

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Sara Gregić, Tea Horvat, Sara Milić

**Karbamati u borbi protiv neurodegenerativnih poremećaja –
sinteza, inhibicija kolinesteraza i molekulsko modeliranje**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Irene Škorić, te na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Grupi za računalne bioznanosti pod komentorstvom dr. sc. Danijele Barić te je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

A β – amiloid β - peptid

ACh – engl. *Acetylcholine* – acetilkolin

AChE – engl. *Acetylcholinesterase* – acetilkolinesteraza

AD – engl. *Alzheimer's disease* – Alzheimerova bolest

ADME-Tox – engl. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity* – apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost

AI – engl. *Acceptable daily Intake* – prihvatljiv dnevni unos

AICD – intracelularni dio APP-a

API – engl. *Active Pharmaceutical Ingredient* – aktivni farmaceutski sastojak

ApoE – apolipoprotein E

APP – amiloidni prekursorski protein

ATP – adenzin-trifosfat

BACE – β - sekretaza

B3LYP – engl. *Becke Three Parameter Lee-Yang-Parr Hybrid Functional* - Beckeov troparametarski Lee-Yang-Parr hibridni funkcional

BChE – engl. *Butyrylcholinesterase* – butirilkolinesteraza

CD36 – trombocitni glikoprotein IV

CDCl₃ – deuterirani kloroform

CDK – engl. *Cyclin-Dependent Kinase* – ciklin ovisna kinaza

ChAT – engl. *Choline Acetyltransferase* - kolin-acetiltransferaza

CNS – engl. *Central Nervous System* - centralni živčani sustav

CYP – citokrom P450 enzimi

DCM – diklormetan

DFT – engl. *Density Functional Theory* - teorija funkcionala (elektronske) gustoće

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DNA – engl. *Deoxyribonucleic acid* – deoksiribonukleinska kisenkiselina

E – dietileter

EC – engl. *Enzyme Commission* – enzimskomisija

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

GFAP – glijski vlaknasti kiseli protein

GSK – engl. *Glycogen synthase kinase* – glikogen sintaza kinaza

HMGB – protein B skupine visoke mobilnosti

HRMS – engl. *High Resolution Mass Spectrometry* - masena spektrometrija visoke rezolucije

IL - interleukin

LRP – engl. *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein* – LRP receptor ili protein povezan s receptorom lipoproteina niske gustoće

MDD – engl. *Maximum Daily Dose* - maksimalna dnevna doza

MARK – engl. *Microtubule-affinity regulating kinases* – kinase koje reguliraju afinitet mikrotubula

MD – engl. *Molecular dynamics* – molekularna dinamika

NADPH – engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NMDA – *N*-metil-D-aspartat

NMR – engl. *Nuclear Magnetic Resonance* - nuklearna magnetska rezonancija

PDB – Protein Data Bank – banka podataka o proteinima

PE – petroleter

PP2A – engl. *Protein Phosphatase 2A* – proteinska fosfataza 2A

ppm – parts per million

PSEN – presenilin

QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship* – kvantitativni odnos strukture i aktivnosti

RAGE – engl. *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* – receptor za krajnje produkte napredne glikacije

RMSD – kvadratni srednji devijacijski odstup

ROS – engl. *Reactive Oxygen Species* - reaktivne kisikove vrste

SOD – superoksid-dismutaza

TEA – trietilamin

TLC – tankoslojna kromatografija

TLR – engl. *Toll-like receptors* – Toll-slični receptori

TMS – tetrametilsilan

TNS- α - engl. *Tumor necrosis factor* – factor tumorske nekroze

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. Neurodegenerativni poremećaji	5
2.2. Alzheimerova bolest.....	6
2.2.1. Kliničke i epidemiološke značajke.....	6
2.2.2. Amiloidni prekursori protein i β -amiloidni peptidi	8
2.2.3. Uloga hiperfosforiliranih τ -proteina	9
2.2.4. Neuroinflamacija i oksidativni stres.....	12
2.2.5. Međusobna povezanost $A\beta$, τ -proteina i neuroinflamacije	14
2.2.6. Kolinergička disfunkcija u Alzheimerovoj bolesti.....	15
2.2.7. Ostale hipoteze o etiologiji Alzheimerove bolesti.....	16
2.3. Kolinesteraze i njihova selektivnost.....	16
2.3.1. Biološka uloga i distribucija kolinesteraza u ljudskom organizmu.....	16
2.3.2. Strukturne značajke aktivnih mjesta AChE i BChE.....	17
2.3.3. Selektivna inhibicija BChE i njezin terapijski potencijal u Alzheimerovoj bolesti.....	19
2.3.4. Farmakodinamičke i farmakokinetičke osobine inhibitora butirilkolinesteraze	21
2.4. Karbamati	22
2.4.1. Klasifikacija i mehanizam djelovanja karbamata.....	22
2.4.2. Prirodni izvori karbamata i njihova farmakološka važnost.....	24
2.4.3. Polusintetski karbamati	26
2.4.4. Inovativne strategije optimizacije karbamatnih derivata u liječenju neurodegeneracije.....	27
2.5. Računalno modeliranje.....	29
2.5.1. Računalno modeliranje inhibitora kolinesteraza u terapiji Alzheimerove bolesti..	29
2.5.2. Metodološki pristupi u računalnom modeliranju interakcija enzim–ligand.....	30
2.5.3. Validacija docking protokola i odabir kristalnih struktura enzima.....	31
2.5.4. Evaluacija rezultata molekuskog dockinga i rangiranje spojeva	32
2.5.5. Farmakofozna analiza i optimizacija dizajna inhibitora	33
2.5.6. <i>Virtual screening</i> i selekcija karbamatnih inhibitora kolinesteraza.....	35
2.5.7. Predikcija ADME-Tox profila i sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru	36

3. REZULTATI I RASPRAVA	38
3.1. Uvod	39
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva	39
3.2.1. Sinteza metilkarbamata 1-8	41
3.2.2. Sinteza dimetilkarbamata 9	43
3.2.3. Sinteza etil-metilkarbamata 10-18	43
3.2.4. Sinteza morfolin-4-karboksialata 19-22	44
3.2. Kristalna struktura karbata	45
3.3. NMR spektroskopska karakterizacija sintetiziranih karbamata	48
3.4. Biološka aktivnost sintetiziranih karbamata	54
3.4.1. Inhibicija enzima kolinesteraza heterostilbenskih karbamata 1–22	54
3.4.2. Računalni rezultati	56
3.5. Genotoksičnost	61
4. EKSPERIMENTALNI DIO	65
4.1. Opće napomene	66
4.2. Sinteza karbamata	67
4.3. Rendgenska kristalografija	81
4.4. <i>In vitro</i> ispitivanje aktivnosti kolinesteraza	83
4.5. Protuupalna aktivnost	83
4.6 Računalni detalji	84
4.7. ADME-Tox predviđanja	85
5. ZAKLJUČAK	86
6. ZAHVALE	88
7. LITERATURA	90
SAŽETAK	104
SUMMARY	105
ŽIVOTOPISI	106

1. UVOD

Alzheimerova bolest (AD) predstavlja najčešći oblik demencije, neurodegenerativni poremećaj koji progresivno oštećuje kognitivne funkcije i značajno narušava svakodnevno funkcioniranje oboljelih osoba. Premda se patofiziologija bolesti još uvijek ne razumije u potpunosti, poznato je da uključuje nakupljanje β -amiloidnih plakova, hiperfosforilaciju τ -proteina te izražene procese oksidacijskog stresa i neuroinflamacije. Posebno značajnu ulogu u patogenezi AD ima narušena kolinergička neurotransmisija, što je potaknulo razvoj terapijskih strategija usmjerenih na očuvanje razine acetilkolina u sinaptičkoj pukotini [1]. Jedan od glavnih pristupa u tom kontekstu je inhibicija enzima odgovornih za razgradnju acetilkolina, acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE).

Dok je AChE dominantan enzim u zdravom mozgu i odgovoran za brzu hidrolizu acetilkolina, u naprednim stadijima Alzheimerove bolesti dolazi do njegove redukcije, dok aktivnost BChE proporcionalno raste, čime ona preuzima veću ulogu u hidrolizi neurotransmitera [2]. Ova promjena u enzimskom profilu dovela je do porasta interesa za selektivne inhibitore BChE, osobito u kasnijim stadijima bolesti. Takvi inhibitori ne samo da usporavaju razgradnju acetilkolina, već mogu i dodatno utjecati na procese agregacije β -amiloida, posredno modulirajući napredovanje bolesti.

Kao farmakološka skupina, karbamati predstavljaju izuzetno zanimljive molekule zbog svoje sposobnosti reverzibilne kovalentne inhibicije kolinesteraza. Djeluju kroz mehanizam karbamilacije aktivnog mjesta enzima, pri čemu nastali karbamilirani kompleks ostaje stabilan određeno vrijeme prije spontane dekarbamilacije. Time se produžuje učinak inhibicije i smanjuje potreba za učestalom primjenom lijeka, što je osobito poželjno u terapiji kroničnih bolesti [3]. Uz to, nedavna istraživanja sve više naglašavaju važnost modificiranja karbamatnih derivata u cilju postizanja selektivnosti prema BChE, optimizaciji farmakokinetičkih svojstava te smanjenju toksičnosti [4].

Napredak u računalnom modeliranju, uključujući molekulski docking, molekulsku dinamiku, kvantno-kemijske proračune i farmakofornu analizu, omogućio je preciznije razumijevanje interakcija između karbamatnih inhibitora i enzima kolinesteraza. Ove metode omogućuju racionalan dizajn i predikciju svojstava novih spojeva prije njihove sinteze, čime znatno doprinose učinkovitosti istraživanja i razvoju novih kandidata za terapiju AD [5]. Osobito se perspektivnim pokazalo povezivanje inhibitora s dodatnim funkcijskim skupinama, primjerice onima s antioksidativnim svojstvima, kako bi se proširio spektar djelovanja i unaprijedila neuroprotektivna komponenta terapije.

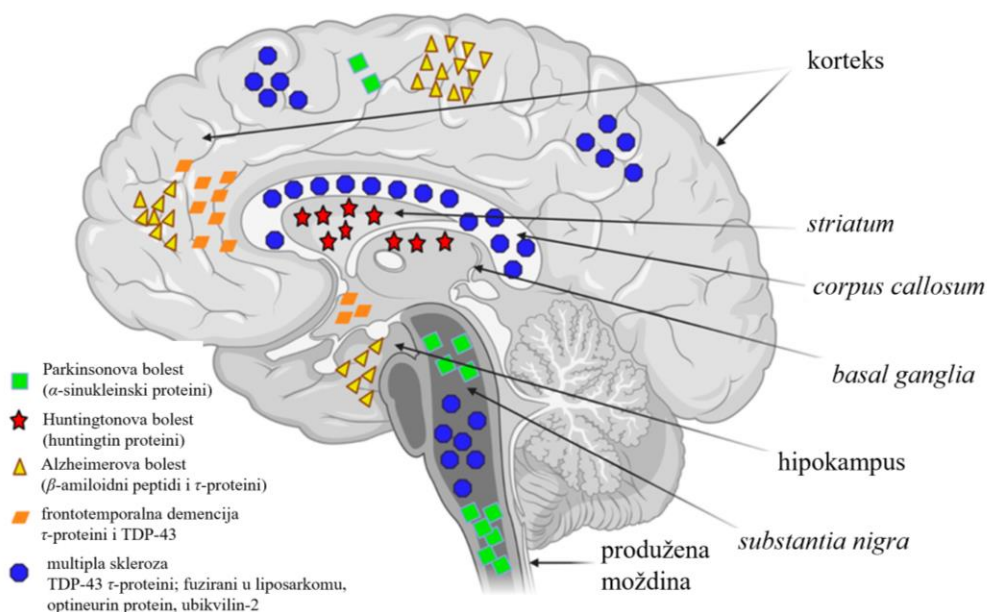
U skladu s navedenim, ovaj rad usmjeren je na dizajn, sintezu, spektroskopsku karakterizaciju te biološku i računalnu evaluaciju novih karbamatnih spojeva s potencijalnom inhibicijskom aktivnošću prema kolinesterazama. Poseban naglasak stavlja se na integraciju eksperimentalnih i teorijskih pristupa u cilju razvoja učinkovitijih i selektivnijih inhibitora s poželjnim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim profilima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Neurodegenerativni poremećaji

Neurodegenerativni poremećaji predstavljaju heterogenu skupinu progresivnih bolesti središnjeg živčanog sustava koje dijele zajedničke patogenetske značajke poput nakupljanja patoloških proteina, poremećene autofagije, mitohondrijske disfunkcije, kronične oksidativne i neuroinflamatorne reakcije te disbalansa prijenosa kalcija i energije. Iako klinička manifestacija varira, primjerice od demencije do motoričkih poremećaja, ovi poremećaji dijele temeljne molekularne mehanizme koji vode do ireverzibilnog gubitka neurona [6–8]. Glavna obilježja uključuju patološko presavijanje i agregaciju proteina, kao što su β -amiloidni i τ -fibrili u Alzheimerovoj bolesti, α -sinukleinske inkluzije u Parkinsonovoj bolesti te TDP-43 i huntingtinske mutacije u drugim oblicima demencije i motoričkih bolesti [9,10]. Disfunkcija autofagije i biorazgradnje proteina, uključujući poremećaje u radu autofagosom lizosomskog sustava, pridonosi nakupljanju toksičnih agregata i dodatno pogoršava patološki proces inhibicijom normalnih degradacijskih puteva [11,12]. Kronična neuroinflamacija, medijirana aktivacijom mikroglialnih i astrocitskih stanica koje luče upalne citokine i povećavaju propusnost krvno-moždane barijere, dodatno pogoršava neurotoksičnost i progresiju bolesti [13–15].

Selektivna osjetljivost pojedinih neuronskih mreža još je jedan od ključnih aspekata patofiziologije ovih bolesti, pri čemu specifična područja mozga pokazuju izraženu podložnost određenim molekularnim poremećajima. Alzheimerovu bolest karakterizira atrofija hipokampusa i korteksa, Parkinsonovu bolest degeneracija *substantia nigre*, dok je kod amiotrofične lateralne skleroze zahvaćen kortikospinalni trakt, a Huntingtonovu bolest obilježava propadanje *striatuma* [16–18]. Takvi obrasci selektivne degeneracije povezani su s konceptom sinaptičkog širenja patoloških proteina koji putem neuronskih veza progresivno zahvaćaju sve šira područja mozga. Osim toga, oksidativni stres i mitohondrijska disfunkcija djeluju u sinergiji, pri čemu smanjena učinkovitost autofagije omogućuje nakupljanje oštećenih mitohondrija, dok reaktivne kisikove vrste dodatno inaktiviraju ključne enzime i potiču apoptozu neurona [19–21]. Na Slici 1 uočava se prikaz različitih područja mozga koja su tipično zahvaćena kod glavnih neurodegenerativnih bolesti. Vizualna ilustracija anatomske distribucije degeneracije u pojedinim bolestima dodatno pojašnjava povezanost između lokalizacije neurodegeneracije i simptoma koji proizlaze iz funkcionalnih gubitaka.



Slika 1. Shematski prikaz različitih područja mozga pogođenih u najčešćim neurodegenerativnim poremećajima (preuzeto iz [22] i modificirano).

2.2. Alzheimerova bolest

2.2.1. Kliničke i epidemiološke značajke

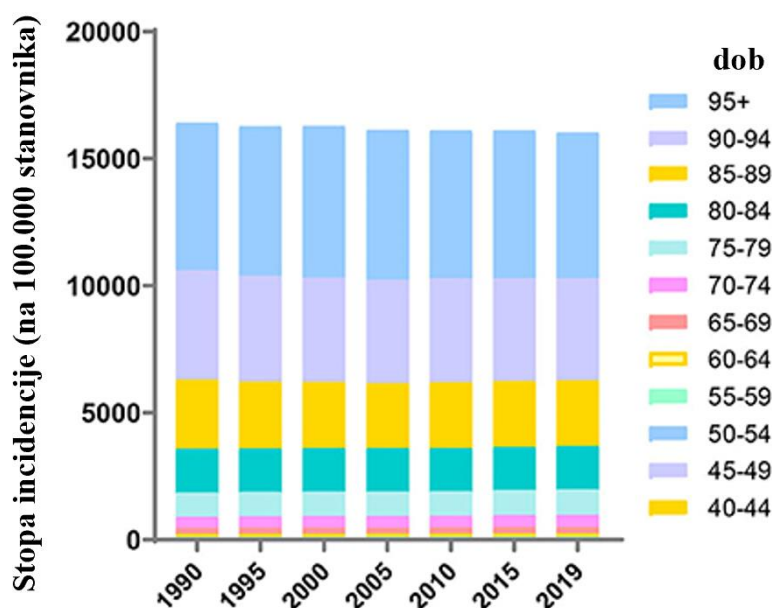
Alzheimerova bolest (AD) predstavlja progresivni kognitivni poremećaj koji se prvenstveno manifestira deficitom kratkotrajnog i dugotrajnog pamćenja, a zatim se širi na jezične sposobnosti, prostornu orijentaciju i izvršne funkcije. U ranim fazama bolesti promatraju se neprimjetni gubici pamćenja, dok u umjerenom stadiju pacijenti počinju gubiti sposobnost samostalnog života te razvijaju neuropsihijatrijske simptome poput depresije, anksioznosti i povremenih halucinacija. U kasnijim fazama javljaju se ozbiljni poremećaji motorike, gubitak sposobnosti verbalne komunikacije, problemi s ravnotežom te smetnje gutanja i kontrole fizioloških potreba, što značajno povećava potrebu za institucionalnom njegom [23,24]. Predviđeno trajanje bolesti nakon dijagnoze varira ovisno o dobi bolesnika i brzini napredovanja degenerativnih promjena, s prosjekom od nekoliko do deset godina [25].

Epidemiološki podaci ukazuju na nagli porast učestalosti Alzheimerove bolesti s dobi. Prema izvješću *Alzheimer's Association*, gotovo sedam milijuna osoba starijih od 65 godina u SAD-u živi s ovom dijagnozom, a predviđa se da će broj oboljelih doseći gotovo 14 milijuna do sredine stoljeća [26]. Globalna slika pokazuje više od 50 milijuna oboljelih u svijetu, s očekivanim udvostručenjem broja svakih 20 godina [27]. Također, žene su statistički češće

pogođene bolešću, što se djelomično pripisuje duljem životnom vijeku, ali i hormonalnim i genetskim čimbenicima [28]. Genetska predispozicija igra važnu ulogu, osobito prisutnost APOE-ε4-alela, koji znatno povećava vjerojatnost obolijevanja. Učestalost bolesti eksponencijalno raste nakon 65. godine, a dodatni čimbenici rizika uključuju vaskularne bolesti, dijabetes i nisku razinu obrazovanja [29,30].

Troškovi skrbi i liječenja Alzheimerove bolesti predstavljaju značajno financijsko opterećenje za zdravstvene sustave i obitelji. Osim formalne medicinske skrbi, ogroman teret čini i neplaćena njega članova obitelji, koja godišnje obuhvaća milijarde sati skrbi, čime dodatno raste potreba za razvojem održivih terapijskih i društvenih strategija [31].

Zbog sve većeg broja oboljelih, rano prepoznavanje simptoma i uvođenje terapije od ključnog su značaja. Upravo razumijevanje ovih kliničkih i epidemioloških okvira osigurava temelj za definiranje terapijskih smjernica utemeljenih na inhibiciji enzima kolinesteraza. Na Slici 2 prikazan je grafički prikaz globalnog porasta broja oboljelih od Alzheimerove bolesti kroz različite dobne skupine i vremenske periode, što dodatno ilustrira ozbiljnost epidemiološkog trenda.



Slika 2. Dobna raspodjela ukupnog broja osoba s Alzheimerovom bolešću u svijetu u razdoblju od 1990. do 2019. godine. Prikaz potvrđuje da su najstarije dobne skupine, osobito one starije od 95. godine, najpogođenije bolešću u apsolutnom broju oboljelih, sličnim obrascem raspodjele u prikazanim godinama (preuzeto iz [32] i modificirano).

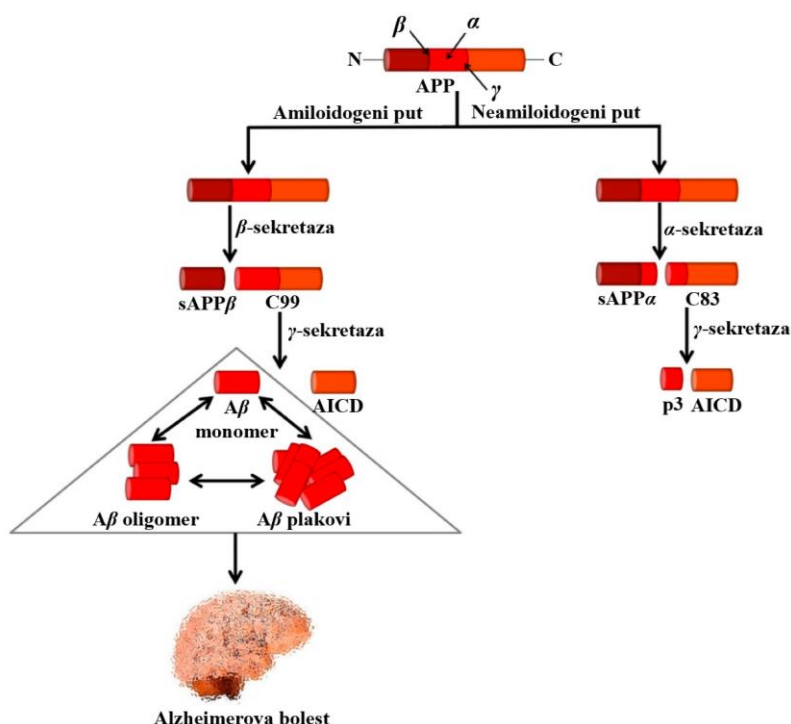
2.2.2. Amiloidni prekursori protein i β -amiloidni peptidi

Amiloidni prekursori protein (APP) je integralni membranski glikoprotein koji se obilno izražava u neuronima središnjeg živčanog sustava, osobito u kortikalnim i hipokampalnim regijama. Njegova fiziološka uloga obuhvaća više staničnih funkcija kao što su regulacija sinaptičke plastičnosti, transport unutar neurona i stanična adhezija [22]. APP posjeduje jednu transmembransku domenu, izvanstanični N-terminalni segment i intracelularni C-terminalni kraj. Najzastupljenije izoforme su APP695, APP751 i APP770, koje se razlikuju duljinom i prisutnošću dodatnih domenskih struktura. Sekvenca unutar APP-a koja odgovara β -amiloidnom peptidu ($A\beta$) može postati supstrat za proteolitičko cijepanje u različitim patofiziološkim okolnostima [32].

Razgradnja APP-a može slijediti dva različita puta. Neamiloidogeni put uključuje djelovanje α -sekretaze, proteaze koja cijepa APP unutar $A\beta$ -sekvence. Cijepanjem nastaju topljivi fragment $sAPP\alpha$ i membranski vezani fragment C83. Naknadno djelovanje γ -sekretaze na C83 rezultira nastankom fragmenta p3 i intracelularnog dijela APP-a (AICD), koji može sudjelovati u regulaciji ekspresije gena i staničnih signalnih puteva [29]. U ovoj obradi β -amiloidni peptidi se ne stvaraju. U amiloidogenom putu prvo djeluje β -sekretaza (BACE1), koja cijepa APP na mjestu izvan β -amiloidne domene i time generira fragment $sAPP\beta$, dok se u membrani zadržava fragment C99. Na njega djeluje γ -sekretaza, višekomponentni enzimatski kompleks čiji je katalitički dio najčešće presenilin-1, i time nastaju β -amiloidni peptidi različite duljine, od kojih su najzastupljeniji $A\beta$ 40 i $A\beta$ 42 [33]. $A\beta$ 42, zbog svoje strukture, pokazuje veću sklonost agregaciji u oligomere, protofibrile i fibrilarne strukture koje se mogu organizirati u izvanstanične depozite poznate kao β -amiloidni plakovi. Plakovi se često nalaze u moždanoj kori i hipokampusu i predstavljaju jedno od histoloških obilježja bolesti. Osim fibrilarnih oblika, mogu nastajati i niže razine organizacije kao što su dimeri i oligomeri, koji posjeduju različita biokemijska i biološka svojstva [34]. Na Slici 3 prikazana je shema razgradnje APP-a s jasno prikazanim koracima α - i β -proteolize, njihovim produktima i krajnjim oblicima nastalih fragmenata. Uočava se i kako u neamiloidogenom putu ne nastaje $A\beta$, dok se u amiloidogenom putu generira $A\beta$ koji se zatim nakuplja u različitim formama.

Određene mutacije u genima koji kodiraju APP, PSEN1 i PSEN2 povezane su s promjenama u proteolitičkoj obradi APP-a, što rezultira povećanom produkcijom $A\beta$ 42 u odnosu na $A\beta$ 40. U kontekstu Alzheimerove bolesti ti se mutacijski oblici najčešće javljaju kod bolesnika s ranim simptomima. Prisutnost ϵ 4-alela apolipoproteina E također utječe na razinu $A\beta$ -peptida jer se promatra kao čimbenik koji može smanjiti kapacitet klirensa $A\beta$ putem

endocitoze i transporta kroz krvno-moždanu barijeru [35]. Razina $A\beta$ -peptida u međustaničnom prostoru ovisi i o aktivnosti enzima odgovornima za njegovu razgradnju, među kojima su neprilizin, inzulinska proteaza i endotelin-konvertirajući enzim. Uz to, $A\beta$ može biti uklonjen i putem LRP1 receptora te vezanjem za glijalne stanice. Na prikazanoj Slici 3 također je označeno mjesto djelovanja navedenih sekretaza te posljedice njihove aktivnosti u obliku nastalih produkata.



Slika 3. Amiloidogeni i neamiloidogeni put razgradnje APP-proteina, nastanak β -amiloidnog peptida i agregacija u oligomere i plakove povezane s razvojem Alzheimerove bolesti (preuzeto iz [32] i modificirano).

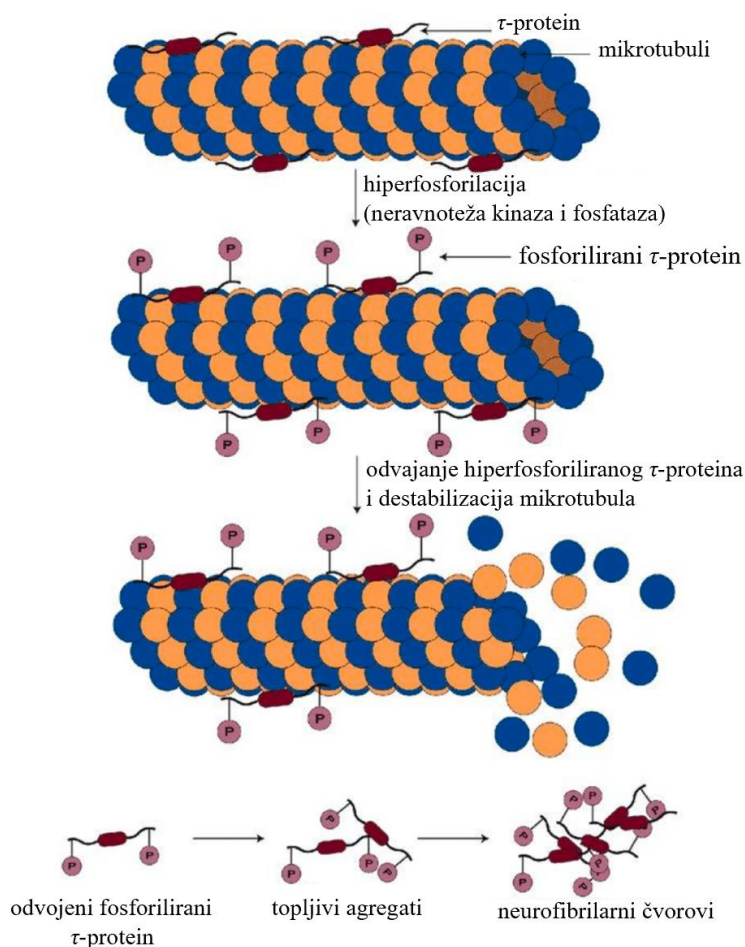
2.2.3. Uloga hiperfosforiliranih τ -proteina

Mikrotubule su ključne za održavanje strukture i transporta unutar neurona, a τ -proteini su njihovi prirodni stabilizatori, smješteni prvenstveno u aksonima gdje reguliraju dinamiku i organizaciju mikrotubula. U svojoj osnovnoj funkciji τ -proteini sadrže izoforme s tri ili četiri ponavljajuće domene povezane s mikrotubulima [36]. U fiziološkom stanju τ -proteini su blago fosforilirani i dolaze i odlaze s mikrotubula u skladu s kinaznim i fosfataznim signalima [37].

U Alzheimerovoj bolesti promatra se neravnoteža između τ -kinaza kao što su GSK-3 β , CDK5 i MARK, te fosfataza poput PP2A. Ta neravnoteža dovodi do višestranе fosforilacije τ -proteina na specifičnim serinskim i treoninskim mjestima, a time se mijenja konformacija

τ -proteina, smanjuje afinitet prema mikrotubulima i povećava sklonost agregaciji [38]. Hiperfosforilirani τ -protein se zatim odvaja s mikrotubula te započinje stvaranje topljivih oligomera koji se dalje spajaju u protofibrile i konačno u netopljive strukture poznate kao neurofibrilarni čvorovi, vidljivi unutar neurona [39].

Na Slici 4 prikazan je shematski prikaz procesa destabilizacije mikrotubula nakon hiperfosforilacije τ -proteina, čime τ -protein gubi sposobnost vezivanja, počinje kolektivno agregirati i oblikuje neurofibrilarne čvorove. Taj prikaz jasno ilustrira transformaciju τ -proteina iz dinamičkog regulatora citoskeleta u toksični agregat koji remeti intracelularnu strukturu.

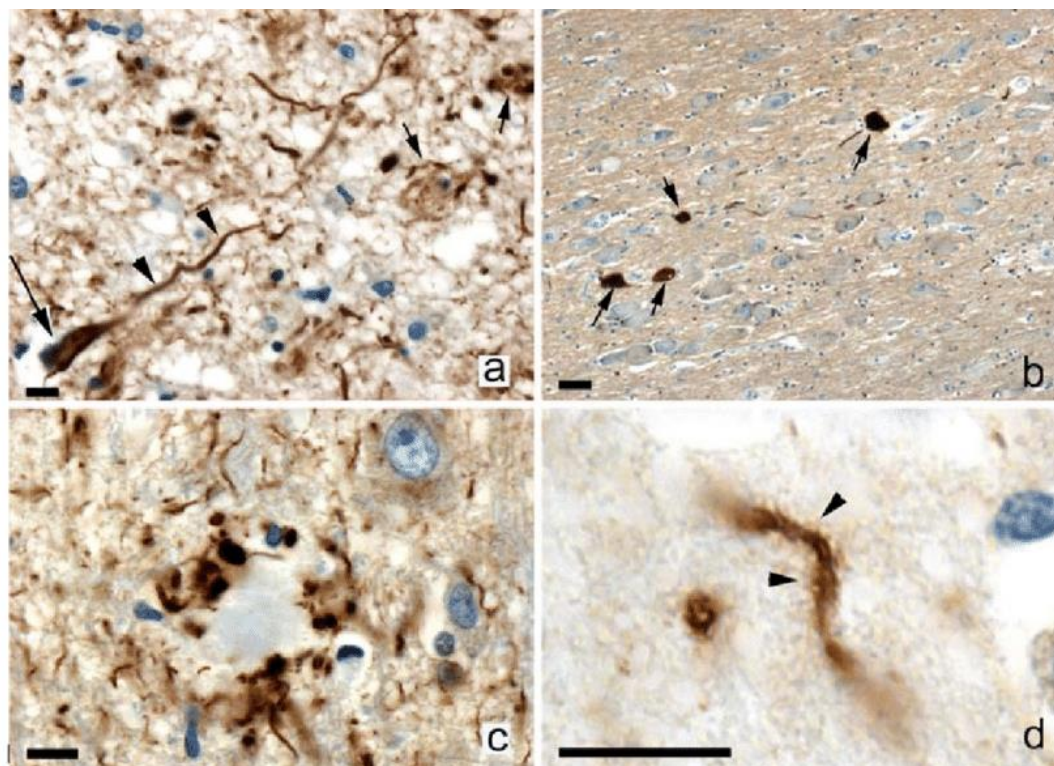


Slika 4. Shema procesa destabilizacije mikrotubula i formiranja neurofibrilarnih čvorova uslijed hiperfosforilacije τ -proteina (preuzeto iz [40] i modificirano).

Patološka akumulacija τ -proteina slijedi jasan prostorno-vremenski obrazac. Prvo se pojavljuje u entorinalnom korteksu, potom se širi kroz hipokampus i konačno dopire do širokih područja neokorteksa, što je zgodno opisano kao progresija τ -patologije [41]. Proces širenja pokazuje elemente prionskog modela, pri čemu τ -protein, oslobođen iz oštećenih neurona, koristi mehanizme kao što su egzocitoza i endocitoza susjednih živčanih stanica kako bi

inducirao agregaciju u njima. Kad τ -agregati oštete citoskelet, dolazi do prekida aksonskog transporta, što rezultira zaostajanjem mitohondrija, sinaptičkih vezikula i drugih organela u aksonima. To utječe na neuronsku funkciju i sinaptičku plastičnost. U eksperimentalnim uvjetima hiperfosforilirani τ -protein pokazuje sposobnost ometanja mitohondrijske funkcije i izazivanja disbalansa u homeostazi kalcija, što dodatno narušava energijski status neurona.

Na Slici 5 prikazan je stvarni histološki uzorak obojen AT8 protutijelom, gdje su uočljivi brojni neurofibrilarni čvorovi unutar moždanog tkiva oboljelih osoba, što potvrđuje prisutnost hiperfosforiliranog τ -proteina [42].



Slika 5. AT8 imunohistokemijski prikaz τ -patologije u Alzheimerovoj bolesti. (a) Distrofni neuriti (trokutići) i neurofibrilarni čvorovi (strelice) u entorinalnom korteksu. (b) Intracelularni τ -agregati u hipokampusu. (c) Tangliroviti agregat u piramidnom neuronu frontalnog korteksa. (d) Vlaknasti τ -agregat u degeneriranim dendritima [42].

Također, τ -patologija ima i poveznicu s neuroinflamacijom. Mikroglia i astrociti mogu stimulirati fosforilaciju τ -proteina aktivacijom citokinskih puteva. Interakcija između patoloških τ -molekula i glifnih stanica dovodi do cikličnog pojačavanja upalnih signala [43].

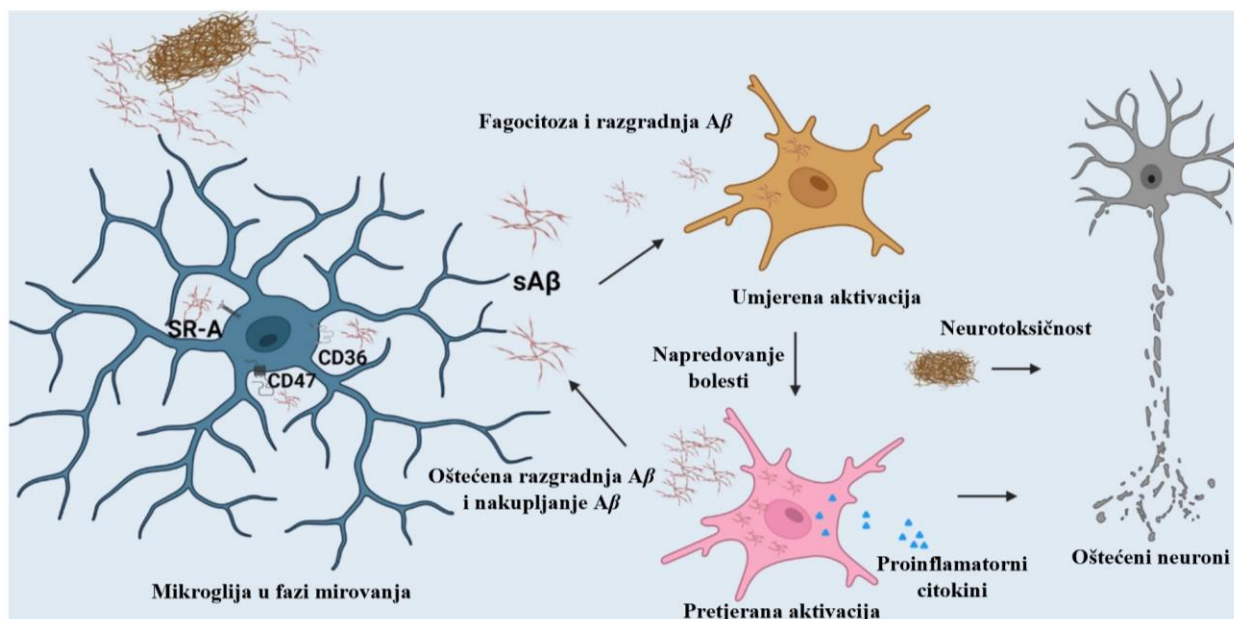
Na molekularnoj razini τ -protein se također modificira putem različitih posttranslacijskih modifikacija, kao što su oksidacija, acetiliranje i nitriranje, što utječe na njegovu sklonost agregaciji i razgradnji. Najnoviji uvidi također uključuju ulogu koju τ -protein igra u inhibiciji sinteze proteina i funkciji ribosoma, osobito u dendritima. Neki modeli

Alzheimerove bolesti ukazuju na to da τ -protein može djelovati kao regulator sinteze proteina, ali istovremeno, prekomjerno akumulirani τ -protein selektivno inhibira određene sinteze i time dovodi do sinaptičke disfunkcije [44].

2.2.4. Neuroinflamacija i oksidativni stres

Neuroinflamacija i oksidativni stres dva su patološka procesa usko povezana s napredovanjem Alzheimerove bolesti. Njihova međusobna modulacija stvara začarani krug u kojem upalni odgovori pogoršavaju oksidativna oštećenja, dok oksidacijski produkti dodatno pojačavaju upalne signale. Središnje stanice uključene u ove procese su mikroglija i astrociti, koji u zdravom mozgu imaju zaštitnu i homeostatsku ulogu, ali u patološkim uvjetima postaju izvori citokina, kemokina i reaktivnih vrsta kisika i dušika. U Alzheimerovoj bolesti mikroglija se aktivira u prisutnosti $A\beta$ depozita i hiperfosforiliranih τ -proteina, što dovodi do prijelaza iz homeostatskog u proupalni fenotip. Takva mikroglija pokazuje ekspresiju receptora poput TLR4, RAGE i CD36 te izlučuje upalne citokine poput IL-1 β , IL-6 i TNF- α , dok istovremeno pojačano proizvodi reaktivne kisikove vrste (ROS) posredstvom NADPH-oksidaze [45,46].

Astrociti također pokazuju reaktivne promjene u Alzheimerovoj bolesti, uključujući povećanu ekspresiju glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), gubitak sposobnosti uklanjanja glutamata iz sinapsi, poremećaj ionske ravnoteže i poticanje sekrecije dodatnih upalnih čimbenika. Sve to narušava neuronsku komunikaciju, plastičnost i doprinosi degeneraciji sinapsi [47]. Na Slici 6 prikazan je shematski prikaz promjene funkcije mikroglije u Alzheimerovoj bolesti. Ovaj prikaz ilustrira kako $A\beta$ -plakovi potiču prijelaz mikroglije iz neuroprotektivnog fenotipa s fagocitnom aktivnošću u proupalni oblik koji karakterizira gubitak homeostatske uloge i sekrecija toksičnih medijatora [48].



Slika 6. Uloga mikroglije u napredovanju Alzheimerove bolesti. U početnim fazama mikroglia doprinosi održavanju homeostaze središnjeg živčanog sustava uklanjanjem $A\beta$ plakova. Međutim, kako bolest napreduje, dolazi do pretjerane aktivacije mikroglije koja počinje izlučivati velike količine proupalnih čimbenika, što rezultira oštećenjem neurona i njihovih sinapsi (preuzeto iz [48] i modificirano).

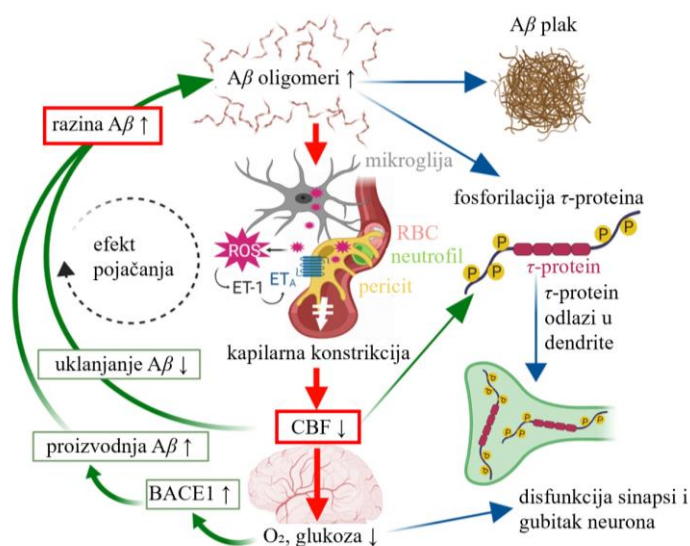
Mitochondrijska disfunkcija dodatno pogoršava stanje stvarajući okruženje u kojem se ROS nekontrolirano nakupljaju, što rezultira oksidativnim oštećenjima DNA, lipida i proteina. Enzimi kao što su superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza i katalaza gube učinkovitost, dok se markeri oksidativnog stresa poput 4-hidroksinonenala, karboniliranih proteina i 8-hidroksigvanozina sve više nalaze u tkivima bolesnika [49]. Osim štetnog učinka na neurone, ROS mogu inducirati dodatnu aktivaciju mikroglije i stvaranje inflamatornih medijatora, zatvarajući time toksični ciklus.

Posebno značajan aspekt ove patologije je uloga transkripcijskog faktora Nrf2, koji u zdravim stanicama pokreće ekspresiju antioksidativnih i detoksikacijskih enzima. U Alzheimerovoj bolesti ekspresija Nrf2 je narušena, a njegov gubitak iz jezgri neurona vodi do smanjene sposobnosti obrane protiv oksidacijskog stresa. Intervencije koje reaktiviraju Nrf2 put, poput nekih derivata sulforafana i bardoksolona, pokazale su potencijal u prekliničkim modelima, smanjujući upalu i oksidativna oštećenja [50].

2.2.5. Međusobna povezanost A β , τ -proteina i neuroinflamacije

Suvremeni molekularni uvidi u Alzheimerovu bolest sve snažnije ukazuju na to da β -amiloidni peptidi, τ -proteini i neuroinflamatorni procesi djeluju u usko povezanom patološkom sustavu. Umjesto izoliranih patofizioloških puteva, ovi elementi formiraju samoojačavajuću mrežu interakcija koje progresivno narušavaju funkciju neurona. Na Slici 7 prikazana je shema koja sažima ove uzajamne utjecaje. Početna akumulacija β -amiloidnog peptida izaziva aktivaciju mikroglije, čija uloga u fiziološkim uvjetima uključuje uklanjanje toksičnih amiloidnih struktura putem fagocitoze. Međutim, tijekom patološke progresije mikroglija prelazi u proupalni fenotip, što rezultira pojačanim otpuštanjem citokina poput TNF- α i IL-1 β te reaktivnih kisikovih vrsta [51]. Takvo okruženje pogoduje patološkoj fosforilaciji τ -proteina, što dovodi do njegovog odvajanja od mikrotubula i stvaranja intracelularnih agregata [52].

Potom τ -oligomeri, uz uzrokovanje aksonskih oštećenja i sinaptičkih disfunkcija, također djeluju kao dodatni upalni podražaj. Kroz mehanizme oslobađanja DAMP signala, uključujući ATP i HMGB1, τ -agregati stimuliraju daljnju aktivaciju mikroglije i astrocita [53]. Time nastaje pozitivna povratna sprega u kojoj međudjelovanje A β , τ -agregata i glijalnih stanica ne samo da održava upalni odgovor, već i pogoršava neurodegeneraciju. Značajno je što ovaj krug nije ograničen na pojedine regije mozga, već se širi kroz neuronske mreže, čime objašnjava i prostornu progresiju bolesti, osobito prema hipokampusu i neokorteksu [54].



Slika 7. Dijagram međusobnog djelovanja A β , τ -proteina i mikroglije u Alzheimerovoj bolesti (preuzeto iz [55] i modificirano).

2.2.6. Kolinergička disfunkcija u Alzheimerovoj bolesti

Jedna od najranije identificiranih i najtemeljitije proučenih patoloških promjena u Alzheimerovoj bolesti jest disfunkcija kolinergičkog sustava. Ova teorija, poznata kao kolinergička hipoteza, razvijena je temeljem opažanja da je kod oboljelih prisutno značajno smanjenje koncentracije acetilkolina (ACh) u pojedinim regijama mozga, osobito u hipokampusu i korteksu, koje su izravno povezane s procesima pamćenja i učenja [56]. Acetilkolin je ključni neurotransmitor u središnjem živčanom sustavu, a njegove sinaptičke koncentracije ovise o aktivnosti enzima kolinacetiltransferaze (ChAT), koji katalizira sintezu ACh, te acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE), koji ga razgrađuju [57].

U Alzheimerovoj bolesti dolazi do degeneracije kolinergičkih neurona, posebice u bazalnom dijelu prednjeg mozga, uključujući Meynertovu jezgru, što rezultira smanjenom sintezom acetilkolina [58]. U paraleli s neuronskim gubitkom, opaža se i smanjenje aktivnosti ChAT, dok se u nekim regijama mozga aktivnost AChE može čak povećati, što dodatno pogoršava kolinergičku neravnotežu [59]. Zanimljivo, u kasnijim stadijima bolesti uloga BChE postaje izraženija, budući da se njena ekspresija pojačava u odnosu na AChE, zbog čega se sve više istražuju selektivni i dvostruki inhibitori obje kolinesteraze [60].

Poremećaj kolinergičkog sustava ima širok raspon patofizioloških posljedica, pored smanjenja kognitivnih funkcija, prisutan je i utjecaj na regulaciju protoka krvi, neuroinflamaciju te modulaciju oslobađanja drugih neurotransmitora [61]. Kolinergički sustav ima i ulogu u regulaciji aktivnosti mikroglije, pri čemu aktivacija α -7 nikotinskih receptora može dovesti do smanjenja produkcije upalnih citokina, što povezuje ovu disfunkciju i s upalnim komponentama Alzheimerove patologije [62].

Na molekularnoj razini, AChE i BChE nisu samo enzimi koji razgrađuju acetilkolin, već i proteini koji mogu sudjelovati u modulaciji agregacije β -amiloidnog peptida. Naime, dokazano je da AChE može promicati agregaciju $A\beta$ tvoreći stabilne komplekse s njegovim monomerima i oligomerima, što ubrzava stvaranje amiloidnih vlakana i plakova [63]. BChE također pokazuje sličnu, iako slabiju, afinitetnu interakciju s $A\beta$, što otvara mogućnost da inhibicija ovih enzima osim simptomatskog učinka ima i patogenetski terapijski potencijal.

Upravo su ove spoznaje dovele do razvoja lijekova poput donepezila, rivastigmina i galantamina, koji inhibiraju razgradnju ACh u sinapsama. Međutim, njihova klinička djelotvornost je ograničena jer ne zaustavljaju progresiju bolesti, što se sve više pripisuje kompleksnoj patofiziologiji u kojoj kolinergički sustav sudjeluje samo kao jedna od

komponenti većeg mrežnog poremećaja [64]. Nova istraživanja usmjerena su prema razvoju inhibitora koji ciljaju i AChE i BChE, posebice onih s reverzibilnim mehanizmom djelovanja i dodatnim antioksidativnim ili neuroprotektivnim svojstvima.

2.2.7. Ostale hipoteze o etiologiji Alzheimerove bolesti

Osim najpoznatijih mehanizama poput akumulacije β -amiloidnog peptida, τ -patologije i oksidativnog stresa, u etiopatogenezi Alzheimerove bolesti ističu se i druge hipoteze koje dodatno naglašavaju njezinu kompleksnu multifaktorijalnu prirodu. Mitohondrijska hipoteza pretpostavlja da disfunkcija mitohondrija i povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta doprinose neurodegeneraciji, dok hipoteza eksitotoksičnosti ukazuje na štetne posljedice prekomjerne stimulacije glutamatnih receptora i unosa kalcija u neuron [65,66]. Metalna hipoteza povezuje poremećaj homeostaze metala poput bakra i željeza s promicanjem agregacije $A\beta$ -peptida i stvaranjem toksičnih ROS, dok se hipoteza inzulinske rezistencije fokusira na smanjenu osjetljivost mozga na inzulin, što ometa glukozni metabolizam i sinaptičku funkciju [67–69]. Apolipoprotein E (ApoE), posebno alel-ApoE4, smatra se čimbenikom rizika jer utječe na eliminaciju $A\beta$ i upalne procese, dok vaskularna hipoteza ukazuje na važnost cerebrovaskularnog zdravlja i propusnosti krvno-moždane barijere u razvoju bolesti [70,71]. Iako su ove hipoteze slabije istražene, doprinose razumijevanju Alzheimerove bolesti i otvaraju dodatne terapijske mogućnosti.

2.3. Kolinesteraze i njihova selektivnost

2.3.1. Biološka uloga i distribucija kolinesteraza u ljudskom organizmu

Kolinesteraze su skupina enzima koji imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze kolinergičkog sustava putem hidrolize estera kolina, ponajviše acetilkolina. Dvije glavne vrste kolinesteraza su acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8), koje se razlikuju po afinitetu prema supstratima, distribuciji u tkivima i fiziološkoj ulozi. Acetilkolinesteraza je visoko specifična za acetilkolin, dok butirilkolinesteraza može hidrolizirati širi spektar kolin-estera uključujući i butirilkolin, ali i acetilkolin s manjim afinitetom.

U zdravom organizmu acetilkolinesteraza je glavni enzim odgovoran za razgradnju acetilkolina u sinaptičkoj pukotini, čime prekida prijenos živčanog impulsa u kolinergičkim

sinapsama. Acetilkolinesteraza se primarno nalazi u kolinergičkim neuronima, osobito u korteksu i hipokampusu, a njezina aktivnost izravno je vezana uz kognitivne funkcije. Butirilkolinesteraza se dominantno sintetizira u jetri i nalazi se pretežno u perifernim tkivima, plazmi i gliji, no prisutna je i u mozgu, gdje njezina ekspresija postaje sve važnija s napredovanjem neurodegenerativnih bolesti. U ranijim stadijima Alzheimerove bolesti butirilkolinesteraza ima sekundarnu ulogu u odnosu na acetilkolinesterazu, no kako bolest napreduje i razina acetilkolinesteraze se smanjuje, značaj butirilkolinesteraze u razgradnji acetilkolina raste [58,72].

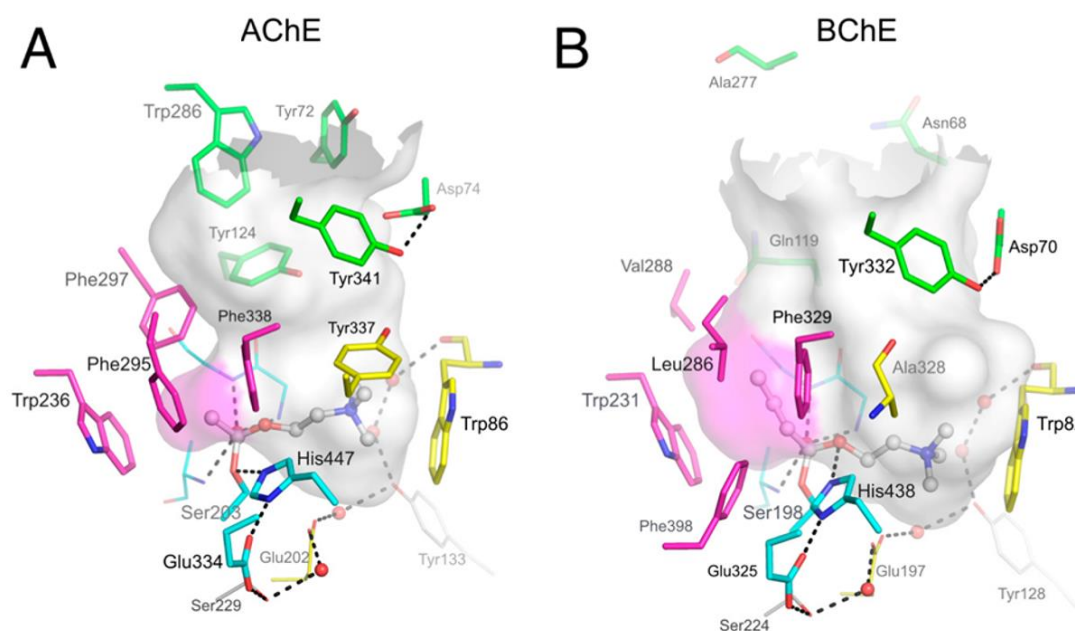
Važno je istaknuti da acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza potječu iz iste porodice karboksilesteraza, ali se izražavaju iz dva različita gena, i to ACHE za acetilkolinesterazu i BCHE za butirilkolinesterazu. Njihova genska ekspresija regulirana je kompleksnim mehanizmima, uključujući epigenetske modifikacije koje mogu utjecati na razine izražaja ovisno o dobi, stanju bolesti i izloženosti okolišnim čimbenicima. U mozgu se butirilkolinesteraza pojavljuje u različitim glijalnim populacijama, posebice u astrocitima, dok se acetilkolinesteraza dominantno pojavljuje u neuronima, što odražava njihovu specifičnu fiziološku ulogu u prijenosu živčanih impulsa i potpori živčanih stanica. Povećani interes za butirilkolinesterazu u terapiji Alzheimerove bolesti dodatno proizlazi iz njezine stabilnije ekspresije tijekom starenja i sposobnosti da kompenzira gubitak funkcije acetilkolinesteraze. U perifernim organima, kao što je jetra, butirilkolinesteraza se koristi kao biomarker izloženosti toksinima, osjetljivosti na anestetike i određene lijekove. U kontekstu neurodegeneracije, njezina prisutnost u središnjem živčanom sustavu daje joj značajnu ulogu kao alternativnu terapijsku metu [73–76].

2.3.2. Strukturne značajke aktivnih mjesta AChE i BChE

Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) pripadaju istoj obitelji serinskih hidrolaza, no iako pokazuju visok stupanj strukturne homologije, njihova aktivna mjesta posjeduju određene ključne razlike koje određuju supstratnu specifičnost, kinetiku inhibicije i farmakološki odgovor na terapijske spojeve. Središnje mjesto katalitičkog djelovanja u obje izoforme jest tzv. katalitička trijada, koja se kod AChE sastoji od ostataka serina, histidina i glutamata (Ser203, His447, Glu334), dok su kod BChE prisutne analogne pozicije, ali uz nešto različit konformacijski raspored i aminokiselinsku okolinu [77].

Jedna od najvažnijih razlika između AChE i BChE jest širina i fleksibilnost njihovog aktivnog mjesta, koji kod BChE pokazuje veći promjer i smanjenu steričku selektivnost. Dok je aktivno mjesto AChE usko i sadrži više aromatskih ostataka poput triptofana i fenilalanina koji sudjeluju u π - π interakcijama sa supstratima, BChE ima manje aromatskih, a više alifatskih ostataka. To joj omogućuje interakciju s većim i hidrofobnijim molekulama [78]. Takva topološka razlika omogućuje BChE da veže i hidrolizira širi spektar estera, uključujući ne samo acetilkolin već i propionilkolin, butirilkolin i različite sintetske estere.

Na Slici 8 prikazana je molekularna usporedba aktivnih mjesta AChE (lijevo) i BChE (desno), s jasno vidljivom razlikom u rasporedu katalitičkih ostataka i širini. Prikaz ističe ključne točke vezanja inhibitora te pokazuje koje su strukturalne značajke zaslužne za selektivnost određenih spojeva prema jednoj ili drugoj izoformi.



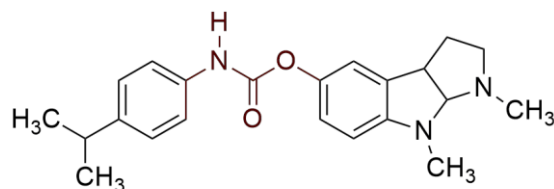
Slika 8. Usporedba aktivnog mjesta acetilkolinesteraze (A, lijevo) i butirilkolinesteraze (B, desno) [77].

Osim razlika u širini aktivnog mjesta, utvrđeno je i da je BChE termodinamički stabilnija, s većim brojem vodikovih veza i hidrofobnih kontakata, što može doprinijeti njezinoj otpornosti na denaturaciju i duljoj funkcionalnoj aktivnosti u patološkim uvjetima prisutnim kod Alzheimerove bolesti. Nadalje, kristalografske analize otkrile su da su određeni spojevi, osobito karbamati i trifenilfosfati, sposobni formirati stabilne kompleksne interakcije s BChE zahvaljujući njezinom proširenom aktivnom mjestu, što omogućuje dizajn selektivnih inhibitora usmjerenih prema ovoj izoformi u kasnijim fazama bolesti [79].

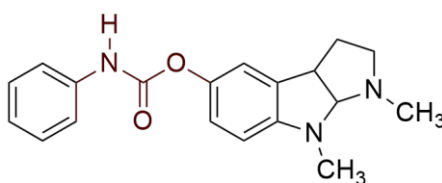
Ove strukturne spoznaje imaju važnu translacijsku vrijednost u farmakološkom dizajnu lijekova. Razumijevanje topologije aktivnog mjesta i njegove fleksibilnosti omogućuje racionalan dizajn selektivnih inhibitora koji ciljano vežu jednu izoformu bez značajnog utjecaja na drugu, čime se potencijalno smanjuju nuspojave i povećava učinkovitost terapije. U novijim istraživanjima koristi se pristup računalnog modeliranja u kojem se molekule inhibitora optimiziraju za točno određene interakcije s katalitičkom trijadom i perifernim anionskim mjestom u enzimu, a takvi modeli često uključuju i simulacije vezanja u dinamičkom okruženju [80].

2.3.3. Selektivna inhibicija BChE i njezin terapijski potencijal u Alzheimerovoj bolesti

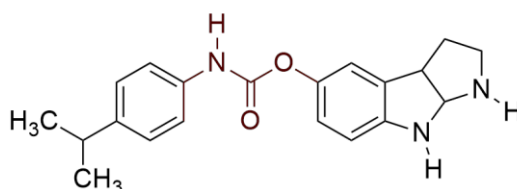
Selektivna inhibicija butirilkolinesteraze (BChE) postaje sve relevantnija u terapiji Alzheimerove bolesti, posebno u uznapredovalim fazama, kada aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) značajno opada i BChE preuzima veću biokemijsku ulogu u razgradnji acetilkolina [58]. U tom kontekstu, razvoj supstanci s izraženim afinitetom i specifičnošću za BChE predstavlja novu terapijsku strategiju koja omogućuje održavanje kognitivne funkcije uz minimalne nuspojave povezane s kolinergičkom hiperstimulacijom. Strukturna obilježja BChE, uključujući šire i fleksibilnije katalitičko mjesto te prisutnost ključnih aromatskih i hidrofilnih ostataka, oblikovala su razvoj karbamatnih inhibitora koji ciljano djeluju na nju bez inhibicije AChE [81]. Među temeljnim primjerima je kimserin i njegovi derivati, koji su dokazali selektivnost prema BChE i pokazali sposobnost reverzibilne inhibicije, povećavajući razinu acetilkolina u moždanom tkivu te poboljšavajući kognitivne funkcije u eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti, bez tipičnih nuspojava poput mučnine ili bradikardije (Slika 9) [82,83]. Njihov farmakofor uključuje karbamatnu skupinu odgovornu za inhibiciju serinske hidrolaze, dok ostatak molekule osigurava visoku selektivnost i povoljan farmakokinetički profil.



Kimserin



Fenserin



Bisnorkimserin

Slika 9. Kemijska struktura selektivnog BChE inhibitora kimserina i njegovih derivata.

Napredna računalna i kristalografska istraživanja otvorila su put razvoju naprednih karbamatnih spojeva koji kombiniraju selektivno vezanje s dodatnim svojstvima, poput smanjenja agregacije β -amiloidnih peptida i modulacije upalnih odgovora. Ovi spojevi ciljaju serin u katalitičkoj trijadi, a istovremeno se stabilno vežu u aktivnom mjestu zahvaljujući interakciji s aromatskim ostacima Trp82 i Phe329 [84]. Takvi spojevi često uključuju aromatske ili heterocikličke prstenove koji osiguravaju π - π interakcije unutar aktivnog mjesta, čime se dodatno stabilizira kompleks enzim-inhibitor. Osim toga, derivati kimserina poboljšani su u pogledu sposobnosti prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru, što omogućuje njihovo djelovanje u ciljanim regijama mozga.

Proširena istraživanja pokazuju da BChE inhibicija može utjecati i na mikroglijski i astrocitni odgovor u mozgu, modulirajući signalne puteve proupalnih citokina i smanjujući kroničnu neuroinflamaciju, što dodatno poboljšava neuronalnu funkciju i smanjuje oksidativni stres. Također, pokazano je da selektivna inhibicija BChE može smanjiti proizvodnju reaktivnih

kisikovih vrsta (ROS), što doprinosi očuvanju mitohondrijske funkcije i sprječavanju daljnjeg oštećenja neurona. Na temelju tih dokaza, BChE selektivni inhibitori smatraju se ključnim komponentama u višeciljanim terapijskim pristupima, često u kombinaciji s antioksidansima, anti- β -amiloidnim lijekovima ili modulacijom τ -proteina, čime se nastoji postići bolji terapijski učinak uz smanjene nuspojave [85].

2.3.4. Farmakodinamičke i farmakokinetičke osobine inhibitora butirilkolinesteraze

Selektivni inhibitori butirilkolinesteraze razvijaju se s ciljem optimizacije terapijskog učinka u kasnijim stadijima Alzheimerove bolesti, pri čemu njihova učinkovitost ovisi o preciznim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim parametrima. U farmakodinamičkom smislu, ključno je postizanje visoke inhibicijske snage uz selektivno vezanje za BChE, što podrazumijeva nizak K_i i trajnu inhibiciju bez neselektivne interferencije s acetilkolinesterazom. Inhibicijska konstanta K_i predstavlja koncentraciju inhibitora pri kojoj se polovica enzimskih aktivnih mjesta nalazi u kompleksu s inhibitorom, što znači da niže vrijednosti K_i ukazuju na jači afinitet interakcije između inhibitora i enzima. Ova vrijednost, izražena najčešće u nanomolarnim ili mikromolarnim jedinicama, služi kao ključan parametar za usporedbu potentnosti različitih spojeva i njihovu selektivnost prema ciljnom enzimu. Brojni karbamatni derivati pokazuju reverzibilnu ili kvazi-reverzibilnu inhibiciju putem kovalentne interakcije s katalitičkom serinskom skupinom u aktivnom mjestu enzima. Takva veza zahtijeva određeno vrijeme za spontane dekarbamilacijske procese, čime se produljuje trajanje farmakološkog učinka bez potrebe za čestom primjenom [86].

Različiti spojevi, poput MF-8622, K298 i metoksifenilnih derivata kimserina, pokazuju selektivnost prema BChE u nanomolarnom rasponu, uz znatno niži afinitet prema AChE. Molekularna fleksibilnost ovih inhibitora omogućuje im efikasno pozicioniranje unutar proširenog aktivnog mjesta BChE, čime se osigurava čvrsta interakcija i stabilna inhibicija [87]. Pritom nije zanemariv ni učinak vremenske inhibicije, jer farmakodinamička svojstva odražavaju ne samo afinitet nego i kinetiku inaktivacije enzima, što postaje posebno važno u degeneriranom neurotkivu s promijenjenim enzimskim ekspresijama.

S farmakokinetičkog aspekta, posebnu pažnju privlače svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije ovih spojeva. Lipofilnost predstavlja kritičan parametar za prijelaz kroz krvno-moždanu barijeru, a spojevi poput euprozina i derivata bisnorkimserina dizajnirani su s optimalnim logP vrijednostima kako bi postigli visoku centralnu bioraspoloživost [88].

Neki od njih dostižu maksimalne koncentracije u moždanom tkivu unutar dva do tri sata nakon oralne primjene, bez značajnih akumulacija u perifernim organima, dok se eliminacija odvija putem hepatičke biotransformacije, uz djelomično sudjelovanje CYP450 sustava [89].

Dodatno poboljšanje profila ovih inhibitora ostvaruje se integracijom funkcijskih skupina s antioksidativnim djelovanjem, kao što su fragmenti ferulinske kiseline, rezveratrola ili melatonina, čime se povećava stabilnost molekule u biološkim tekućinama i dodaje sekundarna neuroprotektivna funkcija [90]. Kombinacija inhibicijske aktivnosti i antioksidacijskog potencijala omogućuje višestruki pristup patofiziologiji bolesti, osobito u uvjetima oksidativnog stresa i neuroinflamacije. Takav pristup pokazuje se osobito prikladnim za progresivne neurodegenerativne procese, u kojima je potrebno osigurati trajnu modulaciju kolinergičke aktivnosti uz paralelno smanjenje neurotoksičnih faktora.

Farmakokinetički profil mora se pritom prilagoditi promijenjenim fiziološkim uvjetima mozga oboljelih bolesnika, poput reducirane perfuzije, promjena u propusnosti krvno-moždane barijere i prisutnosti upalnih medijatora koji mogu mijenjati farmakodinamiku spoja. Iz tog razloga najnoviji spojevi uključuju i strukturalne adaptacije koje smanjuju interakciju s glikoproteinskim transporterima poput P-gp, čime se dodatno povećava intracerebralna koncentracija lijeka [91].

2.4. Karbamati

2.4.1. Klasifikacija i mehanizam djelovanja karbamata

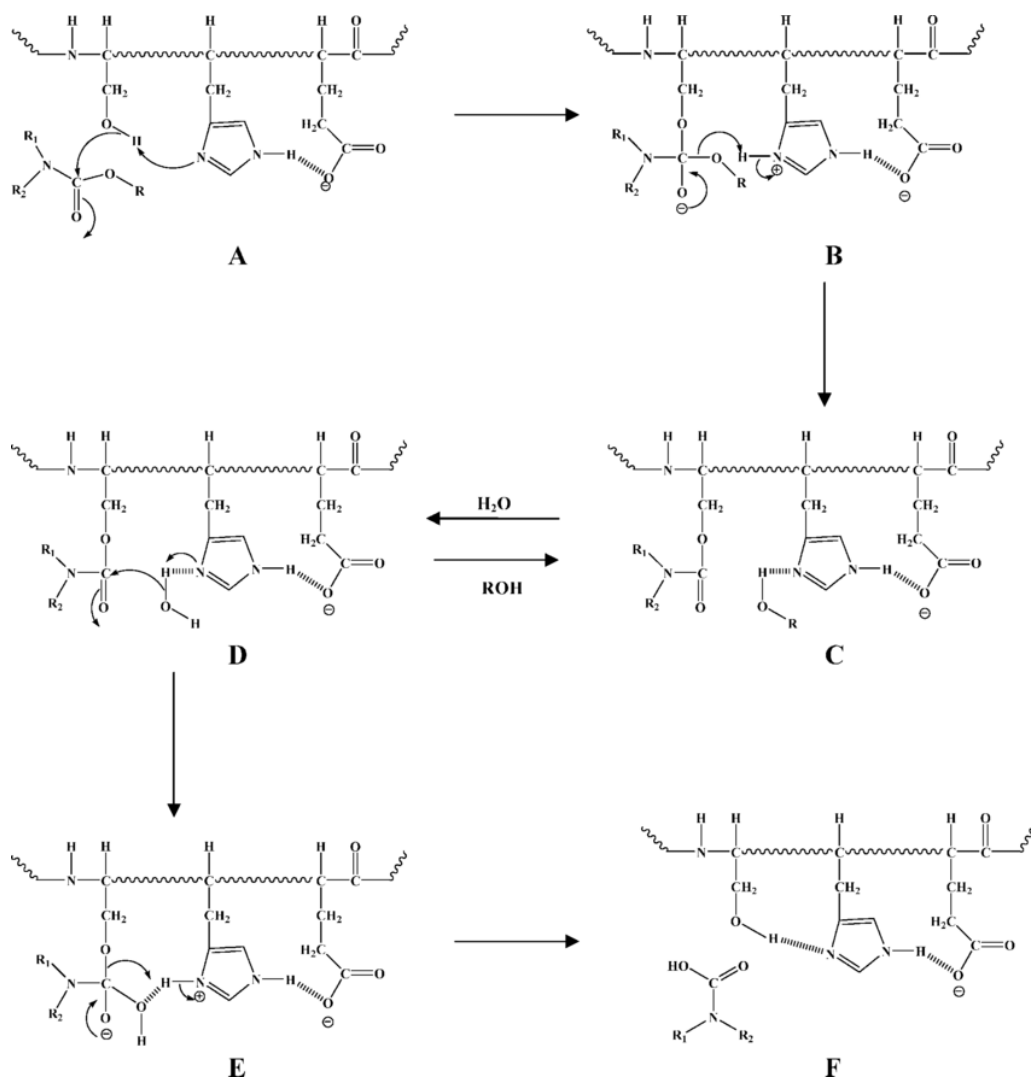
Karbamati čine kemijski i biološki raznoliku skupinu spojeva čija je funkcijska osnova karbamatna skupina, tj. strukturni motiv —NHCOO— , odgovoran za njihovu reaktivnost i biološku aktivnost. Kao inhibitori kolinesteraza, karbamati djeluju putem mehanizma poznatog kao pseudo-nepovratna inhibicija, pri čemu se karbamatna skupina kovalentno veže za serinsku hidroksilnu skupinu unutar katalitičkog mjesta enzima, najčešće butirilkolinesteraze ili acetilkolinesteraze, stvarajući stabilan karbamilirani kompleks koji se sporije hidrolizira od acilirane forme i tako produljuje trajanje inhibicijskog učinka [92]. Mehanizam ove karbamilacije prikazan je na shemi 1, gdje su jasno prikazani koraci nukleofilnog napada serinske skupine, formiranje prijelaznog kompleksa te konačno otpuštanje alkohola uz nastanak stabilnog karbamiliranog enzima [93]. Za razliku od ireverzibilnih inhibitora poput organofosfata, karbamati omogućuju regeneraciju enzima nakon dekarbamilacije, čime

zadržavaju određenu reverzibilnost, ali bez potrebe za brzim izlučivanjem ili neutralizacijom zbog toksičnosti. Značajna prednost karbamata u kontekstu neurodegenerativnih bolesti leži upravo u toj njihovoj selektivnoj, kontroliranoj i vremenski produljenoj inhibiciji, što omogućuje postizanje terapijskog učinka uz smanjeni rizik od nuspojava koje su povezane s prekomjernom kolinergičkom stimulacijom.

Strukturne varijacije unutar klase karbamata omogućuju stvaranje spojeva s visokom selektivnošću za određeni tip kolinesteraze. Tako se molekule koje sadrže prostrane aromatske ili stilbenske fragmente, uključujući derivirane stilben-karbamate, bolje uklapaju u prošireno aktivno mjesto butirilkolinesteraze, čija prostorna organizacija prihvaća voluminoznije i fleksibilnije ligande, dok acetilkolinesteraza ostaje selektivno inhibirana samo od manjih, kompaktnijih molekula [94]. Uz geometriju molekule, bitnu ulogu ima i raspored elektronskih donora i akceptora, jer omogućuju stvaranje vodikovih veza i π - π interakcija s aromatskim ostacima enzima kao što su Trp82 i Phe329. Time se dodatno stabilizira kompleks i produljuje vrijeme inhibicije, što se pozitivno odražava na učestalost doziranja i učinkovitost terapije.

Posebnu pažnju privlače karbamati s dvostrukim farmakološkim učinkom, primjerice oni koji uz inhibiciju kolinesteraza djeluju i kao antioksidansi. Integracija funkcijskih skupina kao što su fenolni ili stilbeniski derivati u karbamatnu jedinicu dovodi do pojave višefunkcionalnih inhibitora, koji osim povećanja koncentracije acetilkolina u sinapsi smanjuju i oksidativni stres u neuronskom tkivu, što predstavlja dodatnu prednost u liječenju Alzheimerove bolesti [95]. Takvi spojevi pokazuju i bolju stabilnost u biološkim tekućinama te višu bioraspoloživost, osobito kada je logP vrijednost unutar optimalnog raspona za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru. Među tim spojevima ističu se derivati rezveratol-karbamata i stilben-karbamati [96].

Farmakološki učinak karbamata dodatno ovisi o kinetici vezanja i otpuštanja, pri čemu spojevi koji pokazuju kvazi-reverzibilnu inhibiciju omogućuju produženo djelovanje bez akumulacije lijeka u perifernim tkivima. Taj se učinak dodatno može modulirati prisutnošću farmakofora koji omogućuju selektivno vezanje u centralnom živčanom sustavu, čime se povećava intracerebralna koncentracija uz istovremeno smanjenje sistemskih nuspojava. Naposljetku, raznolikost izvora karbamatnih spojeva, uključujući sintetske, polusintetske i prirodne derivate, dodatno proširuje terapijski potencijal ove klase, osobito kada se u obzir uzmu kombinirani učinci na kolinesteraznu aktivnost, oksidativni stres i upalne mehanizme povezane s neurodegeneracijom [97].

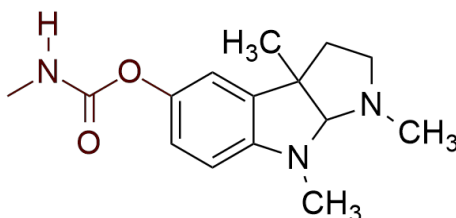


Shema 1. Mehanizam kovalentne modifikacije enzima karbamatnim inhibitorom, prikazuje prijelazne faze karbamilacije serinske skupine i reverzibilne dekarbamilacije uz sudjelovanje alkohola (Shema preuzeta iz literature [93]).

2.4.2. Prirodni izvori karbamata i njihova farmakološka važnost

Karbamatni spojevi prirodnog podrijetla predstavljaju zanimljiv izvor biološki aktivnih molekula s potencijalnom primjenom u liječenju neurodegenerativnih bolesti. U biljkama, gljivama i nekim morskim organizmima pronađeni su sekundarni metaboliti koji sadržavaju karbamatnu skupinu, a koji nerijetko pokazuju inhibicijsku aktivnost prema kolinesterazama ili modulacijski učinak na druge neurobiološke procese. Takvi spojevi, dobiveni iz prirodnih izvora, pružaju prednost u smislu biokompatibilnosti, biosigurnosti i kompleksnih struktura koje je teško postići sintetskim putem. Među najpoznatijim prirodnim karbamatima su fizostigmin, izoliran iz biljke *Physostigma venenosum*, i eserolin, derivat koji dijeli sličan mehanizam djelovanja. Fizostigmin djeluje kao reverzibilni inhibitor acetilkolinesteraze i već

se dugo proučava u kontekstu neuroloških poremećaja, uključujući Alzheimerovu bolest [98]. Na Slici 10 prikazana je kemijska struktura fizostigmina kao reprezentativnog prirodnog karbamatnog spoja koji posjeduje farmakološku aktivnost prema kolinesterazama.



Slika 10. Kemijska struktura fizostigmina.

Biljke roda *Galantus*, *Narcissus* i *Leucojum*, koje pripadaju porodici *Amaryllidaceae*, sadržavaju alkaloidne poput galantamina, no u nekim vrstama zabilježena je prisutnost i karbamatnih derivata koji dodatno moduliraju kolinergičku aktivnost. Osim toga, istraživanja na gljivama roda *Aspergillus* i *Penicillium* pokazala su sintezu karbamatnih metabolita s potencijalnim neuroprotektivnim svojstvima. Ovi spojevi djeluju ne samo kao inhibitori kolinesteraza, već i kao modulatori oksidacijskog stresa i živčanih upalnih procesa, što ih čini privlačnima za daljnji razvoj kao višefunkcionalnih terapijskih sredstava [99].

Morski organizmi, osobito spužve i mekušci, predstavljaju još jedan važan izvor prirodnih karbamata. Spojevi izolirani iz rodova *Lissoclinum*, *Didemnum* i *Aplidium* pokazali su prisutnost karbamatnih skupina u strukturi, uz snažan bioaktivni potencijal. Neki od njih pokazuju sinergistički učinak na kolinesteraznu inhibiciju i antioksidacijske mehanizme u živčanom tkivu, što upućuje na njihov potencijal u prevenciji progresije Alzheimerove bolesti [100]. Osim toga, istraživanja su pokazala da se određeni prirodni karbamati mogu povezati s receptorima živčanih prijenosnika kao što su NMDA i GABA receptori, čime dodatno moduliraju sinaptičku aktivnost i štite neurone od ekscitotoksičnosti i apoptoze [101].

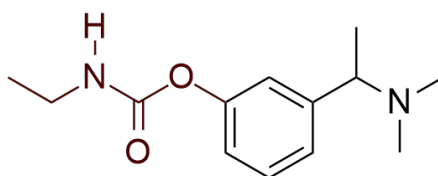
U kontekstu terapijske primjene, prirodni karbamati često predstavljaju polazne točke za razvoj polusintetskih analoga s poboljšanim farmakokinetičkim profilom. Modifikacijom funkcijskih skupina i prilagodbom lipofilnosti ili afiniteta prema određenim enzimskim ciljevima mogu se dobiti spojevi s boljom oralnom bioraspoloživošću, produljenim djelovanjem i smanjenim nuspojavama. Nadalje, njihova sposobnost prelaska kroz krvno-moždanu barijeru čini ih pogodnima za sustavnu primjenu u liječenju centralnih neuroloških

bolesti. Farmakološki potencijal ovih molekula stoga nadilazi inhibiciju kolinesteraza te uključuje širu neuroproteksijsku aktivnost koja uključuje antioksidativne, protuupalne i neurotrofičke učinke [100].

2.4.3. Polusintetski karbamati

Polusintetski karbamati predstavljaju most između prirodnih spojeva i potpuno sintetskih lijekova, kombinirajući strukturne osobitosti biološki aktivnih prirodnih molekula s kemijski modificiranim funkcionalnim skupinama koje optimiziraju njihova farmakološka svojstva. Racionalni dizajn ovih spojeva temelji se na identifikaciji farmakofornih elemenata koji su odgovorni za inhibiciju kolinesteraza, kao što su karbamatna skupina, aromatski fragmenti i polarne skupine koje omogućuju stvaranje vodikovih veza s aktivnim mjestom enzima. Cilj modifikacije je poboljšanje selektivnosti prema određenom izoenzimu (BChE ili AChE), optimizacija kinetike inhibicije i produljenje poluživota lijeka u sustavu [102].

Značajan napredak ostvaren je derivatizacijom poznatih inhibitora kao što su eserolin i rivastigmin, pri čemu su uvedene supstitucije koje mijenjaju lipofilnost, pK_a vrijednosti i sposobnost prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru. Na Slici 11 prikazana je kemijska struktura rivastigmina, jednog od klinički najvažnijih polusintetskih karbamata, čija konformacijska fleksibilnost i prisutnost karbamatne skupine omogućuju selektivnu i kvazireverzibilnu inhibiciju acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.



Slika 11. Kemijska struktura rivastigmina, polusintetskog karbamata.

Također su razvijeni spojevi koji kombiniraju karbamatni mehanizam djelovanja s drugim terapijskim modalitetima, poput inhibicije monoaminoooksidaza, čime se omogućuje višestruki farmakološki učinak u liječenju kompleksnih neurodegenerativnih sindroma [103]. Ovi višefunkcionalni spojevi pokazuju sinergistički učinak smanjenjem oksidativnog stresa i

regulacijom razine neurotransmitora, uz paralelnu inhibiciju kolinesteraza, što doprinosi sveobuhvatnijem pristupu terapiji Alzheimerove bolesti.

Farmakokinetičke optimizacije polusintetskih karbamata uključuju poboljšanje apsorpcije i distribucije, smanjenje metaboličke razgradnje u jetri te smanjenje interakcije s transporterima koji ograničavaju prijenos lijekova u središnji živčani sustav. Posebna pažnja usmjerena je na izbjegavanje P-gp-supstratnosti, jer ona značajno ograničava koncentraciju lijeka u mozgu. U tom smislu razvijeni su karbamatni analozi s modificiranim bočnim lancima, čime se smanjuje afinitet prema P-gp-transporterima i povećava intracerebralna raspoloživost [104].

Također, sve veći broj studija uključuje računalno potpomognut dizajn u otkrivanju novih polusintetskih karbamata, pri čemu se koriste kvantitativni modeli odnosa strukture i aktivnosti (QSAR) te molekulsko modeliranje enzimske-ligandne interakcije kako bi se predvidjela selektivnost i potencijalna toksičnost spojeva prije sinteze [105]. Kombinacija eksperimentalnih i *in silico* pristupa ubrzava otkrivanje novih kandidata i omogućuje detaljno razumijevanje strukturalnih uvjeta potrebnih za potentnu i selektivnu inhibiciju ciljanih enzima. Terapijski potencijal polusintetskih karbamata tako postaje sve izraženiji, ne samo kao simptomatski tretman Alzheimerove bolesti, već i kao alat za intervenciju u patofiziološkim procesima neurodegeneracije.

2.4.4. Inovativne strategije optimizacije karbamatnih derivata u liječenju neurodegeneracije

Suvremeni pristupi optimizaciji karbamatnih derivata temelje se na sve većem razumijevanju molekularnih mehanizama neurodegeneracije i potrebi za razvojem terapijskih sredstava koja nadilaze tradicionalnu inhibiciju kolinesteraza. Inovacije u dizajnu karbamatnih molekula obuhvaćaju integraciju dodatnih funkcionalnosti koje moduliraju različite patofiziološke ciljeve, poput neuroinflamacije, oksidacijskog stresa, mitohondrijske disfunkcije i disregulacije homeostaze metalnih iona. Primjerice, spojevi koji sadrže u svojoj strukturi karbamatnu skupinu povezanu s heterocikličkim jezgrom s protuupalnim svojstvima pokazuju sposobnost inhibicije ekspresije citokina poput IL-1 β i TNF- α , što ih čini relevantnima za ublažavanje neuroinflamacijskih komponenti Alzheimerove bolesti [106].

Uz to, karbamati koji sadrže elektrofilne podjedinice sposobne za kovalentnu interakciju s reaktivnim tiolnim skupinama u regulatornim proteinima antioksidativnih putova (npr. Keap1-

Nrf2-signalni put) mogu aktivirati endogene obrambene mehanizme čime se smanjuje peroksidacijska šteta u neuronskom tkivu. U tom kontekstu istraživani su spojevi koji spajaju karbamatnu funkcionalnost s tiokarbamatnim, izotiocijanatnim i seleno-organospojevima, uz zabilježenu sposobnost simultanog inhibiranja kolinesteraza i induciranja antioksidativnih enzima poput heme-oksigenaze-1 i NAD(P)H: kinon-oksidoreduktaze [107].

Dodatno, zanimljive su strategije konjugacije karbamata s peptidnim nosačima ili s lipofilnim transporterima koji omogućuju ciljanju dostavu karbamatnog lijeka u specifična područja mozga, poput hipokampusu ili korteksa. Takve molekule mogu ostvariti lokalizirano djelovanje uz izbjegavanje sistemske izloženosti i smanjenje nuspojava. Pritom se posebno ispituje učinkovitost spojeva koji iskazuju selektivnu akumulaciju u neuronima zahvaćenima patološkom hiperfosforilacijom τ -proteina ili prisutnošću amiloidnih agregata [108].

U inovativnim karbamatima također se koriste konformacijski zaključeni spojevi (engl. *conformationally restricted carbamates*) kako bi se postigla precizna orijentacija inhibicijskog modula prema aktivnom mjestu enzima, čime se povećava afinitet i smanjuje nespecifično vezanje. Ovakav dizajn posebno je koristan za selektivnu inhibiciju butirilkolinesteraze u kasnim fazama bolesti, čime se nadomješta pad aktivnosti acetilkolinesteraze u degeneriranom tkivu. Korištenje rigidnih bicikličkih ili tricikličkih jezgara, često izvedenih iz prirodnih alkaloida ili sintetskih analoga, povezuje se s višom stabilnošću i produljenim trajanjem inhibitornog učinka.

Na kraju, perspektivne metode za generiranje novih karbamatnih struktura uključuju automatiziranu sintezu i korištenje umjetne inteligencije u predviđanju bioaktivnosti, selektivnosti i toksikoloških profila. Na temelju velikih baza podataka i algoritama strojnog učenja, moguće je dizajnirati virtualne knjižnice karbamata s unaprijed predviđenim svojstvima, čime se znatno ubrzava identifikacija potencijalno uspješnih kandidata za daljnja istraživanja [109]. Time se otvara novo poglavlje u razvoju karbamatnih terapijskih sredstava, u kojem racionalni dizajn, kemijska modulacija i digitalna tehnologija djeluju sinergijski u cilju izgradnje preciznih, selektivnih i učinkovitih molekula za liječenje neurodegenerativnih poremećaja.

2.5. Računalno modeliranje

2.5.1. Računalno modeliranje inhibitora kolinesteraza u terapiji Alzheimerove bolesti

Računalno modeliranje predstavlja jednu od ključnih komponenti suvremenog pristupa razvoju lijekova, osobito u području neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti. Ova metodologija omogućuje dubinsko razumijevanje interakcija na molekulskoj razini između potencijalnih terapijskih spojeva i njihovih bioloških ciljeva, uključujući enzime poput acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Umjesto nasumičnog testiranja velikog broja spojeva, računalni alati omogućuju racionalan dizajn molekula temeljen na poznatoj strukturi ciljnih biomolekula, čime se znatno smanjuje vrijeme i trošak istraživačkog procesa [110,111].

Temeljne metode koje se koriste u računalnom modeliranju uključuju molekulski docking, molekulsku dinamiku i kvantno-kemijsko modeliranje. Molekulski docking omogućuje simulaciju vezanja malih molekula na aktivno mjesto enzima te predviđa energiju vezanja i konformaciju kompleksa ligand–enzim. Ova metoda pruža uvid u geometrijske i elektronske karakteristike interakcija, uključujući prisutnost vodikovih veza, π – π interakcija, hidrofobnih kontakata te drugih privlačnih međudjelovanja [112,113]. Kroz iterativni proces analize i optimizacije, moguće je dizajnirati inhibitore s poboljšanom selektivnošću i potentnošću, osobito za enzime čija se ekspresija mijenja tijekom progresije bolesti [114].

Molekulska dinamika, s druge strane, omogućuje simulaciju gibanja molekula u vremenu pod utjecajem fizičkih sila, čime se dobiva dinamička slika ponašanja kompleksa enzim–ligand u uvjetima koji imitiraju biološko okruženje. Ova tehnika osobito je korisna za analizu stabilnosti kompleksa, identifikaciju prijelaznih stanja i uvid u moguće konformacijske promjene enzima koje utječu na farmakološku aktivnost [115]. Kvantno-kemijsko modeliranje, iako računalno zahtjevnije, omogućuje točnu analizu elektronskih svojstava molekula, raspodjele naboja i reakcijskih mehanizama, čime se dodatno pojašnjava razumijevanje inhibitornog djelovanja.

Jedan od najvažnijih aspekata računalnog modeliranja u razvoju inhibitora kolinesteraza jest njegova primjena u ranoj fazi identifikacije hit struktura. Korištenjem pristupa temeljenog na strukturi cilja (engl. *structure-based drug design*) moguće je virtualno proći velike knjižnice spojeva te odabrati samo one kandidate koji zadovoljavaju kriterije za vezanje na aktivno mjesto enzima [116]. Time se ne samo smanjuje broj spojeva koji se moraju sintetizirati, već se

i povećava vjerojatnost otkrivanja spojeva s povoljnim farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima.

Osim klasičnog dockinga, računalni alati danas uključuju i predviđanje ADME-Tox profila spojeva, čime se unaprijed procjenjuje njihova apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i potencijalna toksičnost. Integracija ovih predviđanja s rezultatima docking simulacija omogućuje cjelovit pristup razvoju lijekova, usmjeravajući istraživanja prema molekulama koje imaju prihvatljiv sigurnosni profil [110,112]. Sve veća dostupnost kristalnih struktura AChE i BChE u bazi podataka Protein Data Banku dodatno podupire preciznost ovih simulacija te otvara mogućnost za razvoj visoko specifičnih inhibitora koji djeluju u točno definiranim patološkim uvjetima [113]. Stoga računalno modeliranje ne predstavlja samo alat za uštedu resursa, već ključno sredstvo za postizanje racionalnog i učinkovitog razvoja inhibitora kolinesteraza. Njegova uloga u integraciji podataka iz strukturne biologije, kemoinformatike i farmakologije omogućuje detaljno mapiranje odnosa strukture i aktivnosti, što čini temelj za dizajn molekula visoke terapijske vrijednosti u borbi protiv Alzheimerove bolesti [117].

2.5.2. Metodološki pristupi u računalnom modeliranju interakcija enzim–ligand

Računalno modeliranje molekulskih interakcija između inhibitora i ciljanih enzima u razvoju lijekova temelji se na nizu metodoloških koraka koji omogućuju preciznu evaluaciju farmakološkog potencijala spojeva prije njihove sinteze. U fokusu takvog modeliranja je proces molekuskog dockinga, koji uključuje virtualno smještanje liganda unutar aktivnog mjesta enzima s ciljem procjene stabilnosti i prirode interakcije. Docking algoritmi pritom koriste različite pristupe za uzorkovanje konformacijskih prostora liganda, uključujući rigidne, semirigidne i potpuno fleksibilne modele, kako bi se identificirale optimalne vezne poze. Najčešće korišteni alati poput AutoDock, GOLD i Glide implementiraju različite strategije optimizacije, primjerice genetske algoritme, simulirano kaljenje ili Monte Carlo metode, kako bi se poboljšala preciznost predikcije [118].

Osim uzorkovanja konformacija, ključan aspekt dockinga je procjena energije vezanja između liganda i ciljanog enzima, koja se izražava pomoću tzv. funkcija bodovanja (engl. *scoring functions*). Ove funkcije kvantitativno opisuju efekte koji utječu na termodinamičku stabilnost kompleksa ligand-enzim, analizom struktura dobivenih dockingom i identifikacijom prisutnih međudjelovanja poput vodikovih veza, van der Waalsovih sila, hidrofobnih (npr.

alkil-alkil) i elektrostatskih (poput kation- π) interakcija. Iako pojedinačni scoring modeli mogu imati ograničenu mogućnost predviđanja, kombinacija više funkcija u tzv. *consensus scoring* pristupu značajno povećava točnost u prepoznavanju bioaktivnih spojeva. U novije vrijeme, sve veću ulogu u ovom procesu imaju i *deep learning* modeli koji uče kompleksne obrasce vezanja iz postojećih baza podataka liganda i enzima te ih koriste za predviđanje nove bioaktivnosti [119].

Nakon početnog pozicioniranja liganda, dodatna razina preciznosti postiže se primjenom molekulske dinamike (MD), koje simuliraju ponašanje kompleksa ligand–enzim kroz vrijeme, uzimajući u obzir fleksibilnost proteina, gibanje molekula otapala i temperaturne oscilacije. Ovi modeli omogućuju evaluaciju stabilnosti kompleksa u realnim uvjetima te identifikaciju prijelaznih stanja koja nisu dostupna statičkim metodama. Komplementarno s MD analizom koristi se i MM-PBSA/MM-GBSA metoda za izračunavanje slobodne energije vezanja, što dodatno potvrđuje stabilnost i učinkovitost interakcije [120].

Važan dio metodologije računalnog modeliranja uključuje i pripremu struktura enzima i liganada. Strukture enzima, preuzete iz baza kao što su Protein Data Bank (PDB), zahtijevaju pripremu za modeliranje, što uključuje uklanjanje malih molekula dodanih da bi se olakšala kristalizacija te dodatak vodikovih atoma, dok se strukture liganada generiraju iz 2D formula uz optimizaciju geometrije korištenjem kvantno-kemijskih metoda (npr. DFT) ili molekulske mehanike. Pritom se vodi računa o tautomerima, protomerima i ionizacijskim stanjima pri fiziološkom pH-u jer upravo te varijante mogu bitno utjecati na afinitet vezanja [121].

Završna faza računalnog modeliranja uključuje vizualnu i kvantitativnu analizu rezultata, uz usporedbu s referentnim ligandima (tzv. standardima) čija je bioaktivnost eksperimentalno potvrđena. Ovakva analiza omogućuje racionalnu selekciju najboljih kandidata za daljnju sintezu i testiranje, uz istodobnu eliminaciju spojeva sa slabim profilom predviđanja.

2.5.3. Validacija docking protokola i odabir kristalnih struktura enzima

Uspješnost računalnog modeliranja u razvoju inhibitora kolinesteraza u velikoj se mjeri oslanja na pouzdanost korištenih kristalnih struktura enzima i na pravilnu validaciju docking protokola. U svrhu povećanja moći predviđanja modela, ključno je odabrati enzimске strukture visoke rezolucije iz baze podataka Protein Data Bank, koje uključuju ko-kristalizirane

inhibitore, što omogućuje precizno definiranje aktivnog mjesta i položaja ključnih aminokiselinskih ostataka. Posebno su relevantne kristalne strukture humanih AChE i BChE s inhibitorima kao što su donepezil, huperzin A ili rivastigmin, jer se na temelju njihovih kompleksa mogu konstruirati validirani modeli vezanja [114].

Validacija docking protokola predstavlja neizostavan korak u uspostavljanju vjerodostojnosti predviđenih rezultata. Ona se provodi re-dokiranjem poznatog liganda u aktivno mjesto enzima, čime se ispituje sposobnost algoritma da rekonstruira eksperimentalni položaj liganda. Ako se predviđena konformacija poklapa s kristalnim položajem s RMSD vrijednošću manjom od 2 Å, protokol se smatra valjanim i može se primijeniti na nove spojeve. Pritom se testiraju različiti algoritmi uzorkovanja i *scoring functions* kako bi se odabrao optimalni pristup s najboljim omjerom točnosti i računalne učinkovitosti. Primjerice, AutoDock najčešće koristi Lamarckov genetski algoritam, dok Glide implementira višefazni postupak grid-based optimizacije, a GOLD se oslanja na stohastičke metode pretraživanja [122].

Dodatno, važno je definirati volumen veznog džepa i uključiti aminokiselinske ostatke koji imaju stabilizacijsku ulogu u interakciji enzima i liganda. U kontekstu enzima kolinesteraza, aktivno mjesto uključuje periferno anionsko mjesto (*Peripheral Anionic Site*, PAS), katalitičku trijadu (Ser–His–Glu) i alkilni džep, a precizno pozicioniranje liganda unutar ovih regija nužno je za točnu simulaciju inhibicijskog potencijala. Validirani modeli tada postaju temelj za *virtual screening* i za kvantitativne analize afiniteta i selektivnosti novih karbamatnih spojeva [123]. Ovaj rigorozan pristup validaciji i optimizaciji docking modela osigurava da računalne predikcije reflektiraju stvarne biološke interakcije te smanjuje rizik od lažno pozitivnih rezultata u kasnijim eksperimentalnim fazama.

2.5.4. Evaluacija rezultata molekulskog dockinga i rangiranje spojeva

Nakon dovršetka dockinga, ključno je pristupiti detaljnoj evaluaciji generiranih kompleksa ligand–enzim kako bi se prepoznali kandidati s najvećim potencijalom za daljnju optimizaciju i sintezu. Ova evaluacija uključuje kvantitativnu analizu afiniteta vezanja izraženog kroz vrijednosti energije vezanja (npr. u kcal/mol), ali i kvalitativni pregled prirode interakcija između liganda i aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta. Spojevi se najčešće rangiraju prema njihovim docking rezultatima, pri čemu se koriste različite *scoring functions* specifične za programski alat koji je korišten, poput AutoDockovih vina *scoring functions*, Glideovog GlideScorea ili GOLD-ovog GoldScorea. Međutim, sama vrijednost nije uvijek

dovoljna za pouzdanu selekciju jer ne odražava nužno sve važne farmakoforičke karakteristike ili promjene konformacije u fleksibilnim proteinima [124].

Stoga je važno dodatno analizirati najbolje rangirane položaje pomoću vizualnih alata (npr. PyMOL, Chimera, VMD) kako bi se osiguralo da je vezanje logično i farmakološki relevantno, pri čemu se posebna pažnja pridaje prisutnosti ključnih interakcija poput vodikovih veza s katalitičkom trijadom, π - π slaganja (engl. *stacking*) s aromatskim aminokiselinama (npr. Trp86 ili Phe338 kod AChE, numeracija prema kristalnoj strukturi 1E7Y.pdb) te interakcija u perifernom anionskom mjestu koje je važno za inhibiciju agregacije A β peptida (kod obje kolinesteraze). Posebno su vrijedni spojevi koji ostvaruju višestruke stabilizirajuće interakcije u više domena aktivnog mjesta, čime se povećava vjerojatnost potentne i selektivne inhibicije

Osim ocjene pojedinačnih interakcija, koristi se i *consensus scoring* strategija, koja uključuje usporedbu rezultata više *scoring functions* kako bi se smanjio utjecaj specifičnih mana pojedinih modela. Dodatno, vrijedna je i *rescoring* analiza, pri kojoj se najbolje rangirane poze ponovno evaluiraju korištenjem neovisnih algoritama ili kroz MM-PBSA/MM-GBSA izračune slobodne energije vezanja. Time se postiže viši stupanj točnosti u predviđanju afiniteta i stabilnosti kompleksa u uvjetima koji bolje simuliraju biološku stvarnost.

Na temelju ovih podataka formira se rang-lista spojeva koja uključuje ne samo afinitet vezanja već i broj i vrstu interakcija, geometrijsku stabilnost kompleksa, prostornu uklopljenost u vezni džep te kompatibilnost s poznatim farmakofornim značajkama inhibitora kolinesteraza. Spojevi koji zadovoljavaju sve kriterije prolaze u sljedeću fazu istraživanja, bilo eksperimentalnu sintezu, bilo dodatne *in silico* analize poput predikcije ADME-Tox profila, čime se računalno modeliranje potvrđuje kao temelj za donošenje racionalnih odluka u razvoju učinkovitih terapijskih agenasa protiv Alzheimerove bolesti.

2.5.5. Farmakoforna analiza i optimizacija dizajna inhibitora

Farmakoforna analiza predstavlja ključan korak u procesu racionalnog dizajna inhibitora jer omogućuje identifikaciju prostornih i elektronskih značajki koje su neophodne za učinkovito vezanje spoja na ciljni enzim. U kontekstu inhibitora kolinesteraza, farmakofori obično uključuju skupine koje sudjeluju u vodikovom vezanju s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu enzima, aromatske prstene koji omogućuju π - π interakcije s aromatskim ostacima poput triptofana i fenilalanina u anionskoj subdomeni aktivnog mjesta, te hidrofobne domene koje pospješuju afinitet prema aktivnom džepu enzima. Ova analiza temelji se na

usporedbi poznatih aktivnih spojeva i izdvajanju zajedničkih strukturnih elemenata koji su odgovorni za biološku aktivnost, pri čemu se koristi niz računalnih alata poput Phase, LigandScout ili Catalyst [125].

Primjenom farmakoforne analize moguće je generirati virtualne farmakoforne modele koji služe kao predložak za pretraživanje baza podataka spojeva, pri čemu se traže molekule koje zadovoljavaju sve potrebne kriterije vezanja. Ti modeli uključuju definiranje ključnih farmakoforičkih točaka, poput akceptora i donora vodikovih veza, aromatskih jezgri i hidrofobnih regija, zajedno s informacijom o njihovom međusobnom prostornom razmještanju. Uspjeh ovog pristupa leži u njegovoj sposobnosti da selektivno identificira spojeve visoke potencije i specifičnosti, koji bi inače bili zanemareni u konvencionalnim pristupima temeljima na strukturi cilja [126].

Nakon identifikacije spojeva koji zadovoljavaju farmakoforni model, pristupa se njihovoj optimizaciji kroz iterativni proces modifikacije strukture i procjene utjecaja tih promjena na afinitet vezanja i farmakološka svojstva. Ove modifikacije mogu uključivati supstituciju funkcionalnih skupina, povećanje rigidnosti fleksibilnih dijelova molekule ili povećanje planarnosti kako bi se poboljšala π - π interakcija s ciljnim ostacima enzima. Također se ispituje mogućnost stvaranja novih interakcija, osobito s perifernim anionskim mjestom (PAS), koje je važno u kontekstu inhibicije agregacije β -amiloidnog peptida u Alzheimerovoj bolesti.

Dodatnu vrijednost optimizaciji daju kvantno-kemijske analize koje omogućuju uvid u raspodjelu elektronske gustoće i polarizabilnost molekule, kao i predikcije farmakokinetičkih svojstava pomoću alata poput QikProp ili SwissADME. Time se istodobno optimizira i farmakodinamički i farmakokinetički profil molekula, čime se povećava vjerojatnost njihove uspješne kliničke primjene. U literaturi su već prikazani brojni primjeri u kojima je primjena farmakoforne analize dovela do otkrića novih potentnih inhibitora, uključujući i karbamate koji su pokazali visoku selektivnost prema butirilkolinesterazi uz smanjenu toksičnost [127].

Kombinacijom farmakoforne analize s rezultatima molekulskog dockinga, molekulskih dinamika i predikcija ADME-Tox profila, stvara se sveobuhvatna platforma za dizajn i optimizaciju inhibitora koja omogućuje donošenje utemeljenih odluka tijekom svakog koraka istraživačkog procesa. Ovaj pristup ne samo da povećava učinkovitost razvoja novih lijekova, već i minimizira rizike povezane s neuspjehom u kasnijim fazama razvoja.

2.5.6. *Virtual screening* i selekcija karbamatnih inhibitora kolinesteraza

Virtual screening predstavlja jednu od ključnih metoda računalnog modeliranja koja omogućuje brzo i usmjereno pretraživanje velikih kemijskih baza podataka s ciljem identifikacije spojeva koji imaju najveći potencijal za inhibiciju ciljnih enzima poput acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Primjena ove metode u razvoju karbamatnih inhibitora kolinesteraza omogućila je znatno učinkovitije definiranje početnih strukturnih kandidata za daljnju sintezu i optimizaciju. *Virtual screening* obično započinje eliminacijom spojeva koji ne zadovoljavaju osnovne farmakokinetičke kriterije (npr. Lipinskijeva pravila), čime se smanjuje broj neadekvatnih molekula, nakon čega slijedi molekulski docking s validiranim enzimskim modelima i rangiranje spojeva prema afinitetu vezanja i broju stabilnih interakcija [128].

U kontekstu karbamatnih derivata, *screening* je posebno usmjeren na identifikaciju struktura koje preferencijalno inhibiraju BChE, čija aktivnost raste u kasnim stadijima Alzheimerove bolesti. Uspješni kandidati obično posjeduju aromatske ili heteroaromske jezgre koje omogućuju π - π interakcije s ključnim aminokiselinama poput Trp82 (BChE, numeracija prema kristalnoj strukturi 1P0I.pdb), polarna područja pogodna za stvaranje vodikovih veza te elektrofilne centre poput karbamatne skupine koja sudjeluje u kovalentnom vezanju za kisik katalitičke serinske hidroksilne skupine [129]. Takve karakteristike osiguravaju visoku selektivnost i potentnost spojeva, što je potvrđeno i eksperimentalnim validacijama nekolicine derivata odabranih upravo putem računalnog *screening*-a [130].

Osim samog afiniteta vezanja, pri selekciji karbamata sve se više primjenjuju integrirani modeli koji uzimaju u obzir predikciju ADME svojstava i toksičnosti. Alati poput SwissADME, pkCSM i admetSAR omogućuju procjenu parametara poput sposobnosti prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru (BBB), metabolizma putem CYP enzima, hepatotoksičnosti i bioakumulacijskog potencijala. Time se spojevi s dobrom bioaktivnošću, ali nepovoljnim farmakokinetičkim profilom, eliminiraju iz daljnje razrade već u ranoj fazi razvoja [131]. U nekoliko nedavnih studija ovakvi sveobuhvatni modeli *virtual screening*-a doveli su do otkrića novih karbamatnih inhibitora s visokim IC₅₀ potencijalom i niskim profilom toksičnosti [132].

Završni korak selekcije uključuje objedinjavanje rezultata više evaluacijskih kriterija, uključujući vrijednosti energije vezanja, prisutnost ključnih interakcija (npr. vodikove veze s Glu197 ili π -stacking s Trp82), kompatibilnost sa znanim farmakofornim obilježjima te prediktivnu farmakokinetiku. Spojevi koji zadovolje sve navedene uvjete izdvajaju se kao

kandidati za eksperimentalnu sintezu i *in vitro* testiranje, čime *virtual screening* postaje neizostavan alat u racionalnom dizajnu karbamatnih inhibitora s ciljanom primjenom u terapiji neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti [133].

2.5.7. Predikcija ADME-Tox profila i sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru

U razvoju novih karbamatnih inhibitora kolinesteraza za liječenje Alzheimerove bolesti, sve veći značaj pridaje se ranoj *in silico* procjeni farmakokinetičkih svojstava i sigurnosnog profila spojeva. Ovaj pristup omogućuje eliminaciju neadekvatnih molekula još prije sinteze, čime se štedi vrijeme i resursi te usmjerava istraživački fokus na spojeve s većom vjerojatnošću kliničkog uspjeha. Procjena ADME-Tox parametara (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost) obično se provodi uporabom računalnih alata poput SwissADME, pkCSM, admetSAR, PreADMET i ADMETlab, koji se temelje na eksperimentalnim bazama podataka i modelima strojnog učenja kako bi predvidjeli farmakokinetičke i sigurnosne profile spojeva [134,135].

Jedan od ključnih kriterija u ovoj fazi procjene jest *drug-likeness*, odnosno sposobnost molekule da bude oralno aktivni lijek. Najčešće se koristi Lipinskijevo pravilo petice, prema kojem molekule koje posjeduju najviše jednu devijaciju od kriterija (molekularna masa < 500 Da, $\log P < 5$, broj vodikovih donora ≤ 5 , broj vodikovih akceptora ≤ 10) imaju visoku vjerojatnost oralne biodostupnosti [136]. U kontekstu karbamatnih derivata, posebnu pažnju treba obratiti na ravnotežu između lipofilnosti i polarnih funkcijskih skupina, jer pretjerana lipofilnost može dovesti do niske topljivosti i toksičnosti, dok prevelika polarnost može otežati prolazak kroz biološke membrane [137].

Za molekule usmjerene na središnji živčani sustav, poput inhibitora kolinesteraza, ključno je predvidjeti njihovu sposobnost prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru (engl. *blood-brain barrier*, BBB), što je jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika u farmakoterapiji neurodegenerativnih bolesti. U tu svrhu koristi se niz *in silico* modela koji procjenjuju BBB permeabilnost na temelju parametara poput topološke polarne površine (TPSA), logBB vrijednosti (omjer koncentracije u mozgu i plazmi) i molekularne fleksibilnosti. Spojevi s TPSA manjom od 90 Å² i logP vrijednostima između 2 i 4 pokazali su veću sposobnost difuzije kroz BBB [138]. Također se koristi i Veberovo pravilo, koje uzima u obzir broj

rotirajućih veza i površinu izloženih polarnih skupina kao dodatne pokazatelje oralne biodostupnosti i mogućnosti prodiranja u CNS [139].

Pored parametara apsorpcije i distribucije, važno je i predvidjeti potencijalne interakcije s metabolizirajućim enzimima, osobito s izoenzimima citokroma P450 (CYP), budući da inhibicija ključnih CYP izoformi (npr. CYP3A4, CYP2D6) može dovesti do interakcija s drugim lijekovima i neželjenih učinaka. Alati poput pkCSM i admetSAR omogućuju predikciju inhibicije ili indukcije pojedinih CYP izoenzima na temelju molekulske strukture [140]. Također se procjenjuje potencijal za stvaranje reaktivnih metabolita, što može biti važno u kontekstu toksičnosti karbamatnih spojeva koji sadrže elektrofilne domene.

Toksikološka predikcija obuhvaća procjenu akutne i kronične toksičnosti, kancerogenosti, hepatotoksičnosti, genotoksičnosti i učinaka na razvoj, koristeći modele temeljene na strukturnim sličnostima s poznatim toksičnim spojevima. Neki alati dodatno omogućuju predikciju LD₅₀ vrijednosti, mogućnosti izazivanja mutacija (Ames test) i toksičnih učinaka na specifične organe, osobito jetru i srcebet. U kontekstu inhibitora koji ciljaju kolinesteraze, osobito je važna i predikcija inhibicije drugih važnih enzima, poput Na/K-ATPaze i karboksilesteraza, jer njihova neselektivna inhibicija može uzrokovati sistemske nuspojave.

Integracija ADME-Tox predikcija s rezultatima molekuskog dockinga i farmakoforne analize omogućuje višerazinsku selekciju spojeva koji nisu samo potentni inhibitori već i molekule prihvatljivog farmakokinetičkog profila i sigurnosnog margina. U literaturi su opisani brojni primjeri uspješne primjene ovih metoda u razvoju karbamatnih derivata s optimiziranim profilom penetracije u CNS i smanjenim rizikom toksičnosti [141]. Time se ADME-Tox analiza potvrđuje kao nezaobilazan korak u racionalnom dizajnu novih inhibitora za liječenje Alzheimerove bolesti.

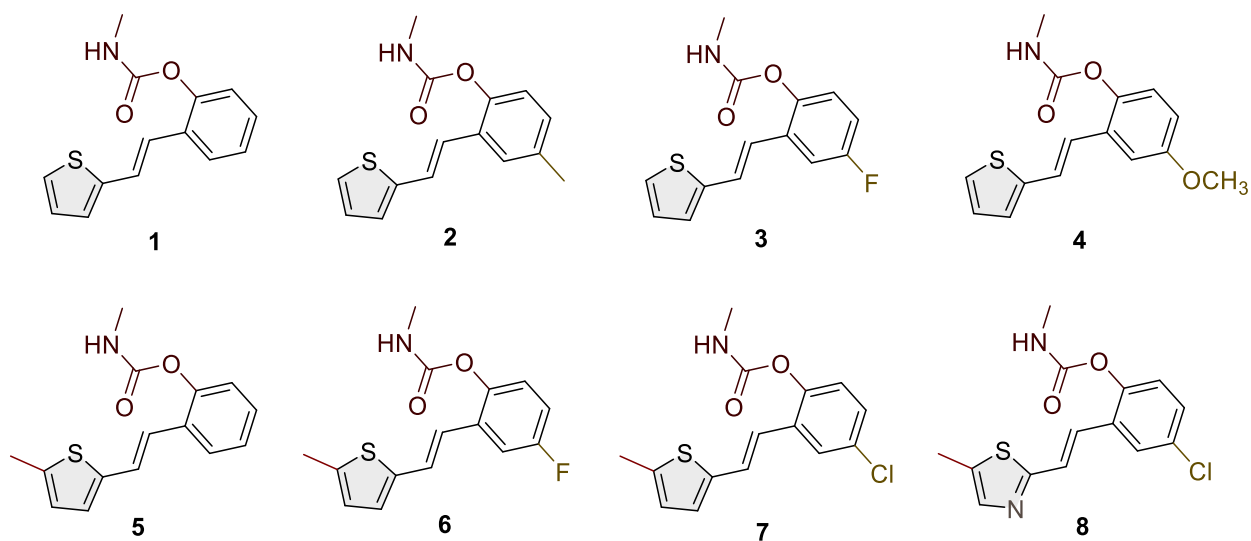
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uvod

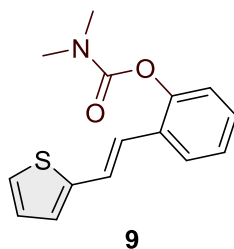
U našem laboratoriju Zavoda za organsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije sintetizirani su razni karbamatni derivati koji pokazuju inhibiciju obje kolinesteraze, AChE i BChE, s posebnim naglaskom na one derivate koji pokazuju selektivnu inhibiciju prema BChE. Dizajn novih inhibitora kolinesteraza bazira se na modifikaciji strukture postojećih karbamatnih inhibitora kolinesteraza, ili sinteze karbamatnih derivata postojećih lijekova Alzheimerove bolesti s ciljem pronalaska novih, učinkovitijih lijekova za tretman neurodegenerativnih bolesti. U ovome znanstvenom radu cilj je bio dizajnirati i sintetizirati nove karbamatne derivate te utvrditi pokazuju li oni bolju inhibicijsku aktivnost od prijašnje sintetiziranih i standardnog inhibitora kolinesteraza. Također, za one ciljane produkte koji su pokazali potencijal inhibicije enzima kolinesteraza predviđene su računalne analize i ispitivanja molekulskog pristajanja. Skelet poznatog antioksidansa rezveratrola je korišten kao osnova za dizajn novih karbamata. Sinteza novih karbamata je temeljena na termičkoj reakciji odgovarajućeg hidroksi-derivata i odgovarajućeg karbamoil-klorida.

3.2. Pregled sintetiziranih spojeva

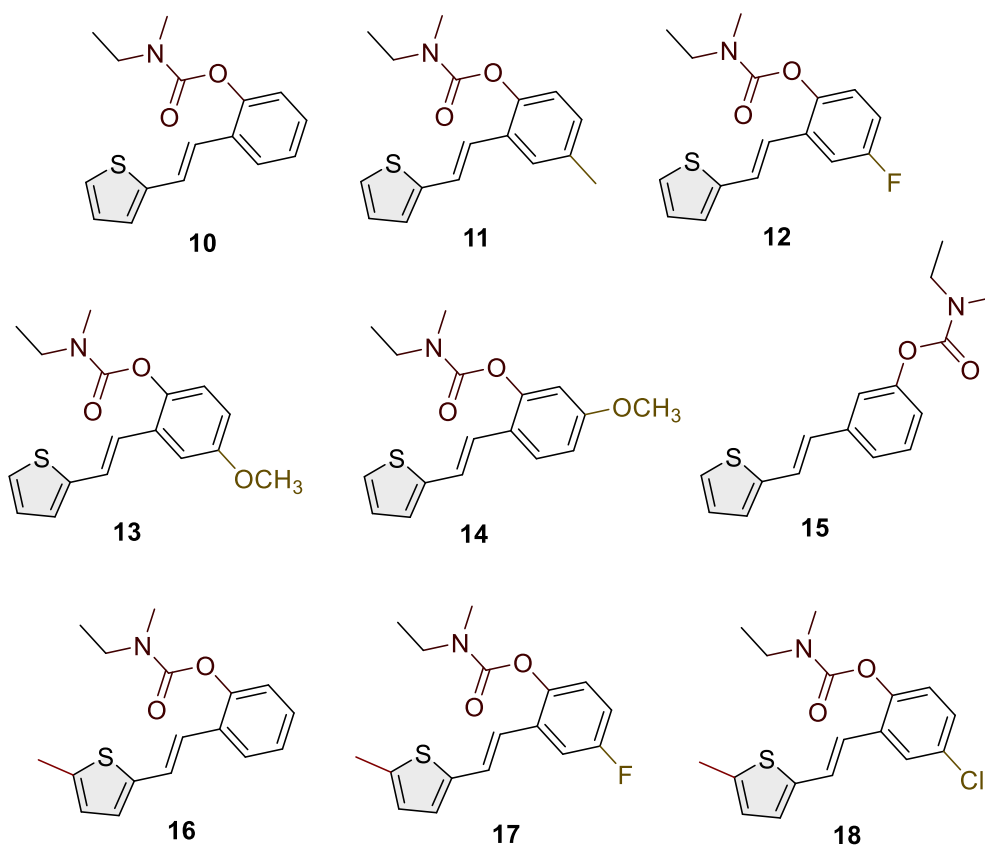
Ciljani produkti ovog rada su karbamati dobiveni sintezom odgovarajućih hidroksi-derivata i *N*-metilkarbamoil-klorida (**1–8**, Slika 12), *N,N*-dimetilkarbamoil-klorida (**9**, Slika 13), *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorida (**10–18**, Slika 14) te morfolin-4-karbonil-klorida (**19–22**, Slika 15). Navedeni spojevi dobiveni su pretežno kao *trans*-izomeri, koji je i ciljani izomer obzirom na usporedbu s biološki aktivnim *trans*-rezveratrolom kao analagom. Za samu sintezu karbamata polazni hidroksi-derivati prethodno su sintetizirani u našem laboratoriju Wittigovom reakcijom iz odgovarajućeg supstituiranog hidroksi-benzaldehida i tiofenske fosfonijeve soli. Tako dobiveni konačni karbamati pokazuju potencijalnu vrlo dobru inhibiciju enzima kolinesteraza i zadovoljavajuća ADME-Tox svojstva.



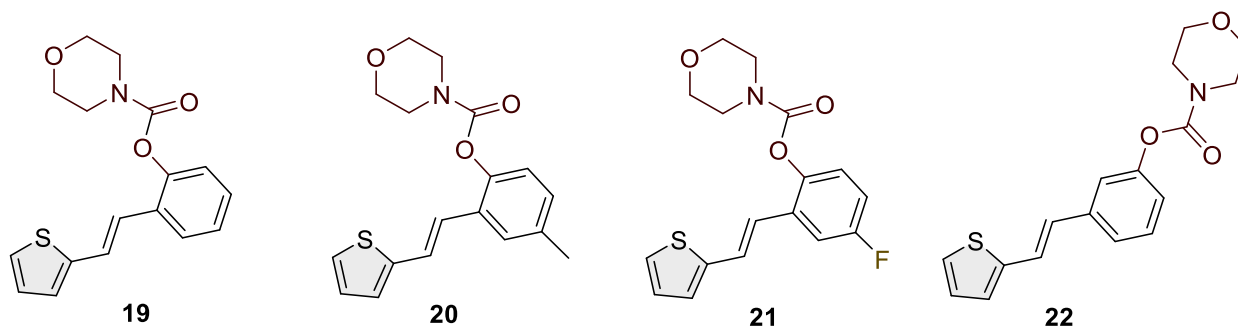
Slika 12. Strukture metilkarbamata 1–8 sintetiziranih u ovom radu.



Slika 13. Struktura dimetilkarbamata 9 sintetiziranog u ovom radu.



Slika 14. Strukture etil-metilkarbamata 10–18 sintetiziranih u ovom radu.



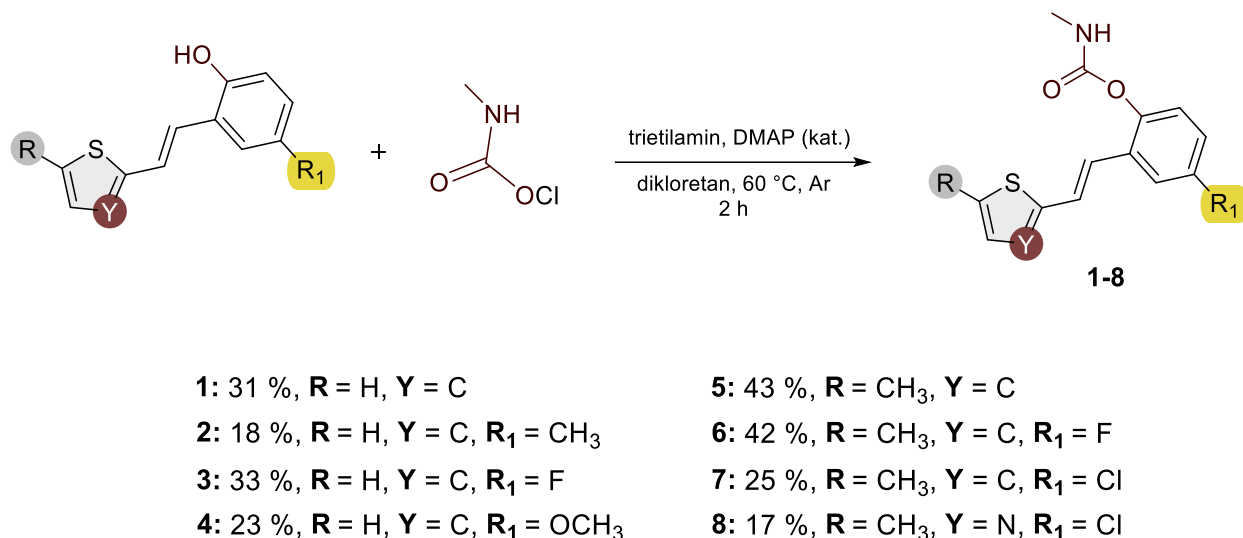
Slika 15. Strukture morfolin-4-karboksilata 19–22 sintetiziranih u ovom radu.

3.2.1. Sinteza metilkarbamata 1–8

Sintetizirani metilkarbamati 1–8 sintetizirani su reakcijom odgovarajućeg rezveratrolnog derivata i *N*-metilkarbamoil-klorida (Shema 2). Kao baza poslužio je trietilamin (TEA), a kao katalizator 4-dimetilaminopiridin (DMAP). Reakcija je provedena pri povišenoj temperaturi u atmosferi argona. Dobiveni produkti su metilkarbamati koji u *para*-položaju u

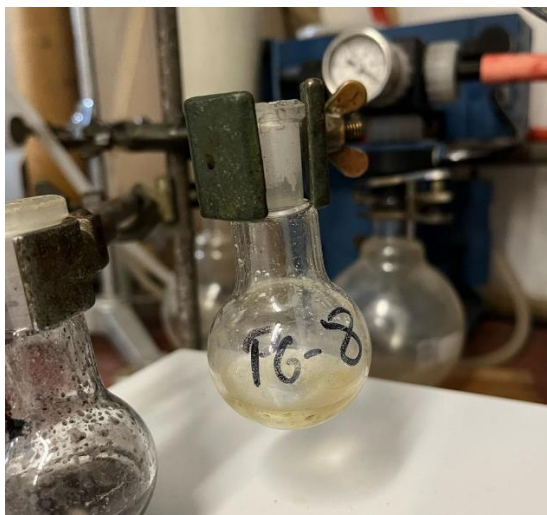
3. REZULTATI I RASPRAVA

odnosu na karbamatnu skupinu imaju pripadajući supstituent. Takve razlike u strukturi odgovorne su za razne spektroskopske karakteristike pojedinog metilkarbamata. Nakon provedene sinteze, dobiveni karbamati pročišćeni su kolonskom kromatografijom određenim sustavom otapala, gdje je kao nepokretna faza služio silika-gel. Isti sustav otapala poslužio je i kod razvijanja pločica tankoslojnom kromatografijom pri praćenju reakcija. Tijekom pročišćavanja kolonskom kromatografijom, kao sporedni produkti pojavljuju se neprореagirani reaktant te TEA, koji kolonskom kromatografijom eluiraju prvi.



Shema 2. Sinteza metilkarbamata **1-8** i pripadajuća izolirana iskorištenja reakcija.

Na sljedećoj slici imamo prikaz aparature za sintezu karbamata iz našeg laboratorija.

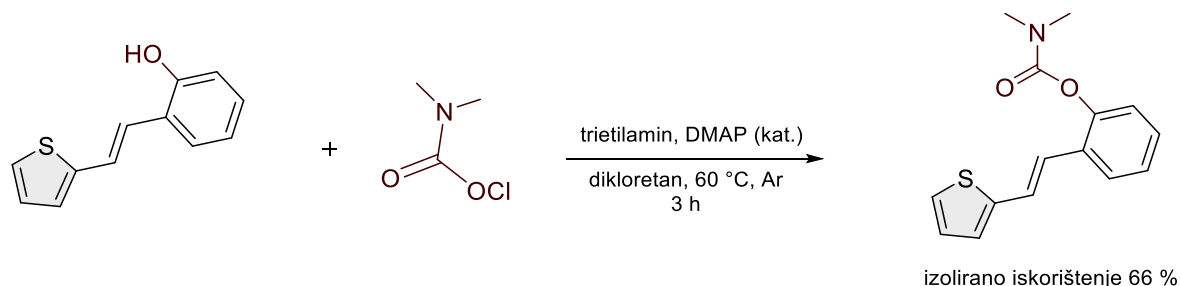


Slika 16. Prikaz aparature i sinteze metilkarbamata.

Produkti reakcije **1–8** pročišćeni su kolonskom kromatografijom sa sustavom otapala petroleter/dietileter (PE/E) različitog omjera, ovisno o pojedinom karbamatu. Izolirana iskorištenja ove skupine karbamata su u intervalu 17-43 %, a prema ^1H NMR spektru, u izoliranim uzorcima nalaze se ciljani produkti prisutni kao *trans*-izomeri.

3.2.2. Sinteza dimetilkarbamata **9**

Sintetizirani dimetilkarbamat **9** sintetiziran je uz pomoć odgovarajućeg početnog hidroksi-spoja i *N,N*-dimetilkarbamoil-klorida (Shema 3) u uvjetima povišene temperature, atmosfere argona i pripadajućih reagensa, TEA i DMAP. Nakon provedene sinteze, dobiveni karbamat pročišćen je kolonskom kromatografijom određenim sustavom otapala, gdje je kao nepokretna faza korišten silika-gel. Isti sustav otapala poslužio je i kod razvijanja pločica tankoslojnom kromatografijom pri praćenju reakcija. Tijekom postupka kromatografije kao sporedni produkt javlja se neprореagirani reaktant koji kolonskom kromatografijom eluira prvi.



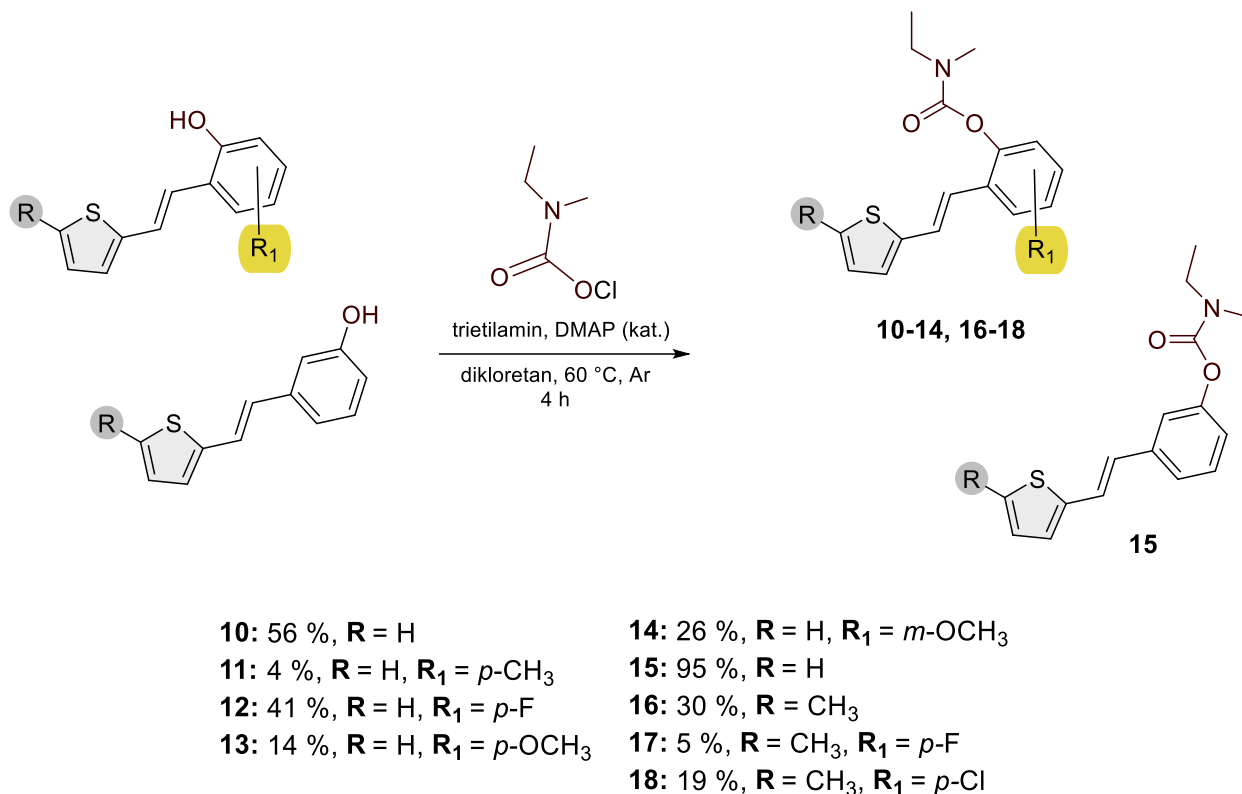
Shema 3. Sinteza dimetilkarbamata **9**.

Dobiveni karbamat pročišćen je kolonskom kromatografijom sustavom otapala PE/E, pri čemu je dobiveno izolirano iskorištenje od 66 %. ^1H NMR spektar pokazuje visoku čistoću spoja kao *trans*-izomer.

3.2.3. Sinteza etil-metilkarbamata **10–18**

Sintetizirani etil-metilkarbamati **10–18** sintetizirani su reakcijom odgovarajućeg hidroksi-derivata i *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorida (Shema 4). Kao reagensi korišteni su TEA i DMAP, a reakcija je provedena u uvjetima povišene temperature u atmosferi argona. Dobiveni produkti su etil-metilkarbamati koji u *para*- ili *meta*-položaju imaju odgovarajući supstituent. Takve razlike u strukturi odgovorne su za razne spektroskopske karakteristike pojedinog

karbamatnog analoga. Nakon provedene sinteze, dobiveni karbamati pročišćeni su kolonskom kromatografijom određenim sustavom otapala, gdje je kao nepokretna faza poslužio silika-gel. Isti sustav otapala poslužio je i kod razvijanja pločica tankoslojnom kromatografijom pri praćenju reakcija. Osim produkta, pročišćavanjem se pojavljuju i neproreagirani reaktant i TEA koji kolonskom kromatografijom eluiraju prvi.



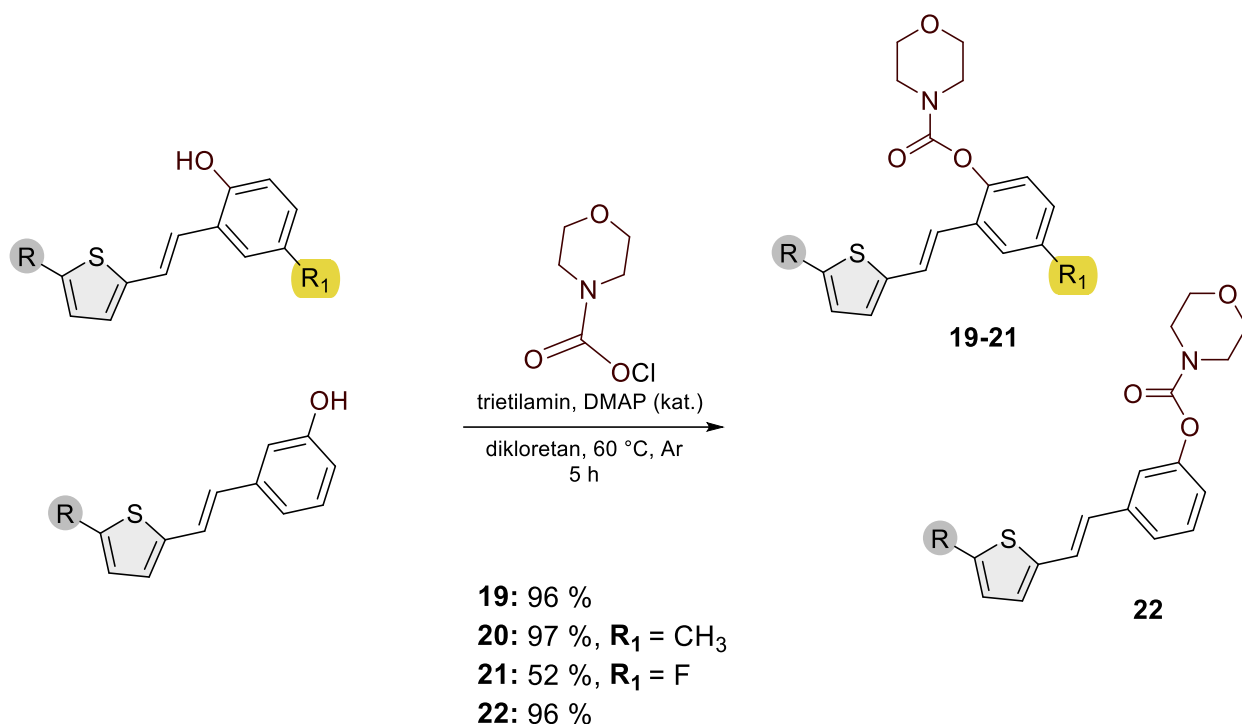
Shema 4. Sinteza (etil)metilkarbamata **10–18** i pripadajuća izolirana iskorištenja reakcija.

Sintetizirani karbamati pročišćeni su kolonskom kromatografijom sustavom otapala PE/E prilikom čega je omjer ovisno o pojedinom karbamatu. Dobivena su izolirana iskorištenja u rasponu od 4-95 %, a temeljem ¹H NMR spektra, uviđa se prevladavanje *trans*-izomera, uz tek nešto manju prisutnost *cis*-izomera (do 5 %).

3.2.4. Sinteza morfolin-4-karboksialata **19–22**

Sintetizirani morfoliran-4-karboksilati **19–22** sintetizirani su reakcijom odgovarajućeg rezeveratrolnog početnog spoja i morfolin-4-karbonil-klorida (Shema 5). U reakciji su korišteni i TEA i DMAP, a reakcija je provedena pri povišenoj temperaturi u atmosferi argona. Dobiveni produkti su morfolin-4-karboksilati koji u *para*-položaju u odnosu na morfolinski prsten imaju

pripadajući supstituent. Nakon provedene sinteze, dobiveni karbamati pročišćeni su kolonskom kromatografijom određenim sustavom otapala, gdje je kao nepokretna faza poslužio silika-gel. Isti sustav otapala poslužio je i kod razvijanja pločica tankoslojnom kromatografijom pri praćenju reakcija.



Shema 5. Sinteza morfolin-4-karboksilata **19–22** i pripadajuća izolirana iskorištenja reakcija.

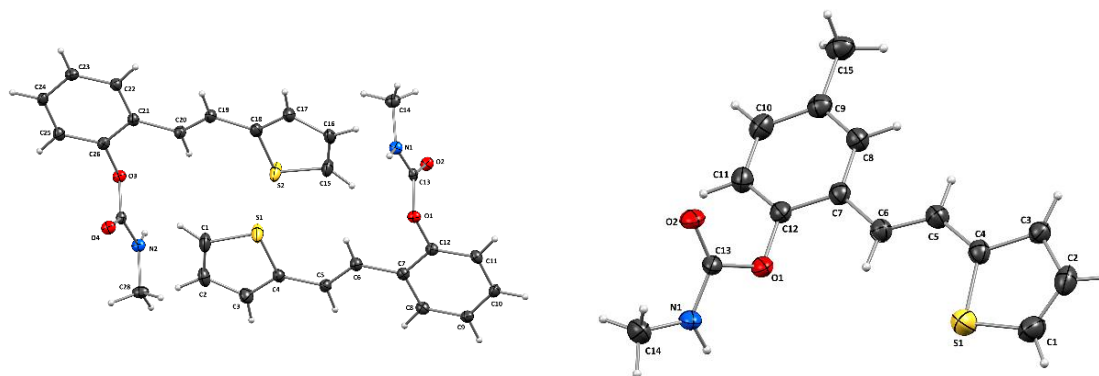
Dobiveni morfolinski karbamati **19–22** pročišćeni su sustavom otapala PE/E različitih omjera ovisno o pojedinom spoju. Dobivena su izolirana iskorištenja u rasponu od 52-97 %, a ^1H NMR spektri pokazuju čiste spojeve koji posjeduju *trans*-konfiguraciju na dvostrukoj ugljik-ugljik vezi.

3.2. Kristalna struktura karbamata

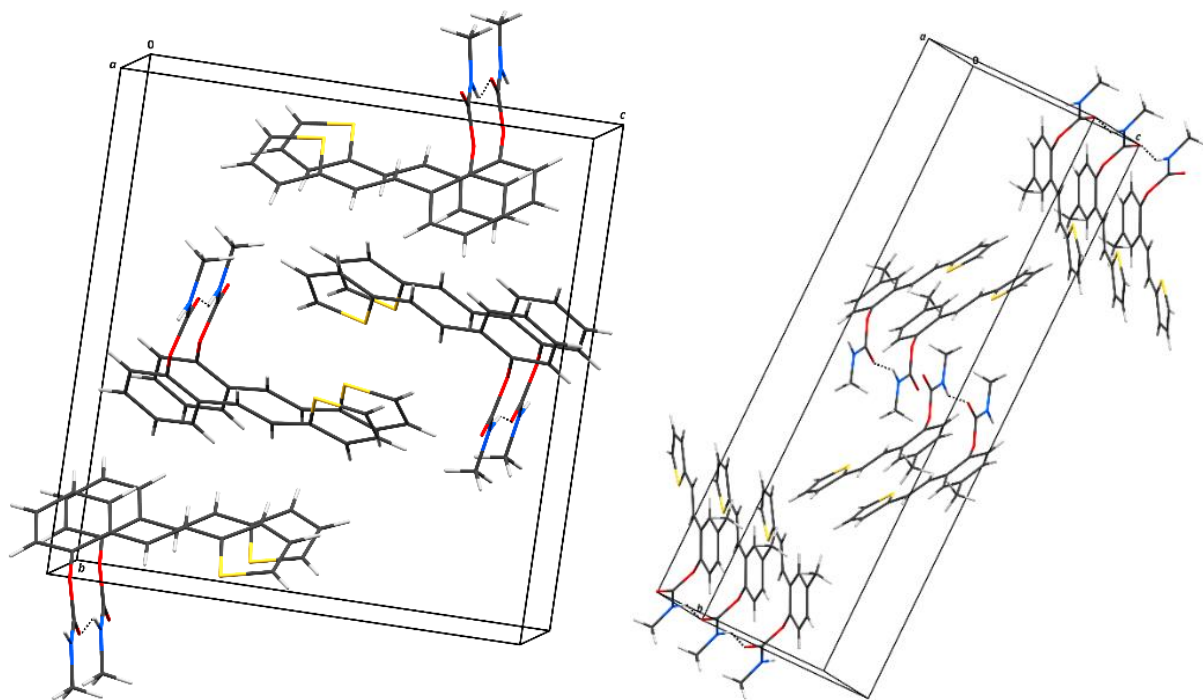
Mjerenja na monokristalima karbamata **1** i **2** provedena su na difraktometru XtaLAB Synergy opremljenom detektorom HyPix600, uz korištenje mikrofokusirane zatvorene rendgenske cijevi s $\text{CuK}\alpha$ zračenjem ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$). Za spoj **1** mjerenja su izvedena pri temperaturi od 100 K, dok su za spoj **2** provedena pri sobnoj temperaturi [293(2) K]. Strukture spojeva **1** i **2** potvrđene su analizom monokristalne rendgenske difrakcije (Slika 17). U oba slučaja kristalni sustav je primarno stabiliziran međumolekulskim vodikovim vezama tipa N–

$\text{H}\cdots\text{O}$ te π – π interakcijama (Slika 18), koje organiziraju molekule u jednodimenzionalne lance duž kristalografske osi. Ti lanci dodatno su stabilizirani slabim van der Waalsovima silama između susjednih slojeva. U kristalnoj strukturi karbamata **1**, dvije međusobno simetrijski neovisne vodikove veze, $\text{N1-H1A}\cdots\text{O2}$ i $\text{N2-H2A}\cdots\text{O4}$, povezuju susjedne molekule. Prisutnost više aromatskih i heteroaromatskih prstenova omogućuje učinkovite π – π interakcije, s udaljenostima između ravnina u rasponu od 2,87 Å do 3,75 Å, što značajno doprinosi slojevitom pakiranju molekula u kristalu.

U spoju **2** ključna međumolekulska interakcija je vodikova veza $\text{N1-H1A}\cdots\text{O2}$, s geometrijskim parametrima: duljina N–H veze = 0,86 Å, udaljenost $\text{H}\cdots\text{O}$ = 2,14 Å, udaljenost $\text{N}\cdots\text{O}$ = 2,892(3) Å te kut $\text{N-H}\cdots\text{O}$ od 145,4°. Osim vodikovih i π – π interakcija, u strukturi spoja **2** uočene su i interakcije tipa $\text{C-H}\cdots\pi$, koje dodatno doprinose stabilnosti kristalne rešetke.



Slika 17. Molekulske strukture spojeva **1** (lijevo) i **2** (desno). Elipsoidi pomaka prikazani su za vjerojatnost od 30%, a atomi vodika prikazani su kao kuglice proizvoljnog radijusa.



Slika 18. Prikaz interakcija vodikovih veza i π - π slaganja u kristalnim strukturama spojeva **1** (lijevo) i **2** (desno). Lanci povezani vodikovim vezama protežu se duž [100] kristalnog smjera. N-H $\cdots$ O vodikove veze prikazane su isprekidanim crtama.

Tablica 1. Geometrijski parametri vodikovih veza određeni geometrijskom analizom.

	$D-H/\text{\AA}$	$H\cdots A/\text{\AA}$	$D\cdots A/\text{\AA}$	$D-H\cdots A/^\circ$	Simetrijska operacija na A
Spoj 1					
N1-H1A $\cdots$ O2	0,84	2,11	2,824(4)	143	$-1 + x, y, z$
N2-H2A $\cdots$ O4	0,93	2,10	2,821(4)	134	$1 + x, y, z$
C6-H6 $\cdots$ S1	0,95	2,73	3,156(5)	108	x, y, z
C6-H6 $\cdots$ O1	0,95	2,46	2,828(5)	103	x, y, z
C10-H10 $\cdots$ O4	0,95	2,57	3,477(5)	160	$1 + x, y, 1 + z$
C16-H10 $\cdots$ O2	0,95	2,60	3,397(5)	142	x, y, z
C20-H20 $\cdots$ S2	0,95	2,73	3,158(3)	108	x, y, z
C20-H20 $\cdots$ O3	0,95	2,46	2,821(4)	103	x, y, z
Spoj 2					
N1-H1A $\cdots$ O2	0,86	2,14	2,892(3)	145,4	$-1 + x, y, z$
C6-H6 $\cdots$ S1	0,93	2,83	3,210(4)	106	x, y, z
C6-H6 $\cdots$ O1	0,93	2,450	2,800(4)	103	x, y, z

Tablica 2. Geometrijski parametri π - π interakcija.

$\pi \cdots \pi$	$Cg^a \cdots Cg/\text{\AA}$	$\alpha^b/^\circ$	$\beta^c/^\circ$	$Cg \cdots \text{Ravnina}(Cg2)/\text{\AA}$	Pomak/ $\text{\AA}$	Simetrija
metilkarbammat 1						
$S1 \rightarrow C4 \cdots S1 \rightarrow C4$	5,078(3)	0,00(3)	50,0	3,264(2)	3,891	-1 + x, y, z
$S1 \rightarrow C4 \cdots S2 \rightarrow C18$	4,246(3)	6,10(2)	33,7	3,751(2)	2,355	x, y, z
$C7 \rightarrow C12 \cdots C7 \rightarrow C12$	5,079(2)	0,00(17)	50,4	3,2388(15)	3,912	-1 + x, y, z
$C7 \rightarrow C12 \cdots C21 \rightarrow C26$	5,521(2)	0,78(17)	58,4	2,8750(15)	4,703	1 + x, y, z
$S2 \rightarrow C18 \cdots S1 \rightarrow C4$	4,246(3)	6,10(2)	27,9	3,5336(19)	1,989	x, y, z
$S2 \rightarrow C18 \cdots S2 \rightarrow C18$	5,079(3)	0,00(2)	52,6	3,0846(19)	4,035	-1 + x, y, z
$C21 \rightarrow C26 \cdots C7 \rightarrow C12$	5,521(2)	0,78(17)	58,6	2,8916(15)	4,713	
$C21 \rightarrow C26 \cdots C21 \rightarrow C26$	5,079(2)	0,03(17)	49,6	3,2914(15)	3,868	-1 + x, y, -1 + z
metilkarbammat 2						
$S1 \rightarrow C4 \cdots S1 \rightarrow C4$	5,128(2)	0,00(19)	54,6	2,9734(16)	4,178	-1 + x, y, z
$S1 \rightarrow C4 \cdots C7 \rightarrow C12$	5,269(2)	8,71(18)	41,0	3,42047(16)	3,458	-1 + x, y, -1 + z
$C7 \rightarrow C12 \cdots C7 \rightarrow C12$	5,128(2)	0,00(16)	46,1	6,5526(14)	3,698	-1 + x, y, z

^a Cg = težište prstena ; ^b α = kut između ravnina dvaju međudjelujućih prstenova ; ^c β = kut između pravca $Cg \cdots Cg$ i normale na ravninu prvog međudjelujućeg prstena.

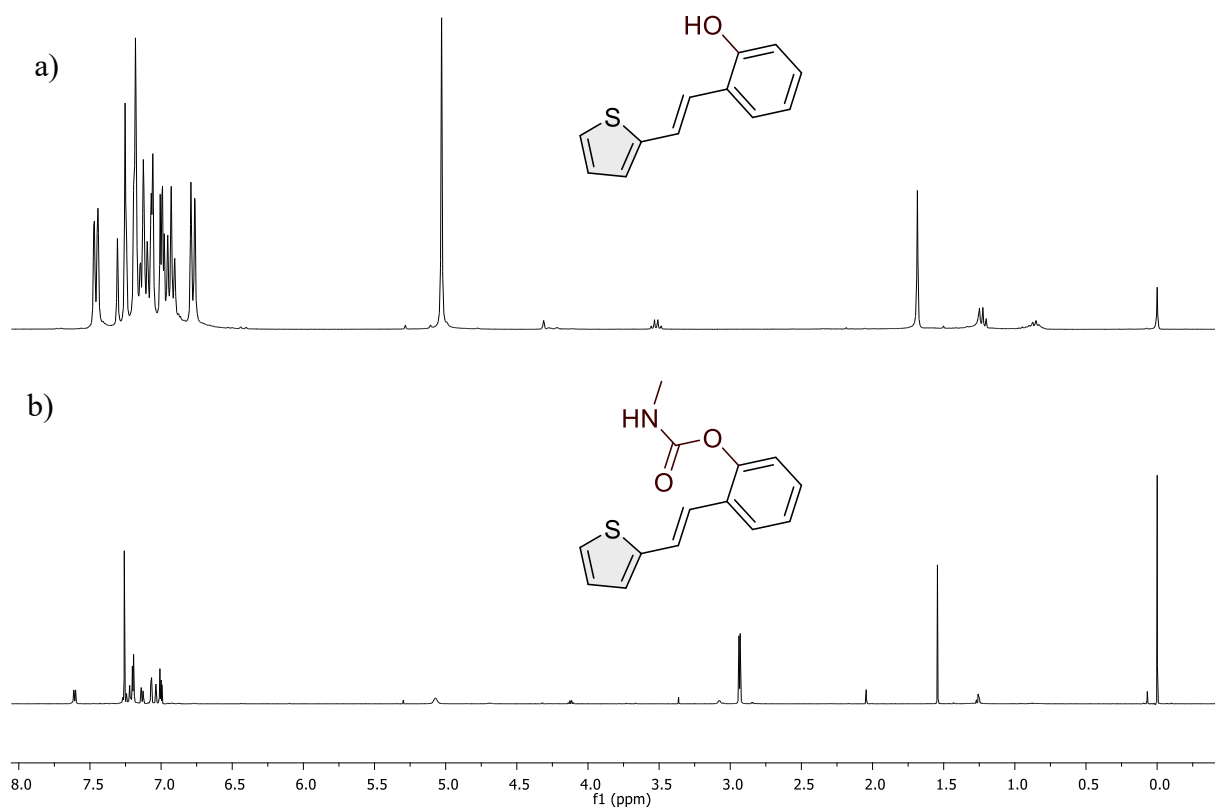
Tablica 3. Geometrijski parametri C-H $\cdots$ π interakcija u spoju 2.

C-H $\cdots$ π	H $\cdots$ Cg/ $\text{\AA}$	$\gamma^a/^\circ$	C-H $\cdots$ Cg/ $\text{\AA}$	C $\cdots$ Cg/ $\text{\AA}$	Simetrijska operacija na Cg
C15-H15A $\cdots$ C7 $\rightarrow$ C12	2,68	11,24	171	3,627(4)	1 + x, y, z

^a γ = kut određen linijom koja spaja težište aromatskog prstena s atomom vodika i okomicom na aromatski prsten.

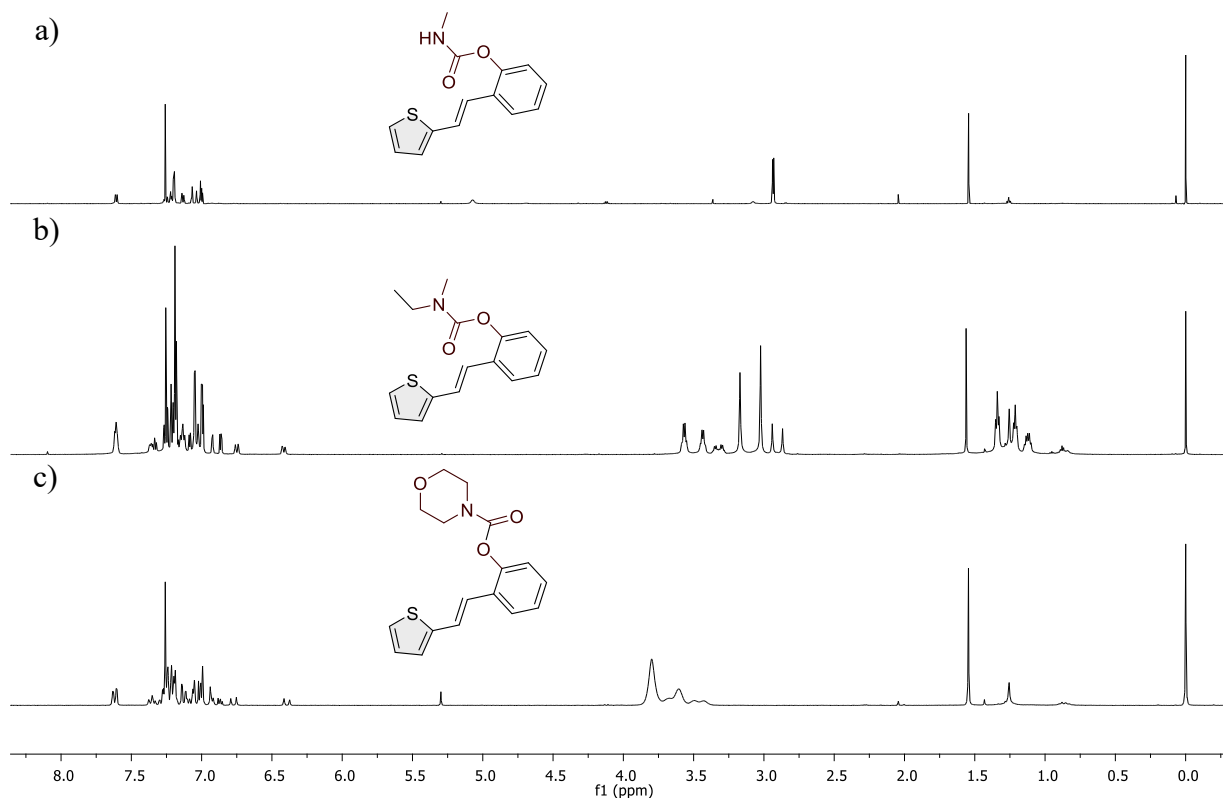
3.3. NMR spektroskopska karakterizacija sintetiziranih karbamta

Sintetizirani derivati karbamta dobiveni su u dovoljnim količinama za analizu spektroskopskih karakteristika nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR). Za sve sintetizirane karbamate uspješno su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektar na temelju kojih su potvrđeni sintetizirani derivati uz pomoć karakterističnih kemijskih pomaka. Spomenuti spektri snimljeni su u deuteriranom kloroformu (CDCl_3), gdje je kao standard korišten tetrametilsilan (TMS).



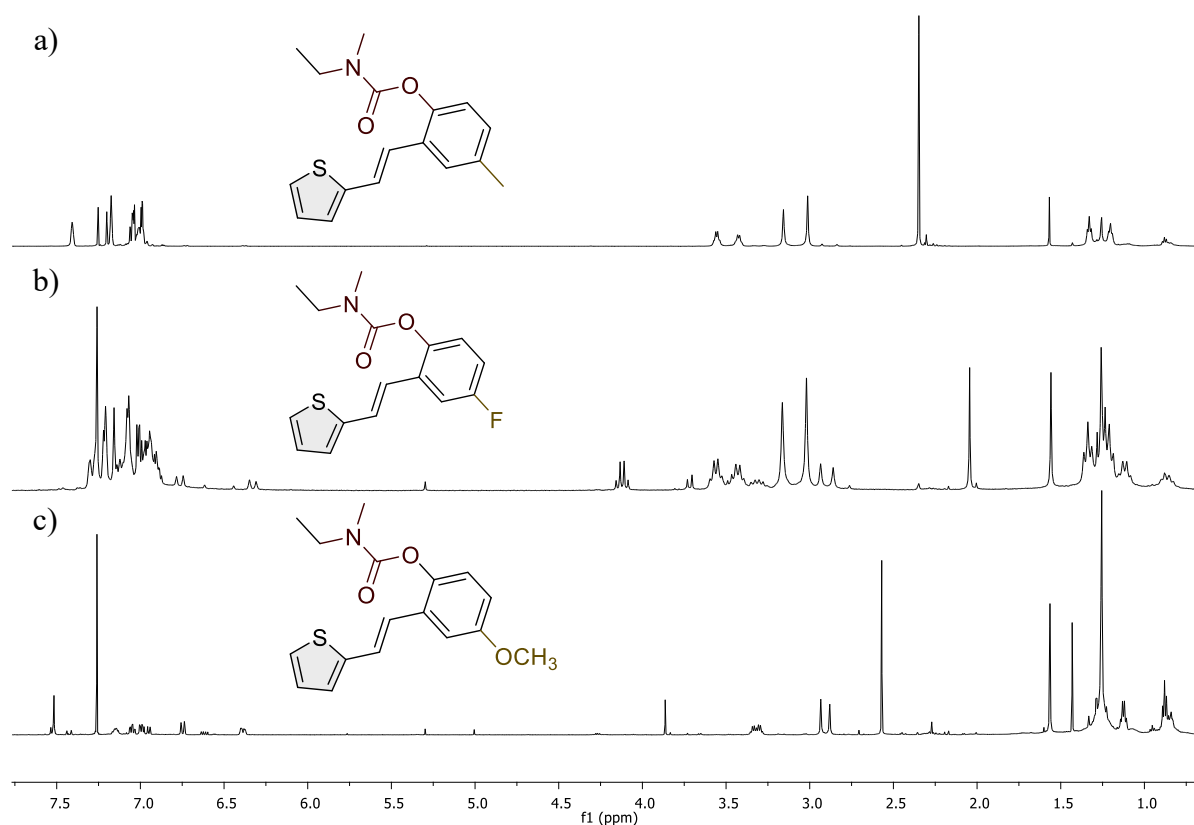
Slika 19. Usporedni ^1H NMR spektri odgovarajućeg početnog hidroksi-derivata (a) i njegovog odgovarajućeg karbamata **1** (b).

Spektar prikazuje usporedbu ^1H NMR spektra početnog hidroksi-spoja (a) i njegovog karbamatnog derivata **1** (b). Oba spektra prikazuje karakteristične signale multipleta u području 7-8 ppm, što odgovara aromatskim protonima benzenske i tiofenske jezgre, te signale u području 6,5-7,5 ppm, koji ukazuju na očuvanu strukturu osnovnog kostura spoja. Glavne razlike pripadaju nestanku nekih početnih odnosno pojavi novih signala. U spektru početnog spoja nalazi se signal za hidroksi-skupinu ($-\text{OH}$) na 5,03 ppm, koji nestaje nakon što se u spoj uvede karbamatna skupina. U spektru karbamata pojavljuju se novi signali koji pripadaju protonima metilne skupine vezane za amino-skupinu, na 2,92 ppm, te proton amino-skupine koji daje širok signal na 5,10 ppm.



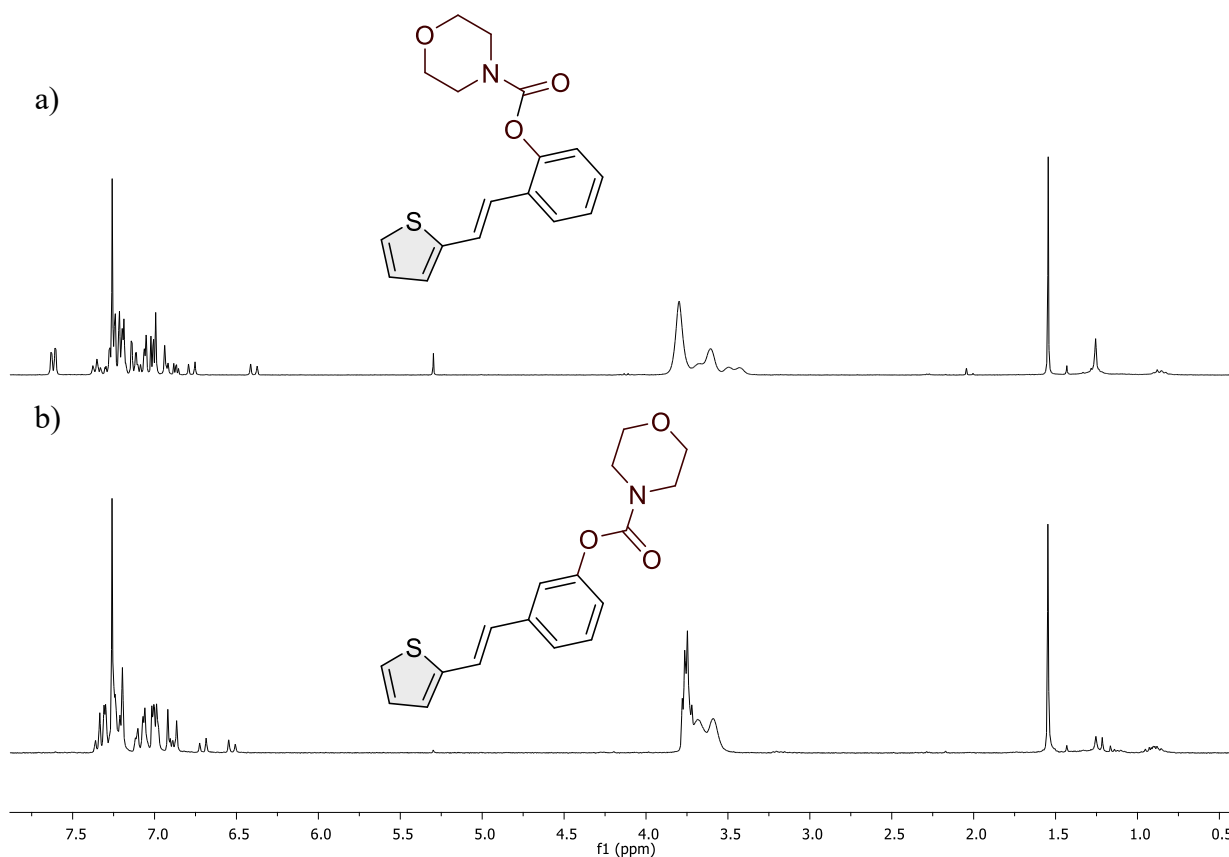
Slika 20. Usporedni ^1H NMR spektar metilkarbamata **1** (a), etil-metilkarbamata **10** (b) i morfolin-4-karboksilata **19** (c).

Spektar pokazuje razlike i sličnosti između tri derivata karbamata: metilkarbamata **1**, etil-metilkarbamata **10** i morfolin-4-karboksilata **19**. Svi spojevi imaju slične signale u aromatskom području (između 7 i 8 ppm), što upućuje na prisutnost aromatskih protona benzenskog i tiofenskog prstena. Razlike se pojavljuju u alifatskom dijelu spektara. Kod metilkarbamata **1** vidi se već spomenuti signal koji pripada metilnoj skupini vezanoj na dušik (2,92 ppm). Kod etil-metilkarbamata **10** pojavljuje se signal za etilnu skupinu i to kao kvartet i triplet u području od 3,60 do 1,20 ppm, dok se kod morfolin-4-karboksilata **19** pojavljuje multiplet u području 4,0 do 3,5 ppm, što odgovara protonima morfolinskog prstena. Također, vidi se prisutnost širokog signala NH protona na Slici 20 (a), koji je kod ostalih derivata zamijenjen signalima drugih skupina.



Slika 21. Usporedni ^1H NMR spektar etil-metilkarbamata s različitim supstituentima, metilnom skupinom **11** (a), fluorom **12** (b) i metoksi-skupinom **13** (c).

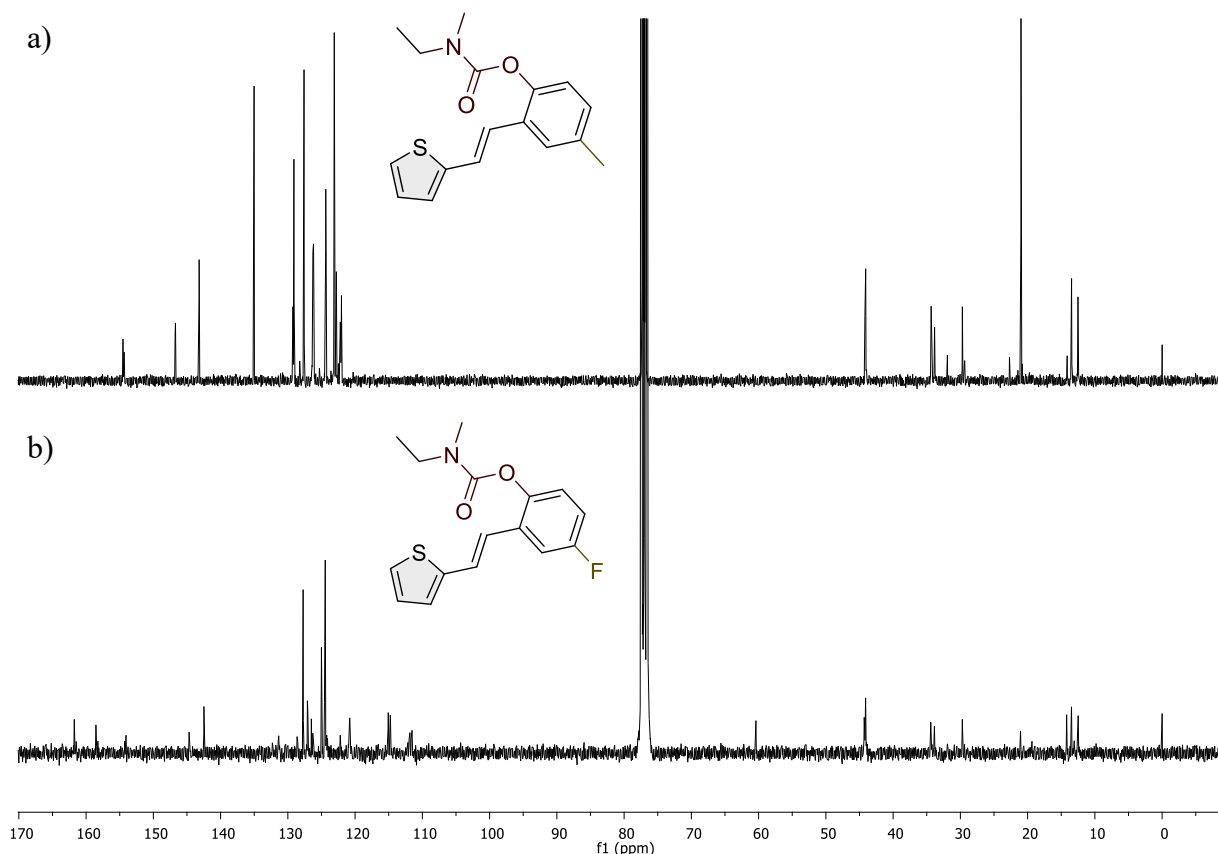
Slika 21 prikazuje usporedbu protonskih NMR spektara triju etil-metilkarbamatnih derivata s različitim supstituentima na aromatskom prstenu: metilnom skupinom, fluorom i metoksi-skupinom. Sva tri spoja (**11–13**) pokazuju karakteristične signale u aromatskom području (između 7 i 8 ppm). Kod spoja s metilnom skupinom signali su jednostavniji, dok se kod spoja s fluorom pojavljuje složenije cijepanje aromatskih protona zbog spin-spin cijepanja s fluorom, što rezultira složenijim multipletima. Razlike se ponovno javljaju u alifatskom području. Kod spoja s metoksi-skupinom pojavljuje se dodatni singlet na oko 3,8 ppm, karakterističan za OCH₃ skupinu, koji nije prisutan kod ostalih spojeva, dok se metilna skupina spoja **11** nalazi na oko 2,4 ppm. Također, metilna i metoksi-skupina djeluju kao donori elektrona, što znači da povećavaju elektronsku gustoću na aromatskom prstenu. Posljedica toga je zasjenjenje obližnjih protona, pa se njihovi signali pomiču prema nižim vrijednostima kemijskog pomaka. S druge strane, fluor je vrlo elektronegativan atom i povlači elektronsku gustoću sa sustava, što uzrokuje pomicanje signala aromatskih protona u blizini fluora prema višim vrijednostima kemijskog pomaka.



Slika 22. Usporedni ^1H NMR spektar morfolin-4-karboksilata **19** i morfolin-4-karboksilata **22**.

Slika 22 prikazuje usporedbu dvaju izomernih spojeva koji se međusobno razlikuju prema položaju karbamatne skupine na fenilnom prstenu. Kod spoja **19** karbamatna skupina nalazi se u *ortho*-, a kod spoja **22** u *meta*-položaju u odnosu na dvostruku ugljik-ugljik vezu. Oba spoja pokazuju sličnosti u spektru. Prisutni su multipleti u području od 7 do 8 ppm, koji pripadaju aromatskim i tiofenskim protonima, kao i multipleti u području od 3,5 do 4,0 ppm karakteristični za protone morfolinskog prstena. Također, kod oba konstitucijska izomera prisutni su signali protona dvostruke veze u području od 6 do 7 ppm, što potvrđuje zajednički osnovni kostur molekule. Razlike se očituju u rasporedu i obliku aromatskih signala. Kod *ortho*-izomera **19**, zbog blizine dvostruke veze i morfolinskog estera, dolazi do izraženijeg cijepanja i promjene intenziteta signala te mogućeg preklapanja istih. Kod *meta*-izomera, gdje je udaljenost dvostruke veze od estera veća, pojavljuju se jednostavniji signali koji su bolje razdvojeni. Također, položaj C=C veze utječe i na kemijski pomak zbog promjene elektronskog okruženja i razine zasjenjenja. *ortho*-izomer tako ima veći elektronski učinak koji izravno

utječe na susjedne protone i na taj način uzorkuje pomicanje prema nižem polju, odnosno većem kemijskom pomaku. S druge strane, *meta*-izomer, kod kojeg su protoni morfolinskog dijela molekule udaljeniji od C=C veze, će uzrokovati veće zasjenjenje i pomak prema nižim kemijskim pomacima.



Slika 23. Usporedni ^{13}C NMR spektar etil-metilkarbamtnih derivata s metilnom skupinom **11** (a) i fluorom **12** (b).

Slika 23 prikazuje usporedbu dvaju ^{13}C NMR spektara etil-metilkarbamtnih derivata **11** i **12** koji se razlikuju po vezanom supstituentu na aromatski prsten. Spoj **11** ima metilnu skupinu, a spoj **12** fluor. Spektri oba spoja pokazuju karakteristične signale u aromatskom području (između 120 i 140 ppm) koji pripadaju ugljicima benzenske i tiofenske jezgre te ugljicima dvostruke veze. U alifatskom području prisutni su signali koji odgovaraju ugljicima etilne i metilne skupine, te dodatno metilne skupine kod spoja **11**. Glavna razlika ovih dvaju derivata proizlazi iz različitih elektronskih učinaka supstituenata. Naime, metilna skupina, već spomenuto, ima slabi elektronski učinak, dok je s druge strane fluor izrazito elektronegativan i

uzrokuje elektronegativan učinak. Posljedica toga su jaka spin-spin sprezanja fluora s ugljicima prstena. Takva karakteristična sprezanja često iznose 180-250 Hz.

3.4. Biološka aktivnost sintetiziranih karbamata

3.4.1. Inhibicija enzima klinesteraza heterostilbenskih karbamata 1–22

Ranije ispitani karbamatni analozi rezveratrola pokazali su zanimljive strukturne značajke za razvoj potpuno selektivnih i snažnih inhibitora BChE [142]. Stoga je, korištenjem modificirane Ellmanove metode, ispitana nova serija različito supstituiranih karbamatnih derivata u svrhu utvrđivanja njihove inhibicijske aktivnosti prema AChE i BChE. Rezultati, izraženi kao IC_{50} vrijednosti derivata karbamata i standardnog reverzibilnog inhibitora galantamina, prikazani su u Tablici 4 te na Slici 24. Ispitivanja nisu provedena nad spojevima čija izolirana masa nije bila dovoljna za sam proces ispitivanja. Stoga se, ispitivani spojevi mogu podijeliti u tri skupine ovisno o tipu karbamatne skupine: sekundarni karbamati (**1–8**), tercijarni karbamati (**9–18**) te tercijarni morfolinski karbamati (**19–22**). Unutar svake skupine uočene su varijacije u vrsti i položaju supstituenata na tiofenskom ili benzenskom prstenu, kao i u samom položaju karbamatne skupine i tipu heterocikla. Samo je jedan derivat sadržavao tiazolni prsten (derivat **8**), dok su svi ostali bili tiofenski. Derivat **8** bio je jedini koji je pokazao određenu inhibiciju AChE, iako s niskom potentnošću ($IC_{50} \approx 275,5 \mu M$). Tiofenski derivati mogu se smatrati potpuno selektivnim inhibitorima BChE.

Unutar prve skupine, najbolji inhibitor bio je spoj **1** s IC_{50} vrijednošću od $0,5 \mu M$ (Tablica 4 i Slika 24), što je u potpunosti u skladu s prethodnim rezultatima koji ukazuju da analozi rezveratrola bolje djeluju kada nemaju supstituent na fenilu na koji je vezana karbamatna skupina. Nešto slabiju, ali i dalje izvrsnu inhibiciju pokazali su derivat s metilnom skupinom na tiofenu (spoj **5**; $IC_{50} = 0,913 \mu M$) te derivat s metilnom skupinom u *meta*-položaju u odnosu na karbamatnu skupinu (spoj **2**; $IC_{50} = 1,102 \mu M$). Iz Tablice 4 vidljivo je da se inhibicijska aktivnost smanjuje uvođenjem ostalih supstituenata s nevezanim elektronskim parovima poput -F, -Cl ili -OCH₃. Sličan trend uočen je i kod skupine sekundarnih karbamata. I ovdje je najbolji inhibitor onaj bez supstituenta na karbamatnoj strani stilbena – derivat **10**, s IC_{50} vrijednošću od $0,583 \mu M$, a razlika u biološkoj aktivnosti kao inhibitora BChE između derivata **10** i sekundarnog analoga **1** gotovo da ne postoji.

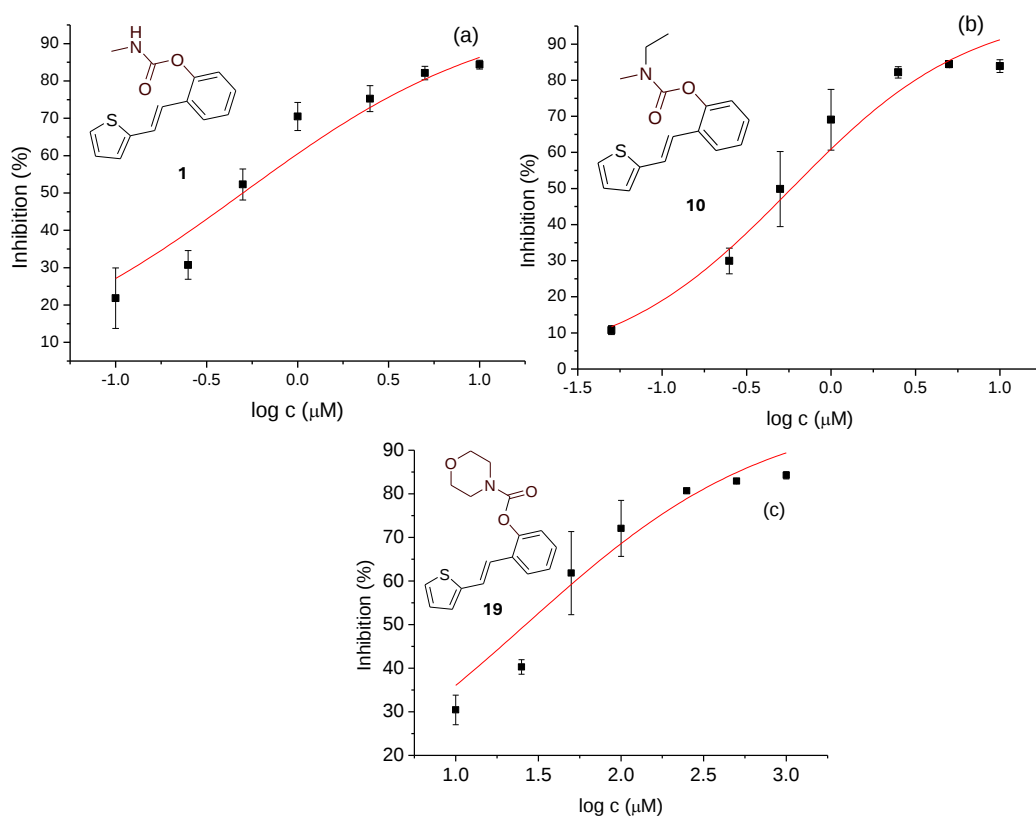
Tablica 4. Inhibicija BChE i izračunate vrijenosti IC₅₀ za spojeve **1–8, 10–12, 14–16 i 19–22**.

Spoj	AchE		BchE	
	% Inhibicija *	IC ₅₀ /μM	% Inhibicija *	IC ₅₀ /μM
1	36,80 ± 0,20 (250)	-	84,37 ± 1,18 (10)	0,500
2	15,43 ± 0,30 (50)	-	85,38 ± 2,29 (10)	0,913
3	30,07 ± 2,38 (100)	-	84,66 ± 3,20 (100)	3,740
4	19,01 ± 1,10 (500)	-	82,15 ± 2,00 (500)	149,7
5	34,60 ± 1,39 (100)	-	74,79 ± 2,36 (5)	1,102
6	19,80 ± 0,65 (50)	-	74,00 ± 3,20 (50)	14,053
7	50,05 ± 1,10 (100)	-	69,80 ± 1,15 (100)	30,403
8	87,21 ± 0,47 (500)	275,5	87,21 ± 0,47 (500)	59,108
10	28,22 ± 1,06 (100)	-	83,91 ± 1,77 (10)	0,583
11	20,71 ± 0,30 (50)	-	82,75 ± 1,57 (10)	1,541
12	23,33 ± 1,67 (68)	-	83,48 ± 1,49 (27)	3,081
14	29,87 ± 0,31 (50)	-	84,41 ± 2,29 (25)	1,883
15	17,85 ± 0,51 (100)	-	83,19 ± 0,84 (50)	1,067
16	20,92 ± 0,46 (250)	-	70,00 ± 0,80 (1)	90,001
19	23,44 ± 1,57 (100)	-	84,25 ± 0,82 (25)	0,0265
20	22,20 ± 1,17 (25)	-	87,48 ± 1,31 (25)	0,430
21	16,13 ± 1,24 (100)	-	82,28 ± 2,44 (25)	0,645
22	41,35 ± 0,92 (50)	-	79,67 ± 2,51 (50)	2,045
Galantamin	90,5 ± 1,3 (60)	0,15	90,10 ± 3,40 (4,5)	7,90

* Brojevi u zagradama predstavljaju maksimalne testirane koncentracije u μM.

Uvođenje metilne skupine na tiofenski prsten (derivat **16**) značajno je smanjilo inhibiciju (IC₅₀ = 85,130 μM), dok je uvođenje metilne skupine na benzenski prsten (spoj **11**) očuvalo snažnu inhibicijsku aktivnost s IC₅₀ vrijednošću od 1,541 μM. Promjenom položaja karbamatne skupine iz *ortho*- u *meta*-položaj kod derivata **15** dolazi do trostrukog smanjenja aktivnosti. Ipak, inhibicija je i dalje izvrsna, s IC₅₀ vrijednošću od 1,503 μM. Prisutnost metoksi-skupine u *para*-položaju održava aktivnost unutar vrlo učinkovitog koncentracijskog raspona, pri čemu derivat **14** pokazuje IC₅₀ vrijednost od 1,883 μM. Najuspješniji inhibitori u cijeloj seriji ispitivanih spojeva su morfolinski karbamati **19–22**, među kojima se derivat **19** ističe kao najpotentniji inhibitor. Izvrsna inhibicija, s IC₅₀ vrijednošću od 26,5 nM, postignuta je upravo s derivatom bez dodatnih supstituenata na benzenskom ili tiofenskom prstenu (Tablica 4 i Slika 24). Ista strukturna značajka pogoduje inhibiciji kao i kod prethodne dvije skupine spojeva. Uvođenje fluora i metilne skupine dovodi do smanjenja aktivnosti, no derivati **20 i 21** i dalje zadržavaju vrlo dobar inhibicijski potencijal. Kada se karbamatna skupina nalazi u *meta*-

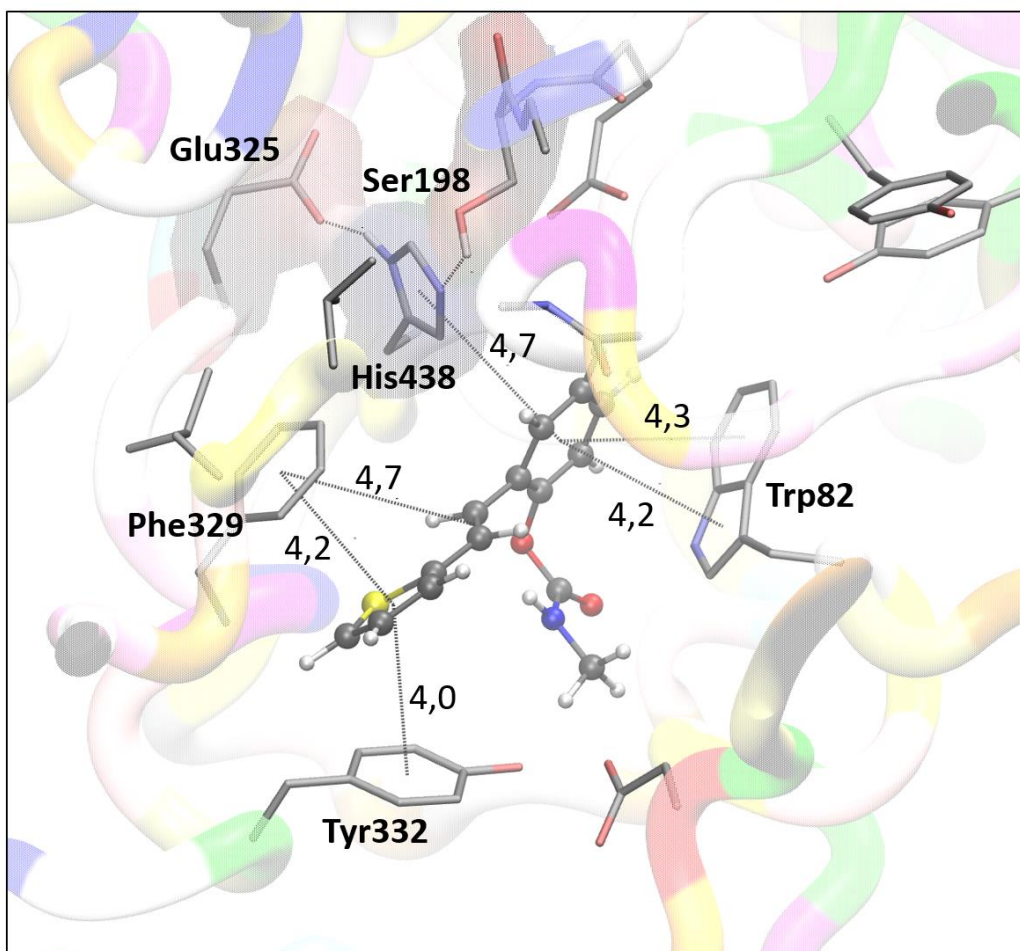
položaju u donosu na dvostruku vezu (spoj **22**), aktivnost je smanjena gotovo stotruko; unatoč tome, spoj se i dalje svrstava među visoko aktivne inhibitore. Ova skupina spojeva, u kojoj je karbamatni dušik, dio morfolinskog prstena pokazala se najučinkovitijom u inhibiciji BChE, čime se derivati **19–22** istuču kao perspektivni kandidati za daljnja istraživanja i razvoj novih derivata.



Slika 24. Grafički prikaz inhibicije BChE pomoću spojeva **1** (a), **10** (b) i **19** (c).

3.4.2. Računalni rezultati

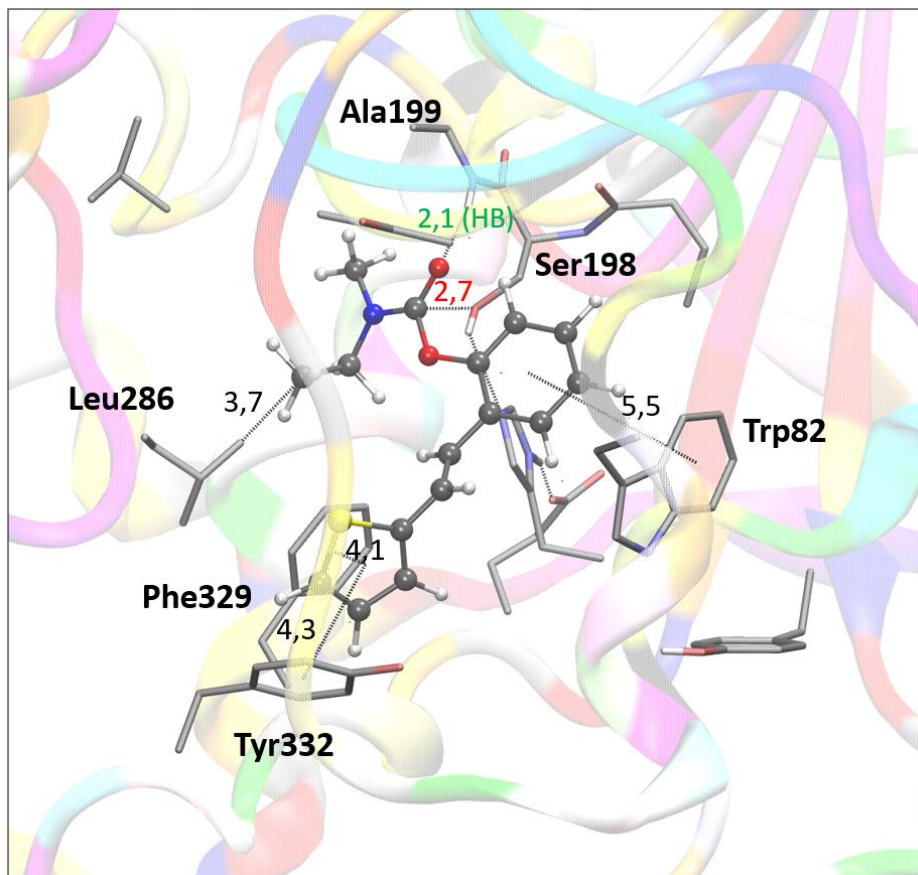
Za studij molekuskog dockinga odabrani su spojevi **1**, **10** i **19**, jer su dali najbolje rezultate pri eksperimentalnom mjerenju inhibicije BChE. Molekulskim dockingom dobivene su strukture nekovalentnog reverzibilnog kompleksa ligand-enzim, a njihov prikaz omogućava uvid u stabilizirajuće interakcije između liganda i aminokiselina u aktivnom mjestu BChE.



Slika 25. Struktura aktivnog mjesta BChE u nekovalentnom kompleksu s molekulom **1** dobivena molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

Na slici 25 prikazan je najstabilniji nekovalentni ligand-protein kompleks između spoja **1** i aktivnog mjesta BChE. Struktura kompleksa dobivena je molekularnim dockingom, pri čemu su udaljenosti između atoma izražene u angstromima (Å). Početna struktura liganda dobivena je kvantno-kemijskim računima, gdje je optimizacija geometrije provedena korištenjem modela zasnovanog na teoriji funkcionala gustoće (engl. Density Functional Theory, DFT). Stabilizacija kompleksa rezultat je nekovalentnih interakcija između liganda i enzima. Najvažnije interakcije uključuju π - π slaganje između fenilne jezgre liganda i aminokiseline triptofan (Trp82) (4,2, 4,3 Å) i histidina (His438) (4,7 Å). Pri takvoj interakciji, fenil blokira estersku subdomenu aktivnog mjesta, odnosno katalitičku trijadu: Glu325, Ser198, His438. π - π slaganje javlja se i između tiofenske jezgre u ligandu i fenilalanina (Phe329) (4,2 Å) i tirozina (Tyr332) (4,0 Å) kao i kod dvostruke veze ugljik-ugljik i Phe329 (4,7 Å).

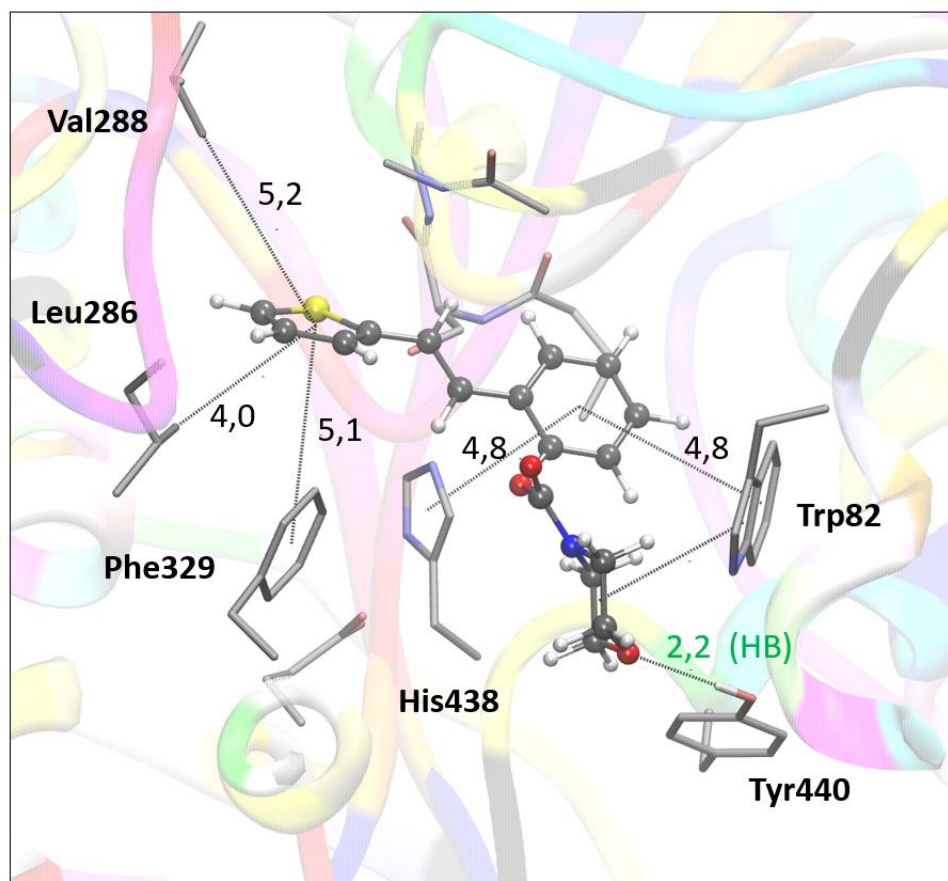
Orijentacija liganda u ovom kompleksu je nepogodna za kovalentno vezanje karbamata za serinski kisik.



Slika 26. Najstabilnija struktura nekovalentnog kompleksa između aktivnog mjesta BChE spoja **10** dobivena molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å; vodikova veza (HB) označena je zelenom bojom, a udaljenost između reakcijskih centara (karbonilnog ugljika na ligandu i serinskog kisika) crvenom.

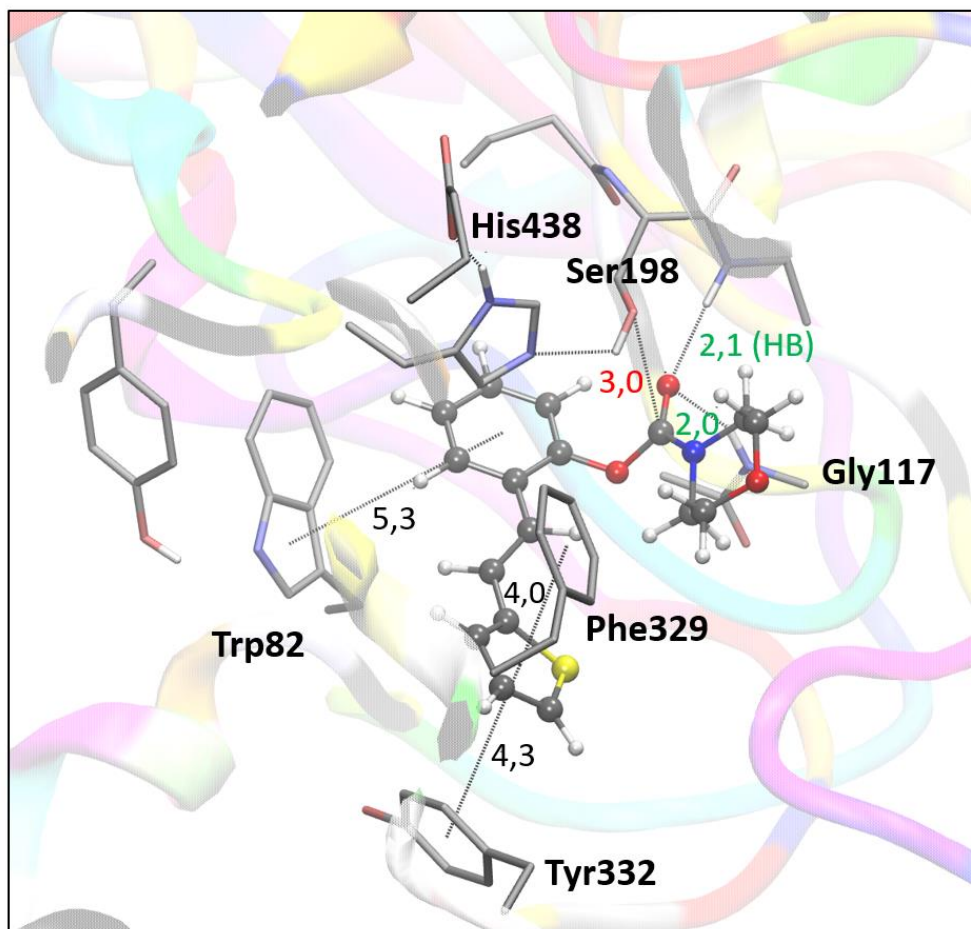
Najstabilniji nekovalentni kompleks između spoja **10** i aktivnog mjesta BChE prikazan je slikom 26. koja pokazuje interakcije između liganda i enzima u svrhu stabilizacije kompleksa. One uključuju π - π slaganje između fenilne jezgre liganda i Trp82 (5,5 Å) u perifernom anionskom mjestu. Nadalje, primijećeno je paralelno π - π slaganje između tiofenske jezgre u ligandui Phe329 (4,1 Å), kao i okomito π - π slaganje između tiofena i Tyr332 (4,3 Å). Dodatno, javljaju se i alkil-alkil hidrofobne interakcije između etilne skupine liganda i leucina (Leu286) (3,7 Å), aminokiseline koja se nalazi u acilnom džepu. U ovom slučaju, orijentacija liganda pogodna je za kovalentno vezanje liganda. Karbamatna skupina liganda dodatno je stabilizirana vodikovom vezom (2,1 Å) između karbonilnog kisika i vodika iz peptidne veze

koja povezuje Ser198 i Ala199. Smještaj i orijentacija liganda omogućava nukleofilni napad serinskog kisika na karbonilni ugljik karbamatne skupine (udaljenost $O_{\text{Ser198}}-C_{\text{karbamata}}$ u nekovalentnom kompleksu je 2,7 Å).



Slika 27. Struktura najstabilnijeg nekovalentnog kompleksa između aktivnog mjesta BChE liganda **19** dobivena molekulskim dockingom. Udaljenosti u Å, a vodikova veza (HB) naznačena je zelenom bojom.

Slikom 27 prikazan je najstabilniji nekovalentni kompleks između spoja **19** i aktivnog mjesta BChE. Stabilizacija kompleksa omogućena je zbog nekovalentnih interakcija između liganda i enzima. Interakcije uključuju okomito π - π slaganje između fenilne jezgre liganda i Trp82 (4,8 Å), a s druge strane fenilna jezgra ostvaruje slično međudjelovanje s His438 (4,8 Å). Iste interakcije javljaju se i između tiofenske jezgre u ligandu i Phe329 (5,1 Å). S druge strane, hidrofobne interakcije javljaju se između tiofenske jezgre i aminokiseline u acilnom džepu, Leu286 (4,0 Å) i valina (Val288) (5,2 Å). Morfolinski fragment liganda ostvaruje vodikovu vezu s Tyr440 (2,2 Å) smještenim u blizini aktivnog mjesta, dok hidrofobna regija morfolina stupa u alkil- π interakciju s Trp82.



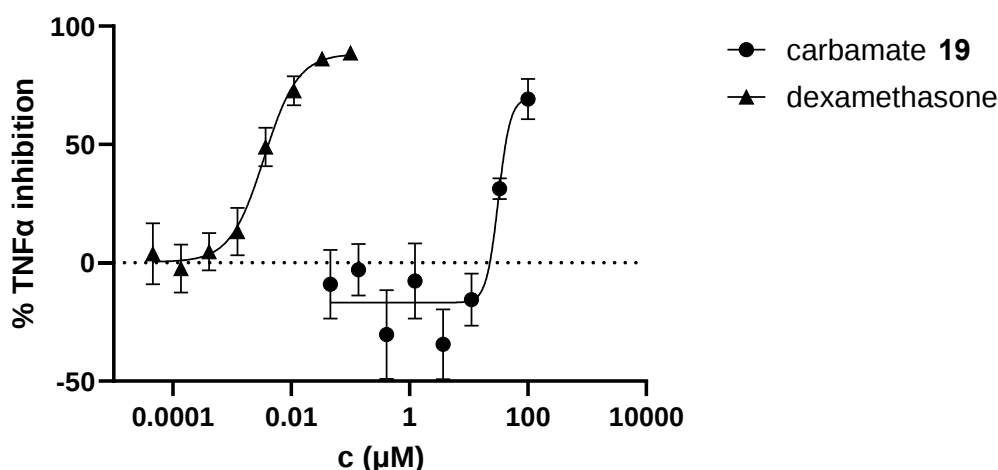
Slika 28. Struktura nekovalentnog kompleksa između aktivnog mjesta BChE i spoja **19** dobivena molekulskim dockingom kao druga po stabilnosti. Orijentacija karbamatne skupine pogodna je za stvaranje kovalentne veze između karbonilnog ugljika u ligandu i serinskog kisika (udaljenost označena crvenom bojom). Zelenom bojom naznačene su vodikove veze, a sve udaljenosti dane su u Å.

Na slici iznad prikazan je drugi najstabilniji nekovalentni kompleks spoja **19** i aktivnog mjesta BChE. Kao i prethodno, stabilizaciji kompleksa doprinijele su interakcije između liganda i enzima koje uključuju π - π slaganje fenilne jezgre liganda i Trp82 (5,3 Å), te tiofenske jezgre u ligandu i Phe329 (4,0 Å), kao i Tyr332 (4,3 Å) s druge strane tiofenskog prstena. Javlja se i hidrofobne interakcije između morfolinskog fragmenta u ligandu i aminokiselina u acilnom džepu, Leu286 i Val288. Orijentacija liganda pogodna je za kovalentno vezanje. Karbamatna skupina liganda stabilizirana je dvjema vodikovim vezama, veza karbonilnog kisika s vodikom iz peptidne veze između Ser198 i Ala199 (2,1 Å), kao i veze s vodikom iz peptidne veze između Gly116 i Gly117 (2,0 Å) u oksianionskoj šupljini. Smještaj i orijentacija liganda omogućava nukleofilni napad serinskog kisika na karbonilni ugljik (udaljenost O_{Ser198}-

C_{karbamat} u nekovalentnom kompleksu je 3,0 Å), što predstavlja prvi stupanj reakcije kovalentnog vezanja liganda za enzim.

3.2.3. Protuupalna aktivnost heterostilbenskih karbamata 1–22

Potencijalna protuupalna aktivnost ispitivanih spojeva procijenjena je *in vitro* u testu u kojem su mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) stimulirane lipopolisaharidom (LPS) radi poticanja proizvodnje faktora tumorske nekroze alfa (TNF- α). Od svih testiranih spojeva, samo karbamat **19** pokazao je sposobnost inhibicije LPS-stimulirane proizvodnje TNF- α . Spoj je bio aktivan pri dvjema najvišim ispitivanim koncentracijama, s prosječnom IC_{50} vrijednošću od 31,6 μM u PBMC stanicama dobivenim od dva donora. Kao referentna tvar u ovom ispitivanju korišten je deksametazon, kortikosteroid široko primjenjivan u liječenju upalnih bolesti. Očekivano, deksametazon je pokazao izrazito snažan učinak inhibicije LPS-inducirane proizvodnje TNF α , s IC_{50} vrijednošću od 3,5 nM.



Slika 29. Inhibicija LPS-stimulirane produkcije TNF α u PBMC dvaju donora.

3.5. Genotoksičnost

Važan korak u istraživanju spojeva s biološkom aktivnošću je procjena toksičnosti, koja se provodi prije analize ADME(T) svojstava (objašnjenje u nastavku), kako bi se identificirali spojevi pogodni za daljnja ispitivanja i oni koji sadrže strukturne mogućnosti za genotoksičnost. Nečistoće koje mogu biti prisutne u aktivnom farmaceutskom sastojku (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) ili u gotovom lijeku ne mogu se u potpunosti izbjeći

pa je daljnje istraživanje takvih spojeva ključan dio razvoja lijeka i od velike je važnosti za sigurnost istih. Osim u aktivnoj tvari, nečistoće mogu biti zastupljene i u svakom intermedijeru tijekom proizvodnog procesa te je potrebno procijeniti ih s obzirom na genotoksična svojstva. Spojevi s dokazanim ili potencijalnim genotoksičnim svojstvima strože su regulirani i moraju se kontrolirati na vrlo niskim razinama, znatno nižim od ostalih nečistoća (ICH M7 smjernica). Razine koje smiju biti prisutne u lijeku izračunaju se na temelju eksperimentalno prihvatljivog dnevnog unosa (AI) i maksimalne dnevne doze (MDD) lijeka. Kod novih spojeva AI obično još nije određen toksikološkim studijama na životinjama. Procjene se prvenstveno provode upotrebom *in silico* Q(SAR) alata. Prilikom razvoja novih aktivnih tvari i gotovih oblika lijekova, nečistoće će biti novi spojevi za koje obično nema dostupnih eksperimentalnih podataka. U tu svrhu koriste se (Q)SAR modeli koji predviđaju biološku aktivnost na temelju strukturnih značajki spojeva. (Q)SAR modeli osobito su važni u ranim fazama istraživanja potencijalno aktivnih lijekova jer omogućuju isključivanje spojeva s mutagenim potencijalom, čime se štede vrijeme i financijska sredstva. Najčešće korišten alat za ovu svrhu je Lhasa softverski paket (Nexus v.2.5.2, Derek Nexus v.6.2.1 i Sarah Nexus v.3.2.1), koji koristi dva komplementarna modela. Njihove se predikcije dodatno evaluiraju od strane stručnjaka. Od spojeva koji su pokazali biološku aktivnost (**1**, **10**, **19** i **20**), samo spoj **1** nije bio prikladan kandidat za daljnje ispitivanje jer je pokazivao potencijalnu mutagenost. Ukoliko bi ovaj spoj ipak bio od posebnog interesa, bilo bi potrebno provesti dodatna *in vitro* Ames testiranja, a po potrebi i *in vivo* kvalifikacijske studije, kako bi se potvrdila njegova prikladnost za primjenu kao aktivne ljekovite tvari. Studije koje se odnose na bioraspoloživost, tj. apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje i toksičnost (ADME(T)) predstavljaju temelj razvoja svakog lijeka. Njihov je cilj pružiti uvid u farmakokinetička svojstva spoja nalik lijeku, kao i potencijalne sigurnosne rizike za ljude. Ta se svojstva mogu proučavati *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. U ranim fazama razvoja lijekova, *in silico* alati imaju veliku prednost jer omogućuju ispitivanje spojeva koji su dostupni u malim količinama ili nisu dovoljno čisti za druge metode ispitivanja. U ovom su radu korišteni besplatni *in silico* alati za izbor potencijalnih kandidata.

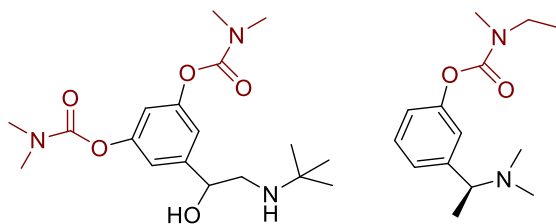
U tablici 5 prikazani su rezultati ispitivanja mutagenog potencijala sintetiziranih karbamata **1–8**, **10–12**, **14–16** i **18–22**. Za spojeve **1**, **3**, **5–8**, **11** i **22** Sara test predviđa mutagenost, dok Derek test pretpostavlja da isti spojevi nisu mutageni. Za ostale spojeve Sara i Derek testovi daju negativne rezultate.

Tablica 5. Mutageni potencijal karbamata procijenjen je pomoću Lhasa M7 evaluacije (zeleni kvadrat – negativan, crveni kvadrat – pozitivan, bijeli kvadrat – nema dostupnih podataka); siva pozadina označava negativan rezultat, svijetlosiva pozadina označava pozitivan rezultat, dok bijela pozadina označava izraženo negativan rezultat.

Structure	ICH M7 Class	Cohort of Concern	Derek Prediction	Sarah Prediction	Experimental Data	Overall in Silico
1	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
2	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
3	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
4	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
5	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
6	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
7	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
8	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
10	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
11	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive
12	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
14	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
15	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
16	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
18	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
19	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
20	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
21	Class 5	No	■ ■ ■ ■ □	□ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Negative
22	Class 3	No	■ ■ ■ ■ □	■ □ □ □	Carc: Unspecified Ames: Unspecified	Positive

Vrijednost log BB (omjer koncentracije lijeka u mozgu i u krvi) za spojeve **10** i **19** iznosi približno 0,3. Taj je rezultat obećavajući, budući da spojevi s log BB > 0,3 lako prolaze krvno-moždanu barijeru (BBB). Drugi pokazatelj je log PS (propusnost × površina); vrijednosti log

PS > -2 upućuju na molekule koje mogu prodrijeti u središnji živčani sustav (CNS). Za sve ispitivane spojeve ta je vrijednost viša od -0,98, što ih svrstava među dobre kandidate za CNS djelovanje. Ukoliko se uzme u obzir da je nevezani oblik lijeka farmakološki aktivan, tada viši postotak nevezanog oblika može ukazivati na bolju bioraspoloživost i sposobnost distribucije u CNS. S obzirom na to da su ispitivani spojevi analozi s aktivnom karbamatnom skupinom, ovi su se parametri usporedili s poznatim lijekovima koji također sadrže karbamatnu funkcijsku skupinu. Za usporedbu su odabrani bambuterol i rivastigmin (Slika X), zbog strukturne sličnosti i srodnih terapijskih indikacija kao i ispitivani spojevi.



Slika 30. Strukture bambuterola (lijevo) i rivastigmina (desno).

Budući da su u pitanju dobro poznati lijekovi, *in silico* predviđanje provedeno je samo za parametre distribucije: VD_{ss}, log BB i log PS. Parametar VD_{ss} (volumen distribucije u stanju ravnoteže) pokazuje slične vrijednosti kao i za spojeve **6**, **10** i **20**. Vrijednosti log BB za poznate lijekove su nešto veće, no budući da vrijednosti iznad 0,3 omogućuju efikasan prolazak krvno-moždane barijere, spojevi **6** i **10** također zadovoljavaju taj kriterij. S obzirom na raspon dobivenih *in silico* ADME(T) parametara te procjene genotoksičnosti, svi ispitivani spojevi – **6**, **10** i **20** – pokazuju potencijal kao početne strukture za daljnji razvoj lijekova.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

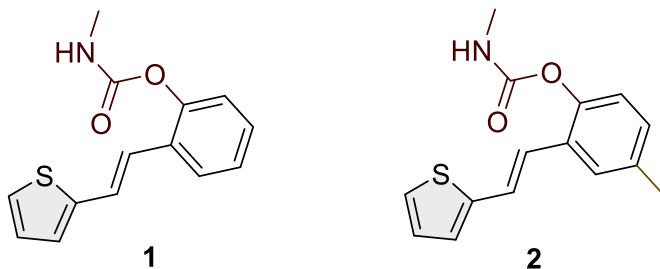
Sva otapala korištena u eksperimentalnom dijelu ovoga rada su komercijalno dostupna bez potrebe za dodatnim pročišćavanjem. Korišteni rezveratrolni prekursori sintetizirani su ranije u okviru istraživanja provedenih u našem laboratoriju. Nakon svake provedene sinteze, reakcijska smjesa bila je podvrgnuta trostrukoj ekstrakciji radi odvajanja organskog i vodenog sloja. Organski sloj sušen je iznad bezvodnog magnezijeva sulfata. Tankoslojna kromatografija (TLC) provedena je na silika-gel pločicama (0,2 mm, 60/Kieselguhr F₂₅₄) uronjenim u 10 mL odgovarajućeg sustava otapala. Kolonska kromatografija izvedena je u staklenim kolonama različitih promjera, napunjenima silika-gelom (60 Å, tehnička čistoća) različitih visina, ovisno o veličini uzorka i složenosti smjese. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) korištena je za karakterizaciju spojeva. Spektri su snimani na Bruker Avance uređajima od 300 i 600 MHz. Uzorci su otopljeni u deuteriranom kloroformu (CDCl₃), a kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS), koji daje jedan signal. Kemijski pomaci izraženi su u ppm jedinicama (engl. *parts per million*). U ¹H NMR spektrima prisutni su karakteristični signali otapala: signal za vodu u kloroformu na 1,50 ppm te signal za nedeuterirani kloroform na 7,24 ppm. U ¹³C NMR spektrima zabilježen je trostruki signal otapala na 77,0 ppm, što je svojstveno deuteriranom kloroformu.

Kratice korištene u eksperimentalnom dijelu: DCE – 1,2-dikloretan, DMAP – 4-dimetilaminopiridin, TEA – trietilamin, DCM – diklormetan, PE – petroleter, E – dietileter, NMR – nuklearna magnetska rezonancija, s – singlet, d – dublet, dd – dublet-dubleta, ddd – dublet-dublet-dubleta, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet.

4.2. Sinteza karbamata

Općeniti postupak

Postupak započinje otapanjem 30-110 mg odgovarajućeg hidroksi derivata (dobivenog Wittigovom reakcijom) u određenom volumenu (0,7-1,2) mL DCE u malim tikvicama s okruglim dnom. Reakcijskoj smjesi se potom dodaju 1,8 eq TEA i 0,09 eq DMAP, nakon čega slijedi miješanje na sobnoj temperaturi 15 minuta i propuhivanje argonom do 1 minute. Po završetku vremena dodaje se kap po kap 1,2 eq odgovarajućeg karbamoil-klorida te se cijela reakcijska smjesa ostavlja na miješalici 2 do 5 sati na temperaturi uljne kupelji od 60°C uz kontinuirano miješanje i inertne uvjete. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom, a po završetku reakcije otapalo je uklonjeno uparavanjem na rotacijskom vakuumskom uparivaču. Dobiveni kruti produkt zatim je otopljen u 10 mL DCM i stavljen u mali lijevak za ekstrakciju. U postupku ekstrakcije kao polarno otapalo korištena je destilirana voda, a sam postupak ekstrahiranja je ponovljen dva puta (2 x 10 mL), pri čemu je drugi puta u 10 mL vode dodan 1 mL HCl-a (2,4 M). Ekstrahirani produkt zatim je ostavljen da se suši iznad bezvodnog magnezijevog sulfata 15-ak minuta nakon čega je filtriran i uparen do suhog pomoću rotacijskog uparivača. Dobiveni karbamati (**1–22**) pročišćeni su kolonskom kromatografijom korištenjem različitih omjera otapala petroleter/dietileter. NMR analiza potvrdila je da su sintetizirani spojevi **1–22** pretežno dobiveni kao *trans*-izomeri, s manjim udjelima *cis*-izomera detektiranim u nekim slučajevima. Iznimka je bio triazolni karabamat **8**, koji je pokazao veći udio odgovarajućeg *cis*-izomera.



(*E*)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbammat (1)

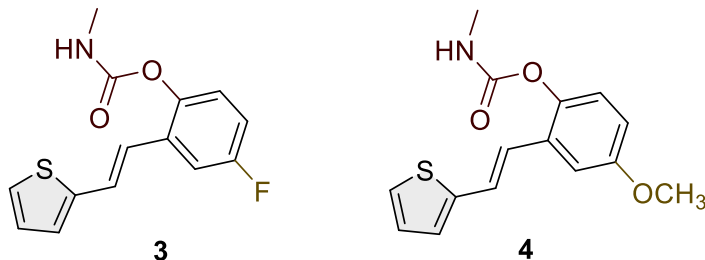
Spoj **1** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (100 mg, 0,50 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (84,6 mg odnosno 116,5 μ L, 0,89 mmol), 0,09 eq DMAP (5,3 mg, 0,04 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (55,5 mg, 0,59 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

37 mg, 31 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 117–119 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7,61 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,26 (m, 3H), 7,20 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 7,13 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 7,12–7,10 (m, 1H), 7,05–7,00 (m, 1H), 5,10 (br s, 1H), 2,92 (d, J = 4,8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ /ppm: 155,0, 154,0, 148,3, 142,9, 128,3, 127,6, 126,4, 126,1, 125,8, 124,6, 123,6, 123,0, 121,8, 27,9; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 259,0667$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 259,0666$.

(*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbammat (2)

Spoj **2** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (100 mg, 0,46 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (79,1 mg odnosno 108,9 μ L, 0,83 mmol), 0,09 eq DMAP (4,9 mg, 0,04 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (93,4 mg, 1,0 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 4 cm; sustav PE/E).

22 mg, 18 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 110–111 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,41 (s, 1H), 7,22–7,17 (m, 2H), 7,09–7,04 (m, 2H), 7,03–6,96 (m, 3H), 5,04 (br s, 1H), 2,92 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 2,35 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,2, 146,2, 143,0, 135,3, 129,4, 129,1, 127,6, 126,4, 126,3, 124,5, 123,3, 122,7, 121,9, 27,9, 21,0; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 273,0824$, i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 273,0826$.

**(*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbamat (3)**

Spoj **3** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (100 mg, 0,45 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (77,6 mg odnosno 106,9 μ L, 0,82 mmol), 0,09 eq DMAP (4,8 mg, 0,04 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (50,9 mg, 0,54 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

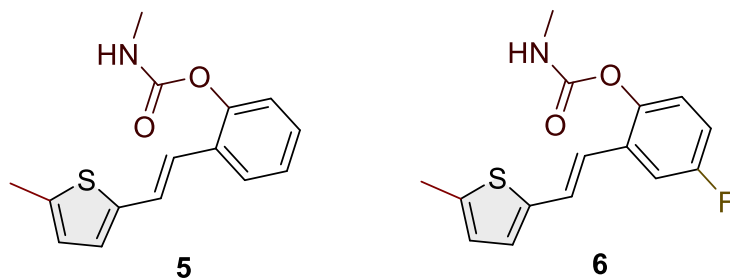
39 mg, 33 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 117–119 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,28 (d, J = 9,7, 1H), 7,22 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 18,4 Hz, 1H), 7,09-7,02 (m, 2H), 7,01 (t, J = 2,7 Hz, 1H), 7,00-6,9 (m, 2H), 5,10 (br s, 1H), 2,92 (d, J = 4,2, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 160,2 (d, J_{CF} = 243,3 Hz), 155,1, 144,3, 142,0, 130,6 (d, J_{CF} = 7,7 Hz), 127,7, 125,1, 124,6, 124,0 (d, J_{CF} = 8,7 Hz), 120,7, 114,9, 111,9, 27,6; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FNO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 277,0573$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 277,0572$.

(*E*)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbamat (4)

Spoj **4** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (100 mg, 0,43 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (73,6 mg odnosno 101,4 μ L, 0,78 mmol), 0,09 eq DMAP (4,6 mg, 0,04 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (48,2 mg, 0,52 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

27 mg, 23 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 123–124 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,25; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,33-7,21 (m, 2H), 7,20 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 3,1 Hz,

1H), 7,03 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,00 (t, $J = 3,9$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,82 (dd, $J = 2,7, 9,6$ Hz, 1H), 5,00 (br s, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,92 (d, $J = 4,8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 157,1, 155,4, 142,7, 142,2, 129,9, 130,7, 127,6, 126,5, 124,7, 123,8, 121,8, 114,1, 110,4, 55,7, 29,7; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 289,0772$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 289,0773$.



(*E*)-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbamat (5)

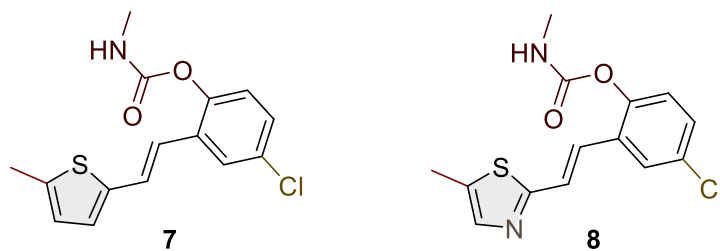
Spoj **5** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (39,4 mg, 0,18 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (31,2 mg odnosno 42,92 μL , 0,33 mmol), 0,09 eq DMAP (1,93 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (20,5 mg, 0,22 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

18 mg, 43 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 114–116 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,66–7,55 (m, 1H), 7,24–7,16 (m, 2H), 7,15–7,09 (m, 2H), 6,89 (t, $J = 16,7$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 6,60 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 5,07 (br s, 1H), 2,93 (d, $J = 4,6$ Hz, 3H), 2,48 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 155,0, 148,2, 140,9, 139,5, 130,0, 128,0, 126,8, 125,9, 125,8, 125,7, 124,0, 123,0, 120,5, 29,7, 15,6; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 273,0824$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 273,0825$.

(*E*)-4-fluor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbamat (6)

Spoj **6** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-fluor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (42,76 mg, 0,18 mmol) otopljenog u 0,8 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (31,2 mg odnosno 42,92 μ L, 0,33 mmol), 0,09 eq DMAP (1,94 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (20,5 mg, 0,22 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

19 mg, 42 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 105–107 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,29–7,23 (m, 2H), 7,09 (d, J = 16,4 Hz, 2H), 6,87 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 6,80 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 6,66–6,64 (m, 1H), 5,06 (br s), 2,93 (d, J = 4,9 Hz, 3H), 2,48 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 160,3 (J_{CF} = 243,1 Hz), 155,0, 144,0, 140,3, 140,2, 131,9 (d, J_{CF} = 8,3 Hz), 127,5, 125,9, 125,0, 124,4 (d, J_{CF} = 8,3 Hz), 119,4, 114,7 (d, J_{CF} = 24,1 Hz), 111,8 (d, J_{CF} = 24,1 Hz), 29,5, 15,7; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 291,0729$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 291,0731$.

**(*E*)-4-klor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-metilkarbamat (7)**

Spoj **7** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-klor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (45,6 mg, 0,18 mmol) otopljenog u 0,8 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (31,2 mg odnosno 42,92 μ L, 0,33 mmol), 0,09 eq DMAP (1,93 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-

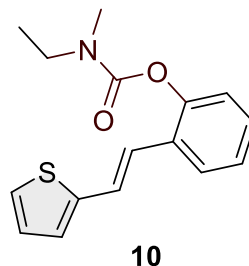
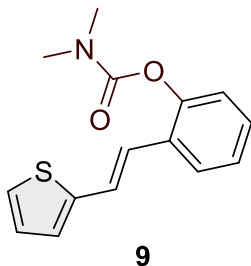
metilkarbamoil-klorid (20,5 mg, 0,22 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

12 mg, 25 % izoliranog spoja; bijeli prah; t.t. 122–123 °C; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,55 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 7,13–7,09 (m, 2H), 7,06 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 6,80–6,76 (m, 1H), 6,66–6,64 (m, 1H), 5,07 (br s, 1H), 2,93 (d, $J = 4,9$ Hz, 3H), 2,47 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 154,7, 147,7, 146,5, 140,3, 131,8, 131,2, 127,7, 127,5, 125,9, 125,5, 125,2, 125,1, 124,3, 29,7, 15,7; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 307,0434$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 307,0433$.

Smjesa (*E*) i (*Z*)-4-klor-2-(2-(5-metiltiazol-2-il)vinil)fenil-metilkarbammat (8)

Spoj 7 sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-klor-2-(2-(5-metiltiazol-2-il)vinil)fenola (45,94 mg, 0,18 mmol) otopljenog u 0,8 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (31,2 mg odnosno 42,92 μL , 0,33 mmol), 0,09 eq DMAP (1,94 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-metilkarbamoil-klorid (20,5 mg, 0,22 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

(*E*)-izomer: 8 mg, 17 % izoliranog spoja; bijeli prah (smjesa izomera); R_f (PE/E (50 %)) = 0,30; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,52 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,12 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,80 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 2,58 (d, $J = 5,0$ Hz, 3H), 2,57 (s, 3H); MS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+ 308$ (100).



(E)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-dimetilkarbamat (9)

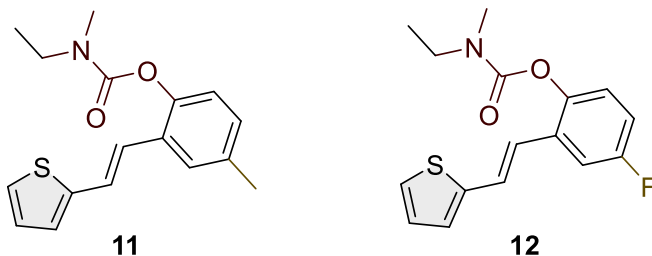
Spoj **9** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (E)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (110 mg, 0,55 mmol) otopljenog u 1,2 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (93,1 mg odnosno 128,3 μ L, 0,98 mmol), 0,09 eq DMAP (8,5 mg, 0,07 mmol) te 1,2 eq *N,N*-dimetilkarbamoil-klorid (70,33 mg odnosno 60,21 μ L, 0,65 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

97,6 mg, 66 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,60; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm 7,60 (dd, J = 1,5, 7,8, Hz, 1H), 7,28-7,24 (m, 2H), 7,19-7,17 (m, 2H), 7,18 (dd, J = 5,5, 6,4 Hz, 1H), 7,14 (dd, J = 8,0, 1,2 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 7,01-6,98 (m, 1H), 3,19 (d, J = 13,7 Hz, 3H), 3,04 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 154,6, 148,8, 143,1, 129,7, 128,3, 127,6, 126,4, 125,9, 125,6, 124,5, 123,4, 123,1, 122,0, 36,9, 36,5; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 273,0823$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 273,0824$.

(E)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (10)

Spoj **10** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (E)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,25 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (42,3 mg odnosno 58,26 μ L, 0,45 mmol), 0,09 eq DMAP (2,7 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (36,11 mg odnosno 32,80 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

39,5 mg, 56 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,80; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm 7,61 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 7,28-7,22 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,20-7,18 (m, 3H), 7,15-7,12 (m, 1H), 7,04 (d, J = 3,5 Hz, 1H), 6,99 (dd, J = 3,6, 5,0 Hz, 1H), 3,56 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 3,17 (s, 3H), 1,32 (t, J = 7,2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 148,9, 143,1, 129,7, 128,8, 128,3, 127,6, 126,4, 125,8, 125,6, 124,5, 123,3, 122,8, 121,9, 44,2, 34,4, 29,7; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 287,0980$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 287,0985$.



(*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (11)

Spoj **11** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,23 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (39,5 mg odnosno 54,4 μ L, 0,42 mmol), 0,09 eq DMAP (3,4 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (33,72 mg odnosno 30,60 μ L, 0,28 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

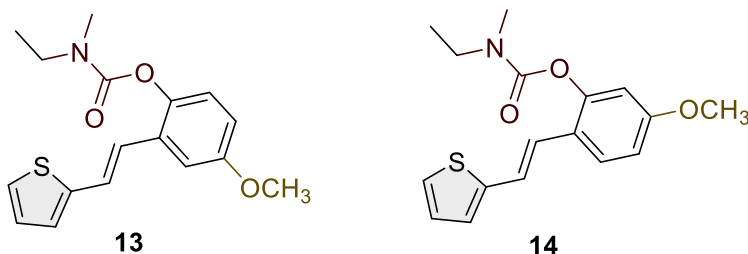
2,5 mg, 4 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,70; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm 7,41 (s, 1H), 7,17 (d, J = 2,8 Hz, 2H), 7,04 (m, 2H), 7,00 (m, 1H), 6,99 (m, 2H), 3,56 (q, J = 6,9 Hz, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 1,33 (t, J = 6,9 Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 154,5, 154,3, 146,7, 143,2, 135,0, 129,1, 127,6, 126,3, 126,2, 124,4, 123,1, 122,8, 122,2, 44,2, 34,3, 29,7, 21,0; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 301,1136$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 301,1141$.

(*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (12)

Spoj **12** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,23 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (38,8 mg odnosno 53,44 μ L, 0,41 mmol), 0,09 eq DMAP (3,7 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (33,1 mg odnosno 30,0 μ L, 0,27 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

28 mg, 41 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,50; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm 7,28 (d, J = 11,7 Hz 2H), 7,21 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 7,17-7,11 (m, 1H), 7,07 (d, J

= 3,1 Hz, 1H), 7,01 (dd, $J = 3,7, 5,0$ Hz, 1H), 6,98-6,93 (m, 1H), 6,94-6,84 (m, 1H), 3,55 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), 3,16 (s, 3H), 1,25 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 160,2 (d, $J_{\text{CF}} = 243,2$ Hz), 142,5, 127,7, 127,1, 126,5, 125,6, 125,0, 124,6, 124,4, 120,8 (d, $J_{\text{CF}} = 8,5$ Hz), 115,1 (d, $J_{\text{CF}} = 24,5$ Hz), 111,5, 110,9, 44,1, 29,7, 21,1.



(*E*)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (13)

Spoj **13** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (40 mg, 0,22 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (29,0 mg odnosno 40,0 μL , 0,31 mmol), 0,09 eq DMAP (1,84 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (25,3 mg odnosno 23,0 μL , 0,21 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

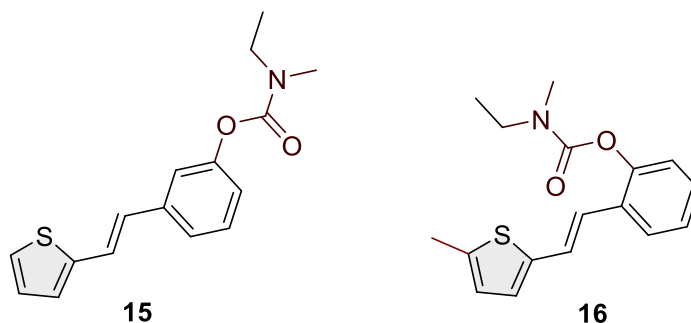
9,8 mg, 14 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; $R_f(\text{PE/E } (50 \text{ \%})) = 0,20$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm 7,53 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 7,31-7,21 (m, 2H), 7,15 (dd, $J = 8,3, 12,8$, Hz, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,03-6,96 (m, 1H), 6,75 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 6,38 (dd, $J = 5,4, 13,3$ Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,30 (m, 2H), 2,64 (s, 3H), 1,43 (s, 3H).

(*E*)-5-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (14)

Spoj **14** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-5-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (31 mg, 0,22 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (36,97 mg odnosno 31,57 μL , 0,39 mmol), 0,09 eq DMAP (1,8 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-

metilkarbamoil-klorid (31,54 mg odnosno 17,76 μ L, 0,26 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

17,9 mg, 26 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (30 %)) = 0,60; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,52 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 7,09 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 6,98 (m, 3H), 6,77 (dd, $J = 2,4, 8,7$ Hz, 1H), 6,70 (s, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,50 (ddd, $J = 6,8, 13,8, 19,1$ Hz, 2H), 3,03 (s, 3H), 1,25 (t, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 159,8, 154,1, 149,7, 143,5, 127,6, 126,5, 125,7, 123,9, 122,4, 121,8, 121,3, 112,5, 108,3, 55,0, 44,1, 29,7, 13,5; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 319,1102$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 319,1107$.



(*E*)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbamat (15)

Spoj **15** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,25 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (42,3 mg odnosno 58,26 μ L, 0,45 mmol), 0,09 eq DMAP (3,7 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (36,11 mg odnosno 32,8 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

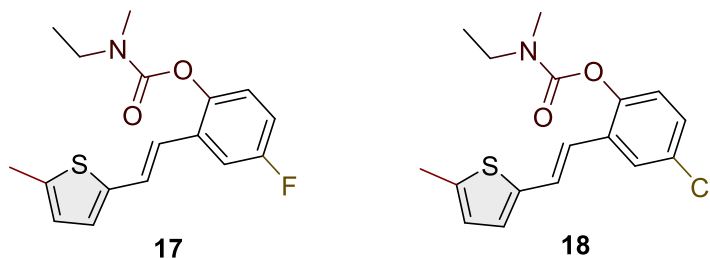
62,6 mg, 95 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,70; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ/ppm 7,34-7,29 (m, 1H), 7,29-7,21 (m, 3H), 7,22-7,16 (m, 1H), 7,05 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,02-6,96 (m, 2H), 6,91 (m, 1H), 3,45 (m, 2H), 3,03 (s, 3H), 1,57 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 ,

150 MHz) δ /ppm: 154,5, 151,9, 142,65, 138,4, 129,4, 127,9, 126,3, 124,5, 123,7, 123,3, 122,5, 120,9, 119,2, 44,1, 34,3, 33,8; HRMS (ESI) (m/z) za $C_{16}H_{17}NO_2S$: $[M + H]^+_{\text{izrač.}} = 287,0980$ i $[M + H]^+_{\text{izmjer.}} = 287,0982$.

(*E*)-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbammat (16)

Spoj **16** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (60 mg, 0,28 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (47,44 mg odnosno 65,34 μ L, 0,50 mmol), 0,09 eq DMAP (3,6 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (40,5 mg odnosno 36,78 μ L, 0,33 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

25,3 mg, 30 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,80; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ /ppm 7,24 (m, 3H), 7,21 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,97 (m, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,09 (m, 3H), 3,03 (s, 3H), 1,95 (m, 3H); HRMS (ESI) (m/z) za $C_{17}H_{19}NO_2S$: $[M + H]^+_{\text{izrač.}} = 303,4142$ i $[M + H]^+_{\text{izmjer.}} = 303,4148$.



(*E*)-4-fluor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbammat (17)

Spoj **17** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-fluor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (53 mg, 0,23 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (38,68 mg odnosno 53,28 μ L, 0,41 mmol), 0,09 eq DMAP (3,6 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-

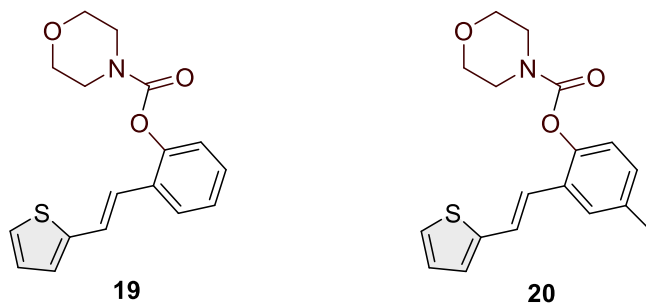
metilkarbamoil-klorid (33,0 mg odnosno 29,97 μL , 0,27 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5\text{ cm}$; $h = 5\text{ cm}$; sustav PE/E).

3,8 mg, 5 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,80; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ/ppm 7,26 (d, $J = 6,8\text{ Hz}$ 3H), 7,12 (m, 1H), 6,98 (m, 1H), 6,90 (m 1H), 6,83 (m, 1H), 3,61 (m, 2H), 2,50 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,72 (m, 3H).

(*E*)-4-kloro-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenil-etil-metilkarbammat (18)

Spoj **18** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-klor-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenola (32,0 mg, 0,13 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (30,06 μL , 0,23 mmol), 0,09 eq DMAP (2,4 mg, 0,01 mmol) te 1,2 eq *N*-etil-*N*-metilkarbamoil-klorid (18,62 mg odnosno 16,91 μL , 0,15 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5\text{ cm}$; $h = 5\text{ cm}$; sustav PE/E);

8,00 mg, 19 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,70; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 335,0747$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 335,0744$.



(*E*)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-morfolin-4-karboksilat (19)

Spoj **19** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,25 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (42,3 mg odnosno 58,26 μL , 0,45 mmol), 0,09 eq DMAP (2,63 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq morfolin-4-karbonil-klorida

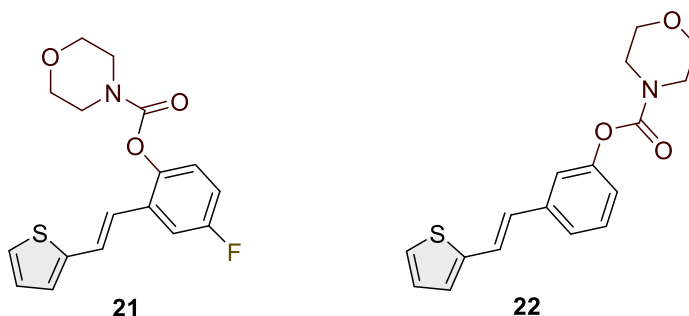
(44,4 mg odnosno 34,6 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

75,1 mg, 96 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,40; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 7,62 (dd, $J = 1,7, 7,5$ Hz, 1H), 7,34 (dd, $J = 8,1, 14,3$ Hz, 1H), 7,19 (dd, $J = 4,2, 7,2$ Hz, 2H), 7,10 (ddd, $J = 2,3, 9,1, 15,6$ Hz, 2H), 6,95-6,86 (m, 1H), 6,58 (dd, $J = 10,7, 11,9$ Hz, 2H), 3,93-3,53 (m, 8H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 148,5, 142,9, 130,4, 129,7, 128,3, 127,7, 126,5, 126,0, 124,6, 123,7, 123,1, 122,7, 121,6, 66,8, 44,3; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 315,0929$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 315,0932$.

(*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-morfolin-4-karboksilat (20)

Spoj **20** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,23 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (39,5 mg odnosno 54,4 μ L, 0,41 mmol), 0,09 eq DMAP (2,9 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq morfolin-4-karbonil-klorida (41,5 mg odnosno 32,4 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom ($\phi = 1,5$ cm; $h = 5$ cm; sustav PE/E).

78,0 mg, 97 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,40; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 7,41 (s, 1H), 7,23 (m, 1H), 7,18 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,00 (dd, $J = 3,5, 4,8$ Hz, 2H), 6,95-6,88 (m, 1H), 6,55 (dd, $J = 10,7, 11,9$ Hz, 1H), 3,69 (m, 8H), 2,34 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 153,6, 146,4, 143,0, 135,4, 129,4, 129,2, 127,7, 126,4, 126,0, 124,6, 123,3, 122,8, 121,7, 66,8, 45,0, 20,9; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 329,1086$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 329,1091$.



(E)-4-fluoro-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-morfolin-4-karboksilat (21)

Spoj **21** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,23 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (38,8 mg odnosno 53,5 μ L, 0,41 mmol), 0,09 eq DMAP (2,9 mg, 0,02 mmol) te 1,2 eq morfolin-4-karbonil-klorida (40,7 mg odnosno 31,8 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

39,5 mg, 52 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,40; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ /ppm: 7,31 (d, J = 2,9 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 7,18-7,10 (m, 1H), 7,08 (t, J = 4,3 Hz, 1H), 7,04-6,99 (m, 1H), 6,95 (dd, J = 5,3, 8,2 Hz, 1H), 6,89 (dd, J = 5,3, 14,0 Hz, 1H), 6,55 (dd, J = 10,7, 11,9 Hz, 1H), 3,69 (m, 8H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 161,7 (d, J_{CF} = 243,2 Hz), 158,5, 152,9, 142,3, 131,4, 127,8, 127,3, 126,5 (d, J_{CF} = 8,6 Hz), 125,1, 124,6, 120,5, 115,0 (d, J_{CF} = 23,9 Hz), 111,9 (d, J_{CF} = 24,1 Hz), 66,7, 45,1; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FNO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 333,0835$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 333,0838$.

(E)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenil-morfolin-4-karboksilat (22)

Spoj **22** sintetiziran je prema općenitom postupku iz (*E*)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenola (50 mg, 0,25 mmol) otopljenog u 0,7 mL DCE, nakon čega su dodani 1,8 eq TEA (42,3 mg odnosno 58,26 μ L, 0,45 mmol), 0,09 eq DMAP (2,63 mg, 0,03 mmol) te 1,2 eq morfolin-4-karbonil-klorida (44,4 mg odnosno 34,6 μ L, 0,3 mmol). Dobiveni produkt je, nakon postupka ekstrakcije, pročišćen kolonskom kromatografijom (ϕ = 1,5 cm; h = 5 cm; sustav PE/E).

87,0 mg, 96 % izoliranog spoja; bezbojno ulje; R_f (PE/E (50 %)) = 0,40; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ/ppm : 7,33 (dd, $J = 5,1, 12,8$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H), 7,20 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 7,14-7,06 (m, 1H), 7,03-6,99 (m, 1H), 6,99 (s, 1H), 6,93-6,83 (m, 1H), 6,62 (dd, $J = 11,9, 16,6$ Hz, 1H), 3,71 (m, 8H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 153,7, 151,6, 142,5, 138,6, 129,5, 127,6, 127,4, 126,4, 124,7, 123,6, 122,7, 120,8, 119,1, 66,6, 43,7; HRMS (ESI) (m/z) za $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izrač.}} = 315,0929$ i $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{izmjer.}} = 315,0934$.

4.3. Rendgenska kristalografija

Mjerenja monokristala izvedena su na difraktometru XtaLAB Synergy s HyPix600 detektorom, korištenjem mikrofokusirane zatvorene rendgenske cijevi s $\text{CuK}\alpha$ (1,54184 Å) zračenjem na 100 K za spoj **1** i sobnoj temperaturi [293(2) K] za spoj **2**. Za prikupljanje i obradu podataka korišten je softverski paket CrysAlisPRO verzije 1.171.43.136a. Kristalne strukture riješene su i dorađene u programu OLEX2, korištenjem SHELXT i SHELXL. Model je optimiziran metodom najmanjih kvadrata matrice; svi atomi osim vodikovih optimizirani su anizotropno. Atomi vodika modelirani su prema položaju vezanih atoma korištenjem naredbe AFIX. Izračuni molekularne geometrije provedeni su pomoću PLATON-a [143], a molekularna grafika pripremljena je pomoću programa CCDC-Mercury [144]. Eksperimentalni podaci o kristalnim podacima, prikupljenim podacima i optimiziranju strukture sažeti su u Tablici 6.

Tablica 6. Kristalografski podaci i detalji optimiziranja strukture za karbamate **1** i **2**.

Svojstvo	Spoj 1	Spoj 2
Empirijska formula	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂ S	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂ S
Molekularna formula (g mol ⁻¹)	259,31	273,34
Dimenzije kristala (mm)	0,3 × 0,03 × 0,02	0,1 × 0,05 × 0,02
Prostorna grupa	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>
<i>a</i> /Å	5,07910(10)	5,12806(17)
<i>b</i> /Å	16,6438(2)	30,1746(7)
<i>c</i> /Å	15,4486(2)	9,2923(4)
α /°	90	90
β /°	98,0250(10)	105,137(4)
γ /°	90	90
<i>Z</i>	4	4
<i>V</i> / Å ³	1293,17(3)	1387,97(8)
<i>D</i> _{izrač.} (g cm ⁻³)	1,332	1,308
μ (mm ⁻¹)	2,171	2,049
Raspon Θ (°)	3,93-80,03	5,12-75,85
<i>T</i> (K)	104(6)	293(2)
Valna duljina zračenja	1,54184 (CuK α)	1,54184 (CuK α)
Tip difraktometra	XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix	XtaLAB Synergy, Dualflex, HyPix
Raspon <i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i>	-6 > <i>h</i> > 6; -21 > <i>k</i> > 21; -19 > <i>l</i> > 19	-6 > <i>h</i> > 6; -26 > <i>k</i> > 37; -11 > <i>l</i> > 11
Prikupljeno refleksija	17951	25937
Neovisne refleksije	5485	2990
Promatrane refleksije (<i>I</i> ≥ 20)	5146	2337
<i>R</i> _{int}	0,0776	0,0899
<i>R</i> (F)	0,0508	0,0743
<i>R</i> _w (F ²)	0,1369	0,2130
Broj parametara, restrikcija	335,1	181,0
Dobrota prilagodbe	1,039	1,054
$\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$ (e Å ⁻³)	0,48; -0,64	0,66; -0,51

4.4. *In vitro* ispitivanje aktivnosti kolinesteraza

Inhibicijska aktivnost ispitivanih spojeva na acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE) procijenjena je korištenjem modificiranog Ellmanovog spektrofotometrijskog testa [145]. AChE (EC 3.1.1.7, *Electrophorus electricus*, tip V-S), BChE (EC 3.1.1.8, konjski serum) i Trisma baza (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol) nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich. Supstrati acetiltiokolin jodid (ATChI) i S-butiriltiokolin jodid (BTChI) također su kupljeni od tvrtke Sig-ma-Aldrich, dok je Ellmanov reagens 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) nabavljen od tvrtke Zwijndrecht. Ispitivani spojevi otopljeni su u etanolu, a 10 μ L svake otopine pomiješano je s 180 μ L Tris pufera (50 mM, pH 8,0) i 10 μ L otopine enzima (konačna koncentracija 0,03 U/ mL). nakon dodavanja 10 μ L DTNB-a (konačna koncentracija 0,3 mM), enzimska reakcija započela je dodavanjem 10 μ L ATChI/BTChI (konačna koncentracija 0,5 mM). Kako bi se uzeo u obzir neenzimski hidrolizirani uzorak, pripremljeni su slijepi uzorci zamjenom enzima jednakom količinom (10 μ L) otopine pufera. Apsorbancija reakcijske smjese mjerena je na 405 nm tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, pomoću čitača mikroploča s 96 jažica. Enzimska aktivnost u odsutnosti inhibitora smatrana je 100 %-tnom, a sva mjerenja su provedena u tri ponavljanja. Postotak inhibicije izračunat je pomoću sljedeće formule: Inhibicija (%) = $[(A_C - A_T)/A_C] \times 100$, gdje je A_C aktivnost enzima bez ispitivanog uzorka, a A_T aktivnost enzima u prisutnosti ispitivanog spoja, izračunata kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Vrijednosti IC_{50} dobivene su nelinearnom regresijskom analizom logaritamski transformiranih koncentracija inhibitora u odnosu na aktivnost enzima.

4.5. Protuupalna aktivnost

Učinak spojeva na proizvodnju tumorskog nekrotičnog faktora alfa (TNF- α) potaknutu lipopolisaharidom (LPS) procijenjen je prema prethodno opisanom postupku [146]. Ukratko, mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC) izolirane su iz sloja leukocita dobivenog od zdravih odraslih dobrovoljaca i resuspendirane u RPMI1640 mediju (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) obogaćenom s 10 % toplinski inaktiviranog FBS-a, 1 % GlutaMAX-a i 1 % antibiotika-antimikotika (Gibco). Zatim je 2×10^5 PBMC stanica usađeno u svaku jažicu 96-jažične ploče. Ispitivani spojevi otopljeni su u dimetilsulfoksidu (DMSO). Pripremljena su trostruka serijska razrjeđenja u DMSO-u i dodane stanicama, s početnom koncentracijom od 100 μ M. Nakon 1 sat

predinkubacije sa spojevima, stanice su stimulirane s 1 ng/mL LPS-a iz *E. coli* 0111:B4. Stanice su inkubirane 24 sata na 37 °C, 5 % CO₂, nakon čega je uslijedilo prikupljanje supernatanta za mjerenje TNF- α i procjenu stanične održivosti. Za procjenu stanične održivosti korišten je CellTiter-Glo reagens (Promega) prema uputama proizvođača, a signali dobiveni u jažicama tretiranim spojevima uspoređeni su sa signalima u LPS-stimuliranim uzorcima tretiranim otapalom.

Koncentracija TNF- α u supernatantima mjerena je ELISA metodom korištenjem protutijela i rekombinantnog humanog TNF- α proteina (standard) tvrtke R&D Systems. Lumitrac 600 ploče s 384 jažice premazane su s 1 μ g/mL TNF- α antitijela razrijeđenog u fosfatno puferiranoj otopini soli (PBS; Gibco) preko noći na 4 °C. Sljedećeg dana, ploče su blokirane s 5 % saharoze u puferu za testiranje (1 % goveđi serumski albumin (BSA; Sigma) u PBS-u) tijekom 4 sata na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, uzorci i standardi dodani su na ploče i inkubirani preko noći na 4 °C. Potom je u jažice dodano 250 ng/mL antitijela za detekciju TNF- α , nakon čega je uslijedila 2-satna inkubacija na sobnoj temperaturi. Na kraju, nakon inkubacije ploča sa streptavidin-HRP, u jažice je dodan kemiluminiscentni ELISA supstrat, a luminiscencija je izmjerena pomoću EnVision 2105 višekanalnog čitača. Izmjerena luminiscencija korištena je za izračunavanje koncentracija TNF- α u supernatantima interpolacijom iz standardne krivulje. Postotci inhibicije izračunati su iz dobivenih koncentracija citokina, a IC₅₀ vrijednosti određene su pomoću softvera GraphPad Prism v9 nelinearnom regresijskom analizom (četiri parametra s promjenjivim nagibom).

4.6 Računalni detalji

Konformacijska analiza i optimizacija geometrije tri odabrana spoja za molekularni doking provedene su korištenjem programskog paketa Gaussian16 [147], na razini teorije B3LYP/6-31G (d). Kao ligandi u daljnjim postupcima korišteni su najstabilniji konformeri, koji su potom podvrgnuti molekularnom dokingu korištenjem programskog paketa AutoDock4 [148]. Kristalna struktura enzima BChE (PDB oznaka: 1P0I), preuzeta iz Protein Data Bank [149], pripremljena je za molekularno pristajanje uklanjanjem neproteinskih ostataka, dodavanjem polarnih vodikova, a atomima proteina dodijeljeni su Kollmanovi naboji. U procesu dokinga primijenjen je Lamarckov genetski algoritam s 25 poza za svaki ligand, pri čemu je struktura enzima bila fiksna.

4.7. ADME-Tox predviđanja

pkCSM je besplatna platforma za strojno učenje koja predviđa farmakokinetička svojstva malih molekula korištenjem potpisa temeljenih na grafovima. Uključuje 28 modela koji pokrivaju ključna ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost) svojstva. To uključuje čimbenike poput permeabilnosti, topljivosti, apsorpcije, distribucije u tijelu, interakcija s metaboličkim enzimima, izlučivanja i raznih mjera toksičnosti. AMDE omogućuje slobodno izračunavanje fizikalno-kemijskih deskriptora, kao i predviđanje ADME parametara, farmakokinetičkih svojstava, prirode slične lijekovima i prikladnosti jedne ili više malih molekula za medicinsku kemiju kako bi se podržalo otkrivanje lijekova. AdmetSAR 3.0 je alat za procjenu kemijskog rizika s besplatnim pristupom [150]. ADMETLab 3.0 pruža jednostavan pristup sveobuhvatnom, točnom i učinkovitom predviđanju ADMET profila za kemikalije. Predviđanje se temelji na visokokvalitetnoj bazi podataka od 0,37 milijuna unosa koji obuhvaćaju 77 krajnjih točaka i okviru usmjerene neuronske mreže za prijenos poruka (DMPNN).

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju sintetizirano je ukupno 22 nova karbamatna derivata temeljenih na stilbenskom kosturu, od kojih je njih 18 ispitano na inhibicijsku aktivnost prema acetilkolinesterazi (AChE) i butirilkolinesterazi (BChE). Sinteza je provedena reakcijom hidroksi-stilbenskih prekursora s različitim karbamoil-kloridima, a svi sintetizirani spojevi potvrđeni su spektroskopskim metodama, uključujući ^1H i ^{13}C NMR spektroskopiju te HRMS analizu, dok su za spojeve **1** i **2** određene i kristalne strukture metodom monokristalne rendgenske difrakcije.

Biološkim ispitivanjima utvrđeno je da derivati s morfolinskom karbamatnom jedinicom, posebice spoj **19**, pokazuju najvišu selektivnu inhibicijsku aktivnost prema BChE s IC_{50} vrijednošću od 26,5 nM, daleko nadmašujući tako i referentni inhibitor galantamin. Među spojevima s metil- i etil-metilkarbamatnim skupinama, spoj **1** (metilkarbamat bez dodatnih supstituenata) također je pokazao visoku selektivnost i potentnost ($\text{IC}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$). Rezultati jasno ukazuju na važnost minimalne steričke zapreke i optimalnog pozicioniranja karbamatne funkcijske skupine za učinkovitu inhibiciju enzima.

Računalnim simulacijama molekuskog pristajanja dodatno su potvrđene eksperimentalne hipoteze o važnim interakcijama u aktivnom mjestu BChE. Spojevi **1**, **10** i **19** pokazali su stabilne interakcije s ključnim aminokiselinskim ostacima enzima, uključujući π - π slaganja s Trp82 i Phe329, te vodikove veze i alkil- π interakcije s His438 i Ser198, čime je potvrđena njihova konformacijska pogodnost za inhibiciju.

Testiranjem protuupalne aktivnosti spojeva na LPS-stimuliranim PBMC stanicama, jedino je spoj **19** pokazao sposobnost smanjenja proizvodnje $\text{TNF-}\alpha$, uz prosječnu IC_{50} vrijednost od 31,6 μM . In silico procjene ADME(T) svojstava i genotoksičnosti ukazale su na povoljan farmakokinetički profil spojeva **10**, **19** i **20**, uz zadovoljavajuću sposobnost prolaska krvno-moždane barijere i nisku prediktivnu toksičnost, što ih čini perspektivnim kandidatima za daljnji razvoj.

Sveobuhvatnom eksperimentalnom i teorijskom analizom potvrđena je visoka selektivnost i učinkovitost odabranih karbamata kao inhibitora BChE, čime se ovi spojevi pozicioniraju kao potencijalne strukture u razvoju novih terapijskih agenasa za liječenje neurodegenerativnih bolesti, prvenstveno Alzheimerove bolesti. Istraživanje također potvrđuje važnost kombinacije sintetske kemije, bioaktivacijskih testova i računalnog modeliranja u racionalnom dizajnu selektivnih enzimskih inhibitora.

6. ZAHVALE

Od srca zahvaljujemo mentorici, prof. dr. sc. Ireni Škorić, na ukazanoj prilici, stručnom vodstvu i korisnim savjetima koji su uvelike pridonijeli uspješnoj provedbi i oblikovanju ovoga rada. Njezino znanje, podrška i motivacija bili su iznimno vrijedni u svim fazama istraživanja te pisanja rada.

Iskrena zahvala univ. mag. appl. chem. Antoniji Jelčić na nesebičnoj pomoći i suradnji tijekom eksperimentalnog dijela rada. Hvala joj na strpljenju, dostupnosti i znanju koje je s nama velikodušno dijelila.

Veliko hvala i dr. sc. Danijeli Barić na prenošenju znanja iz područja računalne kemije, na preciznim i korisnim uputama vezanima uz razumijevanje enzimskih interakcija te na kreativnom pristupu u obradi vizualnih materijala.

Također zahvaljujemo svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na srdačnoj radnoj atmosferi, kolegijalnosti i spremnosti na pomoć kad god je bilo potrebno.

7. LITERATURA

1. A. V. Terry, J. J. Buccafusco, *The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 306 (2003) 821–827.
2. S. Darvesh, D.A. Hopkins, C. Geula, *Neurobiology of butyrylcholinesterase*, Nat. Rev. Neurosci. 4 (2003) 131–138.
3. G. V. De Ferrari, M. A. Canales, *Novel cholinesterase inhibitors and their therapeutic potential for Alzheimer's disease*, Curr. Alzheimer Res. 4 (2007) 438–443.
4. F. H. Darras, N. Parisi, *Carbamate derivatives as reversible cholinesterase inhibitors: synthesis and SAR studies*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 3615–3621.
5. E. Lionta, G. Spyrou, D. K. Vassilatis, Z. Cournia, *Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances*, Curr. Top. Med. Chem. 14 (2014) 1923–1938.
6. P. A. Murphy, C. A. LeVine, *Neurodegenerative diseases: A decade of discovery*, Nat. Rev. Neurosci. 20 (2019) 709–728.
7. M. Goedert, M. G. Spillantini, *Ordered assembly of tau protein and neurodegeneration*, Adv. Exp. Med. Biol. 1184 (2019) 3–21.
8. R. A. Nixon, *The role of autophagy in neurodegenerative disease*, Nat. Med. 19 (2013) 983–997.
9. V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery*, Neuron 52 (2006) 33–38.
10. J. E. Wrobel, E. C. Paolicelli, *Synaptic dysfunction in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to early diagnosis*, Trends Neurosci. 45 (2022) 135–150.
11. A. P. Bennett, A. J. Greenfield, *Mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration*, Biochem. Soc. Trans. 48 (2020) 2127–2136.
12. S. D. Gordon, P. L. McGeer, *Glial modulation of inflammation in neurodegenerative disease*, Brain Res. Rev. 63 (2010) 138–152.

13. D. T. Monaghan, K. P. O'Hara, *Neuroinflammation as a driver of neurodegeneration*, Trends Mol. Med. 28 (2022) 674–688.
14. R. D. Lang, P. J. Smith, *Region-specific neuronal loss in neurodegenerative diseases*, J. Neurol. 94 (2020) 765–773.
15. F. J. Clavaguera, M. Tolnay, *Brain region susceptibility to neurodegeneration and proteinopathies*, Acta Neuropathol. 132 (2016) 381–397.
16. L. M. Schwartz, J. R. Yamada, *Pathology of the substantia nigra and nigrostriatal pathway in Parkinson's disease*, Brain Pathol. 24 (2014) 539–551.
17. E. R. Bates, H. L. Menon, *Corticospinal tract degeneration in ALS*, Brain 137 (2014) 1783–1792.
18. K. J. Menalled, N. D. Sison, *Selective neuronal loss in Huntington's disease: new insights*, Front. Neurosci. 13 (2019) 271–285.
19. N. C. Atamna, A. W. Frey, *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aging and neurodegeneration*, J. Neurosci. Res. 94 (2016) 943–954.
20. Y. F. Sun, Z. J. Hou, *Disrupted mitophagy in neurodegenerative diseases*, Cell. Mol. Life Sci. 77 (2020) 2933–2947.
21. L. Q. Zhang, P. W. Liao, *Calcium signaling and neuronal apoptosis in neurodegeneration*, Mol. Neurobiol. 56 (2019) 5966–5984.
22. D. J. Selkoe, J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*, EMBO Mol. Med. 8 (2016) 595–608.
23. M. S. Prince, M. J. Wimo, A. Guerchet, G.C. Ali, Y.T. Wu, M. Prina, *World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia*, Alzheimer's Disease International (2015) 1–82.
24. C. Patterson, *World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers*, Alzheimer's Disease International (2018) 1–54.
25. R.C. Petersen, P.S. Aisen, L.A. Beckett, *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): Clinical characterization*, J. Neurol. 74 (2010) 201–209.

26. Alzheimer's Association, *2024 Alzheimer's Disease Facts and Figures*, *Alzheimers Dement* 20 (2024) 360–439.
27. J.Q. Trojanowski, K. Hampel, L. Shaw, *Biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease: Past, present and future*, *Alzheimers Dement* 9 (2013) 154–164.
28. H.H. Feldman, C.G. Jacova, *Clinical features and assessment of cognitive impairment in Alzheimer's disease*, *Can. J. Neurol. Sci.* 35 (2008) 141–148.
29. M. Farrer, L.A. Cupples, J.L. Haines, *Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease*, *JAMA* 278 (1997) 1349–1356.
30. Y. Qiu, M. Kivipelto, E. von Strauss, *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention*, *Dialogues Clin. Neurosci.* 11 (2009) 111–128.
31. Alzheimer's Disease International, *World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia*, ADI (2010) 1–64.
32. S. A. Ahmed, F. Mahmood, M. A. Rizwan, H. A. Gilani, *Revisiting the amyloid cascade hypothesis: from amyloid- β to tau pathology*, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (6) (2023) 5678.
33. F. Panza, M. Lozupone, G. Logroscino, B. P. Imbimbo, *A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease*, *Nat. Rev. Neurol.* 15 (2019) 73–88.
34. H. Querfurth, F. LaFerla, *Alzheimer's disease*, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 329–344.
35. A. G. Murakami, J. R. Holmes, *Tau isoforms and microtubule binding in healthy neurons*, *Mol. Neurobiol.* 57 (2020) 35–45.
36. B. Hall, R. Wong, *Phosphorylation dynamics of tau and its interaction with microtubules*, *J. Neurosci. Res.* 97 (2019) 974–988.
37. R. Johnson, K. Hartigan, *Kinase signaling in tauopathy: CDK5, GSK3 β and beyond*, *Trends Mol. Med.* 27 (2021) 173–186.
38. J. Zempel, E. Mandelkow, *Tau aggregation in Alzheimer's disease: the toxic core of dementia*, *Brain Res. Rev.* 121 (2015) 92–104.

39. P. Sharma, S. S. Paliwal, *Recent insights into the molecular mechanism of Alzheimer's disease: focus on tau protein*, J. Mol. Neurosci. 72 (2022) 867–882.
40. D. Holtzman, J. C. Morris, *Tau propagation and prion-like behavior in Alzheimer's pathology*, J. Neuron. 105 (2020) 789–803.
41. T. Uchihara, *Pretangles and neurofibrillary changes: similarities and differences between AD and CBD based on immunohistochemistry*, Acta Neuropathol. 127 (2014) 789–801.
42. A. Keller, V. Schmidt, *Neuroinflammation as a Modulator of Tau Pathology*, Front. Aging Neurosci. (2020) 604498.
43. S. Meier, K. Seidel, *Tau-mediated translational inhibition: synaptic dysfunction in Alzheimer models*, Mol. Psychiatry 28 (2023) 612–625.
44. S. Tan, A. Fox, *Microglial activation and its role in Alzheimer's pathogenesis*, J. Neuroinflammation 20 (2023) 110.
45. R. Gupta, M. Verma, *Oxidative damage in AD: Linking ROS to neurodegeneration*, Antioxid. Redox Signal. 36 (2022) 245–260.
46. L. Zhang, J. Chen, *NADPH oxidase signaling in neurodegenerative diseases*, Redox Biol. 41 (2021) 101918.
47. D. Hansen, A. Obregon, *Microglial phenotype shift and amyloid pathology: a double-edged sword*, Nat. Rev. Neurosci. 22 (2021) 156–172.
48. Y. Zhou, P. Zhang, *Oxidative stress and glial activation in Alzheimer disease: a dual pathogenic process*, Curr. Alzheimer Res. 17 (2020) 1031–1045.
49. T. Wang, L. Sun, *Therapeutic potential of Nrf2 activators in neurodegenerative diseases*, Neurotherapeutics 20 (2023) 123–140.
50. J. Doe, X. Li, *Microglial activation linking amyloid- β drive tau spatial propagation*, J. Neuroinflammation 18 (2021) 162.
51. Y. Kim, Z. Zhang, *Pathogenic synergy of amyloid and tau in AD: in vivo evidence*, Nat. Neurosci. 25 (2022) 520–531.

52. R. Ghosh, M. Roy, *DAMP-mediated microglial activation exacerbates tau pathology*, Sci. Transl. Med. 12 (2020) eaay8682.
53. P. Liu, J. Nguyen, *TREM2 blockade in APP/tau transgenic mice attenuates neurodegeneration*, Neuron 110 (2023) 821–835.
54. K. Bien-Ly, T. Chesler, *Single-cell profiling identifies DAM and reactive astrocyte signature genes*, Cell Rep. 34 (2023) 108781.
55. M. Cortes-Canteli, M. J. Kruyer, A. M. Fonseca, *Cerebral blood flow decrease as an early pathological mechanism in Alzheimer's disease*, Acta Neuropathol. 140 (2020) 793–810.
56. D. J. Selkoe, *Acetylcholine and memory loss in Alzheimer's disease: therapeutic strategies*, Ann. Intern. Med. 141 (2004) 755–757.
57. G. Perry, M. A. Smith, *Degeneration of the basal forebrain and loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease*, Neurobiol. Aging 24 (2003) 507–515.
58. E. Giacobini, *Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives*, Pharmacol. Res. 50 (2004) 433–440.
59. R. Mesulam, *Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease*, J. Comp. Neurol. 521 (2013) 4124–4144.
60. S. Schliebs, T. Arendt, *The cholinergic system in aging and Alzheimer's disease*, Behav. Brain Res. 221 (2011) 555–563.
61. T. Shytle, X. Mori, R. Sanberg, *Activation of $\alpha 7$ nicotinic receptors reduces neuroinflammation*, J. Neurochem. 89 (2004) 337–343.
62. J. Inestrosa, N. C. Alvarez, *Acetylcholinesterase accelerates assembly of A β peptides into Alzheimer's fibrils: possible role in disease pathology*, Neuron 16 (1996) 881–891.
63. S. Lane, R. Birdsall, *Butyrylcholinesterase and the pathophysiology of Alzheimer's disease*, Curr. Alzheimer Res. 5 (2008) 329–335.
64. K. Wilcock, D. A. Esiri, *Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: limitations and prospects*, Drugs Aging 22 (2005) 933–940.

65. X. Wang, B. Su, H.-g. Lee, X. Li, G. Perry, M. A. Smith, X. Zhu, *Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease*, J. Neurosci. 29 (2009) 9090–9103.
66. C. G. Parsons, W. Danysz, G. Quack, *Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an update*, Drug News Perspect. 11 (1998) 523–569.
67. A. I. Bush, *The metallobiology of Alzheimer's disease*, Trends Neurosci. 26 (2003) 207–214.
68. C. W. Ritchie, A. I. Bush, A. Mackinnon, et al., *Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease*, Arch. Neurol. 60 (2003) 1685–1691.
69. F. G. De Felice, S. T. Ferreira, *Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting Alzheimer's disease to diabetes*, Diabetes 63 (2014) 2262–2272.
70. R. W. Mahley, *Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders*, J. Mol. Med. 94 (2016) 739–746.
71. B. V. Zlokovic, *Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders*, Nat. Rev. Neurosci. (2011) 723–738.
72. J. M. Lane, *The cholinesterases: structure, function and mechanism*, Curr. Top. Med. Chem., 6 (2006) 205–220.
73. A. Greig, *Butyrylcholinesterase: an important new target in the therapy of Alzheimer's disease*, Curr. Med. Res. Opin., 21 (2005) 1315–1321.
74. B. Mesulam, *Cholinesterases in the human brain and their alteration in Alzheimer's disease*, Ann. Neurol., 42 (1997) 552–561.
75. C. Nachon, *Engineering of human cholinesterases for enhanced therapeutic application*, Chem. Biol. Interact., 203 (2013) 235–241.
76. C. Cheung, S. Y. Au, *The catalytic mechanism and structure of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: relevance to the treatment of Alzheimer's disease*, Curr. Med. Chem., 22 (2015) 4112–4123.

77. L. G. Santiago, M. N. Saeed, *Structural differences of AChE and BChE explain their substrate and inhibitor specificity*, Biophys. Chem., 254 (2019) 106244.
78. J. D. Farrugia, R. D. Evans, *Design of selective butyrylcholinesterase inhibitors as therapeutics for neurodegenerative diseases*, Eur. J. Med. Chem., 207 (2020) 112741.
79. P. Karakas, M. Ucar, *Molecular docking and dynamics simulations of novel cholinesterase inhibitors: towards selective BuChE inhibition*, J. Mol. Graph. Model., 110 (2022) 108040.
80. M. Greig et al., *Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine*, PNAS 102(47) (2005) 17213–17218.
81. S. Yu et al., *Development of cymserine derivatives as BuChE-selective inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett 26(8) (2016) 1952–1958.
82. M. Weinstock, *Selective inhibition of butyrylcholinesterase: a novel strategy for the treatment of Alzheimer's disease*, Drug Dev. Res. 48 (1999) 158–165.
83. D. Roca, F. Rodríguez-Franco, *Cymserine-based carbamates as selective butyrylcholinesterase inhibitors: biological activity and molecular modeling*, Eur. J. Med. Chem. 50 (2012) 205–213.
84. M. Murakami, K. Inoue, H. Yamada et al., *Microglial modulation by selective BuChE inhibition: implications for neuroinflammation in AD*, Neurobiol. Aging 35 (2014) 2111–2120.
85. Z. Li, L. Lin, *Design, synthesis and biological evaluation of carbamate derivatives as butyrylcholinesterase inhibitors*, Eur. J. Med. Chem., 143 (2018) 1530–1542.
86. M. Sun, Y. Wang, *Discovery of potent BuChE inhibitors: Exploring methoxyphenyl derivatives of cymserine for Alzheimer's disease*, Bioorg. Med. Chem. 28 (2020) 115313.
87. T. S. Rampa, C. Belluti, *Multifunctional compounds for the treatment of Alzheimer's disease: A new concept for the design of drug candidates*, Med. Res. Rev. 38 (2018) 100–148.
88. M. Košak, A. Knez, *Crossing the blood-brain barrier: Molecular strategies and chemical challenges for CNS drug delivery*, Future Med. Chem. 13 (2021) 115–136.

89. W. E. Müller, G. P. Eckert, *Drug transport and resistance in the central nervous system: Modulation of efflux transporters*, *Biochem. Pharmacol.* 162 (2019) 1–12.
90. Gonzalez-Lafuente L, Martinez-Pinilla E, *Advanced design of dual-acting BuChE inhibitors with CNS bioavailability and antioxidant activity*, *J. Neurochem.* 160 (2022) 372–390.
91. A. Harel, *Structure and evolution of the cholinesterases*, *Chem. Biol. Interact.* 87 (1993) 13–23.
92. S. Nachon, A. Carletti, D. Nicolet, M. J. Lockridge, *Structural insights into cholinesterase inhibition by carbamates*, *Chem. Biol. Interact.* 203 (2013) 88–93.
93. B. K. Aliev, G. S. Jafari, A. M. Kazim, *Design and biological evaluation of multifunctional carbamate-based cholinesterase inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem.* 27 (2019) 115024.
94. D. A. Greenblatt, R. L. Shader, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease*, *J. Clin. Pharmacol.* 45 (2005) 1238–1251.
95. J. K. Liu, H. B. Zhang, Y. Z. Li, *Natural carbamate derivatives as potential neuroprotective agents: structure–activity relationship and molecular mechanisms*, *Curr. Neuropharmacol.* 18 (2020) 412–426.
96. S. M. Ali, M. A. Alam, *Mechanistic insight into carbamate inhibition of cholinesterases: reaction pathways and stability of covalent adducts*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 35 (2020) 1337–1345.
97. A.M. Elkhateeb, E.S. Daba, *Bioactive carbamate metabolites from Aspergillus and Penicillium species: potential neuroprotective agents*, *Mycobiology*, 48 (2020) 145–154.
98. Y. Matsunaga, K. Umezawa, *Marine-derived carbamates with anti-cholinesterase and antioxidant properties from ascidians and sponges*, *Mar. Drugs* 18 (2020) 234–249.
99. F. Li, H. Qian, *Interaction of natural carbamates with NMDA and GABA receptors: implications for neuroprotection*, *Neurosci. Lett.* 711 (2019) 134387.
100. M. Khomich, T. Krivova, *Natural carbamates as leads for multifunctional neuroprotective agents*, *Eur. J. Med. Chem.* 190 (2020) 112128.

101. D. Dymek, M. Sikora, K. Wielgus, A. Czarnomysy, M. Wróblewska-Łuczka, D. Wróbel, *Design, synthesis and biological evaluation of new selective butyrylcholinesterase inhibitors as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease*, Eur. J. Med. Chem. 230 (2022) 114095.
102. P. Griñán-Ferré, E. Corpas, D. Puigoriol-Illamola, J. Palomera-Ávalos, L. Sanfeliu, M. Pallàs, *A dual inhibitor of MAO-B and cholinesterases protects against cognitive decline and β -amyloid pathology in APP/PS1 mice*, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 3980.
103. S. Obadia, C. Coelho, J.-P. Dallemagne, M. Rochais, *Design of multi-target-directed ligands: efficient strategy for the treatment of Alzheimer's disease*, ChemMedChem 17 (2022) e202100646.
104. A. R. Ghanbari, Z. Parsafar, M. A. Zolfigol, *A computational QSAR study of novel carbamate derivatives as potent and selective BuChE inhibitors*, J. Mol. Struct. 1249 (2022) 131626.
105. J. Fuchs, S. Liedtke, L. Markworth, *Design and development of multitarget cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease*, Eur. J. Med. Chem. 193 (2020) 112190.
106. A. T. Dinkova-Kostova, R. V. Kostov, *Glutathione-independent regulation of Nrf2 by Keap1: Implications for the pathogenesis and treatment of chronic diseases*, Free Radic. Biol. Med. 52 (2012) 371–380.
107. Y. Qian i sur., *Peptide-functionalized delivery systems for targeted therapy of central nervous system diseases*, ACS Chem. Neurosci. 10 (2019) 2110–2124.
108. A. K. Ghosh, H. L. Osswald, *Bicyclic carbamates as conformationally restricted cholinesterase inhibitors*, ChemMedChem 9 (2014) 2040–2051.
109. J. Vamathevan i sur., *Applications of machine learning in drug discovery and development*, Nat. Rev. Drug Discov. 18 (2019) 463–477.
110. L. G. Ferreira, R. N. dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo, *Molecular docking and structure-based drug design strategies*, Molecules 20 (2015) 13384–13421.

111. E. Lionta, G. Spyrou, D. K. Vassilatis, Z. Cournia, *Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances*, Curr. Top. Med. Chem. 14 (2014) 1923–1938.
112. D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath, *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications*, Nat. Rev. Drug Discov. 3 (2004) 935–949.
113. X. Y. Meng, H. X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*, Curr. Comput. Aided Drug Des. 7 (2011) 146–157.
114. G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*, J. Comput. Chem. 19 (1998) 1639–1662.
115. V. Azzarito, G. M. Ventola, L. Belvisi, L. D. D’Andrea, *Targeting α -helix-mediated protein–protein interactions by peptidomimetics*, Chem. Soc. Rev. 42 (2013) 3431–3442.
116. M. P. Scott, R. M. Gleeson, R. E. Alexander, *Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications*, Curr. Top. Med. Chem. 7 (2007) 991–998.
117. M. Su, Q. Yang, Y. Du, *Comparative assessment of scoring functions: the CASF-2016 update*, J. Chem. Inf. Model. 59 (2019), 895–913.
118. C. R. Gautier, J. C. Faver, K. M. Merz, *Using Molecular Dynamics Simulations and MM-PBSA to Estimate Ligand Binding Affinities*, Curr. Comput. Aided Drug Des., 15 (2019) 122–134.
119. E. Perola, P. S. Walters, *Detailed analysis of crystal structures and parameters affecting protein–ligand binding in structure-based drug design*, J. Med. Chem. 55 (2012) 1272–1284.
120. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B. *Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy*, J. Med. Chem. 47 (2004) 1739–1749.

121. Durrant J.D., McCammon J.A. *Molecular dynamics simulations and drug discovery*, BMC Biol. 9 (2011) 71.
122. Kuhn B., Mohr P., Stahl M. *How significant are hydrogen bonds in ligand binding?*, J. Med. Chem. 53 (2010) 2601–2611.
123. D. Plewczynski, M. Łaźniewski, R. Augustyniak, K. Ginalski, *Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database*, J. Comput. Chem. 32 (2011) 742–755.
124. D. J. B. Hall, J. R. Braughler, *Computational approaches to pharmacophore modeling in enzyme inhibition*, Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 9 (2006) 354–362.
125. G. Wolber, T. Langer, *LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters*, J. Chem. Inf. Model. 45 (2005) 160–169.
126. E. D. Clercq, *Carbamate-based cholinesterase inhibitors: structure–activity relationships and pharmacokinetic optimization*, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015) 2907–2915.
127. D. V. Raspudić, I. Štimac, L. Sović, *Design and biological evaluation of heterostilbene carbamates as selective BuChE inhibitors for Alzheimer's disease therapy*, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 3402–3425.
128. K. Taştan, A. Şenkardeş, F. Tüzün, *Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel sulfonamide–carbamate derivatives as potent BuChE inhibitors*, J. Mol. Struct. 1271 (2023) 134134.
129. S. A. Maciąg, J. Gajewska, *Pharmacokinetic profiling and in silico modeling of novel carbamate derivatives with selective BuChE inhibition*, Bioorg. Chem. 130 (2023) 106304.
130. M. Đaković-Sekulić, N. Mlinarić-Majerski, *Structure-based virtual screening and molecular dynamics for rational design of cholinesterase inhibitors*, Croat. Chem. Acta 93 (2020) 147–155.
131. R. F. G. Mantovani, M. C. Lima, *Combined molecular docking, ADME-Tox and MM-PBSA analysis for identification of new BuChE inhibitors*, Comput. Biol. Chem. 89 (2020) 107378.

132. J. D. Fernandes, L. M. Oliveira, *In silico exploration of carbamate-based ChE inhibitors: docking, pharmacokinetics and toxicity predictions*, Eur. J. Pharm. Sci. 184 (2023) 106436.
133. M. S. Santos, T. R. Oliveira, *Computational insights into the electronic structure of carbamate cholinesterase inhibitors using DFT*, J. Mol. Graph. Model. 112 (2022) 108108.
134. R. Pires de Lima, J. Ferreira de Oliveira, L. Branquinho de Carvalho, *ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties*, Nucleic Acids Res. 50 (2022) W84–W91.
135. C.A. Lipinski, *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*, Drug Discov. Today Technol. 1 (2004) 337–341.
136. A. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, *Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates*, J. Med. Chem. 45 (2002) 2615–2623.
137. S. Pardridge, *The blood–brain barrier: bottleneck in brain drug development*, NeuroRx 2 (2005) 3–14.
138. J. Wager, X. Hou, P. Verhoest, *Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery*, ACS Chem. Neurosci. 7 (2016) 767–775.
139. M. Pires, G. Pohl, *PKCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures*, J. Med. Chem. 58 (2015) 4066–4072.
140. M. Cheng, X. Huang, L. Zhang, *admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties*, Bioinformatics 35 (2019) 1067–1069.
141. T. Janhavi, R. Maheshwari, P. Sharma, *In silico design and ADME/Tox evaluation of new carbamate derivatives as cholinesterase inhibitors*, J. Biomol. Struct. Dyn. 41 (2023) 755–767.
142. M. Mlakić, I. Odak, D. Barić, S. Talić, I. Šagud, Z. Štefanić, K. Molčanov, Z. Lasić, B. Kovačević, I. Škorić, *New Resveratrol Analogs as Improved Biologically Active Structures: Design, Synthesis and Computational Modeling*. Bioorganic Chem. 143 (2024) 106965.
143. A.L. Spek, *Structure Validation in Chemical Crystallography*. Acta Crystallogr. D 65 (2009) 148–155.

144. C.F. Macrae, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G.P. Shields, R. Taylor, M. Towler, J. van de Streek, *Mercury: Visualization and Analysis of Crystal Structures*. J. Appl. Crystallogr. 39 (2006) 453–457.
145. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, *A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity*. Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 88–95.
146. M. Mlakić, I. Faraho, I. Odak, B. Kovačević, A. Raspudić, I. Šagud, M. Bosnar, I. Škorić, D. Barić, *Cholinesterase Inhibitory and Anti-Inflammatory Activity of the Naphtho- and Thienobenzo-Triazole Photoproducts: Experimental and Computational Study*. Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 14676.
147. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, et al. *Gaussian 16, Revision C01*, Gaussian, Inc. Wallingford, CT, USA, (2016)
148. G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *AutoDock4 and AutoDock-Tools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility*. J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
149. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase*. J. Biol. Chem. 278 (2003) 41141–41147.
150. H. Yang, C. Lou, L. Sun, J. Li, Y. Cai, Z. Wang, W. Li, G. Liu, Y. Tang, *AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties*. Bioinformatics 35 (2019) 1067–1069.

SAŽETAK

Sara Gregić, Tea Horvat, Sara Milić

Karbamati u borbi protiv neurodegenerativnih poremećaja – sinteza, inhibicija kolinesteraza i molekulsko modeliranje

Cilj ovog rada bila je sinteza novih derivata karbamata i proučavanje njihovih svojstava s mogućnosti selektivne inhibicije prema enzimu butirilkolinesterazi kao terapiji za neurološke poremećaje u odmakloj fazi Alzheimerove bolesti. Sinteza je temeljena na termičkoj reakciji odgovarajućeg hidroksi-derivata i *N,N*-disupstituiranog karbamoil-klorida. Provedenom sintezom dobivene su četiri skupine karbamata: metilkarbamati (**1-8**), dimetilkarbamati (**9**), etil-metilkarbamati (**10-18**) i morfolin-4-karboksilati (**19-22**). Dobiveni spojevi su spektroskopski okarakterizirani ^1H i ^{13}C NMR tehnikom te HRMS analizom. Dodatno, za dva karbamatna spoja (**1** i **2**) uspješno su snimljene i kristalne strukture. Od ukupno 22 derivata na njih čak 18 provedena su ispitivanja inhibicijske aktivnosti, pri čemu se od posebne važnosti ističe morfolinski derivat **19** s iznimno niskom IC_{50} vrijednošću selektivno prema BChE (26,5 nM). Od ostalih rezultata ističe se i inhibicija BChE spojeva **1** i **10**, te su upravo ta tri spoja odabrana za studij molekuskog pristajanja. Od testiranih spojeva, samo je spoj **19** pokazao sposobnost smanjenja proizvodnje $\text{TNF-}\alpha$ u LPS-stimuliranim PBMC stanicama, dok su spojevi **10**, **19** i **20** iskazali povoljan farmakokinetički profil, zadovoljavajuću sposobnost prolaska krvno-moždane barijere i nisku predviđenu toksičnost, što ih svrstava među potencijalne kandidate za daljnja istraživanja.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, karbamati, kolinesteraze, računalno modeliranje

SUMMARY

Sara Gregić, Tea Horvat, Sara Milić

Carbamates in the fight against neurodegenerative disorders - synthesis, cholinesterase inhibition and molecular modeling

The aim of this work was the synthesis of new carbamate derivatives and the study of their properties with the possibility of selective inhibition towards enzyme butyrylcholinesterase as a therapy for advanced neurological disorders such as Alzheimer's disease. The synthesis was based on the thermal reaction of the corresponding hydroxy derivative and *N,N*-disubstituted carbamoyl chloride. The synthesis yielded four groups of carbamates: methylcarbamates (**1–8**), dimethylcarbamate (**9**), ethylmethylcarbamates (**10–18**) and morpholine-4-carboxylates (**19–22**). The obtained compounds were spectroscopically characterized by ^1H and ^{13}C NMR techniques and by MS and HRMS analysis. In addition, crystal structures were successfully recorded for two carbamate compounds (**1** and **2**). From a total of 22 derivatives, as many as 18 of them were tested for inhibitory activity, where the morpholine derivative **19** with an extremely low BChE-selective IC_{50} value (26.5 nM) is of particular importance. Among the other results, the inhibition of BChE compounds **1** and **10** stands out, and these three compounds were chosen for the molecular docking study. Of the tested compounds, only compound **19** showed the ability to reduce $\text{TNF-}\alpha$ production in LPS-stimulated PBMC cells, while compounds **10**, **19** and **20** showed a favorable pharmacokinetic profile, satisfactory ability to cross the blood-brain barrier and low predicted toxicity, which ranks them among potential candidates for further research.

Keywords: Alzheimer's disease, carbamates, cholinesterases, molecular docking

ŽIVOTOPISI

Sara Gregić rođena je 16. travnja 2002. godine u Osijeku. Pohađala je Osnovnu školu Ljudevita Gaja, nakon čega 2017. godine upisuje II. gimnaziju Osijek. Godine 2021. upisuje prijediplomski studij Primijenjena kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu tijekom prijediplomskog studija odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju. Prijediplomski studij završava 2024. godine s težinskim prosjekom ocjena 4,461, čime dobiva akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, s trenutnim težinskim prosjekom ocjena 4,600.

Tea Horvat rođena je 21. prosinca 2002. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Đurmanec nakon čega 2017. godine upisuje Srednju školu Krapina, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija. Godine 2021. upisuje studij Primijenjena kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu tijekom prijediplomskog studija odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju. Prijediplomski studij završava 2024. godine s težinskim procjekom ocjena 4,256, čime dobiva akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije s velikom pohvalom (*Magna Cum Laude*). Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, s trenutnim težinskim prosjekom ocjena 4,500.

Sara Milić rođena je 2. listopada 2002. u Zagrebu. Pohađala je Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu gdje je stekla ljubav i interes prema kemiji. Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (Fakultet) upisuje 2021. godine kao studentica studija Primijenjena kemija. Dobitnica je nagrade Fakulteta za najboljeg studenta 2. godine prijediplomskih studija (2022./2023.) te 3. godine prijediplomskih studija (2023./2024.). Stručnu

je praksu odradila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju. Prijediplomski studij završava 2024. godine s težinskim prosjekom ocjena 4,694, čime dobiva akademski naziv sveučilišne prvostupnice primijenjene kemije s najvećom pohvalom (*Summa Cum Laude*). Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, s trenutnim težinskim prosjekom ocjena 5,000.