

КОНЬЮГАТЫ ТАКРИНА С АМИНОМЕТИЛИДЕНЗАМЕЩЕННЫМИ МАЛОНАТАМИ: СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

© 2022 г. М. В. Грищенко^а, Н. А. Елькина^а, Г. Ф. Махаева^б, Я. В. Бургарт^а, Н. П. Болтнева^б,
Е. В. Рудакова^б, Е. В. Щегольков^а, Н. В. Ковалева^б, О. Г. Серебрякова^б, В. И. Салютин^{а,*}

^а Институт органического синтеза имени И. Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук,
ул. С. Ковалевской/Академическая 22/20, Екатеринбург, 620108 Россия

^б Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем
химической физики и медицинской химии Российской академии наук, Черноголовка, 142432 Россия

*e-mail: saloutin@ios.uran.ru

Поступило в редакцию 3 сентября 2022 г.

После доработки 15 сентября 2022 г.

Принято к печати 22 сентября 2022 г.

Конденсацией аминополиметиленовых производных такрина с диэтил(этоксиметилиден)малонатом получены новые гибридные соединения – конъюгаты, которые являются эффективными ингибиторами ацетилхолинэстеразы (AChE) (IC_{50} до 0.538 мкМ.) и бутирилхолинэстеразы (IC_{50} до 0.0314 мкМ.). Они также способны вытеснять пропилий из периферического анионного сайта AChE на уровне референсного соединения донепезила и проявляют слабую антиоксидантную активность. Конъюгаты представляют интерес для дальнейшего расширенного исследования в качестве потенциальных препаратов для лечения болезни Альцгеймера.

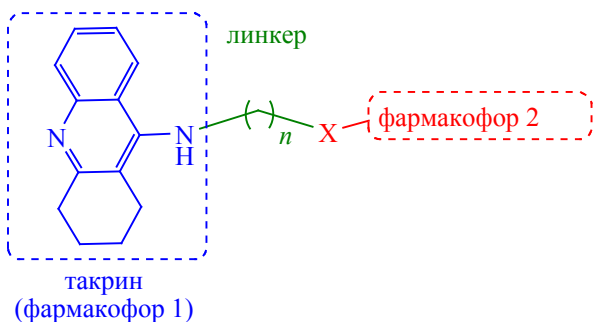
Ключевые слова: конъюгат, такрин, диэтилмалонат, антихолинэстеразная активность, вытеснение пропилия

DOI: 10.31857/S0044460X22110099, **EDN:** LOAXIE

Болезнь Альцгеймера признана Всемирной организацией здравоохранения глобальной приоритетной общественной проблемой, поскольку болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием с прогрессирующей потерей памяти и других когнитивных функций. По состоянию на 2020 г. в мире насчитывалось около 50 миллионов человек с болезнью Альцгеймера, и это количество, по мнению ученых, будет неуклонно возрастать [1]. Для решения данной проблемы необходимо создание эффективных лекарственных средств, обладающих не только симптоматическим, но и

болезнь-модифицирующим действием. Основным классом препаратов, используемых в настоящее время для терапии болезни Альцгеймера, являются ингибиторы холинэстераз, первым из которых был такрин [2, 3]. И хотя такрин в настоящее время не применяется в клинической практике ввиду его гепатотоксичности, он по-прежнему представляет собой значительный фармакотерапевтический ресурс [4], благодаря возможности создания на его основе мультитаргетных лигандов, способных взаимодействовать с несколькими мишенями, ответственными за патогенез болезни Альцгеймера [5–7]. В этой связи особые перспективы имеет

Схема 1.



получение гибридных соединений такрина с другими классами биоактивных веществ путем присоединения второго фармакофора через спейсер определенной длины (схема 1) и создания бифункциональных ингибиторов холинэстераз, способных блокировать AChE-индуцируемую агрегацию бета-амилоида. В таких структурах такриновый фрагмент обеспечивает взаимодействие молекулы ингибитора с каталитическим сайтом AChE, а второй фармакофор связывается с периферическим анионным сайтом, не позволяя связываться с ним молекуле бета-амилоида [8, 9].

В качестве второго фармакофора в данной работе мы использовали метилиденовые производные диэтилмалоната. Производные малоновой кислоты обладают широким спектром биологической активности, участвуя в ряде метаболических циклов [10, 11]. В частности, они являются специфическими ингибиторами сериновой рацемазы, катализирующей образование из L-серина ко-агониста NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторов D-серина в нейронах и глиальных клетках [12]. Увеличение содержания сериновой рацемазы и продукта ее ферментативной реакции, D-серина, рассматривают как процесс, предшествующий эксайтотоксичности, а специфическое ингибирование этого фермента – как перспективный нейропротекторный механизм при нейропатологиях, связанных с гиперактивацией NMDA-рецепторов [13, 14].

Производные малоновой кислоты, в частности, малонамиды являются привилегированными химическими структурами при создании лекарств,

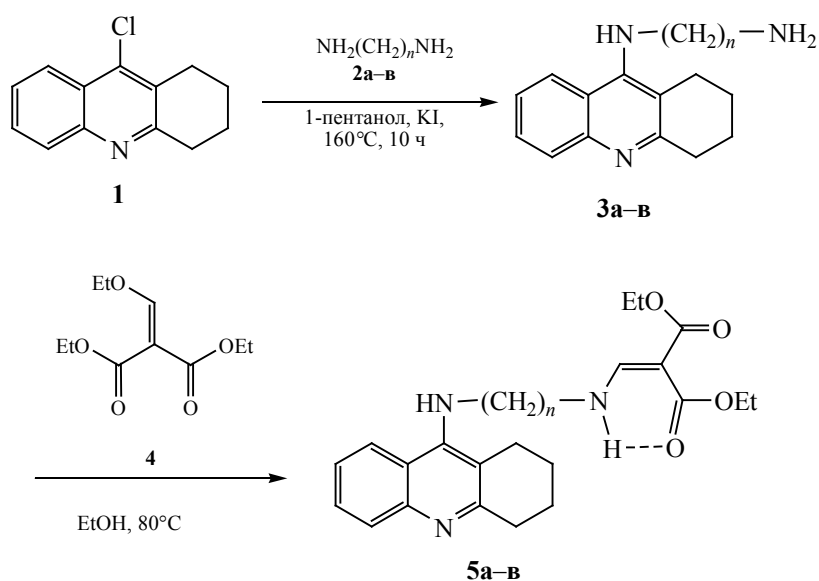
широко используемыми для получения пептидомиметиков и хелатирующих соединений, противодиабетических средств, агонистов κ -опиоидных рецепторов, противоопухолевых препаратов [15]. Недавно на основе малонамида были получены соединения, являющиеся мощными ингибиторами фактора свертывания крови fXa и холинэстераз, позиционированные для углубленного исследования как потенциальные мультитаргетные препараты терапии болезни Альцгеймера [16].

В настоящей работе нами получены гибридные соединения такрина с потенциально биоактивными метилиденовыми производными диэтилмалоната, связанными через алкиленовый спейсер различной длины. Исследован эстеразный профиль новых конъюгатов – их ингибиторная активность в отношении ацетилхолинэстеразы (AChE), бутирилхолинэстеразы (BChE) и структурно родственного фермента карбоксилэстеразы (CES) [17]; для оценки потенциальной способности конъюгатов блокировать AChE-индуцируемую агрегацию бета-амилоида изучена их способность вытеснять пропилий из периферического анионного сайта AChE [18], а также проведена оценка антиоксидантной активности соединений в тесте ABTS [2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота)].

Для синтеза конъюгатов первоначально по известной методике [19, 20] циклизацией коммерчески доступных антралиновой кислоты и циклогексанона под действием POCl_3 был получен 9-хлор-1,2,3,4-тетрагидроакридин **1** (схема 2). Введение алкиленового спейсера в гетероцикл **1** проводили по способу [20] путем замещения атома хлора на аминогруппу диаминоалкана **2a–в**, содержащего 4, 6 или 8 метиленовых звеньев. Далее взаимодействием синтезированных аминополиметиленсодержащих производных такрина **3a–в** с диэтил(этоксиметилиден)малонатом **4** при кипячении в этаноле в течение 6 ч получены целевые конъюгаты **5a–в** (схема 2).

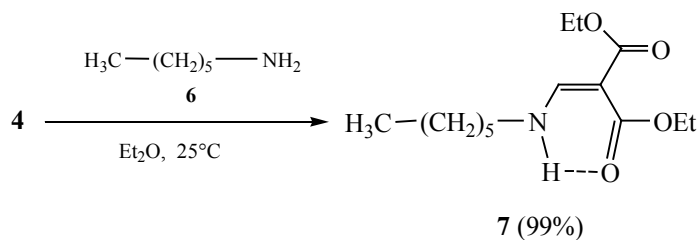
Для оценки влияния аминометилиденмалонатного остатка на ингибиторную активность в качестве модельного соединения был получен диэтил(гексиламинометилиден)малонат **7** конденсацией реагента **4** с гексиламином **6** (схема 3). При этом показано, что использование более мягких усло-

Схема 2.



$n = 4$ (а), 6 (б), 8 (в).

Схема 3.



вий – диэтилового эфира и проведение реакции при комнатной температуре – приводит к образованию диэфира **7** с практически количественным выходом.

Строение полученных соединений **5a–в**, **7** подтверждено методами ИК и ЯМР ^1H , ^{13}C спектроскопии и элементного анализа. Так, в их ИК спектрах наблюдаются высокочастотные полосы поглощения группы NH при $3380\text{--}3280\text{ см}^{-1}$, а также одна или две характеристичные полосы поглощения сложноэфирной группы при $1650\text{--}1640\text{ см}^{-1}$. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C соединений **5a–в**, **7** содержат один набор сигналов. При этом в спек-

трах ЯМР ^1H наблюдается разделение сигналов протонов этоксильных групп в области 1.29–1.35 и 4.18–4.24 м. д., а в спектрах ЯМР ^{13}C обнаружено два сигнала атомов углерода карбонильных функций при 166 и 169 м. д., что указывает на образование внутримолекулярной водородной связи между протоном группы NH и атомом кислорода карбонильного фрагмента одной из сложноэфирных групп. Доказательством замещения именно этоксильной группы в метилиденовом фрагменте служит наличие в спектрах ЯМР ^1H соединений **5a–в**, **7** сигнала протона =CH при 8 м. д. в виде дублета за счет спин-спинового взаимодействия с группой NH.

Таблица 1. Эстеразный профиль соединений **5a–в**, **7** и их способность вытеснять пропилий из периферического анионного сайта *EeAChE*^a

Соединение	IC ₅₀ , мкМ.		CES, % (20 мкМ.)	Вытеснение пропилия, % (20 мкМ.)
	AChE	BChE		
5a	1.93±0.16	1.52±0.05	–	7.5±0.6
5б	0.558±0.016	0.231±0.022	9.0±0.8	12.3±0.9
5в	0.538±0.059	0.0314±0.0028	15.4±1.2	10.1±0.7
7	30.3±0.5	23.1±0.9	3.3±0.5	9.9±0.8
Такрин	0.60±0.05	0.029±0.002	–	4.4 ± 0.6
Донепезил	0.040±0.004	19.2±3.0	–	11.9 ± 0.9

^a «←» – нет активности. Данные представлены как mean±SEM, *n* = 3.

Для синтезированных конъюгатов **5a–в** и модельного соединения **7** определен эстеразный профиль – ингибиторная активность в отношении трех сериновых эстераз: AChE, BChE и CES. Данные представлены в табл. 1. Анализ эстеразного профиля, позволяет выявить как основной потенциальный фармакологический эффект соединений – в данном случае это ингибирование холинэстераз, так и их возможную перекрестную специфичность со структурно родственными ферментом КЭ, ингибирование которой может приводить к побочным эффектам – лекарственным взаимодействиям с другими препаратами со сложноэфирными группами, принимаемыми пациентом [17].

Как видно из табл. 1, все синтезированные конъюгаты **5a–в** являются эффективными ингибиторами AChE и BChE с выраженной селективностью в отношении BChE. Интересно отметить, что увеличение длины спейсера приводит к существенному возрастанию анти-BChE активности: от IC₅₀ 1.52±0.05 мкМ. для соединения **5a** со спейсером $-(CH_2)_4-$ до IC₅₀ 0.0314±0.0028 мкМ. для соединения **5в** со спейсером $-(CH_2)_8-$. При этом анти-BChE активность самого активного соединения **5в** сопоставима с активностью такрина. В то же время увеличение длины спейсера у конъюгатов **5a–в** в меньшей степени влияет на усиление ингибиторной активности соединений в отношении AChE (от IC₅₀ 1.93±0.16 мкМ. для соединения **5a** до IC₅₀ 0.538±0.059 мкМ. для соединения **5в**). Конъюгаты не ингибируют (соединение **5a**) или проявляют очень слабую ингибиторную активность (соединения **5б**, **в**) в отношении CES, гидро-

лизующей многочисленные лекарственные препараты со сложноэфирной группой, что позволяет исключить нежелательные лекарственные взаимодействия при их применении в терапии болезни Альцгеймера. Диэтил(гексиламинометилиден)малонат **7** – модельное соединение, позволяющее оценить собственную антиэстеразную активность второго фармакофора конъюгатов **5a–в**, довольно слабо ингибирует холинэстеразы и практически не ингибирует CES.

Далее было установлено, что конъюгаты **5a–в** в концентрации 20 мкМ. вытесняют пропилий из периферического анионного сайта AChE на уровне чуть ниже или сопоставимым со значениями референсного соединения донепезила (11.9±0.9%) (табл. 1), при этом соединение **5б** со спейсером $-(CH_2)_6-$ проявляет максимальную эффективность (12.3±0.9%). Интересно, что диэтил(гексиламинометилиден)малонат **7** также проявляет заметную активность в данном тесте. Полученные результаты свидетельствуют о способности синтезированных конъюгатов связываться с периферическим анионным сайтом AChE и указывают на их потенциальную способность блокировать AChE-индуцируемую агрегацию бета-амилоида, т. е. проявлять болезнь-модифицирующий эффект.

Учитывая важную роль антиоксидантов в терапии болезни Альцгеймера, мы провели оценку собственной антиоксидантной активности синтезированных конъюгатов в тесте ABTS – по степени связывания модельного ABTS^{•+} радикал-катиона [21]. Результаты показали, что конъюгаты **5a–в** проявляют слабую активность в тесте ABTS

Таблица 2. Антирадикальная активность соединений **5a–в**, **7** в тесте АВТС^a

Соединение	% связывания АВТС-радикала			ТЕАС ^b
	200 мкМ.	100 мкМ.	20 мкМ.	
5a	34.5±1.2	13.8±1.1	1.2±0.2	0.01
5b	28.7±1.5	10.3±1.0	–	0.01
5в	31.8±1.6	12.5±1.2	2.3±0.2	0.01
7	–	–	–	–
Тролокс	100	100	53.3±1.6	1.0

^a «–» – нет активности.

^b ТЕАС – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, антиоксидантная способность, выраженная в тролокс-эквивалентах (расчет ТЕАС приведен в методах); данные представлены как mean±SEM, *n* = 3.

(табл. 2), примерно в 100 раз ниже по сравнению со стандартным антиоксидантом Тролоксом (величины ТЕАС ≈ 0.01). Радикал-связывающий эффект проявлялся при использовании соединений **5a–в** в достаточно высоких концентрациях (100 и 200 мкМ.). При максимальной исследованной концентрации (200 мкМ.) степень связывания АВТС^{•+} радикала достигала лишь 30%. Соединение **7** в исследуемом диапазоне концентраций не показало способности связывать АВТС^{•+}.

Таким образом, нами предложен простой эффективный способ синтеза новых конъюгатов такрина с аминоалкилиден-связанным диэтилмалонатным фрагментом, основанный на конденсации аминоалкилензамещенных такринов с коммерчески доступным диэтил(этоксиметилиден)малонатом. Синтезированные конъюгаты являются эффективными ингибиторами АСhE и ВСhE, с преимущественным ингибированием ВСhE, сопоставимым с активностью такрина. При этом конъюгаты способны связываться с периферическим анионным сайтом АСhE и вытеснять из него пропидий, что указывает на их потенциальную способность блокировать АСhE-индуцируемую агрегацию бета-амилоида. Соединения проявляют слабую радикал-связывающую активность.

В заключение следует отметить, что полученные первые представители ряда оригинальных мультитаргетных конъюгатов представляют интерес для дальнейшего расширенного исследования в качестве потенциальных препаратов для лечения болезни Альцгеймера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры регистрировали на Фурье-спектрометре PerkinElmer Spectrum Two в интервале 4000–400 см⁻¹ с помощью приставки нарушенного полного внутреннего отражения с алмазным кристаллом. Спектры ЯМР ¹H регистрировали на спектрометре Bruker Avance^{III} 500 или Bruker DRX-400 (рабочие частоты 500 и 400 МГц соответственно). Спектры ЯМР ¹³C записаны на спектрометре Bruker Avance^{III} 500 (125 МГц). Внутренний стандарт – Me₄Si. Элементный анализ (С, Н, N) выполняли с помощью элементного анализатора PerkinElmer PE 2400 серия II CHN-O EA 1108. Температуры плавления определяли в открытых капиллярах на аппарате Stuart SMP30. Для колоночной хроматографии использовали силикагель 60 (0.063–0.2 мм, Macherey-Nagel®).

Исходный диэтил(этоксиметилиден)малонат **4** является коммерчески доступным реагентом (Alfa Aesar®). Диаминотетрагидроакридинны **3a–в** синтезировали по известным методикам [20].

Общая методика синтеза конъюгатов такрина с диэтилмалонатом 5a–в. Смесь диэтил-2-этоксиметилиденмалоната **4** (216 мг, 1 ммоль) и диаминотетрагидроакридина **3a–в** (1 ммоль) в этаноле (15 мл) нагревали при 80°C в течение 6 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Отгоняли растворитель. Остаток очищали колоночной хроматографией (элюент – CHCl₃–EtOH, 15:1).

Диэтил-[(4-[(1,2,3,4-тетрагидроакридин-9-ил)амино]бутил)амино]метилен]малонат (5a). Выход 285 мг (65%), желтое масло. ИК

спектр, ν , cm^{-1} : 3376, 3281 (NH), 2933 (CH), 1650 (C=O), 1609, 1498, 1420, 1256, 1219, 1219, 1186, 1070 (C=C, NH, C=N, CH). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.29 т и 1.35 т (6H, CH_3 , J 7.1 Гц), 1.71–1.73 м и 1.87–1.95 м (8H, CH_2), 2.71–2.73 м (2H, CH_2), 3.06–3.07 м (2H, CH_2), 3.33–3.41 м (2H, CH_2), 3.44–3.53 м (2H, CH_2), 3.89 уш. с (1H, NH), 4.19 к и 4.24 к (4H, CH_2 , J 7.1 Гц), 7.35–7.38 м (1H, H_{Ar}), 7.55–7.58 м (1H, H_{Ar}), 7.91 д (2H, H_{Ar} , J 8.6 Гц), 7.99 д (1H, =CH, J 14.1 Гц), 9.24–9.27 м (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 14.3, 14.4, 22.8, 23.0, 24.9, 28.3, 28.7, 34.1, 48.8, 49.4, 59.7, 59.9, 89.8, 116.7, 120.4, 122.5, 123.9, 128.3, 128.9, 147.5, 150.2, 158.7, 159.9, 166.1, 169.5. Найдено, %: С 68.31; Н 7.57; N 9.55. $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 68.63; Н 7.43; N 9.55.

Диэтил-[(1,2,3,4-тетрагидроакридин-9-ил)амино]гексил}амино)метилиден]малонат (5б). Выход 280 мг (60%), желтое масло. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3379, 3281 (NH), 2932 (CH), 1650, 1640 (C=O), 1609, 1581, 1498, 1420, 1222, 1070 (C=C, NH, C=N, CH). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.29 т и 1.34 т (6H, CH_3 , J 7.1 Гц), 1.37–1.46 м, 1.57–1.70 м и 1.89–1.95 м (12H, CH_2), 2.68–2.75 м и 3.03–3.10 м (4H, CH_2), 3.32 т (2H, CH_2 , J 6.7 Гц), 3.47 т (2H, CH_2 , J 7.2 Гц), 3.93 уш. с (1H, NH), 4.18 к и 4.23 к (4H, CH_2 , J 7.1 Гц), 7.32–7.38 м (1H, H_{Ar}), 7.52–7.58 м (1H, H_{Ar}), 7.90 д и 7.94 д (2H, H_{Ar} , J 8.4 Гц), 7.98 д (1H, =CH, J 14.2 Гц), 9.16–9.28 м (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 14.3, 14.4, 22.8, 23.0, 24.8, 26.3, 26.6, 30.6, 31.6, 34.1, 49.3, 49.6, 59.6, 59.8, 89.4, 116.1, 120.3, 122.7, 123.6, 128.2, 128.8, 147.5, 150.6, 158.5, 160.0, 166.2, 169.5. Найдено, %: С 69.35; Н 7.98; N 8.99. $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 69.11; Н 8.13; N 9.26.

Диэтил-[(1,2,3,4-тетрагидроакридин-9-ил)амино]октил}амино)метилиден]малонат (5в). Выход 208 мг (53%), желтое масло. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3382, 3281 (NH), 2928, 2856 (CH), 1650, 1640 (C=O), 1609, 1498, 1421, 1221, 1070 (C=C, NH, C=N, CH). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.29 т и 1.34 т (6H, CH_3 , J 7.1 Гц), 1.32–1.40 м (8H, CH_2), 1.54–1.64 м и 1.62–1.69 м (4H, CH_2), 1.90–1.96 м (4H, CH_2), 2.69–2.74 м и 3.03–3.09 м (4H, CH_2), 3.31 к (2H, CH_2 , J 6.7 Гц), 3.48 т (2H, CH_2 , J 7.2 Гц), 3.95 уш. с (1H, NH), 4.18 к и 4.23 к (4H, CH_2 , J 7.1 Гц), 7.32–7.37 м и 7.52–7.58 м (2H, H_{Ar}),

7.90 д и 7.95 д (2H, H_{Ar} , J 8.4 Гц), 7.99 д (1H, =CH, J 14.2 Гц), 9.15–9.28 м (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 14.3, 14.4, 22.8, 23.0, 24.8, 26.3, 26.8, 29.0, 29.1, 30.6, 31.7, 34.0, 49.4, 49.7, 59.6, 59.8, 89.3, 115.9, 120.2, 122.8, 123.5, 128.2, 128.7, 147.5, 150.7, 158.4, 160.0, 166.3, 169.5. Найдено, %: С 70.27; Н 8.34; N 8.48. $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено, %: С 70.34; Н 8.51; N 8.56.

Диэтил(гексиламинометилиден)малонат (7).

Смесь диэтил-2-этоксиметилиденмалоната **4** (610 мг, 2.8 ммоль) и гексилamina **6** (340 мг, 3.4 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную массу упаривали и сушили. Выход 751 мг (99%), желтое масло. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3280 (NH), 2931 (CH), 1641 (C=O), 1609, 1426, 1377, 1217, 1192, 1071 (C=C, NH, C=N, CH). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 0.89 т (3H, CH_3 , J 6.9 Гц), 1.29 т и 1.34 т (6H, OCH_2CH_3 , J 6.9 Гц), 1.27–1.36 м (6H, CH_2), 1.57–1.64 м (2H, CH_2), 3.32 т. д (2H, NHCH_2 , J 6.8, 6.6 Гц), 4.20 к и 4.24 к (4H, OCH_2CH_3 , J 7.1 Гц), 8.00 д (1H, =CH, J 14.2 Гц), 9.22 уш. с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 13.2, 14.3, 14.4, 22.4, 26.1, 30.6, 31.3, 49.8, 59.5, 59.7, 89.2, 160.0, 166.2, 169.5. Найдено, %: С 61.97; Н 9.29; N 5.16. $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_4$. Вычислено, %: С 61.93; Н 9.55; N 5.13.

Биологические исследования. *Определение эстеразного профиля соединений.* Для определения эстеразного профиля соединений исследовали их ингибиторную активность в отношении коммерческих препаратов ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (КФ 3.1.1.7, АСhE), бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади (КФ 3.1.1.8, ВСhE), а также структурно близкого холинэстеразам фермента карбоксилэстеразы печени свиньи (КФ 3.1.1.1, CES) (все ферменты производства «Sigma-Aldrich», США). Активность АСhE и ВСhE определяли методом Элмана (λ 412 нм) [22] с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолина (1 мМ) и бутирилтиохолина (1 мМ.) соответственно, как детально описано в работе [23]. Условия определения: 100 мМ. фосфатный буфер (рН 7.5), 25°C. Активность CES определяли спектрофотометрически (λ 405 нм) по выделению 4-нитрофенола, субстрат – 1 мМ. 4-нитрофенилацетат, как детально описано в [23]. Условия определения: 100 мМ. фосфатный буфер (рН 8.0), 25°C.

Измерения проводили на микропланшетном ридере FLUOStar Optima (LabTech, Германия).

Соединения растворяли в ДМСО, инкубационная смесь содержала 2% растворителя. Первичную оценку ингибиторной активности соединений проводили путем определения степени ингибирования ферментов при концентрации соединения 20 мкМ. Для этого образец соответствующего фермента инкубировали с исследуемым соединением в течение 5 мин, затем определяли остаточную активность фермента. Каждый эксперимент проводили в 3-кратном повторе. Для наиболее активных соединений определяли величины IC_{50} – концентрации ингибитора, которые требуются для снижения активности фермента на 50%. Для определения IC_{50} ингибирования AChE и BChE образец соответствующего фермента инкубировали с исследуемым соединением в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-4} М. в течение 5 мин, затем определяли остаточную активность фермента. Каждое измерение проводили в 3-кратном повторе. Вычисление IC_{50} проводили с использованием программы Origin 6.1 для Windows (OriginLab, США).

Определение вытеснения пропидия иодида из периферического анионного сайта AChE. Исследование соединений как потенциальных ингибиторов AChE-индуцируемой агрегации β -амилоида проводили флуоресцентным методом путем определения степени вытеснения селективного лиганда иодида пропидия из периферического анионного сайта AChE [24], ответственного за связывание с бета-амилоидом [25], с небольшими модификациями, как детально описано ранее [23]. В качестве источника фермента использовали AChE из *Electrophorus electricus* (EeAChE). В качестве референсного соединения использовали донепезил, который показал 82% снижение AChE-индуцируемой агрегации β -амилоида при концентрации 100 мкМ. [25]. Измерения проводили в 3-кратном повторе на микропланшетном ридере FLUOStar Optima (LabTech, Германия).

Исследование антирадикальной активности соединений. Антирадикальную активность соединений определяли по их способности связывать свободные радикалы в ABTS-тесте в соответствии с методом [21] с незначительными модификаци-

ями, как детально описано ранее [26]. Исследуемые соединения растворяли в ДМСО, содержание которого в реакционной смеси составляло 4% (об/об), вносили в раствор ABTS^{•+} (конечная концентрация ABTS^{•+} в реакционной смеси составляла 100 мкМ) и тщательно перемешивали. Реакцию проводили при 30°C в темноте, время инкубации – 1 ч. Степень обесцвечивания раствора ABTS^{•+} определяли при длине волны 734 нм на микропланшетном ридере xMark BioRad (Hercules, США). Соединения тестировали в диапазоне концентраций 1×10^{-6} – 2×10^{-4} М. Все измерения проводили в 5-кратном повторе для трех независимых экспериментов.

Антирадикальную активность соединений представляли в единицах TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, антиоксидантная способность, выраженная в тролокс-эквивалентах). Величины TEAC получали как отношение тангенсов углов наклона для зависимостей снижения концентрации ABTS^{•+}-радикала от концентрации исследуемого соединения и Тролокса. Расчеты проводили с использованием программы Origin 6.1 для Windows (OriginLab). Все результаты представлены как mean \pm SEM values, рассчитанные с использованием GraphPad Prism version 6.05 for Windows, GraphPad Software.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Грищенко Мария Васильевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4110-2620>

Елькина Наталья Андреевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7365-8108>

Махаева Галина Файвелевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8136-6906>

Бургарт Янина Валерьевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6061-2410>

Болтнева Наталья Павловна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7171-8832>

Рудакова Елена Владимировна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4600-7799>

Щегольков Евгений Вадимович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6611-2855>

Ковалева Надежда Владимировна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4990-5068>

Серебрякова Ольга Георгиевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0313-1423>

Салоутин Виктор Иванович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1976-7861>

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-33-90204) с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Спектроскопия и анализ органических соединений». Отдельные биологические исследования проведены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-53-26016) в рамках госзадания Института физиологически активных веществ РАН (FFSN-2021-0005).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Breijyeh Z., Karaman R.* // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 5789. doi 10.3390/molecules25245789
- Giacobini E.* // *Neurochem. Int.* 1998. Vol. 32. P. 413. doi 10.1016/s0197-0186(97)00124-1
- Knapp M. J.* // *J. Am. Med. Assoc.* 1994. Vol. 271. P. 985. doi 10.1001/jama.1994.03510370037029
- Patil B., Yadav N., Yadav G., Yadav S., Yadav S.* // *World J. Pharm. Res.* 2022. Vol. 11. P. 1954. doi 10.20959/wjpr20222-22943
- Ramalakshmi N., Remya, R.S., Nalini C.N.* // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2021. Vol. 21. P. 2361. doi 10.2174/1389557521666210405161205
- Tian S., Huang Z., Meng Q., Liu Z.* // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2021. Vol. 21. P. 2039. doi 10.2174/1389557521666210212151127
- Zhang P., Xu S., Zhu Z., Xu J.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 176. P. 228. doi 10.1016/j.ejmech.2019.05.020
- Guzior N., Wieckowska A., Panek D., Malawska B.* // *Curr. Med. Chem.* 2014. Vol. 22. P. 373. doi 10.2174/0929867321666141106122628
- Tumiatti V., Minarini A., Bolognesi M.L., Milelli A., Rosini M., Melchiorre C.* // *Curr. Med. Chem.* 2010. Vol. 17. P. 1825. doi 10.2174/092986710791111206
- Beach T.E., Prag H.A., Pala L., Logan A., Huang M.M., Gruszczak A.V., Martin J.L., Mahubani K., Hamed M.O., Hosgood S.A., Nicholson M.L., James A.M., Hartley R.C., Murphy M.P., Saeb-Parsy K.* // *Redox Biol.* 2020. Vol. 36. P. 101640. doi 10.1016/j.redox.2020.101640
- Zhang Y.-M., Rock C.O.* In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* / Eds N.D. Ridgway, R.S. McLeod. Boston: Elsevier, 2016. P. 73. doi 10.1016/b978-0-444-63438-2.00003-1
- Yoshimura T., Goto M.* // *FEBS J.* 2008. Vol. 275. P. 3527. doi 10.1111/j.1742-4658.2008.06516.x
- Mustafa A.K., Ahmad A.S., Zeynalov E., Gazi S.K., Sikka G., Ehmsen J.T., Barrow R.K., Coyle J.T., Snyder S.H., Dore S.* // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. P. 1413. doi 10.1523/jneurosci.4297-09.2010
- Vorlová B., Nachtigallová D., Jirásková-Vaničková J., Ajani H., Jansa P., Řezáč J., Fanfrlík J., Отырка М., Hobza P., Konvalinka J., Lepšík M.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 89. P. 189. doi 10.1016/j.ejmech.2014.10.043
- Aderibigbe A.D., Day D.P.* // *ChemistrySelect.* 2020. Vol. 5. P. 15222. doi 10.1002/slct.202004340
- Purgatorio R., Gambacorta N., Samarelli F., Lopopolo G., de Candia M., Catto M., Nicolotti O., Altomare C.D.* // *Molecules.* 2022. Vol. 27. P. 4269. doi 10.3390/molecules27134269
- Махаева Г.Ф., Рудакова Е.В., Ковалева Н.В., Луцкекина С.В., Болтнева Н.П., Прошин А.Н., Щегольков Е.В., Бургарт Я.В., Салоутин В.И.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2019. С. 967; *Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Kovaleva N.V., Lushchekina S.V., Boltneva N.P., Proshin A.N., Shchegolkov E.V., Burgart Y.V., Saloutin V.I.* // *Russ. Chem. Bull.* 2019. Vol. 68. P. 967. doi 10.1007/s11172-019-2507-2
- Inestrosa N.C., Dinamarca M.C., Alvarez A.* // *FEBS J.* 2008. Vol. 275. P. 625. doi 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x
- Xie S.-S., Lan J.-S., Wang X.-B., Jiang N., Dong G., Li Z.-R., Wang K.D.G., Guo P.-P., Kong L.-Y.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 93. P. 42. doi 10.1016/j.ejmech.2015.01.058
- Mao F., Huang L., Luo Z., Liu A., Lu C., Xie Z., Li X.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. Vol. 20. P. 5884. doi 10.1016/j.bmc.2012.07.045
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.* // *Free Radicals Biol. Med.* 1999. Vol. 26. P. 1231. doi 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M.* // *Biochem. Pharmacol.* 1961. Vol. 7. P. 88. doi 10.1016/0006-2952(61)90145-9

23. Makhaeva G.F., Kovaleva N.V., Boltneva N.P., Lushchekina S.V., Rudakova E.V., Stupina T.S., Terentiev A.A., Serkov I.V., Proshin A.N., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Bachurin S.O., Richardson R.J. // *Bioorg. Chem.* 2020. Vol. 94. P. 103387. doi 10.1016/j.bioorg.2019.103387
24. Taylor P., Lappi S. // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14. P. 1989. doi 10.1021/bi00680a029
25. Bartolini M., Bertucci C., Cavrini V., Andrisano V. // *Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol. 65. P. 407. doi 10.1016/s0006-2952(02)01514-9
26. Makhaeva G.F., Elkina N.A., Shchegolkov E.V., Boltneva N.P., Lushchekina S.V., Serebryakova O.G., Rudakova E.V., Kovaleva N.V., Radchenko E.V., Palyulin V.A., Burgart Y.V., Saloutin V.I., Bachurin S.O., Richardson R. J. // *Bioorg. Chem.* 2019. Vol. 91. P. 103097. doi 10.1016/j.bioorg.2019.103097

Conjugates of Tacrine with Aminomethylidene-Substituted Malonates: Synthesis and Biological Evaluation

M. V. Grishchenko^a, N. A. Elkina^a, G. F. Makhaeva^b, Ya. V. Burgart^a, N. P. Boltneva^b, E. V. Rudakova^b, E. V. Shchegolkov^a, N. V. Kovaleva^b, O. G. Serebryakova^b, and V. I. Saloutin^{a,*}

^a Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620990 Russia

^b Institute of Physiologically Active Compounds of Federal Research Center of Problem of Chemical Physics and Medicinal Chemistry Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

*e-mail: saloutin@ios.uran.ru

Received September 3, 2022; revised September 15, 2022; accepted September 22, 2022

The condensation of tacrine aminopolymethylene derivatives with diethyl (ethoxymethylidene)malonate led to the new hybrid compounds – conjugates, which were the effective inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) (IC₅₀ to 0.538 μM) and butyrylcholinesterase (IC₅₀ to 0.0314 μM). They can displace propidium iodide from peripheral anionic site of AChE at the level of the reference drug donepezil and demonstrate a weak antioxidant activity. Conjugates are of interest for further extended research as potential drugs for the Alzheimer's disease treatment.

Keywords: conjugate, tacrine, diethylmalonate, anticholinesterase activity, propidium displacement