แนวทางใหม่ในการพัฒนาสารยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อรักษาโรคอัลไซเมอร์

New Approach in Development of Acetylcholinesterase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease

นิพนธ์ปริทัศน์

ลือลักษณ์ ล้อมลิ้ม[*1] และ ธีรภัทร นวลน้อย[2]

[1] ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2] ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** luelak.l@psu.ac.th

วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2554;6(2):157-173

Review Article

Luelak Lomlim[*1] and Teerapat Nualnoi[2]

[1] Department of Pharmaceutical Chemistry, Prince of Songkhla University
[2] Department of Pharmaceutical Technology, Prince of Songkhla University

* **Corresponding author:** luelak.l@psu.ac.th

Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2011;6(2):157-173

บทคัดย่อ

Aacetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) เป็นกลุ่มยาหลักที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบัน บทความนี้นำเสนอการพัฒนา AChEI โดยแนวทางที่สำคัญ ได้แก่ การออกแบบและสังเคราะห์ dual binding site inhibitors และการพัฒนาสารให้อยู่ในรูป multi-target-directed ligands (MTDLs) แนวทางการออกแบบ dual binding site inhibitor ได้แก่ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ donepezil และการทำ homo- หรือ heterodimer ของ CAS ligand เป็นต้น ส่วน MTDLs เป็น AChEI ที่มีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรคหรืออาการอื่น ๆ ที่มักพบในผู้ป่วย AD แนวทางการออกแบบ MTDL ได้แก่ การเชื่อมต่อโมเลกุลของ AChEI กับ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์อื่นที่ต้องการ หรือการทำอนุพันธ์ลูกผสม (hybrid molecule) แนวทางทั้งหมดนี้นำไปสู่การพัฒนา AChEI ใหม่ ๆ ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ที่สูงขึ้น และมีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ ตลอดจนมีผลชะลอการดำเนินไปของโรคอีกด้วย

คำสำคัญ : สารยับยั้งอะเซติลโคลีนเอสเทอเรส, โรคอัลไซเมอร์, dual binding site inhibitor, multi target-directed ligands

Abstract

Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) portray the main group of drugs currently used for the treatment of Alzheimer's disease (AD). In this article we present new approaches for the development of AChEIs including the design and synthesis of dual binding site inhibitors and multi-target-directed ligands (MTDLs). Dual binding site inhibitors can be designed as donepezil derivatives or as homo- or heterodimeric CAS ligands. MTDLs reveal AChEI molecule interacting with other targets relevant for the pathophysiology of AD or other symptoms commonly found in the AD patients. MTDLs can be designed by linking AChEI molecules with pharmacophoric groups of other active drug and by creating a hybrid molecule. These strategies lead to the development of new AChEIs with increased potency, therapeutic efficacy for the treatment of symptoms and attenuating the pathogenesis of AD.

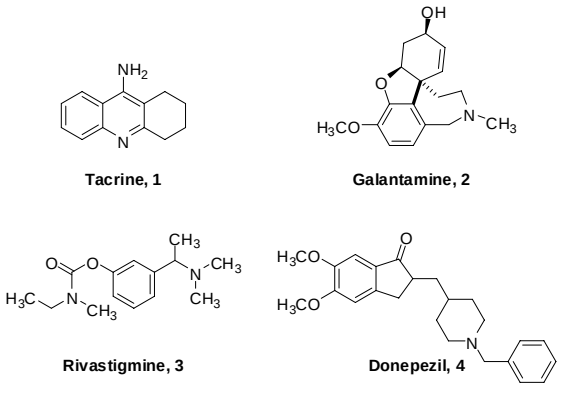
Keywords: acetylcholinesterase inhibitor, Alzheimer's disease, dual binding site inhibitor, multi target-directed ligands

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคสมองเสื่อม (neurodegenerative disease) ซึ่งเป็นหนึ่งในเจ็ดอันดับแรกของโรคที่พบบ่อยในผู้สูงอายุในประเทศไทย โดยพบมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งยังพบว่าผู้สูงอายุหญิงมีสัดส่วนการเป็นโรคมากกว่าชายเล็กน้อย[1]

จากการศึกษาทางพยาธิสรีรวิทยาของเนื้อสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบการเกิด senile plaque ที่เกิดจากการสะสมของ Aβ protein ที่มีการ folding อย่างผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีการเกิด neurofibril tangle (NFT) ซึ่งเกิดจาก hyperphosphorylation ของ τ protein เมื่อโรคมีการดำเนินต่อไปจะพบการตายของเซลล์ประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cholinergic neuron และ synapse ในบริเวณสมองส่วนหน้าจะถูกทำลายอย่างมาก ทำให้ผู้ป่วยเกิดการสูญเสียความจำในที่สุด[2]

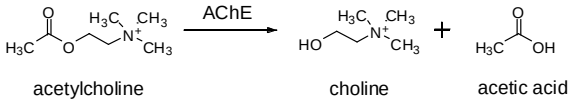
สมมุติฐานเกี่ยวกับการสูญเสียความจำเนื่องจากการทำลายของ cholinergic neuron เรียกว่า "cholinergic hypothesis"[2] ซึ่งนำไปสู่แนวทางการรักษาโดยการใช้ยาที่มีผลเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาท ACh ในสมองของผู้ป่วยโดย acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) ในปัจจุบัน AChEI ที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์มี 4 ชนิด (รูปที่1) ได้แก่ tacrine (**1**), galanthamine (**2**), rivastigmine (**3**) และ donepezil (**4**)[3]



รูปที่ 1 Acetylcholinesterase inhibitors ที่ใช้ในทางคลินิก

เอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase; AChE)

อะเซติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase, AChE; EC 3.1.1.7) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine hydrolase ทำหน้าที่สลาย acetylcholine (ACh) ที่ synaptic cleft ได้ผลิตภัณฑ์ คือ choline และ acetic acid (รูปที่ 2)



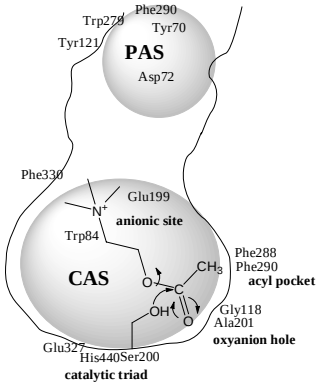
รูปที่ 2 การสลาย ACh โดยเอนไซม์ AChE

จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของ AChE จาก *Torpedo californica* (*Tc*AchE) ด้วยเทคนิค x-ray crystallography พบว่า active site ของ AChE มีลักษณะเป็นช่องที่แคบและลึก โดยมีความลึก 20 Å และส่วนที่แคบที่สุดมีขนาด 4.5 Å พื้นผิวภายในประกอบด้วย aromatic residues หลายชนิด ได้แก่ Trp84 และ Phe330 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ *catalytic anionic site* (CAS) ในบริเวณส่วนล่างของช่องแคบ ส่วน Tyr70, Tyr121 และ Trp279 เป็นส่วนประกอบของ *peripheral anionic site* (PAS) ซึ่งอยู่บริเวณปากช่องแคบ[4]

ACh จับกับ AChE ในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ โดยหมู่ quaternary ammonium จะเกิด cation-π interaction กับ Trp84 ที่ anionic subsite หมู่ acetyl ของ ACh จะจับในส่วน “acyl pocket” ซึ่งมี Phe288 และ Phe290 เป็นองค์ประกอบ ปฏิกิริยา hydrolysis ของ ACh เกิดโดยหมู่ hydroxyl ของ Ser200 เข้าทำปฏิกิริยากับ ester carbonyl ของ ACh ส่วน “oxyanion hole” ทำหน้าที่ในการ stabilize transition state[5] (รูปที่ 3)

Acetylcholinesterase Inhibitors ที่ใช้ในทางคลินิกสำหรับการรักษาอัลไซเมอร์

การยับยั้ง AChE จะทำให้สารสื่อประสาท ACh ในบริเวณ synapse มีระดับสูงขึ้น acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) ที่มีประโยชน์ในการรักษาโรค ได้แก่ สารที่ยับยั้ง AChE แบบผันกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ classic และ nonclassic AChEI

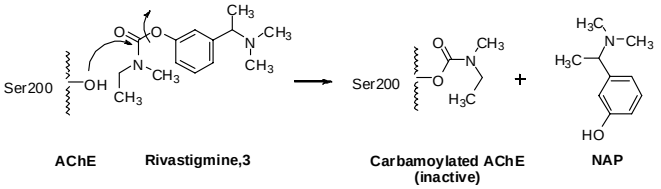


รูปที่ 3 ภาพจำลอง active site gorge ของ *Tc*AChE

1. Classic AChEI

classic AChEI หมายถึง สารที่เป็น substrate ของ AChE ซึ่งเมื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์แล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างคงตัว ทำให้ AChE ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ พันธะดังกล่าวสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ ทำให้สามารถ regenerate เอนไซม์กลับมาในรูปที่ทำงานได้ ยากลุ่มนี้มักมีโครงสร้างทางเคมีเป็น arylcarbamate เช่น rivastigmine เป็นต้น[6]

rivastigmine (**3**) ยับยั้ง AChE โดยการจับในบริเวณ CAS ของเอนไซม์ โดยหมู่ amine ในรูปที่มีประจุบวกจะเกิดอันตรกิริยากับ anionic subsite ทำให้หมู่ carbamate เข้าใกล้กับตำแหน่งของ Ser200 แล้วเกิดปฏิกิริยา carbamoylation ขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดังกล่าว คือ (-)-*S*-3-[(1-dimethylamino)ethyl]phenol (NAP) ยังคงมี affinity ต่อ active site ของเอนไซม์ ทำให้เกิดการยับยั้ง AChE ต่อไปเป็นเวลานาน นอกจากนี้ จากการศึกษาใน *Tc*AChE พบว่าหลังจาก Ser200 ถูกเติมหมู่ carbamate แล้ว His440 จะเคลื่อนออกจาก Glu327 จึงทำให้เกิดการทำลายระบบของ catalytic triad เป็นสาเหตุให้กระบวนการ reactivate เอนไซม์เกิดขึ้นได้ช้าลง[7]



รูปที่ 4 การออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ของ rivastigmine

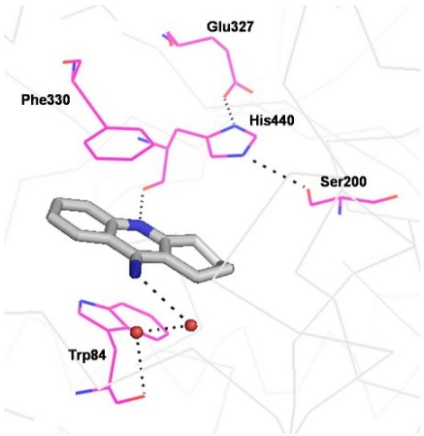
2. Nonclassic AChEI

nonclassic AChEI หมายถึง ยาที่จับกับ AChE โดยมี affinity สูงกว่า ACh แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์[6] สารกลุ่มนี้แบ่งได้เป็นสองประเภทดังต่อไปนี้

2.1 Nonclassic AChEI ที่มี affinity ต่อ CAS

สารกลุ่มนี้ได้แก่ tacrine (**1**) และ galanthamine (**2**) สารเหล่านี้จับกับ AChE เฉพาะในบริเวณ CAS จึงขัดขวาง ACh ไม่ให้เข้ามายังบริเวณ active site ได้ tacrine ได้รับการรับรองให้ใช้รักษาอัลไซเมอร์เป็นชนิดแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1993 แต่ปัจจุบันถูกนำมาใช้น้อยลงเนื่องจากมีพิษต่อตับ tacrine เกิด stacking interaction กับ Trp84 และ Phe330 ที่ “anionic” subsite ของ active site ของ *Tc*AChE nitrogen บนวงแหวน เกิด hydrogen bond กับ carbonyl oxygen ของ His-440 (3.1 Å) ส่วน amino nitrogen สร้าง hydrogen bond กับโมเลกุลของน้ำ[8] (รูปที่ 5)

(-)-galantamine (**2**) เป็นอัลคาลอยด์จาก *Galanthus nivalis* ซึ่งนอกจากมีฤทธิ์ AChEI แล้ว ยังสามารถกระตุ้น nicotinic ACh receptor (nAChR) ทั้งที่ pre- และ post-synaptic พบว่ายาเกิดอันตรกิริยาที่ choline-binding site (Trp84) และ acyl pocket (Phe288, Phe290) ของ *Tc*AChE[9]



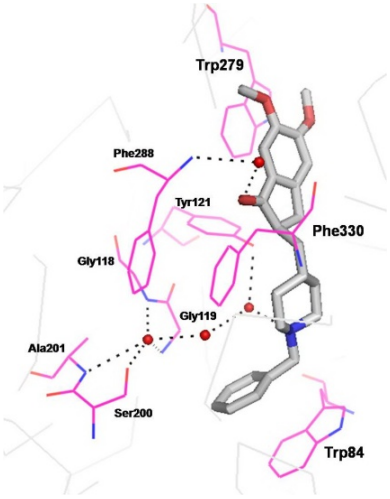
รูปที่ 5 3D crystal structure ของ Tacrine-AChE complex (PDB code 1ACJ)

2.2 Nonclassic AChEI ที่เป็น dual binding site inhibitors

"dual binding site inhibitors" หมายถึง สารที่สามารถจับได้ทั้งในบริเวณ CAS และ PAS ของ AChE โดยทั่วไปสารในกลุ่มนี้จะมีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า AChEI ที่ยับยั้งเฉพาะบริเวณ CAS เพียงตำแหน่งเดียว[10]

สารชนิดแรกที่ถูกค้นพบว่าเป็น dual binding site inhibitor ได้แก่ donepezil (**4**)[11] donepezil เกิดอันตรกิริยากับ *Tc*AChE โดยมี aromatic stacking interaction ระหว่าง *N*-benzyl-piperidine moiety กับ indole ring ของ Trp84 ที่ anionic subsite และ มีอันตรกิริยาระหว่าง indanone moiety ของ donepezil กับ indole ring ของ Trp279 ที่ PAS นอกจากนี้ piperidine nitrogen ของ donepezil ยังเกิด cation-π interaction กับ Phe330 ในช่วงกลางของ active site gorge อีกด้วย[12] (รูปที่ 6)

donepezil เป็น AChEI ชนิดแรกที่พบว่าสามารถยับยั้ง Aβ aggregation[13] การที่ยาจับกับ peripheral anionic site ของ AChE ทำให้ยามีความจำเพาะ (selectivity) ต่อ AChE มากกว่า butyrylcholinesterase (BuChE) ทั้งนี้ สามารถอธิบายได้ว่าการจับระหว่าง donepezil กับ AChE อาศัย π-π interaction กับ Trp279 ที่บริเวณ PAS ของ AChE แต่ BuChE ไม่มี aromatic residue ที่ PAS และตำแหน่งออกฤทธิ์ของ BuChE มีลักษณะเป็นช่องที่มีขนาดใหญ่กว่าของ AChE ทำให้ไม่เอื้อต่อการจับกับ donepezil[14]



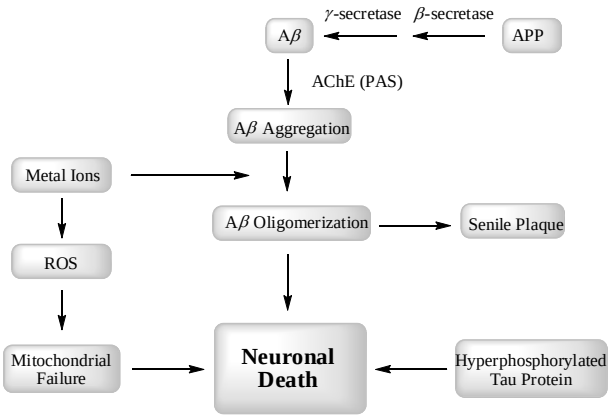
รูปที่ 6 3D crystal structure ของ *Tc*AChE-donepezil complex (PDB code 1EVE)

แนวทางการพัฒนาสารยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสในปัจจุบัน

นอกเหนือจาก cholinergic hypothesis แล้ว การสร้าง Aβ protein aggregation และ τ protein hyperphosphorylation ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ โดย "amyloid cascade hypothesis" กล่าวว่าความผิดปกติในกระบวนการตัดสาย amyloid precursor protein (APP) นำไปสู่การสร้าง Aβ fragment ที่ไม่ละลายน้ำ โดยเริ่มจากการตัดที่ β site ของ APP โดย β-secretase (β-site APP cleaving enzyme, BACE) จากนั้นจะเกิดการตัด APP ส่วนที่เหลือโดย γ-secretase ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Aβ การ folding อย่างผิดปกติของ Aβ ทำให้ลดการละลายน้ำแล้วเกิดการรวมตัวกัน (Aβ aggregation) ดังที่พบใน senile plaque ในสมองของผู้ป่วย นอกจากนี้ mitochondrial APP ยังสะสมใน protein import channel ของ mitochondria การเกิด Aβ aggregation ทำให้เกิดการยับยั้งการขนส่ง cytochrome c oxidase subunit proteins ทำให้เกิดความบกพร่องของกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เพิ่มการสร้าง free radicals ภายในเซลล์ นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท

การเกิด hyperphosphorylation ของ τ protein มีผลทำให้ลดความเสถียรของ microtubule เป็นผลให้เกิดการรบกวนการนำส่งกระแสประสาทที่ synaps และเกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด

นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอื่นอีกหลายประการที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ได้แก่ metal ions และ reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (รูปที่ 7) ดังนั้น แนวทางการรักษาอัลไซเมอร์โดยการเพิ่มปริมาณของสารสื่อประสาท ACh ที่ synapse เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการชะลอการดำเนินไปของโรค



รูปที่ 7 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด neuronal death ในโรคอัลไซเมอร์ (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 15)

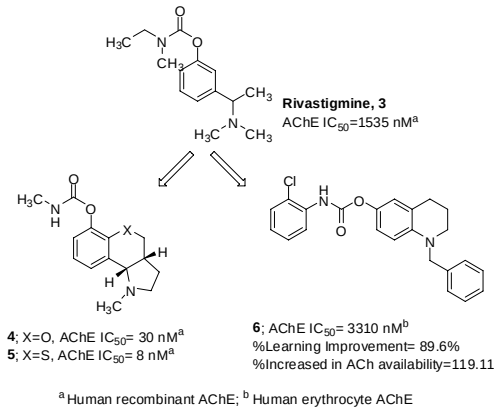
แนวทางการออกแบบ AChEI ใหม่ ๆ สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในช่วง 10 ปีมานี้ นอกเหนือจากความพยายามในการออกแบบ AChEI ที่มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงขึ้นแล้ว ยังมีแนวคิดในการออกแบบสารซึ่งในหนึ่งโมเลกุลมีฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรค หรืออาการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรค เช่น ฤทธิ์ monooxidase inhibitor (MAOI), serotonin transporter (SERT) inhibitors, calcium channel blockers, NO-donor, NMDA receptor antagonists, BACE1 inhibitor เป็นต้น สารที่มีแบบแผนในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างในโมเลกุลเดียวเหล่านี้ เรียกว่า multi-target-directed ligands (MTDLs) โดยแนวทางการออกแบบ MTDL ได้แก่ การเชื่อมต่อระหว่าง AChEI กับสารที่มีฤทธิ์ต้านกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของการเกิดโรค หรือการทำอนุพันธ์ลูกผสม (hybrid molecule)[10,15]

AChEI ที่ออกฤทธิ์เป็น dual binding site inhibitors สามารถยับยั้งการเกิด Aβ aggregation และบริเวณ PAS ของ AChE มีบทบาทโดยตรงต่อการเกิด Aβ aggregation[5] จึงสามารถจัด AChEI ที่เป็น dual binding site inhibitors ว่าเป็น MTDL ได้เช่นกัน เนื้อหาต่อไปนี้จะได้กล่าวถึงการพัฒนาสาร AChEI ตามแนวทางหลัก ๆ 3 แนวทาง ได้แก่ การพัฒนา AChEI ที่มี affinity ต่อ CAS การพัฒนา dual binding site inhibitors และ multi-target-directed ligands (MTDLs) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. การพัฒนา AChEI ที่มี affinity ต่อ CAS

1.1 Conformationally restricted analog ของ rivastigmine

การพัฒนา AChEI จาก rivastigmine (**3**) ได้แก่ การทำ conformationally restricted analog เช่น tricyclic analog **4** และ **5** ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง human recombinant AChE สูงขึ้น[16,17] นอกจากนี้ยังมีอนุพันธ์ **6** ซึ่งให้ผลเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และเพิ่มระดับ ACh ในสมอง[18] (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 Conformationally restricted analogs ของ rivastigmine

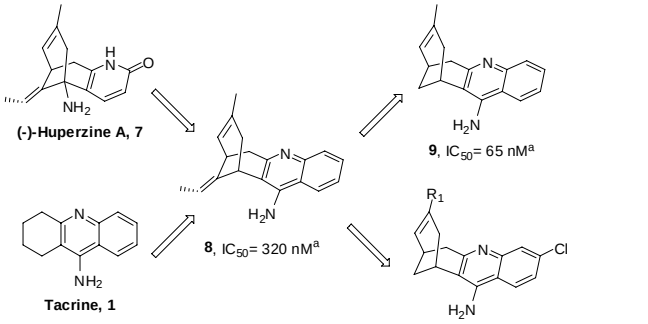
1.2 Tacrine-huperzine hybrid: Huprine

อนุพันธ์ลูกผสม (hybrid) หมายถึง สารที่ได้จากการนำ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมารวมกันเป็นโมเลกุลใหม่ โดยมุ่งหวังให้สารใหม่ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกับสารต้นแบบ[10]

(-)-huperzine A (**7**) เป็นอัลคาลอยด์จาก *Huperzia serrata* เป็น AChEI ที่มีฤทธิ์แรง มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AChE ออกฤทธิ์ได้นานและมีฤทธิ์ neuroprotective มีการสังเคราะห์ tacrine-huperzine A hybrid โดยใช้ส่วน 4-aminoquinoline ในโครงสร้างของ tacrine กับวงแหวน carbobicyclic ของ huperzine A เรียกสารกลุ่มดังกล่าวว่า “Huprines” พบว่าสาร **8** มีความแรงในการออกฤทธิ์ต่ำกว่า tacrine และ huperzine A ในขณะที่ hybrid **9** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า tacrine และ huperzine A เป็น 2 เท่า และ 1.1 เท่า ตามลำดับ[19] (รูปที่ 9)

การเติม Cl หรือ F หรือ CH_3 บนตำแหน่ง 1 และ/ หรือ 3 ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์แรงขึ้น เช่น huprine X (**10**) และ huprine Y (**11**) ซึ่งมีความแรงของการออกฤทธิ์ยับยั้ง human AChE สูงกว่า tacrine และ (-)-huperzine A ถึง 600 และ 800 เท่า ตามลำดับ[20]

huprine X และ Y เป็น tight-binding reversible AChEI สามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) มีฤทธิ์เป็น NMDA receptor antagonist นอกจากนี้ พบว่า (-)-huprine X จับกับ active site ของ AChE ในลักษณะที่คล้ายกับ tacrine[21] นอกจากนี้ (-)-huprine X ยังเป็น agonist ต่อ rat brain M_1 และ nicotinic receptor จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพัฒนาเป็น MTDL สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ต่อไป



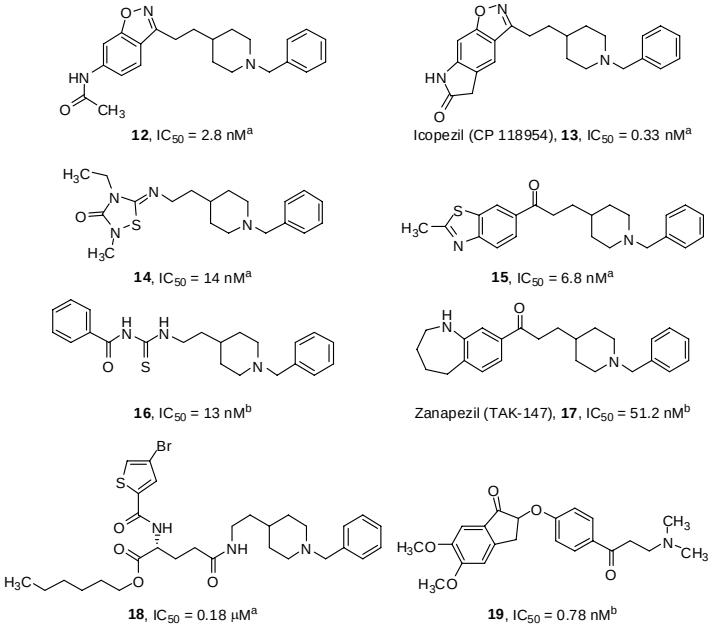
[a] Bovine AChE; [b] Human erythrocytes AChE

รูปที่ 9 แนวทางการออกแบบ tacrine-huperzine hybrids

2. การพัฒนา Dual binding site inhibitors

2.1 อนุพันธ์ของ donepezil

donepezil (**4**) ถูกใช้เป็นสารต้นแบบสำหรับพัฒนาอนุพันธ์ใหม่ ๆ ออกมาอีกหลายชนิด ได้แก่ อนุพันธ์ *N*-benzylpiperidines โดยมีการแทนที่ indanone ring ด้วย benzisoxazole (**12**)[22] และ conformational restricted anaglogue (**13**, icopezil, CP118954)[23] การแทนที่ indanone ring ด้วย heterocyclic ring อื่นๆ ทำให้ได้อนุพันธ์เช่น 1,2,4-thiadiazolidinone ring (**14**) thiazole ring (**15**[24] aroylthiourea moiety (**16**)[25] tetrahydrobenzoazepine (**17**, zanapezil, TAK-147)[26] และอนุพันธ์ที่ได้จาก glutamic acid (**18**)[27] นอกจากนี้ ยังมีอนุพันธ์ของ indanone ได้แก่ สาร **19**[28] (รูปที่ 10) อนุพันธ์เหล่านี้ ล้วนแล้วแต่มีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับนาโนโมลาร์ มีความจำเพาะเจาะจงต่อ AChE สูงกว่า BuChE และสามารถยับยั้งการเกิด Aβ aggregation

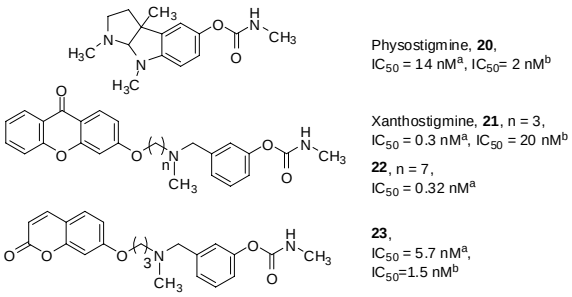


[a] Human erythrocytes AChE; [b] Rat brain AChE

รูปที่ 10 อนุพันธ์ของ donepezil

2.2 Physostigmine และอนุพันธ์

จากยาต้นแบบ คือ physostigmine (**20**) มีการออกแบบ dual binding site inhibitor โดยการเชื่อมต่อโครงสร้าง aryl carbamate กับ xanthone ด้วย linker ที่มีความยาวต่าง ๆ ได้สาร xanthostigmine (**21**) ซึ่งมีความแรงในการยับยั้ง human AChE สูงกว่า physostigmine 46 เท่า molecular modeling แสดงให้เห็นว่า หมู่ carbamate อยู่ในบริเวณ active site ของ *Tc*AChE และเกิดอันตรกิริยากับ catalytic triad[29] การเพิ่มความยาวของ linker สามารถเพิ่มการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง heterocyclic moiety กับบริเวณ PAS ได้อนุพันธ์ **22** ซึ่งมีความยาวของ alkoxy chain n = 7 มีความแรงในการออกฤทธิ์ และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้ง AChE สูงกว่า physostigmine นอกจากนี้ การใช้ heterocyclic ring อื่น เช่น coumarin มาแทนที่ xanthone พบว่าสาร **23** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่ายาต้นแบบ (รูปที่ 11)[30]



[a] Human erythrocytes AChE; [b] Rat brain AChE

รูปที่ 11 แนวทางการออกแบบอนุพันธ์ physostigmine

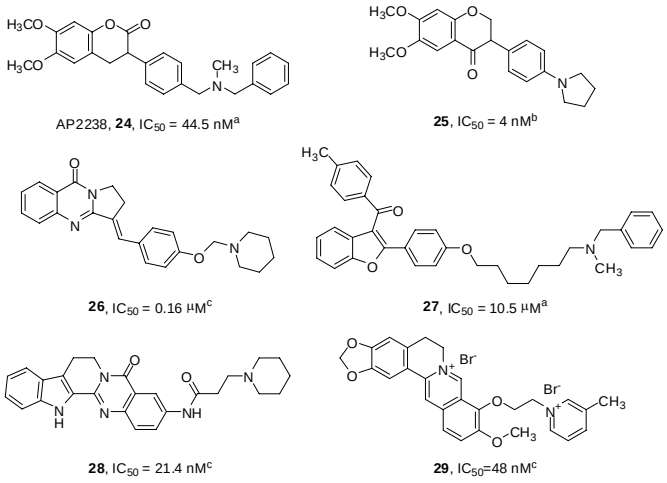
2.3 AP2238 และอนุพันธ์

จาก SAR ของอนุพันธ์ donepezil พบว่า หมู่ benzylamino จำเป็นต่อการจับที่ CAS และ indanone ring จะช่วยการจับที่ PAS เนื่องจากในบริเวณส่วนกลางของ binding site gorge ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็น aromatic จึงมีการออกแบบอนุพันธ์ที่มีหมู่ phenyl บน spacer เพื่อเพิ่มอันตรกิริยากับส่วนกลางของ gorge ได้อนุพันธ์ คือ AP2238 (**24**) ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับนาโนโมลาร์ จากการทำ docking simulation บนโครงสร้างของ human AChE พบว่าหมู่ phenyl บน spacer ช่วยเพิ่มการจับกับ AChE โดยเกิด π-π stacking กับ Tyr341 และ OH-π interaction กับ Tyr124 AP2238 มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อ AChE และ สามารถยับยั้ง AChE-induced Aβ-aggregation ได้อีกด้วย[31]

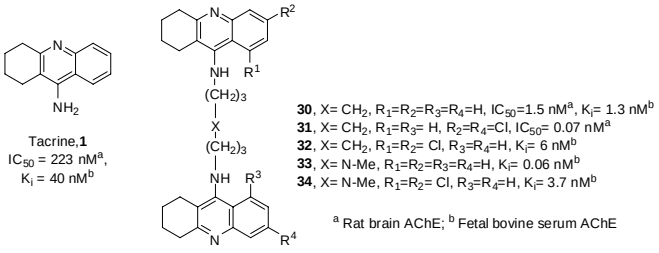
อนุพันธ์อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น dual binding site AChEI ที่เกิดอันตรกิริยากับ mid gorge ได้แก่ อนุพันธ์ flavonoids (**25**)[32] อนุพันธ์ isaindigotone (**26**)[33] อนุพันธ์ benzofuran (**27**)[34] อนุพันธ์ rutaecarpine (**28**)[35] อนุพันธ์ berberine (**29**)[36] (รูปที่ 12)

2.4 Tacrine dimers

นอกจากการจับที่ CAS ซึ่งเป็น high affinity site แล้ว tacrine (**1**) ยังมี affinity อย่างอ่อนกับ amino acid หลายชนิดในบริเวณ PAS อีกด้วย dimer ของ tacrine ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย linker ที่มีความยาวเหมาะสมน่าจะสามารถจับกับ AChE ในบริเวณ binding site ทั้งสองพร้อมกัน ซึ่งจะทำให้ได้สารที่มีความแรงและความจำเพาะต่อการยับยั้งเอนไซม์สูงขึ้น นอกจากนี้ การเชื่อมต่อลิแกนด์ทั้งสองเข้าด้วยกันจะทำให้ลดการสูญเสีย entropy ที่อาจเกิดในระหว่างการจับอย่างอิสระของลิแกนด์เดี่ยวจำนวน 2 โมเลกุลได้ จึงน่าจะทำให้สารในรูป dimer มี affinity ในการจับ AChE สูงขึ้น bis-ligand ส่วนใหญ่ มี potency สูงกว่าลิแกนด์เดี่ยวที่เป็นต้นแบบ



รูปที่ 12 AP2238 และอนุพันธ์

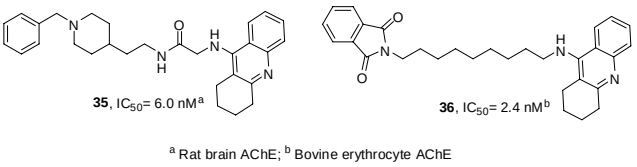


รูปที่ 13 Tacrine dimers

bis(7)-tacrine **(30)** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงที่สุด โดยฤทธิ์แรงกว่า tacrine ถึง 149 เท่า และมี selectivity ต่อ AChE สูงกว่า tacrine 250 เท่า ในทำนองเดียวกัน dimer ของอนุพันธ์ tacrine เช่น สาร **31**-**34** ก็มีฤทธิ์ระดับนาโนโมลาร์ (รูปที่ 13)[37,38]

2.5 Tacrine-donepezil heterodimers

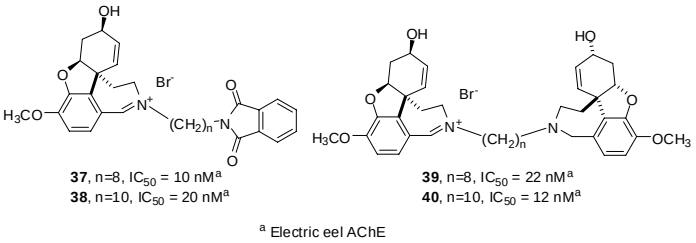
การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ tacrine กับ *N*-benzyl-piperidine moiety ของ donepezil (สาร **35**) ได้สารที่มีความแรงต่ำกว่า donepezil เล็กน้อย แต่มีความแรงสูงกว่า tacrine 37 เท่า และ มี selectivity สูงกว่า tacrine 31 เท่า[39] นอกจากนี้ สาร **36** ซึ่งได้จากการเปลี่ยน indanone ring ของ donepezil เป็น phthalimide ก็พบว่าสารเป็น dual binding site inhibitor ที่มีฤทธิ์แรงเช่นเดียวกัน[40] (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 Tacrine-donepezil heterodimers

2.6 Galantamine-based bis ligands

homo and heterodimers ของ galantamine (**2**) (สาร **37**-**40**)[41] มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า galantamine 16-36 เท่า (รูปที่ 15) สารที่มีหมู่ iminium ในโครงสร้างจะมีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่าสารที่ไม่มีประจุ คาดว่าเนื่องมาจากหมู่ iminium สามารถเกิด cation-π interactions กับวงแหวน aromatic ของ amino acid residues ภายใน gorge ของ AChE อย่างไรก็ดี การมีประจุบวกถาวรบนโครงสร้างของสารอาจขัดขวางการดูดซึมเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางจึงอาจเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาสารในกลุ่มนี้ไปเป็นยาต้านอัลไซเมอร์ต่อไป



รูปที่ 15 Galantamine-based bis ligands

2.7 Huperzine A – based bis-ligands

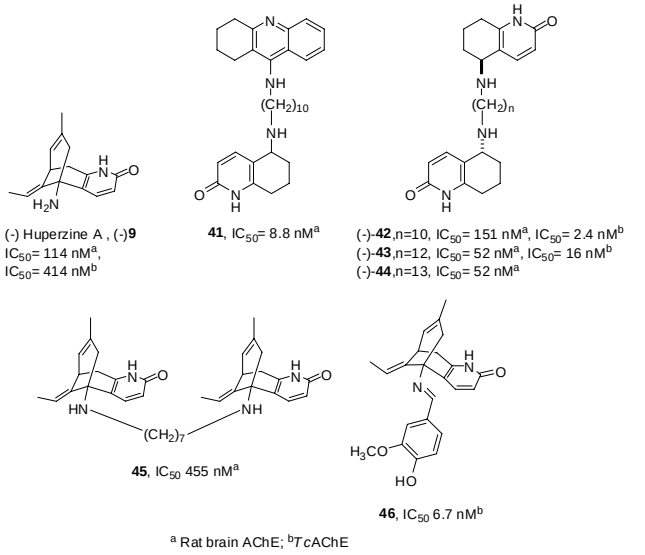
เนื่องจาก huperzine A (**7**) มีราคาแพง และ มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ในการสังเคราะห์ dimer จึงมีการตัดทอนโครงสร้างเหลือเพียงส่วนของ 5-amino-5,6,7,8-tetrahydro-2(1*H*)-quinolinone fragment ที่เรียกว่า “hupyridone” แม้ว่า hupyridone มีความแรงต่ำในการยับยั้ง AChE แต่การทำ dimer ของสารนี้ กับ tacrine โดยเชื่อมต่อกันด้วย decamethylene chain ทำให้ได้สารที่มีความแรงในการยับยั้ง AChE สูงขึ้น เช่น สาร **41** มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่า (-)-huperzine A และ tacrine 13 และ 25 เท่าตามลำดับ[42] (รูปที่ 16)

ความแรงในการออกฤทธิ์ของ hupyridone homodimers สัมพันธ์กับความยาวของ linker แต่ความยาวของ linker ที่เหมาะสมในการยับยั้ง rat brain AChE กับ *Tc*AChE มีค่าแตกต่างกัน โดยพบว่า dimer (-)-**42** มีความแรงในการยับยั้ง rat brain AChE ต่ำกว่า (-)-huperzine A เล็กน้อย ในขณะที่ (-)-**43** และ (-)-**44** มีความแรงในการยับยั้ง rat brain AChE สูงกว่า (-)-

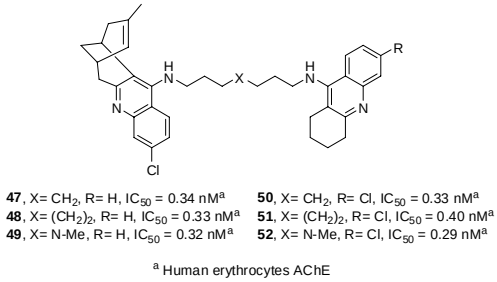
huperzine A ประมาณ 2 เท่า และ สูงกว่า hupyridone ถึง 10000 เท่า[43] ในทางตรงกันข้าม สาร (-)-**42** มีความแรงในการยับยั้ง *Tc*AChE สูงกว่าสาร (-)-**43** และ (-)-huperzine A ประมาณ 7 เท่า และ 170 เท่า ตามลำดับ ความแตกต่างของความแรงในการออกฤทธิ์อธิบายได้ว่า เนื่องมาจากความแตกต่างของ AChE ในแต่ละสปีชีส์ เช่น rat AChE จะมีขนาดของ gorge ที่เล็กกว่าของ *Torpedo californica*[44] อย่างไรก็ดี การทำ homodimer ของ huperzine A เช่น สารหมายเลข **45** ทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต่ำกว่า (-)-huperzine A ในรูป monomer ถึง 6 เท่า อนุพันธ์อื่นๆของ huperzine A ได้แก่ schiff base ของ huperzine A (**46**)[45]

2.8 Huprine-tacrine heterodimer

huprine-tacrine heterodimers **47**-**52** ถูกพัฒนาเป็น dual binding site AChEI (รูปที่ 17) โดยโครงสร้างประกอบด้วย huprine Y moiety ที่ทำหน้าที่จับกับ active site กับ tacrine หรือ 6-chlorotacrine moiety ที่ทำหน้าที่จับกับ PAS โดยทั้งสองหน่วยเชื่อมต่อกันด้วย linker ที่มีความยาว และ คุณสมบัติที่เหมาะสม linker ของสาร **49** และ **52** มีหมู่ amino ซึ่งสามารถถูกโปรโตเนตได้ ทำให้ช่วยในการจับกับ midgorge recognition site จึงช่วยเพิ่มความแรงในการออกฤทธิ์ heterodimer ที่สังเคราะห์ได้มีความแรงในการออกฤทธิ์สูงกว่ายาต้นแบบอย่างมาก[46]



รูปที่ 16 Huperzine A – based bis-ligands



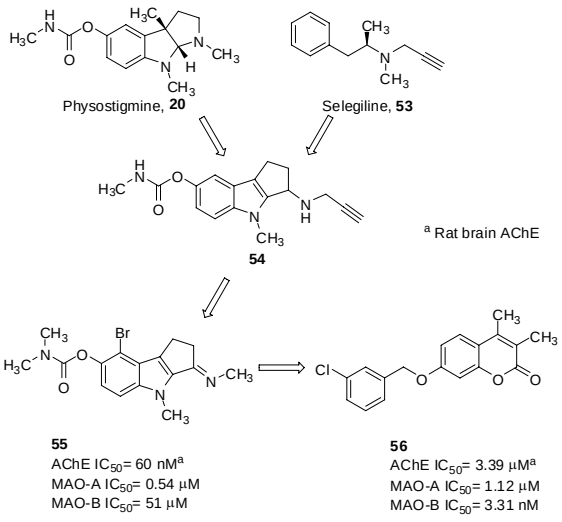
รูปที่ 17 Huprine-tacrine heterodimers

3. Multi-Target-Directed Ligands (MTDLs)

3.1 Dual AChE and MAO inhibitor

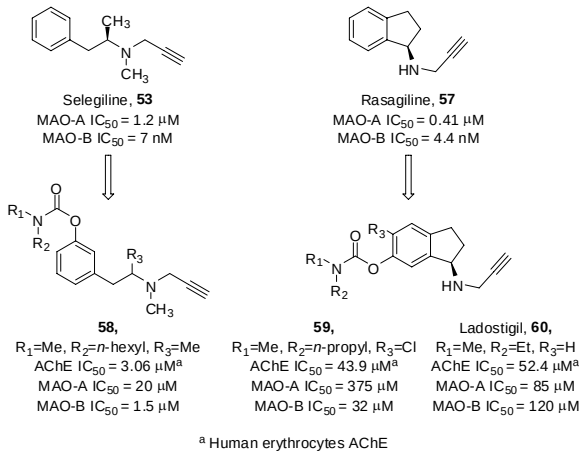
การขาด serotonin มีความเกี่ยวข้องกับอาการ depression และ psychosis ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ มีการศึกษาทางคลินิกใช้ selegiline ซึ่งเป็น monoamine oxidase inhibitor (MAOI) ร่วมกับ AChEI เช่น tacrine หรือ physostigmine พบว่าทำให้ผลการรักษาดีขึ้น[47] นอกจากนี้ การยับยั้ง MAO จะสามารถลด H_2O_2 ซึ่งเป็น by product ของปฏิกิริยา deamination ของสารสื่อประสาท จึงช่วยลดปัจจัยของการเกิด oxidative stress ได้อีกทางหนึ่ง[48]

การนำ propargylamine pharmacophore ของ selegiline (**53**) เติมลงในโครงสร้างของ physostigmine (**20**) ได้เป็นสารหมายเลข **54** ซึ่งยังคงมีฤทธิ์ยับยั้ง MAO แบบไม่ผันกลับ ดังแสดงในรูปที่ 18 อนุพันธ์ imine (**55**) สามารถยับยั้ง MAO แบบผันกลับได้ และมีฤทธิ์ยับยั้ง AChE[49] AChE/ MAO inhibitor อื่นๆ ได้แก่ อนุพันธ์ coumarin (**56**) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น MAO-A, MAO-B inhibitor และ AChEI มีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับไมโครโมลาร์ และยับยั้ง AChE แบบ non-competitive[50]



รูปที่ 18 แนวทางการออกแบบ dual AChE and MAO inhibitor

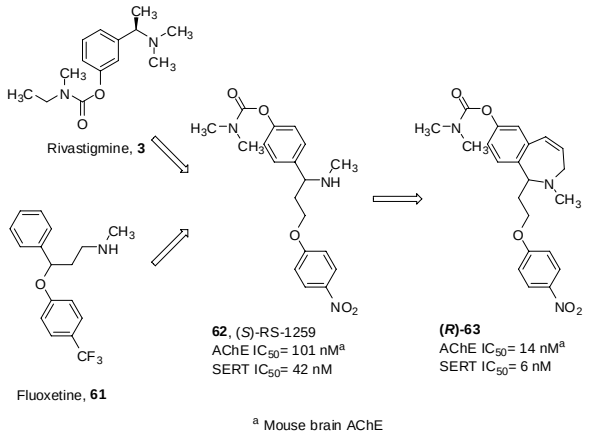
อีกแนวทางหนึ่งในการออกแบบ ได้แก่ การเติมหมู่ carbamate ลงในโครงสร้างของ MAO inhibitor เพื่อเลียนแบบโครงสร้างของ aryl carbamate (รูปที่ 19) ยา MAOI ที่ถูกใช้เป็นยาต้นแบบ ได้แก่ selegiline (**53**) และ rasagiline (**57**) ยาทั้งสองเป็น MAO-B inhibitor ที่มีฤทธิ์ neuroprotective สารที่ถูกพัฒนาตามแนวทางนี้ ได้แก่ อนุพันธ์ phenethylamine (**58**) และ indane (**59**, **60**)[51] ในปัจจุบัน ladostigil (**60**) ถูกพัฒนาอยู่ใน phase II ของ clinical trial สำหรับการรักษา dementia ที่มีอาการคล้าย Parkinson's Disease (PD) และ depression[52]



รูปที่ 19 แนวทางการออกแบบ AChE-MAO-B inhibitor

3.2 Dual AChE and SERT inhibitor

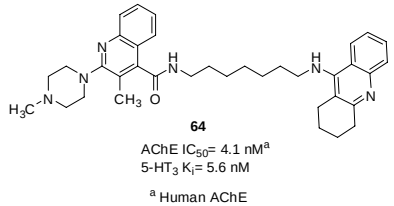
serotonin transporter inhibitors (SERTs) ใช้รักษาอาการซึมเศร้าในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ AChE/SERT inhibitor ได้จากการทำอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง rivastigmine (**3**) กับ fluoxetine (**61**) โดยการเชื่อมต่อ methyleneoxyphenyl moiety ของ fluoxitine (**61**) เข้ากับ ethylamine function ของ rivastigmine (**3**) ได้แก่ (*S*)-RS-1259 (**62**)[53] และ conformational restricted derivative (*R*)-**63** ซึ่งมีฤทธิ์ AChEI และ SERT inhibition ที่สูงขึ้น[54] (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 แนวทางการออกแบบ dual AChE and SERT inhibitors

3.3 Dual AChEI and 5-HT receptor ligand

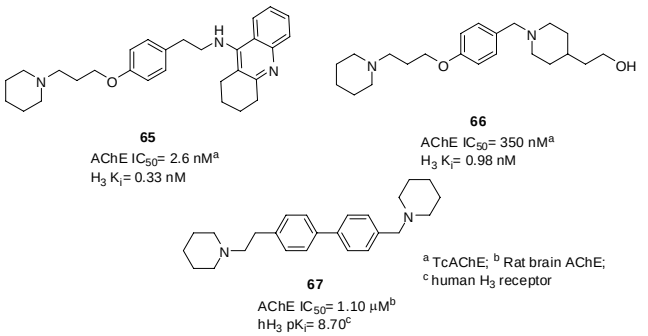
5-HT_3 receptor ทำหน้าที่ควบคุมการหลั่ง ACh ใน cortical tissue[55] ในแนวทางนี้ 5-HT_3 ligand ถูกนำมาต่อกับ tacrine ได้เป็นสาร **64** ซึ่งมี affinity สูง ต่อ 5-HT_3 receptor และ มีฤทธิ์แรงในการยับยั้ง AChE (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 Dual AChEI and 5-HT receptor ligand

3.4 สารที่มีฤทธิ์ AChEI, H_3 receptor antagonist และ anti-cholinergic

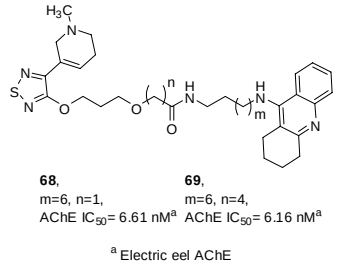
การยับยั้ง H_3 receptor ด้วย selective antagonist สามารถเพิ่มการหลั่งสารสื่อประสาท ACh[56] นำไปสู่การสังเคราะห์สาร **65**[57], **66**[58] และอนุพันธ์ 4-4′-bis-methyl-biphenyl **67**[59] (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 Compound with AChEI, H_3 receptor antagonist and anticholinergic

3.5 Dual AChEI and M_1 receptor agonist

ได้แก่ อนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine และ xanomeline ซึ่งเป็น M_1 receptor agonist อนุพันธ์ลูกผสม **68**, **69** มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ที่แรงกว่าหรือเทียบเท่ากับ tacrine แต่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ BuChE สูงกว่า AChE นอกจากนี้ ยังมี binding affinity ต่อ M_1 receptor เทียบเท่ากับ xanomeline แต่สารเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์กระตุ้น M_1 receptors[60] (รูปที่ 23)



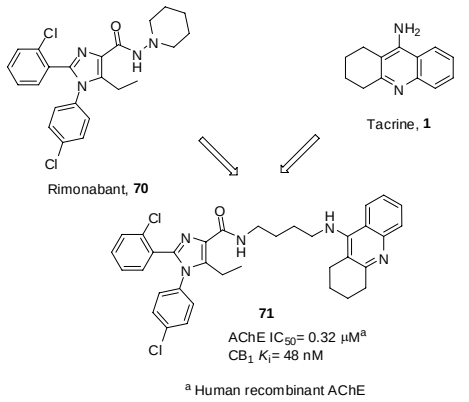
รูปที่ 23 Dual AChEI and M_1 receptor agonist

3.6 Dual AChEI and Cannabinoid CB_1 receptor antagonist

มีรายงานว่า cannabinoid CB_1 receptor antagonist สามารถเพิ่มการหลั่ง ACh ในสมองส่วน cortex และ hippocampus[61] และการให้ CB_1 receptor antagonist คือ rimonabant (**70**) ในขนาดต่ำ ร่วมกับ AChEI พบว่าสามารถเพิ่มความจำในสัตว์ทดลองได้[62] จึงมีการออกแบบอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง rimonabant กับ tacrine (**1**) ได้แก่ อนุพันธ์หมายเลข **71** (รูปที่ 24) ซึ่งมีฤทธิ์ปานกลาง[63]

3.7 Dual AChE and Ca^{2+} modulator

ในโรคอัลไซเมอร์มักพบความผิดปกติของสมดุลย์แคลเซียมร่วมด้วย[64] การที่ Ca^{2+} ผ่านเข้าเซลล์ทาง L-type calcium channel ทำให้มีความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์สูงขึ้น เป็นผลให้การทำงานของ mitochondria ถูกรบกวน นำไปสู่การกระตุ้น apoptotic cascade และ เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด



รูปที่ 24 Dual AChEI and Cannabinoid CB_1 receptor antagonist

มีรายงานว่า tacrine (**1**) สามารถยับยั้ง voltage-dependent calcium channels (VDCC) ใน dorsal root ganglionic cells จึงมีการพัฒนาอนุพันธ์ของ tacrine เพื่อเป็น AChEI และ VDCC modulator เพื่อเป็น neuroprotectant ในโรคอัลไซเมอร์ [65-70]

อนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine กับ nimodipine (**72**) ได้แก่ อนุพันธ์ pyrano[2,3-*b*]quinoline (**73**), 1,8-naphthyridines (ITH 4012, **74**), 1,4-dihydro[1,8]naphthyridines (tacripirine, **75**) และ tetracyclic tacrine (**76**) (รูปที่ 25) สารเหล่านี้สามารถยับยั้ง L-type VDCC ได้ด้วยความแรงที่สูง และ มีฤทธิ์ neuroprotective ส่วน pyrano[2,3-*b*]quinoline และ tetracyclic tacrine มีความแรงในการออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ในระดับปานกลาง ส่วน 1,8-naphthyridines และ tacripyrines หลายชนิดออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ได้ในระดับนาโนโมลาร์

สารในกลุ่มนี้หลายชนิดยับยั้ง AChE แบบ non-competitive ซึ่งคาดว่าเกิดจากการยับยั้งในบริเวณ PAS มากกว่าที่ CAS ซึ่งน่าจะเกิดจากความเกะกะของวงแหวน aromatic บน C4 ขัดขวางการผ่านช่องที่แคบของ gorge เข้าไปยังบริเวณ CAS การออกแบบอนุพันธ์ที่ไม่มีหมู่แทนที่บนตำแหน่ง C4 เช่นสาร **77** ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์เป็น AChEI และ BuChEI สามารถป้องกัน cell stress และ มีฤทธิ์ neuroprotective

cyclic analog ของสาร **75** ได้แก่ อนุพันธ์ tacripyrimedones (**78**) มีฤทธิ์ AChEI ระดับปานกลาง สามารถยับยั้งการไหลเข้าเซลล์ของ Ca^{2+} และมีฤทธิ์ neuroprotective[71] นอกจากนี้ ยังมีรายงานการออกแบบอนุพันธ์ 2-aminopyridine- และ 2-chloro-pyridine-3,5-dicarbonitrile เพื่อลดความซับซ้อนของโครงสร้าง พบว่า สารในกลุ่มดังกล่าว เช่น สาร **79** มีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้ง AChE แต่มีความจำเพาะต่อ AChE สูงกว่า BuChE และมีฤทธิ์ neuroprotective โดยการมีหมู่ amino ที่ตำแหน่ง 2 บน pyridine ring จำเป็นต่อการจับที่ CAS[72]

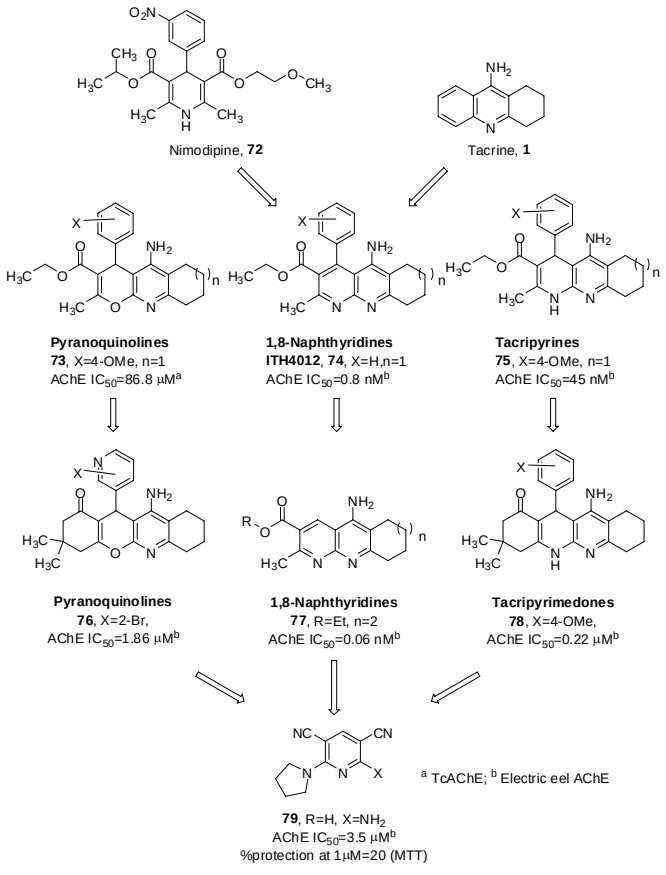
3.8 AChEI ที่มี NO-donor activity

สารที่มีฤทธิ์เป็น nitric oxide (NO) donors และ NO mimetics ช่วยในการเพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปสู่สมอง[73] อนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine กับ NO-donating nitrate- และ diazeniumdiolate (NONOate) moieties สามารถยับยั้ง AChE และ BuChE ได้ในระดับนาโนโมลาร์ ในการทดสอบฤทธิ์ขยายหลอดเลือด พบว่า สาร **80** และ **82** มีฤทธิ์ปานกลาง ส่วนสาร **81** มีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ[74] การทดสอบ hepatotoxicity พบว่า สารหมายเลข **80** ไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต้าน AD ที่มีความปลอดภัยสูงขึ้น[75] (รูปที่ 26)

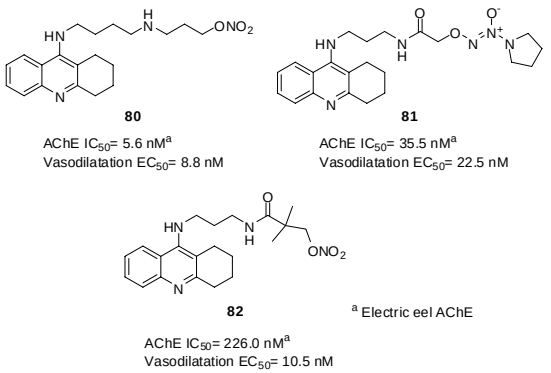
3.9 AChEI ที่มีฤทธิ์ antioxidant

oxidative stress เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในช่วงต้นของการดำเนินไปของโรคอัลไซเมอร์ อีกทั้งสารต้านออกซิเดชันหลายชนิดถูกนำมาศึกษาสำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ จึงนำไปสู่การออกแบบอนุพันธ์ลูกผสมระหว่างยา AChEI กับสารที่เป็น oxidative radical scavenger

licoprine (**84**) เป็นอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine (**1**) กับ lipoic acid (LA, **83**) โครงสร้างส่วน tacrine จะเกิดอันตรกิริยากับ-



รูปที่ 25 Dual AChE and Ca^{2+} modulator

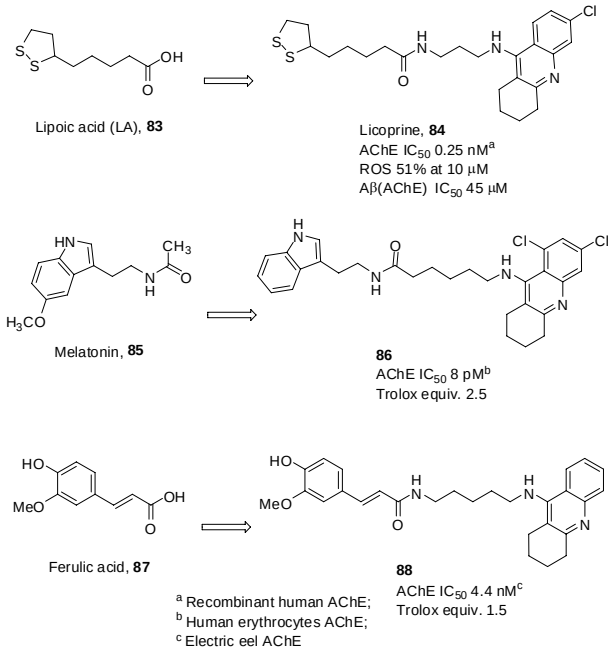


รูปที่ 26 AChE with NO-donor activity

AChE ในบริเวณ PAS สาร **84** สามารถยับยั้ง Aβ-aggregation และ สามารถป้องกันเซลล์ประสาทจาก oxidative stress ได้อีกด้วย[76] (รูปที่ 27)

melatonin (**85**) เป็น endogenous amine ที่มีฤทธิ์ anti-oxidant และ neuroprotective และมีผลต่อ τ และ Aβ pathology พบว่าอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine (**1**) และ melatonin (สาร **86,** รูปที่ 27) มี selectivity สูงต่อ AChE มีความแรงในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า trolox[77] คาดว่าสารในกลุ่มนี้สามารถเกิดอันตรกิริยาได้ทั้งในบริเวณ CAS และ PAS นอกจากนี้จากการทดสอบการซึมผ่านในแบบจำลองทำนายว่าอนุพันธ์เหล่านี้สามารถเข้าสมองได้[78] สาร **86** สามารถลดการเกิด Aβ-induced cell death และการเกิด Aβ aggregation ในเนื้อสมอง[79]

นอกจากนี้ ยังมีการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine และ ferulic acid (**87**) พบว่า สาร **88** ยับยั้ง AChE แบบ reversible และ non-competitive มีฤทธิ์ยับยั้ง BuChE และ มีฤทธิ์ anti-oxidant สูงกว่า trolox[80]



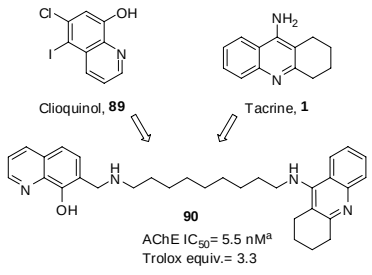
รูปที่ 27 อนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine และ anti-oxidant

3.10 Dual AChEI and chelator

การเสียสมดุลย์ของโลหะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีววิทยาในสมอง เช่น ทองแดง สังกะสี และเหล็ก ตลอดจนการเกิด oxidative stress มีความสัมพันธ์กับการเกิด Aβ plaques และ neurofibrillary tangles (NFT) เมื่อปริมาณของเหล็กและทองแดงในสมองมีระดับสูงขึ้นจะเกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) นำไปสู่ τ hyperphosphorylation และ การสร้าง NFT ในที่สุด ส่วนเหล็กมีผลเพิ่มการ translation ของ APP โลหะเหล่านี้ยังสามารถชักนำให้เกิด Aβ aggregation การใช้ metal chelators จึงสามารถชะลอการดำเนินไปของโรค AD ทั้งในระดับ APP translation การสร้าง Aβ ตลอดจนการสร้าง amyloid plaque และ การสร้าง NFT[81]

metal chelator ที่ถูกนำมาศึกษาในปัจจุบัน ได้แก่ desferioxamine, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ clioquinol (**89**) แต่สารเหล่านี้กระจายเข้าสู่สมองได้น้อย มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ค่อนข้างสูง และ ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่ออวัยวะเป้าหมาย จึงอาจทำให้เกิดความผิดปกติของสมดุลย์โลหะในร่างกายเมื่อนำมาใช้ในระยะยาว

MTDL ในกลุ่มนี้ ได้แก่ tacrine-8-hydroxyquinoline hybrid (**90**) (รูปที่ 28) พบว่า สามารถยับยั้ง human AChE และ BuChE ได้โดยมีความแรงสูงกว่า tacrine อีกทั้งยังสามารถแทนที่ propidium iodide จาก PAS ของ AChE จึงมีความเป็นไปได้ที่สารจะสามารถยับยั้ง Aβ aggregation สาร **90** ยังมีฤทธิ์ anti-oxidant ดีกว่า trolox และ มีคุณสมบัติเป็น neuroprotective สามารถสร้างสารเชิงซ้อนกับ Cu^{2+} ได้อย่างจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ ยังพบว่ามีพิษต่อเซลล์ต่ำ และ ยังคาดว่าสามารถผ่านเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้อีกด้วย[82]



รูปที่ 28 แนวทางการออกแบบ tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids

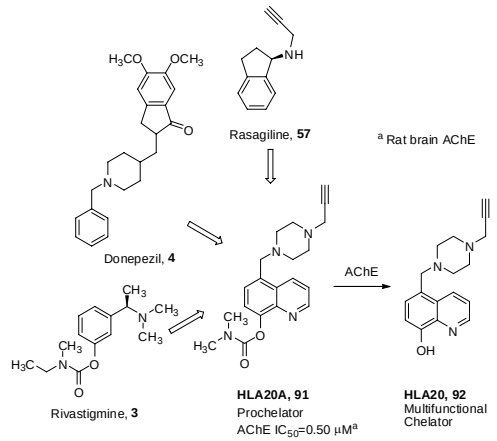
3.11 Site-Activated Chelators

ได้แก่ metal chelator ที่หมู่ฟังก์ชันที่ใช้ในการจับกับโลหะ เช่น หมู่ phenol ถูกบดบัง (mask) ไว้โดยการเปลี่ยนเป็น carbamte หมู่ carbamate จะถูกย่อยโดย AChE ในสมองแล้วเกิดการยับยั้งเอนไซม์พร้อมทั้งปลดปล่อย metal chelator ในรูปที่มีฤทธิ์ออกมา การออกแบบด้วยแนวทางนี้ คาดว่าจะสามารถเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ ณ อวัยวะเป้าหมาย[83]

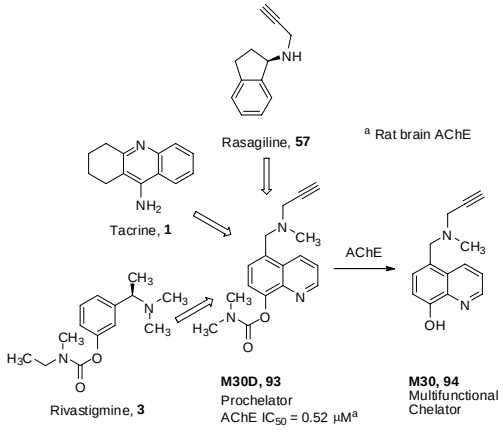
site-activated chelators ได้แก่ HLA20A (**91**) ซึ่งถูกออกแบบมาจาก pharmacophore ของ rasagiline (**57**), rivastigmine (**3**) และ donepezil (**4**) ดังแสดงในรูปที่ 29 เมื่อ HLA20A (**91**) เข้าทำปฏิกิริยากับ AChE แล้ว จะปลดปล่อย HLA20 (**92**) ซึ่งเป็น chelator ออกมา ดังนั้น จึงคาดว่าสารที่ได้น่าจะแสดงฤทธิ์ต่างๆ เช่นเดียวกับยาต้นแบบ

จากแนวทางนี้ ยังมีการทำอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง rasagiline (**57**), rivastigmine (**3**) และ tacrine (**1**) คือ M30D (**93**) ซึ่งจะปลดปล่อย chelator คือ M30 (**94**) ออกมา (รูปที่ 30)

การยับยั้ง AChE ของ HLA20A เป็นแบบ pseudo-irreversible ส่วน M30D ยับยั้ง AChE โดยมี pseudo-first order kinetic สาร **91** และ **93** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า chelator ที่เกิดขึ้น (สาร **92** และ **94** ตามลำดับ) prochelator ไม่มี affinity ต่อ metal ions แต่ chelator ที่เกิดขึ้นสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ metal ions ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า สาร **92** และ **94** สามารถยับยั้ง iron-induced membrane lipid peroxidation ทำหน้าที่เป็น free radical scavenger สามารถลดการ express ของ APP และ การสร้าง Aβ peptides และ ยับยั้ง Aβ aggregation ชนิดที่ถูกกระตุ้นโดย metal ions ได้อีกด้วย[84, 85]



รูปที่ 29 แนวทางการออกแบบ HLA20A



รูปที่ 30 แนวทางการออกแบบ M30D

3.12 AChEI ที่เป็น NMDA receptor antagonist

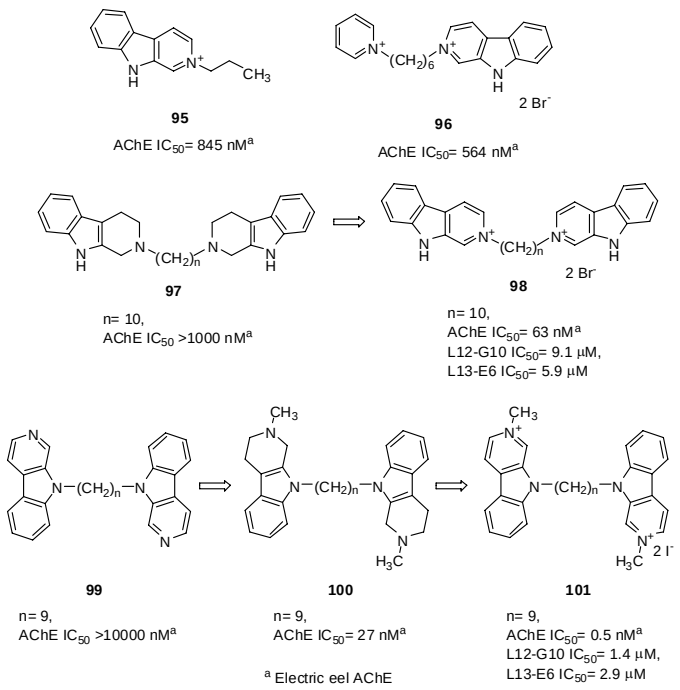
การกระตุ้น NMDA receptor จะทำให้ Ca^{2+} channel เปิด และ Ca^{2+} ไหลเข้าเซลล์ แล้วกระตุ้นการสร้าง free radicals และกระบวนการทำลายเซลล์ประสาท ที่เรียกว่า “glutamate-induced excitotoxicity” [86] ในปัจจุบัน ยากลุ่ม NMDA receptor antagonist ที่ถูกนำมาใช้รักษาอัลไซเมอร์ในทางคลินิก ได้แก่ memantine ส่วนในระดับงานวิจัย มีการทำ MTDL ที่มีฤทธิ์เป็นทั้ง AChEI และ NMDA receptor antagonist ได้แก่ สารในกลุ่ม bivalent β-carbolines และ tacrine-carvedilol hybrid เป็นต้น

β-carbolines (pyrido[3,4-*b*]indoles) เป็นอัลคาลอยด์ที่สกัดได้เป็นครั้งแรกจากพืช *Peganum harmala* มีฤทธิ์เป็นทั้ง AChE, BuChE inhibitor และ NMDA receptor antagonist[87] มีการออกแบบ heterodimer และ homodimer ของ β-carboline มีการเชื่อมต่อบน β-carboline ที่ตำแหน่ง pyridine nitrogen (N^2-) หรือ indole nitrogen (N^9-)[88] พบว่า อนุพันธ์ quaternary ammonium เช่น สาร **95** มีฤทธิ์ยับยั้ง cholinesterases ด้วยความแรงปานกลาง การทำเป็น heterodimer เช่น สาร **96** ทำให้ฤทธิ์ AChEI สูงขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 31)

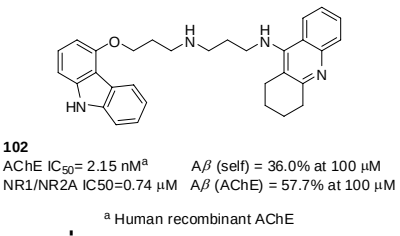
homodimer ที่มีการเชื่อมต่อที่ pyridine nitrogen พบว่าความยาวของ spacer ต้องมากกว่า 6 คาร์บอนอะตอมจึงจะได้สารที่มีฤทธิ์แรง การทำ partially reduced pyridine ring ทำให้ได้อนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ต่ำลง (**97**) สารที่น่าสนใจที่สุดในกลุ่มนี้ ได้แก่ สาร **98** เนื่องจากมีฤทธิ์แรงระดับนาโนโมลาร์ในการยับยั้ง AChE และ BuChE และ NMDA receptor antagonist

สำหรับ homodimer ที่เชื่อมต่อที่ indole nitrogen (**99**) มีฤทธิ์ยับยั้ง cholinesterase ปานกลาง การทำ partially reduced pyridine ring ทำให้ได้อนุพันธ์ **100** ที่มีฤทธิ์สูงขึ้น แต่ฤทธิ์ยับยั้ง cholinesterase จะสูงสุดในสารที่เป็น quaternary ammonium (**101**) ซึ่งมีฤทธิ์แรงในการยับยั้ง AChE และ BuChE และ สารยังเป็น NMDA receptor antagonist อีกด้วย ดังนั้น สารในกลุ่ม homobivalent β-carbolines จึงเป็น lead compound ที่น่าสนใจในการพัฒนายาต้านอัลไซเมอร์ที่เป็น multi-target drug ต่อไปในอนาคต

tacrine-carvedilol hybrid (**102**) เป็นอนุพันธ์ลูกผสมระหว่าง tacrine กับ carbazole moiety ซึ่งเป็น pharmacophore ของ carvedilol ยากลุ่ม beta-blocker ซึ่งมีฤทธิ์ anti-oxidant และ NMDA receptor antagonist[89] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า carbazole หลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้ง Aβ fibril formation สาร **102** สามารถยับยั้ง AChE ได้ในระดับนาโนโมลาร์ ยับยั้งการเกิด Aβ aggregation ทั้งแบบ AChE-induced (Aβ (AChE)) และ self-induced (Aβ (self)) แสดงฤทธิ์เป็น NMDA receptor antagonist และ anti-oxidant [90] (รูปที่ 32)



รูปที่ 31 heterodimer และ homodimer ของ β-carboline



รูปที่ 32 Tacrine-carvedilol hybrid

3.13 Polyamines as MTDL

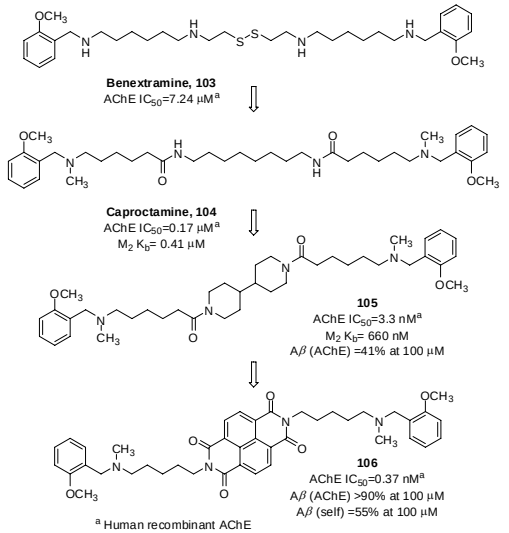
สารกลุ่ม polyamine ถูกพัฒนาจาก benextramine (**103**) ซึ่งเป็น M_2 receptor antagonist และ reversible AChEI ทั้งสองกลไกมีผลทำให้ ACh ในบริเวณ synapse มีปริมาณมากขึ้น อนุพันธ์ polyamine ได้แก่ caproctamine (**104**) ซึ่งเป็น dual binding site inhibitor และ มีaffinity ต่อ M_2 receptor[91] สารที่พัฒนาโดยใช้ caproctamine เป็นสารต้นแบบ ได้แก่ การเปลี่ยน alkyl chain เป็น heterocyclic ring ในสารหมายเลข **105**[92] และ **106**[93] (รูปที่ 33)

จาก caproctamine (**104**) มีการออกแบบโดยเติม backbone ของสาร anti-oxidant ได้แก่ หมู่ benzoquinone ของ coenzyme Q10 (**107**) จึงนำไปสู่การออกแบบและสังเคราะห์ memoquin (**108**) ซึ่งมีฤทธิ์ AChEI ที่แรง สามารถยับยั้ง Aβ aggregation ทั้งในแบบ self induction และ ที่ถูกกระตุ้นด้วย AChE ตลอดจนสามารถยับยั้ง β-secretase (BACE-1) สารนี้จึงมีความโดดเด่นในการเป็น MTDL สามารถยับยั้งหลายกระบวนการในการดำเนินไปของ AD[94, 95]

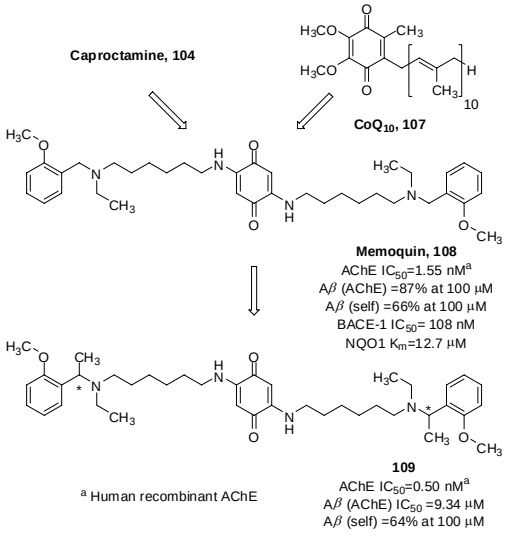
ในอนุพันธ์ที่มีหมู่ methyl บน benzylic carbon ในโมเลกุลของ memoquin พบว่า chirality มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ โดยพบว่า *R,R* stereoisomer (**109**) มีฤทธิ์ AChEI สูงกว่า memoquin 3 เท่า มีความจำเพาะต่อ AChE สูงขึ้น และ สามารถยับยั้ง Aβ aggregation ที่ถูกกระตุ้นโดย AChE ได้ดีกว่า memoquin 3 เท่า[96] (รูปที่ 34)

3.14 AChE – PAS ligand Hybrids

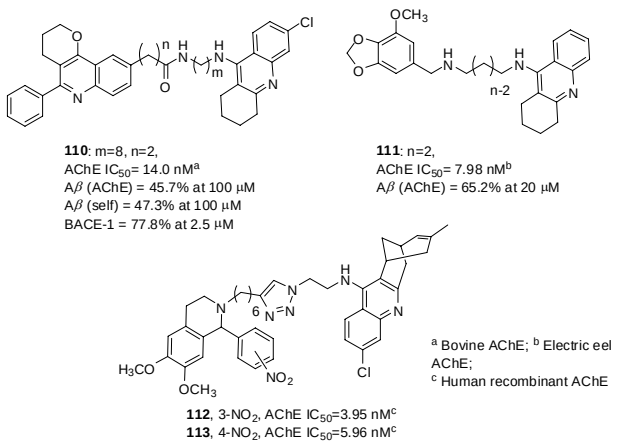
อนุพันธ์ลูกผสมระหว่างอนุพันธ์ tacrine (**1**) กับ ลิแกนด์ที่มีความจำเพาะต่อ PAS ของ AChE เช่น อนุพันธ์ pyrano[3,2-c]quinoline (**110**)[97] และ methylenedioxybenzene (**111**)[98] มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ในระดับนาโนโมลาร์และยังสามารถยับยั้งการเกิด Aβ aggregation นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สาร **110** มีฤทธิ์ยับยั้ง BACE-1 ได้อีกด้วย จากการทำ heterodimer ระหว่าง huprine กับอนุพันธ์ tetrahydroisoquinoline ซึ่งเป็น peripheral site inhibitor โดยอาศัย linker ที่มี triazole ring[99] พบว่า สารหมายเลข **112** และ**113** มีฤทธิ์ดีที่สุดในกลุ่มนี้ แต่อย่างไรก็ดี สารทั้งสองก็ยังมีความแรงในการยับยั้ง AChE ต่ำกว่าสารต้นแบบอยู่ประมาณ 3 เท่า (รูปที่ 35)



รูปที่ 33 แนวทางการออกแบบยากลุ่ม polyamine



รูปที่ 34 แนวทางการออกแบบ memoquin และอนุพันธ์

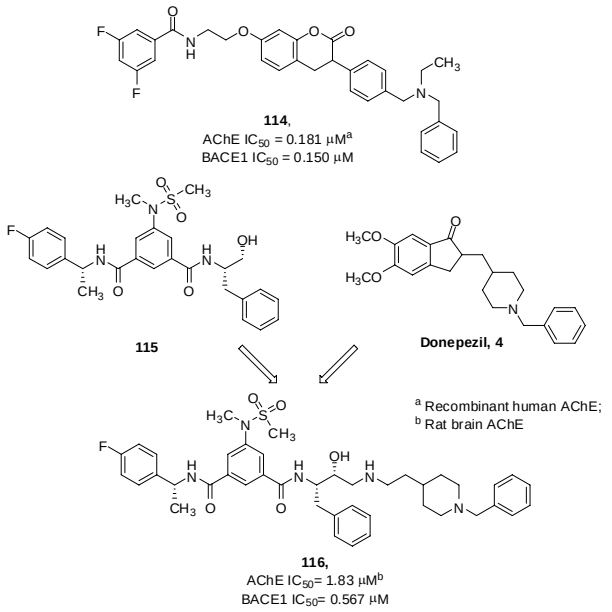


รูปที่ 35 AChE – PAS ligand hybrids

3.15 AChEI ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง BACE1

มีการออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ของ coumarin ที่มี halophenyl-alkylamidic function บนตำแหน่ง 6 หรือ 7[100] เลียนแบบ BACE1 inhibitors ที่เคยมีรายงานมาแล้ว พบว่าสาร **114** สามารถยับยั้ง AChE และ BACE1 ได้ในระดับไมโครโมลาร์ (รูปที่ 36)

นอกจากนี้ ยังมีการใช้ pharmacophore ของ BACE1 inhibitor (**115**) มาเชื่อมต่อกับ *N*-benzylpiperidine moiety ของ donepezil (**4**) พบว่า สารหมายเลข **116** สามารถยับยั้งได้ทั้ง AChE และ BACE-1[101]



รูปที่ 36 AChE with BACE1 inhibitory activity

บทสรุป

Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors เป็นยาหลักที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในทางคลินิกในปัจจุบัน ยาในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์สองแบบ คือ การยับยั้ง AChE โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ กับ การยับยั้งโดยไม่ผ่านการสร้างพันธะโควาเลนต์ ทำให้ลดการทำลาย ACh ที่ synapse ในสมองอย่างไรก็ดี เนื่องจากปัจจัยของการเกิดโรคอัลไซเมอร์มีความซับซ้อน การเพิ่มปริมาณของ ACh ที่ synapse เพียงอย่างเดียวจึงไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการยับยั้งการดำเนินไปของโรค

การพัฒนา AChEI ในปัจจุบัน มุ่งเน้นไปที่การออกแบบและสังเคราะห์สารซึ่งนอกเหนือจากมีความแรงในการออกฤทธิ์ที่สูงขึ้นแล้ว ยังต้องการสารที่มีคุณสมบัติเป็น multi-target-directed ligands (MTDLs) โดยออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและอาการที่เกิดร่วมกับโรคอัลไซเมอร์ได้ด้วย อาทิ เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด Aβ aggregation เช่น peripheral anionic site ของ AChE, BACE1 inhibitor เป็นต้น เป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับการเกิด neuronal death ภายในสมอง เช่น metal ion chelator, antioxidant, calcium channel blocker, NMDA receptor antagonist เป็นต้น รวมถึงเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับระบบสารสื่อประสาทอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับอาการร่วมที่พบในผู้ป่วย เช่น ระบบ serotonin

แนวทางการออกแบบยาที่มีคุณสมบัติเป็น MTDL ถูกนำมาใช้ในการออกแบบยาสำหรับรักษาโรคที่มีความซับซ้อนซึ่งต้องใช้ยาที่ออกฤทธิ์ต่อหลายเป้าหมายร่วมกันในการรักษา การรักษาโรคเหล่านี้โดยให้ยาในแบบ cocktail therapy อาจไม่ได้รับ compliance ที่ดีในการบริหารยาจากผู้ป่วย นอกจากนี้ การที่ผู้ป่วยต้องรับประทานยาหลายชนิดพร้อมๆ กัน อาจเกิด drug-drug interaction ซึ่งจะส่งผลต่อ bioavailability, pharmacokinetics และ metabolism ของยาที่รับประทานร่วมกัน หากการรักษามีการใช้ MTDL ซึ่งเป็นสารโมเลกุลเดียวที่ออกฤทธิ์ต่อหลายเป้าหมายอาจมีประโยชน์ในการลดอันตรกิริยาระหว่างยา และ ลดความซับซ้อนของเภสัชจลนศาสตร์ของยาลงได้

อย่างไรก็ดี การออกแบบ MTDL โดยการเชื่อมต่อ pharmacophore ของสารที่มีฤทธิ์ต่อเป้าหมายตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป มีประเด็นที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลของสารที่ได้จะต้องไม่สูงเกินไปจนอาจมีปัญหาเรื่องการดูดซึมของยา นอกจากนี้ MTDL ที่ได้ จะต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างให้มีความแรงในการออกฤทธิ์ต่อเป้าหมายต่างๆ ใกล้เคียงกันเพื่อผลการตอบสนองที่ดีในการรักษา

จากแนวทางการพัฒนา AChEI ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะมียาใหม่ๆ ที่เป็นทางเลือกในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีประสิทธิภาพทั้งในการรักษาอาการ และ ชะลอการดำเนินไปของโรคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. ปาณบดี เอกะจัมปกะ, นิธิศ วัฒนมะโน. รายงานสถานการณ์สภาวะสุขภาพและพฤติกรรมสุขภาพผู้สูงอายุไทย. *สถานการณ์สุขภาพไทย* 2552;4:1-32.

2. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2010;362:329-344.
3. Lau LF, Broadney MA. Therapeutic approaches for the treatment of Alzheimer's disease: An overview. *Top Med Chem* 2008;2:1-24.
4. Sussman JL, Harel M, Frolow F, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase form *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253:872-879.
5. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'Classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5: 293-302.
6. Fifer EK. Drugs affecting cholinergic neurotransmission. In: Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW (eds.). Foye's principles of medicinal chemistry, 6th ed. Philadelphia. Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, 2008: pp.361-391.
7. Bar-On P, Millard CB, Harel M, et al. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* 2002;41:3555-3564.
8. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, et al. Quaternary kigand binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993:90;9031-9035.
9. Greenblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galantamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters* 1999:463;321-326.
10. Muñoz-Torrero D, Camps P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Med Chem* 2006;13:399-422.
11. Sugimoto H, Iimura Y, Yamanishi Y, Yamatsu K. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related Compounds. *J Med Chem* 1995;38:4821-4829.
12. Kryger G, Silman I, Sussman JL. Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J Physiol Paris* 1998:92;191-194.
13. Bartolini M, Bertuccci C, Cavrini V, Andrisano V. Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol* 2003;65:407-416.
14. Saxena A, Fedorko JM, Vinayaka CR, et al. Aromatic amino acid residues at the active and peripheral anionic sites control the binding of E2020 (Aricept®) to cholinesterases. *Eur J Biochem* 2003;270:4447-4458.
15. Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, et al. Multi-target-directed ligands to combat neurogenerative diseases. *J Med Chem* 2008;51:347-372.
16. Bolognesi ML, Andrisano V, Bartolini M, Minarini A, Rosini M. Hexahydrochromeno[4,3-*b*]pyrrole derivatives as acetyl-cholinesterase inhibitors. *J Med Chem* 2001;44:105-109.
17. Bolognesi ML, Bartolini M, Cavalli A, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *J Med Chem* 2004;47:5945-5952.
18. Chaudhaery SS, Roy KK, Shakya N, et al. Novel carbamates as orally active acetylcholinesterase inhibitors found to improve scopolamine-Induced Cognition Impairment: Pharmacophore-Based Virtual screening, synthesis, and pharmacology. *J Med Chem* 2010;53:6490-6505.
19. Badia A, Baños JE, Camps P, et al. Synthesis and evaluation of tacrine–huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* 1998;6:427-440.
20. Camps P, Muñoz-Torrero D. Tacrine-huperzine A hybrids (Huprines): A new class of highly potent and selective acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem* 2001;1:163-174.
21. Dvir H, Wong DM, Harel M, et al. 3D structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with Huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamic correlates. *Biochemistry* 2002;41:2970-2981.
22. Villalobos A, Blake JF, Biggers CK, et al. Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J Med Chem* 1994;37:2721-2734.
23. Villalobos A, Butler TW, Chapin DS, et al. 5,7-Dihydro-3-[2-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]ethyl]-6H-pyrrolo[3,2-f]-1,2-benzisoxazol-6-one: A potent and centrally-selective inhibitor of acetylcholinesterase. *J Med Chem* 1995;38:2802-2808.
24. Nagel AA, Liston DR, Jung S, et al. Design and synthesis of 1-heteroaryl-3-(1-benzyl-4-piperidinyl)propan-1-one derivatives as potent, selective acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* 1995;38:1084-1089.
25. Vidaluc JL, Calmel F, Bigg DCH, Carilla E, Briley M. Flexible 1-[(2-aminoethoxy)alkyl]-3-ar(o)yl(thio)ureas as novel acetyl-cholinesterase inhibitors. synthesis and biochemical evaluation. *J Med Chem* 1995; 38:2969-2973.
26. Ishihara Y, Goto G, Miyamoto M. Central selective acetylcholine-esterase inhibitor with neurotrophic activity: structure-activity relationships of TAK-147 and related compounds. *Curr Med Chem* 2000;7:341-354.
27. Arce MP, Rodríguez-Franco MI, González-Muñoz GC, et al. Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2009;52:7249-7257.
28. Shen Y, Sheng R, Zhang J, He Q, Yang B, Hu Y. 2-Phenoxy-indan-1-one derivatives as acetylcholinesterase inhibitors: A study on the importance of modification as the side chain on the activity. *Bioorg Med Chem* 2008;16:7646-7653.
29. Rampa A, Bisi A, Valenti P, et al. Acetylcholinesterase inhibitors: synthesis and structure-activity relationships of ω -[*N*-Methyl-*N*-(3-alkylcarbamoyloxyphenyl)methyl]aminoalkoxyheteroaryl derivatives. *J Med Chem* 1998;41:3976-3986.
30. Rampa A, Piazzi L, Belluti F, et al. Acetylcholinesterase inhibitors: SAR and kinetic studies on ω -[*N*-Methyl-*N*-(3-alkyl-carbamoyl-oxyphenyl)methyl]aminoalkoxyaryl Derivatives. *J Med Chem* 2001;44: 3810-3820.
31. Piazzi L, Rampa A, Bisi A, et al. 3-(4-{[Benzyl(methyl)amino]methyl}-phenyl)-6,7-dimethoxy-2*H*-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β-amyloid aggregation: A dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J Med Chem* 2003;46:2279-2282.
32. Sheng R, Lin X, Zhang J, et al. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2009;17:6692-6698.
33. Pan L, Tan JH, Hou JQ, Huang SL, Gu LQ, Huang ZS. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as

acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:3790-3793.

34. Rizzo S, Riviére C, Piazzi L, et al. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, β amyloid aggregation, and a β neurotoxicity. *J Med Chem* 2008;51:2883-2886.
35. Wang B, Mai YC, Li Y, et al. Synthesis and evaluation of novel rutaecarpine derivatives and eelated alkaloids derivatives as selective acetylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010;45:1415-1423.
36. Huang L, Luo Z, He F, Lu J, Li X. Synthesis and biological evaluation of a new series of berberine derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorg Med Chem* 2010;18:4475-4484.
37. Pang YP, Hong F, Quiram P, Jelacic T, Brimijoin SJ. Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl-THA as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. *J Chem Soc Perkin Trans* 1997:171-176.
38. Carlier PR, Han YF, Chow ESH, et al. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg Med Chem* 1999;7:351-357.
39. Shao D, Zou C, Luo C, Tang X, Li Y. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14: 4639-4642.
40. Alonso D, Dorronsoro I, Rubio L, et al. Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorg Med Chem* 2005;13:6588-6597.
41. Guilliou C, Mary A, Renko DZ, Gras E, Thal C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts. *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10:637-639.
42. Carlier PR, Du DM, Han Y, Liu J, Pang YP. Potent, easily synthesized huperzine A-tacrine hybrid acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9:2335-2338.
43. Carlier PR, Du DM, Han Y, Liu J, Perola E, Williams ID, Pang YP. Dimerization of an inactive frangment of huperzine A produces a drug with twice the potency of the natural product. *Angew Chem Int Ed* 2000;39:1775-1777.
44. Wong DM, Greenblatt HM, Dvir H, et al. Acetylcholinesterase complexed with bivalent kigands related to huperzine A: experimental evidence for species dependent protein-ligand complementarity. *J Am Chem Soc* 2003;125:363-373.
45. Yan J, Sun L, Wu G, et al. Rational design and synthesis of highly potent antia-acetylcholinesterase activity huperzine A derivatives. *Bioorg Med Chem* 2009;17:6937-6941.
46. Camps P, Formosa X, Muños-Torrero D, Petrignet J, Badia A, Clos MV. Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *J Med Chem* 2005;48:1701-1704.
47. Marin DB, Bierer LM, Lawlor BA, et al. L-Deprenyl and physostigmine for the treatment of Alzheimer's disease. *Psychiatr Res* 1995;58:181-189.
48. Alper G, Girgin FK, Ozgonul M, Mentes G, Ersoz B. MAO Inhibitors and oxidant stress in aging brain tissue. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999;9:247-252.
49. Fink DM, Palermo MG, Bores GM, et al. Imino 1,2,3,4-tetrahydro-cyclopent[*b*]indole carbamates as dual inhibitors of acetylcholine-esterase and monoamine oxidase. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6:625-630.
50. Gnerre C, Catto M, Leonetti F, et al. Inhibition of monoamine oxidase by functionalized coumarin derivatives: biological activities, QSARs, and 3D-QSARs. *J Med Chem* 2000;43:4747-4758.
51. Sterling J, Herzig Y, Goren T, et al. Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2002;45: 5260-5279.
52. Youdim MB, Amit T, Bar-Am O, Weinreb O, Yogev-Falach M. Implications of co-morbidity for etiology and treatment of neuro-degenerative diseases with multifunctional neuroprotective-neurorescue drugs: Ladostigil. *Neurotox Res* 2006:10:181-192.
53. Abe Y, Aoyagi A, Hara T, et al. Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: Possible treatment of Alzheimer's sisease. *J Pharm Sci* 2003;93:95-105.
54. Toda N, Tago K, Marumoto S, et al. A conformational restriction approach to the development of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem* 2003;11:4389-4415.
55. Barnes NM, Costall B, Naylor RJ, Williams TJ, Wischik CM. Normal densities of 5-HT_3 receptor recognition sites in Alzheimer's disease. *NeuroReport* 1990;1:253-254.
56. Witkin JM, Nelson DL. Selective histamine H_3 receptor antagonists for treatment of cognitive deficiencies and other disorders of the central nervous system. *Pharmacol Ther* 2004;103:1-20.
57. Petroianu G, Arafat K, Sasse BC, Stark H. Multiple enzyme inhibitors by histamine H_3 receptor antagonists as potential precognitive agents. *Pharmazie* 2006;61:179-182.
58. Bembenek SD, Keith JM, Letavic MA, et al. Lead identification of acetylcholinesterase inhibitors-histamine H_3 receptor antagonists from molecular modeling. *Bioorg Med Chem* 2008;16:2968-2973.
59. Morini G, Comini M, Rivara M, et al. Synthesis and structure-activity relationships for biphenyl H_3 receptor antagonists with moderate anti-cholinestarase activity. *Bioorg Med Chem* 2008;16:9911-9924.
60. Fang L, Jumpertz S, Zhang Y, et al. Hybrid molecules from xanomelide and tacrine: Enhanced tacrine actions on cholinesterase and muscarinic M_1 receptors. *J Med Chem* 2010;53:2094-2103.
61. De Groot A, Köfalvi A, Wade MR, et al. CB1 receptor antagonism increases hippocampal acetylcholine release: site and mechanism of action. *Mol Pharmacol* 2006;70:1236-1245.
62. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Lichtman AH. Combination of ribonabant and donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropharmacology* 2007;32:1805-1812.
63. Lange J, Coolen H, van der Neut M, et al. Design, synthesis, biological properties, and molecular modeling investigations of novel tacrine derivatives with a combination of acetylcholinesterase inhibition and cannabinoid CB_1 receptor antagonism. *J Med Chem* 2010;53:1338-1346.
64. Mattson MP, Chan SL. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci* 2001;17:205-224.

65. De los Rios C, Marco JL, Carreiras MD, Chinchon PM, Garcia AG, Villaroya M. Novel tacrine derivatives that block neuronal calcium channels. *Bioorg Med Chem* 2002;10:2077-2088.
66. Leon R, Marco-Contelles J, Garcia AG, Villaroya M. Synthesis, acetylcholinesterase inhibition and neuroprotective activity of new tacrine analogues. *Bioorg Med Chem* 2005;13:1167-1175.
67. Marco-Contelles J, León R, de los Ríos C, García AG, López MG, Villarroya M. New multipotent tetracyclic tacrines with neuroprotective activity. *Bioorg Med Chem* 2006;14:8176-8185.
68. Marco-Contelles J, León R, Lopez MG, Garcia AG, Villaroya M. Synthesis and biological evaluation of new 4*H*-pyrano[2,3-*b*]quinoline derivatives that block acethylcholinesterase and cell calcium signals, and cause neuroprotection against calcium overload and free radicals. *Eur J Med Chem* 2006;41:1464-1469.
69. Marco JL, de los Ríos C, Garcia AG, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of diversely functionalized heterocyclic derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase/ butyrylcholinesterase and modulators of Ca^{2+} channels and nicotinic receptors. *Bioorg Med Chem* 2004;12:2199-2218.
70. Marco-Contelles J, León R, de los Ríos C, et al. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2006;49:7607-7610.
71. León R, de los Ríos C, Marco-Contelles J, et al. New tacrine-dihydropyridine hybrids that inhibit acetylcholinesterase, calcium entry, and exhibit neuroprotection properties. *Bioorg Med Chem* 2008;16: 7759-7769.
72. De los Ríos C, Egea J, Marco-Contelles J, et al. Synthesis, inhibitory activity of cholinesterease, and neuroprotective profile of novel 1,8-naphthyridine derivatives. *J Med Chem* 2010;53:5129-5143.
73. Thatcher GRJ, Bennett BM, Reynolds JN. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:171-182.
74. Fang L, Appenroth D, Decker M, et al. Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. *J Med Chem* 2008;51:713-716.
75. Fang L, Appenroth D, Decker M, et al. NO-Donating tacrine hybrid compounds improve scopolamine-induced cognition impairment and show less hepatotoxicity. *J Med Chem* 2008;51:7666-7669.
76. Bolognesi ML, Minarini A, Tumiatti V, Melchiorre C. Lipoic acid, a lead structure for multi-target-directed drugs for neurodegeneration. *Mini Rev Med Chem* 2006;6:129-139.
77. Rodríguez-Franco MI, Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Hernández-Ledesma B, Bartolomé B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer's disease, with improved acetylcholine-esterase inhibitory and antioxidant properties. *J Med Chem* 2006; 49:459-462.
78. Fernández-Bachiller MI, Pérez C, Campillo NE, et al. Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties. *Chem Med Chem* 2009;4:828-841.
79. Spuch C, Antequera D, Fernández-Bachiller MI, Rodríguez-Franco MI, Carro E. A new tacrine-melatonin hybrid reduces amyloid burden and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 2010;421-431.
80. Fang L, Kraus B, Lehmann J, Heilmann J, Zhang Y, Decker M. Design and synthesis of yacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:2905-2909.
81. Barnham KJ, Bush AI. Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12:222-228.
82. Fernández-Bachiller MI, Pérez C, González-Muñoz GC, et al. Novel tacrine−8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. *J Med Chem* 2010;53: 4927-4937.
83. Amit T, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MB, Mandel S. Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *FASEB J* 2008;22:1296-1305.
84. Zheng H, Youdim MB, Fridkin M. Site-activated multifunctional chelator with acetylcholinesterase and neuroprotective-neurorestorative moie-ties for Alzheimer's therapy. *J Med Chem* 2009;52:4095-4098.
85. Zheng H, Fridkin M, Youdim MB. Site-activated chelators derived from anti-Parkinson drug rasagiline as a potential safer and more effective approach to the treatment of Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2010;35:2117-2123.
86. Collingridge GL, Lester RA. Exitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 1989;41:143-210.
87. Becher PG, Beuchat J, Gademann K, Juttner F. Nostocarboline: isolation and synthesis of a new cholinesterase inhibitor from Nostoc 78-12A. *J Nat Prod* 2005;68:1793-1795.
88. Rook Y, Schmidtke KU, Gaube F, et al. Bivalent β-carbolines as potential multitarget anti-Alzheimer agents. *J Med Chem* 2010;53:3611-3617.
89. Lysko PG, Lysko KA, Webb CL, et al. Neuroprotective activities of carvedilol and a hydroxylated derivative: Role of membrane biophysical interactions. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1645-1656.
90. Rosini M, Simoni E, Bartolini M, et al. Inhibition of acetylcholine-esterase, β-amyloid aggregation, and NMDA receptors in Alzheimer's disease: A promissing direction for the multi-target-directed ligands gold rush. *J Med Chem* 2008;51:4381-4384.
91. Melchiorre C, Andrisano V, Bolognesi ML, et al. Acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone for potential use against Alzheimer's disease. *J Med Chem* 1998;41:4186-4189.
92. Tumiatti V, Andrisano V, Banzi R, et al. Structure-activity eelationships of acethylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone. 3. Effect of replacing the inner polymethylene chain with cyclic, oieties. *J Med Chem* 2004;47:6490-6498.
93. Tumiatti V, Milelli A, Minarini A, et al. Structure-activity relationships of acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone. 4. Further investigation on the inner spacer. *J Med Chem* 2008;51:7308-7312.
94. Bolognesi ML, Banzi R, Bartolini M, et al. Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease. *J Med Chem* 2007;50:4882-4897.
95. Melchiorre C, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V. Polyamines in drug discovery: from the universal template approach to the multitarget-directed ligand design strategy. *J Med Chem* 2010;53: 5906-5914.
96. Bolognesi ML, Bartolini M, Rosini M, Andrisano V, Melchiore C. Structure-activity relationships of memoquin: Influence of the chain

chirality in the multi-target mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:4312-4315.

97. Camps P, Formosa X, Galdeano C, et al. Pyrano[3,2-*c*]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase and β-amyloid-directed anti-Alzheimer compounds. *J Med Chem* 2009;52: 5365-5379.
98. Luo W, Li YP, He Y, et al. Synthesis, and evaluation of novel tacrine-multialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterase and amyloid beta aggregation. *Bioorg Med Chem* 2011;19:763-770.
99. Ronco C, Sorin G, Nachon F, et al. Synthesis and structure-activity relationships of huprine derivatives as human acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2009;17:4523-4536.
100. Piazzi L, Cavalli A, Colizzi F, et al. Multi-target directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:423-426.
101. Zhu Y, Xiao K, Ma L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel dual inhibitors of acetylcholinesterase and β-secretase. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:1600-1613.

Editorial note
Manuscript received in original form on April 15, 2011;
accepted in final form on November 25, 2011