

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

**Syntéza derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny
jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů
Bakalářská práce**

Autor: Gabriela Nosková
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin
Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Hradec Králové

Duben 2020

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Gabriela Nosková
Osobní číslo: S17CH045BP
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin
Téma práce: Syntéza derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů
Zadávající katedra: Katedra chemie

Zásady pro vypracování

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity sloučenin využívaných jako inhibitory NMDA receptorů popsanych v odborné literatuře.
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připraveného derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny, který bude následně poskytnut na biologické testování jako potenciální inhibitor NMDA receptorů.
3. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Dávid Malíňák, Ph.D.
Katedra chemie

Konzultant bakalářské práce: Mgr. Žofia Chrienová
Katedra chemie

Oponent bakalářské práce: Ing. Jana Svobodová, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 26. června 2019
Termín odevzdání bakalářské práce: 27. dubna 2020

LS.

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.
děkan

prof. PharmDr. Kamil Musilek, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny zdroje, ze kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne 27. 4. 2020

Gabriela Nosková

Poděkování:

Chtěla bych velice poděkovat Mgr. Žofii Chrienové za pomoc při práci v laboratoři a za cenné rady a připomínky k tomuto textu. Velice děkuji také RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD. především za pomoc při zpracování výsledků práce a předání cenných zkušeností. Dále děkuji PharmDr. Rudolfu Andrášovi, PhD. za měření hmotnostních spekter a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za měření NMR spekter. Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové a byla podpořena projektem OP VVV (PharmaBrain; reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007444).

Anotace

Ve své bakalářské práci se zabývám syntézou derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů. Teoretická část je zaměřena na rozdělení a popis glutamátových receptorů s důrazem na NMDA receptory. Představuji také současně využívaná léčiva, jejichž terapeutickými cíli jsou NMDA receptory. Praktická část je věnována syntéze derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny, který bude dále podroben biologickému testování *in vitro* jako potenciální inhibitor NMDA receptorů. Pro charakterizaci připravovaných sloučenin byly použity analytické metody NMR a MS.

Klíčová slova

NMDA receptory, glutamát, inhibice, ifenprodil, memantin

Annotation

In my bachelor thesis, I deal with a synthesis of a derivative of piperidine-4-carboxylic acid as a potential inhibitor of NMDA receptors. The theoretical part is focused on the division and specification of glutamate receptors with an emphasis on NMDA receptors. I also present currently used drugs whose therapeutic targets are NMDA receptors. The practical part is dedicated to the synthesis of a derivative of piperidine-4-carboxylic acid, which will undergo further biological testing *in vitro* as a potential inhibitor of NMDA receptors. For the characterization of prepared compounds, analytical methods NMR and MS were used.

Keywords

NMDA receptors, glutamate, inhibition, ifenprodil, memantine

Obsah

Úvod	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Neurotransmitterové receptory.....	12
1.2 Glutamát jako neurotransmitter	13
1.2.1 Uvolňování glutamátu.....	14
1.2.2 Glutamátové transportéry.....	14
1.3 Glutamátové receptory.....	15
1.3.1 AMPA receptory	15
1.3.2 Kainátové receptory	16
1.3.3 NMDA receptory	17
1.3.3.1 Struktura NMDA receptorů	17
1.3.3.2 Funkční domény v NMDA receptorových podjednotkách.....	18
1.3.3.3 Sloučeniny vázající se na ATD.....	18
1.3.3.4 Sloučeniny vázající se na LBD.....	20
1.3.3.5 NMDA receptory jako terapeutické cíle.....	22
1.3.3.6 Memantin a Alzheimerova choroba	23
2 Design.....	25
3 Cíle práce	26
4 Výsledky a diskuse	27
4.1 Příprava 4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonátu .	27
4.2 Příprava <i>terc</i> -butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylátu	28
4.3 Příprava benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylátu.....	29
4.4 Příprava benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu	30
4.5 Příprava benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu	31
4.6 Příprava 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny	32
5 Experimentální část.....	35
5.1 Postup přípravy 4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonátu.....	35
5.2 Postup přípravy <i>terc</i> -butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylátu	36

5.3 Postup přípravy benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylátu ..	37
5.4 Postup přípravy benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu	38
5.5 Postup přípravy benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu	39
5.6 Postup přípravy 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny	40
Závěr.....	41
Použitá literatura	42

Seznam zkratek použitých v textu

5,7-DCKA	5,7-dichlorokynurenová kyselina
7-CKA	7-chlorokynurenová kyselina
A _d N	Nukleofilní adice
ACh	Acetylcholin
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATD	Amino-terminální doména
ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CGP 61594	4-[2-(4-azidofenyl)acetylamino]-5,7-dichlor-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-karboxylová kyselina
CNS	Centrální nervová soustava
CTD	C-terminální doména
DCM	Dichlormethan
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
EAAT	Excitační aminokyselinové transportéry
Eq	Ekvivalent
EtOAc	Ethylacetát
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GDP	Guanosindifosfát
Glu	Glutamát
GluN	Glutamin
GPCRs	Receptory spojené s G-proteiny
GTP	Guanosintrifosfát
LBD	Ligand-vázající doména
LGICRs	Receptory spojené s ligandem řízenými iontovými kanály
L. t.	Laboratorní teplota
MeOH	Methanol
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NVP-AAM077	[(R)-[(S)-1-(4-bromfenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-5-yl)-methyl]-fosfonová kyselina
pTsOH	p-toluensulfonová kyselina
(R)-AP5	(R)-2-amino-5-fosfopentanoát
(R)-AP7	(R)-2-amino-7-fosfoheptanoát
(R)-CPP	(R)-4-(3-fosfopropyl)piperazin-2-karboxylová kyselina
S _N 2	Nukleofilní bimolekulární substituce
S _N Ac	Nukleofilní acylová substituce
TBOA	Threo-β-benzyloxyaspartát
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran

TMD

VGLUTs

xCT

Transmembránová doména

Vezikulární glutamátové transportéry

Glutamát-cystinové výměnné transportéry

Úvod

Komplexní funkce nervové soustavy je závislá na schopnosti rychlého přenosu informací v rámci jejích jednotlivých složek. Za tento rychlý přenos jsou zodpovědné specifické buňky – neurony, které jsou svým tvarem i vlastnostmi uzpůsobeny pro tuto úlohu. Komunikace mezi nervovými buňkami v centrální nervové soustavě (CNS) je zabezpečena elektrickým a chemickým přenosem signálu. Chemický přenos zahrnuje uvolňování neurotransmiterů z jednoho neuronu a změnu aktivity druhého. Chemická komunikace probíhá na synapsích, které se skládají z presynaptického neuronu, synaptické štěrbině a postsynaptického neuronu. V axonálním zakončení presynaptického neuronu se nacházejí vezikuly obsahující neurotransmitery, které se při zvýšení koncentrace Ca^{2+} uvolňují do synaptické štěrbině, vážou se na neurotransmiterové receptory umístěné na povrchu membrány postsynaptického neuronu a svou vazbou mění jejich funkci [1].

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena především na neurotransmiter glutamát a jeho funkci v CNS a na N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory, které se významně podílejí na vzniku neurodegenerativních chorob, kam patří mimo jiné také Alzheimerova choroba [2].

Cílem této bakalářské práce je příprava derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů. Připravená sloučenina je kombinací modifikované molekuly ifenprodilu, prokázaného inhibitoru NMDA receptorů, a derivátu kyseliny γ -aminomáselné (GABA), přirozeného agonisty inhibičních receptorů v CNS.

1 Teoretická část

1.1 Neurotransmitterové receptory

Neurotransmitterové receptory se dělí do dvou hlavních skupin: receptory spojené s ligandem řízenými iontovými kanály (LGICRs) (Obrázek 1A) a receptory spojené s G-proteiny (GPCRs) (Obrázek 1B) [3].

LGICRs jsou proteiny specializované na okamžitou přeměnu chemického signálu neurotransmiterů na signál elektrický [3, 4]. Extracelulární část LGICRs obsahuje vazebné místo, které slouží k navázání neurotransmiteru. Část zanořená do buněčné membrány tvoří iontový kanál, skrze který mohou přes membránu prostupovat ionty [1]. Účinek LGICRs na funkci postsynaptického neuronu po navázání ligandu může být excitační nebo inhibiční v závislosti na povaze iontů, které přes otevřený kanál procházejí [3]. Excitační účinek poskytují LGICRs propouštějící přes membránu kladně nabitě ionty (např. influx Na^+). Naopak inhibiční účinek mají obvykle LGICRs propustné pro záporně nabitě ionty (např. influx Cl^-) [1].

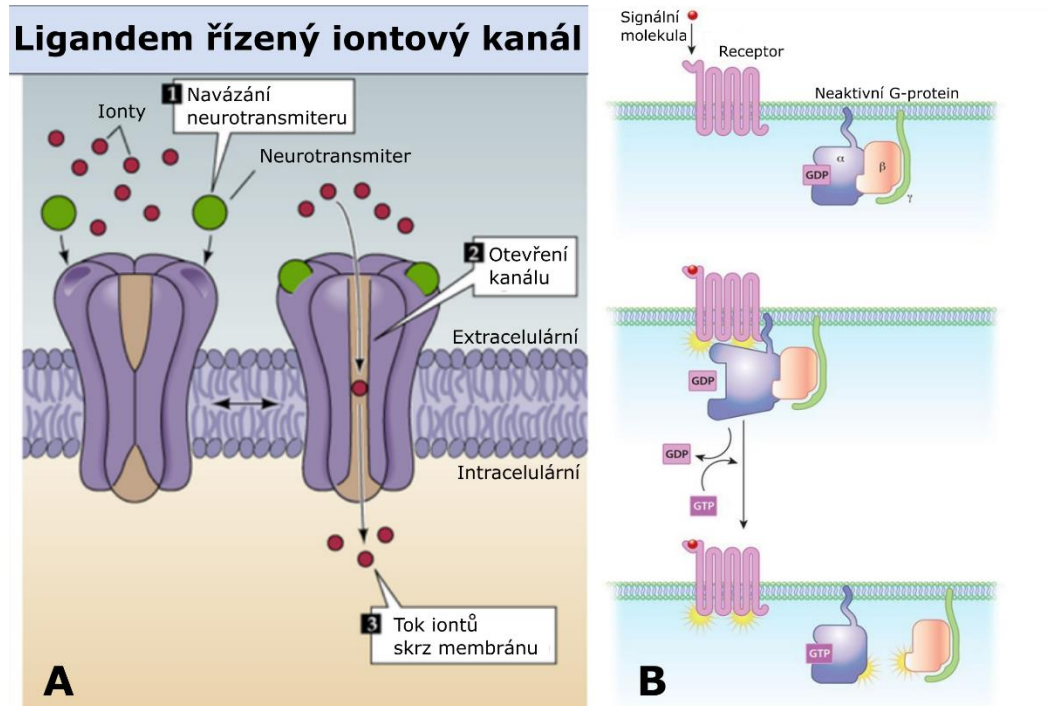
Mezi LGICRs s excitačním účinkem patří například nikotinové acetylcholinové receptory, které po navázání acetylcholinu (ACh) do vazebného místa receptoru umožňují vstup Na^+ , K^+ nebo Ca^{2+} do buňky [5]. K LGICRs s inhibičním účinkem se pak řadí například receptory pro GABA, které zajišťují průchod Cl^- do buňky [6].

GPCRs jsou proteiny, které na sebe váží molekuly neurotransmiterů a následně umožňují průběh intracelulárních biochemických reakcí ovlivňujících řadu buněčných funkcí [3, 4]. V případě GPCRs se neurotransmitery váží do vazebného místa v extracelulární části proteinu procházejícího přes membránu, který je v intracelulárním prostoru připojený na G-protein. G-proteiny jsou intracelulární proteiny schopné vázat nukleotid guanosin trifosfát (GTP) v aktivovaném stavu a guanosin difosfát (GDP) v inaktivovaném stavu. Skládají se ze tří samostatných podjednotek: α , β , a γ . Po navázání neurotransmiteru na receptorový protein dochází k aktivaci G-proteinu, tedy k výměně GDP za GTP a následnému oddělení α -podjednotky a β/γ -podjednotky, které interagují s dalšími proteiny uvnitř buňky. Například stimulační α -podjednotka aktivuje enzym adenylcyklastu, která přeměňuje adenosin trifosfát (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Ten působí na další enzymy upravující funkci celulárních proteinů mechanismem fosforylace. Dalším příkladem je přímá vazba β/γ -podjednotky na iontový kanál zajišťující selektivní influx K^+ , což vyvolává inhibici neuronů [1].

Podobně jako LGICRs i GPCRs mají excitační a inhibiční účinky. Liší se však v rychlosti nástupu a délce trvání účinku. GPCRs vyvolávají odpověď pomaleji, ale

jejich účinek trvá déle, což je dáno větším počtem kroků potřebných k vyvolání odpovědi [1].

Příkladem GPCRs jsou serotoninové receptory [7] nebo opioidní receptory [8].



Obrázek 1: **A:** Receptory spojené s ligandem řízenými iontovými kanály. Navázání ligandu do vazebného místa iontového kanálu vyvolá změnu konformace proteinu a následné otevření iontového kanálu, což umožňuje vstup iontů přes buněčnou membránu. **B:** Receptory spojené s G-proteiny. Navázání ligandu na receptorový protein aktivuje G-protein, jehož podjednotky se oddělí a interagují s dalšími proteiny v buňce. Převzato a upraveno z [9, 10].

1.2 Glutamát jako neurotransmitter

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem nervových buněk savců, má tedy klíčovou roli v mnoha funkcích mozku (např. učení a paměť [11]), ale také je spojován s řadou neurologických onemocnění [7]. Z toho vyplývá, že přítomnost glutamátu je ve správných koncentracích, ve správný čas a na správném místě nezbytná pro funkci nervového systému. Příliš vysoké koncentrace glutamátu vedou k nadměrné aktivaci glutamátových receptorů, což může zapříčinit až smrt nervových buněk v patologickém procesu excitotoxicity [12]. Glutamátová excitotoxicita je například spojena s ischemií [13], dále s neurodegenerativními chorobami jako amyotrofická laterální skleróza [14], roztroušená skleróza [15], Parkinsonova choroba [16] nebo Alzheimerova choroba [2]. Naopak nedostatek glutamátu je spojován například s výskytem schizofrenie [17]. Regulace uvolňování a degradace glutamátu jsou tedy důležité faktory pro udržování jeho fyziologické hladiny v organismu.

1.2.1 Uvolňování glutamátu

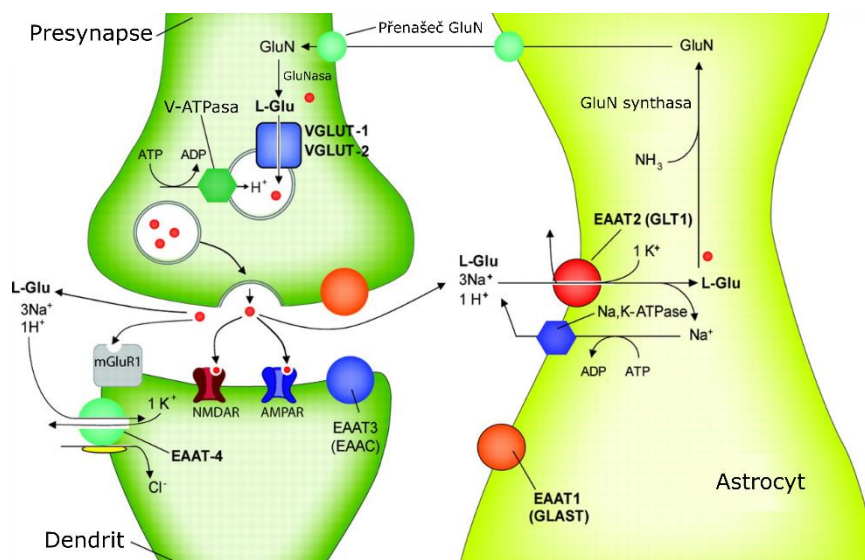
Glutamát je kontinuálně uvolňován do extracelulárního prostoru. Bylo zjištěno, že použitím inhibitorů glutamátové absorpce, například threo- β -benzyloxyaspartátu (TBOA), se začne glutamát v extracelulárním prostoru okamžitě hromadit [18]. Největší pozornost je věnována uvolňování glutamátu z nervových zakončení exocytózou z vezikul. Dalším způsobem je glutamátovými transportéry zprostředkovaná výměna glutamátu za jinou excitační aminokyselinu, jako je L-aspartát, D-aspartát nebo L-cysteát [19]. K uvolňování glutamátu mohou také sloužit glutamát-cystinové výměnné transportéry (xCT), které se nacházejí v astrocytech. Zajišťují přenos cystinu do buňky výměnou za intracelulární glutamát, jedná se tedy o antiport [20].

1.2.2 Glutamátové transportéry

Neurotransmitery jsou krátce po jejich uvolnění odstraňovány ze synapsí, což minimalizuje dobu jejich interakce s receptory, a jsou produkovány krátké přerušované synaptické signály. Ve většině synapsí v mozku se nacházejí specifické proteiny známé jako neurotransmiterové transportéry (Obrázek 2), které protínají buněčnou membránu a zajišťují přenos neurotransmiterů ze synapsí do intracelulárního prostoru buněk. Často tento přenos probíhá na presynaptickém terminálu, kde jsou neurotransmitery uzavírány do vezikul [3, 4].

Prvním typem neurotransmiterových transportérů jsou excitační aminokyselinové transportéry (EAAT). Dělí se na pět subtypů (EAAT1-5) na základě charakteristik ovlivňujících jejich schopnost regulovat koncentraci glutamátu [21]. EAAT se nacházejí v různých částech mozku i v různých buňkách (např. v astrocytech mozečku [22], vnitřního ucha [23], sítnice [24], předního mozku a hipokampu [22], v dendritech a tělech neuronů v mozečku, hipokampu a bazálních gangliích [25] nebo v Purkyňových buňkách v mozečku [26]).

Dalším typem neurotransmiterových transportérů jsou vezikulární glutamátové transportéry (VGLUTs), kam se řadí tři téměř homologické proteiny VGLUT1-3 [27]. Nacházejí se například v neuronech entorhinální kůry, piriformní kůry, amygdaly [27], IV. a VI. vrstvy mozkové kůry, thalamu, mozkového kmene [28], v Purkyňových buňkách [29] nebo v neuronech II. a VI. vrstvy mozkové kůry [30]. VGLUTs všech tří typů můžeme tedy najít v neuronech různých částí CNS, kde se podílejí na ukládání glutamátu do vezikul, a mají tak důležitou roli v excitační transmissi [30].



Obrázek 2: Transport glutamátu (Glu) pomocí VGLUTs a EAAT. V presynaptickém neuronu dochází k přeměně glutaminu (GluN) na Glu pomocí enzymu glutaminasy. VGLUTs zajišťují transport glutamátu do vezikul. Hnací silou je protonový elektrochemický gradient získaný hydrolyzou ATP. Z vezikul je Glu uvolněn do synaptické štěrby. Následně se váže na receptory v postsynaptické membráně (např. NMDA receptory nebo AMPA receptory). EAAT zajišťují sprzęžený symport Glu s 3 Na⁺ a 1 H⁺ a antiport s K⁺ [31], čímž snižují extracelulární koncentraci Glu. Umožňují také nespřážený transport Cl⁻ [32]. Transport Glu do astrocytů zajišťují transportéry EAAT 1-2. V astrocytech pak dochází k přeměně Glu na GluN, který je přenesen do presynaptického neuronu a zpětně přeměněn na Glu [20]. Převzato a upraveno z [33].

1.3 Glutamátové receptory

Jak již bylo zmíněno dříve, glutamát jako neurotransmitter hraje důležitou roli v celé řadě mozkových funkcí. Jeho excitační účinek má za následek aktivaci tří hlavních subtypů LGICRs: receptorů α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny (AMPA), kainátových a NMDA receptorů [3].

Schopnost glutamátu vázat se na různé proteiny (transportéry, receptory, enzymy) je dána vysokou flexibilitou jeho molekuly, která umožňuje existenci několika konformací [34]. Aktivační místa glutamátových receptorů se nacházejí na povrchu buněk. K aktivaci tedy může docházet pouze z extracelulárního prostoru a aktivitu glutamátových receptorů lze regulovat uvolňováním glutamátu do extracelulární tekutiny a jeho následným odstraněním [12].

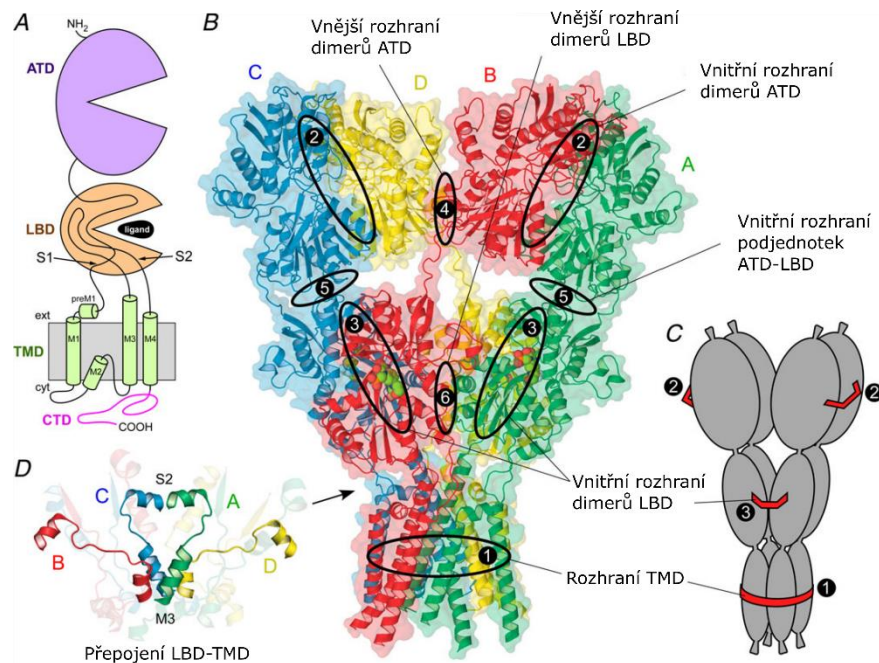
1.3.1 AMPA receptory

AMPA receptory, kainátové receptory a NMDA receptory jsou asi z 25 % homologní. Patří do stejné skupiny receptorů – ionotropní glutamátové receptory [35].

AMPA receptory (Obrázek 3) jsou tetramerní membránové proteiny skládající se z různých kombinací podjednotek GluA1-4 [36]. Všechny AMPA receptorové iontové kanály bez ohledu na přítomné podjednotky jsou propustné pro Na⁺ a K⁺, ale pokud v tetramerním uspořádání chybí GluA2 podjednotka, iontový

kanál je nepropustný pro Ca^{2+} [37]. Aktivace AMPA receptorů zajišťuje mimo jiné také odstranění Mg^{2+} blokujících NMDA receptory [35].

Neurologická onemocnění přímo i nepřímo ovlivňují synaptické funkce v mozku různými mechanismy, ale výsledkem je vždy změna synaptického přenosu a/nebo plasticity. Jelikož AMPA receptory jsou aktivovány excitačním neurotransmiterem glutamát, využívají se jako cíle při vývoji terapeutických přípravků pro léčbu neurodegenerativních onemocnění nebo drogových závislostí [38].



Obrázek 3: Struktura AMPA receptoru. AMPA receptor má tvar písmene Y. Extracelulární část tvoří amino-terminální doména (ATD) a ligand-vázací doména (LBD) zprostředkovávající vazbu Glu. Každá LBD podjednotka je tvořena dvěma polypeptidovými řetězci volně vázanými na transmembránovou doménu (TMD). TMD tvoří tři membránu protínající šroubovice (M1, M3 a M4) [39]. Převzato a upraveno z [36].

1.3.2 Kainátové receptory

Kainátové receptory vykazují určitou podobnost s AMPA receptory z hlediska jejich propustnosti pro ionty po přímém navázání glutamátu. Podobně jako AMPA receptory postrádající GluA2 podjednotku jsou i kainátové receptory většinou nepropustné pro Ca^{2+} a zajišťují odstranění Mg^{2+} blokace NMDA receptorů [35]. Strukturně se kainátové receptory také podobají AMPA receptorům. Skládají se z pěti podjednotek GluK1-5. Všechny podjednotky mají rozsáhlou extracelulární část tvořenou ATD a LBD, tři transmembránové α -šroubovice a intracelulární C-terminální doménu (CTD) [40].

Na rozdíl od AMPA receptorů, lokalizovaných především v postsynaptické membráně, se kainátové receptory nacházejí v presynaptické [41] i v postsynaptické membráně [42]. Postsynaptické kainátové receptory jsou přítomné například v GABAergních interneuronech hipokampu, mozkové kůry či amygdaly a dále

také v neuronech hipokampálních mechových vláken v synapsích pyramidových buněk vlastního hipokampu. Presynaptické kainátové receptory se objevují v GABAergních i glutamerních synapsích, kde usnadňují nebo inhibují uvolnění neurotransmiterů [43].

1.3.3 NMDA receptory

Dalším a neméně významným zástupcem ze skupiny ionotropních glutamátových receptorů jsou NMDA receptory pojmenované podle jejich afinity k NMDA. Jsou hojně rozšířené v CNS, kde mají důležitou úlohu v excitačních synaptických přenosech. Kvůli jejich spojení s řadou neurologických onemocnění jsou také cílem mnoha terapeutických výzkumů. Existuje několik subtypů NMDA receptorů, které se odlišují kompozicí jednotlivých podjednotek, biofyzikálními a farmakologickými vlastnostmi [44].

1.3.3.1 Struktura NMDA receptorů

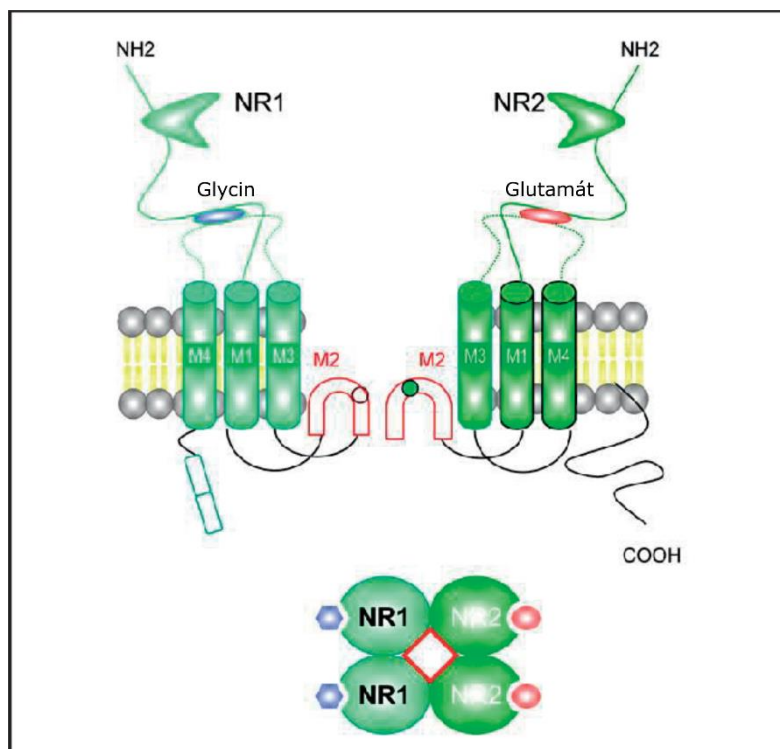
NMDA receptory (Obrázek 4) jsou heteromerní komplexy složené z různých podjednotek. Tyto podjednotky se dělí na tři subtypy – NR1-3.

Dvě NR1 podjednotky tvoří dohromady iontový kanál, který vykazuje všechny klasické vlastnosti NMDA receptorů, jako jsou aktivace glutamátem a glycinem, inaktivace Zn^{2+} , blokace Mg^{2+} , interakce s polyaminy nebo pH senzitivita [35].

NR2 podjednotky mají spíše regulační a rozlišovací funkci. Například regulují vlastnosti NR1 iontových kanálů [35] ve II.-IV. vrstvě mozkové kůry [45], v mozečku [46] nebo v mezimozku [47].

NR3 podjednotky se objevují ve dvou isoformách: NR3A, která má své zastoupení po celé CNS, a NR3B, která je limitována primárně na motorické neurony [35].

Strukturně mají NMDA receptory většinou podobu tetramerů složených nejčastěji ze dvou NR1 a dvou NR2 podjednotek. Ne vždy však mají NMDA receptory jednoduché binární uspořádání jedné NR1 s jedním typem NR2. Některé receptory mohou obsahovat dva typy NR2. Tato triheteromerní uspořádání lze pozorovat v mnoha mozkových oddílech, například NR1/NR2A/NR2B v neuronech předního mozku [48] nebo NR1/NR2A/NR2C v neuronech mozečku [49]. Mimo běžně se vyskytující NR1/NR2 receptory lze pak méně často pozorovat receptory obsahující NR3 podjednotky. Takové receptory mají podobu ternárních komplexů NR1/NR2/NR3 [50].



Obrázek 4: Struktura NMDA receptoru. Extracelulární oblast NMDA receptoru tvoří ATD a LBD. TMD tvoří tři transmembránové segmenty (M1, 3 a 4) a znovu-vstupující pórová smyčka (M2). CTD se nachází v intracelulárním prostoru [44]. Převzato a upraveno z [51].

1.3.3.2 Funkční domény v NMDA receptorových podjednotkách

Extracelulární oblast receptoru je tvořena dvěma doménami: LBD a ATD. LBD obsahuje vazebné místo pro agonisty NMDA receptorů. Aktivace NMDA receptorů vyžaduje současné navázání dvou agonistů: glutamátu, který se váže do vazebného místa NR2 podjednotky [52], a glycinu (nebo D-serinu), který se váže do vazebného místa NR1 nebo NR3 podjednotky [53].

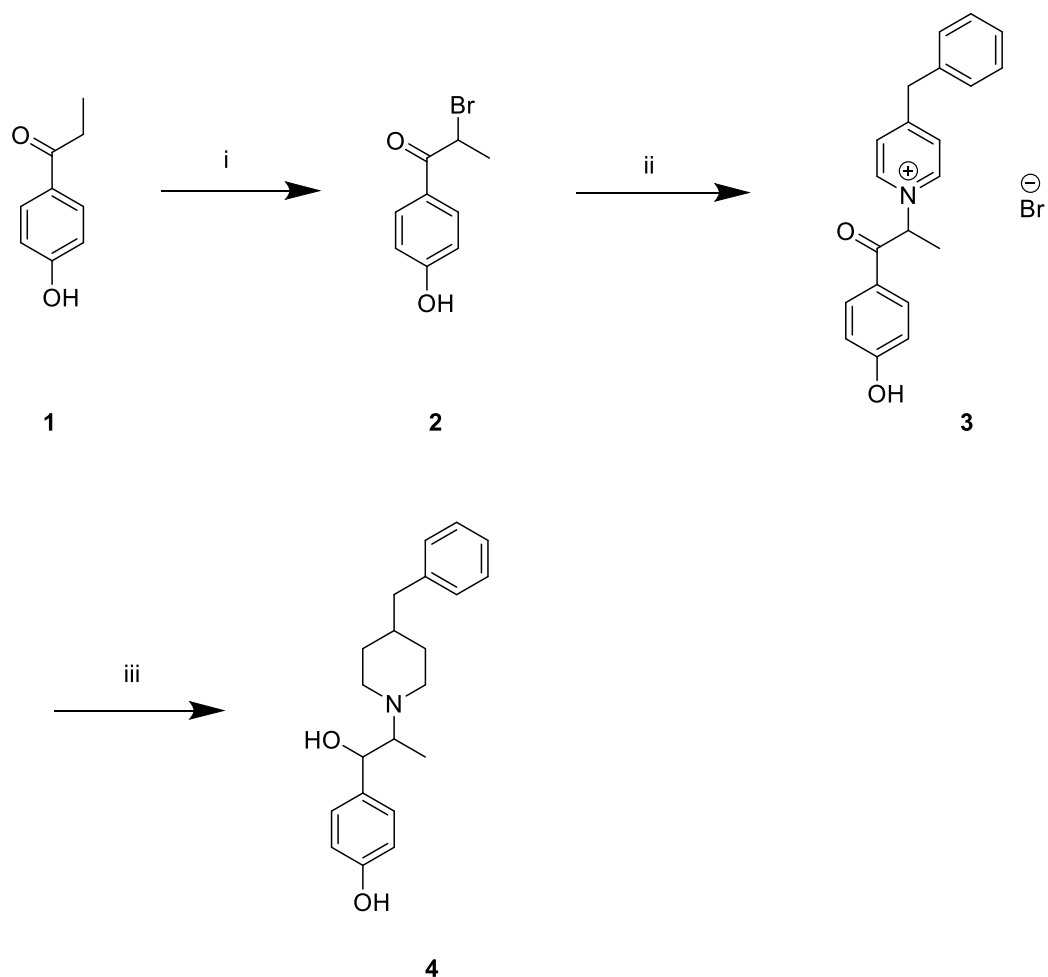
ATD v podjednotkách NR2A a NR2B obsahuje vazebná místa pro alosterické inhibitory, jako jsou Zn^{2+} nebo ifenprodil a jeho deriváty [44].

1.3.3.3 Sloučeniny vázající se na ATD

Zn^{2+} vykazuje vyšší afinitu k NR2A než k NR2B [54]. Jelikož jsou Zn^{2+} přítomné v mnoha glutamatergických synapsích, lze je považovat za endogenní alosterické modulatory NMDA receptorů [55].

Ifenprodil (**4**) a jeho deriváty jsou selektivními antagonisty NR2B [56]. Syntéza **4** sestává z několika kroků. Výchozí látkou je 4'-hydroxypropiofenon (**1**), který v prvním kroku reaguje s bromem v dioxanu jako rozpouštědle při laboratorní teplotě (l. t.). Dochází k bromaci v α -poloze za vzniku 2-brom-1-(4-hydroxyfenyl)propan-1-onu (**2**) a HBr. Reakce probíhá 30 min pod dusíkovou atmosférou. V dalším kroku dochází ke kondenzaci sloučeniny **2** s 4-benzylpyridinem v methanolu (MeOH) jako rozpouštědle a reakční směs je zahřívána pod refluxem za

vzniku 4-benzyl-1-[1-(4-hydroxyfenylkarbonyl)ethyl]pyridinium bromidu (**3**). Posledním krokem je katalytická hydrogenace, kdy působením katalyzátoru Pd/C (5 %) dochází k redukci sloučeniny **3** na ifenprodil (**4**) při teplotě 90-95 °C a tlaku 4,9 MPa. Reakce probíhá 8 h a celková výtěžnost syntézy je 81 % po třech krocích (Schéma 1) [57].



Reagenty a podmínky:

i) Br₂, dioxan, N₂, l. t., 30 min; ii) 4-benzylpyridin, MeOH, 65 °C, 5 h; iii) H₂, 5 % Pd/C, 90-95 °C, 8 h, 4,9 MPa, 81 % (po třech krocích).

Schéma 1: Syntéza ifenprodilu (**4**).

Základ molekuly ifenprodilu tvoří dvě asymetrická (stereogenní) centra, která dávají vzniknout čtyřem stereoizomerním formám. Při testování těchto stereoizomerů bylo zjištěno, že (-)-threo-ifenprodil má nejvyšší NMDA antagonistické účinky. Byla syntetizována také řada analogů ifenprodilu za účelem zkoumání strukturní a biologické aktivity. Například zkracování/prodlužování alkylového řetězce mezi polohou C4 piperidinu a benzenem na pravé straně molekuly zvyšuje vliv molekuly na NMDA receptory [58].

V průběhu let bylo nasyntetizováno množství různých sloučenin vycházejících z ifenprodilu. Ty nejúspěšnější z nich obsahují ve své struktuře dva terminální

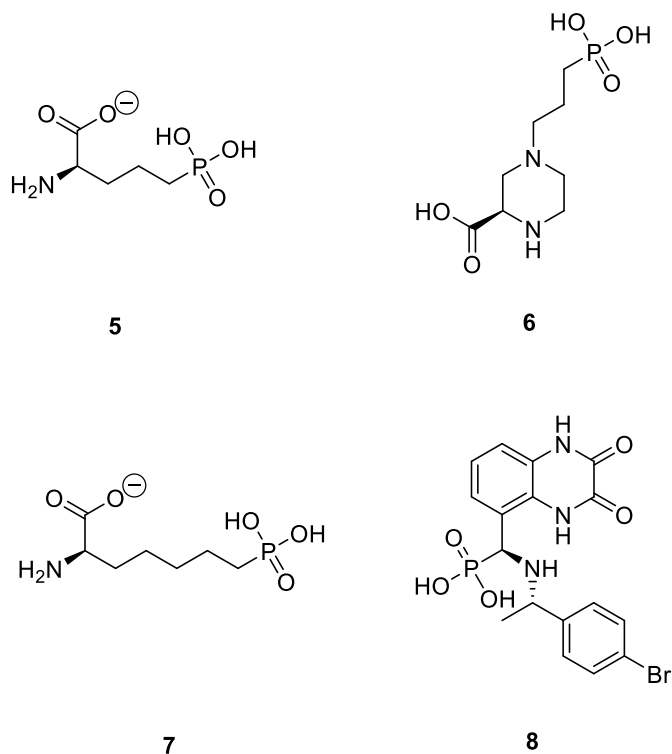
benzenové kruhy, z nichž jeden nese metabolicky stabilní donor H-vazeb. Řetězce spojující tyto dva kruhy se mohou lišit délkou i přítomností heteroatomů. Preferované jsou však heteroatomy s nebazickými vlastnostmi (např. amidy nebo uretany) [58].

Všechny výše zmíněné alosterické modulátory se chovají jako parciální antagonisté. Zn^{2+} vykazuje na NR1/NR2A receptorech ~ 70 % maximální inhibici [59] a ifenprodil a jeho deriváty vykazuje na NR1/NR2B receptorech ~ 90 % maximální inhibici [60], čehož lze využít jako terapeutické výhody, protože alespoň minimální množství aktivovaných NMDA receptorů je nezbytné pro správnou mozkovou funkci [44].

1.3.3.4 Sloučeniny vázající se na LBD

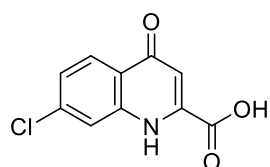
Jak již bylo zmíněno, extracelulární LBD je velmi významnou součástí NMDA receptorů, protože mimo jiné obsahuje vazebné místo pro glutamát na NR2 podjednotce [52] a vazebné místo pro glycin na NR1 podjednotce [53], která jsou zodpovědná za vlastní aktivaci NMDA receptorů. K inhibici NMDA receptorů v oblasti LBD jsou tedy využívány látky sloužící jako receptoroví antagonisté glutamátu nebo glycinu [61].

Prvními NMDA receptorovými antagonisty byli kompetitivní antagonisté glutamátového vazebného místa v NR2 podjednotkách, například (R)-2-amino-5-fosfonopentanoát ((R)-AP5) (**5**) [61]. Větší molekuly zpravidla mohou dosahovat vyšší selektivity díky sterickým efektům [44], proto například antagonní sloučeniny (R)-4-(3-fosfonopropyl)piperazin-2-karboxylová kyselina ((R)-CPP) (**6**) a (R)-2-amino-7-fosfanoheptanoát ((R)-AP7) (**7**) vykazují větší selektivitu než jejich kratší homologní varianta **5** [61]. Další sloučeninou se zvýšenou selektivitou je [(R)-[(S)-1-(4-bromfenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-5-yl)methyl]-fosfonová kyselina (NVP-AAM077) (**8**) (Obrázek 5) [62].

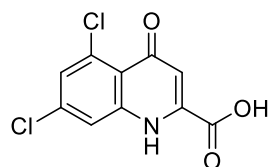


Obrázek 5: Kompetitivní antagonisté **5-8** glutamátového vazebného místa v NR2 podjednotkách.

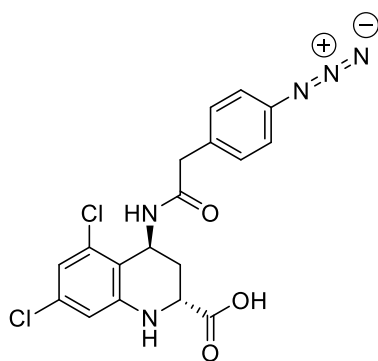
Kompetitivní antagonisté glycinového vazebného místa, například 7-chlorokynurenová kyselina (7-CKA) (**9**) [63], 5,7-dichlorokynurenová kyselina (5,7-DCKA) (**10**) [64] nebo 4-[2-(4-azidofenyl)acetylaminio]-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-2-karboxylová kyselina (CGP 61594) (**11**) [65] (Obrázek 6), projevují také poměrně nízkou selektivitu, což lze očekávat vzhledem k tomu, že se jedná o sloučeniny, jejichž cílem je vazebné místo NR1 podjednotky přítomné ve všech subtypech NMDA receptorů [44].



9



10



11

Obrázek 6: Kompetitivní antagonisté 9-11 glycinového vazebného místa v NR2 podjednotkách.

1.3.3.5 NMDA receptory jako terapeutické cíle

Jak již bylo zmíněno v předchozích odstavcích, NMDA receptory mají nepopiratelnou spojitost s řadou neurologických onemocnění, a jsou tedy cílem mnoha terapeutických výzkumů. Za normálních podmínek jsou iontové kanály NMDA receptorů blokovány Mg^{2+} a aktivovány pouze krátce. Avšak v případě patologických podmínek jsou Mg^{2+} blokátory odstraněny, což vede k abnormální nebo zvýšené aktivitě receptorů [66]. V důsledku toho dochází k nadměrnému hromadění Ca^{2+} v intracelulárním prostoru neuronů a stimulaci buněčné apoptózy nebo nekrózy [67].

Současné farmakologické výzkumy se zaměřují především na skupinu antagonistů NMDA receptorů, kam patří například sloučeniny methadon, ketamin, dextrometorfan, amantadin nebo memantin [68].

Methadon je syntetický opioid, který má zároveň silný antagonistický účinek na NMDA receptory [69]. Na základě studií zabývajících se antagonistickými účinky D-methadonu můžeme uvažovat jeho budoucí využití jako nového antagonisty NMDA receptorů při léčbě depresí a dalších CNS poruch [70].

Ketamin patří do skupiny nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů, jejichž vazebným místem je iontový kanál NMDA receptorů. Navzdory prokázaným antidepresivním účinkům vede opakované užívání ketaminu při léčbě depresí k nežádoucím účinkům, jako jsou například halucinace, zmatenost nebo ztráta

paměti [71]. Právě z tohoto důvodu je snaha objasnit mechanismus účinku a primární cíle ketaminu, aby bylo možné vyvinout látky napodobující antidepresivní účinky ketaminu, ovšem bez nežádoucích vedlejších účinků [72].

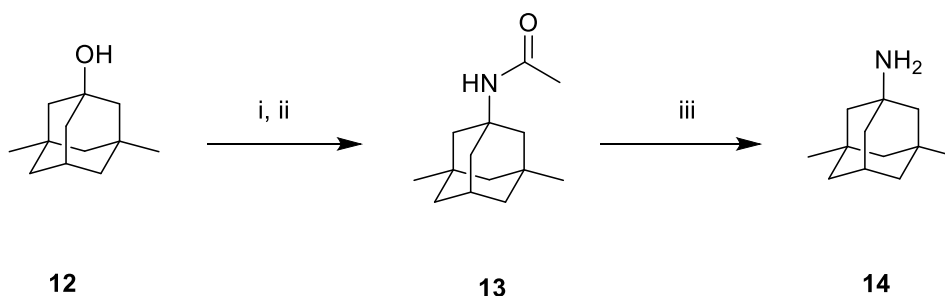
Další látkou ze skupiny nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů je dextrometorfan, který se také váže na iontový kanál NMDA receptorů. Farmakologické vlastnosti dextrometorfanu především v souvislosti s NMDA receptory vedly v minulosti vědce k mnoha výzkumům zaměřeným na jeho terapeutický potenciál například při léčbě neuropatické bolesti [73], epilepsie [74] a neurodegenerativních onemocnění, jako je Huntingtonova choroba [75] nebo amyotrofická laterální skleróza [76]. Bohužel však většina z těchto výzkumů selhala v raných fázích klinických testů.

Podobně jako předchozí zmíněné látky i amantadin má povahu nekompetitivního antagonisty a váže se na iontový kanál NMDA receptorů. Využívá se například pro usnadnění rekonvalescence po traumatických poraněních mozku [77], dále napomáhá při úlevě chronických bolestí, ale zdaleka největší význam má při léčbě Parkinsonovy choroby [78].

1.3.3.6 Memantin a Alzheimerova choroba

Memantin (**14**) jako nekompetitivní antagonist je relativně neúčinný blokátor NMDA receptorů při nízké aktivitě receptorů, ale stává se efektivnějším při zvýšené koncentraci glutamátu [79]. Účinek **14** spočívá v tom, že brání vzniku excitotoxicity v důsledku nadměrného množství glutamátu, ale zároveň nebrání fyziologickým účinkům glutamátu na učení a paměť. Farmaceutického významu dosáhl **14** obzvláště jako terapeutický přípravek pro léčbu Alzheimerovy choroby [80].

Memantin (**14**), chemickým názvem 3,5-dimethyladamantan-1-amin, je syntetizován podle postupu, který zahrnuje několik kroků. V prvním kroku jsou 3,5-dimethyladamantan-1-ol (**12**) a nitril (např. acetonitril) rozpuštěny v organickém rozpouštědle (např. mesitylenu). Přidáním kyseliny (např. koncentrované H₂SO₄) je uskutečněn reakční krok při teplotě 30 °C, který probíhá 3 h. Přídavkem vody je zastavena reakce a dochází ke vzniku 1-acetamido-3,5-dimethyladamantanu (**13**) s výtěžností 80 % (po dvou krocích). Následně je přidána anorganická báze (např. NaOH) a alkohol (např. hexanol). Reakční směs je míchána 18 h při teplotě 130 °C a dochází k hydrolýze sloučeniny **13** za vzniku memantinu (**14**). Výtěžnost reakce je 96 % (Schéma 2) [81].



Reagenty a podmínky:

i) acetonitril, H₂SO₄, mesitylen, 30 °C, 3 h; ii) H₂O, 80 % (po dvou krocích); iii) NaOH, hexanol, 130 °C, 18 h, 96 %.

Schéma 2: Syntéza memantinu (**14**).

Alzheimerova choroba je charakterizována neurologickými i neuropatologickými příznaky. Bohužel současná léčba má pouze symptomatické účinky. Doposud byly schváleny jen dvě skupiny léčiv: nekompetitivní antagonist NMDA receptorů memantin a inhibitory cholinesteras (např. Donepezil, Galantamin a Rivastigmin [82]) [80].

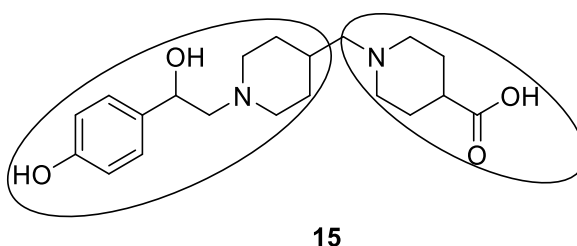
Některé studie se zabývají vzájemným vztahem mezi NMDA receptory a amyloidem β , který tvoří extracelulární plaky v mozkové tkáni a je považován za klíčovou neuropatologickou známku Alzheimerovy choroby. Jedna z prací například uvádí, že nízká aktivace NMDA receptorů zvyšuje produkci amyloidu β , a naopak vysoká aktivace NMDA receptorů produkci amyloidu β snižuje. Role NMDA receptorů v produkci amyloidu β je ale pravděpodobně komplexnější a je třeba dalších výzkumů k jejímu objasnění [83].

Další studie řeší spojitost mezi NMDA receptory a hyperfosforylovaným tau proteinem, který zodpovídá za přítomnost intraneuronálních neurofibrilárních zámoťků a je další neuropatologickou známkou Alzheimerovy choroby. Nadbytek tau proteinu v dendritech vyvolává zvýšení aktivity přítomných NMDA receptorů a Ca²⁺ excitotoxicitu. Některé zdroje potvrzují, že glutamátová excitotoxicita může být inhibována redukcí tau proteinu [84], a naopak aktivována nadměrnou expresí tau proteinu [85].

Je patrné, že NMDA receptory hrají významnou roli při vzniku Alzheimerovy choroby. Rozsah jejich vlivu na toto a další onemocnění je a bude předmětem podrobného výzkumu, jehož součástí je i syntéza nových účinnějších léčiv [80].

2 Design

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na přípravu 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (**15**) jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů. Vybraný derivát patří do série látek navržených za účelem modulace několika biologických cílů současně. Společným rysem těchto látek je přítomnost dvou farmakoforů: obměněné molekuly ifenprodilu (vlevo) jako inhibitoru NMDA receptorů a derivátu kyseliny γ -aminomáselné (vpravo) (Obrázek 7) jako přirozeného agonisty inhibičních receptorů v CNS. Tyto hybridní molekuly potenciálně zlepšují terapeutický index zkoumané látky, protože vzájemně zvyšují účinek a zároveň se vyhýbají polypragmzii.



Obrázek 7: Předlohová struktura 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (**15**).

Afinita daných látek k cílovým proteinům byla testována *in silico* v partnerských institucích. Zároveň byly pro všechny potenciální sloučeniny vypočítány fyzikálně-chemické vlastnosti. Na základě získaných dat byl pro syntézu vybrán derivát piperidin-4-karboxylové kyseliny, jehož fyzikálně-chemické vlastnosti splňují dané požadavky, a byl připraven plán pro vícekrokovou syntézu.

3 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je příprava derivátu piperidin-4-karboxylové kyseliny **15** vícekrokovou syntézou. Výchozí látkou pro syntézu je isonipekotová kyselina, která v prvním reakčním kroku bude reagovat mechanismem nukleofilní acylové substituce (S_NAc). Následujícími kroky budou nukleofilní bimolekulární substituce (S_N2), deprotektace *tert*-butoxykarbonylové skupiny, S_N2 na α -uhlíku bromketonu a redukce karbonylové skupiny mechanismem nukleofilní adice (A_dN). V posledním kroku vznikne finální derivát piperidin-4-karboxylové kyseliny mechanismem katalytické hydrogenace (Schéma 3). Vzniklý produkt bude dále podroben *in vitro* biologickému testování jako potenciální inhibitor NMDA receptorů.

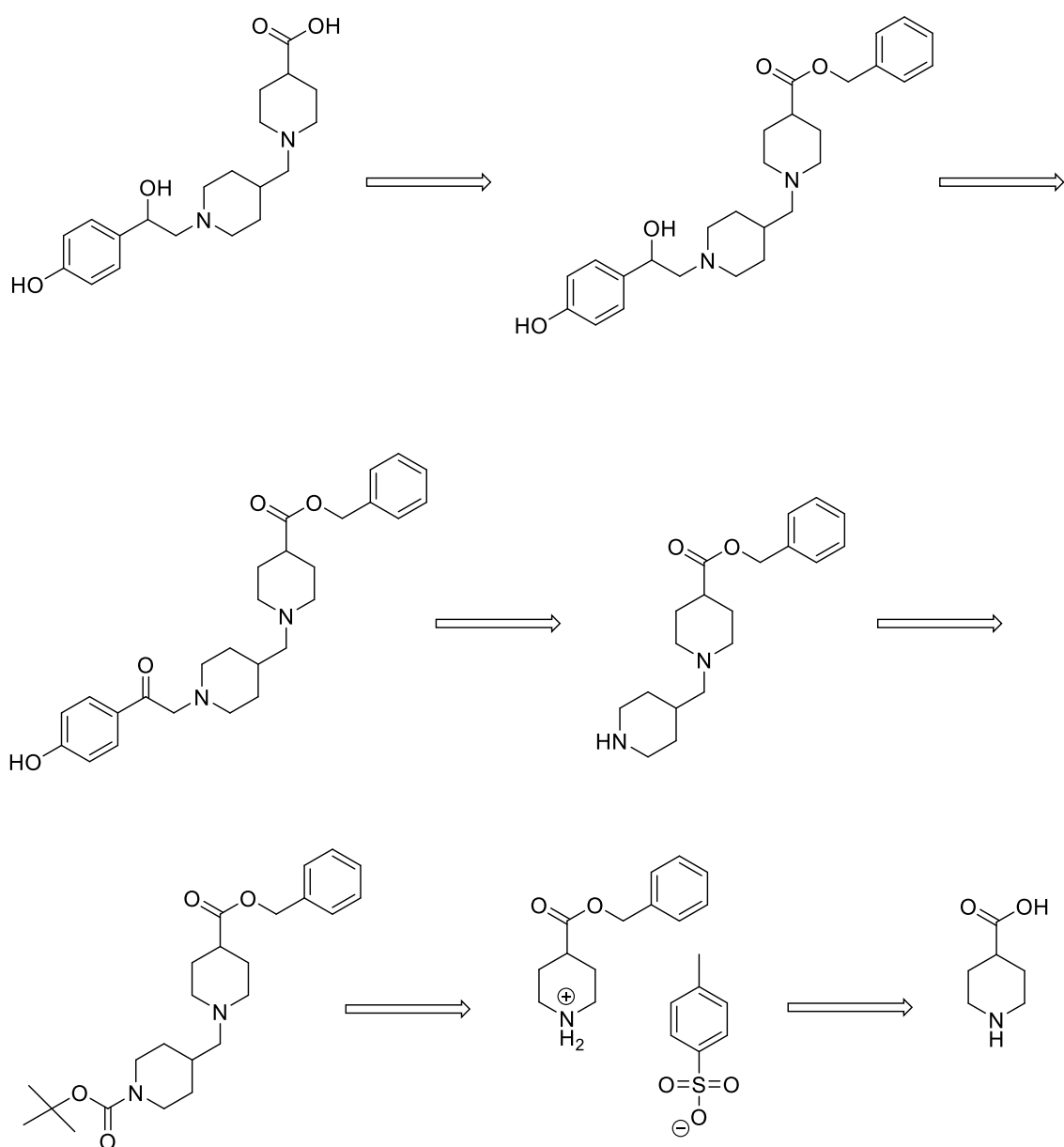


Schéma 3: Retrosynetická analýza přípravy finálního produktu.

4 Výsledky a diskuse

Pro syntézu 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (**15**) byly v prvním kroku využity komerčně dostupné látky: isonipekotová kyselina (**16**) a p-toluensulfonová kyselina (pTsOH) (**17**), ze kterých byl připraven první meziprodukt. Ke splnění cíle bakalářské práce bylo třeba provést 6 kroků syntézy. Ty budou detailněji popsány v následujícím textu.

4.1 Příprava 4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonátu

Příprava 4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonátu (**26**) probíhala mechanismem S_NAc , konkrétně Fischerovou esterifikací (Schéma 4). Za přítomnosti pTsOH (**17**) jako katalyzátoru došlo k protonizaci atomu kyslíku na karboxylové skupině kyseliny **16**, který získal kladný náboj. Rezonanční struktura **19** vzniklého meziproduktu **18** umožnila nukleofilní atak přítomného alkoholu **20** za vzniku tetraedrického intermediátu **21**. Přesunem protonu následně došlo ke vzniku nového intermediátu **22** a přeměně hydroxyskupiny na dobře odstupující skupinu. Odštěpením vody vznikl meziprodukt **23**. Odštěpením protonu pomocí nukleofilní částice **24** došlo k regeneraci katalyzátoru **17** a vzniku esteru karboxylové kyseliny **25**. Bazický atom dusíku přítomný v molekule esteru přijal proton od regenerovaného katalyzátoru **17** za vzniku esteru **26**. Reakce probíhala 24 h pod inertní dusíkovou atmosférou při teplotě 95 °C v Dean-Starkově aparatuře. Jako rozpouštědlo byl použit toluen, který v reakční směsi tvořil s vodou azeotropní směs, a pomocí Dean-Starkovy aparatury došlo k odstranění vody z reakční směsi a posunu reakční rovnováhy ve prospěch produktu. Výtěžnost reakce činila 93 %.

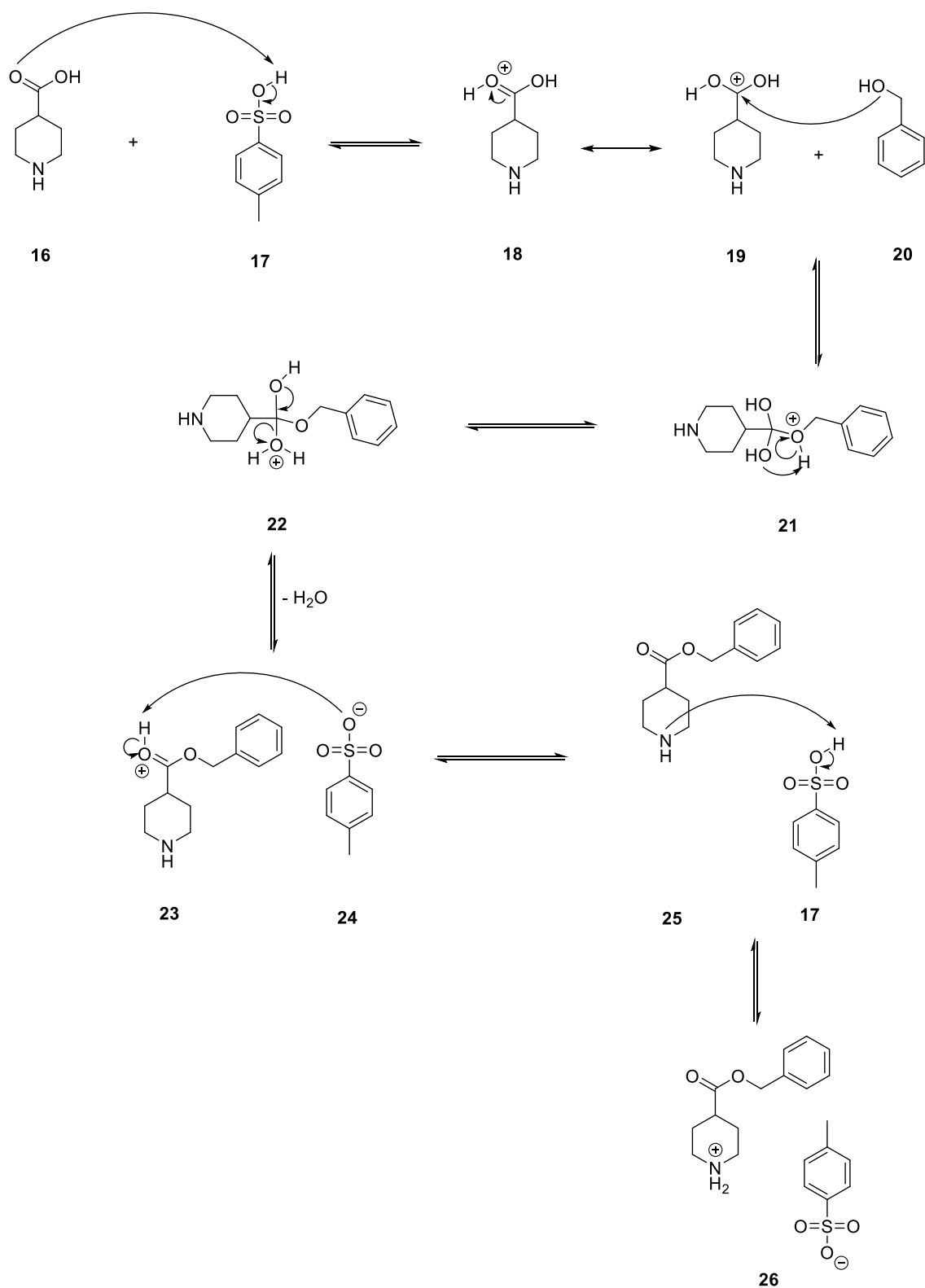


Schéma 4: Mechanismus S_NAc (Fischerova esterifikace) za vzniku esteru **26**.

4.2 Příprava *tert*-butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylátu

Příprava *tert*-butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylátu (**29**) probíhala mechanismem S_N2 , konkrétně šlo o alkylaci

aminu (Schéma 5). Pomocí dvou ekvivalentů (eq) bazického K_2CO_3 došlo k odštěpení protonů z atomu dusíku sloučeniny **26** a vzniklá silně nukleofilní částice **27** napadala CH_2 skupinu v *tert*-butyl-4-(bromomethyl)piperidin-1-karboxylátu (**28**), kde byl z důvodu polarizace vazby lokalizovaný parciální kladný náboj (δ^+). Při S_N2 odstoupil bromidový anion za vzniku sloučeniny **29**. Reakce probíhala 24 h pod inertní dusíkovou atmosférou při teplotě $85\text{ }^\circ\text{C}$ v rozpouštědle *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Následně bylo provedeno čištění pomocí extrakce, filtrace a sloupcové chromatografie. Výtěžnost reakce činila 85 %.

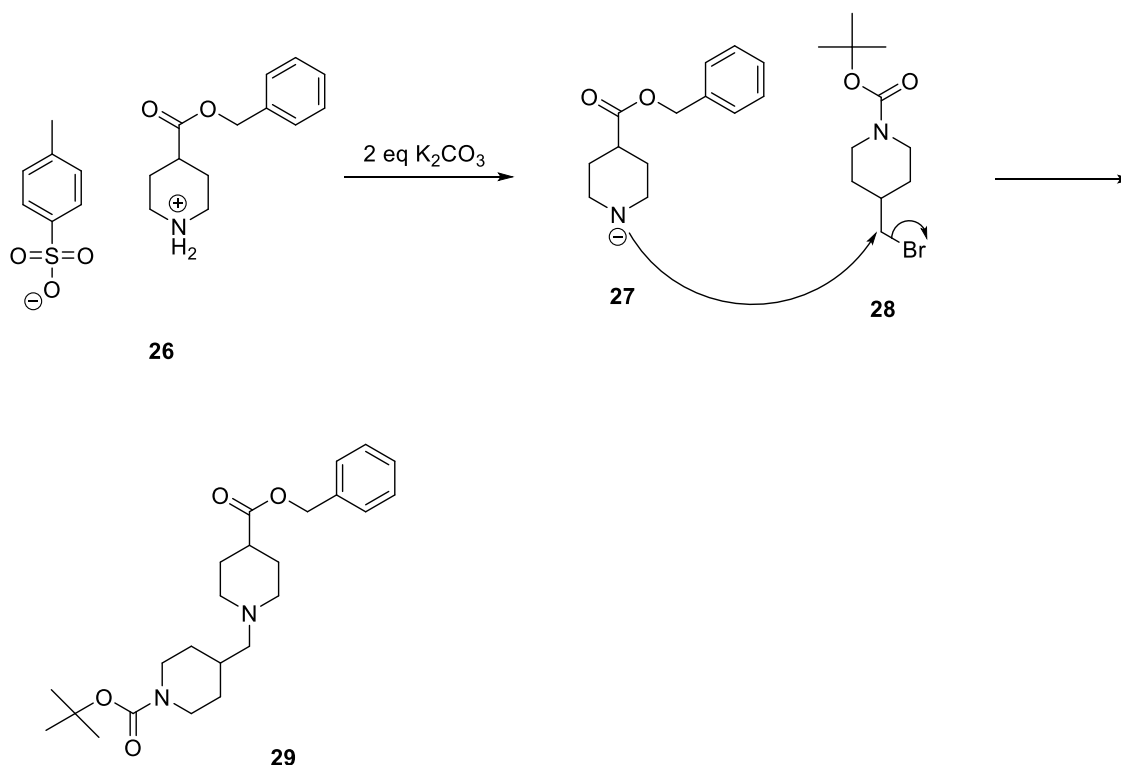


Schéma 5: Mechanismus S_N2 (alkylace aminu) za vzniku sloučeniny **29**.

4.3 Příprava benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylátu

Příprava benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylátu (**35**) probíhala deprotekcí *tert*-butoxykarbonylové skupiny z piperidinového dusíku (Schéma 6). V přítomnosti kyseliny trifluoroctové (TFA) (**30**) došlo k protonizaci atomu kyslíku sloučeniny **29**, který získal kladný náboj za vzniku meziprojektu **31**. Přesunem elektronů došlo k odštěpení *tert*-butylového kationtu **32** za vzniku karboxylové kyseliny **33**. Odštěpením protonu pomocí báze **34** byla regenerována kyselina **30**, následně došlo k protonizaci piperidinového dusíku za odštěpení CO_2 a za vzniku esteru **35**, který nese v molekule volnou sekundární aminoskupinu. Reakce probíhala 4 h pod inertní dusíkovou atmosférou při $0\text{ }^\circ\text{C}$ v rozpouštědle dichlormethanu (DCM) a po ukončení bylo provedeno čištění pomocí sloupcové chromatografie. Výtěžnost reakce činila 96 %.

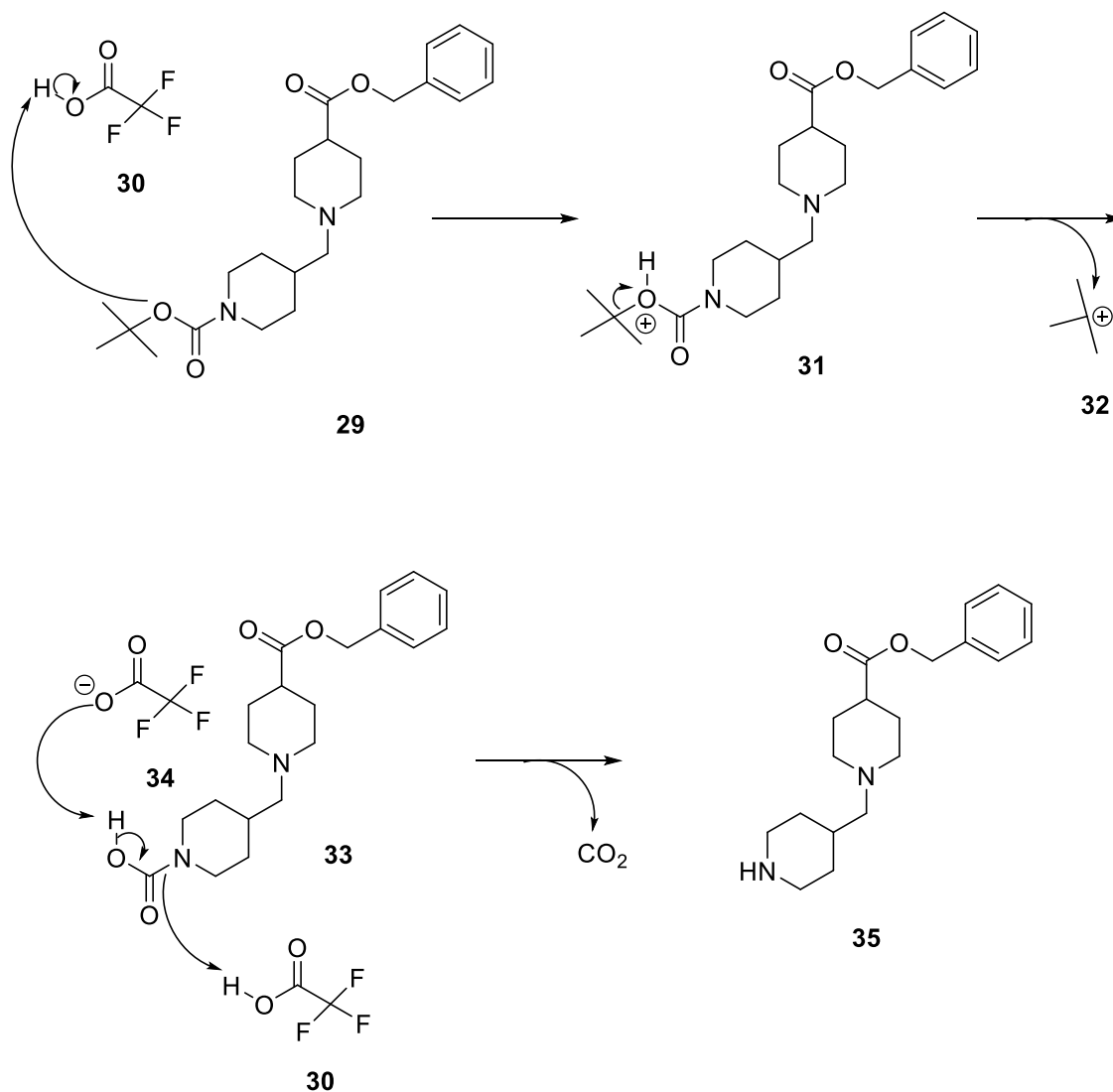


Schéma 6: Mechanismus deprotektce *tert*-butoxykarbonylové skupiny za vzniku esteru 35.

4.4 Příprava benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu

Příprava benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu (39) probíhala mechanismem S_N2 a jednalo se o alkylaci aminu (Schéma 7). Bazický triethylamin (TEA) (36) odštěpil proton z atomu dusíku sekundární aminoskupiny v molekule esteru 35 za vzniku nukleofilní částice 37 atakující mechanismem S_N2 CH₂ skupinu v 2-brom-4'-hydroxyacetofenonu (38), kde byl z důvodu polarizace vazby lokalizovaný parciální kladný náboj (δ⁺). Po odstoupení bromidového aniontu vznikla sloučenina 39. Reakce probíhala 5 h pod inertní dusíkovou atmosférou při laboratorní teplotě v rozpouštědle ethylacetátu (EtOAc) a poté bylo provedeno čištění pomocí extrakce, filtrace a sloupcové chromatografie. Výtěžnost reakce činila 88 %.

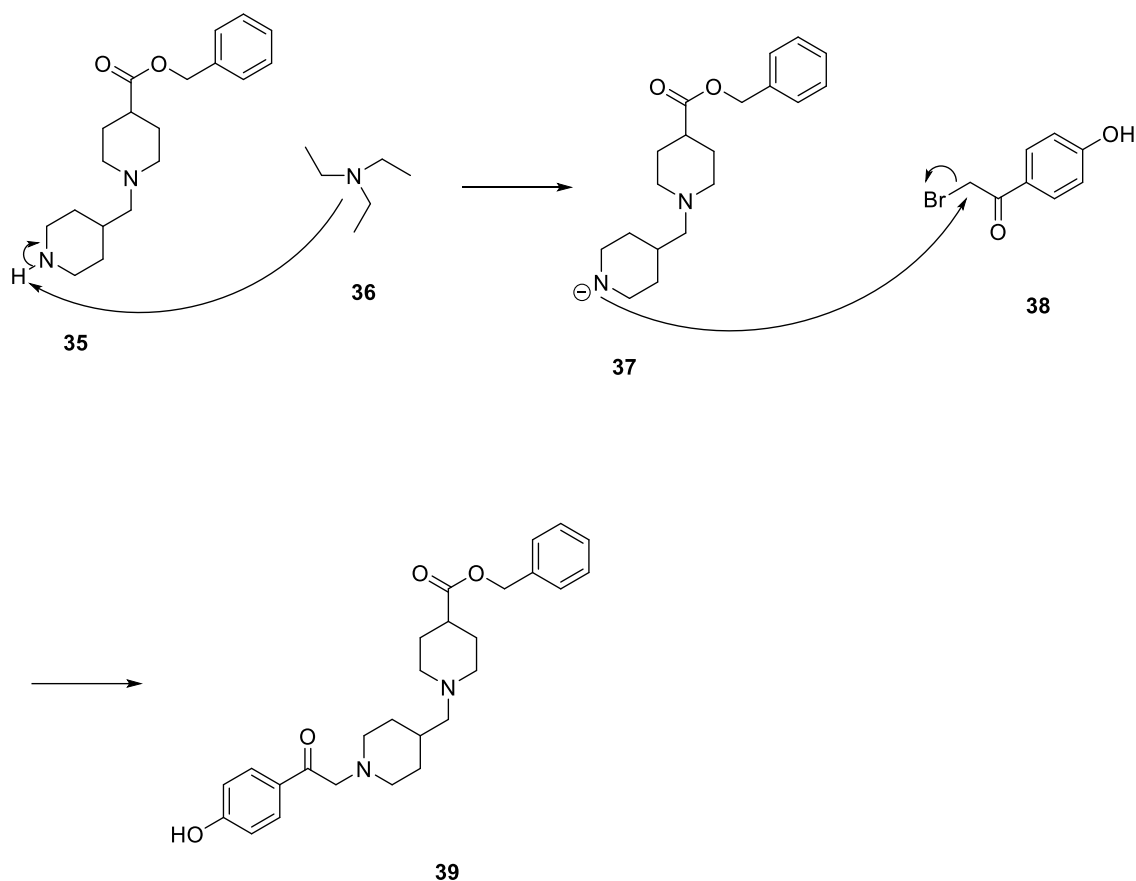


Schéma 7: Mechanismus S_N2 (alkylace aminu) za vzniku ketonu 39.

4.5 Příprava benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu

Příprava benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu (**43**) probíhala mechanismem A_dN . Konkrétně šlo o redukci karbonylové skupiny (Schéma 8). Po nukleofilním ataku NaBH_4 (**40**) na karbonylovou skupinu látky **39** došlo ke vzniku tetraedrického intermediátu **41**, který byl následně protonizován MeOH (**42**) za vzniku sloučeniny **43**. Reakce probíhala 30 min pod dusíkovou atmosférou při $0\text{ }^\circ\text{C}$ ve směsi rozpouštědel MeOH a tetrahydrofuran (THF) (1/1). Následovalo čištění pomocí extrakce, filtrace a sloupcové chromatografie.

Tento krok byl nejprve prováděn s 1,5 eq NaBH_4 , následně s 5 a 10 eq. Tato množství však nebyla dostatečná pro požadovanou přeměnu výchozí látky. Při použití 15 eq NaBH_4 dosáhla výtěžnost reakce 73 %.

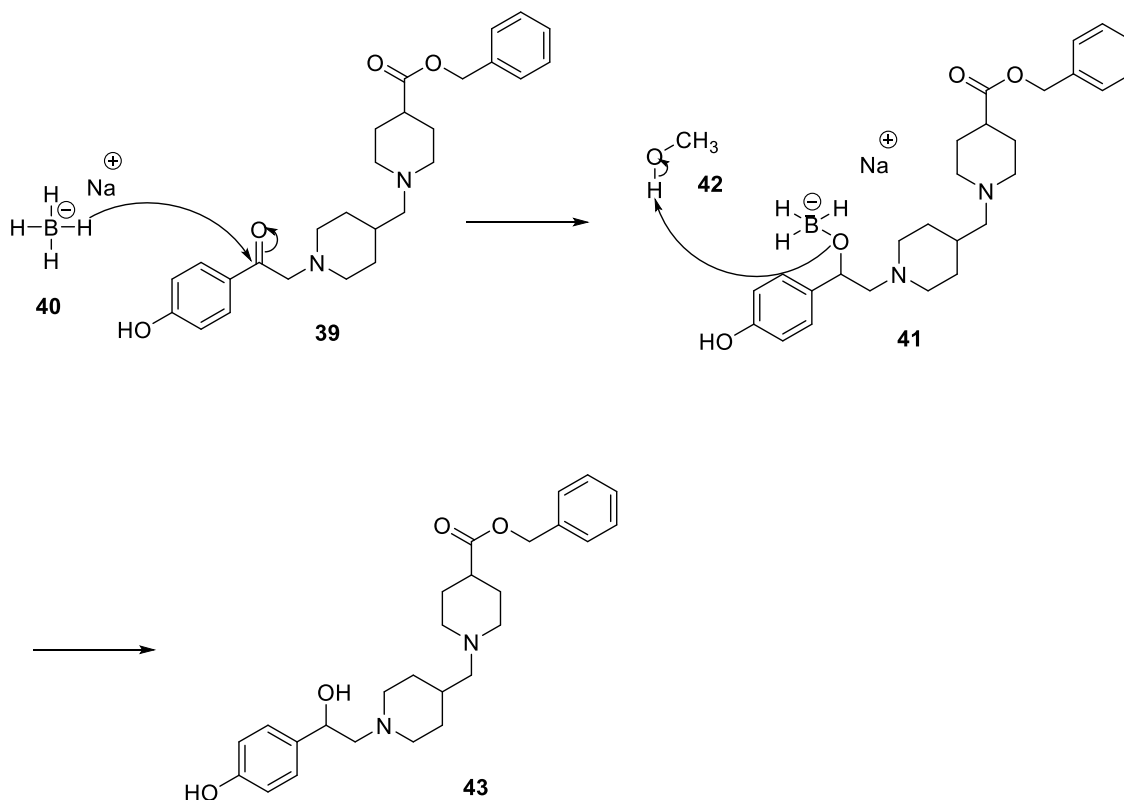


Schéma 8: Mechanismus AdN (redukce karbonylu) za vzniku alkoholu 43.

4.6 Příprava 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny

Příprava 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny (**15**) probíhala mechanismem katalytické hydrogenace (Schéma 9). Reakcí sloučeniny **43** s palladiem (0) vznikl komplexní intermediát **44** obsahující palladium (II). Působením plynného vodíku vznikla sloučenina **45**. Po odstoupení karboxylové kyseliny **15** vznikl meziprodukt **46**, následně toluen (**47**) a došlo k regeneraci katalyzátoru palladium (0) [86]. Reakce probíhala 7 h pod vodíkovou atmosférou při laboratorní teplotě v rozpouštědle MeOH. Po ukončení bylo provedeno čištění pomocí filtrace přes celit a následně extrakce na pevné fázi. Výtěžnost reakce činila 30 %. Nižší výtěžnost byla pravděpodobně zapříčiněna špatnou rozpustností produktu **15** v MeOH a ztráty nastaly při filtraci přes celit a extrakci na pevné fázi.

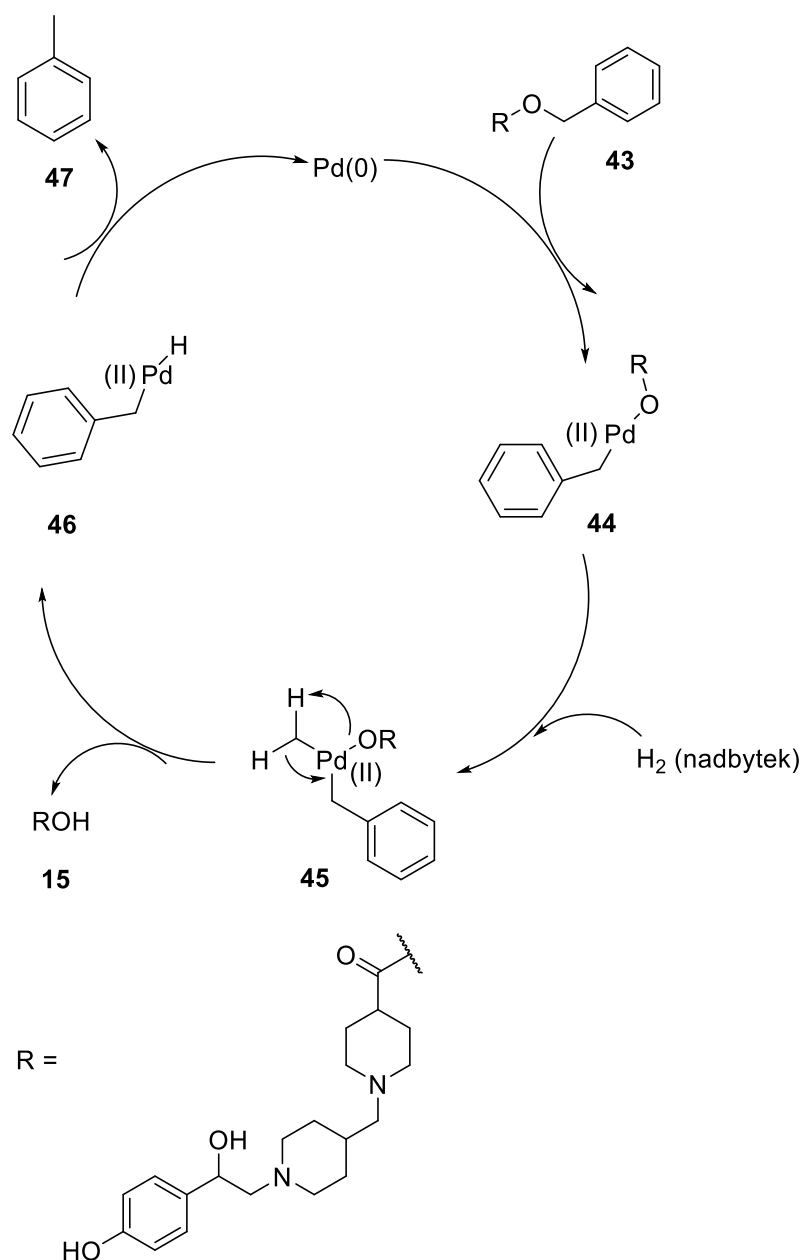
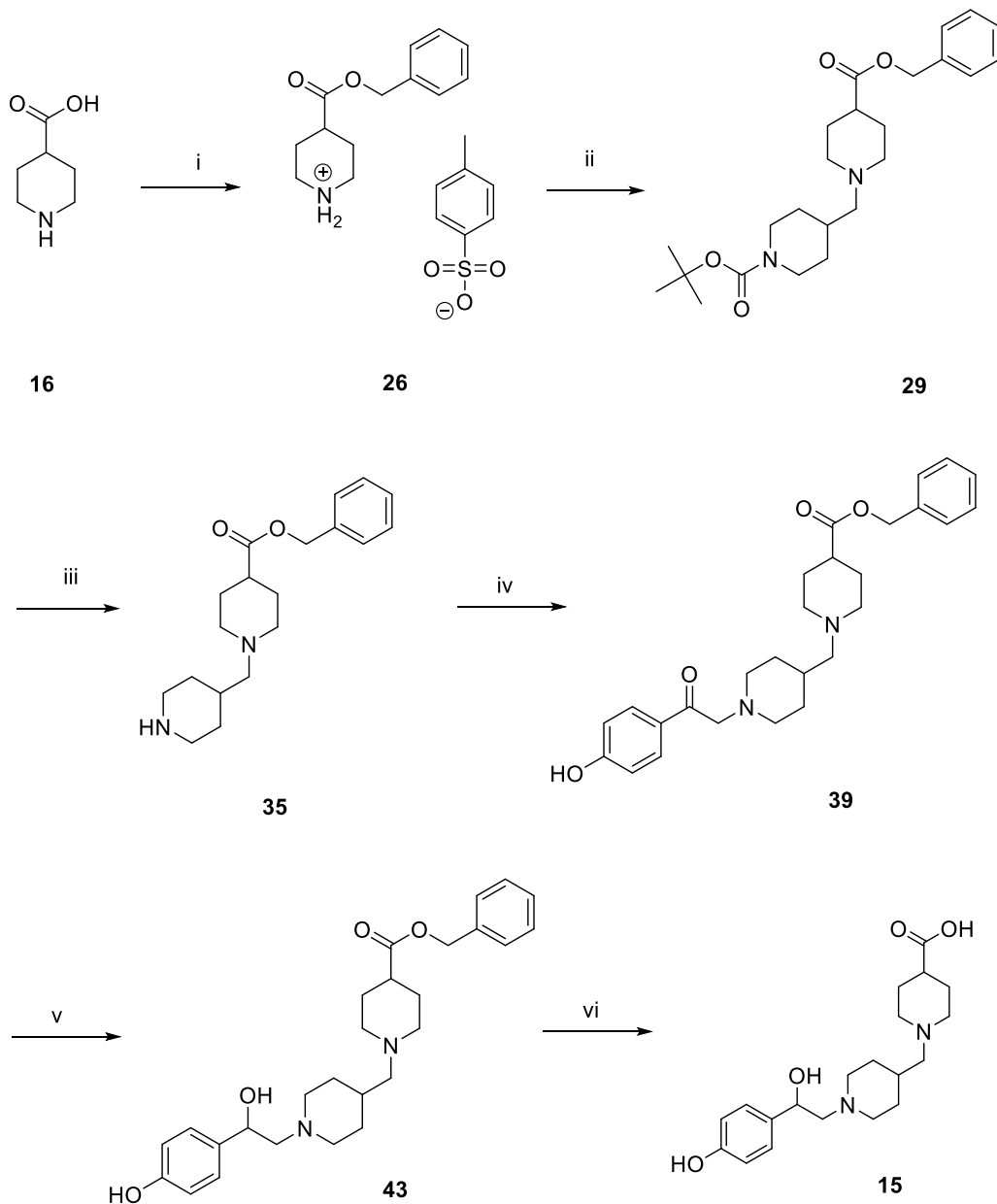


Schéma 9: Mechanismus katalytické hydrogenace za vzniku finální karboxylové kyseliny **15**.

Celková syntéza se skládala ze šesti syntetických kroků, a to z esterifikační reakce (příprava soli **26**), S_N2 reakce a přípravy sloučeniny **29**, dále byla uskutečněna deprotektace *terc*-butoxykarbonylové skupiny (příprava esteru **35**), S_N2 reakce a příprava ketonu **39**, redukce karbonylové skupiny (příprava sloučeniny **43**) a v posledním kroku byla uskutečněna deprotektace benzylové skupiny a příprava finálního produktu **15**. Celková výtěžnost syntézy byla 15 % po šesti reakčních krocích. Souhrnný přehled všech kroků syntézy je uveden ve schématu 10.



Reagenty a podmínky:

i) benzylalkohol, pTsOH, toluen, N₂, 95 °C, 24 h, 93 %; ii) terc-butyl-4-(bromomethyl)piperidin-1-karboxylát, K₂CO₃, DMF, N₂, 85 °C, 24 h, 85 %; iii) TFA, DCM, N₂, 0 °C, 4 h, 96 %; iv) 2-brom-4'-hydroxyacetofenon, TEA, EtOAc, N₂, 0 °C → l. t., 5 h, 88 %; v) NaBH₄, MeOH/THF, N₂, 0 °C, 30 min, 73 %; vi) H₂, 5 % Pd/C, MeOH, l. t., 7 h, 30 %

Schéma 10: Souhrnné schéma přípravy finální karboxylové kyseliny **15**.

5 Experimentální část

Chemikálie a rozpouštědla použité pro syntézu byly dodány firmami Sigma Aldrich (Česká republika), Activate Scientific GmbH (Německo) a VWR International (Česká republika). Průběh všech reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s využitím TLC destiček Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Česká republika). Detekce byla prováděna UV lampou (CAMAG, Donau Lab, Česká republika) při vlnové délce 254 nm a pomocí detekčního činidla kyseliny fosfomolybdenové. Sloupcová chromatografie byla uskutečněna na silikagelu Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm, 70-230 mesh, Fluka, Sigma Aldrich, Česká republika). Při extrakci na pevné fázi byla jako stacionární fáze použita Strata C-18-E (55 μ m, 70A, Phenomenex, Sigma Aldrich, Česká republika). Teploty tání připravených látek byly stanoveny bodotávkem Büchi B-545 (Německo) bez korekce.

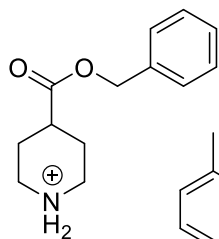
¹H NMR a ¹³C NMR spektra připravených látek byla měřena při laboratorní teplotě v deuterovaných rozpouštědlech dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆), methanolu (CD₃OD-*d*₄) a chloroformu (CDCl₃-*d*) na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C; Varian Comp. Palo Alto, USA). Chemické posuny (δ) protonů v ¹H NMR a uhlíků v ¹³C NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. V ¹H NMR spektrech jsou uváděny vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ (δ = 2,50), CD₃OD-*d*₄ (δ = 3,31) a CDCl₃-*d* (δ = 7,26), v ¹³C NMR spektrech vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ (δ = 39,43), CD₃OD-*d*₄ (δ = 49,05) a CDCl₃ (δ = 77,0). Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hz. Spinová multiplicita je vyjádřena jako br s (broad singlet), s (singlet), d (dublet) a m (multiplet).

K získání hmotnostních spekter byla využita elektrosprejová ionizace (ESI/MS) a selekce iontu pomocí trojitého quadrupólu na přístroji Agilent 6470. Příslušná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

5.1 Postup přípravy 4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonátu

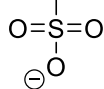
Při přípravě látky **26** byla jako výchozí sloučenina použita isonipekotová kyselina (**16**) (1 g; 7,7 mmol; 1 eq). Po přidání pTsOH (**17**) (1,47 g; 8,5 mmol; 1,1 eq) byla směs rozpuštěna v bezvodém toluenu (11 ml) a následně byl po kapkách přidán benzylalkohol (**20**) (3,87 ml). Směs byla míchána 24 h při teplotě 95 °C v Dean-Starkově aparatuře. Reakce po celou dobu probíhala pod dusíkovou atmosférou a kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po ukončení reakce byl toluen odpařen. Po přidání diethyletheru došlo k precipitaci produktu, který byl následně přefiltrovaný, promytý diethyletherem a vysušený v exsikátoru.

4-((benzyloxy)karbonyl)piperidinium 4-methylbenzensulfonát, 26.



Získaná sloučenina **26** byla izolována jako pevná bílá krystalická látka. $C_{20}H_{25}NO_5S$. $M = 391,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 2,82 g (93 %).



$T_t = 81,4\text{-}83,4 \text{ }^\circ\text{C}$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,54 (br s; 1H), 8,26 (br s; 1H), 7,50 (d; $J = 8,0 \text{ Hz}$; 2H), 7,40-7,31 (m; 5H), 7,12 (d; $J = 7,9 \text{ Hz}$; 2H), 5,12 (s; 2H), 3,28-3,20 (m; 2H), 2,98-2,88 (m; 2H), 2,78-2,72 (m; 1H), 2,29 (s; 3H), 2,02-1,94 (m; 2H), 1,76-1,64 (m; 2H) ppm.

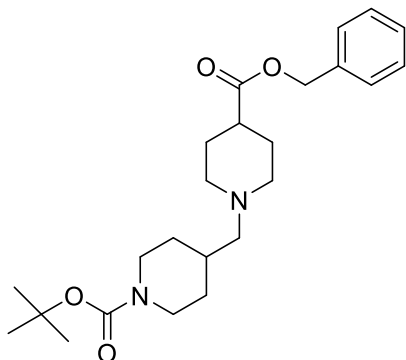
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ 172,8; 145,2; 137,7; 135,9; 128,3; 128,1; 128,0; 127,7; 125,3; 65,7; 42,4; 37,5; 24,5; 20,7 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{13}H_{18}NO_2^+$ (m/z): 220,1; experimentální hodnota: 220,3.

5.2 Postup přípravy *tert*-butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylátu

Pro přípravu látky **29** se jako výchozí látka použila sloučenina **26** (2 g; 5,1 mmol; 1 eq), která byla rozpuštěna v bezvodém DMF (10,2 ml). Po přidání K_2CO_3 (2,82 g; 20,4 mmol; 4 eq) se směs nechala 20 min míchat při laboratorní teplotě. Následně byl přidán *tert*-butyl-4-(bromomethyl)piperidin-1-karboxylát (**28**) (1,56 g; 5,6 mmol; 1,1 eq) a směs se míchala dalších 30 min. Následně byla reakční směs zahřívána na 85 °C a míchána 24 h. Reakce po celou dobu probíhala pod dusíkovou atmosférou a kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po zreagování byla provedena extrakce s EtOAc a ledovou vodou. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 , filtrována a EtOAc byl odpařen na vakuové odparce. Následovalo čištění pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs DCM/MeOH 50/1. Po ukončení chromatografie byl produkt zakoncentrován na vakuové odparce.

Terc-butyl 4-((4-((benzyloxy)karbonyl)piperidin-1-yl)methyl)piperidin-1-karboxylát, 29.



Získaná sloučenina **29** byla izolována jako žlutý olej. $C_{24}H_{36}N_2O_4$. $M = 416,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 1,81 g (85 %).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 -*d*): δ 7,37-7,29 (m; 5H), 5,11 (s; 2H), 4,12-4,00 (m; 2H), 2,84-2,77 (m; 2H), 2,71-2,63 (m; 2H), 2,36-2,28 (m; 1H), 2,12 (d; $J = 7,0 \text{ Hz}$; 2H), 1,97-1,88 (m; 4H), 1,80-1,68 (m; 4H), 1,65-1,57 (m; 1H), 1,45 (s; 9H), 1,08-1,00 (m; 2H) ppm.

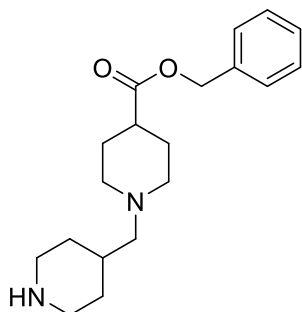
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3 -*d*): δ 175,0; 154,9; 136,1; 128,5; 128,1; 128,0; 79,2; 66,0; 64,7; 53,5; 43,8; 41,3; 33,8; 30,8; 28,5; 28,3 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$: vypočítaná hodnota pro $C_{24}H_{37}N_2O_4^+$ (m/z): 417,3; experimentální hodnota: 417,5.

5.3 Postup přípravy benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylátu

Pro přípravu látky **35** byla použita sloučenina **29** (700 mg; 1,68 mmol; 1 eq) rozpuštěná v bezvodém DCM (6,7 ml). Do reakční směsi ochlazené na 0 °C byla poté po kapkách přidávána TFA (**30**) (1,67 ml; 21,85 mmol; 13 eq) a směs byla míchána 4 h při 0 °C. Reakce po celou dobu probíhala pod dusíkovou atmosférou a kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po ukončení reakce bylo na vakuové odparce odpařeno rozpouštědlo. Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs DCM/MeOH/TEA 9/1/1%, následně DCM/MeOH/TEA 3/1/1%. Po ukončení chromatografie byl produkt zakonzentrován na vakuové odparce.

Benzyl 1-(piperidin-4-ylmethyl)piperidin-4-karboxylát, 35.



Získaná sloučenina **35** byla izolována jako žlutý olej. $C_{19}H_{28}N_2O_2$. $M = 316,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 511 mg (96 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7,37-7,29 (m; 5H), 5,11 (s; 2H), 4,16 (br s; 1H), 3,14-3,08 (m; 2H), 2,83-2,76 (m; 2H), 2,63-2,58 (m; 2H), 2,34-2,28 (m; 1H), 2,12 (d; J = 7,2 Hz; 2H), 1,97-1,86 (m; 4H), 1,78-1,71 (m; 4H), 1,64-1,56 (m; 1H), 1,19-1,11 (m; 2H) ppm.

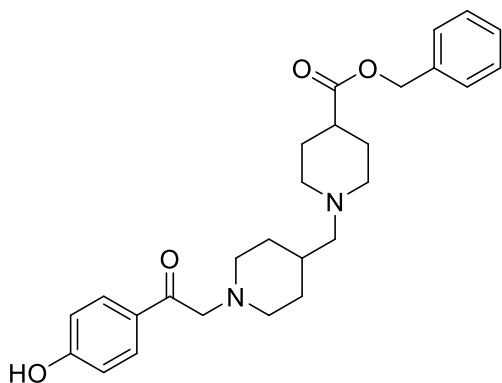
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 175,0; 136,1; 128,5; 128,1; 127,9; 66,0; 65,1; 53,5; 45,9; 41,3; 33,5; 31,1; 28,3 ppm.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₉H₂₉N₂O₂⁺ (m/z): 317,2; experimentální hodnota: 317,4.

5.4 Postup přípravy benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu

Pro přípravu látky **39** byla jako výchozí látka použita sloučenina **35** (110 mg; 0,35 mmol; 1 eq) rozpuštěná v bezvodém EtOAc (1,4 ml). Do reakční směsi ochlazené na 0 °C byl přidán TEA (**36**) (0,05 ml; 0,38 mmol; 1,1 eq) a následně 2-brom-4'-hydroxyacetofenon (**38**) (82 mg; 0,38 mmol; 1,1 eq). Směs se nechala míchat 15 min při 0 °C, poté byla zahřáta na laboratorní teplotu a míchána 5 h. Reakce po celou dobu probíhala pod dusíkovou atmosférou a kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po zreagování byl přidán EtOAc a provedla se extrakce nasyceným roztokem NaCl, nasyceným roztokem NaHCO₃ a znovu nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého Na₂SO₄, přefiltrována a přebytek EtOAc odpařen. Produkt byl následně čištěn sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fáze byla použita směs DCM/MeOH 20/1, následně DCM/MeOH 10/1. Po ukončení chromatografie byl produkt zakoncentrován na vakuové odparce.

Benzyl 1-((1-(2-(4-hydroxyfenyl)-2-oxoethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylát, 39.



Získaná sloučenina **39** byla izolována jako nažloutlá pevná látka. C₂₇H₃₄N₂O₄. M = 450,58 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 138 mg (88%).

T_t = 108,1-110,1 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7,83 (d; J = 8,7 Hz; 2H), 7,37-7,29 (m; 5H), 6,81 (d; J = 8,7 Hz; 2H), 6,20 (br s; 1H), 5,11 (s; 2H), 3,77 (s; 2H), 3,06-3,01 (m; 2H), 2,87-2,82 (m; 2H), 2,39-2,33 (m; 1H), 2,22-2,16 (m; 4H), 2,09-2,02 (m; 2H), 1,96-1,90 (m; 2H), 1,85-1,78 (m; 2H), 1,76-1,70 (m; 2H), 1,61-1,51 (m; 1H), 1,40-1,32 (m; 2H) ppm.

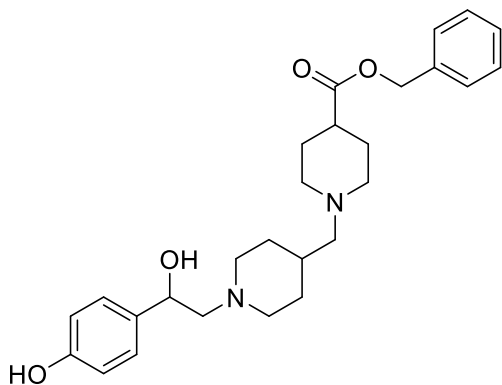
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 194,5; 174,8; 162,1; 136,0; 130,7; 128,5; 128,2; 128,0; 127,8; 115,7; 66,2; 64,6; 63,9; 54,0; 53,3; 40,8; 32,7; 30,4; 27,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺: vypočítaná hodnota pro C₂₇H₃₅N₂O₄⁺ (m/z): 451,3; experimentální hodnota: 451,3.

5.5 Postup přípravy benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylátu

Pro přípravu látky **43** byla jako výchozí sloučenina použita sloučenina **39** (100 mg; 0,22 mmol; 1 eq) rozpuštěná v bezvodém MeOH (1,1 ml) a bezvodém THF (1,1 ml). K reakční směsi ochlazené na 0 °C byl přidán NaBH₄ (**40**) (126 mg; 3,33 mmol; 15 eq) a směs se nechala míchat 30 min při 0 °C. Reakce po celou dobu probíhala pod dusíkovou atmosférou a kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po zreagování byla provedena extrakce s EtOAc a vodou. Organická fáze byla poté vysušena pomocí bezvodého Na₂SO₄, filtrována a EtOAc byl odpařen. Produkt byl nakonec přečištěn sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fáze byla použita směs DCM/MeOH 10/1 později DCM/MeOH 5/1. Po ukončení chromatografie byl produkt zakoncentrován na vakuové odparce.

Benzyl 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylát, 43.



Získaná sloučenina **43** byla izolována jako pevná bílá krystalická látka. C₂₇H₃₆N₂O₄. M = 452,60 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 73 mg (73%).

T_t = 110,5-112,5 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d): δ 7,37-7,29 (m; 5H), 7,13 (d; J = 8,4 Hz; 2H), 6,77 (d; J = 8,4 Hz; 2H), 6,23 (br s; 1H), 5,11 (s; 2H), 4,80-4,75 (m; 1H), 3,28-3,21 (m; 1H), 3,09-3,01 (m; 1H), 2,85-2,78 (m; 2H), 2,68-2,58 (m; 2H), 2,47-2,40 (m; 1H), 2,37-2,31 (m; 1H), 2,29-2,23 (m; 1H), 2,20-2,15 (m; 2H), 2,06-1,97 (m; 2H), 1,94-1,87 (m; 2H), 1,83-1,73 (m; 4H), 1,62-1,53 (m; 1H), 1,43-1,33 (m; 2H) ppm.

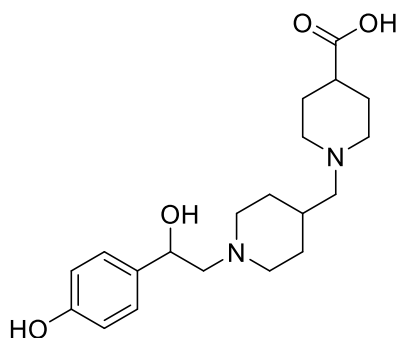
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-d): δ 174,8; 156,0; 136,0; 132,8; 128,5; 128,1; 128,0; 127,3; 115,6; 68,3; 66,1; 65,5; 64,2; 53,4; 52,3; 40,9; 30,0; 29,7; 27,9 ppm.

MS (ESI⁺): [M+H]⁺: vypočítaná hodnota pro C₂₇H₃₇N₂O₄⁺ (m/z): 453,3; experimentální hodnota: 453,3.

5.6 Postup přípravy 1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylové kyseliny

Při přípravě látky **15** byla jako výchozí látka použita sloučenina **43** (70 mg; 0,15 mmol; 1 eq). V zavakuované baňce byla výchozí látka **43** rozpuštěna v bezvodém MeOH (1,5 ml) a baňka byla opět zavakuována. Po přidání 5 % Pd/C (33 mg; 0,015 mmol; 0,1 eq) se baňka znovu zavakuovala a reakční směs byla míchána 7 h při laboratorní teplotě pod vodíkovou atmosférou. Kontrola průběhu reakce byla prováděna TLC metodou. Po zreagování byla provedena filtrace přes celit a promytí MeOH. Následně byl MeOH odpařen na vakuové odparce a produkt vysušen. Poté následovalo čištění pomocí extrakce na pevné fázi (Strata C18-E) s použitím vody a MeOH (v poměru 1/0, 1/1, 0/1) jako rozpouštědel.

1-((1-(2-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)piperidin-4-yl)methyl)piperidin-4-karboxylová kyselina, **15**.



Získaná sloučenina **15** byla izolována jako žlutý olej.
 $C_{20}H_{30}N_2O_4$. $M = 362,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 17 mg (30 %).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): δ 7,25 (d; $J = 8,4 \text{ Hz}$; 2H), 6,78 (d; $J = 8,3 \text{ Hz}$; 2H), 4,97-4,95 (m; 1H), 3,62-3,55 (m; 1H), 3,51-3,45 (m; 1H), 3,26-3,20 (m; 2H), 3,11-2,99 (m; 2H), 2,92-2,84 (m; 2H), 2,71-2,65 (m; 2H), 2,61-2,51 (m; 2H), 2,33-2,25 (m; 1H), 2,05-1,94 (m; 5H), 1,92-1,83 (m; 2H), 1,62-1,48 (m; 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): δ 182,1; 158,8; 133,3; 128,5; 116,4; 68,9; 64,5; 63,3; 54,3; 52,6; 49,9; 31,3; 28,8; 28,3 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}+\text{H}]^+$: vypočítaná hodnota pro $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4^+$ (m/z): 363,2; experimentální hodnota: 363,3.

Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byly shrnuty poznatky o glutamátových receptorech, jejich aktivaci a inhibici. Zvláštní pozornost byla věnována NMDA receptorům, které představují velký potenciál v léčbě neurodegenerativních onemocnění.

V experimentální části byl syntetizován derivát piperidin-4-karboxylové kyseliny **15** šestikrokovou syntézou a cíle bakalářské práce byly splněny. V prvním kroku byl mechanismem S_NAc připraven ester **26** a výtěžek reakce činil 93 %. Ve druhém kroku došlo k alkylaci aminoskupiny přítomné v molekule **26** mechanismem S_N2 a byl připraven ester **29** o výtěžku 85 %. Třetí krok zahrnoval deprotektci *tert*-butoxykarbonylové skupiny z aminoskupiny obsažené v molekule **29**, kdy došlo ke vzniku sloučeniny **35** s volnou sekundární aminoskupinou. Výtěžnost třetího kroku činila 96 %. Ve čtvrtém kroku byla provedena alkylace sekundární aminoskupiny mechanismem S_N2 za vzniku esteru **39** nesoucího ve své molekule ketoskupinu s výtěžností 88 %. Pátý krok probíhal mechanismem A_dN a došlo k redukci ketoskupiny na hydroxyskupinu, byla připravena sloučenina **43**. Tento reakční krok byl prováděn opakovaně s vyššími eq redukčního činidla $NaBH_4$, aby bylo dosaženo výtěžnosti reakce 73 %. V posledním kroku syntézy byla provedena katalytická hydrogenace esteru za vzniku finální karboxylové kyseliny **15**. Vlivem malé rozpustnosti produktu v rozpouštědle činila výtěžnost po filtraci přes celit a extrakci na pevné fázi 30 %. Celková výtěžnost této syntézy byla po šesti reakčních krocích 15 %.

Produkty všech kroků i finální produkt syntézy byly připraveny v požadované čistotě. K určení struktury připravovaných látek byly využity metody NMR a MS. U látek syntetizovaných v pevném stavu byly změřeny jejich teploty tání. Připravený derivát **15** bude dále poskytnut na biologické testování *in vitro*, kde bude zkoumána jeho aktivita jako potenciálního inhibitoru NMDA receptorů.

Použitá literatura

- [1] LOVINGER D. M. Communication Networks in the Brain. *Alcohol Research & Health*. 2008, **31**(3), 196–214.
- [2] HYND, M. R., H. L. SCOTT a P. R. DODD. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2004, **45**(5), 583–595.
- [3] KANDEL, E., J. SCHWARTZ a T. JESSELL. *Principles of Neural Science, Fourth Edition*. New York: McGraw-Hill Companies, Incorporated, 2000. ISBN 978-0-8385-7701-1.
- [4] BRUNTON, L., J. LAZO a K. PARKER. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition*. New York: McGraw Hill Professional, 2005. ISBN 978-0-07-160891-6.
- [5] CHANGEUX, J. P. a Y. PAAS. Nicotinic Acetylcholine Receptors. In: L. R. SQUIRE, ed. *Encyclopedia of Neuroscience* [online]. Oxford: Academic Press, 2009, s. 1129–1133. ISBN 978-0-08-045046-9. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978008045046901127X>
- [6] TREISTMAN, S. N. a G. E. SEALE. Molecular Mechanisms Underlying the Development of Functional and Behavioral Tolerance to Alcohol. In: *Neurobiology of Alcohol Dependence* [online]. San Diego: Academic Press, 2014, s. 321–346. ISBN 978-0-12-405941-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012405941200016X>
- [7] FRAZER, A. a J. G. HENSLER. Serotonin Receptors. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition* [online]. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. ISBN 978-0-7817-1745-8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28234/>
- [8] LAW, P. Y. a H. H. LOH. Opioid Receptors. In: W. J. LENNARZ a M. D. LANE, ed. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. New York: Elsevier, 2004, s. 167–171. ISBN 978-0-12-443710-4. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0124437109004543>
- [9] PACHECO, M. Receptor Types and Subtypes, Fig. 2. Diagram for ligand-gated ion channels [Obrázek]. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007, 1–5.
- [10] NATURE EDUCATION. The relationships of G proteins to the plasma membrane [Obrázek]. *Scitable* [online]. 2014. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/content/the-relationships-of-g-proteins-to-the-14707107/>
- [11] LANGMEIER, M., O. KITTNAR, D. MAREŠOVÁ a J. POKORNÝ. *Základy lékařské fyziologie*. Praha 7: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.

- [12] ZHOU, Y. a N. C. DANBOLT. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*. 2014, **121**(8), 799–817.
- [13] JØRGENSEN, M. B. a N. H. DIEMER. Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1982, **66**(5), 536–546.
- [14] BLASCO, H., S. MAVEL, P. CORCIA a P. H. GORDON. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Current Medicinal Chemistry*. 2014, **21**(31), 3551–3575.
- [15] KUZMINA, U. S., L. F. ZAINULLINA, V. A. VAKHITOV, K. Z. BAKHTIYAROVA a Y. V. VAKHITOVA. [The role of glutamate in the pathogenesis of multiple sclerosis]. *Zhurnal Nevrologii I Psikhiiatrii Imeni S.S. Korsakova*. 2019, **119**(8), 160–167.
- [16] BLANDINI, F., R. H. PORTER a J. T. GREENAMYRE. Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*. 1996, **12**(1), 73–94.
- [17] HOWES, O., R. MCCUTCHEON a J. STONE. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*. 2015, **29**(2), 97–115.
- [18] JABAUDON, D., K. SHIMAMOTO, Y. YASUDA-KAMATANI, M. SCANZIANI, B. H. GÄHWILER a U. GERBER. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, **96**(15), 8733–8738.
- [19] DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001, **65**(1), 1–105.
- [20] BANNAI, S. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1986, **261**(5), 2256–2263.
- [21] VANDENBERG, R. J. a R. M. RYAN. Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews*. 2013, **93**(4), 1621–1657.
- [22] LEHRE, K. P. a N. C. DANBOLT. The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses: Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*. 1998, **18**(21), 8751–8757.
- [23] FURNESS, D. N. a K. P. LEHRE. Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *The European Journal of Neuroscience*. 1997, **9**(9), 1961–1969.
- [24] RAUEN, T., J. D. ROTHSTEIN a H. WÄSSLE. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell and Tissue Research*. 1996, **286**(3), 325–336.

- [25] ROTHSTEIN, J. D., L. MARTIN, A. I. LEVEY, M. DYKES-HOBERG, L. JIN, D. WU, N. NASH a R. W. KUNCL. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 1994, **13**(3), 713–725.
- [26] DEHNES, Y., F. A. CHAUDHRY, K. ULLENSVANG, K. P. LEHRE, J. STORM-MATHISEN a N. C. DANBOLT. The Glutamate Transporter EAAT4 in Rat Cerebellar Purkinje Cells: A Glutamate-Gated Chloride Channel Concentrated near the Synapse in Parts of the Dendritic Membrane Facing Astroglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1998, **18**(10), 3606–3619.
- [27] LIGUZ-LECZGAR, M. a J. SKANGIEL-KRAMSKA. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2007, **67**(3), 207–218.
- [28] FREMEAU, R. T., M. D. TROYER, I. PAHNER, G. O. NYGAARD, Cindy H. TRAN, R. J. REIMER, E. E. BELLOCCHIO, D. FORTIN, J. STORM-MATHISEN a R. H. EDWARDS. The Expression of Vesicular Glutamate Transporters Defines Two Classes of Excitatory Synapse. *Neuron*. 2001, **31**(2), 247–260.
- [29] FREMEAU, R. T., J. BURMAN, T. QURESHI, C. H. TRAN, John PROCTOR, J. JOHNSON, H. ZHANG, D. SULZER, D. R. COPENHAGEN, J. STORM-MATHISEN, R. J. REIMER, F. A. CHAUDHRY a R. H. EDWARDS. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, **99**(22), 14488–14493.
- [30] HERZOG, E., J. GILCHRIST, C. GRAS, A. MUZERELLE, P. RAVASSARD, B. GIROS, P. GASPARD a S. EL MESTIKAWY. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience*. 2004, **123**(4), 983–1002.
- [31] ZERANGUE, N. a M. P. KAVANAUGH. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*. 1996, **383**(6601), 634–637.
- [32] WADICHE, J. I. a M. P. KAVANAUGH. Macroscopic and Microscopic Properties of a Cloned Glutamate Transporter/Chloride Channel. *The Journal of Neuroscience*. 1998, **18**(19), 7650–7661.
- [33] BENARROCH, E. E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease, Distribution and mechanisms of vesicular glutamate transporters (VGLUT) and excitatory amino acid transporters (EAATs) [Obrázek]. *Neurology*. 2010, **74**(3), 259–264.
- [34] BRIDGES, R. J., M. S. STANLEY, M. W. ANDERSON, C. W. COTMAN a A. R. CHAMBERLIN. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1991, **34**(2), 717–725.

- [35] LAU, A. a M. TYMIANSKI. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2010, **460**(2), 525–542.
- [36] SOBOLEVSKY, A. I. Structure and gating of tetrameric glutamate receptors, Figure 1: Structure of iGluR [Obrázek]. *The Journal of Physiology*. 2015, **593**(1), 29–38.
- [37] PIERCE, R. C. a M. E. WOLF. Psychostimulant-induced neuroadaptations in nucleus accumbens AMPA receptor transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013, **3**(2), a012021.
- [38] LEE, K., L. GOODMAN, C. FOURIE, S. SCHENK, B. LEITCH a J. M. MONTGOMERY. AMPA Receptors as Therapeutic Targets for Neurological Disorders. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2016, **103**, 203–261.
- [39] TWOMEY, E. C., M. V. YELSHANSKAYA, R. A. GRASSUCCI, J. FRANK a A. I. SOBOLEVSKY. Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. *Nature*. 2017, **549**(7670), 60–65.
- [40] CARTA, M., S. FIÈVRE, A. GORLEWICZ a C. MULLE. Kainate receptors in the hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*. 2014, **39**(11), 1835–1844.
- [41] CHITTAJALLU, R., M. VIGNES, K. K. DEV, J. M. BARNES, G. L. COLLINGRIDGE a J. M. HENLEY. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature*. 1996, **379**(6560), 78–81.
- [42] CASTILLO, P. E., R. C. MALENKA a R. A. NICOLL. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*. 1997, **388**(6638), 182–186.
- [43] CRÉPEL, V. a C. MULLE. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. *Current Opinion in Pharmacology*. 2015, **20**, 83–88.
- [44] PAOLETTI, P. a J. NEYTON. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007, **7**(1), 39–47.
- [45] BULLER, A. L., H. C. LARSON, B. E. SCHNEIDER, J. A. BEATON, R. A. MORRISSETT a D. T. MONAGHAN. The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1994, **14**(9), 5471–5484.
- [46] KUTSUWADA, T., N. KASHIWABUCHI, H. MORI, K. SAKIMURA, E. KUSHIYA, K. ARAKI, H. MEGURO, H. MASAKI, T. KUMANISHI a M. ARAKAWA. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*. 1992, **358**(6381), 36–41.
- [47] ISHII, T., K. MORIYOSHI, H. SUGIHARA, K. SAKURADA, H. KADOTANI, M. YOKOI, C. AKAZAWA, R. SHIGEMOTO, N. MIZUNO a M. MASU. Molecular

- characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, **268**(4), 2836–2843.
- [48] SHENG, M., J. CUMMINGS, L. A. ROLDAN, Y. N. JAN a L. Y. JAN. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*. 1994, **368**(6467), 144–147.
- [49] WAFFORD, K. A., C. J. BAIN, B. LE BOURDELLES, P. J. WHITING a J. A. KEMP. Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport*. 1993, **4**(12), 1347–1349.
- [50] SASAKI, Y. F., T. ROTHE, L. S. PREMKUMAR, S. DAS, Jiankun CUI, M. V. TALANTOVA, H. K. WONG, X. GONG, S. F. CHAN, D. ZHANG, N. NAKANISHI, N. J. SUCHER a S. A. LIPTON. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*. 2002, **87**(4), 2052–2063.
- [51] NING, L. *Neuronal synapse formation regulated by intercellular adhesion molecules-5 (ICAM-5), Figure 6. Schematic model of NMDAR structure [Obrázek]* [online]. Helsinki, 2013. Disertační práce. University of Helsinki. Dostupné z: <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/40245>
- [52] FURUKAWA, H., S. K. SINGH, R. MANCUSO a E. GOUAUX. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*. 2005, **438**(7065), 185–192.
- [53] YAO, Y. a M. L. MAYER. Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2006, **26**(17), 4559–4566.
- [54] RACHLINE, J., F. PERIN-DUREAU, A. LE GOFF, J. NEYTON a P. PAOLETTI. The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. *The Journal of Neuroscience*. 2005, **25**(2), 308–317.
- [55] FREDERICKSON, C. J., S. W. SUH, D. SILVA, C. J. FREDERICKSON a R. B. THOMPSON. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition*. 2000, **130**(5S Suppl), 1471S–1483S.
- [56] WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*. 1993, **44**(4), 851–859.
- [57] YASUI, B., T. MIYAMOTO, K. HIRAOKA a Y. SAKO. Process for the preparation of 1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-benzyl piperdino)-1-propanol and acid-addition salts thereof [online]. 4377691. 22. březen 1983. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/33/75/99/2428e7b89b5226/US4377691.pdf>

- [58] BORZA, I. a G. DOMÁNY. NR2B selective NMDA antagonists: the evolution of the ifenprodil-type pharmacophore. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2006, **6**(7), 687–695.
- [59] PAOLETTI, P., P. ASCHER a J. NEYTON. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1997, **17**(15), 5711–5725.
- [60] MOTT, D. D., J. J. DOHERTY, S. ZHANG, M. S. WASHBURN, M. J. FENDLEY, P. LYUBOSLAVSKY, S. F. TRAYNELIS a R. DINGLEDINE. Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nature Neuroscience*. 1998, **1**(8), 659–667.
- [61] FENG, B., R. M. MORLEY, D. E. JANE a D. T. MONAGHAN. The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology*. 2005, **48**(3), 354–359.
- [62] NEYTON, J. a P. PAOLETTI. Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2006, **26**(5), 1331–1333.
- [63] YAMAKURA, T. a K. SHIMOJI. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology*. 1999, **59**(3), 279–298.
- [64] HESS, S. D., L. P. DAGGETT, C. DEAL, C. C. LU, E. C. JOHNSON a G. VELIÇELEBI. Functional characterization of human N-methyl-D-aspartate subtype 1A/2D receptors. *Journal of Neurochemistry*. 1998, **70**(3), 1269–1279.
- [65] HONER, M., D. BENKE, B. LAUBE, J. KUHSE, R. HECKENDORN, H. ALLGEIER, C. ANGST, H. MONYER, P. H. SEEBURG, H. BETZ a H. MOHLER. Differentiation of glycine antagonist sites of N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. Preferential interaction of CGP 61594 with NR1/2B receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**(18), 11158–11163.
- [66] ZEEVALK, G. D. a W. J. NICKLAS. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *Journal of Neurochemistry*. 1992, **59**(4), 1211–1220.
- [67] ZIPFEL, G. J., D. J. BABCOCK, J. M. LEE a D. W. CHOI. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *Journal of Neurotrauma*. 2000, **17**(10), 857–869.
- [68] AIYER, R., N. MEHTA, S. GUNGOR a A. GULATI. A Systematic Review of NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Neuropathic Pain in Clinical Practice. *The Clinical Journal of Pain*. 2018, **34**(5), 450–467.
- [69] GORMAN, A. L., K. J. ELLIOTT a C. E. INTURRISI. The d- and l-isomers of methadone bind to the non-competitive site on the N-methyl-D-aspartate

- (NMDA) receptor in rat forebrain and spinal cord. *Neuroscience Letters*. 1997, **223**(1), 5–8.
- [70] BERNSTEIN, G., K. DAVIS, C. MILLS, L. WANG, Michael MCDONNELL, J. OLDENHOF, C. INTURRISI, P. L. MANFREDY a O. V. VITOLO. Characterization of the Safety and Pharmacokinetic Profile of D-Methadone, a Novel N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist in Healthy, Opioid-Naive Subjects: Results of Two Phase 1 Studies. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2019, **39**(3), 226–237.
- [71] LIPTON, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2006, **5**(2), 160–170.
- [72] KRYSTAL, J. H., L. P. KARPER, J. P. SEIBYL, G. K. FREEMAN, R. DELANEY, J. D. BREMNER, G. R. HENINGER, M. B. BOWERS a D. S. CHARNEY. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*. 1994, **51**(3), 199–214.
- [73] MCQUAY, H. J., D. CARROLL, A. R. JADAD, C. J. GLYNN, T. JACK, R. A. MOORE a P. J. WIFFEH. Dextromethorphan for the treatment of neuropathic pain: a double-blind randomised controlled crossover trial with integral n-of-1 design. *Pain*. 1994, **59**(1), 127–133.
- [74] KIMISKIDIS, V. K., V. MIRTSOU-FIDANI, P. G. PAPAIOANNIDOU, I. NIOPAS, G. GEORGIADIS, T. C. CONSTADINIDIS a A. D. KAZIS. A phase I clinical trial of dextromethorphan in intractable partial epilepsy. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 1999, **21**(10), 673–678.
- [75] WALKER, F. O. a V. P. HUNT. An open label trial of dextromethorphan in Huntington's disease. *Clinical Neuropharmacology*. 1989, **12**(4), 322–330.
- [76] GREDAL, O., L. WERDELIN, S. BAK, P. B. CHRISTENSEN, G. BOYSEN, M. O. KRISTENSEN, J. H. JESPERSEN, L. REGEUR, H. H. HINGE a T. S. JENSEN. A clinical trial of dextromethorphan in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1997, **96**(1), 8–13.
- [77] MEYTHALER, J. M., R. C. BRUNNER, A. JOHNSON a T. A. NOVACK. Amantadine to improve neurorecovery in traumatic brain injury-associated diffuse axonal injury: a pilot double-blind randomized trial. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*. 2002, **17**(4), 300–313.
- [78] FISHER, K., T. J. CODERRE a N. A. HAGEN. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. *Journal of Pain and Symptom Management*. 2000, **20**(5), 358–373.
- [79] CHEN, H. S. a S. A. LIPTON. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*. 2006, **97**(6), 1611–1626.

- [80] WINBLAD, B., R. W. JONES, Y. WIRTH, A. STÖFFLER a H. J. MÖBIUS. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2007, **24**(1), 20–27.
- [81] SHIMO, T. Manufacturing process for memantine [online]. 9452971. 27. září 2016. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d6/d4/8e/8a116bdc902bbf/US9452971.pdf>
- [82] EPPERLY, T. D., M. A. DUNAY a J. L. BOICE. Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. *American Family Physician*. 2017, **95**(12), 771–778.
- [83] VERGES, D. K., J. L. RESTIVO, W. D. GOEBEL, D. M. HOLTZMAN a J. R. CIRRITO. Opposing synaptic regulation of amyloid- β metabolism by NMDA receptors in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2011, **31**(31), 11328–11337.
- [84] ITTNER, L. M., Y. D. KE, F. DELERUE, M. BI, Amadeus GLADBACH, J. VAN EERSEL, H. WÖLFING, B. C. CHIENG, M. J. CHRISTIE, I. A. NAPIER, A. ECKERT, M. STAUFENBIEL, E. HARDEMAN a J. GÖTZ. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010, **142**(3), 387–397.
- [85] DECKER, J. M., L. KRÜGER, A. SYDOW, F. J. DENNISSEN, Z. SISKOVA, E. MANDELKOW a E. M. MANDELKOW. The Tau/A152T mutation, a risk factor for frontotemporal-spectrum disorders, leads to NR2B receptor-mediated excitotoxicity. *EMBO reports*. 2016, **17**(4), 552–569.
- [86] SOOM, N. A. a T. THIEMANN. Hydrogenation of Alkenes with NaBH₄, CH₃CO₂H, Pd/C in the Presence of O- and N-Benzyl Functions. *International Journal of Organic Chemistry*. 2016, **6**(1), 1–11.