



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikola Maraković

**DEVELOPMENT OF NEW CHIRAL
2-HYDROXYIMINOACETAMIDE REACTIVATORS
OF PHOSPHYLATED CHOLINESTERASES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikola Maraković

**RAZVOJ NOVIH KIRALNIH
2-HIDROKSIIMINOACETAMIDNIH REAKTIVATORA
FOSFILIRANIH KOLINESTERAZA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Goran Šinko, zn. savj.

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikola Maraković

**DEVELOPMENT OF NEW CHIRAL
2-HYDROXYIMINOACETAMIDE REACTIVATORS OF
PHOSPHYLATED CHOLINESTERASES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Goran Šinko

Zagreb, 2017

Hvala mentoru dr. sc. Goranu Šinku na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju, odabiru teme, stručnom vođenju i pomoći tijekom izrade ove disertacije te kritičkom čitanju iste.

Hvala dr. sc. Zrinki Kovarik, voditeljici projekata MZOS-022-0222148-2889 i HrZZ-4307 u sklopu kojih je izvedeno istraživanje prikazano u ovoj disertaciji, na ukazanom povjerenju, stručnim savjetima tijekom izrade ove disertacije te kritičkom čitanju iste.

Hvala dr. sc. Vladimiru Vinkoviću (Institut Ruđer Bošković) na stručnom vođenju i pomoći tijekom izrade dijela ove disertacije vezanog uz pripremu spojeva.

Hvala dr. sc. Anamariji Knežević (Institut Ruđer Bošković) na pomoći u razradi detaljnog plana pripreme spojeva, optimiziranju reakcijskih uvjeta njihove pripreme i metoda za odijeljivanje enantiomera priređenih spojeva te pomoći tijekom pisanja ove disertacije.

Hvala dr. sc. Maji Katalinić na prenesenom znanju i stručnim savjetima oko kinetičkih mjerenja izvedenih tijekom izrade ove disertacije, pomoći tijekom pisanja ove disertacije te kritičkom čitanju iste.

Hvala dr. sc. Florianu Nachonu (Jean-Pierre Ebel Institute of Structural Biology–Grenoble, Francuska) na uzorcima rekombinantne ljudske acetilkolinesteraze i pročišćene ljudske butirilkolinesteraze korištenima tijekom izrade ove disertacije.

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

Hvala svim kolegicama i kolegama Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju na pomoći tijekom izrade ove disertacije i ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala svim kolegicama i kolegama Laboratorija za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu (Institut Ruđer Bošković) na iskazanoj gostoljubivosti i pomoći tijekom izrade ove disertacije.

Za Petru

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
1. UVOD.....	1
1.1. Definicija problema.....	1
1.2. Svrha rada	4
2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Kolinesteraze	6
2.2. Organofosforni spojevi	14
2.3. Reaktivatori kolinesteraza inhibiranih organofosforinim spojevima	19
2.3.1. Klasični piridinijevi oksimski reaktivatori	19
2.3.2. Oksimski reaktivatori nove generacije i novi pristupi u terapiji kod trovanja organofosforinim spojevima	26
2.4. Molekulska modeliranje	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	39
3.1. Opće napomene	39
3.2. Priprava spojeva	40
3.2.3. Priprava N-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamida (2).....	40
3.2.4. Priprava 1-fenilprop-2-en-1-amina (3).....	40
3.2.5. Priprava tert-butil-1-fenilalkilkarbamata (4)	41
3.2.6. Priprava 3-[N-(tert-butoksikarbonil)amino]-3-fenilpropan-1-ola (5)	41
3.2.7. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-N-(tert-butoksikarbonil)amina (6).....	42
3.2.8. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (7).....	42
3.2.9. Priprava etil-gliksalat-oksima (8).....	42
3.2.10. Priprava etil-2-[(metoksietoksietoksi)imino]acetata (9).....	43
3.2.11. Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (I) i N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-(2-metoksietoksietoksiimino)-acetamida (10) korištenjem lipaze B iz <i>Candida antarctica</i>	43
3.2.12. Pretvorba soli II u amid 10	45
3.2.13. Priprava hidroksiiminooctene kiseline (12)	45
3.2.14. Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (I).....	45
3.2.15. Priprava 2-metil-1-(prop-2-iril)-imidazola (13).....	46

3.2.16. Priprava 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehida (14)	47
3.2.17. Priprava 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (15)	47
3.2.18. Priprava N-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (II)	48
3.2.19. Priprava N-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (III)	48
3.2.20. Priprava N-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (IV)	49
3.2.21. Priprava (S)-1-fenilprop-2-en-1-amina ((S)- 3)	50
3.2.22. Odjeljivanje enantiomera i određivanje apsolutne konfiguracije N-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida	50
3.3. Kinetička mjerenja	51
3.3.1. Pufer, supstrat i reagens	51
3.3.2. N-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamidi i živčani bojni otrovi	52
3.3.3. Enzimski preparati	52
3.3.4. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu	52
3.3.5. Reverzibilna inhibicija kolinestara oksimima	53
3.3.6. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima	56
3.3.7. Obrada rezultata	59
3.4. Molekularno modeliranje	59
4. REZULTATI I RASPRAVA	61
4.1. Računalno dizajniranje novih oksimskih reaktivatora	61
4.2. Priprava spojeva	65
4.2.1. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (7)	67
4.2.2. Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (I)	70
4.2.3. Priprava 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (13) i 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (15)	75
4.2.4. Priprava N-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (II)	76
4.2.5. Priprava N-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (III)	77
4.2.6. Priprava N-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (IV)	77
4.2.7. Odvajanje enantiomera i određivanje apsolutne konfiguracije odvojenih enantiomera	78
4.3. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima u racemičnom obliku	82
4.4. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima u enantiomernom obliku	85
4.5. Molekularno modeliranje kompleksa oksima i kolinestara	86
4.5.1. Molekularno modeliranje AChE kompleksa	86
4.5.2. Molekularno modeliranje BChE kompleksa	90
4.6. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima	94

4.6.1. Probir oksimskih reaktivatora fosfiliranih kolinesteraza.....	94
4.6.2. Reaktivacija fosfilirane AChE oksimima	96
4.6.3. Reaktivacija fosfilirane BChE oksimima	100
4.6.4. Molekulsko modeliranje kompleksa ciklosarinom inhibirane BChE i oksima III	106
4.7. Analiza učinkovitosti novih oksima u reverzibilnoj inhibiciji kolinesteraza i reaktivaciji fosfiliranih kolinesteraza	110
5. ZAKLJUČCI.....	113
6. POPIS OZNAKA, KRATICÂ I SIMBOLA.....	115
7. LITERATURNI IZVORI.....	117
8. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZVOJ NOVIH KIRALNIH 2-HIDROKSIIMINOACETAMIDNIH REAKTIVATORA FOSFILIRANIH KOLINESTERAZA

Nikola Maraković

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

Korištenjem računalnih metoda molekuskog modeliranja proučavane su konformacijske promjene u aktivnom mjestu acetilkolinesteraze (AChE; EC 3.1.1.7) nakon vezanja raznih liganada te su definirane strukturne karakteristike učinkovitih oksimskih reaktivatora AChE inhibirane živčanim bojnim otrovima kao i smjernice za njihovu sintezu. Pripravljena su četiri nova kiralna oksima iz skupine *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida polazeći od racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina pripremljenog iz 3-fenilprop-2-en-1-ola. Enantiomeri oksima odijeljeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama. Novi oksimi ispitani su kao inhibitori AChE i butirilkolinesteraze (BChE; EC 3.1.1.8) i kao reaktivatori kolinesteraza inhibiranih tabunom, ciklosarinom, sarinom i VX-om. Svi oksimi reverzibilno inhibiraju oba enzima s konstantom inhibicije (K_I) u mikromolarnom području. Oba enzima pokazuju najveći afinitet prema *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamidu prema kojem BChE pokazuje značajnu selektivnost i stereoselektivnost. Isti oksim jedini se pokazao učinkovitijim od vodećih oksima opisanih u literaturi i to u slučaju BChE inhibirane ciklosarinom. Molekulskim pristajanjem utvrđeno je da na razlike u smještavanju novih oksima u AChE i BChE najviše utječu razlike u aminokiselinama na pozicijama Tyr72, Tyr124, Phe297 i Tyr337 u aktivnom mjestu AChE.

(XX + 132 stranice, 79 slika, 18 tablica, 209 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb i knjižnici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb.

Ključne riječi: kolinesteraze/ oksimi/ živčani bojni otrovi/ molekulsko pristajanje/ reverzibilna inhibicija/ reaktivacija/

Mentor: dr. sc. Goran Šinko, zn. savj.

Rad prihvaćen: 5. travnja 2017.

Ocjenitelji: 1. dr. sc. Ines Primožič, izv. prof.
2. dr. sc. Goran Šinko, zn. savj.
3. dr. sc. Vladimir Vinković, zn. savj.

Zamjena: doc. dr. sc. Gordan Horvat



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NEW CHIRAL 2-HYDROXYIMINOACETAMIDE REACTIVATORS OF PHOSPHYLATED CHOLINESTERASES

Nikola Maraković

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

Using computational methods of molecular modelling conformational changes in the active site of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) upon binding of various ligands were investigated and structural characteristics of efficient oxime reactivators of AChE inhibited with warfare nerve agents and guidelines for their synthesis were defined. Four new chiral oxime reactivators from *N*-substituted 2-hydroxyiminoacetamide group were prepared starting from racemic 1-phenyl-allylamine prepared from 3-phenylprop-2-en-1-ol. Enantiomers of oximes were separated using high performance liquid chromatography on polysaharidic chiral stationary phases. New oximes were tested for inhibition of AChE and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) and reactivation of cholinesterases inhibited with tabun, cyclosarin, sarin and VX. New oximes reversibly inhibit both enzymes with inhibition constant (K_I) in the micromolar range. Both enzymes show greatest affinity toward 2-hydroxyimino-*N*-(3-(4-((2-methylimidazol-1-yl)methyl)-1,2,3-triazol-1-yl)-1-phenylpropyl)acetamide towards which BChE displays significant selectivity and stereoselectivity. Only this oxime showed greater reactivation efficiency than the reference oximes described in literature in the case of BChE inhibited with cyclosarin. Molecular docking studies concluded that differences in binding of new oximes in AChE and BChE largely result from differences in the amino acids at the position of Tyr72, Tyr124, Phe297 and Tyr337 in the AChE active site.

(XX + 132 pages, 79 figures, 18 tables, 209 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia and the Library of the Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia.

Keywords: cholinesterases/ oximes/ warfare nerve agents/ molecular docking/ reversible inhibition/ reactivation/

Supervisor: Dr. Goran Šinko, Scientific Advisor

Thesis accepted: April 5th, 2017

Reviewers: 1. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
2. Dr. Goran Šinko, Scientific Advisor
3. Dr. Vladimir Vinković, Scientific Advisor

Substitute: Dr. Gordan Horvat, Assistant Professor

1. UVOD

4.1. Definicija problema

Organofosforni spojevi (OP), esteri fosforne, fosfonske ili fosfinske kiseline, koji se koriste kao pesticidi u kontroli nametnika u poljoprivrednoj proizvodnji i kao živčani bojni otrovi (ŽBO) (npr. tabun (etil-dimetilfosforoamidocijanidat; GA), sarin (propan-2-il-metilfosfonofloridat; GB), soman (1,2,2-trimetilpropil-metilfosfonofluoridat; GD), VX (etil-({2-[bis(propan-2-il)amino]etil}sulfanil)metil-fosfinat), ciklosarin (*O*-cikloheksil-metilfosfonofluoridat; GF) predstavljaju trajnu opasnost za ljudsko zdravlje, a u ratnim sukobima i terorističkim napadima opasnost po ljudski život.¹ OP spojevi su strukturni analozi prijelaznog stanja hidrolitičke razgradnje acetikolina i akutna toksičnost ovih spojeva posljedica je njihove sposobnosti ireverzibilnog vezanja na katalitički serin acetilkolinesteraze (AChE; EC 3.1.1.7),^{2,3} čime se inhibira enzimska aktivnost hidrolize prijenosnika živčanih impulsa acetikolina (ACh) u kolinergičnoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava. Prostor interakcije supstrata unutar AChE, ali i drugih liganada, određen je s 14 visoko konzerviranih aminokiselina koje se protežu duž 20 Å dubokog i oko 5 Å širokog aktivnog mjesta.⁴ Aktivno se mjesto sastoji od katalitičkog mjesta koje se nalazi pri dnu aktivnog mjesta i perifernog alosteričkog mjesta koje u ljudskoj AChE čine Tyr72, Tyr124 i Trp286 na rubu otvora aktivnog mjesta. Katalitičko se mjesto sastoji od tri domene: katalitičke trijade (Ser203, Glu334, His447,) s oksianionskom šupljinom (Gly121, Gly122, Ala204), kolinskog mjesta (Trp86, Tyr337, Phe338) i acilnog džepa (Phe295, Phe297).⁵ Reverzibilni inhibitori AChE mogu se vezati ili u katalitičko mjesto enzima, poput galantamina,⁶ ili u periferno mjesto enzima, poput propidija.⁷ Neki inhibitori, poput donepezila ili dekametonija, mogu istodobno stvarati interakcije s kolinskim i perifernim mjestom.⁸

Inhibicija AChE uzrokuje nakupljanje ACh u kolinergičnoj sinapsi i poremećaj u prijenosu živčanih impulsa što dovodi do mučnine, salivacije, paralize dišnog sustava i konačno smrti. Medicinska pomoć u slučaju trovanja OP spojevima uključuje antimuskarinski lijek (npr. atropin), antikonvulziv (npr. diazepam) i neki od nukleofilnih reaktivatora fosfilirane AChE koji cijepaju kovalentnu vezu između atoma fosfora i kisika hidroksilne skupine aktivnog serina.^{9,10} Trenutno se kao nukleofilni reaktivatori koriste monokvaterni (2-PAM) i biskvaterni (obidoksim (LüH-6) i HI-6) piridinijevi (bis)oksimi. Dok monokvaterni

oksimi, koji su dizajnirani tako da dijelom strukture oponašaju fiziološki supstrat, stvaraju interakcije s kolinskim mjestom, biskvaterni (bis)oksimi dizajnirani su tako da istodobno stvaraju interakcije s kolinskim i perifernim mjestom čime se povećava afinitet enzima za vezanje oksima.¹¹ Reaktivacijska učinkovitost navedenih oksima je između ostalog uvjetovana i specifičnim steričkim ograničenjima uzrokovanim od strane konjugata AChE-OP, a koja ovise o strukturi OP spoja zbog čega do danas nije pronađen oksim koji bi jednako učinkovito reaktivirao fosfiliranu AChE neovisno o ŽBO. Također, podjednako kod monokvaternih i biskvaternih (bis)oksimi, oksimska skupina nije uvijek optimalno orijentirana i udaljena od fosfiliranog serina što umanjuje njihovu reaktivacijsku učinkovitost.¹² Osim toga, djelovanje kvaternih piridinijevih oksima ograničeno je na periferni živčani sustav budući da zbog pozitivnog naboja otežano prolaze krvno-moždanu barijeru.¹³

U svrhu učinkovite reaktivacije AChE u središnjem živčanom sustavu razvijeno je nekoliko tipova nenabijenih reaktivatora poput diacetilmonoksima (DAM) i monoizonitrozoacetona (MINA),¹⁴ glikoziliranih piridinijevih oksima,¹⁵ 1,2-diketon monooksima,¹⁶ imidazolijevih aldoksima¹⁷ i *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida koji su bez stalnog naboja, ali su istovremeno podložni protoniranju.¹⁸ Acetamidi su biološki aktivni spojevi koji se koriste kao građevne podjedinice u farmaceutskim pripravcima,¹⁹ bioaktivnim polimernim materijalima²⁰ i herbicidima.²¹ Neki od *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida pokazali su se vrlo učinkovitima u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom i VX-om.^{18,22} Pored potrage za učinkovitijim reaktivatorom fosfilirane AChE, u svrhu bolje zaštite od trovanja ŽBO istražuju se i metode predtretmana koje uključuju zaštitu aktivnog mjesta AChE od fosfilirajućeg agensa vezanjem reverzibilnog inhibitora, najčešće alkaloida ili oksima te karbamata koji su također ireverzibilni inhibitori AChE, ali sa brzom dekarbamilacijskom reakcijom.^{23,24}

Također se istražuje i korištenje butirilkolinesteraze (BChE; EC 3.1.1.8) kao stehiometrijskog endogenog čistila koje djeluje uklanjanjem organofosfornih živčanih agensa iz krvotoka i sprječavanjem njihova dolaska do ciljanog tkiva, odnosno organa.²⁵ BChE je enzim srodan i homologan AChE te je dokazano da hidrolizira supstrate istim mehanizmom. Njegov specifični fiziološki supstrat nije pronađen i time prava fiziološka uloga u organizmu do danas nije razjašnjena.²⁶ Pokazano je da predtretman s BChE ili tretman s BChE nakon perkutanog izlaganja ŽBO može zaštititi organizam od smrtonosne doze otrova.²⁷ Također,

postojanje reaktivatora koji bi učinkovito reaktivirali inhibiranu BChE u plazmi omogućilo bi održavanje visoke koncentracije aktivne BChE u krvotoku, a takav bi sustav predstavljao učinkovito oksimom potpomognuto katalitičko čistilo.²⁸ Iako je BChE strukturno vrlo slična AChE, umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje nalazimo unutar aktivnog mjesta AChE, kod BChE njih šest odgovara alifatskim aminokiselinama.²⁹ Ta razlika čini volumen aktivnog mjesta BChE oko 200 Å³ većim u odnosu na aktivno mjesto AChE.⁵ Kolinsko mjesto ljudske BChE čine aminokiselinski ogranci Trp82, Ala328 i Phe329. U acilnom džepu ljudske BChE umjesto aromatskih, nalaze se aminokiselinski ogranci alifatskih aminokiselina Leu286 i Val288. U perifernom mjestu ljudske BChE se na položajima Tyr72, Tyr124 i Trp286 nalaze alifatske aminokiseline Asn68, Gln119 i Ala277. Razlike u aktivnom mjestu dvaju enzima dovode do različitih načina smještanja istih liganada što dovodi i do promjena u afinitetima dvaju enzima. Tako primjerice donepezil selektivno inhibira AChE dok etopropazin selektivno inhibira BChE.^{8,30} Dizajniranje selektivnih inhibitora AChE i BChE olakšava razumijevanje procesa koji upravljaju prepoznavanjem i vezanjem liganda i dovode do različitih načina smještanja istih liganada u aktivnom mjestu dvaju enzima. Razumijevanje ovih procesa može dovesti do razvoja učinkovitijih reaktivatora fosfiliranog enzima dizajniranjem reaktivatora koji u strukturi sadrže one elemente koji omogućavaju ostvarivanje ključnih interakcija koje upravljaju prepoznavanjem i vezanjem liganda u aktivnom mjestu pojedinog enzima.

Zbog asimetričnosti ždrijela aktivnog mjesta oba enzima pokazuju stereoselektivnost u interakciji s kiralnim supstratima i inhibitorima, poput estera derivata kinuklidina³¹ i karbamata,³² ali i s OP spojevima.³³⁻³⁵ Zbog ove karakteristike se prilikom uporabe kiralnih reaktivatora može očekivati da će pojedini enantiomer pokazivati različitu reaktivacijsku učinkovitost posebno s obzirom na kiralnost živčanih bojnih otrova i dokazanu razliku u kinetici enzimske inhibicije ovisno o kiralnosti bojnog otrova.^{33,36-38} Ipak, u dosadašnjim istraživanjima usmjerenim na razvoj učinkovitijih reaktivatora nije posvećena pozornost razvoju kiralnih reaktivatora.

U novije vrijeme uporabom računalne metode molekuskog pristajanja (*engl. molecular docking*) kojom se predviđa vjerojatni položaj i orijentacija oksima u aktivnome mjestu enzima omogućeno je definiranje strukturnih karakteristika potencijalno učinkovitih reaktivatora koje bi postavile smjernice za njihovu sintezu.³⁹

4.2. Svrha rada

Svrha rada je doprinijeti napretku u potrazi za uspješnijom terapijom pri trovanju živčanim bojnim otrovima putem interdisciplinarnih istraživanja koja uključuju računalno dizajniranje novih oksima metodama molekularnog modeliranja, pripravu novih potencijalno učinkovitih nenabijenih oksimskih reaktivatora fosfiliranih kolinesteraza, određivanje kinetičkih parametara koji definiraju reaktivacijski učinak novih oksima te afinitet slobodnog enzima prema oksimima.

Analiziranjem kristalnih struktura kompleksa AChE i raznih liganada pohranjenih u proteinskoj bazi podataka (PDB – *engl.* Protein Data Bank) proučavane su konformacijske promjene u aktivnom mjestu AChE nakon vezanja liganada te je identificirano moguće treće vezno mjesto pored ranije opisanog kolinskog i perifernog veznog mjesta u prostoru kojeg omeđuju ogranci aminokiselina katalitičke trijade (Ser203, His447, Glu334) i oksianionske šupljine (Gly121, Gly122, Ala204). Predviđanjem mogućih interakcija (vodikove veze, $\pi - \pi$ i $\pi -$ kation interakcije) definirane su i strukturne karakteristike novih oksimskih reaktivatora koji bi istodobno trebali stvarati interakcije s kolinskim i perifernim mjestom te usmjeravati nukleofilnu oksimsku skupinu prema prostoru trećeg veznog mjesta koje je u slučaju fosfiliranog enzima okupirano Ser-OP konjugatom. U skladu s postavljenim smjernicama, računalno su dizajnirani novi nenabijeni oksimski reaktivatori iz skupine kiralnih *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida i procijenjen njihov reaktivacijski potencijal metodom molekularnog pristajanja³⁹ predviđanjem vjerojatnog položaja i orijentacije oksima u aktivnome mjestu enzima.

Četiri kiralna *N*-supstituirana 2-hidroksiiminoacetamida sintetizirana su polazeći od racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina pripravljenog iz komercijalno dostupnog 3-fenilprop-2-en-1-ola Overmanovom reakcijom⁴⁰ i hidrolizom nastalog *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamida. Sintetizirani oksimi prvi su objavljeni reaktivatori sa strukturnim karakteristikama koje omogućavaju istovremeno ostvarivanje interakcija s kolinskim i perifernim mjestom te usmjeravanje nukleofilne oksimske skupine prema fosfiliranom aktivnom serinu. Ovdje razrađen i uhodan sintetski put predstavlja prvi poznati način pripreve reaktivatora s opisanim strukturnim karakteristikama. Enantiomeri *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida pripravljenih u racemičnom obliku odijeljeni su tekućinskom

kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) na komercijalno dostupnim polisaharidnim kiralnim nepokretnim fazama.

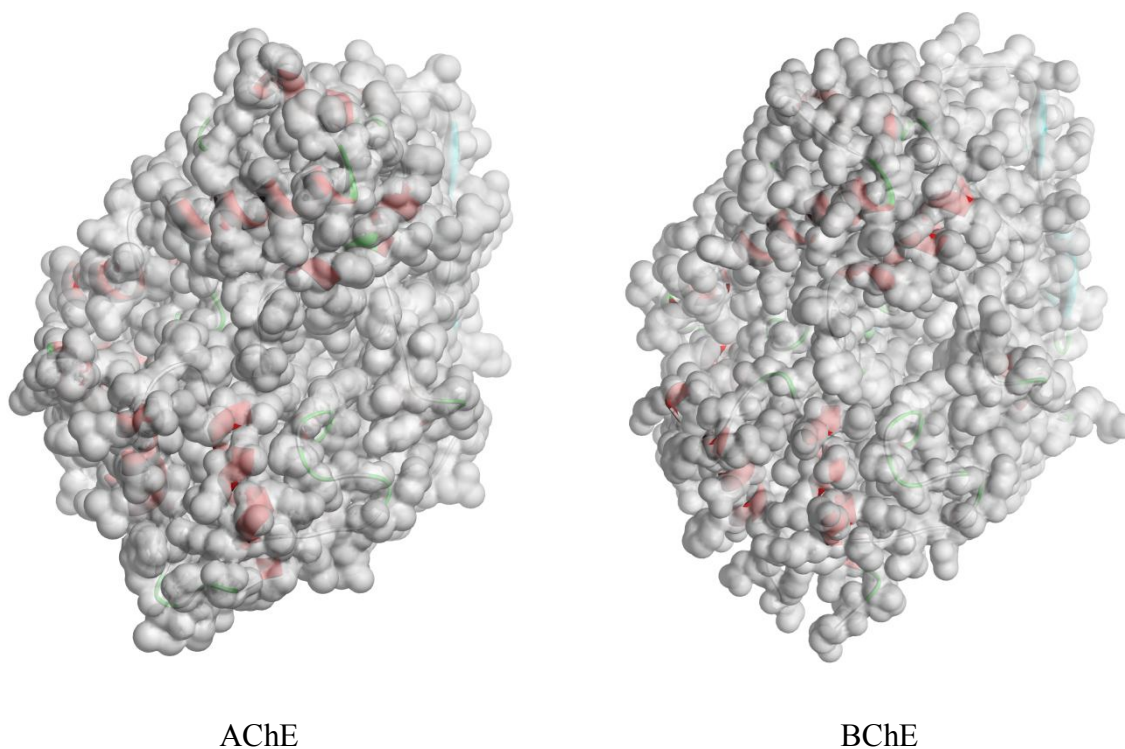
U svrhu određivanja afiniteta kolinesteraza prema novim oksimima praćena je reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima u širem rasponu koncentracija kako bi se odredila konstanta inhibicije (K_I - konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor). Određivanje selektivnosti kolinesteraza prema novim oksimima važno je radi njihove potencijalne primjene u obliku predtretmana reverzibilnim vezanjem. Reaktivacijska učinkovitost novih oksima određena je praćenjem reaktivacije fosfiliranih kolinesteraza oksimima u širem rasponu koncentracija kako bi se odredile kinetičke konstante koje definiraju reaktivacijsku učinkovitost: k_{+2} (maksimalna konstanta brzine reaktivacije), K_{OX} (konstanta disocijacije kompleksa fosfilirani enzim-oksime) i k_r (ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda). U svrhu određivanja stereoselektivnosti kolinesteraza u interakciji s kiralnim oksimima, ali i prilikom reaktivacije fosfiliranih enzima s istima, sva kinetička mjerenja izvedena su s oksimima u racemičnom i enantiomernom obliku.

Zbog dobro opisane stereoselektivnosti AChE i BChE u interakciji sa supstratima i inhibitorima, ali i ovisnosti kinetike enzimske inhibicije o kiralnosti živčanog bojnog otrova, u ovom istraživanju su po prvi put istraživani kiralni reaktivatori fosfiliranih kolinesteraza i ovisnost reaktivacijske učinkovitosti o kiralnosti enzima. Budući da ovo istraživanje po prvi put uključuje ispitivanje reaktivacijske učinkovitosti kiralnih oksima koji istovremeno mogu ostvarivati interakcije s kolinskim i perifernim mjestom te reaktivirati fosfilirani enzim, dobiveni rezultati će doprinijeti boljem razumijevanju strukturnih karakteristika učinkovitih reaktivatora AChE i BChE. U slučaju dokazivanja stereoselektivnosti prilikom reaktivacije fosfiliranih enzima s kiralnim *N*-supstituiranim 2-hidroksiiminoacetamidima, ovo će potaknuti nova istraživanja u smjeru razvoja kiralnih oksimskih reaktivatora.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kolinesteraze

Acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8) (Slika 1) enzimi su koji se zbog svoje uloge u organizmu intenzivno istražuju unutar područja biomedicine i toksikologije. Oba su enzima, prema Enzyme Nomenclature, uvrštena na popis enzima i dodijeljene su im klasifikacijske oznake: EC 3.1.1.7 za acetilkolinesterazu i EC 3.1.1.8 za butirilkolinesterazu, koje se rabe i danas.⁴¹ Kolinesteraze se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina.⁴¹



Slika 1. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze (AChE) (kristalna struktura PDB kod 1B41)⁴² i ljudske butirilkolinesteraze (BChE) (kristalna struktura PDB kod 1P0I).⁴ Crvenom bojom označene su α -uzvojnice, plavom β -nabrane ploče, zelenom bojom petlje, a sivom površina enzima dostupna vodi.

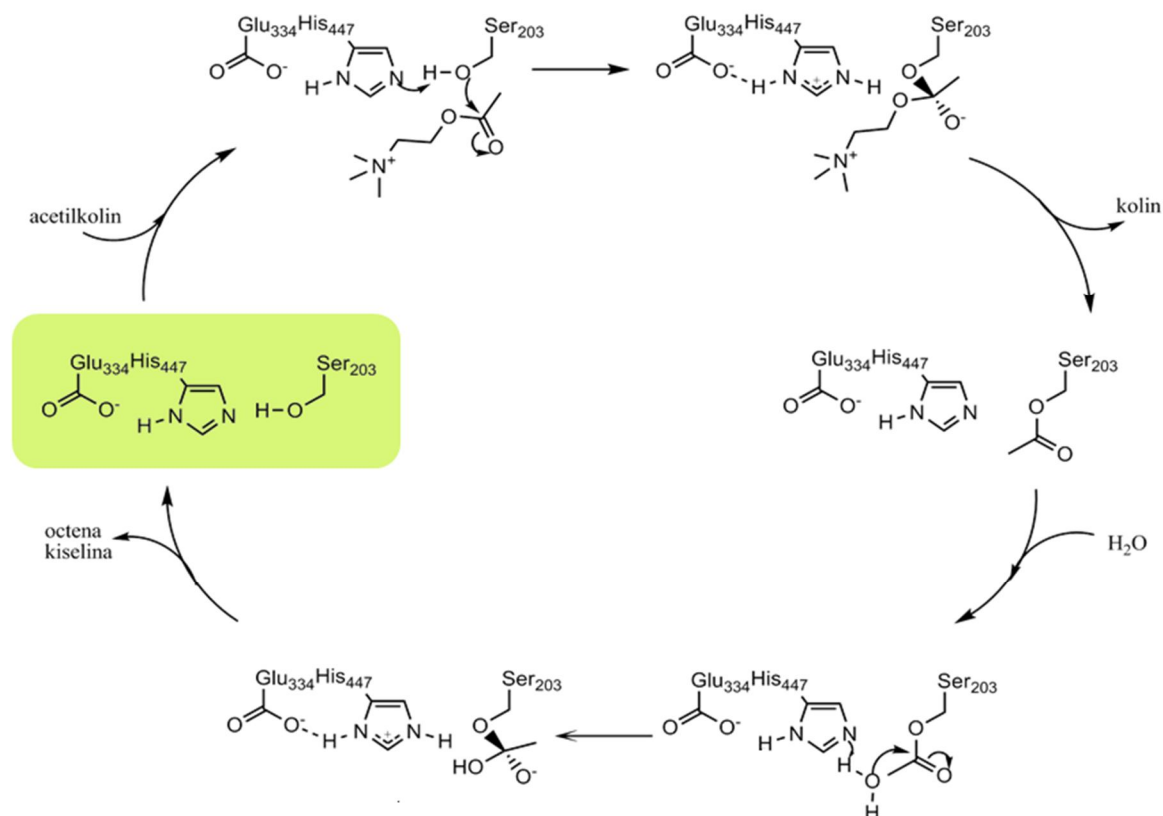
AChE se sintetizira u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a osim u živčanim stanicama, mišićima i mozgu AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite. AChE je od iznimne

važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava.⁴³ Uloga AChE na eritrocitima za sada nije poznata.⁴³ Osim “klasične” katalitičke uloge AChE ima i tzv. nekatalitičke funkcije koje nisu povezane s njezinom fiziološkom funkcijom. Do danas je potvrđeno da AChE potpomaže nastajanje neurita, da sudjeluje u sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih receptora i agregaciji amiloidnih vlakana, dok se njezina uloga u nastajanju krvnih stanica i trombocita povezuje s povećanim rizikom od leukemije kod osoba izloženih djelovanju pesticida koji su inhibitori AChE.⁴⁴⁻⁴⁶

BChE je prisutna u središnjem i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri.^{29,43,47,48} Iako je dokazano da BChE, kao i AChE, može hidrolizirati acetilkolin u sinapsi, njezin specifični fiziološki supstrat nije pronađen i time prava fiziološka uloga u organizmu do danas nije razjašnjena.^{26,49} Za BChE je međutim poznato da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva.^{26,29} Zamijećena je i pojačana ekspresija BChE kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest, no uloga ovog enzima u patologiji bolesti nije potpuno razjašnjena.^{26,29,50} Nadalje, BChE sudjeluje u biokonverziji nekoliko farmakološki važnih spojeva na način da ih aktivira (bambuterol, heroin) ili deaktivira (sukcinildikolin, aspirin, kokain, amitriptilin).^{26,51,52}

Iako postoje razlike u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnog mjesta AChE i BChE, mehanizam hidrolize supstrata je jednak.^{4,42,43,53} Mehanizam hidrolize supstrata na primjeru acetilkolina (ACh), prijenosnika živčanih impulsa, prikazan je na Slici 2. Hidroliza kolinesterazama odvija se na dnu dubokog i uskog ždrijela aktivnog mjesta u tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje kompleksa Michaelisova tipa, aciliranje enzima i njegovo spontano deaciliranje vodom. Za aktivnost enzima odgovorna je katalitička trijada koju čine serin, histidin i glutaminska kiselina. Nukleofilnost Ser203₍₁₉₈₎ (u zagradi je naveden broj aminokiseline u ljudskoj BChE, a broj koji nije u zagradi odnosi se na položaj aminokiseline u ljudskoj AChE) uvećana je mehanizmom opće kiselo-bazne katalize u kojoj sudjeluju aminokiseline katalitičke trijade Glu334₍₃₂₅₎ i His447₍₄₃₈₎. Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskoga prijelaznog stanja koje čine aktivni serin i supstrat.

Reakcijski stupnjevi u hidrolizi uključuju stvaranje međuprodukta u kojemu se acilna skupina supstrata prenosi na serinski ostatak enzima transesterifikacijom.



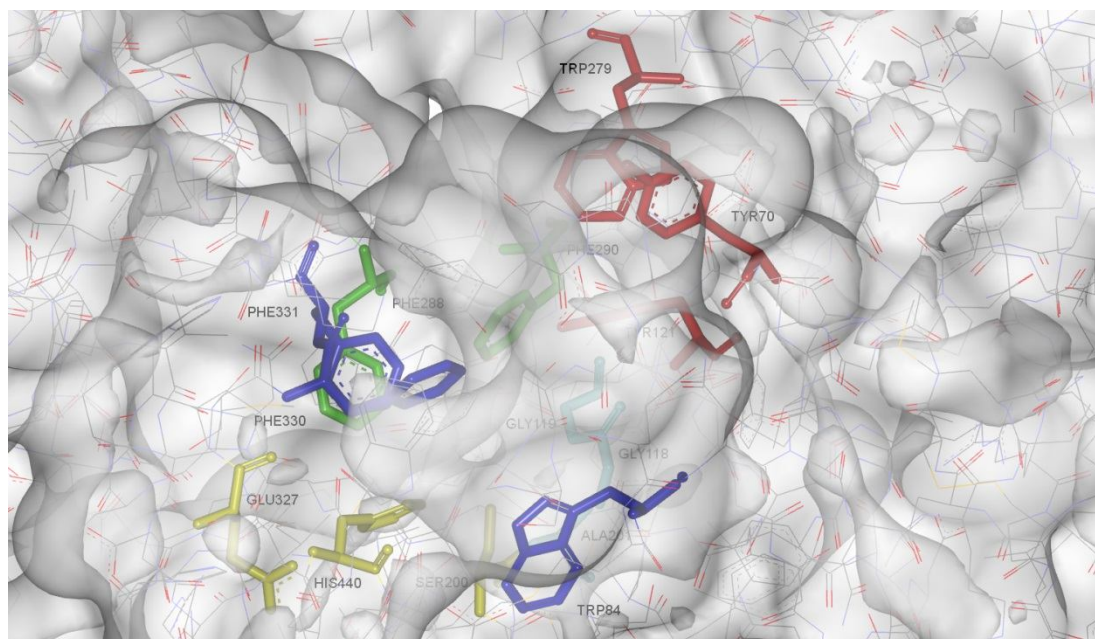
Slika 2. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi acetilkolina kataliziranog kolinesterazama. Broj aminokiselina (Glu – glutaminska kiselina, His – histidin, Ser – serin) odnosi se na položaj aminokiseline u ljudskoj AChE. Preuzeto iz ref. 2.

Kinetika hidrolize kationskog supstrata katalizirana AChE odstupa od Michaelis-Menten kinetike.^{4,46} Kationski supstrati, uključujući ACh, inhibiraju vlastitu katalizu pri koncentracijama koje su višestruko veće od K_m (Michaelisova konstanta; označava koncentraciju supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije) vrijednosti (npr. $> 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, *i.e.* $> 20 \times K_m$ za ATCh (acetiltiokolin) i mišju AChE.⁵⁰

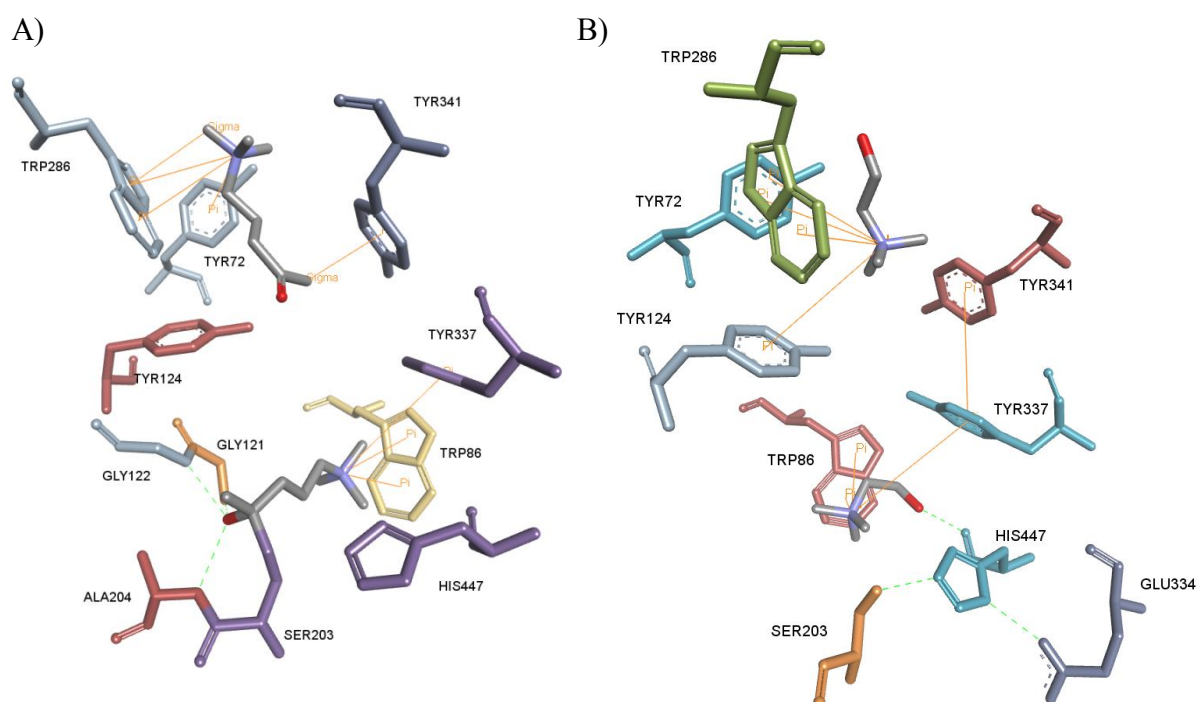
BChE je također inhibirana supstratima, ali zbog većeg i hidrofobnijeg aktivnog mjesta u usporedbi s AChE to se događa pri puno višim koncentracijama supstrata.⁵⁴ Naime, iako je BChE strukturno vrlo slična AChE, većinu aminokiselina koje sačinjavaju njezino aktivno mjesto i time prostor interakcija sa supstratima i inhibitorima čine alifatske aminokiseline za razliku od AChE čije aktivno mjesto pretežno sačinjavaju aromatske

aminokiseline. Tako umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje nalazimo unutar aktivnog mjesta AChE, kod BChE njih šest odgovara alifatskim aminokiselinama^{4,26,29} što volumen aktivnog mjesta BChE čini oko 200 Å³ većim u odnosu na aktivno mjesto AChE.⁵

Aktivno mjesto obaju enzima je 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo,⁴ a sačinjeno je od četiriju domena: a) katalitičkog mjesta (katalitička trijada (Ser203₍₁₉₈₎, His447₍₄₃₈₎ i Glu334₍₃₂₅₎ s oksianionskom šupljinom (Gly118₍₁₁₆₎, Gly119₍₁₁₇₎ i Ala201₍₁₉₉₎), b) kolinskog mjesta (Trp86₍₈₂₎, Tyr337_(Ala328) i Phe338₍₃₂₅₎), c) acilnog džepa (Phe295_(Leu286) i Phe297_(Val288)) i d) perifernog mjesta (Tyr72_(Asn68), Tyr124_(Gln119), Trp286_(Ala277) i Tyr341₍₃₃₂₎) koje je smješteno na rubu ždrijela (Slika 3). Nazivi ovih četiriju domena dodijeljeni su u skladu s njihovom ulogom unutar aktivnog mjesta AChE pri katalizi hidrolize ACh. Uloge pojedinih domena potvrđene su komplementarnim kristalnim strukturama mišje AChE i inaktivnog mutanta mišje AChE sa supstituiranim katalitičkim serinom (Ser203Ala) u različitim kompleksima s četiri supstrata (acetilkolin, acetiltiokolin, sukcinildikolin i butiriltiokolin), dva nehidrolizirajuća analoga supstrata (*m*-(*N,N,N*-trimetilamonij)-trifloracetofenon i 4-ketoamiltrimetilamonij) i jednim reakcijskim produktom (kolin).⁵⁵ Ove kristalne strukture AChE (Slika 4) otkrivaju sukcesivne pozicije i orijentacije supstrata i njihovih analoga vezanih u perifernom mjestu i napredujući unutar ždrijela prema katalitičkom centru, konformacije pretpostavljenog prijelaznog stanja u acilaciji i acil-enzim međuprodukta te pozicije i orijentacije disocirajućih i izlazećih produkata. Aminokiselina Trp86, smještena na samom dnu ždrijela aktivnog mjesta, usmjerava trimetilamonijevu skupinu uoči hidrolize kation- π interakcijom preko šesteročlanog prstena. Amidni vodici Gly118, Gly119 i Ala201 iz oksianionske šupljine stabiliziraju karbonilni kisik ACh u prijelaznom stanju u acilaciji i deacilaciji. Trp286 ima dvojaku ulogu u katalizi hidrolize ACh. Kristalne strukture sa supstratima ili analozima supstrata usidrenim preko kvaterne amonijeve skupine kraj Trp286 i orijentiranim obrnuto od dipolnog momenta aktivnog mjesta pokazuju vezanje povezano s inhibicijom supstratom. Zato će supstrat u suvišku usporiti izlazak kolina elektrostatskim odbijanjem preko acetilne skupine i steričkom blokadom otvora ždrijela aktivnog mjesta. Također, ovi supstrati i analozi mogu prikazivati i dolazeći supstrat, inicijalno privučen od perifernog anionskog mjesta preko svoje acetilne skupine i zatim privremeno zadržan na ulazu u ždrijelo aktivnog mjesta prije nego napreduje dalje u aktivno mjesto.



Slika 3. Aminokiseline aktivnog mjesta acetilkolinesteraze električne jegulje (PDB kod 1ACJ). Crveno obojene aminokiseline pripadaju perifernom alosteričkom mjestu, ljubičasto obojene kolinskom mjestu, plavo obojene oksianionskoj šupljini, zeleno obojene acilnom džepu i žuto obojene katalitičkoj trijadi. Sivom bojom označena je površina enzima dostupna vodi.⁵⁶



Slika 4. Kristalne strukture kompleksa mišje AChE i nehidrolizirajućeg analoga supstrata **4K-TMA** (PDB kod 2HA0) (A) i mišje AChE i kolina, **Ch** (PDB kod 2HA3) (B) ilustriraju položaj dolazeće molekule supstrata u perifernom anionskom mjestu i konformaciju acil-enzim međuprodukta (lijevo), odnosno izlazak hidrolizirane molekule supstrata (desno).⁵⁵

Zbog specifičnosti aktivnog mjesta AChE i BChE njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati pa je posebna pažnja posvećena istraživanju i pronalasku selektivnih inhibitora pojedine kolinesteraze.^{57,58} U Tablici 1. prikazano je nekoliko kolinesteraznih inhibitora (reverzibilnih ili ireverzibilnih) s pripadajućom mjerom njihove inhibitorne moći iskazane kao IC_{50} vrijednost odnosno koncentracijom koja je potrebna za 50%-tnu inhibiciju aktivnosti enzima.⁵² Valja napomenuti da se kod ireverzibilnih inhibitora IC_{50} odnosi na reverzibilni kompleks enzim-inhibitor i da daje informaciju o afinitetu enzima prema inhibitoru, ali ne govori o brzini progresivne inhibicije. Selektivni reverzibilni inhibitori AChE su primjerice donepezil, huperzin A i BW284C51. Selektivni reverzibilni inhibitori BChE su primjerice etopropazin i bambuterol. Jednim od izrazito selektivnih inhibitora kolinesteraza pokazao se i već spomenuti bambuterol koji prema vrijednosti konstante brzine progresivne inhibicije (k_i) mišju BChE inhibira 16 000 puta brže od mišje AChE, dok ljudsku BChE inhibira oko 10 000 puta brže od ljudske AChE.⁵⁹⁻⁶¹

Tablica 1. *In vitro* selektivnost (IC_{50}) nekih inhibitora ljudskih kolinesteraza.⁵² IC_{50} je koncentracija inhibitora potrebna da se inhibira 50 % aktivnosti enzima. Uspoređene su IC_{50} vrijednosti za eritrocitnu AChE i BChE iz plazme.

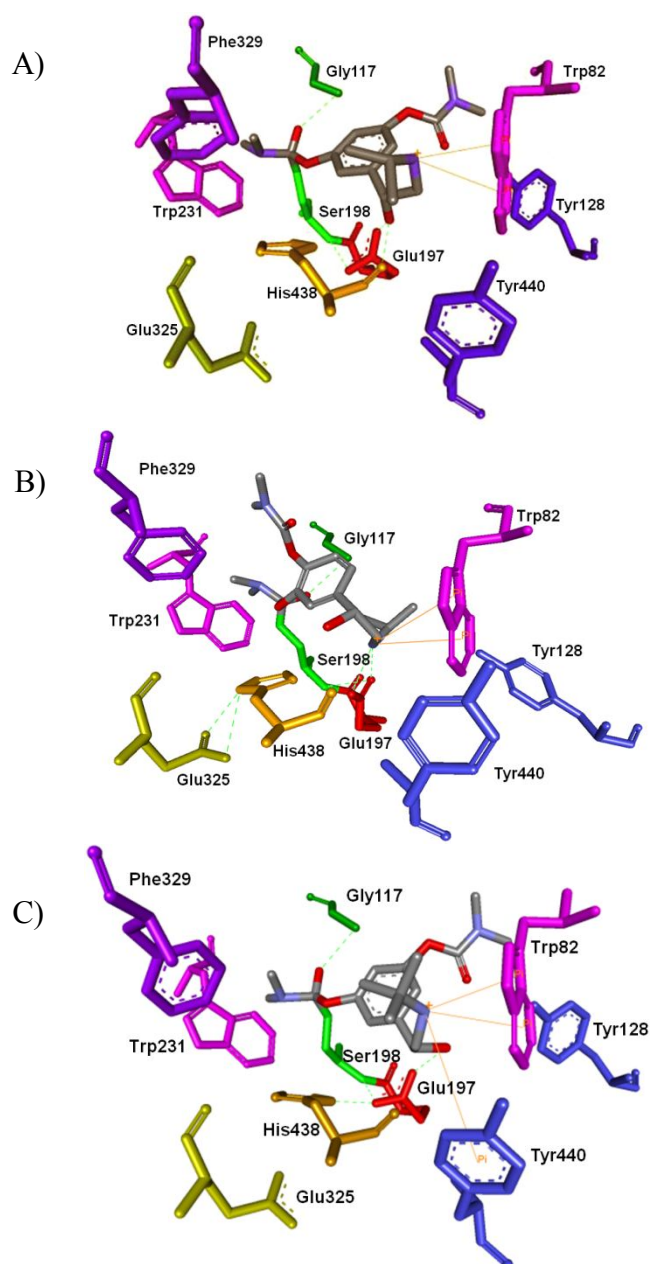
$IC_{50} / \text{nmol dm}^{-3}$				
Spoj	Tip inhibicije	AChE	BChE	BChE/AChE (AChE/BChE)
BW284C51	reverzibilna	19	48000	2500 (0,0004)
huperzin A	reverzibilna	47	30000	640 (0,0016)
donepezil	reverzibilna	22	4200	190 (0,0053)
metrifonat	ireverzibilna	800	18000	23 (0,0435)
galantamin	reverzibilna	800	7300	9 (0,11)
rivastigmin	ireverzibilna	48000	5400	1,1 (0,91)
fizostigmin	ireverzibilna	28	16	0,57 (1,75)
takrin	reverzibilna	190	47	0,25 (4)
izo-OMPA	ireverzibilna	3400	980	0,029 (34,5)
etopropazin	reverzibilna	260000	300	0,0012 (833)
bambuterol	ireverzibilna	30000	3	0,0001 (10 000)
MF-8622	ireverzibilna	100000	9	0,00009 (11 111)

Zbog asimetričnosti ždrijela aktivnog mjesta kolinesteraze pokazuju svojstvo enantioselektivnosti prepoznavajući svaki oblik kiralnosti (središnja, planarna i osna) prisutan na supstratu ili inhibitoru, što se očituje u različitim afinitetima vezanja ili u različitim brzinama reakcije s pojedinim enantiomerima.^{62,63} AChE i BChE tako pokazuju stereoselektivnost prema (*R*)-enantiomerima acetatnih estera derivata kinuklidina³¹ i (*R*)-bambuterolu.⁶⁴ Tako, primjerice, omjer konstanti brzine inhibicije (k_i) kolinestaraza (*R*)- i (*S*)-bambuterolom ($k_{i(R)} / k_{i(S)}$) varira između 4,0-5,3 s obzirom na enzim i njegov izvor.⁶⁴

BChE također pokazuje i stereoselektivnost prema bisdimetilkarbamatnim esterima (*R*)-metaproterenola (metakarb) i (*R*)-izoproterenola (izokarb).⁶⁵ Metaproterenol je bronhodilatator koji se koristi za liječenje astme, bronhitisa i emfizema. Izoproterenol se uglavnom koristi za liječenje bradikardije i zastoja rada srca dok je njegova uloga kao bronhodilatatora puno rjeđa. Stereoselektivnost kolinesteraza procijenjena iz omjera konstanti brzine inhibicije za racemat i (*R*)-enantiomer metakarba i izokarba ($k_{i(R)} / k_{i(rac)}$) otkriva da je (*R*)-metakarb 1,3-2 puta snažniji inhibitor od racemata za sve proučavane kolinesteraze dok je inhibicija (*R*)-izokarbom 1,3-1,7 puta brža nego racematom u slučaju BChE_{UU}, BChE_{AA} i BChE_{UA} dok razlika u inhibiciji nije primijećena u slučaju BChE_{FF}, BChE_{UF} i AChE. Oznake u subskriptu označavaju genotipove butirilkolinesteraze pri čemu U označava uobičajenu, A atipičnu inačicu karakteriziranu mutacijom Asp70Gly, dok F označava fluorid rezistentnu inačicu koju karakterizira mutacija Thr243Met ili Gly390Val. Usporedbom dobivenih rezultata s $k_{i(R)}/k_{i(rac)}$ omjerom dobivenim za bambuterol otkriveno je da je stereoselektivnost kolinesteraza prema metakarbu i izokarbu slična onoj prema bambuterolu.

Proučavanjem prijelaznog stanja karbamilacijskih reakcija biskarbamata molekulskim modeliranjem dobiven je uvid u nevezne interakcije koje određuju stereoselektivnost BChE prema metakarbu, izokarbu i bambuterolu.⁶⁵ Na Slici 5 prikazana je simulacija prijelaznog stanja između hidroksilne skupine aktivnog serina (Ser198) ljudske BChE_{UU} i karbamatne skupine na C2 atomu benzenskog prstena (*R*)-metakarba (Slika 5A), (*R*)-izokarba (Slika 5B) i (*R*)-bambuterola (Slika 5C). Prijelazna stanja karbamilacije trima karbamatima stabilizirana su kation- π interakcijom između protoniranog dušika karbamata i indolnog prstena Trp82 i vodikovom vezom između kisika karbamatne skupine i amino skupine Gly117. Razlike u brzini karbamilacije metakarbom, izokarbom i bambuterolom mogu se pripisati dodatnoj stabilizaciji tipičnoj za pojedini karbamat. Prijelazno stanje (*R*)-metakarba dodatno je

stabilizirano dvjema vodikovim vezama između hidroksilne skupine na kiralnom centru i His438 i Glu197 (Slika 5A) dok je prijelazno stanje (*R*)-izokarba stabilizirano vodikovom vezom između protoniranog dušika i Glu197. Prijelazno stanje (*R*)-bambuterola stabilizirano je kation- π interakcijom između protoniranog dušika i Tyr440 i vodikovom vezom između Glu197 i hidroksilne skupine na kiralnom centru (Slika 5C). Stabilizacija prijelaznog stanja (*S*)-enantiomera bisdimetilkarbamata uključuje promjenu orijentacije hidroksilne skupine što može dovesti do nestanka interakcija s hidroksilnom skupinom koje stabiliziraju prijelazna stanja (*R*)-enantiomera.

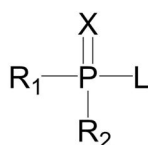


Slika 5. Molekulsko modeliranje prijelaznih stanja ljudske BChE i (*R*)-metakarba (A), (*R*)-izokarba (B) i (*R*)-bambuterola (C).⁶⁵

2.2. Organofosforni spojevi

OP spojevi su esteri, anhidridi ili halogenidi potpuno supstituirane fosforne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Kod tih spojeva središnji atom fosfora mora biti peterovalentan, kisik ili sumpor moraju biti koordinatno-kovalentnom vezom vezani na peterovalentni fosfor (obično se ta veza prikazuje kao dvostruka), R_1 i R_2 mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-, mono- ili dialkil-aminogrupe (Slika 6). U reakciji hidrolize OP spojeva (spontane ili enzimske) odcjepljuje se ona skupina čija je veza s fosforom najslabija (izlazna skupina L; Slika 6). Glavni uzrok akutne toksičnosti organofosfornih (OP) spojeva je inhibicija acetilkolinesteraze, ključnog enzima u prijenosu živčanog impulsa.⁶⁶ Toksičnost OP spojeva, pogotovo iz skupine živčanih bojnih otrova, proizlazi iz činjenice da su ti spojevi strukturni analozi tetraedarskog prijelaznog stanja hidrolize supstrata ACh. OP spojevi koji imaju slobodnu hidroksilnu skupinu (-OH) nisu biološki aktivni i ne inhibiraju acetilkolinesterazu.⁶⁷ Također, OP spojevi koji umjesto atoma kisika, vezanog na središnji atom fosfora, imaju atom sumpora nisu inhibitori acetilkolinesteraze zbog smanjene polarizacije atoma fosfora manje elektronegativnim atomom sumpora i posljedično smanjene elektrofilnosti.^{68,69} Da bi postali inhibitori acetilkolinesteraze, ti spojevi moraju prijeći u svoje oksoanaloge biotransformacijom kataliziranom monooksigenazama.⁶⁷

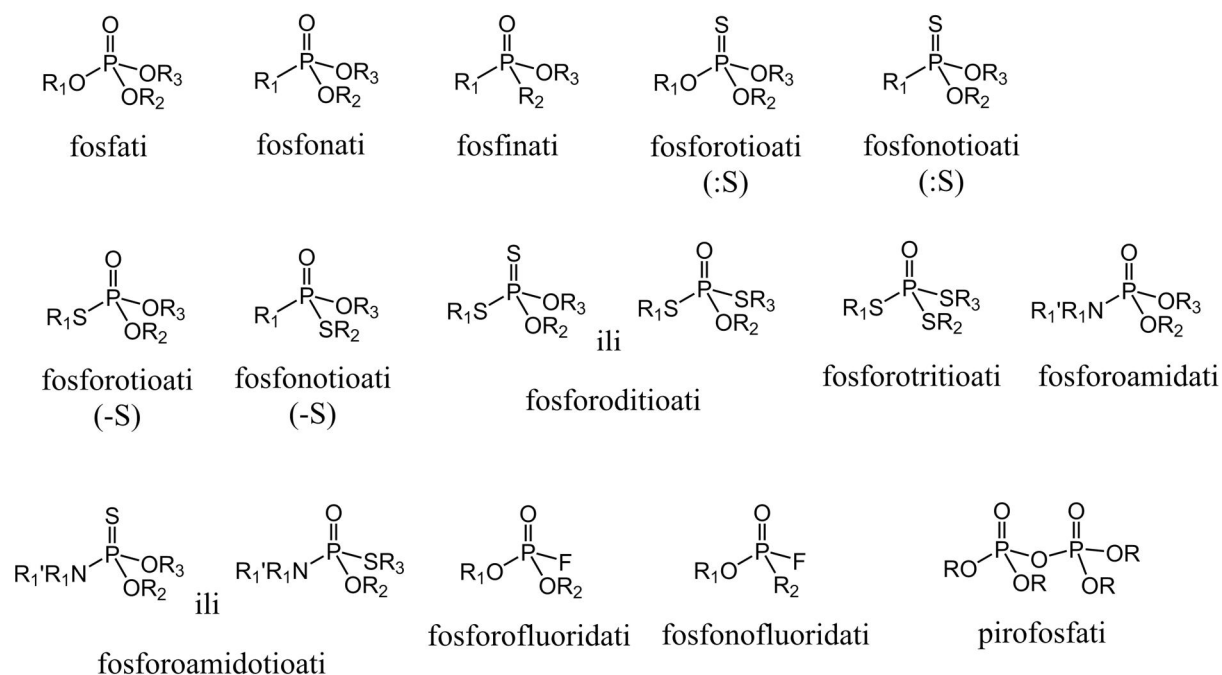
Klinički simptomi inhibicije AChE uzrokovane organofosfornim spojevima uključuju (i) muskarinske efekte (mioza, bradikardija, pojačano izlučivanje urina, sline, suza i znoja, bronhokonstrikcija i povećana gastrointestinalna mobilnost), (ii) nikotinske efekte (mišićna slabost, grčevi tremor, povišen krvni tlak i tahikardija) i središnje efekte (glavobolja, oslabljeno pamćenje i koncentracija, anksioznost, nesanica i najvažnije respiratorna depresija i paraliza).⁶⁶ Smrt je uzrokovana respiratornim zastojem izazvanim paralizom respiratornih mišića i bronhokonstrikcijom zajedno s pojačanim bronhijalnim izlučivanjem i središnjom respiratornom depresijom.⁶⁸



X: -O ili -S
 R_1, R_2 : alkil-, alkoksi-, alkiltio-, aril-, ariloksi-,
mono ili dialkil- amino skupine
L: -F, -CN, -SR₃, -OR₃

Slika 6. Opća formula organofosfornih spojeva.

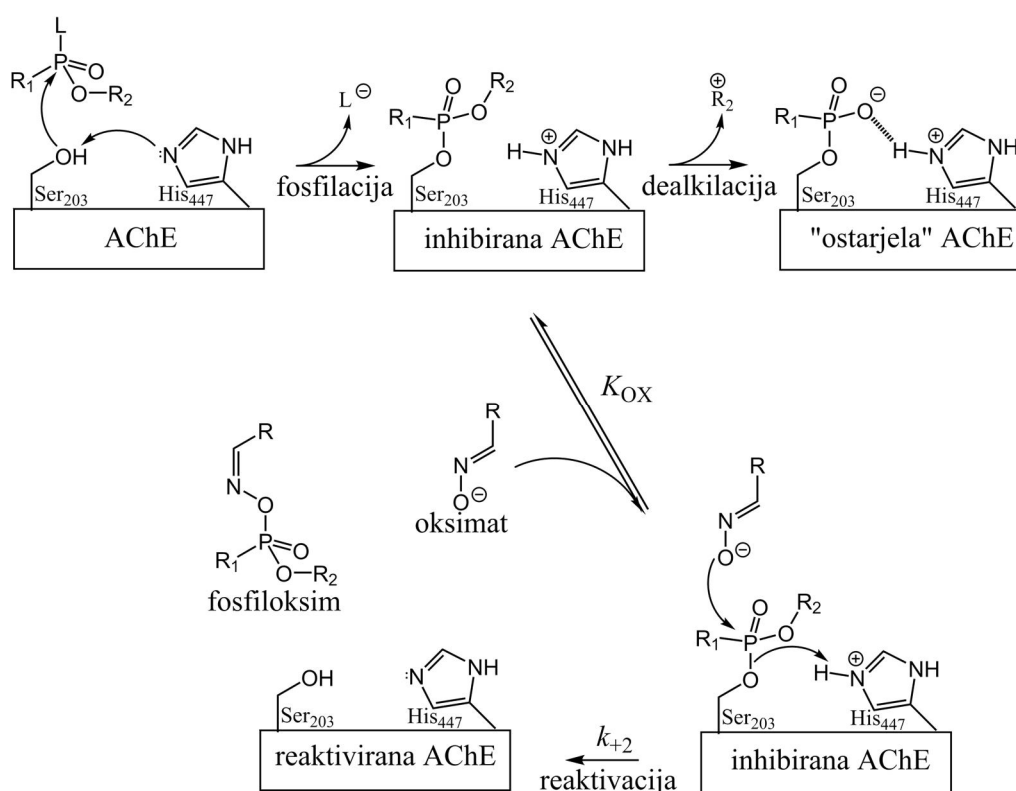
OP spojevi podijeljeni su s obzirom na prirodu supstituenata koji okružuju središnji atom fosfora.⁷⁰⁻⁷² Prema toj podjeli moguće ih je podijeliti u 14 skupina. Na Slici 7. prikazane su skupine OP spojeva kod kojih je jedna od -OR skupina zamijenjena atomom fluora (fosforofluoridati i fosfonofluoridati). Takvu strukturu imaju živčani bojni otrovi sarin i ciklosarin. Živčani bojni otrov VX je fosfonat kod kojega je izlazna skupina -SR.



Slika 7. Struktura organofosfornih spojeva klasificiranih prema prirodi atoma koji okružuju središnji atom fosfora.^{70,71,72,73} Oznaka (:S) znači da je sumpor na središnji atom fosfora vezan koordinatno-kovalentnom vezom, a oznaka (-S) da je vezan esterskom vezom.

Mehanizam interakcije acetilkolinesteraze i OP spojeva analogan je mehanizmu hidrolize acetilkolina katalizirane acetilkolinesterazom pri čemu je kod OP spojeva prvi korak fosfiliranje enzima (Slika 8).⁷⁴ Tetraedarski fosfilni adukt replika je prijelaznog stanja inicijalnog koraka u hidrolizi acetilkolina. Razlika između hidrolize acetilkolina i hidrolize OP spojeva jest u brzini reakcije s vodom, jer je deacetiliranje enzima puno brže od defosfiliranja. Defosfiliranje enzima, koje se često naziva i spontanom reaktivacijom, sporo je, a kod nekih spojeva i ne postoji. Naime, u drugom koraku, katalitički histidin ne može aktivirati molekulu vode jer zauzima neproduktivnu konformaciju (npr. konjugati s VX-om i tabunom) ili mu je blokiran prilaz vodi (npr. konjugat sa somanom). Zbog toga je spontana hidroliza fosfiliranog enzima iznimno spora i traje od nekoliko sati u slučaju dimetilfosforilnih konjugata do nekoliko dana u slučaju konjugata s V-agensima.⁷⁵

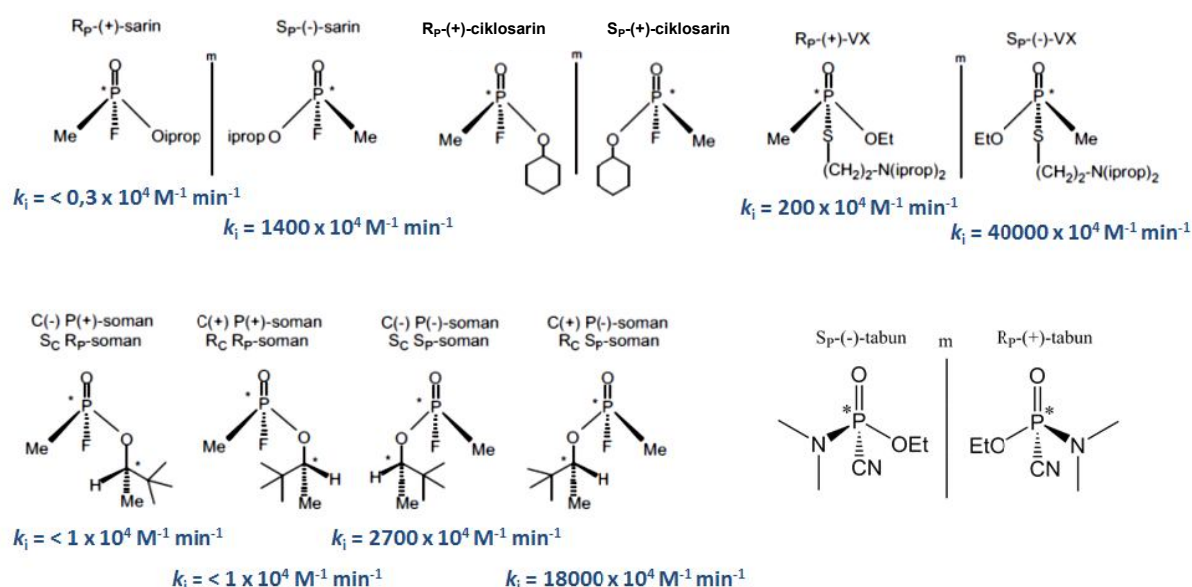
Reaktivacija je brža s oksimima, koji su puno jači nukleofili od vode.⁷⁴ Produkti hidrolize OP spojeva više nisu inhibitori acetilkolinesteraze.⁶⁷ Osim reaktivacije, kod fosfilirane kolinesteraze može doći i do dealkilacije jedne alkoksi skupine na fosforu, čime fosfilirani enzim dobiva negativan naboj koji vodi ili oksimima onemogućava nukleofilni napad te takav enzim ostaje ireverzibilno inhibiran.⁷⁶ Adukt soman-AChE poznat je po vrlo brzom starenju ($\tau_{1/2} \approx 2$ min) što je razlog ozbiljnim poteškoćama u kliničkom tretmanu trovanja.⁷⁶



Slika 8. Mehanizam interakcije acetilkolinesteraze (AChE) s organofosforim spojem. R_1 i R_2 mogu biti alkil-, alkoksi-, alkiltio-, odnosno mono- ili dialkil aminogrupe. L je izlazna skupina.

Neki OP spojevi su kiralne molekule, tj. optički su aktivni. U tu skupinu OP spojeva spadaju svi živčani bojni otrovi ciklosarin, sarin, soman, tabun, VX, ruski VX (*O*-izobutil-*(N,N)*-dietilaminoetil)metil-fosfonotioat; RVX) i kineski VX (*O*-butil-*(N,N)*-dietilaminoetil)metil-fosfonotioat; CVX). Sarin, ciklosarin, tabun i VX sastoje se od smjese dvaju enantiomera od kojih se svaki razlikuje u kiralnosti fosforovog atoma. Ovo omogućuje rotaciju linearno polariziranog svjetla u smjeru kazaljke na satu [P(+)-enantiomeri] ili suprotno od smjera kazaljke na satu [P(-)-enantiomeri]. Nasuprot tome kiralnost somana mnogo je kompleksnija jer se temelji na dva kiralna centra koji je jedan smješten na atomu

fosfora, P(+) i P(-), a drugi na pinakolilnoj skupini, C(+) i C(-). Dakle, soman se pojavljuje u četiri stereoisomera kao dva para diastereoizomera: P(+)C(+), P(+)C(-), P(-)C(-) i P(-)C(+). U svrhu označavanja stereoisomera živčanih bojnih otrova obično se koristi eksperimentalno utvrđeni smjer rotacije polariziranog svjetla dok je označavanje s *R* i *S* oznakama rijetko. Na Slici 9 prikazane su apsolutne konfiguracije i relativne optičke aktivnosti najčešćih živčanih bojnih otrova. Kiralnost je određena prema utvrđenim pravilima Cahna, Ingolda i Preloga pri čemu je kisik iz P=O veze nižeg prioriteta od alkoksi skupine.^{77,79} Empirijski utvrđena optička aktivnost korelirana je s onom spojeva dobivenih stereoselektivnom sintezom.^{79,80} Poznato je da kiralnost živčanih bojnih otrova uzrokuje značajnu razliku u toksikološkim svojstvima koja određuju eliminaciju otrova hidrolizom i kinetiku enzimske inhibicije.⁷⁹

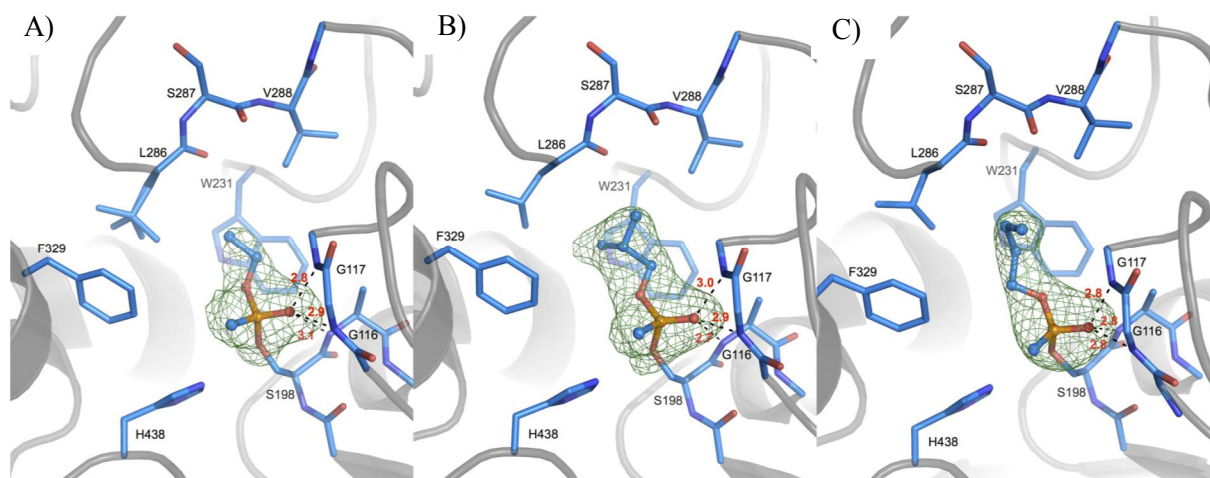


Slika 9. Strukture stereoisomera OP živčanih bojnih otrova i odgovarajuće bimolekularne konstante brzine (k_i) inhibicije goveđe AChE.^{81,82} Zvezdicom je označen asimetrični ugljikov ili fosforov atom.

Kiralnost na središnjem fosforovom atomu uzrokuje više brzine inhibicije P(-)-izomera (S_P) nego P(+)-izomera (R_P). Benschop i de Jong proučavali su temu stereoselektivnosti kolinesteraza prema OP spojevima te su *in vitro* odredili odgovarajuće konstante brzine inhibicije (k_i) za AChE električne jegulje.⁸² Oba P(-)-diastereoizomera somana ($S_P S_C$ - i $S_P R_C$ -soman) pokazuju jako visoke vrijednosti k_i u rasponu $1,8-2,8 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ što se poklapa s njihovom visokom toksičnošću. Nasuprot tome manje

toksični P(+)-dijastereoizomeri ($R_P R_C$ - i $R_P S_C$ -soman) karakterizirani su s 100 000 puta manjim vrijednostima k_i ($< 5 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$). Slični rezultati dobiveni su za enantiomere sarina koji se razlikuju u brzini inhibicije za 5 000 puta s vrijednosti k_i od $1,4 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ za S_P -(-)-oblik. Enantiomeri VX-a pokazuju najmanju razliku budući da je k_i toksičnijeg S_P -(-)-VX ($4 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$) 200 puta viši od R_P -(+)-enantiomera.

Stereoselektivna ovisnost inhibicije organofosornim spojevima također je uočena i u slučaju BChE. Toksičniji P(-)-enantiomeri (S_P) somana brže inhibiraju BChE u usporedbi s odgovarajućim P(+)-enantiomerima (R_P) analogno inhibiciji AChE enantiomerima somana.⁶⁸ Nedavno je pokazano da prisustvo oba enantiomera VX-a, RVX-a i CVX-a mijenja stereoselektivnost ljudske BChE. Naime, proučavanjem kristalnih struktura konjugata VX-BChE, RVX-BChE i CVX-BChE (Slika 10) utvrđeno je da u će prisutstvu oba enantiomera pri submilimolarnoj koncentraciji BChE preferencijalno reagirati s R_P -(+)-VX.³³ Nasuprot tome, mjerenja brzine inhibicije odvojenim enantiomerima VX-a pokazuju da S_P -(-)-VX inhibira BChE nekoliko puta brže nego R_P -(+)-VX.⁸³

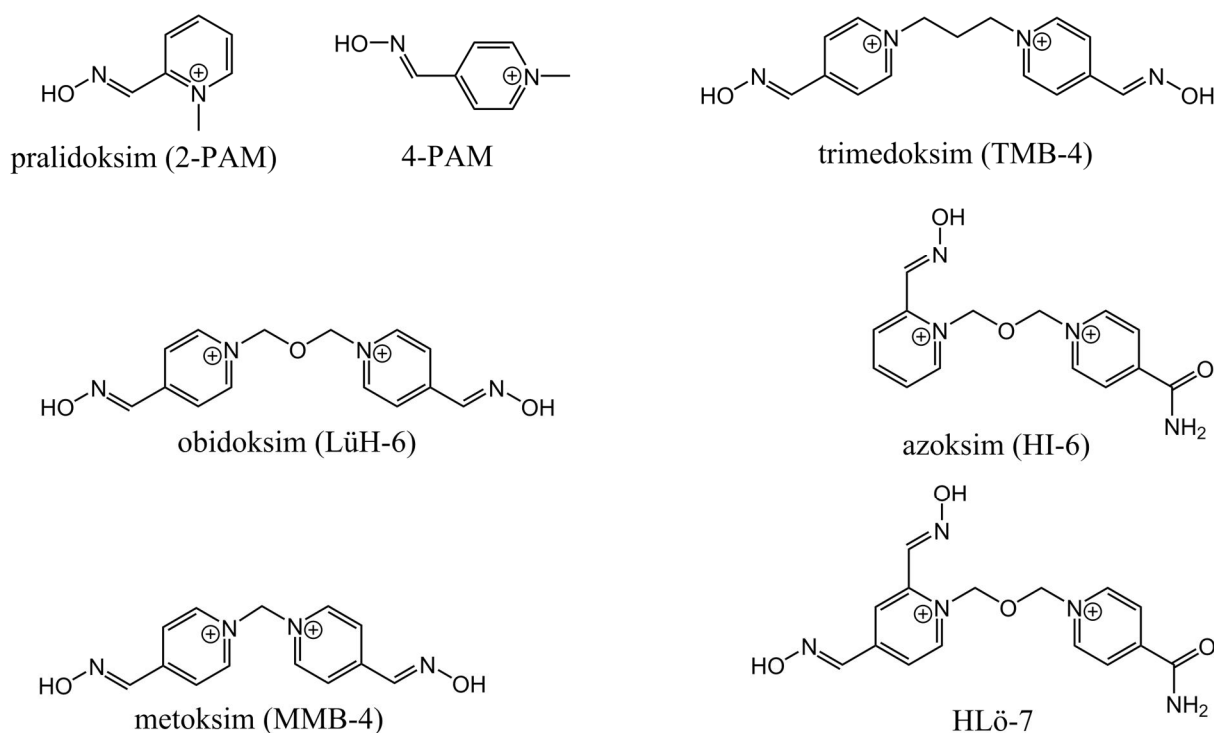


Slika 10. Kristalne strukture konjugata BChE s racemičnim VX-om (A), ruskim VX-om (B) i kineskim VX-om (C) otkrivaju S_P apsolutnu konfiguraciju atoma fosfora za sva tri konjugata. Preuzeto iz ref. 33.

2.3. Reaktivatori kolinesteraza inhibiranih organofosfornim spojevima

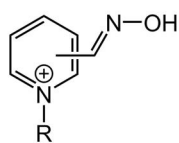
2.3.1. Klasični piridinijevi oksimski reaktivatori

Pod pojmom reaktivatora podrazumijeva se spoj koji mehanizmom nukleofilne supstitucije može defosfilirati katalitički serin kolinesteraze i vratiti enzimu aktivnost. Takav reaktivator mora imati izraženiji nukleofilni karakter od molekule vode. Ubrzo nakon što je utvrđeno da hidroksilamin i nikotinhidroksamska kiselina mogu reaktivirati dietilfosforiliranu AChE, otkriveno je da su spojevi s oksimskom skupinom, tj. oksimi, 2-oksoaldoksimi i posebno 2-piridinijev aldoksim (2-PAM; Slika 11) učinkoviti u reaktivaciji inhibirane AChE.⁸⁴⁻⁸⁹ Na Slici 11 prikazana je struktura nekih od prvih sintetiziranih oksima od kojih se tri (2-PAM, HI-6 i obidoksim) i danas jedini koriste u kliničkom tretmanu otrovanja. Učinkovitost reaktivatora u početnim *in vitro* istraživanjima procjenjuje se prema nekoliko parametara: konstantom brzine reaktivacije (k_{+2}), konstantom disocijacije kompleksa reaktivatora i fosfilirane AChE (K_{OX}) i njihovim omjerom, odnosno konstantom brzine reaktivacije drugog reda, k_r . Optimalne vrijednosti navedenih parametara za reaktivaciju fosfilirane AChE su $k_{+2} > 0,1 \text{ min}^{-1}$ i $K_{OX} < 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$.⁸⁹



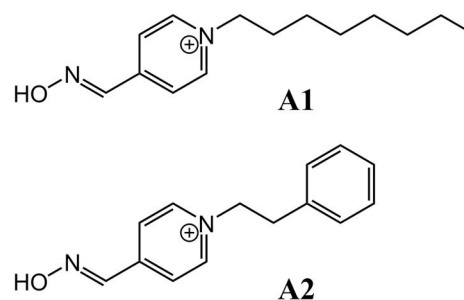
Slika 11. Kemijske strukture glavnih piridinijevih aldoksimskih reaktivatora.

2-PAM je vrlo učinkovit u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom ($k_r = 9\,058\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) ili VX-om ($k_r = 7\,651\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$), ali je neučinkovit u slučaju inhibicije tabunom ili somanom.⁹⁰ Njegov analog 4-PAM koji se razlikuje samo u poziciji oksimske skupine na piridinijevom prstenu manje je učinkovit od 2-PAM-a najvjerojatnije zbog manje učestalosti optimalne orijentacije oksimske skupine u katalitičkom mjestu fosfilirane AChE.⁹¹ Analogi monokvaternog pralidoksima (2-PAM) sintetizirani su kako bi se može bitno poboljšala njegova reaktivacijska učinkovitost (Slika 12).⁹² Ova su istraživanja pokazala da produljivanje bočnog lanca (radi poboljšanja lipofilnosti) ili prisustvo aromatske skupine u bočnom lancu (radi povećanja interakcija s aminokiselinama AChE *via* π - π interakcija) nije poboljšalo reaktivacijsku učinkovitost u usporedbi s 2-PAM-om (relativna reaktivacijska učinkovitost s obzirom na 2-PAM je 46 % i 44 % za **A1**, odnosno **A2** u slučaju reaktivacije AChE inhibirane analogom sarina izopropil *p*-nitrofenil metilfosfonatom.⁹²



R = butil, heksil, oktil, izoamil, 2-etilheksil

R = benzil, 4-metilbenzil, *p*-tert-butilbenzil, 4-fenilbutil



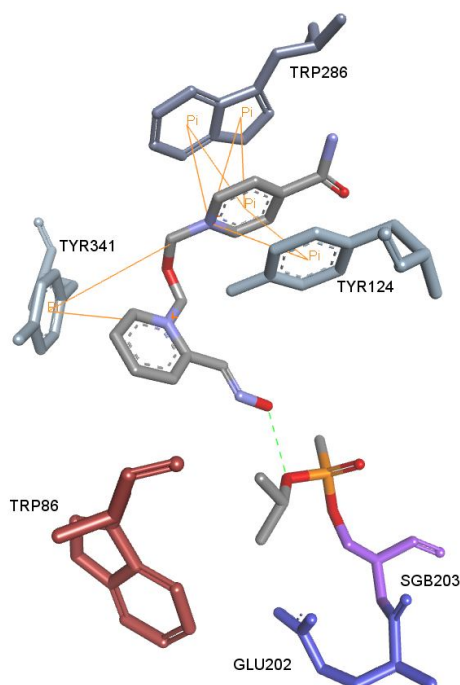
Slika 12. Kemijske strukture analoga 2-PAM-a.

Nadalje, pretpostavljeno je da bi kombiniranje 4-PAM-a s ligandom koji je sposoban povećati broj nekovalentnih interakcija s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima moglo dovesti do spoja koji bi povećao afinitet fosfilirane AChE, ali i zadržao optimalnu orijentaciju oksimske skupine u katalitičkom mjestu AChE tijekom reaktivacije. U skladu s ovim obrazloženjem pripremljen je prvi bispiridinijev aldoksim trimedoksim (TMB-4) (Slika 11) koji se zbog poboljšanog afiniteta pokazao učinkovitijim u odnosu na 2-PAM i 4-PAM.⁹¹ Ubrzo su sintetizirani i drugi aldoksimi po uzoru na TMB-4: obidoksim (LüH-6), HI-6 i HLö-7 (Slika 11).⁹³⁻⁹⁵ Iako su navedeni bispiridinijevi aldoksimi učinkoviti reaktivatori neke od fosfiliranih AChE, nijedan od njih nije univerzalni reaktivator, odnosno učinkovit u slučaju trovanja različitim ŽBO. Naime, njihova učinkovitost u reaktivaciji ovisi o prirodi fosfilne skupine vezane na AChE. Obidoksim se općenito smatra najboljim reaktivatorom u slučaju

inhibicije s organosfosfornim pesticidima poput diizopropil fluorofosfata (DFP) (diizopropilfosforil-AChE) ($k_r = 940 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$).⁹⁶ HI-6 je učinkovit u slučaju inhibicije sarinom ($k_r = 13\,513 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i VX-om ($k_r = 21\,043 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ali je neučinkovit u slučaju inhibicije tabunom.^{97,98} 4-supstituirani oksimi poput TMB-4, HLö-7 i LüH-6 učinkoviti su u slučaju inhibicije tabunom (k_r (TMB-4) = $306 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, k_r (HLö-7) = $188 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, k_r (LüH-6) = $411 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ali njihove brzine reaktivacije izražene putem k_r vrlo su spore u usporedbi s brzinom reaktivacije dobivenom za reaktivaciju VX-om inhibirane AChE (k_r (TMB-4) = $500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, k_r (HLö-7) = $62\,820 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, k_r (LüH-6) = $32\,591 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$).^{97,99} Uzrok manje reaktivacijske učinkovitosti u slučaju inhibicije tabunom povezana je sa slabom elektrofilnosti i steričkim štitom nastalog fosforoamidilnog adukta AChE.⁹⁹ Otežana reaktivacija tabunom inhibirane AChE u skladu je s sporom brzinom inhibicije ovog ŽBO ($k_i = 7,4 \times 10^6 \text{ mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$) koja potječe od slabe elektrofilnosti fosforovog atoma zbog delokalizacije elektronskog para na dušikovom atomu.⁹⁹ Disocijacijska konstanta oksimske skupine (pK_a) također ima važnu ulogu u procjeni učinkovitosti oksima jer je oksimatni anion reaktivna skupina slično kao anion hidroksilne skupine aktivnog serina prilikom hidrolize supstrata. Da bi bili učinkoviti, oksimi moraju biti djelomično deprotonirani u području fiziološkog pH; potpuna deprotonacija je nepoželjna jer je reaktivnost u tom slučaju kompromitirana utroškom desolvacijske energije za nastajanje oksimatnog aniona.¹⁰⁰ Upravo sustav konjugiranih prstenova 2- i 4-alkilpiridinijevih aldoksima (npr. 2-PAM, HI-6 i obidoksim) povećava kiselost ovih oksima dajući pK_a vrijednosti između 7,3 i 8,0.¹⁰⁰

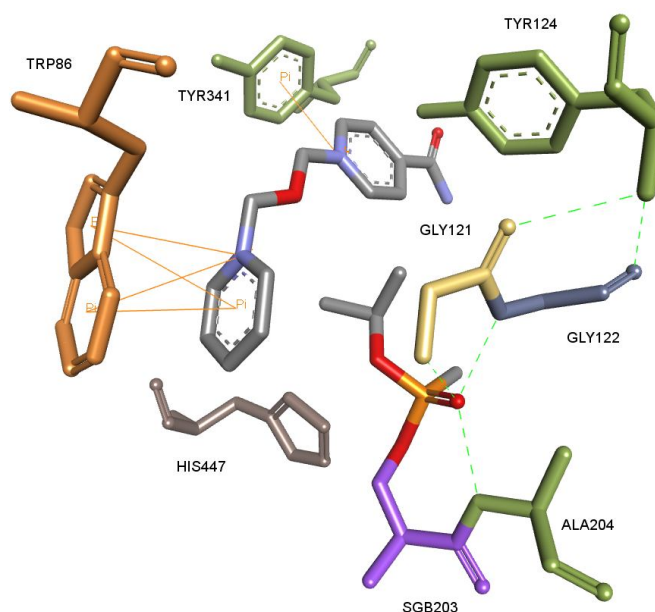
Određivanjem kristalne strukture kompleksa oksima i fosfilirane kolinesteraza moguće je dobiti bolji uvid u interakcije oksima i fosfiliranog enzima te procijeniti potrebne strukturne karakteristike koje bi oksim trebao imati za veću reaktivacijsku učinkovitost. Nisko-energetske konformacije kompleksa HI-6 i mišje AChE fosfonilirane sarinom (HI-6•sarin-*m*AChE) identificirane su kombiniranjem *diffusion trap* kristalografske metode i računalne metode teorije funkcionala gustoće (engl. *density functional theory* – DFT) te razotkrivaju prethodno nepoznate konformacije sustava i moguću koordinaciju nukleofila prije napada.¹⁰¹ Konačna struktura uključuje konformaciju adukta sarina s interakcijom između izopropilne skupine sarina i kisika karboksilne skupine Glu202 (Slika 13) (PDB kod 5FPP). Konformacija sarina ostavlja prostor oko atoma fosfora koji je zbog toga dostupan *cis-/trans-* (*E/Z*) izomerima oksimske skupine HI-6. Kisik *E* izomera oksimske skupine nalazi se unutar van der Waalsove

udaljenosti (3,3 Å) od fosforovog atoma sarina. Karboksiamino supstituirani piridinijev prsten HI-6 ostvaruje tzv. π - π sendvič s arenima Tyr124 i Trp286. Ova konformacija sarinovog adukta stabilizirana je neklasičnom CH $\cdots$ O vodikovom vezom između izopropilne skupine sarina i karboksilne skupine Glu202 s interakcijskom energijom 7 kcal/mol. Također, opažena je i značajna promjena u konformaciji i poziciji Trp286 koja omogućuje nereaktivnom karboksiamino-supstituiranom piridinijevom prstenu HI-6 da radi gore spomenuti tzv. π - π sendvič između arena Tyr124 i Trp286. Ova konformacija Trp286 je jednaka onoj u binarnom kompleksu između HI-6 i native mišje AChE (PDB kod 2GYU) i različita od konformacije Trp286 opažene u binarnom kompleksu sarin-mišja AChE.¹⁰²



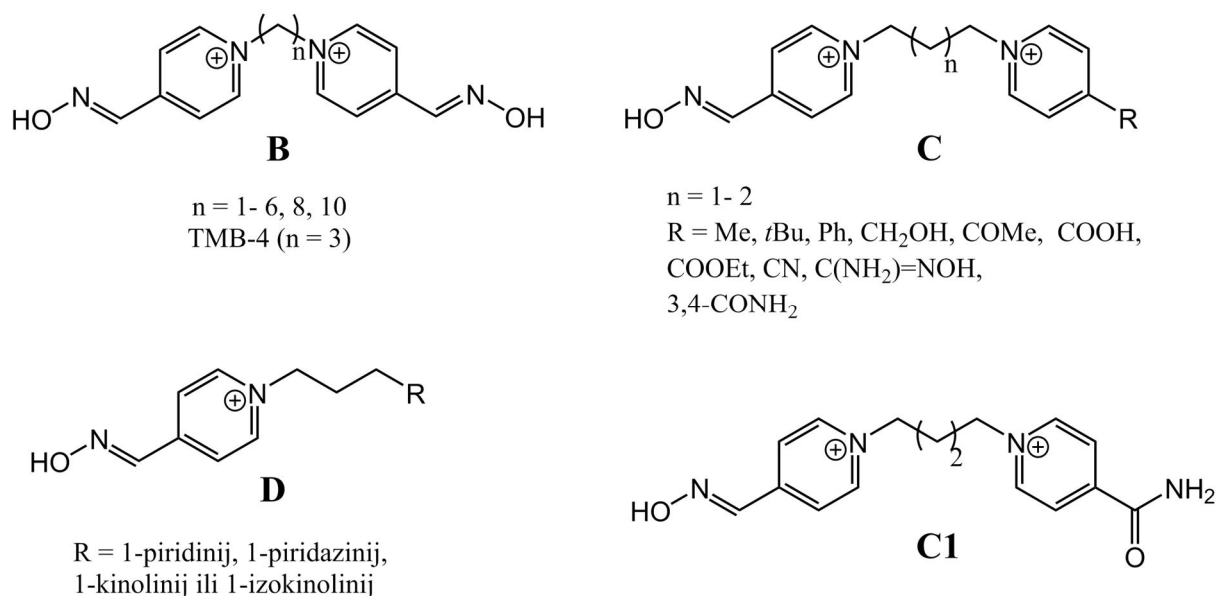
Slika 13. Struktura kompleksa HI-6•sarin-mišja AChE dobivena kombiniranjem *diffusion trap* kristalografske metode i računalne metode teorije funkcionala gustoće (PDB kod 5FPP).¹⁰¹

Struktura kompleksa HI-6 i B monomera konjugata sarin-*m*AChE otkriva potencijalno dodatno vezno mjesto za HI-6 blizu Trp86 (Slika 14) (PDB kod 5FPP). Međutim, π - π interakcije s Trp86 u ovoj strukturi smještaju nukleofil u nepovoljnu poziciju za reakciju zbog čega ova struktura vjerojatno pokazuje neproduktivnu veznu orijentaciju HI-6.

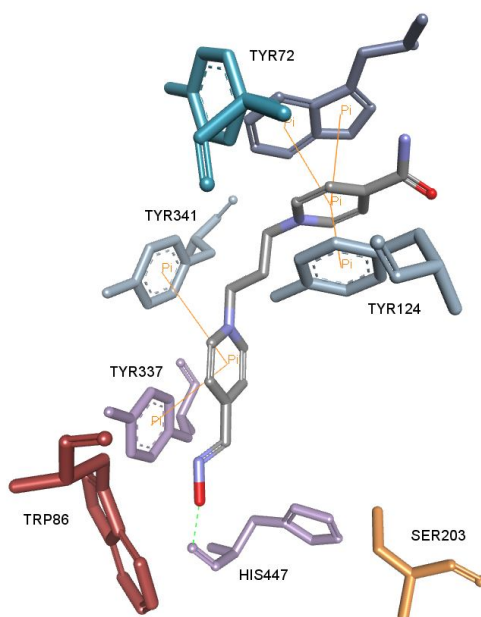


Slika 14. Struktura kompleksa HI-6 (oksimna skupina nije prikazana) i B monomera konjugata sarin-*m*AChE dobivena kombiniranjem *diffusion trap* kristalografske metode i računalne metode teorije funkcionala gustoće (PDB kod 5FPP).¹⁰¹

U istraživanju novih učinkovitijih oksima, do danas, glavne modifikacije izvedene na bispiridinijevim strukturama uključivale su modificiranje pozicije oksimske skupine na piridinijevom prstenu, uvođenje različitih supstituenata i posebice promjene u vrsti i duljini lanca između piridinijevih prstena. U svrhu ispitivanja utjecaja duljine lanca između piridinijevih prstena na reaktivaciju tabunom inhibirane AChE, sintetizirani su analozi trimedoksima (TMB-4). Utvrđeno je da je optimalna udaljenost između dva 4-piridinijeva aldoksima tri ili četiri ugljikova atoma (Slika 15, struktura B).¹⁰³ Monooksimski bispiridinijevi analozi TMB-4 također su evaluirani kao potencijalni reaktivatori ljudske AChE. Neooksimski piridinijev prsten supstituiran je na poziciji 4 s različitim skupinama (Slika 15, struktura C) ili je zamijenjen s heteroaromatskim prstenom (Slika 15, struktura D). Od svih sintetiziranih i evaluiranih monooksimskih analoga, jedino je spoj **C1 (K027)** bio učinkovitiji od TMB-4 u *in vitro* reaktivaciji tabunom inhibirane ljudske AChE ($k_r = 376 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$).¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ ponajviše zbog približno 6 puta povećanog afiniteta inhibiranog enzima (K_{OX} (**K027**) = $0,085 \text{ mmol dm}^{-3}$) u usporedbi s afinitetom prema TMB-4 (K_{OX} (TMB-4) = $0,49 \text{ mmol dm}^{-3}$) (Slika 16).



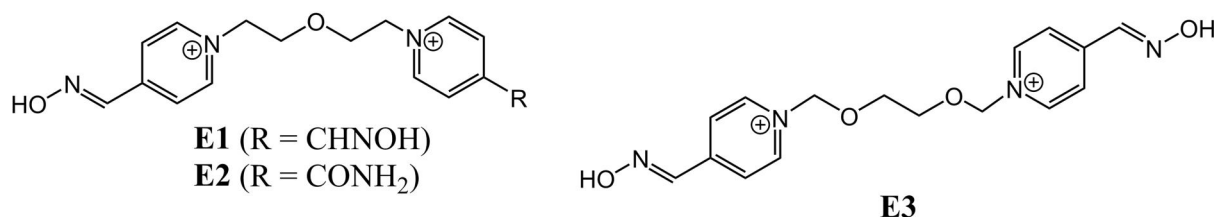
Slika 15. Analozi trimedoksima (TMB-4) evaluirani u reaktivaciji tabunom inhibirane AChE.



Slika 16. Kristalna struktura kompleksa spoja **C1** (**K027**) i mišje AChE (PDB kod 2WHR).¹⁰²

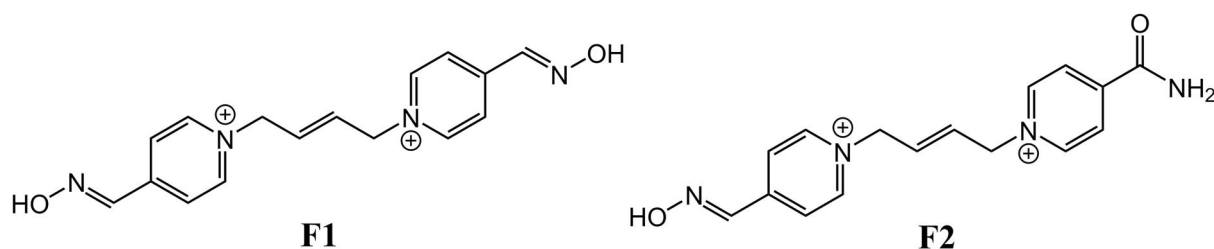
Također, evaluirane su i modifikacije struktura obidoksima. Evaluacija spojeva **E1** (**K117**) i **E2** (**K127**) (Slika 17) pokazala je da su oba spoja učinkovita u reaktivaciji tabunom inhibirane ljudske AChE (k_r (**E1**) = 179 dm³ mol⁻¹ min⁻¹, (k_r (**E2**) = 168 dm³ mol⁻¹ min⁻¹),¹⁰⁷ ali manje od TMB-4 (k_r = 306 dm³ mol⁻¹ min⁻¹).¹⁰⁸ Simetrični bispiridinijev aldoksim s dva kisikova atoma u lancu između dva piridinijeva prstena **E3** pokazao je neznatno bolju

reaktivacijsku učinkovitost u slučaju sarinom inhibirane ljudske AChE nego 2-PAM (41 % reaktivacije nakon 10 min; 1 mmol dm⁻³ **E3**, 34 % reaktivacije nakon 10 min; 1 mmol dm⁻³ 2-PAM).¹⁰⁹



Slika 17. Strukture reaktivatora s jednim ili dva kisikova atoma u lancu između dva piridinijeva prstena.^{108,109}

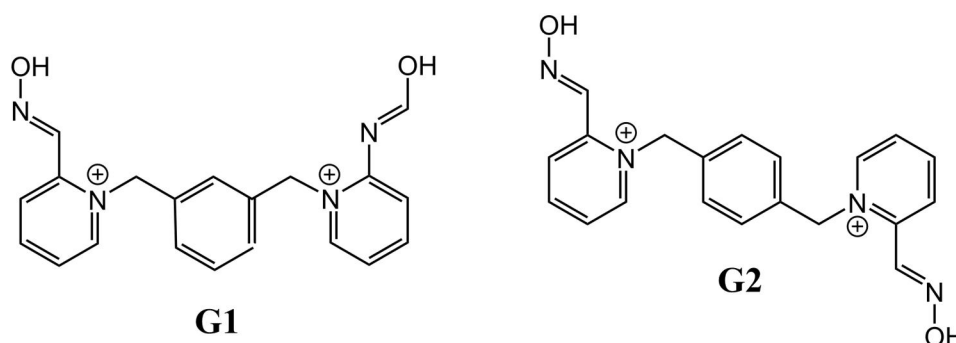
Također, proučavano je i stabiliziranje konformacije oksima umetanjem jednostruko nezasićene veze u lanac za povezivanje dvaju piridinijevih prstena. U usporedbi sa svojim zasićenim analogom **B** (n = 4) (**K074**), **F1** (**K075**) (Slika 18) je 1,5 puta učinkovitiji u reaktivaciji tabunom inhibirane AChE štakora ($k_r = 2\,947\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) zbog većeg afiniteta fosfiliranog enzima (K_{OX} (**K074**) = $29 \pm 3\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$, K_{OX} (**F1**) = $19 \pm 2\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$).¹⁰⁵ Zanimljivo, supstitucija jedne oksimske skupine s karbamoilnom skupinom više od tri puta povećava učinkovitost spoja **F2** (**K203**) ($k_r = 16\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) u odnosu na **F1** u reaktivaciji tabunom inhibirane AChE štakora.¹¹⁰ **F2** također je učinkovitiji od TMB-4 u reaktivaciji tabunom inhibirane ljudske AChE ($k_r = 1\,806\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$).¹⁰⁷



Slika 18. Reaktivatori s (*E*)-but-2-enskim lancem između dvaju piridinijevih prstenova.¹⁰⁵

S namjerom povećanja afiniteta inhibiranog enzima prema reaktivatoru preko kation- π ili π - π interakcija sintetizirani su i proučavani i bispiridinijevi spojevi sa ksilenskim linkerom. Spojevi **G1-2** (Slika 19) šest puta su manje učinkoviti od TMB-4 u reaktivaciji tabunom inhibirane ljudske AChE.¹¹¹ Svejedno, spoj **G2** je pokazao bolju reaktivacijsku učinkovitost u

slučaju sarinom inhibirane ljudske AChE nego 2-PAM ili obidoksim (45 % reaktivacije nakon 10 min; 1 mmol dm⁻³ **G2**, 34 % reaktivacije nakon 10 min; 1 mmol dm⁻³ 2-PAM, 24 % reaktivacije nakon 10 min; 1 mmol dm⁻³ obidoksim).¹¹²



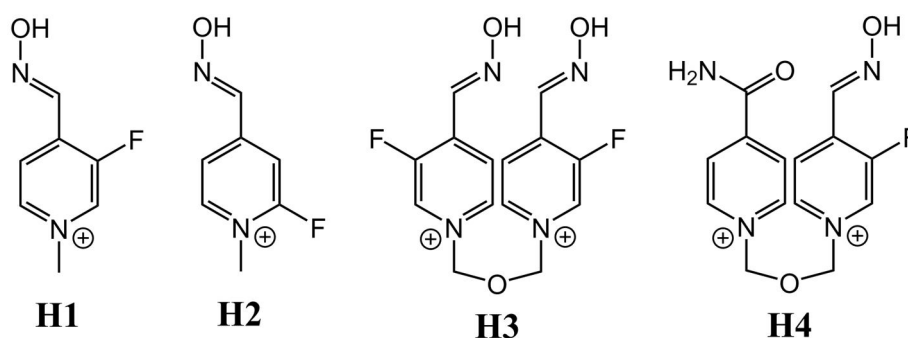
Slika 19. Reaktivatori sa ksilenskim linkerom između dva piridinijeva prstena.¹¹¹

2.3.2. Oksimski reaktivatori nove generacije i novi pristupi u terapiji kod trovanja organofosfornim spojevima

Organofosforne živčani bojni otrovi kao male lipofilne molekule mogu lako proći kroz krvno-moždanu barijeru slobodnom difuzijom i stoga inhibirati AChE u središnjem živčanom sustavu. Međutim, obično korišteni reaktivatori su stalno nabijeni kationski spojevi koji zbog toga teško prolaze krvno-moždanu barijeru.¹¹³ Krvno-moždana barijera sastoji se od endotelijalnog sloja stanica koji odvaja krv i izvanstaničnu tekućinu u mozgu. Čvrsti spojevi između endotelijalnih stanica i ograničena pinocitička aktivnost čine krvno-moždanu barijeru gotovo nepropusnom za viruse, bakterije, proteine i polarne molekule.^{114,115} Stoga, oksimi mogu reaktivirati AChE u perifernom živčanom sustavu, ali nisu učinkoviti u središnjem živčanom sustavu. Posljedično, oksimi pružaju malu ili nikakvu zaštitu protiv neuroloških efekata izloženosti organofosfornim spojevima koji uključuju napade, konvulzije i promjene u ponašanju i psihičkom stanju. Ovo je potaknulo razvoj oksimskih reaktivatora koji mogu prijeći krvno-moždanu barijeru i poništiti utjecaj organofosfornih spojeva na AChE u središnjem živčanom sustavu.

Pretpostavljeno je da bi uvođenje atoma fluora u heterociklički prsten piridinijevih oksima trebalo povećati njihovu lipofilnost. Povećana lipofilnost trebala bi olakšati prolaz kroz krvno-moždanu barijeru povećavajući posredno njihovo područje djelovanja *in vivo*. Tako fluorinirani *N*-metil-4-piridinijev oksim **H1** (Slika 20) pokazuje veću permeabilnost

nego 4-PAM te 2,5 odnosno 2,2 puta veću reaktivacijsku učinkovitost u slučaju paraoksonom inhibirane AChE kućne muhe, odnosno AChE iz goveđih eritrocita (Tablica 2).¹¹⁸ Fluorinirani oksimi **H3** i **H4** pokazali su veću reaktivacijsku učinkovitost u slučaju paraoksonom inhibirane AChE kućne muhe od obidoksima, odnosno HI-6, dok su u slučaju paraoksonom inhibirane AChE goveđih eritrocita veću reaktivacijsku učinkovitost pokazali obidoksim, odnosno HI-6.¹¹⁶



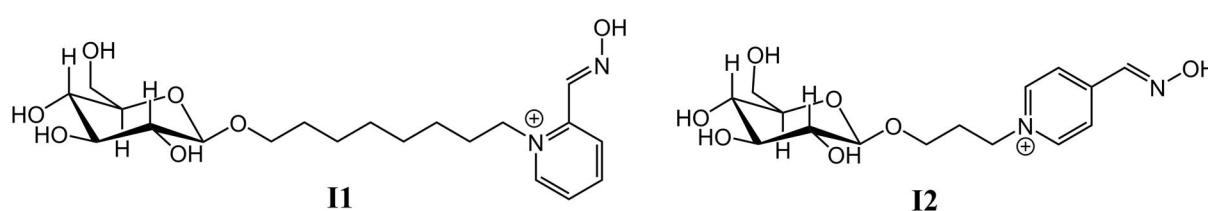
Slika 20. Fluorinirani mono- i biskvaterni piridinijevi aldoksimi.¹¹⁶

Tablica 2. Učinkovitost fluoriniranih mono- i biskvaternih piridinijevih aldoksima **H1-4** u reaktivaciji paraoksonom inhibiranih AChE.¹¹⁶

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	Izvor enzima	OP	Reakt _{max} / %	t / min
H1	5	kućna muha	paraokson	19	60
4-PAM	5	kućna muha	paraokson	7,5	60
H1	5	goveđi eritrociti	paraokson	46	60
4-PAM	5	goveđi eritrociti	paraokson	21	60
H3	5	kućna muha	paraokson	50	60
H4	5	kućna muha	paraokson	22	60
LüH-6	5	kućna muha	paraokson	33	60
HI-6	5	kućna muha	paraokson	4,6	60
H3	5	goveđi eritrociti	paraokson	41	60
H4	5	goveđi eritrociti	paraokson	30	60
LüH-6	5	goveđi eritrociti	paraokson	78	60
HI-6	5	goveđi eritrociti	paraokson	48	60

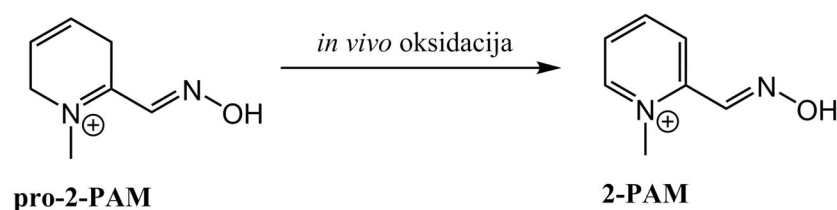
Nadalje, sintetizirani su i konjugati oksima i šećera jer se smatra da takvi spojevi olakšano prolaze krvno-moždanu barijeru zbog prepoznavanja glukozne jedinice od strane

glukoznih transportera.¹¹⁷ Najučinkovitiji konjugat šećera i oksima, spoj **I1** (Slika 21) pokazao je reaktivacijsku učinkovitost prema diizopropil-fosforofloridatom (DFP) (80 % reaktivacije nakon 20 min; 26,46 mmol dm⁻³ **I1**) i paraoksonom (85 % reaktivacije nakon 20 min; 26,46 mmol dm⁻³ **I1**) inhibiranoj ljudskoj AChE sličnu onoj 2-PAM-a (100 % reaktivacije nakon 20 min; 26,46 mmol dm⁻³ 2-PAM) dok je spoj **I2** pokazao značajnu reaktivacijsku učinkovitost prema DFP-om (70 % reaktivacije nakon 20 min; 26,46 mmol dm⁻³ **I2**) i paraoksonom (50 % reaktivacije nakon 20 min; 26,46 mmol dm⁻³ **I2**) inhibiranoj ljudskoj BChE.¹⁵



Slika 21. Konjugati šećera i oksima.¹⁵

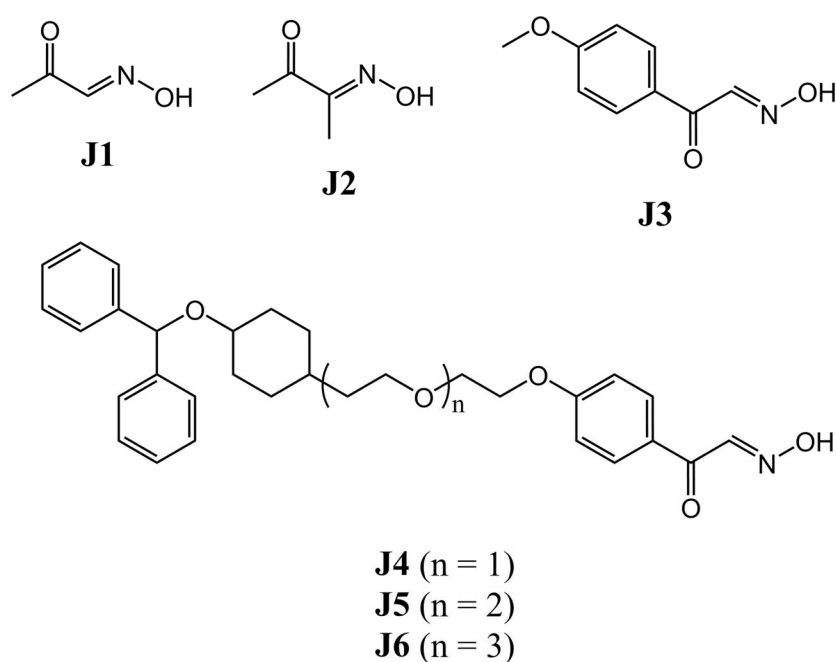
Drugi pristup prolaženja reaktivatora krvno-moždanom barijerom se temelji na korištenju prolijeka 2-PAM-a pri čemu je nabijeni piridinijev prsten zamijenjen sa značajno manje nabijenom dihidropiridilnom skupinom.^{118,119} Jednom kada prođe krvno-moždanu barijeru, pro-2-PAM (Slika 22) brzo podliježe oksidaciji u mozgu dajući funkcionalni aktivni kvaterni oksim 2-PAM koji onda može reaktivirati organofosfornim živčanim bojnim otrovom inhibiranu AChE u središnjem živčanom sustavu.



Slika 22. *In vivo* oksidacija pro-2-PAM-a.¹¹⁸

Najnoviji pristup korišten za povećanje prolaznosti krvno-moždane barijere za oksime odnosi se na sintezu nenabijenih reaktivatora koji su sposobni pasivnim transportom proći krvno-moždanu barijeru i reaktivirati AChE središnjeg živčanog sustava. Prvi ispitani oksimi ovog tipa bili su ranije sintetizirani monoizonitrozo acetoni **J1** (MINA) i diacetilmonooksim

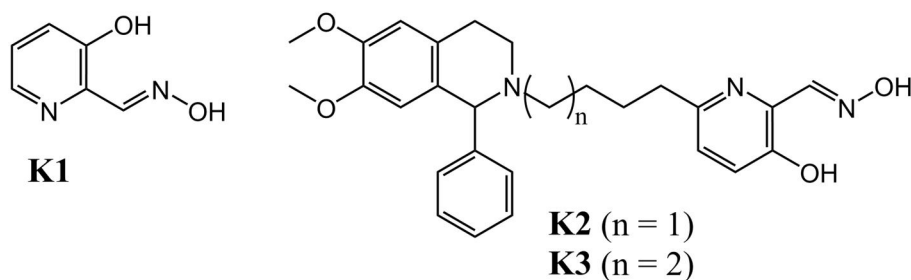
J2 (DAM) s ketoaldoksimskom ili ketoksimskom skupinom kao reaktivatorskom skupinom (Slika 23). Međutim, iako ovi oksimi (MINA) i prolaze krvno-moždanu barijeru, njihova *in vitro* reaktivacijska učinkovitost u slučaju trovanja ŽBO puno je manja nego ona 2-PAM-a i drugih kvaternih oksima.^{14,120} de Koning i suradnici predložili su povezivanje reaktivacijske α -ketoaldoksimske skupine s piperidinskom veznom skupinom za periferno mjesto kako bi se povećao afinitet AChE za vezanje ovih oksima (Slika 23).¹⁶ Hibridi **J4-6** pokazuju značajno povećanje reaktivacijske učinkovitosti 25-36 % reaktivacije sarinom inhibirane ljudske AChE nakon 30 min, 0,1 mmol dm⁻³ oksim; 37 % reaktivacije VX-om inhibirane ljudske AChE nakon 30 min, 0,1 mmol dm⁻³ oksim) u usporedbi s referentnim spojem **J3** (5 % reaktivacije sarinom inhibirane ljudske AChE nakon 30 min, 0,1 mmol dm⁻³ oksim), ali su još uvijek nedovoljno učinkoviti u usporedbi sa klasičnim piridinijevim oksimima.



Slika 23. Neutralni reaktivatori: α -ketoaldoksimi i ketoksimi.^{16,120}

Neutralni piridinaldoksime **K1** (Slika 24) pokazuje visoku maksimalnu konstantu brzine reaktivacije u slučaju VX-om inhibirane ljudske AChE k_{+2} (Tablica 3), ali uz nizak afinitet inhibiranog enzima prema **K1**.¹²¹ Povezivanjem ovog oksima s feniltetrahydroizokinolinom (veznom skupinom za periferno mjesto) u spoj **K2-3** povećan je afinitet inhibiranog enzima i učinkovitost u reaktivaciji VX-om inhibirane ljudske AChE i tabunom inhibirane ljudske AChE. Brzine reaktivacije izjednačile su te čak i premašile one za

HI-6, obidoksim i HLö-7.¹⁷ Na primjer, **K3** je jednako učinkovit u reaktivaciji VX-om inhibirane ljudske AChE kao i HLö-7 koji je trenutno najbolji bispiridinijev oksimski reaktivator VX-om inhibirane ljudske AChE. Spoj **K3** također je učinkovitiji u reaktivaciji tabunom inhibirane AChE nego TMB-4 i **F2 (K203)** koji su trenutno najbolji bispiridinijevi oksimski reaktivatori tabunom inhibirane ljudske AChE.

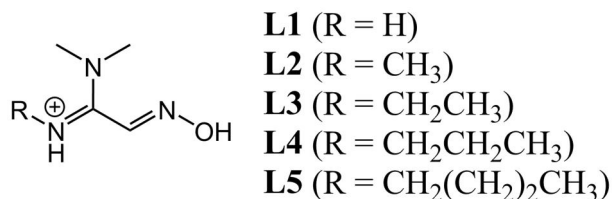


Slika 24. Konjugati fenil-tetrahidroizokinolina i piridinaldoksima.¹⁰⁹

Tablica 3. Učinkovitost piridinaldoksima K1 i njegovih konjugata s fenil-tetrahidroizokinolinom u reaktivaciji ŽBO inhibiranom ljudskom AChE.¹⁰⁹

Oksim	k_{+2} / min^{-1}	$K_{\text{ox}} / \text{mmol dm}^{-3}$	$k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$	OP
K1	$0,5 \pm 0,1$	30 ± 10	17 ± 6	VX
K2	$0,8 \pm 0,2$	$0,05 \pm 0,02$	$17\,450 \pm 8\,170$	VX
K3	$0,35 \pm 0,05$	$0,006 \pm 0,003$	$58\,330 \pm 30\,330$	VX
K2	$0,042 \pm 0,006$	$0,025 \pm 0,09$	$1\,680 \pm 600$	tabun
K3	$0,015 \pm 0,002$	$0,005 \pm 0,002$	$3\,000 \pm 1260$	tabun
HLö-7	0,49	0,0078	62 820	VX
TMB-4	$0,15 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,20$	306 ± 131	tabun
F1 (K203)	$0,13 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	$1\,800 \pm 490$	tabun

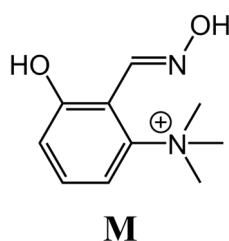
Iako su amidin-oksimski reaktivatori **L1-5** (Slika 25) manje učinkoviti od 2-PAM-a u reaktivaciji AChE *in vitro*, zbog veće lipofilnosti očekuje se da će u mozgu biti prisutni u puno višoj koncentraciji. Istraživanja su pokazala da ovi oksimi (**L3-4**) mogu biti učinkoviti *in vivo* i zaštititi od trovanja ŽBO djelovanjem na središnji živčani sustav.¹²²



Slika 25. Amidin-oksimski reaktivatori.¹²²

Pored nepropusnosti krvno-moždane barijere počesto je reaktivacija fosfilirane AChE oksimom ograničena zbog reinhibicije reaktivirane AChE neizreagiranim organofosfornim spojem koji ostaje cirkulirati u krvotoku. Kako bi se izbjegao ovaj problem, uveden je koncept bioloških čistila (molekule koje uklanjaju organofosforne spojeve iz cirkulacije).¹³ Intravenozno injektirana u krvotok visoko pročišćena ljudska BChE može poslužiti kao biološko čistilo koje je učinkovito u slučaju predtretmana ili nakon trovanja s organofosfornim spojevima.²⁷ Kombinacijom učinkovitog oksimskog reaktivatora fosfilirane BChE i pročišćene ljudske BChE moguće je smanjiti potrebnu količinu BChE potrebnu za zaštitu razvojem tzv. pseudo-katalitičkog čistila.¹²³

Nedavno su Radić i suradnici sintetizirali i ispitati novu seriju nepiridinijevih reaktivatora s egzocikličkim kvaternim dušikovim atomom i hidroksilnom skupinom na aromatskom prstenu i proučavali njihovu reaktivaciju ljudske BChE inhibirane VX-om, ciklosarinom i paraoksonom.¹²³ Između sintetiziranih spojeva, **M** (2-trimetilamonij-6-hidroksibenzaldehid oksim) (Slika 26) je pokazao 3-5 puta veću *in vitro* reaktivacijsku učinkovitost u slučaju VX-om ($k_r = 1\,300\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$), ciklosarinom ($k_r = 3\,700\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) i paraoksonom ($k_r = 480\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) inhibirane ljudske BChE u usporedbi s klasičnim reaktivatorom 2-PAM-om.

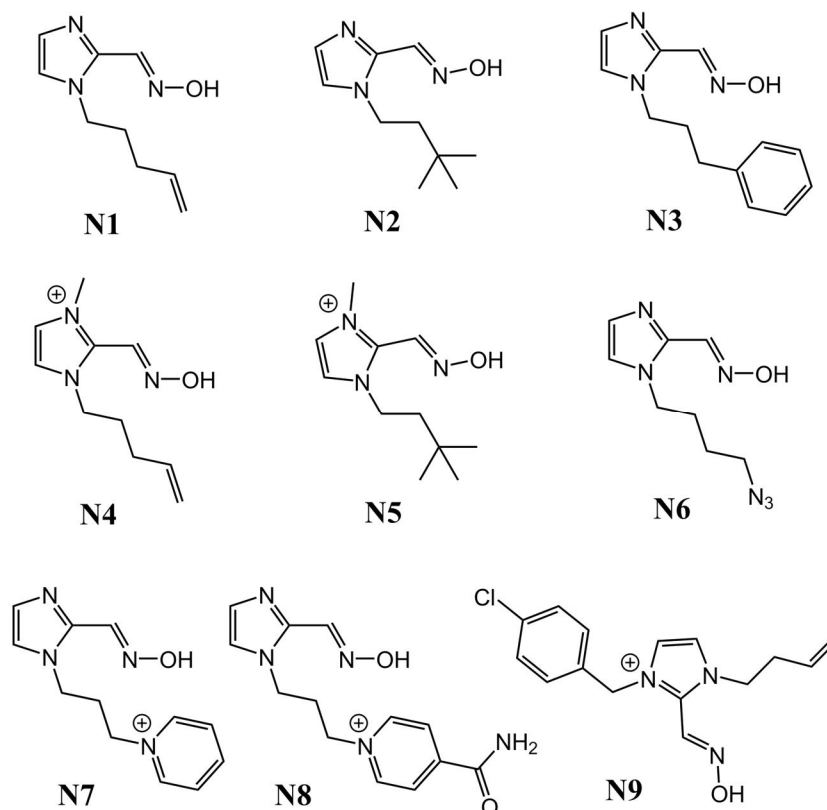


Slika 26. Nepiridinijev oksimski reaktivator s egzocikličkim kvaternim dušikovim atomom.¹²³

Nadalje, nova serija kvaternih i nekvaternih imidazolijevih aldoksima (**N1-7**), (Slika 27) proučavana je u reaktivaciji ljudske BChE inhibirane paraoksonom, sarinom,

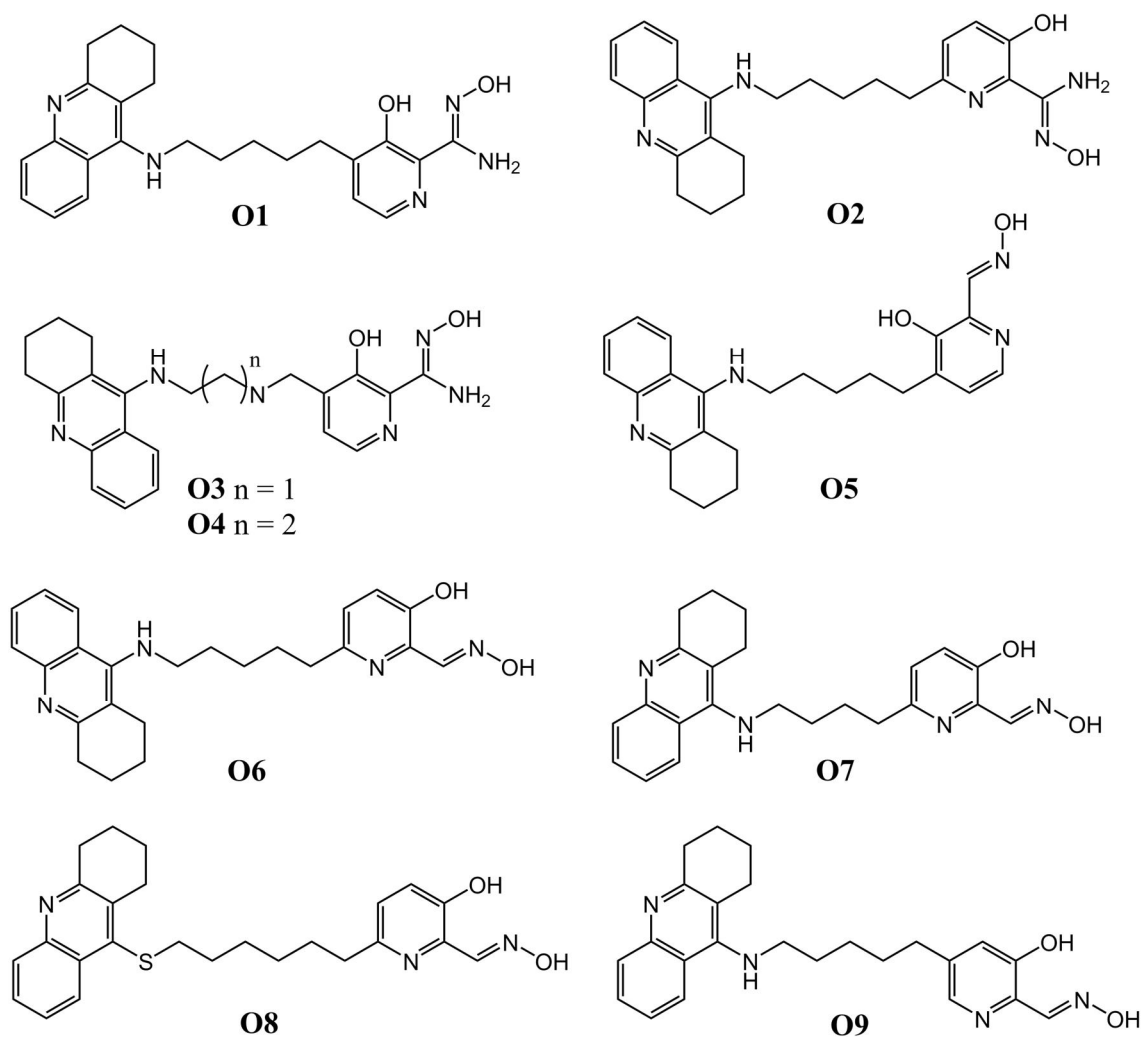
ciklosarinom i VX-om.¹²⁴ Između proučavanih reaktivatora spoj **N1** pokazao je najveću reaktivacijsku učinkovitost u slučaju sarina (k_{obs} (konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima) = $0,75 \text{ min}^{-1}$; $0,67 \text{ mmol dm}^{-3}$ **N1**) i ciklosarina ($k_{\text{obs}} = 6,0 \text{ min}^{-1}$; $0,67 \text{ mmol dm}^{-3}$ **N1**), dok je spoj **N2** pokazao visoku učinkovitost u slučaju paraoksiona ($k_{\text{obs}} = 0,86 \text{ min}^{-1}$; $0,67 \text{ mmol dm}^{-3}$ **N2**) i VX-a ($k_{\text{obs}} = 3,0 \text{ min}^{-1}$; $0,67 \text{ mmol dm}^{-3}$ **N2**). Smanjena reaktivacijska učinkovitost kvaternih *N*-metil imidazolijevih analoga (**N4-5**) u odnosu na tercijarne imidazolijeve aldoksime (**N1-2**) pripisana je ionskoj interakciji Asp70 s kationskim centrom imidazolijevog prstena spojeva **N4-5** koja udaljava oksimsku skupinu od atoma fosfora.¹²⁴

U potrazi za oksimskim reaktivatorom fosfilirane BChE koji bi doprinio razvoju učinkovitijeg tzv. pseudo-katalitičkog čistila Katalinić i suradnici nedavno su ispitali reaktivacijsku učinkovitost nove serije 1,3-disupstituiranih imidazolijevih i benzimidazolijevih oksima u slučaju paraoksonom, tabunom i VX-om inhibirane AChE i BChE.¹²⁵ Između proučavanih reaktivatora posebno se istaknuo spoj **N9** (Slika 27) kao visoko učinkovit reaktivator VX-om inhibirane BChE ($k_r = 6\,900 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) više od 20 puta učinkovitiji od HI-6 ($k_r = 330 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$).



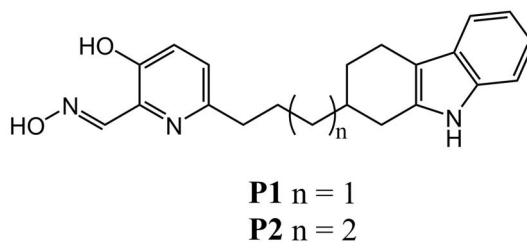
Slika 27. Imidazolijevi aldoksimski reaktivatori.^{124,126}

Kliachyna i suradnici sintetizirali su seriju nenabijenih funkcionalnih reaktivatora fosfilirane kolinesteraze uključujući heterodimere tetrahidroakridina s 3-hidroksi-2-piridin aldoksimima i amidoksimima (**O1-9**) (Slika 28).¹²⁶ Novosintetizirani oksim **O7** pokazao je visoku *in vitro* reaktivacijsku učinkovitost u slučaju VX-om ($k_r = 22\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$), tabunom ($k_r = 3\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) i paraoksonom ($k_r = 31\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) inhibirane ljudske AChE.



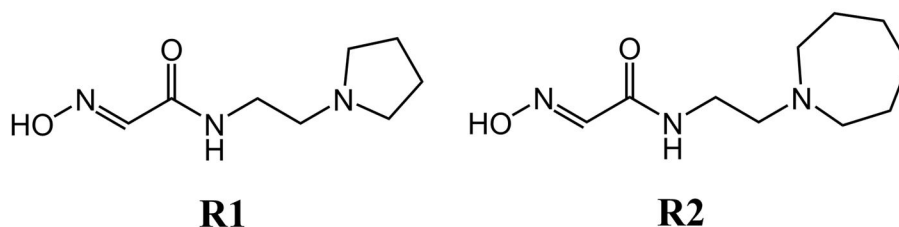
Slika 28. Nenabijeni hibridi tetrahidroakridina s 3-hidroksi-2-piridin aldoksimima i amidoksimima.¹²⁸

Renou i suradnici proširili su istraživanje i objavili sintezu dvaju reaktivatora (**P1-2**) (Slika 29) inhibirane ljudske BChE i ljudske AChE.¹²⁷ Spoj **P2** pokazao se 30 puta učinkovitijim u reaktivaciji VX-om inhibirane ljudske BChE ($k_r = 15\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) nego obidoksim ili 2-PAM. **P2** se pokazao jednako učinkovitim u reaktivaciji tabunom inhibirane ljudske AChE ($k_r = 600\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ min}^{-1}$) poput **TMB-4**.



Slika 29. Derivat triptolin-3-hidroksipiridinaldoksima.¹²⁷

U nenabijene reaktivatore ubrajaju se i *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamidi koji nemaju stalni naboj, ali su istovremeno podložni protoniranju.^{18,22} *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamid **R1** pokazao se učinkovitim u reaktivaciji ljudske AChE inhibirane sarinom ($k_r = 340 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ciklosarinom ($k_r = 88 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i VX-om ($k_r = 670 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Slika 30) iako je manje učinkovit nego 2-PAM.¹²⁸ Razlog tome je nizak afinitet fosfilirane AChE prema spoju **R1**. Uvećavanjem heterocikličkog prstena za dva ugljikova atoma (**R2**) povećan je broj interakcija između spoja i aminokiselina u perifernom mjestu te je na taj način povećana učinkovitost spoja u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom ($k_r = 1\,300 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ciklosarinom ($k_r = 230 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i VX-om ($k_r = 1\,600 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$). U slučaju reaktivacije ciklosarinom inhibirane ljudske AChE spoj **R2** se pokazao više od dva puta učinkovitijim od 2-PAM-a.



Slika 30. *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamidi učinkoviti u reaktivaciji AChE inhibirane sarinom, ciklosarinom i VX-om.¹²⁸

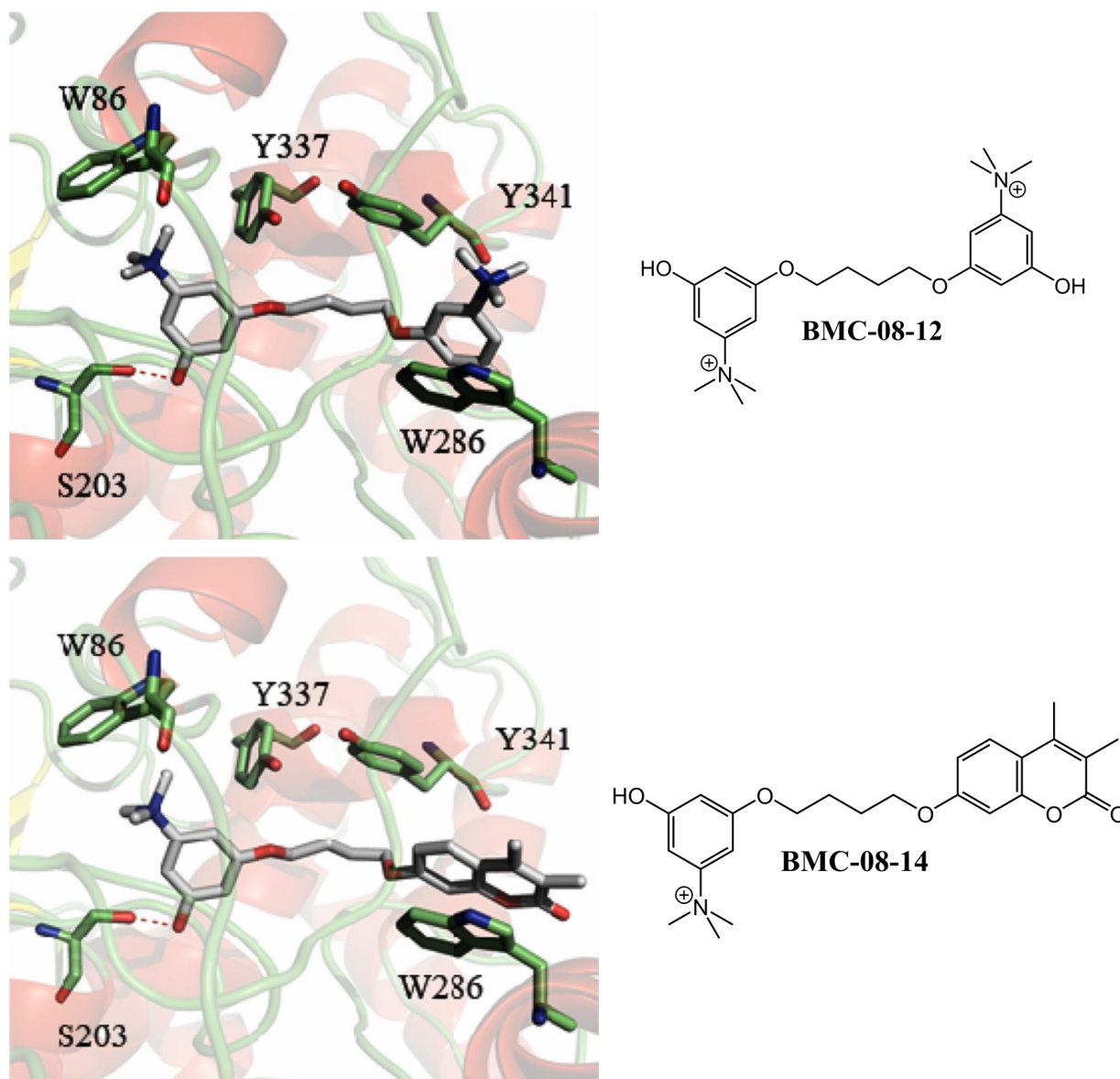
2.4. Molekulsko modeliranje

Računalne metode molekulskog pristajanja (engl. *molecular docking*) i tzv. ocjenjivačke funkcije (engl. *scoring functions*) kao dio područja tzv. *in silico* metoda široko su rasprostranjene metode koje se koriste u različitim fazama otkrivanja novih lijekova i to: (1) predviđanje vezne orijentacije poznatog biološki aktivnog liganda, (2) identifikaciju novih

liganada korištenjem virtualnog probira (engl. *screening*), te (3) predviđanje afiniteta vezanja srodnog liganda na temelju serije poznatih aktivnih liganada. Zasebno ili u kombinaciji s tradicionalnijim pristupima identifikacije tzv. vodećeg spoja (engl. *lead compound*) (npr. *high-throughput screening*, kombinatorna kemija) korištenje *in silico* metoda učinilo je identifikaciju vodećeg spoja jednostavnijom, bržom i ekonomičnijom.¹²⁹ Među najkorištenijim metodama virtualnog probira je molekulsko pristajanje koje je uspješno korišteno za predviđanje veznih orijentacija i afiniteta vezanja mnogih potencijalnih enzimskih inhibitora i receptorskih antagonista. Predviđanje vezne orijentacije određenog spoja unutar aktivnog mjesta neke biološke makromolekule metodom molekulskog pristajanja postiže se izvođenjem određenog broja pokušaja smještavanja spoja i zadržavanja onih orijentacija koje su energetske najpovoljnije. Ovo uključuje nalaženje ispravne orijentacije i konformacije smještavanog spoja pretraživanjem svih translacijskih i rotacijskih stupnjeva slobode. Pretraživanje se zaustavlja jednom kada je postignut određen broj pokušaja ili pronađen određen broj orijentacija. Kako bi se pretražio što veći konformacijski prostor, razvijeni su posebni algoritmi koji bilježe lokalne minimume i usmjeravaju pretragu prema neistraženom konformacijskom prostoru. Odluka o zadržavanju isprobane orijentacije donosi se na temelju izračunate energije interakcije spoja i makromolekule pri toj orijentaciji. Zadržane orijentacije na kraju su rangirane prema ocjeni koja se temelji na nekoj funkciji energije poput polja sila s elektrostatskim članom i članom koji opisuje van der Waalove privlačne i odbojne sile. Virtualni probir metodom molekulskog pristajanja razvijen je i uspješno primijenjen na velik broj farmaceutski važnih bioloških makromolekula.¹²⁹

U literaturi su opisani brojni primjeri istraživanja potencijalnih inhibitora kolinesteraza korištenjem metode molekulskog pristajanja.¹³⁰⁻¹³³ Metodom molekulskog pristajanja najčešće se istražuju utjecaji kation- π , π - π i ostalih neveznih interakcija između nabijenih i aromatskih skupina inhibitora i elektronima bogatih aminokiselina Trp86 i Trp286 iz katalitičkog, odnosno perifernog veznog mjesta AChE.¹³⁴ Leonetti i suradnici metodom molekulskog pristajanja proučavali su smještavanje visokopotentnog reverzibilnog inhibitora AChE između novosintetiziranih monokvaternih i biskvaternih edrofonijevih i kumarinskih amonijevih soli; **BMC-08-12** ($IC_{50} = 1,7 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$) (Slika 31).¹³⁴ Najbolje ocijenjena vezna orijentacija **BMC-08-12** ($50,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) karakterizirana je kation- π interakcijom između trimetilamonijeve skupine i elektronima bogatog bočnog lanca Trp86, visoko specifičnom vodikovom vezom između fenilne hidroksilne skupine i kisikovog atoma

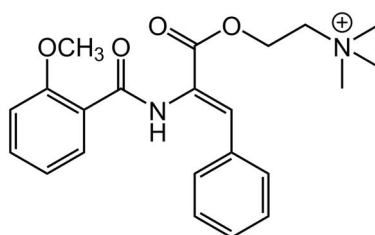
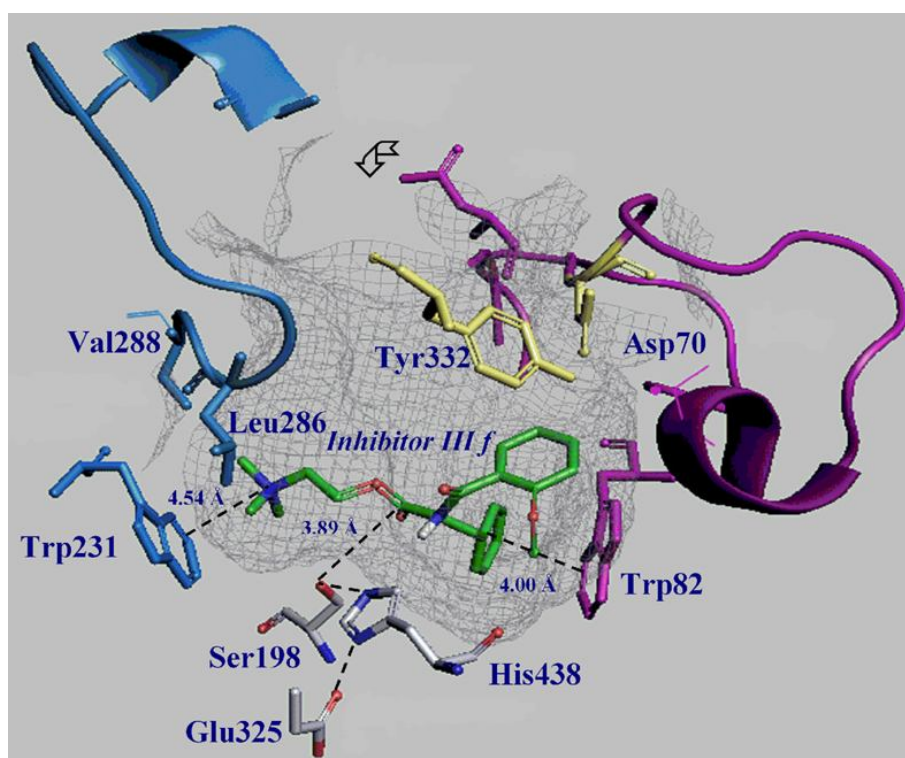
hidroksilne skupine Ser203 i mogućom π - π interakcijom između aromatske skupine liganda i aromatskih prstenova Trp286. Također, najbolje ocijenjena vezna orijentacija najpotentnijeg hetero-bivalentnog inhibitora **BMC-08-14** okarakterizirana je sličnom veznom orijentacijom osim što je π - π interakcija između kumarinske skupine vjerojatno slabija od kombiniranih π - π i kation- π interakcija koje uključuju fenil-trimetilamonijevu skupinu.¹³⁴



Slika 31. Najbolje ocijenjena orijentacija spojeva **BMC-08-12** i **BMC-08-14** u aktivnom mjestu ljudske AChE dobivena metodom molekulskog pristajanja. Crvena crtkana linija označava vodikovu vezu. Preuzeto iz ref. 134.

Metodom molekulskog pristajanja također je moguće dobiti uvid u različite načine smještanja istog liganda s obzirom na to da li se smješta u aktivno mjesto AChE ili aktivno mjesto BChE i tako objasniti razlike u eksperimentalnim rezultatima. Grigoryan i suradnici

metodom molekuskog pristajanja ustanovili su da se α,β -dehidrofenilalanin kolinski ester **CBC-171-08-III_f** u aktivno mjesto BChE veže u orijentaciji koju karakterizira usmjerenost dvaju benzenskih prstena prema Trp82 i Tyr332 dok je pozitivno nabijena amonijeva skupina stabilizirana Trp231 (Slika 32).¹³⁵ Ova orijentacija smjestila je estersku skupinu 3,89 Å od Ser198 što je prevelika udaljenost za hidrolizu esterske veze zbog čega je ovaj ester inhibitor, a ne supstrat BChE. Druge orijentacije spoja **CBC-171-08-III_f** u aktivnom mjestu BChE su također moguće što omogućava istovremenu prisutnost **CBC-171-08-III_f** i supstrata unutar aktivnog mjesta zbog čega se ovaj spoj ponaša kao mješoviti kompetitivni/nekompetitivni inhibitor. Orijentacija **CBC-171-08-III_f** u aktivnom mjestu AChE potpuno je drugačija i karakterizirana izduženom konformacijom liganda duž ždrijela aktivnog mjesta. Dva benzenska prstena okupiraju ulaz u ždrijelo aktivnog mjesta pri čemu je jedan benzenski prsten u interakciji s Trp286 i Tyr72, a drugi sa Ser293 i Tyr341. Na ovaj način spoj blokira ulazak u ždrijelo aktivnog mjesta AChE zbog čega djeluje kao kompetitivni inhibitor.



CBC-171-08-III f

Slika 32. Najbolje ocijenjena orijentacija spoja **CBC-171-08-III f** u aktivnom mjestu ljudske BChE dobivena metodom molekuskog pristajanja. Crtkane linije označavaju vodikove veze i kation- π interakciju. Preuzeto iz ref. 135.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sve reakcije sinteze spojeva izvedene su u inertnoj atmosferi argona osim ako nije drugačije naznačeno. Tetrahidrofuran (THF) destiliran je uz dodatak litijevog aluminijevog hidrida. Sva ostala otapala nabavljena su iz komercijalnih izvora i korišteni bez pročišćavanja. Svi korišteni reagensi kupljeni su od proizvođača *Sigma-Aldrich*, SAD: 3-fenilprop-2-en-1-ol ($\geq 98\%$), 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) ($\geq 98\%$), Cl_3CCN ($\geq 98\%$), di-*tert*-butildikarbonat ($\geq 97\%$), 9-borabicyklo[3.3.1]nonan (9-BBN) ($0,5\text{ mol dm}^{-3}$ u THF-u), difenilfosforil-azid (DPPA) ($\geq 97\%$), trifluoroctena kiselina (TFA) ($\geq 99\%$), etil-glioksalat (50 %-tna otopina u toluenu), hidroksilamin-hidroklorid ($\geq 99\%$), 2-metoksietoksimetil-klorid (MEM-Cl) (tehnička čistoća), benzotriazoliloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP) ($\geq 97\%$), 2-metilimidazol ($\geq 99\%$), propargil bromid (80%-tna otopina u toluenu, p.a.), imidazol-2-karbaldehid ($\geq 97\%$), bakrov(II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{ H}_2\text{O}$) (p.a.), natrijev askorbat ($\geq 98\%$). Lipaza iz *Candida antarctica* na akrilnom nosaču (Novozym 435, 10000 U/g) kupljena je od proizvođača *Sigma-Aldrich*, SAD. Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography* – TLC) izvođena je na aluminijskim pločicama silikagela (60 F25, *Merck*, Njemačka) pri čemu su za vizualizaciju korišteni ultraljubičasto svjetlo ($\lambda = 254\text{ nm}$) ili tzv. fosfomolibdeni kiseli reagens ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \times x\text{H}_2\text{O}$ (25 g) + $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (7,5 g) + H_2SO_4 (25 mL) + H_2O (495 mL). Kromatografija na stupca izvođena je na silika gelu (Silica gel 60, 70-230 veličina otvora sita, Fluka, SAD) ili na aluminijevom oksidu (Aluminiumoxide 90 active, neutralni, aktivnost I, *Merck*, Njemačka). Praćenje tijeka reakcija HPLC-om izvedeno je na Shimadzu 10A VP HPLC sistemu; kolona: Nucleosil 100-5 C18, 250 mm x 4,6 mm kolona, eluens A: H_2O , MeOH, H_3PO_4 (85 %) = 90:10:0.5, eluens B: MeOH, gradijentna metoda: 10/100/100/10 % B u vremenskim intervalima 0/20/25/27 min, 1 mL/min, $\lambda=200\text{-}400\text{ nm}$. HPLC analize kiralnih spojeva u kromatografiji normalnih faza izvedene su na Shimadzu Prominence HPLC sustavu (pumpa LC-20AT, degazer DGU-20A5, UV detektor SPD-20A). Semi-preparativne HPLC kromatografije izvedene su na Knauer sustavu (pumpa Knauer 64, degazer 4-Port Knauer Degasser, sučelje Interface Knauer, UV detektor Knauer Variable Wavelength Monitor i CD detektor Jasco CD-2095). ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV 300 spektrometru

(7 T, 300 MHz, SAD). Kemijski pomaci (δ_H i δ_C) izraženi su u dijelovima po milijunu (ppm) u odnosu na tetrametilsilan (TMS). Analiza spektrometrijom masa izvedena je na HPLC sustavu spregnutim s trostrukim kvadropolnim masenim spektrometrom uz ionizaciju pozitivnim elektroraspršenjem. (engl. *Mass Spectrometry – Positive Electrospray Ionisation*, MS/+ESI). Analiza spektrometrijom masa s visokim razlučivanjem (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) izvedena je na 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer sustavu.

3.2. Priprava spojeva

3.2.1. Priprava *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamida (**2**)¹³⁶

U otopinu 3-fenilprop-2-en-1-ola (2,52 g; 18,8 mmol) u suhom CH_2Cl_2 u atmosferi Ar dodan je DBU (0,56 mL; 3,7 mmol). U ohlađenu otopinu polako je dokapan Cl_3CCN (2,0 mL; 19,9 mmol). Nakon 10 min otapalo je upareno i ostatak profiltriran na stupcu Al_2O_3 u pokretnoj fazi 10% EtOAc/heksan. Sirovi 3-fenilprop-2-en-1-il-2,2,2-trikloracetimidat (**1**) (4,93 g; 94 %) dobiven uparavanjem filtrata otopljen je u ksilenu (100 mL) i u otopinu dodan K_2CO_3 (0,20 g). Reakcijska smjesa grijana je uz povrat 20 h. Otapalo je zatim upareno i ostatak profiltriran preko stupca silikagela u pokretnoj fazi CH_2Cl_2 /heksan = 4/1. Uparavanjem filtrata dobiven je *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamid (**2**) (4,52 g; 92 %; lit. 97 %). Spoj **2** potvrđen je snimanjem ^1H NMR spektra koji je u skladu s literaturom.¹³⁶

3.2.2. Priprava 1-fenilprop-2-en-1-amina (**3**)¹³⁶

U otopinu spoja **2** (4,52 g; 16,2 mmol) u EtOH (80 mL) dodana je 5 mol dm^{-3} vodena otopina NaOH (80 mL). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 20 h i zatim uparena do vodenog ostatka koji je zakiseljen s 5 mol dm^{-3} HCl do pH ~1 i ekstrahiran tri puta s CH_2Cl_2 (80 mL). Vodeni sloj je zalužen s praškastim Na_2CO_3 do pH ~9 i ekstrahiran tri puta s EtOAc (80 mL). Spojeni organski slojevi su sušeni na Na_2SO_4 , profiltrirani i upareni do konačnog produkta 1-fenilpro-2-en-1-amina (**3**) (1,54 g; 71 %; lit. 73 %). Spoj **3** potvrđen je snimanjem ^1H NMR spektra koji je u skladu s literaturom.¹³⁶

3.2.3. Priprava *tert*-butil-1-fenilalilkarbamata (**4**)

U otopinu **3** (1,11 g; 8,3 mmol) u suhom THF-u (50 mL) u atmosferi Ar dodan je Et₃N (1,3 mL; 9,3 mmol). U ohlađenu otopinu polako je dokapana otopina di-*tert*-butildikarbonata (2,0 mL; 8,7 mmol) u suhom THF-u (25 mL). Reakcijska smjesa je miješana 2 h na sobnoj temperaturi i zatim uparena do sirovog produkta koji je pročišćen na stupcu silikagela u pokretnoj fazi CH₂Cl₂/heksan = 4/1 do konačnog produkta *tert*-butil-1-fenilalilkarbamata (**4**) (1,81 g; 93%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7,37–7,24 (5H; m; Ph); 5,99 (1H; ddd; J = 5,4 Hz; 10,1; 17,2 Hz; CHCH₂); 5,32–5,25 (1H; m; CHNH); 5,22 (2H; m; CH₂CH); 4,86 (1H; br s; NH); 1,44 (9H; s; C(CH₃)₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ ppm: 155,01; 141,06; 137,97; 128,64; 127,49; 127,00; 115,43; 79,68; 56,64; 28,35

3.2.4. Priprava 3-[*N*-(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-fenilpropan-1-ola (**5**)

U otopinu **4** (0,35 g; 1,5 mmol) u suhom THF-u (10 mL) u atmosferi Ar polako je dokapana 0,5 mol dm⁻³ otopina 9-BBN-a u THF-u (9,0 mL; 4,5 mmol). Nakon 72 h u reakcijsku smjesu je dodana 3 mol dm⁻³ vodena otopina NaOH (1,5 mL) i zatim polako dokapana 30 %-tna otopina H₂O₂ (1,5 mL). Nakon 1 h dodana je zasićena otopina NaCl (10 mL) i reakcijska smjesa ekstrahirana dva puta s EtOAc (15 mL). Organski slojevi su spojeni, sušeni nad Na₂SO₄, profiltrirani i otapalo upareno do sirovog produkta koji je pročišćen na stupcu silikagela u pokretnoj fazi DCM/MeOH = 25/1 do konačnog produkta 3-[*N*-(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-fenilpropan-1-ola (**5**) (0,33 g; 88%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7,36–7,32 (2H; m; Ph); 7,31–7,25 (3H; m; Ph); 5,02 (1H; br s; CHNH); 4,90 (1H; br s; NH); 3,71–3,67 (2H; m; CH₂OH); 3,10 (1H; br s; OH); 2,11–2,02 (1H; m; CH₂CH₂OH); 1,87–1,79 (1H; m; CH₂CH₂OH); 1,44 (9H; s; C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ ppm: 156,40; 142,00; 128,76; 127,47; 126,40; 79,98; 59,04; 51,59; 39,48; 28,32.

3.2.5. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-*N*-(*tert*-butoksikarbonil)amina (**6**)

U otopinu **5** (0,108 g; 0,43 mmol) u suhom toluenu (3 mL) u inertnoj atmosferi dodan je DPPA (120 μ L; 0,56 mmol) i zatim polako dokapan 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (84 μ L; 0,56 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 h i zatim zagrijana na 90 °C. Nakon 2h reakcijska smjesa je ohlađena, razrijeđena s 20 mL EtOAc i isprano redom zasićenim otopinama NaHCO₃, NaCl i vodom. Organski sloj je sušen nad Na₂SO₄, profiltriran i uparen do sirovog 3-azido-1-fenilpropan-1-*N*-(*tert*-butoksikarbonil)amina (**6**) (0,137 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ /ppm: 7,37–7,32 (2H; m; Ph); 7,30–7,24 (3H; m; Ph); 4,92 (1H; br s; CHNH); 4,77 (1H; br s; NH); 3,34–3,24 (2H; m; CH₂N₃); 2,09–1,96 (2H; m; CH₂CH₂N₃); 1,42 (9H; s; C(CH₃)₃).

3.2.6. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (**7**)

U ohlađenu otopinu sirovog **6** (0,122 g) u CH₂Cl₂ (4 mL) polako je dokapana TFA (170 μ L). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 h i zatim razrijeđena s CH₂Cl₂ (10 mL) i ekstrahirana dva puta vodom (50 mL). Vodeni sloj je zalužen praškastim Na₂CO₃ i zatim ekstrahiran tri puta s EtOAc (30 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su nad Na₂SO₄, profiltrirani i otapalo upareno do konačnog produkta 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (**7**) (0,056 g; 83 % iz **5**).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ /ppm: 7,38–7,24 (5H; m; Ph); 4,03 (1H; t; *J* = 6,9 Hz; CHNH₂), 3,30 (2H; m; CH₂N₃); 1,93 (2H; m; CH₂CH₂CH); 1,71 (2H; br s; NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ /ppm: 145,25; 128,72; 127,37; 126,18; 53,63; 48,76; 38,11.

3.2.7. Priprava etil-gliksalat-oksima (**8**)

U suspenziju 50 %-tne otopine etil-gliksalata u toluenu (7,53 g; 36,9 mmol) i hidroksilamin-hidroklorida (2,56 g; 36,9 mmol) u CH₃CN/H₂O = 9/1 (30 mL) nakon 5 min polako je dokapan Et₃N (5,2 mL; 36,9 mmol). Nakon 1 h otapalo je upareno i u ostatak dodana voda

(10 mL) i EtOAc (30 mL). Organski sloj je ispran sa zasićenom otopinom NH_4Cl i vodom, sušen nad Na_2SO_4 i uparen do konačnog produkta etil-glioksalat-oksima (**8**) (3,61 g; 83 %).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ /ppm: 12,54 (1H; s; NOH); 7,55 (1H; s; CHNOH); 4,20 (2H; q; $J = 7,2$ Hz; CH_2CH_3); 1,24 (3H; t; $J = 7,2$ Hz; CH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ /ppm: 162,24; 140,93; 60,66; 14,00.

3.2.8. Priprava etil-2-[(metoksietoksimetoksi)imino]acetata (**9**)

Diizopropil-etil-eter (DIPEA) (1,2 mL; 7,0 mmol) je dodana u otopinu spoja **8** (0,51 g; 4,3 mmol) u DCM-u (10 mL) u inertnoj atmosferi. Na sobnoj temperaturi MEM-Cl dodan je u dva obroka ($2 \times 0,4$ mL; 7,0 mmol) pri čemu je drugi obrok slijedio 3 sata nakon prvog. Reakcijska smjesa miješana je 18 sati nakon čega je dodan DCM (30 mL) i otopina redom ekstrahirana zasićenom vodenom otopinom NH_4Cl (15 mL) i vodom (15 mL). Organski sloj sušen je na Na_2SO_4 , profiltriran i uparen na sniženom tlaku (100 mbar). Sirovi produkt pročišćen je na stupcu silikagela (DCM-MeOH; 50:1, $R_f = 0,5$) dajući etil-2-[(metoksietoksimetoksi)imino]acetat (**9**) (0,74 g; 84 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,57 (1H, s, CH=NO); 5,34 (2H, s, OCH_2O); 4,32 (2H, q, $J = 7,2$ Hz, OCH_2CH_3); 3,82–3,77 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,58–3,53 (2H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,38 (3H, s, OCH_3); 1,34 (3H, t, $J = 7,2$ Hz, OCH_2CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 142,53; 99,12; 71,59; 68,74; 61,72; 59,01.

3.2.9. Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) i N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-(2-metoksietoksimetoksiimino)-acetamida (**10**) korištenjem lipaze B iz *Candida antarctica*

Ester **8** ili metoksietoksimetoksi (MEM) skupinom zaštićeni ester **9** (1,3 ekv.) dodan je u otopinu amina **7** (1 ekv.) u odabranome otapalu (5 mL/1 mmol amina). Zatim je dodana imobilizirana lipaza B iz *Candida antarctica* (0,3 g/1 mmol amina). Reakcijska smjesa miješana je na temperaturi danoj u Tablici 7 između 24 i 72 sata. Enzim je odfiltriran i ispran

reakcijskim otapalom. Matičnica je uparena pri sniženom tlaku i ostatak pročišćen na stupcu silikagela (heksan-EtOAc, 1:1).

N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**I**)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 11,89 (1H, s, NOH); 8,64 (1H, d, J = 8,7 Hz, NH); 7,48 (1H, s, CH=NOH); 7,36–7,19 (5H, m, Ar); 4,97 (1H, td, J = 5,7; 9,1 Hz, CHCH₂); 3,32 (2H, t, J = 6,8 Hz, CH₂CH₂N₃); 2,00 (2H, m, CH₂N₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 161,84; 144,24; 143,06; 128,86; 127,51; 126,92; 50,49; 48,58; 35,07; HRMS: izračunato za C₁₁H₁₃N₅O₂, 286,0701; nađeno 286,0698.

N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-(2-metoksietoksimetoksiimino)-acetamid (**10**)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,49 (1H, s, CH=NO); 7,38–7,34 (2H, m, Ar); 7,31–7,28 (3H, m, Ar); 6,93 (1H, d, J = 8,2 Hz, NH); 5,24 (2H, m, OCH₂O); 5,15 (1H, q, J = 7,9 Hz, CHCH₂); 3,77 (2H, td, J = 2,7; 4,7 Hz, OCH₂CH₂O); 3,55 (2H, t, J = 4,7 Hz, OCH₂CH₂O), 3,37 (3H, s, OCH₃); 3,30 (2H, m, CH₂CH₂N₃); 2,12 (2H, m, CH₂N₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 160,23; 144,44; 139,79; 128,49; 127,48; 126,07; 98,10; 71,06; 67,84; 58,53; 50,62; 47,90; 34,53.

Nakon reakcije estera **9** i amina **7** enzim je ispran s DCM-om i matičnica uparena pri sniženom tlaku dajući bijelu krutinu.

3-azido-1-fenilpropil amonijev 2-metoksietoksimetoksiiminoacetat (**11**)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,90 (3H, br. s, NH₃⁺); 7,51 (3H, m, Ar, CH=NO); 7,40–7,30 (3H, m, Ar); 5,14 (2H, m, OCH₂O); 4,38 (1H, dd, J = 5,8; 9,1 Hz, CHNH₃⁺); 3,72–3,66 (2H, m, OCH₂CH₂O); 3,43–3,38 (2H, m, OCH₂CH₂O); 3,38–3,31 (1H, m, N₃CH₂CH₂); 3,16 (3H, s, OCH₃); 3,13–3,03 (1H, m, CH₂CH₂N₃); 2,44–2,30 (1H, m, CH₂N₃); 2,22–2,08 (1H, m, CH₂N₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 166,90; 148,85; 137,26; 128,99; 128,81; 127,73; 97,12; 71,43; 67,16; 58,52; 53,12; 47,82; 33,31.

MS/+ESI (m/z): 132 ([C₆H₁₀NO₅–CO₂]⁺), 177 (C₉H₁₃N₄⁺).

3.2.10. Pretvorba soli **11** u amid **10**

BOP (270 mg, 0,61 mmol) je dodan u otopinu soli **11** (200 mg, 0,57 mmol) u dimetilformamidu (DMF) (4 mL) nakon čega je dodan Et₃N (88 µL, 0,63 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći. Zatim je razrijeđena s dietil-eterom (20 mL) i ekstrahirana redom sa zasićenom vodenom otopinom NH₄Cl i vodom. Organski sloj sušen je iznad Na₂SO₄, profiltriran, uparen pri sniženom tlaku i pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela (heksan-EtOAc, 1:1) dajući prozirno ulje **10** (123 mg, 65 %).

3.2.11. Priprava hidroksiiminooctene kiseline (**12**)

Otopina spoja **8** (3,66 g; 31,3 mmol) u 5 %-tnoj vodenoj otopini NaOH (60 mL) miješana je na sobnoj temperaturi preko noći i nakon toga zakiseljena s 5 mol dm⁻³ HCl do pH ~1 i ekstrahirana tri puta s EtOAc. Organski sloj sušen je nad Na₂SO₄, profiltriran i otapalo upareno do konačnog produkta hidroksiiminooctene kiseline (**12**) (2,33 g; 84 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12,56 (2H; br s; NOH; COOH); 7,45 (1H; s; CHNOH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 141,66; 163,84.

3.2.12. Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**)

Priprava N-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) amidacijom etil-glioksalat-oksima (**8**) (Tablica 6)

Etil-glioksalat-oksim (**8**) (1,3 ekv.) dodan je u otopinu amina **7** (1 ekv.) u odabranom otapalu (5 mL/1 mmol amina) nakon čega je dodana baza (1,2 ekv.) navedena u Tablici 6. Reakcijska smjesa miješana je na temperaturi navedenoj u Tablici 6 između 24 i 72 h. Napredak reakcije praćen je HPLC-om.

Priprava *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) upotrebom mikrovalnog (MW) zračenja (Tablica 6)

Amin **7** i ester **8** zatvoreni su u epruvetu. Smjesa je miješana dok nije postala homogena. Zatim je po potrebi dodana DIPEA (1 ekv.). Epruveta je smještena u mikrovalni reaktor i postavljeni su uvjeti: 25 W, temperature iz Tablice 6, 3 min (set), 30 min (hold). Napredak reakcije praćen je HPLC-om.

Priprava *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) amidacijom hidroksiiminooctene kiseline (**12**)

Otopini spoja **7** (0,610 g; 3,46 mmol) u DMF-u (20 mL) dodani su spoj **8** (0,308 g; 3,46 mmol) i BOP (1,836 g; 4,15 mmol). U dobivenu otopinu dokapan je Et₃N (530 µl; 3,80 mmol) u atmosferi argona. Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 2 h iza čega je razrijeđena sa zasićenom vodenom otopinom NH₄Cl i ekstrahirana s Et₂O. Organski sloj sušen je na bezvodnom Na₂SO₄ i uparen pri sniženom tlaku dajući sirovi produkt. Sirovi produkt pročišćen je na stupcu silikagela (heksan/etil-acetat, 1:1) dajući spoj **I** (0,546 g; 64 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 11,89 (1H, s, NOH); 8,64 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, NH); 7,48 (1H, s, CH=NOH); 7,36–7,19 (5H, m, Ar); 4,97 (1H, td, *J* = 5,7; 9,1 Hz, CHCH₂); 3,32 (2H, t, *J* = 6,8 Hz, CH₂CH₂N₃); 2,00 (2H, m, CH₂N₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 161,84; 144,24; 143,06; 128,86; 127,51; 126,92; 50,49; 48,58; 35,07.

HRMS: izračunato za C₁₁H₁₃N₅O₂, 286,0701; nađeno 286,0698.

*3.2.13. Priprava 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (**13**)*

U otopinu 2-metilimidazola (1,00 g; 10,51 mmol) u suhom THF-u (30 mL) u atmosferi Ar dodan je NaH (80 %-tna disperzija u mineralnim ulju) (0,450 g; 15,0 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 1 h te je zatim polako dokapana 80 %-tna otopina propargil bromida u toluenu (1,60 mL; 14,4 mmol) i miješanje nastavljeno preko noći. Reakcijska smjesa je

profiltrirana preko Büchnerovog lijevka uz sniženi tlak zraka i matičnica uparena do ostatka koji je pročišćen na stupcu silikagela u pokretnoj fazi DCM/MeOH = 9/1 do konačnog produkta 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (**13**) (0,940 g; 74 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ_{ppm} : 7,07 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, Ar); 6,72 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, Ar); 4,81 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, CH_2CCH); 3,43 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, CH_2CCH)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6), δ_{ppm} : 143,79; 126,30; 119,57; 78,63; 75,72; 34,74; 12,46.

3.2.14. Priprava 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehida (**14**)

U otopinu imidazol-2-karbaldehida (0,100 g; 1,04 mmol) i NaHCO_3 (0,175 g; 2,08 mmol) u DMF-u (4 mL) u atmosferi Ar dodana je 80 %-tna otopina propargil bromida u toluenu (230 μL ; 2,06 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na 70 °C 24 h i zatim razrijeđena s Et_2O i ekstrahirana s 0,5 mol dm^{-3} HCl. Vodeni sloj je zalužen s praškastim Na_2CO_3 do pH ~12 i ekstrahiran s Et_2O . Organski sloj je sušen nad Na_2SO_4 , profiltriran i uparen do konačnog produkta 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehida (**14**) (0,086 g; 62 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ_{ppm} : 9,83 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, CHO); 7,49 (1H, s, Ar); 7,34 (1H, d, $J = 0,9$ Hz, Ar); 5,27 (2H, d, $J = 2,6$ Hz, CH_2CCH); 2,55 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, CH_2CCH).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ_{ppm} : 182,15; 131,68; 128,24; 125,40; 75,27; 37,20.

3.2.15. Priprava 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (**15**)

U otopinu hidroksilamin hidroklorida (0,052 g; 0,75 mmol) u vodi (2 mL) dodan je NaOAc (0,061 g; 0,74 mmol) i **13** (0,100 g; 0,75 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na 70 °C 1 h, ohlađena te zatim nastali talog profiltriran preko Büchnerovog lijevka uz sniženi tlak i matičnica uparena do konačnog produkta 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (**15**) (0,052 g; 46 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ ppm: 11,59 (1H, s, CHNOH); 8,08 (1H, s, CHNOH); 7,39 (1H, d, J = 0.9 Hz, Ar); 7,05 (1H, d, J = 1.2 Hz, Ar); 5,16 (2H, d, J = 2,6 Hz, CH_2CCH); 3,44 (1H, t, J = 2,5 Hz, CH_2CCH).

3.2.16. Priprava *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**II**)

U otopinu *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) (0,735 g; 3,0 mmol) i etinilciklopentana (345 μL ; 3,0 mmol) u *tert*-BuOH/ H_2O = 2/1 (30 mL) u atmosferi Ar dodan je 0,5 mol dm^{-3} $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (aq) (60 μL ; 0,03 mmol) i 0,1 mol dm^{-3} natrijevog askorbata (aq) (3,0 mL; 0,3 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 30 min, zaluzena sa zasićenom otopinom K_2CO_3 i ekstrahirana tri puta s EtOAc (10 mL). Organski sloj je sušen nad Na_2SO_4 , profiltriran i uparen do ostatka koji je zatim pročišćen na stupcu silikagela u pokretnoj fazi DCM/MeOH = 14/1 do konačnog produkta *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**II**) (0,769 g; 76 %).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6), δ ppm: 11,91 (1H, s, NOH); 8,71 (1H, d, J = 8,6 Hz, NH); 7,80 (1H, s, Ar); 7,50 (1H, s, CHNOH); 7,39–7,18 (5H, m, Ph); 4,86 (1H, m, CHNH); 4,30 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$); 3,09 (1H, p, J = 7,9 Hz, $\text{CHC}(\text{CH})\text{N}$); 2,34 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$); 1,97 (2H, m, CHC_4H_8); 1,75–1,53 (6H, m, CHC_4H_8).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6), δ ppm: 161,39; 151,16; 143,74; 142,39; 128,34; 127,06; 126,45; 120,78; 50,04; 46,74; 36,15; 35,83; 32,74; 24,61.

3.2.17. Priprava *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**III**)

U otopinu *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) (0,500 g; 2,02 mmol) i 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (**13**) (0,243 g; 2,02 mmol) u *tert*-BuOH/ H_2O =2/1 (20 mL) u atmosferi Ar dodan je 0,5 mol dm^{-3} $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (aq) (40 μL ; 0,02 mmol) i 0,1 mol dm^{-3} natrijevog askorbata (aq) (2,0 mL; 0,2 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 30 min, zaluzena sa zasićenom otopinom K_2CO_3 i ekstrahirana tri puta s EtOAc (10 mL). Organski sloj je sušen nad Na_2SO_4 , profiltriran i uparen do ostatka koji je pročišćen na stupcu silikagela

u pokretnoj fazi DCM/MeOH=4/1 do konačnog produkta *N*-(3-(4-((2-metil-imidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**III**) (0,692 g; 93 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 11,99 (1H, s, NOH); 8,74 (1H, d, *J* = 9,1 Hz, NH); 8,02 (1H, s, Ar); 7,51 (1H, s, CHNOH); 7,37–7,22 (5H, m, Ph); 7,06 (1H, d, *J* = 1,0 Hz, Ar); 6,73 (1H, d, *J* = 0,9 Hz, Ar); 5,17 (2H, s, CCH₂N); 4,87 (1H, m, CHNH); 4,35 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂CHNH); 2,42 – 2,27 (5H, m, CCH₃, CH₂CH₂CHNH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 161,41; 143,77; 143,73; 143,10; 142,31; 128,36; 127,08; 126,42; 126,09; 123,30; 119,74; 49,92; 47,02; 40,52; 35,76; 12,66.

3.2.18. Priprava *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metil-imidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**)

U otopinu *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**) (0,355 g; 1,44 mmol) i 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid oksima (**15**) (0,215 g; 1,44 mmol) u *tert*-BuOH/H₂O=2/1 (15 mL) u atmosferi Ar dodan je 0,5 mol dm⁻³ CuSO₄ × 5 H₂O (aq) (30 μ L; 0,015 mmol) i 0,1 mol dm⁻³ natrijevog askorbata (aq) (1,5 mL; 0,15 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 1 h, zaljučena sa zasićenom otopinom K₂CO₃ i ekstrahirana tri puta s EtOAc (6 mL). Organski sloj je sušen nad Na₂SO₄, profiltriran i uparen do konačnog produkta *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**) (0,397 g; 77 %).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 8,75 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, NH); 8,10 (1H, s, CNCHNOH); 7,93 (1H, s, Ar); 7,49 (1H, s, COCHNOH); 7,35–7,21 (6H, m, Ar, Ph); 7,01 (1H, d, *J* = 1,1 Hz, Ar); 5,56 (2H, m, CCH₂N); 4,87 (1H, m, CHNH); 4,34 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₂CHNH); 2,32 (2H, m, CH₂CH₂CHNH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 161,60; 143,51; 143,13; 142,34; 141,07; 139,61; 128,99; 128,36; 127,08; 126,42; 123,38; 123,32; 49,92; 47,02; 41,92; 35,80.

3.2.19. Priprava (S)-1-fenilprop-2-en-1-amina ((S)-3)

U otopinu 1-fenilprop-2-en-1-amina (**3**) (0,636 g; 4,8 mmol) u izopropil-acetatu/heksanu = 6/1 (70 mL) dodana je imobilizirana lipaza B iz *Candida antarctica* (CAL-B) (1,4 g) i reakcijska smjesa miješana 43 h na 30 °C. Enzim je odfiltriran i ispran reakcijskim otapalom. Matičnica je uparena pri sniženom tlaku do uljastog ostatka koji je dispergiran u 10 mL 1 mol dm⁻³ HCl i ekstrahiran dva puta s DCM (30 mL). Vodeni sloj je zalužen s praškastim Na₂CO₃ do pH 9 i ekstrahiran tri puta s Et₂O (30 mL). Organski sloj je sušen nad Na₂SO₄, profiltriran i uparen do konačnog produkta (*S*)-1-fenilprop-2-en-1-amina ((*S*)-**3**) (0.231 g; 37 %).

3.2.20. Odjeljivanje enantiomera i određivanje apsolutne konfiguracije N-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida

Enantiomeri *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida pripravljenih u racemičnom obliku odijeljeni su kiralnom HPLC na Knauer HPLC sustavu (1 mL/min, 254 nm) pri čemu su korištene komercijalno dostupne polisaharidne kiralne nepokretne faze od 3,5-dimetilfenilkarbamata celuloze (Chiralcel OD, Daicel, Japan) i amiloze (Chiralpak AD, Daicel, Japan).¹³⁷ Apsolutna konfiguracija odijeljenih enantiomera *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida određena je usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida pripravljenih iz (*S*)-1-fenilprop-2-en-1-amina (Slika 33, Tablica 2). Enzimska rezolucija racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina izvedena je korištenjem CAL-B prema Kazlauskasovom pravilu.^{138,139}

Tablica 4. Retencijska vremena (t_r) i optička čistoća odijeljenih enantiomera *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida izražena putem enantiomernog viška (*e.v.*). *e.v.* predstavlja omjer razlike i sume molarnih udjela enantiomera u smjesi dvaju enantiomera. Protok pokretne faze je 1 mL/min, a valna duljina detekcije spojeva 254 nm.

Naziv spoja	Kiralna nepokretna faza	Metoda	Apsol. konfigur.	t_r /min	<i>e.v.</i>
(<i>R</i>)-I	Chiralpak AD	Ψ (heksan, etanol) = 90 : 10	<i>R</i>	10,4	96 %
(<i>S</i>)-I	Chiralpak AD		<i>S</i>	13,5	99 %
(<i>R</i>)-II	Chiralcel OD	Ψ (heksan, etanol) = 90 : 10	<i>R</i>	12,8	98 %
(<i>S</i>)-II	Chiralcel OD		<i>S</i>	16,1	98 %
(<i>R</i>)-III			<i>R</i>		98 %*
(<i>S</i>)-III			<i>S</i>		99 %*
(<i>R</i>)-IV	Chiralpak AD	Ψ (heksan, etanol, dietilamin) = 90 : 10 : 0,2	<i>R</i>	12,1	> 99 %
(<i>S</i>)-IV	Chiralpak AD		<i>S</i>	14,2	88 %

* *e.v.* se odnosi na odgovarajući enantiomer oksima **I** iz kojega je uz retenciju konfiguracije pripremljen oksim **III** za čije enantiomere nije bilo moguće postići potpuno razlučivanje dostupnim kiralnim kolonama.

3.3. Kinetička mjerenja

3.3.1. Pufer, supstrat i reagens

U svim pokusima korišten je 0,1 mol dm⁻³ natrijev fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen titracijom 0,1 mol dm⁻³ otopina soli Na₂HPO₄ i NaH₂PO₄, pri 25 °C. pH je određen korištenjem pH-metra SevenEasy pH s InLab[®] 413 elektrodom (*Mettler-Toledo GmbH*, Švicarska), baždarenim standardnom otopinom pufera pH 7,00 ± 0,02 i pH 9,21 ± 0,02 (*Mettler-Toledo GmbH*, Švicarska).

Kao supstrat kolinesteraza korišten je acetiltiokolin jodid (ATCh; *Sigma-Aldrich*, SAD). Ishodne i radne otopine supstrata pripremljene su otapanjem u natrijevom fosfatnom puferu pH 7,4 neposredno prije pokusa.

Reagens 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (DTNB) (6,0 mmol dm⁻³) (*Sigma-Aldrich*, SAD) koji je korišten za određivanje aktivnosti enzima Ellmanovom metodom¹⁴⁰ pripremljen je otapanjem u natrijevom fosfatnom puferu pH 7,4.

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

3.3.2. *N-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamidi i živčani bojni otrovi*

Ispitano je djelovanje novosintetiziranih *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida: *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**), *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**II**), *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**III**) i *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**) u racemičnom i enantiomernom obliku. Ishodne otopine oksima (100 mmol dm^{-3} ili 200 mmol dm^{-3}) priređene su u DMSO-u te su čuvane pri 4°C . Daljnja razrjeđenja oksima načinjena su u natrijevom fosfatnom puferu pH 7,4 prije pokusa. Živčani bojni otrovi tabun, ciklosarin, sarin i VX kupljeni su od *NC Laboratory, Spiez*, Švicarska. Ishodne otopine živčanih bojnih otrova ($5000 \text{ }\mu\text{g/mL}$) pripremljene su u izopropilnom alkoholu i čuvane pri 4°C , dok su daljnja razrjeđenja rađena u vodi prije pokusa.

3.3.3. *Enzimski preparati*

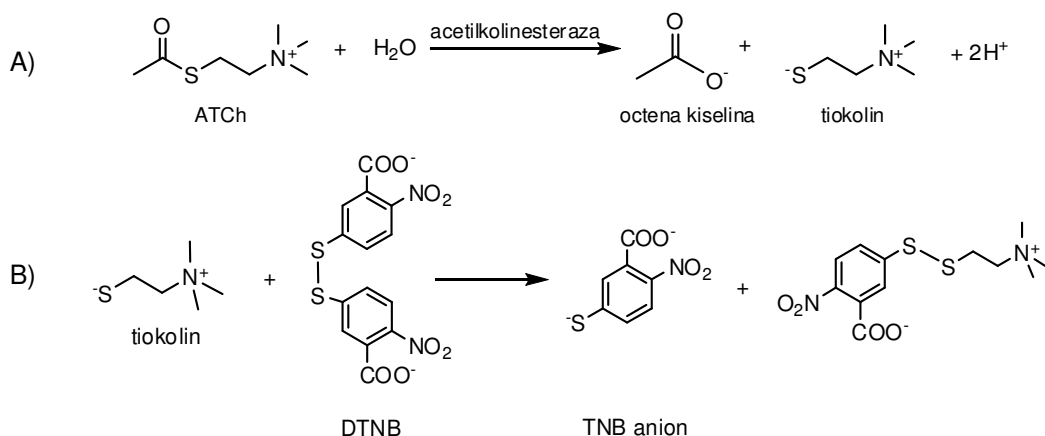
BChE izolirana iz konjskog seruma kupljena je od proizvođača *Sigma Chemical Co.*, SAD. Razrjeđenja konjske BChE rađena su u natrijevom fosfatnom puferu pH 7,4 neposredno prije eksperimenta. Rekombinantne ljudska AChE i ljudska pročišćena BChE pripremljene su u *Jean-Pierre Ebel Institute of Structural Biology (IBS)–DYNAMOP*, Grenoble, Francuska i poklon su dr. sc. Floriana Nachona. Enzimi su razrijeđeni u 1 %-tnoj i 0,1 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma (*Sigma-Aldrich*, SAD) u natrijevom fosfatnom puferu pH 7,4 prije eksperimenta.

3.3.4. *Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu*

Aktivnost kolinesteraza, AChE ili BChE, praćena je spektrofotometrijski metodom po Ellmanu koja se temelji na indirektnom mjerenju enzimske aktivnosti pri 25°C uz supstrat acetiltiokolina (ATCh) i DTNB kao tiolni reagens.¹⁴⁰ Naime, enzimskom hidrolizom tiokolinskog supstrata nastaje tiokolina (TCh) koji po nastanku reagira s tiolnim reagensom DTNB-om. U toj reakciji nastaje anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB^-) koji daje žuto

obojenje reakcijskoj smjesi. Porast apsorbancije prati se pri valnoj duljini od 412 nm i proporcionalan je aktivnosti enzima. Slika 34 prikazuje reakciju Ellmanove metode između tiokolina nastalog hidrolizom ATCh i DTNB-a. Sva mjerenja Ellmanovom metodom rađena su spektrofotometrom CARY 300 (*Varian Inc.* Australija) s termostatiranim kućištem pri 25 °C u kivetama s optičkim putem od 1 cm ili čitačem mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska) s optičkim putem od 0,8 cm.

Reakcijska smjesa za određivanje enzimske aktivnosti sadržavala je 0,3 mmol dm⁻³ DTNB, fosfatni pufer i enzim. Razrjeđenja enzima odabrana su tako da promjena absorbancije u vremenu ($\Delta A/\text{min}$) iznosi oko 0,1 kod koncentracije ATCh od 1,0 mmol dm⁻³ (25 °C, pH 7,4). Mjerenje enzimske aktivnosti započeto je dodatkom ATCh u reakcijsku smjesu do ukupnog volumena od 1,0 mL i trajalo je dvije minute. Kod svih uzoraka tijekom mjerenja promjena absorbancije bila je linearna s vremenom.



Slika 34. Ellmanova metoda: A) enzimskom hidrolizom acetiltiokolina oslobađa se tiokolin, B) tiokolin potom reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB).¹⁴⁰

3.3.5. Reverzibilna inhibicija kolinestara oksimima

3.3.5.1. Reverzibilna inhibicija kolinestara DMSO-om

Budući da su ishodne otopine oksima priređene u DMSO-u, prije ispitivanja učinka oksima na aktivnost AChE/BChE trebalo je ispitati učinak DMSO na enzimsku aktivnost i odrediti postotak DMSO za koji se pouzdano može odrediti da ne utječe na enzimsku aktivnost. Ispitan je učinak na DMSO-a na enzimsku aktivnost kolinestara korištenih za određivanje

reverzibilne inhibicije *N*-supstituiranim 2-hidroksiiminoacetamidima; rekombinantna ljudska AChE te BChE izolirana iz konjskog seruma. BChE izoliran iz konjskog seruma izabrana je radi dostupnosti i visoke homologije s ljudskom BChE (90,4 % identičan aminokiselinski slijed) zbog čega se ne očekuje razlika u inhibiciji dvaju enzima.¹⁴¹ Reakcijska smjesa za određivanje učinka DMSO-a na enzimsku aktivnost sadržavala je enzim otopljen u fosfatnom puferu, 0,3 mmol dm⁻³ DTNB, DMSO u rasponu konačnih udjela (0,2–1,0 %) i ATCh (0,1–0,3 mmol dm⁻³). Konačni volumen reakcijske smjese bio je 300 µL i enzimska reakcija je praćena 240 sekundi pri temperaturi 25 °C na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite M200PRO (*Tecan Group Ltd.*, Švicarska). Tijekom mjerenja je kod svih uzoraka promjena absorbancije bila linearna s vremenom. Izmjerene aktivnosti pri različitim udjelima DMSO-a podijeljene su s aktivnosti enzima bez prisustva DMSO-a pri istoj koncentraciji ATCh (kontrolna aktivnost) i dobivene vrijednosti prikazane kao postotci aktivnosti AChE/BChE (Tablica 5) prema jednažbi:

$$\% Akt = \frac{v_{(E+S+DMSO)}}{v_{(E+S)}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

gdje $v_{(E+S+DMSO)}$ predstavlja aktivnost enzima (odnosno $\Delta A/\text{min}$ enzimске hidrolize supstrata), za dani udio DMSO-a i koncentraciju supstrata, a $v_{(E+S)}$ aktivnost enzima (odnosno vrijednost $\Delta A/\text{min}$ enzimске hidrolize supstrata) za danu koncentraciju supstrata bez prisutstva DMSO-a. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da pri rasponu korištenih koncentracija ATCh (0,1–0,3 mmol dm⁻³) udio DMSO-a kod kojeg se može primjetiti snižavanje enzimске aktivnosti iznosi 0,1 %. Povećavanjem udjela DMSO-a u reakcijskoj smjesi enzimska aktivnost nastavlja se smanjivati. Zato je kako bi se minimizirao utjecaj DMSO-a na stupanj enzimске inhibicije, tijekom ispitavanja učinka oksima na aktivnost AChE/BChE konačni sadržaj DMSO-a u reakcijskoj smjesi držan ispod 0,1 % kad god je to topljivost ispitivanih oksima u natrijevom puferu dozvoljavala. Konačni sadržaj DMSO-a u reakcijskoj smjesi držan je konstantnim kad god je iznosio 0,1 % ili više pri rasponu konačnih koncentracija pojedinog oksima.

Tablica 5. Određivanje učinka udjela DMSO-a u reakcijskoj smjesi na enzimsku aktivnost rekombinantne ljudske AChE i konjske BChE. Navedeni postotci aktivnosti dobiveni su dijeljenjem izmjerenih aktivnosti AChE/BChE pri različitim udjelima DMSO-a (tri mjerenja) s aktivnosti enzima bez prisustva DMSO-a pri istoj koncentraciji ATCh (kontrolna aktivnost) (srednja vrijednost iz tri mjerenja) prema jednadžbi (1).

ϕ (DMSO) / %	enzimska aktivnost / %					
	AChE	BChE	AChE	BChE	AChE	BChE
	c (ATCh) = 0,1 mmol dm ⁻³		c (ATCh) = 0,2 mmol dm ⁻³		c (ATCh) = 0,3 mmol dm ⁻³	
0	100	100	100	100	100	100
0,2	76	82	82	89	88	93
0,5	56	67	59	74	60	77
1,0	33	55	40	62	44	67

3.3.5.2. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima

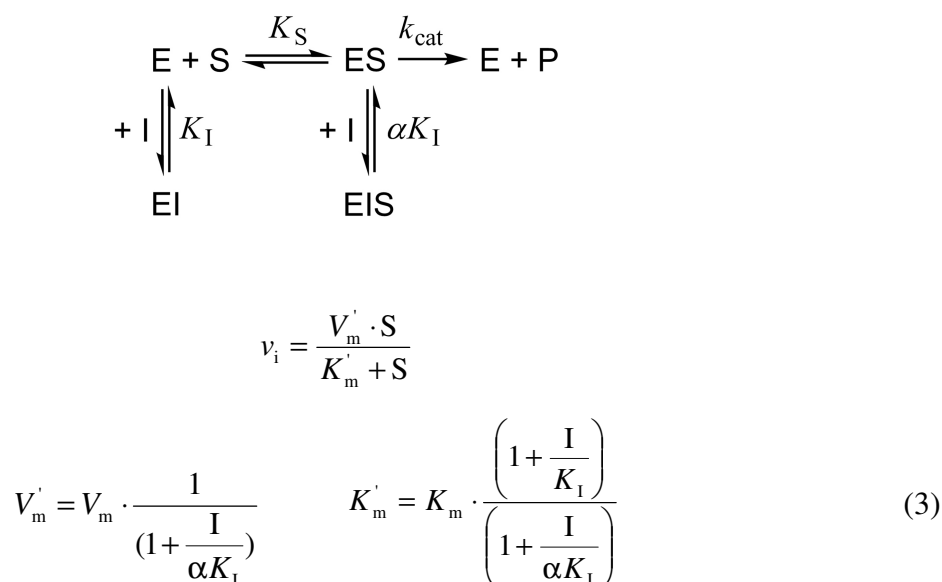
Reverzibilna inhibicija AChE/BChE *N*-supstituiranim 2-hidroksiiminoacetamidima određena je praćenjem smanjenja enzimске aktivnosti u prisutstvu supstrata ATCh. Koncentracijski raspon oksima za inhibiciju odabran je tako da pri svakoj korištenoj koncentraciji supstrata inhibicija kolinesteraze bude u rasponu od 20 % do 80 % kada to omogućava topljivost oksima u fosfatnom puferu. Za svaku koncentraciju supstrata izmjerena je aktivnost enzima uz barem tri koncentracije oksima. Aktivnosti enzima kada je u reakcijskoj smjesi prisutan oksim određena je iz izraza:

$$v_{(E+S)} = v_{(E+S+OX)} - v_{(S+OX)} \quad (2)$$

gdje $v_{(E+S)}$ predstavlja aktivnost enzima (odnosno $\Delta A/\text{min}$ enzimске hidrolize supstrata), $v_{(E+S+OX)}$ ukupnu izmjerenu aktivnost tj. $\Delta A/\text{min}$, a $v_{(S+OX)}$ neenzimsku reakciju (odnosno vrijednost $\Delta A/\text{min}$ neenzimске reakcije za danu koncentraciju oksima i supstrata). Reakcijska smjesa sadržavala je enzim otopljen u fosfatnom puferu, 0,3 mmol dm⁻³ DTNB, *N*-supstituirani 2-hidroksiiminoacetamid u rasponu konačnih koncentracija i ATCh (0,1–0,8 mmol dm⁻³). Konačni volumen reakcijske smjese bio je 300 μL i enzimska reakcija je praćena 240 sekundi pri temperaturi 25 °C na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan Infinite

M200PRO (Tecan Group Ltd., Švicarska). Konačni sadržaj DMSO-a držan je konstantnim kad god je dostizao 0,1 % u rasponu konačnih koncentracija pojedinog oksima te je za oksime **I**, **II** i **IV** redom iznosio 1,5 %, 0,2 % i 0,1 % u slučaju AChE, odnosno 0,2 %, 0,1 % i 0,05 % u slučaju BChE (konačni sadržaj DMSO-a za oksim **III** u oba slučaja nije prelazio 0,05 %) Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom ATCh u reakcijsku smjesu do ukupnog volumena od 300 μL i trajalo je dvije minute. Tijekom mjerenja je kod svih uzoraka promjena absorbancije bila linearna s vremenom.

Konstante inhibicije određene su analiziranjem eksperimentalnih podataka prema sljedećoj jednadžbi koja se temelji na modelu mještane inhibicije (Shema 1):



Shema 1. Model mještane inhibicije i odgovarajuća Michaelis-Mentenina jednadžba brzine enzimske reakcije (3) gdje je S koncentracija supstrata ATCh, I je koncentracija inhibitora (oksima), K_I je konstanta inhibicije (disocijacije) kompleksa enzima i oksima nastalog u katalitičkom mjestu, αK_I konstanta inhibicije (disocijacije) kompleksa oksima i Michaelisovog kompleksa nastalog na perifernom mjestu, K_m je konstanta disocijacije Michaelisovog kompleksa i V_m je maksimalna aktivnost.

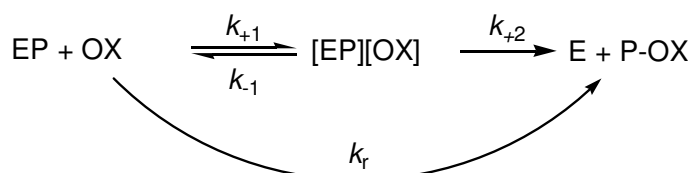
3.3.6. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima

Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza određena je praćenjem vremenskog tijeka povratka aktivnosti kolinesteraza inhibiranih živčanim bojnim otrovom u prisutnosti *N*-supstituiranog 2-hidroksiiminoacetamida. Rekombinatna ljudska AChE i pročišćena ljudska BChE razrijeđene u 1 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma u 0,1 mol dm⁻³ fosfatnom puferu

dodatno su razrijeđene u 0,01 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma u fosfatnom puferu (pH 7,4) i inhibirane s $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ živčanim bojnim otrovom (sarin, ciklosarin, VX) do postizanja 90-100 % inhibicije aktivnosti enzima. Nakon utvrđene inhibicije, suvišak bojnog otrova uklonjen je filtracijom kroz Strata® C18-E kolonice prema uputama proizvođača (*Phenomenex*, SAD). Alikvot tako razrijeđenog inhibiranog enzima nadalje je razrijeđen u fosfatnom puferu koji je sadržavao željenu koncentraciju oksima čime je i započet proces reaktivacije (reaktivacijska smjesa). U određenom vremenu (0-24 h) uzimani su alikvoti reaktivacijske smjese te su razrijeđeni 100 puta u smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, ukupnog volumena 1,0 mL, koja je sadržavala pufer i DTNB ($30 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Mjerenje aktivnosti metodom po Ellmanu započeto je dodatkom supstrata ATCh (konačne koncentracije $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) u reakcijsku smjesu do ukupnog volumena od 1,0 ml i trajalo je dvije minute. Tijekom mjerenja, kod svih uzoraka promjena absorbancije bila je linearna s vremenom. Identičan postupak proveden je i s neinhibiranim uzorkom enzima kako bi se utvrdile kontrolne vrijednosti aktivnosti enzima u prisutnosti ispitivanih koncentracija oksima. Umjesto organofosfornog spoja u kontrolni uzorak enzima dodan je odgovarajući volumen pufera.

Reaktivacija i kontrolna aktivnost praćene su pri 25°C kroz najviše 24 h u prisutnosti oksima u rasponu koncentracija. U ovim uvjetima aktivnost enzima je bila stabilna.

Reaktivacija se opisuje sljedećom shemom:



Shema 2. Kinetički model reaktivacije fosfiliranog enzima oksimskim reaktivatorom.

gdje EP predstavlja fosfilirani enzim, $[\text{EP}][\text{OX}]$ reverzibilni Michaelisov kompleks između EP i oksima (OX), E je slobodni enzim, P-OX fosfilirani oksim, k_{+2} je konstanta brzine reaktivacije prvog reda, a k_r ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda.

Reakcija reaktivacije (Shema 2) opisana je jednačbom:

$$\ln \frac{[\text{EP}]_0}{[\text{EP}]_t} = \frac{k_{+2} \cdot [\text{OX}]}{K_{\text{OX}} + [\text{OX}]} \cdot t = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (4)$$

gdje su $[EP]_0$ i $[EP]_t$ koncentracije fosfiliranog enzima u vremenu 0 odnosno u vremenu t , K_{OX} odgovara omjeru $(k_{-1}+k_{+2})/k_{+1}$ te aproksimira disocijacijsku konstantu $[EP][OX]$ kompleksa, k_{obs} je konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima.

Ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda, k_r , izražena je kao omjer:

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \quad (5)$$

Rezultati mjerenja izraženi su kao postotak reaktivacije enzima (*Reakt*):

$$Reakt = \frac{v_{(EP+OX)_t}}{v_{(E+OX)}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

gdje $v_{(EP+OX)_t}$ predstavlja aktivnost reaktiviranog enzima oksimom u vremenu t umanjenu za vrijednost neenzimske reakcije dok $v_{(E+OX)}$ predstavlja aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima (kontrolna aktivnost) umanjenu za vrijednost neenzimske reakcije. Rezultat dobiven za reaktivaciju oksimima korigiran je za udio spontane reaktivacije ukoliko je zamijećena. Tako je dobiven grafički prikaz ovisnosti postotka reaktivacije dobiven za pojedinu koncentraciju oksima (*Reakt*) o vremenu reaktivacije t . Nadalje, iz početnog linearnog dijela ovisnosti $\log(100-Reakt)$ o vremenu reaktivacije određena je k_{obs} za svaku koncentraciju oksima. Budući da $(100-Reakt)$ odgovara $100 \cdot [EP]_t/[EP]_0$, konstante k_{+2} i K_{OX} određene su ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima prema jednadžbi (4). Jednadžbom (5) izračunata je k_r .

Kada je $[OX] \ll K_{OX}$, pojedine konstante k_{+2} i K_{OX} se ne mogu odrediti jer jednadžba (4) prelazi u oblik:

$$\ln \frac{[EP]_0}{[EP]_t} = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \cdot [OX] \cdot t = k_r \cdot [OX] \cdot t \quad (7)$$

Kada je reakcija reaktivacije opisana jednadžbom (7), k_r je izračunata jednadžbom (8):

$$k_{obs} = k_r \cdot [OX] \quad (8)$$

3.3.7. Obrada rezultata

Obrada rezultata i računi, kao i grafovi izrađeni su pomoću računalnog programa *Graph Pad Prism 6.01* (*GraphPad Software, Inc., USA*) primjenom linearne ili nelinearne regresije.

3.4. Molekulsko modeliranje

Spojevi koji su metodom molekulskog pristajanja (engl. *molecular docking*) smješćavani u aktivno mjesto ljudske AChE i ljudske BChE dizajnirani su i minimizirani korištenjem MMFF94 (*Merck Molecular Forcefield 94*) polja sila implementiranog u ChemBio3D Ultra 12.0 (PerkinElmer, Inc., SAD). Za molekulsko pristajanje tako dizajniranih i minimiziranih oksima korišteno je CHARMm (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) polje sila^{142,143} implementirano u Dock Ligands protokolu (CDOCKER) računalnog paketa Accelrys Discovery Studio 2.5 (*Accelrys, SAD*). Kristalna struktura ljudske AChE (PDB: 1B41, 4PQE)⁴³ ili ljudske BChE (PDB: 2PM8)¹⁴⁴ korištena je kao rigidni receptor. U slučaju smješćavanja oksima u aktivno mjesto ciklosarinom inhibirane BChE kao receptor je korišten model napravljen preklapanjem kristalne strukture ljudske BChE (PDB: 2PM8)¹⁴⁴ i kristalne strukture mišje AChE inhibirane ciklosarinom (PDB: 3ZLU)¹¹ i translacijom ciklosarinskog dijela konjugata AChE i ciklosarina u aktivno mjesto BChE uvođenjem jednostruke veze između kisikovog atoma hidroksilne skupine Ser198 BChE s atomom fosfora iz konjugata AChE i ciklosarina. Vezno mjesto unutar AChE ili BChE definirano je najvećom šupljinom u enzimskoj strukturi okruženo sferom ($r = 13 \text{ Å}$). Sljedeći koraci uključeni su u CDOCKER protokol. Prvo je generiran set od 20 nasumičnih konformacija liganda za svaki testirani spoj. U sljedećem koraku zadržano je 20 nasumičnih orijentacija s energijom manjom od specifične granične vrijednosti koja je iznosila 30 vdW. Ovaj proces je nastavljen dok nije pronađen željeni broj konformacija dovoljno niske energije ili nije dostignut maksimalan broj loših orijentacija. Vrijednost maksimalnog broja loših orijentacija iznosila je 800. U sljedećem koraku svaka orijentacija podvrgnuta je molekulskoj dinamici metodom simuliranog kaljenja (engl. *simulated annealing*). Temperatura je povećana na 700 K i zatim spuštana na 310 K. Broj ponavljanja zagrijavanja i hlađenja tijekom simuliranog kaljenja postavljeni su na 2 000, odnosno 5 000. Za poboljšanje simuliranog kaljenja korišteno je proširenje mreže (engl. *grid extension*) (8,0 Å). U sljedećem koraku korištenjem punog potencijala (engl. *full potential*)

izvedena je konačna minimizacija svake poboljšane poze liganda u rigidnom receptoru. Na kraju, za svaku konačnu pozu izračunane su CHARMM energija (zbroj interakcijske energije i napetosti liganda) i interakcijska energija zasebno. Poze su sortirane po CHARMM energiji i 20 najbolje ocijenjenih (najnegativnijih, dakle najpovoljnijih za vezanje) je zadržano. Odabrane poze za svaki kompleks enzim-ligand minimizirane su korištenjem Minimization protokola sa Smart Minimizer algoritmom. Primijenjeni algoritam izvodi 1000 koraka metode najstrmijeg spusta s iznosom vrijednosti tolerancije RMS gradijenta 3 iza čega slijedi minimizacija metodom konjugiranog gradijenta s vrijednostima maksimalnih koraka (Max Steps) i RMS gradijenta koje iznose 500 i 0,01. Pritom je korišten implicitni model otapala “*Generalized Born with Molecular Volume*”.^{145,146} Nepolarna površina korištena je za procjenu nepolarne komponente solvacijske energije. Dielektrična konstanta implicitnog otapala iznosila je 80. Vrijednost granične udaljenosti (engl. *distance cutoff*) korištena za brojanje nevezanih interakcijskih parova namještena je na 14,0 Å.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Računalno dizajniranje novih oksimskih reaktivatora

Pregledom literature može se uvidjeti da su u dosadašnjim istraživanjima i razvoju učinkovitijih reaktivatora fosfilirane AChE strukture novih reaktivatora bile izvedene iz već postojećih reaktivatora modifikacijom njihove strukture ili modifikacijom strukture liganada za koje je već poznato da se vežu u aktivno mjesto AChE. Nasuprot tome, mnoštvo kristalnih struktura kompleksa AChE i raznih liganada omogućuje detaljno poznavanje trodimenzionalne strukture aktivnog mjesta AChE i interakcija s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta koje upravljaju dinamičnim procesom vezanja liganada te mogu poslužiti u razvoju novih reaktivatora. U ovom radu je stoga isproban pristup razvoju novih reaktivatora fosfilirane AChE temeljen na analizi kristalnih struktura kompleksa AChE i raznih liganada pohranjenih u PDB bazi kojim je moguće definirati dodatne strukturne karakteristike učinkovitijih reaktivatora.

Kako bi se detaljnije mogao proučiti prostor unutar aktivnog mjesta AChE dostupan ligandima pa tako i reaktivatorima, napravljeno je preklapanje kristalnih struktura kompleksa AChE i strukturno raznovrsnih liganada preuzetih iz proteinske baze podataka (PDB: 1Q83, 1HBJ, 1OCE, 3I6M, 3I6Z).¹⁴⁷⁻¹⁵³ Analizirani ligandi ubrajaju se u visokoafinitetne reverzibilne inhibitore AChE što osigurava prepoznavanje najvažnijih veznih mjesta i ključnih interakcija koji određuju stabilnost kompleksa AChE i visokoafinitetnih liganada. Analizom je također identificirana i konfiguracija liganda koja stvara optimalne interakcije s aminokiselinama aktivnoga mjesta za snažno i usmjereno vezanje liganda. Ligandi korišteni u ovom radu i njihove interakcije s aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu dobro su poznati i opisani u literaturi; *syn*-TZ2PA6, 4-amino-5-fluoro-2-metil-3-(3-trifluoroacetilbenziltiometil)kinolin, 8-(*cis*-2,6-dimetilmorfolino)oktilkarbamioleserolin (MF268), *N*-piperidinopropilgalantamin i *N*-saharinoheksilgalantamin (Slika 35).¹⁴⁷⁻¹⁵³ Preklapanjem strukture navedenih liganada u konformacijama koje zauzimaju unutar aktivnog mjesta AChE otkriveno je pored ranije opisanih kolinskog i perifernog veznog mjesta i tzv. treće vezno mjesto koje je omeđeno aminokiselinama katalitičke trijade (Glu334, Ser203, His447) i oksianionske šupljine (Gly121, Gly122, Ala204), a istodobno je dostupno

ligandima (Slika 36). U ovom prostoru se inače nalazi fosfilni dio konjugata nastalog inhibicijom AChE organofosfornim spojem što pokazuju kristalne strukture konjugata AChE i organofosfornih spojeva (PDB: 5FPP, 5FPQ, 3ZLU, 5HF5, 3ZLV).^{11,100,101,151}

Izdvajanjem onih dijelova strukture pojedinih liganada koji su u interakciji s kolinskim, perifernim i tzv. trećim veznim mjestom definirane su strukturne karakteristike potencijalno učinkovitijih reaktivatora koji bi trebali istovremeno stvarati interakcije s perifernim i kolinskim mjestom, dok je treća vezna skupina usmjerena u tzv. treće vezno mjesto i ukoliko posjeduje nukleofilni karakter sposobna reaktivirati fosfiliranu AChE (Slika 37). Dakle, strukturni elementi novih inhibitora mogu se podijeliti u tri vrste ovisno o namijenjenom im veznom mjestu, odnosno vrsti interakcija koje trebaju ostvariti aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta AChE.

Prvu vrstu čine strukturni elementi koji čine veznu skupinu za periferno mjesto i koji trebaju stvarati interakcije u perifernom mjestu; u prvom redu su to aromatske interakcije (π – π i π –kation) s aminokiselinskim ostacima Tyr72, Tyr124 i Trp286, ali i vodikove veze s hidroksilnim skupinama Tyr72 i Tyr124. Motive za ove strukturne elemente moguće je pronaći u strukturama postojećih liganda za koje je kristalografski potvrđeno da upravo tim dijelom svoje strukture stvaraju većinu navedenih interakcija u perifernom mjestu (PDB: 1OCE, 3I6Z).^{149,150}

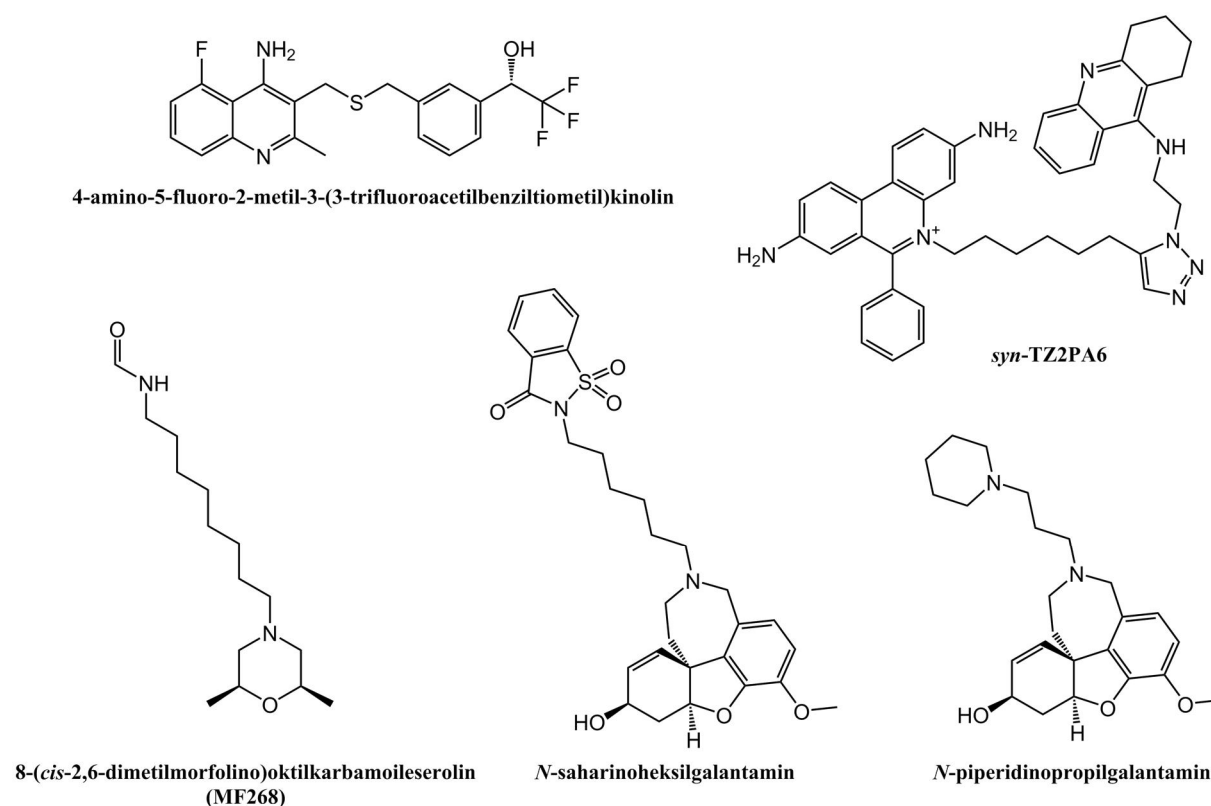
Druga vrsta strukturnih elemenata odnosi se na one koji trebaju stvarati π – π i π –kation interakcije s Trp86 u kolinskom veznom mjestu. Kristalne strukture kompleksa AChE i raznih piridinijevih oksima (PDB kodovi: 2WHR, 2JEY) pokazuju da benzenski prsten stvara aromatske interakcije s Trp86 što ga čini najboljim izborom za ovu vrstu strukturnog elementa.^{101,152}

Treću vrstu strukturnih elemenata usmjerenu u prostor tzv. trećeg veznog mjesta čine oni elementi koje karakterizira lančasta struktura s oksimskom skupinom na kraju koja može mehanizmom nukleofilne supstitucije reaktivirati fosfiliranu AChE. Idealni kandidat za ovaj strukturni element prepoznat je u hidroksiiminoacetamidnoj skupini ranije opisanih nenabijenih oksima **R1** i **R2** (Slika 30) (vidi poglavlje 2.3.2.). Stoga su upravo ovi oksimi poslužili kao predložak za dizajniranje strukture novih reaktivatora u skladu s radnom hipotezom o tri vezna mjesta u aktivnom mjestu AChE (Slika 38). Produljivanjem lanca između hidroksiiminoacetamidne skupine i vezne skupine periferno mjesto za jednu metilensku CH₂ skupinu i supstitucijom vodika jedne CH₂ skupine benzenskim prstenom u

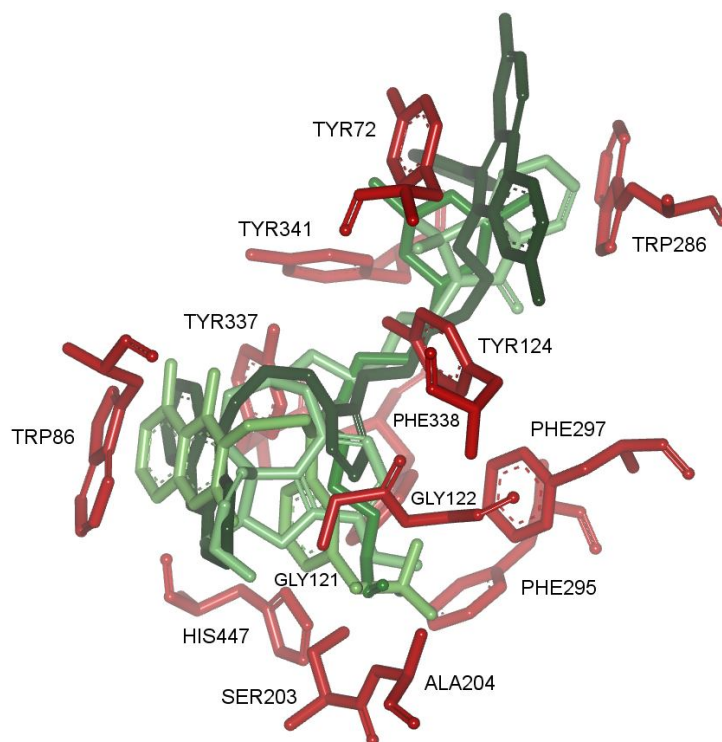
strukturu novih reaktivatora uveden je ranije opisani strukturni element druge vrste. Time je kao jedini strukturni element koji je moguće modificirati preostala vezna skupina za periferno mjesto.

Također, ukoliko se za treću vrstu strukturnih elemenata izaberu oni elementi koji nemaju nukleofilni karakter, ali preko svojih proton–donorskih i proton–akceptorskih skupina mogu stvarati vodikove veze s aminokiselinama koje omeđuju prostor tzv. trećeg veznog mjesta (Gly121, Gly122, Ser203, Ala204, His447) moguće je dizajnirati visokoafinitetne reverzibilne inhibitore koji bi istodobno trebali stvarati nekovalentne interakcije sa sva tri vezna mjesta. Moguć izbor za ovu vrstu strukturnog elementa bili bi primjerice amidna skupina ili bioizosteri nekih skupina (npr. karboksilne skupine ili uree) na kraju ugljikovodičnog lanca.

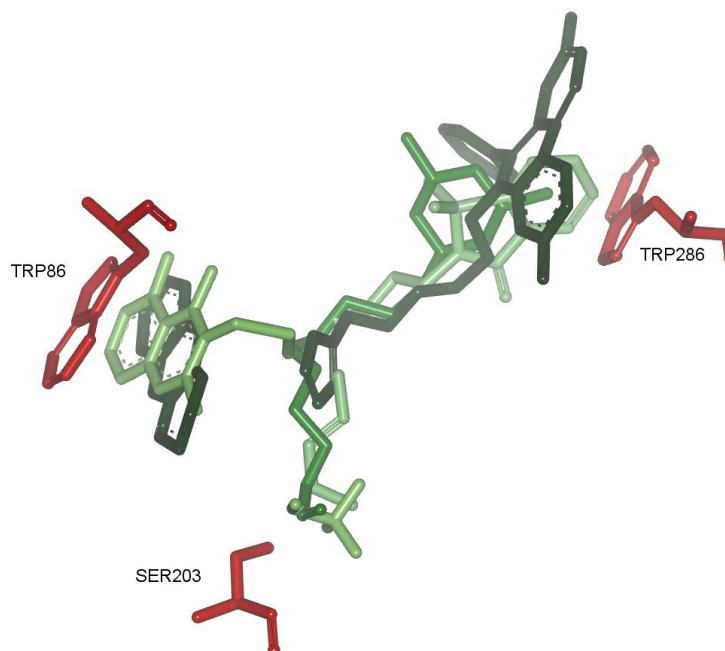
Prostorni raspored ove tri vrste strukturnih elemenata za posljedicu ima pojavu kiralnosti u molekuli, odnosno ugljikov atom na kojemu se spajaju strukturni elementi bit će asimetričan (Slika 38). Zbog kiralnosti reaktivatora moguća je pojava stereoselektivnosti u reaktivaciji fosfiliranog enzima.



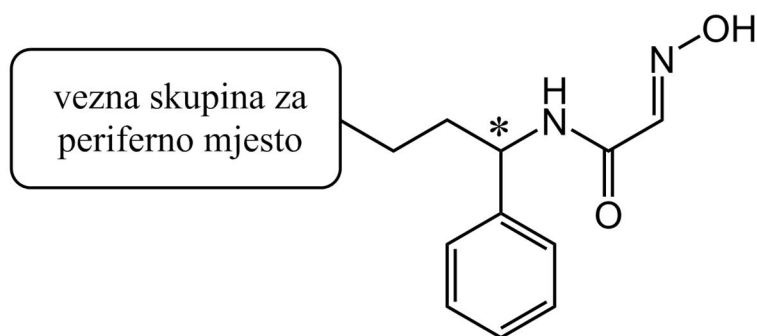
Slika 35. Ligandi korišteni za računalno dizjaniranje novih oksimskih reaktivatora.



Slika 36. Superpozicija liganada (zelena boja) iz kristalnih struktura njihovih kompleksa s AChE (PDB: 1Q83, 1HBJ, 1OCE, 3I6M, 3I6Z).¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Konformacije odabranih aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta AChE (crvena boja) preuzete su iz kristalne strukture kompleksa mišje AChE i *syn*-TZ2PA6 (PDB: 1Q83).¹⁴⁷



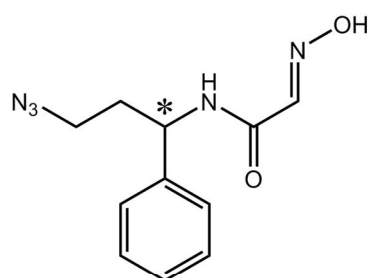
Slika 37. Superpozicija izdvojenih dijelova strukture pojedinih liganada iz kristalnih struktura njihovih kompleksa s AChE (PDB: 1Q83, 1HBJ, 1OCE, 3I6M, 3I6Z)¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ koji su u interakciji s kolinskim, perifernim i tzv. trećim veznim mjestom. Konformacije odabranih aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta AChE (crvena boja) preuzete su iz kristalne strukture kompleksa mišje AChE i *syn*-TZ2PA6 (PDB: 1Q83).¹⁴⁷



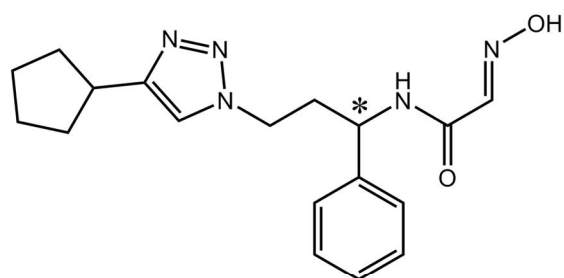
Slika 38. Predložena struktura novih oksimskih reaktivatora koji bi istovremeno trebali ostvarivati interakcije s perifernim i kolinskim veznim mjestom i reaktivirati fosfiliranu AChE 2-hidroksiiminoacetamidnom skupinom. Zvezdica označava asimetričan ugljikov atom.

4.2. Priprava spojeva

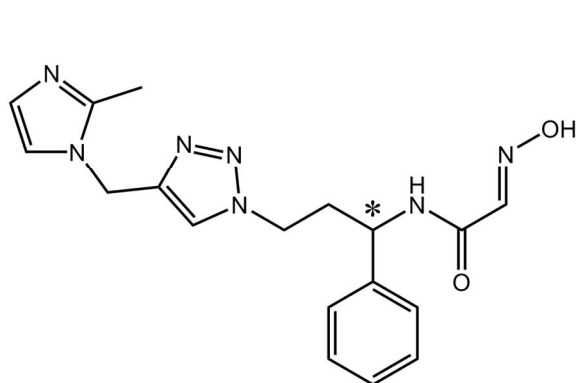
Na osnovu provedenih *in silico* istraživanja predložena je sinteza četiri kiralne ciljne molekule **I**, **II**, **III** i **IV** iz skupine *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida (Slika 39).



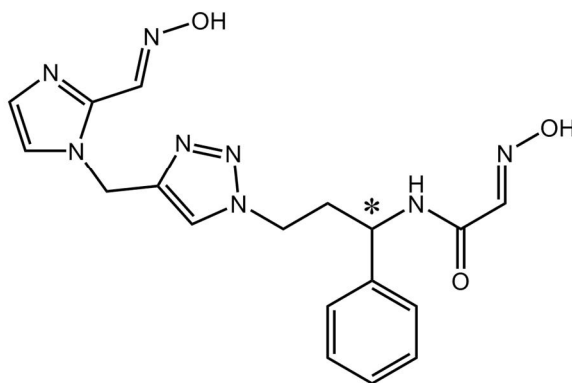
rac-, (*R*)-, (*S*)-**I**



rac-, (*R*)-, (*S*)-**II**



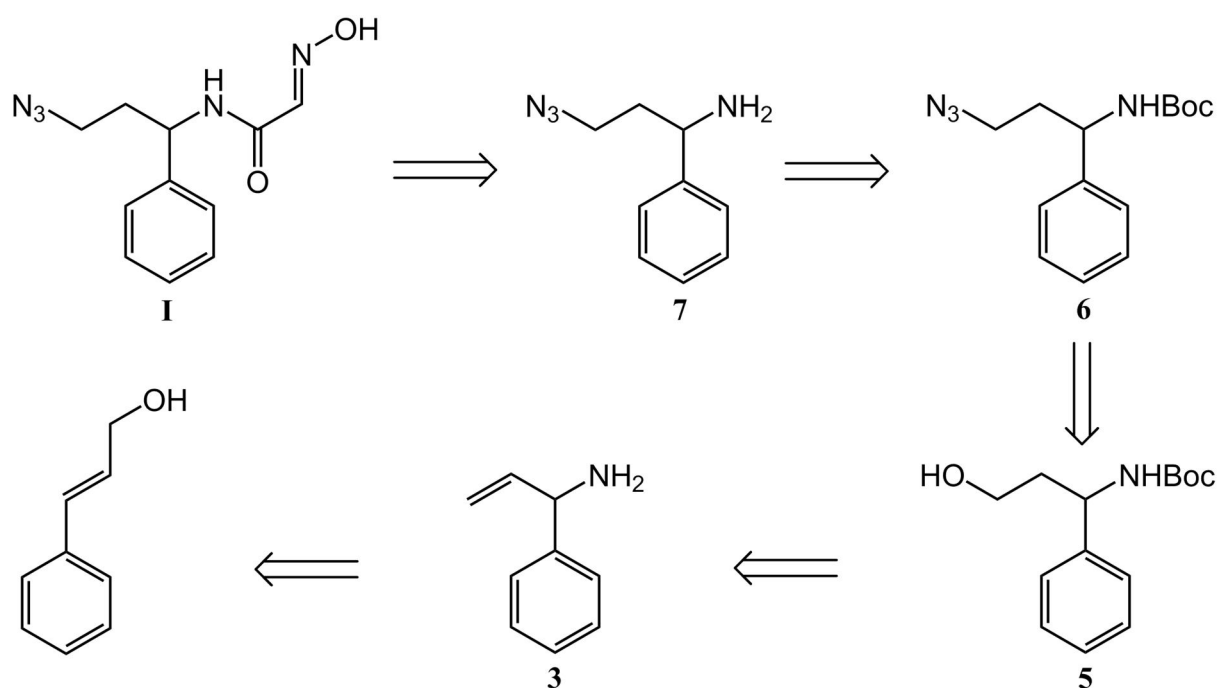
rac-, (*R*)-, (*S*)-**III**



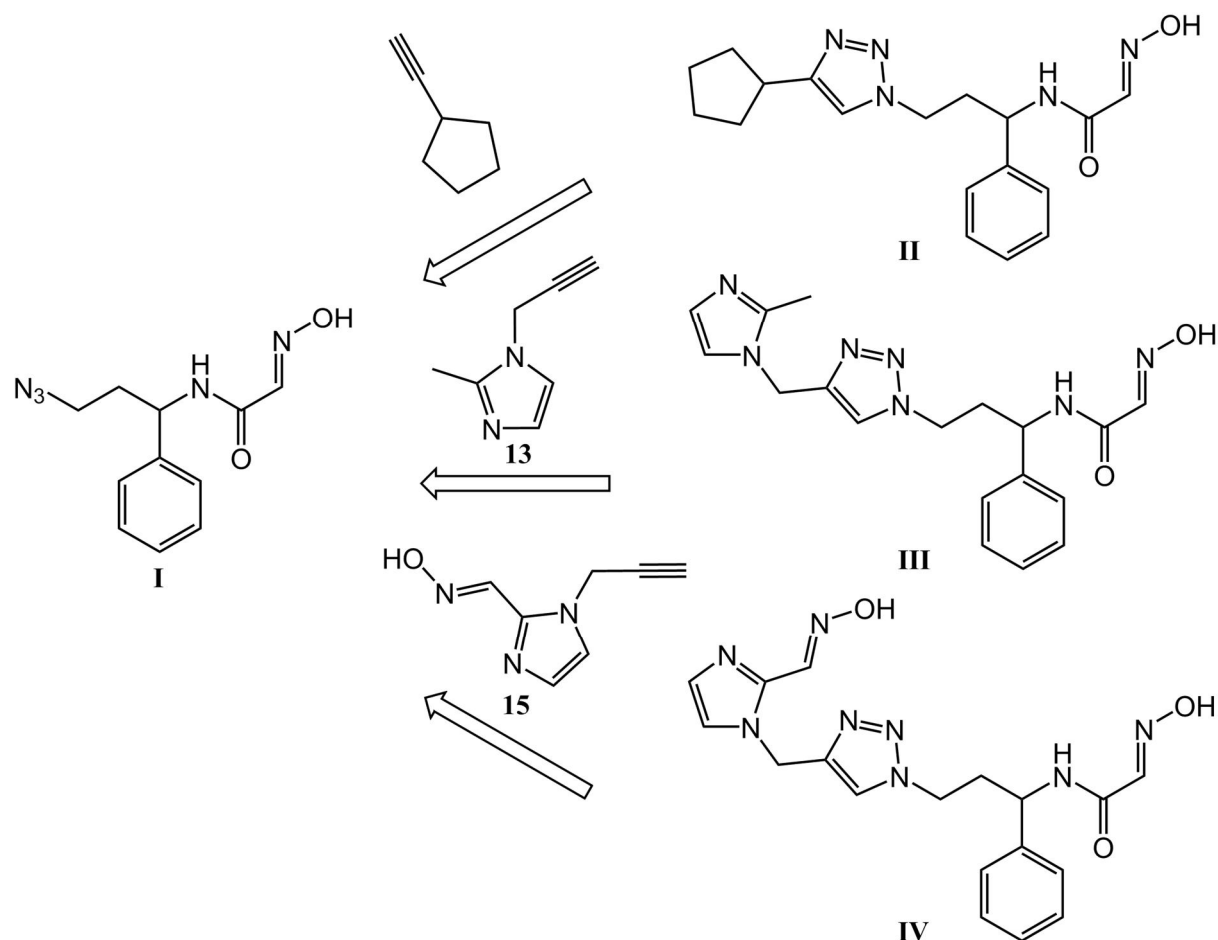
rac-, (*R*)-, (*S*)-**IV**

Slika 39. Strukture predloženih novih kiralnih *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida.

Prema retrosintetskom razmatranju ciljne molekule **I** (Slika 40) sinteza je započela iz komercijalno dostupnog 3-fenilprop-2-en-1-ola iz kojeg se uhodanim sintetskim putem priredio racemični amin **3** koji se potom zaštitio uvođenjem *tert*-butil karbonilne zaštitne skupine (*t*-Boc). Hidroksiliranjem dvostruke veze *t*-Boc zaštićenog amina s 9-BBN-om i NaOH/H₂O₂ nastao je primarni alkohol **5**. Azidacijom hidroksilne skupine i skidanjem *t*-Boc zaštite s **6** priredio se azidoamin **7**. Amidacijom etil-glioksalat-oksima (**8**) sa **7** priređen je oksim **I**. Oksim **II** priređen je tzv. klik-kemijom iz **I** i etinilciklopentana. Na sličan način iz **I** i **13**, odnosno **15** priređeni su spojevi **III** i **IV** (Slika 41).



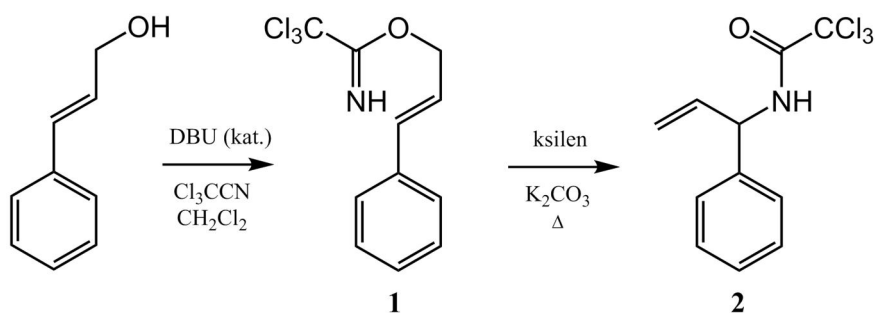
Slika 40. Retrosintetska analiza oksima **I**.



Slika 41. Retrosintetska analiza oksima II, III i IV.

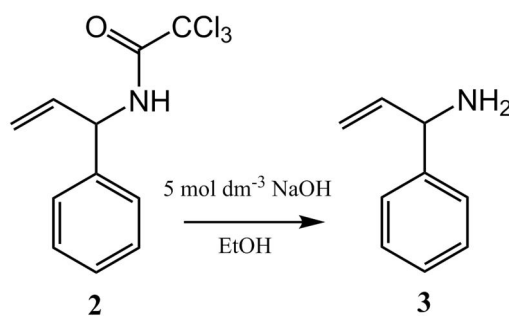
4.2.1. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (7)

Iz komercijalno dostupnog 3-fenilprop-2-en-1-ola racemični *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamid (2) pripravljen je Overmanovom reakcijom (Shema 3).⁴⁰

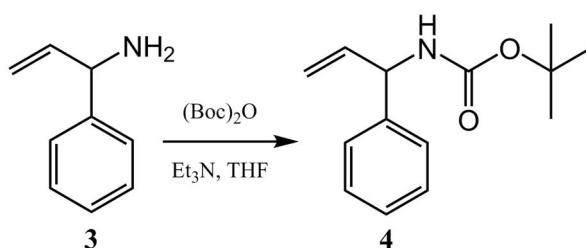


Shema 3. Priprava *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloroacetamida (2).

Prvi stupanj Overmanove reakcije je bazom katalizirana nukleofilna adicija alkohola na cijano skupinu trikloracetitrila u inertnim uvjetima. Drugi stupanj je termička pregradnja dobivenog cinamil 2,2,2-trikloracetimidata (**1**) u *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamid (**2**). Hidrolizom **2** nastao je racemični 1-fenilprop-2-en-1-amin (**3**) (Shema 4) koji je zaštićen uvođenjem *tert*-butil karbonilne skupine (*t*-Boc) (Shema 5).¹⁵³

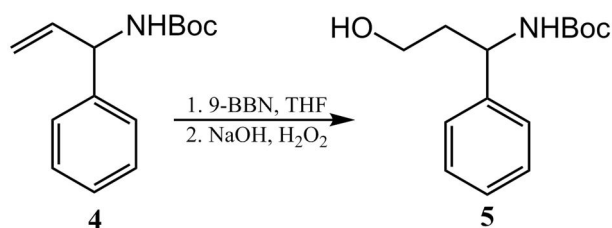


Shema 4. Priprava racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina (**3**)



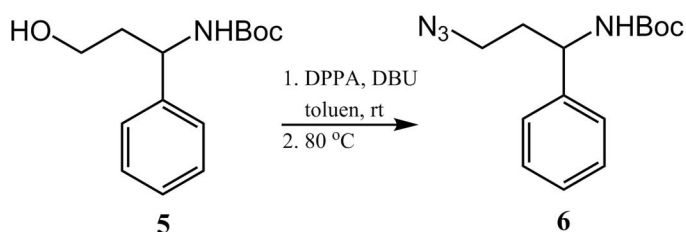
Shema 5. Priprava *tert*-butil 1-fenilalilkarbamata (**4**)

Nastajanje primarnog alkohola 3-[*N*-(*tert*-butoksikarbonil)amino]-3-fenilpropan-1-ol (**5**) iz **4** odvijalo se u dva koraka (Shema 6). Prvi korak odnosio se na hidroboriranje dvostruke veze pomoću 9-BBN-a.^{154,155} U drugom koraku slijedila je oksidacija pomoću NaOH/H₂O₂.^{156,157} Reakciju hidroboriranja bilo je nužno izvoditi u inertnim uvjetima u suhom otapalu. Također, da bi se postiglo maksimalno iskorištenje, 9-BBN je bilo potrebno dodati u suvišku (3 ekv.).

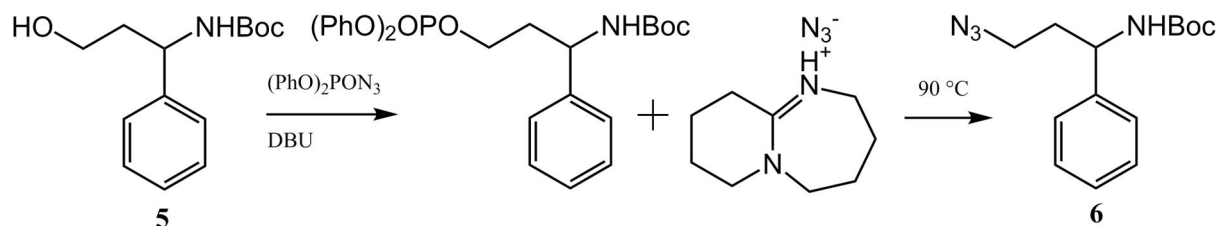


Shema 6. Priprava 3-[*N*-(tert-butoksikarbonil)amino]-3-fenilpropan-1-ola (**5**).

Daljnja funkcionalizacija spoja **5** nastavljena je azidacijom hidroksilne skupine. Azidna skupina omogućuje uvođenje različitih funkcionalnih skupina u molekulu, iako je i sam azid nerijetko konačni produkt sinteze.¹⁵⁸ Preko azidne skupine u molekulu se najčešće uvode amidna skupina¹⁵⁹ ili 1,2,3-triazolni prsten¹⁶⁰ koji su česti strukturni elementi u djelatnim tvarima mnogih lijekova.¹⁶¹ Kao izvor azida za azidaciju hidroksilne skupine korišten je DPPA (Shema 7).¹⁶² Ova S_N2 reakcija izvodila se u suhom toluenu uz dodatak DBU. Reakcija je isprobana i u otapalima THF-u i DMF-u, međutim, nije dolazilo do nastanka željenog produkta. U prvom koraku reakcije dolazi do nastajanja difenilfosfata alkohola, koji se može izolirati pri sobnoj temperaturi, i oslobađanja azida u obliku DBU soli donekle topljive u organskim otapalima (Shema 8). Povišenjem temperature dolazi do nukleofilne supstitucije difenilfosfatne izlazne skupine s azidom i nastajanja 3-azido-1-fenilpropan-1-*N*-(tert-butoksikarbonil)amina (**6**). Nastala DBU sol difenilfosfata topljiva je u vodi i ispire se, zajedno s viškom DBU-a, s vodenom otopinom. Međutim, suvišak DPPA koji je dodan u reakcijsku smjesu prilikom obrade reakcijske smjese ostao je u organskom sloju i nije se mogao odvojiti od produkta. Zato je sirovi produkt bez daljnjeg pročišćavanja podvrgnut idućem koraku u sintezi.

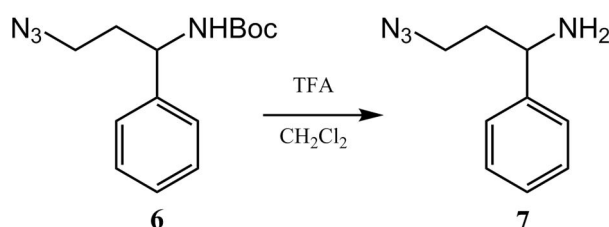


Shema 7. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-*N*-(tert-butoksikarbonil)amina (**6**).



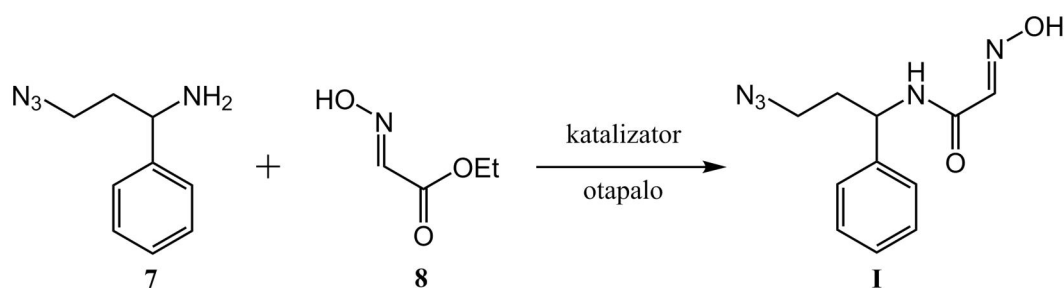
Shema 8. Nastajanje difenilfosfata alkohola, koji se može izolirati na sobnoj temperaturi, i oslobađanja azida u obliku DBU soli.

Uklanjanje *tert*-butilkarbonilne zaštitne skupine sa spoja **6** provedeno je dokapavanjem TFA u otopinu **6** u CH₂Cl₂ (Shema 9) te je dobiven 3-azido-1-fenilpropan-1-amin (**7**).¹⁶³



Shema 9. Priprava 3-azido-1-fenilpropan-1-amina (**7**).

4.2.2. Priprava *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**)



Shema 10. Predloženi put sinteze *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**I**).

U prvotnom planu sinteze *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-(hidroksiimino)-acetamida (**I**) (Shema 10) u zadnjem je koraku predviđena amidacija etil-gliksalat-oksima (**8**) sa spojem **7** u skladu s postupkom priprave analognih oksima **RS41A** i **RS194B**.^{18,164} Stoga su spojevi **7** i **8** pomiješani u kipućem etanolu, no niti nakon 24 h nije došlo do nastajanja produkta (Tablica 6, red 1). Dodatkom Et₃N dolazi do nastajanja **I**, međutim, u vrlo niskom iskorištenju (Tablica 6, red 2). Promjenom otapala i dodavanjem drugih baza (Tablica 6, redovi 3-7 i 9-12) ponovo ne dolazi do nastajanja **I**, osim u slučaju dodatka DIPEA-e u diglimu (bis(2-metoksietil)-eter)

(Tablica 6, red 8), ali u jako niskom iskorištenju. Budući da niti jednom od isprobanih kombinacija otapala i baze nije bilo moguće prirediti **I** u značajnijem iskorištenju, pozornost je usmjerena prema drugim metodama amidacije. Ubrzavanje velikog broja kemijskih reakcija, između ostalog i nastajanje amidne veze, pod utjecajem mikrovalnog (MW) zračenja opisano je u literaturi.^{165,166} Međutim, izlaganjem spojeva **7** i **8** MW zračenju (110 °C) u odsustvu otapala (Tablica 6, red 11-12) u trajanju od 30 min. Nastao je oksim **I**, no i ovog puta u vrlo niskom iskorištenju.

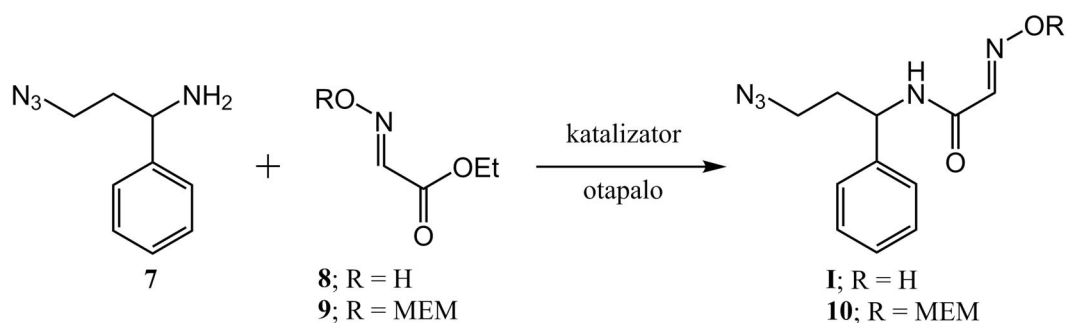
Tablica 6. Ispitivanje učinkovitosti različitih katalizatora pri raznim uvjetima za kataliziranje amidacije spoja **12** sa spojem **10**.

Otapalo	Baza	θ / °C	t / h	Pretvorba ^a / %
EtOH	-	refluks	24	0
EtOH	Et ₃ N	refluks	72	26
1,4-dioksan	Et ₃ N	100	24	0
1,4-dioksan	DIPEA	80	24	0
1,4-dioksan	1,2,4-triazol/DBU	80	24	0
1,4-dioksan	DMAP	80	24	0
diglim	DIPEA	100	48	0
diglim	DIPEA	110	48	8
DMSO	DIPEA	100	48	0
THF	KOt-Bu	sobna temp.	2	0
-	-	MW-110	0.5	17
-	DIPEA	MW-95	0.5	18

^aProdukt je detektiran primjenom HPLC-a uz UV detekciju pri 220 nm.

Pozornost je zatim usmjerena na enzim lipazu B izoliranu iz *Candida antarctica* (CAL-B) i imobiliziranu na akrilnom nosaču, koja je poznata kao vrlo selektivan biokatalizator u enzimskoj rezoluciji primarnih amina^{167,168} i pri nastajanju amidne veze u organskim¹⁶⁹ i ionskim otapalima.¹⁷⁰ Osim toga, CAL-B je komercijalno dostupna, termalno je stabilna u rasponu do čak 60 °C, aktivnost joj je dobra u raznim organskim otapalim bez prisustva vode i s vrlo širokim rasponom acilnih donora koji mu mogu biti supstrati. Stoga su

spojevi **7** i **8** otopljeni u DIPE i u prisutstvu CAL-B miješani 48 h na 40 °C (Shema 11) (Tablica 7, red 1), međutim, nije došlo do nastajanja oksima **I**. Promjenom otapala u MTBE (metil-*tert*-butil-eter) dolazi do nastajanja **I**, no u jako niskom iskorištenju, kako na sobnoj (Tablica 7, red 2) tako i na povišenoj temperaturi (Tablica 7, red 3). Mogući razlog za jako nisko iskorištenje CAL-B katalizirane amidacije treba potražiti u mogućem otežanom pristupu spoja **7** katalitičkom serinu zbog 3-azidopropilnog supstituenta. Naime, CAL-B kao serinska hidrolaza ovisi o dostupnosti nukleofila za napad i cijepanje acil-serin veze.¹⁷¹ Primjerice, alifatski ciklički amini teško prilaze katalitičkom mjestu CAL-B upravo zbog svoje veličine i oblika.¹⁷¹ Drugi mogući razlog niskog iskorištenja CAL-B katalizirane amidacije je da se ester **8** zbog polarne oksimske skupine ne može smjestiti u aktivno mjesto enzima. Štoviše, oksimi se koriste kao nukleofili za pripremu oksimskih estera u enzimski kataliziranoj oksimolizi.^{172,173} Iako je poznato da ovi aktivirani oksimski esteri reagiraju s aminima dajući amide^{174,175} uspješnost nastajanja amida ovisi o strukturama amina i oksimskog estera.¹⁷⁶ Zato je oksimska skupina zaštićena MEM skupinom koja je česta zaštitna skupina alkohola (Shema 12).¹⁷⁷ Potom je istraživana CAL-B katalizirana reakcija dobivenog *O*-zaštićenog etilglioksalat-oksima **9** sa spojem **7** (Shema 11.).

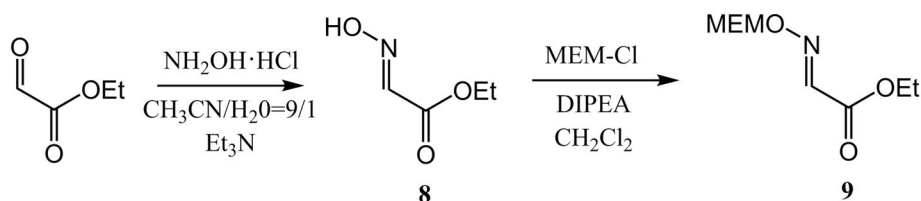


Shema 11. CAL-B katalizirana amidacija spoja **7**.

Tablica 7. Polazni spoj, otapalo, reakcijski uvjeti i prinos u reakcijama nastajanja oksima **I** katalizirana CAL-B.

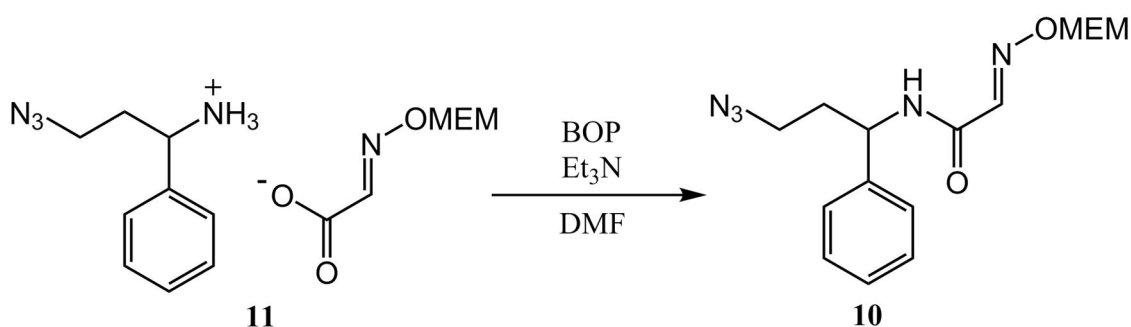
Ester	Otapalo	θ / °C	t / h	η (I ili 10) / %
8	DIPE	40	48	0
8	MTBE	30	24	9
8	MTBE	40	24	2
9	MTBE	40	72	31
9	MTBE ^a	40	48	23
9	DIPE	45	48	0 ^b

^aEt₃N dodan je u reakcijsku smjesu. ¹⁷⁸ ^bSol **11** (vidi Shemu 12) izolirana je iz reakcijske smjese (96 %).



Shema 12. Zaštita oksimske skupine metoksietoksimetilnom (MEM) skupinom.

Kada je kao otapalo korišten MTBE u CAL-B kataliziranoj reakciji, dobiven je odgovarajući amid **10** u niskom iskorištenju (Tablica 7, red 4). U reakciji je također nastajao talog koji je netopljiv u MTBE, ali se dobro otapa u DCM-u. Dodatak Et_3N u reakcijsku smjesu nije utjecao na poboljšanje iskorištenja reakcije.¹⁷⁴ Kada je reakcija izvođena u DIPE (Tablica 7, red 6), nije nastajao produkt, već je samo nastao talog topljiv u DCM-u. NMR i MS analizom dobivenom taloga ustanovljeno je kako je ova supstanca zapravo sol amina **7** i hidroliziranog estera **9** (spoj **11**, Shema 13).

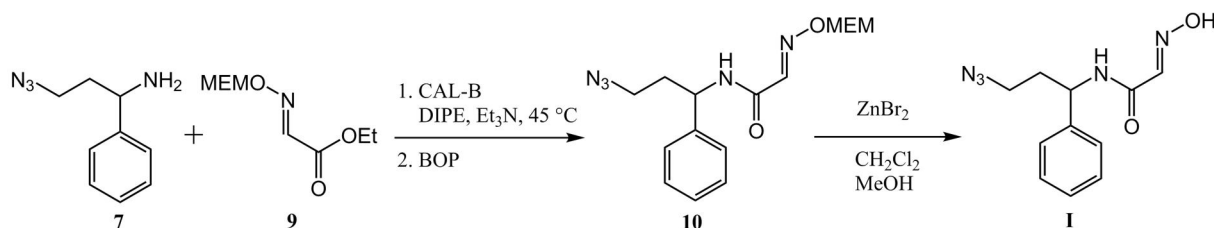


Shema 13. BOP-om katalizirana pretvorba soli **11** u spoj **10**.

Uzimajući u obzir rezultate iz Tablice 7 jasno je da je hidroliza estera **9** katalizirana enzimom brža od očekivanog nastajanja amidne veze. Općenito je poznato da tijekom enzimom katalizirane aminolize i najmanji trag vode može uzrokovati hidrolizu acilnog donora zbog čega se takve reakcije moraju izvoditi u suhim otapalima.¹⁶⁷ DIPE je otapalo koje sadrži dovoljno vode da spriječi nastajanje amida. Zbog toga je sol **11** izolirana u gotovo kvantitativnom iskorištenju (96 %) ukazujući na to da se u ovim reakcijskim uvjetima događa kompletna hidroliza MEM-zaštićenog estera **9**. Nadalje, poznato je da je aminoliza katalizirana Novozymom 435 (CAL-B imobiliziran na makroporoznom akrilnom nosaču) praćena neočekivanom hidrolizom estera bez obzira na rigorozno isključivanje vlage.¹⁷⁷ Pretpostavlja se da su ovi rezultati posljedica adsorpcije tragova vode koja se oslobađa u reakciji. Budući da je u ovom radu korišten Novozym 435, osnovano je pretpostaviti da je i ovaj problem prisutan. Povećanje iskorištenja CAL-B katalizirane priprave spoja **I** je moguće

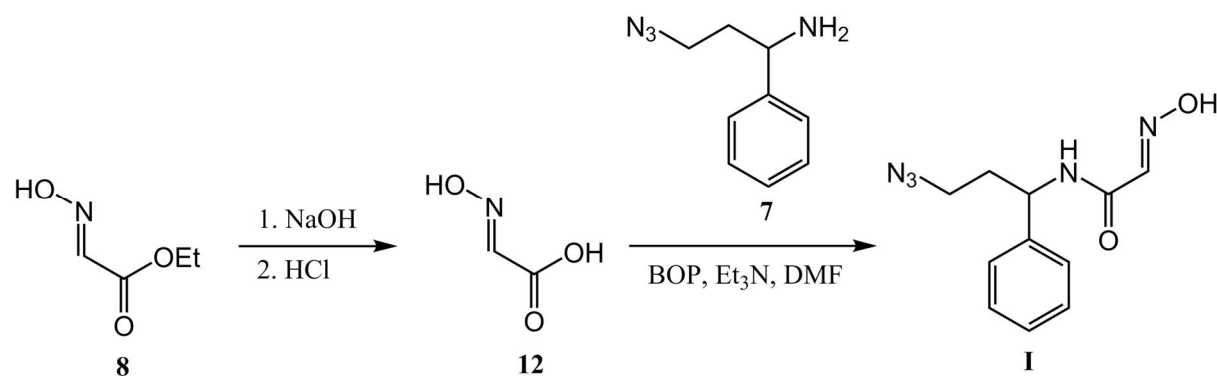
postići korištenjem velikog suviška koji bi osigurao dovoljnu količinu acilnog donora za nastajanje amida. Ipak, budući da ester **9** nije komercijalno dostupan i mora se pripremiti, ovaj pristup nije bio prikladan. Osim toga amid **I** je bio potreban u racemičnom obliku i većem iskorištenju te je isproban alternativni pristup povezivanjem hidroliziranog MEM-zaštićenog estera **9** i amina **7** korištenjem nekog od mnogobrojnih „coupling“ reagensa.^{178,179} U tu svrhu izabran je BOP, iznimno učinkovit reagens koji dozvoljava *in situ* nastajanje iznimno reaktivnog hidroksibenzotriazolilnog estera, poznat i kao Castrov reagens.¹⁸⁰ BOP je dodan u smjesu amina i karboksilne kiseline u omjeru 1:1.¹⁸¹ U BOP-om kataliziranoj reakciji u DMF-u u inertnim uvjetima uz dodatak Et₃N-a došlo je do pretvorbe soli **11** u željeni amid **10** (Shema 13) u zadovoljavajućem iskorištenju.

Budući da se opisana reakcija pokazala iskoristivom, isproban je pristup putem „one pot“ kaskadne enzimске BOP-om katalizirane reakcije estera **9** i amina **7** (Shema 14.). Zbog dovoljnog sadržaja vode DIPE je izabran kao otapalo. U ovoj reakciji CAL-B prvo katalizira hidrolizu estera **9** koji daje sol **11**. Zatim je nastala sol pretvorena u amid **10** korištenjem BOP/Et₃N katalizirane reakcije. Iskorištenje reakcije slično je onome dobivenome kada je sol prvo izolirana iz reakcijske smjese i zatim podvrgnuta povezivanju BOP-om u DMF-u. Željeni amid **I** dobiven je iz amida **10** uklanjanjem MEM zaštitne skupine korištenjem ZnBr₂.^{182,183}



Shema 14. „One pot“ kaskadna enzimom i BOP-om katalizirana priprava oksima **I**.

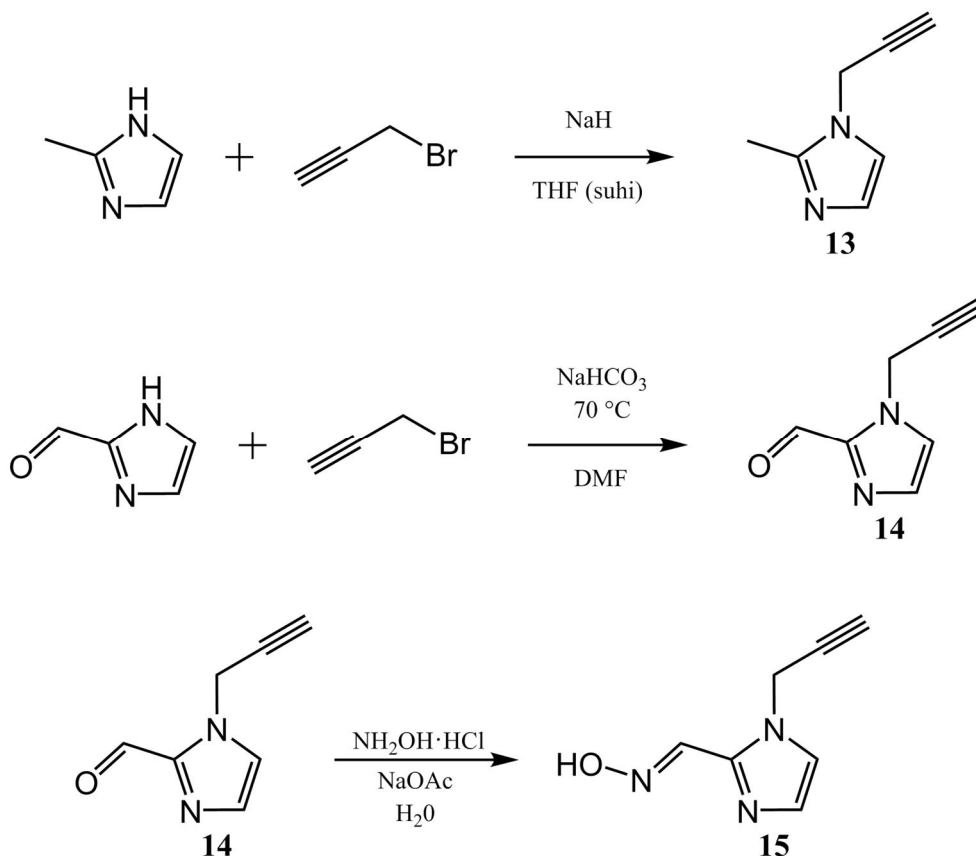
Kako bi se postupak pripreve željenog amida **I** dodatno pojednostavio i izbjeglo korištenje enzima i izolacija produkta, spoj je pripremljen prema postupku prikazanom na Shemi 15. Ester **8** hidroliziran je do hidroksiimino octene kiseline (**12**) tretiranjem s 5 %-tnom vodenom otopinom NaOH i zatim s 5 mol dm⁻³ vodenom otopinom HCl. Konačno, BOP-om katalizirana amidacija spoja **7** uz dodatak Et₃N-a u DMF-u u inertnim uvjetima daje željeni oksim **I**.



Shema 15. Priprava oksima **I** BOP-om kataliziranom amidacijom spoja **7** hidroksiiminoocetenom kiselinom (**12**).

4.2.3. Priprava 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (**13**) i 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (**15**)

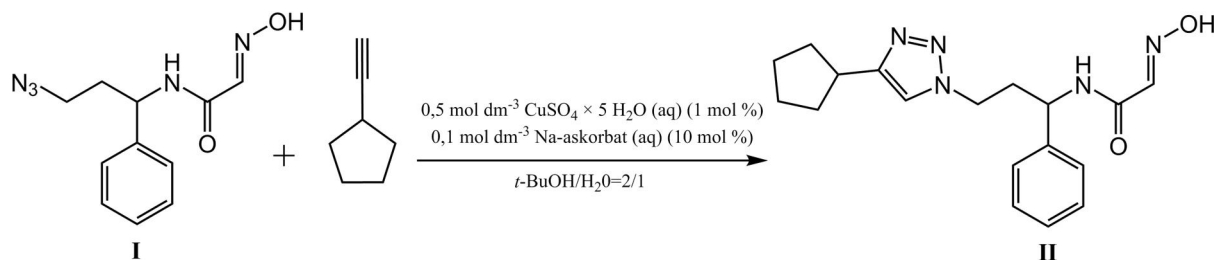
U svrhu priprave ciljnih molekula **III** i **IV** Cu(I) kataliziranom cikloadicijom azida i alkina (CuAAC)^{184,185} bilo je potrebno pripremiti 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazol (**13**) i 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (**15**) (Shema 16). **13** je pripravljen iz 2-metilimidazola i propargil bromida uz NaH u inertnoj atmosferi u suhom THF-u.¹⁸⁶ 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid (**14**) je pripravljen iz imidazol-2-karbaldehida i propargil bromida u prisutstvu NaHCO₃.¹⁸⁷ Reakcija ide u dobrom iskorištenju u DMF-u u inertnim uvjetima. Spoj **15** je pripravljen iz spoja **14** i hidroksilamin-hidroklorida uz dodatak natrijevog acetata.



Shema 16. Priprava 2-metil-1-(prop-2-inil)-imidazola (**13**) i 1-(prop-2-inil)-imidazol-2-karbaldehid-oksima (**15**).

4.2.4. Priprava *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**II**)

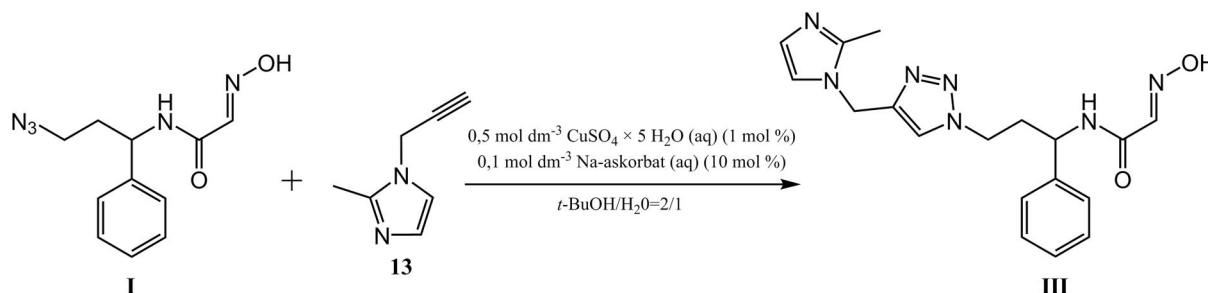
N-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**II**) priređen je Cu(I) kataliziranom cikloadicijom azida i alkina (CuAAC)^{184,185} između oksima **I** i etinilciklopentana prema navedenim reakcijskim uvjetima (Shema 17).¹⁸⁸



Shema 17. Priprava *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**II**).

4.2.5. Priprava *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**III**)

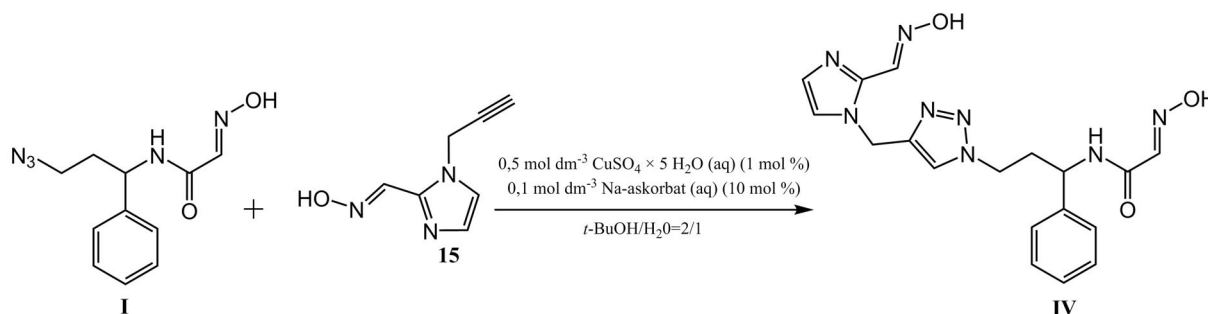
Iz oksima **I** i spoja **13** priređen je *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**III**) u istim reakcijskim uvjetima u kojima je pripremljen oksim **II** (Shema 18).



Shema 18. Priprava *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-(hidroksiimino)acetamida (**III**).

4.2.6. Priprava *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**)

Iz oksima **I** i spoja **15** priređen je *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**IV**) u istim reakcijskim uvjetima u kojima je pripremljen oksim **II** (Shema 19).



Shema 19. Priprava *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**).

4.2.7. *Odvajanje enantiomera i određivanje apsolutne konfiguracije odvojenih enantiomera*

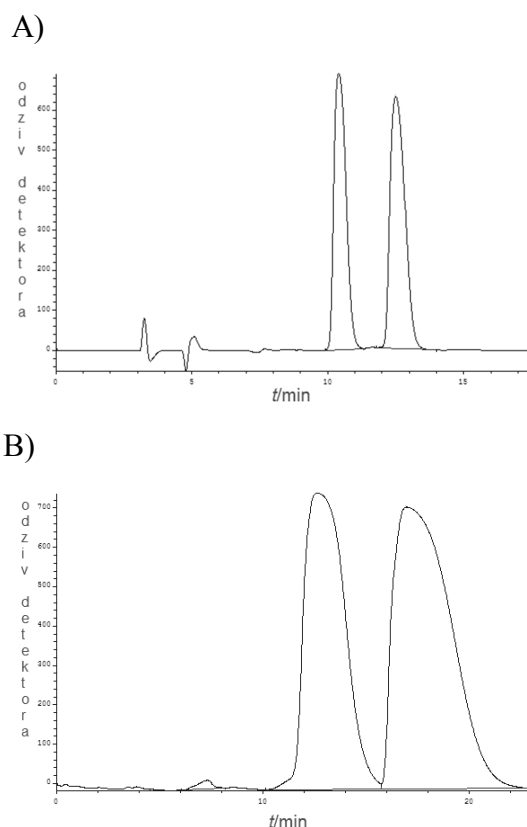
U svrhu priređivanja dovoljnih količina pojedinog enantiomera novih oksima kao najbrža metoda za pripremu enantiomera visoke čistoće odabrana je preparativna kiralna tekućinska kromatografija.¹⁸⁹ Naime, tijekom zadnjih nekoliko desetljeća razvojem direktnih kiralnih metoda za odijeljivanje enantiomera pomoću kiralnih nepokretnih faza (KNF) kiralni HPLC je postao najčešća i najpouzdanija metoda za analizu sastava enantiomera kao i za pripremu čistih enantiomera.¹³⁷ Između triju glavnih metoda koje se u današnje vrijeme koriste za određivanje enantiomernog viška (NMR, GC i HPLC) HPLC metoda je daleko najčešća i koristi se u više od polovice slučajeva.¹⁹⁰ Jednostavnost ove metode uvjetovala je razvoj velikog broja KNF dobivenih vezanjem raznih prirodnih i sintetskih kiralnih spojeva na inertnu podlogu. Pritom se posebno ističu KNF na bazi polisaharida pomoću kojih se izvodi više od 90 % slučajeva određivanja enantiomernog viška.¹⁹⁰ Najčešće korištene komercijalno dostupne polisaharidne KNF su 3,5-dimetilfenilkarbamati celuloze (Chiralcel OD, *Daicel*, Japan) i amiloze (Chiralpak AD, *Daicel*, Japan).¹³⁷ Za odijeljivanje enantiomera novih oksima **I**, **II**, **III** i **IV** testirane su kiralne kolone Chiralcel OD i Chiralpak AD. Uzorci za HPLC analizu pripremljeni su otapanjem oko 1 mg racemičnog spoja u 1 mL pokretne faze. Prilikom analize ubrizgano je 20 µL otopine uzorka. Protok pokretne faze je u svim slučajevima bio 1 mL/min, a valna duljina pri kojoj su spojevi detektirani 254 nm. Sve analize su rađene na sobnoj temperaturi. Valja napomenuti da ove polisaharidne kolone imaju ograničenja vezana uz izbor otapala za pokretnu fazu – u radu s njima nije moguće koristiti jako polarna otapala u velikom volumnom udjelu u pokretnoj fazi. Kiralna polisaharidna kolona Chiralpak AD pokazala se pogodnom za odijeljivanje enantiomera oksima **I** i **IV** uz odgovarajuće pokretne faze (Tablica 8). Kiralnom polisaharidnom kolonom Chiralcel OD postignuto je najbolje odijeljivanje enantiomera oksima **II**. Međutim, ova je kolona pokazala zadovoljavajuće odijeljivanje samo u analitičkim uvjetima, ali ne i u semi-preparativnim uvjetima. U svrhu semi-preparativnog odijeljivanja oksima **II** korištena je kiralna polisaharidna kolona Chiralpak AS. Nijednom od dostupnih kiralnih kolona nije bilo moguće odijeliti enantiomere oksima **III**. Stoga su enantiomeri oksima **III** pripremljeni sintezom iz odgovarajućeg enantiomera oksima **I** tzv. klik-kemijom pri čemu ne dolazi do inverzije konfiguracije na kiralnom centru.

Tablica 8. Retencijska vremena i optička čistoća odijeljenih enantiomera oksima **I**, **II** i **IV**. Protok pokretne faze je 1 mL/min, a valna duljina detekcije spojeva 254 nm.

Oksim	Kiralna nepokretna faza	Metoda	$t_r(R)$ / min	$t_r(S)$ / min	<i>e.v.</i> (R)	<i>e.v.</i> (S)
I	Chiralpak AD	$\Psi(\text{heksan, etanol}) = 90 : 10$	10,4	13,5	96 %	99 %
II	Chiralcel OD	$\Psi(\text{heksan, etanol}) = 90 : 10$	12,8	16,1	98 %	98 %
III					98 %*	99 %*
IV	Chiralpak AD	$\Psi(\text{heksan, etanol, dietilamin}) = 90 : 10 : 0,2$	12,1	14,2	> 99 %	88 %

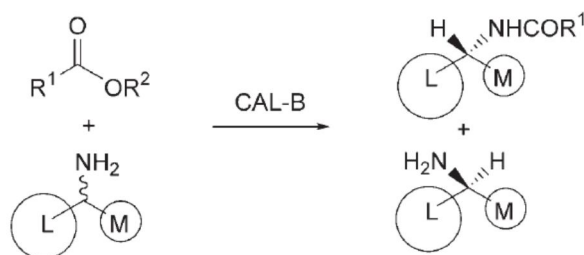
*Enantiomerni višak (*e.v.*) se odnosi na odgovarajući enantiomer oksima **I** iz kojega je uz retenciju konfiguracije pripremljen oksim **III**.

Prilikom semipreparativnog odijeljivanja enantiomera oksima **I**, **II** i **IV** u odgovarajuću kolonu injektirano je 200 μL otopine spoja u etanolu (15 mg/mL) budući da je u ovim uvjetima separacija kromatografskih krivulja još uvijek zadovoljavajuća. Da bi se postigao bolji enantiomerni višak (*e.v.*), eluati odijeljenih enantiomera skupljani su samo u intervalu oko vrijednosti t_r kojemu odgovara oko 95 % površine ispod kromatografske krivulje. Metoda kromatografskog odijeljivanja pokazala se stabilnom i svi uzastopni kromatogrami su vrlo slični za sve navedene oksime. Kromatogrami dobiveni u analitičkim i preparativnim uvjetima prikazani su na Slici 42 na primjeru oksima **I**.

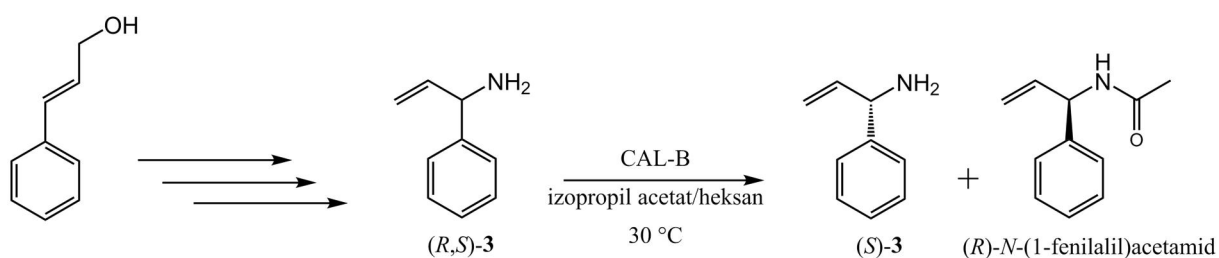


Slika 42. Odjeljivanje enantiomera oksima *rac*-**I** na kiralnoj koloni Chiralpak AD, Ψ (heksan, EtOH) = 90 : 10; A) analitička kolona (250 mm x 4,6 mm), protok pokretne faze 1 mL/min, injektirani volumen 20 μ L; B) semipreparativna kolona (250 mm x 8 mm), protok pokretne faze 5 mL/min, injektirani volumen 200 μ L. Spojevi su detektirani pri 254 nm.

Budući da su oksimi **I**, **II** i **IV** novosintetizirani te njihove spektralne karakteristike nisu poznate, nije moguće određivanje apsolutne konfiguracije odijeljenih enantiomera. K tome, poznato je kako kolone ovog tipa imaju vrlo kompliciran mehanizam prepoznavanja analita zbog čega u slučaju serije analognih spojeva redoslijed ispiranja enantiomera s kolone nije isti za sve oksime. Stoga je apsolutna konfiguracija odijeljenih enantiomera ovih spojeva određena usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima oksima pripremljenih iz enantiomerno obogaćenog 1-fenilprop-2-en-1-amina pripremljenog dodatkom male količine racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina (*S*)-1-fenilprop-2-en-1-aminu. (*S*)-1-fenilprop-2-en-1-amin dobiven je enzimskom kinetičkom rezolucijom racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina korištenjem lipaze B prema Kazlauskasovom pravilu (Slika 43) pri čemu je (*R*)-1-fenilprop-2-en-1-amin aciliran dok je (*S*)-1-fenilprop-2-en-1-amin ostao u otopini (Slika 44).^{138,139}

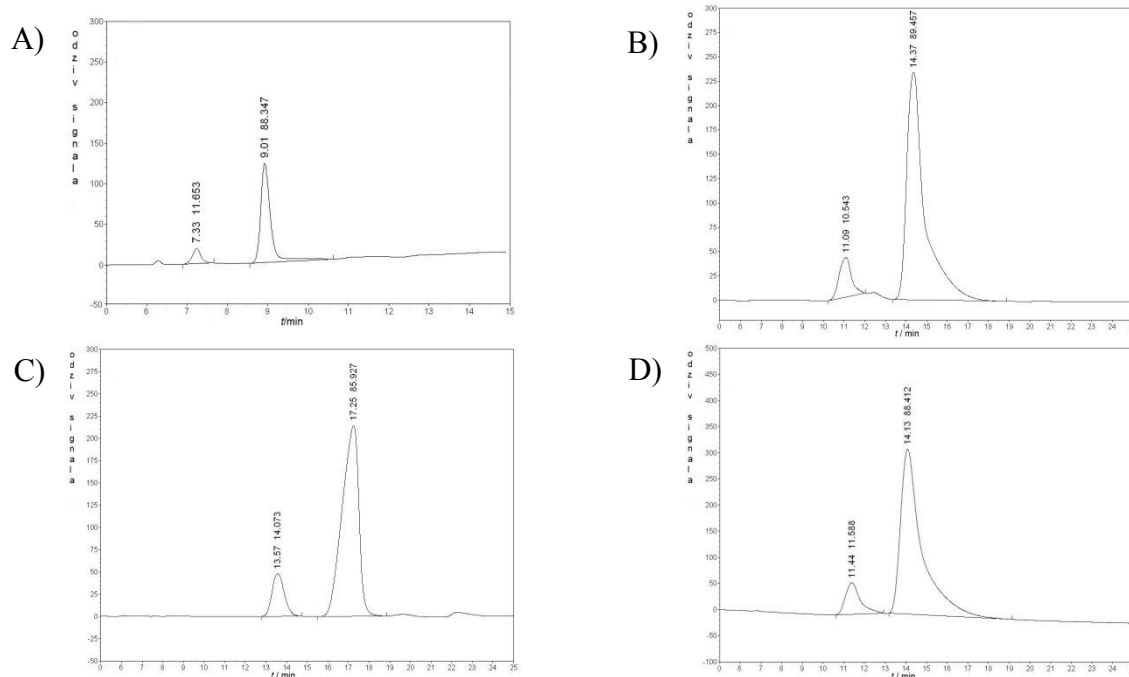


Slika 43. Produkti u kinetičkoj rezoluciji amina lipazom B prema Kazlauskasovom pravilu.¹³⁹



Slika 44. Enzimska kinetička rezolucija 1-fenilprop-2-en-1-amina (**3**).

Analizom na Chiralcel OD-H koloni utvrđeno je da se tako pripremljen enantiomerno obogaćeni 1-fenilprop-2-en-1-amin sastoji 12 % od (*R*)-enantiomera (prvi enantiomer) i 88 % od (*S*)-enantiomera (drugi enantiomer) (Slika 45A). HPLC kromatogrami oksima **I**, **II** i **IV** pripremljenih iz neracemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina u uvjetima u kojima je izvedeno odjeljivanje enantiomera omogućavaju nedvosmisleno određivanje redoslijeda izlaženja pojedinih enantiomera jer će enantiomerno obogaćeni (*S*)-enantiomer imati veću površinu signala nego tek u tragovima prisutni (*R*)-enantiomer (Slika 45B, C i D).



Slika 45. HPLC kromatogrami neracemičnih spojeva s retencijskim vremenima odijeljenih enantiomera A) 1-fenilprop-2-en-1-amina (**3**), analitička kolona Chiralcel OD-H (250 mm x 4,6 mm), Ψ (heksan, izopropanol, dietilamin) = 95 : 5 : 0,2, B) oksima **I**, analitička kolona Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm), Ψ (heksan, etanol) = 90 : 10, C) oksima **II**, analitička kolona Chiralpak AS (250 mm x 4,6 mm), Ψ (heksan, etanol) = 90 : 10, D) oksima **IV**, analitička kolona Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm), Ψ (heksan, EtOH, dietilamin) = 90 : 10 : 0,2. Svi spojevi detektirani su pri 254 nm, protok pokretne faze je 1 mL/min i injektirani volumen 20 μ L.

4.3. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima u racemičnom obliku

Kako bi se odredio afinitet AChE i BChE za oksime **I**, **II**, **III** i **IV** u racemičnom obliku, izvedena su detaljna kinetička mjerenja utjecaja ovih oksima na aktivnost kolinestaraza. Reprezentativni primjer jednog od takvih mjerenja dan je na Slici 46 dok su sumarni rezultati određenih kinetičkih konstanti prikazani u Tablici 9 i Tablici 10. Sva četiri oksima reverzibilno inhibiraju obje kolinesteraze pokazujući mješoviti tip inhibicije. Ovi rezultati upućuju na to da se sva četiri oksima mogu vezati bilo na slobodni enzim (E), bilo na Michaelisov kompleks (ES). Parametar $\alpha > 1$ opisuje pad u afinitetu ES kompleksa prema oksimu u usporedbi s afinitetom slobodnog enzima (E).

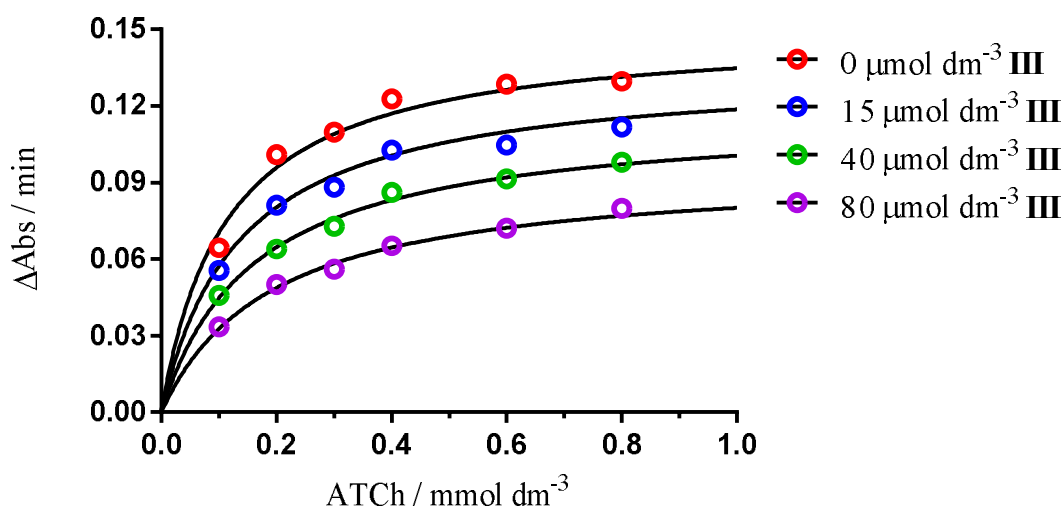
U slučaju AChE (Tablica 9) svi testirani oksimi osim oksima **II** slabije se vežu na ES kompleks nego na slobodni enzim (E). Ipak, zbog slabije topljivosti oksima **II** u 0,1 mol dm⁻³ natrijevom fosfatnom puferu (pH 7,4), kinetički parametri za ovaj spoj nisu mogli biti određeni u optimalnom koncentracijskom rasponu što može objasniti razliku u odnosu na

ostale spojeve. U slučaju BChE (Tablica 10) pad afiniteta ES kompleksa prema oksimima još je izraženiji ukazujući na opstrukciju interakcija između oksima i aminokiselina unutar ždrijela aktivnog mjesta zbog prisustva molekule supstrata.

Konstante inhibicije (K_I) ispitivanih spojeva u slučaju AChE nalaze se u rasponu između 50 i 1200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ s porastom inhibitorne moći u sljedećem redoslijedu: **I** < **II** < **IV** < **III**. U slučaju BChE vrijednosti K_I se nalaze između 0,3 i 130 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ s istim redoslijedom inhibitorne moći kao i u slučaju AChE. Ovi rezultati pokazuju da modifikacija vezne skupine za periferno mjesto, tj. vezne skupine za koju se pretpostavlja da se veže u periferno alosteričko vezno mjesto kolinesteraza značajno utječe na inhibitornu moć spoja. Oba enzima pokazuju najmanji afinitet prema oksimu **I** što je vjerojatno rezultat nedostatka složenije strukture vezne skupine za periferno mjesto prisutne kod oksima **II**, **III** i **IV** u odnosu na azidnu skupinu prisutnu kod oksima **I**. S druge strane oksim **III** se pokazao najsnažnijim inhibitorom obaju enzima. Također, BChE je pokazala selektivnost prema sva četiri oksima vjerojatno zbog većeg volumena aktivnog mjesta BChE i razlike u aminokiselinskom sastavu u usporedbi s aktivnim mjestom AChE koji dozvoljava većim ligandima zauzimanje povoljnije konformacije za stvaranje interakcija s aminokiselinama aktivnog mjesta.⁵ Također, šest od četrnaest aromatskih aminokiselina u aktivnom mjestu AChE odgovaraju alifatskim aminokiselinama u aktivnom mjestu BChE povećavajući njegovu hidrofobnost. Budući da BChE pokazuje gotovo 150 puta veći afinitet za oksim **III** nego AChE, ovaj oksim se može smatrati selektivnim inhibitorom BChE.

Poznavanje stupnja selektivnosti oksima prema AChE, odnosno BChE važno je radi uspješnijeg tretmana u slučaju trovanja organofosfornim živčanim bojnim otrovima. Naime, najistaknutije strategije predtretmana u slučaju trovanja organofosfornim živčanim bojnim otrovima uljučuju zaštitu katalitičkog serina AChE od fosfilirajućeg agensa vezanjem reverzibilnog inhibitora^{23,191-195} i korištenje bioloških čistila poput BChE koji su podložni inhibiciji organofosfornim živčanim bojnim otrovima.^{66,196} Nadalje, BChE djeluje kao prirodno biološko čistilo u krvotoku budući da je brzina inhibicije AChE organofosfornim spojevima slična brzini inhibicije BChE.^{197,198} Uzimajući u obzir iznimno visoku selektivnost BChE prema oksimu **III**, ovi rezultati ne idu u prilog njegovoj upotrebi u zaštiti katalitičkog mjesta AChE od fosfilirajućeg agensa reverzibilnom inhibicijom AChE. Štoviše, na taj način bi se inhibicijom BChE poništilo njezino endogeno djelovanje kao biološkog čistila jer bi se onemogućila njezina inhibicija fosfilirajućim agensom. Ujedno bi se i smanjila količina

oksima **III** dostupna za reaktivaciju fosfilirane AChE. Ipak, ako i fosfilirana BChE zadrži visoku selektivnost prema oksimu **III** iza čega bi uslijedila brza reaktivacija fosfilirane BChE, isti bi u kombinaciji s BChE mogao djelovati kao oksimom potpomognuto katalitičko čistilo.²⁴



Slika 46. Utjecaj promjene koncentracije supstrata ATCh na aktivnost ljudske AChE u prisustvu i odsustvu oksima **III**.

Tablica 9. Reverzibilna inhibicija ljudske AChE oksimima **I**, **II**, **III** i **IV**.

Oksim	[ATCh] / mmol dm ⁻³	[oksim] / μmol dm ⁻³	K_i / μmol dm ⁻³	α
I	0,1-0,6	500-1500	1187 ± 248	$2,5 \pm 1,0$
II	0,1-0,6	30-150 ^a	358 ± 197	$0,9 \pm 0,7$
III	0,1-0,8	15-80	49 ± 22	$2,9 \pm 1,5$
IV	0,1-0,8	50-200	135 ± 26	$4,8 \pm 1,3$

^aZbog slabe topljivosti oksima **II** u 0,1 mol dm⁻³ natrijevom fosfatnom puferu (pH 7,4) konstanta inhibicije (K_i) nije mogla biti određena pri višim koncentracijama oksima **II**.

Tablica 10. Reverzibilna inhibicija konjske BChE oksimima I, II, III i IV.

Oksim	[ATCh] / mmol dm ⁻³	[oksim] / μmol dm ⁻³	K_1 / μmol dm ⁻³	α
I	0,1-0,8	50-200	132 ± 14	6,3 ± 2,2
II	0,1-0,8	15-75	42 ± 4	15 ± 10
III	0,1-0,8	0,1-0,4	0.33 ± 0.03	6,0 ± 1.7
IV	0,1-0,8	20-100	30 ± 3	5,7 ± 1,8

4.4. Reverzibilna inhibicija kolinesteraza oksimima u enantiomernom obliku

Kako bi se ispitala stereoselektivnost kolinesteraza prema kiralnim oksimima I, II, III i IV, određena je reverzibilna inhibicija AChE i BChE ovim spojevima u enantiomerno čistom obliku. Jednako kao u slučaju reverzibilne inhibicije oksimima u racemičnom obliku, sva četiri oksima reverzibilno inhibiraju obje kolinesteraze pokazujući mješoviti tip inhibicije bez obzira da li se radi o (*R*) ili (*S*) enantiomeru (Tablica 11, Tablica 12).

Tablica 11. Reverzibilna inhibicija ljudske AChE enantiomerima oksima I, II, III i IV.

Oksim	[ATCh] / mmol dm ⁻³	[spoj] / μmol dm ⁻³	K_1 (<i>R</i>) / μmol dm ⁻³	α (<i>R</i>)	K_1 (<i>S</i>) / μmol dm ⁻³	α (<i>S</i>)	K_1 (<i>R</i>) / K_1 (<i>S</i>)
I	0,1-0,6	35-500	107 ± 30	10,2 ± 7,1	102 ± 38	2,2 ± 1,3	1,05
II	0,1-0,6	35-200 ^a	321 ± 239	1,2 ± 1,2	234 ± 109	3,3 ± 2,5	1,37
III	0,1-0,8	15-200	24 ± 6	2,6 ± 1,0	53 ± 13	16 ± 9	0,45
IV	0,1-0,8	40-180	214 ± 121	1,7 ± 1,3	133 ± 70	2,7 ± 2,0	1,61

^aZbog slabe topljivosti oksima II u 0,1 mol dm⁻³ natrijevom fosfatnom puferu (pH 7,4) konstanta inhibicije (K_1) nije mogla biti određena pri višim koncentracijama oksima II.

Tablica 12. Reverzibilna inhibicija konjske BChE enantiomerima oksima **I**, **II**, **III** i **IV**.

Oksim	[ATCh] / mmol dm ⁻³	[oksim] / μmol dm ⁻³	K_I (R) / μmol dm ⁻³	α (R)	K_I (S) / μmol dm ⁻³	α (S)	K_I (R) / K_I (S)
I	0,1-0,6	20-200	124 ± 19	5,2 ± 2,4	82 ± 13	3,5 ± 1,3	1,51
II	0,1-0,6	20-150	68 ± 7	3,4 ± 0,8	23 ± 2	9,3 ± 2,5	2,96
III	0,1-0,8	0,1-5	3,5 ± 0,6	3,5 ± 1,3	0,16 ± 0,02	8,1 ± 4,2	22
IV	0,1-0,8	5-90	74 ± 8	5,7 ± 2,0	17 ± 2	5,4 ± 1,5	4,35

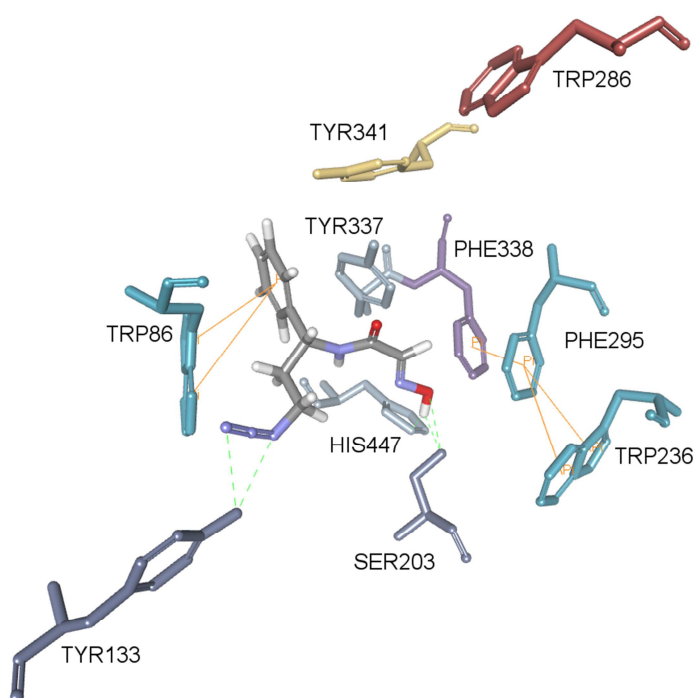
Značajna stereoselektivnost primijećena je u samo u slučaju BChE za oksim **III** čiji se (S) enantiomer čak 22 puta snažnije veže u aktivno mjesto BChE nego (R) enantiomer. Razlike u vezanju enantiomera oksima **III** u aktivno mjesto BChE ogledaju se u dvostrukoj većoj vrijednosti α parametra u slučaju (S) enantiomera koja sugerira da ovaj enantiomer prilikom vezanja u većoj mjeri zauzima prostor namijenjen molekuli supstrata. Manji stupanj stereoselektivnosti BChE primijećen je u slučaju oksima **II** i **IV** pri čemu se u oba slučaja (S) enantiomer ponovo snažnije veže. Razlike u vrijednosti α parametra za pojedini enantiomer sugeriraju da se u slučaju oksima **II** (S) enantiomer veže na način da ispunjava prostor namijenjen molekuli supstrata u većoj mjeri nego (R) enantiomer, dok u slučaju oksima **IV** enantiomeri u istoj mjeri ispunjavaju prostor namijenjen molekuli supstrata. S druge strane, AChE neočekivano ne pokazuje značajniju stereoselektivnost niti prema jednom novom oksimu.

4.5. Molekulsko modeliranje kompleksa oksima i kolinestaraza

4.5.1. Molekulsko modeliranje AChE kompleksa

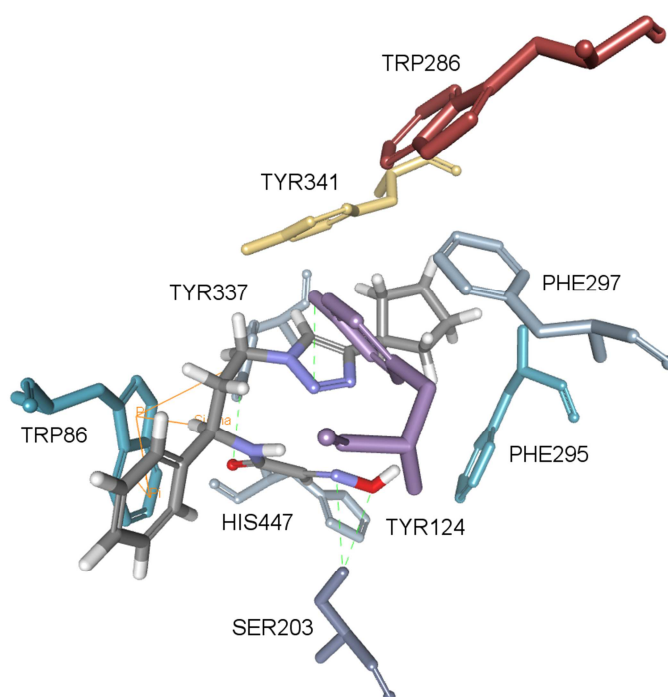
Računalnom metodom molekulskog pristajanja proučavane su konformacije oksima u aktivnom mjestu AChE i BChE kako bi se predvidjele orijentacije strukturnih dijelova oksima i njihove interakcije s aminokiselinama aktivnog mjesta. Predviđanjem vezne orijentacije i interakcija oksima u aktivnom mjestu moguće je proučavati procese koji upravljaju vezanjem oksima.

Pretpostavljena geometrija vezanja oksima **I** u aktivno mjesto AChE podupire radnu hipotezu da se fenilni prsten spoja smješta u kolinsko vezno mjesto ostvarujući π - π interakcije s Trp86 (Slika 47). Kako je ranije spomenuto, ovaj tip interakcije potvrđen je u kristalnim strukturama brojnih kompleksa kolinesteraza s ligandima s aromatskim prstenovima, npr. π - π interakcije između benzilnog prstena i Trp86 u kompleksu donepezila s ljudskom AChE,^{8,199} π - π interakcije takrina i Trp84 u kompleksima takrina i bistakrina s *TcAChE*^{56,200} i kompleksu takrina i ljudske BChE.²⁰¹ Također u skladu s našom radnom hipotezom, 2-hidroksiacetamidni dio usmjeren je prema katalitičkom serinu Ser203 sudjelujući hidroksilnom skupinom u vodikovim vezama sa Ser203 i/ili His447 iz katalitičke trijade. Dodatno, bočni lanac spoja **I** s azidnom skupinom ostvaruje vodikove veze s Tyr133. Ovaj aminokiselinski ostatak sudjeluje u vodikovim vezama s ligandima poput (–)-huperzina A u kompleksu s ljudskom AChE.²⁰¹ Nedostatak interakcija između spoja **I** i aminokiselinskih ostataka u perifernom alosteričkom mjestu može objasniti njegov eksperimentalno utvrđen slabi inhibicijski potencijal u usporedbi s drugim *N*-supstituiranim 2-hidroksiiminoacetamidima ispitanim u ovom radu.



Slika 47. Model kompleksa oksima **I** u aktivnom mjestu ljudske AChE (PDB kod 4PQE)⁴² dobiven računalnom metodom molekuskog pristajanja. Nevalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

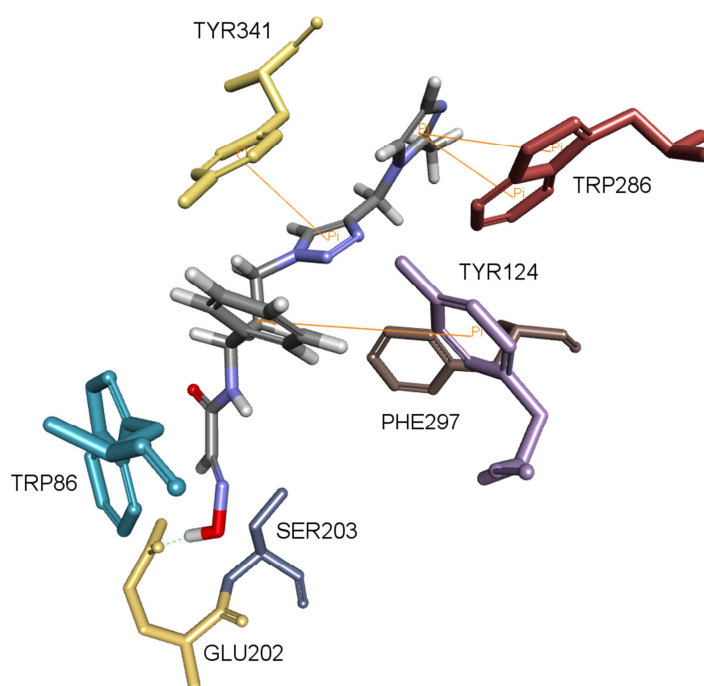
Model kompleksa oksima **II** i AChE (Slika 48) također predviđa π - π interakcije između fenilnog prstena spoja i Trp86. Triazolni prsten, koji nije prisutan u strukturi oksima **I**, ostvaruje vodikovu vezu s Tyr124 vrlo sličnu vodikovoj vezi između fenolnog prstena Tyr124 i piridinijevog prstena 2-hidroksiiminometilpiridinijeva dijela HI-6 opaženu u kristalnoj strukturi kompleksa s mišjom AChE.²⁰² Navedene interakcije upravljaju ukupnim načinom vezanja oksima **II** u aktivnom mjestu AChE usmjeravajući, tzv. periferni vezni ligand – ciklopentilni prsten u periferno alosteričko mjesto i 2-hidroksiiminoacetamidni dio prema katalitičkom serinu s kojim preko oksimske skupine sudjeluje u vodikovim vezama.



Slika 48. Model kompleksa oksima **II** u aktivnom mjestu ljudske AChE (PDB kod 4PQE)⁴² dobiven računalnom metodom molekuskog pristajanja. Nevalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

Vezanje oksima **III** u aktivnom mjestu AChE (Slika 49) u izduženoj konformaciji karakterizirano je s metilimidazolijskim prstenom usmjerenim prema ulazu u ždrijelo aktivnog mjesta i 2-hidroksiiminoacetamidnim dijelom usmjerenim prema dnu aktivnog mjesta. Geometrija vezanja oksima **III** u aktivnom mjestu AChE vodi višestrukim π - π interakcijama s aromatskim aminokiselinama; imidazolijski prsten ostvaruje π - π interakcije s Trp286, triazolni prsten ostvaruje π - π interakcije s Tyr341 i s Phe297 (π -sigma interakcija) i fenilni prsten ostvaruje π - π interakcije s Tyr124. Opisane interakcije u skladu su s kristalnim

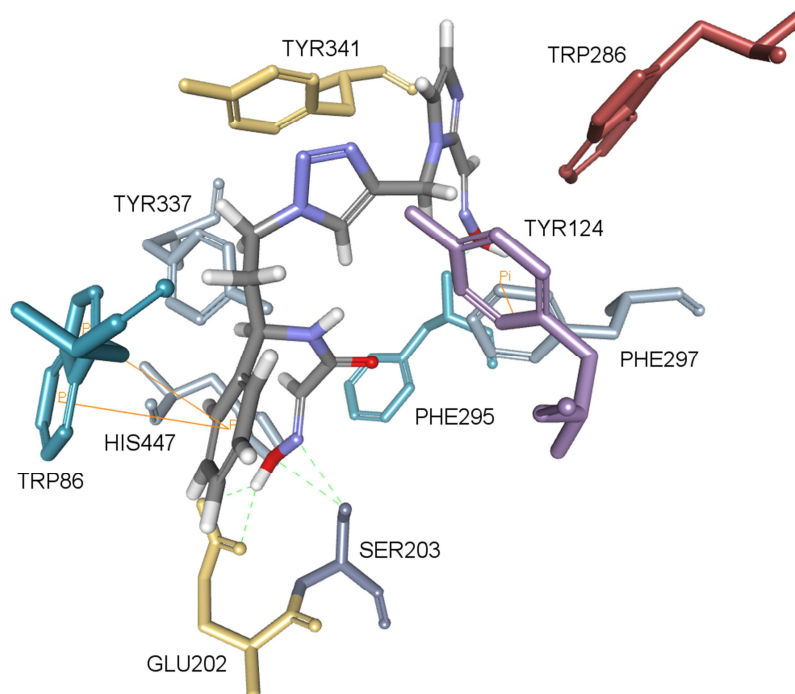
strukturama oksima HI-6, Ortho-7 i obidoksima u kompleksu s mišjom AChE,²⁰² i donepezila u kompleksu s *Tc*AChE. U kristalnim strukturama uočeno je i alternativno vezanje oksima u periferno alosteričko mjesto gdje npr. piridinijev prsten oksima HI-6, Ortho-7 i obidoksima ostvaruje tzv. π - π sendvič između Tyr124 i Trp286. Da bi nastala alternativna konformacija oksima HI-6, Ortho-7 i obidoksima, Trp286 mora promijeniti svoju konformaciju iz one opažene u *apo* stanju AChE.^{102,202}



Slika 49. Model kompleksa oksima **III** u aktivnom mjestu ljudske AChE (PDB kod 1B41)⁴² dobiven računalnom metodom molekulskog pristajanja. Nevalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

Predviđena geometrija vezanja oksima **IV** u aktivnom mjestu AChE (Slika 50) sugerira da se oksim **IV** također veže s veznom skupinom za perifernom mjesto – imidazol-2-karboksialdehid-oksimom na ulazu u ždrijelo aktivnog mjesta i s fenilnim prstenom u kolinskom veznom mjestu. Triazolni prsten veže se u uskom dijelu aktivnog mjesta omeđenom s Tyr124 i Tyr337. Jedina razlika između predviđene geometrije vezanja oksima **III** i **IV** je da se oksim **IV** smješta dublje u aktivno mjesto AChE. Ovo rezultira s π - π interakcijama između imidazol-2-karboksialdehid-oksimom i Trp341. Dodatno, 2-hidroksiiminoacetamidna grupa oksima **IV** sudjeluje u vodikovim vezama s Glu202 i Ser203. Ipak, ovakav način vezanja liganda vodi i gubitku interakcija između imidazolijevog prstena i

aminokiselinskih ostataka perifernog alosteričkog mjesta Tyr124 i Trp286 što može objasniti slabiji inhibitorski potencijal oksima **IV** u usporedbi s oksimom **III**.

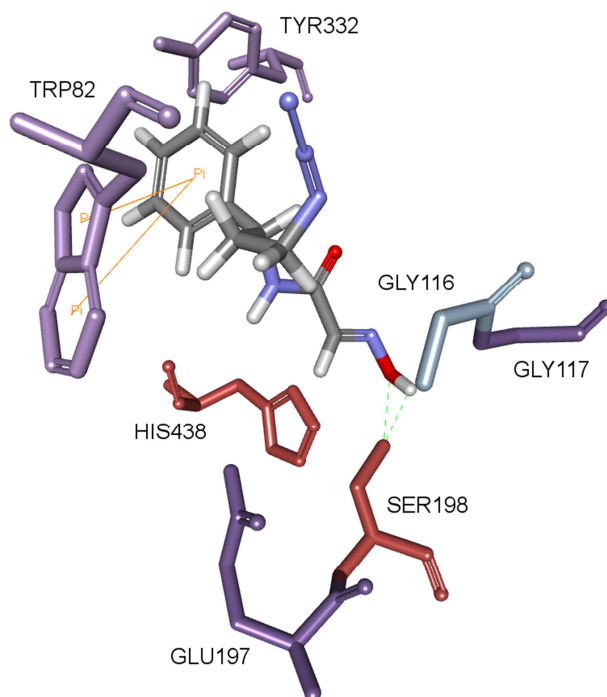


Slika 50. Model kompleksa oksima **IV** u aktivnom mjestu AChE (PDB kod 4PQE)⁴² dobiven računalnom metodom molekuskog pristajanja. Nekovalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

4.5.2. Molekulska modeliranje BChE kompleksa

Najčešće opažena promjena u predviđenim geometrijama vezanja oksima **I**, **II**, **III** i **IV** u aktivnom mjestu BChE u usporedbi s geometrijama vezanja istih spojeva u aktivnom mjestu AChE povezana je s energetski povoljnijim svijenim konformacijama oksima koje odražavaju veći volumen aktivnog mjesta BChE. Model kompleksa oksima **I** i BChE (Slika 51) ponovo podržava radnu hipotezu da se fenilni prsten spoja smješta u kolinsko vezno mjesto sudjelujući u π - π interakcijama s Trp82. Međutim, u aktivnom mjestu BChE fenilni prsten je smješten bliže središtu kolinskog veznog mjesta. Ova promjena u smještavanju fenilnog prstena omogućena je zbog prisustva manjeg Ala328 u BChE kojem odgovara voluminozniji Tyr337 u AChE. Dodatno, bočni lanac modificiran s azidnom skupinom orijentiran je gotovo paralelno s glavnim lancem Trp82 sudjelujući u π - π interakcijama s indolnim prstenom dok je 2-hidroxiacetamidni dio usmjeren prema Ser203 sudjelujući u višestrukim vodikovim

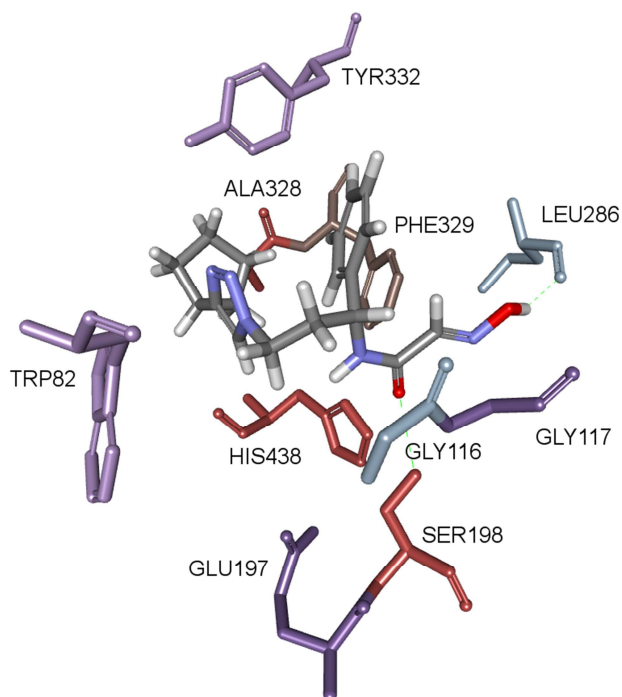
vezama. Još jednom, nepostojanje interakcija između oksima **I** i aminokiselinskih ostataka u perifernom alosteričkom mjestu može objasniti najniži inhibitorni potencijal oksima **I** između svih ispitivanih spojeva u ovom radu.



Slika 51. Model kompleksa oksima **I** u aktivnom mjestu BChE (PDB kod 2PM8)¹⁴⁴ dobiven računalnom metodom molekulskog pristajanja. Nekovalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

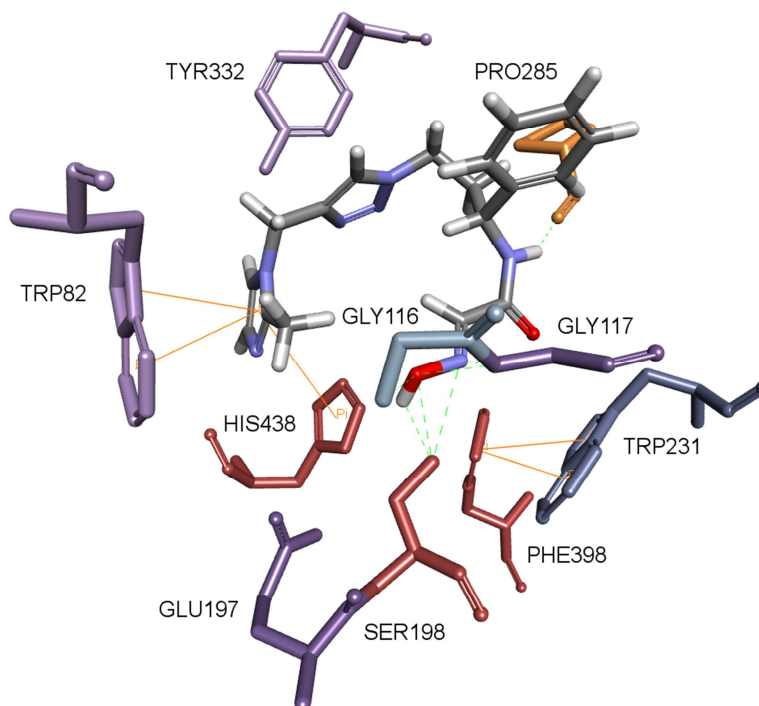
Model kompleksa oksima **II** i BChE (Slika 52) predviđa smještanje oksima **II** okomito na os koja spaja ulaz i dno ždrijela aktivnog mjesta. Ova orijentacija je omogućena zbog prisustva manjih aminokiselina Gln119, Val288 i Ala328 u aktivnom mjestu BChE kojim odgovaraju voluminoznije aromatske aminokiseline Tyr124, Phe297 i Tyr337 u aktivnom mjestu AChE. Dakle, ciklopentilni prsten zauzima prostor koji je inače nedostupan u aktivnom mjestu AChE. 2-hidroxiacetamidni dio usmjeren je prema acilnom džepu sa svojom hidroksilnom skupinom s kojom ostvaruje vodikove veze s Leu286. Dodatno, karbonilni kisik 2-hidroxiacetamidnog dijela ostvaruje vodikove veze sa Ser198. Suprotno radnoj hipotezi fenilni prsten spoja 26 usmjeren je prema ulazu u aktivno mjesto BChE, ali opet dovoljno blizu da ostvaruje π - π interakcije s Phe329. Ovaj aminokiselinski ostatak odgovara Phe338 u aktivnom mjestu AChE za koji je poznato da sudjeluje u aromatskim

interakcijama s, npr. donepezilom u kompleksu s TcAChE⁷ i HI-6 u kompleksu s mišjom AChE.²⁰²



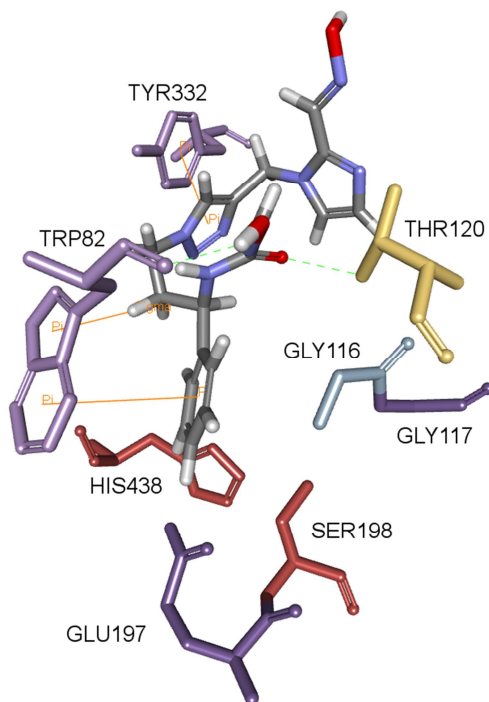
Slika 52. Model kompleksa oksima **II** u aktivnom mjestu ljudske BChE (PDB kod 2PM8)¹⁴⁴ dobiven računalnom metodom molekulskog pristajanja. Nevalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

Model kompleksa oksima **III** i BChE (Slika 53) predviđa veznu geometriju u kojoj je oksim **III** smješten u aktivno mjesto BChE u svijenoj konformaciji. Ponovo, ovo je očekivano obzirom na veličinu aktivnog mjesta i prisustvo alifatskih aminokiselina Gln119, Val288 i Ala328. Dakle, metilimidazolni prsten okupira volumen koji je inače nedostupan u aktivnom mjestu AChE zbog steričkih smetnji bočnog lanca Tyr337 i pritom sudjeluje u π - π interakcijama s Trp82 i His438. 2-hidroxiacetamidni dio usmjeren je prema dnu aktivnog mjesta pri čemu ostvaruje vodikove veze s Gly116 i Gly117 iz oksianionske šupljine i Ser198. Također, 2-hidroxiacetamidni dio preko amidnog vodika ostvaruje vodikovu vezu s Pro285. Pretpostavlja se da je stvaranje vodikovih veza s Pro285 djelomično odgovorno za razlike u inhibiciji konjske, ljudske i mišje BChE.¹⁴¹



Slika 53. Model kompleksa oksima **III** u aktivnom mjestu ljudske BChE (PDB kod 2PM8)¹⁴⁴ dobiven računalnom metodom molekulskog pristajanja. Nekovalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

Model kompleksa oksima **IV** i BChE (Slika 54) predviđa da su imidazol-2-karboksialdehid-oksim i s njim povezani triazolni prsten locirani u gornjem dijelu aktivnog mjesta dok su fenilni prsten i 2-hidroksiacetamidni dio smješteni blizu dna aktivnog mjesta. Ovakvo smještanje triazolnog prstena omogućava da isti sudjeluje u π - π interakcijama s Tyr332 koji odgovara Tyr341 u aktivnom mjestu AChE. U skladu s radnom hipotezom fenilni prsten spoja smješten je na dno aktivnog mjesta BChE dovoljno blizu da ostvaruje π - π interakcije s Trp82 koji osim toga sudjeluje u π -sigma interakciji s vodikovim atomom metilenske skupine i preko glavnog lanca u vodikovoj vezi s hidroksilnom skupinom 2-hidroksiacetamidnog dijela. Ova vodikova veza može se usporediti s onom između metilenske skupine u tetrahidroazepinskom prstenu i glavnog lanca Trp86 u kompleksu (–)-galantamina i TcAChE.¹⁹¹ 2-hidroksiacetamidni dio smješten je bliže centru aktivnog mjesta BChE i gotovo je okomit na os koja povezuje ulaz i dno ždrijela aktivnog mjesta. Pritom je usmjeren u područje između glavnog lanca Trp82 i bočnog lanca Thr120 s kojim preko karbonilnog kisika ostvaruje vodikovu vezu.



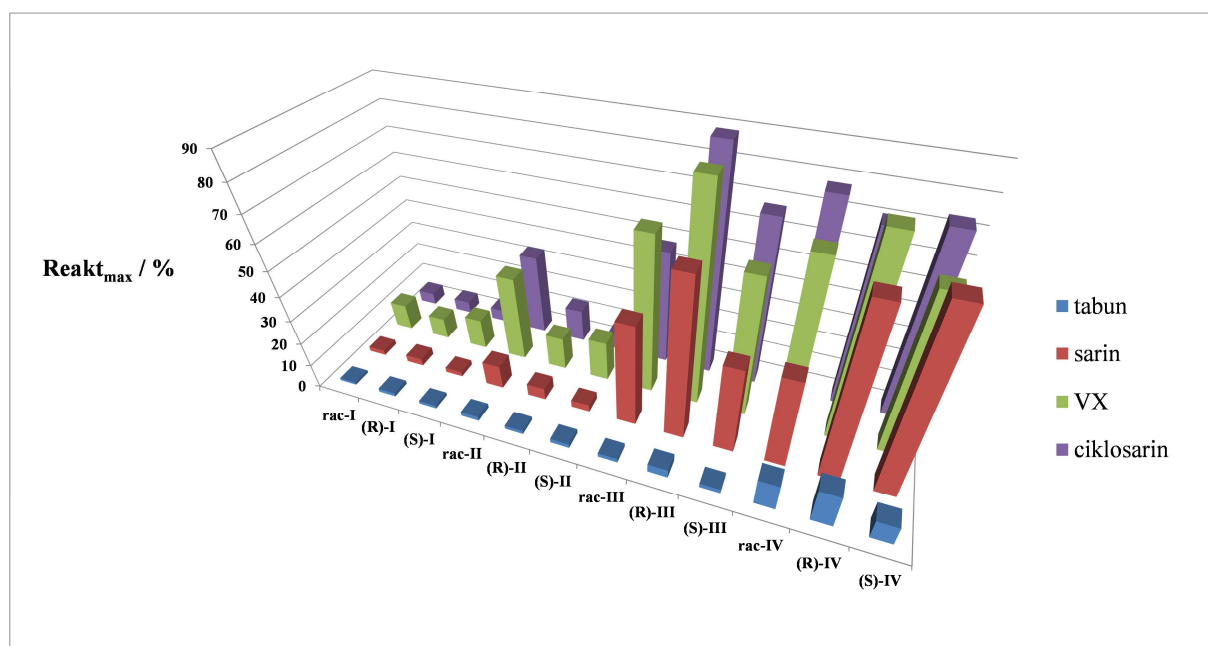
Slika 54. Model kompleksa oksima **IV** u aktivnom mjestu ljudske BChE (PDB kod 2PM8)¹⁴⁴ dobiven računalnom metodom molekulskog pristajanja. Nekovalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

4.6. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima

4.6.1. Probir oksimskih reaktivatora fosfiliranih kolinesteraza

Potencijal novih oksima **I**, **II**, **III** i **IV** kao reaktivatora kolinesteraza inhibiranih ŽBO tabunom, sarinom, VX-om i ciklosarinom procijenjen je određivanjem povratka aktivnosti inhibiranog enzima, odnosno postignutog maksimalnog postotka reaktivacije ($Reakt_{max}$) izračunatog pomoću jednadžbe (6) u prisutnosti jedne određene koncentracije oksima. Takav tzv. probir (engl. *screening*) oksima učinjen je kako bi se za detaljnije karakteriziranje učinkovitosti oksima u reaktivaciji odabrali oni oksimi koji postižu značajniju reaktivaciju kod koje je moguće određivanje kinetičkih konstanti reaktivacije K_{OX} i k_{+2} . Na Slici 55 prikazani su $Reakt_{max}$ za reaktivaciju AChE inhibirane tabunom, sarinom, VX-om i ciklosarinom postignuti pri koncentraciji oksima $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ u 24 h. Spojevi **III** i **IV** pokazali su potencijal za reaktivaciju AChE inhibirane sarinom (35–75 % $Reakt_{max}$), VX-om (60–85 % $Reakt_{max}$) i ciklosarinom (50–90 % $Reakt_{max}$) kako u racemičnom, tako i u enantiomernom obliku. Nasuprot tome, $Reakt_{max}$ za oksime **I** i **II** nije prelazio 30 % aktivnosti

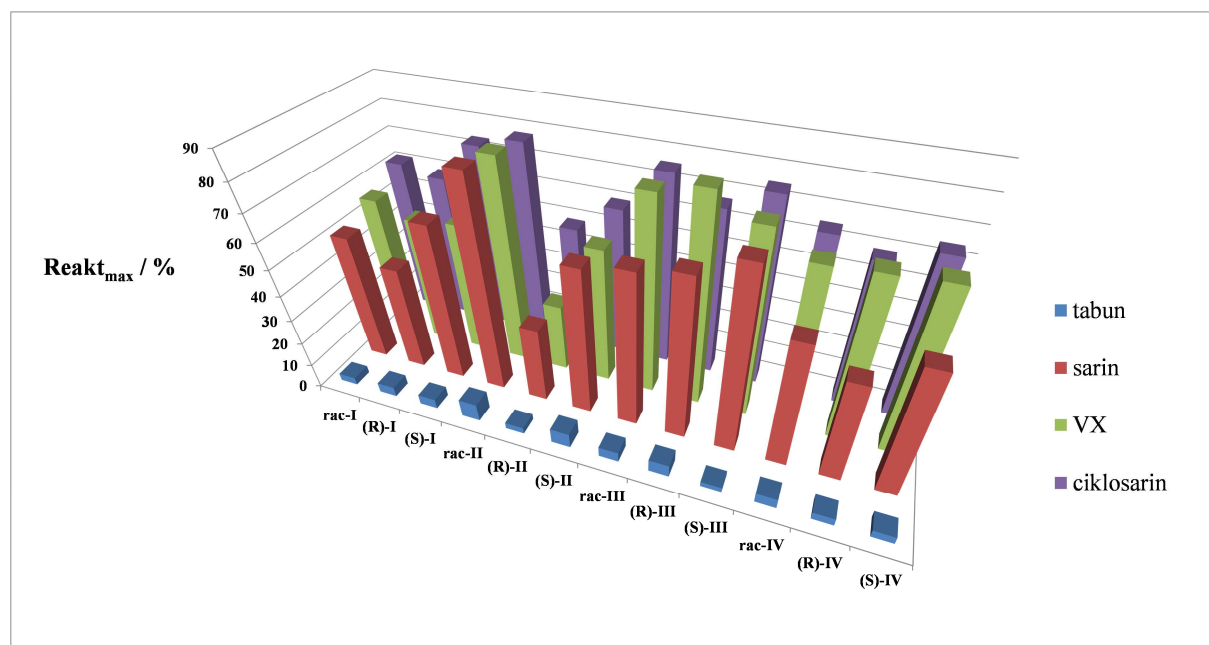
kontrolnog uzorka nefosfiliranog enzima. Kako se može vidjeti niti jedan od oksima nije pokazao potencijal za reaktivaciju tabunom inhibirane AChE pri korištenoj koncentraciji oksima. Ovaj rezultat u skladu je s literaturnim podacima koji opisuju izrazito tešku reaktivaciju tabunom inhibirane AChE koja je posljedica slabe elektrofilnosti i steričkog štita fosforoamidilnog adukta AChE.⁹⁹ U skladu s rezultatima probira oksima odlučeno je detaljnije okarakterizirati samo učinkovitost oksima **III** i **IV** u reaktivaciji sarinom, VX-om i ciklosarinom inhibirane AChE određivanjem kinetičkih konstanti reaktivacije K_{OX} , k_{+2} i k_r .



Slika 55. Maksimalni postotak reaktivacije ($Reakt_{max}$) ljudske AChE inhibirane živčanim bojnim otrovima tabunom, sarinom, VX-om i ciklosarinom postignut u 24 h u prisutnosti $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ oksima (rac-racemat, (R)-enantiomer, (S)-enantiomer).

Na isti način procijenjena je i potencijal novih oksima u reaktivaciji BChE inhibirane ŽBO tabunom, sarinom, VX-om i ciklosarinom (Slika 56). U slučaju reaktivacije BChE inhibirane sarinom, VX-om i ciklosarinom svi su oksimi pokazali određeni potencijal za reaktivaciju; sarin (30–85 % $Reakt_{max}$), VX (30–80 % $Reakt_{max}$) i ciklosarin (50–80 % $Reakt_{max}$). Nadalje, kao u slučaju reaktivacije tabunom inhibirane AChE niti jedan oksim nije pokazao potencijal za reaktivaciju tabunom inhibirane BChE pri koncentraciji oksima $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$. Ovo je očekivano povuče li se analogija između reaktivacije tabunom inhibirane BChE s izrazito teškom reaktivacijom tabunom inhibirane AChE koja je opisana u literaturi. Reaktivacija tabunom inhibirane BChE dosad je malo istraživana i poznato je tek nekoliko oksima koji su pokazali značajniju učinkovitost u reaktivaciji poput **E1 (K117)** i **E2**

(K127) te nekih imidazolijevih oksima.^{25,125} U skladu s rezultatima probira oksima odlučeno je detaljnije okarakterizirati učinkovitost svih oksima (**I**, **II**, **III** i **IV**) u reaktivaciji sarinom, VX-om i ciklosarinom inhibirane AChE određivanjem kinetičkih konstanti reaktivacije K_{OX} , k_{+2} i k_r .



Slika 56. Maksimalni postotak reaktivacije ($Reakt_{max}$) ljudske BChE inhibirane živčanim bojnim otrovima tabunom, sarinom, VX-om i ciklosarinom postignut u 24 h u prisutnosti $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ oksima (rac-racemat, (R)-enantiomer, (S)-enantiomer).

4.6.2. Reaktivacija fosfilirane AChE oksimima

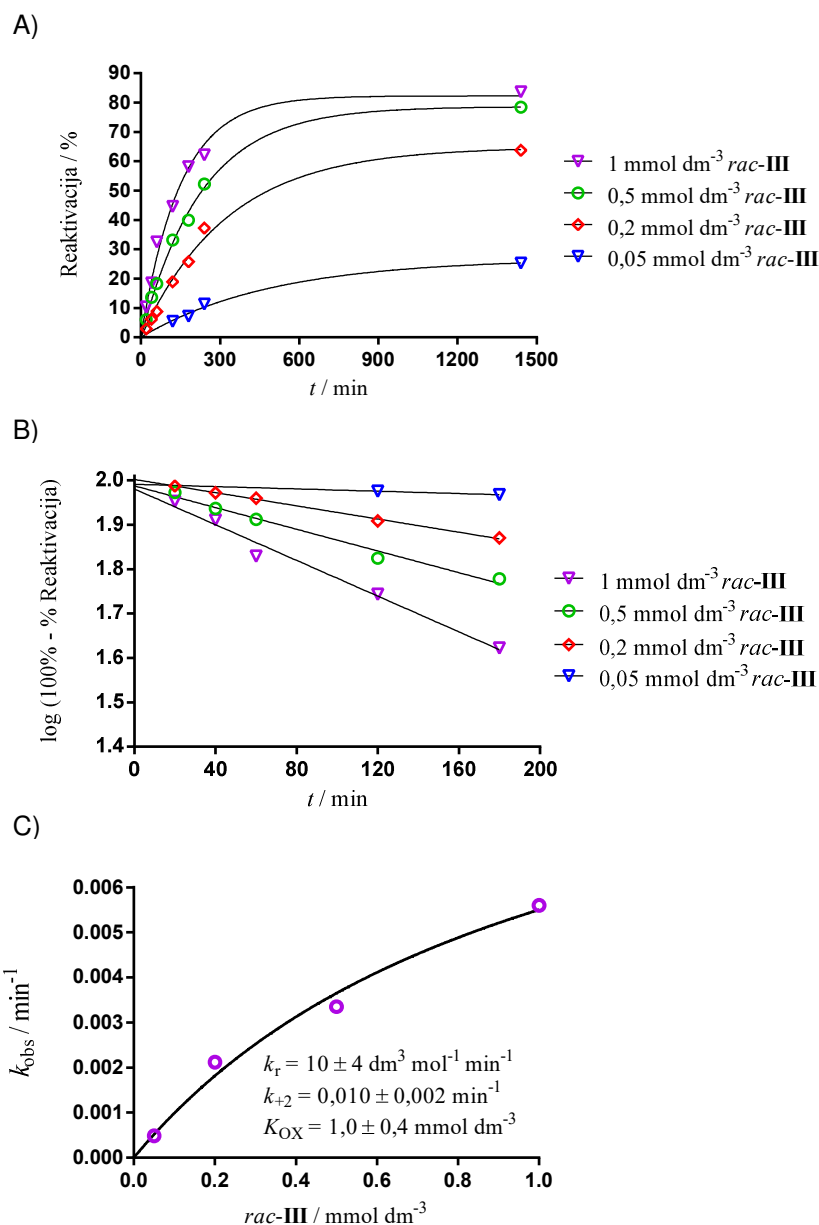
Reaktivacija ljudske AChE inhibirane živčanim bojnim otrovima ciklosarinom, sarinom i VX-om određena je iz učinka *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida **III** i **IV** na povratak aktivnosti inhibiranog oksima. Reprezentativni prikaz reaktivacije fosfilirane AChE oksimima dan je na Slici 57 u slučaju reaktivacije racematom oksima *rac-III*. Kinetički parametri reaktivacije AChE sumirani su u Tablicama 13-15. Ispitivani oksimi **III** i **IV** pokazali su smanjenu učinkovitost u reaktivaciji ljudske AChE inhibirane svim ŽBO u odnosu na klasične piridinijeve oksime 2-PAM i HI-6. Smanjena učinkovitosti oksima **III** u reaktivaciji podjednako je posljedica značajnog odstupanja vrijednosti konstante brzine defosfilacije katalitičkog serina enzima (k_{+2}) koliko i vrijednosti konstante disocijacije kompleksa oksim-fosfilirani enzim (K_{OX}) od vrijednosti optimalnih za reaktivaciju fosfilirane AChE

($k_{+2} > 0,1 \text{ min}^{-1}$; $K_{\text{OX}} < 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$). S druge strane, smanjena učinkovitost oksima **IV** pretežno je posljedica odstupanja vrijednosti k_{+2} od optimalne vrijednosti dok su vrijednosti K_{OX} blizu optimalne vrijednosti. Dakle, prisustvo druge oksimske skupine omogućuje dodatne nekovalentne interakcije s aminokiselinama aktivnog mjesta fosfilirane AChE što povećava afinitet fosfilirane AChE (niže vrijednosti K_{OX}) prema oksimu **IV** i na taj način povećava njegovu ukupnu reaktivacijsku učinkovitost (više vrijednosti k_r) u odnosu na oksim **III**. Naime, složenija struktura vezne skupine za periferno mjesto u slučaju oksima **III** i **IV**, koja omogućuje uspostavljanje nekovalentnih interakcija poput vodikovih veza i aromatskih π - π interakcija, pomaže stabiliziranju konformacije oksima s oksimskom skupinom pravilno orijentiranom za nukleofilni napad na atom fosfora u skladu s pretpostavljenim mehanizmom reaktivacije.

Također, učinkovitost oksima **III** i **IV** u reaktivaciji fosfiliranih AChE vjerojatno je smanjena i zbog visokog afiniteta slobodne AChE (Tablica 9, Tablica 11) prema oksimima što može rezultirati stabilnim vezanjem oksima u nepovoljnoj orijentaciji za reaktivaciju.

Kod svih oksima i ŽBO zabilježeno je postojanje različitih reaktivacijskih maksimuma manjih od 100 % i ovisnih o koncentraciji oksima. Ovaj efekt je u literaturi opisan kao posljedica tzv. starenja enzima odnosno dealkilacije fosfiliranog enzima ako vrijeme u kojem je dosegnut $Reakt_{\text{max}}$ značajno premašuju poluvremena starenja ($\tau_{1/2}$) fosfilirane AChE kao što je slučaj za reaktivaciju ciklosarinom inhibirane AChE ($\tau_{1/2} = 7 \text{ h}$) oksimom **III** i u slučaju reaktivacije sarinom inhibirane AChE ($\tau_{1/2} = 3 \text{ h}$) istim oksimom.⁷⁵ Također, postojanje različitih reaktivacijskih maksimuma u literaturi se opisuje kao posljedica reinhibicije reaktivirane AChE fosfiliranim oksimom ukoliko je takav konjugat stabilan.²⁰³ Međutim, ovo je objašnjenje vrlo dvojbeno uzme li se obzir da bi koncentracija takvog fosfiliranog oksima ovisila o postotku reaktivacije i bila neusporedivo manja od početne koncentracije oksima. Dakle, afinitet slobodnog enzima prema fosfiliranom oksimu bi trebao biti iznimno visok da bi se moglo primijetiti snižavanje enzimske aktivnosti, odnosno snižavanje reaktivacijskog maksimuma.

Suprotno od očekivanja, oba oksima ne pokazuju značajnu stereoselektivnost u reaktivaciji fosfiliranih AChE (2-3 puta veća učinkovitost (*R*)-enantiomera oksima **III**, neznatno veća učinkovitost (*S*)-enantiomera oksima **IV**) što upućuje na to da razlike u vezanju enantiomera ne pridonose povećanju broja konformacija oksima u aktivnom mjestu fosfilirane AChE koje omogućavaju produktivniju reaktivaciju enzima.



Slika 57. Reaktivacija ciklosarinom inhibirane ljudske AChE s oksimom *rac*-III. A) Ovisnost postotka reaktivacije fosfiliranog enzima o koncentraciji oksima i vremenu reaktivacije. B) Određivanje konstante brzine reaktivacije prvog reda, k_{obs} , primjenom jednadžbe (4) odnosno linearizacijom početnog dijela ovisnosti postotka reaktivacije o koncentraciji oksima u grafu A). C) Iz ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima određene su jednadžbom (4) maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda, k_{+2} , i konstanta disocijacije kompleksa fosfilirani enzim-oksime K_{OX} . Jednadžbom (5) određena je konstanta brzine reaktivacije drugog reda k_r .

Tablica 13. Reaktivacija ciklosarinom inhibirane ljudske AChE ispitivanim oksimima **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - III	(0,02-1,0)	0,010 $\pm$ 0,002	1,0 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 4	85	1200
(<i>R</i>)- III	(0,05-1,0)	0,014 $\pm$ 0,004	0,6 $\pm$ 0,3	22 $\pm$ 12	85	1200
(<i>S</i>)- III	(0,02-1,0)	0,005 $\pm$ 0,001	0,6 $\pm$ 0,3	9 $\pm$ 5	85	1200
<i>rac</i> - IV	(0,02-0,2)	0,011 $\pm$ 0,004	0,4 $\pm$ 0,2	29 $\pm$ 17	40	240
(<i>R</i>)- IV ^a	(0,02-0,2)	-	-	20 $\pm$ 1	40	240
(<i>S</i>)- IV ^a	(0,02-0,2)	-	-	24 $\pm$ 1	45	240
2-PAM ^b	(0,02-1,0)	0,12 $\pm$ 0,01	0,058 $\pm$ 0,015	2 000 $\pm$ 530	40-80	30-90
HI-6 ^b	(0,02-1,0)	0,33 $\pm$ 0,02	0,058 $\pm$ 0,011	5 740 $\pm$ 1 120	90	15-60

^aKinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (7) i (8) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. ^bPodaci preuzeti iz ref. 204.

Tablica 14. Reaktivacija sarinom inhibirane ljudske AChE ispitivanim oksimima **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - III	(0,05-1,0)	0,009 $\pm$ 0,003	1,1 $\pm$ 0,7	8 $\pm$ 6	75	1200
(<i>R</i>)- III	(0,05-1,0)	0,008 $\pm$ 0,001	0,4 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 9	90	1200
(<i>S</i>)- III	(0,05-1,0)	0,0032 $\pm$ 0,0006	0,5 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 3	70	1200
<i>rac</i> - IV	(0,02-0,2)	0,0073 $\pm$ 0,0007	0,10 $\pm$ 0,02	74 $\pm$ 16	75	360
(<i>R</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,0072 $\pm$ 0,0008	0,12 $\pm$ 0,03	60 $\pm$ 16	70	360
(<i>S</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,012 $\pm$ 0,002	0,16 $\pm$ 0,04	79 $\pm$ 23	80	360
2-PAM ^a	-	0,25	0,0276	9 058	-	-
HI-6 ^a	-	0,677	0,0501	1 351	-	-

^aPodaci preuzeti iz ref. 90.

Tablica 15. Reaktivacija VX-om inhibirane ljudske AChE ispitivanim oksimima **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - III	(0,02-1,0)	0,015 $\pm$ 0,001	0,46 $\pm$ 0,09	36 $\pm$ 9	85	360
(<i>R</i>)- III	(0,02-1,0)	0,033 $\pm$ 0,009	0,9 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 17	100	360
(<i>S</i>)- III	(0,02-1,0)	0,009 $\pm$ 0,003	0,5 $\pm$ 0,4	18 $\pm$ 15	85	360
<i>rac</i> - IV	(0,02-0,2)	0,014 $\pm$ 0,002	0,11 $\pm$ 0,03	132 $\pm$ 37	80	360
(<i>R</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,012 $\pm$ 0,002	0,14 $\pm$ 0,05	89 $\pm$ 33	90	360
(<i>S</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,014 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,06	119 $\pm$ 67	80	360
2-PAM ^a	-	0,215	0,0281	7 651	-	-
HI-6 ^a	-	0,242	0,0115	21 043	-	-

^aPodaci preuzeti iz ref. 90.

4.6.3. Reaktivacija fosfilirane BChE oksimima

Reaktivacija ljudske BChE inhibirane ŽBO ciklosarinom, sarinom i VX-om određena je iz učinka *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida **I**, **II**, **III** i **IV** na povratak aktivnosti inhibiranog oksima. Reprezentativni prikaz reaktivacije fosfilirane BChE oksimima dan je na Slici 58 u slučaju reaktivacije oksimom (*R*)-**III**.

Kinetički parametri reaktivacije BChE sumirani su u Tablicama 16-18. Ispitivani oksimi pokazali su smanjenu učinkovitost u reaktivaciji fosfiliranih BChE u usporedbi s klasičnim piridinijevim oksimom 2-PAM-om osim u slučaju reaktivacije ciklosarinom inhibirane BChE oksimom **III** (Tablica 16) pri čemu vrijednost k_r dvostruko nadmašuje vrijednost k_r za reaktivaciju 2-PAM-om pronađenu u literaturi.²⁰⁵ Za reaktivaciju ciklosarinom inhibirane BChE oksimom **III** određene su i najviše vrijednosti k_{+2} (k_{+2} (*rac*-**III**) = 0,14 $\pm$ 0,05 min⁻¹; k_{+2} (*S*-**III**) = 0,13 $\pm$ 0,05 min⁻¹) između svih određenih reaktivacija fosfiliranih enzima u ovom radu.

Jednako kao u slučaju reaktivacije fosfiliranih AChE slaboj učinkovitosti oksima u reaktivaciji fosfiliranih BChE vjerojatno doprinosi i razmjerno visoki afinitet slobodne BChE prema oksimima (Tablica 10, Tablica 12) što rezultira stabilnim vezanjem oksima u nepovoljnoj orijentaciji za reaktivaciju.

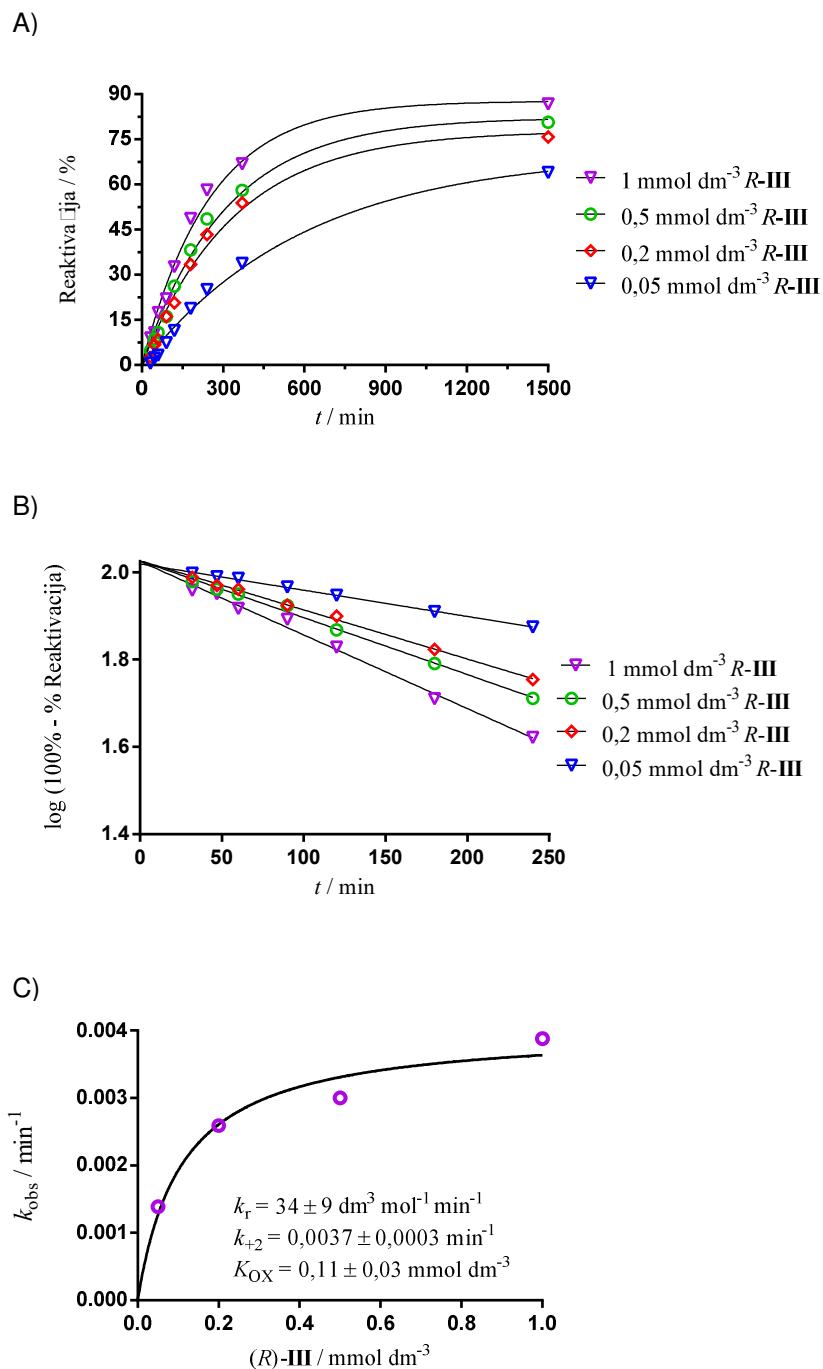
Jednako kao i slučaju reaktivacije fosfilirane AChE zabilježeno je postojanje različitih reaktivacijskih maksimuma manjih od 100 % i ovisnih o koncentraciji oksima. Dok u slučaju reaktivacije ciklosarinom inhibirane BChE ($\tau_{1/2} = 2,2 \text{ h}$)²⁰⁶ oksimom **I** i reaktivacije sarinom inhibirane BChE ($\tau_{1/2} = 12 \text{ h}$)²⁰⁶ ovo može biti posljedica tzv. starenja enzima, budući da vremena u kojima su dosegnuti $Reakt_{max}$ premašuju odgovarajuća $\tau_{1/2}$, u ostalim slučajevima je ovo vjerojatno posljedica nekog drugog efekta poput u literaturi opisanoj reinhibiciji slobodnog enzima fosfiliranim oksimom.²⁰³

Iako oksimi ne pokazuju značajnu stereoselektivnost u reaktivaciji fosfilirane BChE što ponovo upućuje na to da razlike u vezanju enantiomera ne pridonose povećanju broja konformacija oksima u aktivnom mjestu fosfilirane BChE koje omogućavaju reaktivaciju, u gotovo svim slučajevima primijećena je blago povećana učinkovitost (*S*)-enantiomera u reaktivaciji.

Budući da je oksim **III** više od deset puta manje učinkovit u reaktivaciji ciklosarinom inhibirane AChE, može se smatrati selektivnim reaktivatorom ciklosarinom inhibirane BChE. Uvođenje druge oksimske skupine u slučaju bisoksima **IV** nije doprinijelo povećanju učinkovitosti oksima u reaktivaciji fosfilirane BChE u usporedbi s monooksimom **III** pri čemu je i afinitet fosfilirane BChE ostao uglavnom isti prema oba oksima. Ovo je pomalo iznenađujuće budući da je s obzirom na voluminoznije aktivno mjesto fosfilirane BChE u odnosu na aktivno mjesto fosfilirane AChE, očekivano povećanje broja mogućih orijentacija oksima pa time i vjerojatnosti zauzimanja orijentacije s optimalnom udaljenosti i orijentacijom oksimske skupine od atoma fosfora koja omogućuje nukleofilni napad. U slučaju rotacije oksima unutar aktivnog mjesta fosfilirane BChE za punih 180° postojanje druge oksimske skupine zasigurno bi doprinijelo većem broju orijentacija oksima koje omogućavaju reaktivaciju. Dobiveni rezultati sugeriraju da je struktura oksima **IV** ipak suviše voluminozna u odnosu na slobodni prostor aktivnog mjesta fosfilirane BChE da bi bile dozvoljene rotacije oksima za punih 180°.

Podjednaka učinkovitost oksima **I** i **II** s manje razrađenom strukturom vezne skupine za periferno mjesto i oksima **III** i **IV** sa strukturno kompleksnijom veznom skupinom za periferno mjesto u reaktivaciji fosfilirane BChE nasuprot isključivoj učinkovitosti oksima **III** i **IV** u reaktivaciji fosfilirane BChE vjerojatno je posljedica razlike u volumenu aktivnog mjesta dvaju enzima. Voluminoznije aktivno mjesto BChE omogućava više orijentacija oksima u aktivnom mjestu i time povećava vjerojatnost zauzimanja orijentacije s optimalnom

udaljenosti i orijentacijom oksimske skupine od atoma fosfora za nukleofilni napad. Također, budući da voluminoznijim aromatskim aminokiselinama Tyr72, Tyr124 i Trp286 koje dijelom čine periferno mjesto AChE u aktivnom mjestu BChE odgovaraju manje alifatske aminokiseline Asn68, Gln119 i Ala277, umanjuje se prostor interakcije u perifernom mjestu i važnost vezne skupine za periferno mjesto za stabilizaciju konformacije oksima koja omogućuje reaktivaciju fosfilirane BChE. Zato su u slučaju reaktivacije fosfilirane BChE i oksimi **I** i **II** s manje razrađenom strukturom vezne skupine za periferno mjesto podjednako učinkoviti u reaktivaciji.



Slika 58. Reaktivacija VX-om inhibirane ljudske **BChE** s oksimom (*R*)-**III**. A) Ovisnost postotka reaktivacije fosfiliranog enzima o koncentraciji oksima i vremenu reaktivacije. B) Određivanje konstante brzine reaktivacije prvog reda, k_{obs} , primjenom jednadžbe (4) odnosno linearizacijom početnog dijela ovisnosti postotka reaktivacije o koncentraciji oksima u grafu A. C) Iz ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima određene su jednadžbom (4) maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda, k_{+2} , i konstanta disocijacije kompleksa fosfilirani enzim-oksom K_{OX} . Jednadžbom (5) određena je konstanta brzine reaktivacije drugog reda k_t .

Tablica 16. Reaktivacija ciklosarinom inhibirane ljudske BChE ispitivanim oksimima **I**, **II**, **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($Reakt_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$Reakt_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - I	(0,02-1,0)	0,022 $\pm$ 0,006	1,0 $\pm$ 0,4	21 $\pm$ 10	60	180
(<i>R</i>)- I	(0,02-1,0)	0,03 $\pm$ 0,01	1 $\pm$ 1	18 $\pm$ 18	70	180
(<i>S</i>)- I	(0,02-1,0)	0,021 $\pm$ 0,003	0,4 $\pm$ 0,1	55 $\pm$ 22	65	180
<i>rac</i> - II ^a	(0,02-0,2)	-	-	45 $\pm$ 2	65	180
(<i>R</i>)- II	(0,02-0,2)	0,018 $\pm$ 0,009	0,5 $\pm$ 0,3	37 $\pm$ 29	45	180
(<i>S</i>)- II	(0,02-0,2)	0,009 $\pm$ 0,002	0,16 $\pm$ 0,06	53 $\pm$ 21	50	180
<i>rac</i> - III	(0,02-1,0)	0,14 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,6	112 $\pm$ 69	70	120
(<i>R</i>)- III	(0,02-1,0)	0,08 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,4	67 $\pm$ 28	50	120
(<i>S</i>)- III	(0,02-1,0)	0,13 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,6	143 $\pm$ 109	75	120
<i>rac</i> - IV	(0,02-0,2)	0,014 $\pm$ 0,006	0,3 $\pm$ 0,2	52 $\pm$ 43	40	180
(<i>R</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,017 $\pm$ 0,008	0,3 $\pm$ 0,2	57 $\pm$ 51	70	180
(<i>S</i>)- IV	(0,02-0,2)	-	-	59 $\pm$ 1	55	180
2-PAM ^b	(0,01-0,2)	0,029 $\pm$ 0,015	0,5 $\pm$ 0,4	54 $\pm$ 47	80	250

^aKinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (7) i (8) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. ^bPodaci preuzeti iz ref. 205.

Tablica 17. Reaktivacija sarinom inhibirane ljudske **BChE** ispitivanim oksimima **I**, **II**, **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($\text{Reakt}_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$\text{Reakt}_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - I	(0,02-1,0)	0,040 $\pm$ 0,005	0,6 $\pm$ 0,2	63 $\pm$ 19	80	120
(<i>R</i>)- I	(0,05-1,0)	0,010 $\pm$ 0,003	0,8 $\pm$ 0,5	12 $\pm$ 8	75	1100
(<i>S</i>)- I	(0,02-1,0)	0,032 $\pm$ 0,003	0,45 $\pm$ 0,09	73 $\pm$ 17	80	1100
<i>rac</i> - II	(0,02-0,2)	0,006 $\pm$ 0,001	0,27 $\pm$ 0,07	22 $\pm$ 6	100	1400
(<i>R</i>)- II	(0,02-0,2)	0,0011 $\pm$ 0,0006	0,3 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 4	50	1400
(<i>S</i>)- II	(0,02-0,2)	0,0043 $\pm$ 0,0007	0,19 $\pm$ 0,05	23 $\pm$ 7	80	1400
<i>rac</i> - III	(0,05-1,0)	0,009 $\pm$ 0,001	0,4 $\pm$ 0,1	24 $\pm$ 7	85	1200
(<i>R</i>)- III	(0,05-1,0)	0,0041 $\pm$ 0,0003	0,18 $\pm$ 0,05	23 $\pm$ 6	85	1200
(<i>S</i>)- III	(0,05-1,0)	0,0143 $\pm$ 0,0009	0,31 $\pm$ 0,04	46 $\pm$ 7	100	180
<i>rac</i> - IV	(0,05-0,2)	0,0027 $\pm$ 0,0009	0,3 $\pm$ 0,2	8 $\pm$ 5	55	1300
(<i>R</i>)- IV ^a	(0,05-0,2)	-	-	6,4 $\pm$ 0,7	50	1300
(<i>S</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,0024 $\pm$ 0,0006	0,19 $\pm$ 0,08	12 $\pm$ 6	70	1300
2-PAM ^b	(0,01-0,2)	0,013 $\pm$ 0,003	0,1 $\pm$ 0,05	118 $\pm$ 57	75	200

^aKinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (7) i (8) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. ^bPodaci preuzeti iz ref. 205.

Tablica 18. Reaktivacija VX-om inhibirane ljudske BChE ispitivanim oksimima **I**, **II**, **III** i **IV** u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. Kinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (4) i (5) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. U tablici su navedeni postotci reaktivacije ($\text{Reakt}_{\text{max}}$) te vrijeme (t) u kojem su postignuti.

Oksim	[Oksim] / mmol dm ⁻³	k_{+2} / min ⁻¹	K_{ox} / mmol dm ⁻³	k_r / dm ³ mol ⁻¹ min ⁻¹	$\text{Reakt}_{\text{max}}$ / %	t / min
<i>rac</i> - I	(0,02-1,0)	0,010 $\pm$ 0,003	0,8 $\pm$ 0,4	12 $\pm$ 8	75	1300
(<i>R</i>)- I	(0,05-1,0)	0,019 $\pm$ 0,003	1,1 $\pm$ 0,3	17 $\pm$ 6	75	1300
(<i>S</i>)- I ^a	(0,05-1,0)	-	-	10,9 $\pm$ 0,8	90	1300
<i>rac</i> - II	(0,02-0,2)	0,005 $\pm$ 0,001	0,15 $\pm$ 0,05	36 $\pm$ 14	100	1300
(<i>R</i>)- II	(0,02-0,2)	0,0012 $\pm$ 0,0002	0,12 $\pm$ 0,04	9 $\pm$ 3	65	1300
(<i>S</i>)- II	(0,02-0,2)	0,003 $\pm$ 0,001	0,2 $\pm$ 0,2	14 $\pm$ 13	75	1300
<i>rac</i> - III	(0,02-1,0)	0,0047 $\pm$ 0,0003	0,25 $\pm$ 0,04	19 $\pm$ 3	85	1200
(<i>R</i>)- III	(0,02-1,0)	0,0037 $\pm$ 0,0003	0,11 $\pm$ 0,03	34 $\pm$ 9	85	1200
(<i>S</i>)- III	(0,02-1,0)	0,0063 $\pm$ 0,0003	0,29 $\pm$ 0,04	22 $\pm$ 3	85	1200
<i>rac</i> - IV	(0,02-0,2)	0,0026 $\pm$ 0,0006	0,27 $\pm$ 0,09	10 $\pm$ 4	60	1200
(<i>R</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,0027 $\pm$ 0,0005	0,26 $\pm$ 0,08	10 $\pm$ 4	55	1200
(<i>S</i>)- IV	(0,02-0,2)	0,0036 $\pm$ 0,0009	0,3 $\pm$ 0,1	11 $\pm$ 5	65	1200
2-PAM ^b	-	1,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,4	580		

^aKinetičke konstante ($\pm$ standardna pogreška) izračunate su jednadžbama (7) i (8) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih u najmanje dva pokusa. ^bPodaci preuzeti iz ref. 207.

4.6.4. Molekulsko modeliranje kompleksa ciklosarinom inhibirane BChE i oksima **III**

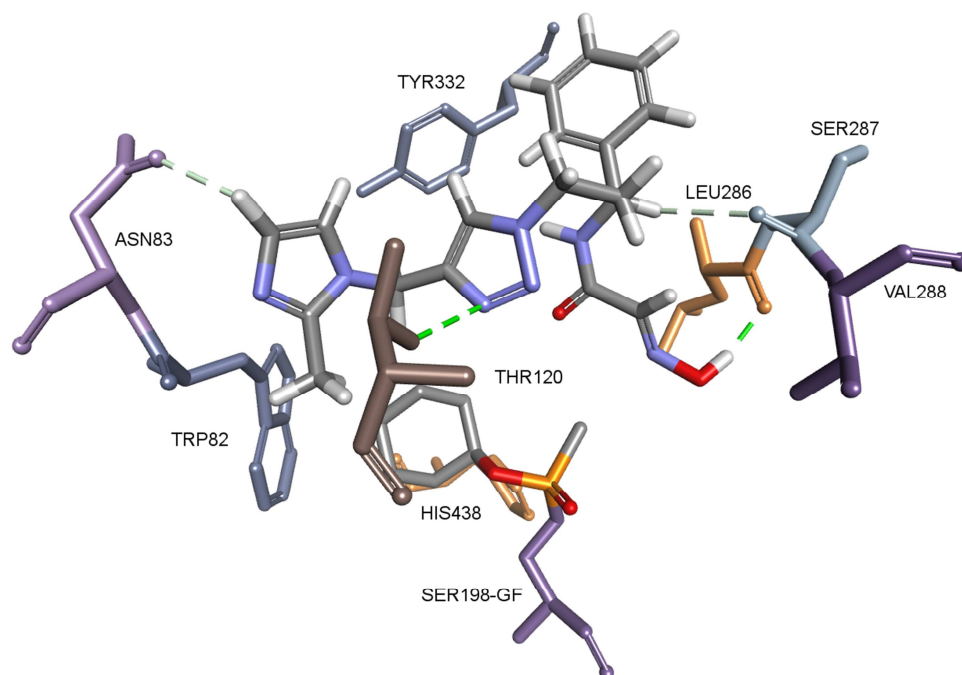
Budući da su u slučaju reaktivacije ciklosarinom inhibirane BChE dobivene najveće vrijednosti kinetičkih parametara (k_{+2} , k_r) kojima se opisuje učinkovitost reaktivatora, računalnom metodom molekulskog pristajanja predviđene su interakcije između (*R*)-enantiomera oksima **III** i aminokiselnih ostataka u aktivnom mjestu ciklosarinom inhibirane BChE. Kako kristalna struktura ciklosarinom inhibirane BChE nije dostupna, napravljen je model preklapanjem kristalne strukture ljudske BChE (PDB: 2PM8)¹⁴⁴ i kristalne strukture mišje AChE inhibirane ciklosarinom (PDB: 3ZLU)¹¹ i translacijom ciklosarinskog dijela konjugata AChE i ciklosarina u aktivno mjesto BChE povezivanjem kisikovog atoma hidroksilne skupine Ser198 BChE s atomom fosfora iz konjugata AChE i ciklosarina.

Model kompleksa između oksima **III** i ciklosarinom inhibirane ljudske BChE prikazan na Slici 59 i predviđa najvjerojatniju konformaciju oksima unutar aktivnog mjesta fosfilirane BChE. Translacijom i rotacijom oko jednostrukih veza moguće je postići konformaciju oksima **III** koja omogućava nukleofilni napad oksimske skupine na atom fosfora i tako reaktivira fosfiliranu BChE. Izdvojena konformacija odabrana je između 20 dobivenih konformacija prema kriteriju udaljenosti između kisika oksimske skupine i atoma fosfora fosfilirane BChE koja treba biti manja od 5 Å. Pritom je oksim **III** orijentiran okomito na os koja spaja otvor aktivnog mjesta s dnom aktivnog mjesta pri čemu je fenilna skupina smještena bliže otvoru aktivnog mjesta, a metilimidazolijev prsten u prostoru iznad kolinskog veznog mjesta radeći vodikovu vezu s kisikom karboksilne skupine Asn83. Triazolni prsten smješten je u središte aktivnog mjesta sudjelujući preko dušikova atoma (N3) u vodikovoj vezi s hidroksilnom skupinom Thr120. Hidroksiiminoacetamidni dio usmjeren je u acilni džep sudjelujući oksimskom skupinom u vodikovoj vezi s karbonilnim kisikom Leu286. U ovoj orijentaciji oksimska skupina nije u pravilnom položaju za nukleofilni napad na atom fosfora te je prethodno nužna promjena konformacija koja će dovesti oksimsku skupinu u optimalnu poziciju za nukleofilni napad. Pored navedenih vodikovih veza predviđena konformacija oksima **III** u aktivnom mjestu ciklosarinom inhibirane BChE dodatno je stabilizirana vodikovom vezom između metilenske skupine (CH₂NH) i karbonilnog kisika Ser287.

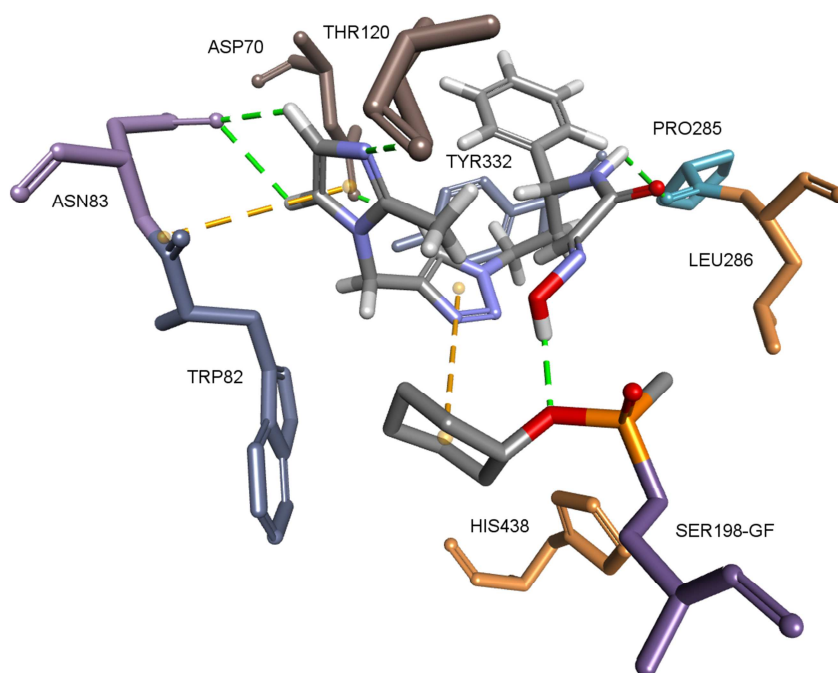
Ovakvo smještanje oksima **III** nije sukladno radnoj hipotezi o usmjerenosti tri vrste strukturnih elemenata prema perifernom mjestu, kolinskom mjestu i tzv. trećem veznom mjestu kod AChE. Ovo je donekle očekivano budući da se glavnina razlike u sastavu aminokiselina aktivnoga mjesta AChE u odnosu na BChE odnosi na šest aromatskih aminokiselina kod AChE kojima kod BChE odgovaraju alifatskih aminokiselina (Tyr72, Tyr124, Trp286, Phe295, Phe297, Tyr337). Osim što BChE ima ~200 Å³ veće aktivno mjesto razlika u aminokiselinskom sastavu aktivnoga mjesta omogućuje oksimu **III** zauzimanje konformacija koje ne bi bile moguće unutar aktivnoga mjesta AChE zbog steričkih ograničenja uzrokovanih aromatskim aminokiselinama.

Također, prilikom analiziranja rezultata molekulskog pristajanja treba uzeti u obzir ograničenja metode korištene u ovom radu koja se odnosi na rigidnost receptora. Naime, dok je vezanje supstrata ili liganada u aktivno mjesto enzima dinamičan proces tijekom kojeg enzim prolazi kroz različita konformacijska stanja karakterizirana različitim orijentacijama aminokiselinskih ostataka,²⁰⁸ tijekom smještanja liganda u aktivno mjesto enzima metodom

molekulskog pristajanja enzim je rigidan i nisu dozvoljene različite konformacije aminokiselinskih ostataka. U slučaju smještanja oksima u aktivno mjesto fosfiliranog enzima, na rezultat utječu ne samo konformacije aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta, već i konformacija organofosfornog dijela konjugata kolinesteraze i OP-a zabilježena u kristalnoj strukturi enzima korištenog kao receptor. Tako i konformacija oksima **III** u aktivnom mjestu ciklosarinom inhibirane BChE dobivena molekulskim pristajanjem ovisi o konformaciji ciklosarinskog dijela, ponajprije cikloheksilne skupine, vezanog na Ser198. Isprobavanjem alternativne konformacije cikloheksilnog dijela vezanog ciklosarina moguće je simulirati drugačiju prostornu usmjerenost ove skupine do koje dolazi prolaskom enzima kroz razna konformacijska stanja te tako ispitati kako ona utječe na smještanje oksima **III** i orijentaciju oksimske skupine. Na Slici 60 prikazan je model kompleksa između oksima **III** i ciklosarinom inhibirane BChE dobiven molekulskim pristajanjem čemu je prethodila promjena konformacije cikloheksilnog dijela ciklosarina otklonom za 90° u odnosu na orijentaciju zabilježenu u kristalnoj strukturi. Usporedbom ovog modela s onim prikazanim na Slici 59 može se uočiti da je najveća promjena između dviju konformacija oksima u približavanju oksimske skupine atomu fosfora što potvrđuje da je za optimalniji pristup oksimske skupine spoja **27** fosforu dovoljna rotacija cikloheksilnog prstena. Također, u ovoj orijentaciji cikloheksilni prsten ostvaruje π interakciju s triazolnim prstenom oksima **III**. Ova interakcija dodatno stabilizira ovu konformaciju cikloheksilnog prstena i povećava vjerojatnost nalaženja prstena u konformaciji koja olakšava orijentaciju.



Slika 59. Model kompleksa oksima **III** u aktivnom mjestu ciklosarinom inhibirane BChE (model dobiven superpozicijom kristalne strukture ljudske BChE (PDB: 2PM8)¹⁴⁴ i kristalne strukture mišje AChE inhibirane ciklosarinom (PDB: 3ZLU)¹¹ dobiven računalnom metodom molekulskog smještavanja. Vodikove veze prikazane su zelenim crtkanim linijama.



Slika 60. Model kompleksa oksima **III** u aktivnom mjestu ciklosarinom inhibirane BChE (model dobiven superpozicijom kristalne strukture ljudske BChE (PDB: 2PM8)¹⁴⁴ i kristalne strukture mišje AChE inhibirane ciklosarinom (PDB: 3ZLU)¹¹ s alternativnom konformacijom cikloheksilnog prstena ciklosarina dobiven računalnom metodom molekulskog smještavanja. Nekovalentne interakcije prikazane su zelenim crtkanim linijama (vodikove veze) i narančastim linijama (π interakcije).

4.7. Analiza učinkovitosti novih oksima u reverzibilnoj inhibiciji kolinesteraza i reaktivaciji fosfiliranih kolinesteraza

Usporedbom afiniteta slobodnih enzima ($1/K_I$) s afinitetom fosfiliranih enzima ($1/K_{OX}$) prema oksimima može se zaključiti da, osim u slučaju VX-om inhibirane AChE, slobodni enzim ima veći afinitet nego fosfilirani enzim prema oksimu koji pokazuju potencijal za reaktivaciju inhibiranih AChE (III i IV) i BChE (I, II, III i IV). Ovo je nepovoljno po reaktivacijsku učinkovitost ovih oksima budući da visoki afinitet slobodnog enzima prema oksimu može rezultirati stabiliziranjem oksima vezanog u nepovoljnoj orijentaciji za reaktivaciju. Visok stupanj selektivnosti slobodne BChE u odnosu na slobodnu AChE, koji je posljedica većeg volumena aktivnog mjesta BChE i razlike u aminokiselinskom sastavu u usporedbi s aktivnim mjestom AChE, nepovoljno utječe i na potencijalnu profilaktičku primjenu ovih spojeva u slučaju trovanja ŽBO. Naime, visok stupanj selektivnosti BChE u odnosu na AChE smanjuje mogućnost upotrebe oksima u zaštiti katalitičkog mjesta AChE od fosfilirajućeg agensa putem reverzibilne inhibicije, ali i visok stupanj inhibicije BChE umanjuje njezino endogeno djelovanje kao biološkog čistila. Ovaj rezultat upućuje na zaključak da dizajniranje oksimskih reaktivatora fosfilirane AChE primijenjeno u ovom radu, pri kojem se optimalna orijentacija oksimske skupine za učinkovitu reaktivaciju smjera postići maksimiziranjem interakcija između oksima i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu, ima ograničenu primjenu. Naime, povećavanje broja interakcija između oksima i aminokiselina u aktivnom mjestu može smanjiti mogućnost postizanja optimalne orijentacije oksima za uspješnu reaktivaciju zbog smanjenja rotacijskih i translacijskih stupnjeva slobode oksima.

Također, oslanjanje na konformacije liganada i njihove interakcije s aminokiselinama, zabilježene u kristalnim strukturama njihovih kompleksa s AChE, prilikom dizajniranja oksimskih reaktivatora ima ograničenu primjenu. Naime, konformacija liganda zabilježena u kristalnoj strukturi tek je jedna od mnogih koje se pojavljuju u dinamičnom procesu vezanja liganda, ne nužno i ona konformacija koja je odgovorna za visok afinitet prema istom ligandu. Dakle, uvođenje onih strukturnih elemenata, koji imaju ključnu ulogu u interakcijama između liganda u konformaciji zabilježenoj u kristalnoj strukturi i aminokiselina u aktivnom mjestu, u strukturu novog oksima ne mora nužno dovesti do vezanja novog oksima u konformaciji identičnoj onoj zabilježenoj u kristalnoj strukturi. Također, prilikom dizajniranja oksimskih reaktivatora procuvane su samo kristalne strukture kompleksa slobodne AChE i liganada. Stoga se može očekivati će interakcije između novog oksima i aminokiselina aktivnog mjesta,

koje bi trebale dovesti do vezanja oksima u konformaciji zabilježenoj u kristalnoj strukturi kompleksa liganda sa slobodnom AChE, biti teže postići kada prostor aktivnog mjesta ispunja i dio molekule konjugiranog OP-a. Ovime se može objasniti neučinkovitost oksima **I** i **II**, odnosno smanjena učinkovitost oksima **III** i **IV** u reaktivaciji fosfiliranih AChE budući da su isti dizajnirani na temelju kristalnih struktura kompleksa izabranih liganada i slobodne AChE. Time više iznenađuje da su se oksimi **III** i **IV** pokazali učinkovitijim u reaktivaciji ciklosarinom inhibirane BChE nego ciklosarinom inhibirane AChE. Ovo je vjerojatno posljedica voluminoznijeg aktivnog mjesta BChE koje omogućava više orijentacija oksima u aktivnom mjestu i time povećava vjerojatnost zauzimanja orijentacije s optimalnom udaljenosti i orijentacijom oksimske skupine od atoma fosfora za nukleofilni napad. Ipak, treba napomenuti da razlike u kinetičkim parametrima koji opisuju interakcije između AChE ili BChE i istih supstrata i liganda ne ovise isključivo o volumenu aktivnog mjesta, već i ukupnoj razlici u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi dvaju enzima koja inherentno određuje fleksibilnost enzima i diktira dinamiku konformacijskih promjena koje upravljaju vezanjem supstrata i liganada te pojedini aminokiselinski ostatci aktivnog mjesta imaju važniju ulogu od steričke. Tako je npr., trostruki mutant mišje AChE Phe295Leu/Phe297Ile/Tyr337Ala, koji aminokiselinskim sastavom i volumenom oponaša acilni džep i kolinsko mjesto BChE, otprilike 20 puta sporije inhibiran *S_p* enantiomerom analoga ciklosarina nego BChE dok je dvostruki mutant Tyr337Ala/Phe338Ala četiri puta brže inhibiran nego BChE.³⁴

Očekivano, rezultati molekulskog pristajanja predviđaju da se svi oksimi, izuzev oksima **I**, smještavaju u aktivno mjesto AChE s veznom skupinom za periferno mjesto u perifernom veznom mjestu (Trp286), fenilnim prstenom u kolinskom veznom mjestu (Trp82) i 2-hidroksiiminoacetamidnom skupinom u tzv. trećem veznom mjestu oko aktivnog Ser203 u skladu s radnom hipotezom. Različit način smještanja oksima **I** vjerojatno je rezultat nedostatka složenije strukture vezne skupine za periferno mjesto koja je prisutna u spojevima **II**, **III** i **IV** u odnosu na azidnu skupinu prisutnu kod oksima **I**. U slučaju BChE nijedan od oksima se u potpunosti ne veže u skladu s navedenom hipotezom, iako su sve tri vezne skupine uključene u nekovalentne interakcije s enzimom, što je očekivano s obzirom da su novi oksimi dizajnirani prema obilježjima aktivnog mjesta AChE. Razlike u aminokiselinskom sastavu aktivnog mjesta dvaju enzima onemogućavaju postizanje istog tipa interakcije koji je namijenjen nekom dijelu strukture novih oksima s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta oba enzima. Tako npr., u perifernom mjestu ljudske BChE se na

položajima Tyr72, Tyr124 i Trp286 u ljudskoj AChE nalaze alifatske aminokiseline Asn68, Gln119 i Ala277 čime se u slučaju BChE onemogućava ostvarivanje π - π interakcija koje je predviđeno između vezne skupine za periferno mjesto i aminokiselina perifernog veznog mjesta.

Između prikupljenih rezultata posebno se ističe iznimna selektivnost i stereoselektivnost BChE prema oksimu **III**. Selektivnost BChE prema ovom oksimu potvrđena je i rezultatima reaktivacije ciklosarinom inhibiranih kolinesteraza pri čemu se oksim **III** pokazao više od 10 puta učinkovitijim u reaktivaciji inhibirane BChE nego inhibirane AChE. Pritom su određene vrijednosti k_r koja dvostruko nadmašuje vrijednost k_r za reaktivaciju klasičnim piridinijevim oksimom 2-PAM-om pronađenu u literaturi²⁰⁵ i najviše vrijednosti k_{+2} između svih određenih reaktivacija fosfiliranih enzima u ovom radu. Također, rezultati molekuskog pristajanja predviđaju da se oksim **III** smješta u aktivno mjesto ciklosarinom inhibirane BChE na način vrlo sličan onome u aktivnom mjestu slobodne BChE. Oksim **III** stoga zavrijeđuje posebnu pažnju te bi buduća istraživanja usmjerena na razvoj selektivnih reverzibilnih inhibitora BChE ili reaktivatora fosfiliranog enzima trebala polaziti od ovog oksima zadržavajući sve njegove strukturne karakteristike osim oksimske skupine koja bi se mogla zamijeniti nekom nenukleofinom skupinom u slučaju razvoja reverzibilnog inhibitora. U slučaju razvoja reaktivatora fosfiliranog enzima oksimska skupina mogla bi se zamijeniti nekom drugom, ne nužno nukleofilnom skupinom poput imidazolijske skupine, za koju je dokazano da može uspješno reaktivirati fosfilirani enzim.²⁰⁹

5. ZAKLJUČCI

- Metodama molekulskog modeliranja analiziranjem kristalnih struktura kompleksa AChE i raznih liganada pohranjenih u PDB bazi i proučavanjem konformacijskih promjena aminokiselina u aktivnom mjestu uzrokovanih vezanjem liganada definirane su strukturne karakteristike novih reaktivatora fosfiliranih kolinesteraza te su postavljene smjernice za sintezu kiralnih oksima iz skupine *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida.
- Polazeći od racemičnog 1-fenilprop-2-en-1-amina pripravljenog iz 3-fenilprop-2-en-1-ola Overmanovom reakcijom i hidrolizom nastalog *N*-(1-fenilalil)-2,2,2-trikloracetamida pripravljeni su nenabijeni oksimi: *N*-(3-azido-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**I**), *N*-(3-(4-ciklopentil-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**II**), *N*-(3-(4-((2-metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamid (**III**) i *N*-(3-(4-((2-(hidroksiimino)metilimidazol-1-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-1-fenilpropil)-2-hidroksiiminoacetamida (**IV**). Novi oksimi pripremljeni su s prinosom između 21 i 27 % u 8 ili 9 sintetskih koraka.
- Enantiomeri novih kiralnih oksima pripremljenih u racemičnom obliku odvojeni su kromatografijom na kiralnim kolonama uz upotrebu HPLC-a osim oksima **III**. Enantiomeri oksima **III** pripremljeni su uz retenciju konfiguracije iz odgovarajućih enantiomera oksima **I**. Apsolutna konfiguracija oksima **I**, **II** i **IV** određena je usporedbom njihovih retencijskih vremena s retencijskim vremenima *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida pripremljenih iz enantiomerno obogaćenog 1-fenilprop-2-en-1-amina. Optička čistoća odijeljenih enantiomera *N*-supstituiranih 2-hidroksiiminoacetamida je između 96 i 99 %.
- Svi ispitivani kiralni oksimi reverzibilno su inhibirali kolinesteraze i u racemičnom i u enantiomerno čistom obliku pokazujući mješoviti tip inhibicije s konstantama disocijacije oksim-enzim kompleksa, K_i , u mikromolarnom području. K_i za AChE su u rasponu od 50 do 1200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, a za BChE od 0,3 do 130 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ s istim redoslijedom inhibitorne moći: **I** < **II** < **IV** < **III**. BChE je pokazala selektivnost prema sva četiri oksima. Oksim **III** može se smatrati selektivnim inhibitorom BChE budući da BChE pokazuje gotovo 150 puta veći afinitet prema oksimu nego AChE. Značajna

stereoselektivnost određena je u samo u slučaju BChE prema oksimu **III** s 22 puta većim afinitetom za (*S*)-enantiomer nego za (*R*)-enantiomer.

- Oksimi **III** i **IV** pokazali su smanjenu učinkovitost u reaktivaciji AChE inhibirane ciklosarinom, sarinom i VX-om u odnosu na klasične piridinijeve oksime 2-PAM i HI-6. Oksimi **III** i **IV** ne pokazuju značajnu stereoselektivnost u reaktivaciji fosfilirane AChE. Oksimi **I**, **II** i **IV** pokazali su smanjenu učinkovitost u reaktivaciji BChE inhibirane ciklosarinom, sarinom i VX-om u usporedbi s klasičnim piridinijevim oksimom 2-PAM-om. Oksim **III** pokazao je smanjenu reaktivacijsku učinkovitost u reaktivaciji BChE inhibirane sarinom i VX-om dok je u slučaju reaktivacije BChE inhibirane ciklosarinom pokazao veću reaktivacijsku učinkovitost od 2-PAM-a. Za reaktivaciju ciklosarinom inhibirane BChE oksimom **III** određene su i najviše vrijednosti k_{+2} (k_{+2} (*rac*-**III**) = $0,14 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$; k_{+2} (*S*-**III**) = $0,13 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$) u ovom radu. Oksimi **I**, **II**, **III** i **IV** ne pokazuju značajnu stereoselektivnost u reaktivaciji fosfilirane BChE.
- Molekulskim pristajanjem predviđene su strukture kompleksa i interakcije ispitivanih oksima sa kolinesterazama. Kod kompleksa AChE s oksimima **II**, **III** i **IV** predviđeno je da se vežu u aktivno mjesto s veznom skupinom za periferno mjesto u perifernom veznom mjestu (Trp286), fenilnim prstenom u kolinskom veznom mjestu (Trp82) i 2-hidroksiiminoacetamidnom skupinom u tzv. trećem veznom mjestu oko aktivnog Ser203 u skladu s radnom hipotezom. U slučaju BChE nijedan od oksima se u potpunosti ne veže u skladu s navedenom hipotezom iako su sve tri vezne skupine uključene u nekovalentne interakcije s enzimom. Molekulsko pristajanje ukazalo je da na razlike u smještavanju ispitivanih oksima u aktivnom mjestu AChE i BChE najviše utječu razlike u aminokiselinskom sastavu njihovih aktivnih mjesta na pozicijama Tyr72, Tyr124, Phe297 i Tyr337 u aktivnom mjestu AChE. Molekulskim pristajanjem predviđena struktura kompleksa oksima **III** i ciklosarinom inhibirane BChE pokazuje da iako se odgovarajući strukturni elementi ne vežu u skladu s radnom hipotezom, oksimska skupina je na udaljenosti od atoma fosfora koja omogućuje reaktivaciju.

6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Kratika	Značenje
2-PAM	2-hidroksiiminometil- <i>N</i> -metilpiridinijev bromid
4-PAM	4-hidroksiiminometil- <i>N</i> -metilpiridinijev bromid
9-BBN	9-borabiciklo[3.3.1]nonan
AChE	acetilkolinesteraza
ATCh	acetiltiokolin jodid
BChE	butirilkolinesteraza
BOP	benzotriazoliloksitris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> lipaza B
CHARMm	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
Ciklosarin	<i>O</i> -cikloheksil-metilfosfonofluoridat
CuACC	Cu(I) katalizirana cikloadicija azida i alkina
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
Diglim	bis(2-metoksietil)-eter
DIPEA	diizopropil-etil-eter
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DPPA	difenilfosforil-azid
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
EtOAc	etil-acetat
HI-6	<i>N</i> -[3-(2-hidroksiiminometilpiridinio)-2-oksapropil]-4-karbamoilpiridinijev dibromid
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
KNF	kiralna nepokretna faza
MEM	metoksietoksimetil-
MM2	<i>Molecular Mechanics 2</i>
MMFF94	<i>Merck Molecular Forcefield 94</i>
MTBE	metil- <i>tert</i> -butil-eter
Obidoksim	(<i>N,N'</i> -2-oksapropano)bis(4-hidroksiiminometilpiridinijev bromid)
OP	organofosforni spoj

Sarin	propan-2-il-metilfosfonofloridat
Soman	1,2,2-trimetilpropil-metilfosfonofluoridat
Tabun	etil-dimetilfosforoamidocijanidat
TCh	tiokolin
THF	tetrahidrofuran
TMB-4	((<i>N,N'</i> -propano)bis(4-hidroksiiminometilpiridinijev bromid)
TMS	tetrametilsilan
TNB ⁻	anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline
VX	etil-({ 2-[bis(propan-2-il)amino]etil } sulfanil)metil-fosfinat
ŽBO	živčani bojni otrov

7. LITERATURNI IZVORI

1. T. S. Marrs, *Pharmacol. Ther.* **58** (1993) 51–66.
2. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, Cholinesterases: structure, role, and inhibition. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
3. G. B. Koelle, Anticholinesterase agents, u: L. S. Goodman, A. Gilman, A. G. Gilman, G. B. Koelle (ur.), *The pharmacological basis of therapeutics*, Macmillan, New York, 1975.
4. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141–41147.
5. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Chem.-Biol. Interact.* **119-120** (1999) 61–69.
6. M. F. Eskander, N. G. Nagykerly, E. Y. Leung, C. Geula, Rivastigmine is a potent inhibitor of acetyl- and butyrylcholinesterase in Alzheimer's plaques and tangles. *Brain Res.* **1060** (2005) 144–152.
7. Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radić, P. Marchot, Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *Embo J.* **22** (2003) 1–12.
8. G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **7** (1999) 297–307.
9. M. Jokanović, M. P. Stojiljković, Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European J. Pharmacol.* **553** (2006) 10–17.
10. P. Eyer, The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* **22** (2003) 165–190.
11. E. Artursson, P. O. Andersson, C. Akfur, A. Linusson, F. Ekström, Catalytic site conformational equilibrium in nerve-agent adducts of acetylcholinesterase: Possible implications for the HI-6 antidote substrate specificity. *Biochem. Pharmacol.* **85** (2013) 1389–1397.
12. A. Hörnberg, E. Artursson, C. Andersson, C. Akfur, A. Linusson, F. Ekström, Crystal structures of oxime-bound fenamiphosacetylcholinesterases: Reactivation involving flipping of the His447 ring to form a reactive Glu334-His447-oxime triad. *Biochem. Pharmacol.* **79** (2010) 507–515.
13. P. Taylor, Anticholinesterase agents, u: L. L. Brunton, B. Chabner, B. C. Knollman (ur.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, 2011.

14. J. W. Skovira, J. C. O'Donnell, I. Koplovitz, R. K. Kan, J. H. McDonough, T. M. Shih, Reactivation of brain acetylcholinesterase by monoisonitrosoacetone increases the therapeutic efficacy against nerve agents in guinea pigs. *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 318–324.
15. G. E. Garcia, A. J. Campbell, J. Olson, D. Moorad-Doctor, V. I. Morthole, Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 199–206.
16. M. C. de Koning, M. van Grohl, D. Noort, Peripheral site ligand conjugation to a non-quaternary oxime enhances reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase *Toxicol. Lett.* **206** (2011) 54–59.
17. G. Mercey, T. Verdet, G. Saint-André, E. Gillon, A. Wagner, R. Baati, L. Jean, F. Nachon, P.-Y. Renard, First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun.* **47** (2011) 5295–5297.
18. R. K. Sit, Z. Radić, V. Gerardi, L. Zhang, E. Garcia, M. Katalinić, G. Amitai, Z. Kovarik, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, P. Taylor, New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 19422–19430.
19. D. G. Rivera, L. A. Wessjohann, Synthesis of novel steroid-peptoid hybrid macrocycles by multiple multicomponent macrocyclizations including bifunctional building blocks (MiBs). *Molecules* **12** (2007) 1890–1899.
20. T. J. Dennes, G. C. Hunt, J. E. Schwarzbauer, J. Schwartz, High-yield activation of scaffold polymer surfaces to attach cell adhesion molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 93–97.
21. A. Jeffrey, F. Bunting, W. Simmons, L. M. Wax, Early preplant application timing effects on acetamide efficacy in no-till corn (zea mays). *Weed Technol.* **17** (2003) 291–296.
22. Z. Radić, R. K. Sit, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 11798–11809.
23. S. Eckert, P. Eyer, H. Mückter, F. Worek, Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 334–357.
24. A. Lucić Vrdoljak, M. Čalić, B. Radić, S. Berend, D. Jun, K. Kuča, Z. Kovarik, Pretreatment with pyridinium oximes improves antidotal therapy against tabun poisoning. *Toxicology* **228** (2006) 41–50.
25. Z. Kovarik, M. Katalinić, G. Šinko, J. Binder, O. Holas, Y.-S. Jung, L. Musilova, D. Jun, K. Kuča, Pseudo-catalytic scavenging: searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 167–171.

26. N. Çokuğras, A. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk. J. Biochem.* **28** (2003) 54–61.
27. C. C. Tenn, J. R. Mikler, I. Hill, K. Weatherby, M. Garrett, N. Caddy, C. Stewart, C. N. Karatzas, Y. Huang, J. K. Troyer, P. M. Lundy, T. W. Sawyer, Recombinant human butyrylcholinesterase as a therapeutic agent to counteract the effects of VX toxicity in domestic swine. *J. Med. Chem. Def.* **6** (2008) 1–20.
28. P. Mason, O. Lockridge, Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons; catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch. Biochem. Biophys.* **494** (2010) 107–144.
29. S. Darvesh, D. A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131–138.
30. M. Goličnik, G. Šinko, V. Simeon-Rudolf, Z. Grubič i J. Stojan, Kinetic model of ethropropazine interaction with horse serum butyrylcholinesterase and its docking into the active site, *Arch. Biochem. Biophys.* **398** (2002) 23–31.
31. A. Bosak, I. Primožič, M. Oršulić, S. Tomić i V. Simeon-Rudolf, Enantiomers of quinuclidin-3-ol derivatives: Resolution and interactions with human cholinesterases, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 121–128.
32. A. Bosak, I. Gazić Smilović, A. Štimac, V. Vinković, G. Šinko, Z. Kovarik, Peripheral site and acyl pocket define selective inhibition of mouse butyrylcholinesterase by two biscarbamates, *Arch. Biochem. Biophys.* **529** (2013) 140–145.
33. M. Wandhammer, E. Carletti, M. Van der Schans, E. Gillon, Y. Nicolet, P. Masson, M. Goeldner, D. Noort, F. Nachon, Structural study of the complex stereoselectivity of human butyrylcholinesterase for the neurotoxic V-agents. *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 16783–16789.
34. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, A. V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem. J.* **373** (2003) 33–40.
35. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates. *Biochemistry* **43** (2004) 3222–3229.
36. H. P. Benschop, L. P. A. de Jong, Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 368–374.
37. H. P. Benschop, C. A. G. Konings, L. P. A. de Jong, Gas chromatographic separation and identification of the four stereoisomers of 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate (soman). Stereospecificity of in vitro “detoxification” reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 4260–4262.
38. L. G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* **366** (2006) 1–13.

39. G. H. Lushington, J.-X. Guo, M. M. Hurley, Acetylcholinesterase revisited: Molecular modeling with the whole toolkit. *Frontiers in Medicinal Chemistry* **5** (2010) 423–456.
40. L. E. Overman, A general method for the synthesis of amines by the rearrangement of allylic trichloroacetimidates. 1,3 Transposition of alcohol and amine functions. *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 2901–2910.
41. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, Academic Press Inc., San Diego, California, 1992.
42. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr., Sect. D* **56** (2000) 1385–1394.
43. P. Taylor, Z. Radić, The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33** (1994) 281–320.
44. H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase – new roles for and old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001) 294–302.
45. E. Meshorer, H. Soreq, Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends in Neuroscience* **29** (2006) 216–224.
46. S. A. Greenfield, M. Zimmermann, C. E. Bond, Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase: the significance of C-terminal peptides. *FEBS Journal* **275** (2008) 604–611.
47. A. Chatonnet, O. Lockridge, Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **260** (1989) 625–634.
48. O. Lockridge, P. Masson, Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* **21** (2000) 113–126.
49. M. M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E. G. Duyen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neurosci.* **110** (2002) 627–639.
50. J. Saez-Valero, D. H. Small, Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **889** (2001) 247–250.
51. M. A. Fisher, Use of cholinesterase inhibitors in the therapy of myasthenia gravis, u: E. Giacobini (ur.), *Cholinesterasee and cholinesterase inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000
52. Giacobini E. Butyrylcholinesterase: its role in brain function. U: Giacobini E. (ur.), *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*. Martin Dunitz Ltd., London, 2003. str. 1-20.
53. Y. Bourne, P. Taylor, P. B. Bougis, P. Marchot, Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 2963–2970.

54. G. Šinko, Z. Kovarik, E. Reiner, V. Simeon-Rudolf, J. Stojan, Mechanism of stereoselective interaction between butyrylcholinesterase and ethopropazine enantiomers. *Biochimie* **93** (2011) 1797–1807.
55. Y. Bourne, Z. Radić, G. Sulzenbacher, E. Kim, P. Taylor, P. Marchot, Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. *J. Biol. Chem.* **278** (2006) 29256–29267.
56. M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P.H. Axelsen, I. Silman, J.L. Sussman, Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90** (1993) 9031–9035.
57. P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman, Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.* **82-83** (1995) 453–458.
58. Z. Kovarik i V. Simeon-Rudolf, An improvement in segregation of human butyrylcholinesterase phenotypes having the fluoride-resistant *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **54** (2003) 239–244.
59. A. Tunek i L. A. Svensson, Bambuterol, a carbamate ester prodrug of terbutalin, as inhibitor of cholinesterase in human blood, *Drug. Metab. Dispos.* **16** (1988) 759–764.
60. Z. Kovarik i V. Simeon-Rudolf, Interaction of human butyrylcholinesterase variants with bambuterol and terbutaline, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **19** (2004) 113–117.
61. D. S. Sitar, Clinical pharmacokinetics of bambuterol, *Clin. Pharmacokinet.* **31** (1996) 246–256.
62. Z. Radić, E. Reiner i P. Taylor, Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives, *Mol. Pharmacol.* **39** (1991) 98–104.
63. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004.
64. A. Bosak, I. Gazić, V. Vinković i Z. Kovarik, Stereoselective inhibition of human, mouse, and horse cholinesterases by bambuterol enantiomers, *Chem.-Biol. Interact.* **175** (2008) 192–195.
65. A. Bosak, I. Gazić Smilović, G. Šinko, V. Vinković, Z. Kovarik, Metaproterenol, isoproterenol, and their bisdimethylcarbamate derivatives as human cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **55** (2012) 6716–6723.
66. S. M. Somani, J. A. Romano Jr., *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida 2001.
67. M. Jakanović, Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* **166** (2001) 139–160.
68. L. G. Costa, Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* **366** (2006) 1–13.
69. J. F. Chlebowski, J. E. Coleman, Mechanisms of hydrolysis of *o*-phosphorothioates and inorganic thiophosphate by *Escherichia coli* alkaline phosphatase, *J. Biol. Chem.* **294** (1974) 7192–7202.

70. R. Krieger (ur.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press Inc., San Diego, California, 2001.
71. R. Gupta (ur.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, Elsevier Academic Press, San Diego, California 2006.
72. G. J. Leigh (ur.), Vl. Simeon (ur. hrvatskog prijevoda), *Hrvatska nomenklatura anorganske kemije, Preporuke IUPAC 1990. i HKD 1995.*, Školska knjiga, Zagreb 1996.
73. A. Bosak, Organofosforni spojevi: klasifikacija i reakcije s enzimima. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57** (2006) 445–457.
74. W. N. Aldridge i E. Reiner, *Enzyme inhibitors as substrates. Interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1972.
75. F. Worek, H. Thiermann, The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorous compounds, *Pharmacol. Ther.* **139** (2013) 249–259.
76. A. P. L. De Jong, Z. G. Wolring, Stereospecific reactivation by some Hagedorn-oximes of acetylcholinesterases from various species including man, inhibited by soman. *Biochem. Pharmacol.* **33** (1984) 1119–1125.
77. R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, Spezifikation der molekularen Chiralität. *Angew. Chem.* **78** (1966) 413–447.
78. V. Prelog, G. Helmchen, Grundlagen des CIP-Systems und Vorschläge für eine Revision. *Angew. Chem.* **94** (1982) 614–631.
79. H. P. Benschop, L. P. A. de Jong, Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 368.
80. J. Massoulié, L. Pezzementi, S. Bon, Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **41** (1993) 31–91.
81. H. P. Benschop, C. A. G. Konings, J. van Genderen, L. P. A. de Jong, Isolation, anticholinesterase properties, and acute toxicity in mice of the four stereoisomers of the nerve agent soman. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72** (1984) 61–74.
82. H. P. Benschop, L. P. A. de Jong, Toxicokinetics of nerve agents. U: S. M. Somani, J. A. Romano Jr. (ur.), *Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida 2001. str. 25–81.
83. O. Cohen, C. Kronman, L. Raveh, O. Mazor, A. Ordentlich, A. Shafferman, Comparison of polyethylene glycol-conjugated recombinant human acetylcholinesterase and serum human butyrylcholinesterase as bioscavengers of organophosphate compounds *Mol. Pharmacol.* **70** (2006) 1121–1131.
84. I. B. Wilson, Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **190** (1951) 111–117.

85. I. B. Wilson, E. K. Meislich, Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by alkylphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953) 4628–4629.
86. A. F. Childs, D. R. Davies, A. L. Green, J. P. Rutland, The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *Br. J. Pharmacol.* **10** (1955) 462–465.
87. A. L. Green, H. J. Smith, The reactivation of cholinesterase inhibited with organophosphorus compounds. I. Reactivation by 2-oxoalldoximes. *Biochem. J.* **68** (1958) 28–31.
88. I. B. Wilson, B. Ginsburg, A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **18** (1955) 168–170.
89. K. Kuča, J. Kassa, A comparison of the ability of a new bispyridinium oxime-1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-carbamoylpyridinium)butane dibromide and currently used oximes to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **18** (2003) 529–535.
90. I. Koplovitz, J. R. Stewart, A comparison of HI-6 and 2-PAM against soman, tabun, sarin and VX in the rabbit. *Toxicol. Lett.* **70** (1994) 269–279.
91. I. B. Wilson, S. Ginsburg, Reactivation of alkylphosphate inhibited acetylcholinesterase by bis quaternary derivatives of 2-PAM and 4-PAM, *Biochem. Pharmacol.* **1** (1959) 200–206.
92. H. Ohta, T. Ohmori, S. Suzuki, H. Ikegaya, K. Sakurada, T. Takatori, New safe method for preparation of sarin-exposed human erythrocytes acetylcholinesterase using non-toxic and stable sarin analogue isopropyl p-nitrophenyl methylphosphonate and its application to evaluation of nerve agent antidotes. *Pharm. Res.* **23** (2006) 2827–2833.
93. A. Luettringhaus, I. Hagedorn, Quaternary hydroxyiminomethylpyridinium salts. The dischloride of bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinium-methyl)-ether (LüH-6), a new reactivator of acetylcholinesterase inhibited by organic phosphoric acid esters. *Arzneimittelforschung* **14** (1964) 1–5.
94. I. Hagedorn, W. H. Gundel, K. Schoene, Reactivation of phosphorylated acetylcholine esterase with oximes: contribution to the study of the reaction course. *Arzneimittelforschung* **19** (1969) 603–606.
95. P. Eyer, I. Hagedorn, R. Klimmek, P. Lippstreu, M. Löffler, H. Oldiges, U. Spöhrer, I. Steidl, L. Szinicz, F. Worek, HLö-7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases. *Arch. Toxicol.* **66** (1992) 603–621.
96. F. Worek, P. Eyer, N. Aurbek, L. Szinicz, H. Thiermann, Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by in vitro analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **219** (2007) 226–234.

97. Y. Segall, D. Waysbort, D. Barak, N. Ariel, B. P. Doctor, J. Grunwald, Y. Ashani, Direct observation and elucidation of the structures of aged and nonaged phosphorylated cholinesterases by ^{31}P NMR spectroscopy. *Biochemistry* **32** (1993) 13441–13450.
98. F. Worek, N. Aurbek, M. Koller, C. Becker, P. Eyer, H. Thiermann, Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochem. Pharmacol.* **73** (2007) 1807–1817.
99. F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **68** (2004) 2237–48.
100. F. Terrier, P. Rodriguez-Dafonte, E. Le Guével, G. Moutiers, Revisiting the reactivity of oximate α -nucleophiles with electrophilic phosphorus centers. Relevance to detoxification of sarin, soman and DFP under mild conditions. *Org. Biomol. Chem.* **4** (2006) 4352–4363.
101. A. Allgardsson, L. Berg, C. Akfur, A. Hörnberg, F. Worek, A. Linusson, F. J. Ekström, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** (2016) 5514–5519.
102. F. Ekström, A. Hörnberg, E. Artursson, L.-G. Hammarström, G. Schneider, Y.-P. Pang Structure of HI-6* sarin-acetylcholinesterase determined by X-ray crystallography and molecular dynamics simulation: Reactivator mechanism and design. *PLoS One* **4** (2009) e5957.
103. J. Cabal, K. Kuča, J. Kassa, Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **95** (2004) 81–86.
104. K. Kuča, J. Bielavský, J. Cabal, J. Kassa, Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 3545–3547.
105. J. Kassa, K. Kuča, J. Karasová, K. Musilek, The development of new oximes and the evaluation of their reactivating, therapeutic and neuroprotective efficacy against tabun. *Mini Rev. Med. Chem.* **8** (2008) 1134–1143.
106. M. Čalić, A. Lucić Vrdoljak, B. Radić, D. Jelić, D. Jun, K. Kuča, Z. Kovarik, *In vitro* and *in vivo* evaluation of pyridinium oximes: mode of interaction with acetylcholinesterase, effect on tabun- and soman-poisoned mice and their cytotoxicity. *Toxicology* **219** (2006) 85–96.
107. M. Katalinić, Učinkovitost bispiridinijevih oksima u reaktivaciji tabunom inhibiranih kolinesteraza, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2001., str. 54.
108. K. Kuča, J. Cabal, Y. S. Jung, K. Musilek, O. Soukup, D. Jun, M. Pohanka, L. Musilova, J. Karasová, L. Novotný, M. Hrabínova, Reactivation of human brain homogenate cholinesterases inhibited by tabun using newly developed oximes K117 and K127. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **105** (2009) 207–210.

109. J. Acharya, D. K. Dubey, A. K. Srivastava, S. K. Raza, In vitro evaluation of bis-pyridinium oximes bearing methoxy alkane linker as reactivators of sarin inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicol. in Vitro* **24** (2010) 1797–1802.
110. K. Musilek, D. Jun, J. Cabal, J. Kassa, F. Gunn-Moore, K. Kuca, Design of a potent reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase synthesis and evaluation of (E)-1-(4-Carbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-ene Dibromide (K203). *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5514–5518.
111. K. Musilek, O. Holas, J. Misik, M. Pohanka, L. Novotný, V. Dohnal, V. Opletalova, K. Kuča, Monooxime-monocarbamoyl bispyridinium xylene-linked reactivators of acetylcholinesterase-Synthesis, in vitro and toxicity evaluation, and docking studies. *ChemMedChem* **5** (2010) 247–254.
112. J. Acharya, D. K. Dubey, A. K. Srivastava, S. K. Raza, In vitro reactivation of sarin-inhibited human acetylcholinesterase (AChE) by bis-pyridinium oximes connected by xylene linkers. *Toxicol. in Vitro* **25** (2011) 251–256.
113. D. E. Lorke, H. Kalasz, G. A. Petroianu, K. Tekes, Entry of oximes into the brain: A review. *Curr. Med. Chem.* **15** (2008) 743–753.
114. P. Ballabh, A. Bruan, M. Nedergaard, The blood-brain barrier: An overview structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16** (2004) 1–13.
115. N. J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the bloodbrain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7** (2006) 41–53.
116. H. C. Jeong, N. S. Kang, N. J. Park, E. K. Yum, Y. S. Jung, Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (2009) 1214–1217.
117. E. Heldman, Y. Ashani, L. Raveh, E. S. Rachaman, Sugar conjugates of pyridinium aldoximes as antidotes against organophosphonate poisoning. *Carbohydr. Res.* **151** (1986) 337–347.
118. E. Shek, T. Higuchi, N. Bodor, Improved delivery through biological membranes. 2. Distribution, excretion, and metabolism of *N*-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime hydrochloride, a pro-drug of *N*-methylpyridinium-2-carbaldoxime chloride. *J. Med. Chem.* **19** (1976) 108–112.
119. J. C. Demar, E. D. Clarkson, R. H. Ratcliffe, A. J. Campbell, S. G. Thangavelu, C. A. Herdman, H. Leader, S. M. Schulz, E. Marek, M. A. Medynets, T. C. Ku, S. A. Evans, F. A. Khan, R. R. Owens, M. P. Nambiar, R. K. Gordon, Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases. *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 191–198.
120. T. M. Shih, J. W. Skovira, J. C. O'Donnell, J. H. McDonough, Central acetylcholinesterase reactivation by oximes improves survival and terminates seizures following nerve agent intoxication. *Adv. Stud. Biol.* **1** (2009) 155–196.

121. G. Saint-André, M. Kliachyna, S. Kodepelly, L. Louise-Leriche, E. Gillon, P.-Y. Renard, F. Nachon, R. Baati, A. Wagner, Design, synthesis and evaluation of new R-nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron* **67** (2011) 6352–6361.
122. J. Kalisiak, E. C. Ralph, J. Zhang, J. R. Cashman, Amidine-oximes: Reactivators for organophosphate exposure. *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3319–3330.
123. Z. Radić, T. Dale, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radić, B. M. Duggan, D. Ajami, J. Rebek, P. Taylor, Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochem. J.* **450** (2013) 231–242.
124. R. K. Sit, V. V. Fokin, G. Amitai, K. B. Sharpless, P. Taylor, Z. Radic, Imidazole aldoximes effective in assisting butyrylcholinesterase catalysis of organophosphate detoxification. *J. Med. Chem.* **57** (2014) 1378–1389.
125. M. Katalinić, N. Maček Hrvat,; K. Baumann, S. Morasi Piperčić, S. Makarić, S. Tomić, O. Jović, T. Hrenar, A. Miličević, D. Jelić, S. Žunec, I. Primožič, Z. Kovarik, A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **310** (2016) 195–204.
126. M. Kliachyna, G. Santoni, V. Nussbaum, J. Renou, B. Sanson, J.-P. Colletier, M. Arboléas, M. Loiodice, M. Weik, L. Jean, P.-Y. Renard, F. Nachon, R. Baati, Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine- aldoxime and -amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase, *Eur. J. Med. Chem.* **78** (2014) 455–467.
127. J. Renou, M. Loiodice, M. Arboléas, R. Baati, L. Jean, F. Nachon, P.-Y. Renard Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* **50** (2014) 3947–3950.
128. Z. Kovarik, N. Maček, R. K. Sit, Z. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chem.-Biol. Interact.* **203** (2013) 77–80.
129. N. Moitessier, P. Englebienne, D. Lee, J. Lawandi, C.R. Corbeil Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br. J. Pharmacol.* **153** (2008) (Suppl.1) S7–26
130. J. Correa-Basurto, C. Flores-Sandoval, J. Marín-Cruz, A. Rojo-Domínguez, L. M. Espinoza-Fonseca, J. G. Trujillo-Ferrara, Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **42** (2007) 10–19

131. N. G. Castro, R. S. Costa, L. S. Pimentel, A. Danuello, N. C. Romeiro, C. Viegas Jr, E. J. Barreiro, C. A. Fraga, V.S. Bolzani, M. S. Rocha, CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (–)-spectaline. *Eur. J. Pharmacol.* **580** (2008) 339–349.
132. J. Correa-Basurto, J. Espinosa-Raya, M. González-May, L. M. Espinoza-Fonseca, I. Vázquez-Alcántara, J. Trujillo-Ferrara, Inhibition of acetylcholinesterase by two arylderivatives: 3a-Acetoxy-5*H*-pyrrolo (1,2-*a*) (3,1)benzoxazin-1,5-(3*aH*)-dione and *cis-N-p*-Acetoxy-phenylisomaleimide. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **21** (2006) 133–138.
133. X. C. He, S. Feng, Z. F. Wang, Y. Shi, S. Zheng, Y. Xia, H. Jiang, X.C. Tang, D. Bai, Study on dual-site inhibitors of acetylcholinesterase: Highly potent derivatives of bis- and bifunctional huperzine B. *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 1394–1408.
134. F. Leonetti, M. Catto, O. Nicolotti, L. Pisani, A. Cappa, A. Stefanachi, A. Carotti, Homo- and hetero-bivalent edrophonium-like ammonium salts as highly potent, dual binding site AChE inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **16** (2008) 7450–7456.
135. H. A. Grigoryan, A. A. Hambardzumyan, M.V. Mkrtchyan, V. O. Topuzyan, G. P. Halebyan, R. S. Asatryan, alpha,beta-Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **171** (2008) 108–116.
136. A. Knežević, G. Landek, I. Dokli, V. Vinković: Efficient enzymatic approach to (*S*)-1-aryl allylamines, *Tetrahedron: Asymmetry* **22** (2011) 936–941.
137. T. Ikai, Y. Okamoto, Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography. *Chem. Rev.* **109** (2009) 6077–6101.
138. D. Rotticci, F. Hæffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **5** (1998) 267–272.
139. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **56** (1991) 2656–2665.
140. 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.
141. Z. Kovarik, A. Bosak, G. Šinko, T. Latas, Exploring active sites of cholinesterases by inhibition with bambuterol and haloxon. *Croat. Chem. Acta* **76** (2003) 63–67.
142. B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* **4** (1983) 187–217.
143. F. A. Momany, R. Rone. Validation of the general purpose QUANTA 3.2/CHARMm force field. *J. Comp. Chem.* **13** (1992) 888–900.

144. M. N. Ngamelue, K. Homma, O. Lockridge, O. A. Asojo, Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase. *Acta Crystallogr., Sect. F* **63** (2007) 723–727.
145. M. Feig, C. L. Brooks III, Recent advances in the development and application of implicit solvent models in biomolecule simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (2004) 217–224.
146. M. Nina, D. Beglov, B. Roux, Atomic Born radii for continuum electrostatic calculations based on molecular dynamics free energy simulations. *J. Phys. Chem. B.* **101** (1997) 5239–5248.
147. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radić, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 1449–1454.
148. C. Doucet-Personeni, P. D. Bentley, R. J. Fletcher, A. Kinkaid, G. Kryger, B. Pirard, A. Taylor, R. Taylor, J. Taylor, R. Viner, I. Silman, J. L. Sussman, H. M. Greenblatt, T. L. Lewis, A Structure-Based Design Approach to the Development of Novel, Reversible AChE Inhibitors. *J. Med. Chem.* **44** (2001) 3203–3215.
149. C. Bartolucci, E. Perola, L. Cellai, M. Brufani, D. Lamba, "Back door" opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry* **38** (1999) 5714–5719.
150. C. Bartolucci, L. A. Haller, U. Jordis, G. Fels, D. Lamba, Probing *Torpedo californica* acetylcholinesterase catalytic gorge with two novel bis-functional galanthamine derivatives. *J. Med. Chem.* **53** (2010) 745–751.
151. M. C. Franklin, M. J. Rudolph, C. Ginter, M. S. Cassidy, J. Cheung, Crystal structure of human acetylcholinesterase in complex with paraoxon in the unaged state (predominant acyl loop conformation) *Proteins* **84** (2016) 1246–1256.
152. F. J. Ekstrom, C. Astot, Y. Pang, Novel nerve-agent antidote design based on crystallographic and mss spectrometric analyses of tabun-conjugated acetylcholinesterase in complex with antidotes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82** (2007) 282–293.
153. A. Dondoni, D. Perrone, *Org. Synth. Coll.* **10** (2004) 320–326.
154. C. F. J. Lane, *Org. Chem.* **39** (1974) 1437–1438.
155. H. C. Brown, E. F. Knights, C. G. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 7765–7770.
156. G. W. Kabalka, N.-S. Li, R. D. Pace, *Synthetic. Commun.* **25** (1995) 2135–2143.
157. H. C. Brown, R. Liotta, C. G. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 5297–5301.
158. B. G. Katzung, *Antiviral Agents. Basic & Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill Medical, New York, 2007, str. 806.
159. E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2** (2000) 2141–2143.
160. R. A. Akula, D. P. Temelkoff, N. D. Artis, P. Norris, *Heterocycles* **63** (2004) 2719–2725.

161. W. H. Brown, u C. S. Foote (ur.), *Organic Chemistry*, Brooks Cole, Pacific Groove, 2002, str. 646.
162. Thompson et al. United States Patent, Patent Number: 5,391.772, Date of Patent: Feb. 21, 1995
163. G. R. Lenz, R. A. Lessor, *Org. Synth. Coll.* **9** (1998) 268–274.
164. B. A. Roberts, C. R. Strauss, *Acc. Chem. Res.* **38** (2005) 653–661.
165. C. Ferroud, M. Godart, S. Ung, H. Borderies, A. Guy, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 3004–3008.
166. J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **13** (2002) 1315–1320.
167. V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **348** (2006) 797–812.
168. P. Tufvesson, A. Annerling, R. H. Kaul, D. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.* **97** (2007) 447–453.
169. K. P. Dhake, Z. S. Qureshi, R. S. Singhal, B. M. Bhanage, *Tetrahedron Lett.* **50** (2009) 2811–2814.
170. D. T. Lai, C. J. O'Connor, *J. Mol. Catal.: B Enzym.* **6** (1999) 411–420.
171. V. Gotor, E. Menéndez, *Synlett* **11** (1990) 699–700.
172. S. Fernández, E. Menéndez, V. Gotor, *Synthesis* **9** (1991) 713–716.
173. E. Menéndez, V. Gotor, *Synthesis* **1** (1993) 72–74.
174. S. Lal, T. J. Snape, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **83** (2012) 80–86.
175. T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley Interscience, New York, 1991.
176. F. Theil, *Tetrahedron* **56** (2000) 2905–2919.
177. F. van Rantwijk, M. A. P. J. Hacking, R. A. Sheldon, *Monatsh. Chem.* **131** (2000) 549–569.
178. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827–10852.
179. E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
180. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **14** (1975) 1219–1222.
181. M. M. Joullié, K. M. Lassen, *Arkivoc* **8** (2010) 189–250.
182. E. J. Corey, J.-L. Gras, P. Ulrich, *Tetrahedron Lett.* **11** (1976) 809–812.
183. A. Vakalopoulos, H. M. R. Hoffmann, *Org. Lett.* **3** (2001) 2185–2188.
184. V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. Van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.* **1** (2006) 51–68.
185. M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **108** (2008) 2952–3015.
186. H. Xiong, M. R. Tracey, T. Grebe, J. A. Mulder, R. P. Hsung, *Org. Synth.* **81** (2005) 147–156.
187. N. Kumagai, G. Muncipinto, S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 3635–3638.
188. N. P. Grimster, B. Stump, J. R. Fotsing, T. Weide, T. T. Talley, J. G. Yamauchi, Á. Nemezc, C. Kim, K.-Y. Ho, K. B. Sharpless, P. Taylor, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 6732–6740.
189. V. Schuring, *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 647–661.
190. X. Chem, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Pure Appl. Chem.* **79** (2007) 1561–1573.

191. L.W. Harris, W.C. Heyl, D.L. Stitcher, C.A. Broomfield, Effects of 1.1'-oxydimethylene bis-(4-tert-butylpyridinium chloride) (SAD-128) and decamethonium on reactivation of soman and sarin-inhibited cholinesterase by oximes, *Biochem. Pharmacol.* **27** (1978) 757–761.
192. J. Bajgar, Prophylaxis against organophosphorus poisoning, *J. Med. Che. Def.* **1** (2004) 1–16.
193. E. Reiner, Inhibition of acetylcholinesterase by 4,4'-bipyridine and its effect upon phosphorylation of the enzyme, *Croat. Chem. Acta* **59** (1986) 925–931.
194. G. Lallement, V. Baille, D. Baubichon, P. Carpentier, J.M. Collombet, P. Filliat, A. Foquin, E. Four, C. Masqueliez, G. Testylier, L. Tonduli, F. Dorandeu, Review of the value of huperzine as pretreatment of organophosphate poisoning, *Neurotoxicology* **23** (2002) 1–5.
195. Zrinka Kovarik, Maja Čalić, Goran Šinko, Anita Bosak, Suzana Berend, Ana Lucić Vrdoljak, Božica Radić, Oximes: reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 173–179.
196. M. A. Dunn, B. E. Hackley, F. R. Sidell, Pretreatment for nerve agent exposure, in: F.R. Sidell, E.T. Takafuji, D.R. Franz (ur.), *Medical Aspects of Chemical Biological Warfare*, Walter Reed Army Medical Center, Washington, 1997, str. 181–196.
197. L. Raveh, E. Grauer, J. Grunwald, E. Cohen, Y. Ashani, The stoichiometry of protection against soman and VX toxicity in monkeys pretreated with human butyrylcholinesterase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145** (1997) 43–53.
198. P. Masson, F. Nachon, C. A. Broomfield, D. E. Lenz, L. Verdier, L.M. Schopfer, O. Lockridge, A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 273–280.
199. J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin, J. J. Height, Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 10282–10286.
200. E. H. Rydberg, B. Brumshtein, H. M. Greenblatt, D. M. Wong, D. Shaya, L. D. Williams, P. R. Carlier, Y. P. Pang, I. Silman, J. L. Sussman, Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5491–5500.
201. F. Nachon, E. Carletti, C. Ronco, M. Trovaslet, Y. Nicolet, L. Jean, P.-Y. Renard, Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase, *Biochem. J.* **453** (2013) 393–399.
202. F. Ekström, Y.-P. Pang, M. Boman, E. Artursson, C. Akfur, S. Börjegen, Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: Structural basis for

- differences in the ability to reactivate tabun conjugates, *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 597–607.
203. C. Luo, A. Saxena, Y. Ashani, H. Leader, Z. Radić, P. Taylor, B.P. Doctor, Role of edrophonium in prevention of the re-inhibition of acetylcholinesterase by phosphorylated oxime, *Chem. Biol. Interact.* **119–120** (1999) 129–135.
204. N. Maček Hrvat, S. Žunec, P. Taylor, Z. Radić, Z. Kovarik, HI-6 assisted catalytic scavenging of VX by acetylcholinesterase choline binding site mutants, *Chem. Biol. Interact.* **259** (2016) 148–153.
205. T. Zorbaz, M. Katalinić, A. Braiki, J. Renou, P.-Y. Renard, J. Ludovic, Z. Kovarik, *In vitro* evaluation of uncharged oximes for organophosphorus nerve agent poisoning, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the Occasion of the 40th Anniversary, HDBMB2016, Split, 2016, Book of abstracts str. 109.
206. F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, Diagnostic aspects of organophosphate poisoning, *Toxicology* **214** (2005) 182–189.
207. J. Renou, J. Diaz, G. Mercey, T. Verdet, C. Rousseau, A. Gastelier, M. Arboleas, M. Toubrey, R. Baati, L. Jean, F. Nachon, P. Renard, Synthesis and *in vitro* evaluation of donepezil-based reactivators and analogues for nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase, *RSC Adv.* **6** (2016) 17929–17940.
208. G. G. Hammes, S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, Flexibility, diversity, and cooperativity: pillars of enzyme catalysis, *Biochemistry* **50** (2011) 10422–10430.
209. F. S. Katz, S. Pecic, T. H. Tran, I. Trakht, L. Schneider, Z. Zhu, L. Ton-That, M. Luzac, V. Zlatanovic, S. Damara, J. Macdonald, D. W. Landry, L. Tong, M. N. Stojanovic, Discovery of new classes of compounds that reactivate acetylcholinesterase inhibited by organophosphates, *ChemBioChem* **16** (2015) 2205–2215.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI

Prezime / ime	Maraković / Nikola
Adresa	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Ksaverska cesta 2, p.p. 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska
Telefon	+385 1 4682 559
Fax	+385 1 4673 303
E-mail	nmarakovic@imi.hr
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum / mjesto rođenja	27. 10. 1986., Glina, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

Datum (od - do)	1. 7. 2011. →
Ustanova zaposlenja	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Odjel	Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju
Radno mjesto	Znanstveni novak, asistent
Područje istraživanja	Istraživanje interakcija kolinesteraza s antidotima i inhibitorima; reaktivacija kolinestaraza inhibiranih organofosfornim spojevima; dizajn i sinteza antidota pri trovanju živčanim bojnim otrovima

ŠKOLOVANJE

Datum	2011. →
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
Studij	Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer organska kemija

Datum	2008. – 2011.
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
Studij	Diplomski studij kemije
Naslov diplomskog rada	“Pristup sintezi alkiliranih benzena s dugačkim alkilnim lancima”
Zvanje	magistar kemije

Datum	2005. – 2008.
Ustanova	Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
Studij	Preddiplomski studij kemije
Zvanje	prvostupnik kemije

Datum	2001. – 2005.
Ustanova	Srednja škola Glina, smjer opća gimnazija

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinji jezik Hrvatski

Drugi jezici Engleski (aktivno)

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETICIJE Korištenje *MS Office*, *GraphPad Prism Software* i *Chembiodraw Software* paketa

OSTALE VJEŠTINE I KOMPETICIJE Članstvo:

- Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju
- Hrvatsko kemijsko društvo

PUBLIKACIJE

- Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (4)
- Sažeci u zbornicima skupova (15)

POPIS PUBLIKACIJAIzvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Mihaljević, Ivan; Popović, Marta; Žaja, Roko; Maraković, Nikola; Šinko, Goran; Smital, Tvrtko. Interaction between zebrafish Oct1 and endo- and xenobiotics. *Aquatic Toxicology* 187 (2017) 18-28. (članak, znanstveni)
2. Maraković, Nikola; Šinko, Goran. The lock is the key: development of novel drugs through receptor based combinatorial chemistry. *Acta Chimica Slovenica*. **64** (2017), 15-39. (članak, pregledni)
3. Maraković, Nikola; Knežević, Anamarija; Vinković, Vladimir; Kovarik, Zrinka; Šinko, Goran. Design and synthesis of *N*-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases. *Chemico-Biological interactions*. **259** (2016), B; 122-132. (članak, znanstveni)
4. Knežević, Anamarija; Vinković, Vladimir; Maraković, Nikola; Šinko, Goran. Enzyme-catalyzed cascade synthesis of hydroxyiminoacetamides. *Tetrahedron Letters*. **55** (2014), 31; 4338-4341. (članak, znanstveni)