

A61K 31/473 (2006.01)
C07D 219/06 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-34**
(22) Přihlášeno: **26.01.2021**
(40) Zveřejněno: **01.06.2022**
(Věstník č. 22/2022)
(47) Uděleno: **22.04.2022**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **01.06.2022**
(Věstník č. 22/2022)

(56) Relevantní dokumenty:
Zagórska, A., et al: Perspectives for New and More Efficient Multifunctional Ligands for Alzheimer's Disease Therapy; *Molecules* (2020);25(15):3337. doi: 10.3390/molecules25153337. ISSN 1420-3049.
WO 03/045 920 A1.

(73) Majitel patentu:
Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec
Králové, Nový Hradec Králové, CZ
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ
Národní ústav duševního zdraví, p.o., Klecany, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ

(72) Původce:
doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D., Březno, CZ
PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D., Opatovice nad
Labem, CZ
Mgr. Martin Horák, Ph.D., Praha 4, Kamýk, CZ
Mgr. Anna Misiachna, 08170 Vita-Poštova, UA
RNDr. Karel Valeš, Ph.D., Praha 5, Zbraslav, CZ
prof. MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc., Kamenice,
CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
7-Fenoxytakrin a jeho použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin pro léčbu některých demencí na základě duální aktivity pro inhibici cholinesteras a jako antagonisty NMDAR.

7-Fenoxytakrin a jeho použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká nové sloučeniny na bázi takrinu jakožto duálně účinného inhibitoru acetylcholinesterasy a antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů, způsobu jeho přípravy a jeho léčebného použití.

10

Dosavadní stav techniky

Tzv. ligandy s multifunkčním charakterem (MTDL; z angl. multi-target directed ligands) se v poslední době často objevují ve vědecké literatuře, protože to jsou sloučeniny, které jsou účinné při léčbě komplexních onemocnění díky své schopnosti interagovat s různými cíli podezřelými z patogeneze onemocnění současně. Základní hypotéza je, že multifaktoriální léčiva budou účinnější než léčiva určená pro jediný cíl. Strategie MTDL je farmakologický nástroj k potlačení onemocnění multifaktoriální povahy a uplatňuje se zejména v oblasti infekčních chorob, onkologických či neurologických onemocnění. V oblasti neurologických onemocnění se jedná zejména potom o neurodegenerativní onemocnění jako Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky případně jejich kombinací (RAMSAY, R. R., M. R. POPOVIC-NIKOLIC, K. NIKOLIC, E. ULIASSI AND M. L. BOLOGNESI A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and translational medicine*, 2018, 7(1), 3.)

25

Tzv. duální účinek léčiv na inhibici acetylcholin esterázy a zároveň schopnost antagonizovat NMDA receptory by dle doporučených postupů měl nalézt uplatnění v terapii demence s Lewyho tělísky nebo v terapii vaskulární demence v kombinaci s demencí s Lewyho tělísky a v kombinaci s Parkinsonovou či Alzheimerovou chorobou (NICE guideline, June 2018, Dementia). Tedy, u těchto onemocnění je kombinatorní léčba například pomocí inhibitorů acetylcholinesterasy v kombinaci s NMDAR antagonistou memantinem účelná, a kombinace těchto dvou účinků do jednoho léčiva je racionální podklad pro kompatibilitu obou účinků v rámci jedné molekuly. Ten je dán zejména faktem, že narušení obou systémů (cholinergní i glutamatergní neurotransmise) se vyskytuje současně v pozdních fázích, tedy při klinickém projevu těchto onemocnění.

35

Nejčastěji volenou strategií přípravy těchto tzv. MTDL je spojení dvou heterogenních farmakoforů, kdy tyto farmakofory jsou spojeny uhlíkovým řetězcem (přístup „linking“). Avšak tento způsob vede ke zvýšené molekulové hmotnosti finálních sloučenin, snížené solubilitě a dalším nevhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem výsledné entity, a současně většímu *off-targetingu* a toxicitě. Proto je výhodné kombinaci různých farmakoforů hledat v rámci jedné molekuly (tzv. přístup „merging“ nebo „fusing“) (BENEK, O., J. KORABECNY AND O. SOUKUP A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2020, 41(7), 433-445).

45

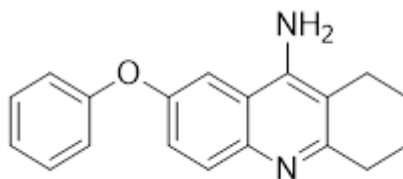
Jednotlivá léčiva s tímto tzv. duálním efektem však nejsou na trhu dostupná (vyjma huperzinu-A schváleného v Číně). V literatuře se však tento duální účinek objevuje. Duální koncept předpokládající inhibici jak AChE, tak NMDA receptorů založený na zmíněném „linking“ přístupu byl poprvé představen navázáním galantaminu na memantin (SIMONI, E., S. DANIELE, G. BOTTEGONI, D. PIZZIRANI, M. L. TRINCAVELLI, L. GOLDONI, G. TAROZZO, A. REGGIANI, C. MARTINI AND D. PIOMELLI Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in Alzheimer's disease. *Journal of medicinal chemistry*, 2012, 55(22), 9708-9721; REGGIANI, A. M., E. SIMONI, R. CAPORASO, J. MEUNIER, E. KELLER, T. MAURICE, A. MINARINI, M. ROSINI AND A. CAVALLI *In vivo* characterization of ARN14140, a memantine/galantamine-based multi-target compound for Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 2016, 6(1), 1-11). Dále byly připraveny hybridy na bázi

55

- takrinu s memantinem (SPILOVSKA, K., J. KORABECNY, J. KRAL, A. HOROVA, K. MUSILEK, O. SOUKUP, L. DRTINOVA, Z. GAZOVA, K. SIPOSOVA AND K. KUCA. 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. In Molecules. 2013, vol. 2, p. 2397-2418; GAZOVA, Z., O. SOUKUP, V. SEPSOVA, K. SIPOSOVA, L. DRTINOVA, P. JOST, K. SPILOVSKA, J. KORABECNY, E. NEPOVIMOVA AND D. FEDUNOVA Multi-target-directed therapeutic potential of 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers in the Alzheimer's disease treatment. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2017, 1863(2), 607-619.) a později byla potvrzena neuroprotektivní účinnost v modelu laboratorního potkana pomocí lézí indukovaných NMDA pro hybrid 6-chlortakrin-memantin (KANIAKOVA, M., E. NEPOVIMOVA, L. KLETECKOVA, K. SKRENKOVA, K. HOLUBOVA, Z. CHRIENOVA, V. HEPNAROVA, T. KUCERA, T. KOBRLOVA AND K. VALES Combination of memantine and 6-chlorotacrine as novel multi-target compound against Alzheimer's disease. Current Alzheimer Research, 2019, 16(9), 821-833).
- V Číně byl u schváleného léčiva pro léčbu Alzheimerovy choroby, huperzinu-A, pozorován tento duální účinek. Navzdory velkým očekáváním jeho duálně působící deriváty (ZHANG, J.-M. AND G.-Y. HU Huperzine A, a nootropic alkaloid, inhibits *N*-methyl-*D*-aspartate-induced current in rat dissociated hippocampal neurons. Neuroscience, 2001, 105(3), 663-669.) spolu s bis-7-takrinem (bis-7-kognitin) (LIU, Y. W., C. Y. LI, J. L. LUO, W. M. LI, H. J. FU, Y. Z. LAO, L. J. LIU, Y. P. PANG, D. C. CHANG, Z. W. LI, R. W. PEOPLES, Y. X. AI AND Y. F. HAN Bis(7)-tacrine prevents glutamate-induced excitotoxicity more potently than memantine by selectively inhibiting NMDA receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications, May 16 2008, 369(4), 1007-1011.) nikdy nedosáhly klinických studií.
- Takrin je léčivo, které bylo schváleno jakožto inhibitor cholinesteras díky svému pro-kognitivnímu účinku pro léčbu v roce 1993, ale od jeho použití bylo později upuštěno pro jeho gastrointestinální vedlejší účinky a hepatotoxicitu. Tedy další využití této molekuly je spojeno s průkazem bezpečnosti nových molekul, zejména stran odlišné metabolizace, která nepovede ke vzniku hepatotoxických intermediátů (PATOCKA, J., D. JUN AND K. KUCA Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. Current Drug Metabolism, May 2008, 9(4), 332-335).

Podstata vynálezu

- Předkládaný vynález je založen na nově identifikovaném duálním účinku fenoxytakrinu se schopností pozitivně interferovat s deficitním cholinergním systémem, a současně antagonistovat NMDA receptory. Vynález se může uplatnit zejména díky tomu, že u tohoto takrinového derivátu je díky vhodné substituci prokázán jiný metabolismus než u takrinu či 7-methoxytakrinu a lze tak předpokládat nepřítomnost hepatotoxického účinku. Uplatnění lze tak očekávat v oblasti neurodegenerativních chorob, konkrétně v terapii demence s Lewyho tělísky nebo v terapii vaskulární demence v kombinaci s demencí s Lewyho tělísky a terapii vaskulární demence v kombinaci s Parkinsonovou či Alzheimerovou chorobou.
- Předmětem tohoto vynálezu je sloučenina 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin (7-fenoxytakrin) vzorce



7-fenoxytakrin může být používán ve formě farmaceuticky přijatelných solí s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo adičních solí s kyselinami.

5 Předmětem tohoto vynálezu je 7-fenoxytakrin pro použití pro inhibici cholinesteras, zejména acetylcholinesterasy (AChE) a/nebo butyrylcholinesterasy (BChE), a současné antagonistické působení na NMDAR.

10 Dále je předmětem tohoto vynálezu 7-fenoxytakrin pro symptomatickou léčbu demence s Lewyho tělísky nebo vaskulární demence v kombinaci s demencí s Lewyho tělísky nebo vaskulární demence v kombinaci s Parkinsonovou či Alzheimerovou chorobou.

Objasnění výkresů

15 Obrázek 1: Neuroprotektivní účinnost zástupce 7-PhOTA v modelu hipokampální léze indukované *N*-methyl-*D*-aspartátem. PBS = fosfátový pufr; NaCl = fyziologický roztok; NMDA = *N*-methyl-*D*-aspartát.

20 Příklady uskutečnění vynálezu

Obecné chemické metody

25 TLC byla prováděna na hliníkových destičkách pokrytých silikagelem 60 F254 (Merck, Praha, ČR).

Sloupcová chromatografie probíhala za atmosferického tlaku na silikagelu 100 (velikost částic 0,063 až 0,200 mm, 70 až 230 mesh ASTM, Fluka, Praha, ČR).

30 Chemikálie nezbytné pro syntézu byly koupeny ze společnosti Sigma-Aldrich Co. LLC a Fluorochem Ltd. a byly použity bez dalšího čištění.

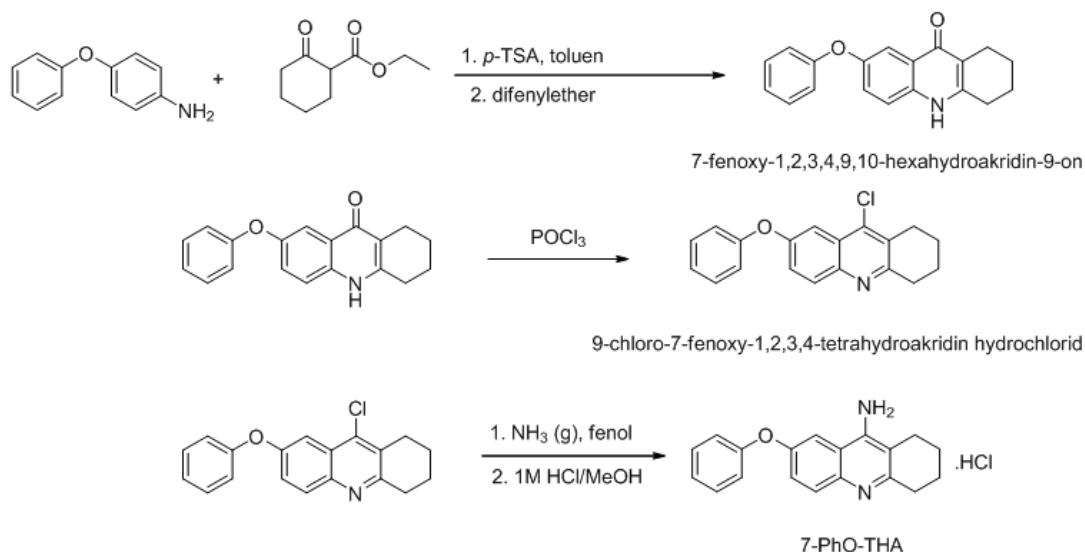
35 Přístroj CEM Explorer SP 12 S Class byl použit pro reakce prováděné za podmínek mikrovlnné aktivace.

40 Pro stanovení hmotnostní spektrometrie byl využitý analytický systém Dionex Ultimate 3000 LC-MS spojený se spektrometrem Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo). Systém LC-MS se skládá z binárního čerpadla HHG-3400RS, který je spojený s vakuovým odplyňovačem. Dále z vyhřívaného sloupcového kompartmentu TCC-3000, autosampleru WTS-3000 a ultrafialového detektoru VWD-3000. Kvadrupolový hmotnostní spektrometr byl vybavený elektron-sprejovým ionizačním zdrojem a data byla zaznamenávána v pozitivním módu s následujícími parametry: sprejové napětí bylo 3,2 kV, kapilární teplota byla 350 °C, teplota plynu byla 300 °C.

45 ¹H a ¹³C spektra NMR byla stanovena při teplotě místnosti v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆) na NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C) a Bruker Avance III (600 MHz pro ¹H a 151 MHz pro ¹³C). Chemické posuny (δ) protonů v ¹H NMR a uhlíků v ¹³C NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. Referenčním standardem pro posun v ¹H NMR spektrech byl centrální pík DMSO-*d*₆ při $\delta = 2,50$ ppm, pík CDCl₃ při $\delta = 7,26$ ppm a pík pro methanol-*d*₄ při $\delta = 3,21$ ppm. V ¹³C NMR spektrech byl interním standardem pík DMSO-*d*₆ při $\delta = 39,43$ ppm, pík CDCl₃ při $\delta = 77,00$ ppm a pro methanol-*d*₄ pík $\delta = 47,6$ ppm. Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hz. Spinová multiplicita signálů v ¹H NMR spektrech je vyjádřena jako bs (broad singlet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet dubletu) t (triplet) nebo m (multiplet).

55 Chemické posuny jsou udávány v ppm (parts per milion, δ) vzhledem k uvedeným rozpouštědlům.

Příklad 1 – Příprava sloučeniny 7-fenoxytakrinu



5 Schéma 1. Syntéza 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin hydrochloridu.

9-chloro-7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin hydrochlorid

Chemická syntéza 7-fenoxytakrinu probíhá ve třech krocích (Schéma 1). V prvním kroku dochází k cyklokondenzační reakci 4-fenoxyanilinu (1,0 ekv.) a ethyl-2-oxocyklohexan-1-karboxylátu (1,1 ekv.) za katalýzy *p*-toluensulfonové kyseliny (*p*-TSA) v toluenu (150 °C, přes noc) a následně v difenyletheru (230-240 °C, 2 hodiny). Po ochlazení reakční směsi je přidán hexan a vzniklé krystaly jsou odfiltrovány na fritě a dvakrát promyty hexanem ke zbavení zbytků difenyletheru. Vzniklý 7-fenoxy-1,2,3,4,9,10-hexahydroakridin-9-on je ihned použit do další reakce bez čištění. V dalším kroku je k 7-fenoxy-1,2,3,4,9,10-hexahydroakridin-9-onu (1,0 ekv.) přidáván fosforylchlorid (9,5 ekv.) za chlazení (ledová lázeň). Poté je ledová lázeň odstraněna a reakční směs je zahřívána na 130 °C po dobu 1 hodinu. Nezareagovaný fosforylchlorid je oddestilován za sníženého tlaku a zbytek reakční směsi pomalu přelit na nadrcený led. Následně je organická sloučenina extrahována mezi dichlormethan a vodu, poté s nasyceným roztokem chloridu sodného. Organická frakce je sušena síranem sodným bezvodým a odpařena do sucha. Čištění probíhá sloupcovou chromatografií s využitím silikagelu (stacionární fáze) a petrolether : ethyl-acetátu (4:1 v/v) jako mobilní fáze za vzniku 9-chlor-7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridinu.

Výtěžek: 95 %. Nažloutlý olej. ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,95 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 7,40 (dd, *J* = 9,1, 2,7 Hz, 1H), 7,38 – 7,33 (m, 2H), 7,18 – 7,12 (m, 1H), 7,10 – 7,05 (m, 2H), 3,14 – 3,03 (m, 2H), 2,99 – 2,89 (m, 2H), 1,97 – 1,83 (m, 4H); ¹³C (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 157,88, 156,62, 155,41, 143,42, 140,21, 130,58, 129,80, 129,11, 126,16, 123,69, 122,77, 119,07, 109,87, 33,85, 27,42, 22,56, 22,48; HRMS [M+H]⁺: 311,0894 (vypočítáno pro [C₁₉H₁₇ClNO]⁺: 311,0891).

7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin hydrochlorid

9-Chlor-7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (1,0 ekv.) a fenol (9,2 ekv.) jsou smíchány v dvouhrdlé baňce a probublávány plynným amoniakem za stálého míchání a ohřevu na 180°C. Po dosažení této teploty je reakční směs probublávána ještě 2 hodiny. Po ochlazení dojde ke zředění dichlormethanem a extrakci s 2M roztokem NaOH, následně vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organická frakce je sušena síranem sodným bezvodým a následně odpařena do sucha. Čištění probíhá sloupcovou chromatografií s využitím hexan:ethyl-acetátu jako mobilní

fáze (95:5→90:10, obj./obj.). Čistý produkt je následně konvertován na hydrochloridovou sůl pomocí 1M roztoku HCl v methanolu.

Výtěžek: 78 %. Žlutá krystalická látka. Teplota tání: 142,5 až 143,8 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,24 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 8,05 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H); 7,64 – 7,54 (m, 1H); 7,41 (tt, *J* = 7,4; 1,1 Hz, 2H); 7,16 (tt, *J* = 7,4; 1,1 Hz, 1H); 7,08 – 6,97 (m, 2H); 3,06 – 2,95 (m, 2H); 2,57 – 2,51 (m, 2H); 1,89 – 1,75 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 157,02; 154,79; 153,48; 150,91; 134,01; 130,34; 126,15; 123,79; 121,66; 118,22; 116,11; 112,02; 109,13; 27,81; 22,82; 21,22; 20,68; HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: vypočítáno pro C₁₉H₁₉N₂O⁺ (m/z): 291,1453; nalezeno 291,1484

Příklad 2: Testování *in vitro*: inhibice lidských enzymů AChE a BChE 7-fenoxytakrinem (7-PhOTA)

Látka podle vynálezu byla zkoumána pro svůj inhibiční potenciál vůči lidským enzymům AChE (*h*AChE) a BChE (*h*BChE). Výsledky testů jsou uvedeny v tabulce 1 a pro porovnání jsou uvedeny i referenční sloučeniny takrin a 7-methoxytakrinu (7-MEOTA).

In vitro aktivita vybraných kandidátů byla stanovena s použitím Ellmanovy metody dle dříve publikovaného protokolu (POHANKA, M., D. JUN AND K. KUČA Improvement of acetylcholinesterase-based assay for organophosphates in way of identification by reactivators. Talanta, Oct 15 2008, 77(1), 451-454.).

Tabulka 1. Výsledky stanovení inhibice *h*AChE a *h*BChE pro 7-fenoxytakrin (7-PhOTA) a referenční sloučeniny takrin a jeho 7-methoxyderivát (7-MEOTA)

sloučenina	AChE IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a	BChE IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a	SI ^b
Takrin	0,32 ± 0,013	0,08 ± 0,001	0,25
7-MEOTA	10,0 ± 1,0	17,6 ± 0,8	1,76
7-PhOTA	2,4 ± 1,8	4,9 ± 33	2,04

^a Uvedené výsledky jsou průměrnou hodnotou alespoň tří experimentů. ^b Index selektivity (SI) pro *h*AChE je vyjádřen poměrem *h*BChE IC₅₀/*h*AChE IC₅₀.

Příklad 3: Testování *in vitro*: stanovení inhibiční aktivity pro GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B podjednotku NMDAR

Inhibiční aktivita testovaných látek vůči NMDAR, konkrétně GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B byla testována pomocí techniky „whole-cell patch clamp“ na buňkách linie HEK293 exprimující tyto podjednotky NMDARs dle dříve publikovaného protokolu (KANIÁKOVA, M., L. KLETECKOVA, K. LICHNEROVA, K. HOLUBOVA, K. SKRENKOVA, M. KORINEK, J. KRUSEK, T. SMEJKALOVA, J. KORABECNY, K. VALES, O. SOUKUP AND M. HORAK 7-Methoxyderivative of tacrine is a ‘foot-in-the-door’ open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity *in vivo*. Neuropharmacology, 2018, 140, 217-232.). Z tabulky 2 lze vyčíst, že všechny testované sloučeniny vykazovaly vysokou inhibiční schopnost při udržovacím potenciálu -60mV vůči oběma podjednotkám (hodnoty IC₅₀ v jednotkách až desítkách mikromolu), až na výjimky, s nevýraznými rozdíly mezi GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B. Oproti tomu při udržovacím potenciálu +40mV byla inhibiční účinnost výrazně nižší, jak lze dokumentovat hodnotami IC₅₀ v řádech desítek mikromolů, případně inhibiční účinnosti vyjádřenou v % při aplikaci látky v koncentraci 100 μM.

Tabulka 2. Výsledky stanovení afinity pro GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B NMDAR

sloučenina	GluN1/GluN2A (-60 mV) IC ₅₀ ± SEM (μM)	GluN1/GluN2A (+40 mV) IC ₅₀ ± SEM (μM)	GluN1/GluN2B (-60 mV) IC ₅₀ ± SEM (μM)	GluN1/GluN2B (+40 mV) IC ₅₀ ± SEM (μM)
Takrin	9,1 ± 0,5	4,6 ± 1,6	19,7 ± 1,8	168,8 ± 9,3
7-PhOTA	7,4 ± 0,5	26,3 ± 1,3	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Příklad 4: Mechanismus působení, specifická vazba k NMDA receptoru pro 7-PhOTA

Našimi experimenty bylo prokázáno, že 7-PhOTA působí prostřednictvím interakce s vazebným místem pro ifenprodil na GluN1/GluN2B receptorech. Předchozí studie ukázaly, že aminokyselinový zbytek GluN1-Y109 je rozhodující pro inhibiční účinek specifických inhibitorů GluN1/GluN2B podjednotky (STROEBEL, D., D. L. BUHL, J. D. KNAFELS, P. K. CHANDA, M. GREEN, S. SCIABOLA, L. MONY, P. PAOLETTI AND J. PANDIT A Novel Binding Mode Reveals Two Distinct Classes of NMDA Receptor GluN2B-selective Antagonists. Mol Pharmacol, May 2016, 89(5), 541-551). Proto jsme zkoumali inhibiční účinek 7-PhOTA na receptory GluN1-Y109C/GluN2B, tedy nesoucí bodovou mutaci v GluN1-Y109, exprimované v buňkách HEK293. 7-PhOTA skutečně vykazoval podobnou hodnotu IC₅₀ pro inhibici GluN1-Y109C/GluN2B při membránovém potenciálu -60 mV ve srovnání s receptory GluN1-ΔATD/GluN2B-ΔATD, formě receptoru, kde je deletovaná celá amino-koncová doména (ΔATD), kde se ifenprodilové místo vyskytuje (tabulka 3). Dospěli jsme tedy k závěru, že 7-PhOTA účinně inhibuje receptory GluN1/GluN2B prostřednictvím vazebného místa pro ifenprodil. Kromě toho vykazuje napětově závislý inhibiční účinek jak na receptory GluN1/GluN2A, tak na GluN1/GluN2B. 7-PhOTA má tedy unikátní mechanismus působení na NMDAR ve srovnání s takrinem a 7-MEOTA v tom, že selektivně inhibuje GluN2B přes ifenprodilové místo.

Tabulka 3: Hodnoty IC₅₀ k mutovaným subjednotkám NMDA receptoru pro 7-PhOTA

Receptor	7-PhOTA								
	-60 mV			-20 mV			+40 mV		
	IC ₅₀	<i>h</i>	<i>n</i>	IC ₅₀	<i>h</i>	<i>n</i>	IC ₅₀	<i>h</i>	<i>n</i>
GluN1/GluN2B	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	14	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	8	2,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	10
GluN1/GluN2A	7,4 ± 0,5	1,9 ± 0,1	6	13,2 ± 0,9	1,6 ± 0,1	6	26,3 ± 1,3	1,7 ± 0,1	5
GluN1-ΔATD/ GluN2B-ΔATD	9,0 ± 0,6	1,5 ± 0,1	9	17,3 ± 1,1	1,3 ± 0,1	5	27,9 ± 2,7	1,0 ± 0,0	5
GluN1-ΔATD/ GluN2A-ΔATD	7,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1	6	-	-	-	-	-	-
GluN1-Y109C/ GluN2B	9,0 ± 0,4	1,5 ± 0,1	9	-	-	-	-	-	-

Příklad 5: Metabolizace a potenciální hepatotoxicita 7-PhOTA

Takrin byl jako léčivo stažen v důsledku své hepatotoxicity. Ta je připisována jeho metabolizaci na 7-hydroxytakrin, který vede k hepatotoxicitě (PATOČKA, J., D. JUN AND K. KUČA Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. Current Drug Metabolism, May 2008, 9(4), 332-335). Naše experimenty za využití lidské mikrosomální frakce prokázaly, že potenciálně hepatotoxický 7-hydroxytakrin vzniká pouze v minimální míře u zástupce 7-PhOTA u člověka na rozdíl od takrinu i 7-MEOTA (tabulka 4).

Mikrosomální *in vitro* experiment byl proveden s cílem identifikovat a semikvantitativně stanovit metabolity první fáze studovaných látek. Inkubace s lidskými jaterními mikrozomy (HLM) byla provedena podle metodiky publikované dříve NEPOVIMOVA, E., J. KORABECNY, R. DOLEZAL, K. BABKOVA, A. ONDREJICEK, D. JUN, V. SEPSOVA, A. HOROVA, M. HRABINOVA, O. SOUKUP, N. BUKUM, P. JOST, L. MUCKOVA, J. KASSA, D. MALINAK, M. ANDRS AND K. KUCA Tacrine-Troxolone Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low *In Vivo* Toxicity. Journal of medicinal chemistry, Nov 26 2015, 58(22), 8985-9003). Reakční směs složená z 50 μ l HLM, 25 μ l roztoku Rapid Start a 420 μ l pufru fosforečnanu draselného (pH 7,4) byla inkubována se zásobními roztoky stanovovaných látek při 37 °C po dobu 3 hodin, a poté byly probíhající mikrosomální reakce zastaveny přidávkem 500 μ l vychlazeného acetonitrilu.

Stabilita takrinu a jeho derivátů při podmínkách I. fáze biotransformace v mikrosomálním prostředí, identifikace a procentuální zastoupení vzniklých metabolitů byly určeny nově vyvinutou a optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou s využitím reverzní stacionární fáze Kinetex PFP (2,6 μ m, 150 \times 3,0 mm, 100 Å) a gradientového elučního režimu v pozitivním módu HRMS detekce (Q Exactive Plus Orbitrap). Dostatečné UHPLC separace metabolitů a parentních látek bylo dosaženo výběrem stacionární fáze, optimalizací složení mobilní fáze (H₂O a ACN s přidávkem 0,05% obj. kyseliny mravenčí), rychlosti průtoku mobilní fáze (0,6 ml/min) objemu nástřiku vzorku (1 μ l) a nastavení teploty kolonového termostatu na 40 °C.

Navržená a identifikace jednotlivých struktur metabolitů byla provedena pomocí vysokorozlišovací schopnosti hmotnostní detekce (Full-MS mód) v kombinaci s interpretací fragmentačních spekter jednotlivých metabolitů (PRM fragmentační mód).

Tabulka 4: Frakce potenciálně toxického metabolitu 7-hydroxytakrinu vznikuvšího z patentních látek metabolizací pomocí lidské mikrosomální frakce

Parentní látka	Zastoupení 7-hydroxytakrinu po metabolizaci
Takrin	30 %
7-MEOTA	40 %
7-PhOTA	1 %

30

Příklad 6: *In vivo* neuroprotektivní účinnost

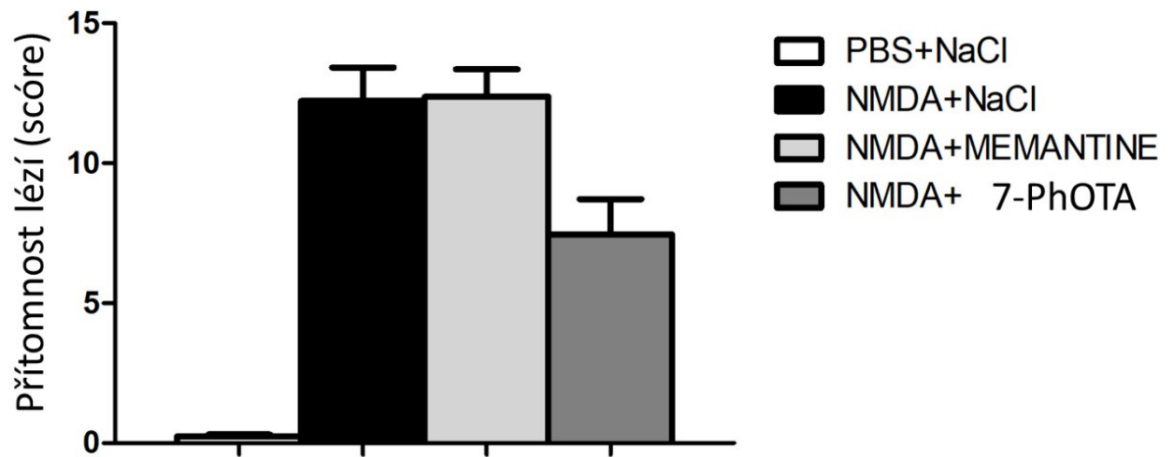
Nadměrná stimulace NMDA receptorů je příčinou buněčné smrti, dochází tedy k neurodegeneraci. Příslušné blokátory NMDA receptorů mohou působit neuroprotektivně. V našem experimentu provedeného dle protokolu popsáno dříve (KANIAKOVA, M., L. KLETECKOVA, K. LICHNEROVA, K. HOLUBOVA, K. SKRENKOVA, M. KORINEK, J. KRUSEK, T. SMEJKALOVA, J. KORABECNY, K. VALES, O. SOUKUP AND M. HORAK 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity *in vivo*. Neuropharmacology, 2018, 140, 217-232). jsme sledovali neuroprotektivní vlastnosti zástupce 7-PhOTA a referenčních sloučenin v modelu hipokampálních lézí vyvolaných intrahipokampální aplikací *N*-methyl-D-aspartátu, agonisty NMDA receptorů. Výsledky prokázaly, že zástupce 7-PhOTA má vyšší neuroprotektivní účinnost než memantin, referenční antagonist NMDA receptorů (obrázek 1).

40

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl s alkalickým kovem, amoniakem či aminem, nebo jeho adiční sůl s kyselinou, pro použití současně jako inhibitor cholinesteras a jako antagonist N-methyl-D-aspartátových receptorů, NMDAR.
- 10 2. 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl s alkalickým kovem, amoniakem či aminem, nebo jeho adiční sůl s kyselinou, pro použití podle nároku 1 při léčbě demence s Lewyho tělísky nebo v terapii vaskulární demence v kombinaci s demencí s Lewyho tělísky nebo v terapii vaskulární demence v kombinaci s Parkinsonovou či Alzheimerovou chorobou.

1 výkres



Obr. 1