

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 201

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/15 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/33 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



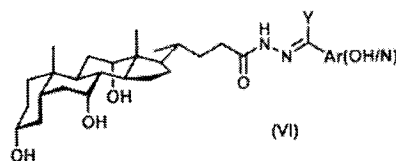
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-428**
 (22) Přihlášeno: **24.06.2015**
 (40) Zveřejněno: **04.01.2017**
(Věstník č. 1/2017)
 (47) Uděleno: **31.01.2018**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **14.03.2018**
(Věstník č. 11/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
 A. J. M. Rasras a kol.: "Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues" European Journal of Medicinal Chemistry 45, 2307-2313 (2010).
 WO 2014/036377 A1; CZ 2012-326 A3.

(73) Majitel patentu:
 Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
 Praha 6 - Dejvice, CZ

(72) Původce:
 Ing. Robert Kaplánek, Ph.D., Praha 10, CZ
 MSc. Cosimo Walter D'acunto, Ph.D., Baronissi,
 Salerno 840 81, IT
 Ing. Tomáš Bříza, Ph.D., Praha 4 - Kunratice, CZ
 Ing. Helena Gbelcová, Ph.D., Jablonica, SK
 Ing. Martin Havlík, Ph.D., Praha 6, CZ
 Ing. Jakub Rak, Plzeň, CZ
 Ing. Zdeněk Kejík, Ph.D., Sokolov, CZ
 doc. Ing. Bohumil Dolenský, Ph.D., Praha 4, CZ
 prof. Ing. Tomáš Ruml, CSc., Praha 10, CZ
 prof. RNDr. Vladimír Král, CSc., Praha 2, CZ



(54) Název vynálezu:
**Použití cholyhydrazonů k prevenci a léčbě
 Alzheimerovy choroby a dalších
 neurodegenerativních poruch a onemocnění**

(57) Anotace:
 Předmětem vynálezu je použití cholyhydrazonů (hydrazonů kyseliny cholové) mající substituovanou 2-hydroxyarylovou nebo 2-N-(hetero)arylovou skupinu. Látky vzorce VI potlačují vznik amyloidu beta (Aβ), redukují jeho toxické účinky na buňky, chelatují ionty biologicky významných kovů a snižují oxidační stres a lze jich tak použít k přípravě terapeutik pro prevenci a léčbu Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění.

CZ 307201 B6

Použití cholylylhydrazonů k prevenci a léčbě Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění

5 Oblast techniky

Vynález se týká použití cholylylhydrazonů (hydrazonů kyseliny cholové) jako terapeutik pro prevenci a léčbu Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, 10 Creutzfeldt–Jakobova choroba, transmisivní spongiformní encefalopatie, hereditární cerebrální angiopatie a další amyloidózy.

15 Dosavadní stav techniky

Amyloidózy vyvolávají celou řadu patologických stavů, zahrnující neurodegenerativní poruchy a onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Creutzfeldt–Jakobova choroba, transmisivní spongiformní encefalopatie, hereditární cerebrální angiopatie a jiné amyloidózy. Na celém světě trpí 20 Alzheimerovou chorobou nebo příbuznými typy neurodegenerativních onemocnění více než 40 milionů lidí a toto číslo se každoročně zvyšuje; odhaduje se, že v roce 2010 by mohlo být postiženo až 100 milionů lidí. Ze statistických dat je patrné, že 2 ze 3 lidí postižených Alzheimerovou chorobou jsou ženy a že onemocnění je nejvíce rozšířeno v západní Evropě a Severní Americe.

Současná medicína tyto choroby doposud nedovede účinně léčit, pouze zpomalit neurodegenerační proces. Jedním z hlavních problémů při hledání vhodné léčby je fakt, že molekulární a buněčné mechanismy vedoucí k těmto chorobám jsou dosud neznámé. Ke vzniku neurodegenerativních onemocnění, zejména Alzheimerovy choroby přispívá celá řada faktorů. 30 Nejvýznamnějším faktorem je abnormální intracelulární nebo extracelulární hromadění peptidových agregátů, a to buď ve formě rozpustných oligomerů či fibril, nebo nerozpustných plaků. Tyto plaky jsou tvořeny agregáty amyloidů, peptidů různé velikosti, obvykle sestávajících z 36 až 43 aminokyselinových jednotek. Tvoří se enzymatickým štěpením větších transmembránových proteinů, nazývaných amyloidní prekurzorové proteiny (APP). Amyloid 35 beta (A β) je tvořen ve dvou isoformách 1–40 A β a 1–42A β . 1–42A β má tendenci agregovat a tvořit fibrily, které se ukládají na neuronech a tvoří plak [M. F. Beal, A. E. Lang, A. C. Ludolph: Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics. Cambridge University Press Publ., 2005, ISBN 978–0–511–54487–3; S. I. Ahmad (Ed.): Neurodegenerative Diseases. Springer Publ., 2012, ISBN 978–1–4614–0653–2]. Mechanismus vzniku agregátů je 40 reverzibilní, monomery a fibrily jsou v dynamické rovnováze. V současné době ještě není přesně známo, zda toxicita způsobená tvorbou plaku nebo přítomností monomerů. Oxidační stres a tvorba volných radikálů a zvýšené hladiny iontů některých biologicky významných kovů (Fe, Cu, Al a Zn) také přispívají k neurotoxicitě [M. F. Beal, A. E. Lang, A. C. Ludolph: Neurodegenerative Diseases: Neurobiology, Pathogenesis and Therapeutics. Cambridge University Press Publ., 2005, ISBN 978–0–511–54487–3; S. I. Ahmad (Ed.): Neurodegenerative Diseases. Springer Publ., 2012, ISBN 978–1–4614–0653–2]. 45

Jedním z možných způsobů prevence a léčby neurodegenerativních onemocnění je snížení koncentrace iontů biologicky významných kovů (např. Fe, Cu, Al a Zn). V klinickém testování je 50 několik chelátorů, např. desferrioxamin a clioquinol; jejich selektivita a účinnost však není příliš vysoká. Nová strategie může být založena na použití multifunkčních molekul, které dokáží chelatovat ionty kovů, mají schopnost pronikat přes hematoencefalickou bariéru a snižovat různé faktory vedoucí k neurodegeneraci, např. redukovat oxidační stres či modulovat aktivitu specifických enzymů. Jedním z typů látek vykazujících kombinovaný účinek proti 55 neurodegenerativním chorobám jsou hydrazony. Tyto látky vykazují široké spektrum

- biologických účinků: antimikrobiální, antimykobakteriální, antivirální, fungicidní, antivirální, protimalarické či protirakovinné účinky [Z.D. Liu, R.C. Hider: Design of iron chelators with therapeutic application *Coord. Chem. Rev.* 2002, 232, 151–171; T. F. Tam, R. Leung–Toung, W. Li, Y. Wang, K. Karimian, M. Spinoet: Iron Chelator Research: Past, Present, and Future *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 983–995; S. Rollas, S. G. Kùçùkgùzel: Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* 2007, 12, 1910–1939; B. Narasimhan, P. Kumar, D. Sharma: Biological activities of hydrazide derivatives in the new millennium. *Acta Pharm. Sci.* 2010, 52, 169–180; A. J. M. Rasras, T. H. Al–Tel, A. F. Al.Aboudi, R. A. Al–Qawasmeh: Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 2307–2313; G. Uppal, S. Bala, S. Kamboj, M. Saini: Therapeutic Review Exploring Antimicrobial Potential of Hydrazones as Promising Lead. *Pharma Chem.* 2011, 3, 250–268; P. Kumar, B. Narasimhan: Hydrazides/Hydrazones as Antimicrobial and Anticancer Agents in the New Millennium. *Mini–Rev. Med. Chem.* 2013, 13, 971–987].
- Účinek hydrazonů jako terapeutik pro prevenci a léčbu neurodegenerativních onemocnění a poruch může být založen na kombinaci několika mechanismů účinku: potlačení tvorby amyloidu beta, na komplexaci iontů kovů, potlačení tvorby reaktivních kyslíkatých částic, inhibici enzymů, zejména cholinesteráz [E. A. Malecki, J. R. Connor: The Case for Iron Chelation and/or Antioxidant Therapy in Alzheimer's Disease. *Drug Develop. Res.* 2002, 56, 526–530; R. Leon, A. G. Garcia, J. Marco–Contelles: Recent Advances in the Multitarget–Directed Ligands Approach for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Res. Rev.* 2013, 33, 139–189; C. A. Perez, Y. Tong, M. Guo: Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. *Curr. Bioactive Comp.* 2008, 4, 150–158; X. Li, J. Jankovic, W. Le: Iron chelation and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *J. Neural. Transm.* 2011, 118, 473–477; A. Gaeta, R. C. Hider: The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Brit. J. Pharmacol.* 2005, 146, 1041–1059; M. Catto, F. Arnesano, G. Palazzo, A. De Stradis, V. Calo, M. Losacco, R. Purgatorio, F. Campagna: Investigation on the influence of (Z)–3–(2–(3–chlorophenyl)hydrazono)–5,6–dihydroxyindolin–2–one (PT2) on β –amyloid(1–40) aggregation and toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2014, 560, 73–82; M. Prinz, S. Parlar, G. Bayraktar, V. Alptuzun, E. Erciyas, A. Fallarero, D. Karlsson, P. Vuorela, M. Burek, C. Forster, Daniela Karlsson et al.: 1,4–Substituted 4–(1H)–pyridylene–hydrazone–type inhibitors of AChE, BuChE, and amyloid– β aggregation crossing the blood–brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013, 49, 603–613; K. Kawagoe, K. Motoki, T. Odagiri, N. Suzuki, C.J. Chen, T. Mimura: Preparation of benzaldehyde or heterocycle carboxaldehyde hydrazone derivatives as inhibitors of agglutination and/or deposition of an amyloid protein or amyloid–like protein. *Patent WO 2004087641 A1, 2004*; U. Holzgrabe, V. Alptuezen: 4–Hydrazono–1,4–dihydropyridine derivatives for the treatment of neurodegenerative disorders. *Patent WO 2010/42642 A1, 2010*; E. Wanker, T. Wiglenda, J.T. Babila, A. Boeddrich, M. Schmidt, S. Neuendorf, F. Schiele: Hydrazones as enhancers of protein degradation and their preparation and use in the treatment of huntingtin–related disorders. *Patent WO 2011/020883 A1, 2011* a *Patent EP 2 287 149 A1, 2011*; A. Wiestner, Y. Ye, Q. Wang, W.C. Trenkle, B.A. Shinkre: Hydrazone and diacylhydrazine derivatives as ERAD inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of diseases. *Patent WO 2011069039 A1, 2011*].
- V nedávné době byla připravena a publikována série cholylhydrazonů (hydrazonů kyseliny cholové) se substituovanými arylkarbaldehydy a arylketony a u těchto cholylhydrazonů byla testována jejich antimikrobiální aktivita [A. J. M. Rasras, T. H. Al–Tel, A. F. Al. Aboudi, R. A. Al–Qawasmeh: Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 2307–2313] a protirakovinná aktivita [J. Rak, R. Kaplánek, T. Štulcová, P. Drašar, M. Havlík, T. Bříza, P. Džubák, M. Hajdúch, P. Konečný, J. Štěpánková, J. Králová, V. Král: Cholylhydrazony a jejich použití k léčbě nádorových onemocnění a leukémií. *Patent CZ 305607 B6(2015)*].

Použití cholylylhydrazonů mající substituovanou 2-hydroxyarylovou nebo 2-N-(hetero)arylovou skupinu k prevenci a léčbě Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění jsou předmětem tohoto patentu.

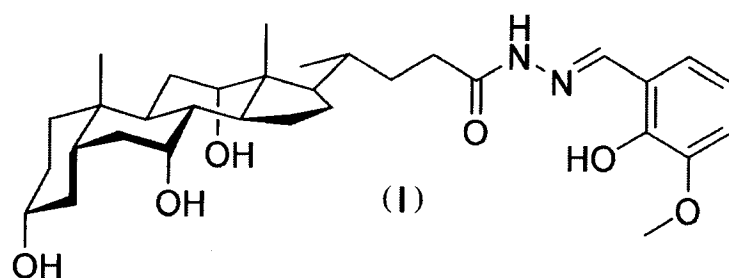
5

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití cholylylhydrazonů (hydrazonů kyseliny cholové) jako terapeutik k prevenci a léčbě Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění.

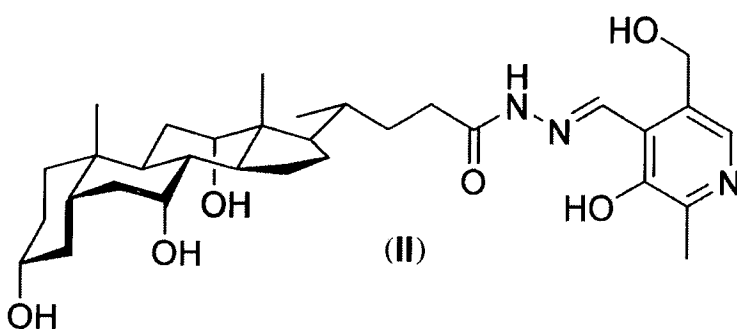
10

Předmětem vynálezu je použití cholylylhydrazonů vybraných ze skupiny *N'*-(2-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cholylylhydrazon (vzorec I),



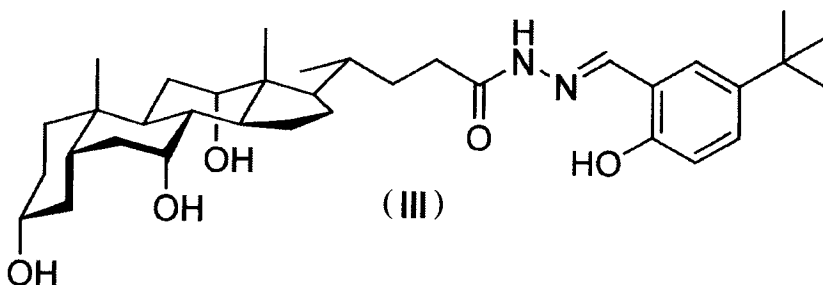
15

N'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholylylhydrazon vzorec II (derivátu pyridoxalu),



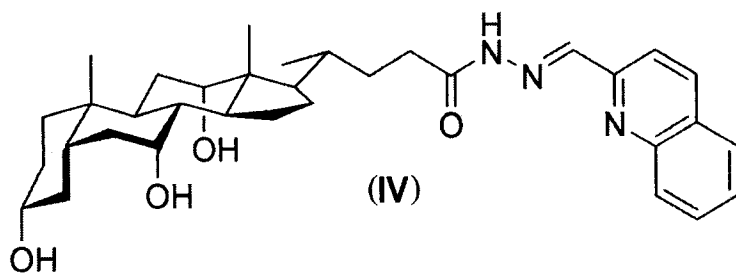
20

N'-(5-(*t*-butyl)-2-hydroxybenzyliden)cholylylhydrazon vzorec III,

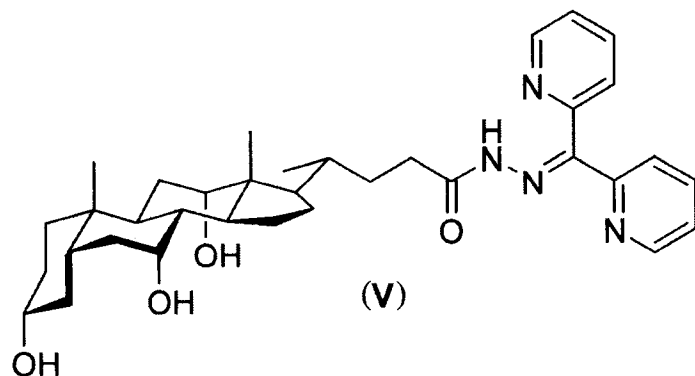


25

N'-(chinolin-2-ylmethyliden)cholylylhydrazon vzorec IV,



a *N'*-(di(pyridin-2-yl)methylen)cholylylhydrazon vzorec V,



Látky vzorce I–V potlačují vznik amyloidu beta (Aβ), redukují jeho toxické účinky na buňky, chelatují ionty biologicky významných kovů a snižují oxidační stres a je tak možné je využít pro přípravu léčiva pro prevenci a léčbu Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch a onemocnění, jako je Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Creutzfeldt–Jakobova choroba, transmisivní spongiformní encefalopatie, hereditární cerebrální angiopatie a další amyloidózy.

Objasnění výkresů

Obrázek 1 znázorňuje proliferační křivky. SHSY5Y buňky byly vystaveny působení látek vzorce I–V po dobu 0, 24, 48 a 72 h. DMSO byl použit jako referenční látka. Test proliferace byl proveden s použitím redukce WST1 (2–(4–jodphenyl)–3–(4–nitrofenyl)–5–(2,4–disulfofenyl)–2*H*–tetrazolium) pomocí spektrofotometrického měření.

Obrázek 2 znázorňuje ELISA test pro detekci 1–42 amyloidu beta. Supernatanty z SHSY5Y–APPswe buněk inkubovaných v přítomnosti 1 μM testovaných látek, a nebo DMSO (kontrola) po dobu 72 hodiny byly analyzovány pomocí ELISA testu pro detekci 1–42 amyloidu beta (1–42 Aβ). Výsledky jsou uvedeny v OD při 450 nm. Clioquinol (5–chlor–7–jodchinolin–8–ol) byl použit jako pozitivní kontrola.

Obrázek 3 znázorňuje test vlivu externě přidaného amyloidu beta (Aβ) na přežití buněk. SHSY5Y buňky byly inkubovány s 5 ng/ml 1–42 isoformy amyloidu beta (AB) v přítomnosti 1 μM testovaných látek a nebo DMSO (kontrola, 2. sloupec v grafu) po dobu 48h. Test buněčného přežití byl proveden s použitím redukce WST1 (2–(4–jodphenyl)–3–(4–nitrofenyl)–5–(2,4–disulfofenyl)–2*H*–tetrazolium) pomocí spektrofotometrického měření. Výsledky jsou uvedeny jako % živých buněk, referenční vzorek (DMSO bez přidaného Aβ) je vztažen na 100% (1. sloupec v grafu).

Obrázek 4 znázorňuje detekci celulárních reaktivních kyslíkatých částic (ROS). SHSY5Y–APPswe buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin s 1 μM testovaných látek. DMSO byl použit

jako kontrola. Test produkce ROS v buňkách byl proveden pomocí fluorescenční sondy DCFDA (2',7'-dichlorfluorescein diacetátu). Výsledky jsou uvedeny jako intenzita fluorescence DCF, detekovaného pomocí fluorescenční spektroskopie s excitací při 495 nm a emisním spektrem při 529 nm. Peroxid vodíku (H_2O_2) byl použit jako pozitivní kontrola testu.

5

Obrázek 5 znázorňuje titrační křivku pro UV/VIS titraci *N*'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorce II) měďnatými ionty v rozmezí $\lambda = 200$ –900 nm.

10

Obrázek 6 znázorňuje titrační křivku pro UV/VIS titraci *N*'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorce II) měďnatými ionty při $\lambda = 320$ nm se stanovením stechiometrie komplexu.

15

Značení látek v obrázcích: 3MeOSA: *N*'-(2-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cholyldrazon (vzorec I); 5tBuSA: *N*'-(5-(*t*-butyl)-2-hydroxybenzyliden)cholyldrazon (III); Px: *N*'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorec II); Q: *N*'-(chinolin-2-ylmethyliden)cholyldrazon (vzorec IV); PyCopy: *N*'-(di(pyridin-2-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorec V).

20

Vlastnosti, proliferace neuroblastomových buněk, potlačení vzniku amyloidu beta (AB), redukce toxických účinků amyloidu beta (AB) na buňky, snížení oxidačního stresu pomocí cholyldrazonů vzorce I–V a jejich komplexační vlastnosti vůči iontům biologicky významných kovů jsou doloženy následujícími příklady, aniž by jimi byly jakkoliv omezeny.

25

Příklady uskutečnění vynálezu

30

Příklad 1. Test proliferace SHSY5Y neuroblastomových buněk

Jako model neuronů pro měření vlastností cholyldrazonů byly použity SHSY5Y neuroblastomové buňky. Pro stanovení koncentrace látek vzorce I–V, při které dochází k očekávanému biologickému účinku, ale která ještě není pro testované buňky toxická, byl proveden test proliferace SHSY5Y neuroblastomových buněk. Na základě předběžných výsledků získaných měření na nádorových buněčných liniích byla zvolena koncentrace látek 1 μM .

Byl proveden WST1 proliferační test na SHSY5Y neuroblastomových buňkách vystavených působení látek vzorce I–V v koncentraci 1 μM po dobu 24, 48 a 72 hodin. Výsledky testu ukazují, že testované látky (3MeOSA: *N*'-(2-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cholyldrazon (vzorec I); 5tBuSA: *N*'-(5-(*t*-butyl)-2-hydroxybenzyliden)cholyldrazon (III); Px: *N*'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorec II); Q: *N*'-(chinolin-2-ylmethyliden)cholyldrazon (vzorec IV); PyCopy: *N*'-(di(pyridin-2-yl)methyliden)cholyldrazon (vzorec V) nebyly toxické při této koncentraci a proto jsou vhodné pro testování jako potenciálních terapeutik pro prevenci a léčbu neurodegenerativních poruch a onemocnění. Obrázek 1 znázorňuje proliferační křivky.

Příklad 2. Potlačení vzniku amyloidu beta (A β)

50

Dopaminergní neuroblastomové buňky SHSY5Y byly zvoleny jako model neuronálních buněk. Pro vytvoření modelu blízkého buňkám postižených neurodegenerací (např. Alzheimerovou chorobou) byl do buněk SHSY5Y vložen pomocí elektroporace plasmid nesoucí gen pro vysokou expresi amyloid beta proteinu (APP^{swe}). Buňky SHSY5Y-APP^{swe} byly inkubovány s přítomností 1 μM testovaných látek vzorce I–V (značení látek je uvedeno v Příkladu 1) a nebo

DMSO (kontrola) po dobu 72 h. Na obrázku 2 jsou uvedeny výsledky ELISA testu (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pro detekci 1–42 amyloidu beta (1–42 A β). Supernatanty z SHSY5Y–APPswe buněk byly analyzovány pomocí ELISA testu pro detekci 1–42 amyloidu beta (1–42 A β). Clioquinol (5–chlor–7–jodchinolin–8–ol) byl použit jako pozitivní kontrola. Výsledky testu ukazují, že testované látky významně snižují produkci 1–42 amyloidu beta (1–42 A β) ve srovnání s kontrolou.

Příklad 3. Redukce toxických účinků amyloidu beta (A β)

Amyloid beta (A β) ve formě plaku nebo monomerů je pro buňky toxický a vede k buněčné smrti. V příkladu 2 je uvedeno snížení produkce amyloidu beta (A β) SHSY5Y–APPswe buňkami. To v důsledku vede ke snížení jejich poškození a smrti působením vzniklého A β . Byl studován vliv externě přidané 1–42 isoformy amyloidu beta (A β) v přítomnosti látek vzorce I–V a bez nich (kontrola). Obrázek 3 znázorňuje test vlivu externě přidaného amyloidu beta (A β) na přežití buněk. SHSY5Y buňky byly inkubovány s 5 ng/ml 1–42 isoformy amyloidu beta (1–42 A β) v přítomnosti 1 μ M testovaných látek, anebo DMSO (kontrola) po dobu 48 h. Test buněčného přežití byl proveden s použitím redukce pomocí spektrofotometrického měření. Výsledky jsou uvedeny jako % živých buněk, referenční vzorek (DMSO bez přidaného A β) je vztažen na 100 %. Z výsledků je patrné, že externě přidaný amyloid beta, vyvolává buněčnou smrt, a dochází ke ztrátě přibližně 25 % buněk po 24 h. V případě přítomnosti testovaných látek vzorce I–V (značení látek je uvedeno v příkladu 1) mají za následek částečné nebo úplné přežití buněk, tedy malou či zanedbatelnou ztrátu buněk. Testované látky tak redukuje toxický účinek externě přidaného amyloidu beta na buňky.

Příklad 4. Snížení oxidačního stresu

Oxidační stres je jedním z faktorů vedoucích k neurodegeneraci. Zvýšená koncentrace reaktivních kyslíkatých částic (ROS) má souvislost s agregací, ukládáním či uvolňováním amyloidu beta (A β). Z tohoto důvodu byly měřeny hladiny ROS v SHSY5Y–APPswe buňkách v přítomnosti látek vzorce I–V a bez nich (kontrola). Obrázek 4 znázorňuje detekci celulárních reaktivních kyslíkatých částic (ROS). SHSY5Y–APPswe buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin s 1 μ M testovaných látek. Peroxid vodíku (H₂O₂) byl použit jako pozitivní kontrola testu. Test hladiny ROS v buňkách byl proveden pomocí fluorescenční sondy DCFDA. Z výsledků je patrné, že látky vzorce I–V (značení látek je uvedeno v příkladu 1) ovlivňují tvorbu ROS. Ve všech případech došlo k výraznému snížení hladiny ROS v průběhu 72 h, i ve srovnání s buňkami inkubovanými pouze s DMSO, které bylo použito pro kontrolu, ve stejné koncentraci jako v případě testovaných látek.

Příklad 5. Komplexační vlastnosti cholyhydrazonů

Jedním z předpokládaných mechanismů účinku tohoto typu látek je chelatace biologicky významných iontů kovů, které způsobují mimo jiné oxidační stres a tvorbu volných radikálů, vedoucích k neurodegeneraci, poškození buněk a tkání. Dalším možným mechanismem účinku je chelatace iontů kovů, které jsou součástí metaloproteinů a metaloenzymů. Jejich chelatace pak způsobuje inhibici enzymové aktivity příslušných metaloproteinů.

UV/Vis titrace N'–(2,5–dihydroxybenzyliden)cholyhydrazonu (strukturní analog látek vzorce I a III) s ionty kovů ukazuje, že tato látka je schopna silně vázat Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ionty, slaběji vázat Ni²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Zn²⁺ ionty, zatímco Ca²⁺, Mg²⁺, Cr³⁺, Mn²⁺ ionty neváže. Za podmínek simulující fyziologické podmínky (podmínky v živém organismu) je výrazná preference vazby

železitých iontů (efekt koncentrace iontů v organismu). Všechny titrace byly provedeny ve směsi dimethylsulfoxid–voda (1:1 v/v) při pH = 7,4 (fosfátový pufr).

Obrázek 5 znázorňuje titrační křivku pro UV/VIS titraci *N'*-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldiazonu (vzorec II) měďnatými ionty v rozmezí λ = 200–900 nm. Obrázek 6 znázorňuje titrační křivku pro UV/VIS titraci *N'*-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldiazonu (vzorec II) měďnatými ionty při λ = 320 nm se stanovením stechiometrie komplexu.

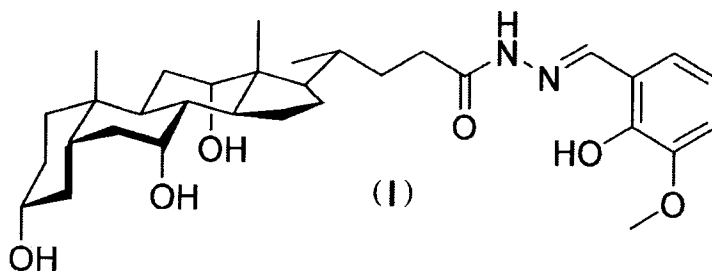
Průmyslová využitelnost

Vynález je využitelný ve farmaceutickém průmyslu, k přípravě nových léčiv jako terapeutik pro prevenci a léčbu Alzheimerovy choroby a neurodegenerativních poruch a onemocnění.

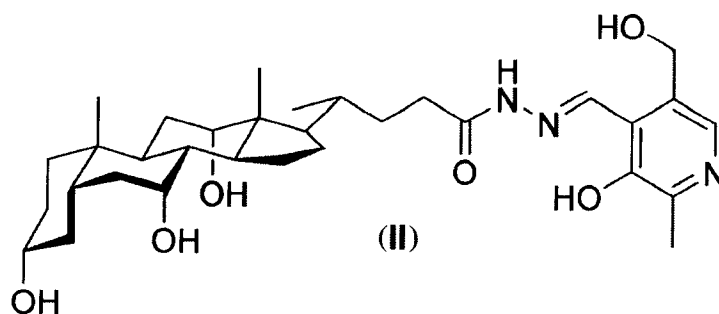
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití cholyldiazonů vybraných ze skupiny

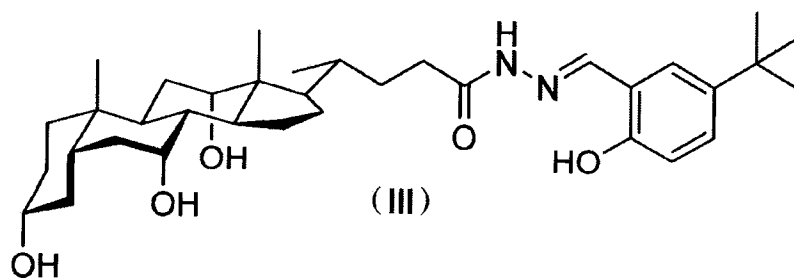
N'-(2-hydroxy-3-methoxybenzyliden)cholyldiazon - vzorec I,



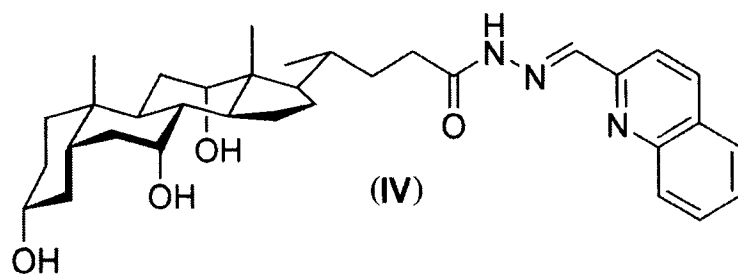
N'-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyliden)cholyldiazon - vzorec II,



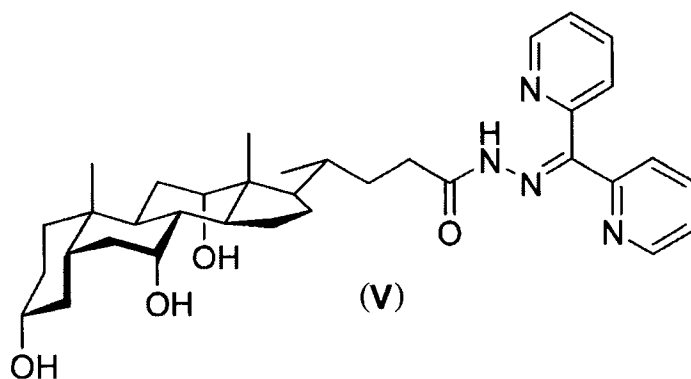
N'-(5-(*t*-butyl)-2-hydroxybenzyliden)cholyldiazon - vzorec III,



N'-(chinolin-2-ylmethyliden)cholylylhydrazon - vzorec IV,



a *N'*-(di(pyridin-2-yl)methyliden)cholylylhydrazon - vzorec V,

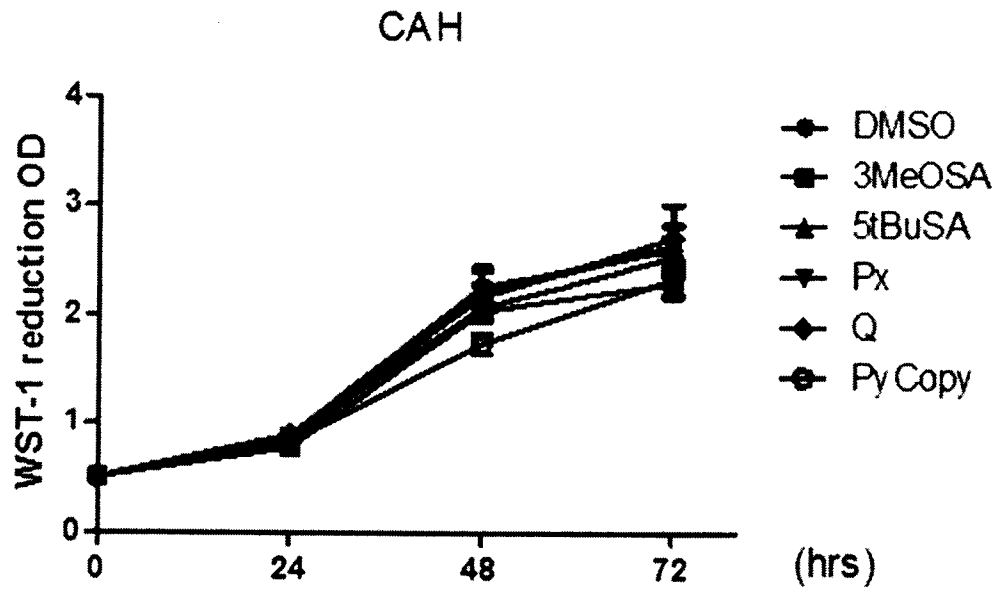


5

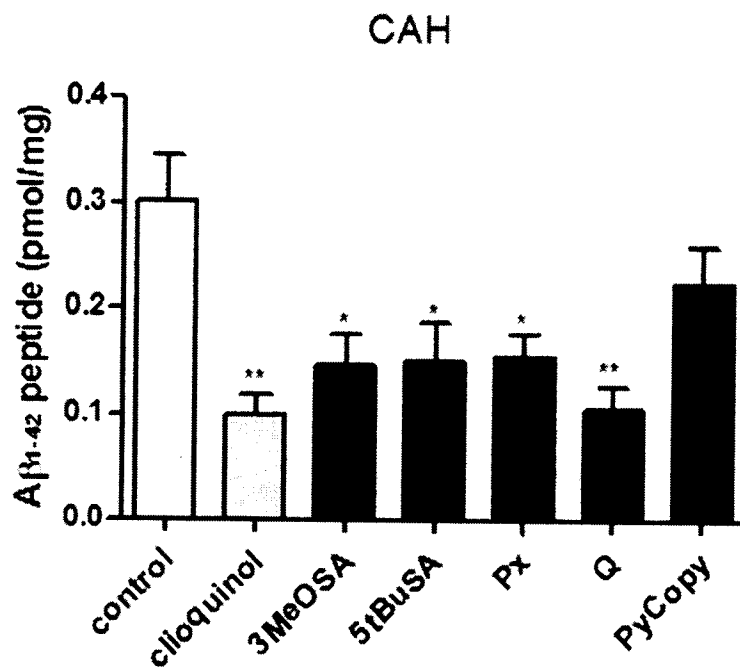
pro přípravu léčiva k léčbě amyloidóz, kde amyloidózou je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Creutzfeldt–Jakobova choroba, transmisivní spongiformní encefalopatie a hereditární cerebrální angiopatie.

10

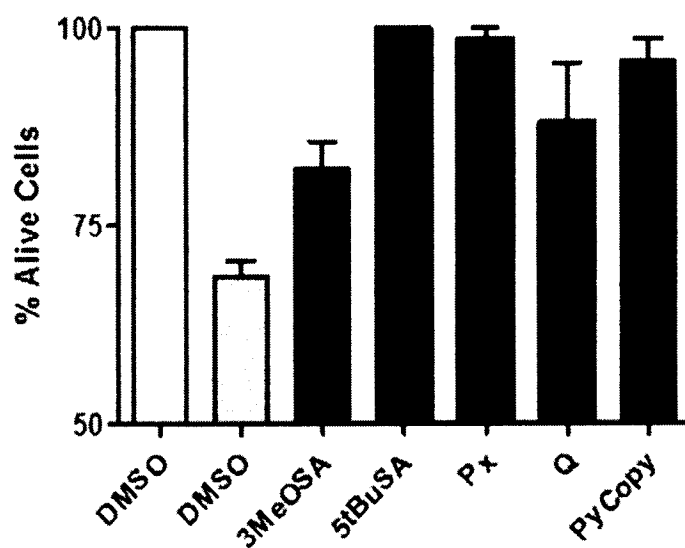
3 výkresy



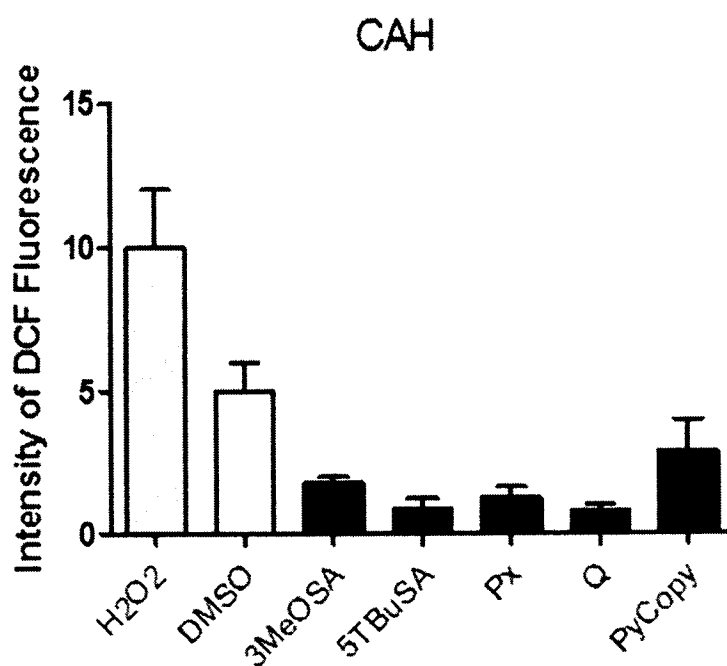
Obr. 1.



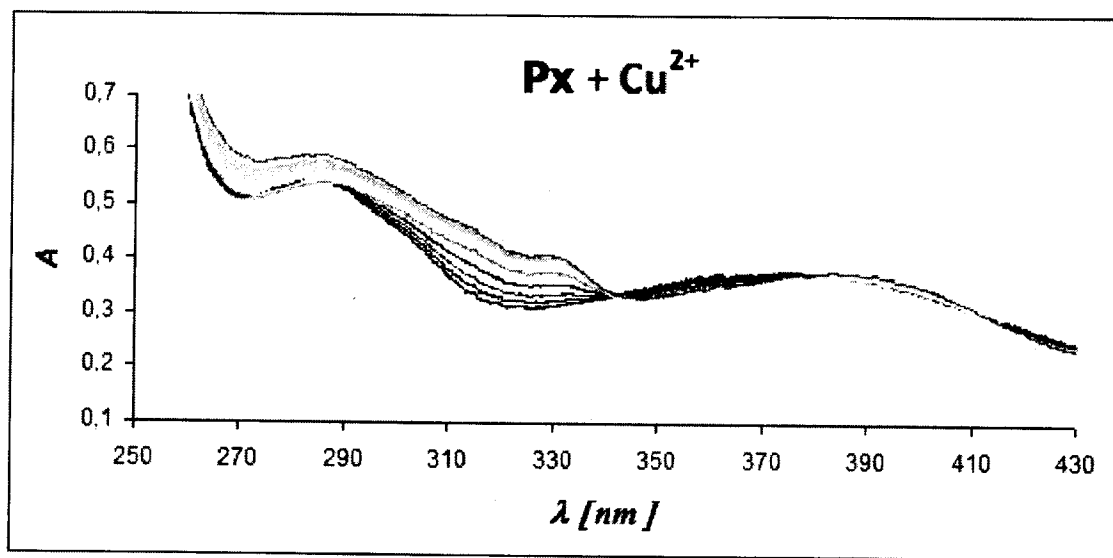
Obr. 2.



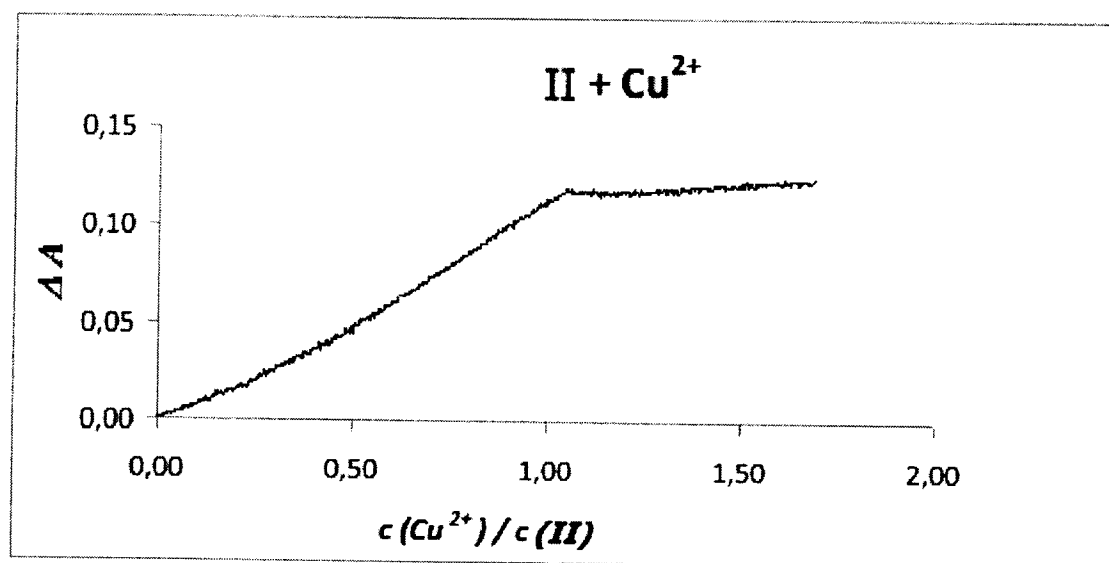
Obr. 3.



Obr. 4.



Obr. 5.



Obr. 6.

Konec dokumentu
