

О. Л. Кобзар, А. Д. Очеретнюк, І. М. Міщенко, О. П. Козаченко,  
В. С. Броварець, А. І. Вовк

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії імені В. П. Кухаря НАН України  
02094, м. Київ, вул. Мурманська, 1. E-mail: [vovk@bpci.kiev.ua](mailto:vovk@bpci.kiev.ua)

## Інгібітори ацетилхолінестерази з тiazолієвим скафолдом: структурні особливості і способи зв'язування

**Метою роботи** була оцінка структурних особливостей замісників і ролі тiazолієвого скафолду у механізмі інгібування ацетилхолінестерази солями тiazолію.

**Результати та їх обговорення.** На основі активності при pH 6,5 і pH 8,0 та за результатами молекулярного докінгу проаналізовані способи зв'язування ацетилхолінестеразою кватернізованих похідних 5-(2-гідроксіетил)-4-метилтiazолу з різними замісниками в положеннях 3 і 5. Наявність *N*(3)-бензильного замісника забезпечує найкраще закріплення інгібітора в каталітичному аніонному сайті, тоді як ацильні фрагменти замісників у положенні 5 розташовуються в області периферичного аніонного сайту. Логарифми значень  $IC_{50}$ , за виключенням сполук з *O*-ацильними карбоциклічними групами, лінійно залежать від розрахованих енергій докінгу як у випадку тiazолієвого іону, так і у разі нейтрального тетраедричного інтермедіату розкриття тiazолієвого циклу.

**Експериментальна частина.** Солі тiazолію синтезовані відомими методами. Активність ацетилхолінестерази визначали за методом Елмана. Молекулярний докінг у область активного центру ацетилхолінестерази здійснено з використанням програми AutoDock 4.2.

**Висновки.** Структурні фрагменти замісників у положеннях 3 і 5 гетероциклічного скафолду забезпечують зв'язування інгібітора в області каталітичного і периферичного аніонних сайтів ацетилхолінестерази, відповідно. Гетероциклічний скафолд може бути зв'язаний у формі тiazолієвого іона або у формі нейтрального тетраедричного інтермедіату розкриття тiazолієвого циклу.

**Ключові слова:** солі тiazолію; ацетилхолінестераза; молекулярний докінг

**O. L. Kobzar, A. D. Ocheretniuk, I. M. Mischenko, O. P. Kozachenko, V. S. Brovarets, A. I. Vovk**

*V. P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine*

### Acetylcholinesterase inhibitors with a thiazolium scaffold: structural features and binding modes

**Aim.** To assess the structural features of substituents and the role of a thiazolium scaffold in mechanisms of acetylcholinesterase inhibition by thiazolium salts.

**Results and discussion.** On the basis of activities of model compounds at pH 6.5 and pH 8.0 and the results of molecular docking the binding modes of quaternized derivatives of 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole with different substituents in position 3 and 5 were analyzed. The presence of *N*(3)-benzyl substituent provides the inhibitor fixation in the catalytic anionic site, whereas acyl fragments of substituents in position 5 are situated in the peripheral anionic site. Logarithms of  $IC_{50}$  values of the thiazolium inhibitors, except for the compounds containing *O*-acyl carbocyclic groups, linearly depend on the calculated docking energies in case of a thiazolium ion as well as a neutral tetrahedral intermediate of the thiazolium ring opening.

**Experimental part.** Thiazolium salts were synthesized by the known methods. The activity of acetylcholinesterase was studied by Ellman's method. Molecular docking to the active site of acetylcholinesterase was performed using an AutoDock 4.2 program.

**Conclusions.** Structural fragments of substituents in positions 3 and 5 of the heterocyclic scaffold provide binding of the inhibitor in the catalytic anionic site and the peripheral anionic site of acetylcholinesterase, respectively. The heterocyclic scaffold can be bound to the enzyme as a thiazolium ion or a neutral tetrahedral intermediate of the ring opening reaction.

**Key words:** thiazolium salts; acetylcholinesterase; molecular docking

**А. Л. Кобзарь, А. Д. Очеретнюк, И. Н. Мищенко, А. П. Козаченко, В. С. Броварець, А. И. Вовк**

*Институт биоорганической химии и нефтехимии имени В. П. Кухаря НАН Украины*

### Ингибиторы ацетилхолинэстеразы с тiazолиевым скафолдом: структурные особенности и способы связывания

**Целью работы** была оценка структурных особенностей заместителей и роли тiazолиєвого скафолда в механизмах ингибирования ацетилхолинэстеразы солями тiazолия.

**Результаты и их обсуждение.** На основании активности при pH 6,5 и pH 8,0 и согласно результатов молекулярного докинга проанализированы способы связывания ацетилхолинэстеразой кватернизованных производных 5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтiazола с различными заместителями в положениях 3 и 5. Наличие *N*(3)-бензильного заместителя обеспечивает лучшее закрепление ингибитора в каталитическом анионном сайте, тогда как ацильные фрагменты заместителей в положении 5 располагаются в области периферического анионного сайта. Логарифмы значений  $IC_{50}$ , за исключением соединений с *O*-ацильными карбоцикліческими группами, линейно зависят от рассчитанных энергий докинга как в случае тiazолиєвого иона, так и в случае нейтрального тетраедрического интермедіата раскрытия тiazолиєвого цикла.

**Експериментальна частина.** Соли тиазолия синтезовані известними методами. Активність ацетилхолінестеразы определяли по методу Элмана. Молекулярний докинг в область активного центра ацетилхолінестеразы выполнен с использованием программы AutoDock 4.2.

**Выводы.** Структурные фрагменты заместителей в положениях 3 и 5 гетероциклического скаффолда обеспечивают связывание ингибитора в области каталитического и периферического сайтов ацетилхолінестеразы, соответственно. Гетероциклический скаффолд может быть связан в форме тиазолиевого иона или в форме нейтрального тетраэдрического интермедиата раскрытия тиазолиевого цикла.

**Ключевые слова:** соли тиазолия; ацетилхолінестераза; молекулярний докинг

Лікування нейродегенеративних захворювань часто ґрунтується на блокуванні активності ацетилхолінестерази (АХЕ), ферменту, що каталізує гідроліз ацетилхоліну у синаптичній щілині, впливаючи тим самим на передачу нервового імпульсу [1-3]. Крім того, АХЕ може бути залучена до формування  $\beta$ -амілоїдних агрегатів [4]. Серед відомих інгібіторів АХЕ є значна кількість органічних сполук різних класів, у тому числі похідних тиазолу [5, 6], бензотиазолу [7], тиазоліпіримідину [8] та тиазолотриазину [9]. Інгібітори цього ферменту, такі як ривастигмін, неостигмін, галантамін, донепезил і такрин, використовуються в клінічній практиці, зокрема, для лікування хвороби Альцгеймера [1, 2]. Однак тіамін (вітамін  $B_1$ ), що привертає увагу своїми нейротропними властивостями [10, 11], а також ряд його  $N(3)$ -алкільних,  $N(3)$ -піримідинілметильних та  $O$ -фосфорильованих аналогів виявляв слабку інгібувальну здатність щодо АХЕ [12].

Використовуючи тиазолевий скаффолд, ми запропонували новий підхід до створення інгібіторів холінестераз, що включав функціоналізацію 5-(2-гідроксі)етильного замісника  $N(3)$ -фенацильних і  $N(3)$ -бензильних структурних аналогів тіаміну [13, 14]. Серед  $O$ -ацилзаміщених 5-(2-гідроксі)етил-4-метил-3-(2-феніл-2-оксоетил)-1,3-тиазолію хлоридів було виявлено інгібітори АХЕ, які демонстрували мікромолярні значення  $IC_{50}$ . Метою цього дослідження була оцінка структурних особливостей модельних тиазолевих сполук і ролі тиазолевого скаффолду у механізмах зв'язування ацетилхолінестеразою.

## Результати та їх обговорення

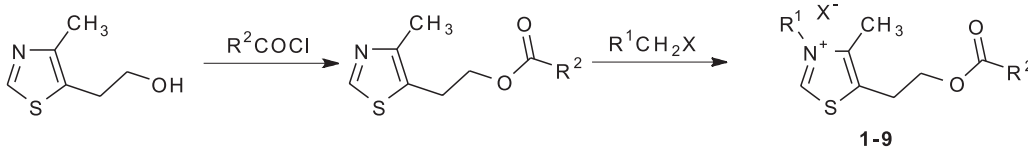
Для оцінки можливих механізмів зв'язування інгібіторів в активному центрі АХЕ у цій роботі *in vitro* та *in silico* проаналізовано інгібувальну здатність тиазолевих солей з метильним, *n*-пропільним, етоксикарбонілметильним і бензильним за-

місниками в положенні 3, а також похідних 3-бензил-5-(2-гідроксі)етил-4-метилтиазолію хлориду з  $O$ -ацильними групами аліфатичної, ароматичної і карбоциклічної природи.

Для синтезу сполук **1-8** були використані відомі методи, які включали ацилювання (2-гідроксі)етил-4-метил-1,3-тиазолу відповідними ацилхлоридами в дихлорометані за наявності триетиламіну [15-17]. Надалі  $O$ -заміщені тиазоли кватернізували алкілгалідами у безводному ацетонітрилі з утворенням тиазолевих солей з виходами 56-66%. Для тестувань біоактивності *in vitro* було використано препарат АХЕ з *Electric eel* (схема 1).

Як видно з таблиці, при рН 6,5 і рН 8,0  $O$ -(4-нітробензоїл)заміщені  $N$ -алкільні тиазолеві солі **1, 2**, так як і етилоксикарбонілметильна похідна **3**, чинять помірний вплив на активність АХЕ зі значеннями  $IC_{50}$  в межах 2-6 мкМ. Інгібувальна здатність похідної **4** значно зростає до низькомікромолярного рівня, що може бути пов'язано як з безпосередньою участю  $N$ -бензильного замісника у механізмах зв'язування ферментом, так і з його індуктивним ефектом. В ряду  $N$ -бензильних аналогів вітаміну  $B_1$  (сполуки **4-8**) вплив  $O$ -4-нітробензоїльної групи (сполука **4**) є сприятливішим у порівнянні з впливом бензоїльного замісника (сполука **8**) і більш ніж на порядок переважає інгібувальну дію похідних **5, 6 і 7** з аліфатичним або карбоциклічним ацильним фрагментом.

Центром фіксації інгібіторів АХЕ, як і субстрату, є каталітична щілина глибиною близько 20 Å, в якій розрізняють каталітичний аніонний сайт (КАС) і периферичний аніонний сайт (ПАС) [18]. Значна стабільність фермент-інгібіторного комплексу забезпечується зв'язуванням інгібітора обома цими сайтами. Молекулярний докинг тиазолевих солей **1-8** показав, що в усіх випадках  $N$ -замісник тиазолевого скаффолду орієнтується у напрямі КАС. Значна подібність при зв'язуванні ферментом притаманна сполукам **1, 4-6 та 8** (рис. 1), тоді як по-



$R^1 = CH_3, CH_2CH_2CH_3, CH_2C(O)OCH_2CH_3, CH_2C_6H_5$ ;  $R^2 = C_6H_5, C_6H_4NO_2-4, CH_2CH(CH_3)_2$ , біцикло[2.2.1]гепт-1-іл, біцикло[2.2.1]гепт-2-іл;  $X = Cl, Br, I$

## Таблиця

Значення  $IC_{50}$  тiazолієвих солей **1-8** як інгібіторів ацетилхолінестерази\*

Сполука	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	IC <sub>50</sub> , мкМ	
				pH = 6,5	pH = 8,0
<b>1</b>	метил	4-нітрофеніл	I	5,7 ± 0,5	5,2 ± 0,9
<b>2</b>	<i>n</i> -пропіл	4-нітрофеніл	Br	3,6 ± 0,3	4,0 ± 0,9
<b>3</b>	етилкарбонілметил	4-нітрофеніл	Br	2,6 ± 0,8	4,3 ± 1,1
<b>4</b>	бензил	4-нітрофеніл	Cl	0,061 ± 0,014	0,076 ± 0,017
<b>5</b>	бензил	2-метилпропіл	Cl	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,6
<b>6</b>	бензил	біцикло[2.2.1]гепт-1-іл	Cl	6,1 ± 0,4	8,7 ± 0,5
<b>7</b>	бензил	біцикло[2.2.1]гепт-2-іл	Cl	2,8 ± 0,2	4,3 ± 0,3
<b>8</b>	бензил	феніл	Cl	0,66 ± 0,06	0,65 ± 0,04

Примітка: \* – значення  $IC_{50}$  є середнім з 2-3 визначень ± стандартне відхилення.

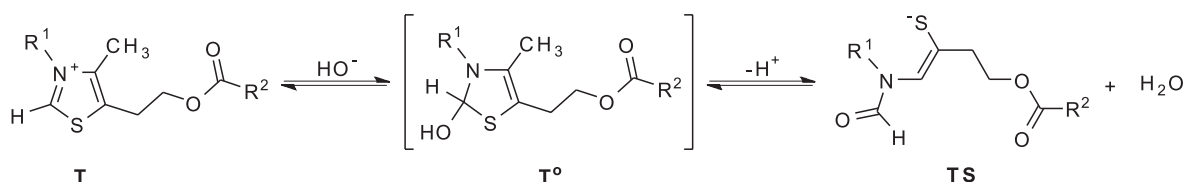


Схема 2

зиції сполук **2**, **3** та **7** є дещо зміщеними. При цьому *N*-бензильні похідні **4-8** здатні формувати π-π зв'язок з амінокислотним залишком Trp86 та σ-π-контакт з Tyr337. Тiazолієвий фрагмент інгібітора в усіх випадках розташований поряд з KAC, забезпечуючи π-π-взаємодії з Tyr341. Ацильні фрагменти замісників у положенні 5 спрямовані у напрямку PAS з характерними взаємодіями атома кисню естерної групи з Phe295. Ароматичний цикл 4-нітробензоїльного фрагменту може формувати π-σ-контакт з Val294, а атоми кисню нітрогрупи (сполуки **1**, **2** та **4**) здатні утворювати водневі зв'язки з Ser293. Описаний спосіб фіксації інгібіторів ілюструє рис. 1 на прикладі сполуки **4**.

Відомо, що в нейтральних та основних водних розчинах тiazолієвий іон (T) може знаходитись у рівновазі з нейтральним тетраедричним інтермедіатом (T°) реакції розкриття тiazолієвого циклу до ентioльного продукту (TS). Значення *pK<sub>a</sub>*,

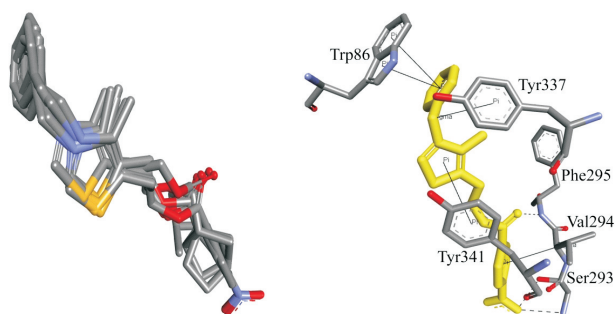


Рис. 1. Суперпозиція тiazолієвих структур **1**, **4-6** та **8** (ліворуч) і спосіб зв'язування сполуки **4** в активному центрі АХЕ (праворуч)

що стосується утворення інтермедіату T° із 3,4-диметилтiazолієвого іону, складає 6,9 [19]. Припускається, що в цьому випадку загальну швидкість реакції розкриття тiazолієвого циклу лімітує депротонування гідроксильної групи T° [19]. Утворення подібних тетраедричних продуктів розглядається як частина можливих механізмів ТДФ-залежного каталізу [20] (схема 2).

Згідно з наведеними вище експериментальними даними значення  $IC_{50}$  тiazолієвих солей **1-8** практично не змінюються при pH 6,5 і pH 8,0 (табл.). При цьому логарифми значень  $IC_{50}$ , за виключенням сполук з *O*-ацильними карбоциклічними групами лінійно залежать від розрахованих енергій докінгу інгібітора як у формі тiazолієвого іону ( $R^2 = 0,85$ ), так і у формі нейтрального тетраедричного інтермедіату ( $R^2 = 0,79$ ) (рис. 2). Результати докінгу свідчать, що у випадку тетраедричного інтермедіату, як і в разі солей тiazолію, замісники в положеннях 3 і 5 фіксуються в каталітичному та периферичному аніонному сайтах, відповідно. Гетероциклічний тетраедричний фрагмент інгібітора закріплюється поряд з KAC і завдяки наявності гідроксильної групи в положенні 2 формує водневі зв'язки з Asp74 і Tyr341 (рис. 3). При цьому ентioльний продукт розкриття тiazолієвого циклу (TS) є менш ймовірним лігандом при комплексоутворенні з ацетилхолінестеразою.

Таким чином, молекулярний докінг і оцінка *in vitro* модельних сполук **1-8** свідчить про те, що наявність *N*-бензильного замісника в тiazолієво-

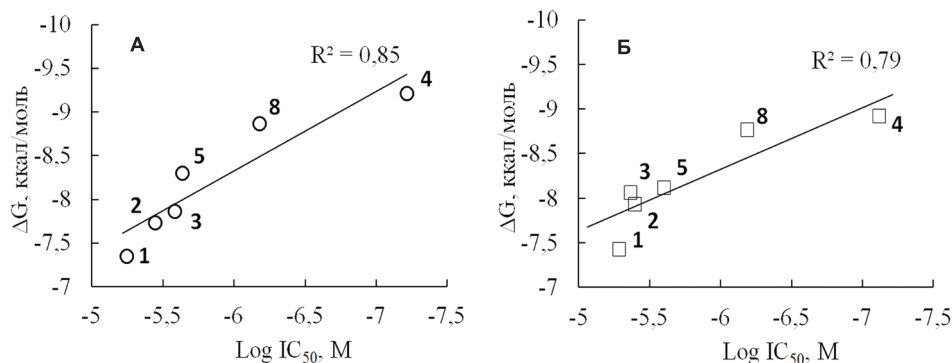


Рис. 2. Графічне представлення залежностей значень  $IC_{50}$  сполук **1-5, 8** від енергій докінгу інгібіторів в іонній формі та у формі нейтральних тетраедричних структур ( $T^*$ ) при pH 6,5 (А) і pH 8,0 (Б), відповідно

му циклі забезпечує фіксацію інгібітора в КАС, тоді як гетероциклічний тiazолієвий фрагмент зв'язується поруч з ним за рахунок  $\pi$ - $\pi$ -взаємодії з Tyr341. При цьому нейтральна тетраедрична сполука, що утворюється в результаті нуклеофільного приєднання гідроксильного іона в положення C(2) тiazолію, утворює водневі зв'язки з Asp74 і Tyr341. Способи локалізації C(5)-замісників тiazолію, що взаємодіють з амінокислотними залишками в області периферичного сайту АХЕ, демонструють можливість оптимізації інгібіторів шляхом модифікації *O*-ацильного фрагмента *N*-бензильних структурних аналогів вітаміну  $V_1$ .

### Експериментальна частина

Спектри ЯМР ( $^1H$  (500 MHz) і  $^{13}C$  (125 MHz)) записані на спектрометрі Bruker Avance DRX 500 з використанням ТМС як внутрішнього стандарту. Хромато-мас-спектри реєструвалися за допомогою рідинної хромато-мас-спектрометричної системи на вискоєфективному рідинному хроматографі Agilent 1100 Series, обладнаному діодною матрицею з мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL. Температури плавлення вимірювали на приладі Fisher-Jones.

**Загальна методика синтезу тiazолієвих солей.** До розчину 1,43 г (10 ммоль) 2-(4-метил-1,3-тіа-

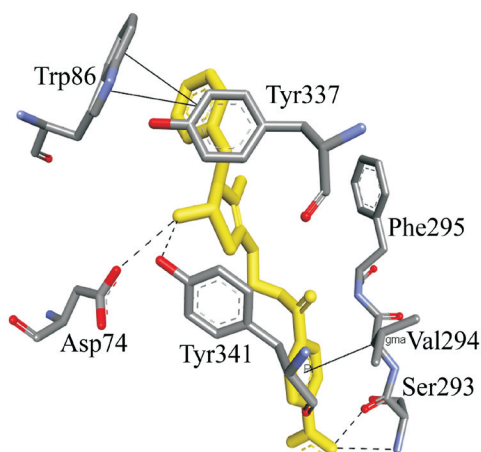


Рис. 3. Спосіб зв'язування нейтрального тетраедричного інтермедіату (похідної сполуки **4**) в активному центрі АХЕ

зол-5-іл)етанолу з 1,7 мл (12 ммоль) триетиламіну в 20 мл сухого дихлорометану додавали краплями розчин 11 ммоль відповідного хлороангідриду в 10 мл дихлорометану при 0-5 °С. Після цього суміш залишали при постійному перемішуванні на ніч і потім додавали 50 мл води. Органічний шар відділяли, промивали водою, сушили над безводним  $Na_2SO_4$ , а розчинник випарювали у вакуумі. Отримані естери вводили в наступну стадію синтезу без додаткової очистки. До розчину 10 ммоль попередньо отриманого естеру в 30 мл безводного ацетонітрилу додавали 15 ммоль відповідного алкілгалогеніду і реакційну суміш кип'ятили впродовж 20 год. Розчинник випарювали, залишок обробляли гарячим ацетоном, отриманий осад відфільтровували і отримували солі **1-8**.

**3,4-Диметил-5-{2-[(4-нітробензоїл)оксі]етил}-1,3-тіазолію йодид (**1**).** Вихід – 65 %. Т. пл. – 185-187 °С;  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 2,50 (с, 3H), 3,47 (т,  $J_{HH} = 5,80$  Гц, 2H), 4,10 (с, 3H), 4,54 (т,  $J_{HH} = 5,80$  Гц, 2H), 8,20 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 8,37 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 10,02 (с, 1H);  $^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ : 11,8, 25,9, 40,8, 65,1, 124,4, 131,2, 133,6, 135,2, 143,9, 150,8, 157,5, 164,5; LC-MS,  $m/z$  (%): 309 (100)  $[M-Cl]^+$ . Знайдено, %: C 38,78%; H 3,43%; N 6,52%.  $C_{14}H_{15}IN_2O_4S$ . Обчислено, %: C 38,72; H 3,48; N 6,45.

**4-Метил-5-{2-[(4-нітробензоїл)оксі]етил}-3-пропіл-1,3-тіазолію бромід (**2**).** Вихід – 58 %. Т. пл. – 135-137 °С;  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 0,87 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 3H), 1,80 (кв,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 2H), 2,50 (с, 3H), 3,47 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 2H), 4,45 (т,  $J_{HH} = 5,10$  Гц, 2H), 4,55 (т,  $J_{HH} = 5,10$  Гц, 2H), 8,18 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 8,36 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 10,14 (с, 1H);  $^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ : 10,9, 11,8, 22,9, 26,2, 54,8, 65,1, 124,3, 124,5, 131,3, 134,4, 135,3, 143,4, 150,9, 157,4, 164,6; LC-MS,  $m/z$  (%): 337 (100)  $[M-Cl]^+$ . Знайдено, %: C 46,34; H 4,69; N 6,82.  $C_{16}H_{19}BrN_2O_4S$ . Обчислено, %: C 46,27; H 4,61; N 6,75.

**3-(2-Етокси-2-оксоетил)-4-метил-5-{2-[(4-нітробензоїл)оксі]етил}-1,3-тіазолію бромід (**3**).** Вихід – 66 %. Т. пл. – 149-151 °С;  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $DMCO-d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 1,22 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 3H), 2,44 (с, 3H),



3,51 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 2H), 4,22 (кв,  $J_{HH} = 5,10$  Гц, 2H), 4,56 (т,  $J_{HH} = 5,10$  Гц, 2H), 5,65 (с, 2H), 8,18 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 8,35 (д,  $J_{HH} = 8,50$  Гц, 2H), 10,17 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 11,7, 14,5, 26,2, 53,8, 62,9, 65,1, 124,5, 131,3, 134,3, 135,3, 144,0, 150,9, 160,3, 164,5, 166,5; LC-MS,  $m/z$  (%): 381 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 44,52; Н 4,23; N 6,15.  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_6\text{S}$ . Обчислено, %: С 44,45; Н 4,17; N 6,10.

**3-Бензил-4-метил-5-{2-[(4-нітробензоїл)оксі]етил}-1,3-тіазолію хлорид (4).** Вихід – 63 %. Т. пл. – 197-199 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 2,38 (с, 3H), 3,46 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 2H), 4,54 (т,  $J_{HH} = 5,35$  Гц, 2H), 5,89 (с, 2H), 7,28-7,40 (м, 5H), 8,12 (д,  $J_{HH} = 8,80$  Гц, 2H), 8,32 (д,  $J_{HH} = 8,80$  Гц, 2H), 10,53 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 12,18, 26,26, 56,38, 65,20, 124,54, 128,43, 129,33, 129,72, 131,27, 133,67, 135,26, 143,54, 150,90, 158,73, 164,58; LC-MS,  $m/z$  (%): 383 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 57,25; Н 4,73; N 6,83.  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ . Обчислено, %: С 57,35; Н 4,57; N 6,69.

**3-Бензил-4-метил-5-{2-[(3-метилбутаноїл)оксі]етил}-1,3-тіазолію хлорид (5).** Вихід – 56 %; Т. пл. – 155-157 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 0,81 (с, 3H), 0,87 (с, 3H), 1,86-1,91 (м, 1H), 2,08-2,10 (м, 2H), 2,36 (с, 3H), 3,27 (ш. с, 2H), 4,21 (ш. с, 2H), 5,92 (с, 2H), 7,32-7,42 (м, 5H), 10,61 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 12,0, 22,5, 25,5, 26,1, 42,9, 56,2, 63,2, 128,4, 129,3, 129,6, 133,6, 135,2, 143,3, 158,5, 172,3; LC-MS,  $m/z$  (%): 320 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 61,15; Н 6,93; N 3,91.  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{ClNO}_2\text{S}$ . Обчислено, %: С 61,09; Н 6,84; N 3,96.

**3-Бензил-5-{2-[(біцикло[2.2.1]гепт-1-ілкарбоніл)оксі]етил}-4-метил-1,3-тіазолію хлорид (6).** Вихід – 63 %; Т. пл. – 184-186 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 1,20-1,69 (м, 10H), 2,22 (с, 1H), 2,35 (с, 3H), 3,27 (т,  $J_{HH} = 5,50$  Гц, 2H), 4,23 (т,  $J_{HH} = 5,50$  Гц, 2H), 5,85 (с, 2H), 7,25-7,49 (м, 5H), 10,39 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 12,1, 26,2, 30,0, 33,1, 37,5, 42,3, 52,0, 56,4, 63,5, 128,4, 129,4, 129,7, 133,6, 135,6, 143,2, 158,4, 175,6; LC-MS,  $m/z$  (%): 358 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 64,43; Н 6,76; N 3,64.  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClNO}_2\text{S}$ . Обчислено, %: С 64,35; Н 6,69; N 3,57.

**3-Бензил-5-{2-[(біцикло[2.2.1]гепт-2-ілкарбоніл)оксі]етил}-4-метил-1,3-тіазолію хлорид (7).** Вихід – 62 %; Т. пл. – 167-169 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 0,90-1,62 (м, 8H), 2,14-2,33 (м, 2H), 2,36 (с, 3H), 2,64-2,72 (м, 1H), 3,25-3,28 (м, 2H), 4,19-4,22 (м, 2H), 5,88 (с, 2H), 7,28-7,46 (м, 5H), 10,49 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 12,0, 24,8, 26,2, 28,6, 29,1, 29,2, 31,9, 34,0, 35,8, 36,6, 36,7, 45,59, 46,0, 56,2, 63,3, 63,4, 128,3, 128,4, 129,3, 129,6, 133,5, 135,4, 143,2, 158,3, 174,2; LC-MS,  $m/z$  (%): 358 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 64,42; Н 6,71; N 3,51.  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClNO}_2\text{S}$ . Обчислено, %: С 64,35; Н 6,69; N 3,57.

**5-[2-(Бензоїлоксі)етил]-3-бензил-4-метил-1,3-тіазолію хлорид (8).** Вихід – 56 %; Т. пл. –

156-158 °С;  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ , м.ч.: 2,38 (с, 3H), 3,42 (т,  $J_{HH} = 5,65$  Гц, 2H), 4,49 (т,  $J_{HH} = 5,65$  Гц, 2H), 5,81 (с, 2H), 7,30-7,91 (м, 10H), 10,47 (с, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ ),  $\delta$ : 12,01, 26,24, 56,27, 64,26, 128,25, 129,32, 129,62, 133,53, 134,04, 135,36, 143,28, 158,48, 165,92; LC-MS,  $m/z$  (%): 340 (100) [M-Cl]<sup>+</sup>. Знайдено, %: С 64,92; Н 5,61; N 3,79.  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClNO}_2\text{S}$ . Обчислено, %: С 64,25; Н 5,39; N 3,75.

**Інгібування AXE *in vitro*.** Ферментний препарат AXE (типу V-S, ліофілізований порошок, 200 одиниць/мг білка) було придбано у фірми Sigma-Aldrich. Інгібувальну здатність сполук **1-8** досліджували з використанням методу Елмана [21]. Перед початком проведення експерименту сполуки розчиняли у чистому диметилсульфоксиді з наступним розбавленням отриманих розчинів бідистильованою водою до необхідної концентрації. Загальний об'єм модельної системи складав 0,5 мл і вміщував 25 мМ фосфатний буфер зі значенням рН 6,5 або 8,0, 1 % DMSO та 0,1 мМ *S*-ацетилтіохолін йодиду. Суміш термостатували впродовж 5 хв при 25 °С, після чого додавали розчин AXE і 10 мкл 50 мМ спиртового розчину 5,5'-дитіобіс-(2-нітробензойної кислоти). Швидкість ферментативної реакції контролювали спектрофотометрично при 412 нм за зростанням концентрації 5-тіо-2-нітробензоату.

**Молекулярний докінг.** Дані кристалічної структури AXE було завантажено із сервера RCSB PDB (PDB код 4EY7 [22]) ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) [23]. Перед початком докінгу в активний центр (ланцюг А) з кристалічної структури ферменту було вилучено інший ланцюг, ліганди та молекули води. Молекулярну структуру сполук було створено в програмі MarvinSketch та оптимізовано напівемпіричним квантово-механічним методом AM1 в програмі MORAC [24]. Файли для докінгу були підготовлені у програмі MGLTools 1.5.6. Програма Autodock 4.2 була використана для моделювання фермент-інгібіторних комплексів з використанням методу генетичного алгоритму Ламарка (LGA) [25]. Для аналізу отриманих моделей зв'язування було застосовано програму Discovery Studio 3.5 (Accelrys, San Diego, CA).

## Висновки

Структурні фрагменти замісників у положеннях 3 і 5 тіазолієвого скафолду забезпечують ефективність інгібування AXE, зв'язуючись в області каталітичного і периферичного аніонних сайтів ферменту. Згідно з результатами молекулярного докінгу гетероциклічний фрагмент інгібітора може бути зафіксований як у формі тіазолієвого іона, так і у формі нейтрального тетраедричного інтермедіату розкриття тіазолієвого циклу.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

## Перелік використаних джерел інформації

1. Martorana, A. Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? / A. Martorana, Z. Esposito, G. Koch // *CNS Neurosci. Ther.* – 2010. – Vol. 16, Issue 4. – P. 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x>
2. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology / M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti et al. // *Curr. Neuropharmacol.* – 2013. – Vol. 11, Issue 3. – P. 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>
3. Sereq, H. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor / H. Sereq, S. Seidman // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – Vol. 2, Issue 4. – P. 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>
4.  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies / M. Bartolini, C. Bertucci, V. Cavrini, V. Andrisano // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 65, Issue 3. – P. 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01514-9)
5. Yurttas, L. Design, synthesis and evaluation of new thiazole-piperazines as acetylcholinesterase inhibitors / L. Yurttas, Z. A. Kaplancikli, Y. Ozkay // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 28, Issue 5. – P. 1040–1047. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.709242>
6. Design and discovery of novel thiazoleacetamide derivatives as anticholinesterase agent for possible role in the management of Alzheimer's / Z.-Q. Sun, L.-X. Tu, F.-J. Zhuo, S.-X. Liu // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 26, Issue 3. – P. 747–750. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.001>
7. Synthesis, structural characterization, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors / V. Pejchal, S. Stepankova, M. Pejchalova et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24, Issue 7. – P. 1560–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.033>
8. Design, synthesis, and biological evaluation of 5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives as a new type of acetylcholinesterase inhibitors / H. Zhi, L. Chen, L. Zhang et al. // *Arkivoc.* – 2008. – Vol. 2008, Issue 13. – P. 266–277. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0009.d29>
9. Synthesis and biological evaluation of 7H-thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazin-7-one derivatives as dual binding site acetylcholinesterase inhibitors / S. Liu, R. Shang, L. Shi et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 81. – P. 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.020>
10. Manzetti, S. Thiamin function, metabolism, uptake, and transport / S. Manzetti, J. Zhang, D. van der Spoel // *Biochemistry.* – 2014. – Vol. 53, Issue 5. – P. 821–835. <https://doi.org/10.1021/bi401618y>
11. Bunik, V. I. Benefits of thiamin (vitamin B<sub>1</sub>) administration in neurodegenerative diseases may be due to both the coenzyme and non-coenzyme roles of thiamin / V. I. Bunik // *J. Alzheimer's Dis. Parkinson.* – 2014. – Vol. 4, Issue 6. – P. 173–177. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000173>
12. Alspach, J. D. Inhibition of acetylcholinesterase by thiamine. A structure-function study / J. D. Alspach, L. L. Ingraham // *J. Med. Chem.* – 1977. – Vol. 20, Issue 1. – P. 161–164.
13. N-Phenacylthiazolium salts as inhibitors of cholinesterases / A. Ocheretniuk, O. Kobzar, I. Mischenko, A. Vovk // *French-Ukrainian J. Chem.* – 2017. – Vol. 5, Issue 2. – P. 1–14. <https://doi.org/10.17721/fujcV5I2P1-14>
14. Synthesis and the activity assessment of adamantyl-containing thiazolium inhibitors of butyrylcholinesterase / A. D. Ocheretniuk, O. L. Kobzar, O. P. Kozachenko et al. // *Журн. орг. та фармац. хімії.* – 2017. – Т. 15, вип. 4 (60). – P. 48–55. <https://doi.org/10.24959/opfj.17.926>
15. Buchman, E. R. Studies of crystalline Vitamin B<sub>1</sub>.<sup>1</sup> X. Sulfite cleavage. III. Chemistry of the basic product / E. R. Buchman, R. R. Williams, J. C. Keresztesy // *J. Am. Chem. Soc.* – 1935. – Vol. 57, Issue 10. – P. 1849–1851. <https://doi.org/10.1021/ja01313a026>
16. Sano, T. Vergleich der wirksamkeit der verschiedenen aureninester von organischen sauren / T. Sano // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1944. – Vol. 19, Issue 11. – P. 185–205. <https://doi.org/10.1246/bcsj.19.185>
17. Matsukawa, T. Studies on vitamin-B<sub>1</sub> and its related compounds 13. Syntheses vitamin-B<sub>1</sub>-esters / T. Matsukawa, S. Yurugi // *Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jpn.)* – 1951. – Vol. 71, Issue 2. – P. 69–72.
18. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors / H. Sugimoto, Y. Yamanishi, Y. Iimura, Y. Kawakami // *Curr. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 7, Issue 3. – P. 303–339. <https://doi.org/10.2174/0929867003375191>
19. Mechanism of hydrolysis of a thiazolium ion: general acid-base catalysis of the breakdown of the tetrahedral addition intermediate / M. W. Washabaugh, Ch. C. Yang, J. T. Stivers, K.-S. Lee // *Bioorg. Chem.* – 1992. – Vol. 20, Issue 4. – P. 296–312. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(92\)90040-A](https://doi.org/10.1016/0045-2068(92)90040-A)
20. A thiamine-dependent enzyme utilizes an active tetrahedral intermediate in vitamin K biosynthesis / H. Song, C. Dong, M. Qin et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – Vol. 138, Issue 23. – P. 7244–7247. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03437>
21. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. jr. Andres, R.M. Featherstone // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – Vol. 7, Issue 2. – P. 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
22. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands / J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55, Issue 22. – P. 10282–10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>
23. The Protein Data Bank / H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, Issue 1. – P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
24. Stewart, J. J. P. MOPAC2016. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. [Електронний ресурс]. – Available at : <http://OpenMOPAC.net>
25. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function / G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday et al. // *J. Comput. Chem.* – 1998. – Vol. 19, Issue 14. – P. 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b)

## References

1. Martorana, A., Esposito, Z., Koch, G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16 (4), 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x>
2. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11 (3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>
3. Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>
4. Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., & Andrisano, V. (2003).  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical Pharmacology*, 65 (3), 407–416. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01514-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01514-9)
5. Yurttas, L., Kaplancikli, Z. A., & Özkay, Y. (2012). Design, synthesis and evaluation of new thiazole-piperazines as acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28 (5), 1040–1047. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.709242>
6. Sun, Z.-Q., Tu, L.-X., Zhuo, F.-J., & Liu, S.-X. (2016). Design and discovery of Novel Thiazole acetamide derivatives as anticholinesterase agent for possible role in the management of Alzheimer's. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26 (3), 747–750. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.001>
7. Pejchal, V., Štěpánková, Š., Pejchalová, M., Královce, K., Havelek, R., Růžičková, Z., ... Lepšík, M. (2016). Synthesis, structural characterization, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24 (7), 1560–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.033>
8. Zhi, H., Chen, L., Zhang, L., Liu, S., Wan, D. C. C., Lin, H., Hu, C. (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of 5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives as a new type of acetylcholinesterase inhibitors. *Arkivoc*, 2008 (13), 266–277. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0009.d29>
9. Liu, S., Shang, R., Shi, L., Wan, D. C.-C., & Lin, H. (2014). Synthesis and biological evaluation of 7H-thiazolo[3,2-b]-1,2,4-triazin-7-one derivatives as dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.020>

10. Manzetti, S., Zhang, J., & van der Spoel, D. (2014). Thiamin Function, Metabolism, Uptake, and Transport. *Biochemistry*, 53 (5), 821–835. <https://doi.org/10.1021/bi401618y>
11. Bunik, V. I. (2014). Benefits of Thiamin (Vitamin B1) Administration in Neurodegenerative Diseases may be Due to Both the Coenzyme and Non-coenzyme Roles of Thiamin. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 4 (6). <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000173>
12. Alspach, J. D., Ingraham, L. L. (1977). Inhibition of acetylcholinesterase by thiamine. A structure–function study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 20 (1), 161–164.
13. Ocheretniuk, A., Kobzar, O., Mischenko, I., ... Vovk, A. (2017). N-Phenacylthiazolium Salts as Inhibitors of Cholinesterases. *French–Ukrainian Journal of Chemistry*, 5(2), 1–14. <https://doi.org/10.17721/fujcv5i2p1-14>
14. Ocheretniuk, A. D., Kobzar, O. L., Kozachenko, O. P., Brovarets, V. S., & Vovk, A. I. (2017). Synthesis and the activity assessment of adamantylcontaining thiazolium inhibitors of butyrylcholinesterase. *Журнал органічної та фармацевтичної хімії*, 15 (4(60)), 48–55. <https://doi.org/10.24959/ophcj.17.926>
15. Buchman, E. R., Williams, R. R., & Keresztesy, J. C. (1935). Studies of Crystalline Vitamin B1.1X. Sulfite Cleavage. III. Chemistry of the Basic Product. *Journal of the American Chemical Society*, 57 (10), 1849–1851. <https://doi.org/10.1021/ja01313a026>
16. Sano, T. (1944). Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen Aneurinester von organischen Säuren. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 19 (11), 185–205. <https://doi.org/10.1246/bcsj.19.185>
17. Matsukawa, T., Yurugi, S. (1951). Studies on vitamin–B<sub>1</sub> and its related compounds 13. Syntheses vitamin–B<sub>1</sub>–esters. *Yakugaku Zasshi (Journal of the Pharmaceutical Society of Japan)*, 71 (2), 69–72.
18. Sugimoto, H., Yamanish, Y., Iimura, Y., & Kawakami, Y. (2000). Donepezil Hydrochloride (E2020) and Other Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 7 (3), 303–339. <https://doi.org/10.2174/0929867003375191>
19. Washabaugh, M. W., Yang, C. C., Stivers, J. T., & Lee, K.-S. (1992). Mechanism of hydrolysis of a thiazolium ion: General acid–base catalysis of the breakdown of the tetrahedral addition intermediate. *Bioorganic Chemistry*, 20 (4), 296–312. [https://doi.org/10.1016/0045-2068\(92\)90040-A](https://doi.org/10.1016/0045-2068(92)90040-A)
20. Song, H., Dong, C., Qin, M., Chen, Y., Sun, Y., Liu, J., ... Guo, Z. (2016). A Thiamine–Dependent Enzyme Utilizes an Active Tetrahedral Intermediate in Vitamin K Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 138 (23), 7244–7247. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03437>
21. Ellman, G. L., Courtney, K. D., jr. Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
22. Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., ... Height, J. J. (2012). Structures of Human Acetylcholinesterase in Complex with Pharmacologically Important Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55 (22), 10282–10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>
23. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28 (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
24. Stewart, J. J. P. (2016). MOPAC2016. *Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA*. Available at: <http://OpenMOPAC.net>
25. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19 (14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(19981115\)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b)

Надійшла до редакції 08.04.2019 р.