

# Priprava kvaternih O-benzil-oksima kinuklidina te njihova antikolinesterazna aktivnost

---

Zajec, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:508258>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivan Zajec**

**Priprava kvaternih *O*-benzil-oksima  
kinuklidina te njihova antikolinesterazna  
aktivnost**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za organsku kemiju, Kemijskog odsjeka Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Bernarda Denegrija i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Ines Primožič.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Ines Primožič na pruženoj mogućnosti izrađivanja diplomskoga rada na Zavodu za organsku kemiju PMF-a, izboru teme, neprestanoj podršci i trudu te razumijevanju.*

*Zahvaljujem stručnoj savjetnici dr. Almi Ramić na prenesenom znanju, strpljivosti, cjelokupnom vodstvu kroz laboratorij te produktivnom i ugodnom radnom okruženju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela.*

*Zahvaljujem dr. sc. Aniti Bosak, Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, na određivanju inhibitornog potencijala spojeva prema ljudskim kolinesterazama te Dr Florianu Nachonu, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Francuska na određenoj rendgenskoj strukturi enzima i inhibitora.*

*Zahvaljujem se svojoj djevojci Ivani koja je neprekidno bila uz mene i bez koje kraj studija ne bi bio moguć.*

*Zahvaljujem se i svojim prijateljima i kolegama, posebno Kosti i Tomislavu, koji su mi bili podrška i tjerovali me kroz brojne prepreke tijekom studiranja.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja je bila sa mnom otpočetak fakulteta, na svim podrškama, materijalnim i nematerijalnim, što su vjerovali u mene i bili tu za mene.*

I.Z.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Kolinergični živčani sustav .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Acetilkinolin. Enzimi kolinesteraze. Acetilkinolinesteraza. Butirilkinolinesteraza. Fiziološke i potencijalne funkcije. ....</b>	<b>2</b>
1.2.1. <i>Struktura i aktivno mjesto kolinesteraza. Mehanizam reakcije enzimatske konverzije i hidrolize u aktivnom mjestu. ....</i>	7
<b>1.3. Inhibitori acetilkinolinesteraze .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. <i>Stratifikacija i klasifikacija inhibitora. Parasimpatolitici. Mehanizmi i farmakologija inhibitora. ....</i>	11
1.3.2. <i>Proces starenja enzima kod otrovanja organofosforinim spojevima. ....</i>	16
1.3.3. <i>Neurodegenerativne bolesti. Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Reverzibilni inhibitori acetilkinolinesteraze i butirilkinolinesteraze. ....</i>	17
1.3.4. <i>Mijastenija gravis i piridostigmin. ....</i>	21
<b>1.4. Oksimska funkcijska skupina .....</b>	<b>22</b>
1.4.1. <i>Kemijska reaktivnost oksima. Specifične reakcije. ....</i>	23
1.4.2. <i>Biološka aktivnost oksima .....</i>	24
1.4.3. <i>Farmaceutska primjena oksima. Pozadina antidotske terapije oksimima. ....</i>	24
1.4.4. <i>Aktivnost oksima prema kolinesterazama. Farmakološki značaj antagonizma organofosforinim spojevima pralidoksimom. ....</i>	25
<b>1.5. Kvaterni amonijev kation. Kvaterne amonijeve soli i spojevi .....</b>	<b>27</b>
1.5.1. <i>Sinteza kvaternih amonijevih soli i Menshutkinova reakcija. ....</i>	29
<b>1.6. Cinhona alkaloidi, struktura. Antimalarici. Kinolinski i kinuklidinski prsten. Biokemijska svojstva i primjena kinuklidinskih spojeva. ....</b>	<b>30</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Reagensi, standardi, spektroskopija i određivanje tališta za karakterizaciju spojeva .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Priprava O-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima. Reakcija nukleofilne adicije. Sinteza spoja 1. ....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Priprava kvaternih derivata O-benzilnog etera kinuklidin-3-on oksima 2 – 9 .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. <i>Sinteza N-benzil-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (2) .....</i>	36
3.3.2. <i>Sinteza N-(4-trifluorometil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (3) .....</i>	37
3.3.3. <i>Sinteza N-(4-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (4) .....</i>	37
3.3.4. <i>Sinteza N-(3,4-diklorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (5) .....</i>	38
3.3.5. <i>Sinteza N-(3,5-di-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (6) .....</i>	38
3.3.6. <i>Sinteza N-(4-trifluorometoksibenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (7) .....</i>	39
3.3.7. <i>Sinteza N-(3,4-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (8) .....</i>	39

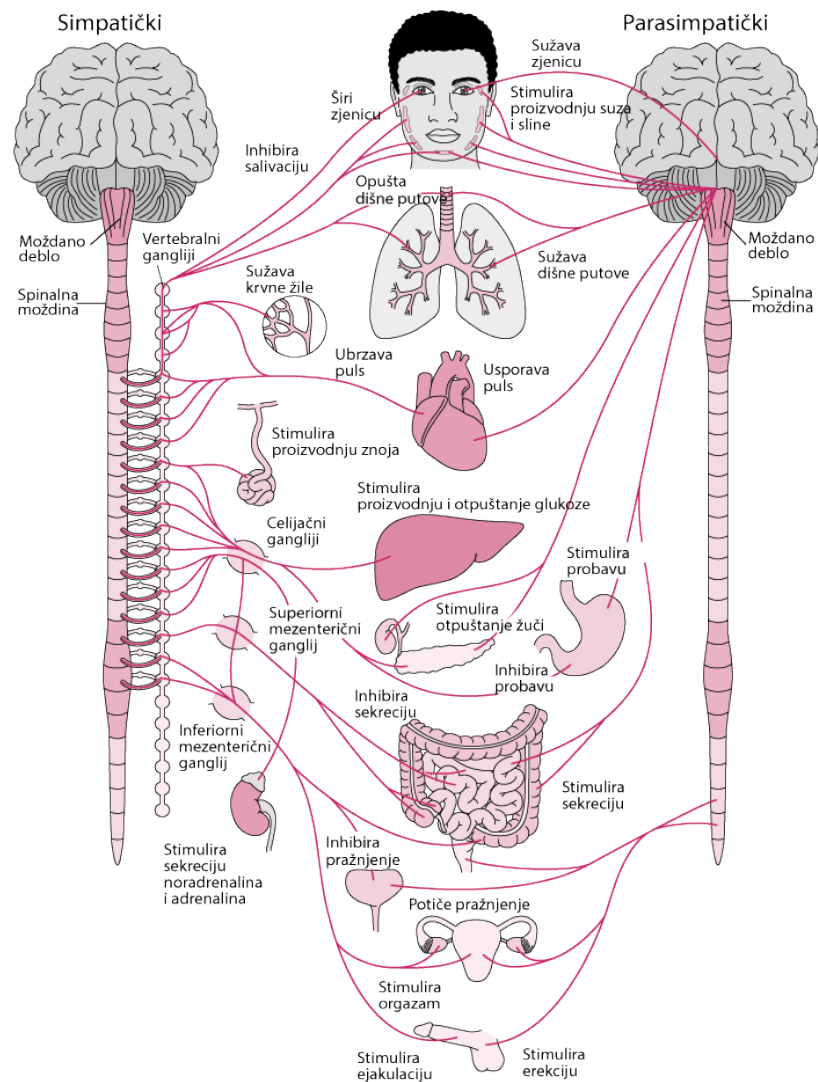
3.3.8. <i>Sinteza N-(3,5-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (9)</i> .....	40
3.3.9. <i>Sinteza N-(2-klor-6-fluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (10)</i> .....	41
<b>3.4. Biokemijska metoda mjerenja inhibicijskog potencijala kinuklidinskih derivata. Ellmanova metoda mjerenja inhibitorne aktivnosti sintetiziranih spojeva</b> .....	<b>41</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>43</b>
4.1. Uvod .....	43
4.2. <i>Sinteza O-benzilkinuklidin-3-on-oksima kao početnog spoja za daljnje reakcije</i> .....	45
4.3. <i>Menshutkinova reakcija. Sinteza kvaternih derivata O-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima</i> .....	45
4.4. <i>Fizikalno-kemijska karakterizacija spojeva</i> .....	46
4.5. <i>Spektroskopska karakterizacija spojeva</i> .....	47
4.6. <i>Inhibitorski potencijal. IC<sub>50</sub> vrijednosti. Ellmanova metoda.</i> ....	49
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>56</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	<b>57</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>58</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>69</b>
<b>9. PRILOZI</b> .....	<b>71</b>
<b>9.1. IR i NMR spektri sintetiziranih spojeva</b> .....	<b>71</b>
9.1.1. <i>N-benzil-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (2)</i> .....	71
9.1.2. <i>N-(4-trifluorometil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (3)</i> .....	73
9.1.3. <i>N-(4-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (4)</i> .....	75
9.1.4. <i>N-(3,4-diklorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (5)</i> .....	77
9.1.5. <i>N-(3,5-di-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (6)</i> .....	79
9.1.6. <i>N-(4-trifluorometoksibenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (7)</i> .....	81
9.1.7. <i>N-(3,4-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromida (8)</i> .....	83
9.1.8. <i>N-(3,5-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromida (9)</i> .....	85
9.1.9. <i>N-(2-klor-6-fluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (10)</i> .....	87
<b>10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	<b>89</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Kolinergični živčani sustav

Autonomni živčani sustav (AŽS) dijelimo na parasimpatički, simpatički živčani sustav, ali treći, kompleksan enterički živčani sustav. Svi preganglijski neuroni, bez obzira na porijeklo, luče acetilkolin (ACh) kao dominantan neurotransmitor, a vlakna koja luče ACh općenito nazivamo kolinergičnim. Svi ili gotovo svi postganglijski neuroni parasimpatičkog živčanog sustava su kolinergični, a ACh zatim djeluje na muskarinske (podtipovi M1, M2 i M3, gdje M dolazi od muskarina) te nikotinske (podtipovi N1 i N2, gdje N dolazi od nikotina) receptore. Također neka su vlakna simpatičkog živčanog sustava kolinergična (Guyton AC, Hall JE, 2012).

Vagus, kranijalni živac broj X (10. moždani živac) ima svoje jezgre, ukupno četiri, u produljenoj moždini koje nazivamo: solitarnom jezgrom, dorzalnom jezgrom, **dvostranom** jezgrom te spinalnom trigeminalnom jezgrom (Barnes PJ, Thomson NC, 2009). Ovaj živac i njegova vlakna nose većinu parasimpatičkih živčanih vlakana (oko 75 %) te inerviraju većinu organa, predominantno srce, gastro-intestinalni sustav, gušteraču, bubrege i brojne druge. Kolinergična živčana vlakna izvire u dvostranoj jezgri u moždanom deblu i putuju niz vagusni živac i sinapsu u parasimpatičkim ganglijima koji se nalaze unutar stijenke dišnih putova. Iz tih ganglija kratka post-ganglionska vlakna putuju do glatkih mišića dišnih putova i submukoznih žlijezda. Kod životinja električna stimulacija vagusnog živca uzrokuje oslobađanje ACh iz kolinergičnih živčanih okončina, uz aktivaciju muskarinskih kolinergičnih receptora na glatkim mišićnim i žlijezdanim stanicama, što rezultira bronhokonstrikcijom i izlučivanjem sluzi. Prethodna primjena antagonista muskarinskog receptora, kao što je atropin, sprječava vagalno induciranu bronhokonstrikciju (Barnes PJ, Thomson NC, 2009). Na slici 1, shematski je prikazan anatomski raspored i djelovanje autonomnog živčanog sustava.



Slika 1. Anatomija i fiziologija autonomnog živčanog sustava (preuzeto iz Low P. Pregled autonomnog živčanog sustava, <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=13648>, pristupljeno 22. 6. 2024.)

## 1.2. Acetilkinolin. Enzimi kolinesteraze. Acetilkinolinesteraza. Butirilkinolinesteraza. Fiziološke i potencijalne funkcije.

Acetilkinolin, jedna od mnogobrojnih malih molekula, koje nazivamo neurotransmitorima ili neuroprijenosnicima, služi kao glasnik između kolinergičnih živčanih okončina, kako u središnjem (SŽS, središnji živčani sustav), tako i u perifernom živčanom sustavu. ACh je neurotransmiter formiran iz kolina i acetyl-CoA kroz katalitičko djelovanje kolina acetyltransferaze, a sam acetyl-CoA dolazi iz glukoze i Ciklusa limunske kiseline (ciklus trikarbonskih kiselina, Krebsov ciklus), a specifičan je za završetke velikih piramidnih stanica motoričke kore, za različite vrste neurona u bazalnim ganglijima, za motoneurone koji

inerviraju skeletne mišiće, za preganglijske neurone AŽS-a, za postganglijske neurone parasimpatičkog i neke postganglijske neurone simpatičkog živčanog sustava. Većinom je njegovo djelovanje ekscitacijsko, ali neka djelovanja su mu inhibitorna kao što je djelovanje na miokard (Guyton AC, Hall JE, 2012).

Kada govorimo o perifernom živčanom sustavu, na primjer u neuromuskularnom spoju, na završnoj mehaničkoj ploči, ACh služi kao prijenosnik signala za muskularnu kontrakciju, djelujući na kanale na postsinaptičkoj membrani, koje nazivamo acetilkolinskim receptorima. Njegovo vezanje mijenja propustljivost za ione, potičući akcijski potencijal. Tako zapravo, ova glasnica molekula, povećavanjem svoje koncentracije u sinaptičkoj pukotini oslobađajući se iz presinaptičke membrane iz vezikula, otvara jedinstvenu vrstu kationskih kanala, koji su gotovo jednako permeabilni za nabijene čestice natrija i kalija ( $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ). Upravo je to temelj prijenosa depolarizacijskog signala distalno (Berg JM i sur., 2013). Osim u neuromuskularnom spoju, ACh igra ulogu i u prijenosu signala između dva neurona i kao takav važan je u stvaranju pamćenja, učenja i memorije dok periferno u egzokrinim žlijezdama potiče izlučivanje svih sadržaja žlijezda koje primaju parasimpatičku inervaciju, uključujući suzne, traheo-bronhijalne, salivarne, probavne i znojne žlijezde. (Sam C, Bordoni B, 2023.). Također djeluje i na piloerektalni mišić kod simpatičkog živčanog sustava. Glavne mete acetilkolina su nikotinski i muskarinski receptori, koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani.

Kako bi njegova uloga bila kontrolirana, regulirana i ciljana, podražaj na kontrakciju ili lučenje žlijezda mora biti dovršen, akcijski potencijal utišan, depolarizacijski signal mora prestati, a sam neurotransmiter razgraditi iz sinaptičke pukotine, ali i ponovno pohraniti natrag nerazgrađen u presinaptički živčani završetak, kako bi se dio energije utrošene na njegovu sintezu ipak očuvao. Upravo u njegovoj razgradnji u sinaptičkoj pukotini sudjeluju enzimi koje nazivamo kolinesterazama, enzimi široko rasprostranjeni u životinjskom i biljnom svijetu s visokom enzimatskom aktivnošću čineći tako poluvijek molekule ACh vrlo kratkim (djelići sekunde). Acetilkinesteraza (AChE) je enzim koji se prvenstveno nalazi na postsinaptičkim neuromuskularnim spojevima, osobito u mišićima i živcima. Odmah razgrađuje ili hidrolizira acetilkolin, prirodni neurotransmiter, u octenu kiselinu i kolin. Primarna uloga AChE je prekinuti neuronski prijenos i signalizaciju između sinapsi kako bi se spriječilo raspršivanje ACh i aktivacija obližnjih receptora. Sprječavajući konstantan podražaj i akcijski potencijal, AChE pomaže prestanku muskarinskih učinaka kao što su mioza (sužavanje zjenica), povećana salivacija i lakrimacija, dijareja i uriniranje, nikotinskih učinaka kao što su neuromuskularna



blokada i fascikulacije, te središnje živčani učinci kao što je bradikardija (Khandhar B, Trang A, 2023; Singh R, Sadiq NM, 2023).

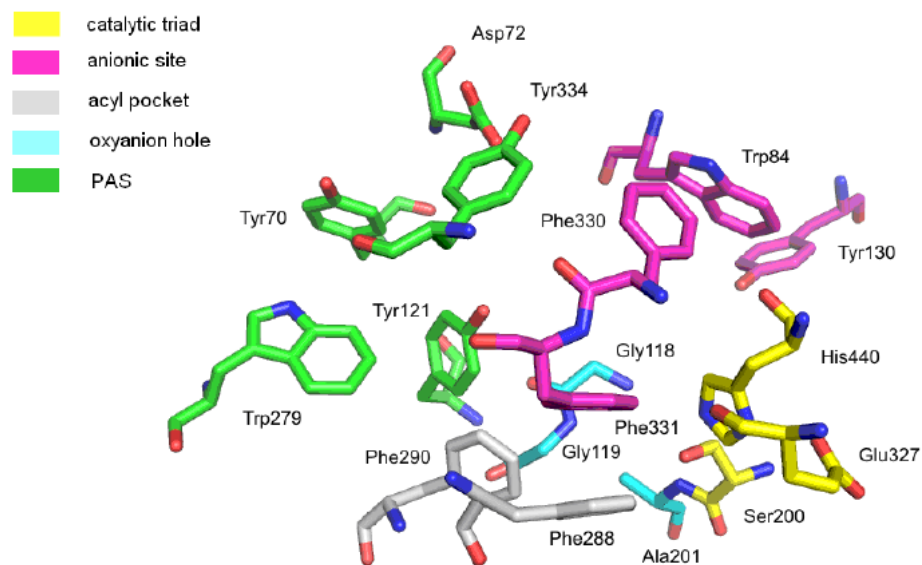
Srodni enzimi butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8, acilkolin acilhidrolaza, pseudokolinesteraza) i acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) spadaju u skupinu hidrolaza, točnije u skupinu hidrolaza koje djeluju na esterske veze (podskupina esteraza) i podskupinu esteraza koje djeluju na karboksilnu skupinu: karboksil-ester hidrolaze, a sve prema IUBMB enzimskoj nomenklaturi (Augustinsson KB, 1948). Iz navedenoga, spomenuti glavni fiziološki supstrat ACh, djelovanjem ovih enzima se raspada na kolin (alkohol) i octenu kiselinu. Zaključno, ove ovi enzimi spadaju i u skupinu serinskih esteraza jer u aktivnom mjestu nose aminokiselinski ostatak serina.

AChE je enzim visokog biokemijskog obrtaja supstrata u produkt te visoke enzimatske aktivnosti. U fiziološkim uvjetima, AChE postoji kao tetramer povezan s kolagenu-sličnom Q podjedinicom (ColQ) ili prolinom bogato membransko sidro (eng. *proline-rich membrane anchor*, PriMA). AChE je povezana s molekulama sidrenja domenom koju zovemo WAT, amfifilna triptofanska tetramerizacijska domena (Massoulié J i sur., 2005; Dvir H i sur., 2010). Kao monomer je topljiva u vodi i na taj način prisutna u plazmi. Usidrena u membranu, AChE ima strukturu „drveta“ gdje deblo čini kolagenska molekula koja je usidrena u membranu postsinaptičkog neurona ili ciljane stanice. Krošnjju „drveta“ enzima čine tri grane sa karakterističnim disulfidnim (S-S) mostovima (npr. između katalitičkih domena u dimeru), a svaka grana nosi esteraznu aktivnost, sa četiri aktivna mjesta. Svaki enzim na grani „drveta“ sastoji se od četiri proteinske podjedinice od koje svaka nosi enzimatsku aktivnost. Iz fiziološkog aspekta, jako je važno da se prostorno enzim nalazi blizu same mete ACh, odnosno njegovih receptora (nikotinski i muskarinski) jer na taj način enzim hvata glasnik koji je već učinio svoju funkciju (Patrick GL, 2001a). Zaključno, AChE može biti u oligomernim strukturama (raznim molekularnim formama), većinom u mozgu sisavaca kao tetramer G4, s manjom količinom u obliku monomera G1 (Wang R, Tang XC, 2005) te u obliku dimera (Dvir H i sur., 2010). Enzimski monomer AChE ima duboko i usko ždrijelo, duboko 20 Å koje se proteže do polovice čitavog enzima i zatim proširuje u bazi (Manavalan P i sur., 1985).

Butirilkolinesteraza, poznata je još i kao nespecifična kolinesteraza ili pseudokolinesteraza i primarno je nađena u jetri, dok je AChE poznata kao eritrocitna kolinesteraza jer je nađena i u staničju kakvo su i crvene krvne stanice. Kolinesteraze se svrstavaju među B-esteraze, enzime inhibirane organofosfornim spojevima i posjeduju serinsko katalitičko mjesto, a shematska slika aktivnog mjesta enzima izoliranog iz električne raže (lat. *Torpedo californica*), koji se

naziva acetilkolinesteraza organizma *Torpedo californica* (TcAChE), prikazana je na slici 2 (Bajda M i sur., 2013). Osnovnu strukturu AChE i BChE čini 12  $\beta$ -nabranih ploča, okruženih s 14  $\alpha$ -uzvojnica, što ih klasificira u hidrolaze  $\alpha/\beta$  strukture, a u fiziološkim uvjetima, AChE postoji kao oligomer (tetramer, dimer) (Taylor P, Radić Z, 1994; Dvir H i sur., 2010).

Iako je dokazano da BChE, kao i AChE, može hidrolizirati ACh u sinapsi, njezin specifični fiziološki supstrat nije pronađen i time prava fiziološka uloga u organizmu do danas nije razjašnjena te je zamijećena je i pojačana ekspresija BChE kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Osim Alzheimerove bolesti (DAT), kao i AChE predstavlja metu za tretman Miastenije gravis (MG), i Parkinsonove bolesti (PB) (Bosak A i sur., 2011). Ako uspoređujemo enzimatsku aktivnost AChE i BChE, pseudokolinesteraza je efektivnija i brža u odnosu na AChE (Huang YJ i sur., 2007).



Slika 2. Shematski prikaz aktivnog mjesta AChE i aminokiselina u ždrijelu enzima organizma *Torpedo californica* – TcAChE (preuzeto iz Bajda M i sur., 2013)

Iz aspekta kliničke farmakologije, najpoznatiji supstrat BChE jest sukcinilkolin (nazvan još i suksametnij), miorelaksansa koji se koristio u abdominalnoj kirurgiji u općoj anesteziji, ali mu se korisnost smanjila otkrićem pacijenata s atipičnom ekspresijom BChE (različite mutacije, naslijeđene kao autosomno-recesivna svojstva) i upravo ta bioraznolika farmakokinetika kod tih pacijenata pokazuje smanjenu sposobnost hidrolize supstrata (gotovo polovičnom brzinom), stavljajući pacijente u opasnost, jer ne mogu enzimski neutralizirati anestetik te padaju u sukcinilsku apneju (produljena paraliza dišnog sustava) (Katzung BG,

2020a). Kao srodni enzim AChE, manje je specifična za ACh i ova pseudokolinesteraza nalazi se u brojnim drugim tkivima kao što su jetra, glija, ali i krvna plazma te ostala tkiva (Katzung BG, 2020b). Analiza aktivnosti butirilkolinesteraze u plazmi može se koristiti kao test funkcije jetre jer zajedno hiperkolinesterasemija i hipokolinesterasemija ukazuju na patološke procese (Whittaker M, 1980).

BChE se većinom nalazi u središnjem živčanom sustavu (SŽS) te je u visokim koncentracijama nalazimo u amigdali, hipotalamusu i hipofizi (Darvesh S i sur., 1998), a još je eksprimirana u središnjoj cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri (Bosak A i sur. 2011). Kodirana je genom BCHE i primarno se stvara u jetri (Allderdice PW i sur., 1991). Poluživot BChE je oko 10 do 14 dana (Whittaker M, 1980).

Iako su neke genetske varijante BChE povezane s povišenim rizikom od srčane smrti ili ranog početka Alzheimerove bolesti, nije bilo poznato da ovaj enzim igra izravnu ulogu u fiziologiji sisavaca (Brimjoin i sur., 2017). Valja napomenuti da osobe koje su nosioci tihe (eng. *silent*) inačice BChE ili neke od kvantitativnih inačica sa sniženom koncentracijom BChE nemaju nikakvih zdravstvenih teškoća, ali čine rizičnu skupinu kod trovanja pesticidima i u slučaju primjene lijekova za Alzheimerovu bolest (donepezil i huperzin A). Ostali supstrati su redom, osim navedenih, kokain, aspirin kao predstavnik nesteroidnih protuupalnih lijekova i amitriptilin, antidepresiv prve generacije koje enzim deaktivira, ali i heroin i bambuterol koje aktivira, a ostali farmakološki i egzogeni supstrati su prokain i mivakurij (Bosak A i sur., 2011).

Nadalje, novije studije s viralnim genskim transferom u miševima pokazale su da BChE hidrolizira takozvani „hormon gladi“, grelin, važan za fiziološke i patološke procese inzulinskog otpuštanja, adipoziteta i energetske homeostaze te razvoja i razvitka nekih tipova karcinoma (Chopin L i sur., 2011). BChE tako utječe na grelinsku koncentraciju u cirkulaciji (smanjuje koncentraciju peptidnog hormona). Ova biološka funkcija ima važne posljedice za dobivanje na tjelesnoj masi i metabolizam masti sugerirajući tako da igra ulogu u metabolizmu lipoproteina i masti. Pokazano je da grelin utječe i na emocionalno ponašanje kao što je agresija. Prekomjerna ekspresija BChE dovodi do niske razine grelina u krvotoku i smanjuje agresiju i društveni stres kod miševa. U određenim okolnostima ti kombinirani učinci doprinose povećanom životnom vijeku životinja smještenih u skupini. Ovi nalazi mogu se generalizirati na ljude, jer nedavne kliničke studije više istraživača pokazuju da, među pacijentima s teškim kardiovaskularnim bolestima, dugovječnost korelira s povećanjem razine aktivnosti BChE u plazmi. Prema novijim saznanjima, manipulacijom BChE i drugim metodama genskog

transfera i dostave nanočestica, enzim bi mogao imati potencijal u širokom spektru metaboličkih ili psihosocijalnih poremećaja (Brimijoin S i sur., 2017).

### **1.2.1. Struktura i aktivno mjesto kolinesteraza. Mehanizam reakcije enzimatske konverzije i hidrolize u aktivnom mjestu.**

Kao što je prikazano i na slici 2, kolinesteraze su serinske hidrolaze s aminokiselinom serinom (Ser) u aktivnom mjestu. Svojom enzimatskom aktivnošću uzrokuju deesterifikaciju ili odcjepljenje karboksilne skupine u prethodno navedenim supstratima, oslobađajući produkte koji su karboksilna kiselina i alkohol. Gledano iz biokemijske perspektive, ova reakcija je klasična hidroliza, karakteristična za esteraze, a odvija se u dalje navedenim koracima: nastajanje Michaelisova kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Proces aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskoga prijelaznog stanja koje čine aktivni serin (Ser203, serinski aminokiselinski ostatak na rednom mjestu 203) i supstrat (Quinn DM, 1987; Bosak i sur., 2011).

Geni čija ekspresija za posljedicu ima stvaranje enzima AChE i BChE su različiti no oba enzima pokazuju i dijele izniman postotak homologije primarnih aminokiselinskih sekvenci čak i 90% u terciarnoj strukturi te dijele isti mehanizam enzimatske reakcije (Taylor P, Radić Z, 1994; Kryger G i sur., 2000). Njihova razlika proizlazi iz njihove specifičnosti te selektivnosti za supstrate. Iako je BChE strukturno vrlo slična AChE, umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje nalazimo unutar aktivnog mjesta AChE, kod BChE je njih 6 zamijenjeno alifatskim aminokiselinama. To čini volumen aktivnog mjesta BChE oko 200 Å<sup>3</sup> većim u odnosu na aktivno mjesto AChE (Darvesh S, Hopkins DA, 2003; Bosak A i sur., 2011).

Aktivno mjesto obaju enzima je 20 Å dugačko, odnosno duboko (ulazi u gotovo pola dubine čitavog enzima) i oko 5 Å široko ždrijelo (eng. *Gorge*). Pomoću kristalografije, specifičnog vezanja liganada i ciljane mutageneze, identificirane su četiri domene koje čine aktivno mjesto obaju enzima: katalitičko mjesto (katalitička trijada ili trijas s oksianionskom šupljinom), kolinsko mjesto je lipofilno i nenabijeno (kation- $\pi$  mjesto, dokazana prisutnost Triptofanskog ostatka (Shinitzky M i sur., 1980), važno za kation i  $\pi$  interakcije aromatskog dijela triptofana s pozitivno nabijenim dijelom supstrata) važno za stabilizaciju pozitivno nabijenoga kvaternog dijela kolinskih supstrata (a u literaturi je poznat i kao anionsko vezno mjesto (eng. *anionic site*) (Patrick GL, 2001a)), acilni džep odgovoran za smještanje kiselog (anionskog, acilnog) dijela supstrata i periferno mjesto koje je smješteno na rubu ždrijela. Katalitičko ili aktivno mjesto enzima, gdje se reakcija i odvija, smješteno je na dnu ždrijela i čini ga katalitička trijada odnosno aminokiseline Ser203, His447 i Glu334 koje izravno sudjeluju u katalizi, a ovo mjesto

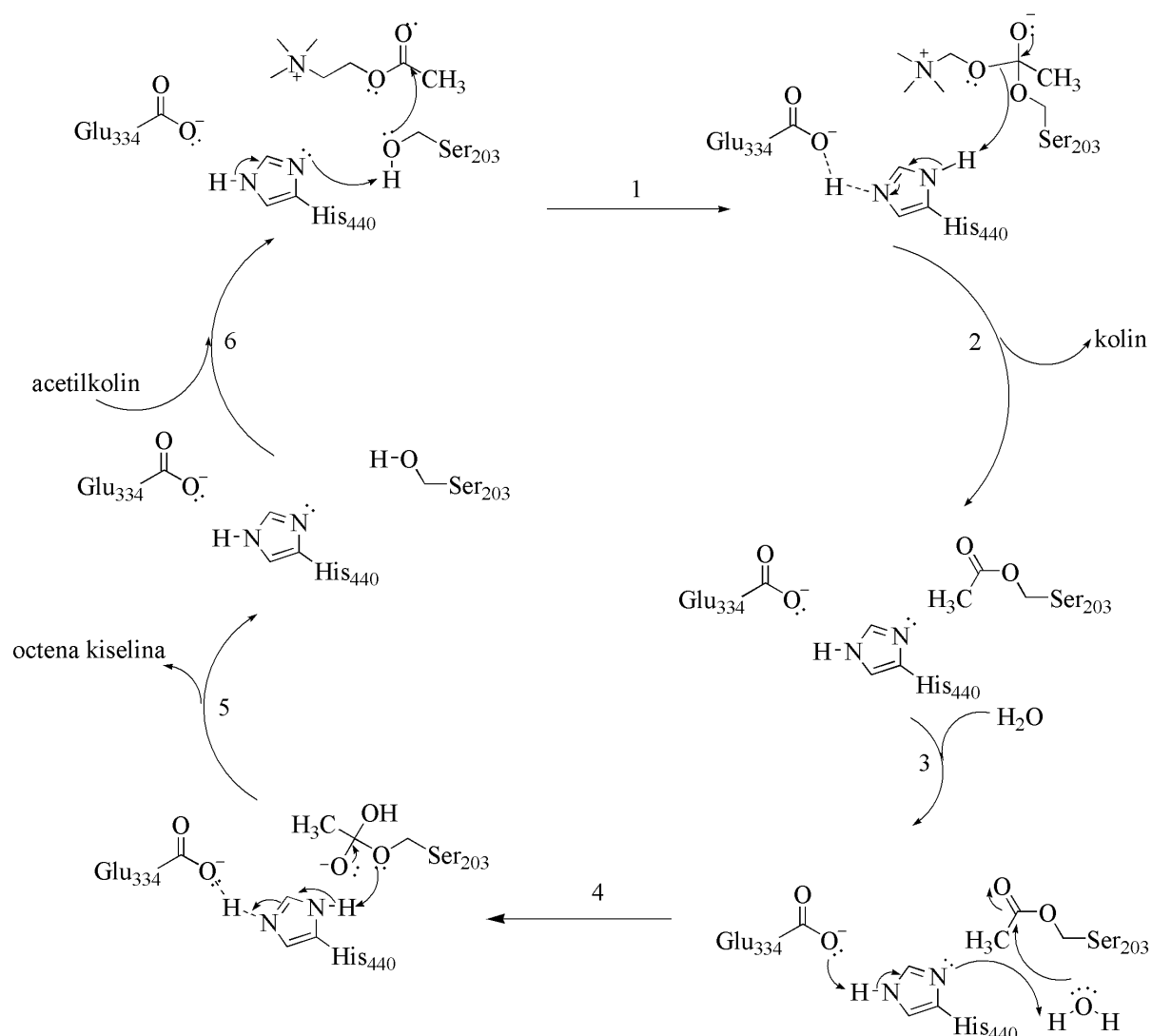
se u literaturi spominje i kao estersko vezno mjesto (Dvir H i sur., 2010). Aminokiselinski ostatak serina u katalitičkom mjestu je nukleofilniji od ostalih serina u enzimu zbog stvaranja slabih vodikovih veza s dušikovim atomom iz imidazolskog prstena His447, dok druge vodikove veze čine specifičan dizajn mreže i u njenu stvaranju su najvažnije karbonilna skupina Glu334 i slobodni elektronski par na drugom dušiku imidazolskog prstena His447. U mehanizmu reakcije, serinski kisik, kao nukleofil napada karbonilni ugljikov atom u karboksilnoj skupini supstrata, a prilikom nastajanja tetraedarskog međuprodukta sa supstratom se stvaraju vodikove veze (H-veze) te tako stabiliziraju karbonilni kisik supstrata. U stvaranju H-veza sudjeluju upravo aminokiselinski ostaci Gly118, Gly119 i Ala201 koji zapravo čine jedno od mjesta na enzimu, oksianionsku šupljinu (Taylor P, Lappi S, 1989-1997). Katalitičko mjesto kolinesteraza sadržava i aminokiselinski ogranak glutamata (sa slobodnom karboksilnom -COOH skupinom) koji je smješten neposredno do aktivnog serina. Glutamat je stabilizator prijelaznih stanja tijekom katalitičkog procesa što ostvaruje elektrostatskim interakcijama s protoniranim katalitičkim histidinom, a zapravo čini histidin boljom bazom da primi proton od serina u mehanizmu te općenito stabilizira imidazolski prsten i na taj način pridonosi dealkilaciji (Nachon F i sur., 2003; Dvir H i sur., 2011). Kolinsko mjesto enzima sačinjeno je od aminokiselinskih ogranaka Trp86, Tyr337 i Tyr338 te je prethodno navedeni triptofan izrazito konzervirano mjesto u životinjskom svijetu, a kod *Torpedo californica* umjesto Tyr337 prisutan je fenilalanin. Prisutnost aromatskih aminokiselinskih ostataka omogućava međudjelovanje aromata i supstrata kao veze tipa kation- $\pi$ , a neki autori spominju međudjelovanje pozitivno nabijenog dušika kroz indicirani dipol interakcije (Partick GL, 2001), a prije su ove interakcije kao elektrostatske interakcije, bile pripisane aspartatu. Triptofan koordinira ili usmjerava te omogućava smještaj nabijenog dijela supstrata (kvaternizirani dušik), omogućavajući time bržu hidrolizu kolinskih supstrata (Ordentlich A i sur., 1993), ali i zadržavanje supstrata na mjestu. Ovo anionsko, kolinsko vezno mjesto, slično je vezujućoj regiji kod kolinergičnog receptora i smatra se da se blizu njega nalaze dva hidrofobna džepa za prijanjanje i smještaj metilnih skupina, ali nikako drugih, većih alifatskih ostataka kolinskog dijela molekule (Partick GL, 2001). Kolinsko je vezno mjesto važno za neke od mehanizama inhibicije AChE te kao mjesto vezanja inhibitora (Reiner E i sur., 1991), a pokazano je da se i acetiltiokolin (ACh) veže za ovo mjesto kao prvi korak katalitičkog puta (Szgletes T i sur., 1999). Odsutnost fenilalanina na položaju 328 kod BChE utječe na afinitet enzima prema nekim inhibitorima, a velika je razlika kod AChE i BChE upravo u ovom mjestu jer kolinsko mjesto kod BChE nije specifično samo za pozitivno nabijene ligande i supstrate,

već BChE može hidrolizirati i neutralne, pa čak i neke negativno nabijene ligande, kao što je prethodno spomenuti aspirin (Bosak A i sur., 2011). Acilni džep omogućava vezivanje i interakciju acilne skupine supstrata s enzimom, usmjeravajući ga prema aktivnom serinu i ostatku enzima. U acilnom dijelu AChE glavni značaj nose dva aminokiselinska ostatka fenilalanina: Phe295 i Phe297 koji svojom strukturom ocrtavaju dimenzije acilnog džepa, dok se kod acilnog džepa ljudske BChE, umjesto aromatskih, nalaze aminokiselinski ogranci alifatskih ili lančanih aminokiselina Leu286 i Val288 koje svojim manjim dimenzijama smanjuju selektivnost BChE (Radić E i sur., 1993) te omogućavaju hidrolizu šireg spektra supstrata u odnosu na AChE (Nachon F i sur., 2003). Posljednje mjesto, periferno mjesto ljudske AChE čine ogranci Tyr72 i Tyr124 te Trp286, a te su aminokiseline važne za specifičnosti određene inhibicije s dekametodnijem i propidijem (Radić Z i sur., 1993). Ulogu perifernog mjesta u BChE nose ipak alifatski aminokiselinski ostaci Asn, Gln i Arg pa je zbog toga otvor u ždrijelo širi i veći (Radić Z i sur., 1993; Nachon F i sur., 2003). Posljedica je tih razlika u promijenjenom afinitetu za inhibitore AChE. U blizini ždrijela u AChE se nalazi i Asp74 koji igra ulogu stabiliziranja i vezanja supstrata te doprinosi prihvaćanju liganda, posebice kationskih, a važan je i u pravilnoj orijentaciji kod ulaska u aktivno mjesto. Nadalje, taj je aspartat kod BChE na mjestu 70 (različito od mjesta 74 u AChE) i kao takav važan za aktivaciju ili inhibiciju BChE (Masson P i sur., 1996). Kod inhibicije pri visokim koncentracijama ACh, upravo je periferno mjesto lokacija gdje i za alosteričku inhibiciju enzima (Radić Z i sur., 1991).

Produkti hidrolize supstrata ne mogu difundirati natrag kroz ždrijelo jer bi difuzija produkata u tom slučaju utjecala na dolazak novih molekula supstrata do aktivnog mjesta. Ovaj problem, enzim rješava na način da su Trp86, koji je bio dio kolinskog, anionskog veznog mjesta i Tyr442 pokretni i gibljivi. Tijekom mirovanja tvore H vezu, a nakon katalize se ta veza prekida i oni mijenjaju svoju konformaciju, stvarajući tako put za prolazak produkata, što je temelj visoke enzimske aktivnosti AChE (Sanson B i sur., 2011). Govoreći o kinuklidinskim supstratima, ljudska AChE i BChE mogu hidrolizirati kinuklidinij acetate, benzoate, izonikotinate i ftalate, a sama brzina hidrolitičke reakcije ovisi o karboksilnom dijelu molekule, gdje se istraživanjima pokazalo da izonikotinat pokazuje svojstvo najboljeg supstrata AChE (Bosak A i sur., 2005; Primožič I i sur., 2012).

Kako aktivni serin, kao i ostali alifatski alkoholi ima slab nukleofilni potencijal, kroz kiselo-baznu katalitičku ulogu histidina kao akceptora i donatora vodikovog iona ili protona, preuzimanjem protona uzrokuje stvaranje visoko nukleofilnog kisika u serinu i tako

omogućava napad na karbonilni centar supstrata. Mehanizam reakcije AChE, prikazan je na slici 3 (Patrick GL, 2001a).



Slika 3. Mehanizam reakcije enzima po koracima: 1 – nukleofilni napad serinskog kisika na karbonilni centar, His je bazni katalizator; 2 – odlazak kolina i djelovanje His kao kiselog katalizatora; 3- stvaranje aciliranog enzima i dolazak vode; 4 – nukleofilni napad vode na karbonilni centar, His je baza; Odlazak octene kisline i deacilacija enzima vodom, His je kiselina; 6 – ponovni dolazak supstrata, ACh

Tijekom mehanizma, histidin kao kiselina protonira supstrat, stvarajući bolju izlaznu skupinu (eng. *Leaving group*, LG). Na taj način se stvara karbonilna skupina i izbacuje alkohol kao izlaznu skupinu, u procesu kojeg nazivamo aciliranje enzima. Sada u ovom aciliranom

stanju (kovalentno vezan supstrat na enzim), u ždrijelu prisutna molekula vode, nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom acila na enzimu, gdje opet His kao akceptor protona, sada kao baza, služi za pojačavanje nukleofilnog karaktera vode. Protonirani histidin tada kao kiselina, predaje svoj proton međuprojektu ponovno stvarajući kvalitetnu izlaznu skupinu u obliku karboksilne kiseline. U slučaju hidrolize acetilkolina, izlazi octena kiselina, a enzim se vraća u prvotno mirujuće stanje, a proces odlaska karboksilne skupine nazivamo deaciliranje enzima. Upravo zbog te strukturalne blizine serina i histidina u katalitičkoj trijadi, enzimatska je reakcija 100 milijuna puta brža od kemijske hidrolize (ACh je hidroliziran u 100  $\mu$ s od međudjelovanja s enzimom) (Patrick GL, 2001a).

### 1.3. Inhibitori acetilkolinesteraze

#### 1.3.1. *Stratifikacija i klasifikacija inhibitora. Parasimpatolitici. Mehanizmi i farmakologija inhibitora.*

Inhibitore acetilkolinesteraza nazivamo još i antikolinesteraznim spojevima, a nose uloge lijekova, otrova ili toksina, insekticida, a ovisno o interakciji sa metom na enzimu, međudjelovanja i veze mogu biti reverzibilne i ireverzibilne. Dakle, ovisno o vezi inhibitori mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni, a postoje i neki koji se mogu vezivati „pseudo-ireverzibilno“. U terapiji, koriste se uglavnom reverzibilni inhibitori, čija je veza sa enzimom slaba, nekovalentna, interakcije su. Kovalentna inhibicija ireverzibilnim ili pseudo-ireverzibilnim inhibitorima se koristi kod pesticida i insekticida ili u vojnoj industriji kao bio-oružja i nervni agensi (Fulco CE i sur., 2000; Wang P i sur., 2019). Valja imati na umu da djelotvornost lijekova koji djeluju na kolinergičke receptore na primjer muskarinski ili nikotinski receptor ovisi o njihovim farmakoforima i udaljenosti esterske skupine i kvaterniziranog dušika koji kod muskarinskog receptora iznosi 4,4, a kod nikotinskog 5,9 Å. Kako receptori acetilkolina međudjeluju s metom na sličan način kao i supstrat i enzim, a i zbog sličnosti aktivnih mjesta enzima i veznog mjesta na receptoru, možemo povući paralelu farmakofora parasimpatomimetika i farmakofora parasimpatolitika (Patrick GL, 2001d).

Prirodni inhibitori, pronađeni najviše u biljnom, ali i životinjskom svijetu su redom alkaloidi: huperzin A, solanidin i solanin te flavonoidi (npr. galagin) (Giacobini E, 2000; Katalinić M i sur., 2010). Jedan od zanimljivijih spojeva jest huperzin A, izoliran iz kineske crvotočine lat. *Huperzia serrata*, koji se stoljećima koristi u kineskoj narodnoj medicini kao zbirnom i holističkom pristupu tradicionalne kineske medicine za terapiju simptoma koji imaju



široki raspon: od konfuzije do shizofrenije, a vezanje samog lijeka na receptore je specifično i izaziva male nuspojave (Patrick GL, 2000c; Callizot N i sur. 2021).

Tri su kemijske skupine inhibitora: 1) jednostavni alkoholi i kvaterni amini (edrofonij, koji se koristi u terapiji mijastenije gravis, ileusa i aritmija), 2) esteri alkohola i karbaminske kiseline s karbamoilnim ostacima (karbamati, uretani kao što je neostigmin) i 3) organski derivati fosforne kiseline (ekotiopat) (Katzung BG, 2020c). Primarna ciljna meta ovih inhibitora je acetilkolinesteraza iako oni inhibiraju i butirilkolinesterazu.

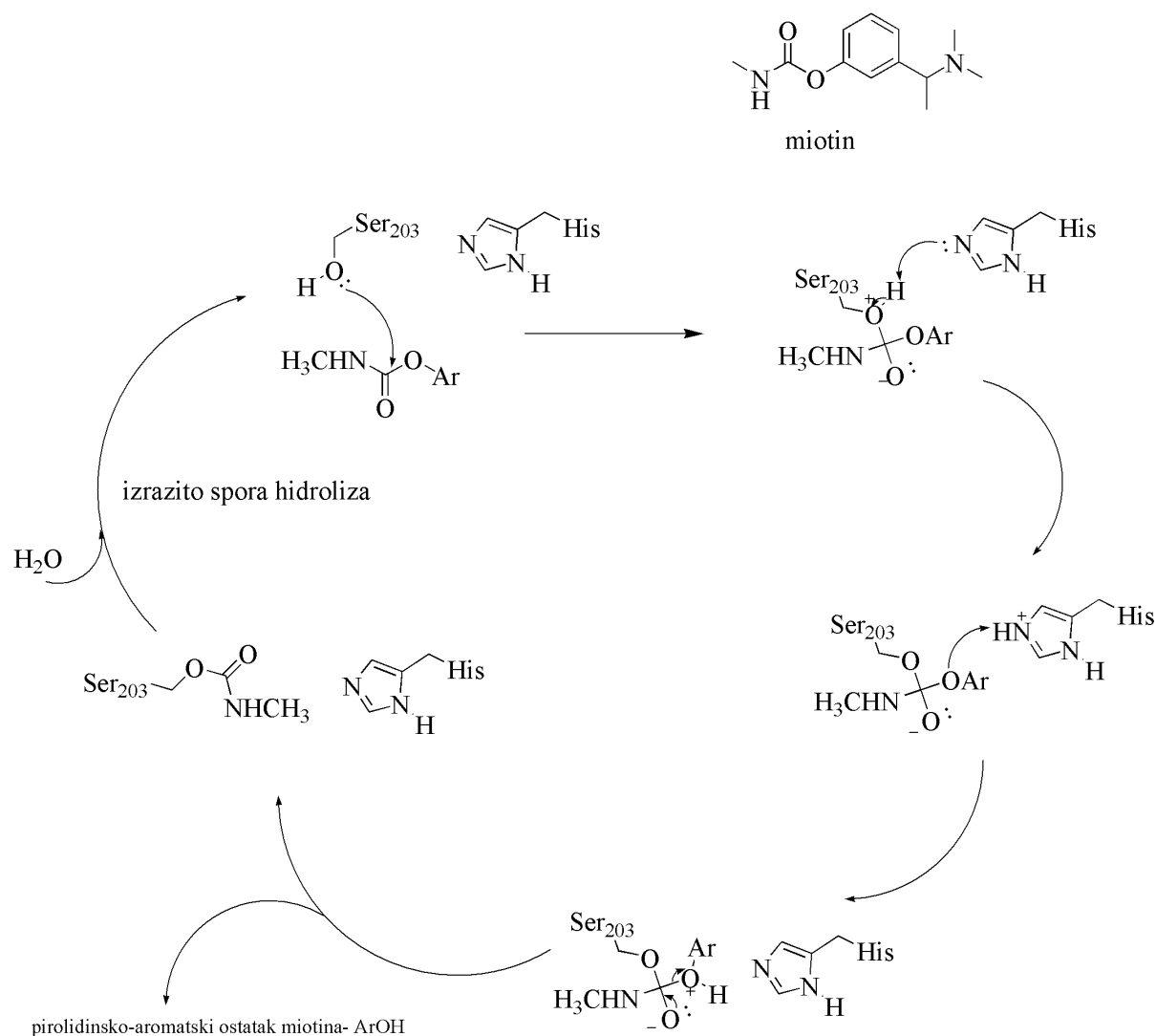
Od farmakoloških djelovanja, inhibitori AChE najviše djeluju na središnji živčani sustav, oko, dišni, probavni, mokraćni, kardiovaskularni (vagotonično djelovanje: negativno kronotropno, dromotropno i blago negativno inotropno) te na živčano-mišićnu spojnicu. Cjelokupni učinak je povećanje perifernog otpora i krvnog tlaka s umjerenom bradikardijom i smanjenim srčanim minutnim volumenom (kod umjerenih doza inhibitora), a zbog djelovanja na kardiovaskularni sustav antihipertenzivna terapija kod pacijenata s Alzheimerovom bolešću mora se revidirati (Katzung BG, 2020e).

Takrin (THA, tetrahidroaminoakridin) je bio prvi dugodjelujući inhibitor kolinesteraze, ali i modulator muskarinskih receptora, koji se koristio u liječenju blage do umjerenom teške Alzheimerove bolesti. Iznimno je hepatotoksičan lijek sa smanjenom djelotvornošću pa je zato izbjegavan i zamijenjen novim lijekovima za Alzheimerovu bolest (McGleenon BM i sur., 1999): Donepezil, Galantamin i rivastigmin kao noviji i selektivniji inhibitori kolinesteraza, a prednost pred takrinom im je da nisu hepatotoksični. Djelotvornost čak i ovih novih lijekova nije značajna budući da je Alzheimerova bolest progresivna i kompleksna, a navedeni lijekovi ne smanjuju progresiju bolesti. Od toksičnih učinaka navedeni su periferni kolinomimetički učinci te povraćanje, proljev i mučnina (Katzung BG, 2020c) Lijekove ove skupine, takrinske skupine, svrstavamo u reverzibilne inhibitore AChE. Reverzibilni se inhibitori vežu u aktivno mjesto (npr. takrin) ili na periferno mjesto (npr. galantamin) ili istodobno na oba mjesta (npr. dekametnij) te se vezanjem inhibitora induciraju različite posljedice u enzimu kao što su: konformacijska promjena enzima, elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih inhibitora s kationskim dijelom supstrata tijekom enzimatske reakcije ili steričke i/ili elektrostatske smetnje kod ulaska supstrata u aktivno mjesto enzima (Reiner E i sur., 2000). Glavne strukturne jedinice i strukturna obilježja molekula su : prisutnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata koji pomažu ulasku u usko ždrijelo i interakciju inhibitora s aktivnim mjestom (Ripoll DR i sur., 1993).

Prva kemijska skupina je skupina inhibitora koje nazivamo karbamatima, a iz ove skupine najstariji je prirodni spoj fizostigmin koji je otkriven 1864.-te godine te izoliran iz kalabarskog graha ili ordalskog graha (lat. *Physostigma venenosum*) iz zapadne Afrike. Sama je struktura ovog spoja otkrivena 1925.-te godine i otkriveno je da, iz aspekta medicinske kemije, za njegovo djelovanje trebaju biti zadovoljene tri karakteristike (eng. *structure-activity relationship*, SAR, odnos strukture molekule i djelovanja): spoj treba imati karbamatsku funkcijsku skupinu koju još nazivamo uretan, benzenski prsten i pirolidinski dušik (umjesto kojeg njegovi strukturni analozi imaju npr. tercijarnu alifatsku dušičnu skupinu). Pozitivno nabijeni dušik važan je za vezanje na kolinsko vezno mjesto i interakciju s aspartatom, benzenski prsten stvara hidrofobne veze i dobra je izlazeća skupina u mehanizmu dok je karbamatska skupina nužna i karakteristična za ovu skupinu što se može vidjeti na slici 4.

Kod mehanizma inhibicije, važno je napomenuti da se reakcija odvija slično kao i sa supstratom sve do trenutka vezivanja na enzim i odlaska fenolne skupine, katalizirano djelovanjem histidina kao aminokiselinskog ostatka s kiselo-baznim djelovanjem (Patrick GL, 2001a). Kovalentno vezan za enzim ostaje upravo uretan ili karbamat što čini idući korak hidrolize izrazito sporim. Voda koja bi trebala hidrolitički odstraniti karbamat sa serina (enzim u ovom stadiju nazivamo *karbamilirani* enzim) to čini iznimno sporo i ne može odstraniti karbamoilsku skupinu nukleofilnim napadom, čak ni uz pomoć histidina. Ovaj korak je onaj koji određuje brzinu reakcije enzima, a enzim postaje 40 milijuna puta sporiji u prevođenju supstrata u produkt. Upravo je činjenica što dušik karbamoilske skupine rezonancijski daje svoj slobodan par elektrona ugljiku kojeg je voda trebala napasti, ona glavna koja karbamate čini tako dobrim inhibitorima. Fizostigmin se koristi u terapiji glaukoma, ali ima nedostatak u širokom spektru nuspojava i zbog toga su stvoreni drugi analozi koji se koriste kod mijastenije gravis ili kao antidot za kurare (otrov južnoameričkih Indijanaca, aktivna tvar tubokurarin). Jedan od takvih je i miotin, a njegova je struktura prikazana na slici 4, koji zbog prolaska krvno-moždane barijere (KMB), kao slobodna baza (ionizirana kod pH plazme 7,3 do 7,4), i

osjetljivosti na hidrolizu nije dobar za medicinske svrhe.



Slika 4. Strukture i mehanizmi karbamata. Miotin.

Zbog njihovog mehanizma i mogućnosti ponovne obnove enzimske aktivnosti, karbamate svrstavamo u pseudo-ireverzibilne inhibitore, a mjesto vezanja može biti na oba enzima, kako AChE tako BChE (Darvesh S i sur. 2008; Meden A i sur., 2023).

Važniji analog fizostigmina je neostigmin koji upravo rješava probleme miotina jer on nije slobodna baza pri fiziološkom pH budući da ima kvaterniziran dušikov atom umjesto tercijarnog dušika (nema prolaska KMB i nuspojava miotina). Zamjenom metilkarbamata miotina dimetil-karbamatnom skupinom, povećana je otpornost na hidrolizu i to kroz dva pretpostavljena mehanizma. Prvi mehanizam se temelji na nukleofilnoj supstituciji vode gdje se smanjivanjem elektrofilnog karaktera karbonilnog ugljika se smanjuje reaktivnost gdje je

metilna skupina donor elektrona dušiku zbog kojeg dušik ima veću tendenciju rezonancije sa karbonilnim ugljikovim atomom. Drugi je mehanizam, mehanizam fragmentacije u kojemu se fenolna skupina inhibitora gubi prije dolaska vode kao nukleofila, a u ovom mehanizmu se opisuje kako je nužan odlazak protona s karbamatske skupine za podložnost hidrolizi. Zbog toga što je  $\text{CH}_3^+$  specija ili metilni ion jako reaktivan, loša je izlazna skupina i time nema fragmentacije karbamata (Patrick GL, 2001a). Osim ovih prednosti, svojstva neostigmina su da je udaljenost esterske skupine i kvaterniziranog dušika 4,7 Å, a vezivanjem kvaterne amonijeve skupine izravno na benzen, smanjuje se broj konformacija koje fizostigmin u trenutku vezivanja za metu može imati (Patrick GL, 2001a). Neostigmin se primjenjuje kao antidot neuromuskularnoj blokadi intravenozno ili peroralno kod mijastenije gravis, ileusa ili atonije mokraćnog mjehura. Od karbamatnih insekticida ističe se karbaril koji se zbog lipofilnosti brzo apsorbira i veže na meta u organizmu kukca (Katzung BG, 2020c; Patrick GL, 2001a).

Organofosforni spojevi (OP) velika su skupina inhibitora u koju najviše spadaju nervni ili živčani otrovi, bojni otrovi koji se najviše primjenjuju u vojne svrhe. Danas se primjenjuju više kao lijekovi ili insekticidi. Neki od bojnih otrova koji se spominju u literaturi jesu difos, sarin, soman, VX i brojni drugi. Oni su ireverzibilni inhibitori AChE te uzrokuju fosforilaciju serinskog ostatka katalitičke trijade, stvaranjem kovalentne veze, a nakon što je stvorio Michaelisov tip kompleksa. Fosforilirani produkt jako je stabilan i otporan na hidrolizu, za razliku od kompleksa i adukta koji stvaraju karbamati. Na ovaj način uzrokuju neuromuskularnu blokadu i konstantnu kolinergičnu stimulaciju acetilkolinom te ako se ovakvo stanje ne riješi primjenom antidota, neminovno dovodi do letalnog ishoda. Ovo stanje se naziva kolinergičnim sindromom čiji su znakovi mioza, salivacija, lakrimacija, uriniranje, defekacija, crijevne tegobe i nelagode, emeza (povraćanje) te bronhoreja, bronhokonstrikcija i konvulzije (Katzung BG, 2020d). Bojni otrovi, izrazito su lipofini spojevi i mali spojevi te im takva obilježja omogućavaju lak ulaz kroz KMB i centralnu inhibiciju. Temeljem spoznaje mehanizma djelovanja bojnih otrova, otkriven je lijek ekotiopat koji je dizajniran na način da sjeda u aktivno mjesto preciznije na način da je u strukturu inkorporiran kvaterni amonijev ion koji se veže na anionsku regiju (kolinska regija). Ekotiopat i difos mogu se koristiti za terapiju glaukoma s prednošću ekotiopata što se brže hidrolizira s aktivnog mjesta. Osim glaukoma, neki se organofosforni spojevi koriste i kao insekticidi, a najpoznatiji insekticidi ove skupine su paration i malation koji se nazivaju tiosulfatima. Upravo dvostruka veza sumpora i fosfora u strukturi ne dopušta blokiranje aktivnog mjesta AChE te činjenica da nema biokemijskih

puteva prevođenja P=S u P=O vezu kod ljudi, čini ih sigurnima za primjenu. Dok kod insekata, ovi spojevi su prolijekovi koji se aktiviraju oksidativnom desulfurizacijom, reakcijom koja prevodi vezu fosfora i sumpora u vezu fosfor-kisik. Iako ih navedena svojstva čine sigurnima kod ljudi, ovi spojevi nisu idealni jer su jako lipofilni i prolaze membrane i barijere, te se mogu apsorbirati kroz kožu. Zaključno, neovisno o putu primjene, apsorpcija im je značajna. Nažalost, ribe ne mogu inaktivirati i eliminirati malation, pa ako se insekticidi primjenjuju blizu njihovih staništa, može doći do pomora (Katzung BGc, 2020; Patrick GL, 2001a).

U kliničko-farmakološkoj uporabi i centru istraživanja, svoje su mjesto pronašli uglavnom inhibitori koji osiguravaju reverzibilno ili nekompetitivno djelovanje. Indikacije u kojima se spominju su uglavnom neurološke prirode kod neurodegenerativnih bolesti i demencija (DAT i PB, Lewyjeva bolest) (galantamin, donepezil, takrin i rivastigmin), okularnih tegoba kao što je glaukom (fizostigmin), atonije mokraćnog mjehura, ileusa (pogotovo postoperativni ileus bez opstrukcije), autoimunih bolesti kao što je miastenija gravis (piridostigmin), kardiovaskularnih bolesti (edorfonij) te kod shizofrenije i autizma (Katzung BG, 2020; Sing, Singh R, Sadiq NM, 2023; <https://www.britannica.com/science/anticholinesterase>)

Kao antikolinergici i antikolinesterazni agensi, spominju se i razni derivati kinuklidinija i derivata temeljenih na kinuklidinskom prstenu, jer su sami kinuklidin-3-ol i njegovi derivati pokazali brojna antikolinesterazna djelovanja te ih smatramo bioizosterima acetilkolina, odnosno, rečeno drugim riječima, njegovi su biciklički strukturni analozi. Upravo se kvaternizacijom kinuklidina dobiva pozitivan naboj na molekuli koji je nužan za ulazak do aktivnog mjesta, pristupanje enzimu i djelovanjem sa kolinskim veznim mjestom u ždrijelu.

### ***1.3.2. Proces starenja enzima kod otrovanja organofosfornim spojevima.***

Starenje se odnosi na dealkilaciju fosforiliranog enzima, što dovodi do miješanja elektrona na način koji dodatno jača kovalentnu vezu između organofosfornog spoja i kolinesteraze do te mjere da čak ni pralidoksim ne može reaktivirati enzim. Opseg i brzina starenja ovise o karakteristikama određenog spoja, ali se u pravilu očekuje da će organofosforni spojevi korišteni u vojne svrhe vrlo brzo stariti i stoga su izuzetno opasni. Na primjer, poluživot molekule acetilkolinesteraze izložene živčanom agensu somanu može biti i do 1,3 minute (Gupta R, Parmar M. 2023).

Kompleks fosforiliranog enzima, nastao u prvoj fazi procesa (vezanje, pa hidroliza) može podleći ovom procesu. Riječ je o raskidanju jedne od veza fosfor-kisik u molekuli inhibitora s posljedičnim učvršćivanjem veze fosfor-kisik, gdje kisik dolazi od serina katalitičke trijade. Na primjer, adukt enzima i bojnog otrova somana počinje starjeti nakon 10 minuta, dok u

slučaju drugog bojnog otrova, spoja VX, sama pojava se počinje manifestirati tek nakon 38h. Kod terapije antidotima kod neuromuskularne blokade, važno je antidot primijeniti što prije kako adukt, odnosno kompleks inhibitor-enzim nebi ostario (Katzung BG, 2020c).

### ***1.3.3. Neurodegenerativne bolesti. Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Reverzibilni inhibitori acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.***

Alzheimerova demencija (DAT, Demencija Alzheimerovog tipa) i Parkinsonova bolest (PB), najpoznatije su neurodegenerativne bolesti, gdje je DAT povezana s moždanom atrofijom, starenjem i učestalija je kod ženskog spola, dok je PB povezana s degeneracijom dopaminergičkog sustava, propadanjem bazalnih ganglija te je češća kod muškaraca starije životne dobi (Simon DK i sur., 2019).

Parkinsonova bolest karakterizirana je klasičnim, glavnim simptomima bolesti koje nazivamo parkinsonizmima, a ti simptomi su redom: tremor, bradikinezija, rigiditet i muskularni spazam te posturalna nestabilnost povezane s problemima koordinacije, hodanja i održavanja ravnoteže (<https://www.nhs.uk/conditions/parkinsons-disease/symptoms/>; Rizek P, Kumar N, 2016). Etiološki gledano, ovi simptomi, posljedica su neuralnog staničnog propadanja sive moždane tvari, predominantno dopaminergičkih neurona kod sustava bazalnih ganglija, točnije u crnoj tvari te djelomično putamenu i strijatalnom tijelu (lat. *corpus striatum*). Na taj način je oštećen nigrostrijatalni put, koji je središnji put kontrole motoričke funkcije, što pokazuju smanjeni kolinergični markeri, a povezuje se s Parkinsonskom demencijom i kognitivnim propadanjem (Bohnen NI, Albin RL, 2011). Inhibitori kolinesteraze se koriste u terapiji kod pacijenata sa PB sa simptomima kognitivnog propadanja i poteškoća, ali ne smanjuju rizik pada (Pagano i sur., 2014).

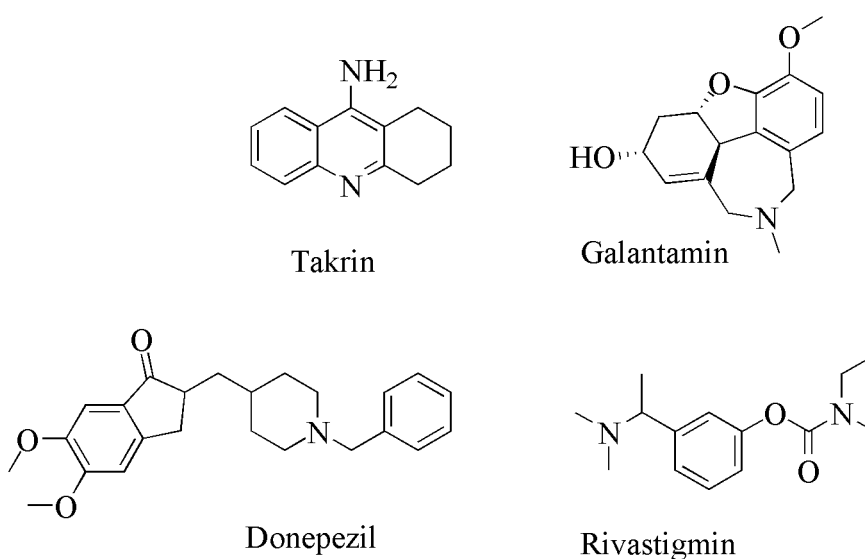
Alzheimerova demencija ili demencija Alzheimerovog tipa neurodegenerativna je progresivna bolest, povezana sa starenjem i pripada u najčešće i najsmrtonosnije demencije (50% svih demencija, danas gotovo 2/3 svih demencija). Epidemiološki gledano, DAT je prevalentnija i češća u starijih osoba sa povećanjem demencije u svijetu s 20,3 milijuna ljudi u 1990.-toj godini na 43,8 milijuna u 2016.-oj, što je povećanje od 116%, a od 1990. do 2019. Incidencija i prevalencija DAT i ostalih demencija narasla je sa 147,95 do 160,84%, dok neke projekcije govore da će demencija zahvatiti 150 milijuna ljudi do 2050.-te godine (Li X i sur. 2022). Kod starijih se osoba sa svakom godinom iznad 65.-te pojavnost i rizik razvijanja DAT udvostručuje (Qiu C, i sur., 2009). Neki od rizičnih čimbenika razvitka DAT su kardiovaskularne bolesti, pretilost, dijabetes, depresija, pušenje te genetska predispozicija. Prema izvještajima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, eng. *World Health*

*Organization*), DAT trenutačno pogađa oko 47 milijuna ljudi, a smatra se da će se do 2050.-te godine ovaj broj učtverostručiti (Peterson B, 2019).

Iz etiološkog stajališta, prva teorija nastanka DAT je kolinergična hipoteza, temeljena na činjenici da je jedan od najkonzistentnijih nalaza zahvaćenost kolinergičnog živčanog sustava bazalne Meynertove jezgre i medijalne septalne jezgre, (Šimić, 2003; Hampel H i sur., 2018). Nedostatak acetilkolina i stanična degeneracija sinapsa kolinergičnog središnjeg živčanog sustava kao i bazalne Meynertove jezgre, pokazuje značaj ACh jer bazalna Meynertova jezgra ima ključnu ulogu u koordinaciji kortikalne aktivnosti kroz proces učenja (Martínez-Rubio C i sur., 2018). Sva ova istraživanja naglašavaju ulogu AChE u stvaranju memorije, kontroli ponašanja, kogniciji i učenju. Iz histološkog i anatomskog stajališta, DAT se kortikalnom demencijom zbog obimnog gubitka stanica i atrofije mozga u glavnim područjima korteksa iako su zahvaćene i subkortikalne strukture, posebice u područjima limbičkog sustava kao što su hipokampus i amigdala (Tkalčić i sur., 2003). Biološki markeri iz patofiziologije Alzheimerove bolesti uključuju upravo hipofunkciju kolinergičnog živčanog sustava, ali i druge mnogobrojne neurotransmitore, neuropeptide i aminokiseline, a brojna su istraživanja uputila na rani nedostatak i gubitak aferentnih kortikalnih sustava koji kao neurotransmitor koriste ACh, dopamin, adrenalin i serotonin (Tkalčić i sur., 2003; Zetterberg H, Bendlin BB, 2021), dok u ostale pokazatelje svrstavamo članove neuropeptidgeričkih sustava i promjenu aminokiselinskih sadržaja u moždanom tkivu kod kojih je najčešće je pronađena smanjena razina somatostatina, povećana razina glutamata i prolina te smanjena razina taurina, ornitina i lizina (Tkalčić i sur., 2003). Druga teorija nastanka DAT je amiloidna hipoteza koja je općeprihvaćena i jedan je od mehanizama starenja, govori o tome patologija amiloid beta peptida, proizašlog iz amiloidnog prekursorskog proteina djelovanjem beta- i gama-sekretaze (patofiziološki uvjeti; inače alfa- i beta sekretaze kidaju supstrat), stvara peptide od 42 aminokiseline (A $\beta$ 42), a povišena razina tog peptida u izravnoj je korelaciji s njegovom neurotoksičnošću. Upravo takav peptid je u pozadini stvaranja nakupljenih fibrilarnih odnosno vlaknastih amiloidnih proteina, neurofibrilarnih nakupina, sinaptičke disfunkcije, neurodegeneracije i kognitivnog propadanja.. Ova bolest karakterizirana je nakupljanjem amilodina, proteina i staničnog materijala unutar i okolo stanice, a najviše se nakuplja A $\beta$ 42 peptid (Paroni G i sur., 2019; Sharma P i sur., 2019). Također, jedno od obilježja DAT je i hiperfosforilacija proteina tau (Sharma P i sur., 2019). Karakteristične degenerativne posljedice patofiziologije smanjenje acetilkolinesteraze, a povećanje butirilkolinesteraze, gubitak kolinergičnih neurona i receptora te smanjenje acetilkolina. Simptomatologija DAT obuhvaća

kontinuirano mentalno propadanje, disfunkciju ponašanja, nemogućnost obavljanja dnevnih i rutinskih aktivnosti te demencija (Kumar A, i sur., 2015; Chen XQ i sur., 2016; Sharma P i sur., 2019).

Na temelju prethodno navedene kolinergične hipoteze, u liječenju DAT, koriste se selektivni i reverzibilni inhibitori AChE koje zovemo galantamin, donepezil i rivastigmin, a u njihovom racionalnom dizajniranju i otkrivanju, za postizanje optimalne inhibicije enzima centralno, potrebno je bilo nadvladati lipofilnost KMB, odnosno postići distribuciju u moždano tkivo (Katzung BG 2020c). Glavne nuspojave su gastrointestinalne: povraćanje, mučnina i proljev te kardiovaskularne (bradikardija), a kontraindicirani su kod pacijenata s teškim promjenama u srčanom provođenju. Slike njihovih struktura prikazane su na slici 5.



Slika 5. Strukture reverzibilnih inhibitora AChE u terapiji DAT.

Donepezil je reverzibilni nekompetitivni inhibitor enzima koji se koristi kod blage DAT i dozira se jedanput navečer. Izvan indikacije, koristi se kod Lewyjeve bolesti i demencije, traumatske ozljede mozga, vaskularne demencije i demencije povezane sa Parkinsonovom bolešću. Derivat je piperidina koji djeluje centralno, brzo i reverzibilno na inhibiciju enzima, a in vitro studije pokazuju da je specifičan za AChE (Kumar A i sur., 2024). Također djeluje na smanjivanje i regulaciju „nadolje“ neuroinflamatornih puteva koji su u pozadini patofiziološke upale na način da smanjuje mikroglijalnu i astrocitnu aktivaciju, karakterističnu za DAT. Smanjujući upalne procese u moždanom staničju, donepezil pokazuje prednosti nad ostalim inhibitorima AChE (Kim J i sur., 2021).

Rivastigmin je spori, reverzibilni ili čak pseudo-ireverzibilni dualni inhibitor AChE i BChE i dostupan u peroralnim i transdermalnim formulacijama, od kojih transdermalna formulacija



osigurava kontinuirano i postepeno oslobađanje lijeka kroz 24 sata osiguravajući tako manje nuspojava. Analog je fizostigmina i svrstavamo ga u skupinu karbamata, a pokazuje selektivnost za mozak s pogodnim učincima na kogniciju, memoriju, koncentraciju i normalne dnevne aktivnosti. Ima kratko biološko poluvrijeme što u smanjuje mogućnost akumulacije (Kandiah N i sur., 2017). BChE, koja je meta Rivastigmina primarno se nalazi u glijalnim stanicama mozga i igra ulogu u kolinergičnoj povezanosti, na način da se aktivnost enzima kod demencija i kognitivnog propadanja povećava u hipokampusu i temporalnoj kori. Inhibicijom BChE, postiže se pozitivan učinak na kogniciju (Giacobini E i sur., 2002), a posebno je zanimljiva meta i za ostale subkortikalne demencije kao što je Parkinsonova bolest te vaskularna subkortikalna demencija (Erkinjuntti T i sur., 2004).

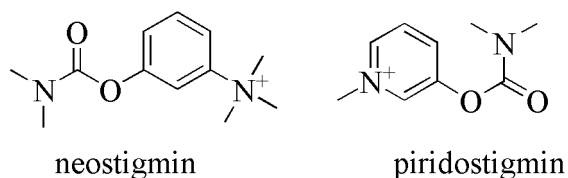
Galantamin je tercijarni prirodni alkaloid i produkt izoliran iz visibabe kao što je lat. *Galanthus nivalis*, a koristi se za blagu do srednje tešku DAT s odobrenjem FDA od 2001. godine, dok su ostale primjene izvan primarne indikacije povezane s neurodegenerativnim propadanjem kod Parkinsonove bolesti i ostalih demencija, kao što je Lewyjeva bolest (Kalola UK, Nguyen H., 2023). Kao antidot koristi se kod trovanja organofosforinim spojevima (Pereira EF i sur., 2010) te kod akutne intoksikacije skopolaminom, a koristi se i kao dodatna terapija u odvikavanju od alkohola i pušenja (Croissant B i sur., 2006). Ovaj spoj je reverzibilni, selektivni i kompetitivni inhibitor AChE (Razay G, Wilcock GK., 2008), a također je alosterički aktivator određenih vrsta nikotinskih receptora (presinaptički i postsinaptički), kao ciljne mete acetilkolina, a ovo djelovanje uzrokuje povećano ispuštanje neurotransmitora iz presinaptičkih neurona, zbog čega se smatra kolinomimetikom (Lilienfeld S., 2002). Kolinomimetsko djelovanje ostvaruje vezanjem na alosteričko vezno mjesto, čime se mijenja konformacija mete, što povećava sinaptičku razinu ACh te pojačava djelovanje susjednih serotonergičnih i glutaminičasnih neurona te upravo ovo djelovanje na ostale neurotransmitore, pripisuje se pozitivnim učincima galantamina na ponašanje kod DAT (Villarroya M i sur., 2007; Kalola UK, Nguyen H., 2023). Osim primarnih mehanizama, ima ulogu čistača reaktivnih kisikovih vrsta te antiapoptička svojstva s izraženim neuroprotektivnim djelovanjem (Lopez MG i sur., 1987). U liječenju DAT primjenjuje se peroralno, a posebno je za naglasiti formulaciju sa postepenim otpuštanjem (ER, eng. *extended release*, postepeno otpuštanje), jer se ova formulacija može uzimati jedanput ujutro, s poboljšanjem adherencije (Brodaty H i sur., 2005).

Iako su današnji lijekovi za DAT i PB uglavnom lijekovi koji djeluju na jednu metu koji mogu ostvariti samo trenutne i kratkotrajne učinke na poboljšanje simptoma, većina ih ne može

usporiti ili zaustaviti proces progresivnog propadanja i pojave moždane atrofije, a upravo ove skromne učinke uzrokuju sa dosta raznolikim nuspojavama koje ovise o primijenjenom lijeku te kao takvi često ne mogu ispuniti sve moguće potrebe kliničkih farmakologa koji nastoje liječiti bolest u samom središtu i uzroku (Bolognesi ML i sur., 2007; Mehta M i sur., 2011). Zato se u posljednjim godinama nastoji istraživati lijekove koji će, osim antikolinesteraznog, imati širi spektar učinaka na mete (eng. *Multiple disease-related targets*) koje su zaslužne za prve korake u patofiziologiji neurodegenerativnih bolesti (Wu M i sur., 2019; Cummings J i sur., 2020). Zaključno, u najnovijim studijama, nastoji se odabrati potentne antikolinesterazne lijekove trenutno na tržištu, iskoristiti njihov kostur te sve skupine koje su nužne za SAR, a koji bi mogli imati potencijal popratnih pozitivnih djelovanja ovisno o novim grupama, supstuentima ili molekularnim fragmentima koje uvodimo na kostur putem organske sinteze (Bolognesi ML i sur., 2007.; Wu M i sur., 2019).

#### 1.3.4. *Mijastenija gravis i piridostigmin.*

Mijastenija gravis (MG) je kronična, progresivna i autoimuna bolest koju karakteriziraju propadanje nikotinskih receptora s poremećenim prijenosom podražaja sa živca na mišić zbog promijenjene neuromuskularne veze ili sinapse (živčano-mišićni spoj). Počinje blažim simptomima: povremenim dvoslikama (diplopije) zbog izglednog „umora“ očnih mišića, ptozom (spuštanjem) očnih kapaka i slabostima mišića na glavi i udovima, potom napreduje pa zahvaća veći dio mišićnoga sustava uzrokujući smetnje u izgovaranju riječi, žvakanju, gutanju i ostalim radnjama koje izvode poprečno-prugasti mišići (<https://www.enciklopedija.hr/clanak/miastenija-gravis>; Katzung BG, 2020c). Uzrok propasti nikotinskih receptora je stvaranje protutijela protiv glavne imunogene regije na  $\alpha$ -1-podjedinici receptora, a time autoprotutijela uzrokuju internalizaciju receptora, sprječavaju vezanje acetilkolina i uzrokuju liziranje postsinaptičke membrane (Katzung BG, 2020c). Reverzibilni inhibitor AChE, kao što je piridostigmin, iznimno je koristan u liječenju ove bolesti jer se ona ne može liječiti običnim agonistima kolinergičnih receptora (Remijn-Nelissen L i sur., 2023).

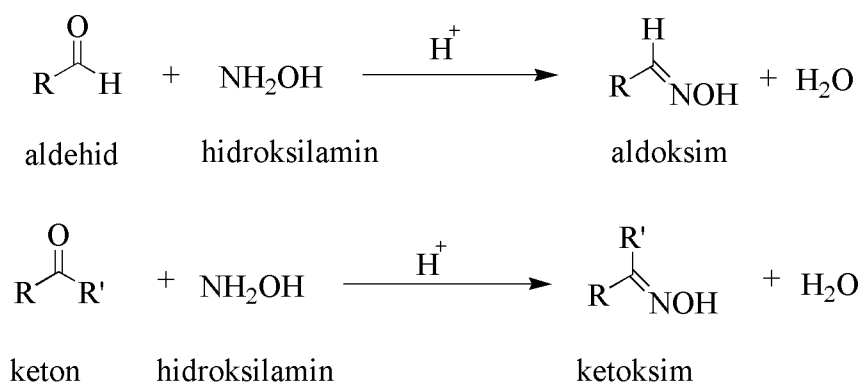


Slika 6. Strukture lijekova u terapiji MG.

Piridostigmin i neostigmin su parasimpatomimetici, lijekovi iz skupine fizostigmina kao karbamati prikazani na slici 7, koji se koriste kao lijekovi izbora za početak liječenja MG (Remijn-Nelissen L i sur., 2023), a nužni su za dugoročno liječenje miastenije gravis odnosno za kroničnu kontrolu bolesti. Ovi lijekovi imaju relativno kratko vrijeme djelovanja pa se moraju koristiti češće (svakih 6 sati piridostigmin ili svaka 4 sata neostigmin), a postoje i oblici s produljenim otpuštanjem. Ovi lijekovi spadaju u inhibitore srednje dugog djelovanja (Katzung BG, 2020c). Samo liječenje može uzrokovati muskarinske nuspojave, pa se mora kontrolirati atropinom. Kod drugih indikacija i kao moguće indikacije, piridostigmin se može koristiti kod smanjene aktivnosti mišića mokraćnog mjehura i ortostatske hipotenzije (Katzung BG, 2020d). Koristio se u Zaljevskom ratu u vojne svrhe za suzbijanje neuromuskularnog bloka kod trovanja Somanom, a može se uzimati i profilaktički u smislu stvaranja kompleksa s enzimom koji je reverzibilan i slabiji od kompleksa s organofosforinim spojevima u procesu koji zovemo preinhibicija ili predtretman (eng. *pretreatment*) (Falco CE i sur., 2000; Golomb BA, 2008). Po mehanizmu djelovanja su reverzibilni inhibitori enzima, a piridostigmin se koristi kao bromid (Falco CE i sur., 2000).

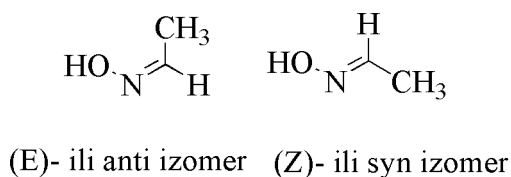
#### 1.4. Oksimska funkcijska skupina

Oksimi su organski spojevi sa funkcijska skupinom prikazanoj na slici 7, a općom formulom  $RR'C=N-OH$  te su srodni iminima ( $R_1R_2C=NR_3$ , Schiffovim bazama), a dijelimo ih na aldoksime i ketoksime jer u reakciji organske sinteze, nukleofilne adicije hidrosilamina na elektrofilni karbonilni ugljikov atom aldehida ili ketona, dolazi do nastanka veze ugljika i dušika te ih onda ovisno o nastanku nazivamo aldoksimima, koji su nastali iz aldehida i ketoksimima, koji su nastali iz ketona (Pine SH, 1994; Uyanik M, Ishihara K, 2014).



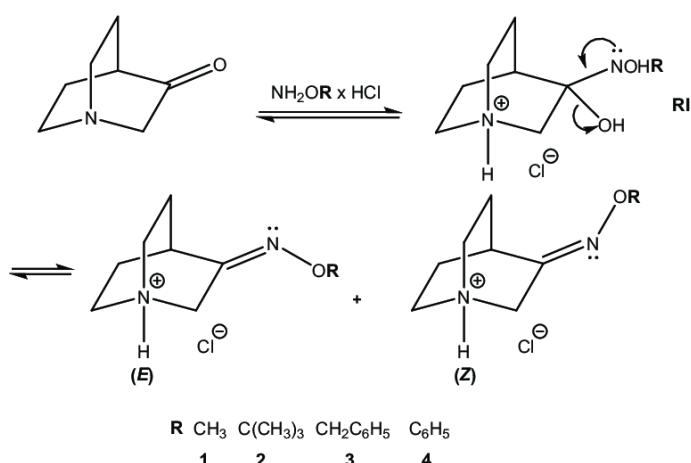
Slika 7. Sinteza aldoksima i ketoksima.

Ako se dva bočna lanca na središnjem ugljiku međusobno razlikuju kod aldoksima ili ketoksima s dvije različite "R" skupine - oksim može imati dva različita geometrijska stereoisomerna oblika prema E/Z (E – njem. *entgegen* – nasuprot, Z – njem. *zusammen*) konfiguraciji. Starija terminologija *syn* i *anti* korištena je za identifikaciju posebno aldoksima prema tome je li skupina R bila bliže ili dalje od hidroksilne skupine. Oba oblika dovoljno su stabilna te se međusobno odvajaju standardnim tehnikama. Stereoizomeri oksima prikazani su na slici 8.



Slika 8. Prikaz (E)- ili (Z)-, odnosno *anti* ili *syn* izomera aldoksima

Na slici 9, prikazan je mogući mehanizam sinteze *O*-supstituiranih kinuklidin-3-on-oksima (Spahić Z i sur., 2022).



Slika 9. Predloženi mehanizam proučavanih reakcija kod sinteze *O*-supstituiranih kinuklidin-3-on-oksima (preuzeto iz Spahić Z i sur., 2022).

#### 1.4.1. *Kemijska reaktivnost oksima. Specifične reakcije.*

Oksimi se ponašaju kao slabe kiseline i baze. Aldoksimi se mogu oksidizirati tijekom destilacije, dok ketoksimi u prisutnosti kiseline čak i u u tragovima, mogu proći egzotermnu preraspodjelu kataliziranu kiselinom koja se naziva Beckmannova pregradnja. Produkt pregradnje je stabilan amid (Bailey PD i sur., 2004). Hidroliza oksima lako se odvija zagrijavanjem u prisutnosti različitih anorganskih kiselina, a oksimi se razgrađuju u

odgovarajuće ketone ili aldehide i hidroksilamine. Oksimi se mogu razgraditi zagrijavanjem (Maruoka K, Yamamoto H, 1991).

#### **1.4.2. Biološka aktivnost oksima**

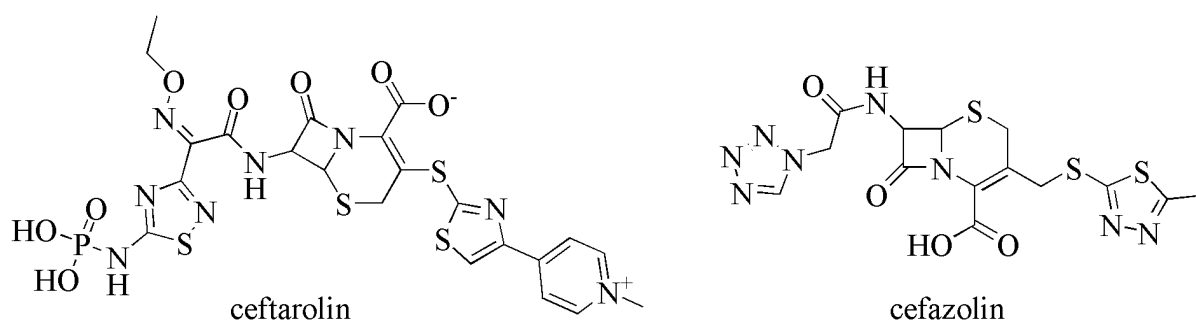
Oksimsku funkcijsku skupinu zatičemo u organskim kemijskim spojevima široke farmaceutske primjene (Pauwels B i sur., 2015; Dhuguru i sur., 2022.; Yilmaz i sur., 2023.). Često se nalazi u središtu toksikoloških proučavanja i razmatranja kao kod antidota pri trovanju s organofosforim spojevima (Plavšić F, Žuntar I, 2006), a sve zbog njihove aktivnosti prema enzimu acetilkolinesterazi (Chambers JE i sur., 2020). Također, spojevi sa kinuklidinskim prstenom i oksimskom funkcijskom skupinom pokazali su visok potencijal te širok spektar antimikrobne aktivnosti protiv rezistentnih patogena kao što je mikroorganizam *Pseudomonas aeruginosa* (Radman Kastelic A i sur., 2019).

Govoreći o interakcijama s biološkim metama i receptorima, oksimska skupina može se ponašati kao donor vodikove veze (OH skupina) ili kao akceptor vodikove veze (atomi dušika i kisika), što ima drastično veći utjecaj na jačinu biološke aktivnosti u usporedbi s karbonilnom funkcionalnom skupinom (Aakeröy, CB i sur., 2013).

#### **1.4.3. Farmaceutska primjena oksima. Pozadina antidotske terapije oksimima.**

U farmaceutskoj industriji, oksimi se istražuju kao inovativni agensi s antibakterijskim, antifungalnim, protuupalnim, antioksidativnim, pa čak i protutumorskim djelovanjima (Dhuguru i sur. 2022.). Kao antimikrobni lijekovi i antibiotici posebno su u središtu istraživanja kod skupine antibiotika cefalosporina kao što su cefuroksim (2. generacija cefalosporina) indiciran kod akutnoga bronhitisa i infekcija gornjega dišnog sustava (Kosmalski T i sur., 2023.) te posljednje generacije cefalosporina npr. ceftarolina (Bui T i sur., 2024; <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=18170>), a struktura nekih cefalosporina prikazana je na slici 10. Oksimska skupina, dugo je poznata i kod  $\beta$ -laktamskih antibiotika (monobaktami, nokardicin A) kao jedan od ključnih razloga povećanja antimikrobne aktivnosti tako da doprinosi stabilnosti  $\beta$ -laktamskog prstena na  $\beta$ -laktamazu određenih bakterija (Kojo H i sur., 1988). Oksimsku skupinu nalazimo još kod lijekova fluvoksamina s antidepresivnim djelovanjem s biološkom metom serotoninskog transportera postsinaptički, ali i oksikonazola s antifungalnim djelovanjem (Kosmalski T i sur., 2023.) s metom lanosterol 14- $\alpha$ -demetilaze (inhibicija sinteze ergosterola). Osim toga, oksimske skupine koriste se kao poveznice i u lijekovima za liječenje neuroloških poremećaja kao što je multipla skleroza, a kao primjer u literaturi naveden je siponimod, kod kojeg upravo zamjena *n*-oktilnog dijela molekule

fangolimoda, njegovog prethodnika, s benziloksi-oksimskom skupinom povećava rigidnost molekule i smanjuje selektivnost prema sfingozin-1-fosfat receptoru 3, smanjujući mu tako nuspojave (Kihara Y, Chun J, 2023; Vališ i sur., 2023). Međutim, čini se da siponimod ima specifičniju i selektivniju aktivnost od fangolimoda u CNS-u, barem u staničnim kulturama i životinjskim modelima. Djelujući na sfingozin-1-fosfat receptor 1 uzrokuje protuupalno djelovanje u akutnim i aktivnim fazama multiple skleroze (Achiron A i sur., 2023).



Slika 10. Cefalosporinski lijekovi s oksimskom skupinom.

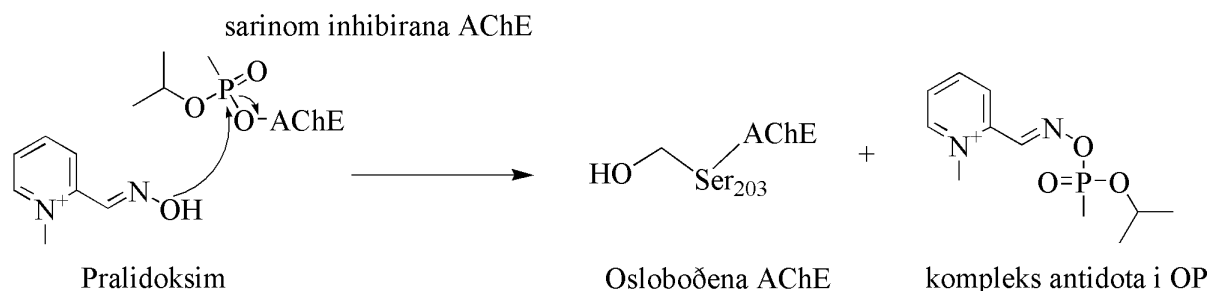
Lijekovi pete generacije cefalosporina.

Osim toga, oksimski ostaci koriste se kao poveznice i u lijekovima za liječenje neuroloških poremećaja kao što je multipla skleroza, a kao primjer u literaturi naveden je siponimod, kod kojeg upravo zamjena n-oktilnog dijela molekule fangolimoda, njegovog prethodnika, sa benziloksi-oksimskim ostatkom povećava rigidnost molekule i smanjuje selektivnost prema sfingozin-1-fosfat receptoru 3, smanjujući mu tako nuspojave (Kihara Y, Chun J, 2023; Achiron A i sur. 2023). Međutim, čini se da siponimod ima specifičniju i selektivniju aktivnost od fangolimoda u CNS-u, barem u staničnim kulturama i životinjskim modelima. Djelujući na sfingozin-1-fosfat receptor 1 uzrokuje protuupalno djelovanje u akutnim i aktivnim fazama multiple skleroze (Achiron A i sur. 2023).

#### 1.4.4. Aktivnost oksima prema kolinesterazama. Farmakološki značaj antagonizma organofosfornih spojeva pralidoksimom.

Pojedini oksimi, zbog svoje aktivnosti prema enzimu AChE, pojavljuju se u literaturi i kao nukleofilni reaktivatori kod otrovnih organofosfornih živčanih agensa (Kovarik Z, Zobraz T, 2022). Organofosforni spojevi se dijele na insekticide, pesticide, bojne otrove i karbamate. To su kemijski spojevi nastali postupkom esterifikacije koji uključuju fosfornu kiselinu i alkohol. Unutar ljudskog organizma, organofosforni spojevi djeluju kao ireverzibilni inhibitori enzima AChE, što dovodi do viška neurotransmitera acetilkolina. Ovaj višak ACh u tijelu dovodi do manifestacije simptoma povezanih s kolinergičnim sindromom (Adeyinka A i sur., 2023).

Reaktivatori acetilkolinesteraze uključuju oksime kao što su: pralidoksim (PAM), diacetilmonoksim (DAM), obidoksim i drugi, a struktura PAM prikazana je na slici 11. Kako organofosforni spojevi uzrokuju fosforilaciju OH-skupine serina u aktivnom mjestu enzima, kovalentno se vežu za aktivno mjesto. Oksimska skupina (=NOH) ima vrlo visok afinitet za atom fosfora s kojim se natječe za vezanje na OH serina. Ovi oksimi mogu defosforilirati i reaktivirati inhibirani enzim iz kompleksa organofosforni spoj-kolinesteraza, ako kompleks nije „ostario“ (Kassa J, 2002; Katzung BG, 2020d). Pralidoksim je glavni lijek koji se preporuča i najučinkovitiji je u reaktivaciji kolinesteraze u živčano-mišićnim spojinicama skeletnoga mišićja. Nabijenost pralidoksima kao inhibitora acetilkolinesteraze njegov nedostatak, budući da ne može uzrokovati inhibiciju u SŽS, jer mu naboj smeta transportu kroz KMB, kao glavnu barijeru između periferne krvi i središnjeg živčanog sustava. Zbog toga je dizajniran Pro-2-PAM, koji, budući da je lipoilan tercijarni amin, lako prolazi lipidnu barijeru kao što je KMB, biotransformacijom se oksidira u PAM u moždanom tkivu te uzrokuje povrat antikolinergične aktivnosti u SŽS (Patrick GL, 2001b; Demar JC i sur., 2011).



Slika 11. Nukleofilni napad oksimskog kisika pralidoksima i oslobađanje „neostarjele“ AChE.

Mehanizam djelovanja pralidoksima temelji se na djelovanju lijeka kao jačeg nukleofila od vode koja napadom na atom fosfora, kida stabilni organofosforni adukt kovalentno vezan na serin 203. Zbog toga je pralidoksim jedan od ranih primjera racionalnog dizajniranja lijeka jer je njegov razvoj počeo od samog hidroksilamina za koji je otkriveno da hidrolizira organofosforne spojeve, ali je on bio pretoksičan za humanu uporabu. Upravo je činjenica da organofosforni spojevi ne zauzimaju čitavo aktivno mjesto, pogotovo anionsko vezno mjesto, omogućilo razvitak pralidoksima koji se sa svojim metiliranim piridinskim dušikom, pozitivno nabijenim, veže na anionsko vezivno mjesto. Nukleofilna skupina, stavljena je u *ortho* položaj piridinskog prstena, budući da je na tom mjestu najbliže za napad na fosfoesterski adukt (Patrick GL, 2001b).

Ranije se smatralo da je pralidoksim više ili manje neučinkovit nakon 24 do 48 sati izlaganja. Razlog tome je fenomen starenja enzima objašnjen prethodno. Danas postoje stabilni kitovi, autoinjektori pralidoksima s atropinom (Abbara C i sur., 2019) i diazepamom za sinergistički učinak, a nova otkrića infuzijskih mikropumpi za dostavu pralidoksima sistemski, obećavaju veću bioraspoloživost od tradicionalnih puteva primjene (Liu HX i sur., 2015). Pralidoksim nema poznatih štetnih interakcija s lijekovima. Postoje pozitivni dokazi koji ukazuju na njegov sinergizam kada se primjenjuje zajedno s atropinom. S jedne strane, pralidoksim je otkriven u plazmi ranije i u višim koncentracijama kada se daje zajedno s atropinom i avizafonom. S druge strane, znakovi atropinizacije također su se pojavili ranije nego što se očekivalo kada se daju sami. Ova sinergija je razlog za uključivanje ovih lijekova zajedno u auto-injektor (Namba T i sur., 1971; Abbara C i sur., 2010).

Atropin je alkaloid biljaka porodica pomoćnice, lat. *Solanaceae*: smrtonosno velebilje (lat. *Atropa belladonna*), kužnjak (lat. *Datura stramonium*) i crna bunika (lat. *Hyoscyamus niger*), te on i njegovi derivati i srodnici (npr. skopolamin), nazočni u prirodi, tercijarni su aminski alkaloidni esteri tropske kiseline. Kao takvi, djeluju kao antimuskarinici (izravni parasimpatomimetik atropinske skupine) izazivajući antikolinergični sindrom, dok se u ovom kontekstu farmakološki nadopunjuju s pralidoksimom i piridostigminom (Abbara C i sur., 2019).

Piridostigmin je lijek korišten kod inkontinencije i mijastenije gravis, a inhibitor je acetilkolinesteraze (posredni parasimpatomimetik karbamatske skupine). Njegova primjena kao predtretmana reverzibilnim inhibitorima rezervirana je za situacije u kojima se predviđa letalni ishod akutnog trovanja bojnim otrovima. Također, iz toksikološkog aspekta, potrebna je pravodobna, kontrolirana i precizna primjena piridostigmina kako suvišak kolinergičnih učinaka ne bi rezultirao kolinergičnim sindromom (Fulco CE i sur., 2000).

Zaključno, osim pralidoksima, kod trovanja organofosfornim spojevima, potrebno je znati kompletnu patofiziološku pozadinu procesa trovanja, kao i toksikologiju otrova, farmakodinamička te farmakokinetička svojstva sinergista kao što su atropin i piridostigmin. U tu svrhu atropin, koji se daje s pralidoksimom tada djeluje izravno na muskarinske receptore antimuskarinski, reverzibilnom blokadom kolinomimetičkih učinaka (Katzung BG, 2020d).

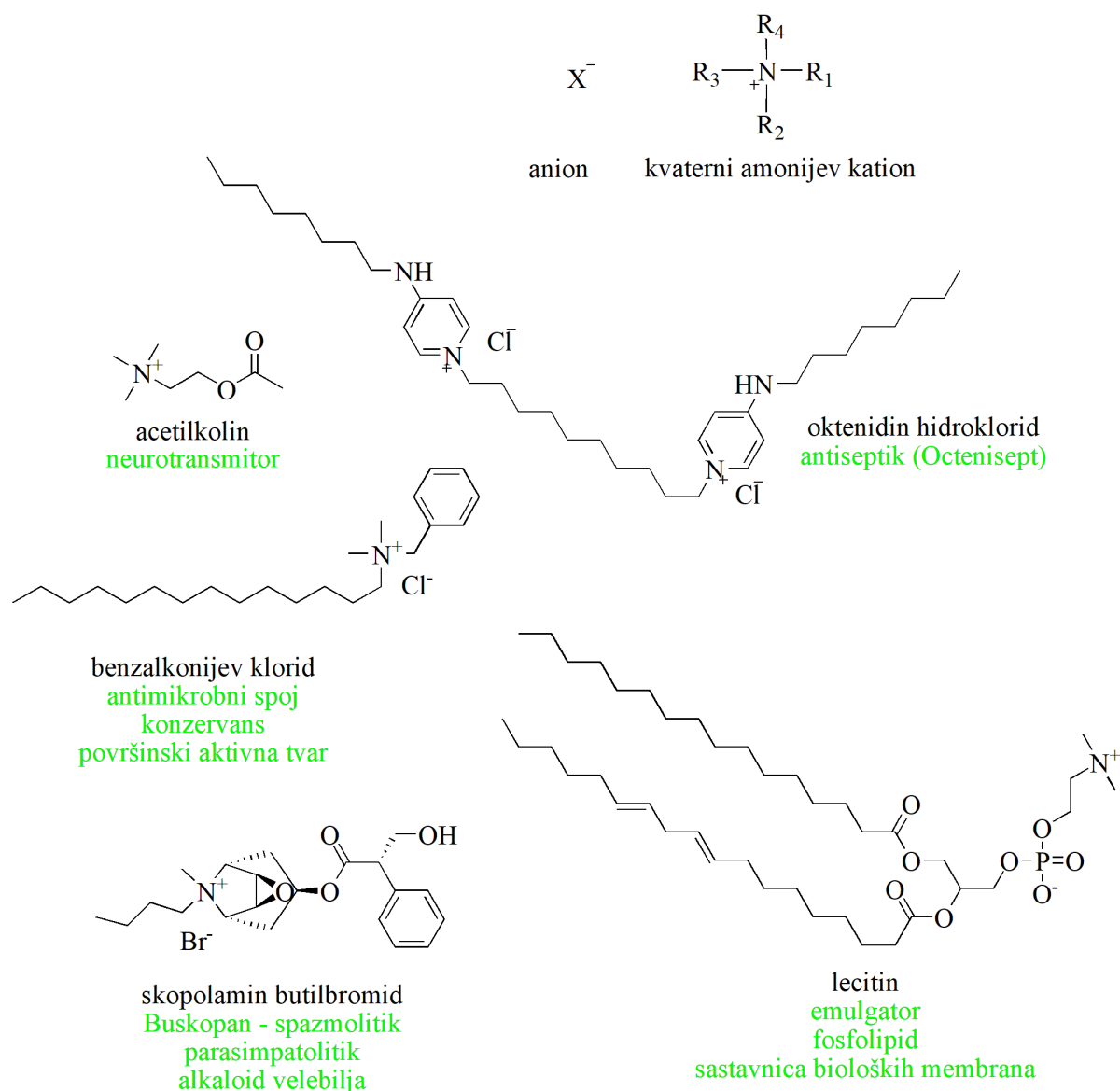
## **1.5. Kvaterni amonijev kation. Kvaterne amonijeve soli i spojevi**

Kvaterni amonijevi spojevi su spojevi pozitivno nabijenih dušikovih kationa i negativno nabijenih aniona koje zajedno formiraju kvatenu amonijevu sol. Kvaterni amonijev ion je



kation i opća formula soli prikazana je na slici 12, ima četiri alkilne ili arilne skupine. Za razliku od tercijarnih amina ili tercijarnih amonijevih kationa, ovi su kationi pozitivno nabijeni neovisno o pH sustava ili fiziološke tekućine što im je jedno od negativnih svojstava, u kontekstu farmakokinetike, pogotovo apsorpcije kroz lipofilne biološke membrane i distribucije u pojedine organske sustave iz središnjeg odjeljka, gdje se za primjer navodi pralidoksim i nužnost stvaranja prolijeka za izazivanje centralne inhibicije (Patrick GL, 2001b; Demar JC i sur., 2011).

Govoreći o njihovoj funkciji i primjeni u različitim područjima djelovanja, kvaterne amonijeve soli nalazimo kao antimikrobne agense te antiseptike (npr. Cetilpiridinijev klorid, oktenidin klorid kao aktivna tvar *Octenisepta*®) i dezinficijense, surfaktante ili površinski aktivne tvari, konzervanse (npr. benzalkonij klorid, cetrimonij klorid ili bromid), antistatičke agense, ali i omekšivače u tekstilnoj industriji te regeneratore u kozmetici (Arnold WA i sur., 2023). Dezinficijensi i sredstva za čišćenje obično imaju kraće alkilne lance C9 do C16, što se razlikuje od onih proizvoda za čišćenje koji se koriste za osobnu uporabu i imaju 22 ugljikova atoma, a upravo se primjena antiseptika iznimno povećala od prethodne COVID-19 pandemije (Bolto B i sur., 1998; Marteinson SC i sur., 2023). Nadovezujući se na antimikrobnu djelotvornost, prekomjerna uporaba benzalkonij klorida kao dezinficijensa dovela je do rastućih antimikrobnih rezistencija i tolerancije na antiseptik, npr. kod Gram(-) negativnih oportunističkih patogena te kod spora Gram(-)negativnih i Gram(+)pozitivnih bakterija (Chaplin CCE, 1952; Buffet-Bataillon S. i sur., 2012; Hu J i sur., 2019). Mehanizam djelovanja kvaternih amonijevih antiseptika je razgradnja otapanje stanične membrane mikroorganizma i inaktiviranje citoplazmatskih enzima (Mohapatra S. i sur., 2023).



Slika 12. Opća formula kvaternih amonijevih soli. Primjeri kvaternih soli i spojeva.

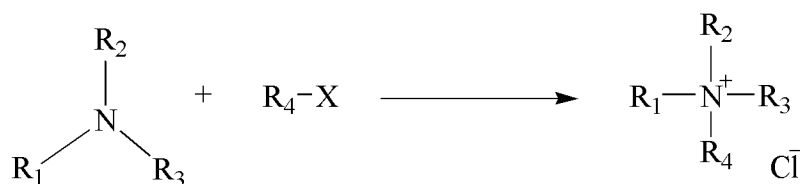
U prirodi se kvaterne amonijeve soli kao što su flicin, betain, kolin i karnitin te trigonelin mogu naći u biološkim organizmima. Imaju brojne funkcije u organizmima, kao osmoliti, prekursori neurotransmitera i glavni građevni elementi bioloških membrana tvoreći fosfolipide, od kojih je najpoznatiji lecitin (Jeremy MB i sur., 2013).

### 1.5.1. Sinteza kvaternih amonijevih soli i Menshutkinova reakcija

Kvaterni amonijevi spojevi sintetiziraju se alkilacijom tercijanog amina, a također je široko poznata reakcija kvaternizacije, u starijoj literaturi poznata i kao Menshutkinova reakcija u kojoj su reaktanti neutralni, a produkti dva suprotno nabijena iona koja formiraju sol. Osim

kvaternizacije alkilacijom, poznate su i kvaternizacije amina alkil-halogenidima ([https://en.wikipedia.org/wiki/Menshutkin\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Menshutkin_reaction)).

Menshutkinova reakcija nazvana je po Nikolaju Menshutkinu (Николай Александрович Меншуткин, 1842–1907) koji je opisao proces u 1880-toj godini, a u organskoj kemiji se opisuje kao reakcija izbora u prevođenju tercijanih amina u kvaterne amonijeve soli u reakciji s alkil-halogenidom. Reakcija se najčešće provodi u organskim otapalima kao što su alkoholi (etanol, metanol) (Deleuze, MS; Leigh, DA, 1999). Alkilirajući agensi koji se u ovoj reakciji koriste su prema padajućoj reaktivnosti i superiornosti jodidi, bromidi i kloridi. Mehanizam reakcije je tipična supstitucija  $S_N2$  mehanizma, u kojoj je atom dušika nukleofil i kao takav napada elektrofilni ugljikov atom direktno povezan s halogenom (Smith MB, March J, 2001; Giri S i sur., 2014). Ograničenje ove reakcije je da se klorirana otapala, kao što su diklormetan ili dikloretan ne smiju koristiti zbog moguće neželjene reakcije s tercijarnim aminom, dok se kloroform može koristiti jer zbog steričkih smetnji i neželjenih elektronskih svojstava sporo reagira s tercijarnim aminima (Hansen SH, Nordholm L, 1981). Mehanizam reakcije pripreve kvaternih amonijevih soli ili Menshutkinova reakcija, prikazana je na slici 13.



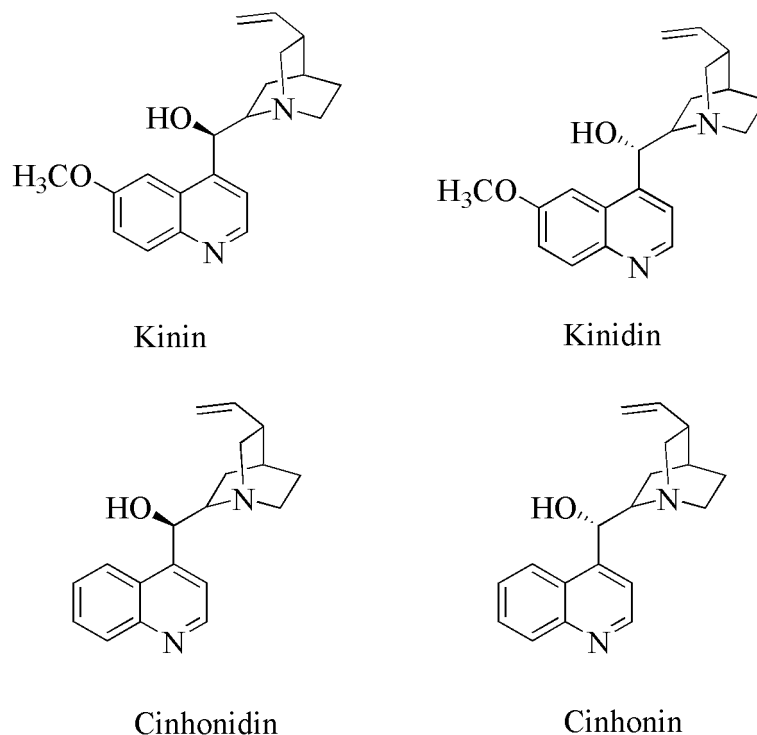
Slika 13. Menshutkinova reakcija.  $S_N2$  mehanizam.

### 1.6. *Cinchona* alkaloidi, struktura. Antimalarici. Kinolinski i kinuklidinski prsten. Biokemijska svojstva i primjena kinuklidinskih spojeva.

Kinuklidinski alkaloidi ili *Cinchona* alkaloidi bazični su spojevi izolirani iz kore drveta i grmova roda lat. *Cinchona*, biljaka kininovca autohtonih za područje Bolivije, Ekvadora i Perua, a koji imaju veliki medicinski značaj, primarno kao prvi antimalarici, te sintetički i katalitički značaj u organskoj kemiji, ali i u prehrambenoj industriji koji daju gorak alkoholnim pićima, pa se prema tome na ovim područjima zasniva njihova primjena (Chandra Bharadway K i sur., 2018; Boratyński PJ i sur., 2019).

U *Cinchona* alkaloidima ubrajamo kinin, važan antihelmintik, kinidin, specifičan za liječenje određenih aritmija, cinchonin te cinchonidin te njihove 10,11-dihidro derivate, a svi se oni u biljkama stvaraju kao diastereomeri, koji se u industriji izoliraju (Boratyński PJ i sur., 2019).

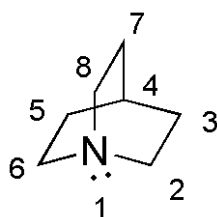
Gledajući stereokemiju *Cinchona* alkaloida, svi spojevi dio su tzv. kiralnog bazena, tj. lako dostupnih prirodnih kiralnih spojeva. Iznimna karakteristika *Cinchona* alkaloida je dostupnost više stereoizomera. U posljednjih nekoliko desetljeća, najveći interes za ove spojeve bio je vezan uz njihovu primjenu u stereoselektivnoj sintezi i separaciji enantiomera. Govoreći o strukturi, prikazanoj na slici 14, prisutni su aromatski kinolinski (ili 6-metoksikinolinski), biciklički kinuklidinski prsten s vinilnim supstituentom te središnja hidroksilna skupina na položaju devet.



Slika 14. Struktura i stereokemija izoliranih i prirodnih *Cinchona* alkaloida iz vrsta roda lat. *Cinchona*.

Kinolin je heterociklički aromatski organski spoj s kemijskom formulom  $C_9H_7N$ , a brojni kinolinski alkaloidi izolirani su i identificirani iz prirodnih izvora. Mnoga su istraživanja dokumentirala njihova antitumorska, antimalarijska (Wiesner J i sur., 2003), antibakterijska, antifungalna, antiparazitska i insekticidna, antivirusna, protuupalna, antitrombocitna i druga djelovanja (Anjali PD, Singh D, 2016), a danas su primarno zastupljeni u medicini i poljoprivredi. Nadalje, cinchonini i cinchonidini, kvaternizirani s kemijskim skupinama različitih veličina, pokazali su antikolinesterazna svojstva i djelovanja, što je ukazalo na mogućnost njihove uporabe kao reverzibilnih inhibitora ljudske AChE (Bosak A i sur., 2018).

Malarija je najsmrtonosnija humana parazitska infekcija, a prema izvješću svjetske zdravstvene organizacije za 2015., 292 000 afričke djece mlađe od pet godina pogođeno je i umrlo od malarije, a bolest je uzrokovala približno i 300 000 smrtnih slučajeva diljem svijeta u istoj dobnoj skupini (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565158>). Uzročnik malarije su paraziti roda *Plazmodij* (lat. *Plasmodium*) od kojih su najznačajniji *P. falciparum* i *P. vivax* i to u kontekstu uzrokovanja više od 95 % slučajeva malarije na svjetskoj razini (Mishra M i sur., 2017). Od antimalarika, najznačajniji je kinin, koji se zbog parenteralne primjene, niske cijene i velike učinkovitosti protiv *P. falciparum*, naširoko koristi za terapiju malarije. U 2006. ga je WHO prestala preporučivati za prvu liniju liječenja zbog sve veće pojave rezistencije te visoke toksičnosti.



Slika 15. Kinuklidinski prsten i numeracija.

Kinuklidinski prsten (slika 15) definira se kao osmeročlani biciklički prsten 1-azabicyclo[2.2.2]oktan, a temeljno je biciklički amin s dušikom (Favre HA, Powell WH, 2014; Consalvo D, Stahl W, 1998) koji je dobio ime upravo po kininu i biljci kininovcu. Ovaj je prsten zasićeni biciklički spoj, simetrične i rigidne, fiksirane strukture, za razliku od alifatskih i tercijarnih amina te *N*-supstituiranih piperidina. Atomi koji čine kinuklidinski prsten ne mogu mijenjati svoje relativne položaje rotirajući oko svojih jednostrukih kovalentnih veza, koje su uključene u biciklički sustav gdje svaki prsten ima oblik "čamca", odnosno konformaciju izvijene kolijevke (Yakhontov LN, 1969; Blackstock i sur., 1987).

U usporedbi s drugim 1-azabicykloalkanima, kinuklidin karakterizira visoka simetrija i samo mala napetost u cikličkom sustavu. Dušikov atom, zarobljen u prstenu ima klasičnu  $sp^3$  hibridizaciju. Bazičnost kinuklidina, koja ovisi o elektronskoj gustoći oko dušikovog atoma, relativno je visoka i bliža nižim alifatskim aminima i *N*-alkilpiperidinima. U usporedbi s kinuklidinom, bazičnost kondenziranih sustava benzo- i dibenzokinuklidina smanjena je zbog induktivnog učinka fenilnih skupina (Arnett EM, Wu CJ, 1959). Ispitana je reaktivnost različitih katalizatora na bazi kinuklidina u Baylis-Hillmanovoj reakciji, te je utvrđena izravna korelacija između bazičnosti baze i reaktivnosti, bez iznimke. Slijedeći redoslijed reaktivnosti utvrđen je  $pK_{(a)}$  konjugiranih kiselina (mjerениh u vodi) danih u zagradama: kinuklidin (11,3),

3-hidroksikinuklidin (9,9), 1,4-diazabiciklo[2.2.2.]oktan (8,7), 3-acetoksikinuklidin (9,3), 3-klorkinuklidin (8,9) i 3-oksokinuklidin (7,2) (Aggarwal VK i sur., 2003). Navedeni supstituirani derivati kinuklidinskog prstena manje su bazični, što vidimo prema opadanju vrijednosti  $pK_{(a)}$ , a ovaj je fenomen posljedica induktivnog efekta uvođenja supstituenata koji odvlače elektrone na prstenu. Kao i ostale relativno jake baze i njemu srodni tercijarni amini, reagira s brojnim Lewisovim kiselima. Također, kinuklidinski prsten, kao i ostali amini, može sudjelovati u  $S_N2$  reakcijama, pa i Menshutkinovoj reakciji opisanoj prethodno, pri čemu se stvaraju kvaterne amonijeve soli.

Derivati kinuklidina, kinuklidin-3-oli i njihovi esteri, prema dosadašnjim istraživanjima, mogu se smatrati bicikličkim analogima acetilkolina, što objašnjava njihovo svojstvo i mogućnost da su u interakciji s metama kolinergičnog sustava. Neki kinuklidin-3-ol oksimi pokazali su djelovanje kao antidoti pri organofosforom trovanju, što je potvrđeno kasnijim istraživanjima na miševima (kod otrovanja bojnim otrovom somanom), kao što su derivati 3-oksokinuklidinija (Simeon-Rudolf V i sur., 1998) te kinuklidinijevi oksimi koji sadržavaju biskvaterni piridinijev prsten (Lučić A i sur., 1997). Zaštitni učinak kinuklidinskih spojeva kod trovanja somanom dugo je poznat i utvrđen je kod kinuklidinijevih oksima te karbamata kao što su karbamoil-*N*-alilkinuklidinijev bromid (Sterling GH i sur., 1993) i karbamoilpiridinijev eter (Lučić A i sur., 1997).

Nadalje, pokazano je da uporaba visokoučinkovitih bioloških čistila (eng. *bioscavengers*) ima visoki potencijal u antagonizmu djelovanja organofosforim spojevima i da djeluje na područja koja su daleko šira od razine kolinesteraze (Zandona A i sur., 2020). Najnovija istraživanja pokazala su kako upravo spojevi koji se temelje na monokvaternim oksimima kinuklidina u kombinaciji s BChE, imaju potencijala za djelovanje kao biološka čistila kod trovanja ciklosarinom kao bojnim otrovom (Zandona A i sur., 2020).

Kvaternizirani derivati kinuklidina (Bosak A i sur., 2005), a i njihovi konjugati s imidazolijem i piridinijem pokazali su aktivnost prema enzimu AChE, djelujući kao reverzibilni inhibitori (Simeon-Rudolf V i sur., 1998; Reiner E i sur., 1999), a dva karbamata temeljena na kinuklidiniju su se pokazali kao slabi progresivni inhibitori AChE (slabi karbamoilirajući agensi AChE) (Reiner E i sur., 1999). Sintetizirani su i brojni karbamati kinuklidina koji su se pokazali kao potentni dvojni inhibitori što AChE, što BChE djelujući upravo na serin u aktivnom mjestu enzima, a daljnja istraživanja njihovog pasivnog transporta kroz KMB pokazalo je da nekvaternizirani i kvaternizirani fenilkarbamati mogu proći KMB i djelovati u središnjem živčanom sustavu (Matošević A i sur., 2021).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Terapijski, industrijski te biokemijski potencijal derivata kinuklidina i kvaternih amonijevih kinuklidinskih spojeva opsežan je i širok. Iz tog razloga, a također iz perspektive sve veće potrebe za ciljanom, specifičnom i selektivnom inhibicijom enzima AChE. S druge strane, pogotovo kod sve više prisutnih incidencija, frekvencija i prevalencija demencije, nužno je istraživati lijekove i s aktivnošću prema mjestima u samom ždrijelu enzima, a koji će dodatno ciljati procese šire od AChE ili BChE kao na primjer: neurodegeneraciju, neuralnu upalu i prekomjernu aktivaciju glija stanica te poremećene kolinergične biomarkere. Postoji potreba usmjerenije i brže antidotske aktivnosti kvaterniziranih heterocikličkih oksima kod trovanja organofosforim spojevima. Inhibitori kolinesteraza stoga imaju primjenu kao predtretman u zaštiti od trovanja organofosforim spojevima.

Cilj ovog rada je sintetizirati *O*-benzilni eter kinuklidin-3-on-oksima reakcijom nukleofilne adicije, te ga iskoristiti kao ishodišni spoj za reakcije kvaternizacije tercijarnog dušikovog atoma mehanizmom  $S_N2$  supstitucije (Menshutkinova reakcija) s različito supstituiranim benzil-bromidima. Sintetizirani spojevi potencijalno su antikolinesterazni agensi, te će se odrediti njihova inhibitorna aktivnost prema enzimu butirilkolinesterazi. Budući da je iz literature poznato da spojevi koji nose pozitivan naboj na jednom dijelu (kvaterni dušikov atom), a oksimsku skupinu na položaju tri kinuklidinskoga prstena, imaju sklonost ka vezanju u aktivno mjesto enzima, na taj način će se proširiti baza podataka vezana za područje antikolinesteraznih spojeva. Budući da su AChE i BChE po mnogo svojstva analogne, a i homologne strukture u velikom postotku, reakcije inhibicije BChE indiciraju mogućnost sličnih (jačih ili slabijih) interakcija inhibitora i s AChE.

Pripravljen je niz od devet spojeva od kojih osam do sada nisu opisani u literaturi, karakterizirana je spektroskopskim metodama nuklearne magnetske rezonancije, infracrvene spektroskopije i spektrometrije masa s ciljem primarne i temeljne identifikacije i potvrđivanja funkcijskih skupina te strukture.

Uporabom Ellmanove metode (Ellman GL i sur., 1961.) kao kolorimetrijske biokemijske metoda indirektnog određivanja aktivnosti enzima BChE iz konjskog seruma (EC 3.1.1.8), ispitan je inhibitorni potencijal novosintetiziranih spojeva, koji je izražen kao  $IC_{50}$ , odnosno koncentracija potrebna da se aktivnost enzima ili biološke mete smanji za pola u *in vitro* uvjetima.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Reagensi, standardi, spektroskopija i određivanje tališta za karakterizaciju spojeva

Kemikalije i reagensi, korišteni u sintezi kvaternih derivata kinuklidina, bili su analitičke čistoće te su u nastavku navedeni abecednim redom: benzil-bromid (98 %, Sigma Aldrich, Njemačka), *O*-benzilhidroksilamin-hidroklorid (99 %, BLD Pharm, Kina), 4-*tert*-butilbenzil-bromid (98 %, BLD Pharm, Kina), 3,5-di-*tert*-butilbenzil-bromid (98 %, BLD Pharm, Kina), 3,4-di-fluorbenzil-bromid (98 %, Sigma Aldrich, Njemačka), 3,5-di-fluorbenzil-bromid (98 %, Sigma Aldrich, Njemačka), kinuklidin-3-on hidroklorid (99 %, Sigma Aldrich, Njemačka), 3,4-diklorbenzil-bromid (98 %, BLD Pharm, Kina), 2-klor-6-fluorbenzil-bromid (96 %, Sigma Aldrich, Njemačka), 4-(trifluometil)benzil-bromid (98 %, Sigma Aldrich, Njemačka), 4-(trifluormetoksi)benzil-bromid (98 %, Sigma Aldrich, Njemačka).

Praćen je i tijek reakcije, odnosno nastajanje produkata, a nestajanje reaktanata putem tankoslojne kromatografije (TLC), a kromatografija je provedena na aluminijskim pločicama silikagela (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>), kao stacionarna faza. Kao mobilna faza ili eluens, koristio se sustav otapala kloroform:metanol=9:1. Detekcija spojeva na kromatografskoj pločici provedena je vizualno, pomoću UV lampe i reverzibilnom adicijom joda, jer ovi spojevi adicijom joda daju obojene produkte.

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR, eng. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) snimljeni su pri 400 MHz za <sup>1</sup>H NMR te 100 MHz za <sup>13</sup>C NMR na spektrometru Bruket Avance II HD Ascend, a kao otapalo se koristio deuterirani metanol. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u dijelovima na milijun (ppm, eng. parts per million), a sve u odnosu na unutarjni standard tetrametilsilan (TMS). Dobiveni signali obilježeni su kao s = singlet, d = dublet, dd = dublet dubleta, t = triplet, q = kvartet, quin = kvintet i m = multiplet, dok su konstante sprege (*J*) prikazane u Herzima. Obilježeni su i atomi kinuklidina, prema IUPAC-ovom pravilu numeriranja organskih spojeva. Apostrofom su označeni atomi benzenskog prstena *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima, a zvjezdicom su označeni atomi benzenskog prstena kvaternih derivata.

Spektri infracrvene spektroskopije (IR, eng. *Infrared spectroscopy*) s Fourierovom transformacijom (FT-IR) snimljeni su pomoću spektrometra FT-IR Perkin-Elmer spectrum



Two, a korištena metoda je spektroskopija prigušene potpune refleksije (eng. ATR, Attenuated Total Reflection). Snimanje je provedeno u području od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Spektrometrija masa, koristila se za potvrđivanje strukture sintetiziranih spojeva, pomoću sustava nanoUHPLC-MS/MS ThermoScientificQEactive Plus.

Za karakterizaciju krutina određeno je talište. Korišten uređaj je bio Büchi Melting Point B-540 u otvorenim kapilarama. Vrijednosti nisu korigirane.

### **3.2. Priprava *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima. Reakcija nukleofilne adicije. Sinteza spoja 1.**

U okruglu tikvicu (25 mL) doda se kinuklidin-3-on hidroklorid (0,500 g, 3,10 mmol) i *O*-benzilhidroksilamin hidroklorid (0,540 g, 3,38 mmol) te apsolutni, bezvodni etanol (15 mL). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj miješalici pri 350 rpm te grije u uljnoj kupelji pri 85 C uz refluks (povratno hladilo uz klorkalcijevu cijevčicu). Napredak reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom u sustavu otapala kloroform: metanol=9:1. Smjesa se zagrijava uz povrat 24 sata te se zatim otapalo upari na rotacijskom uparivaču uz snižen tlak. U tikvicu se zatim doda 1 ml vode i postepeno, uz miješanje, zasićena otopina natrijevog dok otopina ne postane lužnata (pH~11). Zatim se provede ekstrakcija s kloroformom (3 puta po 10 mL) te se organski sloj suši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Otopina se profiltrira preko vate i otapalo se upari do suha na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiveni sirovi produkt pročisti se kromatografijom na stupcu u kojoj je stacionarna faza silikagel, a kao eluens korišten je prethodno navedeni sustav otapala. Dobiven je čisti uljasti blijedožućkasti spoj **1** (0,520 g, 73,22 %).

### **3.3. Priprava kvaternih derivata *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on oksima 2 – 9**

#### **3.3.1. Sinteza *N*-benzil-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (2)**

Spoj **1** (0,10 g, 0,40, mmol), otopi se u suhom acetonu (1,5 mL) u okrugloj tikvici volumena 10 mL. Dodaje se dokapavanjem drugi reaktant, benzil bromid (65  $\mu\text{L}$ , 0,53 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici na 420 rpm pri sobnoj temperaturi, a tijek reakcije, praćen je pomoću TLC-a. Nakon 24 sata dobiveni talog se profiltrira uz vakuum, ispire hladnim acetonom i eterom te osuši na zraku. Dobiven je **spoj 2** (0,1838 g, 92,60 %),  $t_f = 184,4 - 186,1$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI:  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}^+$  izračunato 321,1961 dobiveno 321,1962.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2973 (C-H), 1293 (C-O), 1032 (C-N), 926 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,00 - 2,12 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,17 - 2,28 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,85 - 2,92 (quin,  $J=3,2$  Hz, 1 H, H4,) 3,55 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,62 - 3,72 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,41 (s, 2 H, H2) 4,60 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,09 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,25 - 7,40 (m, 5 H, ArH') 7,51 - 7,61 (m, 5 H, ArH\*);

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,42 (C5, C7) 28,92 (C4) 56,12 (C6, C8) 58,57 (C2) 69,01 (CH<sub>2</sub>) 77,62 (O-CH<sub>2</sub>) 127,99 (C1') 129,14 (C4') 129,40 (C2', C6') 129,46 (C3', C5') 130,51 (C3\*, C5\*) 132,03 (C4\*) 134,23 (C2\*, C6\*) 138,64 (C1') 153,25 (C=N).

### 3.3.2. *Sinteza N-(4-trifluormetil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (3)*

Spoj **3** sintetiziran je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,10 g, 0,40 mmol) i 4-(trifluormetil)benzil bromida (0,11 g, 0,46 mmol). Dobiven je spoj **3** (0,1891 g, 91,53 %),  $t_r = 158,2 - 158,8$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 389,1835 dobiveno 389,1836.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2971 (C-H), 1325 (C-O), 1089 (C-N), 927 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,03 - 2,13 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,17 - 2,29 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,90 (quin,  $J=3,2$  Hz, 1 H, H4) 3,56 - 3,64 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,64 - 3,75 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,46 (s, 2 H, H2) 4,71 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,09 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,26 - 7,38 (m, 5 H, ArH') 7,79 (d,  $J=8,1$  Hz, 2 H, H2\*, H6\*) 7,85 (d,  $J=8,1$  Hz, 2 H, H3\*, H5\*);

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,40 (C5, C7) 28,82 (C4) 56,34 (C6, C8) 58,83 (C2) 67,87 (CH<sub>2</sub>) 77,67 (O-CH<sub>2</sub>) 127,31 (q,  $J=3,3$  Hz, CF<sub>3</sub>) 129,15 (C4') 129,45 (ArH') 132,26 (C3\*, C5\*) 132,27 (C4\*) 133,58 (C1') 135,10 (C2\*, C6\*) 138,60 (C1\*) 152,98 (C=N).

### 3.3.3. *Sinteza N-(4-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (4)*

Spoj **4** sintetiziran je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 4-tert-butilbenzil-bromida (0,144  $\mu\text{L}$ , 0,78 mmol). Dobiven je spoj **4** (0,3257 g, 82,89 %),  $t_r = 223,4 - 224,1$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 377,2587 dobiveno 377,2587.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2963 (C-H), 1357 (C-O), 1049 (C-N), 913 (N-O);

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  1,34 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 2,00 - 2,11 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,16 - 2,28 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,88 (quin, *J*=3,1 Hz, 1 H, H4) 3,49 - 3,60 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,61 - 3,71 (m, 2 H, H6b, H7b) 4,40 (s, 2 H, H2) 4,56 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,09 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,28 - 7,37 (m, 5 H, ArH') 7,45 - 7,49 (m, 2 H, H2\*, H6\*) 7,56 - 7,60 (m, 2 H, H3\*, H5\*);

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,41 (C5, C7) 28,95 (C4) 31,55 (CH<sub>3</sub>) 35,76 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 56,00 (C6, C8) 58,51 (C2) 68,74 (CH<sub>2</sub>) 77,60 (O-CH<sub>2</sub>) 124,99 (C1\*) 127,48 (C3\*, C\*5) 129,12 (C4') 129,38 (C2', C6') 129,44 (C2\*, C6\*) 133,98 (C3', C5') 138,66 (C1') 153,31 (C4\*) 155,52 (C=N).

#### **3.3.4. Sinteza N-(3,4-diklorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (5)**

Spoj **5** sintetiziran je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 3,4-diklorbenzil -bromida (0,106  $\mu\text{L}$  0,73 mmol). Dobiven je spoj **5** (0,2534 g, 80,75 %), *t*<sub>f</sub> = 193,9 – 194,4 °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 389,1182 dobiveno 389,1183.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2944 (C-H), 1365 (C-O), 1046 (C-N), 911 (N-O);

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,01 - 2,13 (m, 2 H) 2,17 - 2,28 (m, 2 H) 2,90 (quin, *J*=3,12 Hz, 1 H) 3,48 - 3,59 (m, 2 H) 3,60 - 3,70 (m, 2 H) 4,41 (s, 2 H) 4,56 (s, 2 H) 5,10 (s, 2 H) 7,27 - 7,38 (m, 5 H) 7,48 (dd, *J*=8,31, 2,20 Hz, 1 H) 7,71 (d, *J*=8,31 Hz, 1 H) 7,78 (d, *J*=2,20 Hz, 1 H);

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,39 (C5, C7) 28,82 (C4) 56,25 (C6, C8) 58,71 (C2) 67,24 (CH<sub>2</sub>) 77,63 (O-CH<sub>2</sub>) 128,55 (C4\*) 129,14 (C4') 129,40 (C3', C5') 129,45 (C2', C6') 132,57 (C6\*) 133,94 (C5\*) 134,41 (C3\*) 136,05 (C2\*) 136,43 (C1\*) 138,57 (C1') 153,04 (C=N).

#### **3.3.5. Sinteza N-(3,5-di-tert-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (6)**

Spoj **6** sintetiziran je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 3,5-di-tert-butilbenzil-bromida (0,22 g, 0,78 mmol). Dobiven je spoj **6** (0,1891 g, 91,53 %), Dobiven je

spoj **6** (0,1891 g, 91,53 %),  $t_r = 229,4 - 230,2$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 433,3213 dobiveno 433,3216.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2953 (C-H), 1362 (C-O), 1028 (C-N), 977 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  1,32 (s, 18 H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)) 2,01 - 2,13 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,20 - 2,31 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,89 (quin,  $J=3,1$  Hz, 1 H, H4) 3,51 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,65 - 3,76 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,34 (s, 2 H, H2) 4,57 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,07 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,29 - 7,36 (m, 5 H, ArH') 7,37 (d,  $J=1,71$  Hz, 2 H, H2\*, H6\*) 7,61 (t,  $J=1,83$  Hz, 1 H, H4\*);

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,50 (C5, C7) 28,90 (C4) 31,72 (CH<sub>3</sub>) 35,83 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 56,27 (C6, C8) 58,07 (C2) 69,67 (CH<sub>2</sub>) 77,72 (O-CH<sub>2</sub>) 125,88 (C4\*) 127,17 (C1', C1\*) 128,53 (C2\*, C6\*) 129,20 (C4') 129,50 (ArH') 138,19 (C3\*, C5\*) 153,44 (C=N).

### 3.3.6. *Sinteza N-(4-trifluormetoksibenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (7)*

Spoj **7** sintetiziran je propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 4-(trifluormetoksi)benzil-bromida (119,82  $\mu\text{L}$ , 0,73 mmol). Dobiven je spoj **7** (0,2881 g, 82,28 %),  $t_r = 165,8 - 166,8$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> izračunato 405,1784 dobiveno 405,1785.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2976 (C-H), 1371 (C-O), 1034 (C-N), 935 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,02 - 2,13 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,17 - 2,28 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,89 (q,  $J=3,1$  Hz, 1 H, H4) 3,57 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,68 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,44 (s, 2 H, H2) 4,65 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,09 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,27 - 7,38 (m, 5 H, ArH') 7,45 (d,  $J=8,1$  Hz, 2 H, H3\*, H5\*) 7,69 (d,  $J=8,6$  Hz, 2 H, H2\*, H6\*);

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,39 (C5, C7) 28,87 (C4) 56,16 (C6, C8) 58,65 (C2) 67,74 (CH<sub>2</sub>) 77,66 (O-CH<sub>2</sub>) 122,71 (C3\*, C5\*) 127,09 (C1\*) 129,15 (C2', C6') 129,43 (C3', C5') 129,46 (C4') 136,34 (C2\*, C6\*) 138,62 (C1') 152,25 (C4\*) 153,07 (C=N).

### 3.3.7. *Sinteza N-(3,4-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (8)*

Spoj **8** sintetiziran je propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 3,4-difluorbenzil-bromida (94  $\mu$ L, 0,73 mmol) ; dodano dokapavanjem 94  $\mu$ L). Dobiven je spoj **8** (0,2711 g, 93,13 %),  $t_t = 193,4 - 194,0$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 357,1773 dobiveno 357,1773.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2966 (C-H), 1371 (C-O), 1034 (C-N), 935 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,03 - 2,10 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,17 - 2,28 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,90 (quin,  $J=3,1$  Hz, 1 H, H4) 3,51 - 3,61 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,62 - 3,74 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,43 (s, 2 H, H2) 4,60 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,09 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,27 - 7,49 (m, 7 H, ArH', ArH\*) 7,58 (ddd,  $J=10,9, 7,6, 1,9$  Hz, 1 H, H6');

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,40 (C5, C7) 28,85 (C4) 56,19 (C6, C8) 58,62 (C2) 67,50 (CH<sub>2</sub>) 77,66 (O-CH<sub>2</sub>) 119,49 (d,  $J=17,5$  Hz, C5\*) 123,32 (d,  $J=18,2$  Hz, C2\*) 125,31 (dd,  $J=6,8$  Hz, 3,3 Hz, C1\*) 129,16 (C4') 129,46 (ArH') 131,50 (q,  $J=3,3$  Hz, C6\*) 138,59 (C1') 151,22 (dd,  $J=157,7$  Hz, 11,8 Hz, C4\*) 153,02 (C=N) 153,71 (dd,  $J=160,6$  Hz, 13,3 Hz, C3\*).

### 3.3.8. *Sinteza N-(3,5-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (9)*

Spoj **9** sintetiziran je propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 3,5-difluorbenzil-bromida 101  $\mu$ L, 0,78 mmol). Dobiven je spoj **9** (0,2749 g, 88,49 %),  $t_t = 181,8 - 182,8$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 357,1773 dobiveno 357,1771.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2947 (C-H), 1243 (C-O), 1047 (C-N), 935 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,03 - 2,12 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,20 - 2,28 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,90 (quin,  $J=3,2$  Hz, 1 H, H4) 3,55 - 3,64 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,66 - 3,75 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,46 (s, 2 H, H2) 4,64 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,10 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,18 - 7,25 (m, 1 H, H3\*) 7,25 - 7,29 (m, 2 H, H2\*, H6\*) 7,29 - 7,38 (m, 5 H, ArH');

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,41 (C5, C7) 28,75 (C4) 56,43 (C6, C8) 58,86 (C2) 67,35 (CH<sub>2</sub>) 77,63 (O-CH<sub>2</sub>) 107,42 (t,  $J=25,5$  Hz, C4\*) 117,32 (d,  $J=7,4$  Hz, C2\*) 117,51

(d,  $J=7,4$  Hz, C6\*) 129,14 (C4') 129,42 (C2', C6') 129,44 (C3', C5') 131,58 (t,  $J=9,4$  Hz, C1\*) 138,59 (C1') 152,98 (C=N) 164,5 (d,  $J=249,9$  Hz, C5\*) 164,7 (d,  $J=250,2$  Hz, C3\*).

### 3.3.9. *Sinteza N-(2-klor-6-fluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijevog bromida (10)*

Spoj **10** sintetiziran je prema propisu 3.3.1. reakcijom spoja **1** (0,15 g, 0,65 mmol) i 2-klor-6-fluorbenzil-bromida (107  $\mu$ L, 0,78 mmol). Dobiven je spoj **10** (0,2791 g, 86,44 %),  $t_r = 184,3 - 184,9$  °C, HRMS/<sup>+</sup>ESI: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sup>+</sup> izračunato 373,1477 dobiveno 373,1479.

**IR (ATR)**  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  2943 (C-H), 1320 (C-O), 1046 (C-N), 979 (N-O);

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  2,04 - 2,15 (m, 2 H, H5a, H7a) 2,20 - 2,31 (m, 2 H, H5b, H7b) 2,90 (quin,  $J=3,1$  Hz, 1 H, H4) 3,66 - 3,73 (m, 2 H, H6a, H8a) 3,75 - 3,83 (m, 2 H, H6b, H8b) 4,57 (s, 2 H, H2) 4,79 (d,  $J=1,71$  Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>) 5,10 (s, 2 H, O-CH<sub>2</sub>) 7,27 - 7,38 (m, 6 H, ArH', H4\*) 7,51 (d,  $J=8,1$  Hz, 1 H, H3\*) 7,63 (td,  $J=8,2$  Hz, 6,24 Hz, 1 H, H5\*);

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)**  $\delta/\text{ppm}$  24,55 (C5, C7) 28,01 (C4) 56,55 (C6, C8) 59,28 (C2) 60,05 (CH<sub>2</sub>) 77,59 (O-CH<sub>2</sub>) 115,45 (d,  $J=16,6$  Hz, C1\*) 116,6 (d,  $J=23,5$  Hz, C5\*) 128,26 (d,  $J=3,4$  Hz, C3\*) 129,10 (C4') 129,29 (C2', C6') 129,43 (C3', C5') 135,39 (d,  $J=10,8$  Hz, C4\*) 138,60 (C1') 138,96 (d,  $J=4,1$  Hz, C2\*) 153,27 (C=N) 164,21 (d,  $J=252,9$  Hz, C6\*).

## 3.4. **Biokemijska metoda mjerenja inhibicijskog potencijala kinuklidinskih derivata. Ellmanova metoda mjerenja inhibitorne aktivnosti sintetiziranih spojeva.**

Inhibitorski potencijal sintetiziranih spojeva prema enzimu butilkolinesteraza (EC 3.1.1.8) dobivene iz konjskog seruma koja je komercijalno dostupna (liofilizirani prašak,  $\geq 22$  jedinice/mg proteina, Sigma Aldrich, Njemačka) i nije dodatno pročišćena ispitana je Ellmanovom metodom. Korišteni reagensi i kemikalije nabrojani su abecednim redom: acetiltiokolin jodid (ATCh, 99 %, Sigma-Aldrich, Njemačka), dinatrijev fosfat (99 %, Honeywell Fluka, Njemačka), 5,5'-ditiobis(2-nitro)benzojeva kiselina (DTNB ili Ellmanov reagens, 99 %, Sigma Aldrich, Njemačka), mononatrijev fosfat (97 %, Sigma Aldrich, Njemačka).

Biokemijski eksperimenti provedeni su na sobnoj temperaturi (25 °C) u fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,4. Kao supstrat BChE korišten je acetiltiokolin-jodid, a sva mjerenja su provedena prema Ellmanovoj metodi uz DTNB kao indirektni indikator enzimatske aktivnosti. Ellmanov test proveden je na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica, reakcijske smjese ukupnog volumena 300 µL. Tijek reakcije u realnom vremenu pratimo spektroskopski na uređaju Molecular Devices SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader pri valnoj duljini od 414 nm.

U tablici 1, prikazani su reagensi i kemikalije te njihovi volumeni i koncentracije u reakcijskoj smjesi u jažicama. Spojevi, potencijalni inhibitori, prethodno su otopljeni u vodi, no u slučaju teškog otapanja, dodan je DMSO, dimetil-sulfoksid ili MeOH, metanol, radi dobivanja prozirne otopine. Reakcije se provode u vodenom mediju, a prate se i kontrole sa puferom, puferom i DTNB, puferom, BChE i DTNB, puferom, BChE, DTNB i ATCh.

**Tablica 1.** Količina supstanci i reagensa u reakcijskoj smjesi jažice ukupnog volumena 300 µL

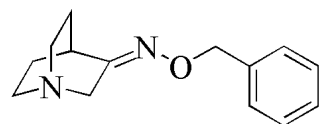
<b>Reagens</b>	<b>Otopina</b>	<b>Koncentracija</b>	<b>V (µL) / jažica</b>
Pufer	Fosfatni pufer, pH = 7,4		165
DTNB	26,15 mg u 10 mL pufera	0,33 mM	15
BChE	1,00 mg u 10 mL pufera	0,10 mg mL <sup>-1</sup>	50
ATChE	39,55 mg u 10 mL vode	1,00 mM	50
Spojevi	25,00 mM	Različite koncentracije	20

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

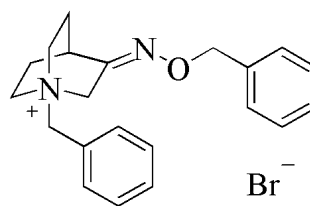
### 4.1. Uvod

Kako bi se ispunio cilj ovog rada, sintetizirani su spoj **1**, *N*-benzil-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid, spoj **2**, te osam novih spojeva koji do sada nisu opisani u literaturi, a testirani su kao potencijalni inhibitori BChE. Na početku sinteze, pripremljen je spoj **1** iz kinuklidin-3-ona, koji je poslužio kao početni spoj za kvaternizaciju kinuklidinskoga dušikovog atoma različito supstituiranim derivatima benzil-bromida. Njihove strukture prikazane su na slici 16. Novosintetizirani spojevi identificirani su i karakterizirani spektroskopskim metodama te im je određeno talište. Svim spojevima, utvrđen je IC<sub>50</sub> Ellmanovom metodom, kao jedan od pokazatelja inhibitornoga potencijala i smanjenja enzimatske aktivnosti butirilkolinesteraze dobivene iz konjskog seruma.

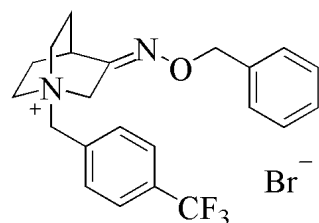




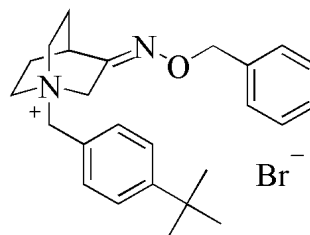
**1**



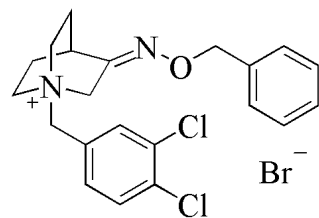
**2**



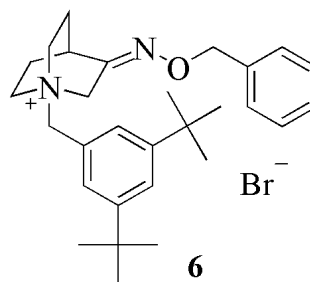
**3**



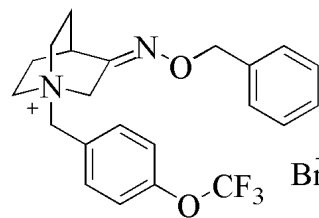
**4**



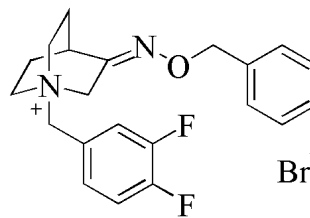
**5**



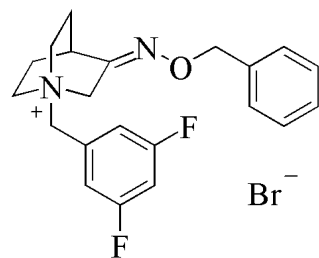
**6**



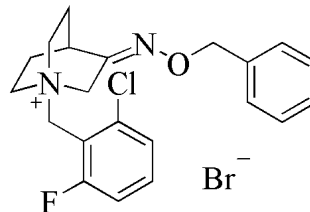
**7**



**8**



**9**



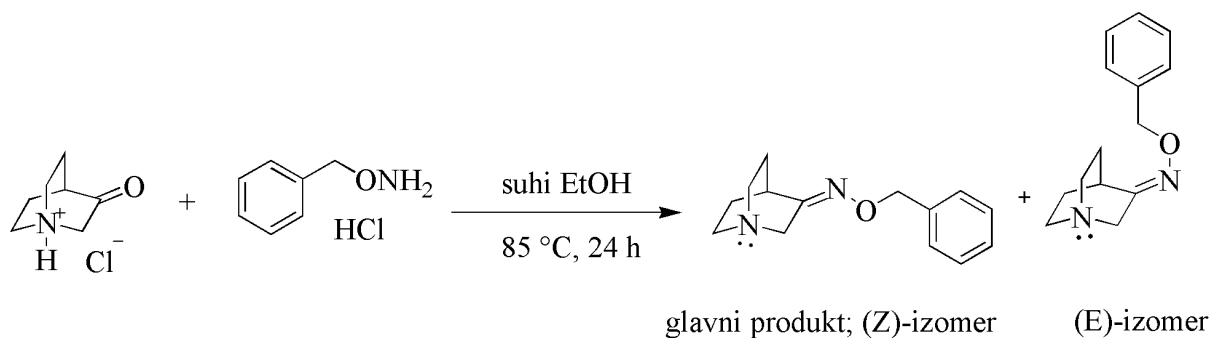
**10**



Slika 16. Struktura sintetiziranih spojeva **1** do **10**

## 4.2. Sinteza *O*-benzilkinuklidin-3-on-oksima kao početnog spoja za daljnje reakcije

Reakcijom kinuklidin-3-on hidroklorida i *O*-benzilhidroksilamin hidroklorida dobiven je eter *O*-benzilkinuklidin-3-on-oksima, spoj **1**, slika 17. Reakcijska smjesa sadržavala je etanol kao otapalo, a zagrijavana je na uljnoj kupelji (85 °C) uz povratno hladilo (refluks) i klorkalcijevu cijevčicu. Ukupno trajanje sinteze je 24 sata. Nakon sinteze provedena je izolacija sintetiziranoga oksima prema propisu već opisanom u literaturi (Laučan M, 2023), u kojemu se dodaje zasićena otopina natrijevog karbonata (pH ~ 11), čime se uklanjaju protoni s kinuklidinskog dušikovog atoma te se na ovaj način oslobađa oksim kao slobodna baza. Oksim se tada, kao slobodna baza, ekstrahira u organski sloj pomoću kloroforma, a uspješnost ekstrakcije prati se putem TLC uz kloroform:MeOH=9:1 kao mobilnu fazu. Kloroformski, organski sloj se skuplja u tikvicu s okruglim dnom, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Time je izoliran spoj **1**, koji je pročišćen kromatografijom na stupcu u sustavu otapala kloroform:MeOH=9:1. Dobiven je uljasti, blijedožućkasti produkt **1**.



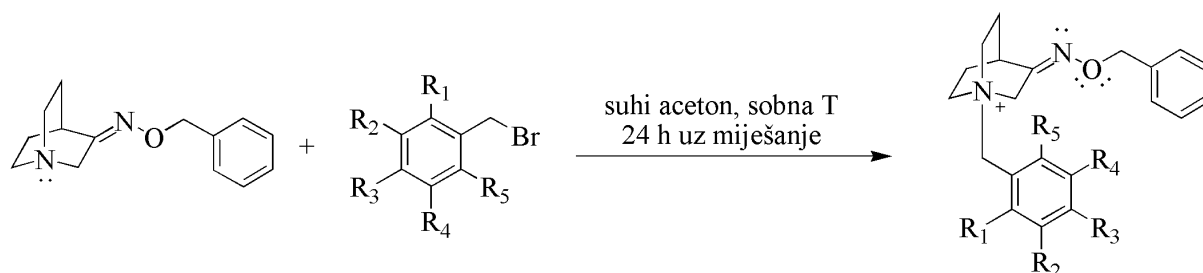
Slika 17. Sinteza *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima.

U ovoj reakciji, moguć je nastanak 2 stereoisomera, *syn* i *anti* izomera oksima. NMR spektroskopijom moguće je odrediti konfiguraciju nastalog produkta, što je proučeno u prethodnim diplomskim i doktorskim radovima, na temelju kojih se utvrdilo da pretežito nastaje *syn* ili (Z)- izomer putem NOESY spektra (Laučan M., 2023).

## 4.3. Menshutkinova reakcija. Sinteza kvaternih derivata *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima

Koristeći prethodno znanje o reakcijama supstitucije između tercijanih amina i halogeniranih ugljikovodika, reakcijom nukleofilne supstitucije pripremljeni su kvaterni derivati *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima, reakcijom kinuklidinskog dušika i različito supstituiranih benzil-

bromida (9 spojeva), redom: benzil-bromid, 4-(trifluorometil)benzil-bromid, 4-*tert*-butilbenzil-bromid, 3,4-diklorbenzil-bromid, 3,5-di-*tert*-butilbenzil-bromid, 4-(trifluorometoksi)benzil-bromid, 3,4-difluorbenzil-bromid, 3,5-difluorbenzil-bromid i 2-klor-6-fluorbenzil-bromid u suhom acetonu, na sobnoj temperaturi. Reakcija se, uz miješanje na magnetskoj miješalici, ostavi 24 sata. Dobiveni spojevi **2-10**, kvaterne su amonijeve soli, prikazani na slici 18. U tablici 2 prikazani su svi supstituenti na aromatskom prstenu benzilnog dijelu molekule.



Slika 18. Sinteza različito supstituiranih kvaternih derivata *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima

**Tablica 2.** Supstituenti ( $R_1$ - $R_5$ ) na aromatskom prstenu benzilne skupine sintetiziranih spojeva **2-10**

Spoj	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$
<b>2</b>	-H	-H	-H	-H	-H
<b>3</b>	-H	-H	-CF <sub>3</sub>	-H	-H
<b>4</b>	-H	-H	-C(CH <sub>3</sub> )	-H	-H
<b>5</b>	-H	-H	-Cl	-Cl	-H
<b>6</b>	-H	-C(CH <sub>3</sub> )	-H	-C(CH <sub>3</sub> )	-H
<b>7</b>	-H	-H	-OCF <sub>3</sub>	-H	-H
<b>8</b>	-H	-H	-F	-F	-H
<b>9</b>	-H	-F	-H	-F	-H
<b>10</b>	-F	-H	-H	-H	-Cl

#### 4.4. Fizikalno-kemijska karakterizacija spojeva

*O*-benzilni eter kinuklidin-3-on oksima (**1**) je viskozna, blijedožućkasta tekućina pri sobnoj temperaturi, dobre topljivosti u etanolu i suhom acetonu. Kvaterni derivati **2-10** su krutine bijele boje na sobnoj temperaturi. Ne pokazuju topljivost u eteru, dok su neki od njih kao na primjer

spoj 3 i 4, djelomično topljivi u acetonu, pa se zbog toga treba koristiti eter za ispiranje kod vakuum-filtracije. Neki i od spojeva su ljepljivi i higroskopni, kao na primjer spoj 4. Tališta spojeva, izmjerena u rasponu od 158,2 do 230,2 °C te njihova iskorištenja prikazana su na tablici 3. Uvođenjem *tert*-butilnih supstituenata u benzenski prsten benzil-bromida, drastično povećava točku tališta, pa tako spoj 4 i 6 imaju najvišu točku tališta, dok supstitucija prstena sa trifluormetil- ili trifluormetoksi- skupinom, kod spoja 3 i 7, smanjuje točku tališta. Nadalje, derivati sa halogenim atomima na prstenu (spoj 5, 8, 9 i 10) imaju točku tališta bližu nesupstituiranom spoju 2, ali i dalje višu od nesupstituiranog.

**Tablica 3.** Iskorištenja reakcija i tališta kvaterniziranih kinuklidinskih derivata 2-10.

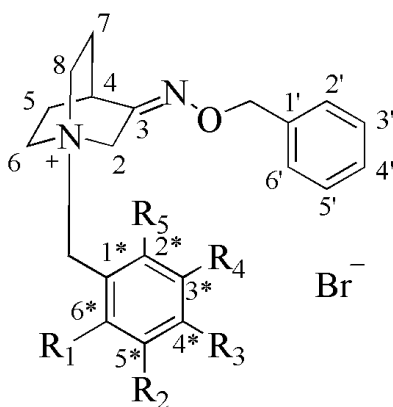
Spoj	Iskorištenje, $\eta$ / %	Talište, $t_t$ / °C
1	88,49	-
2	92,60	184,4 – 186,1
3	91,53	158,2 – 158,8
4	82,89	223,4 – 224,1
5	80,75	193,9 – 194,4
6	89,66	229,4 – 230,2
7	85,28	165,8 – 166,8
8	93,13	193,4 – 194,0
9	88,49	181,8 – 182,8
10	86,44	184,3 – 184,9

Prema dobivenim vrijednostima iskorištenja reakcija kvaternizacije *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on oksima, možemo vidjeti da su svi spojevi sintetizirani u visokim iskorištenjima. Najniža iskorištenja dobivena su za spojeve 5 i 7.

#### 4.5. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Spektroskopske metode korištene u ovom radu bile su nuklearna magnetska rezonancija, infracrvena spektroskopija te spektrometrija masa.

Nuklearna magnetska rezonancija je spektroskopska tehnika koja služi za identifikaciju organskih spojeva i lijekova te se zbog tih svojstava naširoko upotrebljava u Farmakopejama, kao što je i Europska farmakopeja, kao nezaobilazan čimbenik primarnih identifikacija (Watson, 1999a). Na slici 19. prikazana je numeracija ugljikovih atoma gdje su, prema IUPAC-ovom pravilu numeriranja, brojevima označeni ugljikovi atomi kinuklidina, apostroфом označeni atomi benzenskog prstena *O*-benzilnog etera kinuklidin-3-on-oksima i posljednje, zvjezdicom označeni atomi benzenskoga prstena uvedenog kvaternizacijom dušikovoga atoma kinuklidina.



Slika 19: IUPAC numeriranje atoma ugljika kvaternih spojeva

Struktura kinuklidinskih derivata sintetiziranih u ovom eksperimentu, potvrđena je  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektrima kao dio tehnike NMR. Protoni kinuklidinskog prstena relativno su zasjenjeni i njihovi signali su se javljaju kao karakterističan multiplieti u području kemijskog pomaka od 2,0 do 4,5 ppm. Jedan od tih multipljeta je i proton na položaju četiri pri kemijskom pomaku 2,9 koji se spreže sa četiri susjedna protona ali i protonima bicikličkoga sustava koji su udaljeniji za još jednu vezu. Razlike u  $^1\text{H}$  spektrima spojeva vide se u aromatskom području s obzirom na razlike u supstituciji benzilnoga aromatskog prstena.

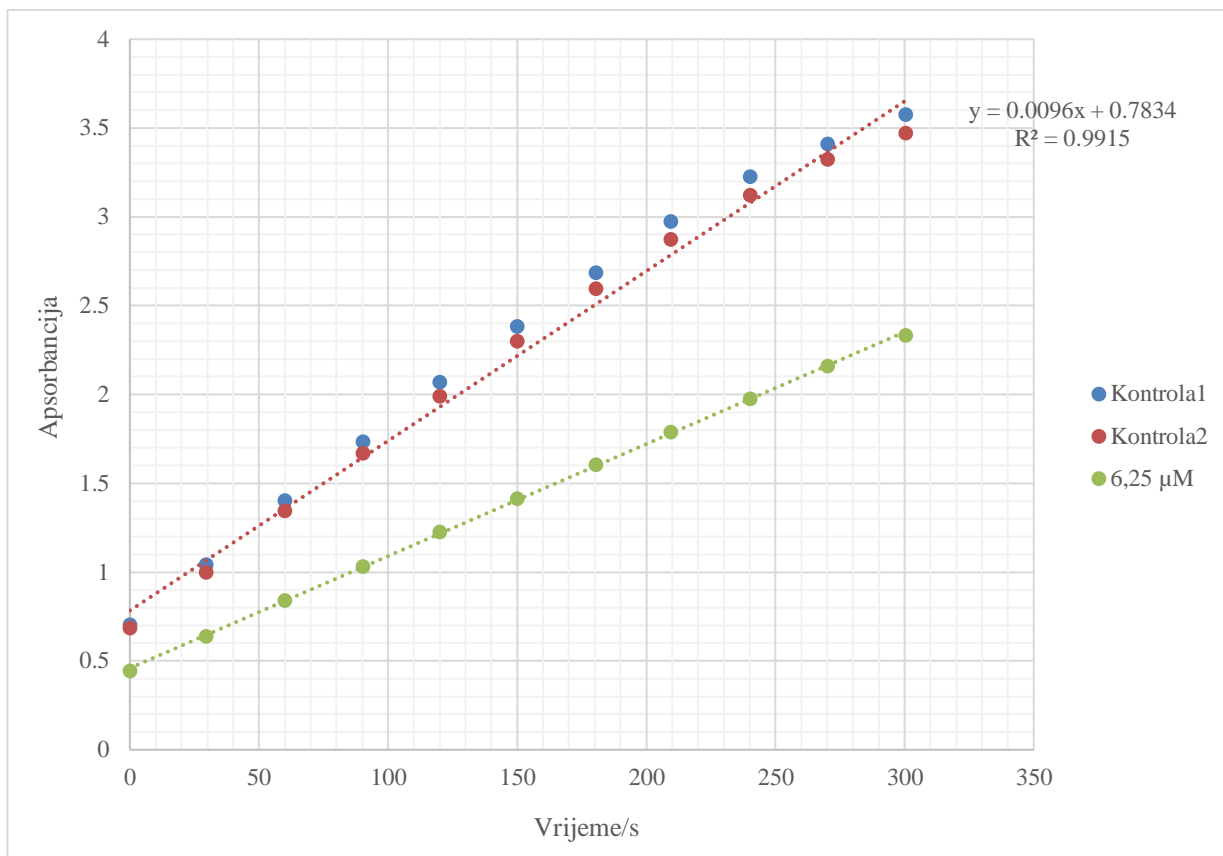
Kod  $^{13}\text{C}$  spektra također je slična situacija, gdje se signali ugljikovih atoma kinuklidinskoga bicikličkoga sustava, ali i eterske benzilne skupine (oksim) nalaze gotovo na identičnim mjestima s istim kemijskim pomacima. Razlike u spektrima su očite u aromatskom području, gdje se vidi, ovisno o supstituentu na benzil-bromidu koji je uveden, nepodudarnost u signalima ugljikovih atoma benzilne skupine. Upravo su ti kemijski pomaci, vezani za halogene ili alkilne supstituenate na benzenu, a također je potrebno analizirati sprezanje signala ugljika s fluorovim atomima u spojevima **3**, **7-10**. NMR  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektri, nalaze se u Prilogu.

IR, infracrvena spektroskopija, spektroskopska je tehnika koja je iznimno važna u identifikaciji funkcijskih skupina, ali i potvrde strukture spoja na temelju dijela spektra koji se naziva otisak prsta (eng. *fingerprint*). Priloženi u prilogu, nalaze se IR spektri novosintetiziranih kinuklidiskih derivata, spojevi **1** do **10**.

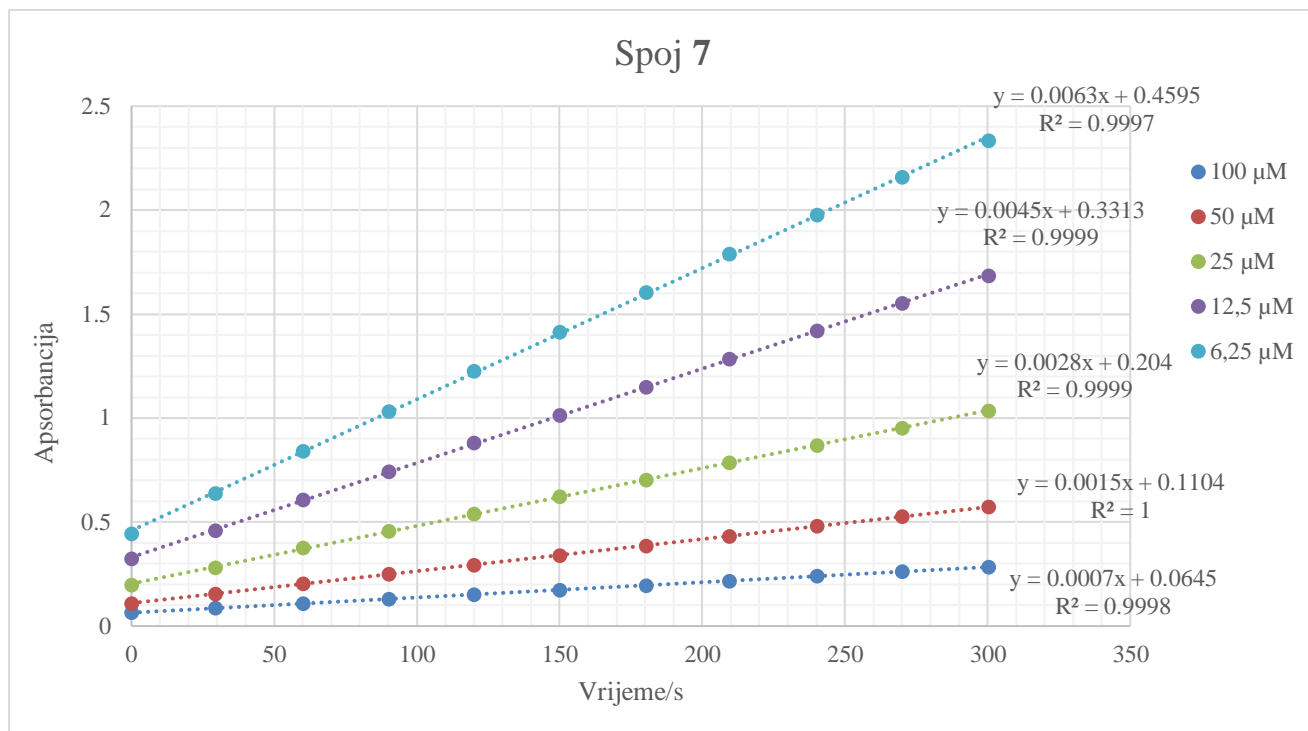
Spektrometrija masa (MS, eng. *Mass spectrometry*) analitička je, kemijsko-fizikalna, instrumentalna tehnika, utemeljena na stvaranju nabijenih molekula ili molekularnih fragmenata u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska u područje visokog vakuuma s raznim metodama ionizacije (Watson DG, 1999b). Spektri masa spojeva **1** do **10**, snimljeni su pomoću spregnutog sustava nanoUHPLC-MS/MS ThermoScientific QEactive Plus, a kao tehnika ionizacije korišteno je elektroraspršenje.

#### **4.6. Inhibitorni potencijal. IC<sub>50</sub> vrijednosti. Ellmanova metoda.**

Novosintetizirani spojevi, testirani su kao potencijalni inhibitori BChE izolirane iz konjskog seruma pomoću Ellmanove metode. Određene su IC<sub>50</sub> vrijednosti koje predstavljaju koncentraciju spoja koja je neophodna za 50 % inhibicije biološke aktivnosti enzima *in vitro*. Sve koncentracije dobivene su serijskim razrjeđivanjem temeljne standardne otopine (eng. *stock solution*) spojeva. Za svaku koncentraciju inhibitora reakcija je praćena 5 minuta, te je utvrđena linearna ovisnost apsorbancije o vremenu, slike 20 i 21 (za spoj **7**). Utvrđeno je da nagib pravca pokazuje i prati konstantu inhibicije prvog reda.



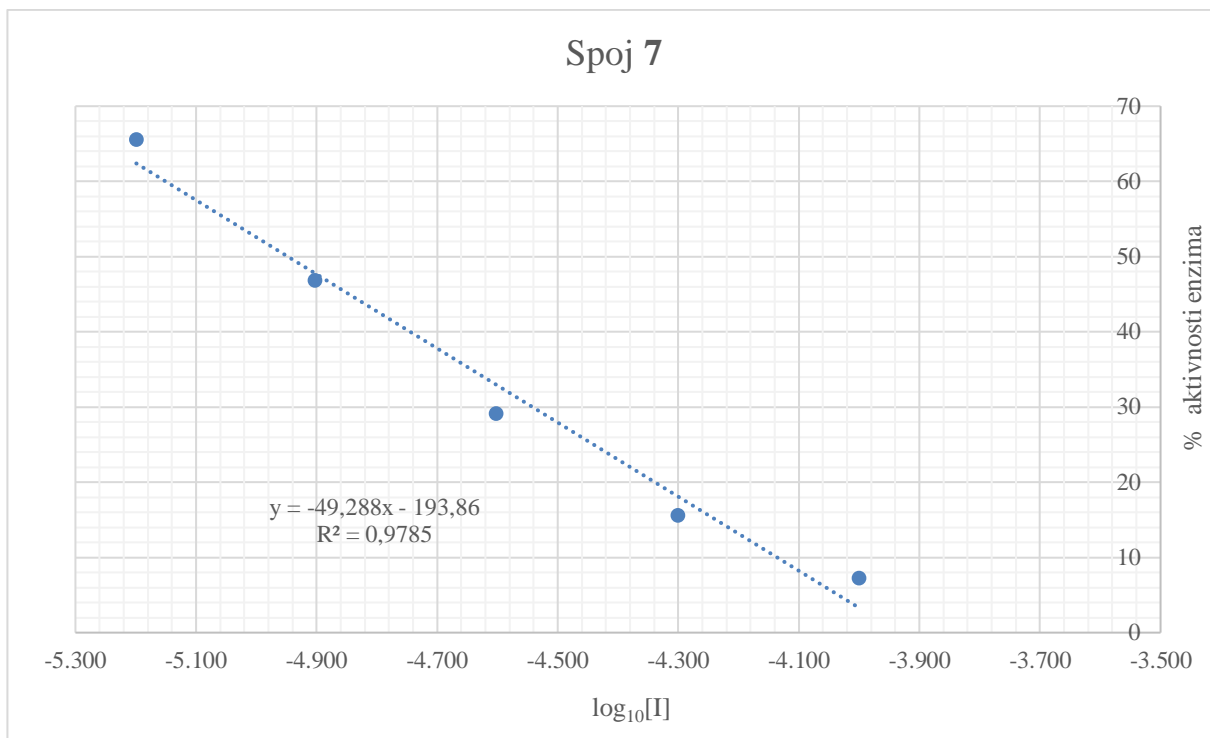
Slika 20. Usporedba brzine hidrolize supstrata ATCh s BChE bez (crvene i plave točke kontrole u duplikatu, Kontrola1 i Kontrola2) i s dodanim inhibitorom, spojem **7** (svijetlo zelene točke, koncentracija inhibitora 6,25 μM).



Slika 21. Brzine hidrolize supstrata ATCh s BChE s dodanim inhibitorom, spojem 7 s koncentracijama 6,25 μM (svijetlo plave točke), 12,50 μM (ljubičaste točke), 25,00 μM (zelene točke), 50,00 μM (crvene točke) i 100,00 μM (plave točke).

Postotak izmjerene enzimske aktivnosti izračunat je kao omjer konstante brzine reakcije s inhibitorom i konstante brzine reakcije bez inhibitora. Kako bi se odredila IC<sub>50</sub> vrijednost, konstruiran je graf (slika 22) koji pokazuje ovisnost postotka izmjerene enzimske aktivnosti i log<sub>10</sub>[I]. Iz izmjerenih podataka dobivene su vrijednosti IC<sub>50</sub> za svaki od sintetiziranih spojeva (Locock K i sur., 2015), a njihove brojčane vrijednosti zajedno s odstupanjima (standardna pogreška ili odstupanje, RSD) prikazane su u tablici 4.





Slika 22. Ovisnost postotaka izmjerene enzimske aktivnosti o  $\log_{10}[I]$ .

**Tablica 4.**  $IC_{50}$  vrijednosti izračunate za spojeve **1 – 10** u reakciji inhibicije BChE.  $IC_{50}$  vrijednosti dobivene Ellmanovom metodom, istaknute su kao srednje vrijednosti (sa standardnim odstupanjem, RSD;  $\pm$  standardna pogreška) i određene iz najmanje 3 pokusa.

<b>Spoj</b>	<b><math>IC_{50} / \mu\text{mol dm}^{-3}</math></b>
<b>1</b>	425,1 $\pm$ 31,1
<b>2</b>	0,49 $\pm$ 0,05
<b>3</b>	32,9 $\pm$ 2,5
<b>4</b>	0,8 $\pm$ 0,1
<b>5</b>	0,6 $\pm$ 0,3
<b>6</b>	0,28 $\pm$ 0,01
<b>7</b>	12,1 $\pm$ 1,8
<b>8</b>	12,4 $\pm$ 1,6
<b>9</b>	2,40 $\pm$ 0,4
<b>10</b>	0,39 $\pm$ 0,02

Analizom tablice 4, vidi se da je nekvaterni spoj **1** pokazao najslabiji inhibitorski potencijal prema BChE s  $IC_{50}$  vrijednosti od  $425,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ , dok je njegov kvaterni derivat, spoj **2**, kojemu je dušikov atom kinuklidinskog prstena kvaterniziran nesupstituiranom benzilnom skupinom pokazao gotovo 868 puta veću inhibitorsku aktivnost prema enzimu ( $IC_{50}$  vrijednosti od  $0,49 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). Dakle, kvaternizacija kinuklidinskog prstena značajno poboljšava inhibitorsku aktivnost prema enzimu BChE. Nadalje, uvođenjem supstituenata na aromatski prsten benzilne skupine mijenja se aktivnost prema enzimu. Ako se uzme spoj **2** kao referentni spoj, možemo reći da supstitucija vodikovih atoma fenilne skupine u *para* položaju sa supstituentima kao što su  $-\text{OCF}_3$  ili  $-\text{CF}_3$  (trifluormetoksi ili trifluormetil) drastično smanjuje inhibitorski potencijal, jer upravo spojevi **3** i **7** koji nose te skupine imaju 67 puta (spoj **3**) i 25 puta (spoj **7**) manji  $IC_{50}$ . Uvođenjem sličnih supstituenata (halogena), kao što su dva fluorova atoma u *meta* i *para* položaj fenila, smanjuje aktivnost za 25 puta (spoj **8**) u odnosu na spoj **2**. Nadalje, srednje smanjenje aktivnosti, referentno na spoj **2**, možemo vidjeti kod spoja **9**, gdje, slično kao kod spoja **8**, fluorovi atomi u *meta* položajima umanjuju inhibitorsku aktivnost za 5 puta. Kod spoja **4** i **5**, uvođenje velikog *tert*-butilnog supstituenta ili klorovih atoma u *meta* i *para* položaj blago smanjuje sposobnost inhibicije ili ne utječe drastično na inhibiciju, sa povećanjem  $IC_{50}$  1,6 (spoj **4**) i 1,2 (spoj **5**) puta. Dok na drugu stranu, supstitucije fenilnog prstena koje su se pokazale povoljnijima i perspektivnijima u vidu povećanja inhibitorske aktivnosti su supstitucije *tert*-butilnim skupinama u *meta* položajima (spoj **6**) i fluorovim i klorovim atomom u *ortho* položajima (spoj **10**) gdje spoj **6** pokazuje 1,75, a spoj **10** 1,26 puta veći inhibitorski potencijal. Tako je zaključno, spoj **6** pokazao najznačajniju sposobnost inhibicije s  $IC_{50}$  vrijednošću od  $0,28 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Spojevi **2**, **4** – **6** i **10** su se pokazali kao nanomolarni inhibitori ( $IC_{50}$  vrijednosti u rasponu 280 – 800 nM), dok su prethodno sintetizirani i testirani kvaterni derivati *O*-benzilni eteri kinuklidin-3-on-oksima pokazali slabiju moć inhibicije BChE ( $IC_{50}$  vrijednosti u mikromolarnom području, Laučan M, 2023).

Da bi se provjerila aktivnost spojeva i na ljudskim kolinesterazama, kinetičke konstante inhibicije za sve pripravljene spojeve odredila je dr. sc. Anita Bosak, v. zn. sur. (Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb). Inhibitorski potencijal pripremljenih spojeva **1** – **10** ispitan je na rekombinantnoj ljudskoj AChE i pročišćenoj ljudskoj BChE spektroskopskom metodom po Ellmanu, tablica 5. Ispitani spojevi pokazali su bolje vezanje u aktivno mjesto ljudske AChE nego BChE. Spoj **6**,

kvaterni derivat s dvije *tert*-butilne skupine u *meta* položajima na fenilnom prstenu pokazao je najveći afinitet prema AChE s  $K_i$   $16 \pm 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

Svi ispitani kvaterni derivati pokazali su se boljim inhibitorima BChE. Derivat **1** je 20 puta bolji inhibitor BChE nego AChE, dok uvođenje benzilnog supstituenta dolazi do povećanja inhibicije oba enzima. Spojevi **2 - 10** nanomolarni su inhibitori BChE s  $K_i$  od 79 do  $820 \text{ nmol dm}^{-3}$  što ih kvalificira kao visokopotentne BChE inhibitore. Najbolji inhibitor BChE je spoj **4**, kvaterni derivat s *tert*-butilnom skupinom u *para* položaju na fenilnom prstenu benzilne skupine vezane na kinuklidinom atom dušika.

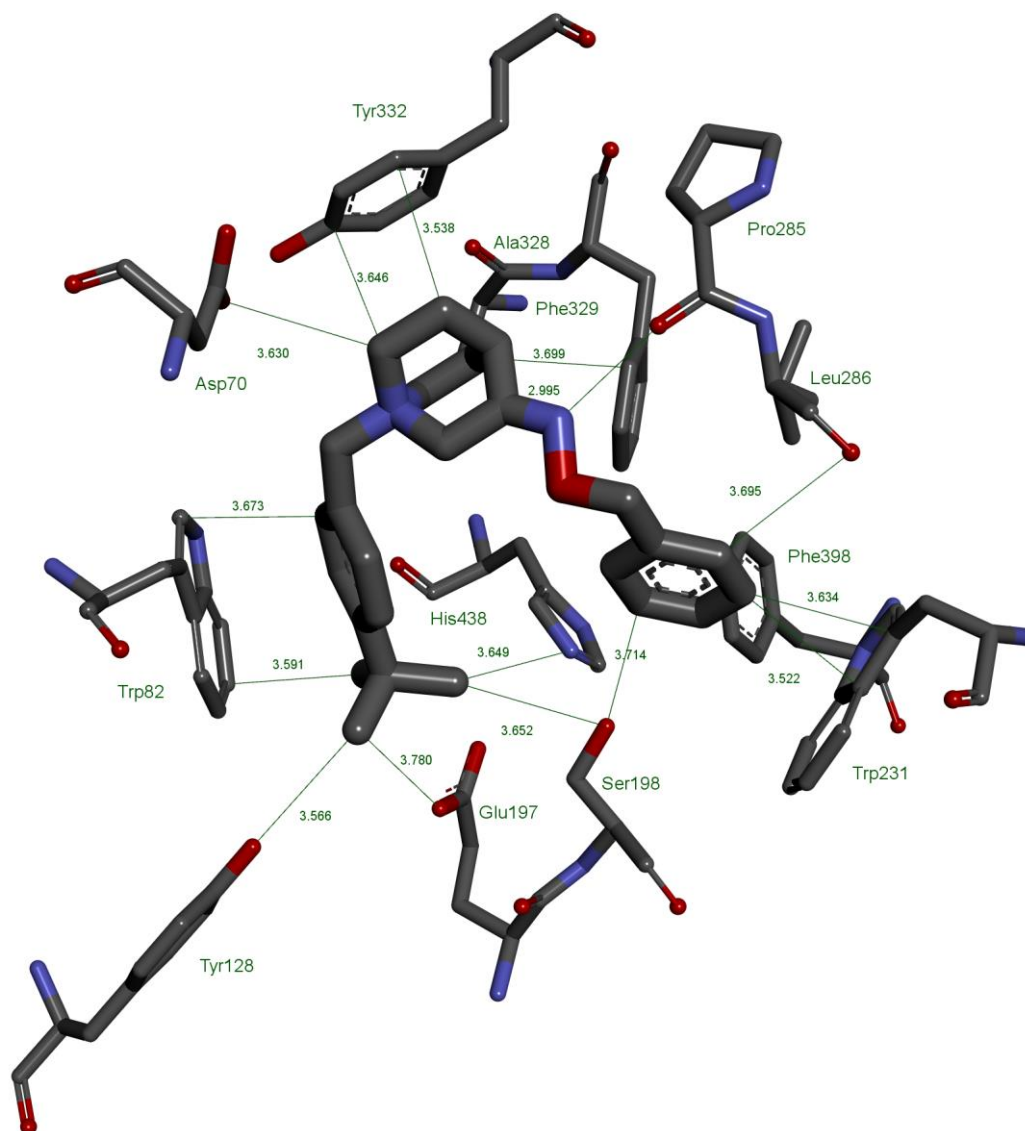
Kvaterni derivati cinhonidina pokazali su značajnu selektivnost prema BChE. Najselektivnijim se pokazao spoj **4**, kojemu je kinuklidinski atom dušika kvaterniziran s *para-tert*-butilbenzilnom skupinom, s 354 puta većom inhibicijom BChE, slijede ga spojevi **9** i **10** s 331 odnosno 323 puta boljom inhibicijom BChE.

**Tablica 5.** Konstante disocijacije  $K_i$  određene za inhibiciju ljudskih AChE i BChE s pripremljenim spojevima **1 – 10**.

Spoj	$K_i/\mu\text{mol dm}^{-3}$		$\frac{\text{AChE}}{\text{BChE}}$
	AChE	BChE	
<b>1</b>	$360 \pm 25$	$18 \pm 1$	20
<b>2</b>	$41 \pm 2$	$0.66 \pm 0.02$	62
<b>3</b>	$30 \pm 2$	$0.64 \pm 0.02$	47
<b>4</b>	$28 \pm 2$	$0.079 \pm 0.004$	354
<b>5</b>	$17 \pm 1$	$0.13 \pm 0.00$	130
<b>6</b>	$16 \pm 1$	$0.19 \pm 0.02$	84
<b>7</b>	$72 \pm 5$	$0.74 \pm 0.03$	97
<b>8</b>	$28 \pm 2$	$0.82 \pm 0.02$	34
<b>9</b>	$106 \pm 17$	$0.32 \pm 0.01$	331
<b>10</b>	$42 \pm 3$	$0.13 \pm 0.00$	323

Najboljem inhibitoru ljudske BChE, spoju **4** su francuski znanstvenici Xavier Brazzolotti i Florian Nachon (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1 Place du Général Valérie André, Brétigny sur Orge) odredili kristalnu strukturu unutar aktivnog mjesta kristala ljudske

BChE, slika 23. Može se uočiti da aromatski prstenovi imaju niz povoljnih  $\pi - \pi$  interakcija s aromatskim aminokiselinama aktivnoga mjesta, te je spoj smješten tako da vrlo dobro blokira prilaz supstrata ATCh-a u aktivno mjesto gdje upravo *tert*-butilna skupina ima vrlo bliske kontakte s atomima aminokiselina katalitičke trijade.



Slika 23. Kristalna struktura spoja **4** (deblji štapićasti model) unutar aktivnog mjesta kristala ljudske BChE. Prikazane su orijentacije samo aminokiselina (tanji štapićasti modeli) aktivnog mjesta BChE koje su unutar 3,8 Å od atoma spoja **4**. Vodikovi atomi izostavljeni su zbog preglednosti. Međuatomske udaljenosti izražene su u Å ( $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$ ).

## 5. ZAKLJUČCI

- Reakcijom kunuklidin-3-on hidroklorida i *O*-benzilhidroksilamin-hidroklorida u suhom etanolu pri povišenoj temperaturi sintetiziran je *O*-benzilni eter kinuklidin-3-on-oksima (**1**) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu.
- Ovaj oksim poslužio je za daljnje reakcije kvaternizacije. Pripravljene su sljedeći derivati: *N*-benzil- (**2**), *N*-(*para*-trifluormetoksibenzil)- (**3**), *N*-(*para-tert*-butilbenzil)- (**4**), *N*-(*meta*, *para*-diklorbenzil)- (**5**), *N*-(*meta*, *meta*-*di-tert*-butilbenzil)- (**6**), *N*-(*para*-trifluormetoksibenzil)- (**7**), *N*-(*meta*, *para*-difluorbenzil)- (**8**), *N*-(*meta*, *meta*-difluorbenzil)- (**9**), *N*-(*ortho*, *ortho*-difluorbenzil)- (**10**). Kvaterni derivati **3** - **10** do sada nisu opisani u literaturi.
- Spojevi su okarakterizirani tehnikama IR, NMR, (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) i MS. Također su im opisana fizikalno-kemijska svojstva. Inhibitorni potencijal prema BChE izoliranoj iz konjskoga seruma mjereno je uz pomoć Ellmanove metode. Svi sintetizirani spojevi pokazali su odličnu inhibitornu aktivnost osim nekvaternog spojem **1**. Inhibitorni potencijal izražen je kao IC<sub>50</sub> vrijednost.
- Spojevi **2** – **10** pokazali su inhibitornu aktivnost prema BChE s vrijednostima IC<sub>50</sub> od 0,28 μmol dm<sup>-3</sup> do 32,9 μmol dm<sup>-3</sup>. Kao najsnažniji inhibitor BChE, pokazao se spoj **6**, kvaterni derivat oksima s dvije *tert*-butilne skupine u *meta* položajima.
- Ostali potentni inhibitori prikazani u radu su: kvaterni derivat oksima s nesupstituiranom benzilnom skupinom (spoj **2**) te spoj **10**, kvaterni derivat oksima s atomima klora i fluora u *ortho* položajima.
- Nadalje, svi spojevi pokazali su inhibitorni potencijal i prema ljudskim kolinesterazama. Spoj **4** pokazao se kao nanomolarni selektivni inhibitor butirilkolinesteraze s 354 puta većim afinitetom prema butirilkolinesterazi s *K<sub>i</sub>* vrijednosti od 79 nmol dm<sup>-3</sup>.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACh – acetilkolin

AChE – acetilkolinesteraza

ATCh – acetiltiokolin

ATR – prigušena totalna ili ukupna refleksija (eng. *Attenuated Total Reflectance*)

AŽS – autonomni živčani sustav

BChE – butirilkolinesteraza

DAM - diacetylmonodoksim

DAT – Demencija Alzheimerovog tipa

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-nitro)benzojeva kiselina, Ellmanov reagens

IR, FT-IR – infracrvena spektroskopija (eng. *Infrared spectroscopy*, infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier-transform infrared spectroscopy*))

KMB – krvno-moždana barijera

MG – mijastenija gravis

MS – spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*)

OP – organofosforni spojevi

PAM – pralidoksim

PB – Parkinsonova bolest

ppm – dijelovi na milijun ili dio na milijun (eng. *Parts per million*)

SAR - odnos strukture molekule i djelovanja, eng. *structure-activity relationship*

SŽS – središnji živčani sustav

TcAChE – acetilkolinesteraza ili acetilkolinesteraza iz organizma *Torpedo californica*

TLC – tankoslojna kromatografija (eng. *Thin-layer chromatography*)

TMS – tetrametilsilan

UPLC - Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

UV – ultraljubičasto zračenje, zračenje ultraljubičastog valnog područja (engl. *Ultraviolet*)

WHO – svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World health organization*)

## 7. LITERATURA

Aakeröy CB, Sinha AS, Epa, KN, Chopade PD, Smith MM, Desper J. Structural chemistry of oximes. *Cryst Growth Des*, 2013, 13 (6), 2687–2695.

Abbara C, Rousseau JM, Lelièvre B, Turcant A, Lallement G, Ferec S, Bardot I, Diquet B. Pharmacokinetic analysis of pralidoxime after its intramuscular injection alone or in combination with atropine-avizafone in healthy volunteers. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(8), 1857-67.

Adeyinka A, Muco E, Regina AC. Organophosphates. [Ažurirano 12. studenog 2023]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499860/>, pristupljeno 02. 06. 2024.

Aggarwal VK, Emme I, Fulford SY, Correlation between pK(a) and reactivity of quinuclidine-based catalysts in the Baylis-Hillman reaction: discovery of quinuclidine as optimum catalyst leading to substantial enhancement of scope. *J Org Chem*, 2003, 68(3), 692-700.

Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*. 1991, 11(2), 452-4.

Anticholinesterase. *Encyclopedia Britannica*, 8 Travnja 2024, <https://www.britannica.com/science/anticholinesterase>, pristupljeno 8. 06. 2024.

Anjali PD, Singh D. Quinoline: a diverse therapeutic agent. *Int J Pharm Sci Res*, 2016, 7, 1–13.

Arnett EM, Wu CJ. *Chem Ind*, 1959, 1488.

Arnold WA, Blum A, Branyan J, Bruton TA, Carignan CC, Cortopassi G, Datta S, Dewitt J, Doherty AC, Halden RU, Harari H, Hartmann EM, Hrubec TC, Iyer S, Kwiatkowski CF, Lapiere J, Li D, Li L, Muñoz Ortiz JG, Salamova A, Schettler T, Seguin RP, Soehl A, Sutton R, Xu L, Zheng G. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern. *Environ Sci Technol*, 2023, 57 (20), 7645-7665.

Augustinsson, K.-B. Cholinesterases. A study in comparative enzymology. *Acta Physiol Scand*, 1948, 15 (52).

Bailey PD, Mills TJ, Pettecrew R, Price RA. 5.06 - Amides. *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II*. Karitzky AR, Taylor JK, urednici, London, Elsevier, 2004, str. 201-294.

Bajda M, Więckowska A, Hebda M, Guzior N, Sotriffer CA, Malawska B. Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3), 5608-32.

Barnes PJ, Thomson NC. Neural and Humoral Control of the Airways. Asthma and COPD (Second Edition), Basic Mechanisms and Clinical Management. Elsevier, 2009, 32, 381-397.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. 6. englesko izdanje. 1. hrvatsko izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 370.

Blackstock, SC; Lorand, JP; Kochi, JK. "Charge-Transfer Interactions of Amines with Tetrahalomethanes. X-Ray Crystal Structures of the Donor-Acceptor Complexes of Quinuclidine and Diazabicyclo [2.2.2]Octane with Carbon Tetrabromide". *J Org Chem.* 1987, 52 (8), 1451–1460.

Bohnen NI, Albin RL. The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res*, 2011, 221(2), 564-73.

Bolognesi ML, Cavalli A, Valgimigli L, Bartolini, M, Rosini M, Andrisano, V, Recanatini M, Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Drug Design Strategy: From a Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitor to a Trifunctional Compound against Alzheimer's Disease. *J Med Chem*, 2007, 50, 6446–6449.

Bolto BA, Dixon DR, Eldridge RJ, King SJ. The Use of Cationic Polymers as Primary Coagulants in Water Treatment. In *Chemical Water and Wastewater Treatment V*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1998, 173–185.

Boratyński PJ, Zielińska-Błajet M, Skarżewski J. Cinchona Alkaloids-Derivatives and Applications. *Alkaloids Chem Biol*, 2019, 82, 29-145.

Bosak A, Katalinić, M., Kovarik, Z. Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija, *Arh Hig Rada Toksikol*, 2011, 62(2), str. 175-189.

Bosak A, Ramić A, Šmidlehner T, Hrenar T, Primožič I, et al. Design and evaluation of selective butyrylcholinesterase inhibitors based on Cinchona alkaloid scaffold. *PLOS ONE*, 2018, 13(10).

Bosak A; Primožič I; Oršulić M; Tomić S; Simeon-Rudolf V. Enantiomers of quinuclidin-3-ol derivatives: Resolution and interactions with human cholinesterases. *Croat Chem Acta* 2005, 78, 121–128.

Brimijoin S, Chen VP, Pang YP, Geng L, Gao Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem Biol Interact*, 2016, 259 (dio B).

Brodaty H, Corey-Bloom J, Potocnik FC, Truyen L, Gold M, Damaraju CR. Galantamine prolonged-release formulation in the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2005, 20 (2-3), 120-32.

Buffet-Bataillon S; Tattevin P; Bonnaure-Mallet M; Jolivet-Gougeon A. Emergence of Resistance to Antibacterial Agents: The Role of Quaternary Ammonium Compounds-a Critical Review. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39 (5), 381–389.



Bui T, Patel P, Preuss CV. Cephalosporins. [Ažurirano 12. veljače 2024.]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>, pristupljeno 10. 06. 2024.

Callizot N, Campanari ML, Rouvière L, Jacquemot G, Henriques A, Garayev E, Poindron P. Huperzia serrata Extract 'NSP01' With Neuroprotective Effects-Potential Synergies of Huperzine A and Polyphenols. *Front Pharmacol*, 2021, 12:681532.

Cefalosporini, Wreth BJ. MSD medicinski priručnik za pacijente 2024. <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=18170>, pristupljeno 25.06.2024.

Chandra Bharadway K, Gupta T, Singh RM. Alkaloid group of Cinchona officinalis: structural, synthetic, and medicinal aspects. U: Synthesis of Medicinal Agents from Plants. Tewari A, Tiwari S, urednici, Elsevier, 2018, 9, str. 205-227.

Chaplin CE. Bacterial Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants. *J Bacteriol*, 1952, 63 (4), 453–458.

Chen, XQ; Mobely, WC, Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A $\beta$  and Tau species. *Front Neurosci*, 2019, 13, 1–21.

Chopin L, Walpole C, Seim I, Cunningham P, Murray R, Whiteside E, Josh P, Herington A. Ghrelin and cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 340(1), 65-9.

Consalvo D, Stahl W. The molecular structure of quinuclidine obtained by high resolution microwave spectroscopy. *J Mol Struct*, 1998, 447, 1–2, 119-126.

Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimer's Dement: Transl Res Clin Interv*, 2020, 6.

Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 2013, (3), 315-35.

Darvesh S, Darvesh KV, McDonald RS, Mataija D, Walsh R, Mothana S, Lockridge O, Martin E. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J Med Chem*, 2008, 51(14), 4200-12.

Darvesh S, Grantham DL, Hopkins DA. Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 1998, 393, 374–90.

Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4, 131-8.

Deleuze MS, Leigh DA, Zerbetto FJ. *Am Chem Soc*, 1999, 121, 2364.

Demar JC, Clarkson ED, Ratcliffe RH, Campbell AJ, Thangavelu SG, Herdman CA, Leader H, Schulz SM, Marek E, Medynets MA, Ku TC, Evans SA, Khan FA, Owens RR, Nambiar MP, Gordon RK. Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 2010, 187(1-3), 191-8.

Dhuguru J, Zviagin E, Skouta R. FDA-Approved Oximes and Their Significance in Medicinal Chemistry. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(1), 66.

Diehl A, Nakovics H, Croissant B, Smolka MN, Batra A, Mann K. Galantamine reduces smoking in alcohol-dependent patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2006, 44(12), 614-22.

Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*, 2010, 187(1-3), 10-22.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7, 88-95.

Erkinjuntti T, Román G, Gauthier S, Feldman H, Rockwood K. Emerging therapies for vascular dementia and vascular cognitive impairment. *Stroke*, 2004, 35(4), 1010–1017.

Favre HA, Powell WH. Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, Plava knjiga, 2014, str. 169.

Fulco CE, Liverman CT, Sox HC i sur. Pyridostigmine Bromide. U: Gulf War and Health: Volume 1. Depleted Uranium, Sarin, Pyridostigmine Bromide, Vaccines. Institute of Medicine (US) Committee on Health Effects Associated with Exposures During the Gulf War. Washington (DC), National Academies Press (US), 2000, 207-266.

Giacobini E, Spiegel R, Enz A, Veroff AE, Cutler NR. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J Neural Transm (Vienna)*, 2002, 109(7–8), 1053–1065.

Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to the Alzheimer therapy. U: Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. Giacobini E, urednik, London, Martin Dunitz Ltd., 2000, 181-227.

Giri S, Inostroza-Rivera, R Herrera, B. i sur. The mechanism of Menshutkin reaction in gas and solvent phases from the perspective of reaction electronic flux. *J Mol Model*, 2014, 20, 2353.

Golomb BA. Acetylcholinesterase inhibitors and Gulf War illnesses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(11), 4295-300.

Gupta R, Parmar M. Pralidoxime. [Ažurirano 1. svibnja 2023]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558908/>, pristupljeno 15.06.2024.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, udžbenik, 12. izdanje. Kukulja Taradi S, Andreis I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. **551-552**, str. **729-733**.

Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 2018, 141(7), 1917-1933.

Hansen SH; Nordholm L. N-alkylation of tertiary aliphatic amines by chloroform, dichloromethane and 1,2-dichloroethane. *J Chromatogr A*, 1981, 204, 97–101.

Hu J, Ben Maamar S, Glawe AJ, Gottel N, Gilbert JA, Hartmann E. M. Impacts of Indoor Surface Finishes on Bacterial Viability. *Indoor Air*, 2019, 29 (4), 551–562.

Huang YJ, Huang Y, Baldassarre H, Wang B, Lazaris A, Leduc M, Bilodeau AS, Bellemare A, Côté M, Herskovits P, Touati M, Turcotte C, Valeanu L, Lemée N, Wilgus H, Bégin I, Bhatia B, Rao K, Neveu N, Brochu E, Pierson J, Hockley DK, Cerasoli DM, Lenz DE, Karatzas CN, Langermann S. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(34). 13603-8.

Kalola UK, Nguyen H. Galantamine. [Ažurirano 12. ožujka 2023.]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574546/>, pristupljeno 14. 06. 2024.

Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, Karanam AK, Christopher S. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging*, 2017, 12, 697-707.

Kassa J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2002, 40 (6), 803–16.

Katalinić M, Rusak G, Domaćinović Barović J, Šinko G, Jelić D, Antolović R, Kovarik Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem*, 2010;45:186-92.

Katzung BG. Temeljna i klinička farmakologija. 14. izdanje. Trkulja V, Klarica M, Šalković-Petrišić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 69a, str. 93-96b, str. 115-123c, str. 130-133d, str. 1062-1063e.

Kihara Y, Chun J. Molecular and neuroimmune pharmacology of S1P receptor modulators and other disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*, 2023, 246.

Kim J, Lee HJ, Park SK, Park JH, Jeong HR, Lee S, Lee H, Seol E, Hoe HS. Donepezil Regulates LPS and A $\beta$ -Stimulated Neuroinflammation through MAPK/NLRP3 Inflammasome/STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19), 10637.

Kojo H, Mine Y, Nishida M, Goto S, Kuwahara S. Nature of monocyclic beta-lactam antibiotic Nocardicin A to beta-lactamases. *Microbiol Immunol*, 1988, 32(2), 119-30.

Kosmalski T, Kupczyk D, Baumgart S, Paprocka R, Studzińska R. A Review of Biologically Active Oxime Ethers. *Molecules*, 2023, 28(13), 5041.

Kovarik Z, Zorbaz T. Neuropharmacology: Oxime antidotes for organophosphate pesticide and nerve agent poisoning. *Period Biol*, 2020, 121-122(1-2), 35–54.

Kryger G, Harel M, Giles K, Toker L, Velan B, Lazar A, Kronman C, Barak D, Ariel N, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr Sect D*, 2000, 56, 1385-94.

Kumar A, Gupta V, Sharma S. Donepezil. [Ažurirano 17. kolovoza 2023]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513257/>, pristupljeno 14. 06. 2024.

Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Rep*, 2015, 67, 195–203.

Laučan M, *O*-benziloksimi kao inhibitori butirilkolinesteraze, diplomski rad, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2023.

Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2019. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14.

Lilienfeld S. Galantamine--a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev*, 2002, 8(2), 159-76.

Liu HX, Liu CF, Yang WH. Clinical study of continuous micropump infusion of atropine and pralidoxime chloride for treatment of severe acute organophosphorus insecticide poisoning. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78(12), 709-13.

Locock K, Tran H, Codd R, Allan R. Hands-On Approach to Structure Activity Relationships: The Synthesis, Testing, and Hansch Analysis of a Series of Acetylcholinesterase Inhibitors. *J Chem Educ*, 2015, 92 (10), 1745-1750.

Low P, Pregled autonomnog živčanog sustava. MSD medicinski priručnik za pacijente. <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=16999>, pristupljeno 13. 7. 2024.

Lučić A, Radić B, Peraica M, Mesic, M, Primožič I, Binenfeld Z. Antidotal efficacy of quinuclidinium oximes against soman poisoning. *Arch. Toxicol*, 1997, 71, 467–470.

Manavalan P, Taylor P, Johnson WC Jr. Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands. *Biochim Biophys Acta*. 1985, 829(3), 365-70.

Marteinson SC, Lawrence MJ, Taranu ZE, Kosziwka K, Taylor JJ, Green A, Winegardner AK, Rytwinski T, Reid JL, Dubetz C, Leblanc J, Galus MD, Cooke SJ. Increased Use of Sanitizers and Disinfectants during the COVID-19 Pandemic: Identification of Antimicrobial Chemicals and Considerations for Aquatic Environmental Contamination. *Environ Rev*, 2023, 31, 76.

Martinez-Rubio C, Paulk AC, McDonald EJ, Widge AS, Eskandar EN. Multimodal Encoding of Novelty, Reward, and Learning in the Primate Nucleus Basalis of Meynert. *J Neurosci*, 2018, 38(8), 1942-1958.

Maruoka K, Yamamoto H. Functional Group Transformations via Carbonyl Derivatives. U: Comprehensive Organic Synthesis. Barry M. Trost, Ian Fleming, urednici, Pergamon, 1991, str. 763-793.

Masson P, Froment M-T, Bartels CF, Lockridge O. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem*, 1996, 235, 36-48.

Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact*, 2005, 157-158, 3-14.

Matošević A, Radman Kastelic A, Mikelić A, Zandona A, Katalinić M, Primožič, I, Bosak, A, Hrenar, T. Quinuclidine-Based Carbamates as Potential CNS Active Compounds. *Pharmaceutics* 2021, 13 (3), 420.

McGleenon BM, Dynan KB, Passmore AP. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, 48(4), 471-80.

Meden A, Knez D, Brazzolotto X, Modeste F, Perdih A, Pišlar A, Zorman M, Zorović M, Denic M, Pajk S, Živin M, Nachon F, Gobec S. Pseudo-irreversible butyrylcholinesterase inhibitors: Structure-activity relationships, computational and crystallographic study of the N-dialkyl O-arylcarbamate warhead. *Eur J Med Chem*, 2023, 247.

Mehta M, Adem A, Sabbagh M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Int. J Alzheimers Dis*, 2011, 2012.

Menshutkin reaction, 2024, [https://en.wikipedia.org/wiki/Menshutkin\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Menshutkin_reaction), pristupljeno 10.06.2024.

Mijastenija gravis, Hrvatska Enciklopedija, 2024., <https://www.enciklopedija.hr/clanak/miastenija-gravis>, pristupljeno 09. 06. 2024.

Mishra M, Mishra VK, Kashaw V, Iyer AK, Kashaw SK. Comprehensive review on various strategies for antimalarial drugdiscovery. *Eur J Med Chem*, 2017, 125, 1300–1320.

Mohapatra S, Yutao L, Goh SG, Ng C, Luhua Y, Tran NH, Gin KY. Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. *J Hazard Mater*, 2023, 445.

Nachon F, Masson P, Nicolet Y, Lockridge O, Fontecilla-Camps JC. Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. U: Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors. Giacobini E, urednik. London: Martin Dunitz Ltd., 2003, str. 39.

Namba T, Nolte CT, Jackrel J, Grob D. Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Am J Med*, 1971, 50(4), 475-92.

Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Velan B, Shafferman A. Dissection of the human acetylcholinesterase active centre determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem*, 1993, 268, 17083-95.

Pagano G, Rengo G, Pasqualetti G, Femminella GD, Monzani F, Ferrara N, Tagliati M. Cholinesterase inhibitors for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2015, 86(7), 767-73.

Paroni G, Bisceglia P, Seripa D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(2), 493-510.

Patrick GL. An introduction to Medicinal Chemistry, drugo izdanje. New York, Oxford University Press, **2001d**, str. 446.

Patrick GL. Anticholinesterases and acetylcholinesterase. U: An introduction to Medicinal Chemistry, drugo izdanje. New York, Oxford University Press, **2001a**, str. 468-479.

Patrick GL. Anticholinesterases as „smart drugs“. U: An introduction to Medicinal Chemistry, drugo izdanje. New York, Oxford University Press, **2001c**, str. 481-482.

Patrick GL. Pralidoxime – an organophosphate antidote. U: An introduction to Medicinal Chemistry, drugo izdanje. New York, Oxford University Press, **2001b**, str. 479-481.

Pauwels B, Boydens C, Brouckaert P, Van de Voorde J. Oximes induce erection and are resistant to oxidative stress. *J Sex Med*, 2015, 12(4), 906-15.

Pereira EF, Aracava Y, Alkondon M, Akkerman M, Merchenthaler I, Albuquerque EX. Molecular and cellular actions of galantamine: clinical implications for treatment of organophosphorus poisoning. *J Mol Neurosci*, 2010, 40(1-2), 196-203.

Peterson, B. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*, 2019, 15 (3), 321–387.

Pine SH. Nukleofilne adicije na karbonilnu grupu – aldehidi i ketoni. U: Organska kemija, 3. promijenjeno izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 1994., str. 81-109.

Plavšić F, Žuntar I. Pesticidi. U: Uvod u analitičku toksikologiju. Zagreb, Školska knjiga, 2006.

Primožič I, Hrenar T, Tomić S. Binding Modes of Quinuclidinium Esters to Butyrylcholinesterase. *Croat Chem Acta*, 2012, 85, 77–83.

Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci*, 2009, 11(2), 111-28.

Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev*, 1987, 87, 955–975.

Radić Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 1993, 32, 12074-84.

Radić Z, Reiner E, Taylor P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol*, 1991, 39, 98-104.

Radman Kastelic A, Odžak R, Pezdirc I, Sović K, Hrenar T, Čipak Gašparović A, Skočibušić M, Primožič I. New and Potent Quinuclidine-Based Antimicrobial Agents. *Molecules*. 2019, 24(14), 2675.

Razay G, Wilcock GK. Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, 2008, 8(1), 9-17.

Reiner E, Aldridge N, Simeon V, Radic Z, Taylor P. Mechanism of substrate inhibition of acetylcholinesterase. U: *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. Massoulié J, Bacou F, Barnard E, Chatonnet A, Doctor BP, Quinn DM, urednici, American Chemical Society, 1991, 227–228.

Reiner E, Radić Z. Mechanism of action of cholinesterase inhibitor. U: *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. Giacobini E, urednik, London, Delhi, Martin Dunitz Ltd., Informa Healthcare, 2000, 103-120.

Reiner E, Škrinjarić-Špoljar M, Dunaj S, Simeon-Rudolf V, Primožič I. 3-hydroxyquinuclidinium derivatives: Synthesis of compounds and inhibition of acetylcholinesterase. *Chem Biol Interact*, 1999, 120, 173–181.

Remijn-Nelissen L, Bakker W, van Gelder, T, Tannemaat M, Verschuuren, J, Symptomatic, pharmacological treatment of myasthenia gravis. *RRNMF Neuromuscular Journal*, 2023, 4(3).

Ripoll DR, Faerman CH, Sussman JL. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90, 5128-32.

Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Can Med Assoc J*, 2016, 188, 1157–1165.

Sam C, Bordoni B. Physiology, Acetylcholine. [Ažurirano 10. travnja 2023]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>, pristupljeno 20. lipnja 2024.

Sanson B, Colletier JP, Xu Y, Lang PT, Jiang H, Silman I, Sussman JL, Weik M. Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Sci*, 2011, 20(7), 1114-8.

Sharma P, Srivastava P, Seth A, Tripathi PN, Banerjee AG, Shrivastava SK. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies. *Prog Neurobiol*, 2019, 174, 53-89.

Shinitzky M, Dudai Y, Silman I. Spectral evidence for the presence of tryptophan in the binding site of acetylcholinesterase. *FEBS Lett*, 1973, 30, 125–128.

Simeon-Rudolf V, Reiner E, Skrinjarić-Spoljar M, Radić B, Lucić A, Primožič I, Tomić S. Quinuclidinium-imidazolium compounds: synthesis, mode of interaction with acetylcholinesterase and effect upon Soman intoxicated mice. *Arch Toxicol*, 1998, 72(5), 289-95.

Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*, 2020, 36(1), 1-12.

Singh R, Sadiq NM. Cholinesterase Inhibitors. [Ažurirano 17. srpnja 2023.]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544336/>, pristupljeno 21. lipnja 2024.

Smith MB, March J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure. New York, Wiley-interscience, a J. Wiley & sons, inc., publication, 2001, 2112.

Spahić Z; Hrenar T; Primožič I. Polytopal Rearrangement Governing Stereochemistry of Bicyclic Oxime Ether Synthesis. *Int J Mol Sci*, 2022, 23, 12331.

Sterling GH, Doukas PH, Jackson C, Caccese R, O'Neill KJ, O'Neill JJ. 3-Carbamyl-N-allylquinuclidinium bromide. Effects on cholinergic activity and protection against soman. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(2), 465-72.

Symptoms – Parkinson's disease. National Health Service (NHS). <https://www.nhs.uk/conditions/parkinsons-disease/symptoms/>, pristupljeno 9.6.2024.

Szegletes T, Mallender WD, Thomas PJ, Rosenberry TL. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*, 1999, 38, 122–133.

Šimić G. Neurobiologija demencije, 2003., <http://dementia.hiim.hr/neuro.htm>, pristupljeno 08. 06. 2024.

Taylor P, Lappi S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry*, 1975. 14, 1989–1997.

Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994, 34, 281–320.

Tkalčić M, Pokrajac-Bulian A, Bosanac D, Tomić Z. Procjena kognitivnog statusa pacijenata s demencijom. *Psiholgijske Teme*, 2003, 12, str. 55–62.

Trang A, Khandhar PB. Physiology, Acetylcholinesterase. [Ažurirano 19. siječnja 2023]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing; 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>, pristupljeno 10. lipnja 2024.

Uyanik M, Ishihara K. Functional Group Transformations via Carbonyl Derivatives. U: Comprehensive Organic Synthesis (Second Edition). Knochel P, Molander GA, urednici, Elsevier, 2014, str. 573-597.

Vališ M, Achiron A, Hartung HP, Mareš J, Tichá V, Štourač P, Halusková S, Angelucci F, Pavelek Z. The Benefits and Risks of Switching from Fingolimod to Siponimod for the Treatment of Relapsing-Remitting and Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs R D*, 2023, 23(4), 331-338.

Villarroya M, García AG, Marco-Contelles J, López MG. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007, 16(12), 1987-98.



Wang P, Li H, Hassan MM, Guo Z, Zhang ZZ, Chen Q. Fabricating an Acetylcholinesterase Modulated UCNPs-Cu<sup>2+</sup> Fluorescence Biosensor for Ultrasensitive Detection of Organophosphorus Pesticides-Diazinon in Food. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(14):4071-4079.

Wang R, Tang XC. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals*, 2005, 14(1-2), 71-82.

Watson DG. Mass spectrometry. U: *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Harcourt Publishers Limited, 1999b, str. 167-193.

Watson DG. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. U: *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Harcourt Publishers Limited, 1999a, str. 145-166.

Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*. 1980, 35, 174-197.

Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New antimalarial drugs. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42, 5274–5293.

Wilson BW. 68 – Cholinesterases. U: *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Treće izdanje. Krieger R, urednik, Elsevier, 2010, 68, str. 1457-1478.

World Health Organization, 2015 Guidelines for the treatment of malaria, treće izdanje., [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y), pristupljeno 10. 07. 2024.

World Malaria Report, 2015, World Health Organization <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.

Wu M, Ma J, Ji L, Wang M, Han J, Li Z. Design, synthesis, and biological evaluation of rutacecarpine derivatives as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, 2019, 177, 198-211.

Yakhontov LN. The Chemistry of Quinuclidine. *Russ Chem Rev*, 1969, 38 (6), 470-489.

Yilmaz A, Koca M, Boga M, Kurt A, Ozturk T. Synthesis of Novel Oxime and Benzofuran Chemical Frameworks Possessing Potent Anticholinesterase Activity: A SAR Study Related to Alzheimer Disease. *ChemistrySelect*, 2023, 8(30).

Zandona A, Katalinić M, Šinko G, Radman Kastelic A, Primožič I, Kovarik Z. Targeting organophosphorus compounds poisoning by novel quinuclidine-3 oximes: Development of butyrylcholinesterase-based bioscavengers. *Arch Toxicol*, 2020, 94 (9), 3157–3171.

Zetterberg H, Bendlin BB. Biomarkers for Alzheimer's disease-preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(1), 296–308.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog rada klasičnim postupcima organske sinteze pripremljen je *O*-benzilni eter kinuklidin-3-on oksima reakcijom hidroklorida kinuklidin-3-ona i *O*-benzilhidroksilamina, bez dodatka anorganskih ili organskih baza. Kvaternizacijom kinuklidinskog atoma dušika u molekuli pripremljenog *O*-benziloksima s odabranim nesupstituiranim i različito supstituiranim benzil-bromidima (trifluormetilna ili trifluormetoksi skupina u *para* položaju, *tert*-butilna skupina u *para* ili *meta* položajima, atomi halogena na određenim pozicijama prstena) pripremljen je niz od devet spojeva, od kojih osam do sada nisu opisani u literaturi. Novosintetiziranim spojevima određeno je talište te je struktura potvrđena spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, 1D nuklearnom magnetskom rezonancijom te spektrometrijom masa. Nakon fizikalno-kemijske karakterizacije, svim spojevima određen je inhibitorski potencijal prema enzimu butirilkolinesterazi iz konjskog seruma (EC 3.1.1.8) korištenjem Ellmanove kolorimetrijske metode za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze. Svi ispitani spojevi reverzibilno su inhibirali enzim u mikro- i nanomolarnom području. Kao najsnažniji inhibitor pokazao se spoj **6**, kvaterni derivat oksima s dvije *tert*-butilne skupine u *meta* položajima na aromatskom prstenu benzilne skupine vezane na kvaterni dušikov atom kinuklidina ( $IC_{50} = 0,28 \pm 0,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ).

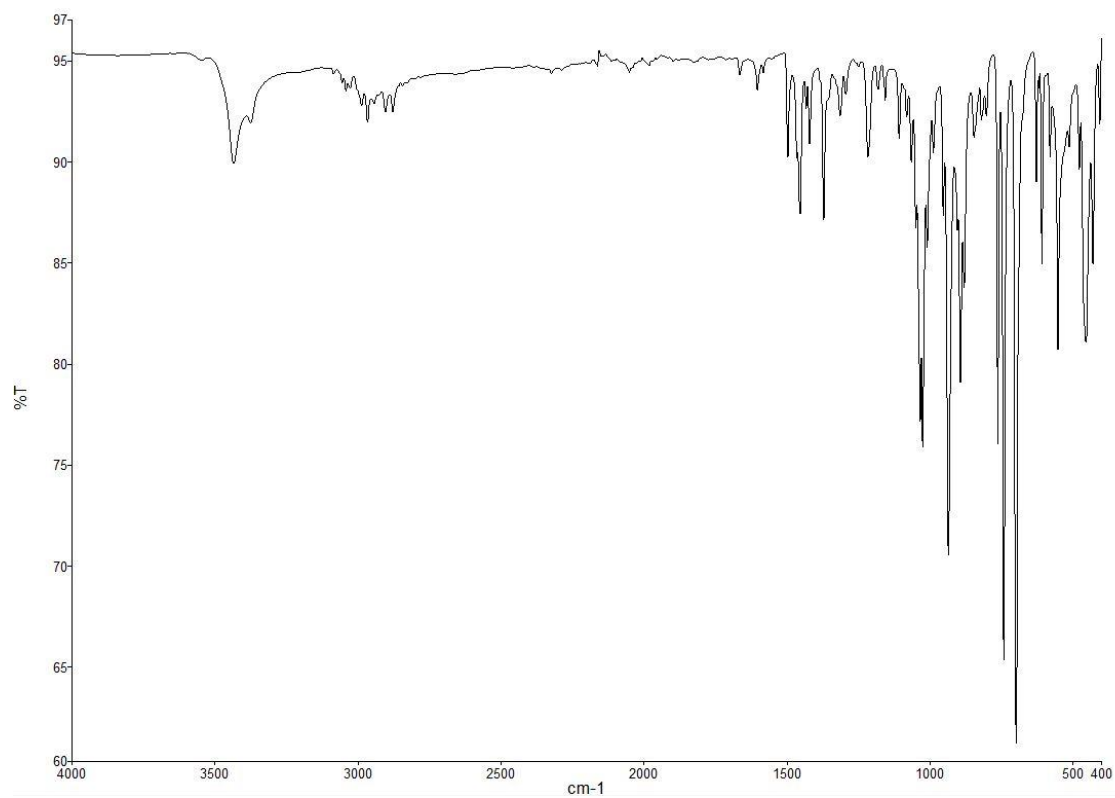
## SUMMARY

Within this work, *O*-benzyl ether quinuclidin-3-one oxime was prepared by the reaction of hydrochloride salts of quinuclidin-3-one and *O*-benzylhydroxylamine, without the addition of inorganic or organic bases. By quaternization of a quinuclidine nitrogen atom in a molecule prepared with *O*-benzyl oxime with unsubstituted and selected, differently substituted benzyl bromides (trifluoromethyl or trifluoromethoxy groups in the para- position, tert-butyl group in the para or meta positions, halogen compounds at certain benzene ring positions), a series of nine compounds, quaternary derivatives of quinuclidine, was prepared. Out of those nine, eight have not been described in the literature so far. The melting point of the newly synthesized compounds was determined, and the structure was characterized and confirmed by spectroscopic methods: infrared spectroscopy, 1D nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. Subsequent to physico-chemical characterization of the compounds, the inhibitory potential toward the enzyme butyrylcholinesterase from equine serum (EC 3.1.1.8) was determined using the Ellman colorimetric method to determine cholinesterase activity. All tested compounds reversibly inhibited the enzyme in the micromolar and nanomolar range. The strongest inhibitor was quaternary *O*-benzyl oxime derivative with two tert-butyl groups in meta positions on the quaternary quinuclidine benzyl group ( $IC_{50} = 0.28 \pm 0.01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ).

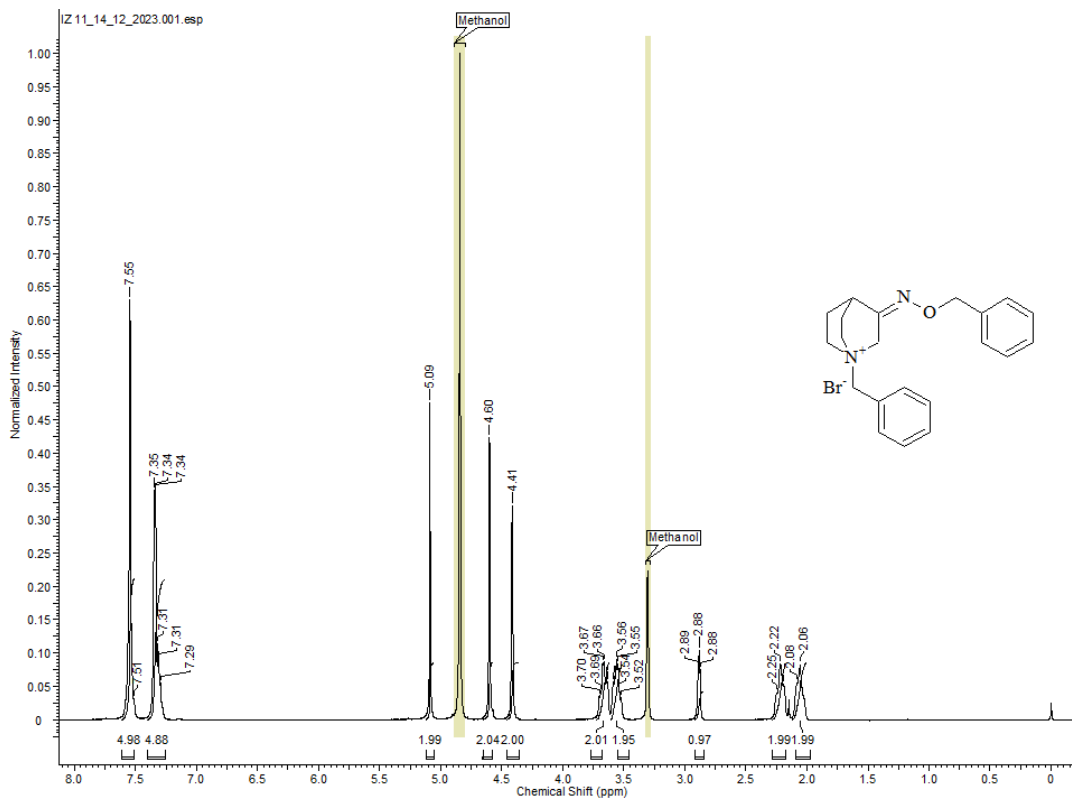
## 9. PRILOZI

### 9.1. IR i NMR spektri sintetiziranih spojeva

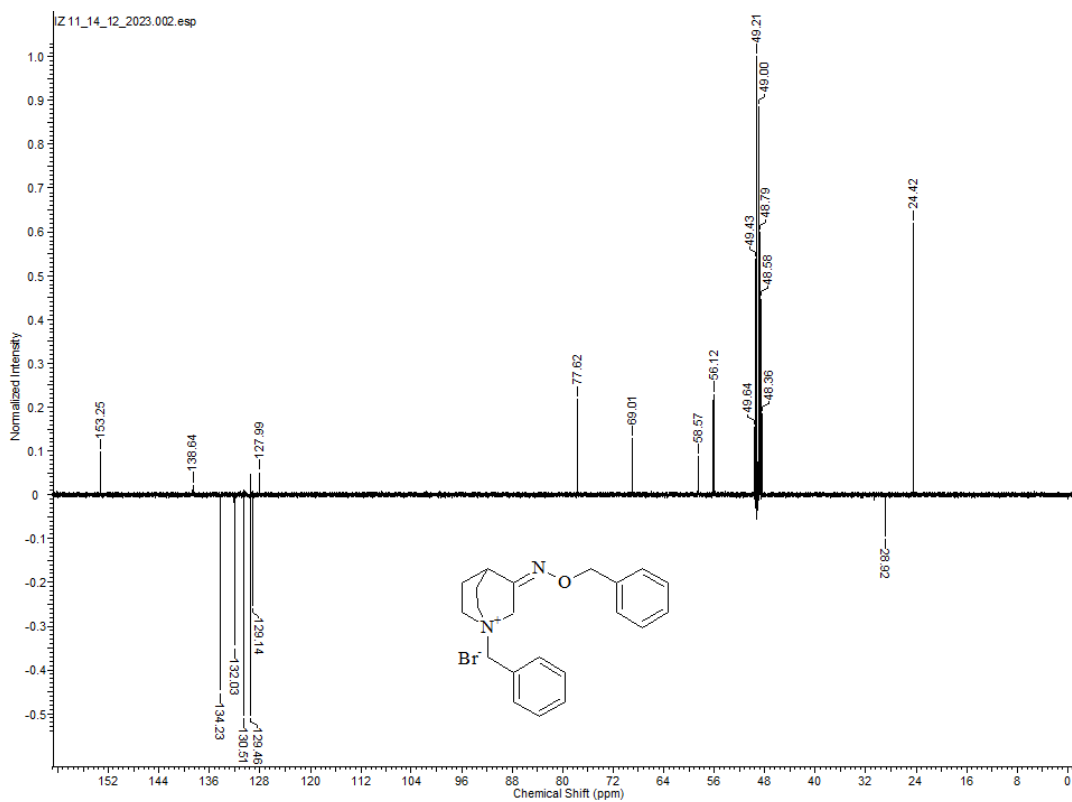
#### 9.1.1. *N*-benzil-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (2)



Slika P1. IR Spoja 2

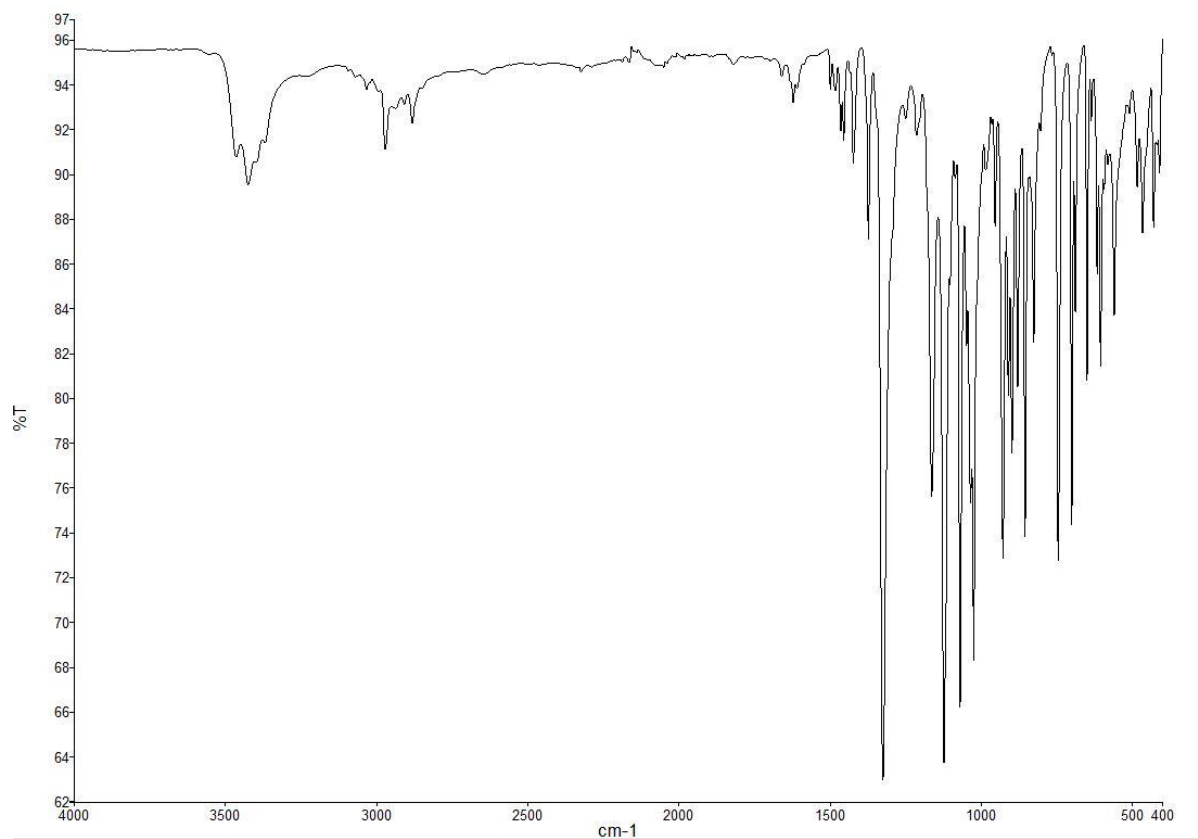


Slika P2.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **2** snimljen u MeOH- $d_4$

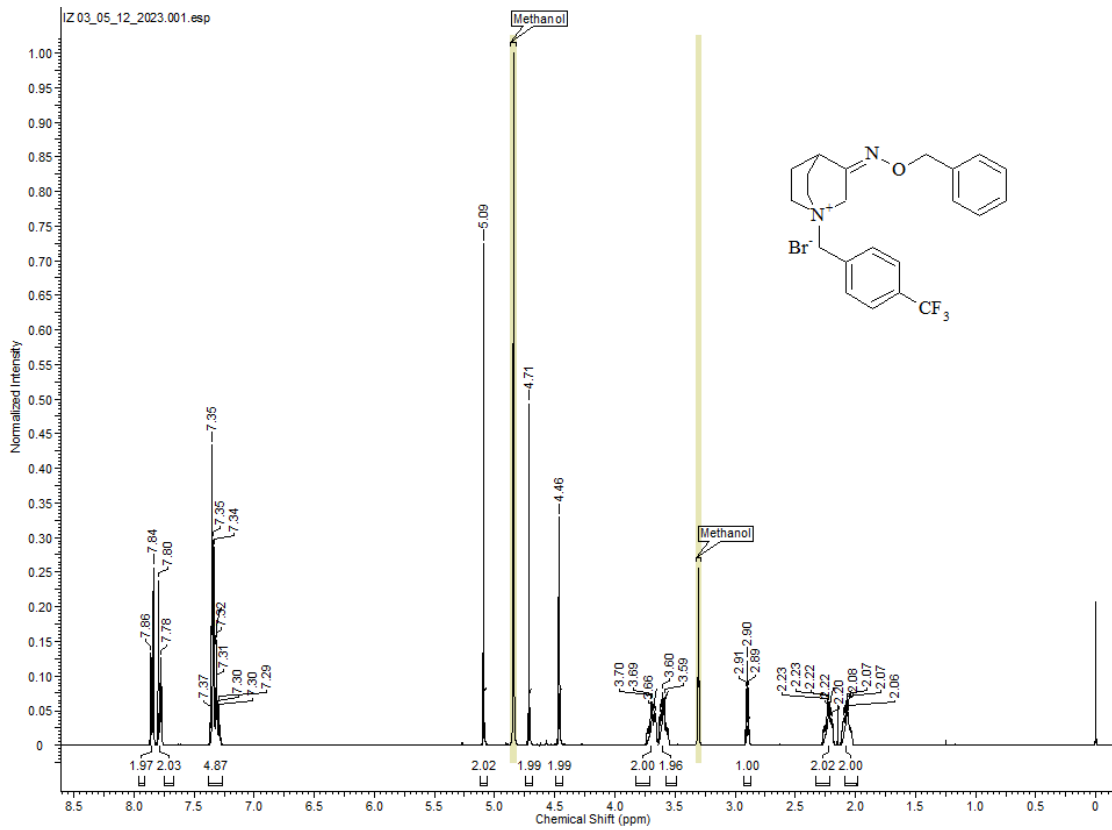


Slika P3. DEPT-Q spektar spoja **2** snimljen u MeOH- $d_4$

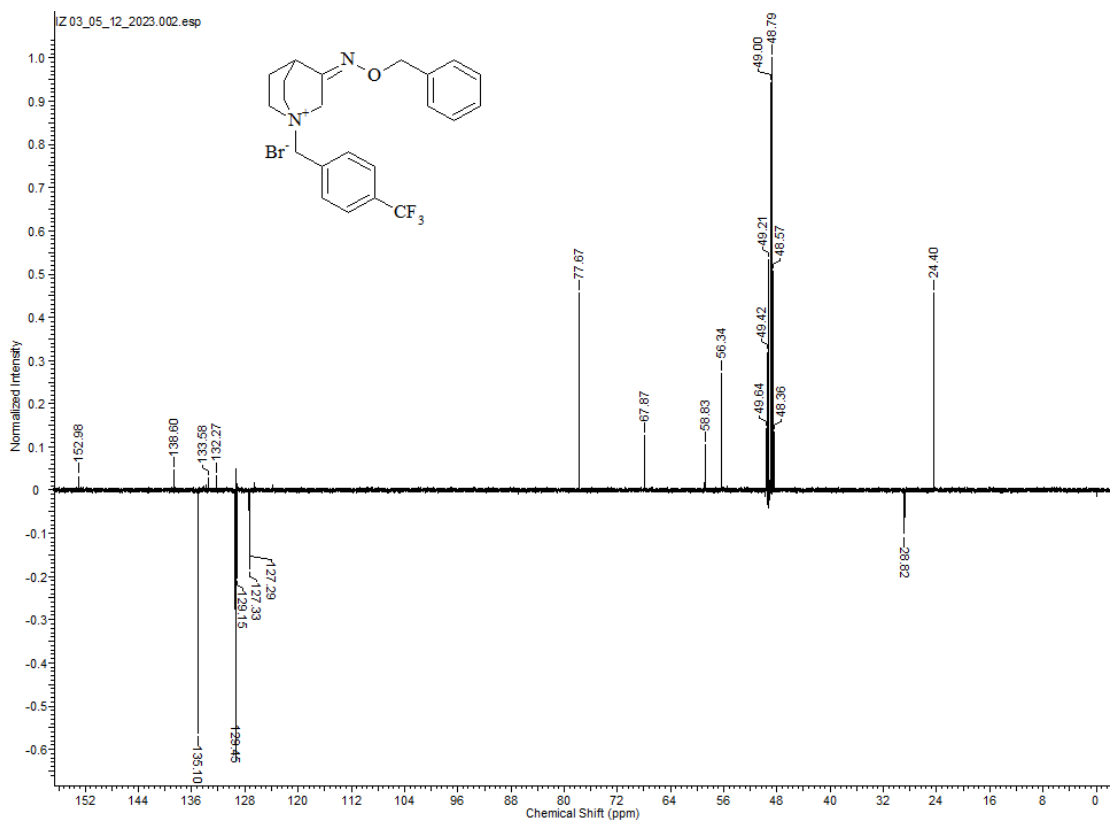
**9.1.2. N-(4-trifluormetil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (3)**



Slika P4. IR spektar spoja **3**

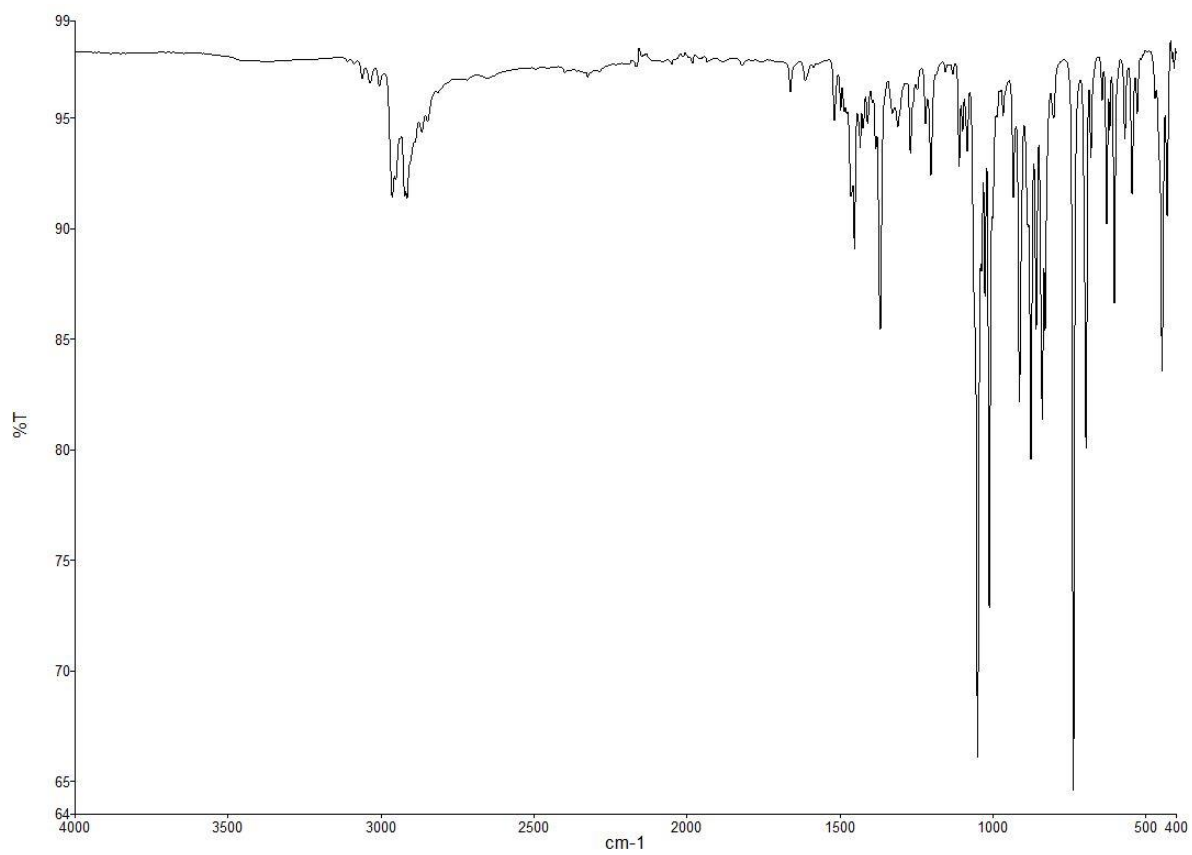


Slika P5. 1H NMR spektar spoja **3** snimljen u MeOH



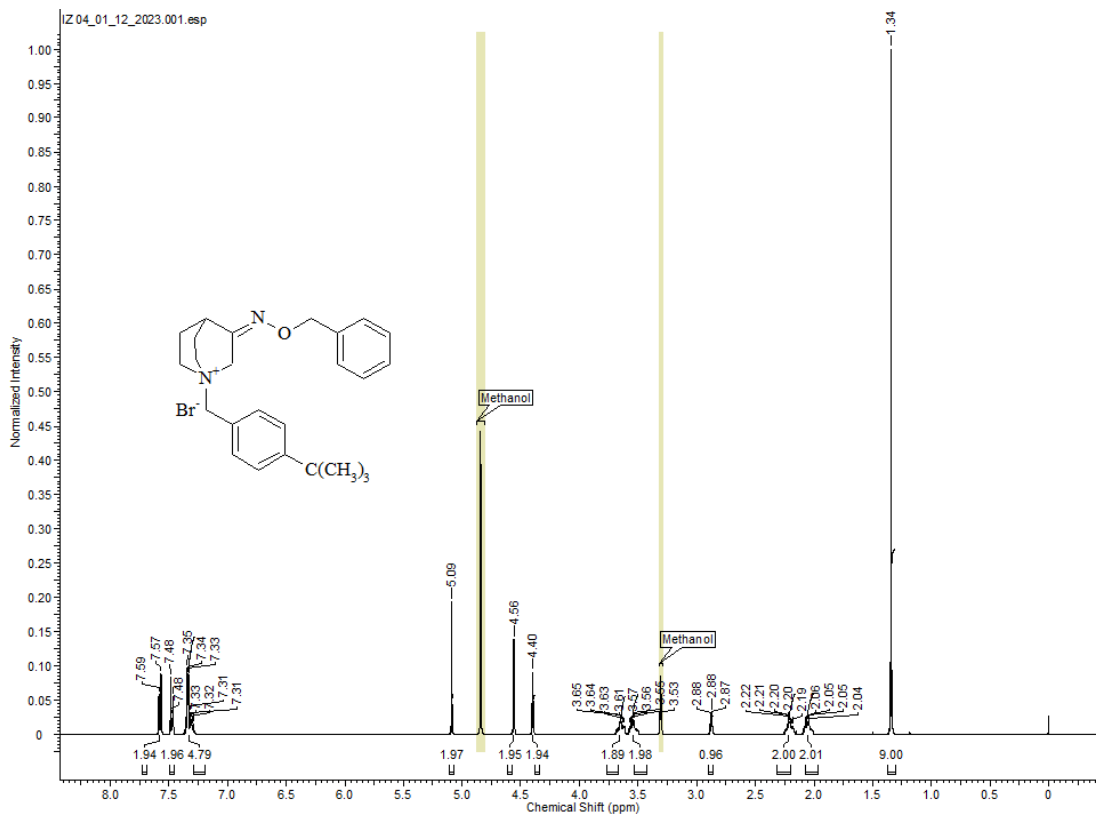
Slika P6. DEPT-Q spektar spoja **3** snimljen u MeOH-d<sub>4</sub>

**9.1.3. N-(4-*tert*-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (4)**

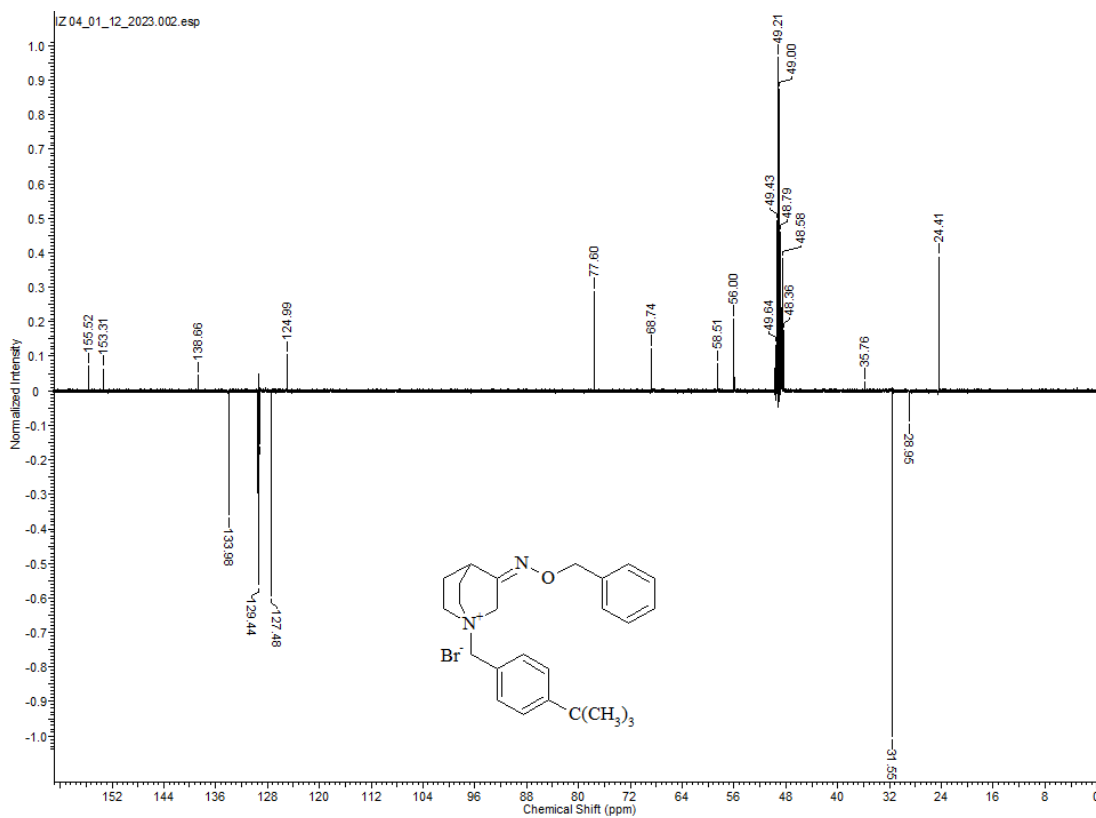


Slika P7. IR spektar spoja **4**



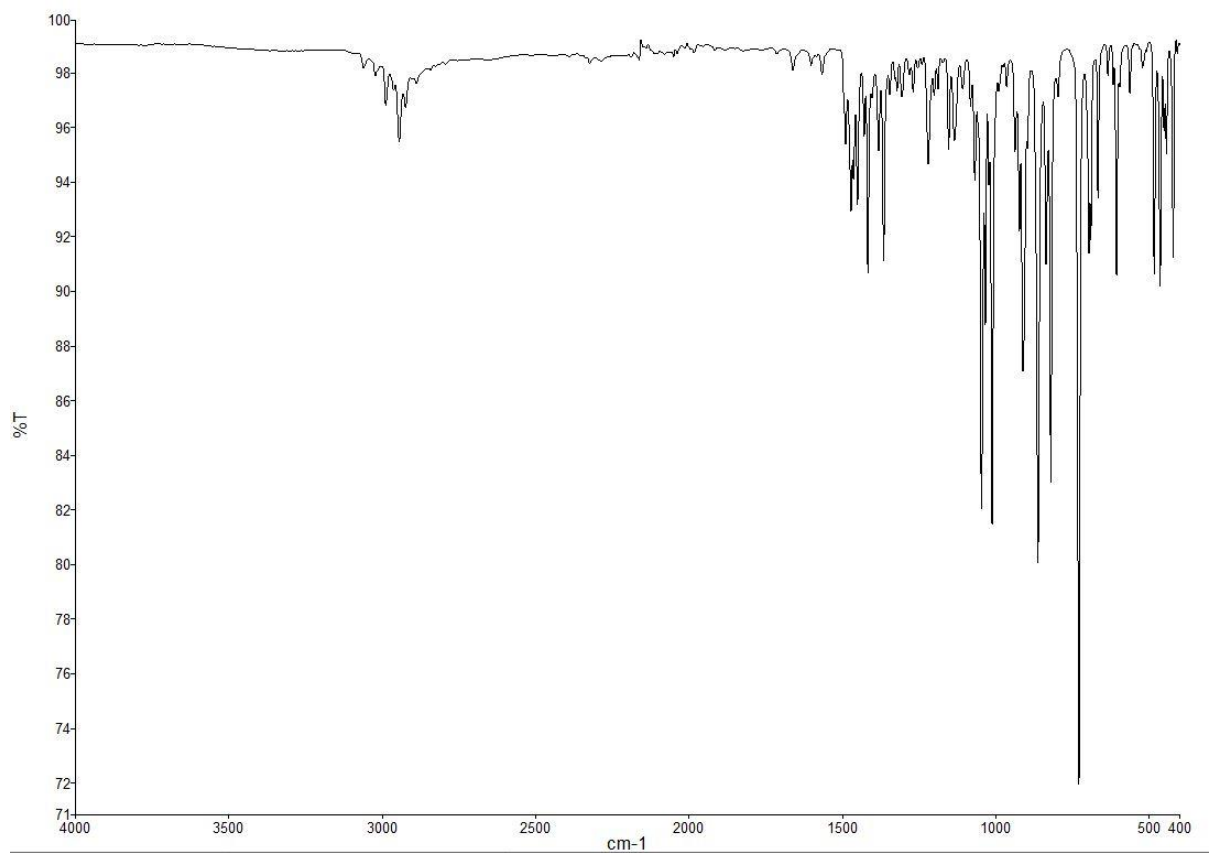


Slika P8.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **4** snimljen u MeOH- $d_4$

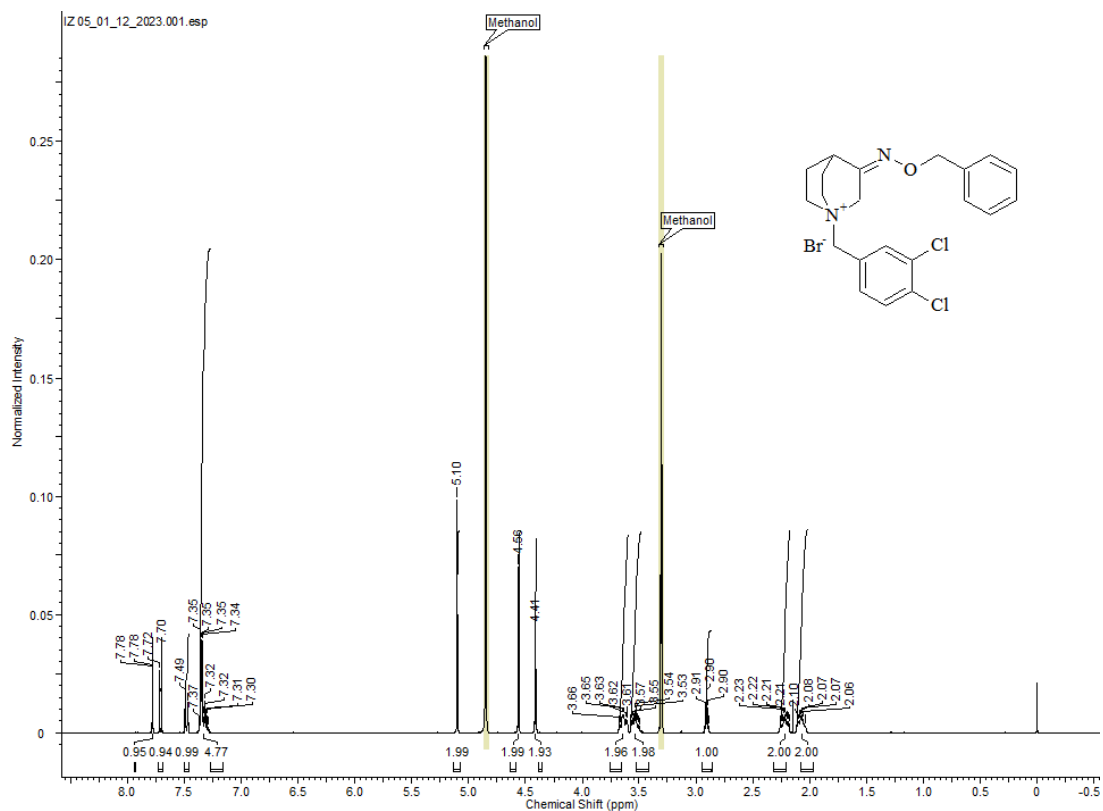


Slika P9. DEPT-Q spektar spoja **4** snimljen u MeOH- $d_4$

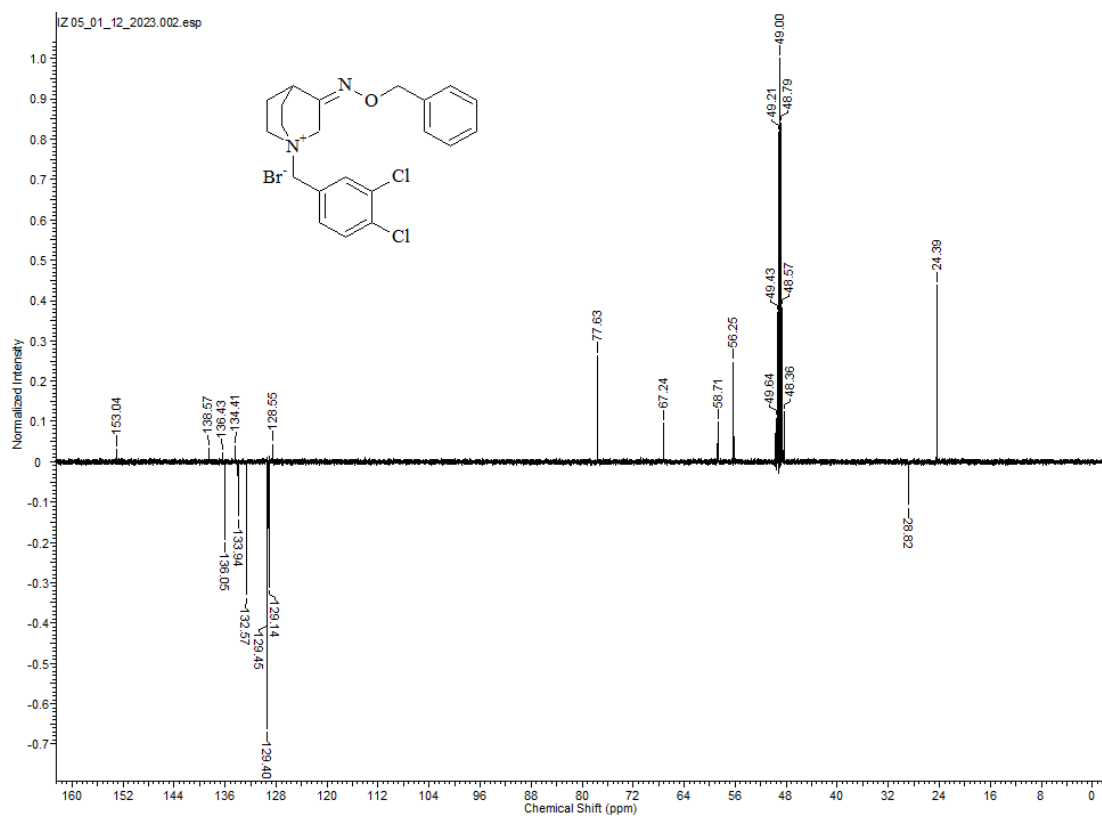
**9.1.4. N-(3,4-diklorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (5)**



Slika P10. IR spektar spoja **5**

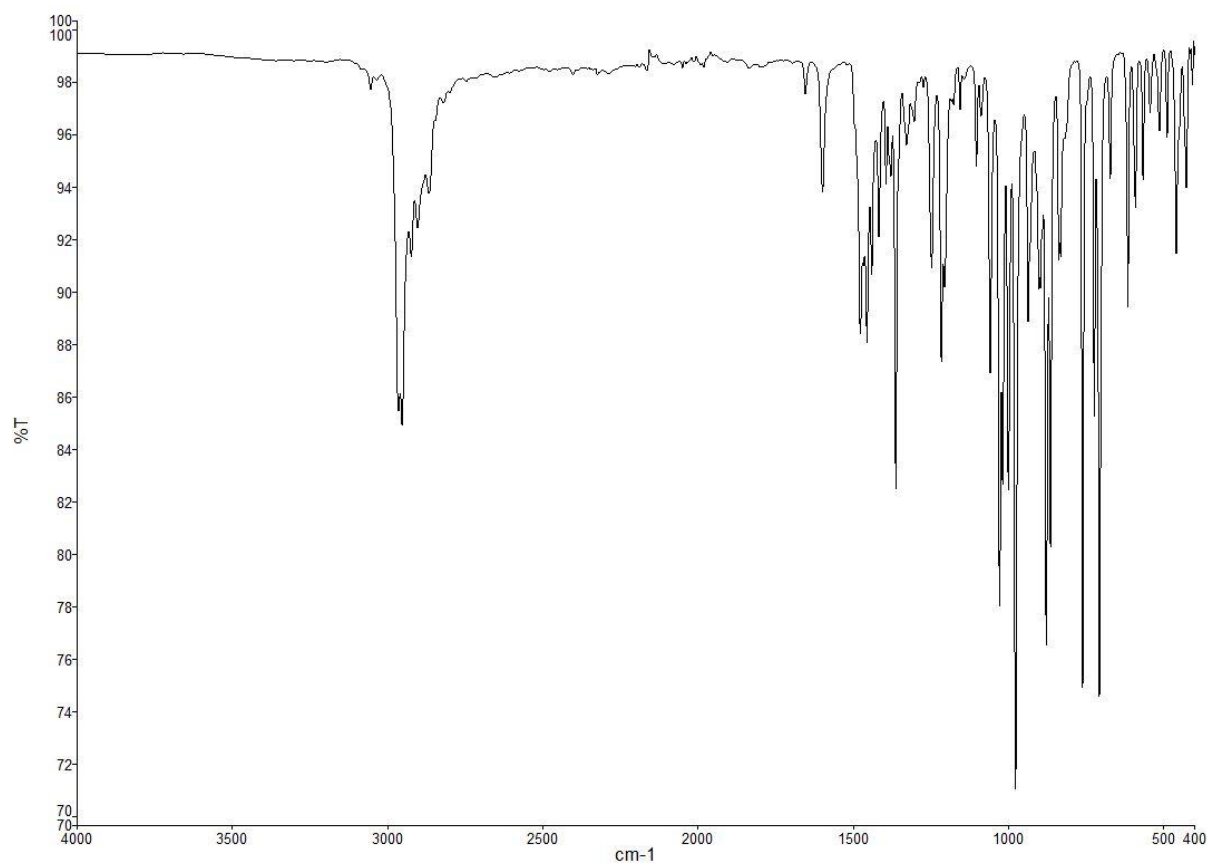


Slika P11.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **5** snimljen u MeOH- $d_4$



Slika P12. DEPT-Q spektar spoja **5** snimljen u MeOH- $d_4$

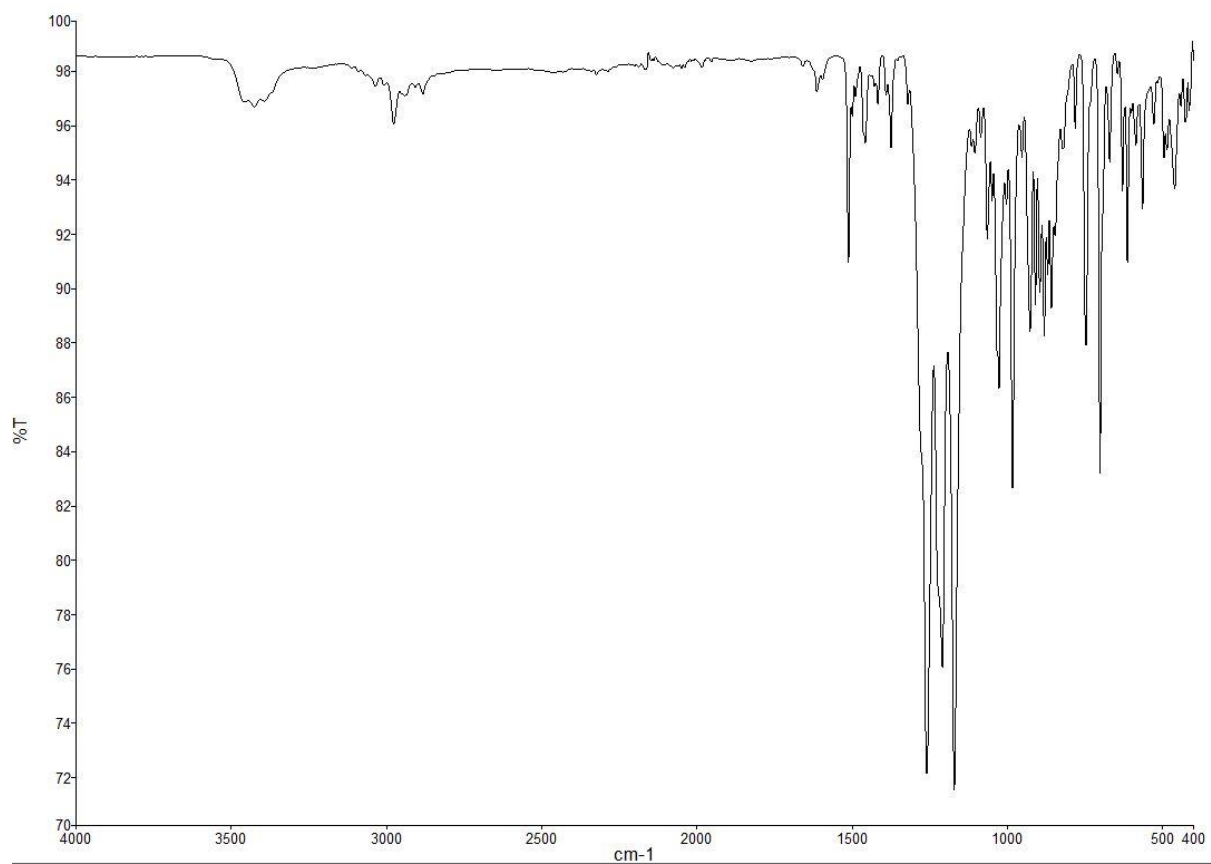
**9.1.5. N-(3,5-di-*tert*-butilbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (6)**



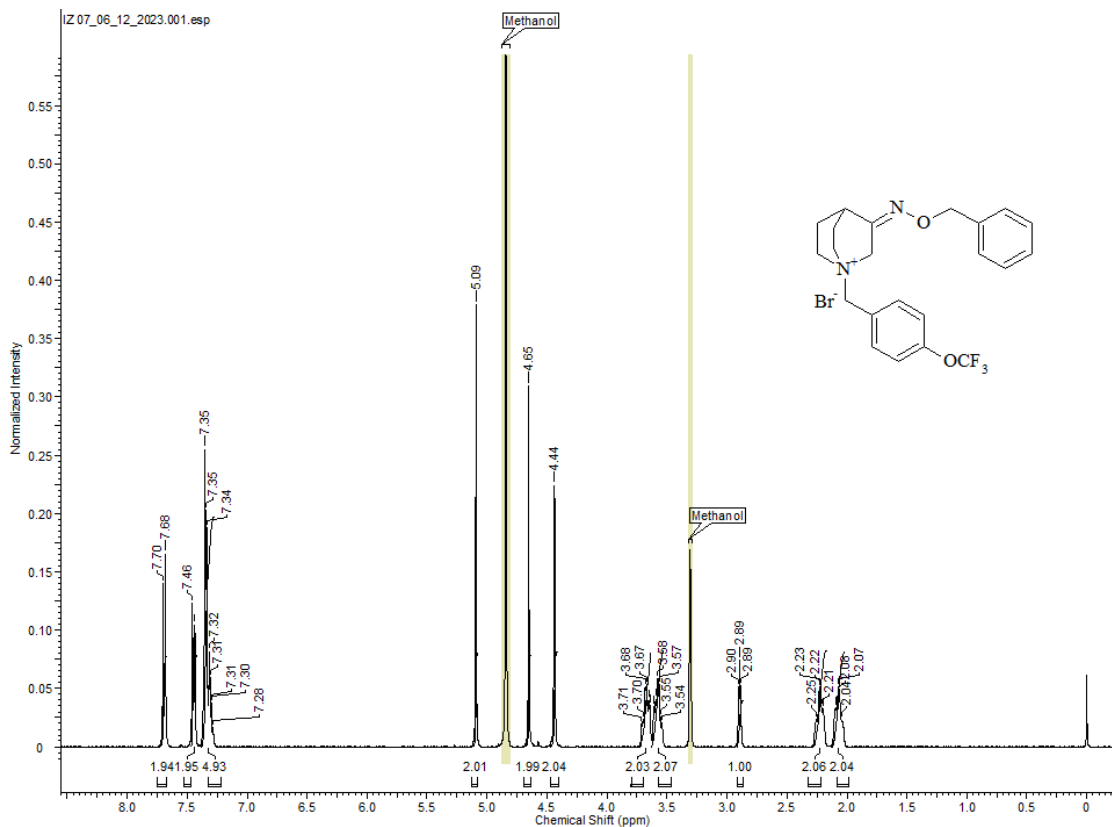
Slika P13. IR spektar spoja **6**



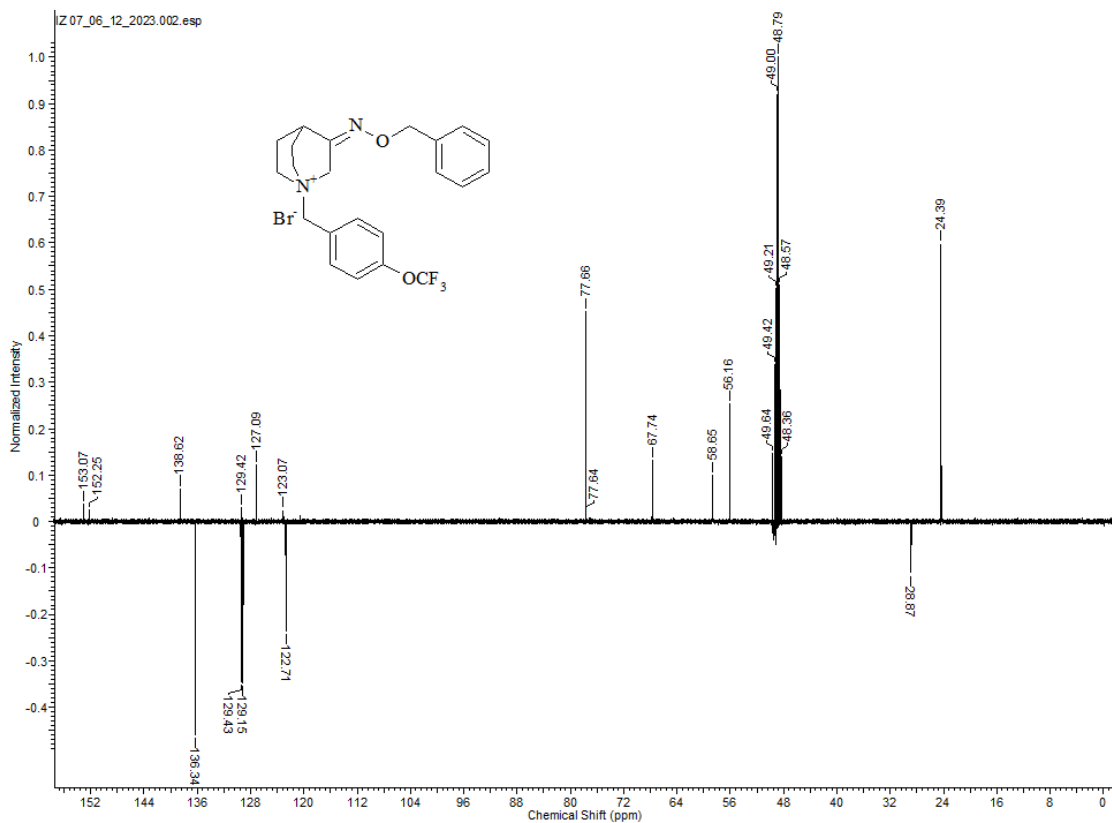
**9.1.6. N-(4-trifluorometoksibenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (7)**



Slika P16. IR spektar spoja **7**

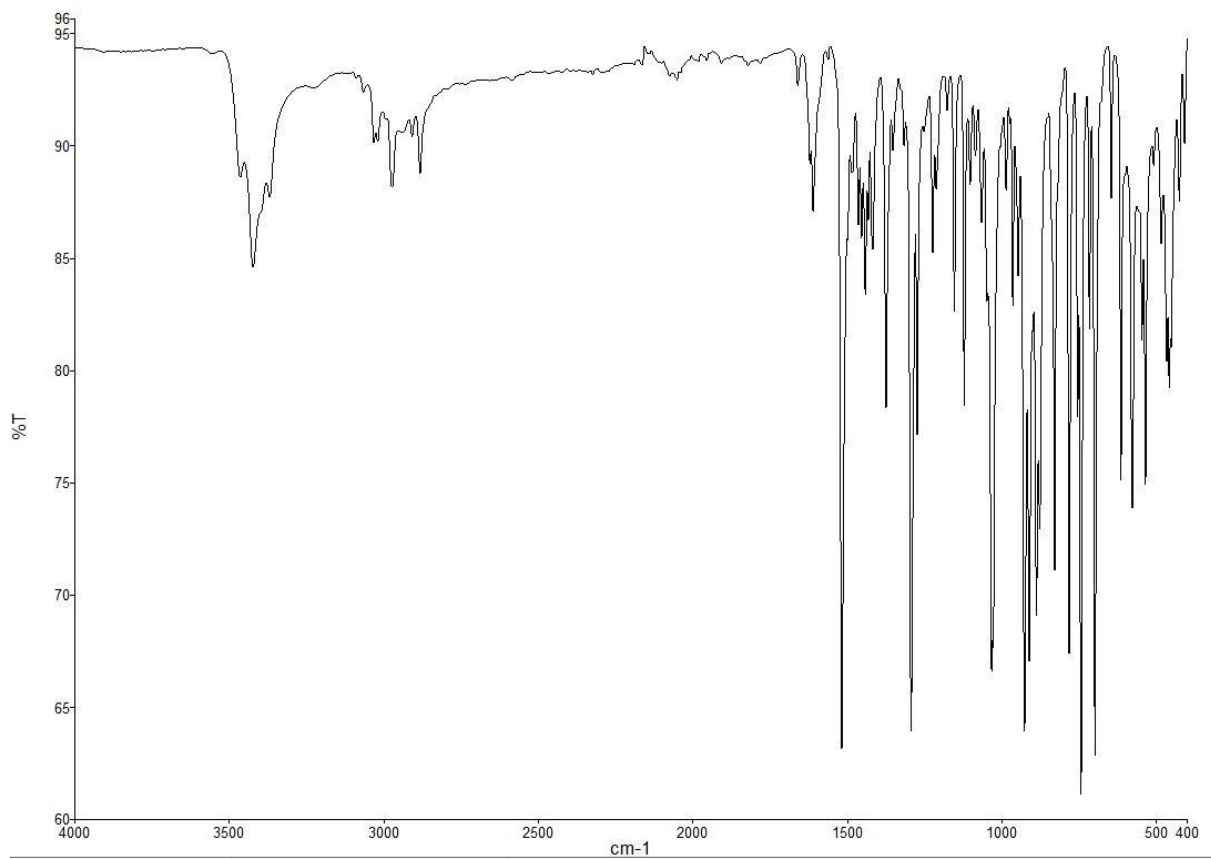


Slika P17. 1H NMR spektar spoja **7** snimljen u MeOH-d<sub>4</sub>



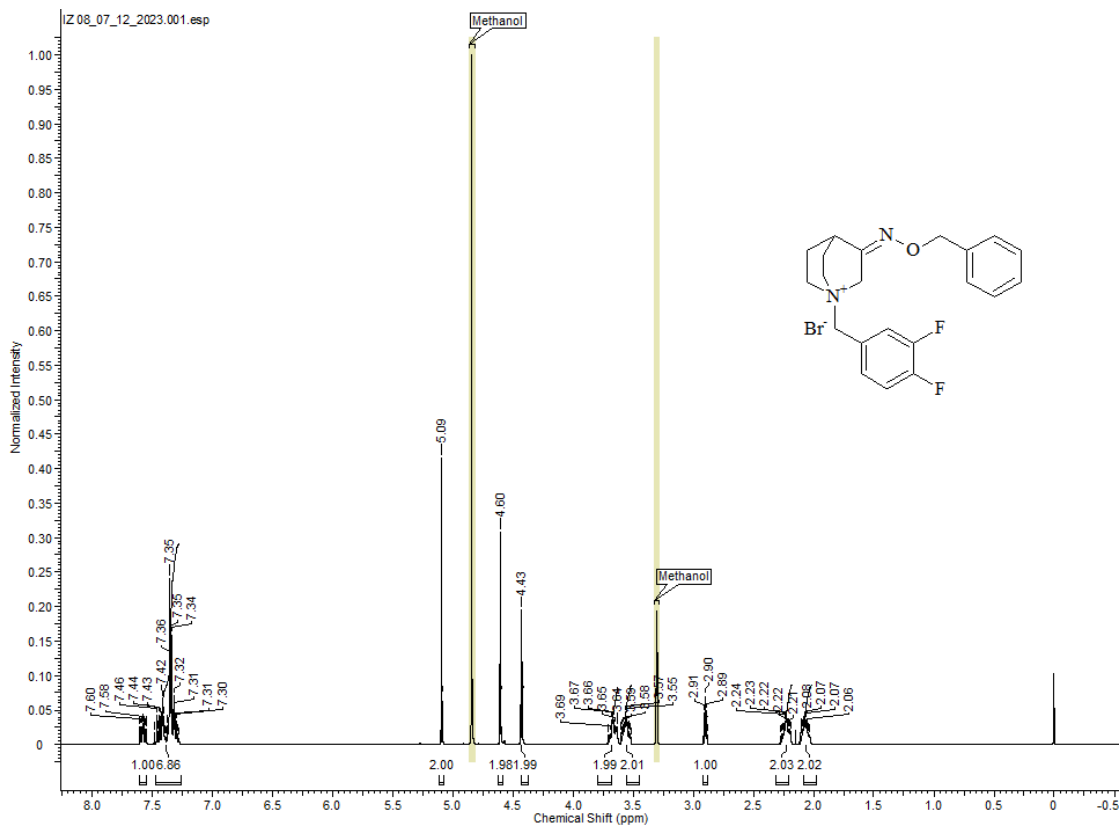
Slika P18. DEPT-Q spektar spoja **7** snimljen u MeOH-d<sub>4</sub>

**9.1.7. N-(3,4-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromida (8)**

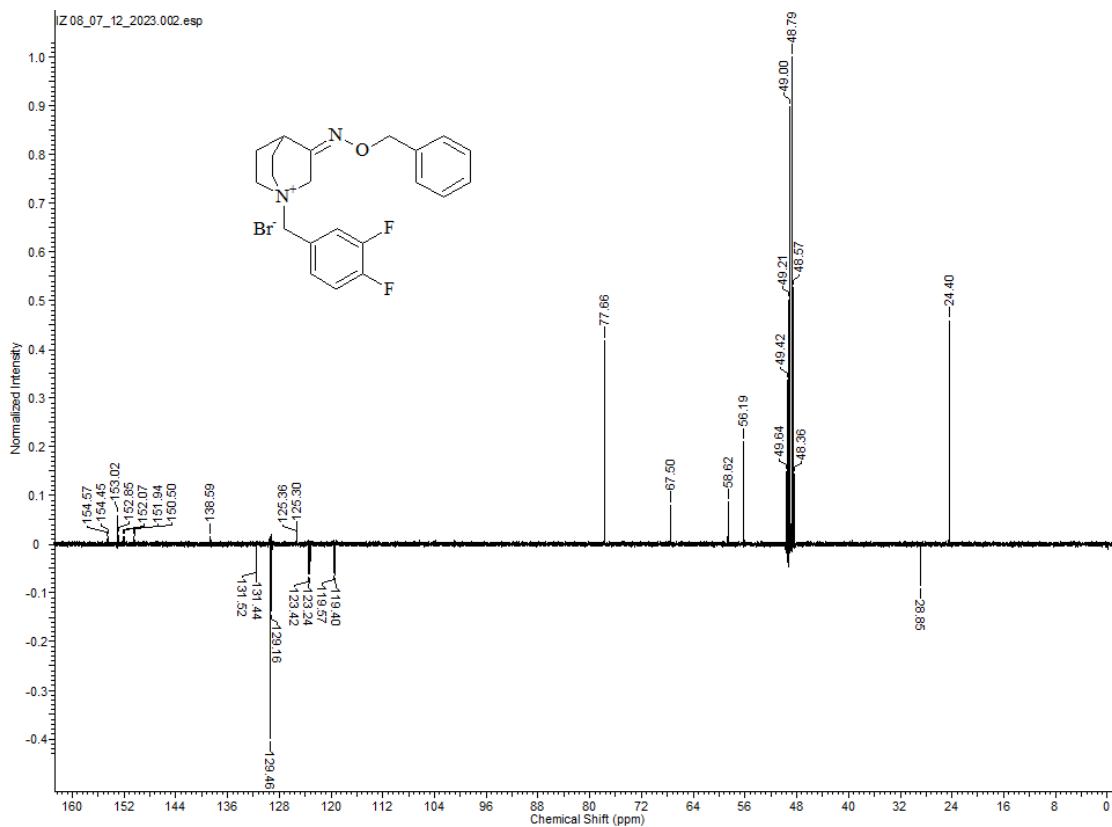


Slika P19. IR spektar spoja **8**



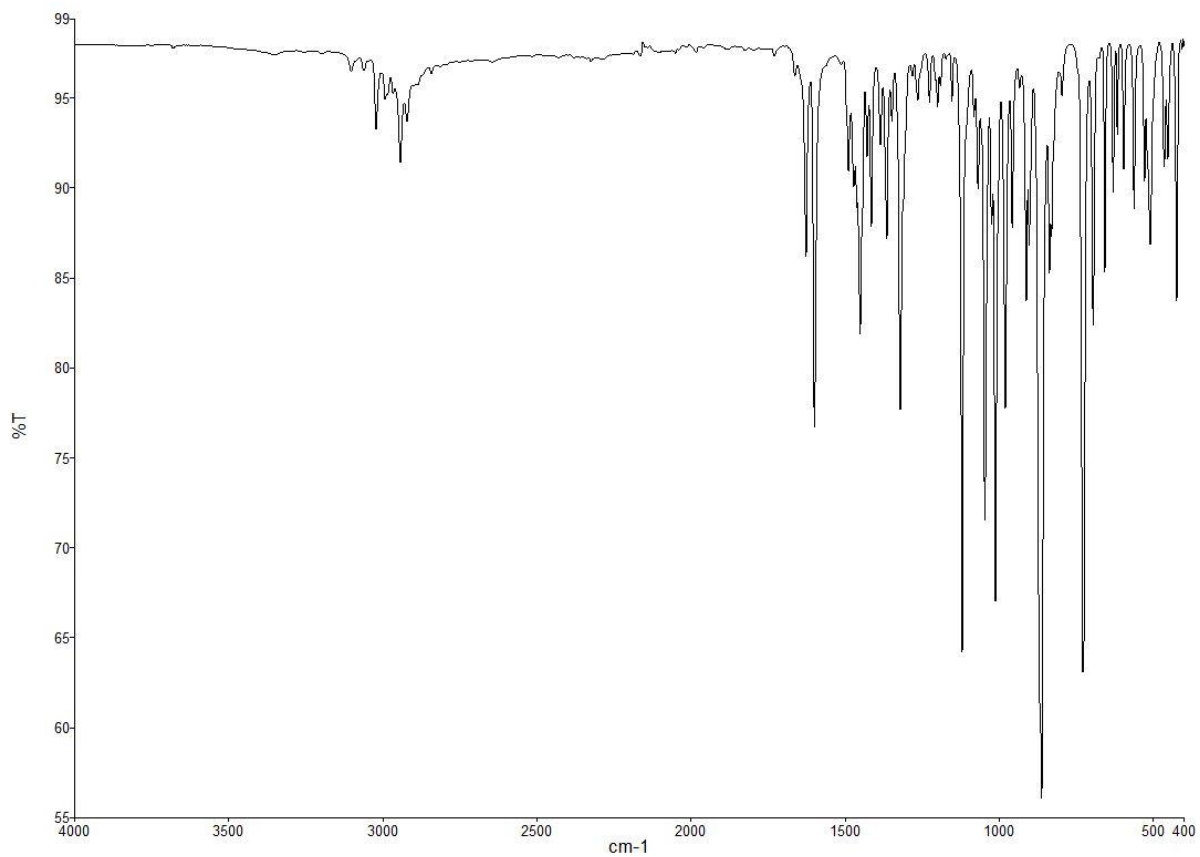


Slika P20.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **8** snimljen u MeOH- $d_4$

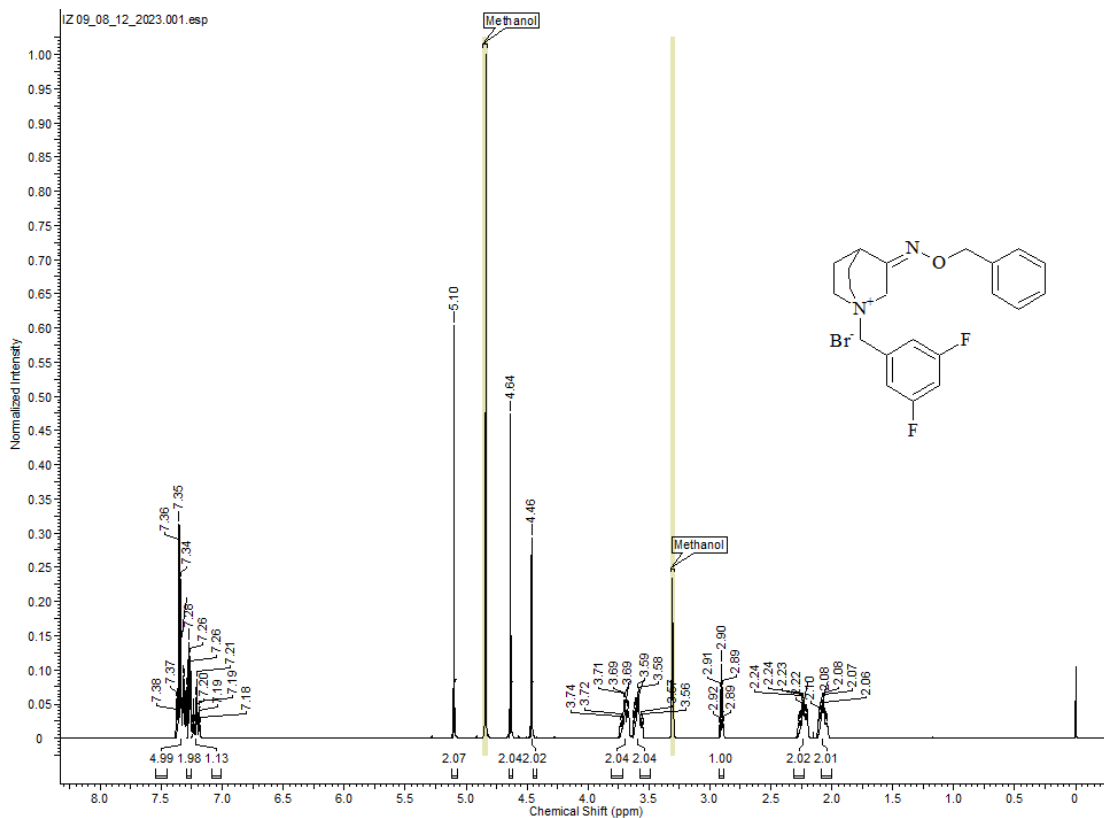


Slika P21. DEPT-Q spektar spoja **8** snimljen u MeOH- $d_4$

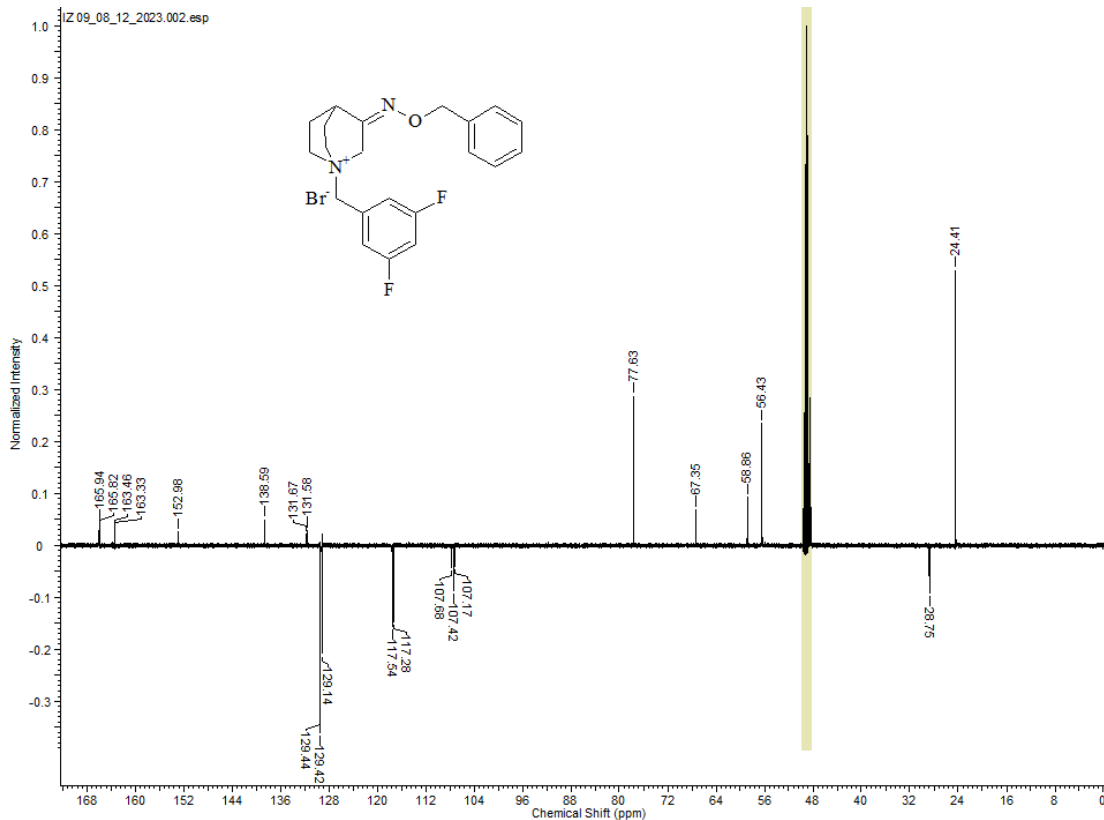
**9.1.8. N-(3,5-difluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromida (9)**



Slika P22. IR spektar spoja **9**

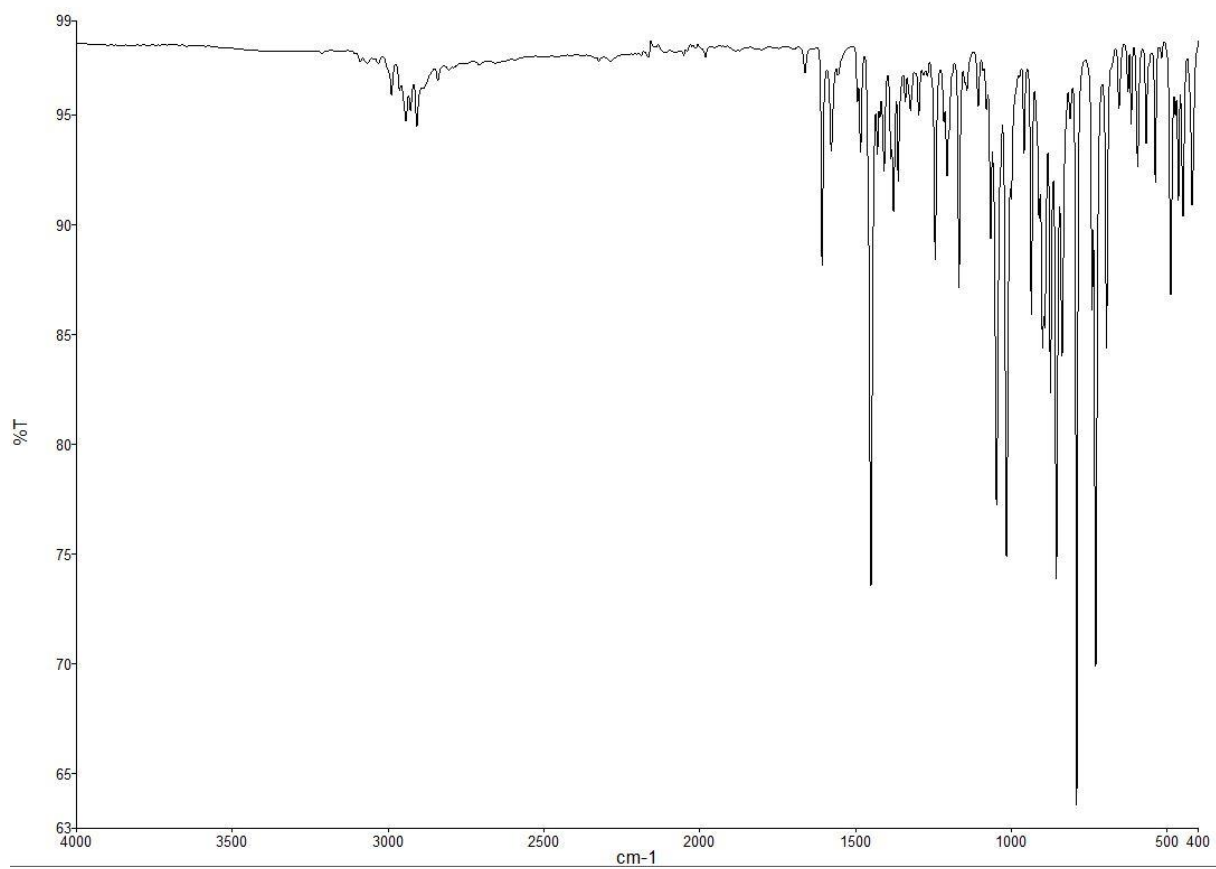


Slika P23.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja 9 snimljen u MeOH- $d_4$

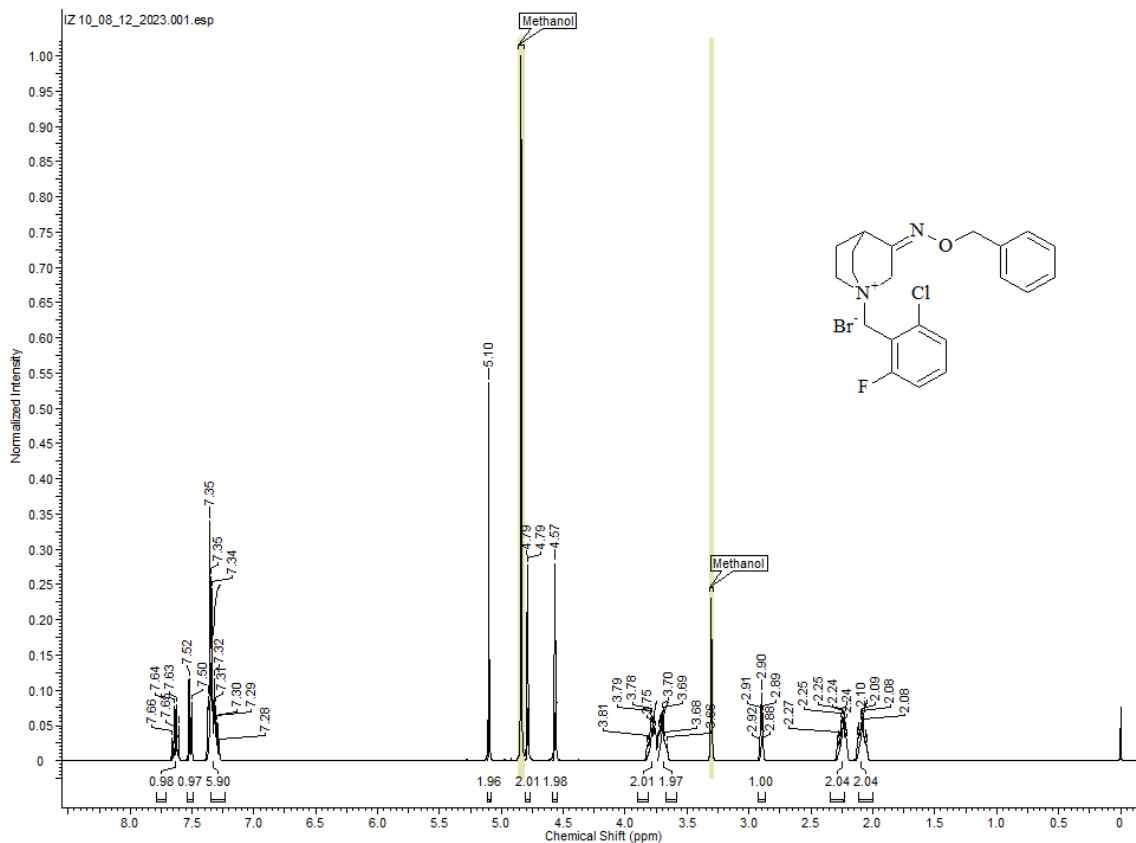


Slika P24. DEPT-Q spektar spoja 9 snimljen u MeOH- $d_4$

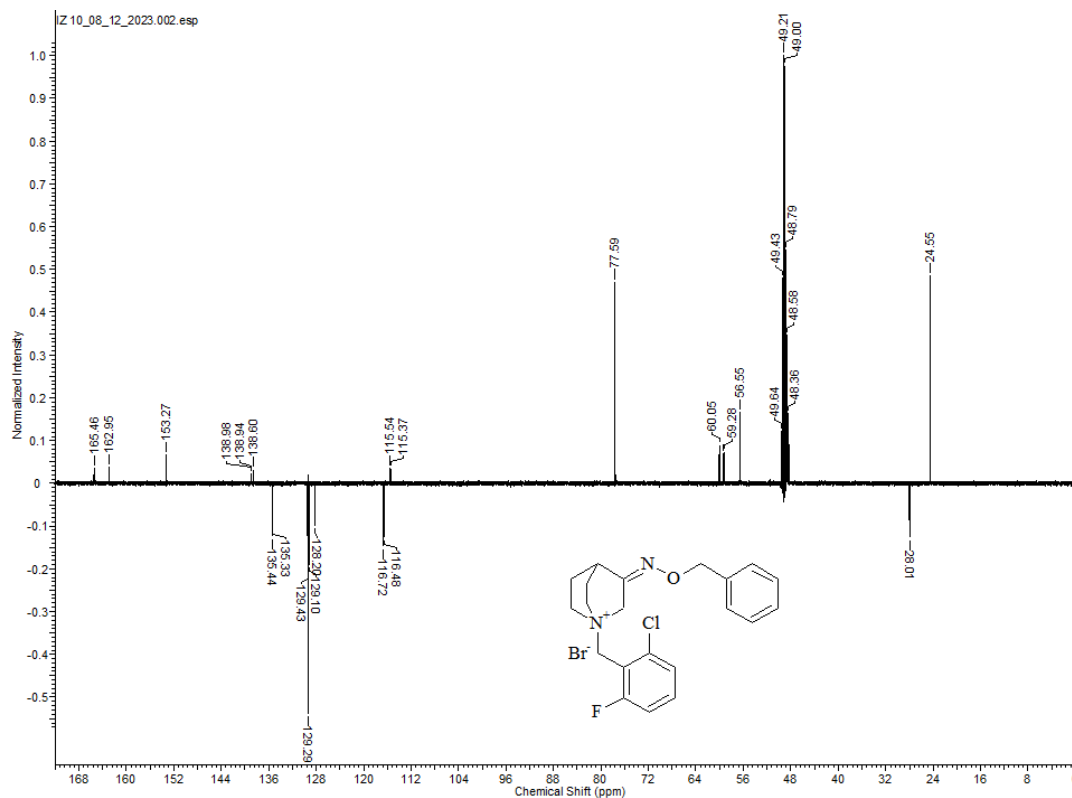
**9.1.9. N-(2-klor-6-fluorbenzil)-3-((benziloksi)imino)kinuklidinijev bromid (10)**



Slika P25. IR spektar spoja **10**



Slika P26. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **10** snimljen u MeOH-d<sub>4</sub>



Slika P27. DEPT-Q spektar spoja **10** snimljen u MeOH-d<sub>4</sub>

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA  
KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za organsku kemiju  
Organska kemija  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### PRIPRAVA KVATERNIH *O*-BENZIL-OKSIMA KINUKLIDINA TE NJIHOVA ANTIKOLINESTERAZNA AKTIVNOST

Ivan Zajec

#### SAŽETAK

U okviru ovog rada klasičnim postupcima organske sinteze pripremljen je *O*-benzilni eter kinuklidin-3-on oksima reakcijom hidroklorida kinuklidin-3-ona i *O*-benzilhidroksilamina, bez dodatka anorganskih ili organskih baza. Kvaternizacijom kinuklidinskog atoma dušika u molekuli pripremljenog *O*-benziloksima s nesupstituiranim i odabranim, različito supstituiranim benzilbromidima (trifluormetilna ili trifluormetoksi skupina u para položaju, *tert*-butilna skupina u *para* ili *meta* položajima, spojevi halogena na određenim pozicijama prstena) pripremljen je niz od devet spojeva, od kojih osam do sada nisu opisani u literaturi. Novosintetiziranim spojevima određeno je talište te je struktura određena i potvrđena spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, 1D nuklearnom magnetskom rezonancijom te spektrometrijom masa. Nakon sinteze te fizikalno-kemijske karakterizacije spojeva, svima je određen inhibitorni potencijal prema enzimu butirilkolinesterazi iz konjskog seruma (EC 3.1.1.8) korištenjem Ellmanove kolorimetrijske metode za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze. Svi ispitani spojevi reverzibilno su inhibirali enzim u mikro- i nanomolarnom području. Kao naj snažniji inhibitor pokazao se spoj **6**, kvaterni derivat oksima s dvije *tert*-butilne skupine u *meta* položajima na aromatskom prstenu benzilne skupine vezane na kvaterni dušikov atom kinuklidina ( $IC_{50} = 0,28 \pm 0,01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 70 stranica, 23 grafičkih prikaza, 5 tablica i 152 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *O*-benzil-oksimi-kinuklidina, sinteza, antikolinesterazni spojevi,  $IC_{50}$ , Ellmanova metoda, acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza

Mentor: **izv. prof. dr. sc. Bernard Denegri**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentorica: **prof. dr. sc. Ines Primožič**, *redovita profesorica u trajnom izboru, Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.*

Ocjenjivači: **izv. prof. dr. sc. Bernard Denegri**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**prof. dr. sc. Ines Primožič**, *redovita profesorica u trajnom izboru, Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.*

**izv. prof. dr. sc. Ana Budimir**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of organic chemistry  
Organic chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### SYNTHESIS OF O-BENZYL OXIME QUINUCLIDINES AND THEIR ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY

Ivan Zajec

#### SUMMARY

Within this work, *O*-benzyl ether quinuclidin-3-one oxime was prepared by the reaction of hydrochloride salts of quinuclidin-3-one and *O*-benzylhydroxylamine, without the addition of inorganic or organic bases. By quaternization of a quinuclidine nitrogen atom in a molecule prepared with *O*-benzyl oxime with unsubstituted and selected, differently substituted benzyl bromides (trifluoromethyl or trifluoromethoxy groups in the para- position, tert-butyl group in the para or meta positions, halogen compounds at certain benzene ring positions), a series of nine compounds, quaternary derivatives of quinuclidine, was prepared. Out of those nine, eight have not been described in the literature so far. The melting point of the newly synthesized compounds was determined, and the structure was characterized and confirmed by spectroscopic methods: infrared spectroscopy, 1D nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. Subsequent to physico-chemical characterization of the compounds, the inhibitory potential toward the enzyme butyrylcholinesterase from equine serum (EC 3.1.1.8) was determined using the Ellman colorimetric method to determine cholinesterase activity. All tested compounds reversibly inhibited the enzyme in the micromolar and nanomolar range. The most potent inhibitor was quaternary *O*-benzyl oxime derivative with two tert-butyl groups in meta positions on the quaternary benzyl group ( $IC_{50} = 0.28 \pm 0.01 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 70 pages, 23 figures, 5 tables and 152 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *O*-benzyl quinuclidine oximes, synthesis, anticholinesterase compounds,  $IC_{50}$ , Ellman's method, butyrylcholinesterase

Mentor: **Bernard Denegri, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Comentor: **Ines Primožič, Ph.D.** Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Science

Reviewers: **Ana Budimir, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ines Primožič, Ph.D.** Full Professor with tenure, University of Zagreb Faculty of Science

**Ana Budimir, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2024