

**К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ЦИКЛА И СТРУКТУРЫ СПЕЙСЕРА КОНЬЮГАТОВ ТАКРИНА И ЕГО ЦИКЛОПЕНТИЛЬНОГО ГОМОЛОГА С 5-(4-ТРИФТОРМЕТИЛ-ФЕНИЛАМИНО)-1,2,4-ТИАДИАЗОЛОМ НА СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ****Н.В. Ковалёва\*, А.Н. Прошин, Е.В. Рудакова, Н.П. Болтнева, И.В. Серков, Г.Ф. Махаева**Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,  
142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; \*эл. почта: kovalevanv@ipac.ac.ru

Синтезированы конъюгаты такрина и его циклопентильного аналога с 5-(4-трифторметил-фениламино)-1,2,4-тиадиазолом, объединённые двумя разными спейсерами – пентиламинопропановым и пентиламинопропеновым, исследован их эстеразный профиль, способность вытеснять пропилий из периферического анионного сайта (ПАС) ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и антиоксидантная активность в тесте АБТС. Полученные соединения эффективно ингибируют холинэстеразы с преимущественным действием на бутирилхолинэстеразу, вытесняют пропилий из ПАС АХЭ из *Electrophorus electricus* (ЕеАХЭ) и обладают высокой радикал-связывающей способностью. Показано, что в зависимости от строения спейсера, а именно наличия в нем пропенаминового или пропанаминового фрагмента, меняется спектр биологической активности конъюгатов.

**Ключевые слова:** такрин; 1,2,4-тиадиазол; ацетилхолинэстераза; бутирилхолинэстераза; антиоксиданты; болезнь Альцгеймера**DOI:** 10.18097/BMCRM00027**ВВЕДЕНИЕ**

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространённым прогрессирующим нейродегенеративным расстройством среди пожилых людей. Она характеризуется нарушениями памяти, дисфункцией когнитивных способностей, поведенческими отклонениями вплоть до полной деградации личности. По оценкам специалистов, в настоящее время около 20 миллионов людей страдают от БА, и это число достигнет 114 миллионов к 2050 году [1, 2]. Несмотря на огромные усилия по поиску новых эффективных средств для лечения БА, за последние 12 лет на рынок не было выведено ни одного нового препарата [3].

Одним из подходов к поиску новых лекарственных препаратов является создание гибридных структур – конъюгатов, содержащих два или более различных фармакофоров, объединённых спейсером [4]. В качестве одного из фармакофоров часто используют молекулу, обладающую антихолинэстеразными свойствами, поскольку при БА страдает холинэргическая нервная система, и использование ингибиторов холинэстераз повышает уровень нейромедиатора ацетилхолина [5]. Учитывая, что окислительный стресс и агрегация бета-амилоида являются одними из ключевых этиологических факторов патогенеза нейродегенеративных расстройств, в качестве второго фармакофора вводят фрагменты, придающие конъюгатам антиоксидантные и/или антиагрегантные свойства [6, 7].

В настоящей работе в качестве ингибитора ацетилхолинэстеразы (АХЭ, КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ, КФ 3.1.1.8) мы использовали молекулу такрина и его циклопентильного аналога. В качестве второго фармакофора мы использовали 1,2,4-тиадиазольный

скаффолд. Производные 1,2,4-тиадиазола, как известно, обладают широким спектром биологической активности [8, 9]. Среди соединений этого класса найдены ингибиторы АХЭ, антиоксиданты, лиганды глутаматных рецепторов ЦНС [10-12].

Целью работы был направленный синтез новых гибридных соединений на основе такрина и его циклопентильного гомолога – 2,3-дигидро-1Н-циклопента[b]хинолин-9-иламина, модифицированных через пентиламинопропановый и пентиламинопропеновый спейсеры 5-(4-трифторметил-фениламино)-1,2,4-тиадиазолом, исследование их антихолинэстеразной активности, способность вытеснять пропилий из периферического анионного сайта (ПАС) АХЭ и связывать свободные радикалы.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использованы следующие реактивы: ацетилхолинэстераза эритроцитов человека, ацетилхолинэстераза из *Electrophorus electricus* (ЕеАХЭ, фракция VI-S), бутирилхолинэстераза сыворотки лошади, карбоксилэстераза печени свиньи, ацетилтиохолина иодид, 4-нитрофенил ацетат, 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота), АБТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота), гидрофосфат натрия дигидрат, такрин (9-амино-1,2,3,4-тетрагидроакридина гидрохлорид), донепезил ((±)-2-[(1-бензил-4-пиперидил)метил]-5,6-диметокси-1-инданона гидрохлорид), пропилий иодид (3,8-диамино-5-[3-(диэтилметиламмоний)пропил]-6-фенилфенантридиния диiodид), L-аскорбиновая кислота, S-бутирилтиохолина иодид, бис-пара-нитрофенил-фосфат, тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-хроман-2-карбоновая кислота), диметилсульфоксид, дигидрофосфат калия, персульфат калия (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), трис(гидрокси метил)аминометан гидрохлорид (Трис),



этанол (этиловый спирт) (“Sigma-Aldrich”, США); 3-амино-5-метил-изоксазол, 4-трифторметиланилин, тиофосген, метиленхлорид, боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ), метанол, дейтерохлороформ (“Cambridge isotope laboratories Inc.”, США).

#### Синтез

Спектры ПМР регистрировали на приборе Bruker DPX-200 (Германия), химические сдвиги приведены в  $\delta$ -шкале относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ . Температуры плавления определяли на нагревательном столике Бётиуса без коррекции.

#### Общая методика синтеза соединений **4a,b** и **5a,b**

Раствор аминопентильного производного такрина или его гомолога **1** (0.01 М), в 5 мл метанола прибавляли к раствору 5-(4-трифторметил-фениламино)-1,2,4-тиадиазола **2** (0.01 М) в 10 мл метанола и оставляли при комнатной температуре до выпадения осадка – целевого конъюгата **4** (енамина). Осадок отфильтровывали, суспендировали в 30 мл метанола, нагревали до  $50^\circ\text{C}$  и при интенсивном перемешивании прибавляли порциями боргидрид натрия (0.01 М). Полученную реакционную смесь перемешивали до полного растворения суспензии. По окончании реакции метанол упаривали, прибавляли 50 мл метиленхлорида и промывали водой ( $2 \times 50$  мл), насыщенным водным раствором хлористого натрия, сушили над сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. При необходимости (оценка чистоты методом ЯМР-спектроскопии) продукт очищали с помощью колоночной хроматографии и получали целевой конъюгат **5** (амин).

Выходы, физические и спектральные данные для соединений **4a** и **5a,b** приведены ниже.

**N-(2,3-Дигидро-1H-циклопента[b]хинолин-9-ил-N'-{1-метил-2-[5-(4-трифторметил-фениламино)-[1,2,4]тиадиазол-3-ил]-винил}-пентан-1,5-диамин (4a).** Светло-жёлтые кристаллы, Т. пл.  $210\text{--}212^\circ\text{C}$ . Выход 66%. ПМР ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J/\text{Гц}$ ): 1.68 (м, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2)_3$ ), 2.04 (с, 3H,  $=\text{CCH}_3$ ), 2.12 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.05 (кв,  $J=7.8$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.21 (кв,  $J=7.3$  Гц,  $\text{CH}_2$ ), 3.29 (кв,  $J=6.5$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.66 (кв,  $J=6.5$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.93 (уш. с., 1H, NH), 5.22 (с, 1H,  $=\text{CH}$ ), 7.35 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.50 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.53 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.62 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.73 (д,  $J=8.3$  Гц, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.92 (д,  $J=8.3$  Гц, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 8.35 (т,  $J=5.5$  Гц, 1H, NH), 10.10 (уш. с., 1H, NH).

**2-[5-(4-Трифторметил-фениламино)-[1,2,4]тиадиазол-3-ил]-1-метил-винил-N'-(1,2,3,4-тетрагидро-акридин-9-ил)-пентан-1,5-диамин (4b)** был описан ранее [13].

**N-(2,3-Дигидро-1H-циклопента[b]хинолин-9-ил-N'-{1-метил-2-[5-(4-трифторметил-фениламино)-[1,2,4]тиадиазол-3-ил]-этил}-пропан-1,5-диамин (5a).** Кристаллизующееся масло. Выход 60%. ПМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J/\text{Гц}$ ): 1.15 (д,  $J=6.4$  Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.75 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.05 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.66 (м, 2H,  $\text{CHCH}_2$ ), 3.14 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.17 (м, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ), 3.24 (кв,  $J=6.5$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ),

3.64 (кв,  $J=6.5$  Гц, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.74 (уш. с., 1H, NH), 7.37 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.46 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.56 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.66 (д,  $J=8.6$  Гц, 2H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.70 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.824 (д,  $J=7.8$  Гц, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ).

**N-{2-[5-(4-Трифторметил-фениламино)-[1,2,4]тиадиазол-3-ил]-1-метил-этил}-N'-(1,2,3,4-тетрагидро-акридин-9-ил)-пентан-1,5-диамин (5b).** Кристаллизующееся масло. Выход 58%. ПМР ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , м.д.,  $J/\text{Гц}$ ): 1.13 (д,  $J=6.7$  Гц, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.45 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.69 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.89 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.65 (м, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{N}$ ), 2.87 (м, 2H,  $\text{CHCH}_2$ ), 3.03 (м, 1H, NH), 3.10 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.15 (м, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ), 3.56 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.30 (уш. с., 1H, NH), 7.30 (м, 5H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.53 (м, 1H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ), 7.95 (м, 2H,  $\text{H}_{\text{аром}}$ ).

#### Исследование эстеразного профиля соединений

Для кинетических исследований использовали коммерческие препараты АХЭ эритроцитов человека, БХЭ сыворотки лошади и карбоксилэстеразы (КЭ, КФ 3.1.1.1) печени свиньи. Активность АХЭ и БХЭ определяли методом Эллмана ( $\lambda=412$  нм) [14] с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолина (1 мМ) и бутирилтиохолина (1 мМ), соответственно. Условия определения активности АХЭ и БХЭ: 100 мМ фосфатный буфер pH 7.5,  $25^\circ\text{C}$ . Активность КЭ определяли спектрофотометрически по выделению 4-нитрофенола ( $\lambda=405$  нм), субстрат – 4-нитрофенилацетат (1 мМ) [15]; условия определения: 100 мМ фосфатный буфер pH 8.0,  $25^\circ\text{C}$ . Измерения проводили на микропланшетном спектрометре FLUOstar OPTIMA (“BMG LABTECH”, Германия). Соединения растворяли в ДМСО, инкубационная смесь содержала 2% растворителя. Первичную оценку ингибиторной эффективности соединений проводили путём определения ингибирования активности ферментов при концентрации соединения 20 мкМ. Для этого образец соответствующего фермента инкубировали с исследуемым соединением в течение 5 мин, затем определяли остаточную активность фермента. Каждый эксперимент проводили в трёх повторах.

#### Определение величин $IC_{50}$ для ингибирования АХЭ, БХЭ и КЭ

Ингибиторную активность соединений характеризовали величиной  $IC_{50}$  – концентрацией ингибитора, которая требуется для снижения активности фермента на 50%. Для определения  $IC_{50}$  ингибирования АХЭ, БХЭ и КЭ образец соответствующего фермента инкубировали с исследуемым соединением в диапазоне концентраций  $1 \times 10^{-12}$ – $1 \times 10^{-4}$  М (концентрация ДМСО 2 об. %) в течение 5 мин, затем определяли остаточную активность фермента. Каждый эксперимент проводили в трёх повторах. Вычисление  $IC_{50}$  проводили с использованием программы Origin 6.1 (“OriginLab”, США).

#### Определение степени вытеснения пропидия иодида из периферического анионного сайта $E_e\text{AChE}$ синтезированными соединениями

Способность соединений конкурентно вытеснять пропидий иодид – селективный лиганд ПАС АХЭ,

оценивали флуоресцентным методом [16, 17]. В качестве источника фермента использовали *EeAXЭ* из *Electrophorus electricus* как высокоактивный и более дешёвый фермент по сравнению с АХЭ человека, характеризующийся высокой степенью очистки. Интенсивность флуоресценции пропидия иодида в связанном состоянии с АХЭ возрастает в несколько раз. Снижение интенсивности флуоресценции в присутствии исследуемых соединений показывает их способность связываться с ПАС АХЭ, и, соответственно, блокировать агрегацию бета-амилоида.

Для определения степени вытеснения пропидия иодида из ПАС АХЭ *EeAXЭ* (7 мкМ) инкубировали с исследуемым соединением в концентрации 20 мкМ в 1 мМ трис-НСI буфере рН 8.0, 25°C в течение 15 мин. Затем добавляли раствор пропидия иодида (конечная концентрация 8 мкМ), инкубировали 15 мин и снимали спектр флуоресценции ( $\lambda=530$  нм (возб.) и  $\lambda=600$  нм (эмис.)). Донепезил и такрин использовали как референсные соединения. Бланк содержал пропидий иодид той же концентрации в 1 мМ трис-НСI буфере рН 8.0. Измерения проводили в трипликате на микропланшетном ридере FLUOstar OPTIMA.

Степень вытеснения пропидия иодида из периферического анионного сайта АХЭ (% вытеснения) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ вытеснения} = 100 - \left( \frac{IF_{\text{АХЭ+Пропидий+ингибитор}}}{IF_{\text{АХЭ+Пропидий}}} \right) \times 100,$$

где  $IF_{\text{АХЭ+Пропидий}}$  – интенсивность флуоресценции связанного с *EeAXЭ* пропидия в отсутствие исследуемого соединения (принимается за 100%),  $IF_{\text{АХЭ+Пропидий+ингибитор}}$  – интенсивность флуоресценции связанного с *EeAXЭ* пропидия в присутствии исследуемого соединения.

#### Исследование антирадикальной активности соединений

Антирадикальную активность соединений определяли в АБТС тесте по их способности связывать катион-радикал АБТС<sup>•+</sup> [18]. АБТС<sup>•+</sup>-радикал получали в результате реакции 7 мМ водного раствора АБТС с 4.9 мМ водным раствором персульфата калия, взятых в равных объёмах. Реакция протекает в течение 12-16 ч при комнатной температуре в темноте. Перед проведением измерений полученный раствор АБТС<sup>•+</sup>-радикала разбавляли 96% этиловым спиртом до получения величины оптической плотности образца 0.75-0.95 при  $\lambda=734$  нм. Исследуемые соединения вносили в раствор АБТС<sup>•+</sup> и тщательно перемешивали. Реакцию проводили при 30°C в темноте, время инкубации 1 ч. Степень обесцвечивания раствора АБТС<sup>•+</sup>-радикала определяли при длине волны 734 нм на микропланшетном спектрометре BioRad xMark (Япония). Величину антирадикальной активности соединений представляли в единицах ТЕАС (trolox equivalent antioxidant capacity, антиоксидантная способность, выраженная в тролокс-эквивалентах). Значения ТЕАС рассчитывали, сравнивая разности ( $A_0 - A_{\text{test}}$ ) для исследуемого соединения и ( $A_0 - A_{\text{trolox}}$ )

для Тролокса (при концентрации обоих 20 мкМ) по формуле:

$$\text{ТЕАС} = (A_0 - A_{\text{test}}) / (A_0 - A_{\text{trolox}}),$$

где  $A_0$  – оптическая плотность контрольного раствора АБТС<sup>•+</sup>-радикала в отсутствие соединений;  $A_{\text{test}}$  и  $A_{\text{trolox}}$  – оптическая плотность раствора АБТС<sup>•+</sup>-радикала после добавления исследуемого соединения и Тролокса, соответственно. Для наиболее активных соединений получены также величины  $IC_{50}$  (концентрация соединения в мкМ, при которой происходит снижение концентрации АБТС<sup>•+</sup> на 50%). Диапазон концентраций исследуемых соединений составлял  $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-4}$  М. Вычисление  $IC_{50}$  проводили с использованием программы Origin 6.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

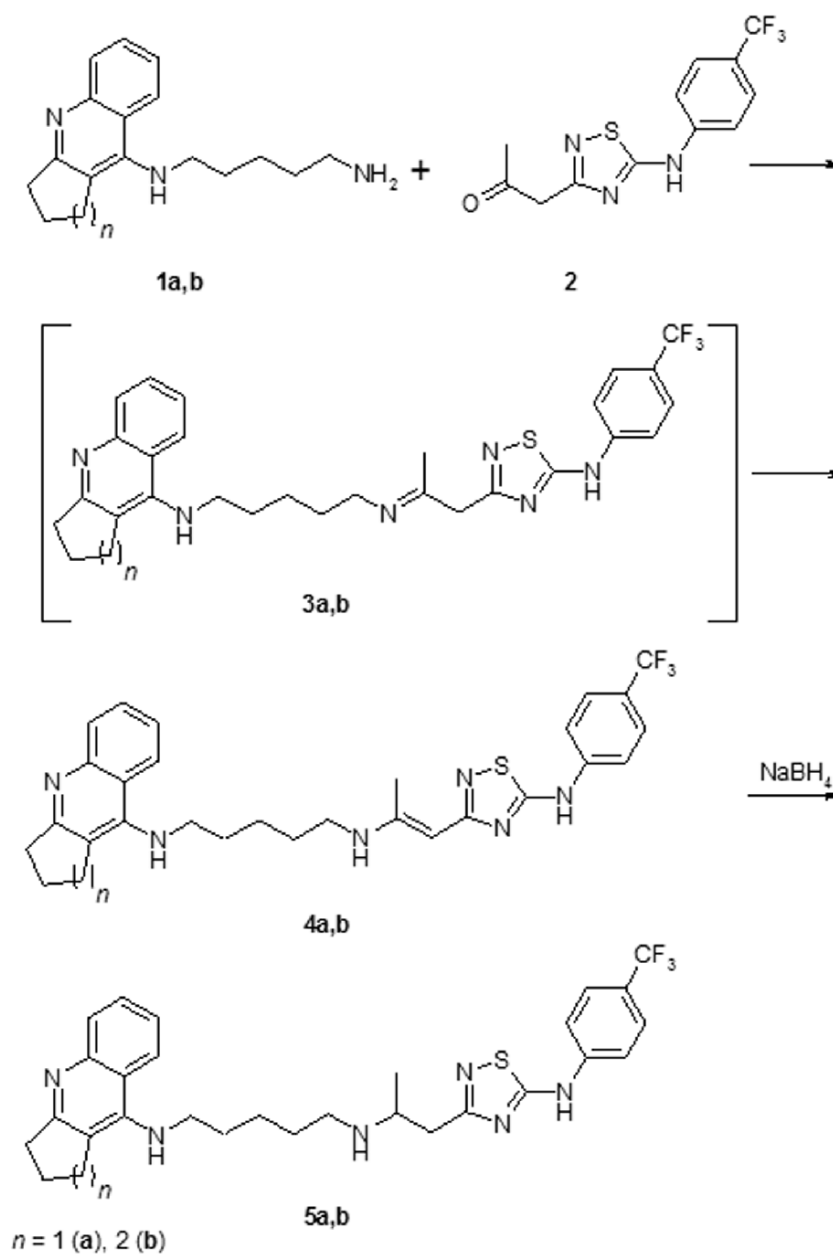
Целевые соединения **4a,b** и **5a,b** были получены взаимодействием аминопентильного производного такрина или его гомолога **1a,b**, полученных по описанной ранее методике [19], с 5-(4-трифторметил-фениламино)-1,2,4-тиадиазолом **2**, полученным взаимодействием 3-амино-5-метилизоксазола и 4-трифторметил-фенилизотиоцианата [20] по схеме, представленной на рисунке 1.

При конденсации первичного амина **1** с кетоном **2** сначала происходит образование “классического” основания Шиффа – имина **3**, который *in situ* перегруппировывается в целевой конъюгат **4** (енамин), выпадающий в осадок. Отфильтрованный енамин при перемешивании в горячем метаноле восстанавливается добавлением эквимольного количества боргидрида натрия. Полное растворение осадка означает окончание реакции гидрирования. Реакционная смесь упаривается, остаток растворяется в хлористом метиле, борные примеси удаляются промыванием водой. Упаривание органической фазы даёт достаточно чистый целевой конъюгат **5** со средними выходами.

Исследование биологической активности синтезированных конъюгатов включало в себя оценку их эстеразного профиля – ингибиторной активности в отношении АХЭ, БХЭ и структурно близкого фермента – КЭ, способности связываться с ПАС АХЭ и антирадикальной активности.

Как видно из таблицы 1, синтезированные конъюгаты проявляют высокую ингибиторную активность в отношении обеих холинэстераз, проявляя селективность в отношении БХЭ. Вариация размера алифатического цикла такринового фрагмента показала, что соединения с 6-членным алифатическим циклом в целом эффективнее ингибируют все эстеразы, по сравнению с соединениями с 5-членным циклом. Для соединений **5a,b** при ингибировании БХЭ влияние размера цикла выражено в наименьшей степени.

Влияние структуры сейсера оказалось более значительным: наличие в нём енаминового (соединения **4a,b**) или аминового (**5a,b**) фрагментов в большой степени определяет проявление того или иного вида биологической активности гибридного соединения.



**Рисунок 1.** Синтез целевых конъюгатов **4a,b** и **5a,b**.

**Таблица 1.** Ингибиторная активность и селективность конъюгатов **4a** ( $n=1$ ), **4b** ( $n=2$ ), **5a** ( $n=1$ ), **5b** ( $n=2$ ) в отношении АХЭ, БХЭ и КЭ.

Compound	IC <sub>50</sub> ±SEM (μM), n=3			Selectivity	
	AChE	BChE	CaE	IC <sub>50</sub> AChE / IC <sub>50</sub> BChE	IC <sub>50</sub> CaE / IC <sub>50</sub> BChE
4a	6.27±0.12	0.835±0.066	84.0±6.7	7.5	100
4b	2.29±0.18	0.10±0.01	2.82±0.25	22.9	28.2
5a	2.47±0.07	0.0069±0.0006	>100	360.0	>14500
5b	0.36±0.03	0.0064±0.0006	33.9±3.1	56.8	5300
Tacrine	0.60±0.05	0.0295±0.0002	>100	20.3	>3400
BNPP	n.a.	n.a.	1.80±0.11	.*	-

n.a. - not active; \* - not determined.

Так, конъюгаты с пентиламинопропановым спейсером (**4a,b**) ингибируют БХЭ на уровне базового фармакофора такрина, с величинами  $IC_{50}$  порядка  $10^{-8}$  М. Ингибирование АХЭ слабее и наблюдается в микромолярном диапазоне, несколько ниже активности такрина (табл. 1). В то же время конъюгаты с пентиламинопропановым спейсером (**5a,b**) проявляют более высокую ингибиторную активность в отношении обеих холинэстераз по сравнению с аминокпропановыми аналогами, при этом особенно существенно возрастает анти-БХЭ активность: соединения **5a,b** ингибируют БХЭ на 1-2 порядка более эффективно по сравнению с конъюгатами, содержащими аминокпропановый фрагмент. Величины  $IC_{50}$  для соединений **5a,b** находятся в наномолярном диапазоне, то есть конъюгаты с пентиламинопропановым спейсером являются самыми мощными ингибиторами БХЭ в изученной серии соединений.

Известно, что в здоровом мозге ацетилхолин преимущественно гидролизуется АХЭ, тогда как БХЭ играет вспомогательную роль [21]. Однако при прогрессии БА отмечено снижение активности АХЭ, в то время как активность БХЭ постепенно увеличивается [22]. В связи с этим возрастает роль БХЭ как терапевтической мишени для компенсации холинергического дефицита, наблюдаемого при БА. Полагают, что соединения, ингибирующие обе холинэстеразы – АХЭ и БХЭ, повышают эффективность лечения [23], а применение селективных ингибиторов БХЭ делает его более безопасным в связи с отсутствием у них побочных эффектов, присущих ингибиторам АХЭ [24].

Следует отметить, что ингибиторная активность большинства исследованных соединений в отношении БХЭ значительно выше, чем в отношении КЭ. При этом наибольшая селективность ингибирования БХЭ по сравнению с КЭ наблюдается у конъюгатов с пентиламинопропановым спейсером **5a,b** (табл. 1). В связи с этим можно предположить, что при использовании этих соединений в терапии БА нежелательные лекарственные взаимодействия, связанные с ингибированием КЭ, гидролизующей многочисленные медикаментозные средства со сложноэфирными группами, будут минимальными.

Помимо классической функции гидролиза ацетилхолина АХЭ играет важную роль в процессинге бета-амилоида: ПАС АХЭ взаимодействует с растворимыми пептидами бета-амилоида, способствуя их агрегации [25]. Результаты по вытеснению пропидия из ПАС АХЭ, полученные для синтезированных конъюгатов, приведены в таблице 2. Видно, что соединения с пентиламинопропановым спейсером **4a,b** в концентрации 20 мкМ снижают интенсивность флуоресценции связанного с АХЭ пропидия на 21-23%, тогда как соединения с пентиламинопропановым спейсером **5a,b** – на 29-31%. При этом все конъюгаты более эффективно вытесняют пропидий из ПАС АХЭ, чем референсное соединение донепезил. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтезированные конъюгаты связываются с ПАС АХЭ и, следовательно, способны блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию бета-амилоида.

Также мы исследовали антирадикальную активность конъюгатов в АБТС тесте. Как видно из таблицы 2, в отличие от базового фармакофора такрина все синтезированные конъюгаты обладают способностью связывать свободные радикалы. При этом соединения с пентиламинопропановым спейсером (**4a,b**) проявляют высокую АБТС-связывающую активность, превышающую активность стандартного антиоксиданта Тролокса ( $TEAC = 1.28 \div 1.44$ ), тогда как антирадикальная активность соединений с пентиламинопропановым спейсером (**5a,b**) примерно в 3 раза ниже. Мы полагаем, что высокая радикал-связывающая активность соединений с аминокпропановым спейсером определяется наличием системы сопряжения электронов между 2-аминопропенильным и тиадиазольным фрагментами молекулы, показанной ранее [26, 27].

Таким образом, в результате проведенного исследования синтезированы новые гибридные структуры – конъюгаты такрина и его гомолога с 5-членным циклом в алифатическом фрагменте с 5-(4-трифторметил-фениламино)-1,2,4-тиадиазолом и установлена их структура. Для всех изученных соединений показана высокая антихолинэстеразная активность с выраженной селективностью в отношении БХЭ, способность связываться с ПАС АХЭ и вытеснять из него пропидий

Таблица 2. Способность конъюгатов **4a,b** и **5a,b** вытеснять пропидий из периферического анионного сайта EeAXЭ и связывать свободные радикалы в АБТС-тесте.

Compound	Propidium displacement, % at 20 $\mu$ M of tested compounds	ABTS scavenging activity, TEAC*
4a	23.3 $\pm$ 2.1	1.32 $\pm$ 0.03
4b	21.2 $\pm$ 2.3	1.45 $\pm$ 0.06
5a	31.5 $\pm$ 2.7	0.47 $\pm$ 0.05
5b	29.4 $\pm$ 2.8	0.48 $\pm$ 0.04
tacrine	4.4 $\pm$ 0.6	0
donepezil	10.1 $\pm$ 0.6	-**
trolox	-	1.0
ascorbic acid	-	0.98 $\pm$ 0.04

\* - TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) - was determined from the ratio of the slopes of the concentration-response curves, test compound/Trolox; \*\* - not determined.

и, следовательно, блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию бета-амилоида, а также способность связывать свободные радикалы.

Анализ полученных результатов показал, что структура спейсера, а именно наличие в нём пропанаминового или пропанаминового фрагмента, существенно меняет спектр биологической активности конъюгатов. При этом конъюгаты с пентиламинопропановым спейсером обладают наилучшим эстеразным профилем с точки зрения безопасности, тогда как конъюгаты с пентиламинопропановым спейсером проявляют более высокую способность связывать свободные радикалы. Вариация размера алифатического цикла такринового фрагмента в меньшей степени отражается на спектре биологической активности соединений. Соединения с 6-членным алифатическим циклом – производные такрина – представляются более предпочтительными.

Полученные результаты показывают перспективность дальнейшей разработки синтезированных конъюгатов и оптимизации их структуры как с точки зрения мультифункциональной фармакологической активности, так и в плане повышения безопасности.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Синтез, установление структуры, а также исследование эстеразного профиля полученных соединений и молекулярное моделирование выполнены за счёт средств гранта РФФИ 17-03-00984-а; часть работы, связанная с оценкой способности соединений вытеснять пропиидий из ПАС *Ee*АХЭ и изучением их антиоксидантной активности выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (тема № 0090-2017-0019). В работе использовалось оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН. Работа по молекулярному моделированию выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hamulakova, S., Poprac, P., Jomova, K., Brezova, V., Lauro, P., Drostinova, L., Jun, D., Sepsova, V., Hrabnova, M., Soukup, O., Kristian, P., Gazova, Z., Bednarikova, Z., Kuca, K., & Valko, M. (2016) Targeting copper(II)-induced oxidative stress and the acetylcholinesterase system in Alzheimer's disease using multifunctional tacrine-coumarin hybrid molecules. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 161, 52-62. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.05.001
2. Zhang, C., Du, Q.-Y., Chen, L.-D., Wu, W.-H., Liao, S.-Y., Yu, L.-H., & Liang, X.-T. (2016) Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116, 200-209. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.03.077
3. Bachurin, S.O., Bovina, E.V., & Ustyugov, A.A. (2017) Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major

- Trends. *Medicinal Research Reviews*, 37(5), 1186-1225. DOI: 10.1002/med.21434
4. Rosini, M., Simoni, E., Minarini, A., & Melchiorre, C. (2014) Multi-target design strategies in the context of Alzheimer's disease: acetylcholinesterase inhibition and NMDA receptor antagonism as the driving forces. *Neurochemical Research*, 39(10), 1914-1923. DOI: 10.1007/s11064-014-1250-1
5. Minarini, A., Milelli, A., Simoni, E., Rosini, M., Bolognesi, M., Marchetti, C., & Tumiatti, V. (2013) Multifunctional Tacrine Derivatives in Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(15), 1771-1786. DOI: 10.2174/15680266113139990136
6. Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D., & Malawska, B. (2014) Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 22(3), 373-404. DOI: 10.2174/0929867321666141106122628
7. Tonelli, M., Catto, M., Tasso, B., Novelli, F., Canu, C., Iusco, G., Pisani, L., Stradis, A.D., Denora, N., Sparatore, A., Boido, V., Carotti, A., & Sparatore, F. (2015) Multitarget Therapeutic Leads for Alzheimer's Disease: Quinolizidinyl Derivatives of Bi- and Tricyclic Systems as Dual Inhibitors of Cholinesterases and beta-Amyloid (Abeta) Aggregation. *ChemMedChem*, 10(6), 1040-1053. DOI: 10.1002/cmdc.201500104
8. Li, Y., Geng, J., Liu, Y., Yu, S., & Zhao, G. (2013) Thiadiazole - a promising structure in medicinal chemistry. *ChemMedChem*, 8(1), 27-41. DOI: 10.1002/cmdc.201200355
9. Castro, A., Castano, T., Encinas, A., Porcal, W., & Gil, C. (2006) Advances in the synthesis and recent therapeutic applications of 1,2,4-thiadiazole heterocycles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(5), 1644-1652. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.10.012
10. Martinez, A., Fernandez, E., Castro, A., Conde, S., Rodriguez-Franco, I., Baños, J.-E., & Badia, A. (2000) N-Benzylpiperidine derivatives of 1,2,4-thiadiazolidinone as new acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(10), 913-922. DOI: 10.1016/S0223-5234(00)01166-1
11. Porcal, W., Hernandez, P., Gonzalez, M., Ferreira, A., Olea-Azar, C., Cerecetto, H., & Castro, A. (2008) Heteroarylnitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(19), 6150-6159. DOI: 10.1021/jm8006432
12. Makhaeva, G.F., Proshin, A.N., Boltneva, N.P., Rudakova, E.V., Kovaleva, N.V., Serebryakova, O.G., Serkov, I.V., & Bachurin, S.O. (2016) 1,2,4-Thiadiazoles as promising multifunctional agents for treatment of neurodegenerative diseases. *Russian Chemical Bulletin*, 65(6), 1586-1591. DOI: 10.1007/s11172-016-1486-9
13. Makhaeva, G.F., Grigoriev, V.V., Proshin, A.N., Kovaleva, N.V., Rudakova, E.V., Boltneva, N.P., Serkov, I.V., & Bachurin, S.O. (2017) Novel Conjugates of Tacrine with 1,2,4-Thiadiazole as Highly Effective Cholinesterase Inhibitors, Blockers of NMDA Receptors, and Antioxidants. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 477, 405-409. DOI: 10.7868/S0869565217360269
14. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., & Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
15. Sterri, S.H., Johnsen, B.A., & Fonnum, F. (1985) A radiochemical assay method for carboxylesterase, and comparison of enzyme activity towards the substrates

- methyl [1-14C] butyrate and 4-nitrophenyl butyrate. *Biochemical Pharmacology*, 34(15), 2779-2785.
16. Taylor, P., Lwebuga-Mukasa, J., Lappi, S., & Rademacher, J. (1974) Propidium - a Fluorescence Probe for a Peripheral Anionic Site on Acetylcholinesterase. *Molecular Pharmacology*, 10(4), 703-708.
17. Taylor, P., & Lappi, S. (1975) Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding. *Biochemistry*, 14(9), 1989-1997. DOI: 10.1021/bi00680a029
18. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
19. Szymanski, P., Laznickova, A., Lazniecek, M., Bajda, M., Malawska, B., Markowicz, M., & Mikiciuk-Olasik, E. (2012) 2,3-dihydro-1H-cyclopenta[b]quinoline derivatives as acetylcholinesterase inhibitors-synthesis, radiolabeling and biodistribution. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 10067-10090. DOI: 10.3390/ijms130810067
20. Serkov, I.V., Proshin, A.N., Petrova, L.N., & Bachurin, S.O. (2010) Novel 1,2,4-thiadiazoles with an NO-producing fragment. *Doklady Chemistry*, 435(2), 311-313. DOI: 10.1134/s0012500810120013
21. Mesulam, M.-M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E.G., & Lockridge, O. (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, 110(4), 627-639. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00613-3
22. Nordberg, A., Ballard, C., Bullock, R., Darreh-Shori, T., & Somogyi, M. (2013) A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, 15(2). DOI: 10.4088/PCC.12r01412
23. Lane, R.M., Potkin, S.G., & Enz, A. (2006) Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 101-124. DOI: 10.1017/S1461145705005833
24. Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.S., Mamczarz, J., Holloway, H. W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., & Lahiri, D.K. (2005) Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17213-17218. DOI: 10.1073/pnas.0508575102
25. Inestrosa, N.C., Dinamarca, M.C., & Alvarez, A. (2008) Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *The FEBS journal*, 275(4), 625-632. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x
26. Grigoriev, V.V., Makhaeva, G.F., Proshin, A.N., Kovaleva, N.V., Rudakova, E.V., Boltneva, N.P., Gabrel'yan, A.V., Lednev, B.V., & Bachurin, S.O. (2017) 1,2,4-Thiadiazole derivatives as effective NMDA receptor blockers with anticholinesterase activity and antioxidant properties. *Russian Chemical Bulletin*, 66(7), 1308-1313. DOI: 10.1007/s11172-017-1890-9
27. Proshin, A.N., Serkov, I.V., Petrova, L.N., & Bachurin, S.O. (2014) 5-Amino-3-(2-aminopropyl)-1,2,4-thiadiazoles as the basis of hybrid multifunctional compounds. *Russian Chemical Bulletin*, 63(5), 1148-1152. DOI: 10.1007/s11172-014-0563-1

Поступила: 21. 05. 2018.  
Принята к публикации: 21. 08. 2018.

## EFFECT OF THE CYCLE SIZE AND SPACER STRUCTURE IN TACRINE AND ITS CYCLOPENTYL HOMOLOGUE CONJUGATES WITH 5-(4-TRIFLUOROMETHYL-PHENYLAMINO)-1,2,4-THIADIAZOLE ON THE SPECTRUM OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

*N.V. Kovaleva\*, A.N. Proshin, E.V. Rudakova, N.P. Boltneva, I.V. Serkov, G.F. Makhaeva*

Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,  
1 Severny proezd, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia; \*e-mail: kovalevanv@ipac.ac.ru

The conjugates of tacrine and its cyclopentyl analogue with 5-(4-trifluoromethyl-phenylamino)-1,2,4-thiadiazole, combined with two different spacers, pentylaminopropane and pentylaminopropene, were synthesized. Their esterase profile, the ability to displace propidium from the peripheral anionic site (PAS) of acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant activity in the ABTS test were investigated. The compounds obtained effectively inhibit cholinesterases with a predominant effect on butyrylcholinesterase, displace propidium from the PAS of *Electrophorus electricus* AChE (*EeAChE*) and exhibit a high radical-scavenging capacity. It is shown that, depending on the spacer structure, particularly, the presence of a propenamine or propanamine fragment, the spectrum of biological activity of the conjugates changes.

**Key words:** tacrine; 1,2,4-thiadiazoles; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; antioxidants; Alzheimer's disease

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was performed within the framework of the RFBR grant #17-03-00984-a (synthesis, structure determination, as well as study of the esterase profile of the compounds obtained and molecular modeling). Displacement of propidium iodide from the PAS of *EeAChE* and ABTS scavenging activity of conjugates were studied in the framework of the Russian State assignment no. 0090-2017-0019. The equipment of the Center for the collective use of IPAC RAS was used. Molecular modeling was carried out using the equipment of the Center for the collective use of super high-performance computing resources of the Lomonosov Moscow State University.