

UNIVERSITA' DI PISA



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea in Farmacia

Tesi di laurea

*SINTESI DI NUOVI DERIVATI CARBAMMICI AD ATTIVITA'
NEUROPROTETTIVA*

Relatori

Prof.ssa Simona Rapposelli

Dott.ssa Maria Digiacomo

Candidata

Maria Chiara Moroniti

Anno accademico: 2014/2015

SSD CHIM08

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	3
1. IL MORBO DI ALZHEIMER	4
2. EZIOPATOGENESI	4
2.1 Aggregazione amiloide.	5
2.1.1 <i>Enzima BACE-1</i>	7
2.2 Grovigli neuro fibrillari	8
2.3 Neuroinfiammazione	9
2.4 Stress ossidativo	10
2.4.1 <i>Metalli di transizione</i>	12
2.4.2 <i>Enzima MAO-B</i>	13
2.5 Sistema colinergico	13
2.5.1 <i>Enzima BuChE</i>	16
3. NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE	18
3.1 Inibitori dell'AChE e BuChE: dalla terapia tradizionale ai MTDLs.	18
3.2 Ibridi di inibitori colinesterasici con antiossidanti	20
3.3 Ibridi di inibitori colinesterasici e delle MAO	23
3.4 Ibridi di inibitori colinesterasici e chelanti dei metalli	25
3.5 Ibridi di inibitori delle colinesterasi con inibitori BACE-1	26
INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	29
PARTE SPERIMENTALE	41
BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUZIONE

GENERALE

Introduzione generale

1. IL MORBO DI ALZHEIMER

Il morbo di Alzheimer (AD, Alzheimer's disease), descritto per la prima volta dal neurologo tedesco Alois Alzheimer, nel 1907, rimane al giorno d'oggi una tra le patologie neurodegenerative più diffuse e la causa più comune di demenza nella popolazione senile del mondo occidentale.

Vengono riconosciute due forme di AD, una di tipo *familiare* (quando si verifica in più componenti di una famiglia), ed una di tipo *sporadico*. In entrambi i casi si manifesta inizialmente il così detto *deterioramento cognitivo lieve* (MCI) per poi proseguire, negli stadi più avanzati, in una progressiva perdita della memoria accompagnata da disturbi comportamentali e relazionali. Pur non essendo del tutto comprese le cause della patologia, gli esperti concordano nel riconoscere alla base dell'AD fattori di tipo genetico, endogeno ed ambientali.¹

Inoltre data la previsione dell'incremento di circa un triplo di persone affette da AD entro il 2050, la ricerca di nuovi farmaci è accelerata notevolmente nell'ultimo decennio.^{1,2}

2. EZIOPATOGENESI

Sebbene l'eziologia dell'Alzheimer non sia ancora del tutto chiara, nel corso degli anni sono stati definiti dei fattori che contribuiscono all'insorgenza e alla progressione della patologia (fig.1) :

- generazione di *placche amiloidi* insolubili a partire dalla deposizione di peptidi β -amiloidi ($A\beta$)
- formazione dei grovigli neurofibrillari (NTFs)
- stress ossidativo
- disomeostasi di metalli pesanti (Fe,Cu e Zn)
- alterazione del sistema colinergico.
- neuroinfiammazione

L'accumulo di placche amiloidi e la formazione di grovigli neurofibrillari NTFs sono considerati i due eventi biochimici predominanti dell'AD, costituendo il punto di partenza per cambiamenti omeostatici e funzionali al livello del SNC che conducono alla neurodegenerazione.^{1,2}

Introduzione generale

In condizioni patologiche si ha il cosiddetto *pathway amiloidogenico*, in cui l'enzima BACE-1 esegue, inizialmente, un taglio proteolitico all'estremità C-terminale della proteina APP producendo un frammento da 12 kDA. Successivamente, per azione della γ -secretasi, si forma il peptide $A\beta$ di 40 aminoacidi ($A\beta_{1-40}$) o di 42 aminoacidi ($A\beta_{1-42}$). Il peptide $A\beta_{1-42}$, più neurotossico del più abbondante peptide $A\beta_{1-40}$ all'interno del neurone, è responsabile di una serie di eventi biologici che portano a morte neuronale, quali disfunzione e danneggiamento dei mitocondri, espressione di geni apoptotici, attivazione di processi infiammatori ed incremento di ROS. In seguito alla morte neuronale i peptidi $A\beta$ vengono liberati nello spazio extracellulare, e non presentando le caratteristiche biologiche della forma naturale, tendono a depositarsi in aggregati extracellulari sulla membrana dei neuroni. Il processo di aggregazione di $A\beta$ inizia con la formazione di monomeri e procede con dimeri, oligomeri solubili, protofibrille e infine con fibrille mature, tra questi, gli oligomeri solubili sembrano essere i più neurotossici. (fig.2) ^{2,9}

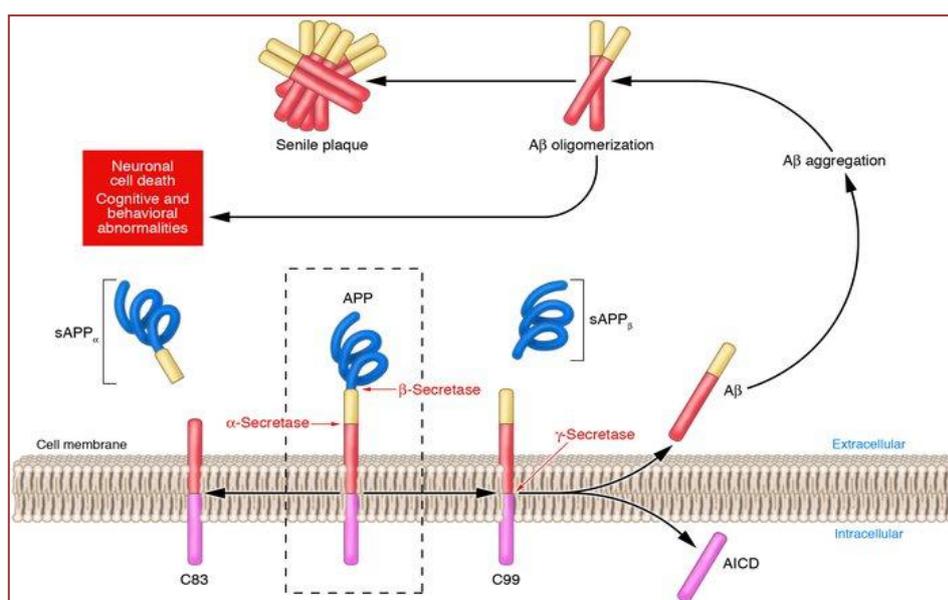


Fig.2 Meccanismo di clivaggio da parte delle tre secretasi (α , β e γ) della proteina APP e formazione dei peptidi $A\beta$.

Introduzione generale

2.1.1 *Enzima BACE-1*

BACE-1 è un enzima di 501 amminoacidi, ubiquitario, anche se presente soprattutto a livello dei neuroni cerebrali, dove è responsabile della generazione dei peptidi amiloidi $A\beta_{1-40}$ e $A\beta_{1-42}$. È un'aspartato-proteasi poiché presenta all'interno del sito catalitico due residui di aspartato, Asp32 e Asp228 che assumono una conformazione a diade simmetrica.⁽³⁾ Possiede un'attività enzimatica ottimale a pH acido (4.5), ciò spiega come la sua azione prevalga nel lume di apparati subcellulari che presentano valori di pH piuttosto bassi come l'apparato del Golgi ed gli endosomi. Studi di mutagenesi hanno rilevato una notevole specificità dell'enzima verso le sequenze amminoacidiche presenti in prossimità del sito di clivaggio sulla proteina APP. L'introduzione di grossi amminoacidi idrofobici come la leucina permettono di incrementare l'azione proteolitica della β -secretasi mentre la sostituzione con piccoli amminoacidi come la valina nella solita posizione sembrerebbe ridurre la sua attività enzimatica.⁴ (fig.3)

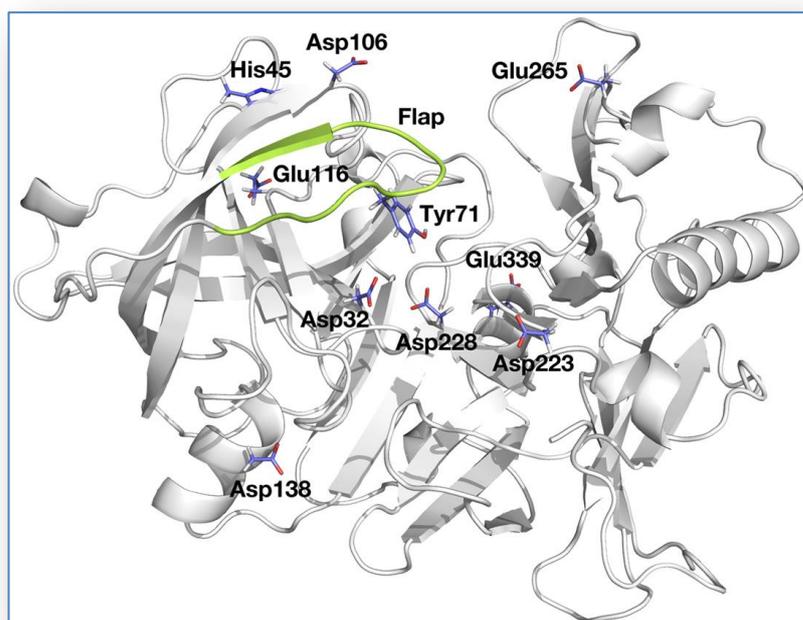


Fig.3 Struttura del BACE-1: sito catalitico con residui Asp32 e Asp223

È stato inoltre appurato come l'incremento dei livelli di BACE-1 di almeno il doppio nei pazienti affetti da AD, sia dovuta ad un aumento dello stress ossidativo e delle mutazioni genetiche a carico della proteina APP. In particolare è stata riconosciuta una

Introduzione generale

mutazione ricorrente in prossimità del sito di clivaggio di BACE-1 detta “swedish - mutation” (così chiamata perché scoperta per la prima volta in una famiglia svedese) in cui si verifica la sostituzione degli amminoacidi lisina-metionina con asparagina-leucina, che renderebbe la proteina APP più disponibile alla proteolisi da parte delle β -secretasi. La caratterizzazione delle proprietà dell'enzima BACE-1, ancora sconosciute fino ad un decennio fa, ha permesso di focalizzare la ricerca sullo studio di composti in grado di inibire l'azione di BACE-1, considerato uno dei target primari per interferire con il processo amiloidogenico .

In seguito è stata identificata anche l'isoforma BACE-2, che presenta il 63% della sequenza amminoacidica in comune con l'omologo BACE-1, ma è meno presente a livello cerebrale, ed inoltre, non sembrerebbe esser coinvolto nella proteolisi della proteina APP.⁴

2.2 Grovigli neurofibrillari

Altro fattore caratterizzante il morbo di Alzheimer è la presenza di ulteriori aggregati insolubili riscontrati a livello dell'ippocampo, dell'amigdala e della corteccia entorinale, denominati grovigli neurofibrillari (NFTs). Essi sono costituiti da filamenti ad elica appaiati (PHF) derivanti da un'iperfosforilazione della proteina τ (tau), la quale in condizioni fisiologiche riveste un ruolo essenziale nella regolazione e stabilizzazione dei microtubuli citoplasmatici neuronali.

L'iperfosforilazione della proteina tau porta ad un errato assemblaggio dei microtubuli, ad una perdita delle trasmissioni sinaitiche ed una conseguente morte neuronale.

L'iperfosforilazione sembrerebbe dovuta principalmente all'attivazione delle chinasi GSK-3 β e Cdk5, ed un'inibizione dell'attività della fosfatasi PP-2A. L'attività di queste chinasi sembrerebbe essere innescata dai peptidi β amiloidi e dall'aumento delle concentrazioni di Ca²⁺ nell'ambiente intracellulare.^{1,20}

2.3 Neuroinfiammazione

La neuroinfiammazione rappresenta una delle cause dell'insorgenza dell'AD, ed è caratterizzata dalla presenza di cellule della microglia attivate all'interno della placca e astrociti reattivi localizzati in periferia.

Le microglia sono cellule del sistema immunitario con il compito di eliminare agenti esterni attraverso un meccanismo fagocitario e citotossico. Nel decorso della patologia queste cellule sembrerebbero avere due funzioni contrastanti: nei primi stadi della malattia, grazie alla loro azione di "scavenger", promuovono l'eliminazione dei depositi di peptidi A β ; in un secondo momento, in seguito al loro accumulo, inducono un massivo rilascio di citochine proinfiammatorie (IL -1, IL-6, IFN- γ , TNF- α), di proteasi neurotossiche e chemochine, tutti fattori che promuovono il deposito dei peptidi A β e il progresso della malattia neurodegenerativa.⁵(Fig.4)

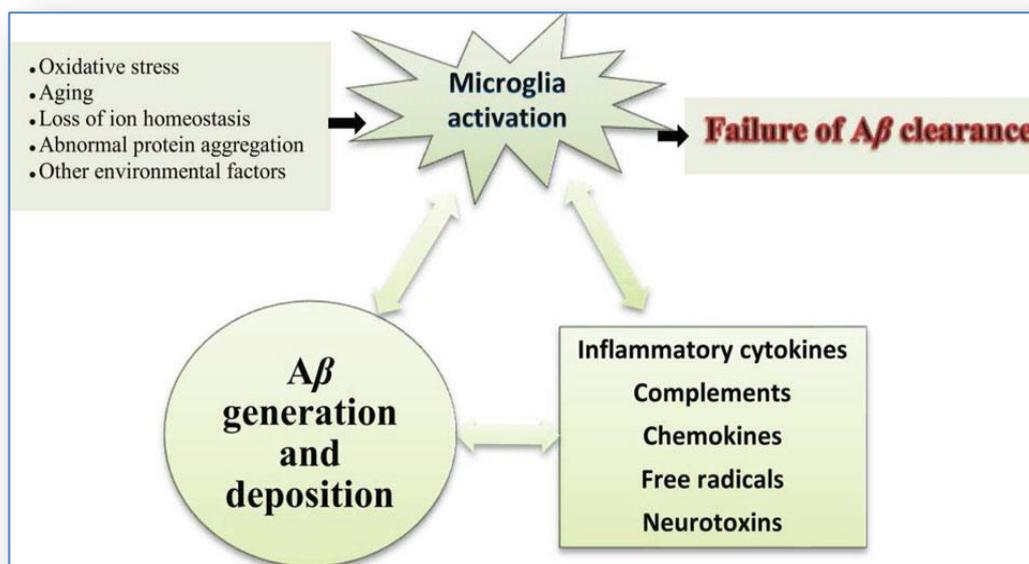


Fig.4. Interconnessione tra attivazione dei microglia, neuroinfiammazione e aggregazione A β .

Introduzione generale

Il meccanismo di eliminazione da parte delle cellule della microglia dei peptidi A β ₄₀ e A β ₄₂ è mediato dai recettori “scavenger” (SRs), che vengono classificati sulla base della loro struttura in: SRs A, B e C. È stato dimostrato in test *in vivo*, che un maggior livello di SR-A nella microglia può determinare un aumento della produzione di citochine proinfiammatorie e una diminuzione della clearance di peptidi A β .⁵ SR-A può far aderire le fibrille A β alla microglia, con conseguente secrezione di mediatori infiammatori, suggerendo che SR-A è un potenziale target terapeutico per l'AD. Uno studio recente ha anche evidenziato che CD36 (SRB-1), un recettore per A β nella microglia, fa aumentare lo stress ossidativo cerebrovascolare, la disfunzione neurovascolare e l'angiopatia amiloide. CD36, legandosi alle fibrille A β , media la risposta della microglia e dei macrofagi su A β . E' stato anche dimostrato che i recettori SR-C potrebbero essere coinvolti nel legame e nella clearance di A β da parte della microglia nell'AD.

Alcuni studiosi sostengono, inoltre, che la riduzione della *clearance* dei peptidi A β nei pazienti affetti da AD, derivi da una modificazione della permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE), dovuta all'attivazione del processo infiammatorio indotto dalle cellule della microglia, il quale sembrerebbe giocare un ruolo importante nell'alterazione delle funzionalità delle proteine di giunzione e di trasporto, delle cellule endoteliali della BEE e sulla densità vascolare.⁵

2.4 Stress ossidativo

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno messo in relazione il danno causato dallo stress ossidativo con il morbo di Alzheimer.¹

Lo stress ossidativo è dovuto ad uno squilibrio tra produzione ed eliminazione di radicali liberi in particolar modo di specie reattive dell'ossigeno, ROS (*Radical Oxygen Species*) come il perossido d'idrogeno, lo ione radicalico dell'ossigeno e l'anione superossido (Fig.6). L'incremento di ROS nell'organismo si manifesta con un aumento di proteine ossidate, prodotti finali della glicosilazione e della perossidazione lipidica, modificazioni su base ossidativa a carico del DNA nucleare e mitocondriale ed infine diminuzione dei livelli di citocromo C ossidasi. Questi eventi possono in ultimo scaturire in apoptosi o necrosi, quindi essere determinanti nella patogenesi dell'AD.

Introduzione generale

I ROS si formano, in condizioni fisiologiche, a livello mitocondriale durante il metabolismo aerobio, oppure possono generarsi da fattori esogeni come le radiazioni UV, inquinamento e reazioni infiammatorie.

Nell'organismo esistono dei sistemi ad azione antiossidante capaci di contrastare l'azione dei radicali dell'ossigeno, come le superossido dismutasi (SOD), le catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GSH) ed altre molecole ad attività non enzimatica come le vitamine (A, C, E).

Un'azione insufficiente da parte degli antiossidanti endogeni può essere determinante per la comparsa della malattia.

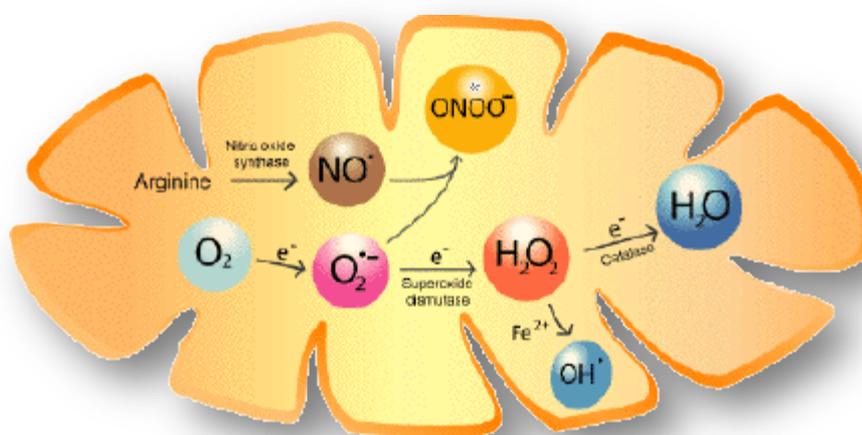


Fig.5 Le principali specie di ROS prodotte durante il metabolismo aerobio nel mitocondrio.

Lo stress ossidativo può contribuire alla formazione di placche amiloidi, può indurre processi di neuroinfiammazione e di disomeostasi dei metalli.

In particolare i peptidi $A\beta$ possono interferire con la normale funzione mitocondriale, così come una situazione di *eccitotossicità* neuronale dovuta ad un aumento della neurotrasmissione glutammica attraverso iperstimolazione dei recettori ionotropici del N-metil-D-aspartato (NMDA). Quest'ultimi sono responsabili di un aumento dell'afflusso intracellulare di ioni Ca^{2+} che si vanno, quindi, ad accumulare a livello dei mitocondri, determinando una riduzione della produzione di ATP ed un aumento di ROS, con conseguente apertura di grossi canali mitocondriali (mPTP). L'apertura di questi canali facilita il passaggio bidirezionale ed incontrollato di grosse molecole,

Introduzione generale

provocando, così, una situazione finale di *swelling* e rottura delle membrane mitocondriali, uno dei primi segnali che conducono ad apoptosi e quindi a morte neuronale.²

Inoltre, in relazione allo stress ossidativo, le cellule della microglia, che in condizioni normali producono NO, ad elevate concentrazioni ed in seguito a combinazione con il radicale superossido O^{2-} , inducono la formazione di perossinitrito (ONOO-), che è considerato un radicale ad alta tossicità cellulare.⁶

2.4.1 *Metalli di transizione*

Nel SNC dei pazienti affetti da Alzheimer, si verifica una disomeostasi di ioni metallici quali Fe, Cu e Zn, come viene confermato da esami spettroscopici che rilevano un'elevata concentrazione di questi metalli all'interno delle placche amiloidi. È evidente che un cambiamento in concentrazione di queste specie metalliche, normalmente implicati nelle reazioni redox cellulari, possa contribuire ad un incremento di ROS.

Lo ione Cu^{2+} viene rilasciato dai terminali post sinaptici, in seguito ad attivazione dei recettori NMDA del glutammato. Questo ione, nella forma Cu^+ , risulta essere un essenziale per l'attività di enzimi mitocondriali come il citocromo C e l'enzima superossido-dismutasi, per cui un'alterazione della sua concentrazione contribuisce in maniera significativa alla comparsa di disordini neuronali. Inoltre, lo ione Cu^{2+} , una volta ridotto dai peptidi $A\beta$, va a formare complessi con lo stesso peptide amiloidogenico ($A\beta-Cu$) e con la proteina APP ($APP-Cu$). Tali complessi contribuiscono all'aggregazione $A\beta$ e alla formazione di placche senili.²

Anche lo Zn^{2+} sembra essere coinvolto nella patogenesi dell'AD. Tale ione viene liberato dalle terminazioni presinaptiche in seguito a rilascio di glutammato e la sua concentrazione fisiologica risulta essenziale per il mantenimento delle funzioni neuronali GABAergiche e glutammiche. Lo zinco è in grado di interagire con la proteina APP, a livello del sito di legame dell'enzima α -secretasi, inibendo così la formazione di peptidi non amiloidogenici, di conseguenza risulta esserci maggior disponibilità del precursore all'azione delle β -secretasi incrementando la formazione di peptidi $A\beta_{(1-40)}$ e $A\beta_{(1-42)}$.^{1,7}

Introduzione generale

2.4.2 *Enzima MAO-B*

Negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta allo studio dell'enzima monoamino ossidasi di tipo B.. Questo enzima è fisiologicamente implicato nella deaminazione di neurotrasmettitori monoaminici noradrenergici (dopamina, noradrenalina) e serotoninergici, e poiché l'alterazione del sistema noradrenergico e serotoninergico risulta essere la principale causa della componente depressiva e psicotica associata alla patologia dell'Alzheimer, questo enzima è stato ampiamente studiato come possibile target per il trattamento dell'AD.⁸

L'attività catalitica di tale enzima è responsabile dell'incremento dei livelli di H₂O₂ ed altri radicali dell'ossigeno nella corteccia temporale, frontale e parietale di pazienti affetti da AD, nei quali, per l'appunto, l'attività delle MAO-B risulta essere notevolmente superiore rispetto a quella riscontrata in soggetti sani. Infatti inibitori selettivi delle MAO-B come la Rasagillina e la Selegillina hanno dimostrato di avere un effetto positivo sul ripristino delle attività cognitive e di apprendimento in modelli animali associati all'AD.⁸

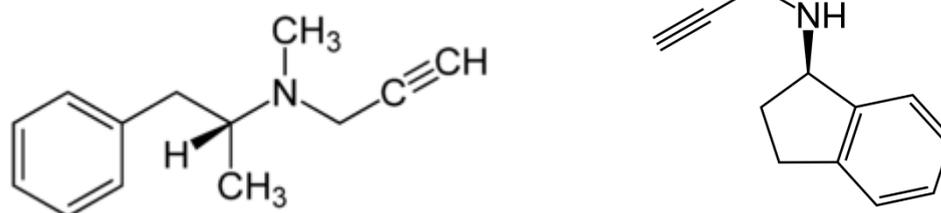


Fig.6 inibitori MAO-B: Rasagillina (a destra), Selegillina (a sinistra).

2.5 Sistema colinergico

Risulta ormai nota l'importante compromissione del sistema colinergico nei pazienti affetti da AD. La degenerazione dei neuroni implicati nella trasmissione colinergica presenti nella corteccia e nell'ippocampo, in concomitanza ad un decremento dei livelli di acetilcolina costituisce la causa principale della progressiva perdita delle capacità cognitive e mnemoniche associate all' Alzheimer.²

La riduzione dei livelli di acetilcolina sembrerebbero esser dovuti da un lato, ad una scarsa sintesi di neurotrasmettitore da parte dell'enzima colina O-acetiltrasferasi (ChAt),

Introduzione generale

il quale utilizza come substrati la colina e l'acetil-CoA, dall'altro, ad un aumento dell'azione degli enzimi catalitici acetilcolinesterasi (AChE) e butirrilcolinesterasi (BuChE), responsabili della degradazione dell'acetilcolina. L'AChE è maggiormente presente nel SNC, mentre la BuChE, in condizioni normali sembrerebbe essere presente soprattutto a livello plasmatico ed essere meno affine all'acetilcolina.

L'AChE si trova in prossimità delle membrane post-sinaptiche delle giunzioni colinergiche, è costituita da due importanti siti d'interazione: il sito catalitico, chiamato, CAS, formato da tre amminoacidi (Ser200, His440, Glu327) localizzati in una gola di 14 amminoacidi, ed un sito periferico *PAS* costituito da cinque residui amminoacidici (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279, Tyr334). (Fig.7)

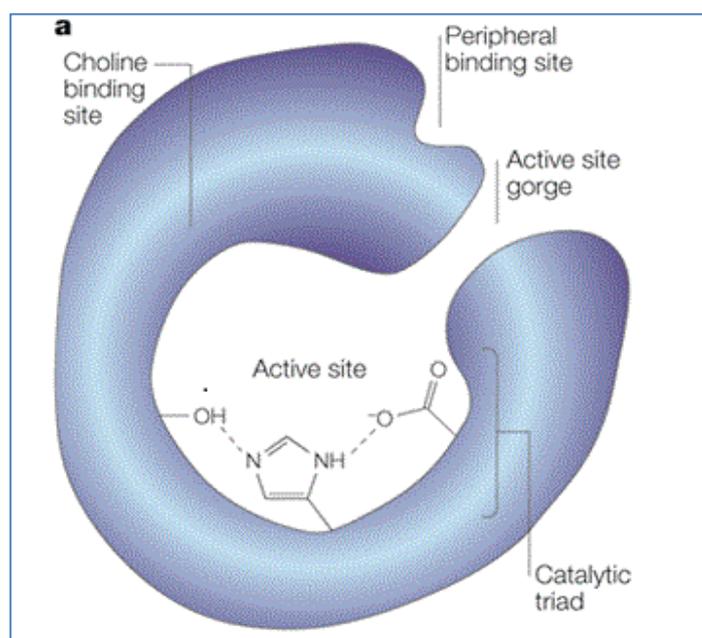


Fig.7 Siti d'interazione dell'enzima AChE: sito catalitico (CAS) e sito periferico (PAS).

La reazione d'idrolisi dell'acetilcolina avviene mediante interazioni specifiche con due siti dell'AChE: il *sito anionico* che forma un legame con l'ammonio quaternario dell'acetilcolina mediante interazione elettrostatica, e il *sito esterasico* che interagisce, tramite legame a idrogeno, con l'ossigeno carbonilico dell'acetile (fig.8). In seguito a tali interazioni quindi l'acetilcolina viene convertita in colina e acido acetico, e la colina viene, quindi, ripristinata a livello presinaptico per la sintesi di nuovo neurotrasmettitore.²¹

Introduzione generale

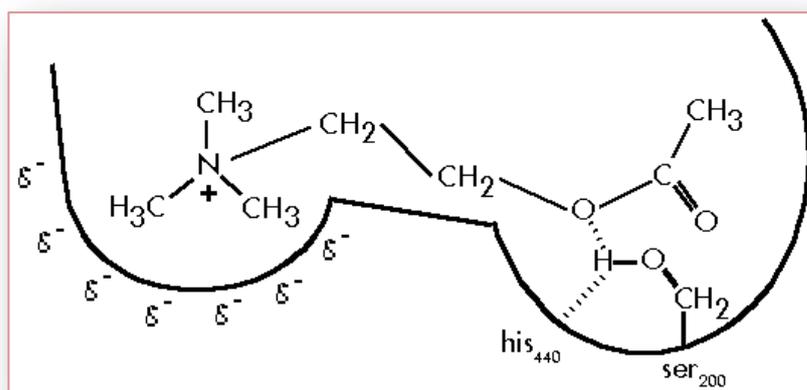


Fig.8 Siti di legame dell'enzima AChE responsabili dell'idrolisi dell'acetilcolina

L'enzima AChE, oltre ad essere responsabile del decremento dei livelli di acetilcolina, è anche, coinvolto nella formazione delle placche amiloidi. Negli ultimi anni è stato, infatti, dimostrato che l'AChE è implicata nell'aggregazione $A\beta$ attraverso un'interazione elettrostatica tra il sito PAS ed i residui cationici presenti sui peptidi $A\beta$; ciò porterebbe alla formazione di complessi AChE- $A\beta$ più tossici delle singole fibrille amiloidi, e quindi ad una "aggregazione $A\beta$ -AChE indotta" che contribuisce alla formazione delle placche senili.

Uno studio pionieristico che ha dato prova di ciò, ha riguardato la sintesi di derivati contenenti due porzioni capaci di interagire in modo ottimale con entrambi i siti (PAS e CAS) dell'AChE. L'ibrido molecolare contenente il nucleo aromatico del cromano, in grado di inibire il sito PAS ed un gruppo benzil-amminico capace di interagire con il sito CAS dell'enzima AChE, connessi tra di loro mediante uno spaziatore fenilico (Fig.9). Tale composto ha mostrato di inibire l'AChE ($IC_{50} = 44.5$ nM), ridurre del 35% l'aggregazione $A\beta$ -AChE indotta" alla concentrazione di 100 μ M.

Introduzione generale

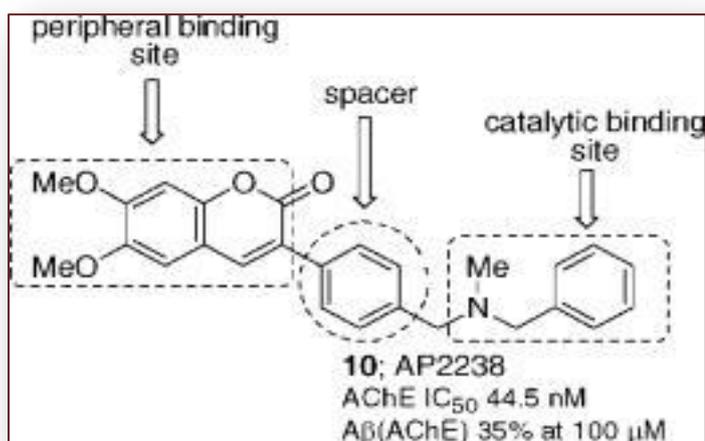


Fig.9 inibitore duale dei siti CAS e PAS dell'AChE

Questo risultato positivo ha aperto la strada verso la ricerca di nuovi inibitori delle colinesterasi capaci di interferire con il processo amiloidogenico, e quindi utili nella terapia dell'AD.¹

2.5.1 Enzima BuChE

La BuChE, è un enzima esterasico presente a livello plasmatico, epatico e in alcune regioni cerebrali dove viene primariamente secreto dalle cellule gliali, come l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia temporale.

Nonostante l'AChE e la BuChE siano codificati da due diversi geni a livello cromosomico, sono costituiti per il 65% della stessa sequenza amminoacidica. Tuttavia la BuChE possiede una certa affinità anche nei confronti di substrati diversi dell'acetilcolina, grazie alla presenza, nel sito catalitico, di due piccoli residui amminoacidici (valina e leucina), i quali lo rendono disponibile ad una attività idrolitica anche nei confronti di composti a più alto peso molecolare. È importante precisare come le due colinesterasi manifestino una cinetica enzimatica (Km) diversa: la BuChE presenta infatti un'attività catalitica efficiente anche ad alte concentrazioni di acetilcolina, mentre l'attività dell'AChE risulta ottimale solo a basse concentrazioni di neurotrasmettitore. Tale caratteristica conferisce alla BuChE un ruolo di supporto all'azione dell'AChE, in condizioni di eccesso di acetilcolina nei terminali neuronali, in maniera tale da mantenere in equilibrio le funzionalità colinergiche cerebrali.

Introduzione generale

Diversi studi biochimici, negli ultimi anni, hanno evidenziato un ruolo determinante dell'enzima BuChE nella patogenesi dell'AD. Nei pazienti affetti da AD si assiste, infatti, ad un decremento dei livelli di AChE del 30-35% e al contempo ad un aumento dell'attività della BuChE in alcune aree cerebrali, come l'ippocampo e la corteccia temporale del 40-90%, con accumulo in concentrazione rilevanti dello stesso enzima all'interno o in prossimità delle placche amiloidi¹⁰. Quest'ultimo evento mette in luce il contributo della BuChE ad un incremento della neurotossicità e ad un'accelerazione della formazione di aggregati A β nei primi stadi della malattia, anche se i meccanismi rimangono ancora poco conosciuti. Al fine di chiarire il ruolo svolto dalla BuChE nell'AD, sono stati condotti degli studi genetici che hanno indicato una sovra-espressione di un gene denominato "wild-type" della BuChE, in circa due terzi dei pazienti affetti da AD analizzati, di cui in prevalenza uomini. Questo gene è responsabile della formazione di una BuChE con attività idrolitica più elevata nei confronti del neurotrasmettitore rispetto alle condizioni fisiologiche, e di conseguenza la BuChE può essere implicata nel rapido declino cognitivo. La prevalenza dell'attività dell'enzima BuChE in tali individui, ha sottolineato l'importanza dell'utilizzo in terapia di inibitori colinesterasici aventi un meccanismo duale nei confronti dell' AChE e BuChE.³

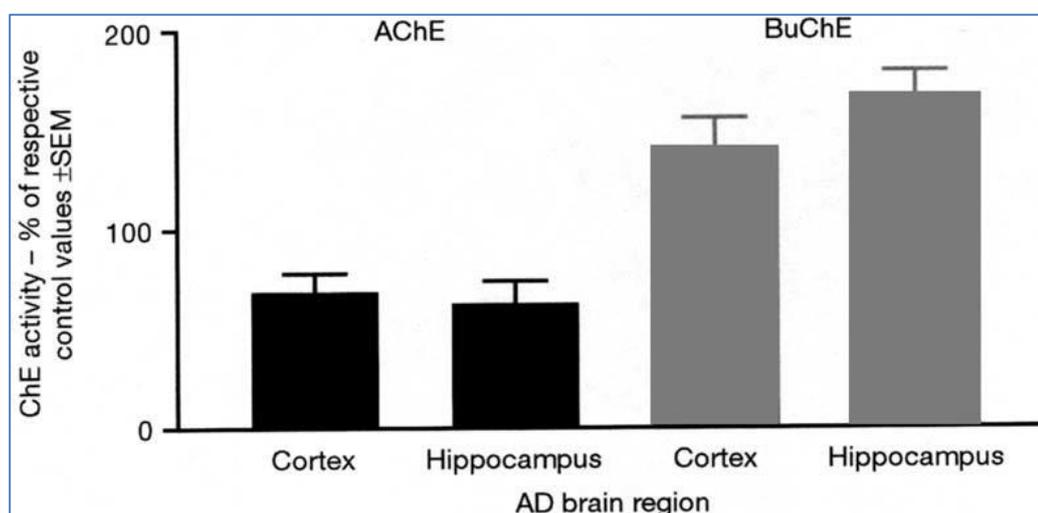


Fig.10 Confronto dell'attività delle colinesterasi nella corteccia e nell'ippocampo di un paziente affetto da AD, con un visibile incremento della BuChE.

3. NUOVE FRONTIERE TERAPEUTICHE

L'eziologia multifattoriale dell'Alzheimer ha indirizzato, ormai da anni, la ricerca verso lo studio di farmaci multifunzionali, MTDLs (*“Multi Target Directed Ligands”*). Questo tipo di molecole possono essere ottenuti attraverso la combinazione di due o più porzioni farmacoforiche diverse, in grado di interagire su target differenti, in un'unica molecola (farmaco multi-target). I farmaci multitarget presentano una potenza farmacologica superiore rispetto alle singole porzioni molecolari, in quanto in grado di agire in maniera sinergica su diversi aspetti della malattia, per produrre risposte farmacologiche specifiche che nel loro insieme dovrebbero rallentare o bloccare il processo neurodegenerativo in maniera più efficiente.

Questo tipo di approccio è utile in patologie complesse e multifattoriali come l'AD, dove fino ad oggi sono stati riscontrati degli insuccessi con strategie di tipo MMT (*multiple medication therapy*), in cui è prevista l'associazione di più farmaci, con diverso meccanismo d'azione e diversi parametri farmacocinetici, che rendono complessa la *compliance* del paziente ed aumentano la possibilità di effetti avversi. In confronto a questo tipo di terapia l'approccio multi target prevede una miglior biodisponibilità dei composti ed un minor numero d'interazioni “sostanza-sostanza”.^{1,2}

3.1 Inibitori dell'AChE e BuChE: dalla terapia tradizionale ai MTDLs

Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChEI), tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina, insieme alla memantina, che è un antagonista non competitivo del recettore NMDA, sono gli unici farmaci usati fin ad oggi nella terapia dell'AD. Essi risultano utili nell'attenuare la sintomatologia associata all'AD, ristabilendo i livelli di acetilcolina nelle terminazioni sinaptiche e apportando un miglioramento nelle capacità cognitive e relazionali associati al deficit colinergico. Uno dei principali approcci nella strategia MTDLs è stato quello di modificare la struttura degli AChEI noti, in modo tale da amplificarne le proprietà biologiche e farmacologiche, rendendole quindi in grado di intervenire nel progresso della malattia, e di andare oltre la loro efficacia sintomatica.

Introduzione generale

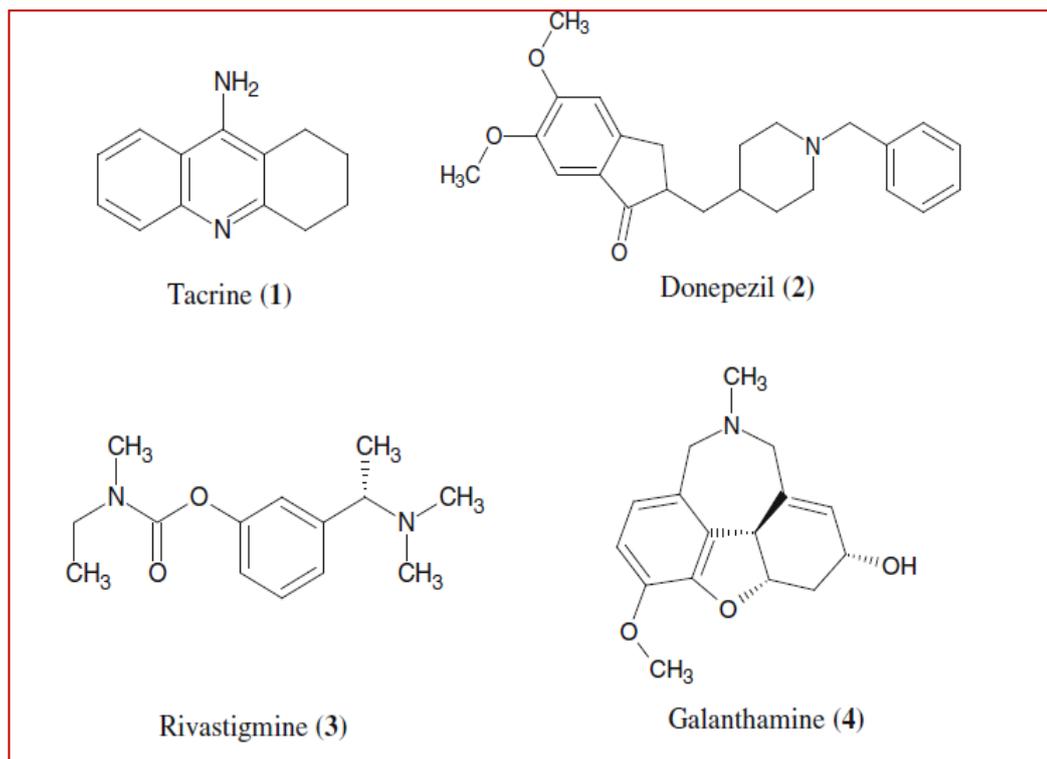


Fig.11 AChEI in commercio per la terapia dell'AD.

La tacrina è stato il primo AChEI approvato dal FDA (1993) per il trattamento dell'AD con una valida attività nei confronti sia dell'AChE che della BuChE, tuttavia il suo uso in terapia fu ben presto limitato a causa della riscontrata epatotossicità. Nonostante ciò, la tacrina è stata ampiamente utilizzata nella progettazione di composti multitarget, al fine di sfruttare il meccanismo duale nei confronti delle BuChE e AChE e di minimizzare la sua tossicità. Uno dei *lead compound* utilizzato per lo sviluppo di MTDLs è stata la bis-tacrina, l'omodimero della tacrina. (fig.12) Tale composto ha mostrato una potenza 1000 volte superiore rispetto alla tacrina nell'inibire l'AChE ed una notevole attività inibitoria nei confronti dell'aggregazione A β -AChE indotta (IC₅₀ di 41.7 μ M). La cistamina-tacrina, ottenuta dalla sostituzione del ponte eptametileno della bis tacrina con quello della cistamina, è risultata avere una migliore capacità inibitoria dell'AChE e della BuChE (senza però alcuna attività selettiva). In aggiunta questo composto ha presentato un'ottima attività antiossidante, in particolare nei confronti di H₂O₂, ed capacità inibitorie della aggregazione A β (IC₅₀ = 24.2 μ M).²

Introduzione generale

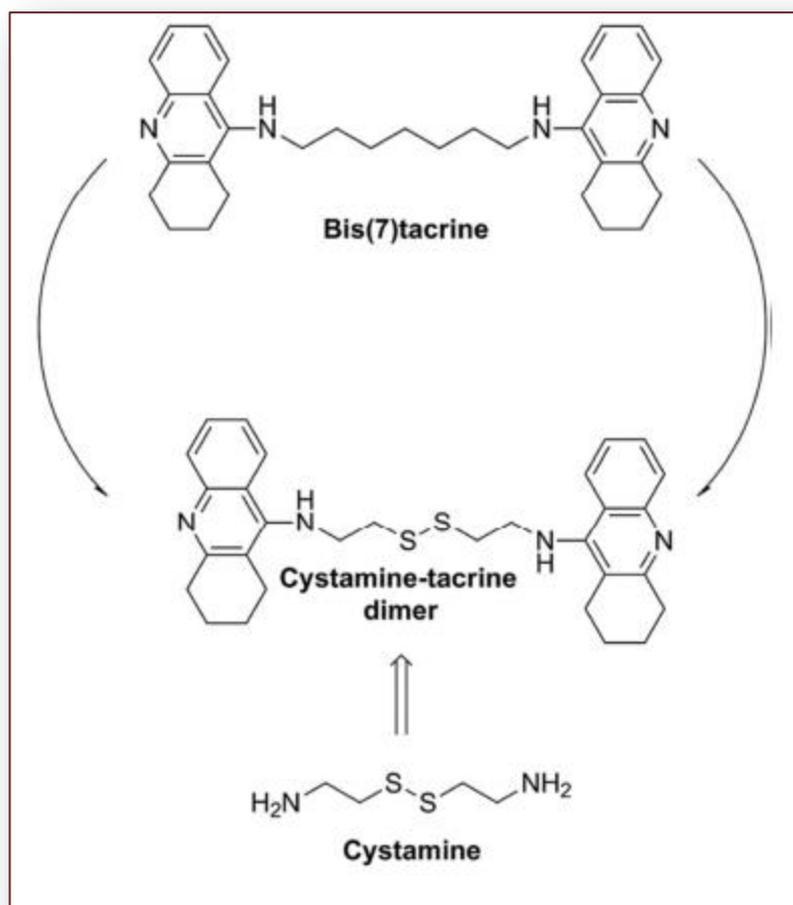


Fig.12 dimero della bis-tacrina e cistamina-tacrina

3.2 Ibridi di inibitori colinesterasici e antiossidanti

Lo stress ossidativo appare uno dei fattori determinanti nella patogenesi dell'AD. Tuttavia gli studi *in vivo* di composti antiossidanti adoperati singolarmente nella terapia dell'AD non hanno dato risultati soddisfacenti. Da ciò è scaturita la possibilità di coniugare l'attività antiossidante con quella colinesterasica con lo scopo di trarre maggiori vantaggi terapeutici nei confronti della neurodegenerazione, contrastando l'azione dei ROS e al contempo incrementando i livelli di acetilcolina. Molti lavori hanno riguardato la Tacrina la cui epatotossicità è dovuta probabilmente ad un incremento di ROS ed al conseguente stress ossidativo indotto sugli epatociti. Quindi aggiungere la molecola della Tacrina con porzioni antiossidanti potrebbe essere vantaggioso nel minimizzare questo effetto indesiderato.

Introduzione generale

Uno studio a riguardo ha previsto la combinazione della tacrina con un composto antiossidante come l'acido lipoico (LA), mediante uno spaziatore aminopropilico, ottenendo così la lipocrina. Studi sperimentali hanno dimostrato che tale molecola multifunzionale è in grado di legare entrambi i siti dell'AChE, (CAS e PAS) con un IC_{50} nell'ordine del nanomolare, agendo come uno dei più potenti AChEI attualmente noti. La lipocrina è anche in grado di ridurre l'aggregazione $A\beta$ AChE-indotta con un IC_{50} nell'ordine del micromolare. Inoltre presenta un'attività citoprotettiva nei confronti della formazione di ROS grazie alla presenza dell'acido lipoico.¹

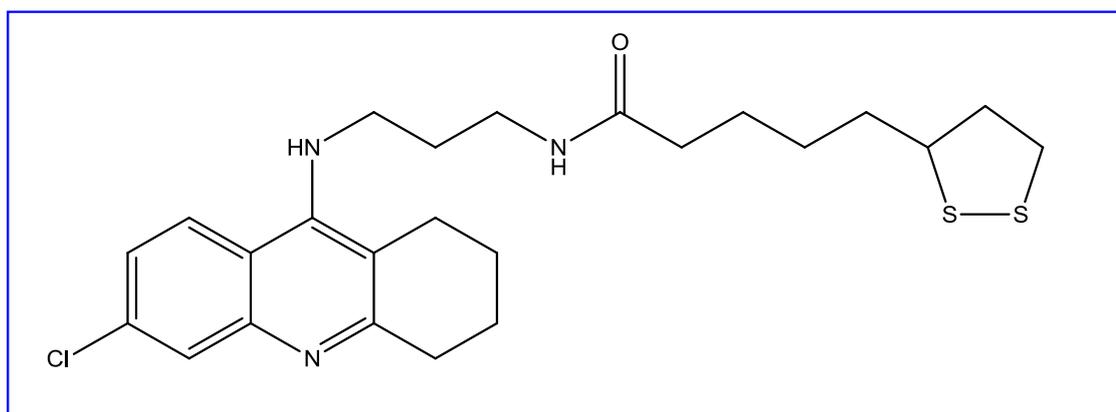


Fig.13 Ibrido tacrina-acido lipoico

Dei risultati interessanti sono stati ottenuti anche dallo sviluppo di ibridi della tacrina con l'acido ferulico, un acido fenolico naturale ad attività antiossidante, coniugati mediante un linker alchilendiamminico, il quale risulterebbe efficace nella riduzione della tossicità epatica della tacrina. La serie di composti ottenuta ha dimostrato un'attività inibitoria nei confronti della AChE (IC_{50} dai 4.4 ai 38.6 nM) migliore della tacrina, ed un'inibizione della BuChE (IC_{50} da 5.9 ai 34.1 nM). Studi di cinetica enzimatica hanno inoltre messo in luce l'affinità di questi ibridi nei confronti del sito PAS che li renderebbe quindi capaci d'intervenire nel processo di $A\beta$ -aggregazione indotta da AChE. L'attività antiossidante rilevata mediante un saggio ORAC (oxygen radical absorbance capacity) nei confronti dei ROS ha dimostrato valori Trolox equivalenti compresi tra 1.3 e 2.0 ± 0.04 , del tutto paragonabili a quelli riportati per l'acido ferulico stesso. (fig.14)

Introduzione generale

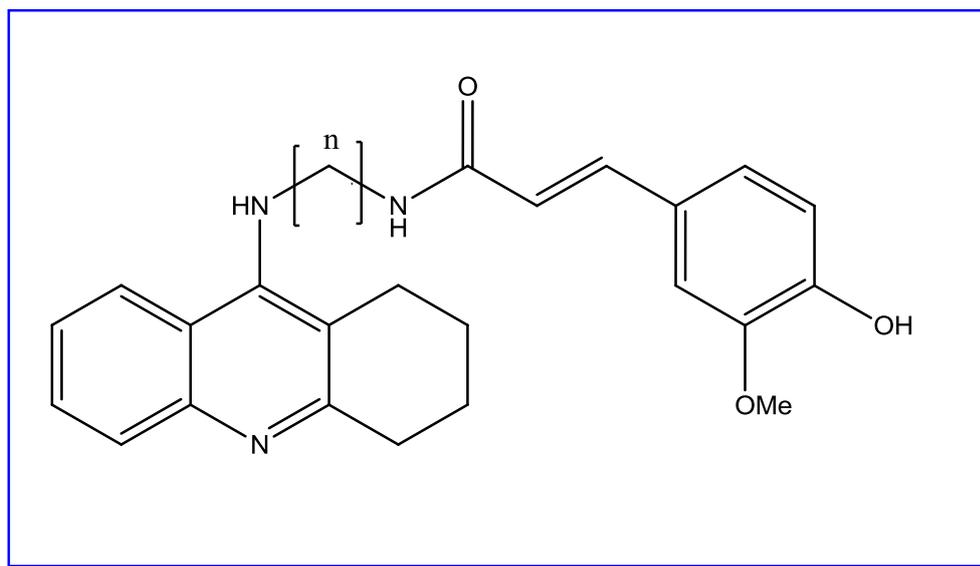


Fig.14 Serie di ibridi della tacrina e l'acido ferulico

Sono stati, anche, sintetizzati ibridi della tacrina con l'acido caffeico (CA) l'analogo demetilato dell'acido ferulico, anch'esso presente in natura, che vanta di un molteplici profilo farmacologico tra cui azione antiossidante, antinfiammatoria ed antitumorale.

I derivati ottenuti **5a-f** (fig.15) hanno riportato un'attività di inibizione degli enzimi AChE e BuChE comparabile o poco superiore a quella degli ibridi tacrina acido ferulico (TA₃FA). Tale attività sembrerebbe correlata al numero di atomi di carbonio del linker. Inoltre tali composti hanno mostrato anche un'interessante attività antiossidante paragonabile a quella dell'acido caffeico stesso, ed una buona attività chelante. (tabella)

Compounds	IC ₅₀ ± SEM ^a (μM)		Ratio of BuChE/AChE IC ₅₀	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ ^f ± SEM ^a , μM)
	AChE ^b	BuChE ^c		
5a	1.8 ± 0.1	2.3 ± 0.4	1.3	14.1 ± 0.4
5b	8.8 ^d ± 0.9	83.7 ^d ± 1.4	9.6	11.1 ± 0.6
5c	1.9 ± 0.8	3.9 ± 0.9	2.1	10.4 ± 0.4
5d	1.0 ± 0.1	5.5 ± 0.4	5.5	9.7 ± 0.6
5e	0.3 ± 0.1	29.5 ± 0.5	93.8	4.8 ± 0.9
5f	6.3 ± 0.4	3.8 ± 0.2	0.6	4.7 ± 0.6
TA ₃ FA	0.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	28.6	37.6 ± 0.9
Tacrine	0.9 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1	>1000
Caffeic acid	N/A ^e	N/A ^e	N/A ^e	5.7 ± 0.4

Tabella : valori di IC₅₀ dei composti **5a-f**, dell'acido caffeico, della tacrina e della serie TA₃FA relativi all'inibizione dell' AChE e della BuChE e all'attività di scavenging.

Introduzione generale

È risultato interessante, osservare come nel derivato **5e** la sostituzione in posizione 6 dell'anello aromatico della tacrina con un atomo di cloro possa aver incrementato la sua selettività verso l'AChE ($IC_{50} = 0.3 \pm 0.1 \mu M$) rispetto alla BuChE ($IC_{50} = 29.5 \pm 0.5 \mu M$) ed migliorare l'interazione con entrambi i siti PAS e CAS dell'AChE. Tale derivato cloro-sostituito, inoltre, ha dimostrato effetti neuroprotettivi, attività antiossidante e chelante per il catione Cu^{2+} .^{1,17}

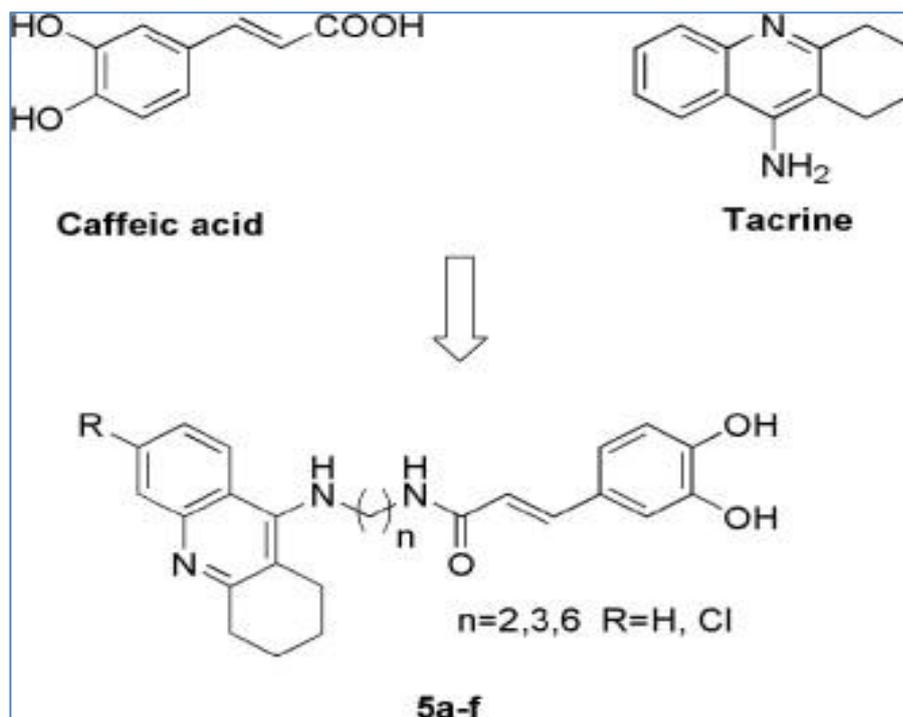


Fig.15 Ibrido multifunzionali tacrina - acido caffeico

3.3 Ibridi di inibitori colinesterasici e inibitori delle MAO

L'enzima MAO può rappresentare un target utile nella progettazione di nuovi MTDLs, poiché come già accennato, l'attività catalitica di deaminazione di tale enzima determina una notevole produzione di H_2O_2 in alcune aree cerebrali contribuendo all'insorgenza dello stress ossidativo neuronale. Inoltre i composti multifattoriali AChE/MAO potrebbero essere in grado di prevenire lo squilibrio del sistema noradrenergico e serotoninergico, e conseguentemente limitare la componente depressiva che può manifestarsi in pazienti affetti da Alzheimer.

Una interessante serie di ibridi con azione inibitoria sinergica sia sulle AChE che sulle MAO, è stata ottenuta per introduzione nella struttura di inibitori *reversibili* delle MAO-

Introduzione generale

È già in uso terapeutico (la selegilina o la rasagilina), della porzione farmacoforica carbammica della rivastigmina. Questa serie di composti (in figura 16); ha mostrato un'azione inibitoria bilanciata nei confronti dell'AChE e delle MAO.^{1,2}

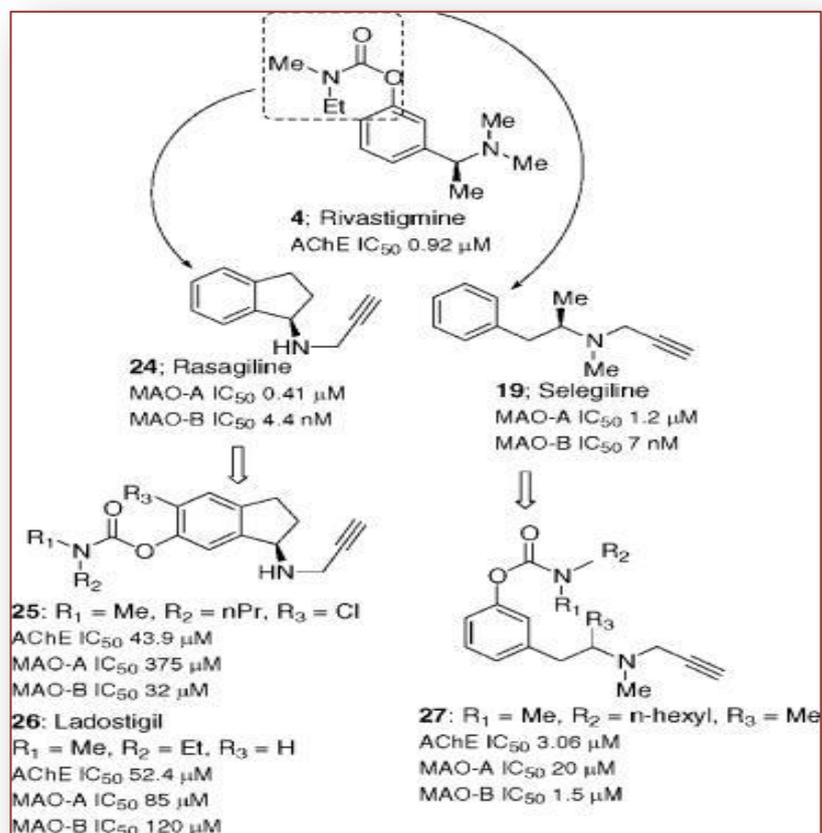


Fig.16 inibitori AChE/MAO

In un altro lavoro è stata progettata la sintesi di ibridi ottenuti dalla coniugazione della tacrina con omoisoflavonoidi, noti per l'attività MAO-B inibitoria. In particolare il composto **33** (in figura 17), con un gruppo metossi in posizione para dell'anello fenilico ed un linker a sei atomi di carbonio, ha mostrato una buona azione inibitoria nei confronti dell'AChE della BuChE (IC₅₀ = 67.9 nM e 33.0 nM, rispettivamente) e nei confronti delle MAO-B (IC₅₀ = 0.401 μM).¹⁴

Introduzione generale

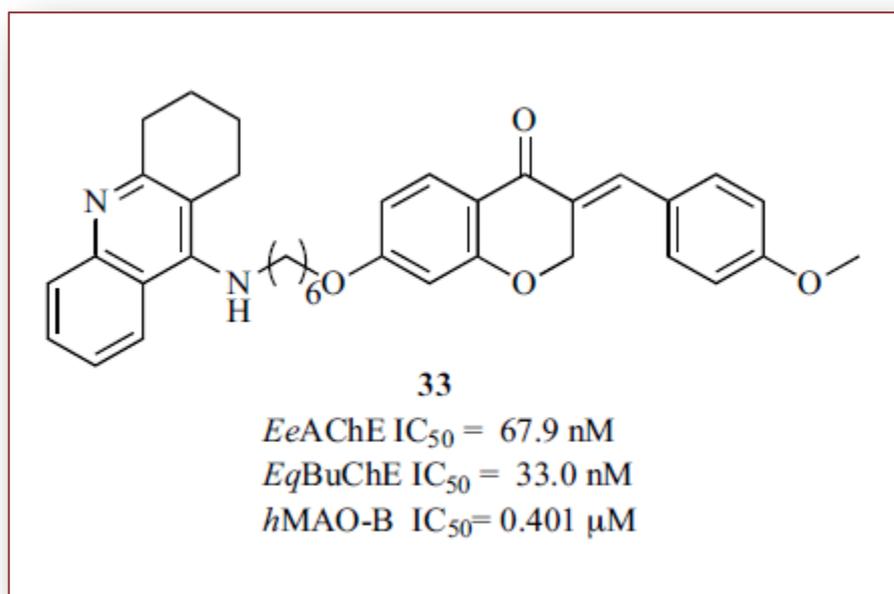


Fig. 17 Ibrido tacrina-omoisoflanoide con i rispettivi valori di IC₅₀ su AChE, BuChE e MAO-B

3.4 Ibridi di inibitori colinesterasici e chelanti dei metalli

La disomeostasi dei metalli contribuisce in maniera determinante al progresso della patologia, tuttavia l'utilizzo di composti ad esclusiva azione chelante non ha avuto successo nella terapia dell'AD poichè tali farmaci interagivano, anche, con biometalli essenziali per le normali funzioni fisiologiche dell'organismo, causando effetti collaterali e citotossicità. Quindi recentemente sono stati riportati in letteratura vari esempi in cui la porzione chelante è stata integrata in molecole multitarget in modo tale da minimizzarne gli effetti negativi ed amplificarne l'azione farmacologica. A tale scopo sono stati studiati composti *pro-chelanti*, ossia derivati in grado di esplicare la loro azione chelante *in vivo* solo in presenza di elevati livelli di ROS.

Un ibrido ad attività chelante interessante è il composto ottenuto coniugando la tacrina al nucleo cumarinico mediante uno spaziatore di tipo piperazinico. (fig.18)

Introduzione generale

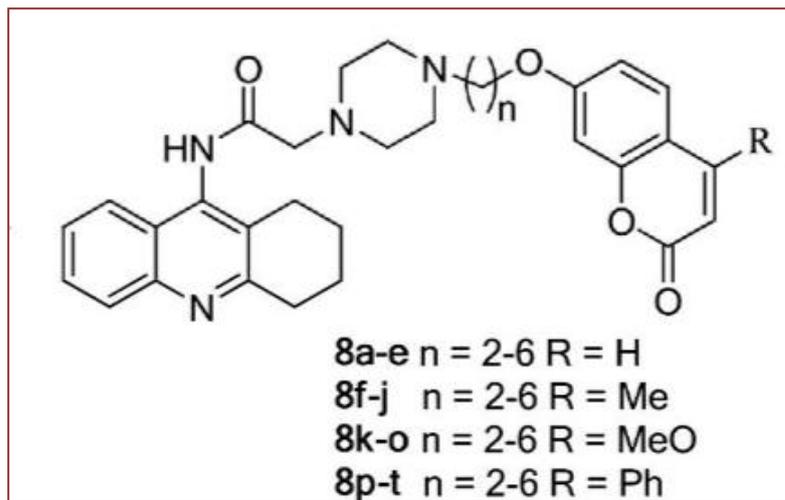


Fig.18 Ibrido tacrina-cumarina

In particolare il composto **8f** (fig.18) è risultato il più attivo della serie mostrando una IC_{50} nei confronti dell'AChE di 0.092 μ M. Tale derivato è in grado di interagire con il sito CAS dell'AChE grazie alla presenza della tacrina e con il sito PAS grazie al nucleo cumarinico, inoltre è stata rilevata un'importante azione chelante nei confronti di Fe^{2+} e Cu^{2+} .¹³

3.5 Ibridi di inibitori delle colinesterasi e inibitori di BACE-1

L'enzima β -secretasi (BACE-1) è responsabile della generazione di peptidi $A\beta$ amiloidogenici, ed essendo la sua azione un punto focale per il *pathway* amiloidogenico, è divenuto negli anni uno dei bersagli più ambiti nella terapia dell'AD. Da qui l'interesse per la sintesi di composti multitarget che incorporano una porzione farmacoforica in grado di inibire l'enzima BACE-1. Una delle classi di composti più interessanti per l'inibizione dell'enzima BACE-1 è rappresentata dalle cumarine, che possono essere di origine sia sintetica che naturale e che presentano numerose proprietà tra cui quella anticoagulante, antimicrobica e antiossidante. (fig.19)

Introduzione generale

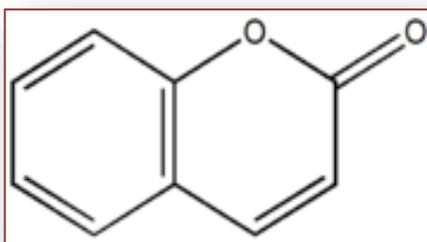


Fig.19 Nucleo Cumarinico

In un interessante studio è stata sintetizzata una serie di ibridi multifunzionali a partire dal nucleo cumarinico di AP2243 (**65**), un composto che si è mostrato capace di interagire con entrambi i siti PAS e CAS e di inibire l'AChE con $IC_{50} = 18.3 \text{ nM}$. (fig.20). La sostituzione del gruppo metossi delle posizioni 6 e 7 del nucleo cumarinico del composto di partenza (**65**) con gruppi alofenilalchilammidici ha permesso di estendere l'attività anche verso l'enzima BACE-1, infatti i derivati **68** e **69** hanno mostrato un'attività simultanea nei confronti dell'AChE ($IC_{50} = 0.551 \mu\text{M}$ e $0.181 \mu\text{M}$ rispettivamente) e dell'enzima BACE-1 ($IC_{50} = 0.149 \mu\text{M}$ e $0.150 \mu\text{M}$ rispettivamente).^{2,18}

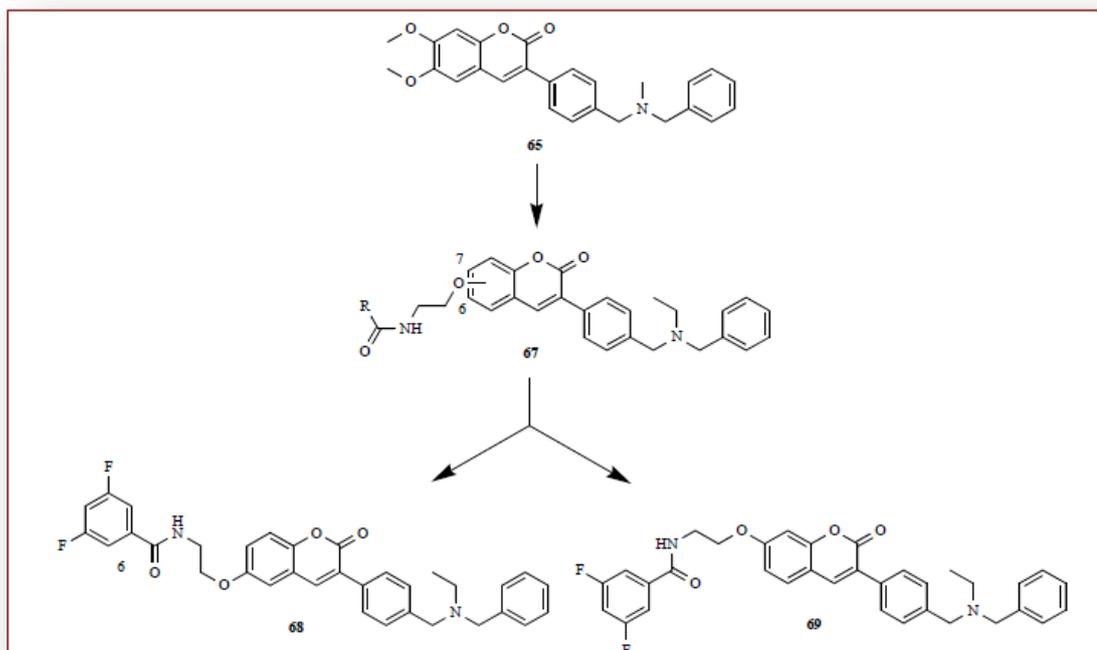


Fig.20 Ibridi molecolari **65-69** inibitori dell'enzima AChE e enzima BACE-1.

INTRODUZIONE
ALLA PARTE
SPERIMENTALE

Introduzione alla parte sperimentale

Lo stress ossidativo è un fenomeno derivante dalla condizione di squilibrio fra processi ossidativi e riduttivi che avvengono continuamente in ogni cellula durante le trasformazioni biochimiche implicate nel metabolismo fisiologico.

Svolge un ruolo patogenetico rilevante sia nell'invecchiamento precoce che in alcune gravi forme patologiche di tipo infiammatorio e/o degenerativo, quali aterosclerosi, neoplasie e malattie neurodegenerative.

In condizioni fisiologiche, nell'organismo vengono generati radicali liberi e altre specie reattive dell'ossigeno che sono prodotti principalmente nei mitocondri e possono essere classificati in ROS (*“Radical Oxygen Species”*), a cui appartengono il radicale superossido (O_2^-), il radicale ossidrilico (OH^\cdot) e il perossido di idrogeno (H_2O_2), e gli RNS (*“Radical Nitrogen Species”*), tra cui l'ossido nitrico (NO^\cdot) e il perossinitrito (ONOO^\cdot).⁶

Il complesso sistema antiossidante che l'organismo umano ha sviluppato per proteggere le cellule dai ROS e RNS coinvolge fattori endogeni ed esogeni che funzionano sinergicamente per neutralizzare tali specie reattive. Tra i componenti endogeni si ritrovano alcuni enzimi in grado di catalizzare reazioni di inattivazione di radicali liberi, quali la superossido dismutasi (SOD), glutazione perossidasi (Gpx), catalasi ed alcune proteine che svolgono un'azione chelante nei confronti di alcuni ioni essenziali quali Fe^{2+} e Cu^+ che sono coinvolti nelle reazioni di ossido-riduzione.

Tra gli antiossidanti esogeni si ritrovano numerose sostanze a struttura eterogenea presenti in molti alimenti dieta, integratori alimentari e tra i quali vitamina C e vitamina E flavonoidi.⁶

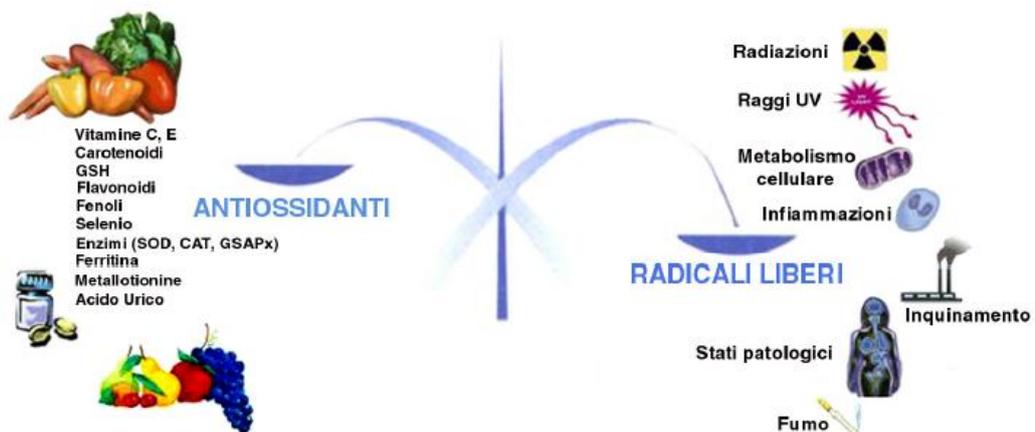


Fig. 22 Rappresentazione grafica dei principali fattori coinvolti nello Stress Ossidativo.

Introduzione alla parte sperimentale

In condizioni patologiche i ROS possono danneggiare le membrane o alcuni componenti cellulari attraverso una serie di reazioni di perossidazione dirette (i.e perossidazione lipidica). E' inoltre noto che i ROS sono coinvolti in reazioni di nitratura, carbonilazione e nitrosilazione di metalli, e di alcune proteine o acidi nucleici. Tale reazione porta alla formazione di intermedi reattivi coinvolti nell'alterazione dei componenti cellulari).

Il sistema nervoso centrale è particolarmente vulnerabile nei confronti dei processi ossidativi a causa delle elevate quantità di ossigeno richieste dal metabolismo neuronale e dell'elevato contenuto di acidi grassi insaturi, facilmente aggredibili dalla perossidazione. La vulnerabilità del SNC allo stress ossidativo è inoltre condizionata dalla presenza, in alcune regioni dell'encefalo, di depositi significativi di ioni metallici come il ferro o il rame che prendono parte a processi ossido-riduttivi.

E' quindi evidente come l'accumulo nell'encefalo di aggregati proteici che avviene in alcune forme patologiche neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer, contribuisca in maniera significativa al danno ossidativo. Recentemente è stato infatti riportato che le forme oligomeriche di β -amiloide hanno la capacità di stimolare la produzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) con conseguente promozione della perossidazione lipidica.

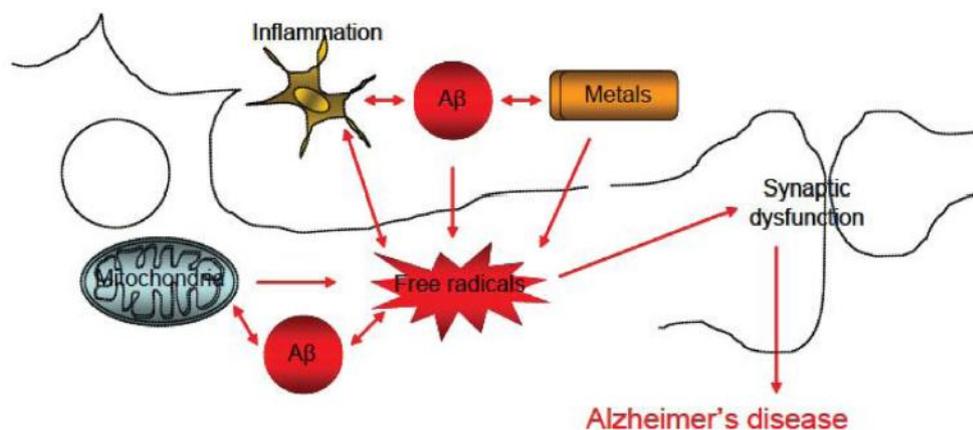


Fig. 23 Schema della generazione e del ruolo dei radicali liberi in AD

I peptidi A β , così come un'alterata funzionalità mitocondriale e l'aumento della concentrazione di ioni metallici quali ferro e rame a livello centrale, rappresentano quindi delle potenziali fonti di stress ossidativo nell'AD.

Sebbene ancora oggi non sia possibile precisare se lo stress ossidativo sia una causa o un effetto dell'AD, è comunque evidente che l'esistenza di una stretta correlazione tra il

Introduzione alla parte sperimentale

danno ossidativo e la patogenesi dell' AD rende l'uso degli antiossidanti un'opzione terapeutica attraente.

Partendo da queste evidenze, una grande varietà di antiossidanti sono stati esaminati come potenziali neuroprotettori. Studi in vitro e su modelli animali hanno mostrato risultati promettenti anche se l'efficacia negli studi clinici non è ancora stata confermata. Molto probabilmente ciò è attribuibile ad una scarsa biodisponibilità e una bassa permeabilità attraverso la barriera emato-encefalica della maggior parte degli antiossidanti studiati.

Con l'intento di superare gli attuali limiti farmacocinetici degli antiossidanti studiati per il trattamento del morbo di Alzheimer, negli ultimi anni la ricerca si è indirizzata allo sviluppo di molecole multifunzionali ottenute dalla combinazione di molecole note già impiegate per il trattamento dell'AD con porzioni molecolari dotate di proprietà antiossidanti.

La classe di farmaci più studiati, utilizzati per la sintesi di molecole multitarget è rappresentata dagli inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE), un target che rimane cruciale per la terapia AD. Tra gli inibitori noti si ritrovano il donepezil, rivastigmina, galantamina che risultano comunque efficaci nell'attenuare la sintomatologia legata alla disfunzione colinergica (fig.24) ²

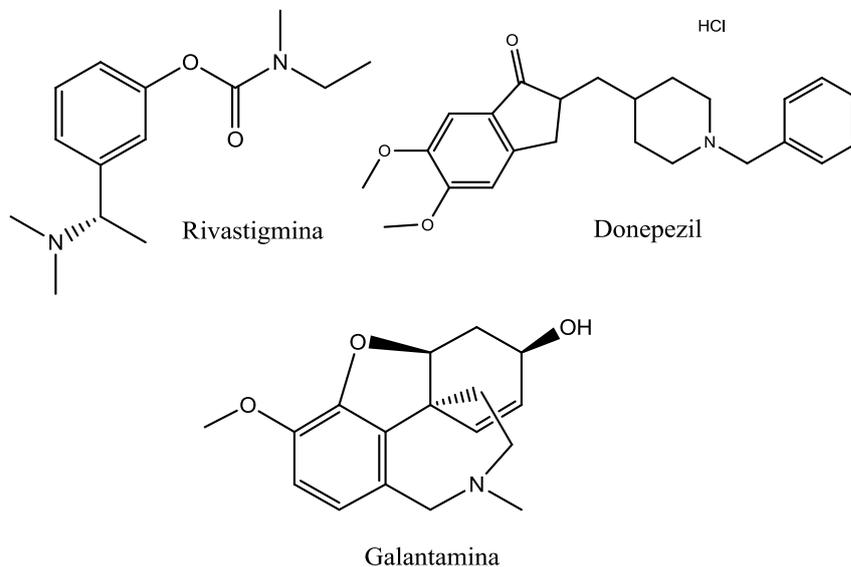


Fig.24 Composti adoperati attualmente per il trattamento dell'Alzheimer: Inibitori dell'AChE.

Introduzione alla parte sperimentale

Numerosi esempi riportati in letteratura indicano che la combinazione di tali farmaci con specie ad attività antiossidante rappresenta un approccio farmaceutico innovativo in grado di migliorare non solo le proprietà farmacocinetiche ma anche farmacodinamiche del farmaco nativo.

Un esempio è rappresentato dall'ibrido tacrina-cistamina riportata in figura.

La cistamina è un composto con proprietà antiossidanti, cito e neuro-protettive, poiché è in grado di ridurre la tossicità legata a differenti tipi di tossine. La tacrina è un inibitore di AChE. L'ibrido tacrina - cistamina ha mostrato un'attività inibitoria 1000 volte maggiore rispetto a quello del farmaco nativo e un profilo farmacologico altrettanto migliore. Questa aumentata potenza è dovuta alla capacità del dimero di interagire simultaneamente con il sito catalitico (CAS) e periferico (PAS) dell'AChE. Tale interazione è responsabile della riduzione della formazione AChE - indotta di aggregati A β . Inoltre tale molecola ha mostrato capacità neuroprotettive dovute sia all'inibizione di enzimi coinvolti nella sintesi di proteina beta amiloide (come il BACE) sia all'antagonismo nei confronti di recettori glutamatergici (NMDA). L'attività neuroprotettiva è inoltre incrementata dalle proprietà antiossidanti della cistamina. Studi su linee cellulari di neuroblastoma, hanno infatti dimostrato che il dimero cistamina-tacrina, a concentrazioni nell'ordine del sub-micromolare, induce una completa protezione dal danno ossidativo indotto da H₂O₂ e riduce significativamente la produzione di ROS, incrementando, così, la vitalità cellulare.²

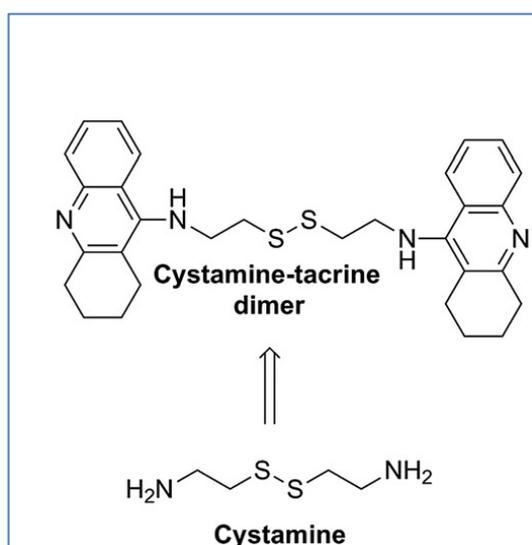
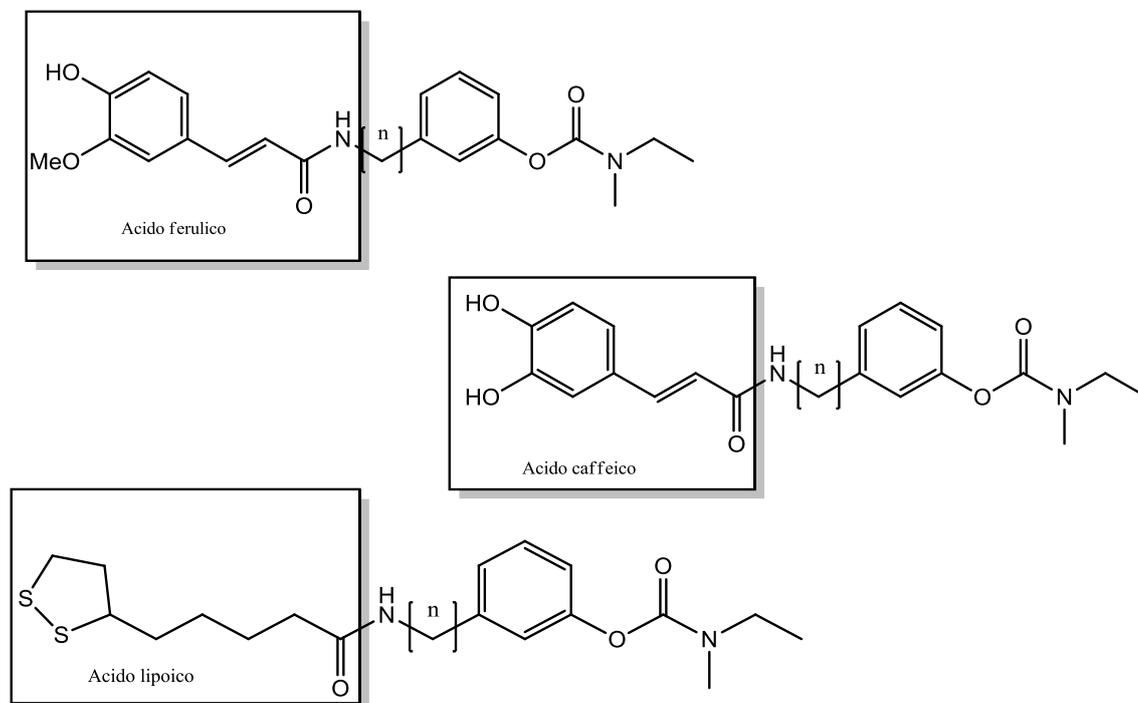


Fig.25 struttura chimica del dimero cistamina-tacrina e della cistamina

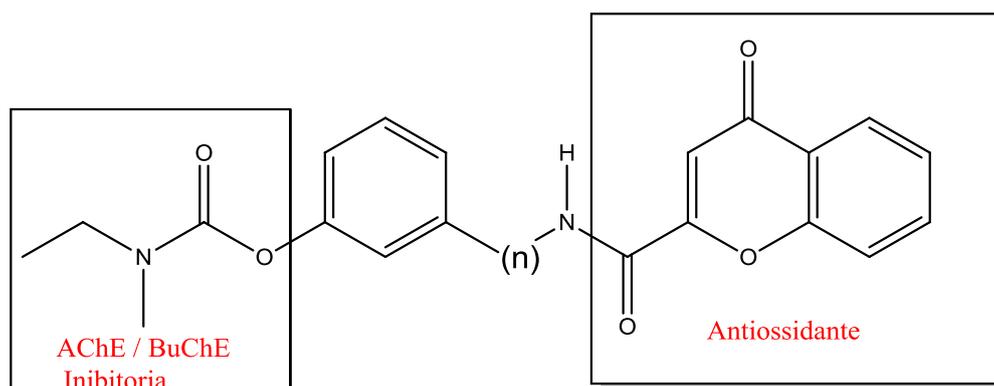
Tenendo quindi in considerazione il fatto che la combinazione di antiossidanti con inibitori di AChE potrebbe migliorare il profilo farmacologico dei farmaci attualmente

Introduzione alla parte sperimentale

disponibili per la terapia dell'AD, da qualche anno, il laboratorio in cui ho svolto questa tesi di laurea si occupa della progettazione e sintesi di derivati multitarget potenzialmente utili per il trattamento del morbo di alzheimer. In particolare, alcune molecole recentemente sintetizzate sono state ottenute dalla combinazione della porzione farmacoforica carbammica della rivastigmina con molecole ad attività antiossidante come l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido lipoico.



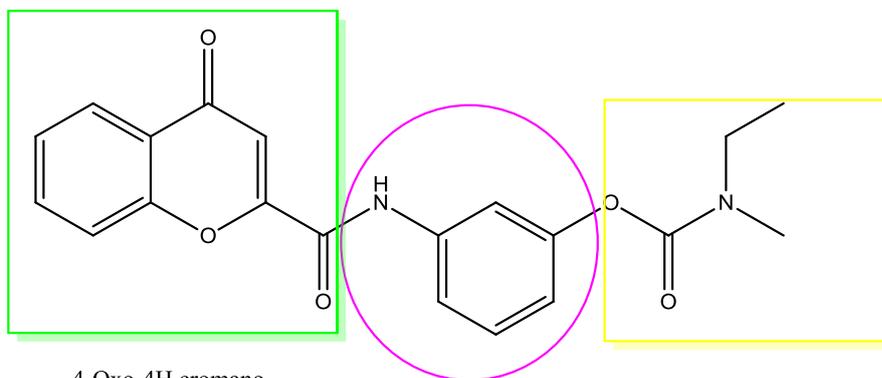
Tali composti, saggiati per la loro attività neuroprotettiva, antiossidante e per l'affinità nei confronti degli enzimi colinesterasici (AChE e BuChE), hanno mostrato di possedere migliori proprietà rispetto alla rivastigmina. Sulla base dei risultati interessanti ottenuti dallo studio di questi composti, in questa tesi di laurea sono stati sviluppati dei derivati ibridi di struttura A (Fig.26) aventi un nucleo benzopiranic, presente in numerosi flavonoidi e dotato di attività antiossidante, coniugato alla porzione farmacoforica carbammica della Rivastigmina, AChE e BuChE inibitore.



Introduzione alla parte sperimentale

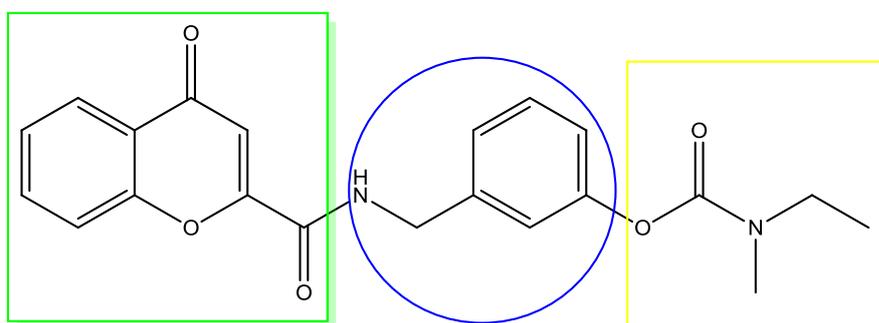
Fig.26 Ibrido **A** con porzione carbammica coniugata mediante spaziatore ad un nucleo flavonoide.

In particolare sono stati sintetizzati i composti **1a**, **1b** e **1c** in cui la porzione N-etil- N metil carbammica della rivastigmina è stata coniugata mediante un linker anilिनico (**1a**), benzil amminico (**1b**) e feniletilamminico (**1c**) al nucleo 4-Oxo-4H- cromano.



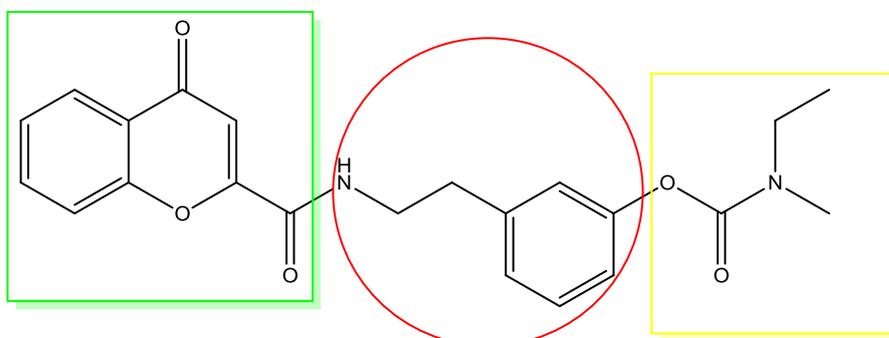
linker
anilिनico

1a



linker
benzilamminico

1b



linker
feniletilamminico

1c

Introduzione alla parte sperimentale

La scelta dell'utilizzo del nucleo oxo-cromanico come porzione da coniugare alla rivastigmina è dovuta al fatto che tale nucleo è dotato sia di attività antiossidante che BACE1 inibitoria.

Un recente studio ha infatti mostrato che il derivato **19** (fig.27) ottenuto dalla coniugazione della tacrina con questo scaffold di tipo benzopiranic ha mostrato una potente inibizione combinata di BACE1, AChE e BuChE umane ($2.80 \pm 0.01 \mu\text{M}$, $8.0 \pm 0.2 \text{ nM}$ e $1.50 \pm 0.04 \text{ nM}$, rispettivamente), e buone proprietà antiossidanti (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), trolox equivalenti = 1.30 ± 0.04).¹⁹

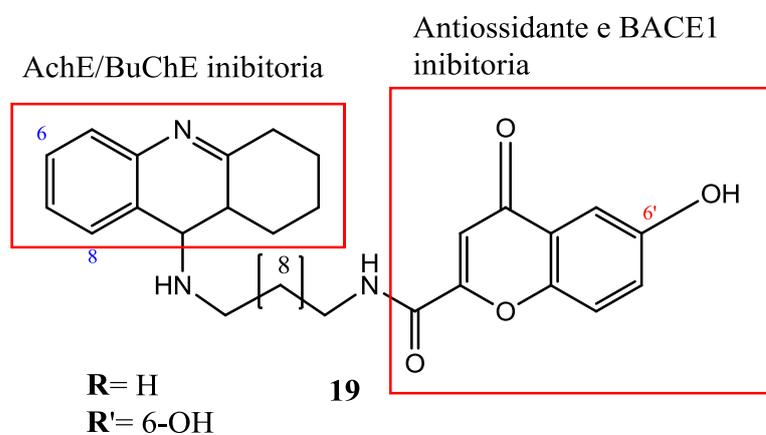
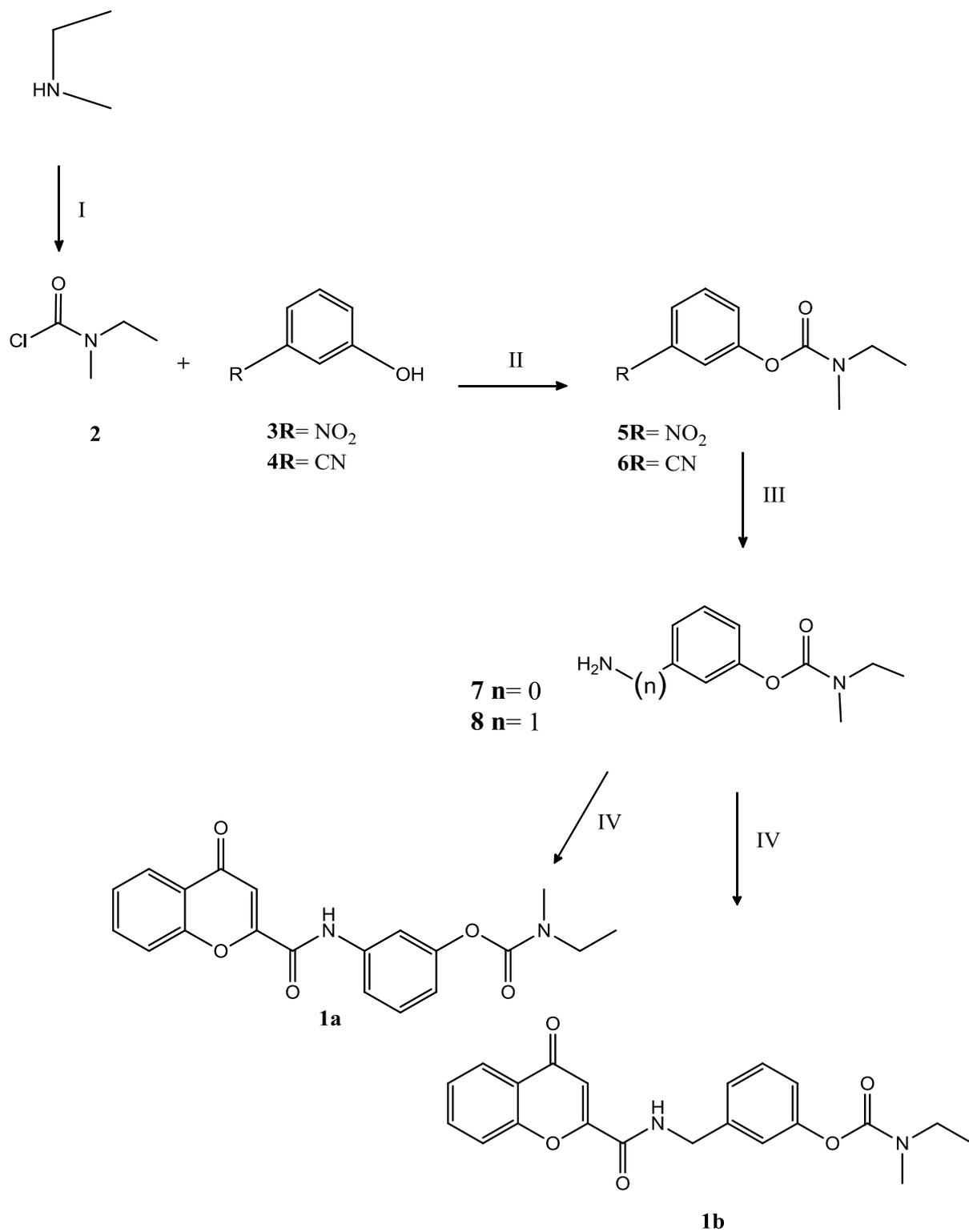


Fig.27 Ibrido **19**, ha riportato una promettente attività inibitoria nei confronti di BuChE e AChE e BACE-1 ed attività antiossidante.

SCHEMA 1



Introduzione alla parte sperimentale

Reagenti e Condizioni : **(I)** NaHCO₃, trifosgene, CH₂Cl₂, 10-15 °C, 12h; **(II)** Et₃N, 95°C, 15h; **(III)** EtOH, Pd/C, H₂, t.a., 12h.; **(IV)** Acido 4-Oxo-4H-cromano-2 carbossilico, BOP, Et₃N, t.a., 12 h.

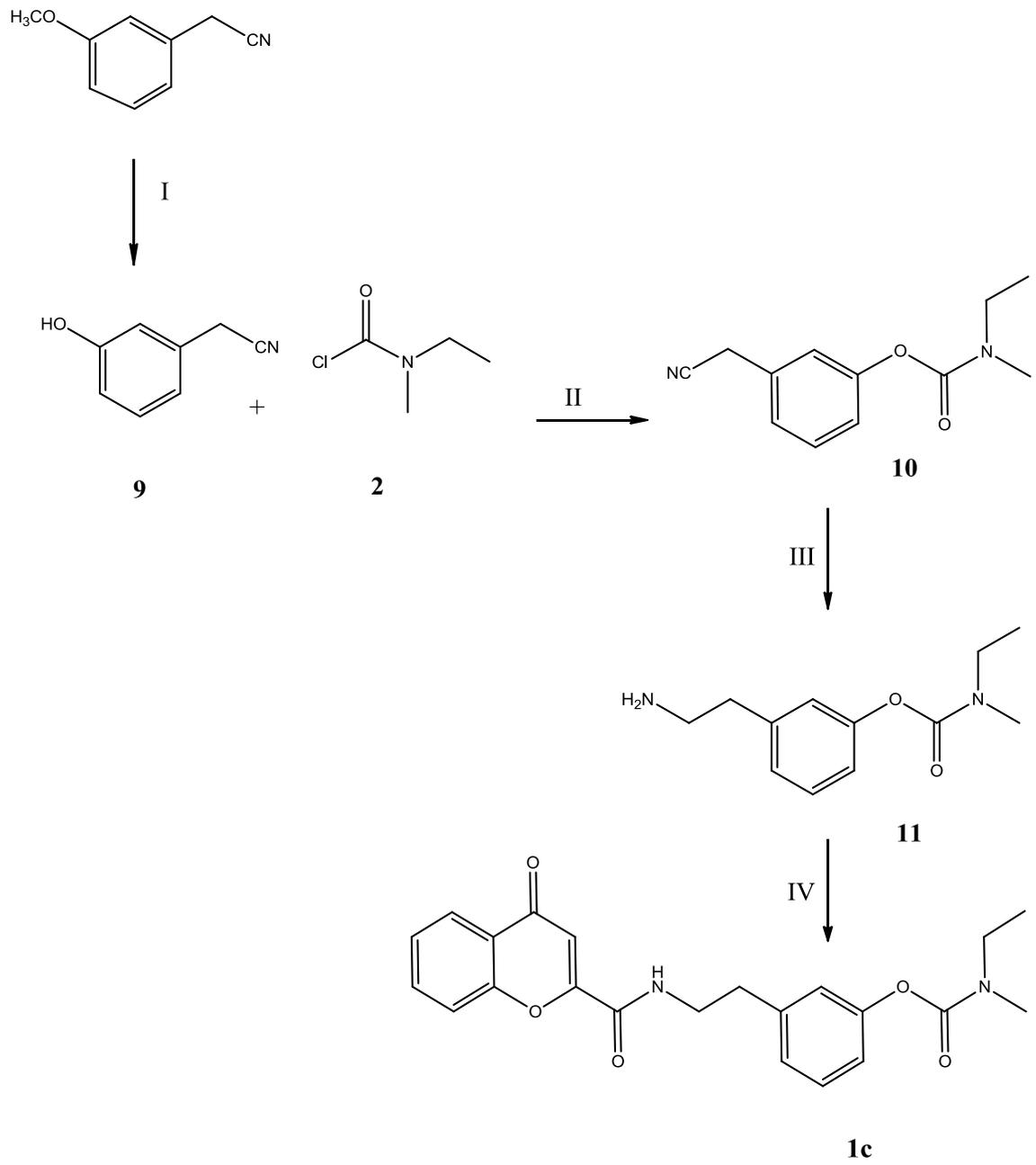
Per quanto riguarda i composti sintetizzati, le loro procedure sperimentali sono riportate negli schemi seguenti.

I derivati **1a** e **1b** sono stati ottenuti secondo lo **schema 1**.

La reazione della N-etil-metil ammina commerciale con il trifosgene in presenza di NaHCO₃ ha fornito l'N-etil-metil carbamoil cloruro **2**, che è stato successivamente sottoposto a reazione con l'opportuno fenolo (**3,4**) in presenza di trietilammina fornendo i derivati carbammici **5** e **6**.

Gli intermedi **5** e **6** sono stati sottoposti ad idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C al fine di ottenere i corrispondenti derivati amminici **7** e **8**. I composti finali **1a** e **1b** sono stati ottenuti per reazione di condensazione dei derivati **7** e **8** con l'acido 4-Oxo-4H-cromano-2-carbossilico commerciale, in presenza di BOP come agente condensante e di Et₃N come base.

SCHEMA 2



Introduzione alla parte sperimentale

Reagenti e condizioni: **(I)** BBr₃, CH₂Cl₂, -10°C, 3h; **(II)** Et₃N, 95°C, 15h; **(III)** MeOH, HCl, Pd/C, H₂, t.a., 12h; **(IV)** Acido 4-Oxo-4H-cromano-2 carbossilico, BOP, Et₃N, 12h t.a.

La sintesi del derivato **1c** è illustrata nello **schema 2**.

La reazione di demetilazione del 3-metossi fenil acetonitrile mediante BBr₃ ha fornito il 3-idrossifenilacetone **9**, il quale è stato sottoposto ad una reazione con l’N-etil-metil carbamoil cloruro (**2**) ottenendo il derivato carbammico **10**.

La riduzione del derivato fenilacetone **10** a derivato fenilettilamminico (**11**), è stata effettuata tramite idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C,

La reazione di condensazione mediante utilizzo dell’agente condensante BOP in presenza di Et₃N tra il composto **11** e l’acido 4-Oxo-4 H cromano-2-carbossilico ha permesso di ottenere il composto desiderato **1c**.

PARTE
SPERIMENTALE

Materiali e metodi

La struttura di tutti i composti è stata esaminata per mezzo della spettrometria ^1H NMR. Nei dati sperimentali sono stati riportati i segnali più significativi degli spettri ^1H NMR. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici corrispondenti con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Bruker operante a 400 MHz in CDCl_3 . I chemical shift δ sono espressi in ppm (scala δ).

Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di analitica: la differenza tra i valori teorici e quelli calcolati è risultata essere compresa nell'intervallo di $\pm 0,4\%$.

Le evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante, mentre le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando Mg_2SO_4 .

Le TLC analitiche sono state effettuate usando lastre Merck di gel di silice G60 contenente un indicatore fluorescente 20.2 mm; le macchie sono state prese in esame mediante una lampada UV (256 nm).

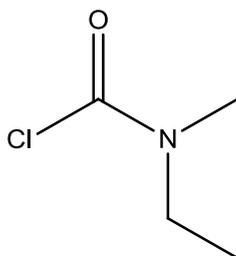
Per le cromatografie su colonna è stato usato un gel di silice Merck 70- 230 Mesh.

Per le filtrazioni su setto a celite è stata usata celite ® 521.

Per le idrogenazioni è stato usato il generatore d'idrogeno HG 2000 CLAIND ® .

SCHEMA 1

Sintesi di etil(metil)carbamoil cloruro (2)



Ad una miscela di trifosgene commerciale (1.67 g, 5.58 mmoli) e NaHCO_3 (1.42 g, 0.017 mmoli) in CH_2Cl_2 (10ml) è stata addizionata, mediante gocciolatore nell'intervallo di 1 h, di una soluzione di N-etilmetilamina in CH_2Cl_2 (5ml), mantenendo la temperatura a 10°C . In seguito la reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 h.

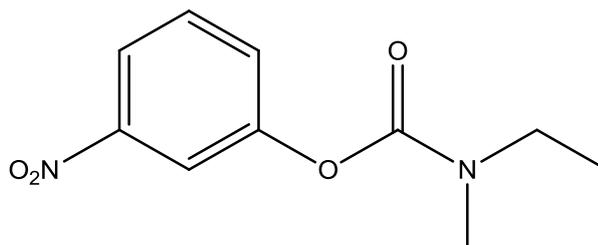
Trascorso tale intervallo di tempo, la sospensione è stata filtrata e il solvente è stato evaporato ad ottenere il composto desiderato **2**.

RESA = 92%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.18 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 1° rotamero); 1.22 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 2° rotamero); 3.02 (s, 1.5H, CH_3 , 1° rotamero); 3.11 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.45 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 1° rotamero); 3.51 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 2° rotamero) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi del composto 3-nitrofenil-etil(metil)carbammato (5)



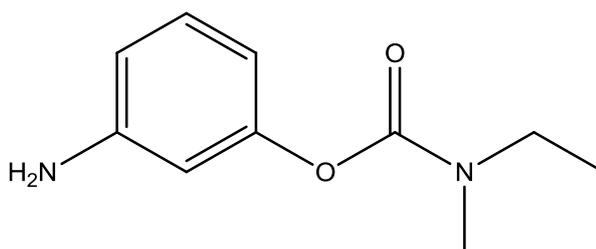
Ad una soluzione di 3-nitrofenolo commerciale **3** (225 mg, 1.62 mmoli) in Et₃N (1ml) è stato aggiunto l'etil(metil)carbamoil cloruro **2** (200 mg, 1.65 mmoli), e la soluzione risultante è scaldata a 95°C per 15 h. Trascorso tale periodo la miscela di reazione è stata ripresa con CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione acquosa di NaOH 1N. La fase organica così ottenuta è stata essiccata, filtrata ed evaporata, ottenendo il derivato **5**.

RESA = 75%

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.21 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.26 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 3.01 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.09 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.42 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.50 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 7.47-7.54 (m, 2H, Ar); 8.00-8.01 (m, 1H, Ar); 8.06 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz, Ar) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi di 3-aminofenil-etil(metil)carbammato (7)



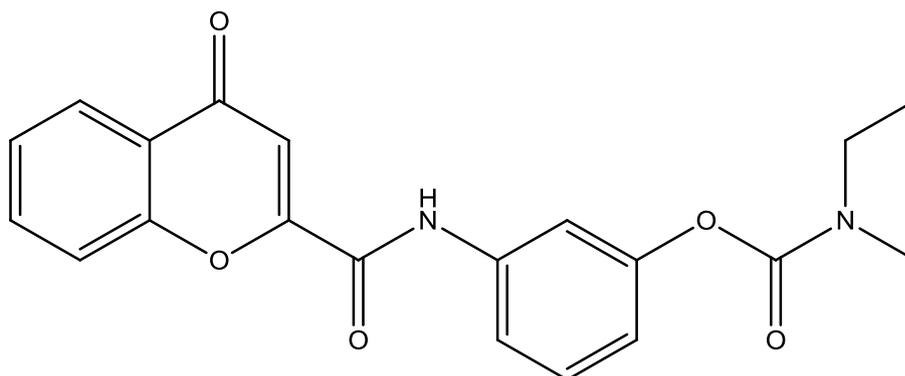
Ad una soluzione dell'intermedio **5** (278 mg, 1.80 mmoli) in EtOH assoluto è stato aggiunto Pd/C (100 mg). Tale miscela è stata sottoposta ad idrogenazione catalitica a temperatura ambiente per 12 h, quindi la sospensione è stata filtrata su setto a celite. In seguito ad evaporazione del solvente è stato ottenuto il composto desiderato **7**.

RESA= 99%

¹H NMR (CDCl₃) δ : 1.22-1.23 (m, 3H, CH₃, 1° rotamero); 2.97 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.03 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.36-3.46 (m, 2H, CH₂); 6.44 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, Ar); 6.49 (dd, 2H, $J = 2.0, 8.0$ Hz, Ar); 7.10 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi di 3-(4-oxo-4H-cromano-2-carbossi-amide) fenil etil(metil)carbammato (1a)



Ad una miscela di acido 4-Oxo-4H-cromano-2-carbossilico commerciale (98 mg, 0.51 mmoli) e BOP (296 mg 0.60 mmoli) in CH_2Cl_2 (14ml) è stato addizionato il derivato **7** (100 mg, 0.51 mmoli) e Et_3N (0.20 ml), la reazione è quindi mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 12h. Trascorso tale periodo, la miscela di reazione è stata ripresa con CH_2Cl_2 e lavata con HCl 10%, NaHCO_3 0.5M ed infine con H_2O , quindi la fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata. Il grezzo, così ottenuto, è stato purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando come eluente una miscela $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ in rapporto 98:2 per dare il composto desiderato **1a**.

RESA= 37%

P.f = 155-160 ° C

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.19-1.27 (m, 3H, CH_3); 3.01 (s, 1.5 H, CH_3 , 1° rotamero); 3.08 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.40-3.52 (m, 2H, CH_2); 6.94-6.98 (m, 1H, Ar); 7.37 (dd 1H, J = 8.0, 8.4 Hz, Ar); 7.48-7.54 (m, 2H, Ar); 7.59-7.62 (m, 2H, Ar); 7.79 (dd, 1H, J = 7.6, 8.0 Hz, Ar); 8.25 (d, 1H J = 8.0 Hz, Ar); 8.63 (s, 1H, Ar) ppm.

Parte sperimentale

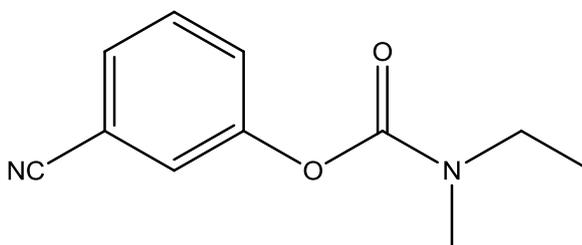
^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 178.09; 157.05; 155.31; 154.5; 152.17; 137.2; 134.86; 129.95; 126.40; 126.33; 124.52; 119.09; 118.99; 118.18; 117.25; 114.44; 112.89; 44.31; 34.44 (1° rotamero); 34.00 (2° rotamero); 13.39 (1° rotamero) 12.60 (2° rotamero)ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$	C	H	N
Calc. %	65.57	4.95	7.65
Trov. %	65.27	4.85	7.56

SCHEMA 1

Sintesi del composto 3-cianofenil-etil(metil)carbammato (6)



Ad una soluzione di 3-idrossibenzonitrile commerciale **4** (368 mg, 3.10 mmoli) in Et_3N (1 ml) è stato aggiunto etil(metil)carbamoil cloruro **2** (378 mg, 3.095 mmoli). La reazione è stata posta in agitazione ai 95°C per circa 15 h. Trascorso questo tempo la miscela di reazione è stata ripresa con CH_2Cl_2 , lavata con una soluzione acquosa di NaOH 1N. La fase organica così ottenuta è stata essiccata, filtrata, ed evaporata ad ottenere l'intermedio desiderato **6**.

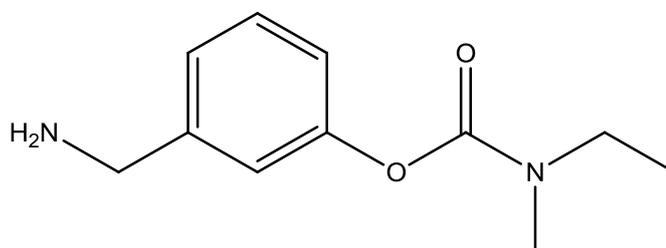
RESA= 67%

Parte sperimentale

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.18 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 1° rotamero); 1.21 (t, 1.5H, $J = 7.2$ Hz, CH_3 , 2° rotamero); 2.98 (s, 1.5H, CH_3 , 1° rotamero); 3.06 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.40 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 1° rotamero); 3.45 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 2° rotamero); 7.35-7.38 (m, 1H, Ar); 7.42-7.48 (m, 3H, Ar) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi di 3-((amino)metil)fenil-etil(metil)carbammato (**8**)



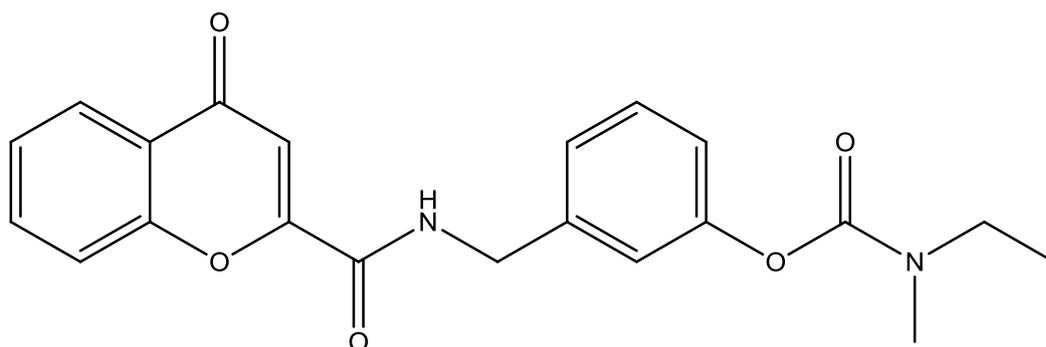
Una soluzione dell'intermedio **6** (440 mg, 2.08 mmoli) in EtOH assoluto (6 ml), è stata addizionata di Pd/C (100 mg), e sottoposta ad idrogenazione catalitica a temperatura ambiente per 12 h. Trascorso tale periodo la sospensione è stata filtrata su setto a celite, ed in seguito ad evaporazione del solvente è stato ottenuto il prodotto desiderato **8**.

RESA = 98%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.11-1.26 (m, 3H, CH_3); 2.98 (s, 1.5H, CH_3 , 1° rotamero); 3.06 (s, 1.5H, CH_3 , 2° rotamero); 3.40 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, CH_2 , 2° rotamero); 3.87 (s, 2H, CH_2NH_2); 6.99 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar); 7.08 (s, 1H, Ar); 7.13 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, Ar); 7.28-7.33 (m, 1H, Ar) ppm.

SCHEMA 1

Sintesi di 3-((4-oxo-4H-cromano-2-carbossi-amide)metil)fenil -etil(metil)carbammato (1b)



Ad una miscela di acido 4-Oxo-4H-cromano-2 carbossilico commerciale (137 mg, 0.72 mmoli) e BOP (414 mg, 0.93 mmoli) in CH₂Cl₂ (15 ml) è stato aggiunto il derivato **8** (139 mg, 0.72 mmoli) e Et₃N (0.87 ml). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 12 h, quindi è stata ripresa con CH₂Cl₂, e lavata con una soluzione acquosa di HCl al 10%, con NaHCO₃ 0.5 M ed infine con H₂O. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata, ottenendo ungrezzo che è stato purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando come eluente una miscela di CHCl₃/MeOH in rapporto 95:5, a dare il composto desiderato **1b**.

RESA = 35%

P.f = 165- 170 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.17–1.26 (m, 3H, CH₃); 2.98 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.06 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.41 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz, CH₂, 2° rotamero); 4.65 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H CH₂); 7.05-7.10 (m, 1H, Ar); 7.11-7.14 (m, 1H, Ar); 7.20-7.22 (m, 2H, Ar); 7.37 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar); 7.43-7.47 (m, 1H,

Parte sperimentale

Ar); 7.52 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar); 7.70-7.74 (m, 1H, Ar); 8.22 (dd, 1H $J = 1.6, 8.0$ Hz, Ar) ppm.

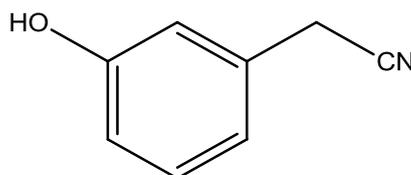
^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 178.26; 159.44; 155.38; 154.69; 151.98; 138.53; 134.65; 129.85; 126.13; 126.07; 125.03; 124.44; 121.68; 121.58; 118.32; 112.45; 44.24; 43.73; 34.37 (1° rotamero); 33.96 (2° rotamero); 13.34 (1° rotamero) 12.56 (2° rotamero) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$	C	H	N
Calc. %	66.31	5.30	7.36
Trov. %	66.23	5.26	7.21

SCHEMA 2

Sintesi del composto 2-(3-idrossifenil)acetonitrile (9)



Ad una soluzione di 3-metossifenil-acetonitrile (452.3 mg, 3.40 mmoli) in CH_2Cl_2 , posta sotto flusso di N_2 e raffreddata a -10°C , è stato addizionato BBr_3 commerciale (10.47 ml, 10.45 mmoli) nell'arco di 40 min, quindi la miscela di reazione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per 3 h.

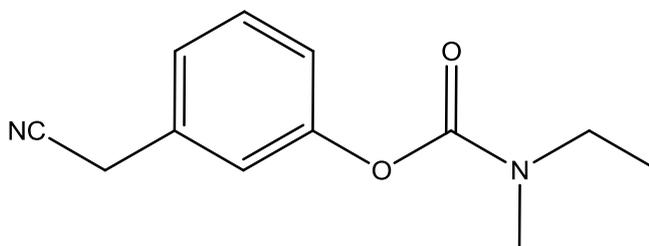
Trascorso tale periodo, è stata aggiunta H_2O e la fase acquosa è stata estratta con CH_2Cl_2 . La fase organica risultante è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo l'intermedio desiderato **9**.

RESA= 75%

¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.72 (s, 2H, CH₂CN); 6.80-6.86 (m, 3H, Ar); 7.21-7.25 (m, 1H, Ar) ppm

SCHEMA 2

Sintesi del derivato 3-(cianometil)fenil-etil(metil) carbammato (**10**)



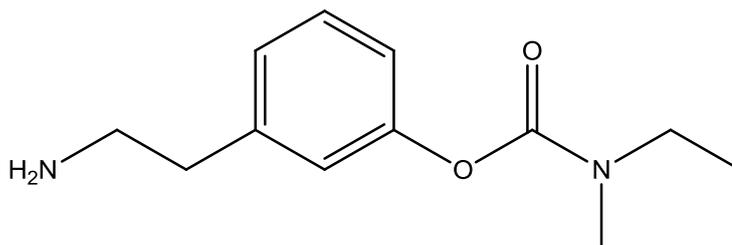
Ad una miscela di etil(metil)carbamoil cloruro **2** (322 mg, 2.67 mmoli) in Et₃N (1.76 ml) è stato aggiunto il derivato **9** (353 mg, 2.65 mmoli). La reazione è stata posta in agitazione per 15 h a 95° C. Quindi la miscela di reazione è stata ripresa con CH₂Cl₂ e lavata con una soluzione acquosa di NaOH 1 N. La fase organica è stata così essiccata, filtrata ed evaporata per ottenere il derivato **10**.

RESA= 70 %

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.19 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.25 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 3.00 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.07 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.40 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 3.75 (s, 2H, CH₂CN); 7.08-7.10 (m, 2H, Ar); 7.16 (d, 1H; *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.36 (t, 1H; *J* = 7.6 Hz, Ar) ppm.

SCHEMA 2

Sintesi di 3-(2-aminoetil) fenil etil (metil) carbammato (11)



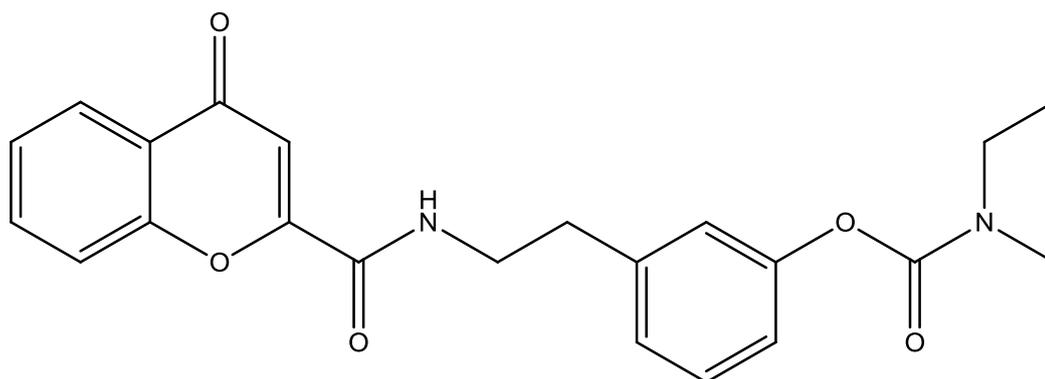
Ad una soluzione del derivato **10** (322 mg, 1.46 mmoli) in MeOH è stato aggiunto HCl concentrato (0.15 ml) e Pd/C (113 mg). La miscela di reazione è stata poi sottoposta ad idrogenazione catalitica a temperatura ambiente, per 12h. Terminato tale periodo, la sospensione è stata filtrata su setto a celite, e il solvente evaporato. Il residuo così ottenuto è stato ripreso con CH₂Cl₂ e lavato con una soluzione acquosa di NaOH 1N e H₂O, quindi la fase organica è stata essiccata, filtrata, ed evaporata fornendo il composto desiderato **11**.

RESA = 93%

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.15 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.24 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.75 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂); 2.99 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂); 3.06 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.14 (s, 1.5H, CH₃, 2° rotamero); 3.41 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.47 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 6.96-7.00 (m, 2H, Ar); 7.03 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.26-7.30 (m, 1H, Ar) ppm.

SCHEMA 2

Sintesi del derivato 3-(2-(4-oxo-4H-cromano-carbossiamide)etil) fenil etil (metil) carbammato (**1c**)



Ad una miscela di acido 4-Oxo-4 H- cromano-2 carbossilico commerciale (60 mg, 0.31 mmoli) e BOP (182 mg, 0.41 mmoli) in CH₂Cl₂ (9ml) è stato aggiunto il derivato **11** (70 mg, 0.31 mmoli) e Et₃N (0.1 ml). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte, quindi è stata ripresa con CH₂Cl₂, è lavata con una soluzione acquosa di HCl al 10% , NaHCO₃ 0,5 M ed infine con H₂O. La fase organica ottenuta è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo un grezzo che è stato purificato mediante cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela di CHCl₃/ MeOH in rapporto 98:2, per dare il prodotto **1c**.

RESA = 32 %

P.f = 134-139 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.13 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz, CH₃, 1° rotamero); 1.21 (t, 1.5H *J* = 7.2 Hz, CH₃, 2° rotamero); 2.92-2.95 (m, 2H, CH₂); 2.93 (s, 1.5H, CH₃, 1° rotamero); 3.04 (s, 1.5 H, CH₃, 2° rotamero); 3.33 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 1° rotamero); 3.42 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, CH₂, 2° rotamero); 3.72 (q, 2H, *J* = 6.8 Hz, CH₂); 7.00-7.02 (m, 2H, Ar); 7.06 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.14-7.18 (m, 2H, Ar, NH); 7.31 (dd, 1H *J* = 7.6, 8.0 Hz, Ar);

Parte sperimentale

7.40 (dd, 1H, $J = 7.6, 8.0$ Hz, Ar); 7.51 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar); 7.68 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, Ar); 8.17 (dd, 1H, $J = 1.6, 7.6$ Hz, Ar) ppm.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 178.34; 159.41; 155.38; 154.81; 151.92; 139.88; 134.48; 129.73; 126.01; 125.95; 125.75; 124.39; 122.52; 122.46; 120.33; 118.48; 112.11; 44.18; 40.99; 35.26; 34.31 (1° rotamero) 33.91 (2° rotamero); 13.31 (1° rotamero); 12.53 (2° rotamero) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$	C	H	N
Calc.%	66.99	5.62	7.08
Trov.%	67.15	5.73	7.17

Bibliografia

- (1) **A.Cavalli, M.Bolognesi, A. Minarini, M.Rosini, V.Tumiatti, M.Recanatini, C.Melchiorre** *Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases. J. Med. Chem.*, **2008**, 51(3), 347 – 367.
- (2) **K.Tranches Dias, C.Viegas**, *Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease*, **2014**, 12(3): 239–255.
- (3) **B. Mueller, G.Adler**, *Prevalence of Wild-Type Butyrylcholinesterase Genotype in Patients with Alzheimer's Dementia*, *World Journal of Neuroscience*, **2015**, 5, 175-179.
- (4) **Robert Vassar**, *b -Secretase (BACE) as a drug target for alzheimer's disease* *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (**2002**) 1589–1602.
- (5) **Zhiyou Cai, M. Delwar Hussain & Liang-Jun Yan**, *Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease*, *International Journal of Neuroscience*, **2014** ,124:5, 307-321.
- (6) **Jennifer Madeo ,Chris Elsayad**, *The Role of Oxidative Stress in Alzheimer 's Disease*, *Madeo and Elsayad, J Alzheimers Dis Parkinsonism* **2013**, 3:2.
- (7) **Joo-Yong Lee, Toby B. Cole, Richard D. Palmiter, Sang Won Suh, and Jae-Young Koh** *Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice.* **2002**.
- (8) **M. Huang, S. Xie, N. Jiang, Jin-Shuai Lan, L. Kong, X. Wang**, *Multifunctional coumarin derivatives: Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition, anti-b-amyloid (Ab) aggregation and metal chelation properties against Alzheimer's disease*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25 (**2015**) 508–513.
- (9) **Marksteiner, J.; Humpel, C.; Hinterhuber, H.** *Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid, tau, phosfotau-181 and total protein*, *Drug Today*, **2007**, 43(6), 423 – 431

- (10) Nigelh , Ebomoky. Lahiri, Kumars Ambamurti, *Butyrylcholinesterase: An Important New Target in Alzheimer's Disease Therapy*, *International Psychogeriatrics*, Vol. 14, Suppl. 1, 2002, pp. 77-91.
- (11) Birks J, Grimley Evans J, Iakovidou V, Tsolaki M *Rivastigmine for Alzheimer's disease* (Review),2009.
- (12) Y. Shimmyo, T. Kihara, A. Akaike, T. Niidome, H. Sugimoto, *Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1780 (2008) 819–825.
- (13) S. Xie, X. Wang, Jiang- Y. Li, L.Yang ,L. Yi Kong, *Design, synthesis, and evaluation of novel tacrine-coumarine hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease*. *European journal of Medical Chemistry*, 64 (2013) 540-553.
- (14) Guzior N., Wieckowska A., Panek D., Malawska B.; *Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease*; *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22:373-404.
- (15) E. Viayna, T. G. _mez, C. Galdeano, L. Ram rez, M.Ratia *Novel Huprine Derivatives with Inhibitory Activity toward b-Amyloid Aggregation and Formation as Disease-Modifying Anti-Alzheimer Drug Candidates*.
- (16) L. Birgit Kraus,c Jochen Lehmann,a Joerg Heilmann,Yihua Zhangb,and Michael Deckera, *Design and synthesis of tacrine–ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates*, (2008) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 2905–2909.
- (17) X. Chao a, Xixin He b, Y. Yang a, X. Zhou a, M. Jin c, Shu Liu d, Z. Cheng, Huang c, J.Qin c, S. Rapposelli. *Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel tacrine–caffeic acid hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (2012) 6498–6502.

- (18) **L. Piazza, A. Cavalli, F. Colizzi, F. Belluti**, *Multi target directed coumarin derivatives: h AChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds*, *Biorganic & Medicinal letters* 18 (2008) 423-426.
- (19) **M. Bachiller, C. Perez, L. Monjas, J. Randemann, M. Franco**, *New Tacrine–4-Oxo-4H-chromene Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer’s Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and β -Amyloid-Reducing Properties*, *J. Med. Chem.*, 2012, 55 (3), pp 1303–1317.
- (20) **Liu, F.; Li, B.; Tung, E.D.; Grundke-Ighal, I.; Ighal, K.** *Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation*. *Eur J. Neurosci*, 2007, 26(12), 3429 – 3436.
- (21) **F. Hoffgaard**. *Structure-based, biophysical annotation of molecular coevolution of acetylcholinesterase*, *Proteins*, 2011, 79; 3144-54.