko hvala mojim roditeljima, bratu i sestri na svemu što čine za mene i što su mi uvijek bili vjetar u leđa te su jednako zaslužni za sva moja postignuća.

Hvala Bojanu na velikoj podršci, razumijevanju i savjetima.

Ana Matošević

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Uloga i funkcija butirilkolinesteraze	5
2.1.1. Struktura BChE.....	8
2.1.1.1. Aktivno mjesto BChE.....	10
2.1.2. Polimorfizam ljudske butirilkolinesteraze.....	12
2.1.3. Acetilkinolinesteraza.....	15
2.1.4. Sličnosti BChE i AChE.....	17
2.2. Alzheimerova bolest.....	18
2.2.1. Patofiziologija Alzheimerove bolesti.....	19
2.2.2. Liječenje Alzheimerove bolesti.....	22
2.3. Karbamati.....	24
2.3.1. Karbamati kao inhibitori kolinesteraza u tretmanu neurodegenerativnih bolesti.....	26
2.3.4. Metode sinteze karbamata.....	30
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Sinteza spojeva	33
3.1.1. Opće napomene.....	33
3.1.1.1. Analiza čistoće spojeva	34
3.1.2. Općeniti postupak sinteze polaznih 5-(2-bromacetil)-1,3- fenilen biskarbamata I-VI.....	35
3.1.2.1. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamata) (I).....	35
3.1.2.2. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata) (II).....	36
3.1.2.3. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata) (III).....	36
3.1.2.4. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarbamata) (IV).....	36
3.1.2.5. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bispiperidin-1-ilkarboksilata (V).....	37
3.1.2.6. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamata) (VI).....	37
3.1.3. Općeniti postupak sinteze 5,2-amino (1-hidroksi)-1,3-fenilen biskarbamata 1-30.....	38
3.1.4. Sinteza 5,2-amino (1-hidroksi)-1,3-fenilen-biskarbamat hidroklorida).....	38
3.1.4.1. Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamata)-hidroklorida (I).....	39

3.1.4.2. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(4-tolilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (2).....	39
3.1.4.3. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (3).....	40
3.1.4.4. Sinteza 5-[2-(adamantan-1-il-amino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (4).....	40
3.1.4.5. Sinteza 5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (5).....	41
3.1.4.6. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (6).....	41
3.1.4.7. Sinteza 5-(2-cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (7).....	41
3.1.4.8. Sinteza 5-[2(fenilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata).....	42
3.1.4.9. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (9).....	42
3.1.4.10. Sinteza 5-[1-hidroksi-2(tert-pentilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (10).....	43
3.1.4.11. Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorid (11).....	43
3.1.4.12. Sinteza 5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (12).....	44
3.1.4.13. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (13).....	44
3.1.4.14. Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata)-hidroklorida (14).....	45
3.1.4.15. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(dietil)karbamata (15).....	45
3.1.4.16. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(tert-pentilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata)-hidroklorida (16).....	45
3.1.4.17. Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata)-hidroklorida (17).....	46
3.1.4.18. Sinteza 5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata) hidroklorida (18).....	46
3.1.4.19. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata)-hidroklorida (19).....	47
3.1.4.20. Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat) hidroklorida (20).....	47
3.1.4.21. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(tertpentilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (21).....	48
3.1.4.22. Sinteza 5-[2-1-adamantan-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat) hidroklorida (22).....	48
3.1.4.23. Sinteza 5-[2-(1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat) hidroklorida (23).....	48

3.1.4.24. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis-(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (24).....	49
3.1.4.25. Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (25).....	49
3.1.4.26. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (26).....	50
3.1.4.27. Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (27).....	50
3.1.4.28. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (28).....	51
3.1.4.29. Sinteza 5-[2-cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil) karbamat)-hidroklorida (29).....	51
3.1.4.30. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamat) hidroklorida (30).....	52
3.2. Inhibicija ljudskih kolinesteraza	53
3.2.1. Enzimi	53
3.2.2. Pufer, supstrati i reagensi.....	53
3.2.3. Mjerenje aktivnosti kolinesteraza	54
3.2.4. Mjerenje brzine progresivne inhibicije	55
3.2.5. Mjerenje brzine spontane dekarbamilacije.....	57
3.2.6. Obrada rezultata.....	58
3.3. Kelatiranje biometala biskarbamatima	59
3.3.1. Kemikalije	59
3.3.2. Procjena kelatacijske sposobnosti biskarbamata	59
3.3.3. Stehiometrija kompleksa biskarbamat-biometal	59
3.4. Procjena mogućnosti prolaska biskarbamata kroz krvno-moždanu barijeru (BBB).....	60
3.5. Molekulska pristajanje	61
3.6. Citotoksičnost biskarbamata.....	63
3.6.1. Kemikalije, mediji i stanične kulture.....	63
3.6.2. Određivanje citotoksičnosti biskarbamata.....	63
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	65
4.1. Rezultati	65
4.1.1. Dizajn i sinteza biskarbamata.....	65
4.1.2. Stabilnost spojeva u vodi.....	71
4.1.3. Inhibicija kolinesteraza biskarbamatima.....	73
4.1.3.1. Inhibicija butirilkolinesteraze	73
4.1.3.2. Inhibicija acetilkolinesteraze.....	77
4.1.3.3. Selektivnost karbamilacije kolinesteraza	81

4.1.3.4. Inhibicija atipične butirilkolinesteraze odabranim biskarbamatima	82
4.1.4. Analiza reverzibilnog kompleksa odabranih biskarbamata i BChE _{UU} i AChE.....	84
4.1.5. Dekarbamilacija kolinesteraza	90
4.1.6. In silico procjena mogućnosti prolaska spoja kroz krvno-moždanu barijeru pasivnim transportom.....	92
4.1.7. Citotoksičnost biskarbamata.....	94
4.1.8. Kelatiranje biometala	96
4.2. Rasprava	99
§ 5. ZAKLJUČAK	104
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi).....	107
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	109
§ 8. ŽIVOTOPIS	XV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

DIZAJN, SINTEZA I BIOLOŠKA EVALUACIJA BISKARBAMATA KAO POTENCIJALNIH SELEKTIVNIH INHIBITORA BUTIRILKOLINESTERAZE

Ana Matošević

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb

Inhibicija butirilkolinesteraze (BChE) predstavlja novi, obećavajući pristup liječenju Alzheimerove bolesti (AB). U sklopu ove disertacije dizajnirani su i sintetizirani biskarbamati s različito supstituiranim atomima dušika karbamatnih skupina i 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca. Za 25 biskarbamata određena je sposobnost inhibicije ljudske BChE i acetilkolinesteraze (AChE), procijenjena je sposobnost prelaska krvno-moždane barijere pasivnim transportom, *in vitro* toksičnost prema jetrenim, bubrežnim i živčanim stanicama te sposobnost kelatiranja biometala Cu^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} . Svi ispitivani biskarbamati pokazali su vremenski ovisnu inhibiciju s konstantama brzine inhibicije od $10^3 - 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ i općenito većom selektivnošću prema BChE u odnosu na AChE. Za tri biskarbamata utvrđena je mogućnost prolaska krvno-moždane barijere pasivnim transportom, dok je za njih devet ta sposobnost ograničena. Većina biskarbamata nije pokazala citotoksični učinak prema odabranim staničnim linijama, dok su svi pokazali sposobnost kelatiranja najmanje jednog od ispitanih iona biometala. Radi visoke BChE selektivnosti, netoksičnosti, sposobnosti kelatiranja biometala i prolaska krvno-moždane barijere, za daljnji razvoj kao lijekova za liječenje kasnijih stadija AB istaknula su se tri spoja (**3**, **9** i **26**).

(119 stranica, 32 slike, 8 shema, 14 tablica, 164 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, biskarbamati, BBB, inhibicija, kelatiranje, kolinesteraze

Mentor: dr. sc. Anita Bosak, v. zn. sur.

Rad prihvaćen: 7.12.2022.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. dr. sc. Danijela Barić, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF BISCARBAMATES AS POTENTIAL SELECTIVE INHIBITORS OF BUTYRYLCHOLINESTERASE

Ana Matošević

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb

Inhibition of butyrylcholinesterase (BChE) represents a new, promising approach to the treatment of Alzheimer's disease (AD). As part of this dissertation, biscarbamates with different substituted nitrogens of carbamate groups and 1-hydroxy-2-aminoethyl chain were designed and synthesized. For 25 biscarbamates, the ability to inhibit human BChE and acetylcholinesterase (AChE) was determined, the ability to cross the blood-brain barrier (BBB) by passive transport, *in vitro* toxicity to liver, kidney and neural cells and the ability to chelate biometals Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} were evaluated. All of the tested biscarbamates showed a time-dependent inhibition with inhibition rate constants in $10^3 - 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ range with a generally higher preference for BChE compared to AChE. For three biscarbamates it was found that they should be able to cross the BBB by passive transport, while this ability was limited for nine biscarbamates. Most of the biscarbamates did not show a cytotoxic effect against the selected cell lines. All of the biscarbamates were shown to have the ability to chelate at least one of the biometals. Due to the high BChE selectivity, non-toxicity, ability to chelate biometals and pass the BBB, three compounds (**3**, **9** and **26**) were pointed out for further development as drugs for the treatment of later stages of AD.

(119 pages, 32 figures, 8 schemes, 14 tables, 164 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Alzheimer's disease, biscarbamates, BBB, chelation, cholinesterases, inhibition

Supervisor: Dr Anita Bosak, Senior Research Associate

Thesis accepted: 7.12.2022.

Reviewers:

Dr Jasmina Rokov Plavec., Assistant Professor
Dr Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
Dr Danijela Barić, Senior Scientific Associate

§ 1. UVOD

Butirilkolinesteraza (BChE) je serinska hidrolaza koja se sintetizira u jetri, a osim u jetri nalazi se i u mozgu, srcu, plućima, gušterači, crijevima i bubrezima. U najvećim količinama prisutna je u plazmi i jetri.^[1-3] Naziv je dobila prema jednom od svojih supstrata – butirilkolinu. U literaturi se zbog svoje nedefinirane fiziološke uloge često naziva i pseudokolinesterazom, nespecifičnom kolinesterazom ili serumskom kolinesterazom.^[1] Nema definiran fiziološki supstrat, ali je poznato da može hidrolizirati širok spektar estera, od raznih kolinskih i tiokolinskih do neutralnih, pa čak i nekih negativno nabijenih estera.^[4-7] BChE sudjeluje u biokonverziji nekih farmakološki važnih spojeva kao što su bambuterol (bronhodilatator koji se koristi u liječenju astme), aspirin (lijek koji se koristi za smanjenje boli, protiv groznice ili upale), heroin (opioid koji se koristi kao droga), irinotekan (lijek protiv raka), kokain (alkaloid koji se koristi kao droga), sukcinildikolin (živčano-mišićni blokator kratkotrajnoga djelovanja koji se upotrebljava za opuštanje mišića pacijenata u općoj anesteziji i pri intubaciji) te mnogi drugi.^[8-10] Hidrolizira i hormon grelin čime sudjeluje u regulaciji metabolizma masti.^[11]

BChE je visoko polimorfan enzim. Do danas je opisano oko 75 prirodnih mutacija BChE koje uključuju promjene samo jednog nukleotida ili deleciju/inserciju većeg broja nukleotida,^[1,12] a karakterizira ih različiti afinitet prema supstratima i inhibitorima ili imaju smanjenu aktivnost u odnosu na uobičajenu BChE.^[12-14] Postojanje polimorfa BChE može utjecati na učinkovitost lijekova za čije je djelovanje potrebna aktivnost BChE i posljedično uzrokovati neželjene nuspojave. Iz tog razloga klinički je najzanimljivija atipična BChE jer je uočeno kako homozigoti ove inačice iznimno sporo hidroliziraju mišićni relaksans sukcinildikolin te u slučaju njegove primjene mogu doživjeti produljenu apneju,^[13, 14] a u slučaju trovanja antikolinesteraznim spojevima predstavljaju rizičnu skupinu.

BChE je jedna od dviju kolinesteraza prisutnih u ljudskom organizmu. Druga je acetilkolinesteraza (AChE), esencijalna kolinestraza čija je fiziološka uloga hidroliza prijenosnika živčanog impulsa acetilkolina (ACh). BChE i AChE su dva strukturno homologna enzima i dijele oko 65 % homologije u primarnoj sekvenci i 90 % homologije u terciarnoj strukturi. Unatoč visokoj homologiji, zbog različitog aminokiselinskog sastava aktivnog mjesta BChE i AChE se razlikuju prema katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti vezanja supstrata i

afinitetu prema ligandima. ^[15-21] BChE, uz AChE, sudjeluje u regulaciji količine ACh u sinapsama središnjeg živčanog sustava i glatkih mišića. ^[15] U slučaju inhibicije AChE prisutne u mozgu, BChE djelomično preuzima njezinu ulogu i hidrolizira ACh. ^[5-8] BChE prisutna u krvi čisti organizam od raznih prirodnih i sintetskih antikolinesteraznih spojeva kao što su različiti organofosforni i karbamatni pesticidi te živčani bojni otrovi koji su po strukturi organofosfati, štiteći tako AChE od inhibicije. ^[5-8]

Alzheimerova bolest (AB) je složeni neurološki poremećaj čiju etiologiju čine smanjena koncentracija prijenosnika živčanog impulsa ACh, taloženje amiloidnih β -peptida, hiperfosforilacija tau proteina, hiperaktivacija monoaminoooksigenaze B, oksidacijski stres i dishomeostaza biometala. ^[22, 23] Liječenje AB je simptomatsko i utječe uglavnom na ublažavanje simptoma bolesti, ali ne i na njezin tijek, razvoj i konačan ishod. ^[24] Temelji se uglavnom na povećanju koncentracije ACh inhibicijom enzima koji ga hidroliziraju, primarno AChE. Za liječenje AB trenutno su odobrena tri inhibitora kolinesteraza: galantamin i donezepil koji su selektivni inhibitori AChE i rivastigmin koji je neselektivni inhibitor AChE i BChE. ^[15] Novija istraživanja etiologije BChE pokazala su kako tijekom napredovanja AB aktivnost AChE opada na oko 33-45 % svoje normalne aktivnosti, dok aktivnost BChE progresivno raste za oko 40-120 % svoje normalne aktivnosti. ^[25] Nadalje, BChE je pripisana i uloga u transformaciji amiloidnih plakova iz benignih, karakterističnih za normalno starenje, u maligne kakvi se pronalaze u mozgu oboljelih od AB. ^[25] *In vitro* istraživanja provedena na glodavcima pokazala su kako selektivna inhibicija BChE, s obzirom na AChE, povoljno utječe na kognitivne sposobnosti i smanjuje amiloidne nakupine u mozgu glodavaca s induciranom AB te smanjuje nastanak nuspojava karakterističnih pri uporabi selektivnih AChE inhibitora: tremora, uznemirenosti, hipersalivacije i znojenja. ^[25] Na temelju tih rezultata, selektivna inhibicija BChE nametnula se kao novi, obećavajući pristup u tretmanu uznapredovale AB.

Do danas je sintetiziran i testiran niz selektivnih, strukturno različitih inhibitora BChE: derivata takrina i tienotiazina, ^[26-28] cinkoni, ^[26] cinkonidini, kinini, ^[26] kinolini, kinuklidini, ^[29, 30] flavonoidi, ^[31] razni derivati amina, amida i imida, karbamati te mnogih drugih spojeva. ^[26,28, 32, 33] Vrlo obećavajući rezultati dobiveni su za spojeve s karbamatnom skupinom. Mehanizam djelovanja karbamata i kolinesterazâ sličan je mehanizmu djelovanja ACh i AChE; ali za razliku od izrazito brze hidrolize acetilkolina, hidroliza karbamata je znatno sporija; ^[34-36] deacetilacija AChE je oko milijardu puta brža od dekarbamilacije disupstituiranih i

monosupstituiranih karbamata. [33-36] Prvi karbamat korišten u liječenju AB bio je fizostigmin, spoj koji se inicijalno koristio za liječenje povišenog očnog tlaka, glaukoma. [37] Međutim, pokazano je kako njegova primjena povoljno utječe i na smanjenje simptoma i poboljšanje kognitivnih funkcija kod osoba oboljelih od AB. Danas se fizostigmin primjenjuje kao inhibitor AChE u liječenju miastenije gravis, neuromuskularnog poremećaja koji uzrokuje slabost skeletnih mišića. U liječenju miastenije gravis primjenjuju se i karbamati piridostigmin i neostigmin, parasimpatomimetici koji svoj učinak ostvaruju kao inhibitori AChE usporavajući hidrolizu ACh i time povećavaju učinkovitost kolinergičkog prijenosa. [38] Karbamat rivastigmin odobren je za liječenje blage do umjerene demencije Alzheimerovog tipa i demencije kod Parkinsonove bolesti. [38] Sintetiziran je i niz BChE selektivnih spojeva koje u svojoj strukturi imaju karbamatnu skupinu. Vrlo obećavajućim selektivnim inhibitorom BChE pokazao se karbamat kimserin koji ljudsku BChE inhibira oko 15 puta brže u odnosu na ljudsku AChE. [39] Međutim, njegov razvoj kao lijeka za AB je zaustavljen budući je dokazano da se većina primijenjenog kimserina u tijelu metabolizira u neurotoksični opioid eserolin. [40, 41] Nakon toga sintetiziran je niz derivata kimserina, od kojih su se vrlo obećavajućima pokazali bisnorkimserin i *N*-feniletilnorkimserin koji su bili čak 110, odnosno 5000 puta selektivniji prema BChE u odnosu na AChE. [15] Od tih spojeva, trenutno je samo bisnorkimserin u II. fazi kliničkih ispitivanja. [42]

Biskarbamat bambuterol, prolijek bronhodilatatora terbutalina, izrazito je selektivni inhibitor BChE koji humanu BChE inhibira oko 20.000 puta brže od AChE, [43, 44] ali vrlo slabo prolazi kroz krvno-moždanu barijeru (BBB). [43, 45] Budući da prilikom upotrebe bambuterola nisu zabilježene nikakve nuspojave, nije toksičan te s obzirom da su produkti njegove prve i druge hidrolize monokarbamat bambuterola te terbutalin također inhibitori kolinesteraza, njegova struktura predstavlja dobru osnovu za dizajn i sintezu novih spojeva s ciljem pronalaska novog selektivnog inhibitora BChE. Wu i suradnici sintetizirali su seriju bisdimetilnih i monodimetilnih analoga bambuterola kojima je mijenjana struktura i duljina 1-hidroksi-2-aminoetilnog dijela molekule, međutim nijedan od njih nije pokazao selektivnost za BChE kao bambuterol. [45, 46] Istraživanja na derivatima s različitim rasporedom karbamatnih skupina na benzenskoj jezgri pokazala su kako je inhibicijski učinak biskarbamata prema BChE određen položajem karbamatnih skupina na benzenskoj jezgri pri čemu se *meta* položaj karbamatnih skupina pokazao optimalnim za reakciju sa serinom u aktivnom mjestu BChE. [47]

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije AB trenutno pogađa više od 50 milijuna ljudi diljem svijeta s tendencijom rasta broja oboljelih kao posljedicom starenja svjetske populacije.^[48] Visoka učestalost bolesti značajno pridonosi rastućem ekonomskom opterećenju zdravstvenog sustava zemalja ističući potrebu za razvojem spojeva koji bi bili djelotvorniji lijekovi od trenutno odobrenih, a naročito lijekova koji bi bili učinkoviti u kasnijim stadijima bolesti i/ili djelotvorni na više potencijalnih uzročnika bolesti.

Glavni cilj ove doktorske disertacije je pronalazak biskarbamata koji ima/ju potencijal za primjenu u tretmanu AB kao selektivni inhibitori BChE, što bi bilo njihovo primarno djelovanje, i koji bi mogli dodatno djelovati kao kelatori biometala uključenih u patogenezu AB. Također, cilj disertacije je i postaviti smjernice za daljnje poboljšanje strukture biskarbamata u smislu povećanja selektivnosti prema BChE, za regulaciju mogućnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i toksičnosti prema živčanim stanicama, stanicama jetre i bubrega. U tu svrhu dizajnirano je i sintetizirano nekoliko serija različitih biskarbamata s različitim supstituentima na karbamatnom i 1-hidroksi-2-aminoetilnom dijelu molekule, definiran je njihov inhibicijski učinak i selektivnost prema humanim kolinesterazama, procijenjena je sposobnost prolaska spojeva kroz krvno-moždanu barijeru i njihova kelatacijska sposobnost, određena je njihova citotoksičnost te je definiran utjecaj polimorfizma BChE na inhibicijski potencijal odabranih biskarbamata.

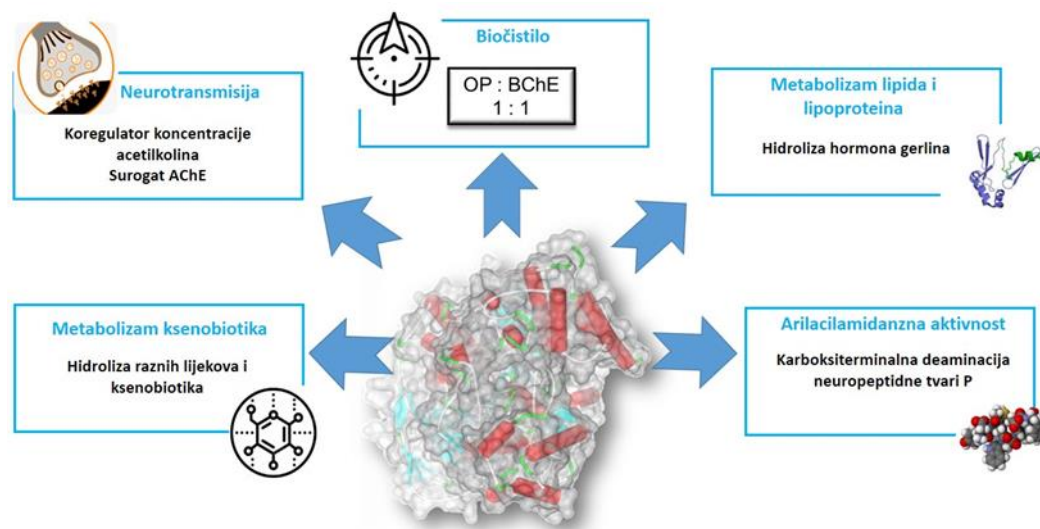
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Uloga i funkcija butirilkolinesteraze

Butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8) je serinska hidrolaza koja nema definiran fiziološki supstrat. ^[1-5] Može hidrolizirati različite prirodne i sintetske estere poput kolinskih i tiokolinskih estera (acetil(tio)kolin, propionil(tio)kolin, butiril(tio)kolin, benzoil(tio)kolin i dr.), neke neutralne (heroin, kokain, prokain i dr.) pa čak i neke negativno nabijene estere (aspirin). ^[5-8]

BChE je nazvana prema jednom od svojih supstrata – butirilkolinu. U literaturi se zbog svoje nedefinirane fiziološke uloge često naziva i pseudokolinesterazom ili nespecifičnom kolinesterazom, a kako je najveća koncentracija BChE u organizmu u serumu, i serumskom kolinesterazom. ^[1] U ljudi, BChE se sintetizira u jetri, a osim u jetri nalazi se i u mozgu, srcu, plućima, gušterači, crijevima, bubrezima i serumu. ^[2, 5] Prosječna koncentracija BChE u ljudskoj plazmi je u rasponu od 3,5 – 9,3 mg/L. ^[2]

Iako nema definiranu fiziološka ulogu, BChE je uključena u velik broj bioloških procesa u organizmu. ^[1, 5] BChE je tako uključena u ko-regulaciju koncentracije prijenosnika živčanih impulsa acetilkolina (ACh) u sinapsama središnjeg živčanog sustava (eng. *central nervous system*, CNS) i glatkih mišića. U slučaju inhibicije esencijalne acetilkolinesteraze (AChE), BChE djelomično preuzima njezinu funkciju reguliranja koncentracije ACh u mozgu (**Slika 2.1.**). ^[5-9] U krvi BChE djeluje kao bio-čistilo koje štiti esencijalnu AChE od inhibicije organofosforim i karbamatnim pesticidima te organofosforim živčanim bojnim otrovima. ^[1, 3] BChE djeluje na način da navedene spojeve veže i tako snizi koncentraciju molekula slobodnih za vezanje na AChE. Stoga se danas sve više istražuje upotreba BChE kao biološkog čistila koje se može primijeniti u prevenciji i zaštiti od izloženosti toksičnim antikolinesteraznim spojevima. ^[10, 11]

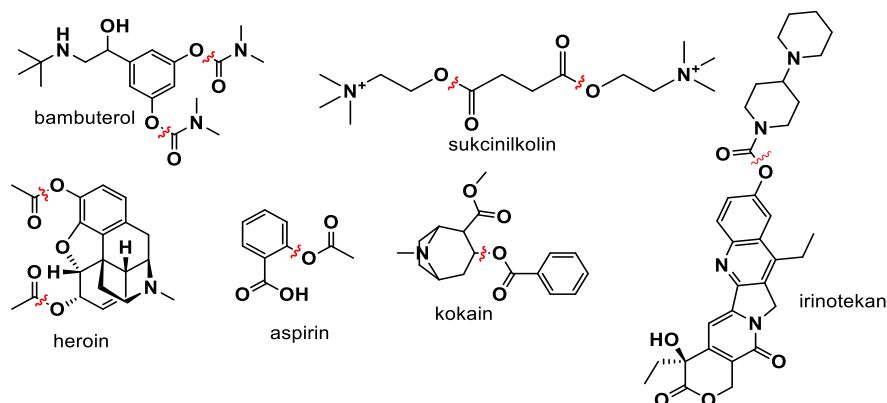


Slika 2.1. Poznate funkcije BChE u organizmu

Uloga BChE u metabolizmu lipida i lipoproteina još uvijek nije u potpunosti razjašnjena te se posljednjih godina intenzivnije istražuje. Tako je zabilježena povećana aktivnosti BChE u serumu kod pretelih osoba i osoba oboljelih od hiperlipidemije i dijabetesa u usporedbi sa zdravim osobama. Kako je pokazano da uslijed inhibicije BChE tetraizopropil pirofosforamidom (Iso-OMPA) dolazi do smanjenja koncentracije triglicerida kod štakora, zamoraca i ljudi, pojava dijabetesa povezuje se s porastom koncentracije triglicerida i porastom aktivnosti BChE u serumu. ^[49-51] Međutim, dokazano je također kako BChE sudjeluje u regulaciji metabolizma masti hidrolizom grelina, hormona koji potiče apetit, u njegove neaktivne oblike, desacil-peptid i oktansku kiselinu. ^[52]

Nadalje, BChE sudjeluje u biokonverziji i metabolizmu različitih lijekova i ksenobiotika na način da ih aktivira ili deaktivira. Primjer aktivacije je hidroliza prolijeka bambuterola u njegov aktivni oblik, bronhodilatator terbutalin ^[53] i heroina u njegov aktivni oblik morfij. ^[54] Također, BChE sudjeluje u hidrolizi prolijeka irinotekana u antitumorski lijek SN-38 ^[55], sukcinilkolin hidrolizira u sukcinat i kolin ^[56], a aspirina u 2-hidroksibenzojevu kiselinu i octenu kiselinu (Slika 2.2.). Primjer deaktivacije je hidroliza kokaina u netoksične metabolite ekgonin metil ester i benzojevu kiselinu zbog čega se vjeruje kako bi mutanti BChE s poboljšanom hidrolitičkom aktivnošću mogli biti terapijski korisni za liječenje trovanja kokainom i ovisnosti o kokainu. Dva mutanta ljudske BChE, CocH1 i CocH3, pokazala su 1000, odnosno

2000 puta bržu hidrolizu kokaina od BChE divljeg tipa. ^[11] Međutim, nedostatak primjene mutanata BChE je njihovo vrlo kratko vrijeme poluživota što je usmjerilo istraživanja ka modifikaciji tog enzima sa ciljem produljenja vremena poluživota. ^[11]



Slika 2.2. Strukturne formule nekih lijekova koje BChE hidrolizira. Crvena valovita linija označava vezu koja se hidrolizira.

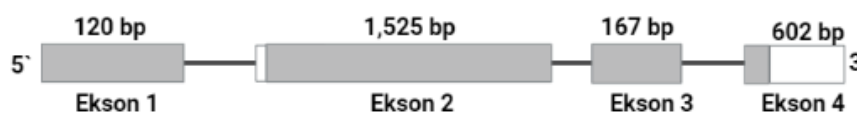
BChE pokazuje i arilacilamidaznu aktivnost hidrolizirajući *o*-nitroacetanilid u *o*-nitroanilin i acetat, čija uloga u organizmu za sada nije razjašnjena. ^[57] Pretpostavlja se kako je arilacilamidazna aktivnost BChE povezana s njezinom ulogom u neurogenezi, gdje sudjeluje u razgradnji neuropeptidne tvari P. Naime, pokazano je kako BChE sudjeluje u karboksiterminalnoj deaminaciji neuropeptidne tvari P inicirajući njezin metabolizam. ^[57, 58] Arilacilamidazna aktivnost BChE povezuje se i sa sazrijevanjem β -amiloidnih plakova u mozgu pacijenata s AB. ^[59, 60] No, ova uloga BChE do sada nije potvrđena i razjašnjena. Naime, dosadašnjim istraživanjima baziranim na histokemijskoj analizi moždanog tkiva miša s AB potvrđena je samo prisutnost BChE u β -amiloidnim ($A\beta$) plakovima te se njezina točna uloga još istražuje. ^[5, 61]

BChE se pripisuje i uloga u razvoju živčanog sustava koja do danas nije u potpunosti razjašnjena te se pretpostavlja kako BChE koja se u mozgu nalazi u glija stanicama i bijeloj tvari sudjeluje u proliferaciji i diferencijaciji živčanog tkiva. ^[5, 62] Naime, BChE se eksprimira u ranom embrionalnom razvoju sisavaca gdje je zamijećena u aksonima, živčanim završecima, konusima rasta i stanicama koje okružuju aksone, što ukazuje na moguću ulogu ovog enzima u rastu aksona. ^[5, 62] Također, tijekom razvoja živčanog sustava, aktivnost BChE je prisutna u gotovo svim neuronima mozga i visokoj koncentraciji u kuboidnim stanicama ventrikula. ^[5, 62]

Takva prolazna ekspresija u velikoj populaciji neurona i ne-živčanih stanica protumačena je kao dokaz uloge ovog enzima u razvoju živčanog sustava kroz njegovu enzimsku aktivnost, kao i kroz njegovu sposobnost reguliranja drugih proteina. [5]

2.1.1. Struktura BChE

Sekvenciranje gena ljudske BChE potvrdilo je postojanje samo jednog autosomnog BCHE gena koji se sastoji od četiri eksona (E1-E4) i tri introna smještenih na ljudskom kromosomu 3, na položaju 3q26.1–q26.2 (Slika 2.3.). [3, 63]



Slika 2.3. Struktura gena kojim je kodirana ljudska BChE. Gen zauzima 70 kb na kromosomu 3 i sastoji se od četiri eksona (E1-E4) te od tri introna. Sivo su označene protein-kodirajuće regije.

Ljudska BChE je u organizmu prisutna u četiri molekularna oblika: G1 (monomer); G1-ALB (monomer vezan s albuminom); G2 (dimer) i G4 (tetramer). [3, 64] Najzastupljeniji je oblik G4 koji se nalazi u plazmi, odnosno serumu [3, 16] i predstavlja oblik topivog globularnog tetramera koji se sastoji od četiri identične podjedinice organizirane kao dimer dimera, pri čemu se svaki dimer sastoji od dva monomera povezana disulfidnom vezom. [65] Tetramerna G4 BChE može biti vezana na membrane tzv. proteinskim sidrom bogatim prolinom (PRiMA, eng. *proline-rich membrane anchor protein*), koje je također uključeno i u oligomerizaciju pojedinih katalitičkih podjedinica. [5]

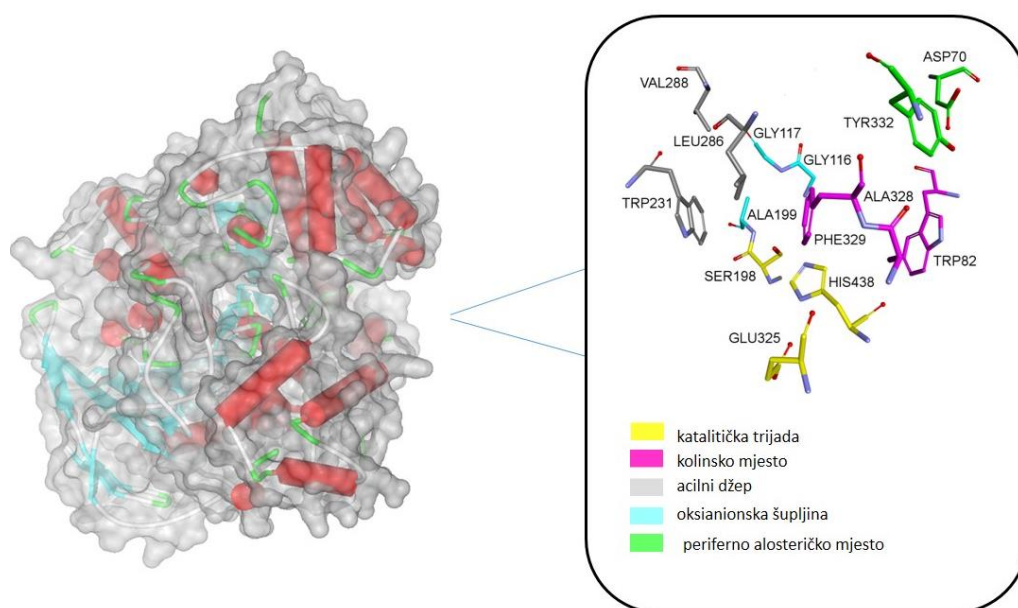
Također, postoji i G4 ColQ oblik BChE s kolagenskim repom koja se sastoji od tri tetramera pričvršćena na membrane putem kolagenskog sidra. [5] Na plazmatskim membranama mišićnih stanica, eritrocita i limfocita najzastupljenija je dimerna forma koja je glikofosfatidilinozitolnim (GPI) sidrom vezana na membranu. Monomerne i dimerne forme zastupljene su uglavnom u mozgu, mišićima i crijevima, dok se ColQ i PRiMA forme G4 nalaze u centralnom živčanom sustavu i neuromuskularnim vezama. [5, 16]

BChE je visoko *N*-glikozilirani protein kod kojega čak do 30 % ukupne mase enzima otpada na vezane ugljikohidrate. ^[65] Kompleksni ugljikohidrati su kovalentno vezani na devet aminokiselinskih ostataka asparagina. Tako veliki broj kompleksnih ugljikohidrata predstavljao je problem pri rješavanju kristalne strukture BChE koja je objavljena 2003. godine nakon što su uvedene višestruke mutacije asparagina u glutamin kako bi se uklonila mjesta za glikozilaciju. ^[5, 6] Glikozilacija ima ulogu u smatanju, izlučivanju i stabilnosti BChE ^[3, 63]; smatra se da visoki stupanj glikozilacije omogućava dugotrajnu stabilnost BChE u plazmi, tj. cirkulaciji krvi, gdje je njezina aktivnost i najizraženija. ^[1-3]

Naime, pokazano je kako u slučaju pohrane plazme na 4, 22 ili -20 °C aktivnost BChE ostaje nepromijenjena kroz najmanje 8 dana. ^[66] Skladištenjem plazme na sobnoj temperaturi tijekom 21 dana, aktivnost BChE pada za oko 60 % početne aktivnosti, dok plazma pohranjena u hladnjaku na 4 °C ili smrznuta na -20 °C zadržava preko 90 % svoje početne aktivnosti tijekom 50 dana. ^[2, 67]

2.1.1.1. Aktivno mjesto BChE

BChE čini 12 β -naboranih ploča i 14 α -uzvojnica zbog čega se može klasificirati kao hidrolaza α/β strukture (**Slika 2.4.**). [1, 68-69]



Slika 2.4. Kristalna struktura ljudske butirilkolinesteraze (lijevo) [6]. Crvenom bojom označene su α -uzvojnice, plavom β -nabrane ploče, zelenom bojom petlje, a sivom površina enzima dostupna vodi. Aktivno mjesto ljudske BChE (desno) [PDB: 1POI]

Aktivno mjesto BChE ima oblik 20 Å dugačkog i oko 5 Å širokog ždrijela (**Slika 2.4.**). Pomoću kristalografije, mutageneze i specifičnog vezanja liganada identificirane su četiri strukturne domene koje čine aktivno mjesto BChE: katalitičko mjesto koje čini katalitička trijada s oksianionskom šupljinom, kolinsko mjesto važno za stabilizaciju pozitivno nabijenoga kvaternog dijela kolinskih supstrata i acilni džep odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata. Aminokiselinama aspartatu 70 i tirozinu 332, smještenima na rubu ždrijela, pripisana je uloga perifernog mjesta enzima po analogiji sa strukturom AChE. [6]

Katalitička trijada nalazi se na dnu ždrijela, a čine ju aminokiseline serin 198 (Ser198), histidin 438 (His438) i glutamat 325 (Glu325) koje su uključene u katalizu. Aktivni Ser198 je nukleofilniji od ostalih serina u enzimu za što je zaslužna mreža vodikovih veza koja se formira između $O\gamma$ protona Ser198 i slobodnog elektronskog para atoma dušika imidazolskog prstena His438. Mrežu vodikovih atoma čini i Glu325 vodikovom vezom između svoje karbonilne

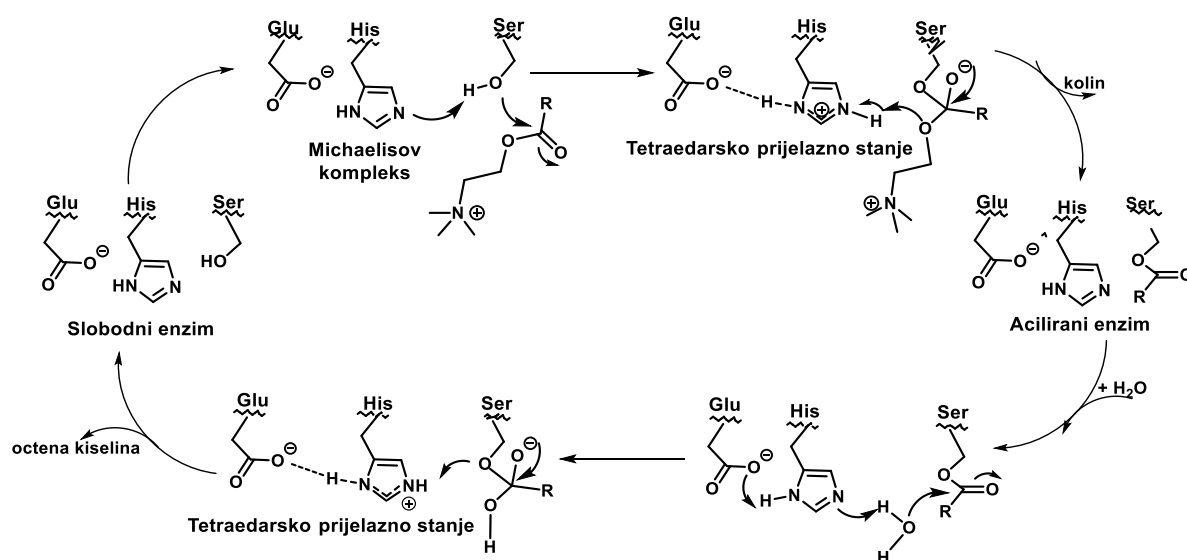
skupine i slobodnog para elektrona na atomu dušika imidazolnog prstena His438. Prilikom stvaranja tetraedarskog prijelaznog stanja, karbonilni atom kisika supstrata stabilizira se vodikovim vezama s glicinom 116 (Gly116), glicinom 117 (Gly117) i alaninom 199 (Ala199), aminokiselinama koje čine oksianionsku šupljinu enzima. Uloga Glu325, smještenog tik do aktivnog Ser198, je stabiliziranje prijelaznih stanja tijekom katalize što se ostvaruje elektrostatskim interakcijama s protoniranim katalitičkim histidinom. ^[1, 6]

Kolinsko mjesto enzima čine ogranci aminokiselina triptofana 82 (Trp82), alanina 328 (Ala328) i fenilalanina 329 (Phe329) koji su direktno uključeni u interakciju s ligandom i koji omogućuju nastajanje interakcija kation- π tipa. Trp82 orijentira supstrat/ligand pri ulazu u ždrijelo i omogućava smještanje nabijenog dijela molekule u kolinsko mjesta enzima što omogućava brzu hidrolizu kolinskih supstrata. Kolinsko mjesto BChE nije specifično za pozitivno nabijene ligande, već može smjestiti i neutralne, pa čak i neke negativne nabijene ligande (aspirin).

Acilni džep omogućava smještanje acilne skupine supstrata, određujući time njegovu orijentaciju prema reaktivnom serinu i ostatku enzima. U acilnome džepu ljudske BChE prisutne su alifatske aminokiseline leucin 286 (Leu286) i valin 288 (Val288) koje svojim dimenzijama omogućavaju smještanje širokog spektra supstrata i inhibitora. ^[1, 2, 11]

Kod ljudske BChE, tri aromatske aminokiseline koje izgrađuju periferno mjesto AChE nedostaju te je uloga perifernog mjesta dodijeljena aminokiselinama aspartat 70 (Asp70) i tirozin 332 (Tyr332) smještenima na ulazu u ždrijelo. ^[1]

Hidroliza supstrata potpomognuta BChE analogna je mehanizmu hidrolize ACh potpomognutog AChE. Mehanizam uključuje nastajanje Michaelisovog kompleksa, aciliranje enzima i njegovu spontanu deacilaciju vodom (**Shema 2.1.**). U prvom koraku, pod utjecajem Glu326, His438 djeluje kao baza koja privlači proton s hidroksilne skupine Ser198 te ga tako čini nukleofilnijim od ostalih serina u molekuli. Nukleofilni atom kisika Ser198 reagira s karbonilnim ugljikovim atomom ACh čime nastaje tetraedarsko prijelazno stanje. Nakon toga se kolin odcjepljuje, a serin ostaje acetiliran (acilirani enzim). Voda, koja pod utjecajem His438 postaje nukleofinija od ostalih molekula vode u aktivnom mjestu enzima, reagira s karbonilnim atomom ugljika aciliranog enzima što dovodi do nastajanja novog tetraedarskog prijelaznog stanja te u konačnici do otpuštanja octene kiseline i deaciliranja enzima. ^[9, 70]



Shema 2.1. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi acetilkolina

2.1.2. Polimorfizam ljudske butirilkolinesteraze

BChE je visoko polimorfni enzim. Do danas je opisano oko 75 prirodnih mutacija BChE koje uključuju promjene samo jednog nukleotida ili deleciju/inserciju većeg broja nukleotida. [2, 69, 71, 72] Mutacije mogu utjecati na katalitičku aktivnost BChE ili na njezinu koncentraciju u tijelu. Neke od inačica BChE i njihove mutacije navedene su u **Tablici 2.1.** [1, 11, 69] Genotipove butirilkolinesteraze: UU, UA, AA/AS i FF/FS moguće je jasno odrediti na temelju njihove različite aktivnosti prema supstratima, kao i različite inhibicije sa specifičnim inhibitorima. [2, 71, 73, 74]

Tablica 2.1. Neke prirodne inačice ljudske butirilkolinesteraze ^[2, 69]

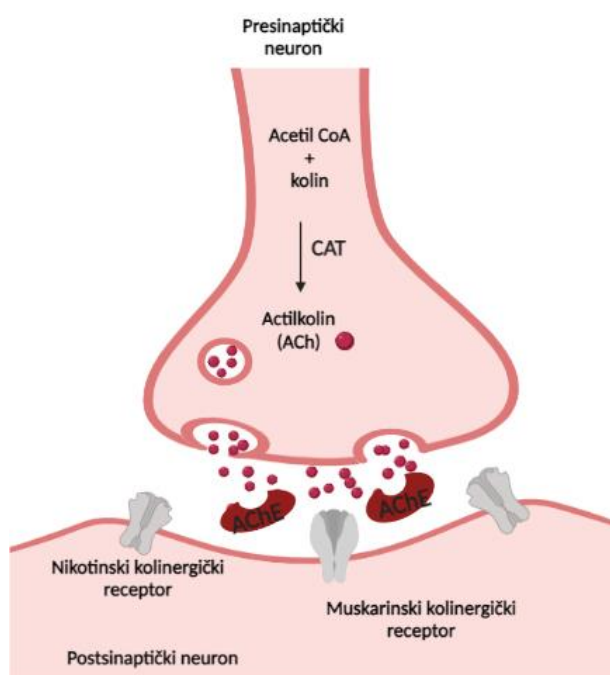
BChE inačica	Oznaka	Promjena u proteinskoj sekvenci	Karakteristike
Fluoridna-1	F	Thr243→Met	Slaba inhibicija dibukainom i fluoridnim ionom
Fluoridna-2	F	Gly390→Val	Slaba inhibicija fluoridnim ionom
Tiha-1	S	Gly117 → pomak okvira čitanja	Aktivnost manja od 10 % aktivnosti U
Tiha-2	S	Ile6→pomak okvira čitanja	30 % niža koncentracija u odnosu U
Tiha-3	S	Tyr500→stop	
Tiha-4	S	Thr24→Met	Aktivnost manja od 10 % aktivnosti U
Tiha-5	S	Phe28→Ile	–
Tiha-6	S	Tyr33→Cys	–
Tiha-7	S	Ala34→Val	–
Tiha-8	S	Pro37→Ser	–
Tiha-9	S	Glu90→Asp	–
Tiha-10	S	Asn96→Tyr	–
Kalow	K	Ala539→Thr	–
James	J	Glu497→Val Ala539→Thr	70 % niža koncentracija u odnosu U
Hammersmith	H	Val142→Met	90 % niža koncentracija u odnosu U
Cynthiana		nepoznata	180-300 % veća aktivnost od U
Johannesburg		nije u kodirajućoj regiji	180 % veća aktivnost od U
C5+		nepoznata	dodatna vrpca u poliakrilamidnom gelu
Atipična	A	Asp70→Gly	sporija hidroliza

Homozigoti uobičajene BChE (UU) čine oko 74 % ljudske populacije, dok ostatak otpada na nositelje najmanje jednog alela za neku od inačica BChE. Mutacija nađena na K-alelu je najčešća mutacija BChE u europskoj, američkoj i japanskoj populaciji te je svaka četvrta osoba nositelj ove mutacije. ^[75] Kod Amerikanaca i Europljana najveću frekvenciju pojavljivanja, osim homozigota UU, ima heterozigot UK koji se pojavljuje kod svake pete osobe, dok se homozigot KK pojavljuje kod svake 69. osobe. ^[69] Upravo se K-inačica BChE u kombinaciji s mutacijom apolipoproteina E tipa 4 (ApoE ε4) povezuje s povećanim rizikom razvoja Alzheimerove bolesti. ^[76-78]

Brojčano najbrojniju skupinu BChE inačica s 54 identificirane inačice čine tzv. tihе inačice (*eng. silent*), koje karakterizira smanjena aktivnost (do maksimalno 30 % aktivnosti uobičajene BChE) ili čak potpuna odsutnost aktivnosti BChE (**Tablica 2.1.**). Kvantitativne inačice BChE predstavljaju inačice s nižim koncentracijama BChE u serumu. Kalow-a, James-ova i Hammersmith-ova inačica prisutne su u 30 %, 70 % i 90 % nižim koncentracijama od koncentracije uobičajene BChE. Homozigoti neke od tihih inačica BChE ili neke od kvantitativnih inačica s nižom koncentracijom BChE nemaju za život opasnih posljedica. ^[1, 2, 71] Međutim, takve osobe su osjetljivije na inhibicijsko djelovanje organofosfornih spojeva, a s obzirom da BChE sudjeluje u metabolizmu velikog broja lijekova i ksenobiotika njihove doze se moraju prilagoditi ili je potrebno takve spojeve u potpunosti isključiti iz upotrebe. Neke varijante pokazuju i do tri puta veću aktivnost od uobičajene BChE, kao npr. Cynthiana, Johannesburg i C5+. Klinički najzanimljivija inačica BChE je atipična BChE. Prema podacima američkog Nacionalnog centra za biotehnologiju, 1 od 25 osoba je heterozigot ove inačice, dok je 1 od 2050 osoba homozigot. ^[69] Homozigoti atipične BChE su iznimno osjetljivi na mišićne relaksanse sukcinildikolin i mivakurijum, a u slučaju njihove primjene mogu doživjeti dugotrajnu apneju, pa čak i smrt. ^[1, 2, 11] Naime, kod osoba koje su homozigoti atipične BChE hidroliza sukcinilkolina u cirkulaciji je vrlo spora pa primjenom uobičajene doze sukcinilkolina dolazi do predoziranja jer se sukcinilkolin veže na acetilkolinski receptor i blokira prijenos impulsa između živca i mišića.

2.1.3. Acetilkinesteraza

Acetilkinesteraza (AChE; E.C.3.1.1.7) je esencijalna kolinesteraza odgovorna za izrazito brzu i učinkovitu hidrolizu ACh (**Slika 2.5.**) i jedan je od najučinkovitijih enzima u prirodi zaslužan za iznimno brz prijenos živčanih impulsa. ^[15, 79] AChE se sintetizira u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a osim u živčanim stanicama, mišićima i mozgu, AChE se nalazi još i u srcu i krvi gdje je vezana za eritrocite. Uloga AChE vezane za eritrocite za sada nije razjašnjena. Osim katalitičke uloge, AChE potpomaže nastajanje neurita, a njena se uloga u nastajanju krvnih stanica i trombocita povezuje s povećanim rizikom od leukemije kod osoba izloženih djelovanju pesticida. ^[15, 79]



Slika 2.5. Shematski prikaz prijenosa živčanog impulsa. Acetilkinolin (ACh) se sintetizira iz acetil-CoA i kolina, djelovanjem kolin-acetiltransferaze (CAT) te se nalazi u vezikulama presinaptičkog neurona. Dolazak živčanog impulsa uzrokuje otpuštanje ACh u sinaptičku pukotinu gdje se veže na nikotinske ili muskarinske kolinergičke receptore. Vežanje ACh za receptore uzrokuje depolarizaciju postsinaptičke membrane koja se širi uzduž električki podražljive membrane druge stanice nakon čega AChE hidrolizira ACh čime se ponovno uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane.

Ljudska AChE je kodirana ACHE genom na kromosomu 7, a kao posljedica alternativnog prekrajanja primarnog transkripta (engl. *alternative splicing*), AChE se javlja u tri različite varijante koje imaju različite funkcije T, H i R.^[15, 80, 81] Amfipatska izoforma AChE-T (engl. *tail*) prisutna je u mozgu i mišićnom tkivu u obliku tetramera kojeg čine dvije dimerne podjedinice međusobno povezane hidrofobnim interakcijama, a svaki dimer izgrađen je od dvije monomerne podjedinice međusobno povezane disulfidnim vezama.^[80] Tetramer AChE-T je pomoću prolina koji se nalazi na kraju kolagenskog vlakna (Co1Q) ili PRiMA proteina (engl. *proline-rich membrane anchor protein*) vezan na postsinaptičke membrane živčanih odnosno mišićnih stanica.^[80] AChE-H je hidrofobna, dimerna izoforma AChE koja se nalazi u eritrocitima vezana za membranu. Uloga ove izoforme AChE do danas nije razjašnjena, ali se pokazalo kako je aktivnost ove izoforme izolirane iz eritrocita pouzdan pokazatelj aktivnosti AChE u sinapsi.^[80] Treća izoforma AChE-R (engl. *readthrough*) prisutna je u obliku topljivog monomera i lokalizirana je u sinaptičkoj pukotini ili u krvi.^[80-84] U normalnim uvjetima ova je izoforma prisutna u niskim koncentracijama, dok je u velikim količinama eksprimirana u stresnim stanjima u mozgu, mišićima i drugim organima.^[84] Na taj način, smatra se da AChE-R ima ulogu u obrani organizma i ublažavanju neželjenih posljedica izloženosti stresu ili drugim štetnim faktorima.^[80-84]

Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja ACh u sinaptičkoj pukotini i prekomjerne stimulacije nikotinskih (nAChR) i muskarinskih acetilkolinskih receptora (mAChR) što posljedično dovodi do nakupljanja ACh i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa (desenzibilizacija receptora). Skup simptoma trovanja koji se pritom javljaju naziva se kolinergičkom krizom i uključuje poremećaj vida, tremor, pojačanu salivaciju, a u težim slučajevima dolazi do napadaja, zatajenja disanja i smrti.

2.1.4. Sličnost BChE i AChE

BChE i AChE su dva strukturno homologna enzima koji dijele oko 65 % homologije u primarnoj sekvenci i 90 % homologije u terciarnoj strukturi. ^[15] Aktivno mjesto AChE analogno je aktivnom mjestu BChE, a čini ga 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo. Aktivno mjesto čine četiri domene: katalitičko mjesto (katalitička trijada s oksianionskom šupljinom), kolinsko mjesto, acilni džep i periferno mjesto koje je smješteno na rubu ždrijela. ^[6] Iako dijele visok postotak homologije, zbog različitog sastava aminokiselina unutar aktivnog mjesta, BChE i AChE se razlikuju u katalitičkoj aktivnosti i specifičnosti vezanja supstrata, a njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati. Acilni džep aktivnog mjesta ljudske AChE definiraju fenilalanin 295 (Phe295) i fenilalanin 297 (Phe297) ograničavajući smještanje supstrata većih od propionilkolina, zbog čega je AChE visoko selektivan enzim. Periferno mjesto ljudske AChE čine aminokiselinski ogranci tirozina 72 i 124 (Tyr72 i Tyr124) i triptofana 286 (Trp 286) važni za pojavu alosteričkog mehanizma inhibicije AChE pri visokim koncentracijama ACh. ^[83] Za razliku od AChE, BChE ne pokazuje inhibiciju supstratom pri visokim koncentracijama ACh što je vidljivo iz krivulje ovisnosti aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata ACh (pS krivulja). ^[84-85]

Dok inhibicija AChE ima posljedice opasne za život, inhibicija BChE istim spojem ne utječe na vitalne funkcije organizma. Jedni od najpoznatijih i najopasnijih inhibitora AChE su organofosfati (OP). Mehanizam toksičnog djelovanja OP spojeva je ireverzibilna inhibicija AChE. Uslijed inhibicije aktivnosti AChE OP spojem, BChE u krvnoj plazmi kovalentnim vezanjem OP spojeva djeluje kao stehiometrijsko biočistilo za OP prije nego što prođu krvno-moždanu barijeru te inhibiraju AChE. ^[3, 11]

Kolinesteraze, prvenstveno AChE, su najčešća meta u tretmanu neurodegenerativnih bolesti u čijoj etiologiji je smanjena koncentracija ACh kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest te miastenija gravis. ^[1, 5]

2.2. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna neurodegenerativna bolest koju karakterizira propadanje sinapsi i neurona kortikalnih i subkortikalnih regija mozga te narušavanje funkcije sustavâ prijenosnika živčanih impulsa. [86, 87] Radi se o najrasprostranjenijoj i najčešćoj neurodegenerativnoj bolesti koja, prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije [48] trenutno pogađa više od 50 milijuna ljudi, a vjeruje se kako će se ta brojka do 2030. godine udvostručiti. [48] Propadanje sinapsi i neurona posljedično izaziva narušavanje kognitivnih funkcija, gubitak pamćenja te promjene ponašanja što se manifestira kroz niz simptoma koji se vezuju uz AB (**Slika 2.6.**). [88] Simptomi bolesti su različiti (**Slika 2.6.**), a njihova pojavnost i intenzitet variraju od osobe do osobe. Najuočljiviji simptom AB je demencija (**Slika 2.6.**) koja se javlja tijekom napredovanja AB i koja predstavlja najučestaliji oblik demencije prisutan u oko 60 % svih slučajeva demencije. [48]



Slika 2.6. Simptomi Alzheimerove bolesti

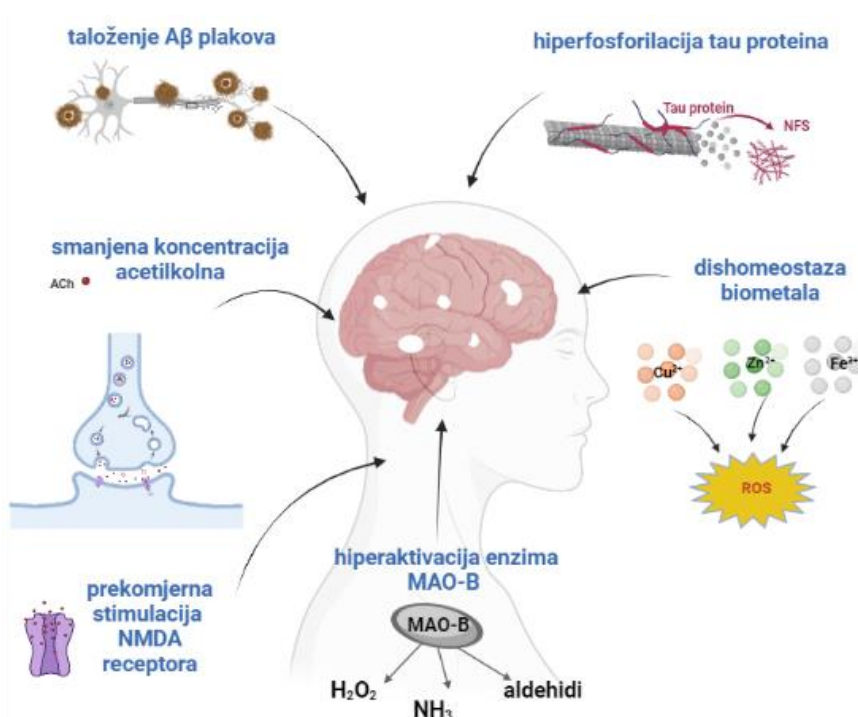
Napredovanjem bolesti simptomi mogu doseći stadij u kojem oboljeli nisu u stanju obavljati svakodnevne aktivnosti (**Slika 2.6.**).

Uzrok AB nije poznat, ali je starenje najznačajniji rizični faktor za razvoj bolesti, a brojne studije pokazuju i niz drugih rizičnih čimbenika kao što su smanjena mentalna i fizička

aktivnost tijekom života, ozljede glave, kardiovaskularne bolesti, pretilost, pušenje i dijabetes. [89, 90]

2.2.1. Patofiziologija Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest (AB) je složena multifaktorijalna bolest koju karakterizira više patofizioloških čimbenika (**Slika 2.7.**) uz koje se vezuju različite hipoteze o nastanku i uzročnicima Alzheimerove bolesti.



Slika 2.7. Shematski prikaz patofiziološki faktora koji utječu na razvoj AB

Jedno od patoloških obilježja AB je smanjenje koncentracije kemijskog neurotransmitera ACh. [91-94] ACh sudjeluje u neurotransmisiji kolinergičkih neurona te ima iznimno važnu ulogu u održavanju funkcionalnosti kolinergičkog sustava. [95] Uz smanjenje koncentracije ACh vezuje se **kolinergička hipoteza** kao najstarija hipoteza o nastanku AB koja sugerira kako su disfunkcija i degeneracija kolinergičkih neurona posljedica poremećaja u sintezi ACh. Smanjena koncentracija ACh ima za posljedicu narušavanje kolinergičke neurotransmisije što dovodi do poremećaja kognitivnih sposobnosti kao što su pamćenje, učenje, pažnja i dr. Potvrda

ove hipoteze je potvrđena uloga ACh u procesima pamćenja ^[96-99] i pozitivna korelacija između stupnja kognitivnih poremećaja i smanjenja koncentracije ACh. ^[96, 100]

Drugo patofiziološko obilježje AB je taloženje amiloidnih β -peptida izvan neurona u obliku A β -plakova. A β je protein koji nastaje cijepanjem amiloidnog prekursorskog proteina (APP, eng. *amyloid precursor protein*) djelovanjem γ - i β - sekretaze. β -amiloidni plakovi mogu doprinijeti staničnoj smrti ometajući komunikaciju između neurona u sinapsama, mogu agregirati u oligomere i/ili velike A β plakove pokrećući neurodegenerativnu kaskadu koja uključuje neuroinflamaciju i oksidacijski stres što u konačnici dovodi do smrti neurona i kognitivnih disfunkcija. ^[91, 101, 102] Prema **amiloidnoj hipotezi** progresivna sinteza i taloženje amiloidnih β -peptida izvan neurona glavni su uzrok nastanka AB. ^[91, 93, 96, 102]

Također, kod osoba oboljelih od AB dolazi i do hiperfosforilacije tau proteina. Uloga tau proteina je održavanje stabilnosti mikrotubula u aksonima omogućavajući tako normalan prijenos tvari unutar stanice, a sudjeluje i u staničnim i unutarstaničnim gibanjima kao i u upravljanju rasporedom staničnih tjelešaca, određivanje oblika i polarnosti stanice te u diobi eukariotskih stanica. **Tau hipoteza** o nastanku AB pretpostavlja kako pojavom hiperfosforilacije tau proteina dolazi do odvajanja tau proteina od mikrotubula, degradacije mikrotubula i formiranja neurofibrilarnih snopova (NFS) tzv. petlji tau proteina uzrokujući blokadu transporta hranjivih tvari i drugih molekula unutar neurona što na kraju dovodi do oslabljene funkcije i aktivnosti sinapsa tj. smetnji u sinaptičkoj funkciji neurona. ^[91, 96, 100, 102] Potvrđena je korelacija između nastanka NFS i gubitka kognitivnih sposobnosti. ^[100, 102] Do danas nije znanstveno objašnjeno je li hiperfosforilacija uzrok ili posljedica AB budući da se petlje tau proteina javljaju i kod drugih bolesti.

Hipoteza oksidacijskog stresa bazira se na neuravnoteženom metabolizmu kisika pri čemu dolazi do nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) kao što su hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid i dr. te reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS). Slobodni radikali remete normalne redoks puteve u organizmu koji održavaju homeostazu organizma te na taj način oštećuju makromolekule. Mitohondrij sadrži mnoge redoks enzime i generira ROS-ove kao rezultat neuspješne oksidacijske fosforilacije. Mitohondrijska disfunkcija se javlja rano i ima važnu ulogu u patogenezi AB. ^[103] Također, uočeno je da u pojedinim dijelovima mozga osoba koje boluju od AB dolazi do povećanog nakupljanja metala Fe²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺ što dovodi do promjene homeostaze biometala.

Promjene u biodistribuciji metala u presinaptičkim i postsinaptičkim neuronima uzrokuju abnormalnu neurotransmisiju, utječu na aktivnosti enzima ovisnih o metalima i povećano izlučivanje amiloidnih β -peptida. Nadalje, metalni ioni s amiloidnim β -peptidima formiraju stabilne komplekse koji su toksičniji od $A\beta$ plakova, mogu generirati reaktivne kisikove vrste koji uzrokuju oksidacijski stres, peroksidaciju lipida i oštećenja proteina. [23, 24, 91, 104, 105] U središnjem živčanom sustavu željezo je uključeno u mnoge važne biološke procese u mozgu, kao što su transport kisika, proizvodnja mijelina i sinteza neurotransmitera. Poremećena distribucija Fe^{2+} u mozgu uzrokuje i ferroptozu, tj. reguliranu staničnu smrt uzrokovanu slobodnim radikalima nastalima putem Fentonove reakcije. Dolazi do peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina ovisne o željezu u fosfolipidima staničnih membrana te gubitka aktivnosti glutation-peroksidaze 4, što rezultira akumulacijom lipidnih reaktivnih kisikovih vrsta, što posljedično dovodi do smrti neurona. [106] Oko 80-90 % cinka u mozgu je vezano na vezujuće proteine, a ostatak cinka se nalazi unutar vezikula u sinapsama ekscitirajućih neurona. Vezikularni cink se otpušta iz sinapsi tek kada sinapsa dobije određeni signal te može regulirati aktivaciju različitih prijenosnika živčanih impulsa. Kada su neuroni oštećeni uslijed oksidacijskog stresa, vezani intracelularni cink se otpušta u citoplazmu i na taj način aktivira određene signalizacijske puteve koji uzrokuju još veću produkciju ROS-ova. [107]

Kronična neuropala je jedan od bitnih faktora u patofiziologiji AB te se povezuje s povećanjem broja aktiviranih mikroglija i astrocita, aktiviranih komplementarnih proteina, citokina i ROS-ova. [108, 109] Povišena razina proupalnih citokina u mozgu oboljelog od AB dovodi do smrti neurona. [109]

Kod osoba oboljelih od AB dolazi i do povećane stimulacije *N*-metil-D-aspartat (NMDA) receptora pri čemu je poremećen povratak nevezanih glutamata u presinaptički neuron, zbog čega dolazi do poremećaja u transportu Ca^{2+} iona što za posljedicu ima oštećenje sinapsi zbog nemogućnosti održavanja aksona i dendrita funkcionalnima.

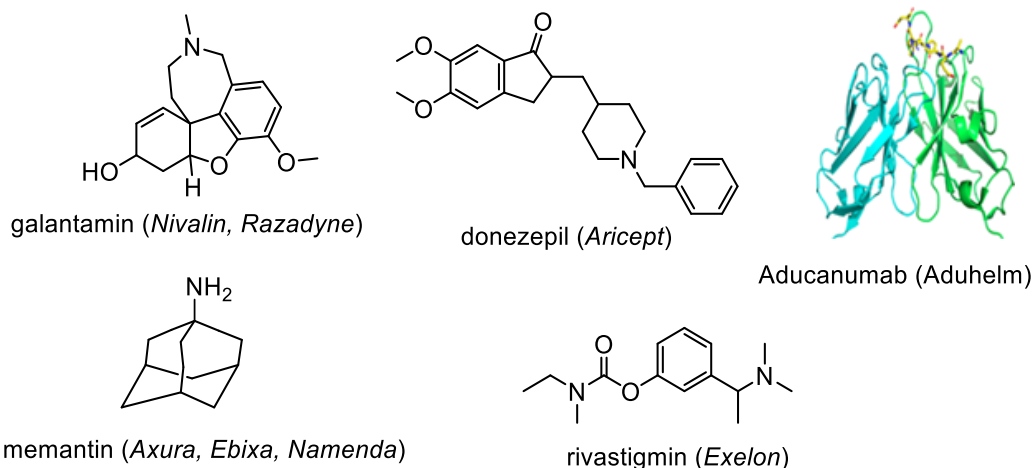
Za AB karakteristična je i povećana aktivnost enzima monoamin oksigenaze-B (MAO-B) zaduženog za oksidacijsku deaminaciju mnogih monoamina, pa tako i neurotransmitera (adrenalin i noradrenalin, dopamin, serotonin i mnogih egzogenih amina) čime se remeti metabolizam proizvodeći velike količine neurotoksičnih molekula poput H_2O_2 , aldehida i supstituiranih amina ili amonijaka. [110]

Složena patofiziologija AB ukazuje na potrebu dizajna novih molekula liganda koje istovremeno mogu djelovati na više meta odgovornih za nastanak i razvoj bolesti (engl. *multitarget-directed ligands*; MTDL). Istraživanja su pokazala kako hibridne molekule koje su dizajnirane na bazi postojećih kolinesteraznih inhibitora (galantamin, donezepil, takrin) imaju i neke dodatne aktivnosti ovisno o fragmentima unesenima u strukturu. Tako su, na primjer, dizajnirani hibridi koji djeluju kao inhibitori AChE, a istodobno djeluju i na NMDA receptore, monoamin oksidaze ili mogu djelovati na parametre oksidacijskog stresa. ^[111, 112]

2.2.2. Liječenje Alzheimerove bolesti

Liječenje AB je danas isključivo simptomatsko i utječe uglavnom na ublažavanje simptoma, a ne i na tijek, razvoj i konačan ishod bolesti. ^[91, 96] Temelji se uglavnom na povećavanju koncentracije ACh inhibicijom kolinesterazâ te su tri od pet lijekova ^[91, 96] koji se trenutno koriste za liječenje AB kolinesterazni inhibitori: galantamin, donepezil i karbamat rivastigmin koji se primjenjuju u liječenju blage, umjerene i teže AB, kao i blage do umjerene demencije kod Parkinsonove bolesti (**Slika 2.8.**). Alkaloid galantamin je selektivni, kompetitivni inhibitor AChE ^[113] koji djeluje i kao alosterički modulator nikotinskih kolinergičkih receptora te potencira kolinergičku nikotinsku transmisiju. Donepezil je piperidinski selektivni reverzibilni AChE inhibitor. ^[114] Karbamat rivastigmin je progresivni neselektivni inhibitor AChE i BChE ^[115, 116] koji djeluje u središnjem živčanom sustavu, a posebno je aktivan u korteksu i hipokampusu. ^[116]

Četvrti odobreni lijek za liječenje AB je memantin. ^[96] Memantin djeluje kao nekompetitivni antagonist NMDA receptora.

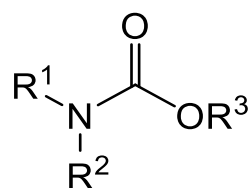


Slika 2.8. Strukturne formule lijekova koji se koriste u tretmanu Alzheimerove bolesti

U lipnju 2021. godine u SAD-u je po žurnom postupku odobren aducanumab (*Aduhelm*; **Slika 2.8.**), monoklono antitijelo koje ciljano djeluje na amiloidne plakove smanjujući njihovo nakupljanje. To je prvi lijek koji djeluje izravno na jedan od patofizioloških čimbenika AB. No, Europska agencija za lijekove (EMA) odbila je potpisati odobrenje za stavljanje lijeka u promet zbog nedostatka dokaza o njegovoj djelotvornosti i sigurnosti. ^[117]

2.3. Karbamati

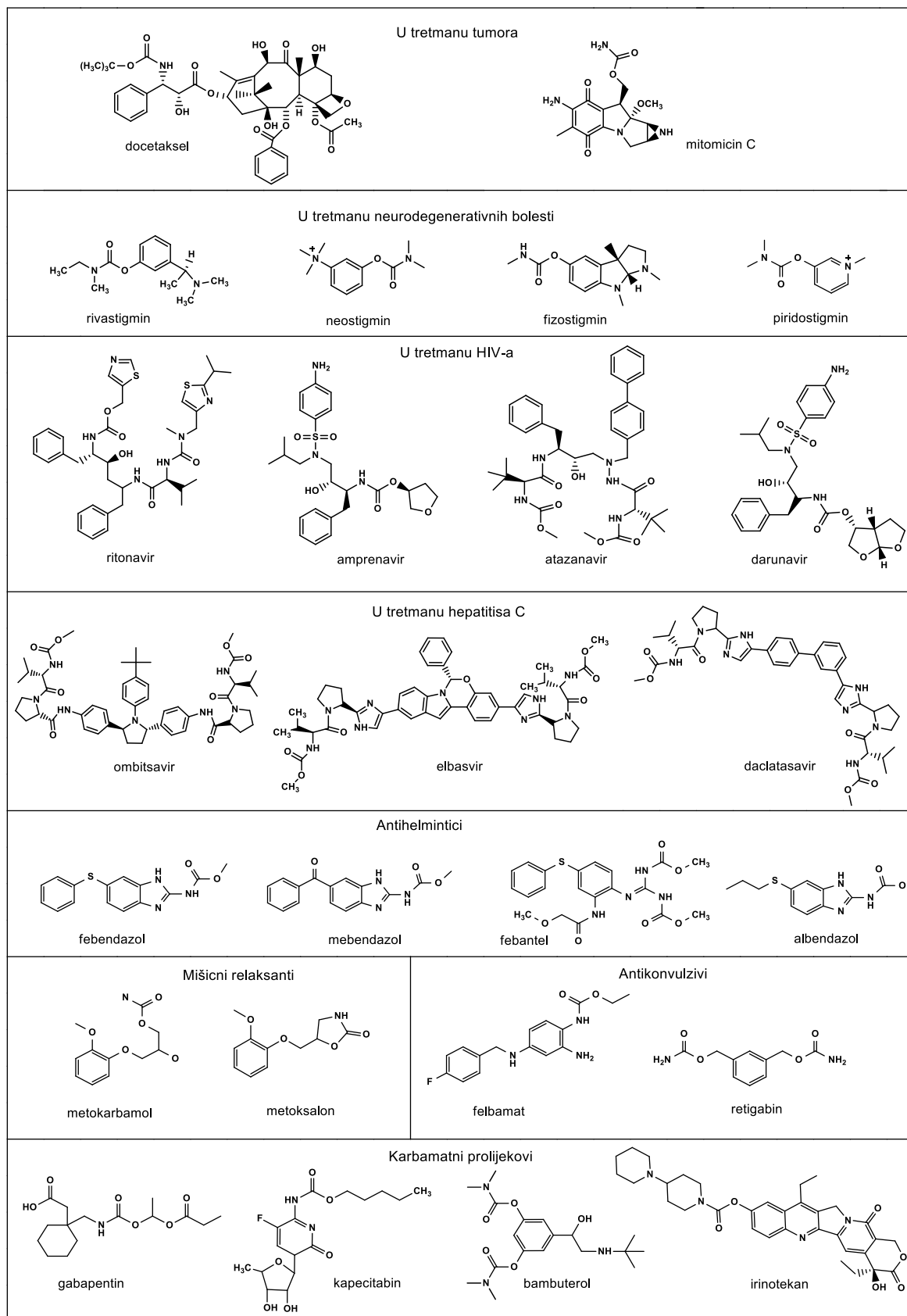
Karbamati su esteri karbaminske kiseline čija je općenita strukturna formula prikazana na **slici 2.9.** Karbamatnu skupinu čini karbonilna skupina (C=O) na koju su vezane alkoksilna skupina (OR³-skupina) i supstituirana amino-skupina (R¹NR²). R¹, R² i R³ mogu biti različite alkilne i arilne skupine te kombinacije alkilnih i arilnih skupina.



Slika 2.9. Općenita strukturna formula karbamata

Razvoj karbamatnih spojeva započeo je njihovom primjenom u poljoprivredi kao pesticida (karbamatni insekticidi, fungicidi i herbicidi). ^[118] Istraživanja i razvoj karbamata kao potencijalnih lijekova započela su otkrićem fizostigmina, metilkarbamatnog estera, koji je 1854. godine ekstrahiran iz sjemenki graha Kalabar (*Physostigma venenosum*). ^[118] Inicijalno, fizostigmin se koristio za liječenje glaukoma, dok se danas primjenjuje i u liječenju miastenije gravis.

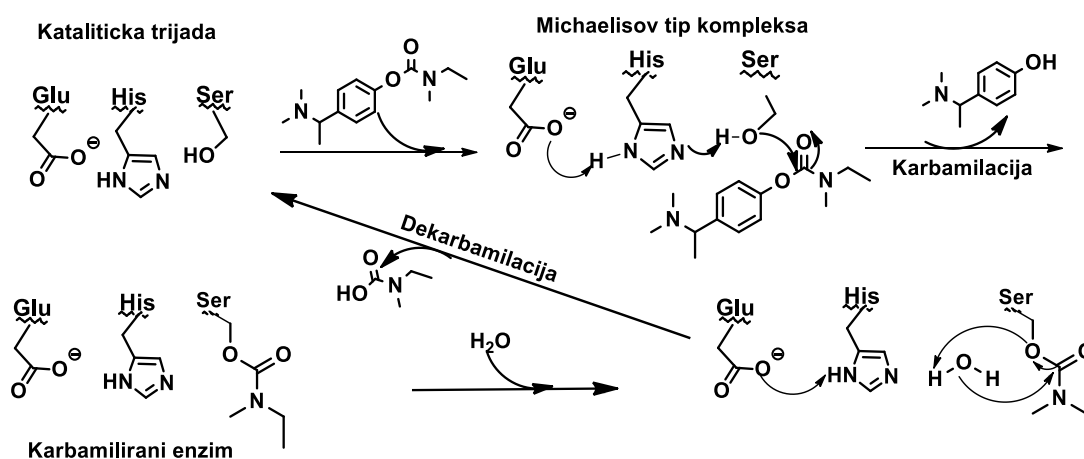
Kemijska svojstva, konformacijska i metabolička stabilnost, mogućnost prolaska kroz stanične membrane, a za pojedine karbamate i kroz krvno-moždanu barijeru, učinila su karbamatnu skupinu poželjnim dijelom strukture mnogih farmakološki važnih spojeva. U novije vrijeme karbamatna skupina postaje važan dio strukture mnogih lijekova odobrenih od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *United States Food and drug administration*, US FDA) te prolijeva pa su mnogi lijekovi posebno osmišljeni kako bi interakcija lijeka i mete išla upravo preko karbamatne skupine (**Slika 2.10.**). Novija su istraživanja pokazala kako spojevi iz skupine karbamata mogu imati antitumorsko, antibakterijsko, antifungalno, antimalarijsko, antivirusno, protuupalno, antikonvulzivno i antihelmitno djelovanje. ^[119, 120]



Slika 2.10. Karbamatna skupina kao dio strukture nekih lijekova

2.3.1. Karbamati kao inhibitori kolinesteraza u tretmanu neurodegenerativnih bolesti

Do danas je sintetiziran i testiran niz strukturno različitih karbamata za koje je dokazano da inhibiraju obje kolinesteraze, AChE i BChE. Mehanizam djelovanja karbamata na kolinesteraze (**Shema 2.2.**) sličan je mehanizmu djelovanja ACh na AChE, ali za razliku od izrazito brze hidrolize acetilkolina, hidroliza karbamata je znatno sporija. ^[34-36] Brzina deacetilacije AChE ($k_{\text{deac}} = 7,56 \cdot 10^7 \text{ h}^{-1}$) ^[35] je oko milijardu puta brža od dekarbamilacije AChE inhibirane disupstituiranim ($k_{\text{dekarb}}=0,162 \text{ h}^{-1}$ ^[33] i $k_{\text{dekarb}}=0,324 \text{ h}^{-1}$ ^[34]) i monosupstituiranim karbamatima ($k_{\text{dekarb}}=0,654 \text{ h}^{-1}$). ^[34, 36, 121]



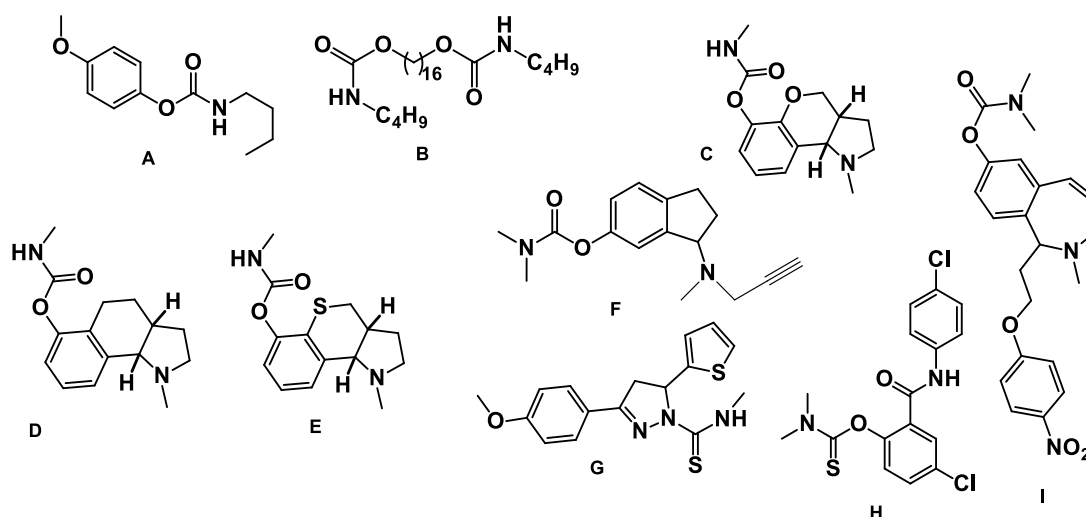
Shema 2.2. Mehanizam inhibicije kolinesteraza karbamatom rivastigminom

Prvi poznati inhibitor kolinesteraza upravo je i prvi karbamatni lijek fizostigmin, metilkarbamatni ester, znan i kao eserin koji se inicijalno koristio kao lijek u tretmanu AB. ^[117] Za fizostigmin je pokazano kako poboljšava dugotrajno pamćenje, povećava pokretljivost crijeva, snižava arterijski i očni tlak. ^[37] No, zbog pokazane hepatotoksičnosti, usporavanja rada srca i izazivanja grčenja glatkog mišićja trbušnih organa povučen je iz upotrebe kod liječenja AB, ali se koristi za liječenje glaukoma.

Karbamati piridostigmin, fizostigmin i neostigmin djeluju kao inhibitori AChE usporavajući hidrolizu ACh i time povećavaju učinkovitost kolinergičkog prijenosa, a koriste se i kao

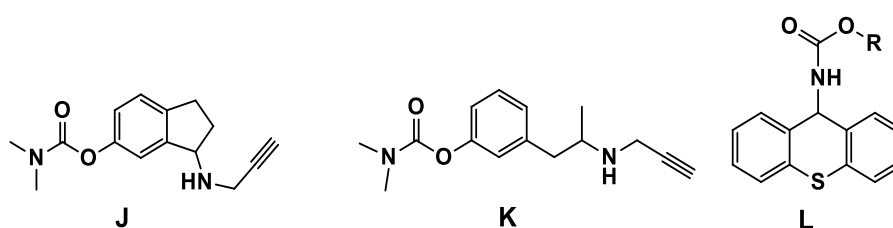
parasimpatomimetici u liječenju miastenije gravis. ^[37] Rivastigmin je inhibitor BChE i AChE koji se primjenjuju u liječenju blage, umjerene i teže AB, kao i blage do umjerene demencije kod Parkinsonove bolesti. ^[122, 123]

Dizajn novih inhibitora kolinesteraza bazira se na modifikaciji strukture postojećih karbamatnih inhibitora kolinesteraza, ili sinteze karbamatnih derivata postojećih AB lijekova s ciljem pronalaska novih, učinkovitijih lijekova za tretman neurodegenerativnih bolesti. Do danas je sintetiziran i testiran niz strukturno različitih karbamata za koje je dokazano da inhibiraju obje kolinesteraze, AChE i BChE. Tako su Lin i suradnici sintetizirali različite derivate rivastigmina. Iz te serije spojeva karbamat **A** s metoksi-skupinom u *para* položaju fenila i karbamat **B** s heksadekanskim lancem između *N*-butil supstituiranih karbamatnih skupina pokazali su se kao najpotentniji inhibitori AChE (Slika 2.11.). ^[123] Bolognesi i suradnici sintetizirali su seriju benzopirano[4,3]-pirolnih derivata rivastigmina, koji su se pokazali potentnijim inhibitorima obiju kolinesteraza od rivastigmina (spojevi **C-E**, Slika 2.11.) pri čemu inhibicijski potencijal spojeva takve strukture ovisi o alkilnom supstituentima na atomu dušika karbamatne skupine. Naime, oni su pokazali kako su karbamati s metilnom skupinom na atomu dušika karbamatne skupine potentniji inhibitori AChE u odnosu na karbamate s etilnim ili 1-feniletilnim skupinama na atomu dušika karbamatne skupine. ^[124] Sterling i suradnici sintetizirali su karbamate *N*-propargilaminoindana (spoj **F**, Slika 2.11) i *N*-propargilfenetilamina kao derivate rivastigmina koji djeluju kao neselektivni AChE i BChE inhibitori pri čemu je pokazano da propargilamin kao aminski supstituent dovodi do smanjenja brzine inhibicije AChE u odnosu na etilmetilkarbamate i metilpropilkarbamate. ^[125] Ucar i suradnici ^[126] su sintetizirali tiokarbamate derivate fizostigmina od kojih se kao najpotentniji inhibitor kolinesteraza pokazao 3-(4-metoksifenil)-*N*-metil-5-(tiofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbotioamid (spoj **G**, Slika 2.11.). ^[126] Krátký i suradnici ^[127] su sintetizirali i testirali seriju različito supstituiranih aromatskih i tiokarbamatah derivata rivastigmina gdje su pokazali kako *N*-fenil-*N*-metilni derivati brže inhibiraju ljudsku AChE u odnosu na ostale derivate iz serije, pri čemu je *O*-{4-klor-2-[(4-klorfenil)karbamoil]fenil}-*N,N*-dimetilkarbamotioat (spoj **H**, Slika 2.11.) identificiran kao najpotentniji inhibitor AChE. Toda i suradnici ^[128] sintetizirali su hibride rivastigmina i fluoksetina, lijeka koji se koristi u liječenju depresije (spoj **I**, Slika 2.11.) gdje je pokazano kako promjena položaja dimetilkarbamate skupine na benzenskoj jezgri iz *meta* u *para* povećava inhibicijski potencijal spojeva prema AChE.



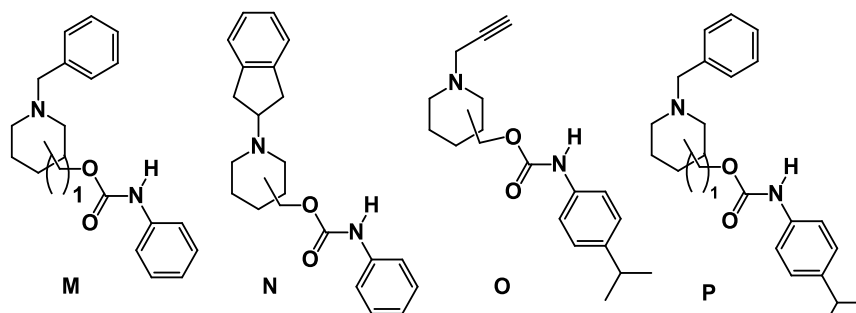
Slika 2.11. Strukturene formule nekih karbamatnih inhibitora kolinesteraza [123-128]

Groner i suradnici [129] su pokazali kako su *N,N*-dimetil-karbamatni derivati *N*-propargiliranih-1-aminoindana (odnosno rasagilina, poznatog inhibitora MAO-B enzima) (spoj **J**, Slika 2.12) i fenilpropan-2-il-amina (dodatak prehrani koji pospješuje gubitak tjelesne mase i poboljšava fizičku spremnost) (spoj **K**, Slika 2.12.) potentni inhibitori AChE. Darvesh i suradnici [122] su sintetizirali i ispitali seriju karbamatnih derivata fenotiazina (spoj **L**, Slika 2.12) koristeći strukturu etopropazina, selektivnog inhibitora AChE koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti, kao strukturu osnovu, gdje se pokazalo kako ovi karbamati reverzibilno inhibiraju BChE, dok ireverzibilno inhibiraju AChE.

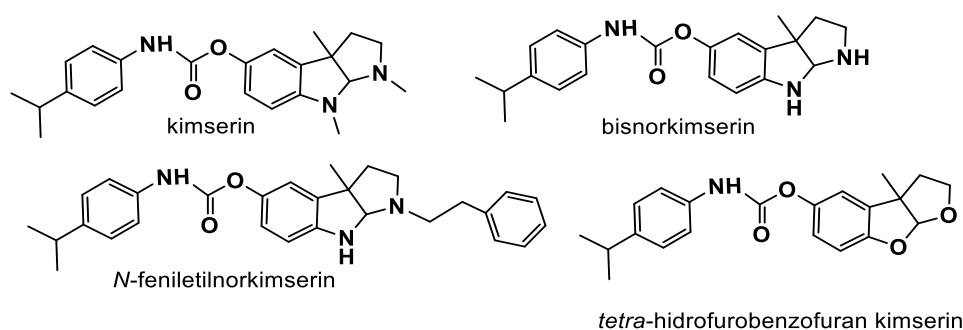


Slika 2.12. Strukturene formule molekula *N,N*-dimetilkarbamatnih derivata i *N*-propargiliranih-1-aminoindana (1), fenil-propan-2-il amina (2) te karbamatnih derivata fenotiazina [122, 129]

Košak i suradnici sintetizirali su seriju *N*-alkilpiperidinskih karbamata galantamina i rivastigmina za koje je pokazano kako su potentni inhibitori objiju kolinesteraza [130] i MAO-B (spojevi **M** – **P**, Slika 2.13.).

Slika 2.13. Strukturne formule molekula *N*-alkilpiperidinskih karbamata ^[130]

Budući da se selektivna inhibicija BChE istaknula se kao obećavajući pristup tretmanu AB jedan dio istraživanja usmjerio se ka pronalaženju selektivnog inhibitora BChE koji u svojoj strukturi ima karbamatnu skupinu. Do sada se iznimno selektivnim inhibitorom BChE pokazao karbamat kimserin (**Slika 2.14.**), strukturalni analog fizostigmina s izopropilfenilnom umjesto metilne skupine na N-4, koji je 15 puta selektivniji inhibitor BChE u odnosu na AChE. No, primjena kimserina za liječenje AB-a zaustavljena je zbog nastanka toksičnog metabolita eserolina. Derivati kimserina *tetra*-hidrofurobenzofuran kimserin, bisnorkimserin i *N*-feniletilnorkimserin također su se pokazali selektivnim inhibitorima BChE. Najviše obećava bisnorkimserin koji je ušao u II. fazu kliničkih ispitivanja. ^[28, 39]



Slika 2.14. Strukturne formule kimserina i njegovih derivata

Izrazito selektivnim inhibitorom BChE pokazao se bambuterol (**Slika 2.2.**), koji ljudsku BChE inhibira oko 20.000 puta brže od ljudske AChE. ^[43] Bambuterol je dimetilni biskarbamat terbutalina i u upotrebi je kao prolijek koji se koristi za liječenje astme i kronične opstruktivne bolesti pluća. U organizmu se pod utjecajem BChE hidrolizira u svoj aktivni oblik terbutalin, agonist β 2-receptora, bronhodilatator kratkog djelovanja. Hidroliza bambuterola uključuje dekarbamilaciju BChE čime se osigurava sporo otpuštanje terbutalina i omogućava uzimanje

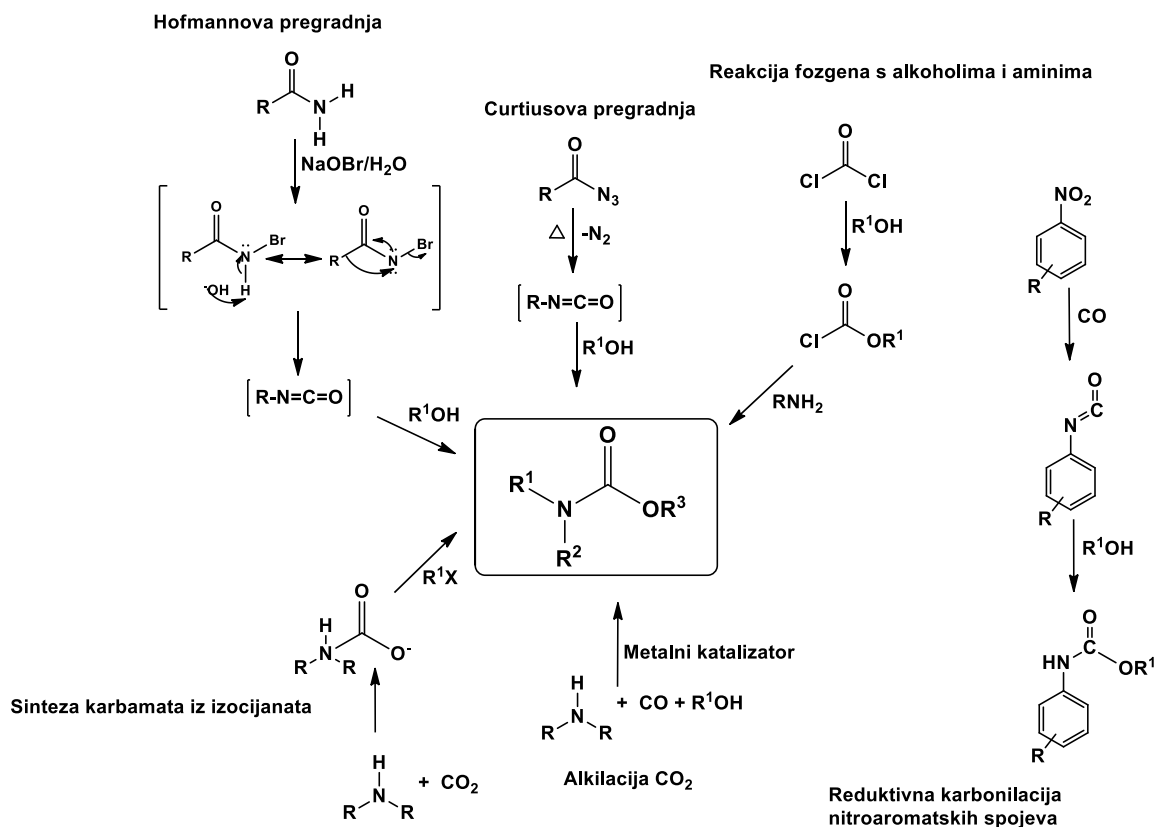
bambuterola jednom dnevno. Bambuterol se koristi i za opuštanje mišića maternice, žučnog mjehura i drugih tkiva ili organa koja sadrže β 2-receptore. ^[45] Bambuterol je kiralni spoj s asimetričnim ugljikovim atomom te je pokazano kako (*R*)-bambuterol inhibira obje kolinesteraze oko 5 puta brže od (*S*)-bambuterola. ^[131] I dimetilni biskarbamati bronhodilatatora metaproterenola i izoproterenola su se pokazali vrlo potentnim inhibitorima BChE, ali manje selektivnima od bambuterola. ^[47] Pokazano je kako raspored karbamatnih skupina na benzenskoj jezgri jednak onome kakav je kod bambuterola i metaproterenola, osigurava tim karbamatima geometriju u aktivnom mjestu BChE optimalnu za reakciju s aktivnim serinom. Nadalje, Wu i suradnici sintetizirali su seriju bis(dimetilnih) i bis(dietilnih) analoga bambuterola s derivatima *n*-butilamina u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, kao i monokarbamatnih analoga bambuterola. Međutim nijedan od njih nije pokazao inhibicijski potencijal kao bambuterol. ^[45, 46]

2.3.2. Metode sinteze karbamata

Najčešće metode koje se primjenjuju u sintezi karbamata su Hoffmanova pregradnja amida, Curtiusova pregradnja acil-azida, reduktivna karbonilacija nitroaromatskih spojeva, karbonilacija amina, reakcija fozgena s aminom i alkoholom te alkilacija ugljikovog dioksida (**Shema 2.2**).

Hofmannovom pregradnjom (**Shema 2.3**.) karbamati se dobivaju izravno iz karboksiamida. ^[132-134] Prvi korak je deprotonacija amino-skupine pomoću bazne otopine broma (natrijev hipobromit) pri čemu nastaje bromamidni međuprodukt čijim unutarmolekulskim Hofmannovim pregrađivanjem preko nitrenskog međuprodukta nastaje odgovarajući izocijanat. Reakcijom izocijanta i alkohola u zadnjem koraku nastaje karbamat. ^[132-134] Postojeća metoda u kojoj se koristi alkalna otopina bromida davala je spojeve s niskim prinosom pa je uloženo mnogo napora u razvoj reagensa i modifikaciju Hofmannove pregradnje. Tako su predloženi različiti oksidansi i baze, a diacetoksijodobenezen ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$), metoksi bromid (MeOBr), *N*-bromsukcinimid uz natrijev metoksid ($\text{NBS-CH}_3\text{ONa}$), *N*-bromsukcinimid uz kalijev hidroksid (NBS-KOH), olovov tetraacetat i benziltrimetilamonijev

tribromid su neki od njih. No, te metode zahtjevaju veliku količinu oksidansa, pa su ekonomski slabo isplative. [132-134]



Shema 2.3. Metode sinteze karbamata

Curtiusova pregradnja (Shema 2.3.) se koristi za sintezu karbamata i uree. Sinteza uključuje pirolizu acil-azida čime nastaje izocijanatni međuprodukt. Reakcijom izocijanata s alkoholom nastaje karbamat. Acil-azidi se obično sintetiziraju iz derivata karboksilne kiseline kao što su acil-kloridi, anhidridi i hidrazidi. [135, 136.]

Jedna od prvih metoda koja je korištena za sintezu karbamata je reakcija fozgena s alifatskim alkoholima i aminima i često se koristi u proizvodnji poliuretana (Shema 2.3.). [137] Prvi korak sinteze je reakcija fozgena s alkoholom pri čemu nastaje klorformijatni međuprodukt, koji potom reagira s aminom te nastaje karbamat. Fozgen se dugo vremena koristio kao osnovni građevni blok u organskoj sintezi karbonata, uree i karbamata. No, kako je fozgen toksičan te fozgenacijom alkohola nastaje i korozivni hidroklorid kao nusprodukt, danas se umjesto njega koriste 1,1,1-triklormetil-formijati (difozgen) i bis-(1,1,1-triklormetil)-karbonat (trifozgen).

^[138] Također, kao dobra alternativa fosfenu pokazao se ugljikov dioksid ^[139, 140] čija je primjena vrlo atraktivna zbog njegove netoksičnosti, nekorozivnosti i nezapaljivosti. Poznato je da ugljikov dioksid brzo reagira s aminima te nastaju amonijeve soli karbaminske kiseline (**Shema 2.3.**). Metoda se zasniva na stvaranju karbamatnog aniona reakcijom amina i ugljikovog dioksida, nakon čega anion ide u reakciju s elektrofilom (najčešće halogenalkanom) te nastaje karbamat. ^[139, 140]

Nitroaromatski karbamati se dobivaju redukcijskom karbonilacijom nitroaromatskih spojeva (**Shema 2.3.**). To je egzotermna reakcija katalizirana paladijem, rutenijem ili rodijem. Zagrijavanjem nitroaromatskog spoja u atmosferi ugljikovog monoksida nastaje nitroaromatski izocijanat, čijom reakcijom s alkoholom nastaje karbamat. Nedostatak ove metode je upotreba toksičnog ugljičnog monoksida i visoka cijena metalnih katalizatora.

Nadalje, karbamati se mogu sintetizirati i oksidacijskom karbonilacijom amina (**Shema 2.3.**). Reakcijom amina, alkohola, ugljikovog monoksida i kisika uz metalni katalizator u jednom koraku nastaje karbamat od interesa. Metalni katalizatori korišteni tijekom oksidacijskih karbonilacija su paladij, halogenidi platine i alkalnih metala. Nedostatak ove metode su niski prinosi, upotreba otrovnog ugljikovog monoksida, problem odvajanja produkta i visoka cijena metalnih katalizatora.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sinteza spojeva

3.1.1. Opće napomene

Za sintezu spojeva korištena su komercijalno dostupna otapala i kemikalije bez daljnjeg pročišćavanja: diklormetan (DCM, *Sigma Aldrich*, Dramstadt, Njemačka), metanol (MeOH; *Honeywell*, Seelze, Njemačka), etil-acetat (EtOAc; *Honeywell*, Seelze, Njemačka), kloroform (*Honeywell*, Seelze, Njemačka), izopropanol (*Honeywell*, Seelze, Njemačka), 1,2-dikloretan (*Honeywell*, Seelze, Njemačka), 3,5-dihidroksiacetofenon (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), dimetilkarbamoil-klorid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), dietilkarbamoil-klorid (*Alfa Aser*, Heysham, Velika Britanija), *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (*Tokyo Chemical Industry*, Tokyo, Japan), 1-pirolidinkarbonil-klorid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), 1-piperidinkarbonil-klorid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), *N*-fenil-*N*-metilkarbamoil-klorid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP; *Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), bakrov(II) bromid (*Sigma Aldrich*, Darmstadt, Njemačka), trietilamin (Et₃N; *Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), natrijev borhidrid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), adamantan-1-ilamin (*Acros Organics*, Geel, Belgija), cikloheksilamin (*Alfa Aser*, Kandel, Njemačka), *tert*-pentilamin (*Alfa Aser*, Kandel, Njemačka), anilin (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), *p*-toluidin (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), piperidin (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), 1-feniletilamin (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), 2-feniletilamin (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD), bezvodni natrijev sulfat (*Merck*, Darmstadt, Njemačka) i amonijev klorid (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD).

Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin layer chromatography*, TLC) izvođena je na aluminijskim pločicama silikagela (*TLC Silica gel 60 F254*, *Merck*, Dramstadt, Njemačka). Za vizualizaciju je korišteno ultraljubičasto svjetlo ($\lambda = 254$ nm) ili tzv. *fosfomolibdeni kiseli reagens* ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$ (25 g) + $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (7,5 g) + H_2SO_4 (25 mL) + H_2O (495 mL)) (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD). Kromatografija na stupcu izvođena je na silikagelu (*Flash Silica gel*, *Merck*, Dramstadt, Njemačka).

^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV300 (7 T, 300 ili 600 MHz, SAD) u Centru za NMR Instituta Ruđer Bošković. Snimljeni spektri su analizirani na temelju kemijskih pomaka i multiplentnosti signala te iznosa konstanti sprege pomoću programa MestReNova (*Mesterlab Research S.L.*, SAD). Kemijski pomaci (δH i δC) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm) u odnosu na tetrametilsilan (TMS). Konstante sprege (J) izražene su u hercima (Hz). Signali su označeni kao s (singlet), br s (široki singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), t (triplet) i m (multiplet).

3.1.1.1. Analiza čistoće spojeva

Za analizu čistoće spojeva korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) koja je provedena na Shimadzu 10A VP HPLC sustavu (pumpa LC-10AD VP, degazer DGU-14A, grijač kolone CTO-10AC VP, gradijentni sklop za miješanje FCV-10AL VP, upravljački sklop SCL-10A VP, UV detektor SPD-M10A VP) uz sljedeće uvjete: kolona Nucleosil 100-5 C18; dimenzije kolone 250 mm x 4,6 mm; protok 1 mL/min; injektirani volumen 20 μL ; UV detekcija 200 – 400 nm. Korištena je gradijentna metoda uz pokretnu fazu A (H_2O , MeOH, H_3PO_4 (85 %) = 90:10:0,5) i pokretnu fazu B (MeOH) uz gradijentno ispiranje: 50/100/100/50 % B u vremenskim intervalima 0/20/25/27 min. Čistoća spojeva, dobivena kao omjer površine signala spoja i ukupne površine signala u kromatogramu uz UV detekciju pri 220 nm, izražena je u postotcima. Analiza čistoće spojeva napravljena je na Zavodu za organsku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković.

Analiza spektrometrijom masa s visokim razlučivanjem (eng. *High resolution mass spectrometry*, HRMS) provedena je na 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer sustavu u Laboratoriju za bioanalitiku Instituta Ruđer Bošković.

3.1.2. Općeniti postupak sinteze polaznih 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-biskarbamata I-VI

3,5-dihidroksiacetofenon (1 ekviv.), trietilamin (4,5 mL) i 4-(dimetilamino) piridin (200 mg) otopljeni su u 1,2-dikloretanu (50 mL). Otopina je zagrijavana na 60-65 °C, ovisno o spoju, te joj je dokapan odgovarajući karbamoil ili karbonil klorid (2 ekviv.). Reakcijska je smjesa miješana preko noći u atmosferi dušika. Tijek reakcije je praćen pomoću TLC-a (diklormetan: metanol = 50:1). Nakon hlađenja, reakcijska smjesa je razrijeđena s diklormetanom (50 mL) te ekstrahirana s vodom (40 mL). Organski je sloj potom ekstrahiran sa smjesom klorovodične kiseline ($c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) i vode u omjeru 1:1 (10 mL). Nakon toga, dobiveni organski sloj je ekstrahiran s vodom (40 mL), sušen bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran i uparen do suhog. Dobiven je odgovarajući 5-acetil-1,3-fenilen-biskarbamat koji je potom otopljen u smjesi etil-acetata i kloroforma= 1:1 (80 mL) (1 ekviv.) te mu je dodan bakrov(II) bromid (2 ekviv.). Otopina je zagrijavana na 65 °C kroz 4 h uz neprestano miješanje. Nakon hlađenja, smjesa je profiltrirana preko Büchnerova lijevka uz ispiranje taloga etil-acetatom. Matičnica je dva puta ekstrahirana s vodom (50 mL), a organski sloj sušen je bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran preko Büchnerova lijevka i uparen do suhog. Dobiven je odgovarajući 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-biskarbamat. Tako dobiveni produkt pročišćen je preko stupca ispunjenog *Flash* silikagelom uz mobilnu fazu koju je činila smjesa diklormetana i metanola (DCM:MeOH= 50:1).

3.1.2.1. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamata) (I)

Spoj **I** dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidroksiacetofenona (2,85 g; 18,76 mmol) i dimetilkarbamoil-klorida (3,45 mL; 37,52 mmol). Reakcija se miješala 24 h na temperaturi od 60 °C. Dobiveno je 4,06 g spoja (žuti kristali; 76 %). Nastanak spoja **I** potvrđen je snimanjem ^1H i ^{13}C NMR spektara.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,14 (d, $J=2,26$, 2H, H_{arom}); 6,99 (t, $J=2,07$ Hz, 1H, H_{arom}); 4,57 (s, 2H, CH_2Br); 3,51–3,15 (m, 8H, CH_3NCOO); 2,99–2,81 (m, 4H, CH_3NCOO).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{C/ppm}$: 154,21; 151,74; 147,38; 134,74; 119,50; 116,22; 36,62; 32,61.

3.1.2.2. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata) (II)

Spoj **II** dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidoksiacetofenona (2,00 g; 16 mmol) i *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorida (2,4 mL, 32 mmol). Reakcija se miješala 24 h na temperaturi od 65 °C. Dobiveno je 3,03 g spoja (žuti kristali; 65 %). Nastanak spoja **II** potvrđen je snimanjem ¹H i ¹³C NMR spektara.

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz), δH/ppm: 7,15 (s, 2H; H_{arom}); 6,88 (t, *J*=2,07 Hz, 1H, H_{arom}); 4,43 (s, 2H, CH₂Br); 3,46–3,36 (m, 6H, CH₃NCOO); 3,29–3,20 (m, 4H, CH₂NCOO); 1,27–1,18 (m, 8H, CH₃CH₂NCOO).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz), δC/ppm: 189,77; 153,35; 152,16; 135,29; 122,05; 118,85; 42,39; 39,22; 30,94; 14,24.

3.1.2.3. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata) (III)

Spoj **III** dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidoksiacetofenona (2,00 g; 16 mmol) i dietilkarbamoil-klorida (3,5 mL; 32 mmol). Reakcija se miješala 24 h na temperaturi od 65° C. Dobiveno je 5,40 g spoja (žuti kristali; 85 %). Nastanak spoja **III** potvrđen je snimanjem ¹H i ¹³C NMR spektara.

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz), δH/ppm: 7,59 (d, *J*=2,65, 2H, H_{arom}); 6,68 (s, 1H, H_{arom}); 4,43 (s, 2H, CH₂Br); 3,49–3,36 (m, 8H, CH₃CH₂NCOO); 1,26–1,17 (m, 12 H, CH₃CH₂NCOO).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz), δC/ppm: 189,71; 153,68; 152,16; 135,30; 121,99; 121,44; 44,15; 39,24; 13,23.

3.1.2.4. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarbamata) (IV)

Spoj **IV** dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidoksiacetofenona (2,00 g; 13 mmol), i 1-pirolidinkarbonil-klorida (3,0 mL; 26 mmol). Reakcija se miješala 48 h na temperaturi od 65 °C. Dobiveno je 4,37 g spoja (bijeli prah; 73 %). Nastanak spoja **IV** potvrđen je snimanjem ¹H i ¹³C NMR spektara.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,60 (d, $J=2,35$ Hz, 2H, H_{arom}); 7,32 (t, $J=2,23$ Hz, 1H, H_{arom}); 4,43 (s, 2H, CH_2Br); 3,56 (t, $J=6,74$ Hz, 4H, *pirolidin*); 3,48 (t, $J=6,57$ Hz, 4H, *pirolidin*); 1,99–1,90 (m, 8H, *pirolidin*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{C/ppm}$: $\delta\text{C/ppm}$: 154,18; 151,18; 143,08; 116,72; 115,90; 68,08; 58,40; 53,27; 47,31; 42,42; 42,01; 40,24; 38,70; 35,52; 29,03; 14,17; 13,34.

3.1.2.5. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilata) (V)

Spoj V dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidoksiacetofenona (2,88 g; 18 mmol) i 1-piperidinkarbonil-klorida (6,43 g; 36 mmol). Reakcija se miješala kroz 48 h na temperaturi od 65 °C. Dobiveno je 3,82 g spoja (bijeli prah; 55 %). Nastanak spoja V potvrđen je snimanjem ^1H i ^{13}C NMR spektara.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,30 (t, $J=2,25$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,67 (s, 1H, H_{arom}); 4,44–4,42 (m, 2H, CH_2Br); 3,62 (s, 8H, *piperidin*); 3,53 (s, 8H, *piperidin*); 1,68–1,58 (m, 4H, *piperidin*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{C/ppm}$: 154,18; 151,18; 143,08; 116,72; 115,90; 68,08; 58,40; 53,27; 47,31; 42,42; 42,01; 40,24; 38,70; 35,52; 29,03; 14,17; 13,34.

3.1.2.6. Sinteza 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamata) (VI)

Spoj VI dobiven je prema postupku 3.1.2. iz 3,5-dihidoksiacetofenona (2,39 g; 19 mmol) i *N*-fenil-*N*-metilkarbamoil-klorida (6,50 g; 38 mmol). Reakcija se miješala 48 h na temperaturi od 70 °C. Dobiveno je 3,85 g spoja (žuti kristali; 59 %). Nastanak spoja VI potvrđen je snimanjem ^1H i ^{13}C NMR spektara.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,67 (s, 2H, H_{arom}); 7,60–7,58 (m, $J=2,29$ Hz, 9H, H_{arom}); 7,56 (d, $J=1,56$ Hz, 2H, H_{arom}); 7,27 (t, $J=1,48$ Hz, 1H, H_{arom}); 4,42 (s, 2H, CH_2Br); 3,10 (s, 3H, CH_3); 3,03 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{C/ppm}$: 154,18; 151,18; 143,08; 116,72; 115,90; 68,08; 58,40; 53,27; 47, 31; 42,42; 42,01; 40,24; 38,70; 35,52; 29,03; 14,17; 13,34.

3.1.3. Općeniti postupak sinteze 5,2-amino (1-hidroksi)-1,3-fenilen biskarbamata 1-30

Odgovarajući 5-(2-bromacetil)-1,3-fenilen biskarbamat (1 ekviv.), dobiven postupkom 3.1.2, otopljen je u metanolu (20 mL) te mu je dodan natrijev borhidrid (2 ekviv.) uz diklormetan (3 mL). Reakcijska je smjesa miješana 3 h na sobnoj temperaturi u atmosferi dušika nakon čega je uparena do suhog, dodan joj je diklormetan (50 mL) i ekstrahirana je zasićenom otopinom amonijevog klorida (20 mL). Organski sloj sušen je bezvodnim natrijevim sulfatom, profiltriran preko Büchnerova lijevka i uparen do suhog. Dobiven je odgovarajući 5-(2-brom-1-hidroksietil)-1,3-fenilen-biskarbamat koji je potom otopljen u izopropanolu (1 ekviv.) i dodan mu je odgovarajući amin (2 ekviv.). Reakcijska smjesa se zatim miješala na određenoj temperaturi kroz 24 ili 48 h, ovisno o aminu, nakon čega je ohlađena i uparena do suhog. Dobiveni produkt je ulje ili prah, ovisno o odabranima biskarbamatu i aminu. Tako dobiveni produkt je zatim pročišćen na stupcu *Flash* silikagela uz gradijentno ispiranje mobilnom fazom koju je činila smjesa diklormetana i metanola u različitim omjerima (DCM:MeOH = 90:1;70:1, 50:1, 20:1, 9:1).

3.1.4. Sinteza 5,2-amino (1-hidroksi)-1,3-fenilen-biskarbamat hidroklorida

Postupak je analogan postupku 3.1.3. bez pročišćavanja. β -aminoalkohola je u dodatnom koraku dodana smjesa izopropanola i 1M HCl u omjeru 1:1 do pH 1. Smjesa je otparena do suhog. Produkt je ulje ili prah, ovisno o odabranima biskarbamatu i aminu. Produkt je zatim pročišćen na stupcu *Flash* silikagela uz gradijentno ispiranje mobilnom fazom koju je činila smjesa diklormetana i metanola u različitim omjerima (DCM:MeOH = 90:1;70:1, 50:1, 20:1, 9:1).

3.1.4.1. *Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (1)*

Spoj 1 pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.3. Polazni biskarbamat bio je spoj I (DM), a amin cikloheksilamin. Produkt je žuto ulje (105 mg, 21 %). HRMS: izračnato teorijski 394,2342, određeno 394,2346. HPLC čistoća produkta: 97 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,06 (d, $J=2,0$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,88 (t, $J=2,2$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,10 (dd, $J=9,7$; 2,7Hz, 1H, OH); 4,64 (br s, 1H, CH); 3,15 (dd, $J=12,3$; 3,1 Hz 1H, CH); 3,07 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCO}$); 2,98 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCO}$); 2,90–2,81 (m, 2H, cikloheksilamin); 2,09–2,02 (m, 2H, cikloheksilamin); 1,81–1,76 (m, $J=11,6$ Hz, 2H, cikloheksilamin); 1,63 (d, $J=12,1$ Hz; 1H, cikloheksilamin); 1,44–1,33 (m, 2H, cikloheksilamin); 1,28–1,14 (m, 4H, cikloheksilamin).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,60; 151,90; 143,57; 116,14; 115,23; 69,12; 57,78; 52,50; 36,72; 30,71; 30,51; 25,22; 24,64.

3.1.4.2. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(4-tolilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (2)*

Spoj 2 pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat bio je spoj I, a amin *p*-toluidin. Produkt je bijeli prah (54,81 mg, 13 %). HRMS: izračnato teorijski 402,2029, određeno 402,2030. HPLC čistoća produkta: 99 %. $T_{\text{f}}= 141,8$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 6,97 (d, $J=8,1$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,84 (d, $J=8,0$ Hz, 2 H, H_{arom}); 6,84 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, H_{arom}); 6,62 (d, $J=8,0$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,48–6,46 (m, 1H, H_{arom}); 4,63 (d, $J=5,4$ Hz; 1H, OH); 3,52 (s, 1H; CH); 2,44 (s, (s, 6H, CH_3NCOO); 2,12 (s, 3H, CH_3); 1,57 (s, 3H, CH_3NCOO); 1,27 (s, 3H, CH_3NCOO).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,80; 153,79; 147,45; 143,83; 08, 129,79; 127,80; 115,22; 114,25; 113,84; 69,82; 49,83; 35,69; 20,40.

3.1.4.3. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (3)*

Spoj **3** pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat bio je spoj **I**, a amin je piperidin. Produkt je žuto ulje. (101,24 mg; 35 %). HRMS: izračnato teorijski 402,2005, određeno 402,1991. HPLC čistoća produkta: 98 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,07 (d, $J=2,2$; 2H, H_{arom}); 6,89 (t, $J=2,0$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,41 (t, $J=6,4$ Hz; 1H, OH); 3,11–3,08 (m, 4H, piperidin); 3,07 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$); 3,01–2,99 (m, 2H, piperidin); 2,98 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$); 2,14–1,88 (m, 4H, piperidin); 1,74–1,56 (m, 2H, piperidin).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,43; 154,07; 152,20; 152,07; 142,08, 120,20; 116,15; 115,52; 74,18; 67,44; 65,09; 60,40; 36,81; 36,73; 36,53; 36,48; 22,89; 21,94.

3.1.4.4. *Sinteza 5-[2-(adamantan-1-il-amino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (4)*

Spoj **4** pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.3. Polazni biskarbamat je spoj **I**, a amin je 1-amino-adamantan. Produkt je žuti prah (54,65 mg, 30 %). HRMS: izračnato teorijski 446,2655, određeno 446,2669. HPLC čistoća produkta: 99 %. $T_{\text{f}}= 131,7$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 6,98 (d, $J=2,1$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,89 (d, $J=2,2$ Hz; H_{arom}); 4,56 (dd, $J=3,7$; 8,6 Hz; 2H, CHOH); 3,08 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$); 3,03 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$); 2,97 (dd, $J=3,8$; 12,1 Hz, 1H, CH); 2,61 (dd, $J=8,6$; 12,1 Hz, 1H, adamantan-1-ilamin); 2,08–2,02 (m, 3H, adamantan-1-ilamin); 1,71–1,54 (m, 12H, adamantan-1-ilamin).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,54; 151,80; 145,29; 115,49; 114,43; 71,66; 50,34; 47,95; 43,05; 36,68; 36,64; 36,43; 29,55.

3.1.4.5. *Sinteza 5-[-2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (5)*

Spoj **5** pripravljen je prema općenitom postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat spoj **I**, a amin je 1-fenil-etilamin. Produkt je bijelo ulje (72,73 mg, 23 %). HRMS: izračnato teorijski 416,2185, određeno 416,2185. HPLC čistoća produkta: 95 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,37–7,30 (m, 5H, H_{arom}); 6,95–6,93 (m, 2H, H_{arom}); 6,84–6,82 (m, 1H, H_{arom}); 4,92 (dd, $J=2,6$; 9,3 Hz; 1H, CHOH); 3,98 (dd, $J=6,6$; 13,6 Hz, 1H, CH_2); 3,04 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$); 2,97 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{NCOO}$), 2,91 (dd, $J=3,5$; 12,4 Hz; 1H, CH_2); 2,61 (dd, $J=9,0$; 12,4Hz, 1H, CH); 1,53 (t, $J=6,5$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{C/ppm}$: 154,69; 151,77; 144,22; 128,26; 127,67; 126,74; 116,02; 115,11; 70,67; 70,21; 58,84; 58,27; 54,29; 54,06; 36,72; 36,43; 22,95.

3.1.4.6. *Sinteza 5-[-2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorida (6)*

Spoj **6** pripravljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **II**, a amin je 2-feniletilamin. Produkt je prozirno ulje (56 mg, 38 %). HPLC čistoća produkta: 89 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta\text{H/ppm}$: 7,31–7,27 (m, 2H, H_{arom}); 7,22–7,16 (m, 3H, H_{arom}); 6,90 (d, $J=2,3$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,88 (t, $J=2,1$ Hz, 1H, H_{arom}), 4,73 (dd, $J=3,1$; 8,4 Hz; 1H, CHOH); 3,08 (s, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO})$); 3,01 (s, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO})$), 2,96–2,89 (m; 2H, CH_2NCOO); 2,84–2,79(m, 2H, CH_2NCOO); 2,78–2,71 (m, 2H, CH_2NCOO); 1,26 (s, 2H, CH_2NCOO).

3.1.4.7. *Sinteza 5-(2-cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorida (7)*

Spoj **7** pripravljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat spoj **II**, a amin je cikloheksilamin. Produkt je žuto ulje (244,2 mg, 68 %). HRMS: izračnato teorijski 422,2655, određeno 422,2646. HPLC čistoća produkta: 97 %.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,10 (d, $J=2,5$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,92 (t, $J=2,3$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,34 (d, $J=9,6$ Hz, 1H, CHOH); 3,47 (q, $J=7,1$ Hz; 2H $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,39 (q, $J=7,2$ Hz; 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$), 3,26 (dd, $J=2,6$; 11,5 Hz; 1H, CH); 3,06–2,89 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$; CH_2); 2,17 (t, $J=11,8$ Hz, 2H, cikloheksilamin), 1,85 (d, $J=12,5$ Hz; 2H, cikloheksilamin), 1,64–1,50 (m, 3H, cikloheksilamin); 1,28–1,14 (m, 9H, cikloheksilamin).
 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,22; 154,07; 151,97; 142,61; 116,18; 115,55; 68,28; 58,41; 52,14; 44,14; 34,25; 33,81; 29,25; 29,16; 24,81; 24,47; 13,19; 12,41.

3.1.4.8. Sinteza 5-[2(fenilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata) (8)

Spoj 8 pripremljen je prema postupku 3.1.3. Polazni biskarbamat je spoj II, a amin je anilin. Produkt su žuti kristali (39,15 mg, 11 %). HRMS: izračnato teorijski 416,2185, određeno 416,2180. HPLC čistoća produkta: 99 %. $T_{\text{i}}=118,9$ °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,16 (dd, $J=6,9$; 7,4 Hz; 2H, H_{arom}); 7,15 (d, $J=1,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 7,08 (s, 1H, H_{arom}); 6,69 (d, $J=1,0$ Hz; 1H, H_{arom}); 6,68 (d, $J=1,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 4,87–4,81 (m, 1H, CH); 4,18 (s, 1H, CHOH); 3,72–3,67 (m, 6H, CH_3NCOO); 3,06–2,94 (m, 1H, CH_2); 1,55–1,51 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 1,30–1,08 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$).
 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 155,10; 153,99; 149,19; 138,55; 128,62; 119,10; 113,50; 68,98; 51,73; 43,40; 34,37.

3.1.4.9. Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamata)-hidroklorida (9)

Spoj 9 pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj II, a amin je piperidin. Produkt je žuto ulje (47,5 mg, 15 %). HRMS: izračnato teorijski 430,2318, određeno 430,2320. HPLC čistoća produkta: 99 %.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,08 (d, $J=2,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,89 (t, $J=26,0$ Hz; 1H, H_{arom}); 4,88–4,82 (m, 1H, CHOH); 3,47–3,35 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,05–2,93 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 2,80–2,45 (m, 6H, piperidin i CH_2); 1,76–1,63 (m, 4H, piperidin); 1,55–1,42 (m, 2H, piperidin); 1,26–1,15 (m, 6H, CH_3NCO).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,14; 153,99; 151,87; 144,17; 118,89; 115,68; 114,65; 70,06; 67,89; 66,30; 59,85; 54,48; 44,01; 34,23; 26,12; 25,42; 23,69; 13,22; 12,45.

3.1.4.10. Sinteza 5-[1-hidroksi-2(tert-pentilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metilkarbamat)-hidroklorida (**10**)

Spoj **10** pripremljen je prema postupku 3.1.3.24. Polazni biskarbamat je spoj **II**, a amin je *tert*-pentilamin. Produkt je žuto ulje (47,5 mg, 15 %). HRMS: izračnato teorijski 410,2655, određeno 410,2667. HPLC čistoća produkta: 97 %.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,10 (d, $J=2,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,96 (t, $J=2,2$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,41 (d, $J=9,5$ Hz; 1H, CHOH); 3,46 (q, $J=7,1$ Hz; 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,40 (q, $J=7,1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,25 (d, $J=11,9$ Hz, 1H, CH_2); 3,04 (s, 3H, CHOH ; CH_2); 2,97 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 2,92 (t, $J=11,6$ Hz; 1H, CH_2); 1,78 (q, $J=7,5$ Hz, 1H, CH_2); 1,42 (s, 3H, CH_3); 1,39 (s, 3H, CH_3); 1,26–1,15 (m, 6H, CH_3NCOO); 1,01 (t, $J=7,4$ Hz; 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,14; 153,98; 151,98; 142,05; 115,96; 67,92; 60,91; 49,48; 44,12; 34,25; 33,84; 30,96; 29,70; 23,19; 23,17; 13,19; 12,42; 8,01.

3.1.4.11. Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorida (**11**)

Spoj **11** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **II**, a amin je 1-amino-adamantan. Produkt je žuto ulje (226,9 mg, 67 %). HRMS: izračnato teorijski 474,2968, određeno 474,2980. HPLC čistoća produkta: 98 %.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,12 (d, $J=1,8$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,93 (s, 1H, H_{arom}); 5,44 (d, $J=7,6$ Hz; 1H, CHOH); 3,50–3,32 (m, 4H, CH_2NCOO ; CH_2), 3,28 (t, $J=11,2$ Hz; 1H, CH_2), 3,03 (s, 3H, CH_3NCOO); 2,96(s, 3H, CH_3NCOO); 2,20–1,95 (m, 11H, *adamantan-1-ilamin*); 1,85 (s, 4H, *adamantan-1-ilamin*); 1,26–1,12 (m, 7H, *adamantan-1-ilamin*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,27; 154,12; 151,92; 142,53; 116,28; 115,71; 67,95; 58,36; 53,25; 47,73; 44,12; 40,17; 38,55; 35,47; 34,25; 33,84; 29,01; 13,21; 12,43.

3.1.4.12. Sinteza 5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil))
karbmata-hidroklorida (**12**)

Spoj **12** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **II**, a amin je 1-fenil-etilamin. Produkt je bezbojno ulje (34,6 mg, 27 %). HRMS: izračnato teorijski 482,2057, određeno 482,2050. HPLC čistoća produkta: 95 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,49 (d, $J=8,1$ Hz; 1H, H_{arom}); 7,44 (d, $J=7,2$ Hz; 1H, H_{arom}); 7,38–7,29 (m, 5H, H_{arom}); 7,05–6,96 (m, 2H, H_{arom}); 6,81–6,75 (dd, $J=8,0$; 10,4 Hz, 1H, H_{arom}); 5,39 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, CHOH); 4,35–4,28 (dd, $J=6,4$; 10,0 Hz, 1H, CHOH); 3,48–3,27 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,23–2,83 (m, 7H, CH_2 ; CH_3NCOO); 2,73 (dd, $J=9,9$; 12,4 Hz; 3H, CH_3NCOO); 2,67 (t, $J=8,7$ Hz; 2H, CH_2); 1,90–1,79 (dd, $J=6,9$; 10,6 Hz; 3H, CH_3); 1,25–1,14 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,52; 151,62; 143,36; 138,04; 135,96; 129,45; 128,83; 127,79; 127,18; 116,84; 115,90; 68,06; 59,69; 53,18; 52,01; 44,20; 44,10; 34,23; 33,81; 29,68; 20,66; 20,42; 13,14; 12,36.

3.1.4.13. Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-
bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorida (**13**)

Spoj **13** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **II**, a amin je 2-feniletilamin. Produkt je bezbojno ulje (27,9 mg, 9 %). HRMS: izračnato teorijski 482,2057, određeno 482,2043. HPLC čistoća produkta: 96 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,31–7,29 (m, 2H, H_{arom}); 7,25–7,22 (m, 3H, H_{arom}); 7,06 (d, $J=3,5$ Hz; 1H, H_{arom}); 6,88–6,82 (m, 1H, H_{arom}); 5,16 (d, $J=6,3$ Hz; 1H, CHOH), 3,46 (q, $J=7,1$ Hz; 2H, CHOH); 3,39 (q, $J=7,1$ Hz; 1H, CH_2); 3,27–3,21 (m, 2H, CH_2), 3,16–3,07 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,04 (s, 3H, CH_3NCOO); 3,00–2,96 (m, 3H, CH_3NCOO); 1,27–1,14 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 154,35; 154,20; 151,91; 136,64; 128,85; 128,77; 128,54; 126,95; 116,36; 115,60; 68,20; 54,65; 49,76; 44,17; 34,29; 33,83; 32,40; 13,18; 12,41.

3.1.4.14. *Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorida (14)*

Spoj **14** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je cikloheksilamin. Produkt je prozirno ulje (20 mg, 35 %). HPLC čistoća produkta: 86 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,09 (d, $J=5,0$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,90 (t, $J=2,4$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,34 (d, $J=8,1$; 1H, CHOH); 3,43 (q, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,37 (q, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,31 (d, $J=4,2$ Hz, 1H, CH), 3,28 (d, $J=2,6$ Hz, 1H, CH); 3,05–3,00 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 2,19–2,09 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 1,85 (d, $J=3,1$ Hz, 2H, *cikloheksilamin*); 1,68–1,48 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCO}$); 1,26–1,16 (m, 8H, *cikloheksilamin*).

3.1.4.15. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamata) (15)*

Spoj **15** pripremljen je prema postupku 3.1.3. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je piperidin. Produkt je smeđe ulje (21,09 g; 14 %). HRMS: izračnato teorijski 436,2811, određeno 436,2805. HPLC čistoća produkta: 95 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,02 (d, $J=2,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,92 (t, $J=2,1$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,08 (s, 1H, CHOH); 4,06 (t, $J=10,2$ Hz; 2H, CH_2); 3,45–3,35 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,05–2,93 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 2,80–2,45 (m, 3H, *piperidin* i CH_2); 1,73 (s, 4H, *piperidin*); 1,52 (s, 2H, *piperidin*); 1,26 (t, $J=4,2$; 6,8 Hz; 6H, CH_3NCO).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,86; 152,92; 142,66; 116,03; 115,55; 68,51; 59,61; 49,39; 42,26; 41,91; 31,50; 23,66; 14,20; 13,33; 8,06.

3.1.4.16. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(tert-pentilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorida (16)*

Spoj **16** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je *tert*-pentilamin. Produkt je žuto ulje (30,5 mg, 25 %). HRMS: izračnato teorijski 438,2968, određeno 438,2971. HPLC čistoća produkta: 97 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,11 (d, $J=1,9$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,87 (t, $J=2,1$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,36 (d, $J=10,4$ Hz; 1H, OH); 3,45–3,29 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,21 (d, $J=11,0$ Hz;

1H, CH₂); 2,92 (t, *J*=11,2 Hz; 1H, CHOH); 1,75–1,64 (m, 2H, CH₂); 1,38 (d, *J*=7,0 Hz; 6H, CH₃CH₂NCOO); 1,28–1,12 (m, 12H, CH₃CH₂NCOO); 0,96 (t, *J*=7,4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz), δ_C/ppm: 153,86; 151,92; 142,66; 116,03; 115,55; 68,51; 59,61; 49,39; 42,26; 41,91; 31,50; 23,66; 14,20; 13,33; 8,06.

3.1.4.17. *Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorida (17)*

Spoj **17** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je 1-amino-adamantan. Produkt je žuto ulje (232,8 mg, 70 %). HRMS: izračnato teorijski 502,3281, određeno 502,3279. HPLC čistoća produkta: 95 %.

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz), δ_H/ppm: 7,14 (d, *J*=2,1Hz; 2H, H_{arom}); 6,89 (t, *J*=2,1 Hz; 1H, H_{arom}); 5,44 (d, *J*=9,1 Hz; 1H, CHOH); 3,47–3,32 (m, 8H, CH₂NCOO; CH₂); 3,27 (d, *J*=2,4 Hz; 1H, CH); 3,06 (d, *J*=3,3 Hz; 1H, CH); 2,20–1,96 (m, 12H, CH₃CH₂NCOO); 1,70 (br s, 5H, adamantan-1-ilamin); 1,28–1,14 (m, 12H, CH₃CH₂NCOO; adamantan-1-ilamin).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz), δ_C/ppm: 154,18; 151,83; 143,08; 116,72; 115,9,92; 67,98; 58,32; 53,27; 47,31; 42,42; 42,01; 40,24; 38,70; 35,52; 29,03; 28,98; 14,17; 13,34.

3.1.4.18. *Sinteza 5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat) hidroklorida (18)*

Spoj **18** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je 1-fenil-etilamin. Produkt je prozirno ulje (89,4 mg, 49 %). HRMS: izračnato teorijski 472,2811, određeno 472,2820. HPLC čistoća produkta: 97 %.

¹H NMR (CDCl₃, 300MHz), δ_H/ppm: 7,36–7,28 (m, 5H, H_{arom}); 6,94–6,90 (m, 2H, H_{arom}); 6,89–6,87 (m, 1H, H_{arom}); 4,76 (ddd, *J*=3,7; 8,4; 43,5 Hz; 1H, CHOH); 3,86–3,69 (m, 1H, CH₂); 3,45–3,21 (m, 8H, CH₃CH₂NCOO); 2,85–2,73 (m, 1H, CH); 2,69–2,53 (m, 1H, CH); 1,40 (dd, *J*=3,2; 6,8 Hz, 3H, CH₃CH₂NCOO); 1,25–1,14 (m, 12H, CH₃CH₂NCOO).

¹³C NMR (CDCl₃, 300MHz), δ_C/ppm: 153,82; 151,79; 145,16; 144,89; 144,72; 144,60; 128,58; 127,10; 126,52; 115,67; 114,69; 71,54; 71,29; 58,46; 57,67; 54,82; 54,40; 42,22; 41,88; 24,24; 24,14; 14,21; 13,36.

3.1.4.19. *Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorida (19)*

Spoj **19** pripravljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **III**, a amin je 2-feniletilamin. Produkt je narančasto ulje (120,3 mg, 47 %). HRMS: izračnato teorijski 472,2811, određeno 472,2815. HPLC čistoća produkta: 98 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,34–7,28 (m, 2H, H_{arom}); 7,24–7,15 (m, 2H, H_{arom}); 7,00 (d, $J=2,2$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,89 (t, $J=2,2$ Hz; 1H, H_{arom}); 4,83 (dd, $J=3,4$; 9,1 Hz; 1H, CHOH); 3,48–3,26 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 3,07–2,73 (m, 8H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$); 1,31–1,08 (m, 12H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NCOO}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 161,86; 153,89; 151,85; 144,19; 138,77; 128,75; 128,60; 126,46; 115,90; 114,96; 70,11; 56,03; 50,29; 42,27; 41,91; 35,14; 14,21; 13,35.

3.1.4.20. *Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (20)*

Spoj **20** pripravljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **IV**, a amin je cikloheksilamin. Produkt je bijeli prah (53,48 mg, 35 %). HRMS: izračnato teorijski 446,2655, određeno 446,2661. HPLC čistoća produkta: 95 %. $T_{\text{r}}=134,4$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,08 (d, $J=2,1$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,95 (t, $J=2,1$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,23 (d, $J=9,0$ Hz; 1H, CHOH); 3,55–3,50 (m, 4H, *pirolidin*); 3,45–3,40 (m, 4H, *pirolidin*); 3,21 (dd, $J=2,8$; 13,3 Hz; 1H, CH_2); 3,00–2,88 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 2,20–2,10 (m, 2H, *pirolidin*); 1,98–1,88 (m, 8H, *pirolidin*); 1,85–1,78 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 1,55–1,42 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 1,28–1,15 (m, 4H, *cikloheksilamin*).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 152,78; 151,86; 142,82; 115,98; 115,28; 68,73; 58,09; 52,61; 46,48; 46,37; 29,76; 29,69; 25,78; 24,96; 24,54.

3.1.4.21. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(tertpentilamino)-etil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (21)*

Spoj **21** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **IV**, a amin je *tert*-pentilamin. Produkt je bijeli prah (98,9 mg, 55 %). HRMS: izračnato teorijski 434,2655, određeno 434,2667. HPLC čistoća produkta: 98 %. $T_i = 143,7$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,11 (s, 2H, H_{arom}); 6,96 (s, 1H, H_{arom}); 5,41 (d, $J=9,0$ Hz; 1H, CHOH); 3,62–3,34 (m, 8H, *pirolidin*); 3,28 (d, $J=11,9$ Hz, 1H, CH_2NH); 2,97 (t, $J=11,2$ Hz, 1H, NH); 2,04–1,84 (m, 8H, *pirolidin*); 1,84–1,66 (m, 2H, *pirolidin*); 1,53–1,29 (m, 6H, CH_2CNH ; CH_3CNH); 1,03 (t, $J=7,4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CNH}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 152,76; 151,87; 142,12; 115,98; 115,58; 67,91; 60,92; 49,51; 46,48; 46,39; 31,07; 25,77; 24,95; 23,13; 7,99.

3.1.4.22. *Sinteza 5-[2-1-adamantan-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (22)*

Spoj **22** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **IV**, a amin je 1-amino-adamantan. Produkt je bijeli prah (181,9 mg, 58 %). HRMS: izračnato teorijski 498,2968, određeno 498,2991. HPLC čistoća produkta: 98 %. $T_i = 100,3$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,12 (d, $J=2,1$ Hz; 2H, $\text{H}_{\text{arom } r}$); 6,96 (t, $J=2,3$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,37 (d, $J=9,3$ Hz, 1H, CHOH); 3,55 (t, $J=6,9$ Hz, 4H, *pirolidin*); 3,47 (t, $J=6,3$ Hz; 4H, *pirolidin*); 3,25 (d, $J=11,3$ Hz; 1H, CH_2); 3,02 (t, $J=11,3$ Hz; 1H, CH_2); 2,18–1,87 (m, 19H, *adamantan-1-ilamin*, *pirolidin*); 1,73–1,59 (m, 6H, *adamantan-1-ilamin*, *pirolidin*)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 152,78; 151,87; 142,33; 116,06; 115,60; 68,08; 58,25; 53,43; 47,76; 46,48; 46,37; 38,59; 35,48; 29,08; 25,77; 24,97.

3.1.4.23. *Sinteza 5-[2-(1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (23)*

Spoj **23** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **IV**, a amin je 1-fenil-etilamin. Produkt je prozirno ulje (26 mg, 21 %). HPLC čistoća produkta: 87 %.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,23 (d, $J=2,4$ Hz, 2H, H_{arom}); 6,90 (t, $J=2,1$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,85 (s, 1H, H_{arom}); 6,68–6,63 (m, 2H, H_{arom}); 5,33 (d, $J=9,2$ Hz; 1H, CHOH); 3,21–3,18 (m, 4H, *pirolidin*); 3,16 (t, $J=8,4$ Hz; 4H, *pirolidin*); 3,14–3,09 (m, 4H, CH_2); 1,43 (t, $J=7,2$ Hz; 8H, *pirolidin*).

3.1.4.24. *Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksi-etil]-1,3-fenilen-bis-(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (24)*

Spoj **24** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **IV**, a amin je 2-feniletilamin. Produkt je bijeli prah (39,54 mg, 30 %). HRMS: izračnato teorijski 468,2498, određeno 468,2498. HPLC čistoća produkta: 99 %. $T_{\text{r}}=147,9$ °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,25–7,15 (m, 7H, H_{arom}); 6,85 (t, $J=2,1$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,40 (d, $J=8,8$ Hz; 1H, CHOH); 3,52 (t, $J=6,5$ Hz, 4H, *pirolidin*); 3,39 (t, $J=6,6$ Hz, 4H, *pirolidin*); 3,27–3,00 (m, 8H, *pirolidin*); 2,02–1,83 (m, 8H, CH_2 ; *pirolidin*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,42; 151,67; 144,07; 136,87; 136,81; 128,83; 126,88; 117,27; 116,22; 68,43; 45,83; 41,20; 33,49; 8,65.

3.1.4.25. *Sinteza 5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (25)*

Spoj **25** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **V**, a amin je cikloheksilamin. Dobiven je bijeli prah (23,3 mg, 8 %). HRMS: izračnato teorijski 474,2968, određeno 474,2970. HPLC čistoća produkta: 95 %. $T_{\text{r}}=113,5$ °C.

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 7,06 (d, $J=2,0$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,91 (t, $J=2,2$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,34 (d, $J=9,43$ Hz, 1H, CHOH); 3,60–3,44 (m, 8H, *piperidin*); 3,27 (d, $J=11,38$ Hz, 1H, *piperidin*); 3,03–2,97 (m, 2H, *cikloheksilamin*); 2,19–2,12 (m, 2H, *cikloheksilamin*), 1,85 (d, $J=11,2$ Hz; 2H, *cikloheksilamin*); 1,67–1,49 (m, 14H, *cikloheksilamin*, *piperidin*); 1,28–1,20 (m, 4H, *cikloheksilamin*).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,28; 152,04; 142,34; 116,03; 115,59; 68,37; 58,46; 52,54; 45,52; 45,12; 29,69; 29,17; 25,86; 25,50; 24,79; 24,44; 24,27.

3.1.4.26. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (26)*

Spoj **26** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **V**, a amin je piperidin. Dobiveno je žuto ulje (85,1 mg, 50 %). HRMS: izračnato teorijski 460,2811, određeno 460,2817. HPLC čistoća produkta: 95 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,05 (d, $J=2,4$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,90 (t, $J=2,4$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,42 (dd, $J=4,5$; 8,2 Hz; 1H, CHOH); 3,62–3,40 (m, 12H, *piperidin*); 3,14–3,11 (m, 2H, *piperidin*); 1,71–1,53 (m, 18H, *piperidin*).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,20; 152,09; 142,01; 116,10; 115,46; 67,73; 64,09; 54,96; 45,58; 45,13; 25,84; 25,49; 24,22; 22,72; 21,79.

3.1.4.27. *Sinteza 5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (27)*

Spoj **27** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **V**, a amin je 1-amino-adamantan. Dobiven je žuti prah (39,56 mg, 20 %). HRMS: izračnato teorijski 526,3281, određeno 526,3300. HPLC čistoća produkta: 96 %. $T_{\text{i}}=153,8$ °C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,12 (d, $J=2,1$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,96 (t, $J=2,3$ Hz; 1H, H_{arom}); 5,40 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, CHOH); 3,62–3,41 (m, 8H, *piperidin*); 3,29–3,17 (m, 1H, CH); 2,98 (t, $J=11,3$ Hz; 1H, *adamantan-1-ilamin*); 2,20–1,94 (m, 10H, *adamantan-1-ilamin*); 1,74–1,54 (m, 18H, *adamantan-1-ilamin*, *piperidin*).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,21; 152,09; 142,02; 116,12; 115,64; 67,33; 64,09; 54,95; 45,55; 45,14; 25,85; 25,50; 24,23; 22,72; 21,79.

3.1.4.28. *Sinteza 5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorida (28)*

Spoj **28** pripremljen je prema postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **V**, a amin je 1-fenil-etilamin. Dobiven je narančasto ulje (23 mg, 10 %). HPLC čistoća produkta: 88 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,34–7,31 (m, 2H, H_{arom}); 7,29–7,28 (m, 2H, H_{arom}); 7,05 (t, $J=2,1$ Hz; 2H, H_{arom}); 6,92 (s, 1H, H_{arom}); 5,25 (dd, $J=6,1$; 12,2 Hz, 1H, CHOH); 3,94 (s, 4H, *piperidin*); 3,85 (s, 4H, *piperidin*); 3,68 (t, $J=6,92$ Hz, 2H, *piperidin*); 3,47 (t, $J = 6,34$ Hz, 2H, *piperidin*).

3.1.4.29. *Sinteza 5-[2-cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil) karbamat)-hidroklorida (29)*

Spoj **29** pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.4. Polazni biskarbamat je spoj **VI**, a kao amin korišten je cikloheksilamin. Dobiveno je žuto ulje (22,46 mg, 8 %). HRMS: izračunato teorijski 518,2655, određeno 518,2632. HPLC čistoća produkta: 97 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,37 (t, $J=7,8$ Hz, 4H, H_{arom}); 7,31 (d, $J=8.0$ Hz, 4H, H_{arom}), 7,26–7,20 (m, 3H, H_{arom}), 7,11–7,00 (m, 2H, H_{arom}), 5,30 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, CHOH), 3,37 (br s, 6H, *adamantan-1-ilamin*), 3,20 (d, $J=12.3$ Hz, 1H, CH_3), 3,00–2,90 (m, 2H, CH_3), 2,11 (t, $J=14.5$ Hz, 2H, *cikloheksilamin*), 1,83–1,75 (m, 2H, *cikloheksilamin*), 1,65–1,44 (m, 4H, *cikloheksilamin*), 1,30–1,10 (m, 4H, *cikloheksilamin*).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$: 153,73; 151,74; 142,48; 129,10; 126,82; 126,09; 116,19; 115,27; 68,30; 58,41; 52,38; 38,24; 29,14; 24,73; 24,38.

3.1.4.30. *Sinteza 5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)-etil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamat)-hidroklorida (30)*

Spoj **30** pripremljen je prema općenitom postupku 3.1.4. Polazni biskrabamat je spoj **VI**, a kao amin korišten je piperidin. Dobiveno je žuto ulje (36mg, 27 %). HPLC čistoća produkta: 91 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz), $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$: 7,40 (t, $J=7,8$ Hz, 4H, H_{arom}); 7,33 (br s, 3H, H_{arom}), 7,26–7,22 (m, 4H, H_{arom}), 7,01 (s, 1H, H_{arom}), 4,92, (s, 1H, OH), 3,44 (br s, 4H, piperidin), 2,85 (br s, 2H, piperidin), 2,66–2,52 (m, 3H, CH_3), 1,78 (s, 4H, piperidin), 1,53 (s, 2H, piperidin), 1,30–1,23 (m, 2H, piperidin).

3.2. Inhibicija ljudskih kolinesteraza

3.2.1. Enzimi

Kao izvor kolinesteraza korištena je ljudska krv. Izvor acetilkolinesteraze (AChE) bili su hemolizirani ljudski eritrociti, dok je izvor butirilkolinesteraze (BChE_{UU}) bila nativna ljudska plazma. Uzorci krvi dobiveni su od zdravih donora na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska, kojima je ranije određen fenotip na temelju različitog stupnja inhibicije specifičnim inhibitorima: dibukain-hidrokloridom, natrijevim fluoridom i Ro 02-0683. Svaku inačicu definira raspon inhibicijskih brojeva koji predstavljaju stupanj inhibicije enzima specifičnim inhibitorima izraženim u postocima. ^[71, 73, 74] Krv je uzorkovana u heparizirane epruvete koje su potom centrifugirane tijekom 20 minuta (2,5 rpm) kako bi se plazma i eritrociti odvojili. Plazma je potom odvojena, a eritrociti su dvaput isprani i na kraju razrijeđeni fosfatnim puferom ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) do volumena pune krvi. Tako pripremljeni eritrociti su smrzavani na $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi hemolizirali. Uzorci atipične BChE (BChE_{AA}) dobiveni su od dr. sc. Oksane Lockridge (University of Nebraska Medical Centre, Eppley Institute, Omaha, SAD). Razrjeđenja enzima rađena su neposredno prije izvođenja pokusa u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 7,4.

3.2.2. Pufer, supstrati i reagensi

U svim pokusima korišten je $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen titracijom $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina soli Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i NaH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska), pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Za određivanje pH korišten je pH-metar SevenEasy pH s InLab[®] 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

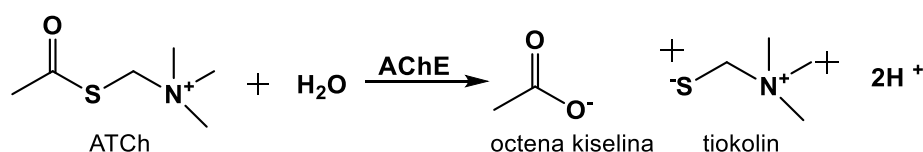
Kao supstrat za hAChE korišten je acetiltiokolinov jodid (ATCh; Sigma Aldrich, SAD), dok je propioniltiokolinov jodid (PTCh; Sigma Aldrich, SAD) korišten kao supstrat za hBChE_{UU} i hBChE_{AA}. Ishodne otopine supstrata, $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ za ATCh i $c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ za PTCh, pripremane su u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa. Reagens DTNB (5,5'-ditiobis-2-

nitrobenzojeva kiselina) (*Sigma*, SAD) priređivan je kao 3,0 mmol dm⁻³ otopina u fosfatnom puferu. Otopina je čuvana na 4 °C do tri dana. Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

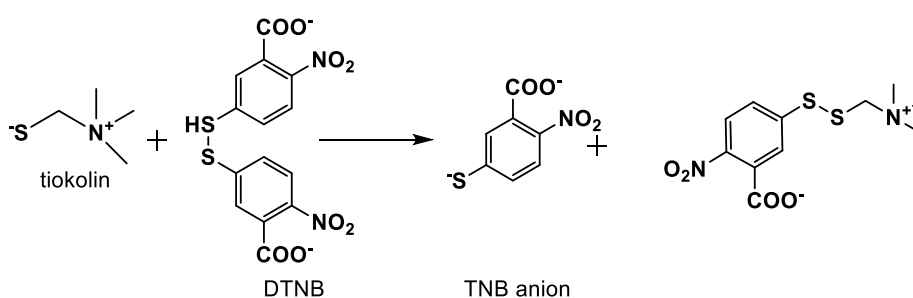
3.2.3. Mjerenje aktivnosti kolinesteraza

Aktivnost kolinesteraza, AChE, BChE_{UU} i BChE_{AA}, praćena je spektrofotometrijski primjenom Ellmanove metode koristeći DTNB kao tiolni reagens. ^[141] Enzimskom hidrolizom supstrata (ATCh ili PTCh) nastaje tiokolin (TCh) koji reagira s 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojevom kiselinom), DTNB, pri čemu nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻) (**Shema 3.1.**) što je popraćeno pojavom žutog obojenja reakcijske smjese. Porast apsorbancije TNB⁻ aniona u vremenu proporcionalan je aktivnosti enzima ^[141, 142], a prati se pri valnoj duljini od 412 nm za BChE odnosno na 436 nm za AChE ($\epsilon_M = 13,6 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A)



B)



Shema 3.1. Ellmanova metoda: enzimskom hidrolizom acetiltiokolina oslobađa se tiokolin (A) koji potom reagira s DTNB-om (B) pri čemu se oslobađa žuti anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻).

Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti enzima sadržavala je DTNB, fosfatni pufer i enzim, dok je odgovarajući supstrat dodavan neposredno prije mjerenja. Konačna razrjeđenja

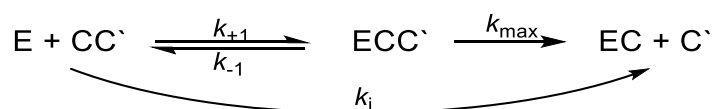
AChE bila su 500-600 puta ovisno o uzorku, a BChE 300-400 puta za uobičajenu, odnosno 150-200 puta za atipičnu inačicu BChE. Mjerenja aktivnosti rađena su prema slijepoj probi koja je sadržavala vodu, BChE_{UU} ili BChE_{AA} DTNB, PTCh i pufer u slučaju BChE_{UU} ili BChE_{AA}, odnosno vodu, AChE, DTNB, pufer i ATCh u slučaju AChE. Konačna koncentracija ATCh bila je 1 mmol dm⁻³, dok je konačna koncentracija PTCh bila 4 mmol dm⁻³. Konačna koncentracija DTNB-a bila je 0,3 mmol dm⁻³. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 1 mL. Mjerenje aktivnosti započeto je otprilike 10 sekundi nakon dodatka supstrata i trajalo je jednu minutu. Kod svih mjerenja promjena apsorbancije, $\Delta A/\text{min}$, bila je linearna s vremenom.

Sva mjerenja provedena su na spektrofotometrima CARY 3 ili CARY 300 (*Varian Inc*, Australija) s termostatiranim kućištem pri 25 °C u kivetama s optičkim putem od 1 cm.

3.2.4. Mjerenje brzine progresivne inhibicije

Progresivna inhibicija određena je mjerenjem vremenske ovisnosti inhibicije kolinesteraza biskarbamatima. U reakcijsku smjesu koja je sadržavala DTNB, pufer i enzim dodan je inhibitor, a nakon određenog vremena inkubacije dodan je i supstrat čime je inhibicija zaustavljena te je mjerena preostala aktivnost enzima. Konačne koncentracije biskarbamata bile su u rasponu od 5-100 000 nmol dm⁻³, ovisno o biskarbamatu.

Progresivna inhibicija kolinesteraza karbamatima opisana je **shemom 3.2.**:



Shema 3.2. Progresivna inhibicija kolinesteraza biskarbamatima

gdje E, CC', ECC', EC i C' označavaju slobodan enzim, inhibitor, Michaelisov tip kompleksa enzima i inhibitora, karbamilirani enzim i monokarbamat, redom.

Oznake k_{+1} i k_{-1} predstavljaju konstante brzina reakcije asocijacije, odnosno disocijacije Michaelisovog tipa kompleksa enzima i biskarbamata ($[\text{E}][\text{CC}']$), k_{max} predstavlja maksimalnu

konstantu brzine inhibicije prvog reda, dok k_i označava sveukupnu konstantu brzine inhibicije drugog reda.

Shemu **3.2.** opisuje jednadžba (1):

$$\ln \frac{[E]_0}{[E]_0 - [EC]} = \frac{k_{max} \cdot [CC^*]}{K_i + [CC^*]} \cdot t_i \quad (1)$$

gdje $[E]_0$ predstavlja ukupnu koncentraciju enzima koja je proporcionalna aktivnosti enzima u odsutnosti inhibitora, v_0 . Razlika $[E]_0 - [EC]$ proporcionalna je aktivnosti enzima (v) preostaloj nakon vremena inhibicije t_i . Zbog toga se jednadžba (1) može zapisati u obliku:

$$\ln \frac{v_0}{v} = \frac{k_{max} \cdot [CC^*]}{K_i + [CC^*]} \cdot t_i = k_{obs} \cdot t_i \quad (2)$$

Konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa, K_i , definirana je sljedećom jednadžbom:

$$K_i = \frac{k_{-1} + k_{max}}{k_{+1}} \quad (3)$$

Ako je $k_{max} \ll k_{-1}$ tada K_i predstavlja konstantu disocijacije Michaelisova tipa kompleksa [EAB].

Iz jednadžbe (2) proizlazi kako je $\ln(v_0/v)$ linearno proporcionalan s vremenom inhibicije (t_i). Nagib pravca predstavlja prividnu konstantu brzine inhibicije prvog reda za određenu koncentraciju inhibitora, k_{obs} :

$$k_{obs} = \frac{k_{max} \cdot [CC^*]}{K_i + [CC^*]} \quad (4)$$

Sveukupna konstanta brzine inhibicije (k_i) određuje se iz ovisnosti konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji inhibitora. Kada ta ovisnost nije linearna, progresivna inhibicija slijedi jednadžbu (1) te se konstante k_{max} i K_i određuju prema jednadžbi (4), a njihov omjer daje sveukupnu konstantu inhibicije:

$$k_i = \frac{k_{max}}{K_i} \quad (5)$$

Kada je $[CC'] \ll K_i$, koncentracija Michaelisovog kompleksa je zanemarivo mala, pa se jednažba (2) pojednostavljuje:

$$\ln \frac{v_0}{v} = \frac{k_{max} \cdot [CC']}{K_i + [CC']} \cdot t_i = k_i \cdot [CC'] \cdot t_i \quad (6)$$

Nagib pravca predstavlja konstantu brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}). Tada nije moguće izračunati pojedinačne konstante k_{max} i K_i te vrijedi odnos:

$$k_{obs} = k_i \cdot [CC'] \quad (7)$$

u kojemu nagib pravca predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije k_i .

3.2.5. Mjerenje brzine spontane dekarbamilacije

Brzina spontane dekarbamilacije određena je praćenjem vremenskog tijeka povratka aktivnosti karbamiliranih kolinestereaza. AChE, BChE_{UU} ili BChE_{AA} su najprije 60 minuta inkubirane s 100 mmol dm⁻³ biskarbamatom kako bi se postigla 90 – 100 % inhibicije enzima. ^[143] Suvišak biskarbamata potom je uklonjen filtracijom smjese kroz filtracijske kolonice (Strata® C18-E, *Phenomenex*, Torrance, SAD) čime je započeta spontana dekarbamilacija karbamiliranih enzima. Usporedno s inhibiranim probama na isti način su pripremljene i mjerene aktivnosti kontrolnih proba koje su sadržavale sve komponente kao i odgovarajuće inhibirane probe izuzev inhibitora. U određenim vremenskim razmacima (0 – 8 h) od početka dekarbamilacije, alikvoti inhibiranog enzima su dodani u reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti enzima koja je sadržavala pufer i DTNB. Mjerenje aktivnosti dekarbamiliranog enzima započeto je dodatkom supstrata ATCh za AChE (konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³) ili PTCh za BChE_{UU} i BChE_{AA} (konačne koncentracije 4 mmol dm⁻³) i trajalo je dvije minute. Tijekom mjerenja, kod svih uzoraka promjena apsorbancije bila je linearna s vremenom. Identičan postupak proveden je i s neinhibiranim uzorkom enzima. Spontana dekarbamilacija i kontrolna aktivnost enzima praćene su pri 22 °C kroz najviše 8 h tijekom kojih je kontrolna aktivnost enzima bila stabilna.

Konstanta brzine spontanog povratka aktivnosti enzima tj. konstanta brzine dekarbamilacije (k_{dekarb}) izračunata je prema jednadžbi:

$$\ln\left[1 - \frac{v_t}{v_0}\right] = -k_{\text{dekarb}} \cdot t$$

gdje je v_0 označava aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora, a v_t aktivnost enzima u vremenu t proteklom nakon početka spontane dekarbamilacije. Nagib pravca predstavlja $-k_{\text{dekarb}}$. [144, 145]

3.2.6. Obrada rezultata

Za računanje svih kinetičkih parametara, kao i za izradu grafičkih prikaza korišten je statistički paket GraphPadPrism (*Graph Pad Inc*, San Diego, SAD). Strukturne i 3D formule supstrata i inhibitora su izrađene u programskom paketu ChemDraw Ultra 21.0 (*CambridgeSoft*, SAD).

3.3. Kelatiranje biometala biskarbamatima

3.3.1. Kemikalije

Bakrov(II) klorid dihidrat, cinkov klorid, željezov (II) klorid tetrahidrat i metanol nabavljeni su iz komercijalno dostupnih izvora (*Sigma Aldrich*, St. Louise, SAD). Kloridi i biskarbamati otopljeni su u metanolu neposredno prije pokusa kako bi se dobile otopine množinske koncentracije 100 mmol dm^{-3} .

3.3.2. Procjena kelatacijske sposobnosti biskarbamata

Kelatacijski učinak novo sintetiziranih biskarbamata određen je na temelju promjena u spektrima biskarbamata nastalih nakon miješanja s biometalima.^[146] Snimani su spektri kompleksa metal-biskarbamat u 1., 30. i 60. minuti nakon miješanja biskarbamata i metala, te zasebni spektri biskarbamata i odgovarajućeg metala u rasponu valnih duljina od 200 do 600 nm. Koncentracija metala bila je $60 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a biskarbamata $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Promjene u spektru biskarbamata nastale nakon miješanja biskarbamata i metala u odnosu na spektre samih biskarbamata i biometala, ukazuju na nastanak kompleksa biskarbamat-biometal i potvrđuju se diferencijalnim spektrima. Diferencijalni spektri dobiveni su numeričkim oduzimanjem spektara biskarbamata i biometala od spektra kompleksa metal-biskarbamat.

3.3.3. Stehiometrija kompleksa biskarbamat-biometal

Kako bi se odredila stehiometrija kompleksa biskarbamat-biometal, korištena je metoda molarnih omjera.^[147, 148] Molarni odnosi biskarbamata i metala bili su u rasponu od 0,1 do 0,9.

Koncentracija biskarbamata bila je $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Apsorbancije kompleksâ je mjerena na 245 nm budući da je na toj valnoj duljini opažen maksimum apsorbcije nastao kao posljedica formiranja kompleksa metal-biskarbamat. Stehiometrija kompleksa biskarbamat-biometal određena je iz grafičkog prikaza ovisnosti apsorbcije kompleksa u ovisnosti o molarnim omjerima biskarbamata i biometala. Točka sjecišta dvaju pravaca u grafičkom prikazu odgovara optimalnom molarnom udjelu biskarbamata u kompleksu biskarbamat-biometal.

Sva mjerenja izvedena su na spektrofotometru CARY 300 (*Varian Inc*, Australija) s termostatiranim kućištem pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u kvarcnim kivetama s optičkim putem od 1 cm.

3.4. Procjena mogućnosti prolaska biskarbamata kroz krvno-moždanu barijeru (BBB)

Sposobnost sintetiziranih biskarbamata da prođu krvno-moždanu barijeru (eng. *Blood-brain barrier*, BBB) procijenjena je usporedbom izračunatih fizikalno kemijskih svojstava biskarbamata^[149-151]: logaritma koeficijenta raspodjele oktanol/voda (clogP), molekulske mase (M_r), polarne površine (eng. *polar surface area*; PSA), broja donora vodikovih veza (eng. *hydrogen bond donor*; HBD), broja akceptora vodikovih veza (eng. *hydrogen bond acceptor*; HBA) i molekulske fleksibilnosti koju karakterizira broj rotirajućih veza (eng. *rotational bond*; RB) s preporučenim graničnim vrijednostima fizikalno-kemijskih svojstava potrebnih za prolazak spoja kroz krvno moždanu barijeru. Preporučene granične vrijednosti temelje se na fizikalno-kemijskim svojstvima lijekova za koje je poznato da prolaze kroz BBB.^[149-152] Fizikalno-kemijska svojstva biskarbamata izračunata su pomoću platforme Chemicalize 2018.
[152, 153]

3.5. Molekulsko pristajanje

Za predviđanje smještanja biskarbamata u aktivno mjesto BChE_{UU} i AChE korištena je *in silico* metoda molekulskog pristajanja (engl. *molecular docking*) pri čemu su kao receptori korištene kristalne strukture slobodnih kolinesteraza dostupne u podatkovnoj bazi PDB (engl. *Protein data bank*); za BChE_{UU} je korištena struktura 1P0I [6], a za AChE struktura 4EY4. [154] Prije pokretanja postupka molekulskog pristajanja, biskarbamati su nacrtani u ChemBio3D Ultra 21.0 (*PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA*) i pomoću protokola Prepare Ligands u Biovia Discovery Studio v18.1. programskom paketu (*Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Francuska*) pripremljeni za molekulsko pristajanje s obzirom na moguća različita protonacijska stanja, izomere i tautomere pri pH 7,4. Biskarbamatima je minimizirana energija korištenjem CHARMM polja sila i Smart Minimizer metode minimizacije pomoću protokola Minimize Ligands implementiranog u Biovia Discovery Studio-u. Također, prije pokretanja postupka molekulskog modeliranja, pripremljeni su i enzimski receptori što je uključivalo definiranje mjesta vezanja unutar kristalnih struktura AChE i BChE_{UU}. Mjesto vezanja definirano je sferom koja okružuje aminokiselinske ostatke koji omeđuju ždrijelo aktivnog mjesta enzima ($r = 13 \text{ \AA}$ za BChE_{UU} i $r = 14 \text{ \AA}$ za AChE). Superpozicijom mreža molekula vode iz kristalnih struktura različitih BChE_{UU} i AChE kompleksa dostupnih u PDB bazi podataka identificirane su konzervirane molekule vode i preslikane u kristalne strukture BChE_{UU} i AChE korištene kao receptor u molekulskom pristajanju. Molekulsko pristajanje provedeno je programom Biovia Discovery Studio Client pokretanjem Flexible Docking protokola [156] implementiranog u Biovia Discovery Studio-u. Kao fleksibilne aminokiseline koje omeđuju ždrijelo aktivnog mjesta odabrane su: Tyr72, Trp86, Tyr124, Tyr133, Ser203, Trp236, Trp286, Phe297, Phe297, Glu334, Tyr337, Phe338, Tyr341, His447 i Tyr449 u slučaju AChE te Asn68, Asp70, Trp82, Gln119, Tyr128, Glu198, Ser198, Pro285, Leu286, Ser287, Trp231, Glu325, Phe329, Phe398 i His438 u slučaju BChE_{UU}. Korišteni protokol uključuje sljedeće korake: izračunavanje konformacija enzima pomoću ChiFlex algoritma, stvaranje konformacija biskarbamata, pristajanje biskarbamata u aktivno mjesto enzima pomoću LibDock algoritma, klsterska analiza poza biskarbamata dobivenih pristajanjem kako bi se uklonile slične poze, re-izgradnja

konformacija enzima optimiziranjem odabranih aminokiselinskih ostataka u prisutnosti rigidnih biskarbamata pomoću ChiRotor algoritma, i konačno optimiziranje orijentacije biskarbamata pomoću CDOCKER algoritma. Na kraju su za svaku konačnu pozu biskarbamata izračunate CHARMM energija (zbroj interakcijske energije i energije napetosti liganda) i interakcijska energija. Poze su sortirane prema CHARMM energiji počevši od negativnijih, tj. povoljnijih za vezanje, prema manje negativnima. Reprezentativna poza svakog biskarbamata odabrana je na temelju najvišeg rezultata dobivenog korištenjem protokola Consensus Score, a na temelju ocjena različitih funkcija koje procjenjuju afinitet vezanja implementiranih u Score Ligand Poses protokolu.

3.6. Citotoksičnost biskarbamata

3.6.1. Kemikalije, mediji i stanične linije

Ispitivanje toksičnosti novo sintetiziranih biskarbamata provedeno je na staničnim linijama ljudskih neuroblastoma SH-SY5Y (ECACC 94030304; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska), ljudskih hepatocita HepG2 (ATCC HB8065; *American Type Culture Collection*, SAD) i ljudskim embrionalnim stanicama bubrega HEK293 (ECACC 85120602; *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, Engleska). Sve stanice uzgajane su pri kontroliranim uvjetima (5 % parcijalni tlak ugljičnog dioksida, pCO₂, i temperaturi 37 °C) i u odgovarajućim medijima. Za odvajanje stanica od podloge koristila se otopina 0,25 % tripsina i EDTA (*Sigma-Aldrich*, SAD), nakon čega su stanice re-suspendirane i dan prije pokusa nasadene u mikrotitarske pločice.

Za ispitivanje citotoksičnosti koristio se tzv. MTS reagens koji sadrži 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevu sol (MTS) i fenazin-metosulfat (PMS). PMS prenosi elektron s NADH u citoplazmu kako bi se MTS reducirao u formazan topiv u vodi. (*Promega*, Madison, SAD). Otopine MTS-a (2 mg dm⁻³) i PMS-a (0,92 mg dm⁻³) pripravljene su u PBS-u (engl. *Phosphate-Buffered Saline*; Kemika, Hrvatska) i čuvane na -20 °C do pokusa. Na dan pokusa pripremana je radna otopina MTS reagensa koja je sadržavala PMS: MTS: PBS= 1:20:120.

3.6.2. Određivanje citotoksičnosti biskarbamata nakon 24 h

Citotoksičnost biskarbamata ispitana je kolorimetrijski pomoću MTS testa prema protokolu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (*Promega*, SAD) koji se zasniva se na činjenici da se MTS tetrazolijev spoj (Owenov reagens) žute boje u živim stanicama reducira u smeđe-ljubičasto obojani formazanski produkt pomoću nikotinamid-adenin-

dinukleotid-fosfata (NADPH) ili nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH), spojeva koji nastaju u metabolički aktivnim stanicama u reakcijama kataliziranim dehidrogenazama. Porast koncentracije formazanskog produkta proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica, a praćen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska).

Dan prije eksperimenta, na mikrotitarske pločice s 96 jažica, nasadeno je približno 20 000 stanica po jažici. Drugi dan, nakon što je aspiriran stanični medij, u jažice su dodane otopine spojeva u odabranom rasponu koncentracija (5-800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Stanice su zatim inkubirane tijekom 24 sata pri kontroliranim uvjetima (5 % pCO₂ i temperaturi 37 °C). Nakon inkubacije, stanice su isprane PBS puferom, dodan je čisti medij i MTS reagens te su vraćene u inkubator. Nakon 1 – 4 sata (ovisno o razvoju boje) očitana je apsorbancija pri 490 nm za svaku od odabranih koncentracija karbamata.

Rezultati citotoksičnosti su prikazani kao postotak inhibicije staničnog rasta I u odnosu na netretirane kontrolne stanice:

$$I = \left[1 - \frac{A_t}{A_n} \right] \cdot 100\%$$

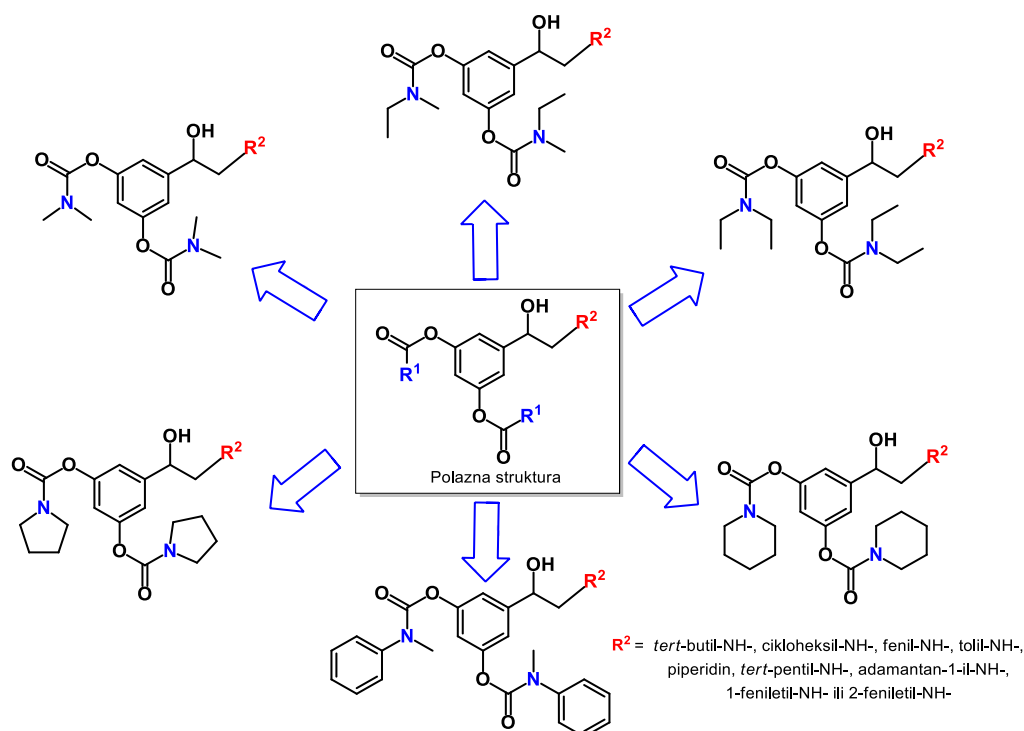
gdje je A_t apsorbancija izmjerena u tretiranih stanica, a A_n apsorbancija izmjerena u netretiranih stanica. Kada je u rasponu testiranih koncentracija bio određen cijeli profil citotoksičnosti, tj. kada je $I = 0 - 100\%$, određena je koncentracija biskarbamata pri kojoj je inhibicija staničnog rasta bila 50 % (IC_{50}) pomoću jednadžbe za sigmoidalnu ovisnost korištenjem Prism8 softvera (*GraphPad Software*, San Diego, SAD).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

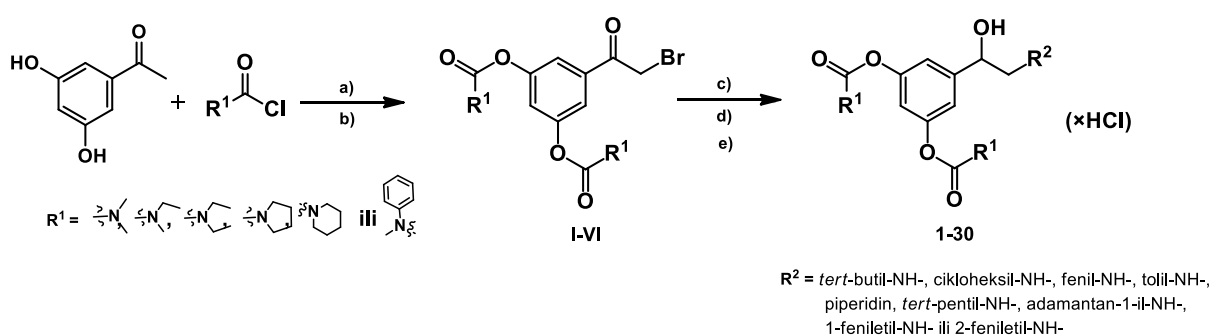
4.1.1. Dizajn i sinteza biskarbamata

U dizajnu spojeva kao strukturna osnova korišten je bambuterol, dimetilni biskarbamat s karbamatnim skupinama u položajima 1' i 3' na benzenskoj jezgri i 1-hidroksi-2-aminoetilnim lancem na položaju 5'. Dizajnirani su biskarbamati sa različitim alifatskim, cikličkim i aromatskim supstituentima na atomima dušika karbamatnih skupina i atomu dušiku 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca molekule. Općenite strukture dizajniranih bis(dimetilnih), bis(etilmetilnih), bis(dietilnih), bis(pirolidinskih), bis(piperidinskih) i bis(fenilmetilnih) analoga bambuterola s različitim supstituentima na atomu dušiku 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca: *tert*-butilom, cikloheksilom, *p*-metilfenilom, piperidinom, fenilom, *tert*-pentilom, adamantan-1-ilom, 1-feniletinom ili 2-feniletinom prikazane su na **Shemi 4.1**.



Shema 4.1. Općenite strukturne formule dizajniranih biskarbamata s prikazanim supstituentima na atomima dušika karbamatnih skupina

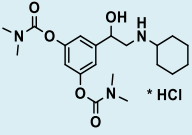
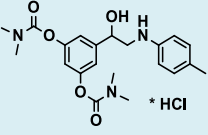
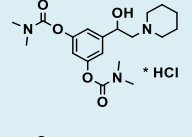
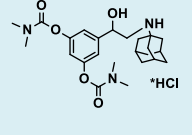
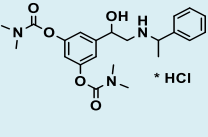
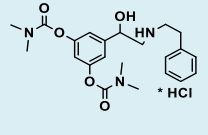
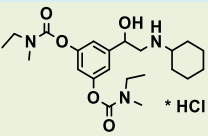
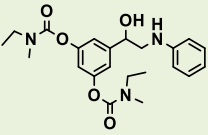
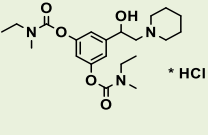
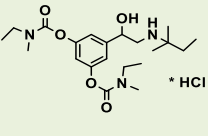
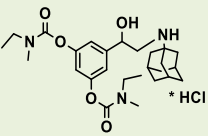
Dizajnirani biskarbamati su sintetizirani sintetskim putem koji se sastojao od pet koraka, prikazanim na **Shemi 4.2**. Prvi korak sinteze bio je karbamilacija 3,5-dihidroksiacetofenona karbamoil-kloridima kako bi se dobili odgovarajući biskarbamati. Idući stupanj sinteze je adicija broma na α -položaj u odnosu na keto-skupinu biskarbamata kojom je dobiven biskarbamatni α -bromketon (spojevi **I-VI**). Redukcijom keto-skupine α -bromketona u sljedećem koraku sinteze nastaje β -bromalkohol. Reakcijom nukleofilne supstitucije između β -bromalkohola i odgovarajućeg amina nastaju ciljani biskarbamati β -aminoalkohola. Zadnji stupanj sinteze bio je hidrokloriranje biskarbamatnog β -aminoalkohola kojim su dobiveni hidrokloridi biskarbamata (spojevi **1-30**).

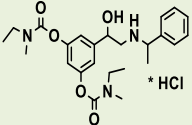
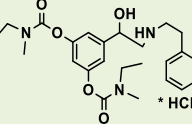
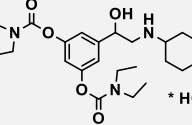
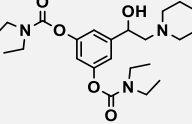
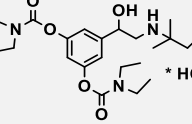
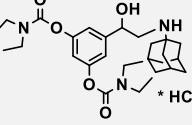
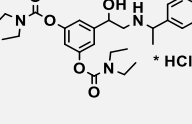
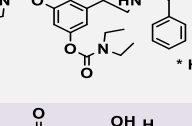
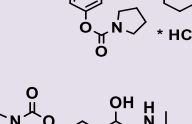
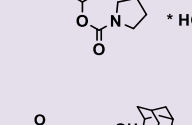
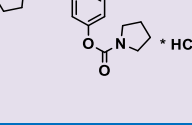


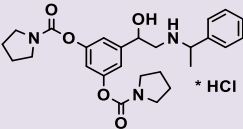
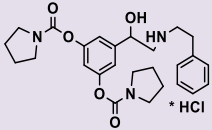
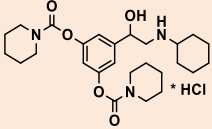
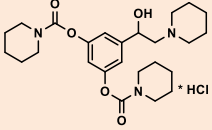
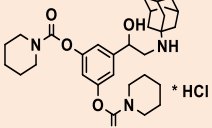
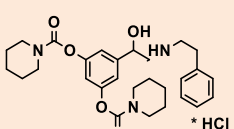
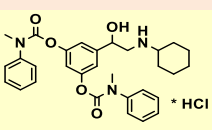
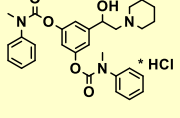
Shema 4.2. Shematski prikaz sinteze biskarbamata **1-30**: a) trietilamin, 4-(dimetilamino) piridin, 1,2-dikloretran, 60-65 °C; b) CuBr_2 , etil acetat: kloroform=1:1, 60 °C; c) NaBH_4 , metanol, diklormetan; d) izopropanol, 60-80 °C; e) HCl u izopropanolu, 60 °C.

Sintetizirano je ukupno 30 biskarbamata (**Tablica 4.1.**): 6 bis(dimetilnih), 7 bis(etilmetilnih), 6 bis(dietilnih), 4 bis(pirolidinska), 4 bis(piperidinska) te 2 bis(fenilmetilna) karbamata (**Tablica 4.1.**).

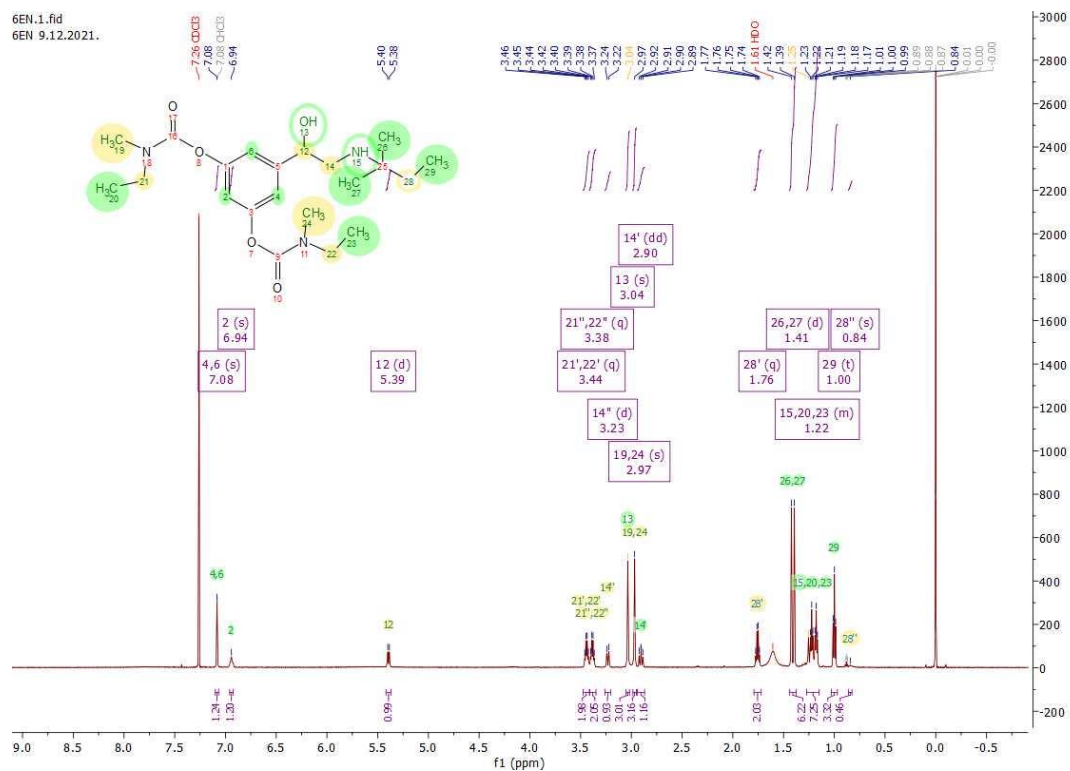
Tablica 4.1. Strukture sintetiziranih biskarbamata

Oznaka spoja	Struktura	Naziv
1		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
2		5-[1-hidroksi-2-(4-tolilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
3		5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
4		5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
5		5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
6		5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dimetilkarbamat)-hidroklorid
7		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid
8		5-[2-(fenilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)
9		5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid
10		5-[1-hidroksi-2-(<i>tert</i> -pentilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid
11		5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid

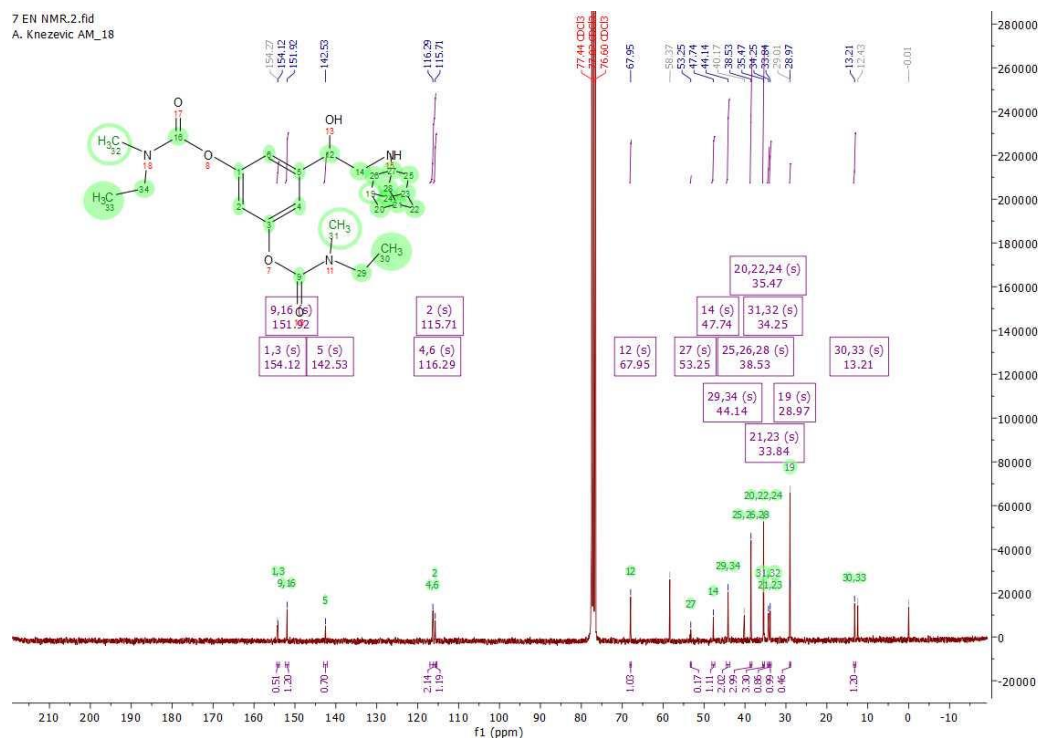
12		5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid
13		5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(etil(metil)karbamat)-hidroklorid
14		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorid
15		5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)
16		5-[1-hidroksi-2-(<i>tert</i> -pentilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorid
17		5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorid
18		5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorid
19		5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(dietilkarbamat)-hidroklorid
20		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
21		5-[1-hidroksi-2-(<i>tert</i> -pentilamino)etil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
22		5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid

23		5-[2-((1-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
24		5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(pirolidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
25		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
26		5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
27		5-[2-(adamantan-1-ilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
28		5-[2-((2-fenil)etilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(piperidin-1-ilkarboksilat)-hidroklorid
29		5-[2-(cikloheksilamino)-1-hidroksietil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamat)-hidroklorid
30		5-[1-hidroksi-2-(piperidin-1-il)etil]-1,3-fenilen-bis(fenil(metil)karbamat)-hidroklorid

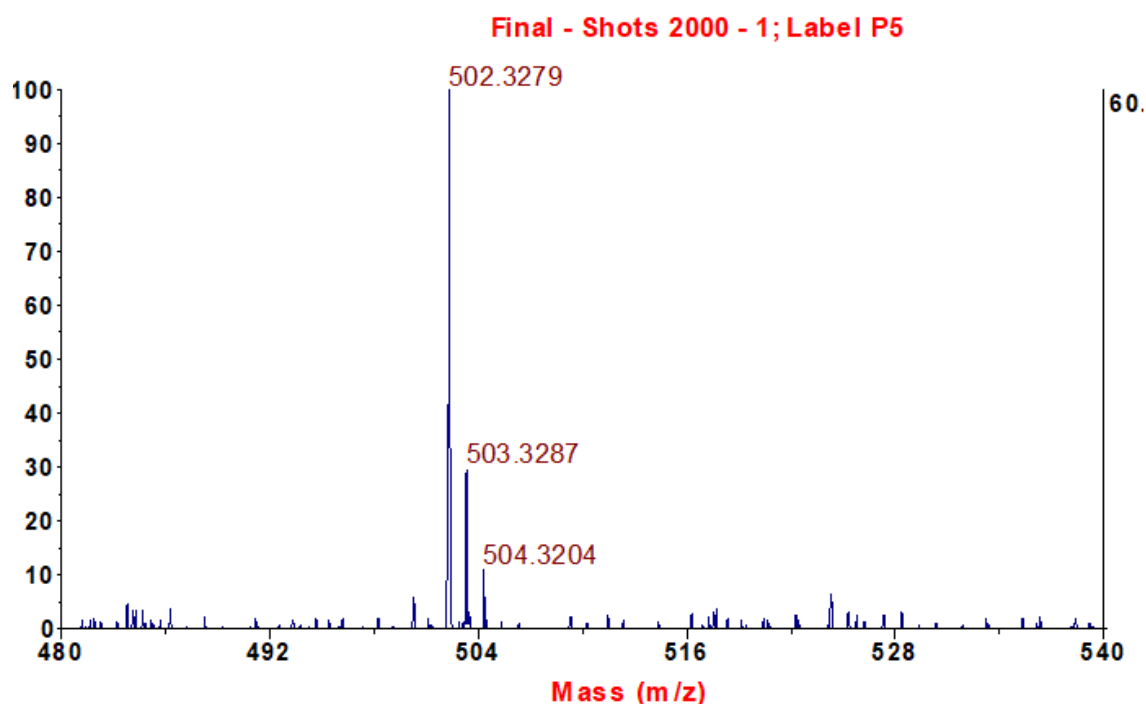
Novo sintetiziranim spojevima struktura je potvrđena NMR (^1H i ^{13}C) i HRMS spektrima. Primjeri ^1H , ^{13}C i HRMS spektra prikazan je na **Slikama 4.1., 4.2. i 4.3.**, redom. Čistoća novo sintetiziranih biskarbamata određena je HPLC metodom i bila je u rasponu od 85 do 99 %, ovisno o spoju.



Slika 4.1. ¹H NMR spektar spoja 11 s označenim protonima



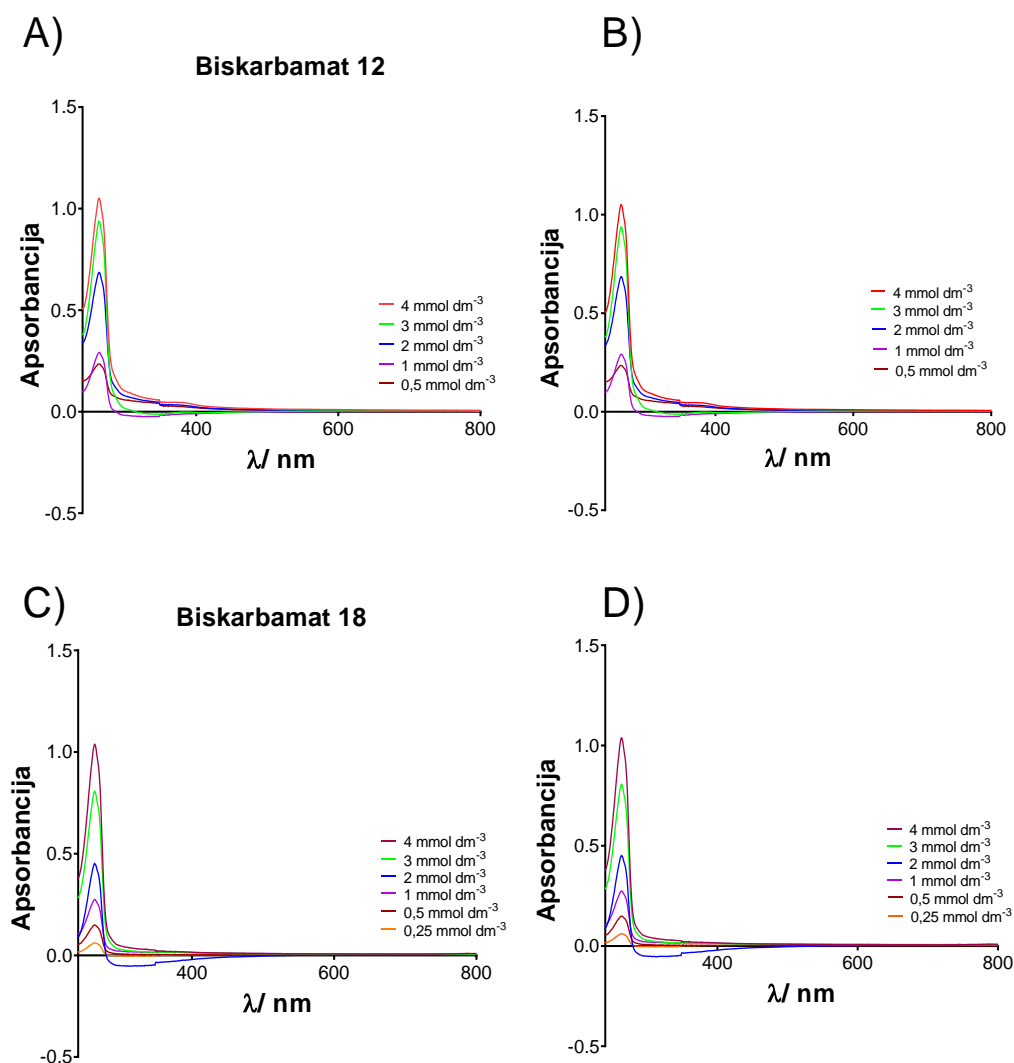
Slika 4.2. ¹³C NMR spektar spoja 12 s označenim ugljicima



Slika 4.3. HRMS spektar spoja 17 području m/z 480 – 540

4.1.2. Stabilnost spojeva u vodi

Budući da su ishodne otopine biskarbamata pripremane u vodi, svim sintetiziranim karbamatima određena je stabilnost u vodenoj otopini. U tu svrhu snimani su apsorpcijski spektri za najmanje pet različitih koncentracija otopina biskarbamata ($0,25 - 4 \text{ mmol dm}^{-3}$) neposredno nakon otapanja spojeva, te u periodu do najviše mjesec dana, ovisno o spoju. Apсорpcijski spektri snimani su u kvarcnim kivetama, u rasponu od 240 – 800 nm. U promatranom vremenskom periodu svi biskarbamati bili su stabilni (Slika 4.4.).



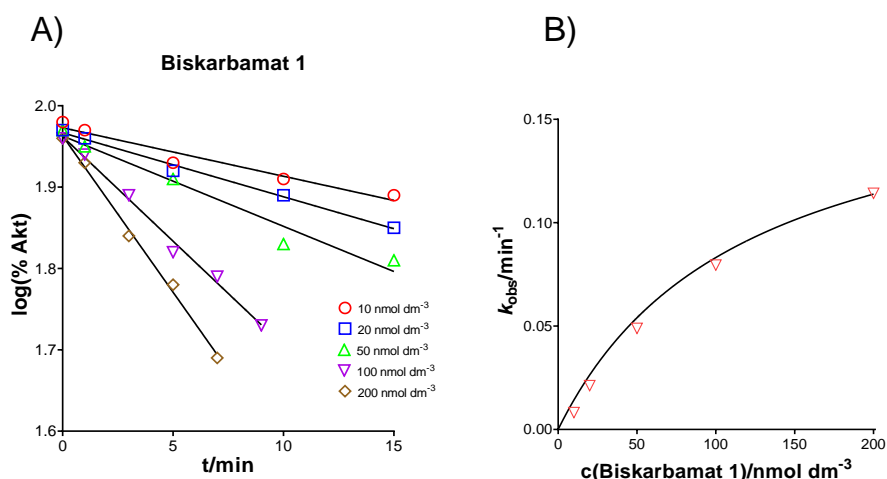
Slika 4.4. Apsorpcijski spektri biskarbamata **12** i **18** otopljenih u vodi A) spektar biskarbamata **12** snimljen neposredno nakon otapanja; B) spektar biskarbamata **12** snimljen mjesec dana nakon otapanja; C) spektar biskarbamata **18** snimljen neposredno nakon otapanja; D) spektar biskarbamata **18** snimljen tjedan dana od otapanja

4.1.3. Inhibicija kolinesteraza biskarbamatima

Progresivna inhibicija kolinesteraza određena je mjerenjem vremenske ovisnosti inhibicije enzima s biskarbamatima. Konstante brzine inhibicije prvog reda za određenu koncentraciju inhibitora (k_{obs}) određene su linearnom regresijskom analizom iz ovisnosti logaritma preostale aktivnosti enzima o vremenu inhibicije. Sveukupne konstante brzine inhibicije (k_i) određene su iz ovisnosti konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji inhibitora. Kada je k_{obs} bila linearna funkcija koncentracije biskarbamata, sveukupne konstante brzine inhibicije (k_i) određene su prema jednadžbi 7, a u slučajevima gdje je odnos konstanta brzine inhibicije prvog reda i koncentracije biskarbamata bio nelinearan, konstanta k_i izračunata je prema jednadžbi 5 te je bilo moguće izračunati i konstante k_{max} i K_i . Od 30 sintetiziranih biskarbamata, za kinetička istraživanja odabrano je njih 25 kojima je čistoća bila najmanje 95 %. Ispitivani karbamati bili su podijeljeni u šest skupina ovisno o supstituentima na atomima dušika karbamatnih skupina. Unutar određene skupine, spojevi su se razlikovali po supstituentu na atomu dušika 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca.

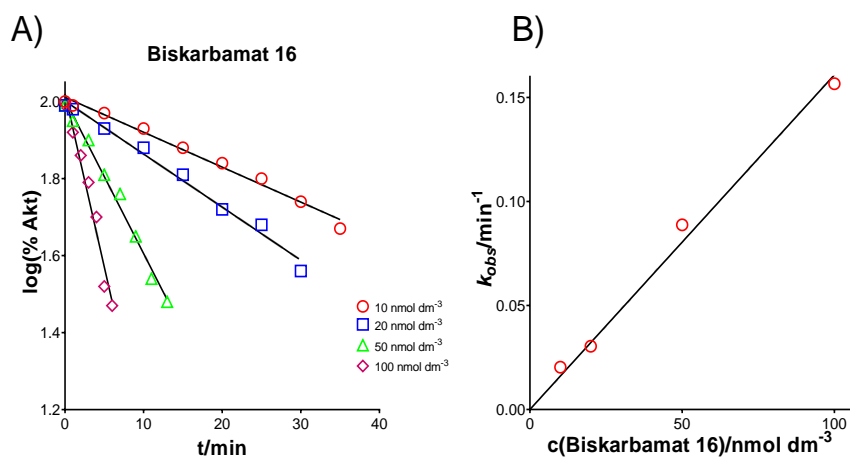
4.1.3.1. Inhibicija butirilkolinesteraze

Za dvadeset dva biskarbamata je ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata bila nelinearna (**Slika 4.5**) te su za te spojeve određene i maksimalna konstanta brzine inhibicije, k_{max} , i konstanta disocijacije kompleksa enzim-biskarbamat, K_i .



Slika 4.5. Progresivna inhibicija BChE_{UU} biskarbamatom **1**: A) ovisnost logaritma postotka preostale aktivnosti o vremenu inhibicije; B) nelinearna ovisnost konstante inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata

Za biskarbamate **16**, **18** i **19** ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata bila je linearna (Slika 4.6.) te su pripadne k_i konstante određene iz nagiba pravca iz grafičkog prikaza ovisnosti k_{obs} o koncentraciji inhibitora.



Slika 4.6. Progresivna inhibicija BChE_{UU} biskarbamatom **16** A) ovisnost logaritma postotka preostale aktivnosti o vremenu inhibicije; B) linearna ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata

Svi ispitivani biskarbamati bili su brzi ili vrlo brzi inhibitori BChE_{UU} s konstantama brzine inhibicije k_i u rasponu od (0,0101 – 38,0) $10^6 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ (Tablica 4.2.). Najbrži inhibitor BChE_{UU} bio je spoj **26** s piperidinom kao supstituentom i na atomima dušika karbamatnih skupina i u 1-hidroksietilnom lancu, čija je konstanta inhibicije ($k_i = 38,0 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$)

bila gotovo 10 puta viša od one za bambuterol.^[43, 45] Biskarbamati **9**, **11** i **21** pokazali su se jednako brzim inhibitorima BChE_{UU} kao i bambuterol, dok je jedanaest spojeva (**1**, **3**, **7**, **10**, **16**, **17**, **20**, **22**, **25**, **27** i **29**) inhibiralo BChE_{UU} oko dva puta sporije u odnosu na bambuterol. Deset biskarbamata (**2**, **4**, **5**, **8**, **12**, **13**, **15**, **18**, **19** i **24**) inhibirale je BChE_{UU} od 46 do oko 3700 puta sporije od bambuterola.^[43, 45]

Tablica 4.2. Konstante inhibicije BChE_{UU}

Biskarbamat	$k_i \cdot 10^6$ [mol ⁻¹ dm ³ min ⁻¹]	K_i [μmol ⁻¹ dm ³]	k_{max} [min ⁻¹]
1	1,54 ± 0,40	0,116 ± 0,027	0,180 ± 0,021
2	0,0202 ± 0,0023	12,9 ± 2,5	0,261 ± 0,026
3	1,74 ± 0,48	0,0754 ± 0,0188	0,131 ± 0,015
4	0,0192 ± 0,0021	27,0 ± 6,5	0,582 ± 0,091
5	0,818 ± 0,034	0,203 ± 0,070	0,166 ± 0,035
7	1,47 ± 0,193	0,485 ± 0,049	0,739 ± 0,057
8	0,0101 ± 0,006	7,92 ± 3,85	0,0806 ± 0,0215
9	3,71 ± 0,84	0,0451 ± 0,0095	0,167 ± 0,014
10	2,28 ± 0,42	0,0485 ± 0,0083	0,110 ± 0,007
11	3,68 ± 1,23	0,115 ± 0,038	0,423 ± 0,293
12	0,238 ± 0,119	1,06 ± 0,35	0,252 ± 0,169
13	0,205 ± 0,052	1,42 ± 0,30	0,292 ± 0,034
15	0,141 ± 0,051	1,02 ± 0,35	0,144 ± 0,029
16	1,64 ± 0,37	–	–
17	2,18 ± 0,52	0,236 ± 0,045	0,514 ± 0,061
18	0,0145 ± 0,0049	–	–
19	0,0144 ± 0,0053	–	–
20	1,05 ± 0,45	0,212 ± 0,078	0,224 ± 0,050
21	4,51 ± 1,52	0,127 ± 0,025	0,571 ± 0,057
22	1,80 ± 0,37	0,378 ± 0,049	0,679 ± 0,062
24	0,191 ± 0,026	1,39 ± 0,38	0,267 ± 0,040
25	2,62 ± 0,97	0,155 ± 0,052	0,399 ± 0,073
26	38,0 ± 6,7	0,0119 ± 0,0030	0,453 ± 0,065
27	1,89 ± 0,59	0,0910 ± 0,0229	0,171 ± 0,019
29	1,63 ± 0,57	0,0622 ± 0,0129	0,101 ± 0,008
Bambuterol*	4,4 ± 0,2	–	–
Rivastigmin	0,0551 ± 0,0022	–	–
Fizostigmin	2,80 ± 0,940	250 ± 24,0	0,612 ± 0,221

*[44, 157]

Detaljnou analizom rezultata inhibicije BChE_{UU} biskarbamatima nije bilo moguće jasno definirati strukturne parametre odgovorne za brzinu inhibicije koji bi omogućili predviđanje inhibicijskog potencijala spojeva iste strukturne osnovice. Naime, usporedbom brzine inhibicije između pojedinih skupina spojeva grupiranih s obzirom na supstituente na atomima dušika karbamatnih skupina, nije uočena korelacija između duljine i/ili veličine supstituenta na atomima dušika karbamatne skupine i brzine inhibicije; od bis(dimetilnih) karbamata najbrži inhibitor BChE_{UU} bio je spoj **3** s $k_i = 1,74 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ (piperidin kao supstituent u 1-hidroksietilnom lancu), najbrži bis(etilmetilni) inhibitor bio je karbamat **9** s $k_i = 3,71 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ (piperidin kao supstituent u 1-hidroksietilnom lancu), dok je najbrži inhibitor od bis(dietilnih) karbamata bio spoj **17** s $k_i = 2,18 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ (adamantan-1-il u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu. Od osam biskarbamata kojima je karbamatni dušik dio cikličkog sustava, najbrži od bis(pirolidinskih) karbamata bio je biskarbamat **21** s $k_i = 4,64 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ s *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, dok je najbrži od bis(piperidinskih) karbamata bio biskarbamat **26** s $k_i = 38,03 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ s piperidinom u 1-hidroksietilnom lancu. Također, unutar određenih skupina nije pronađena korelacija između brzine inhibicije BChE_{UU} i struktureaminskog supstituenta na hidroksiaminoetilnom lancu. Naime, od bis(dimetilnih) karbamata najbrži inhibitor BChE_{UU} bio je spoj **3** s piperidinom u 1-hidroksietilnom lancu, a najsporiji inhibitor bio je spoj **2** s toliolom kao supstituentima u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, dok je kao najbrži bis(etilmetilni) inhibitor bio karbamat **9** s piperidinom u 1-hidroksietilnom lancu, a najsporiji spoj **8** s fenilom kao supstituentima u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu. Najbrži bis(dietilni) inhibitor bio je karbamat **17** adamantan-1-ilom, a najsporiji su bili spojevi **18** i **19** s feniletilnim skupinama u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu. Od biskarbamata kojima je karbamatni dušik dio cikličkog sustava, najsporiji hBChE_{UU} inhibitor bio je bis(pirolidinski) karbamat **24** koji ima 2-feniletilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu.

Na temelju rezultata, za pretpostaviti je kako se manju brzinu inhibicije BChE_{UU} može očekivati s biskarbamatima koji imaju cikličke amine u 1-hidroksietilnom lancu i alifatske skupine na karbamatnom dušiku, budući da su spojevi s fenilom (spoj **8**, **18** i **19**), cikloheksilom (spoj **1**) ili adamantan-1-ilom (spoj **4**) u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu u kombinaciji s alkilnim skupinama na karbamatnom dušiku do 2400 puta sporije inhibirali BChE_{UU} u usporedbi s najbržim inhibitorom BChE_{UU}, spojem **26**.

BChE_{UU} nije pokazala razliku u brzini inhibicije strukturnim izomerima **12** i **13**, ili **18** i **19**, koji se razlikuju u supstituentu na 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu.

Kako recipročna vrijednost konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa, K_i , predstavlja afinitet enzima prema inhibitoru, pa se sporija inhibicija BChE_{UU} biskarbamatima **2**, **4** i **8** može se objasniti niskim afinitetom BChE_{UU} prema tim spojevima. Jednako tako, brža inhibicija biskarbamatima **3**, **9**, **10** i **26** može biti posljedica visokog afiniteta BChE_{UU} prema tim spojevima.

Svi ispitivani biskarbamati su inhibirali ljudsku BChE_{UU} pri nižim koncentracijama nego što su dimetilni i etilmetilni biskarbamati s derivatima *n*-butila u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu inhibirali konjsku BChE. ^[45] Konstanta brzine inhibicije određena ovdje za biskarbamat **11** odgovara vrijednosti koju je ranije odredio Wu. ^[45]

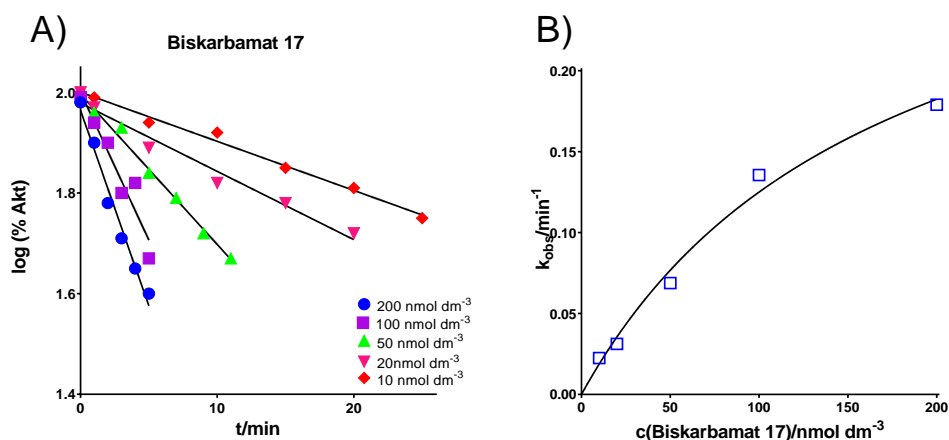
Vrijednost konstante brzine inhibicije kolinesteraza rivastigminom dobivena u ovoj disertaciji za AChE odgovara vrijednosti iz literature, dok je vrijednost dobivena za BChE_{UU} pet puta manja. ^[158] Također, šesnaest biskarbamata (**1**, **7**, **9**, **10**, **11**, **16**, **17**, **20**, **21**, **22**, **25**, **26**, **27** i **29**) ima viši inhibicijski potencijal za BChE_{UU} od rivastigmina te inhibira hBChE od 20 do 690 puta brže od rivastigmina, dok je pet biskarbamata (**5**, **12**, **13**, **15** i **24**) pokazalo jednak inhibicijski potencijal prema BChE_{UU} kao i rivastigmin. Biskarbamati **2**, **4**, **8**, **18** i **19** inhibiraju BChE_{UU} 2 do 5 puta sporije od rivastigmina.

Vrijednost konstante brzine inhibicije kolinesteraza fizostigminom odgovara vrijednostima u literaturi. ^[159, 160] Četiri biskarbamata **9**, **11**, **21** i **26** inhibiraju BChE_{UU} od 2 do 15 puta brže od fizostigmina, tri biskarbamata **10**, **17** i **25** inhibiraju BChE_{UU} jednako brzo kao i fizostigmin, dok ostali biskarbamati inhibiraju BChE_{UU} od 2 do oko 280 puta sporije od fizostigmina.

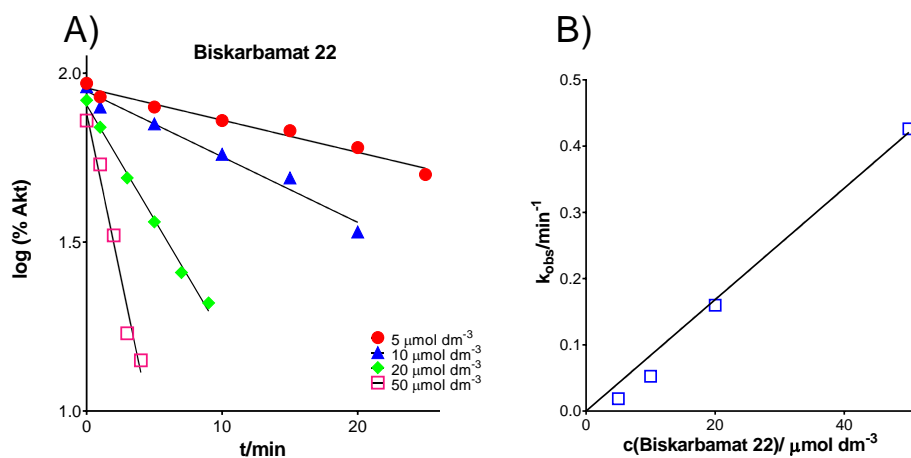
4.1.3.2. Inhibicija acetilkolinesteraze

Detaljna kinetička analiza pokazala je kako je za sedam biskarbamata (**11**, **12**, **18**, **19**, **21**, **22** i **25**) ovisnost k_{obs} o koncentraciji biskarbamata bila linearna (**Slika 4.8.**) te su sveukupne konstante brzine inhibicije (k_i) određene iz ovisnosti konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji inhibitora. Za preostalih osamnaest biskarbamata ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata bila nelinearna (**Slika 4.7.**) što

je omogućilo zasebno određivanje maksimalne konstante brzine inhibicije, k_{\max} , i konstante disocijacije enzim-karbamat kompleksa, K_i .



Slika 4.7. Progressivna inhibicija AChE biskarbamatom **17**: A) ovisnost logaritma postotka preostale aktivnosti o vremenu inhibicije; B): nelinearna ovisnost konstante inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata



Slika 4.8. Progressivna inhibicija AChE biskarbamatom **22** A) ovisnost logaritma postotka preostale aktivnosti o vremenu inhibicije; B): linearna ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata

Svi ispitivani biskarbamati inhibirali su AChE s konstantama brzine inhibicije k_i u rasponu od $(0,00109 - 4,56) \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ (Tablica 4.3.). Najbrži inhibitor AChE bio je spoj **16** s dietilnim skupinama na atomima dušika karbamatnih skupina i *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-

aminoetilnom lancu spoja. Općenito, svi biskarbamati bili su od 5 –20.700 puta brži inhibitori AChE od bambuterola. [43,45]

Tablica 4.3. Konstante inhibicije AChE

Biskarbamat	$k_r \cdot 10^6$ [mol ⁻¹ dm ³ min ⁻¹]	K_i [μmol ⁻¹ dm ³]	k_{max} [min ⁻¹]
1	0,0261 ± 0,0102	14,9 ± 4,8	0,389 ± 0,086
2	0,00109 ± 0,00020	128 ± 28	0,140 ± 0,020
3	0,0312 ± 0,0032	5,16 ± 1,11	0,161 ± 0,014
4	0,0033 ± 0,0013	80,5 ± 22,7	0,269 ± 0,044
5	0,0221 ± 0,0052	7,81 ± 1,78	0,174 ± 0,022
7	1,73 ± 0,44	0,383 ± 0,081	0,661 ± 0,090
8	0,0139 ± 0,0071	17,0 ± 6,0	0,237 ± 0,057
9	0,252 ± 0,068	1,11 ± 0,27	0,279 ± 0,034
10	0,0402 ± 0,0063	4,57 ± 0,66	0,184 ± 0,013
11	2,00 ± 0,70	–	–
12	0,014 ± 0,005	–	–
13	0,0310 ± 0,0132	3,29 ± 0,52	0,102 ± 0,007
15	0,0263 ± 0,0110	3,36 ± 0,85	0,0886 ± 0,0092
16	4,56 ± 1,18	0,0439 ± 0,0191	0,200 ± 0,141
17	2,02 ± 0,65	0,181 ± 0,053	0,364 ± 0,161
18	0,00693 ± 0,00210	–	–
19	0,00679 ± 0,000217	–	–
20	0,0193 ± 0,0096	41,4 ± 35,6	0,801 ± 0,576
21	0,0036 ± 0,000303	–	–
22	0,00841 ± 0,00053	–	–
24	0,021 ± 0,0043	11,1 ± 5,0	0,228 ± 0,064
25	0,0136 ± 0,0050	–	–
26	0,0382 ± 0,0131	6,93 ± 2,04	0,264 ± 0,040
27	0,165 ± 0,074	2,23 ± 0,95	0,369 ± 0,116
29	0,0182 ± 0,0063	15,8 ± 3,6	0,288 ± 0,044
Bambuterol*	0,000220 ± 0,000070	1900 ± 590	0,42 ± 0,007
Rivastigmin	0,00222 ± 0,00046	–	–
Fizostigmin	4,90 ± 0,380	66,0 ± 27,0	0,322 ± 0,226

*[44]

Na temelju rezultata inhibicije nije bilo moguće definirati jasan odnos između brzine inhibicije AChE i strukture supstituenata na karbamatnom i/ili 1-hidroksi-2-aminoetilnom dijelu novo

sintetiziranih biskarbamata. Usporedbom k_i konstanti između pojedinih grupa spojeva grupiranih s obzirom na supstituente na atomima dušika karbamatnih skupina nije uočena korelacija između duljine i/ili veličine supstituenta na karbamatnom dušiku i brzine inhibicije, kao ni korelacija između brzine inhibicije i strukture aminskeg supstituenta na hidroksietilnom lancu unutar pojedinih skupina. Naime, od bis(dimetilnih) karbamata najbrži inhibitor AChE je karbamat **3** s piperidinom u hidroksietilnom lancu ($k_i = 31 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), a najsporiji karbamat **2** s toliolom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 1,1 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), najbrži bis(etilmetilni) inhibitor je karbamat **11** s adamantan-1-ilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 1,90 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), a najsporiji karbamat **8** s 1-feniletilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 14 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), najbrži bis(dietilni) inhibitor bio je karbamat **16** s *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 4,56 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), dok su najsporiji bis(dietilni) inhibitori bili karbamati s **18** i **19** 1-feniletilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 6,80 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$). Najbrži inhibitor AChE od ciklički supstituiranih biskarbamata je bis(pirolidinski) karbamat **27** s adamantan-1-ilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu ($k_i = 0,16 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$), dok je bis((fenil)metilnikarbat) **29** sa cikloheksilom ($k_i = 0,018 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$) u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu bio najsporiji.

Nadalje, AChE nije pokazala razliku u brzini inhibicije strukturnih izomera **18** i **19**, dok je spoj **13** s feniletilom kao supstituentom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu inhibirao AChE oko dva puta brže od njegovog strukturnog izomera **12**. Brža inhibicija AChE biskarbamatom **12** može biti posljedica veće rotacijske slobode spoja **12** u odnosu na spoj **13**.

Velika brzina inhibicije AChE spojevima **7**, **16** i **17** može se povezati s visokim afinitetom hAChE prema tim spojevima. Također, iako je afinitet AChE prema ostalim spojevima manji i do 2000 puta nego za spojeve **7**, **16** i **17**, razlike u brzinama inhibicije AChE ostalim biskarbamatima prate promjene u afinitetu AChE prema tim biskarbamatima.

Konstante brzine inhibicije AChE rivastigminom i fizostigminom određene u ovoj disertaciji odgovaraju literaturnim podacima.^[158-160] Usporedbom konstanti brzine inhibicije AChE biskarbamatima i rivastigminom, pokazano je kako novo sintetizirani biskarbamati inhibiraju AChE 2–2000 puta brže od rivastigmina. Također, pokazano je kako biskarbamat **7**, **11**, **16** i **17** jednako brzo inhibiraju AChE kao i fizostigmin, dok ostali biskarbamati inhibiraju AChE 20–1500 puta sporije od fizostigmina.

4.1.3.3. *Selektivnost karbamilacije kolinesteraza*

Selektivnost bikarbamata određena je iz omjera konstanti brzine inhibicije za BChE_{UU} i AChE (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Omjer sveukupnih konstanti brzine inhibicije BChE_{UU} i AChE

Biskarbamat	BChE _{UU} $k_i \cdot 10^6 [\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}]$	AChE $k_i \cdot 10^6 [\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}]$	$k_{i(\text{BChE})}/k_{i(\text{AChE})}$
1	1,54 ± 0,40	0,0261 ± 0,0102	59
2	0,0202 ± 0,0023	0,00109 ± 0,00020	19
3	1,74 ± 0,48	0,0312 ± 0,0032	56
4	0,0192 ± 0,0021	0,0033 ± 0,0013	6
5	0,818 ± 0,034	0,0221 ± 0,0052	37
7	1,47 ± 0,193	1,73 ± 0,44	0,88
8	0,0101 ± 0,006	0,0139 ± 0,0071	0,71
9	3,71 ± 0,84	0,252 ± 0,068	14
10	2,28 ± 0,42	0,0402 ± 0,0063	56
11	3,68 ± 1,23	2,00 ± 0,70	1.8
12	0,238 ± 0,119	0,014 ± 0,005	18
13	0,205 ± 0,052	0,0310 ± 0,0132	6,6
15	0,141 ± 0,051	0,0263 ± 0,0110	5,4
16	1,64 ± 0,37	4,56 ± 1,18	0,36
17	2,18 ± 0,52	2,02 ± 0,65	1
18	0,0145 ± 0,0049	0,00693 ± 0,00210	2
19	0,0144 ± 0,0053	0,00679 ± 0,000217	2
20	1,05 ± 0,45	0,0193 ± 0,0096	55
21	4,51 ± 1,52	0,0036 ± 0,000303	1288
22	1,80 ± 0,37	0,00841 ± 0,00053	209
24	0,191 ± 0,026	0,021 ± 0,0043	10
25	2,62 ± 0,97	0,0136 ± 0,0050	184
26	38,0 ± 6,7	0,0382 ± 0,0131	1087
27	1,89 ± 0,59	0,165 ± 0,074	12
29	1,63 ± 0,57	0,0182 ± 0,0063	91
Bambuterol	4,4 ± 0,2	0,000220 ± 0,000070**	19600
Rivastigmin	0,0551 ± 0,0022	0,00222 ± 0,00046	25
Fizostigmin	2,80 ± 0,940	4,90 ± 0,380	0,57

*[21, 44]

Generalno, ispitivani biskarbamati su se pokazali selektivnim inhibitorima BChE koji BChE_{UU} inhibiraju 10 do oko 1300 puta brže od AChE pri čemu su se selektivnijima pokazali biskarbamati sa cikličkim supstituentima na dušiku karbamatne skupine: bis(pirolidinski), bis(piperidinski) i bis(fenil(metilni) karbamati sa ciklički ili aromatski supstituiranim dušikom 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca, dok su manju selektivnost pokazali spojevi s dietilnim atomima dušika karbamatnih skupina karbamatnom dušiku bez obzira na supstituente na atomu dušika 1-hidroksi-2-aminoetilnog lancu. Najselektivnijima su se pokazali biskarbamati **21** (bis(pirolidinski) karbamat s *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) i **26** (bis(piperidinski) karbamat s piperidinom u 1-hidroksietilnom lancu) koji su BChE_{UU} inhibirali 1288, odnosno 1087 puta brže od AChE, redom, dok su se neselektivnim inhibitorima pokazali biskarbamat **7** (bis(etil(metilni)) karbamat s cikloheksilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, biskarbamat **8** (bis(etil(metilni)) karbamat s 2-feniletilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) te biskarbamat **17** (bis(dietilni) karbamat s adamantan-1-ilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu). Sedam biskarbamata (**1**, **3**, **10**, **20**, **22**, **25** i **29**) pokazalo je 50 do 200 puta veću selektivnost za BChE_{UU} u odnosu na AChE, dok je šest biskarbamata (**2**, **5**, **9**, **12**, **24** i **27**) bilo 10 do 40 puta selektivnije. Omjer konstanti inhibicije BChE_{UU}/AChE za preostale biskarbamate je bio manji od 10.

Općenito, nijedan od spojeva nije dostigao selektivnost bambuterola koji je oko 20.000 puta selektivniji inhibitor BChE_{UU} u odnosu na AChE^[43, 45]. Međutim, devet biskarbamata čija je selektivnost bila u rasponu od 37 – 1300, bilo je selektivnije prema BChE_{UU} od rivastigmina.^[158]

4.1.3.4. Inhibicija atipične butirilkolinesteraze odabranim biskarbamatima

Progresivna inhibicija atipične butirilkolinesteraze (BChE_{AA}) određena je mjerenjem vremenske ovisnosti inhibicije enzima odabranim biskarbamatima **1**, **3**, **7**, **10**, **11**, **16**, **17**, **20**, **21**, **22**, **25** i **26** koji su se pokazali brzim inhibitorima BChE_{UU} s konstantama brzine inhibicije istog reda veličine kao i bambuterol ($k_i = (1,54-38,0) \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$) te biskarbamat **24** koji se pokazao sporijim inhibitorom BChE_{UU} ($k_i = (0,191 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1})$).

Detaljna kinetička analiza pokazala je kako je kod devet biskarbamata ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata linearna dok je za četiri biskarbamata utvrđena nelinearna ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda (k_{obs}) o koncentraciji biskarbamata.

Testirani biskarbamati pokazali su se brzim inhibitorima BChE_{AA} s konstantama brzine inhibicije k_i u rasponu od $(1,7 - 26,6) \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ (Tablica 4.5.).

Tablica 4.5. Sveukupne konstante brzine inhibicije BChE_{AA}

Biskarbamat	BChE _{AA}			BChE _{UU}	
	$k_i \cdot 10^3 [\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}]$	$K_i [\mu\text{mol}^{-1}\text{dm}^3]$	$k_{max} [\text{min}^{-1}]$	$k_i \cdot 10^6 [\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}]$	$k_i (\text{BChE}_{UU})/k_i (\text{BChE}_{AA})$
1	15,6±6,48	–	–	1,54 ±0,40	99
3	13,2±5,78	–	–	1,74 ± 0,48	132
7	2,59±0,138	–	–	1,47 ± 0,193	568
10	17,4±4,21	–	–	2,28 ± 0,42	131
11	7,23±0,357	–	–	3,68 ±1,23	509
16	1,70 ± 0,819	–	–	1,64 ± 0,37	965
17	1,58±0,0412	–	–	2,18 ± 0,52	1380
20	26,6±2,14	14,4±6,14	0,382±0,260	1,05 ± 0,45	40
21	9,02±0,5111	–	–	4,51 ± 1,52	500
22	4,45±1,31	–	–	1,80 ± 0,37	405
24	6,73±1,74	72,9±21,1	0,491±0,281	0,191 ± 0,026	28
25	5,97±1,59	57,8±37,7	0,345±0,274	2,62 ± 0,97	440
26	45,3±1,14	13,7±79,3	0,621±0,446	38,0 ± 6,7	840
Bambuterol	85±2,00*	–	–	4,4±0,2*	50
Rivastigmin	5,64±1,54	52,9±3,21	0,297±0,224	0,0551±0,0022	10

*[73]

Najbržim inhibitorom BChE_{AA} pokazao se biskarbamat **26**, koji ima piperidin i na atomima dušika karbamatnih skupina i u 1-hidroksietilnom lancu, s konstantom brzine inhibicije $k_i=45,3 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$, dok su najsporiji bili su bis(dietilni) karbamati **16** (s *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) i **17** (s adamantan-1-ilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) s konstantama brzine inhibicije $k_i=1,70 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$ te $1,58 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$. Karbamat **26** bio je ujedno i najbrži inhibitor uobičajene BChE.

Na temelju rezultata kinetičke analize, nije uočena korelacija između duljine i/ili veličine supstituenta atomima dušika karbamatnih skupina i brzine inhibicije.

Također, nije pronađena korelacija između brzine inhibicije i strukture supstituenta u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu unutar pojedinih skupina biskarbamata (bis(dimetilne), bis(etil(metilne)), bis(dietilne), bis(pirolidinske), bis(piperidinske) i bis(fenil(metilne))).

Inhibicija atipične BChE bila je 30 do 1380 puta sporija u odnosu na brzinu inhibicije BChE_{UU} istim spojem. (**Tablica 4.5.**), što odgovara ranije objavljenim rezultatu za bambuterol koji je BChE_{AA} inhibirao oko 50 puta sporije od BChE_{UU}.^[73] Pokazano je kako je brzina inhibicije BChE_{AA} ispitivanim biskarbamatima od 2 do 53 puta sporija od inhibicije BChE_{AA} bambuterolom.

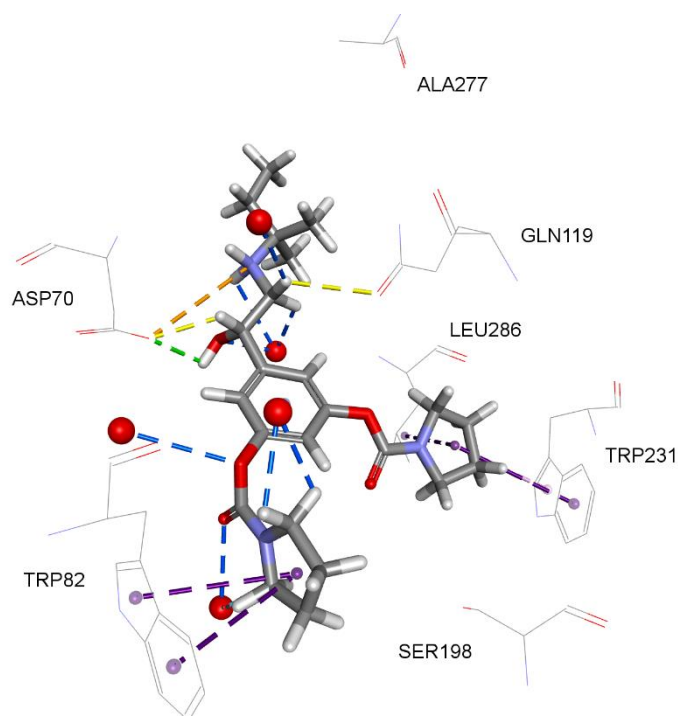
Određena je i konstanta brzine inhibicije atipične BChE rivastigminom pri čemu se rivastigmin pokazao 10 puta bržim inhibitorom BChE_{UU} od BChE_{AA}.

4.1.3.5. Analiza reverzibilnog kompleksa odabranih biskarbamata i BChE_{UU} i AChE

Kako bi se objasnile razlike u brzinama inhibicije BChE_{UU} pojedinim odabranim biskarbamatima kao i razlike u inhibiciji AChE, korištena je metoda molekuskog pristajanja (engl. *molecular docking*) kojom se pretpostavilo smještanje biskarbamata u aktivno mjesto BChE_{UU} i AChE. Budući da brzina karbamilacije kolinesteraza ovisi o ulasku karbamata u aktivno mjesto enzima i formiranju reverzibilnog kompleksa kolinesteraza (ChE)-karbamata koji odgovara Michaelisovom kompleksu između enzima i inhibitora, analizirane su nekovalentne interakcije koje doprinose stabilizaciji ChE-karbamatnih kompleksa i pozicioniranju karbamata prema kisiku serina katalitičke trijade.

Analizirani su kompleksi između BChE_{UU} i najselektivnijeg BChE inhibitora karbamata **21**, zatim karbamata **26** koji se pokazao najbržim BChE inhibitorom, karbamata **18** kao najsporijeg BChE inhibitora te kompleks između AChE i najbržeg AChE inhibitora, karbamata **16**. Na **Slici 4.9.** prikazan je kompleks BChE_{UU}-**21**. Biskarbamat **21** ostvaruje elektrostatske interakcije s aminokiselinskim ostatkom perifernog mjesta BChE_{UU} Asp70, hidrofobne alkilne i π -alkilne interakcije s aminokiselinskim ostatkom Trp82 unutar kolinskog mjesta te alkilne interakcije s

aminokiselinskim ostatkom Leu286 i π -alkilne interakcije s aminokiselinskim ostatkom Trp231 unutar acilnog džepa BChE (ostale interakcije navedene su u **Tablici 4.6.**).



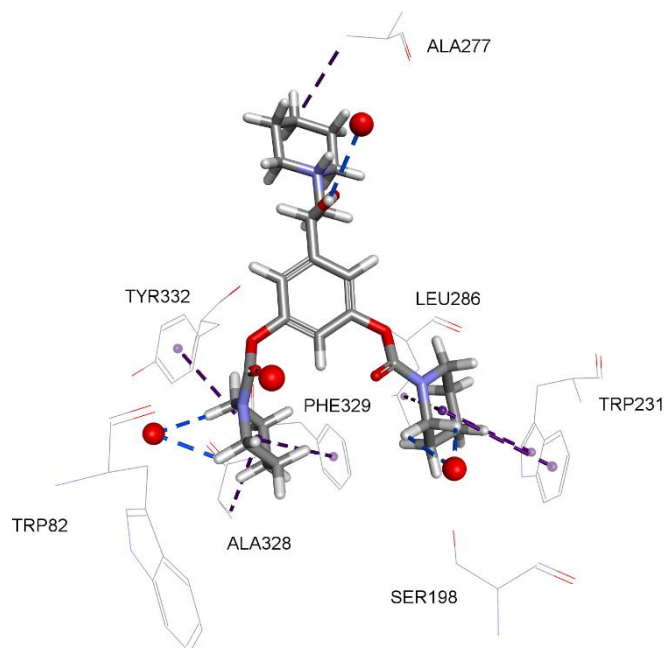
Slika 4.9. Model kompleksa BChE_{UU}-21. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih međumolekulskih interakcija (navedene u **Tablici 4.6.**): narančastom bojom označena je elektrostatska interakcija između Asp70 i N15; zelena boja označava vodikovu vezu između Asp70 i H36; žutom su bojom označene sve slabe vodikove veze; plavom bojom označene su sve vodikove veze s vodom. Crvene kuglice predstavljaju molekule vode, a ljubičasta boja predstavlja sve hidrofobne interakcije.

Tablica 4.6. Interakcije između biskarbamata **21** i BChE_{UU}.

Aminokiselina	Nekovalentne interakcije
Asp70	N15, elektrostatske interakcije
HOH736	O8, vodikova veza
HOH786	O17, vodikova veza
HOH709	21 , vodikova veza; π -donor vodik donor
HOH920	H37, vodikova veza; C-H veza
HOH989	H38, vodikova veza; C-H veza
HOH930	H40, vodikova veza
Asp70	H36, vodikova veza
Asp70	H35, vodikova veza
Gln119	H38, vodikova veza
Leu286	21 , hidrofobna alkil interakcija
Trp82	21 , hidrofobna π -alkil interakcija
Trp82	21 , hidrofobna π -alkil interakcija
Trp231	21 , hidrofobna π -alkil interakcija
Trp231	21 , hidrofobna π -alkil interakcija

Visoki inhibicijski potencijal spoja **21** može se objasniti orijentacijom njegovih karbamatnih skupina unutar aktivnog mjesta BChE. Naime, obje karbamatne skupine spoja **21** su orijentirane prema dnu aktivnog mjesta: karbamatna skupina na položaju 3' orijentirana je izravno prema serinu 198, dok je karbamatna skupina na položaju 5' orijentirana prema Trp231 u kolinskom mjestu.

Kompleks između BChE_{UU} i najbržeg biskarbamata **26**, prikazan je na **slici 4.10**.



Slika 4.10. Model kompleksa BChE_{UU}-26. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih međumolekulskih interakcija (navedene u **Tablici 4.7**): plavom bojom označene su sve vodikove veze s vodom. Crvene kuglice predstavljaju molekule vode, a ljubičasta boja predstavlja sve hidrofobne interakcije.

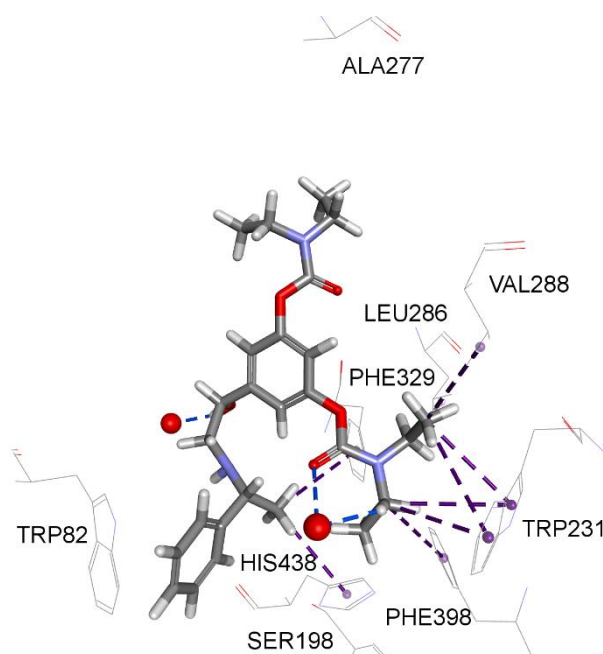
Biskarbamat **26** ostvaruje hidrofobne interakcije s aminokiselinskim ostatkom Ala277, smještenim na ulazu u aktivno mjesto, vodikove veze te hidrofobne alkilne i π -alkilne interakcije s aminokiselinskim ostacima Ala328 i Phe329 unutar kolinskog mjesta hBChE te hidrofobne alkilne interakcije s aminokiselinskim ostatkom Leu286 i π -alkilne interakcije s aminokiselinskim ostatkom Trp21 unutar acilnog džepa BChE_{UU} (ostale interakcije navedene su u **Tablici 4.7**). Visoki inhibicijski potencijal i selektivnost ovog biskarbamata prema BChE može se objasniti orijentacijom njegovih karbamatnih skupina unutar aktivnog mjesta BChE; obje karbamatne skupine biskarbamata **26** orijentirane su prema dnu aktivnog mjesta BChE, karbamatna skupina na položaju 3' ostvaruje hidrofobne alkilne interakcije s Ala328 u

anionskom mjestu BChE, dok karbamatna skupina na položaju 5' ostvaruje hidrofobne π -alkil interakcije s Trp231 u kolinskom mjestu.

Tablica 4.7. Interakcije između biskarbamata **26** i BChE_{UU}.

Aminokiselina	Nekovalentne interakcije
HOH709	O17, vodikova veza
HOH1024	H38, vodikova veza
HOH825	H43, vodikova veza; C-H veza
HOH825	H50, vodikova veza; C-H veza
HOH706	H61, vodikova veza; C-H veza
Ala277	C31, hidrofobna-alkil interakcija
Leu286	26 , hidrofobna alkil interakcija
Ala328	26 , hidrofobna alkil interakcija
Trp231	26 , hidrofobna π -alkil interakcija
Phe329	26 , hidrofobna π -alkil interakcija
Tyr332	26 , hidrofobna π -alkil interakcija

Najsporiji BChE_{UU} inhibitor, biskarbamat **18** (Slika 4.11.), ostvaruje vodikove veze i hidrofobne alkilne i π -alkilne interakcije s aminokiselinskim ostacima unutar acilnog džepa (Trp231, Leu286, Val288) (ostale interakcije navedene su u **Tablici 4.8.**).



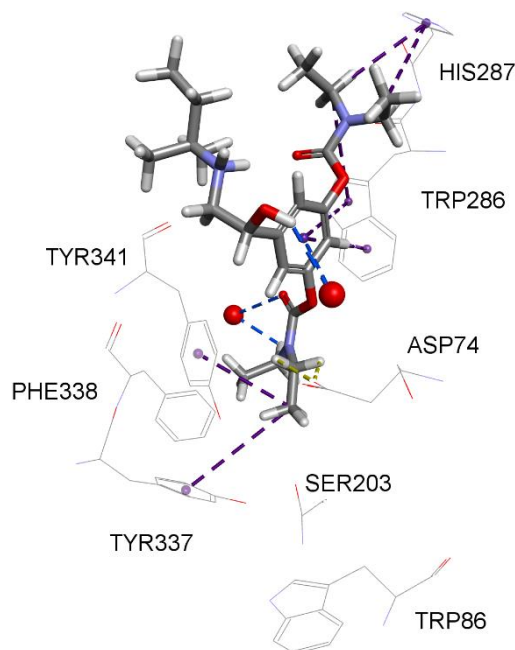
Slika 4.11. Model kompleksa BChE_{UU}-**18**. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih međumolekulskih interakcija (navedene u **Tablici 4.8.**): plavom bojom označene su sve vodikove veze s vodom. Crvene kuglice predstavljaju molekule vode, a ljubičasta boja predstavlja sve hidrofobne interakcije.

Niži inhibicijski potencijal ovog biskarbamata može se objasniti orijentacijom njegovih karbamatnih skupina unutar aktivnog mjesta BChE. Za razliku od biskarbamata **21** i **26**, kod kojih su obje karbamatne skupine orijentirane prema dnu aktivnog mjesta, kod biskarbamata **18** samo je jedna od njegove dvije karbamatne skupine usmjerena je prema dnu aktivnog mjesta (druga je usmjerena prema ulazu) smanjujući vjerojatnost uspješne reakcije karbamilacije. Naime, takva prostorna orijentacija benzenskih supstituenata u **18** unutar aktivnog mjesta BChE_{UU} dovodi do stvaranja intramolekularne C-H veze između karbonilnog kisika karbamatne skupine i vodika vezanog za ugljik 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca. Ova interakcija na neki način zaključava karbamat u nepovoljnom položaju za reakciju karbamilacije.

Tablica 4.8. Interakcije između biskarbamata **18** i BChE_{UU}

Aminokiselina	Nekovalentne interakcije
HOH825	H39, vodikova veza
HOH706	H62, vodikova veza; C-H veza
Leu286	C33, hidrofobna alkil interakcija
Val288	C33, hidrofobna alkil interakcija
Trp231	C33, hidrofobna π - alkil interakcija
Trp231	C33, hidrofobna π - alkil interakcija
Phe329	C32, hidrofobna π - alkil interakcija
Phe398	C32, hidrofobna π - alkil interakcija
His438	C32, hidrofobna π - alkil interakcija

Modelni kompleks između najpotentnijeg AChE inhibitora **16** i AChE prikazan je na **slici 4.12**.



Slika 4.12. Model kompleksa AChE-**16**. Isprekidane linije predstavljaju različite vrste nekovalentnih međumolekulskih interakcija (navedene u **Tablici 4.9.**): plavom bojom označene su sve vodikove veze s vodom. Crvene kuglice predstavljaju molekule vode, a ljubičasta boja predstavlja sve hidrofobne interakcije.

Model kompleksa AChE-**16** predviđa kako biskarbamat **16** ostvaruje višestruke nevezne interakcije unutar aktivnog mjesta AChE: vodikove veze s aminokiselinskim ostacima perifernog mjesta AChE (C-H veze s Tyr124 i Trp286) i hidrofobne π -alkil interakcije s aminokiselinama kolinskog mjesta (Tyr337 i Phe 338). Sve interakcije navedene su u **Tablici 4.9**. Prema modelu, karbamatna skupina spoja **16** na položaju 3'okrenuta je prema katalitičkoj trijadi smještenoj na dnu aktivnog mjesta i ostvaruje hidrofobne π -alkil interakcije s aminokiselinama kolinskog mjesta Tyr337 i Phe 338, dok druga karbamatna skupina na položaju 5' ostvaruje hidrofobne π -alkil interakcije s aminokiselinskim ostatkom His287 na ulazu u aktivno mjesto.

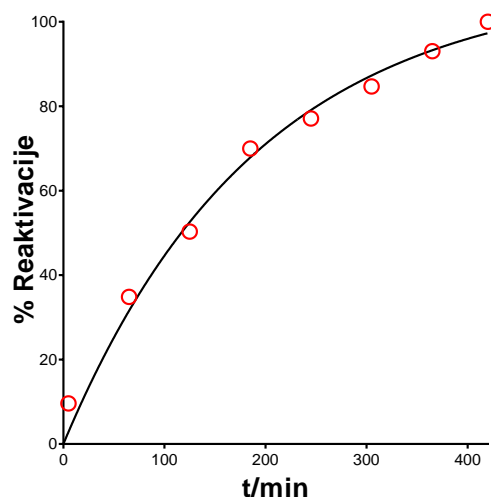
Tablica 4.9. Interakcije između biskarbamata **16** i AChE

Aminokiselina	Nekovalentne interakcije
HOH708	H36, vodikova veza
HOH809	H52, vodikova veza; C-H veza
Tyr124	H51, vodikova veza
Asp74	H59, C-H veza
Asp74	H60, C-H veza
Trp286	H32, hidrofobna π -sigma
Trp286	16 , hidrofobna π - π T
Trp286	16 , hidrofobna, hidrofobna π - π T
His287	C20, hidrofobna π -alkil
His287	C21, hidrofobna π -alkil
Tyr337	C25, hidrofobna π -alkil
Phe338	C24, hidrofobna π -alkil
Tyr341	C24, hidrofobna alkil
Tyr341	C25, hidrofobna π -alkil

Usporedbom modelnih kompleksa biskarbamata s BChE te AChE, pokazano je kako brzi inhibitori BChE **21** i **26** imaju obje karbamatne skupine orijentirane prema dnu aktivnog mjesta, dok suprotno tome brzi inhibitor AChE **16** ima jednu karbamatnu skupinu orijentiranu prema dnu aktivnog mjesta, a drugu prema ulazu u aktivno mjesto.

4.1.5. Dekarbamilacija kolinesteraza

Do inhibicije kolinesteraza biskarbamatima dolazi uslijed stvaranja kovalentne veze između karbamatne skupine biskarbamata i katalitičkog serina kolinesteraza tj. karbamilacije enzima. Hidroliza karbamiliranog enzima je spontana i događa se djelovanjem vode, pri čemu se oslobađaju slobodni enzim i monokarbamat. Povratak aktivnosti enzima nazvan dekarbamilacijom, definiran je konstantom brzine dekarbamilacije, k_{dekarb} , određenom izravnim praćenjem spontanog povratka aktivnosti inhibiranih enzima (**Slika 4.13.**). Konstante brzine dekarbamilacije svih ispitivanih biskarbamata određene su za BChE_{UU} i AChE (**Tablica 4.10.**), dok su za BChE_{AA} određene za 13 biskarbamata s kojima su provedeni testovi inhibicije BChE_{AA}.



Slika 4.13. Spontani povratak aktivnosti BChE_{UU} inhibiran biskarbamatom 12

Za BChE_{UU} konstante brzine dekarbamilacije, k_{decarb} , bile su u rasponu od 0,072 do 0,192 h⁻¹ ($\bar{k}_{\text{decarb}} = 0,136 \pm 0,013 \text{ h}^{-1}$) te u rasponu od 0,138 do 0,222 h⁻¹ ($\bar{k}_{\text{decarb}} = 0,173 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$) za AChE. Brzina dekarbamilacije ovisila je o supstituentima na atomima dušika karbamatnih skupina pri čemu je brzina spontane dekarbamilacije BChE_{UU} i AChE inhibiranih biskarbamatima s alifatskim supstituentima na karbamatnom dušiku bila oko 2 puta brža od brzine dekarbamilacije ciklički supstituiranih karbamata. Vrijednosti k_{decarb} konstanti bile su u skladu s literaturnim podacima za k_{decarb} *N*-disupstituiranih karbamata za oba enzima. [33-35] Konstante brzine spontane dekarbamilacije k_{decarb} (Tablica 4.10.) za atipičnu BChE bile su u rasponu od 0,0761 do 0,194 h⁻¹ ($\bar{k}_{\text{decarb}} = 0,115 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$). Općenito, vrijednosti konstanti brzina dekarbamilacije BChE_{AA} bile su vrlo slične za sve biskarbamate, neovisno o supstituentima na dušiku karbamatne skupine ili dušiku 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca. Generalno, vrijednosti konstanti brzina dekarbamilacije BChE_{AA} i BChE_{UU} bile su vrlo slične, osim u slučaju biskarbamata **3** (bis(dimetilni) karbamat s piperidinom u 1-hidroksetilnom lancu) i **25** (bis(piperidinski) karbamat s cikloheksilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) kada je dekarbamilacija BChE_{AA} bila oko dva puta sporija od dekarbamilacije BChE_{UU}, dok je za biskarbamat **17** (bis(dietilni) karbamat s adamantan-1-ilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu) dekarbamilacija BChE_{AA} bila oko dva puta brža od dekarbamilacije BChE_{UU}. Međutim, na temelju rezultata nije bilo moguće jasno definirati strukturne karakteristike biskarbamata odgovorne za različitu brzinu dekarbamilacije BChE_{AA} i BChE_{UU}.

Tablica 4.10. Konstante brzine dekarbamilacije (k_{decarb}) za BChE_{UU} i AChE te BChE_{AA}

Biskarbamat	k_{decarb} [h ⁻¹]		
	BChE _{UU}	AChE	BChE _{AA}
1	0,162 ± 0,006	0,174 ± 0,018	0,104 ± 0,007
2	0,192 ± 0,024	0,174±0,006	–
3	0,132 ± 0,012	0,180±0,018	0,0941 ± 0,007
4	0,150 ± 0,012	0,138 ± 0,012	–
5	0,186 ± 0,006	0,144 ± 0,012	–
7	0,0960 ± 0,0060	0,180 ± 0,018	0,117 ± 0,006
8	0,126 ± 0,012	0,182 ± 0,012	–
9	0,156 ± 0,006	0,150 ± 0,012	–
10	0,192 ± 0,018	0,174 ± 0,012	0,139 ± 0,017
11	0,0960 ± 0,0060	0,150 ± 0,012	0,0761 ± 0,005
12	0,180 ± 0,012	0,162 ± 0,012	–
13	0,126 ± 0,006	0,150 ± 0,012	–
15	0,156 ± 0,018	0,150 ± 0,012	–
16	0,0720 ± 0,006	0,216 ± 0,018	0,110 ± 0,007
17	0,0720 ± 0,006	0,180 ± 0,018	0,194 ± 0,005
18	0,114 ± 0,006	0,222 ± 0,018	–
19	0,126 ± 0,018	0,204 ± 0,012	–
20	0,174 ± 0,006	0,204 ± 0,06	0,106 ± 0,005
21	0,108 ± 0,006	0,180 ± 0,012	0,094 ± 0,008
22	0,102 ± 0,006	0,174 ± 0,024	0,118 ± 0,010
24	0,132 ± 0,012	0,150 ± 0,012	0,139± 0,011
25	0,162 ± 0,012	0,210 ± 0,018	0,0979 ± 0,007
26	0,126 ± 0,018	0,168 ± 0,012	0,108 ± 0,008
27	0,168 ± 0,012	0,156 ± 0,012	–
29	0,120 ± 0,012	0,162 ± 0,018	–

4.1.6. In silico procjena mogućnosti prolaska spoja kroz krvno-moždanu barijeru pasivnim transportom

Sposobnost biskarbamata da prijeđu krvno-moždanu barijeru (BBB) pasivnim transportom procijenjena je na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava te usporedbom vrijednosti tih svojstava s preporučenim vrijednostima za poznate lijekove aktivne u središnjem živčanom sustavu (SŽS).^[149] Lijekovi koji djeluju u SŽS općenito imaju relativnu molekulsku masu nižu od 500, lipofilnost izraženu kao logP manju od 5, manje od pet donora vodikovih veza, manje od deset akceptora vodikove veze, manje od deset rotacijskih veza i polarnu površinu manju od 90 Å² u odnosu na lijekove koji nisu aktivni u SŽS-u. Izračunate vrijednosti molekularnih

deskriptora za biskarbamate i preporučene vrijednosti za lijekove aktivne u SŽS-u ^[150, 151] prikazane su u **Tablici 4.11**.

Tablica 4.11. *In silico* izračunata fizikalno–kemijska svojstva biskarbamata: relativna molekulska masa (M_r), logP, broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodikovih veza, broj rotacijskih veza (RB) te područje ukupne polarne površine (PSA)/10.

Biskarbamat	$M_r/100$	logP	HBD	HBA	RB	PSA/10
1	4,299	2,143	2	4	8	9,134
2	4,379	2,496	1	4	8	9,134
3	4,159	1,577	1	4	7	8,255
4	4,820	2,435	2	4	8	9,134
5	4,520	2,484	2	4	9	9,134
7	4,580	2,856	2	4	10	9,134
8	4,155	2,696	2	4	10	9,134
9	4,440	2,290	1	4	9	8,255
10	4,460	2,633	2	4	11	9,134
11	5,107	3,148	2	4	10	9,134
12	4,800	3,198	2	4	11	9,134
13	4,800	3,070	2	4	12	9,134
15	4,356	3,004	1	4	11	8,255
16	4,740	3,347	2	4	13	9,134
17	5,381	3,862	2	4	12	9,134
18	5,081	3,912	2	4	13	9,134
19	5,081	3,784	2	4	14	9,134
20	4,820	2,954	2	4	8	9,134
21	4,701	2,731	2	4	9	9,134
22	5,341	3,246	2	4	8	9,134
24	5,040	3,168	2	4	10	9,134
25	5,101	3,843	2	4	8	9,134
26	4,961	3,278	1	4	7	8,255
27	5,622	4,136	2	4	8	9,134
29	5,541	5,459	2	6	10	9,134
Bambuterol	4,039	1,397	2	4	8	9,134
Rivastigmin	2,500	2,400	0	2	5	3,270
Fizostigmin	2,750	2,200	1	3	2	4,480
Preporučene vrijednosti*	5	5	5	10	10	9*

*[152]

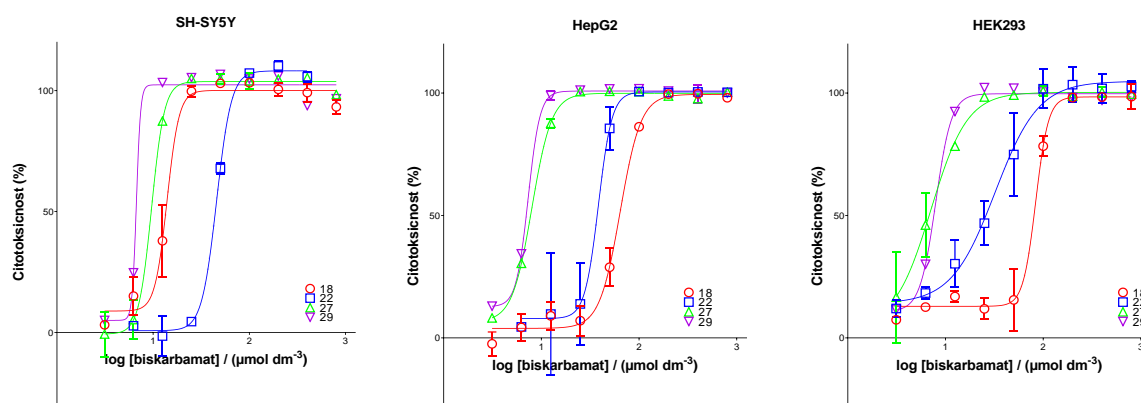
Za spojeve **3**, **9** i **26** vrijednosti svih fizikalno-kemijskih svojstava su u rasponu preporučenih vrijednosti ^[150] na temelju čega je zaključeno kako ti spojevi mogu proći kroz krvno moždanu barijeru. Budući da korištena metoda predstavlja proširenu *Lipinski rule of 5* metodu, pretpostavlja se da je kršenje jednog od pravila dopušteno. ^[150, 152] Tako je za 8 biskarbamata (**1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **8**, **20** i **21**) vrijednost PSA ($91,34 \text{ \AA}^2$) bila nešto veća ($\Delta\text{PSA} = 1,34 \text{ \AA}^2$) od gornje preporučene vrijednosti (90 \AA^2) pa je procijenjeno da za te spojeve postoji ograničena mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Tome u prilog govori i Palm koji je pokazao

kako i spojevi s većom PSA od preporučene mogu prijeći krvno-moždanu barijeru. [152,162]. Ograničena mogućnost prolaska kroz KŽB procijenjena je i za biskarbamat **15** koji ima jednu rotacijsku vezu više od preporučene. Za preostalih 14 biskarbamata utvrđeno je odstupanje u vrijednostima za dva ili tri fizikalno-kemijska svojstva te je procijenjeno kako oni ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru pasivnim transportom. Općenito, većina ovih biskarbamata imala je više rotacijskih veza i veću PSA od preporučene te veću relativnu molekulsku masu.

Izračunate vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava biskarbamata uspoređene su s vrijednostima izračunatim za rivastigmin, fizostigmin i bambuterol. Općenito, vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava ispitivanih biskarbamata bile su više u usporedbi s onima za rivastigmin i fizostigmin, dok su zahvaljujući strukturnoj analogiji, usporedive s vrijednostima fizikalno-kemijskih svojstava bambuterola.

4.1.7. Citotoksičnost biskarbamata

Citotoksični učinak karbamata procijenjen je na stanicama HepG2, HEK293 i SH-SY5Y. Citotoksičnost biskarbamata izražena je kao IC_{50} vrijednost, odnosno vrijednost pri kojoj se inhibira rast 50 % stanica, a određena je praćenjem vijabilnosti stanica nakon 24 satne izloženosti stanica biskarbamatima. IC_{50} vrijednosti su određene iz krivulja ovisnosti postotka živih stanica o logaritmu testiranog raspona koncentracija biskarbamata (**Slika 4.14.**). Raspon koncentracija biskarbamata od 5-800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ odabran je jer odgovara onom korištenom u *in vitro* pokusima inhibicije kolinesteraza, te da inhibira rast stanica u rasponu od 0-100 %.



Slika 4.14. Reprezentativne krivulje ovisnosti postotka živih stanica o logaritmu koncentracije biskarbamata za četiri citotoksična karbamata

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.12.

Tablica 4.12. IC_{50} vrijednosti ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) biskarbamata nakon izloženosti stanica u trajanju od 24 sata izražene su kao srednja vrijednost eksperimentalno dobivenih vrijednosti (\pm standardna pogreška).

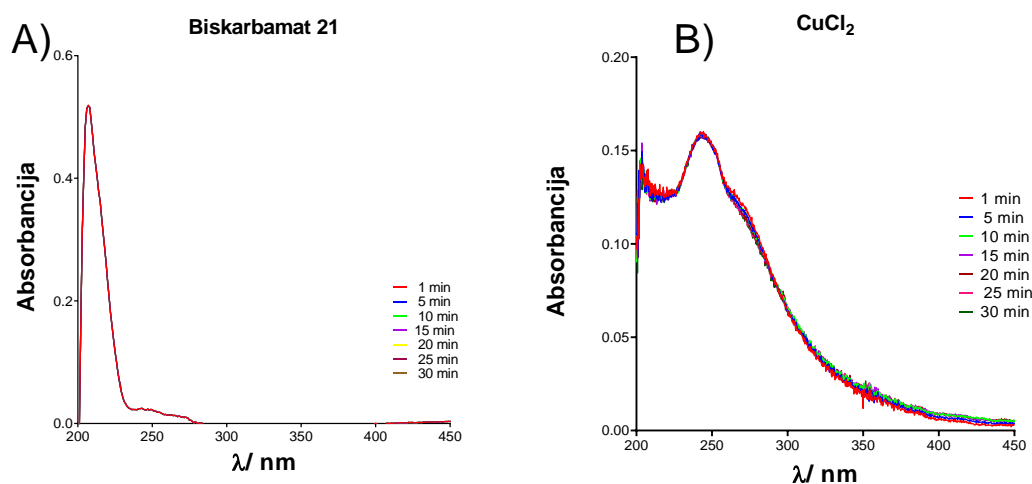
Biskarbamat	HEK293	HepG2	SH-SY5Y
1	≥ 800	≥ 800	≥ 800
2	≥ 800	≥ 800	≥ 800
3	≥ 800	≥ 800	≥ 800
4	240 ± 26	324 ± 30	197 ± 0
5	759 ± 0	646 ± 15	603 ± 47
7	347 ± 7	398 ± 22	525 ± 32
8	316 ± 10	479 ± 27	513 ± 58
9	≤ 800	≥ 800	≥ 800
10	≥ 800	≥ 800	≥ 800
11	112 ± 6	48 ± 1	89 ± 3
12	79 ± 11	71 ± 3	126 ± 18
13	43 ± 9	83 ± 5	214 ± 15
15	40 ± 2	40 ± 8	38 ± 3
16	234 ± 17	251 ± 10	240 ± 29
17	21 ± 3	15 ± 2	19 ± 1
18	11 ± 3	77 ± 13	17 ± 4
19	36 ± 1	34 ± 4	39 ± 4
20	251 ± 25	248 ± 6	178 ± 26
21	282 ± 9	457 ± 53	≥ 800
22	32 ± 6	42 ± 5	47 ± 4
24	≥ 800	≥ 800	≥ 800
25	38 ± 2	27 ± 2	30 ± 3
26	288 ± 32	295 ± 47	126 ± 25
27	$7 \pm 0,3$	$8 \pm 0,3$	$8 \pm 0,7$
29	8 ± 1	$15 \pm 0,3$	$7 \pm 0,1$
Bambuterol	≥ 800	≥ 800	≥ 800

IC₅₀ vrijednosti biskarbamata za sve tri stanične linije bile su u rasponu od 7 do 800 μmol dm⁻³. Biskarbamati **1**, **3**, **9**, **10** i **24** se nisu pokazali toksičnima ni za jednu od staničnih linija, dok su biskarbamati **4**, **5**, **7**, **8**, **11**, **12**, **13**, **15**, **16**, **17**, **19**, **20**, **25** i **26** bili toksični za sve tri stanične linije, ali u koncentracijama koje su bile više od koncentracija u kojima su ti spojevi inhibirali kolinesteraze. Biskarbamat **21** pokazao se toksičnim za stanične linije **HEK293** i **HepG2**, no u koncentracijama višim od onih u kojima inhibira kolinesteraze, dok su biskarbamati **18**, **22**, **27** i **29** bili su toksični za sve tri stanične linije u koncentracijama u kojima su inhibirali aktivnost obiju kolinesteraza.

Na temelju dobivenih rezultata nije moguće jasno definirati ovisnost supstituenata na atomima dušika karbamatnih skupina i/ili na 1-hidroksi-2-aminoetilnom dijelu molekule i citotoksičnosti generalno ili prema pojedinim staničnim linijama.

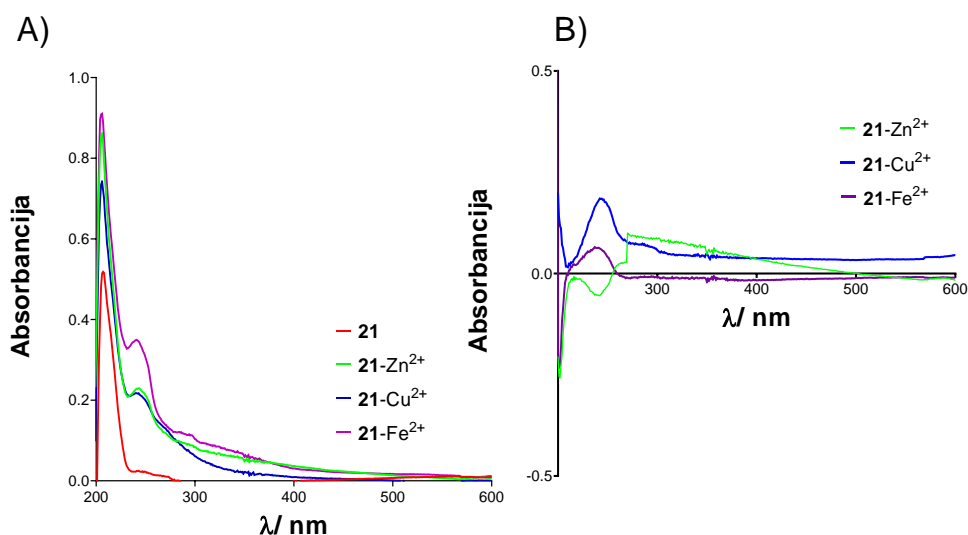
4.1.8. Kelatiranje biometala

Kelatacijski učinak biskarbamata ispitan je analizom apsorpcijskih spektara samih biskarbamata i biometala (Slika 4.15.) s apsorpcijskim spektrom smjese biskarbamata i biometala.



Slika 4.15. A) Prikaz UV spektra biskarbamata **21** u vremenu od 1. do 30. minute B) prikaz UV spektra CuCl₂ u vremenu od 1. do 30. minute

Općenito, smjese svih novo sintetiziranih biskarbamata s metalnim solima pokazale su značajne promjene u apsorpcijskom spektru u odnosu na spektre samih biskarbamata i odgovarajućeg biometala ukazujući na mogućnosti tih spojeva da s odabranim biometalima tvore koordinacijske komplekse. Promjene apsorpcijskog spektra smjese biskarbamat-biometal su uključivale: pomak apsorpcijskog pika od približno 10 do 20 nm od izvornog pika biskarbamata (crveni pomak), smanjenje intenziteta apsorpcije pika i/ili pojavu novog pika. Kelatacijska sposobnost biskarbamata potvrđena je diferencijalnim spektrima smjese biskarbamat-biometal (Slika 4.16. B).



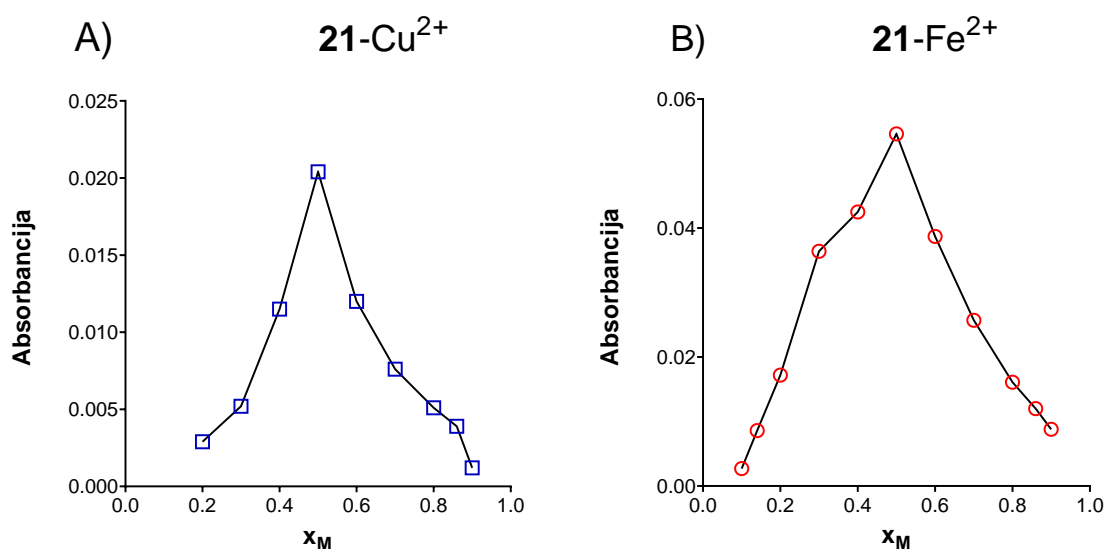
Slika 4.16. A) Prikaz UV spektra biskarbamata **21** (crvena krivulja), kompleksa biskarbamata **21** i Zn²⁺ (zeleno krivulja), **21** i Cu²⁺ (plava krivulja) i **21** i Fe²⁺ (ljubičasta krivulja) B) prikaz diferencijalnih spektara kompleksa **21**-Zn²⁺ (zeleno krivulja), **21**-Cu²⁺ (plava krivulja) i **21**-Fe²⁺ (ljubičasta krivulja)

Stehiometrija kompleksa biskarbamat-biometal određena je metodom množinskih omjera za biskarbamate **1**, **2**, **3**, **5**, **10**, **20**, **21**, **22**, **25** i **26** koji su se pokazali od 20 do 1300 puta selektivnijim inhibitorima hBChE_{UU} u odnosu na hAChE te biskarbamate **7** i **16** koji su bili 2 do 3 puta selektivniji hAChE inhibitori u odnosu na hBChE_{UU}.

Pokazano je da biskarbamati **1** i **25** formiraju komplekse sa sva tri biometala u omjeru 1:1, dok biskarbamati **2**, **7**, **21** i **26** formiraju komplekse s dva biometala u omjeru 1:1 (biskarbamati **2** i **21** s biometalima Cu²⁺ i Fe²⁺ (Slika 4.17.)), biskarbamat **7** s biometalima Zn²⁺ i Cu²⁺,

biskarbamat **26** s biometalima Zn^{2+} i Fe^{2+}). Za biskarbamate **3**, **10** i **22** je pokazano da formiraju komplekse s jednim biometalom u omjeru 1:1 (kompleksi **3**- Fe^{2+} , **10**- Fe^{2+} , **22**- Cu^{2+}). Osim omjera 1:1, neki od biskarbamata su s ispitivanim biometalima tvorili komplekse drugačijih omjera. Tako je biskarbamat **20** tvorio komplekse **20**- $Zn^{2+}=3:7$; **20**- $Cu^{2+}=2:3$; **20**- $Fe^{2+}=1:4$, dok su biskarbamati **3**, **5** i **22** tvorili komplekse s dva biometala: biskarbamat **3** sa Zn^{2+} i Cu^{2+} (**3**- $Zn^{2+}=2:3$; **3**- $Cu^{2+}=1:4$); biskarbamat **5** s Fe^{2+} (**5**- $Fe^{2+}=2:3$), biskarbamat **22** sa Zn^{2+} i Fe^{2+} (**22**- $Zn^{2+}=2:3$; **22**- $Fe^{2+}=3:7$). Biskarbamat **7** formirao je kompleks s Fe^{2+} u omjeru 2:3, dok je biskarbamat **16** formirao kompleks s Cu^{2+} u omjeru 2:3.

Za dva biskarbamata, iako su diferencijalni spektri potvrdili formiranje kompleksa između biskarbamata i biometala, stehiometriju kompleksa biskarbamat-biometal s dva od tri biometala (**5** s sa Zn^{2+} i Cu^{2+} , **10** sa Zn^{2+} i Cu^{2+} i **16** sa Zn^{2+} i Fe^{2+}) nije bilo moguće odrediti. Isti je slučaj bio sa tri biskarbamata u kombinaciji s jednim od biometala (**2** s Zn^{2+} , **21** sa Zn^{2+} i **26** s Cu^{2+}).



Slika 4.17. Određivanje stehiometrije A) **21**- Cu^{2+} kompleksa i B) **21**- Fe^{2+} kompleksa metodom molarnih omjera

4.2. Rasprava

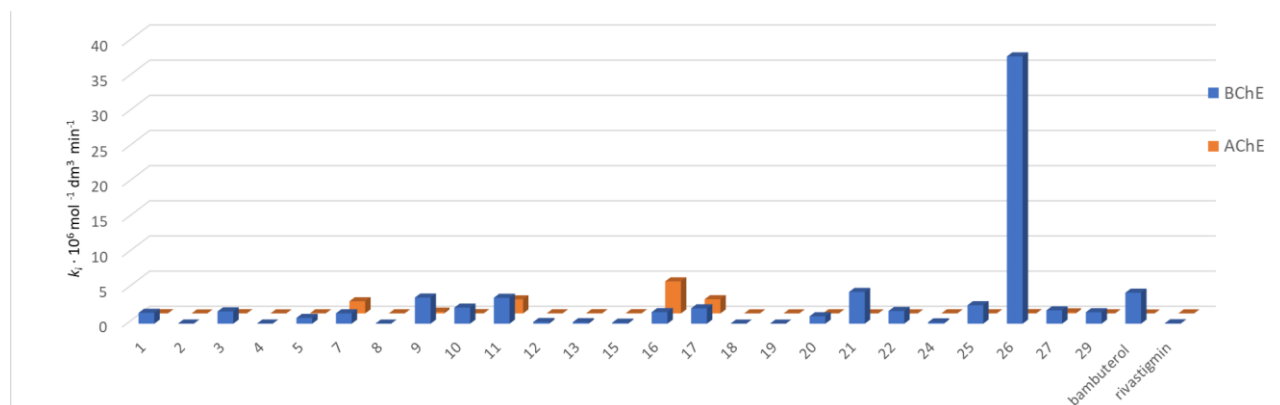
Alzheimerova bolest koja danas pogađa više od 50 milijuna ljudi diljem svijeta je zbog svoje rasprostranjenosti i stalnog porasta broja oboljelih jedan od vodećih javnozdravstvenih problema na globalnoj razini. Ukupan trošak zdravstvene zaštite, dugoročne skrbi i hospicijskih usluga za osobe s dijagnosticiranom AB za 2020. je bio procijenjen na 1 bilijun USD ^[48] što pokazuje koliki financijski teret ta bolest predstavlja za ekonomiju zemalja. S obzirom na stalan porast broja oboljelih te uzimajući u obzir psihosocijalni teret koji će bolesnici donijeti svojim njegovateljima, uglavnom članovima obitelji koji za svoju skrb ne dobivaju novčanu naknadu, postoji velika potreba za lijekovima koji bi mogli usporiti ili ublažiti simptome bolesti i omogućiti pacijentima neovisnost u svakodnevnom životu. Iako je AB multifaktorijalna bolest što pretpostavlja više mogućih meta liječenja bolesti, liječenje AB uglavnom je simptomatsko i usmjereno je na ublažavanje i olakšavanje simptoma, ali ne i na tijek, razvoj i finalni ishod bolesti. ^[95] Propadanje kolinergičkih neurona u mozgu i gubitak neurotransmisije glavni su uzroci opadanja kognitivnih funkcija u bolesnika s AB. ^[93] Povrat neurotransmisije, a time i liječenje AB danas se uglavnom temelji na povećavanju koncentracije neurotransmitera acetilkolina inhibicijom kolinesteraza, prvenstveno AChE. Međutim, novija istraživanja koja su pokazala kako tijekom napredovanja AB aktivnost BChE progresivno raste za oko 40-90 % njezine normalne aktivnosti, dok aktivnost AChE pada, prometnula su BChE u novu obećavajuću metu u tretmanu AB. Također, pokazano je da selektivna inhibicija BChE smanjuje pojavnost nuspojava karakterističnih za AChE inhibitore: tremor, uznemirenost, mučnina, povraćanje, hipersalivacija, glavobolja, znojenje, te da povoljno utječe na kognitivne sposobnosti kod glodavaca s AB. ^[25]

Cilj ove doktorske disertacije bio je dizajn i sinteza te biološka evaluacija biskarbamata za moguću primjenu u tretmanu AB kao lijeka/ova namijenjenog/ih liječenju uznapredovale i kasne faze AB kojemu/ima je primarni cilj selektivna inhibicija BChE, kao i postavljanje smjernica za njihovo daljnje strukturno poboljšanje. Iz tog razloga, u dizajnu novih biskarbamata kao strukturna baza iskorištena je struktura dimetilnog biskarbamata bambuterola budući da je bambuterol izrazito selektivan inhibitor ljudske BChE. Bambuterol je u upotrebi kao prolijek bronhodilatatora terbutalina i njegova upotreba ne ispoljava nikakve nuspojave vezane uz kolinergički sustav. Uz navedeno, kao produkt hidrolize prve karbamatne skupine

bambuterola nastaje monokarbamat koji je također inhibitor kolinesteraza ^[43, 45] što ukazuje na mogućnost uporabe spojeva slične strukture kao lijekova produljenog djelovanja kod liječenja AB. Stoga su dizajnirani strukturni analozi bambuterola s različitim alifatskim i cikličkim supstituentima na atomima dušika karbamatnih skupina te na dušiku 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca, kako bi se ispitaio utjecaj različitih supstituenata na inhibitornu moć biskarbamata prema kolinesterazama.

Do sada je uspješno sintetizirano 30 biskarbamata, od kojih je njih 25 bilo odgovarajuće čistoće te su na njima provedena i daljnja *in vitro* istraživanja inhibicije, citotoksičnosti i sposobnosti kelatiranja biometala koji se najčešće povezuju s pojavom AB, te *in silico* procjena sposobnosti prolaska krvno-moždane barijere.

Svi novo sintetizirani biskarbamati pokazali su se vrlo potentnim, vremenski ovisnim inhibitorima obiju kolinesteraza, generalno selektivnijima za BChE_{UU} u odnosu na AChE (**Slika 4.18.**), čime je bila potvrđena početna hipoteza istraživanja, a odabrana strukturna osnova spojeva se pokazala obećavajućom za razvoj novih, potentnih inhibitora BChE_{UU} s ciljem primjene u tretmanu srednje i kasne faze AB. U prilog tome govori i činjenica da ti biskarbamati inhibiraju BChE_{UU} i do 690 puta brže od rivastigmina, lijeka koji se trenutno primjenjuje u liječenju AB. Također, dodatna prednost ovih biskarbamata je i mogućnost njihove primjene i/ili daljnjeg razvoja kao AB lijekova s produženim djelovanjem u odnosu na druge kolinesterazne lijekove koji djeluju kao reverzibilni inhibitori (donepezil i galantamin) jer spor proces dekarbamilacije osigurava produljeno djelovanje lijeka. Nadalje, kao produkt prve hidrolize biskarbamatâ nastaju monokarbamati koji također mogu inhibirati kolinesteraze, po uzoru na monokarbamat bambuterola, što u konačnici predstavlja dodatno povoljno svojstvo i u odnosu na karbamat rivastigmin. Zbog toga je u planu i sinteza monokarbamatnih derivata novo sintetiziranih biskarbamata te diola koji nastaju kao krajnji produkt hidrolize novo sintetiziranih biskarbamata kako bi se ispitaio njihov inhibicijski potencijal prema kolinesterazama.

Slika 4.18. Inhibicija BChE_{UU} i AChE

Jedan od glavnih zahtjeva u razvoju novih lijekova je netoksičnost spojeva prema meti djelovanja i organima odgovornim za metabolizam i izlučivanje tvari. Većina novo sintetiziranih biskarbamata bila je netoksična prema živčanim (SH-SY5Y) stanicama, kao i prema jetrenim (HepG2) i bubrežnim (HEK) stanicama što ide u prilog daljnjeg razvoja ovih spojeva kao lijekova za tretman Alzheimerove bolesti.

Kao strukturni motiv koji bi trebalo izbjegavati u daljnjem dizajnu i razvoju novih spojeva istaknuo se adamantan-1-il vezan na atom dušika 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca, budući da su biskarbamati koji su u svojoj strukturi imali ovaj motiv pokazali citotoksičnost prema modelnim stanicama.

Kako je AB multifaktorijska bolest, čiju patofiziologiju osim smanjene koncentracije neurotransmitera ACh, karakterizira i taloženje A β -peptida, hiperfosforilacija tau proteina, oksidacijski stres, hiperaktivacija MAO-B te dishomeostaza biometala, postoji nekoliko mogućih meta za njezino liječenje što nameće pretpostavku da bi bolji učinak u liječenju imali lijekovi koji mogu istovremeno djelovati na više od jedne mete. Budući da dishomeostaza biometala Zn²⁺, Cu²⁺ i Fe²⁺ uzrokuje abnormalnu neurotransmisiju, proizvodnju slobodnih radikala, promjene aktivnosti enzima ovisnih o metalima, ferroptozu i povećano izlučivanje amiloidnih β -peptida ^[163, 164] javila se potreba za spojevima koji mogu kelatirati ove metale. Budući da svi novo sintetizirani biskarbamati imaju sposobnost kelatiranja barem jednog od biometala (Zn²⁺, Cu²⁺ i/ili Fe²⁺) sposobnost kelatiranja identificira ih kao potencijalne višeciljne lijekove (engl. *Multi target directed ligands*) za tretman AB koji istovremeno inhibiraju kolinesteraze i kelatiraju biometale. Sposobnost kelatiranja Fe²⁺ iznimno je važna kod ferroptoze, regulirane stanične smrti uzrokovane slobodnim radikalima nastalima putem

Fentonove reakcije. Ferroptaza predstavlja jednu od najnovijih meta u tretmanu jer se posljednjih godina dovodi u vezu s nastankom AB.

Kako je primarni cilj djelovanja novo sintetiziranih biskarbamata bila inhibicija BChE, a BChE je visoko polimorfan enzim čiji polimorfizam utječe na učinkovitost lijekova za čije je djelovanje potrebna aktivnost BChE, ispitano je i njihovo djelovanje na atipičnu inačicu BChE, budući da se heterozigoti ove inačice smatraju rizičnom skupinom kod primjene spojeva koji djeluju kao antikolinergici i pokazuju osjetljivost na primjenu nekih lijekova kao npr. mišićni relaksansi sukcinildikolin i mivakurijum. Za BChE_{AA} je ranije bilo dokazano da ju bambuterol inhibira 50 puta sporije nego uobičajenu BChE te se očekivalo kako će slično ponašanje imati i novo sintetizirani biskarbamati. Pokazano je kako odabrani biskarbamati inhibiraju BChE_{AA} od 28 do 840 puta sporije od BChE_{UU} što u slučaju primjene ovih spojeva kao lijekova može nepovoljno utjecati na nositelje ove inačice. Obzirom da se povećani rizik razvoja Alzheimerove bolesti često povezuje s pojavnosti K-inačice BChE u kombinaciji s mutacijom apolipoproteina E tipa 4 (ApoE ε4) bilo bi zanimljivo ispitati inhibicijski potencijal biskarbamata prema toj inačici. ^[76, 77]

U ovoj disertaciji pokazano je kako su biskarbamati s karbamatnim skupinama u *meta* položaju na benzenskoj jezgri obećavajuća strukturna osnova za dizajn novih spojeva s ciljem primjene u tretmanu uznapredovale i kasne faze AB. Iako je analizirano ukupno 25 spojeva s različitim supstituentima na atomima dušika karbamatnog i hidroksiaminoetilnog dijela molekule, nije bilo moguće izvesti jasne zaključke o korelaciji između brzine inhibicije BChE i AChE i strukturnih karakteristika pojedinih biskarbamata, ali je uočen trend veće selektivnosti i veće brzine inhibicije ljudske BChE kod spojeva s cikličkim i aromatskim supstituentima na karbamatnom dušiku i dušiku hidroksiaminoetilnog lanca u odnosu na iste kojima je barem jedan dio molekule alifatski. Stoga je potrebno produbiti istraživanje sintezom dodatnih biskarbamata sa sistematskim promjenama supstituenata kako bi se mogla definirati jasna veza između strukture i biološke aktivnosti biskarbamata.

Pokazano je kako s obzirom na AChE svi novosintetizirani biskarbamati imaju jednaku ili veću konstantu brzine inhibicije od rivastigmina, a četiri biskarbamata (**7**, **11**, **16** i **17**) inhibiraju AChE s konstantama brzine inhibicije reda veličine $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, što čini ove biskarbamate vrlo brzim inhibitorima AChE s potencijalom daljnjeg razvoja kao inhibitora AChE.

Petnaest biskarbamata inhibiralo je BChE_{UU} s konstantama brzine inhibicije reda veličine $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, od čega se njih devet pokazalo 50 i više puta selektivnijim inhibitorima BChE u odnosu na AChE. Ti biskarbamati pokazali su i sposobnost kelatiranja barem jednog biometala, no prema *in silico* predikciji većina njih ne može proći krvno-moždanu barijeru. Međutim, osim prolaska krvno-moždane barijere pasivnim transportom, spojevi mogu proći krvno-moždanu barijeru i vezanjem na različite transportere, što daje potencijal daljnjeg razvoja ovih spojeva.

Od trenutno sintetiziranih i ispitanih biskarbamata kao obećavajući za daljnji razvoj kao lijekova za tretman uznapredovale i kasne faze AB istaknuli su se biskarbamati **3**, **9** i **26** koji inhibiraju BChE s konstantama brzine inhibicije reda veličine $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, više su od 1000 puta selektivniji za BChE u odnosu na AChE, kelatiraju sva tri biometala, netoksični su za živčane, jetrene i bubrežne stanice te mogu prijeći krvno-moždanu barijeru pasivnim transportom.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Sintetizirano je 30 bis(dimetilnih), bis(dietilnih), bis(etil(metilnih)), bis(piperidinskih), bis(pirolidinskih) i bis(fenil(metilnih)) karbamata s različitim alifatskim, cikličkim ili aromatskim aminima u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu s prinosima od 10 do 70 % i čistoćom od 85 do 99 %.
- Svi ispitivani biskarbamati pokazali su se vremenski ovisnim inhibitorima obiju kolinesteraza.
- Analiza inhibicijskog potencijala i strukture novo sintetiziranih biskarbamata nije pokazala jasnu korelaciju između brzine inhibicije kolinesteraza sa strukturom supstituenata na karbamatnom i/ili 1-hidroksi-2-aminoetilnom dijelu biskarbamata.
- Ispitivani biskarbamati bili su općenito selektivniji inhibitori BChE_{UU} u odnosu na AChE. Biskarbamati s cikličkim supstituentima na dušiku karbamatne skupine i s cikličkim ili aromatskim supstituentima na atomu dušika 1-hidroksi-2-aminoetilnog lanca pokazali su se kao selektivniji inhibitori BChE_{UU}, od kojih je najselektivniji BChE_{UU} inhibitor biskarbamat 26, bis(piridiniski) karbamat s piridinom kao aminskim supstituentom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu. Najmanju selektivnost imali su spojevi s dietilnom skupinom na karbamatnom dušiku bez obzira na supstituent u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, od kojih je biskarbamat 16, s *tert*-pentilom u 1-hidroksi-2-aminoetilnom lancu, imao konstantu brzine inhibicije istog reda veličine kao i bambuterol.
- Metodom molekuskog pristajanja pokazano je kako su kod najbržih inhibitora BChE_{UU} obje karbamatne skupine biskarbamata orijentirane prema dnu aktivnog mjesta BChE_{UU}, dok je 1-hidroksi-2-aminoetilni lanac orijentiran prema izlazu iz aktivnog mjesta.
- Brzina dekarbamilacije BChE_{UU} i AChE je vrlo slična za biskarbamate s alifatski supstituiranim atomom dušika karbamatne skupine, dok je u slučaju biskarbamata s ciklički supstituiranim dušikom karbamatne skupine dekarbamilacija BChE_{UU} bila nešto brža od dekarbamilacije AChE.
- Na brzinu karbamilacije utječe polimorfizam BChE te je pokazano kako je brzina inhibicije atipične BChE biskarbamatima od 30 do 840 puta manja u odnosu na brzinu inhibicije BChE_{UU}. Dekarbamilacija BChE_{AA} je oko dvaput sporija od dekarbamilacije BChE_{UU}.

- Od 25 biskarbamata, samo su četiri biskarbamata **18**, **22**, **27** i **29** hepatotoksična, neurotoksična i nefrotoksična u koncentracijama u kojima pokazuju inhibicijsku aktivnost.
- Svi biskarbamati pokazali su sposobnost kelatiranja barem jednog od iona biometala Zn^{2+} , Cu^{2+} i Fe^{2+} .
- Za tri biskarbamata je na temelju njihovih fizikalno-kemijskih svojstava procijenjeno da bi trebali moći prijeći krvno-moždanu barijeru pasivnim transportom.
- Najviše potencijala za daljnji razvoj kao lijekova za tretman uznapredovale i kasne faze Alzheimerove bolesti pokazuju biskarbamati **3**, **9** i **26** koji brzo i selektivno inhibiraju BChE, netoksični su s potencijalom prolaska kroz BBB te kelatiraju ione biometala Zn^{2+} , Cu^{2+} i Fe^{2+} , zbog čega se mogu primijeniti i kao višeciljni lijekovi u tretmanu AB. Također, ovi biskarbamati imaju potencijal za primjenu i kao lijekovi u tretmanu drugih neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove bolesti i miastenije gravis.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

Kratica	Značenje
ACh	acetilkolin
AChE	acetilkolinesteraza
ATCh	acetiltiokolin jodid
AB	Alzheimerova bolest
BBB	krvno-moždana barijera
BChE _{UU}	Uobičajena butirilkolinesteraza
BChE _{AA}	Atipična butirilkolinesteraza
DCM	diklormetan
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
Et ₃ N	triethylamin
EtOAc	etil-acetat
HBA	broj akceptora vodikovih veza (engl. <i>hydrogen bond acceptors</i>)
HBD	broj donora vodikovih veza (engl. <i>hydrogen bond donors</i>)
HCl	klorovodična kiselina
HEK293	adherentne ljudske embrionalne stanice bubrega
HepG2	adherentne ljudske stanice jetre
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	spektrometrija masa visokog razlučivanja (engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i>)
log _P	koeficijent raspodjele tvari između oktanola i vode
MeOH	metanol
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
NaBH ₄	natrijev borhidrid
NADH	reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotida

NADPH	reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata
PMS	fenazin-metosulfat
PSA	područje polarne površine (engl. <i>polar surface area</i>)
PTCh	propioniltiokolin-jodid
RB	veze koje se mogu rotirati (engl. <i>rotatable bonds</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SH-SY5Y	adherentne ljudske stanice neuroblastoma

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Giacobini, u E. Giacobini (ur.), Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors, Martin Dunitz Ltd., London, 2003, 1-20.
2. O. Lockridge, Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses, *Pharmacol. Ther.* **148** (2015) 34-46.
3. P. Masson, E. Carletti i F. Nachon, Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase, *Protein Pept. Lett.* **16** (2009) 1215-1224.
4. E. Giacobini, Cholinergic function and Alzheimer's disease, *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **18** (2003) 1-5.
5. S. Darvesh, D. A. Hopkins i C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131-138.
6. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps i F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141-41147.
7. N. H. Greig, D. K. Lahiri i K. Sambamurti, Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy, *Int. Psychogeriatr.* **14** (2002) 77-91.
8. E. Giacobini, Cholinesterases in human brain: the effect of cholinesterase inhibitors on Alzheimer's disease and related disorders, u: *The Brain Cholinergic System in Health and Disease*, (E. Giacobini i G. Pepeu, ur.), Informa Helthcare, Abingdon, 2006 str. 235-264.
9. E. Giacobini, R. Spiegel, A. Enz, A. E. Veroff i N. R. Cutler, Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit, *J. Neural. Transm.* **109** (2002) 1053-1065.
10. E. Giacobini, Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease?, *Drugs Aging* **18** (2001) 891-898.
11. S. Xing, Q. Li, B. Xiong, Y. Chen, F. Feng, W. Liu i H. Sun, Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism, *Med. Res. Rev.* **21745** (2020) 1-44.
12. O. Lockridge, Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine, *Pharmac. Ther.* **47** (1990) 35-60.
13. R. J. Valentino, O. Lockridge, H. W. Eckerson i B. N. La Du, Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on *in vitro* biochemical studies, *Biochem. Pharmacol.* **30** (1981) 1643-1649.

14. Y. Loewenstein-Lichtenstein, M. Schwarz, D. Glick, B. Norgaard-Pedersen, H. Zakut i H. Soreq, Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in `atypical` BCHE carriers, *Nat. Med.* **1** (1995) 1082-1085.
15. E. Giacobini, u E. Giacobini (ur.), *Cholinesterases and Cholinesterases Inhibitors*, 3rd ed.; Informa Healthcare: London, UK, 2000.
16. A. N. Çokuğras, Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance, *Turk. J. Biochem.* **28** (2003) 54-61.
17. J. Massoulié, The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases, *Neurosignals.* **3** (2002) 130-143.
18. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge i B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem. Biol. Interact.* **119–120** (1999) 61–69.
19. T. L. Rosenberry, X. Brazzolotto, I. R. MacDonald, M. Wandhammer, M. Trovaslet-Leroy, S. Darvesh i F. Nachon, Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: a crystallographic, kinetic and calorimetric study, *Molecules* **22** (2017) 1–21.
20. A. Bosak, I. Gazić, V. Vinković i Z. Kovarik, Amino acid residues involved in stereoselective inhibition of cholinesterases with bambuterol, *Arch. Biochem.* **471** (2008) 72-76.
21. Z. Kovarik, A. Bosak, G. Šinko i T. Latas, Exploring active sites of cholinesterases by inhibition with bambuterol and haloxon, *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 63-67.
22. K. Sharma, Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics, *Mol. Med. Rep.* **20** (2019) 1479-1487.
23. Alzheimer's Association, 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer. Dement.* **17** (2021) 321–387.
24. J. Y.Y. Szeto i S. J. G. Lewis, Current treatment options for Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia, *Curr. Neuropharmacol.* **14** (2016) 326-338.
25. N. H. Greig, T. Ustuki, D. K. Ingram, Y. Wang, G. Pepeu, C. Scali, Q. S. Yu, J. Mamczarz, H. W. Holloway, T. Giordano, D. Chen, K. Furukawa, K. Sambamurti, A. Brossi i D. K. Lahiri, Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent, *PNAS* **22** (2005) 17213-17218.
26. Q. Li, H. Yang, Y. Chen i H. Sun, Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Eur. J. Med. Chem.* **132** (2017) 294-309.
27. D. Karlsson, A. Fallarero, G. Brunhofer, C. Mayer, O. Prakash, C. G. Mohan, P. Vuorela i T. Erker, The exploration of thienothiazines as selective butyrylcholinesterase inhibitors, *Eur. J. Pharm. Sci.*

- 47 (2012) 190-205 Gaeta A. i R. C. Hider, The crucial role of metal ion sin neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy, *Br. J. Pharmacol.* **146** (2005), 1041-1059.
28. M. A. Kamal, X. Qu, Q. S. Yu, D. Tweedie, H. W. Holloway. Y. Li, Y. Tan i N. H. Greig, Tetrahydrofurobenzofuran cymserine, a potent butyrylcholinesterase inhibitor and experimental Alzheimer drug candidate, enzyme kinetic analysis, *J. Neural. Transm.* **115** (2008) 889–898.
29. A. Bosak, A. Ramić, T. Šmidlehner, T. Hrenar, I. Primožič i Z. Kovarik, Design and evaluation of selective butyrylcholinesterase inhibitors based on Cinchona alkaloid scaffold, *PLoS One* **13** (2018) e0205193.
30. I. Primožič, T. Hrenar, S. Tomić i Z. Meić, Interactions of chiral quinuclidin-3-yl benzoates with butyrylcholinesterase: kinetic study and docking simulations, *J. Phys. Org. Chem.* **15** (2002) 608-614.
31. M. Katalinić, G. Rusak, J. Domaćinović Barović, G. Šinko, D. Jelić, R. Antolović i Z. Kovarik, Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 186-192.
32. A. Matošević, A. Radman Kastelic, A. Mikelić, A. Zandona, M. Katalinić, I. Primožič, A. Bosak i T. Hrenar, Quinuclidine-based carbamates as potential CNS active compounds, *Pharmaceutics* **13** (2021) e420
33. A. Matošević, A. Knežević, A. Zandona, N. Maraković, Z. Kovarik i A. Bosak, Design, synthesis and biological evaluation of biscarbamates as potential selective butyrylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Pharmaceutics* **15** (2022) e101220
34. M. Rotenberg i S. Almog, Evaluation of the decarbamylation process of cholinesterase during assay of enzyme activity, *Clin. Chim. Acta* **240** (1995) 107-116.
35. P. Hofer i U. P. Fringeli, Acetylcholinesterase kinetics, *Biophys. Struct. Mech.* **8** (1981) 45-59.
36. E. Reiner, Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamoylated cholinesterases, *Bull. Wld. Hlth. Org.* **44** (1971) 109-112.
37. N. Frascogna, Physostigmine: is there a role for this antidote in pediatric poisonings? *Curr. Opin. Pediatr.* **19** (2007) 201–205.
38. P. Camps i D. Muñoz-Torrero, Cholinergic drug sin pharmacotherapy of Alzheimer's disease, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2** (2002) 11-25.
39. M. A. Kamal, A. A. Al-Jafari, Q. S. Yu i N. H. Greig, Kinetic analysis of the inhibition of human butyrylcholinesterase with cymserine, *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj. BBA-GEN. SUBJECTS.* **2** (2006) 200–206.
40. Q. S. Yu, H. W. Holloway, T. Utsuki, A. Brossi i N. H. Greig, Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 1855-1861.

41. S. M. Somani, R. K. Kutty i G. Krishna, Eseroline, a metabolite of physostigmine, induces neuronal cell death, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106** (1990) 28–37.
42. Alzheimer's Drug Discovery Fondation. 2018 Alzheimer's Clinical Trials Report, <https://www.alzdiscovery.org/research-and-grants/clinical-trials-report/2018-report> (preuzeto: 30.9.2022.)
43. A. Tunek i L. A. Svensson, Bambuterol, a carbamate ester prodrug of terbutaline, as inhibitor of cholinesterases in human blood, *Drug Metab. Dispos.* **16** (1988) 759–764.
44. I. Gazić, A. Bosak, G. Šinko, V. Vinković i Z. Kovarik, Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 1513–1519.
45. J. Wu, Y. Tian, S. Wang, M. Pistolozzi, Y. Jin, T. Zhou, G. Roy, L. Xu i W. Tan, Design, synthesis and biological evaluation of bambuterol analogues as novel inhibitors of butyrylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* **126** (2016) 61–71.
46. J. Wu, M. Pistolozzi, S. Liu i W. Tan, Design, synthesis and biological evaluation of novel carbamates as potential inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Biorg. Med. Chem.* **28** (2020) e115324.
47. A. Bosak, I. G. Smilovic, G. Šinko, V. Vinković i Z. Kovarik, Metaproterenol, isoproterenol and their bisdimethyl-carbamate derivates as human cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **55** (2012) 6716–6723.
48. World health organization. Neurological disorders: public health challenges, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369> (preuzeto 30.9.2022.)
49. E. W. Randell, M. S. Mathews, H. Zhang, J. S. Seraj i Guang Sun, Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome, *Clin. Biochem.* **38** (2005) 799 – 805.
50. K.M. Kutty i R.H. Payne, Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism, *J. Clin. Lab. Anal.* **8** (1994) 247-250.
51. K. M. Kutty, R. Redheendran i D. Murphy, Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. *Experientia* **33** (1977) 420-421.
52. S. Brimijoin, V. P. Chen, Y. P. Pang, L. Geng i Y. Gao, Physiological roles for butyrylcholinesterase: a BChE- ghrelin axis, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 271- 275.
53. D. S. Sitar, Clinical pharmacokinetics of bambuterol, *Clin. Pharmacokinet.* **31**(1996) 246–256.
54. A.Y Salmon, Z. Goren, Y. Avissar i H. Soreq, Human erythrocyte but not brain acetylcholinesterase hydrolyses heroin to morphine, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26** (1999) 596-600.

55. R. H. J. Mathijssen, R.T J. van Alphen, J. Verweij, W. J. Loos, K. Nooter, G. Stoter i A. Sparreboom, Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11), *Clin. Cancer Res.* **7** (2001) 2182-2194.
56. R. J. Valentino, O. Lockridge, H. W. Eckerson i B. N. La Du, Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies, *Biochem. Pharmacol.* **30** (1981) 1643-1649.
57. R. Boopathy, R. Valmiki Rajesh, S. Darvesh i P. G. Layer, Human serum cholinesterase from liver pathological samples exhibit highly elevated aryl acylamidase activity, *Clin. Chim. Acta* **380** (2007) 151–156.
58. E. Weitnauer, A. Robitzki i P. G. Laye, Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chick than in horse, but much lower than in fetal calf serum, *Neurosci. Lett.* **254** (1998) 153–156.
59. M. F. Montenegro, M. T. Moral-Naranjo, M. Paez de la Cadena, F.J. Campoya, E. Munoz-Delgado i C.J. Vidal, The level of aryl acylamidase activity displayed by human butyrylcholinesterase depends on its molecular distribution, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 336–339.
60. F. Checler, J. Grassi i J. P. Vincent, Cholinesterases display genuine arylacylamidase activity but are totally devoid of intrinsic peptidase activities, *J. Neurochem.* **62** (1994) 756-763.
61. J. Jasięcki, M. Targonska i B. Wasag, The role of butyrylcholinesterase and iron in the regulation of cholinergic network and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) e2033.
62. P. Dubovy i P. Haninec, Non-specific cholinesterase activity of the developing peripheral nerves and its possible function in cells in intimate contact with growing axons of chick embryo, *Int. J. Devl. Neuroscience* **8** (1990) 589-602.
63. P. W. Allderdice, H. A. R. Gardner, D. Galutira, O. Lockridge, B. N. La Du i P. J. Mcalpine, The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26, *Genomics* **11** (1991) 452-454.
64. J. Saez-Valero, G. Poza-Cisneros i C. J. Vidal, Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma, *Neurosci. Lett.* **206** (1996) 173-176.
65. O. Lockridge, E. G. Duysen i P. Masson, Butyrylcholinesterase: overview, structure, and function, u: T. Satoh i R. C. Gupta (ur.), *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity, and epidemiology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2010.
66. P. Juul, Stability of plasma enzymes during storage, *Clin. Chem.* **13** (1967) 416–422.
67. C. R. Crane, D. C. Sanders i J. K. Abbott, Studies on the storage stability of human blood cholinesterases: aviation medical report, *USA: Department of Transportation, Federal Aviation Administration* **1** (1970) 70-74.

68. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker i I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science* **253** (1991) 872-879.
69. O. Lockridge, R. B. Norgren, R. C. Johnson i T. A. Blake, Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors, *Chem. Res. Toxicol.* **29** (2016) 1381-1392.
70. Y. Zhou, S. Wang i Y. Zhang, Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B.* **114** (2010) 8817–8825.
71. R. T. Evans i M. J. McQueen, Cholinesterase phenotyping: clinical aspects and laboratory applications, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **23** (1986) 35-64.
72. S. Lushchekina, H. Delacour, O. Lockridge i P. Masson, Human butyrylcholinesterase polymorphism: molecular modeling, *Int. J. Risk Saf. Med.* **27** (2015) 80–81.
73. Z. Kovarik i V. Simeon-Rudolf, Interaction of human butyrylcholinesterase variants with bambuterol and terbutaline, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **19** (2004) 113-117.
74. V. Simeon-Rudolf i E. Reiner, Variants of human serum esterases reacting with organophosphates, carbamates and pyridinium oximes, *ASA. Newsl.* **91** (2001) 14-16.
75. O. Lockridge i P. Masson, Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *NeuroToxicology* **21** (2000) 113-126.
76. Z. Wang, Y. Jiang, X. Wang, Y. Du, D. Xiao, Y. Deng i J. Wang, Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease risk: a meta-analysis, *Med. Sci. Monit.* **21** (2015) 1408-1413.
77. E. Podoly, D. E. Shalev, S. Shenhar-Tsarfaty, E. R. Bennett, E. B. Assayag, H- Wilgus, O. Livnah i H. Soreq, The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 17170-17179.
78. C. V. Altamirano, C. F. Bartels i O. Lockridge, The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme, *J. Neurochem.* **74** (2001) 869-877.
79. A. Bosak, M. Katalinić i Z. Kovarik, Kolinesteraze: Struktura, uloga, inhibicija, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
80. M. Nazim, A. Masuda, M. Alinoor Rahman, F. Nasrin, J. Takeda, K. Ohe, B. Ohkawara, M. Ito i K. Ohno, Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms, *Nucleic. Acids Res.* **1** (2016) 1-14.
81. L. Pezzementi, F. Nachon i A. Chatonnet, Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*, *PLoS One* **6** (2011) e17396.

82. J. Massoulie i S. Bonn, The molecular form of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates, *Ann. Rev. Neurosci.* **5** (1982) 57-106
83. Z. Radić, D. M. Quinn, D. C. Vellom, S. Camp i P. Taylor, Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin, *J. Biol. Chem.* **70** (1995) 20391-20399.
84. E. Meshorer i H. Soreq, Viruses and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies, *Trends Neurosci.* **29** (2006) 216-224.
85. K. B. Augustinsson i H. Eriksson, The reaction mechanism of butyrylcholinesterase, *Croat. Chem. Acta* **47** (1975) 277-285.
86. Z. Breijyeh i R. Karaman, Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment, *Molecules* **25** (2020) e5789
87. S. A. Lyness, C. Zarow i H. C. Chui, Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis, *Neurobiol. Aging* **24** (2003) 1-23.
88. T. Hope, J. Keene, K. Gedling, S. Cooper, C. Fairburn i R. Jacoby, Behaviour changes in dementia 1: point of entry data of a prospective study, *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **12** (1997) 1062-1073.
89. R. Mayeux, Epidemiology of neurodegeneration, *Annu. Rev. Neurosci.* **26** (2003) 81-104.
90. K. A. Jellinger, Head injury and dementia, *Curr. Opin. Neurol.* **17** (2004) 719-723.
91. M. Sharma, Preventing Alzheimer's disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* **74** (2019) 1924-1925.
92. M. Carmo Carreiras, E. Mendes, M. J. Perry, A. P. Francisco i J. Marco-Contelles, The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics, *Curr. Top. Med. Chem.* **13** (2013) 1745-1770.
93. E. Giacobini, Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives, *Pharmacol. Res.* **50** (2004) 433-440.
94. R. T. Bartus, R. L. Dean, B. Beer i A. S. Lippa, The Cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science* **217** (1982) 408-417.
95. T. H. Ferreira-Vieira, I. M. Guimaraes, F. R. Silva i F. M. Ribeiro, Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system, *Curr. Neuropharmacol.* **14** (2016) 101-115.
96. L.C. dos Santos Picança, P. F. Ozela, M. F. de Brito Brito, A. A. Pinheiroa, E. C. Padilhab, F. S. Bragac, C. D. Tomich de Paula da Silvad, C. B. dos Santosc, J. M. C. Rosad i L. I. da Silva Hagemelime, Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment, *Curr. Med. Chem.* **23** (2018) 3141-3159.
97. H. Hampell, M. M. Mesulam, A. C. Cuello, A. S. Khachaturian, A. Vergallo, M. R. Farlow, P. J. Snyder, E. Giacobini i Z. S. Khachaturian, Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research, *J. Prev. Alzheimer's Dis.* **3** (2018) 1-14.

98. P. T Francis, A. M. Palmer, M. Snape i G. K. Wilcock, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **66** (1999) 137–147.
99. D. A. Drachman, Aging of the brain , entropy , and Alzheimer disease, *Neurology* **67** (2006) 1340–1352.
100. X. Du, X. Wang¹ i M. Geng, Alzheimer's disease hypothesis and related therapies, *Transl. Neurodegener.* **7** (2018) 1-7.
101. X. Q. Chen i W. C. Mobley, Alzheimer disease pathogenesis: insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and Tau species, *Front. Neurosci.* **13** (2019) e659.
102. C. X. Gong, F. Liu i K. Iqbal, Multifactorial hypothesis and multi-targets for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* **64** (2018) 107-117.
103. S. Y. Li, X. B. Wang, S. S. Xie, N. Jiang, K. D. G.Wang, H. Q. Yao, H. B. Sun i L. Y. Kong, Multifunctional tacrine flavonoid hybrids with cholinergic, β -amyloid-reducing, and metal chelating properties for the treatment of Alzheimer's disease, *Eur. J. Med.Chem.* **69** (2013) 632–646.
104. C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau i F. Collin, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biol.* **17** (2018) 2213-2317.
105. L. Wang, Y. L. Yin, X. Z. Liu, P. Shen, Y. G. Zheng, X. R. Lan, C. B. Lu i J. Z. Wang, Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Transl. Neurodegener.* **9** (2020) e10
106. K. Chen, X. Jiang M. Wu, X. Cao, W. Bao¹ i L. Q. Zhu, Ferroptosis, a potential therapeutic target in Alzheimer's disease, *Front. Cell Dev. Biol.* **9** (2021) e704298
107. Z. Sezgin Z i Y. Dincer, Alzheimer's disease and epigenetic diet, *Neurochem. Int.* **78** (2014) 105-116.
108. S. Seneff, G. Wainwright i L. Mascitelli, Nutrition and Alzheimer's disease: the detrimental role of a high carbohydrate diet, *Eur. J. Intern. Med.* **22** (2011) 134–140.
109. C. H. Latta, H. M. Brothers i D. M. Wilcock, Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience* **302** (2015) 103–111.
110. S. Schedin-Weiss, M. Inoue, L. Hromadkova, Y. Teranishi, N. G. Yamamoto, B. Wiegner, N. Bogdanovic, B. Winblad, A. Sandebring-Matton, S. Frykman i L. O. Tjernberg, Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with γ -secretase and regulates neuronal amyloid β -peptide levels, *Alzheimers Res. Ther.* **9** (2017) e57
111. A. Dorababu, Critical evaluation of current Alzheimer's drug discovery (2018-19) & futuristic Alzheimer drug model approach, *Bioorg. Chem.* **93** (2019) e103299
112. M. L. Bolognesi, A. Cavalli, L. Valgimigli, M. Bartolini, M. Rosini, V. Andrisano, M. Recanatini i C. Melchiorre, Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site

- acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 6446–6449.
113. G. Razay i G. K. Wilcock, Galantamine in Alzheimer's disease, *Expert. Rev. Neurotherapeutics* **8** (2008) 9-17.
114. V. Jelic i T. Darreh-Shori, Donepezil: a review of pharmacological characteristics and role in the management of Alzheimer disease, *Clin. Med. Insights Ther.* **2** (2010) 771-788.
115. J. Corey-Bloom, R. Anand i J. Veach, A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease, *Int. J. Geriatr. Psychopharmacol.* **1** (1998)55–65.
116. T. Müller, Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **3** (2007) 211-218.
117. E. Mahase, Aducanumab: European agency rejects Alzheimer's drug over efficacy and safety concerns, *BMJ* **375** (2021) e3127
118. P. Adams i F. A. Baron, Esters of carbamic acid, *Chem. Rev.* **65** (1965) 567–602.
119. A. Matošević i A. Bosak, Carbamate group as structural motif in drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71** (2020) 285-299.
120. A. K. Ghosh i M. Brindisi, Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 2895–2940.
121. E. Reiner i Z. Radić, Mechanisam of action of cholinesterase inhibitor, u: E. Giacobini (ur.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Martin Duntic Ltd. , London, 2000.
122. S. Darvesh, K. V. Darvesh, R. S. McDonald, D. Mataija, R. Walsh, S. Mothana, O. Lockridge i E. Martin, Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 4200–4212.
123. Anand P. i Singh B., A review on cholinesterase inhibitors, *Arch. Pharm. Res.* **36** (2013) 375-399.
124. M. L. Bolognesi, M. Bartolini, A. Cavalli, V. Andrisano, M. Rosini, A. Minarini i C. Melchiorre, Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues, *J. Med.Chem.* **47** (2004) 5945–5952.
125. J. Sterling, Y. Herzig, T. Goren, N. Finkelstein, D. Lerner, W. Goldenberg, I. Miskolczi, S. Molnar, F. Rantal, T. Tamas, G. Toth, A. Zagyva, A. Zekany, J. Finberg, G. Lavian, A. Gross, R. Friedman, M. Razin, W. Huang, B. Kraus, M. Chorev, M.B. Youdim i M. Weinstock, Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and henethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 5260–5279.
126. G. Ucar, N. Gokhan, A. Yesilada i A.A. Bilgin, 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: a novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases, *Neurosci. Lett.* **38** (2005) 327–331.

127. N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko i H. Kogen, A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* **11** (2003) 4389–4415.
128. M. Krátký, Š. Štěpánková, K. Vorčáková, M. Švarcová i J. Vinšová, Novel cholinesterase inhibitors based on O-aromatic N,N-disubstituted carbamates and thiocarbamates, *Molecules* **21** (2016) e21020191
129. E. Groner, Y. Ashani, D. Schorer-Apelbaum, J. Sterling, Y. Herzig i M. Weinstock, The kinetics of inhibition of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by two series of novel carbamates, *Molec. Pharmacol.* **71** (2007) 1610-1617.
130. U. Košak, N. Strašek, D. Knez, M. Jukič, S. Žakelj, A. Zahirović, A. Pišlar, X. Brazzolotto, F. Nachon, J. Kos i S. Gobec, N-alkylpiperidine carbamate as potential anti- Alzheimer's agents, *Eur. J. Med. Chem.* **197** (2020) 112282
131. A. Bosak, I. Gazić, V. Vinković i Z. Kovarik, Stereoselective inhibition of human, mouse, and horse cholinesterases by bambuterol enantiomers, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 192-195.
132. M. J. Burk i J. G. Allen, A mild amide to carbamate transformation, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 7054–7057.
133. Y. Matsumura, T. Maki i Y. Satoh, Electrochemically induced Hofmann rearrangement, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 8879 –8882.
134. P. Gogoi i D. Konwar, An efficient modification of the Hofmann rearrangement: synthesis of methyl carbamates, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 531 –533.
135. T. Curtius, Hydrazide und azide organischer sauren I. Abhandlung, *J. Prakt. Chem.* **50** (1894) 275 –294.
136. E. F. V. Scriven i K. Turnbull, Azides: their preparation and synthetic uses, *Chem. Rev.* **88** (1988) 297 –368.
137. J. S. Nowick, N. A. Powell, T. M. Nguyen i G. Noronha, An improved method for the synthesis of enantiomerically pure amino acid ester isocyanates, *J. Org. Chem.* **57** (1992), 7364–7366.
138. P. Majer i R. S. Randad, A safe and efficient method for preparation of N,N'-unsymmetrically disubstituted ureas utilizing triphosgene, *J. Org. Chem.* **59** (1994) 1937–1938.
139. M. Abla, J. C. Chol i T. Sakakura, Halogen-free process for the conversion of carbon dioxide to urethanes by homogeneous catalysis, *Chem. Commun.* (2001) 2238–2239.
140. Y. Yoshida, S. Ishii i T. Yamashita, A direct synthesis of carbamate ester from carbon dioxide, amine and alkyl halide, *Chem. Lett.* **13** (1984) 13, 1571–1572.
141. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres i R. M. Featherstone, New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–95.

142. P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf i E. Reiner, Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal. Biochem.* **312** (2003) 224–227.
143. M. Weinstock i E. Groner, Rational design of a drug for Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitory and neuroprotective activity, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 216–221.
144. M. Pistolozzi, H. Du, H. Wei i W. Tan, Stereoselective inhibition of human butyrylcholinesterase by the enantiomers of bambuterol and their intermediates, *Drug Metab. Dispos.* **43** (2015) 344–352.
145. E. Perola, L. Cellai, D. Lamba, L. Filocamo i M. Brufani, Long chain analogs of physostigmine as potential drugs for Alzheimer's disease: new insights into the mechanism of action in the inhibition of acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1343** (1997) 41–50.
146. L. Baum i A. Ng, Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models, *J. Alzheimer's Dis.* **6** (2004) 367–377.
147. T. Pal, P. Patil i A. Shrama, Synthesis, molecular docking and spectroscopic studies of pyridoxine carbamates as metal chelator, *J. Mol. Struct.* **1223** (2021) e128837.
148. F. Prati, C. Bergamini, R. Farto, A. Soukup, J. Korabency, V. Andrisano, M. Bartolini i M. L. Bolognesi, Novel 8-hydroxyquinoline derivatives as multitarget compounds for the treatment of Alzheimer's disease, *ChemMedChem* **11** (2016) 1284–1295.
149. P.M. Carvey, B. Hendey i A. J. Monahan, The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective, *J. Neurochem.* **111** (2009) 291–314.
150. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy i P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3–26.
151. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward i K. D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 2615–2623.
152. H. Pajouhesh i G. R. Lenz, Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs, *NeuroRX* **2** (2005) 541–553.
153. Z. Rankovic, CNS drug design: Balancing physicochemical properties for optimal brain exposure, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 2584–2608.
154. Cheung, J.; Rudolph, M.J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M.S.; Gary, E.N.; Love, J.; Franklin, M.C.; Height, J.J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands, *J. Med. Chem.* **55** (2012), 10282–10286.
155. T. L. Rosenberry, X. Brazzolotto, I. R. Macdonald, M. Wandhammer, M. Trovaslet-Leroy, S. Darvesh i F. Nachon, Comparison of the binding of reversible inhibitors to human

- butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: a crystallographic, kinetic and calorimetric study, *Molecules* **22** (2017) e2098
156. U. Košak, B. Brus, D. Knez, S. Žakelj, J. Trontelj, A. Pišlar, R. Šink, M. Jukič, M. Živin, A. Podkowa, F. Nachon, X. Brazzolotto, J. Stojan, J. Kos, N. Coquelle, K. Sałat, J. P. Colletier i S. Gobec, The magic of crystal structure-based inhibitor optimization: development of a butyrylcholinesterase inhibitor with picomolar affinity and in vivo activity, *J. Med. Chem.* **61** (2018) 119–139.
157. C. F. Bartels, F. S. Jensen, O. Lockridge, A. F. L. Van der Spek, H. M. Rubinstein, T. Lubrano i B. N. La, DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites, *Am. J. Hum. Genet.* **50** (1992) 1086–1103.
158. P. Bar-On, C. B. Millard, M. Harel, H. Dvir, A. Enz, J. L. Sussman i I. Silman, Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine, *Biochemistry* **41** (2002,) 3555–3564.
159. J. M. J. Coelho Filho i J. Birks, Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2** (2001) e1499
160. M. Mehta, A. Adem i M. Sabbagh, New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* **2** (2012) 1-8.
161. Z. Kovarik, Z. Radić, B. Grgas, M. Škrinjarić-Špoljar, E. Reiner i V. Simeon-Rudolf, Amino acid residues involved in the interaction of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with the carbamates Ro 02-0683 and bambuterol, and with terbutaline, *Biochim. Biophys. Acta* **1433** (1999) 261-271.
162. K. Palm, K. Luthman, A. L. Ungell, G. Strandlund i P. Artursson, Correlation of drug absorption with molecular surface properties, *J. Pharm. Sci.* **85** (1996) 32–39.
163. R. N. Rosenberg, Metal chelation therapy for Alzheimer Disease, *Arch. Neurol.* **60** (2003) 1678-1679.
164. M. L. Hegde, P. Bharathi, A. Suram, C. Venugopal, R. Jagannathan, P. Poddar, P. Srinivas, K. Sambamurti, K. J. Rao, J. Scancar, L. Messori, L. Zecca i Paolo Zatta, Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* **17** (2009) 457–468.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime i prezime	Ana Matošević
Adresa	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Ksaverska cesta 2, pp 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska
Telefon/ E-mail	+385 1 4682 564 / amatoševic@imi.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum i mjesto rođenja	18.06.1992. Osijek, Hrvatska
Radno iskustvo	
Datum (od– do)	2018. →
Ustanova	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Jedinica	Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju
Radno mjesto	Asistent
Područje istraživanja	Dizajn i sinteza novih spojeva i ispitivanje njihovog inhibicijskog potencijala prema kolinesterazama. Proučavanje enzimske kinetike, interakcija kolinesteraza s reverzibilnim i progresivnim inhibitorima Procjena interakcija acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze s raznim inhibitorima u terapijske svrhe kod neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonova, Alzheimerova bolest).
Školovanje	
Datum (od –do)	2018. →
Ustanova	Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Studij	Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija
Datum (od –do)	2015.-2017.
Ustanova	Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju
Studij	Istraživački studij kemije
Naslov diplomskog rada	Priprava oksima pomoću eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida
Zvanje	Magistra kemije
Datum (od –do)	2011.-2015.
Ustanova	Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju
Studij	Preddiplomski sveučilišni studij kemije
Naslov završnog rada	Elektrokemijska impedancijska spektroskopija
Zvanje	Sveučilišna prvostupnica kemije
Osobne vještine	
Materinji jezik	Hrvatski
Drugi jezici	Engleski (B2), Njemački (A2),
Tehničke kompeticije	MS Office, GraphPad Prism, ChemDrawBio, ChemAxon's Marvin, MestReNova
Članstva	
	Hrvatsko kemijsko društvo Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju
Nagrade i priznanja	
	1. FEBS YTF fellowship za sudjelovanje na Joint IUBMB/FEBS Advanced Lecture Course Molecular Targets for Anti-aging Interventions, Spetses Island, Grčka 2022. 2. Stipendija Hrvatskog kemijskog društva i ISCM-a za sudjelovanje na 17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022), Dubrovnik, Hrvatska 2022 .

3. Stipendija za sudjelovanje na FEBS 20th YSF 2020 and 45th FEBS Congress 2020, Lovran, Hrvatska i Ljubljana, Slovenija 2020.
4. Stipendija Sveučilišta J.J.Strossmayer u Osijeku za izvrsnost, 2016/2017.
5. Rektorova nagrada Sveučilišta J. J.Strossmayer u Osijeku 2017.

Popis publikacija

1. **Matošević, Ana**; Knežević, Anamarija; Zandona, Antonio; Maraković, Nikola; Kovarik, Zrinka; Bosak, Anita, Design, synthesis and biological evaluation of biscarbamates as potential selective butyrylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Pharmaceuticals* **15** (2022), 10; 1220
2. Ramić, Alma; **Matošević, Ana**; Debanić, Barbara; Mikelić, Ana; Primožič, Ines; Bosak, Anita; Hrenar, Tomica, Synthesis, biological evaluation and machine learning prediction model for fluorinated Cinchona alkaloid-based derivatives as cholinesterase inhibitors, *Pharmaceuticals* **15** (2022), 10; 1214
3. Komatović, Katarina; **Matošević, Ana**; Terzić- Jovanović, Nataša; Žunec, Suzana; Šegan, Sandra; Zlatović, Mario; Maraković, Nikola; Bosak, Anita; Opsenica, Dejan, 4-aminoquinoline-based adamantanes as potential anticholinesterase agents in symptomatic treatment of Alzheimer's disease, *Pharmaceutics* **14** (2022), 6; 1305, 19
4. **Matošević, Ana**; Radman Kastelic, Andreja; Mikelić, Ana; Zandona, Antonio; Katalinić, Maja; Primožič, Ines; Bosak, Anita; Hrenar, Tomica, Quinuclidine-based carbamates as potential CNS active compounds, *Pharmaceutics*, **13** (2021), 3; 42
5. **Matošević, Ana**; Bosak, Anita, Carbamate group as structural motif in drugs: a review of carbamate derivatives used as therapeutic agents, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **71** (2020) 285-299.

Sudjelovanje na projektima

1. Projekt Zaklade HAZU „Sinteza i biološka evaluacija karbamata kao potencijalnih inhibitora kolinesteraza u tretmanu Alzheimerove bolesti“ (voditeljica: **A. Matošević**)
2. Projekt Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj bioaktivnih molekula za tretman neurodegenerativnih bolesti“ (HrZZ-IP-2020-02-9343; voditeljica: A. Bosak)
3. Projekt Hrvatske zaklade za znanost „Analiza interakcija butirilkolinesteraze s novim inhibitorima i reaktivatorima“ (HrZZ-IP-2018-01-7683; voditeljica: Z. Kovarik)
4. Hrvatsko-slovenski bilateralni projekt „Promjena vijabilnosti mišićnih stanica pod utjecajem oksimskih analoga“ (voditeljica: M. Katalinić)
5. Institutski projekt „Dizajn, sinteza i evaluacija selektivnih inhibitora butirilkolinesteraze“ (IMI-IP-2017-02, do 10.7.2020.; voditeljica: A. Bosak)

Sudjelovanje u nastavi

- U akademskoj godini 2020./2021. u svojstvu asistentice sudjelovala sam u provedbi praktikumske nastave iz kolegija Praktikum biokemije (Preddiplomski studij kemije),
- U akademskoj godini 2020./2021. bila sam voditeljica i mentorica stručne prakse studentice III. godine Prediplomskog studija kemije, Aleksandrine Voldošak

Kongresna priopćenja

1. Primožič, I., **Matošević, A.**, Ramić, A., Mikelić, A., Hrenar, T., Bosak, A. Cinchona-alkaloid-derived compounds as selective inhibitors of butyrylcholinesterase, 14th International Meeting on Cholinesterases and 8th International Conference on Paraoxonases, Bologna, Italija, 2022.
2. Bosak, A., **Matošević, A.**, Knežević, A., Maraković, N., Kovarik, Z. Biscarbamates as cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease, 14th International Meeting on Cholinesterases and 8th International Conference on Paraoxonases, Bologna, Italija, 2022.
3. Komatović, K., **Matošević, A.**, Spasić, M., Maraković, N., Bosak, A., Opsenica, D. Synthesis and biological evaluation of 4-amino-7- chloroquinolines as novel reversible inhibitors of human cholinesterases, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology HDBMB22: *From Science to Knowledge*, Brela, Hrvatska, 2022.

4. **Matošević, A.**, Knežević, A., Zandona, A., Maraković, N., Kovarik, Z., Bosak, A. Design, synthesis and biological evaluation of biscarbamates as potential selective butyrylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, Joint IUBMB/FEBS Advanced Lecture Course "*Molecular targets for anti-aging interventions*" Spetses Island, Grčka, 2022.
5. Bartolić, M., **Matošević, A.**, Spasić, M., Opsenica, D., Bosak, A. Evaluation of 4-aminoquinolines as potential MTDL ligands for the treatment of Alzheimer's disease, Joint IUBMB/FEBS Advanced Lecture Course "*Molecular targets for anti-aging interventions*" Spetses Island, Grčka 2022.
6. Bartolić, M., **Matošević, A.**, Bušić, V., Gašo Sokač, D., Bosak, A. Evaluation of hydrazone-based compounds as potential drugs for treatment of Alzheimer's disease, European School of Medicinal Chemistry- 41st Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" Seminar for PhD Students, Urbino, Italija 2022.
7. **Matošević, A.**, Knežević, A., Maraković, N., Kovarik, Z., Bosak, A. Design, synthesis and biological evaluation of cyclic biscarbamates as selective butyrylcholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease, European School of Medicinal Chemistry- 41st Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" Seminar for PhD Students, Urbino, Italija 2022.
8. Bosak, A., Opsenica, D., **Matošević, A.**, Komatović, K., Terzić-Jovanović, N., Žunec, S., Maraković, N. Evaluation of 4-aminoquinolines as potential anticholinesterase agents in the treatment of Alzheimer's, 17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022), Mlini-Dubrovnik, Hrvatska, 2022.
9. Bartolić, M., **Matošević, A.**, Bušić, V., Gašo-Sokač, D., Bosak, A. Hydrazone-based compounds evaluated as inhibitors of human cholinesterases, 17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022), Mlini- Dubrovnik, Hrvatska, 2022.
10. **Matošević, A.**, Knežević, A.; Zandona, A.; Maraković, N.; Katalinić, M., Kovarik, Z.; Bosak, A. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic meta-biscarbamates, 17th International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM2022), Mlini- Dubrovnik, Hrvatska, 2022.
11. Opsenica, D., Bosak, A., **Matošević, A.**, Komatović, K., Maraković, N. 4-aminoquinolines, a privileged pharmacophore - from antimalarials to inhibition of cholinesterase, 27th Croatian meeting of chemists and chemical engineers Veli Lošinj, Hrvatska, 2021.
12. **Matošević, A.**, Bosak, A. Application of NMR for monitoring the synthetic route and characterization of bisacrbamates, Adriatic NMR Conference 2021, Primošten, Hrvatska, 2021.
13. **Matošević, A.**, Bosak, A. Design, synthesis and biological evaluation of compounds as active drugs in the central and peripheral nervous system, 5. PhD Student Symposium, PMF, Zagreb, Hrvatska, 2021.
14. **Matošević, A.**, Knežević, A., Bosak, A. Heterocyclic carbamates as potential drugs for the treatment of the neurodegenerative diseases, 29th European Colloquium on Heterocyclic Chemistry, Rouen: ECHC, Francuska, on- line 2021.
15. **Matošević, A.**, Knežević, A., Zandona, A., Katalinić, M., Kovarik, Z., Bosak, A. Influence of the butyrylcholinesterase gene polymorphism on the inhibition of butyrylcholinesterase by biscarbamates, a potential Alzheimer's disease drugs, The 45th FEBS Congress „*Molecules of Life: Towards New Horizons*“, Ljubljana, Slovenija i 20th FEBS Young Scientists' Forum (YSF), Lovran, Hrvatska, on-line 2021.
16. Bosak, A., **Matošević, A.**, Zandona, A., Šinko, G., Komatović, K., Opsenica, D. New 4-aminoquinoline-based cholinesterase inhibitors, The 45th FEBS Congress „*Molecules of Life: Towards New Horizons*“, Ljubljana, Slovenija, on-line 2021.
17. Komatović, K., **Matošević, A.**, Terzić- Jovanović, N., Bosak, A., Opsenica, D. Adamantane based derivatives as reversible inhibitors of human AChE and BChE, The 45th FEBS Congress „*Molecules of Life: Towards New Horizons*“, Ljubljana, Slovenija i 20th FEBS Young Scientists' Forum (YSF), Lovran, Hrvatska, on-line 2021.

18. **Matošević, A.**, Knežević, A., Bosak, A. Efficient five-step synthetic pathway toward biologically active carbamates, International Conference 18th Ružička days "TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY", Vukovar, Hrvatska, 2020.
19. **Matošević, A.**, Knežević, A., Kovarik, Z., Bosak, A. Selectivity of biscarbamates in interaction with human cholinesterases. 4. PhD Student Symposium, PMF, Zagreb, Hrvatska 2020.
20. Primožič, I., Radman Kastelic, A., Mikelić, A., Hrenar, T., **Matošević, A.**, Bosak, A., Kovarik, Z. Design, synthesis and characterisation of quinuclidine carbamates, 16th International Symposium on Cholinergic Mechanisms Rehovot, Izrael, 2019.
21. Ramić, A., Hrenar, T., **Matošević, A.**, Bosak, A., Primožič, I. Synthesis and evaluation of fluorinated Cinchona alkaloids as cholinesterases inhibitors, 16th International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Rehovot, Izrael, 2019.
22. Bosak, A., **Matošević, A.**, Knežević, A., Zandona, A., Katalinić, M., Kovarik, Z. Design, synthesis and biological evaluation of biscarbamates as potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors, 16th International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Rehovot, Izrael, 2019.
23. **Matošević, A.**; Knežević, A.; Kovarik, Z.; Bosak, A. Selectivity of biscarbamates in interaction with human cholinesterases, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "Crossroads in Life Sciences", HDBMB2019, Lovran, Hrvatska, 2019.
24. Ramić, A., **Matošević, A.**, Bosak, A., Kovarik, Z., Hrenar, T., Primožič, I. Design, synthesis and characterisation of Cinchona alkaloid carbamates, 26th Croatian meeting of chemists and chemical engineers, Šibenik, Hrvatska, 2019.
25. **Matošević, A.**, Knežević, A., Kovarik, Z., Bosak, A. Synthesis of biscarbamates as potential selective inhibitors of butyrylcholinesterase, 2nd Mini-symposium of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Young Medicinal Chemist's Meeting, Zagreb, Hrvatska, 2018.

Radionice

1. Joint IUBMB/FEBS Advanced Lecture Course "Molecular targets for anti-aging interventions", Spetses Island, Grčka, 2022.
2. European School of Medicinal Chemistry- 41st Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" Seminar for PhD Students, Urbino, Italija, 2022.
3. Radionica "Uvod u molekulsko modeliranje", Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 2021.
4. Praktična radionica "Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa", BioCentar, Zagreb, Hrvatska, 2021.
5. Online tečaj "Models of the Blood-Brain Barrier: Scientific Tools to Target the Brain", Farmaceutski fakultet u Lisabonu, 2021.
6. HDBMB&FEBS Education Workshop "Excellent lab book for an excellent career", HDBMB, Zagreb, Hrvatska, 2020.
7. Radionica "How to successfully write a scientific paper?" i "Scopus: how to choose a journal wisely?", Faculty of Science, Zagreb, Hrvatska, 2020.
8. Seminar i radionica "Osnove proteomike", BioCentar, Zagreb, Hrvatska, 2020.
9. Radionica i seminar „Latest advances in LC-MS/MS analysis”, Sciex, Zagreb, Hrvatska, 2020.
10. Radionica „Gene Expression and Reproductive Health“, Zagreb, Hrvatska, 2019.
11. Radionica "Better skills for better jobs: Education and training for successful research careers" FEBS Workshop on Education, Lovran, Hrvatska, 2019.
12. Advanced Course "Trends in Enzymology and Biocatalysis", Azuleon sas, Rim, Italija, 2019.
13. Radionica "Uvod u molekulsko modeliranje", Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, 2018.