

سنتز، مطالعه جوشوندگی مولکولی و بررسی ویژگی دارونمایی مشتق‌های جدید تiazولوتری آزولوپیریمیدین حاوی گروه بنزیلوکسی فنیل به‌عنوان بازدارندگان آنزیم‌های کولین‌استراز

محمد عظیمی^۱، زهرا نجفی^{۲*}، آیدا ایرجی^{۳*}، احمدرضا سلگی^۴ و سهیلا اسمعیلی^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۲. دانشیار شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۳. استادیار شیمی دارویی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۴. دانشجوی دکتری حرفه‌ای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

۵. دانشجوی دکتری شیمی آلی، دانشکده شیمی و علوم نفت، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

دریافت: خرداد ۱۴۰۴ بازنگری: مرداد ۱۴۰۴ پذیرش: شهریور ۱۴۰۴



<https://doi.org/10.30495/JACR1.1404.1208773>

چکیده

آنزیم‌های استیل کولین‌استراز (AChE) و بوتیریل کولین‌استراز (BChE) به‌عنوان اهداف دارویی مؤثر در مدیریت علائم بیماری آلزایمر به‌عنوان یکی از شایع‌ترین اختلال‌های عصبی در سالمندان هستند. بازدارندگان آن‌ها موجب افزایش سطح استیل کولین در همایه‌های مغزی و درمان علامتی بیماری می‌شوند. بنابراین، در این پژوهش، مجموعه‌ای از مشتق‌های جدید تiazولوتری آزولوپیریمیدین دارای گروه بنزیلوکسی فنیل در یک واکنش سه‌جزئی با بازده خوب سنتز شدند و فعالیت مهار آن‌ها بر روی آنزیم‌های استیل کولین‌استراز و بوتیریل کولین‌استراز (BChE) به‌روش المن ارزیابی شد. نتیجه‌ها نشان داد ترکیب حاوی ۴-متیل بیشترین فعالیت بازدارندگی علیه AChE ($1.74 \pm 22/15$ میکرومولار) و ترکیب دارای ۴-فلوئور بهترین اثر بازدارندگی را در برابر BChE ($1.5 \pm 11/70$ میکرومولار) داشتند. بررسی روابط ساختار-فعالیت (SAR) نشان داد که ماهیت، اندازه و جایگزینی در موقعیت R در حلقه بنزیلی نقش تعیین‌کننده‌ای در انتخاب‌پذیری و قدرت بازدارندگی دارد. مطالعه‌های جوشوندگی مولکولی، الگوی پیوند به‌تقریب مشابهی را در هر دو آنزیم نشان داد. همچنین، نشان داد که پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های π - π مهم‌ترین تعامل‌های مدل دارویی در جایگاه فعال هر دو آنزیم هستند. در ادامه، ارزیابی ویژگی‌های داروجنبش‌شناختی و بررسی قانون لیپینسکی، دارونمایی مناسب ترکیب‌ها را تأیید کرد. این نتیجه‌ها حاکی از قابلیت بالای مشتق‌های سنتز شده برای توسعه بازدارنده‌های کولین‌استراز برای درمان بیماری آلزایمر است.

واژه‌های کلیدی: سنتز، تiazولوتری آزولوپیریمیدین، بازدارنده‌های کولین‌استراز، آلزایمر، مطالعه‌های جوشوندگی مولکولی، دارونمایی.

مقدمه

بیماری آلزایمر^۱ یک اختلال پیش رونده و تحلیل برنده عصبی است که به عنوان شایع ترین علت زوال عقل در سالمندان شناخته می شود. این بیماری با کاهش تدریجی حافظه، توانایی شناختی و عملکرد رفتاری همراه است و تأثیر قابل توجهی بر کیفیت زندگی بیماران دارد. با وجود پیشرفت های علمی فراوان، علت دقیق بروز این بیماری هنوز به طور کامل مشخص نشده است. با این حال، تجمع پلاک های بتا-آمیلوئید^۲، درهم تنیدگی های نوروفیبریلاری^۳ ناشی از پروتئین تاو فسفریله شده، تنش اکسایشی و اختلال در سامانه کولینرژیک^۴ از ویژگی های آسیب شناسی^۵ اصلی مرتبط با پیشرفت بیماری بشمار می روند [۱ و ۲].

یکی از مهم ترین مشخصه های پاتولوژیک در بیماری آلزایمر، کاهش سطح استیل کولین (ACh) در مغز است. این ناقل عصبی نقش کلیدی در فرایندهای یادگیری و حافظه دارد. آنزیم استیل کولین استراز (AChE) مسئول تجزیه ACh در فضای سیناپسی است و بازدارندگی آن می تواند با افزایش سطح ACh در مغز، منجر به بهبود عملکرد شناختی بیماران آلزایمری شود. در بیماران مبتلا به آلزایمر، عدم تعادل بین آنزیم های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز (BChE) رخ می دهد به طوری که فعالیت AChE تغییر نمی کند یا کاهش می یابد، در حالی که فعالیت BChE به طور چشمگیری افزایش می یابد. بنابراین، به نظر می رسد که بازدارندگی BChE نیز می تواند به عنوان یک هدف درمانی ارزشمند برای درمان آلزایمر در نظر گرفته شود [۳].

جایگاه فعال آنزیم AChE انسانی، یک شیار بلند با طول کلی تقریبی ۲۰ آنگستروم است که شامل جایگاه فعال کاتالستی (CAS^۶) در انتهای شیار است، در حالی که جایگاه

آنیونی محیطی (PAS^۷) نزدیک به ورودی شیار قرار دارد. این دو جایگاه با این شیار باریک به هم متصل شده اند. برای آنزیم BChE نیز الگوی مشابهی وجود دارد با این تفاوت که جایگاه فعال آن، کمی بزرگتر از AChE است. بازدارندگان به طور معمول دارای دو بخش با ویژگی دارویی^۸ هستند که با یک اتصال دهنده به هم متصل شده اند [۴].

اگرچه بازدارنده های استیل و بوتیریل کولین استراز بسیاری همچون دونهپیل^۹، ریواستیگمین^{۱۰} و گالاتنامین^{۱۱} برای درمان علامتی آلزایمر تأیید شده اند، این داروها به طور کلی اثربخشی محدود و عوارض جانبی قابل توجهی دارند [۵ و ۶]. بنابراین، نیاز به کشف و توسعه بازدارنده های جدید با قدرت، انتخاب پذیری و ایمنی بالاتر همچنان احساس می شود [۷ تا ۹]. در این راستا، طراحی منطقی دارو با بهره گیری از روش های مبتنی بر ساختار، رویکردی کارآمد برای شناسایی ترکیب های نوین با فعالیت بهینه علیه کولین استراز فراهم می سازد [۱۰]. همچنین، در سال های اخیر، شیمیدانان دارویی علاقه زیادی به طراحی و سنتز مولکول های هیبریدی جدیدی نشان داده اند که شامل دو یا چند هسته دارای ویژگی دارویی متفاوت با ویژگی زیستی و ساختارهای متفاوت هستند [۱۱ و ۱۲].

مشتق های پیریمیدین شامل تری آزولوپیریمیدین به عنوان یکی از خانواده های مهم ترکیب های ناچور حلقه، دارای فعالیت های زیستی متنوعی از جمله ویژگی پادالتهابی، پادسرطانی و محافظت عصبی هستند [۱۳ تا ۱۵]. از این هسته شیمیایی برای طراحی بازدارندگان کولین استراز استفاده شده است. مشتق های جدید از دو حلقه ای تریازولوپیریمیدین ترکیب A (شکل ۱) توسط جمیل و همکارانش با مقدار IC₅₀ برابر با ۰/۰۶۵ میکرومولار در برابر AChE گزینش پذیری خوبی نسبت به BChE نشان دادند [۱۶]. همچنین، رامهان و همکارانش نیز مشتق های جدید از سه حلقه ای پیرازولو-تریازولوپیریمیدین

1. Alzheimer's disease

4. Cholinergic

7. Peripheral anionic site (PAS)

10. Rivastigmine

2. Amyloid beta

5. Pathology

8. Pharmacophore

11. Galantamine

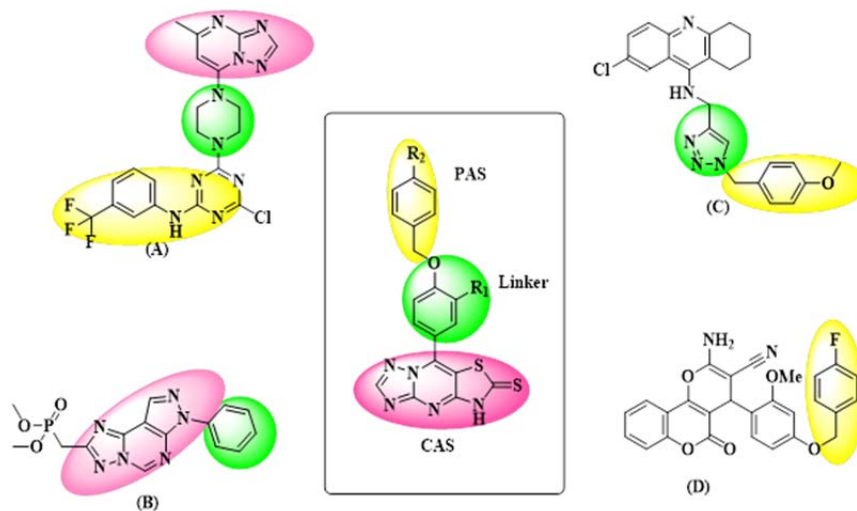
3. Neurofibrillary Tangles (NFT)

6. Catalytic active site (CAS)

9. Donepezil

داده شده است، توانستند به عنوان هسته با ویژگی‌های دارویی در بازدارندگی آنزیم‌های کولین استراز مشارکت داشته باشند [۱۸ و ۱۹].

فسفونات ترکیب B (شکل ۱) را سنتز کردند که قدرت بازدارندگی با IC_{50} برابر با ۱/۷۳ میکرومولار در برابر AChE را نشان دادند [۱۷]. از سوی دیگر ساختار انتهایی بنزیل شامل ترکیب‌های C و D در چندین مطالعه که در شکل ۱ نمایش



شکل ۱ ترکیب‌های تهیه شده برپایه استفاده از تری‌آزولوپیریمیدین به عنوان بازدارنده CAS (بنفش)، بخش بنزیل به عنوان بازدارنده PAS (زرد) و رابط میانی (سبز) در مطالعه‌های متفاوت

جورشوندگی مولکولی^۲، داروجنبش‌شناختی و دارونمایی نیز انجام شد. نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش می‌تواند دیدگاه‌های ارزشمندی در زمینه روابط ساختار-فعالیت (SAR) این گروه از ترکیب‌ها ارائه دهد و مسیر طراحی داروهای مؤثرتر برای درمان بیماری آلزایمر را هموار سازد.

بخش تجربی

دستگاه‌ها

نقاط ذوب ترکیب‌های سنتز شده با دستگاه Stuart melting point apparatus SMP3 اندازه‌گیری شد. طیف‌های 1H -NMR و ^{13}C -NMR ترکیب‌ها، با دستگاه مدل Bruker 300 MHz ثبت و جابه‌جایی‌های شیمیایی (δ) آن‌ها

در نتیجه، ادغام^۱ اسکلت تiazolوتری‌آزولوپیریمیدین و ساختار بنزیل به دلیل قابلیت برقراری پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های $\pi-\pi$ با بقایای کلیدی در جایگاه فعال آنزیم‌ها، توجه زیادی را به خود جلب کرده است. همچنین، حضور گروه تیون از رودانین می‌تواند از راه برهم‌کنش‌های دهنده-گیرنده، موجب افزایش میل پیوند به هدف دارویی شود [۲۰ تا ۲۲]. این ویژگی‌ها موجب شدند که در این پژوهش، سنتز و ارزیابی زیستی مجموعه‌ای از مشتق‌های تiazolوتری‌آزولوپیریمیدین حاوی گروه بنزیلوکسی فیل به عنوان بازدارنده‌های کولین استراز، انجام شود. همچنین، برای بررسی دقیق‌تر چگونگی این ترکیب‌ها در جایگاه فعال آنزیم، مطالعه‌های

گرفته شد [۲۳]. در این آزمون، واکنش میان تیول آزاد شده از آب کافت بستر^۲ با معرف^۵-دی تیوبیس (۲-نیتروبنزوئیک اسید) (DTNB^۳)، منجر به تولید فراورده رنگی می شود که جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری می شود.

آنزیم (AChE (EC 3.1.1.7، استخراج شده از مارماهی BChE (EC 3.1.1.8، مشتق از سرم اسب، بسترهای استیل تیوکولین یدید (ATCI)، بوتیریل تیوکولین یدید (BTCl)، و معرف DTNB همگی از شرکت سیگما-آلد ریچ تهیه شدند.

برای آماده سازی محلول ها، ترکیب های مورد نظر در مخلوطی از DMSO و متانول به نسبت مساوی (۱:۱) حل شدند و سپس با بافر $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ با غلظت ۰/۱ مولار و pH برابر ۸ رقیق شدند. آزمایش ها در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس و با استفاده از پلیت ۹۶ خانه مدل BioTek ELx808 انجام شد.

در هر خانه از پلیت، به ترتیب ۵۰ میکرولیتر بافر، ۲۵ میکرولیتر از محلول ترکیب مورد آزمایش (حل شده در مخلوط DMSO و متانول)، و ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم با غلظت نهایی ۰/۲۲ U/ml افزوده شد. پس از ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، ۱۲۵ میکرولیتر از محلول DTNB (۳ میلی مولار در بافر) افزوده شد. سپس، ۲۵ میکرولیتر از محلول بستر (با غلظت ۳ میلی مولار) افزوده شد و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، تغییرهای جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. درصد بازدارندگی آنزیمی با فرمول ۱ محاسبه شد.

$$100 \times \left[\frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \right] = \text{درصد بازدارندگی} \quad (1)$$

به صورت ppm گزارش شدند. تجزیه و تحلیل عنصری با دستگاه Elementar Analysensystem GmbH VarioEL CHNS انجام شد. طیف های فرو سرخ تبدیل فوریه (FTIR) ترکیب ها با دستگاه مدل Bruker ALPHA FT-IR spectrometer ثبت شدند.

روش کلی سنتز مشتق های حد واسط آلدهید اتری 3a-c

وانیلین (۱) (۱ میلی مول) با مشتق های متفاوت بنزیل هالید (۲) (۱/۲ میلی مول) در حضور پتاسیم کربنات (۱ میلی-مول) در حلال DMF (۵ میلی لیتر) و در دمای اتاق واکنش دادند. پس از اتمام واکنش، مخلوط آب و یخ به مخلوط واکنش افزوده شد و مشتق های بنزیل اوکسی بنز آلدهیدها (۳) به صورت رسوب سفید به دست آمدند و بدون خالص سازی بیشتر برای مراحل بعد، به کار برده شدند [۱۹].

روش کلی سنتز مشتق های جدید تیا زولوتری آزولوپیریمیدین حاوی گروه آریل آلکیلوکسی فنیل (6a-f)

در یک بالن ۲۵ میلی لیتری ته گرد، بنزیل اوکسی بنز آلدهید (۳) (۱ میلی مول)، رودانین (۴) (۱ میلی مول) و ۳-آمینو-۴،۵-تری آزول (۵) (۱ میلی مول) در حضور مقداری پاراتولئن سولفونیک اسید (۱۰ درصد مولی)، و ۵ میلی لیتر حلال اتانول به محلول افزوده شدند و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت بازروانی شدند. پیشرفت واکنش با روش TLC دنبال شد (در تانک TLC، ابتدا به نسبت ۱:۵ n-هگزان و اتیل استات ریخته شد و سپس، با توجه به پیشرفت فاز متحرک در صورت لزوم اتیل استات افزوده می شد). پس از پایان واکنش، مخلوط واکنش تا دمای اتاق سرد و رسوب به دست آمده صاف و با اتانول یا دی اتیل اتر سرد شسته شد.

ارزیابی فعالیت بازدارندگی ترکیب های سنتز شده بر آنزیم های

AChE و BChE

برای بررسی اثر بازدارندگی مشتق های سنتز شده بر آنزیم های AChE و BChE، از روش رنگ سنجی المن^۱ بهره

1. Ellman

2. Substrate

3. 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

4. Lyophilized

ابزار AutoDock Tools (ADT, version 1.5.6) آماده‌سازی شدند. سپس، ترکیب منتخب از بین مشتق‌های سنتز شده (که بهترین کارایی بازدارندگی را نشان داده بود)، با نرم‌افزار آنالاین MarvinSketch رسم شد.

برای BChE، مختصات مرکز شبکه جوشوندگی به گونه‌ای تعیین شد که ناحیه فعال آنزیم شامل محل‌های CAS و PAS را دربرگیرد ($X = 134.75$, $Y = 112.63$, $Z = 40.79$) و اندازه جعبه شبکه برابر با $60 \times 60 \times 60$ با فاصله نقطه‌ای 0.375 آنگستروم انتخاب شد. برای AChE نیز، تنظیمات مشابهی اعمال شد و مختصات مرکز جعبه روی نقاط ($X = 3.386$, $Y = 65.434$, $Z = 63.34$) تعیین شد.

جوشوندگی با بهره‌گیری از الگوریتم ژنتیک لامارکین^۴ انجام شد که شامل جمعیتی متشکل از ۱۵۰ حالت اولیه به‌صورت تصادفی بود. تعداد بیشینه ارزیابی‌های انرژی برابر با $2/5 \times 10^6$ ، بیشینه نسل‌ها برابر با ۲۷۰۰۰ و تعداد اجرای الگوریتم برابر با ۱۰۰ بار در نظر گرفته شد. تحلیل نتیجه‌ها با تحلیل خوشه‌ای بر پایه مقدار RMSD با آستانه‌ی ۰/۲ نانومتر صورت گرفت و کم‌انرژی‌ترین حالت در هر جمعیت‌ترین خوشه برای تحلیل نهایی انتخاب شد. تجسم گرافیکی تعامل‌های میان لیگاند و باقی‌مانده‌های فعال آنزیم با نرم‌افزار Discovery Studio Visualizer (نسخه ۲۰۲۱) انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای شناسایی ساختار ترکیب‌های سنتز شده، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته پروتون ($^1\text{H-NMR}$) و کربن-۱۳ ($^{13}\text{C-NMR}$) به کار گرفته شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمون‌های زیستی بر پایه مقدارهای غلظت بازدارنده (IC_{50}) از راه سنجش فعالیت آنزیم‌های AChE و BChE با روش المن بررسی شدند. برای درک بهتر تعامل‌ها بین لیگاندها و جایگاه فعال آنزیم‌ها، از شبیه‌سازی جوشوندگی مولکولی بهره گرفته شد تا چگونگی

پیش‌بینی مجازی ویژگی دارونمایی^۱ و داروجنبش‌شناختی^۲

برای ارزیابی ویژگی فیزیکوشیمیایی و قابلیت دارویی ترکیب‌های سنتز شده، دو ابزار آنالاین SwissADME [۲۴] و pkCSM [۲۵] به کار گرفته شد. عامل‌هایی مانند وزن مولکولی، تعداد دهنده‌های پیوند هیدروژنی، تعداد پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی، لگاریتم ضریب تقسیم چربی-آب، مساحت سطح قطبی توزیع شده (TPSA) و تعداد پیوندهای قابل چرخش برای هر ترکیب محاسبه شد. این اطلاعات به منظور ارزیابی اولیه از قابلیت عبور ترکیب‌ها از غشاهای زیستی و بررسی تطابق آن‌ها با قوانین لیپینسکی^۳ و سایر معیارهای داروشناسی مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه، به منظور بررسی ویژگی‌های داروجنبش‌شناختی و سمیت احتمالی، ترکیب‌های موردنظر در سامانه pkCSM وارد شده و عامل‌هایی مانند جذب خوراک، توزیع، دگرگشت، دفع (ADME) و همچنین، پیش‌بینی سمی‌بودن بررسی شدند. نتیجه‌های به‌دست آمده از این تحلیل‌ها به عنوان معیاری برای غربالگری و انتخاب ترکیب‌های مناسب برای مطالعه‌های زیستی و محاسباتی بیشتر در نظر گرفته شدند.

مطالعه‌های جوشوندگی مولکولی

برای بررسی چگونگی پیوند و شناسایی تعامل‌های احتمالی ترکیب‌های طراحی شده با آنزیم‌های استیل کولین استراز (AChE) و بوتیریل کولین استراز (BChE)، مطالعه‌های جوشوندگی مولکولی با نرم‌افزار AutoDock 4.2 انجام شد [۲۶]. ساختار سه‌بعدی آنزیم‌ها از پایگاه داده RCSB PDB استخراج شد؛ برای AChE، ساختار مربوط به کمپلکس با کد 1EVE و برای BChE ساختار با کد 6I0B از جایگاه RCSB PDB انتخاب شد.

پیش از انجام جوشوندگی، مولکول‌های آب و لیگاندهای همراه از ساختارهای بلوری حذف شدند و فایل‌های موردنیاز با

1. Drug-likeness

4. Lamarckian

2. Pharmacokinetic

3. Lipinski rule

نتیجه‌ها و بحث

داده‌های طیفی نمونه‌های سنتز شده

قرارگیری ترکیب‌ها در محل‌های فعال آنزیم‌ها و نوع برهم‌کنش‌های بین آن‌ها (مانند پیوند هیدروژنی و برهم‌کنش‌های π - π) پیش‌بینی شود. این داده‌ها در کنار نتیجه‌های تجربی برای تفسیر روابط ساختار-فعالیت (SAR) استفاده شدند.

نمونه **6a** زردرنگ با گستره نقطه ذوب 201 تا 203 درجه سلسیوس و سنتز شده با بهره 63 درصد

9-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6a)
FTIR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3310, 3157, 2820, 1694, 1582, 1182, 1127; ^1H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.78 (s, 1H, NH), 7.62 (s, 1H, H₆), 7.50 – 7.35 (m, 5H, H₂", H₃", H₄", H₅", H₆"), 7.28 – 7.14 (m, 3H, H₂", H₅", H₆"), 5.20 (s, 2H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) 195.94, 169.85, 150.70, 149.81, 136.94, 132.70, 128.97, 128.54, 128.41, 126.41, 124.93, 122.99, 114.19, 114.12, 70.43, 56.12.

نمونه **6b** زردرنگ با گستره نقطه ذوب 225 تا 227 درجه سلسیوس سنتز شده با بهره 61 درصد

9-(4-((2-fluorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6b)
FTIR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3166, 3050, 2810, 1696, 1587, 1271, 1245; ^1H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.79 (s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H, H₆), 7.58 – 7.42 (m, 2H, H₅", H₆"), 7.31 – 7.16 (m, 5H, H₃", H₄", H₅", H₆" & H₂"), 5.21 (s, 2H, CH₂), 3.83 (s, 3H, OMe); ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 195.92, 169.84, 168.43, 167.83, 162.57, 159.31, 150.43, 150.02, 149.71, 149.61, 132.61, 132.56, 131.45, 131.40, 131.20, 131.09, 126.68, 126.63, 125.08, 125.03, 124.88, 124.00, 123.83, 123.70, 123.64, 123.09, 121.20, 116.06, 115.78, 114.13, 114.00, 113.92, 64.73, 64.68, 56.03.

نمونه **6c** جامد زردرنگ با گستره نقطه ذوب 195 تا 197 درجه سلسیوس سنتز شده با بهره 67 درصد

9-(4-((4-fluorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6c)
FTIR (KBr): ν (cm^{-1}) = 33150, 3152, 2813, 1651, 1581, 1279, 1226; ^1H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.79 (s, 1H, NH), 7.64 (s, 1H, H₆), 7.53 (m, 2H, H₅", H₆"), 7.30 – 7.19 (m, 5H, H₂", H₃", H₅", H₆" & H₂"), 5.19 (s, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, OMe); ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 195.97, 169.87, 150.56, 149.80, 133.17, 132.68, 130.77, 130.66, 126.49, 124.89, 123.06, 115.95, 115.67, 114.20, 69.69, 56.12.

نمونه **6d** جامد زردرنگ با گستره نقطه ذوب 182 تا 183 درجه سلسیوس سنتز شده با بهره 65 درصد

9-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6d)
FTIR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3317, 3158, 2810, 1696, 1569, 1181, 1175; ^1H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.80 (s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, H₆), 7.49 (s, 4H, H₂", H₃", H₅", H₆"), 7.27 – 7.16 (m, 3H, H₂", H₅", H₆"), 5.20 (s, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, OMe); ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 195.96, 169.88, 150.43, 149.77, 136.01, 133.13, 132.65, 130.19, 128.99, 126.54, 124.86, 123.08, 114.20, 114.15, 69.52, 56.12.

نمونه **6e** جامد زردرنگ با گستره نقطه ذوب 192 تا 193 درجه سلسیوس سنتز شده با بهره 64 درصد

9-(4-((4-bromobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6e)
FTIR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3318, 3158, 2815, 1695, 1570, 1182, 1127; ^1H NMR (301 MHz, DMSO): δ

(ppm) = 13.77 (s, 1H, NH), 7.67 – 7.54 (m, 3H, 2H, H_{5'}, H_{6'} & H₆), 7.50 – 7.35 (m, 2H, 2H, H_{2'}, H_{3'}), 7.23 – 7.16 (m, 3H, H_{2'}, H_{5'}, H_{6'}), 5.18 (s, 2H, CH₂), 3.86 (s, 3H, OMe); ¹³C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 195.95, 169.87, 150.42, 149.79, 136.44, 132.62, 131.91, 130.45, 126.57, 124.85, 123.10, 121.68, 114.18, 69.58, 56.14.

نمونه 6f جامد زردرنگ با گستره نقطه ذوب ۱۸۴ تا ۱۸۵ درجه سلسیوس سنتز شده با بهره ۶۰ درصد

9-(3-methoxy-4-((4-(trifluoromethyl)benzyl)oxy)phenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6f)

FTIR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3315, 3157, 2810, 1695, 1181, 1126; ¹H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.79 (s, 1H, NH), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_{2'}, H_{3'}), 7.69 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H_{5'}, H_{6'}), 7.62 (s, 1H, H₆), 7.24-7.16 (m, 3H, H_{2'}, H_{5'}, H_{6'}), 5.32 (s, 2H, CH₂), 3.87 (s, 3H, OMe); ¹³C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 195.94, 169.84, 150.30, 149.82, 141.88, 132.59, 128.63, 126.71, 125.90, 125.85, 124.82, 123.20, 114.29, 114.21, 69.48, 56.18.

نمونه 6g جامد زردرنگ با گستره نقطه ذوب ۱۹۸ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس سنتز شده با بهره ۶۸ درصد

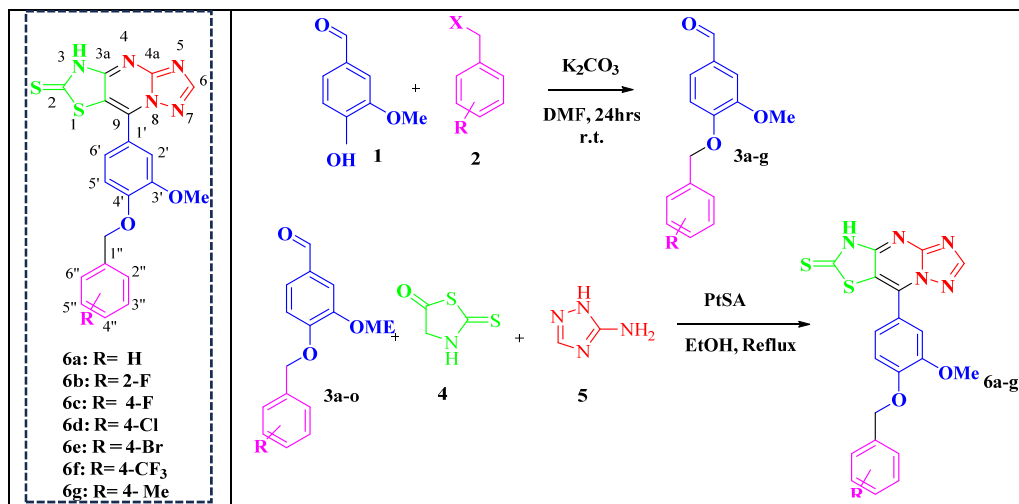
9-(3-methoxy-4-((4-methylbenzyl)oxy)phenyl)thiazolo[4,5-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2(3H)-thione (6g)

FTIR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3310, 2820, 1691, 1582, 1267, 1212; ¹H NMR (301 MHz, DMSO): δ (ppm) = 13.80 (s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, H₆), 7.37 – 7.34 (m, 2H, H_{5'}, H_{6'}), 7.21 (m, 5H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{6'} & H₂), 5.15 (s, 2H, CH₂), 3.84 (s, 3H, OMe), 2.33 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (76 MHz, DMSO): δ (ppm) = 196.02, 169.98, 150.72, 149.78, 137.85, 133.89, 132.70, 129.52, 128.56, 126.32, 124.94, 122.97, 114.13, 70.31, 56.09, 21.28.

سنتز نمونه‌ها

به‌دست‌آمده از محیط واکنش جداسازی و با اتانول خالص یا دی‌اتیل اتر، دوباره بلوری شد. ساختار کلی مسیر سنتز در شکل ۲ نمایش داده شده است.

ترکیب‌های هدف با یک واکنش سه جزئی در شرایط بازروانی در حلال اتانول در حضور کاتالیست پاراتولون سولفونیک اسید سنتز شدند. پس از پایان واکنش، رسوب



شکل ۲ طرحواره کلی سنتز ترکیب‌های مورد مطالعه

در بخش بنزینی توانست درصد بازدارندگی $1/21 \pm 57/18$ با IC_{50} برابر با $2/33 \pm 28/48$ میکرومولار نشان دهد. ترکیب‌های 6d و 6e با جایگزین‌های ۴-کلرو و ۴-برمو نیز اثرهای بازدارندگی ضعیف $3/02 \pm 29/68$ و $4/02 \pm 41/87$ را نشان دادند. ترکیب 6f با جایگزین ۴-تری‌فلوئورومتیل نیز توانست اثرهای بازدارندگی اندکی بهتر از ترکیب 6c با درصد $5/83 \pm 64/65$ و IC_{50} برابر با $0/84 \pm 25/71$ نشان دهد. به‌نظر می‌رسد این بهبود ناشی از اثرهای الکترون‌کشندگی و چربی‌دوستی نباشد زیرا ترکیب 6b با ۲-فلوئور نتوانست مانند ترکیب 6c با ۴-فلوئور اثر بازدارندگی نشان دهد درحالی‌که هردو به یک میزان در الکترون‌کشندگی مشارکت دارند. آنچه اهمیت دارد جهت‌گیری جایگزینی فلوئور است. موقعیت پارا توانسته است به‌احتمال با نوعی برهم‌کنش‌های دوقطبی-دوقطبی با جایگاه‌های فعال برهم‌کنش داشته باشد که در هر دو ترکیب 6c و 6f وجود دارد. در ادامه، ورود گروه متیل به‌عنوان الکتروکشنده چربی‌دوست در موقعیت پارا (ترکیب 6g) منجر به بهبود در فعالیت بازدارندگی با درصد $6/83 \pm 54/65$ و IC_{50} برابر با $1/74 \pm 22/15$ شد. احتمال می‌رود این افزایش قدرت بازدارندگی به‌دلیل برقراری پیوندهای آب‌گریز یا پای-آلکیل در جایگاه فعال آنزیم باشد.

ارزیابی برون‌تنی بازدارندگی آنزیم‌های AChE و BChE برای بررسی قدرت بازدارندگی ترکیب‌های سنتز شده، آزمون بازدارندگی آنزیم‌های AChE و BChE با استفاده از روش المن انجام گرفت. نتیجه‌های به‌دست‌آمده به‌صورت درصد بازدارندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و همچنین مقدارهای IC_{50} (بر حسب میکرومولار) در جدول ۱ ارائه شده‌اند. جایگزین‌های افزوده‌شده را می‌توان از سه دیدگاه الکترون‌دهندگی یا کشندگی، آب‌دوستی یا چربی‌دوستی و اندازه یا ازدحام فضایی بررسی کرد. بررسی اثر بازدارندگی ترکیب‌های سنتز شده بر روی آنزیم AChE نشان داد که ترکیب 6a بدون هیچ جایگزینی در موقعیت R، درصد بازدارندگی $1/69 \pm 32/07$ با IC_{50} بالای ۵۰ میکرومولار را از خود نشان داد. در مرحله بعد، افزودن هالوژن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های الکترون‌کشنده چربی‌دوست شامل ۲-فلوئور، ۴-فلوئور، ۴-کلرو، ۴-برمو و ۴-تری‌فلوئورومتیل به‌ترتیب ترکیب‌های 6b، 6c، 6d و 6f را تولید کرد. ترکیب 6b با جایگزینی ۲-فلوئور در بخش بنزینی افزایش بسیار اندکی در درصد بازدارندگی $2/1 \pm 36/13$ نشان داد. درحالی‌که ترکیب 6c با جایگزینی ۴-فلوئور

1. Half maximal inhibitory concentration

جدول ۱ فعالیت بازدارندگی مشتق‌های تiazolotriazolopirymidine (6a-g) علیه آنزیم‌های استیل‌کولین‌استراز (AChE) و بوتیریل‌کولین‌استراز (BChE) برپایه درصد بازدارندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیرهای IC_{50} (μM)

ردیف	ترکیب	R	استیل‌کولین‌استراز (AChE)		بوتیریل‌کولین‌استراز (BChE)	
			درصد بازدارندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	IC_{50} (μM)*	درصد بازدارندگی در غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	IC_{50} (μM)*
۱	6a	H	327.07 ± 1.69	$50 >$	30.42 ± 1.1	$50 >$
۲	6b	F-2	36.13 ± 2.11	$50 >$	46.88 ± 3.32	$50 >$
۳	6c	F-4	57.18 ± 1.21	28.48 ± 2.33	61.92 ± 4.23	11.70 ± 1.5
۴	6d	Cl-4	29.68 ± 3.02	$50 >$	41.49 ± 3.04	$50 >$
۵	6e	Br-4	41.87 ± 4.02	$50 >$	66.48 ± 2.98	32.04 ± 1.5
۶	6f	CF ₃ -4	64.65 ± 5.83	25.71 ± 0.84	47.13 ± 2.88	$50 >$
۷	6g	Me-4	54.65 ± 6.83	22.15 ± 1.74	47.43 ± 4.99	$50 >$
۸	دونیزیل	-	-	0.79 ± 0.05	-	10.6 ± 2.1

نسبت داده شود. ترکیب 6e با گروه ۴-برومو با وجود اندازه بیشتر، توانست فعالیت بهتری نسبت به کلر داشته باشد و IC_{50} آن به 1.5 ± 32.04 میکرومولار کاهش یافت. این تفاوت می‌تواند ناشی از حضور اتم برم با ایجاد سد مانع فضایی در حفره‌ای که از قبل کلر به سختی در آن جای گرفته بود، باشد که موجب تغییر در پیکربندی فضایی لیگاند و در نتیجه خم شدن لیگاند شد به گونه‌ای که برم در حفره دیگری با اندازه مانع فضایی کمتر قرار بگیرد. این خم‌شدگی، امکان برهم‌کنش مؤثرتر پای-پای با اسیدهای آمینه آروماتیک جایگاه فعال را فراهم می‌کند. ترکیب‌های 6f و 6g به ترتیب با جانشینی گروه‌های ۴-تری‌فلوئورمتیل و ۴-متیل در موقعیت R بررسی شدند. در هر دو مورد، مقدار IC_{50} بالاتر از 50 میکرومولار گزارش شد، که نشان‌دهنده فعالیت بازدارندگی به نسبت ضعیف علیه آنزیم BChE است. به نظر می‌رسد گروه‌های ۴-کلرو، ۴-تری‌فلوئورمتیل و گروه متیل با بزرگ شدن نسبت به فلئور به دلیل ممانعت فضایی برای برقراری برهم‌کنش با باقی‌مانده‌های جایگاه فعال آنزیم، در موقعیت پارا، نمی‌تواند برهم‌کنش مؤثر ایجاد کند. در مورد ۴-برمو در ترکیب 6e

در بررسی روابط ساختار-فعالیت ترکیب‌ها علیه آنزیم BChE، ترکیب 6a اولیه فاقد جایگزینی در موقعیت R، فعالیت بازدارندگی به نسبت ضعیفی از خود نشان داد (درصد بازدارندگی حدود 1.69 ± 327.07 و IC_{50} بالاتر از 50 میکرومولار). گروه ۲-فلئور در موقعیت اورتو ترکیب 6b تولید کرد که تغییر چشمگیری در فعالیت مشاهده نشد و با وجود افزایش جزئی در درصد بازدارندگی، مقدار IC_{50} همچنان بالاتر از 50 میکرومولار باقی ماند. جایگزینی ۲-فلئور با ۴-فلئور در ترکیب 6c منجر به افزایش قابل توجه فعالیت بازدارندگی و کاهش IC_{50} به 1.5 ± 11.70 میکرومولار شد. این افزایش را می‌توان به هندسه فضایی بهینه گروه فلئور در موقعیت پارا نسبت داد که امکان شکل‌گیری مؤثرتر برهم‌کنش‌های دوقطبی-دوقطبی فلئور و انتقال بار بهتر به دلیل الکترون‌کشندگی فلئور بر بنزیل با اسید آمینه‌های جایگاه فعال، اشاره کرد. جانشین کردن این گروه با جایگزینی کلر (۴-کلرو) در ترکیب 6d فعالیت بازدارندگی ضعیفی از خود نشان داد و IC_{50} آن بالاتر از 50 میکرومولار محاسبه شد (3.02 ± 29.68 درصد بازدارندگی) که می‌تواند به دلیل اندازه بزرگ اتم کلر یا الکترون‌کشندگی ضعیف‌تر آن

ستتر، مطالعه جوشوندگی مولکولی و بررسی ویژگی دارونمایی ...

برای ارزیابی قابلیت دارویی ترکیب‌های سنتز شده، عامل‌های داروجنبش‌شناختی کلیدی شامل وزن مولکولی، تعداد دهنده‌های پیوند هیدروژنی، تعداد پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی، چربی دوستی (Log P)، تعداد پیوندهای قابل چرخش و سطح قطبی (PSA) با ابزار SwissADME بررسی شدند (جدول ۲).

پیکربندی ترکیب در جایگاه تغییر می‌کند و قرارگیری در حفره بزرگتر می‌شود که موجب بهبود برهم‌کنش به IC_{50} برابر با ۱/۵ ± 32.04 می‌شود. نتیجه‌های پیش‌بینی‌شده از ویژگی داروجنبش‌شناختی ترکیب‌های منتخب

جدول ۲ ویژگی‌های دارونمایی و عامل‌های فیزیکوشیمیایی مشتق‌های تiazolotri-آزولوپیریمیدین (6a-g) شامل تعداد دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی، وزن مولکولی، Log P، تعداد پیوندهای قابل چرخش و مساحت سطح قطبی (PSA)

ردیف	ترکیب	تعداد دهنده‌های پیوند هیدروژنی	تعداد پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی	وزن مولکولی	چربی دوستی	تعداد پیوندهای قابل چرخش	PSA
۱	6a	۱	۵	۴۲۱.۵۰	۳.۸۹	۵	۱۳۷.۶۶
۲	6b	۱	۶	۴۳۹.۴۹	۳.۹۹	۵	۱۳۷.۶۶
۳	6c	۱	۶	۴۳۹.۴۹	۳.۹۹	۵	۱۳۷.۶۶
۴	6d	۱	۵	۴۵۵.۹۴	۴.۵۱	۵	۱۳۷.۶۶
۵	6e	۱	۵	۵۰۰.۳۹	۴.۵۸	۵	۱۳۷.۶۶
۶	6f	۱	۸	۴۸۹.۴۹	۴.۷۷	۶	۱۳۷.۶۶
۷	6g	۱	۵	۴۳۵.۵۲	۴.۲۵	۵	۱۳۷.۶۶

هیچ‌یک از ترکیب‌ها از حد ۵ تجاوز نکرد که نشان‌دهنده تعادل قابل قبول بین حلال‌پذیری در چربی و آب است. بررسی پیش‌بینی ویژگی ADMET (جدول ۳) نشان داد که همه ترکیب‌ها دارای جذب روده‌ای بالا (بیش از ۹۰ درصد) هستند که بیانگر قابلیت خوب جذب خوراکی است. همچنین، هیچ‌کدام از ترکیب‌ها به‌عنوان بستر OCT2 کلیوی یا بازدارنده کانال hERG شناخته نشدند که نشانه‌ای مثبت در زمینه ایمنی قلبی و دفع دارو است.

از نظر توزیع (جدول ۳)، همه ترکیب‌ها نفوذپذیری خوبی نسبت به سد خونی-مغزی داشتند ($BBB > -1$). در حیطه دگرگشت، بیشتر ترکیب‌ها به‌عنوان بستر یا بازدارنده آنزیم‌های CYP شناسایی شدند (به‌ویژه CYP3A4 و CYP2C9)، که به‌دلیل تداخل‌های دارویی نسبت به مصرف هم‌زمان با سایر

برپایه قانون پنج‌گانه لیبینسکی، یک ترکیب دارویی مناسب برای جذب خوراکی باید دارای وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون، Log P کمتر از ۵، تعداد پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی کمتر از ۱۰ و تعداد دهنده‌های پیوند هیدروژنی کمتر از ۵، میزان سطح قطبی (PSA) کمتر از ۱۴۰ و تعداد پیوندهای قابل چرخش کمتر از ۱۰ باشد. این نتیجه‌ها نشان داد که همه ترکیب‌های بررسی‌شده از دید تعداد دهنده‌های پیوند هیدروژنی، تعداد پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی و تعداد پیوندهای قابل چرخش در گستره قابل قبول قرار دارند. وزن مولکولی بیشتر ترکیب‌ها نیز در نزدیکی یا پایین‌تر از آستانه ۵۰۰ دالتون بود، به‌جز ترکیب 6e که با وزن ۵۰۰/۳۹ دالتون اندکی از این مقدار فراتر رفت. این افزایش جزئی تأثیر اندکی دارد و به‌تنهایی نقض‌کننده قانون لیبینسکی نیست. همچنین، مقدار Log P

سنتز شده از قابلیت مناسبی برای ادامه توسعه به عنوان بازدارنده های آنزیم استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز برخوردار هستند.

ترکیب ها که فعالیت بازدارندگی روی CYP ها دارند باید با احتیاط مصرف شوند. به طور کلی، اکثر ترکیب ها با قانون لیپینسکی هم خوانی داشتند و ویژگی های دارونمایی مطلوبی از خود نشان دادند. این نتیجه ها نشان می دهد که ترکیب های

جدول ۳ نتیجه های پیش بینی ویژگی ADMET (جذب، توزیع، دگرگشت، دفع و سمی بودن) مشتق های تiazolotri آزو لویپریمیدین (g-6)

ردیف	ترکیب	جذب روده ای	نفوذ پذیری (BBB)	دگرگشت				سمی بودن	
				بازدارنده CYP2D6	بازدارنده CYP2C9	بازدارنده CYP2C19	بازدارنده CYP1A2	AMES	بازدارنده hERG I
۱	6a	۹۲/۰۷	-۰/۳۷	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۲	6b	۹۲/۶۶	-۰/۵۹	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۳	6c	۹۲/۲۲	-۰/۵۹	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۴	6d	۹۱/۱۲	-۰/۴۴	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۵	6e	۹۱/۰۶	-۰/۴۳	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۶	6f	۹۰/۲۵	-۰/۲۴	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر
۷	6g	۹۲/۵۸	-۰/۱۹	بله	بله	بله	بله	خیر	خیر

جایگاه آنیونی کاتالستی (CAS^۲) با اسید آمینه هایی چون Trp84، Gly118، Glu199، Tyr130 و Tyr121 به بخش دهانه حفره آنزیمی با Trp279، Phe330 و Tyr121 جهت گیری می کند (شکل های ۳ و ۴).

یکنواختی در قرارگیری فضایی نشان می دهد که اسکلت مرکزی مولکول ها دارای سازگاری بالا با ساختار جایگاه فعال آنزیم است و می تواند به صورت پایدار در محل پیوند قرار گیرد (شکل ۴). بنابراین، به نظر می رسد که تفاوت های مشاهده شده در قدرت بازدارندگی ترکیب ها بیشتر ناشی از نوع و ماهیت برهم کنش هایی مانند پیوندهای هیدروژنی، $\pi-\pi$ ، چربی دوستی و اثرهای فضایی جایگزین ها در موقعیت R است.

عده های جورشوندگی مولکولی

بر پایه نتیجه های به دست آمده از جورشوندگی مولکولی، جایگاه فعال آنزیم AChE (با شناسه PDB: 1EVE) شامل آمینواسیدهای کلیدی Ser200، Trp84، Tyr121، Trp279، Phe288، Arg289 و Phe330 است که نقش مهمی در پیوند لیگاندها ایفا می کنند. این اسیدهای آمینه ها در برهم کنش هایی مانند پای-پای و پیوندهای هیدروژنی با لیگاندها نقش دارند. در میان ترکیب های بررسی شده، پیوندهای هیدروژنی و $\pi-\pi$ به عنوان مهم ترین تعامل های مدل دارویی^۱ در جایگاه فعال آنزیم AChE شناسایی شد که در پایداری و جهت گیری صحیح لیگاند در جایگاه فعال بسیار مؤثر است (شکل ۳).

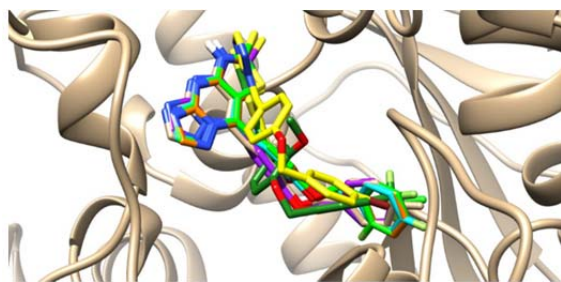
مطالعه های جورشوندگی ترکیب های 6a تا 6g نشان داد که همه لیگاندها با وجود تفاوت در گروه های موقعیت R، در جایگاه فعال آنزیم AChE به طور تقریبی پیکربندی یکسانی را اشغال کرده اند (شکل ۳)، به طوری که بخش تiazolotri آزو لویپریمیدین در

1. Pharmacophore

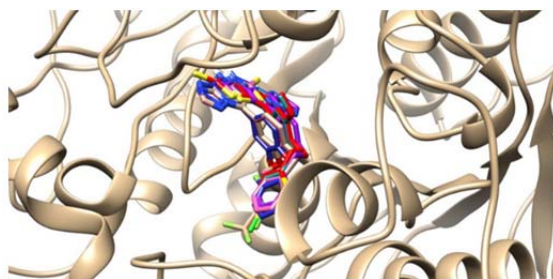
2. Catalytic anionic site

بیانگر سازگاری ساختاری بالای اسکلت مرکزی ترکیبها با ساختار آنزیم است. با این حال، ترکیب 6e با 4-Br انحراف جزئی از موقعیت فضایی سایر لیگاندها نشان داد؛ به گونه‌ای که هسته پیریمیدینی این ترکیب متمایل‌تر به سمت CAS از موقعیت سایر ترکیبها قرار گرفت. این ترکیب دچار خمش می‌شود و وارد برهم‌کنش با Trp82 می‌شود. این تفاوت فضایی به احتمال به دلیل تأثیرهای استریک Br و اثر آن‌ها بر موقعیت‌یابی کلی لیگاند در جایگاه فعال است.

همان‌گونه که در شکل ۶ دیده می‌شود، بخش تiazolوتری‌آزولوپیریمیدین با آمینواسیدهای در جایگاه آنیونی کاتالیستی و جایگاه آنیونی محیطی (PAS) وارد برهم‌کنش می‌شود در حالی که انتهای بنزیلی به بخش جایگاه فعال در Ser198، leu286 و His438 جهت‌گیری می‌کند.

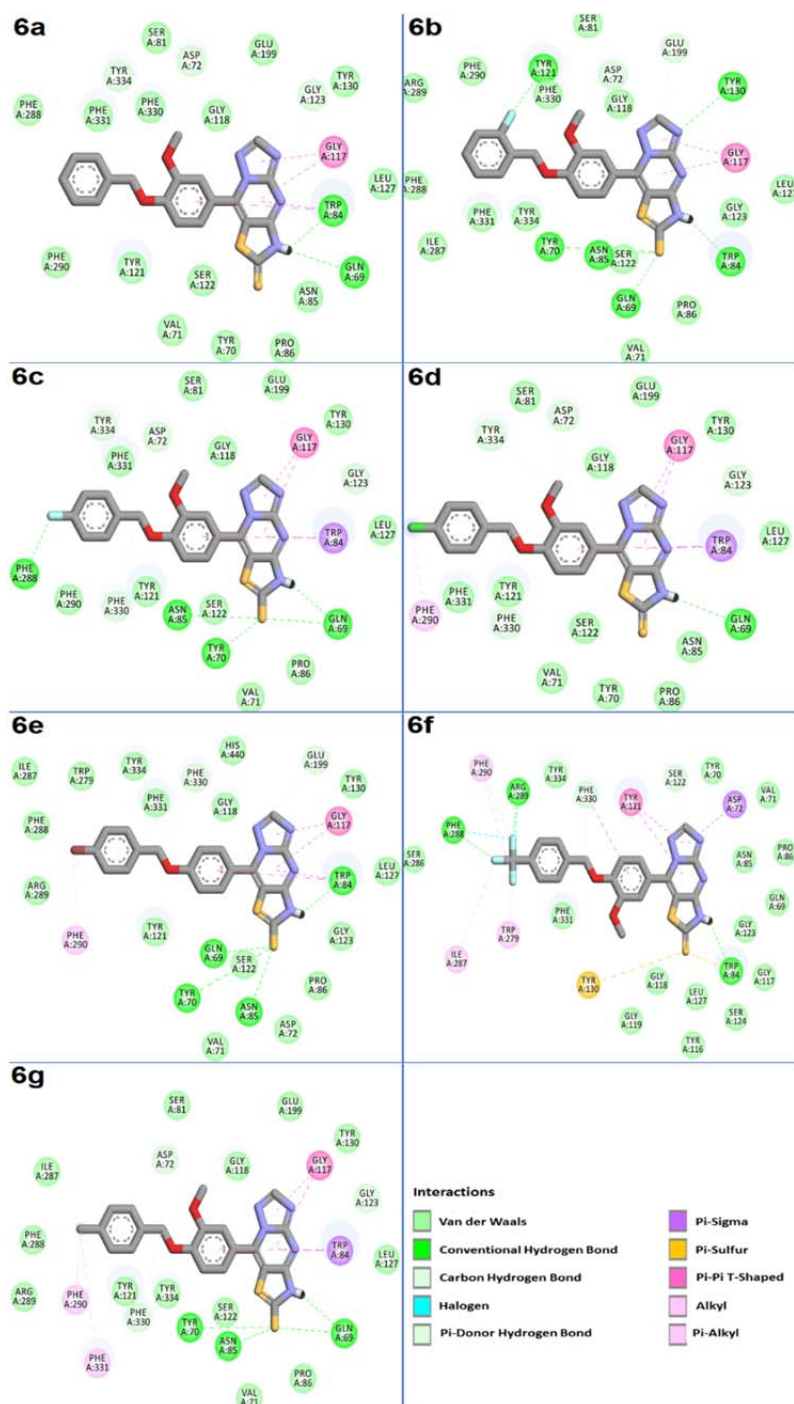


شکل ۵ نمای هم‌پوشانی لیگاندهای 6a تا 6g در جایگاه فعال آنزیم BChE



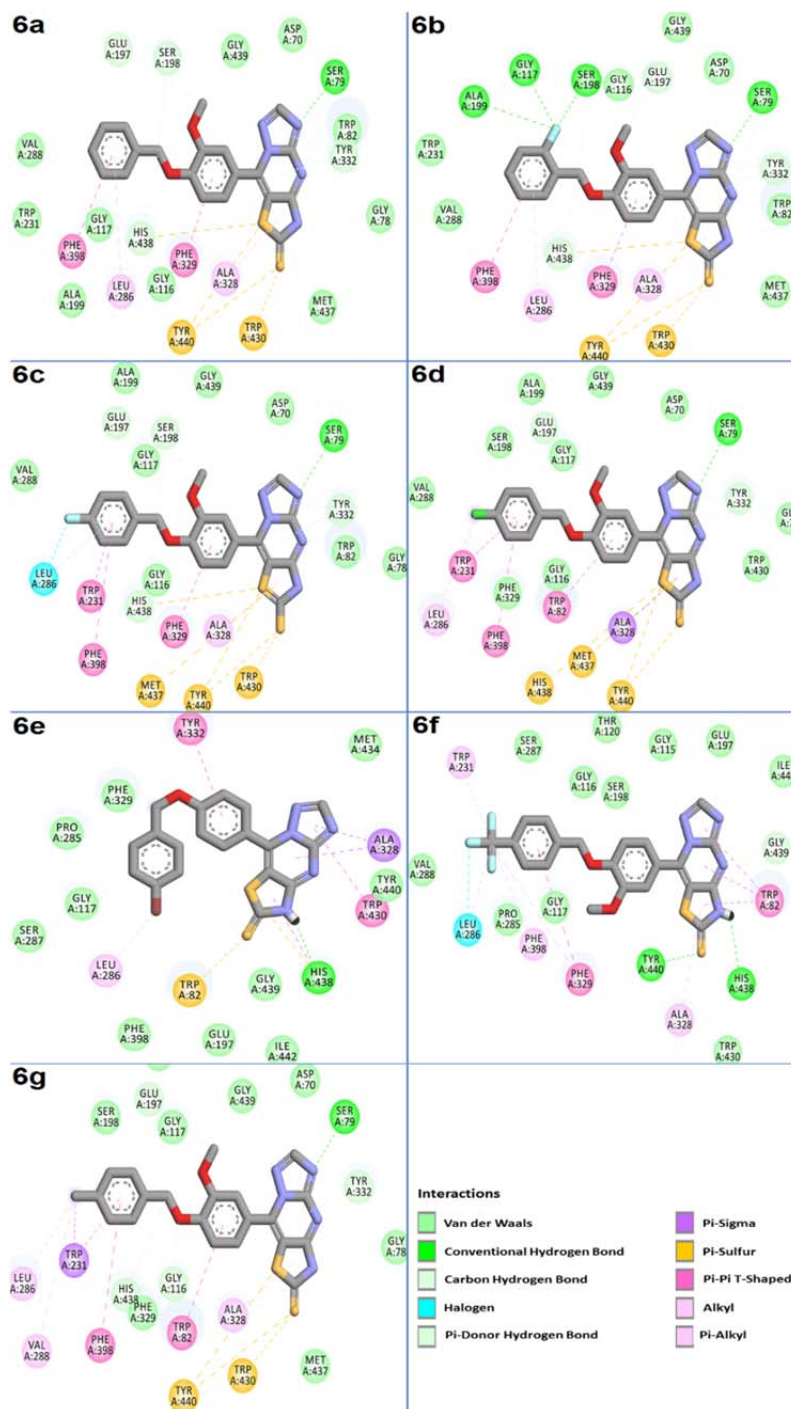
شکل ۳ نمای هم‌پوشانی لیگاندهای 6a تا 6g در جایگاه فعال آنزیم AChE (همان‌طور که مشاهده می‌شود، تمامی ترکیبها در موقعیت فضایی مشابهی قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده سازگاری بالای اسکلت مرکزی آن‌ها با ساختار جایگاه فعال است).

برای درک بهتر چگونگی پیوند ترکیبهای طراحی‌شده با جایگاه فعال آنزیم BChE، مطالعه‌های جوشوندگی مولکولی با بلورشناسی ساختاری آنزیم با کد PDB: 6I0B انجام شد (شکل‌های ۵ و ۶). حفره آنزیمی شامل سه اسید آمینه کلیدی در Ser198، leu286 و His438 در جایگاه فعال آنزیم و Trp82 از جایگاه آنیونی کاتالیستی (CAS) و Asp70 و Tyr332 از جایگاه آنیونی محیطی (PAS) نقش مهمی در برهم‌کنش با لیگاندها ایفا می‌کنند. برای بررسی تطابق فضایی لیگاندهای متفاوت در جایگاه فعال آنزیم BChE، همه لیگاندها، به صورت هم‌پوشانی‌شده بررسی شدند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بیشتر ترکیبها در موقعیت فضایی مشابهی درون جایگاه فعال قرار گرفته‌اند که



شکل ۴ نمایش دوبعدی برهم‌کنش‌های ترکیب‌های 6a-g با اسیدآمین‌های جایگاه فعال AChE

ستتر، مطالعه جورشوندگی مولکولی و بررسی ویژگی دارونمایی ...



شکل ۶ نمایش دوبعدی برهم کنش‌های ترکیب‌های 6a-g با اسیدآمین‌های جایگاه فعال BChE

نتیجه گیری

سمت PAS جهت گیری می کنند، مربوط می شود. همچنین، پیوندهای دوقطبی و $\pi-\pi$ و عوامل فضایی به عنوان مهم ترین تعامل های مدل دارویی در جایگاه فعال آنزیم های AChE و BChE هستند. همچنین، بررسی های دارو جنش شناختی با به کارگیری ابزارهای مجازی نشان داد که ترکیب ها ویژگی های دارونمایی، دارو جنش شناختی و قابلیت مناسبی برای توسعه بیشتر با هدف درمان بیماری آلزایمر دارند. این یافته ها می تواند مبنای طراحی مشتق های جدید با انتخاب پذیری بیشتر و قدرت بازدارندگی بالاتر باشد و مسیر توسعه عوامل درمانی نوین برای بیماری آلزایمر را هموار سازد. در ادامه، سنتز و ارزیابی مشتق های بیشتر با تغییرهای هدفمند در گروه های جانبی و مطالعه های درون تنی سودمند به نظر می رسد.

سپاسگزاری

این اثر با شماره پژوهش ۱۴۰۳۰۵۲۳۴۲۶۷ توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی همدان حمایت شد.

در این پژوهش، مشتق های جدید تiazolotriazolopyrimidine دارای گروه بنزیلوکسی فیل سنتز و به عنوان بازدارنده آنزیم های کولین استراز بررسی شدند. بررسی روابط ساختار-فعالیت (SAR) نشان داد که ماهیت، اندازه و جهت گیری جایگزینی در موقعیت R نقش کلیدی در بهینه سازی برهم کنش با جایگاه های فعال آنزیم ها ایفا می کند. در میان ترکیب های مورد مطالعه، ترکیب های حاوی فلوئور شامل 6c و 6f با گروه ۴-فلوئور و ۴-تری فلوئورومتیل و ترکیب 6g با گروه ۴-متیل به ترتیب فعالیت بازدارندگی $2/33 \pm$ ، $28/48 \pm$ ، $0/84 \pm$ و $25/71 \pm$ و $1/74 \pm$ میکرومولار بر علیه AChE از خود نشان دادند، در حالی که ترکیب 6c علیه BChE نیز کارایی مطلوبی داشت ($1/5 \pm$ و $11/70 \pm$ میکرومولار). نتیجه های مطالعه های جوشوندگی مولکولی نتیجه های به دست آمده از آزمون آنزیمی را تایید کرد و نشان داد که اسکلت تiazolotriazolopyrimidine در جایگاه آنیونی کاتالستی (CAS) قرار می گیرد، در حالی که تفاوت فعالیت بازدارندگی بیشتر به اثرات فضایی و الکترونیکی گروه های جانبی که به

مراجع

- [1] Alzheimer's Association Report. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2022;18(4):700-89. doi: [org/10.1002/alz.12638](https://doi.org/10.1002/alz.12638)
- [2] Perron J, Scramstad C, Ko JH. Brain metabolic imaging-based model identifies cognitive stability in prodromal Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2025;15(1):17187. doi: [org/10.1038/s41598-025-02039-2](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02039-2)
- [3] Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *Int Psychogeriatr*. 2002;14:77-91. doi: [org/10.1017/S1041610203008676](https://doi.org/10.1017/S1041610203008676)
- [4] Pourshojaei Y, Abiri A, Eskandari K, Haghighijoo Z, Edraki N, Asadipour A. Phenoxyethyl piperidine/morpholine derivatives as PAS and CAS inhibitors of cholinesterases: Insights for future drug design. *Sci Rep*. 2019;9(1):19855. doi: [org/10.1038/s41598-019-56463-2](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56463-2)
- [5] Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics: A review. *Mol Med Rep*. 2019;20(2):1479-87. doi: [org/10.3892/mmr.2019.10374](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374)
- [6] Moreta MP, Burgos-Alonso N, Torrecilla M, Marco-Contelles J, Bruzos-Cidón C. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors on cognitive function in Alzheimer's disease: Review of reviews. *Biomedicine*. 2021;9(11):1650. doi: [org/10.3390/biomedicine9111689](https://doi.org/10.3390/biomedicine9111689)
- [7] Vecchio I, Sorrentino L, Paoletti A, Marra R, Arbitrio M. The state of the art on acetylcholinesterase inhibitors in the treatment

- of Alzheimer's disease. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 2021;13:11795735211029113. doi: [org/10.1177/11795735211029113](https://doi.org/10.1177/11795735211029113)
- [8] Marucci G, Buccioni M, Dal Ben D, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacol.* 2021;190:108352. doi: [org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352)
- [9] Sobha A, Ganapathy A, Mohan S, Madhusoodanan N, Babysulochana AD, Alaganandan K, et al. Novel small molecule-based acetylcholinesterase (AChE) inhibitors: From biological perspective to recent developments. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* 2024;139:100237. doi: [org/10.1016/j.ejmcr.2024.100237](https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100237)
- [10] Chen Y, Fang L, Peng S, Liao H, Lehmann J, Zhang Y, et al. Discovery of a novel acetylcholinesterase inhibitor by structure-based virtual screening techniques. *Bioorg Med Chem.* 2012;22(9):3181-7. doi: [org/10.1016/j.bmcl.2012.03.046](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.046)
- [11] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2021;397(10284):1577-90. doi: [org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- [12] Mintun MA, Lo AC, Duggan Evans C, Wessels AM, Ardayfio PA, Andersen SW, et al. Donanemab in early Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2021;384(18):1691-704. doi: [org/10.1056/NEJMoa2100708](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2100708)
- [13] Kumar S, Narasimhan B. Therapeutic potential of heterocyclic pyrimidine scaffolds. *Chem. Cent. J.* 2018;12:1-29. doi: [org/10.1186/s13065-018-0406-5](https://doi.org/10.1186/s13065-018-0406-5)
- [14] Abdel-Megid M, El-Mahdy KM, Elkazak AM, Zarif SE, Salem ME. Synthetic approaches and biological evaluation of nitrogen bridgehead thiazolo[3,2-a]pyrimidines. *Results Chem.* 2024;6:101807. doi: [org/10.1016/j.rechem.2024.101807](https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101807)
- [15] Mahgoub MY, Elmaghraby AM, Harb AE, Ferreira da Silva JL, Justino GC, Marques MM. Synthesis, crystal structure, and biological evaluation of fused thiazolo[3,2-a]pyrimidines as new acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules.* 2019;24(12):2306. doi: [org/10.3390/molecules24122306](https://doi.org/10.3390/molecules24122306)
- [16] Jameel E, Meena P, Maqbool M, Kumar J, Ahmed W, Mumtazuddin S, et al. Rational design, synthesis and biological screening of triazine-triazolopyrimidine hybrids as multitarget anti-Alzheimer agents. *Eur J Med Chem.* 2017;136:36-51. doi: [org/10.1016/j.ejmech.2017.04.064](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.064)
- [17] Attarrosan M, Firuzi O, Iraj A, Sharifi S, Tavakkoli M, Vesal M, et al. Imino-2H-chromene based derivatives as potential anti-Alzheimer's agents: design, synthesis, biological evaluation and in silico study. *Chem. Biodiversity.* 2022;19(1):e202100599. doi: [org/10.1002/cbdv.202100599](https://doi.org/10.1002/cbdv.202100599)
- [18] Najafi Z, Mahdavi M, Saeedi M, Karimpour-Razkenari E, Asatouri R, Vafadarnejad F, et al. Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: in vitro, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017;125:1200-12. doi: [org/10.1016/j.ejmech.2016.11.008](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.008)
- [19] Chehardoli G, Karimi F, Akbarzadeh T, Hariri R, Najafi Z. Novel 2-amino-pyrano[3,2-c]quinoline-3-carbonitrile derivatives bearing benzyloxy phenyl moiety as butyrylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, in vitro evaluation, and molecular docking studies. *Avicenna J Pharm Res.* 2022;3(2):82-90. doi: [org/10.34172/ajpr.1068](https://doi.org/10.34172/ajpr.1068)
- [20] Salem MM, Gerges MN, Noser AA. Synthesis, molecular docking, and in-vitro studies of pyrimidine-2-thione derivatives as antineoplastic agents via potential RAS/PI3K/Akt/JNK inhibition in breast carcinoma cells. *Sci Rep.* 2022;12(1):22146. doi: [org/10.1038/s41598-022-26571-7](https://doi.org/10.1038/s41598-022-26571-7)
- [21] Natarajan R, Anthoni Samy HN, Sivaperuman A, Subramani A. Structure-activity relationships of pyrimidine derivatives and their biological activity: A review. *Med Chem.* 2023;19(1):10-30. doi: [org/10.2174/1573406418666220509100356](https://doi.org/10.2174/1573406418666220509100356)
- [22] Abdelhamid AO, Elghandour AH, Hussein AM, Zaki YH. Reactions of hydrazonoyl

- halides 41: Synthesis of 1,2,4-triazoles, 2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazoles, and triazolo[4,3-a]pyrimidines. Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem. 2005;180(9):2097-109. doi: **org/10.1080/104265090917448**
- [23] Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961;7(2):88-95. doi: **org/10.1016/0006-2952(61)90145-9**
- [24] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017;7(1):42717. doi: **org/10.1038/srep42717**
- [25] Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. J Med Chem. 2015;58(9):4066-72. doi: **10.1021/acs.jmedchem.5b00104**
- [26] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 2009;30(16):2785-91. doi: **org/10.1002/jcc.21256**

Synthesis, molecular docking studies, and drug-likeness evaluation of new thiazolotriazolopyrimidine derivatives containing benzyloxy phenyl groups as cholinesterase enzymes inhibitors

M. Azimi¹, Z. Najafi^{2,*}, A. Iraj^{3,*}, A. Solgi⁴, S. Esmaili⁵

1. MSc. Student of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.

2. Associate Prof. of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.

3. Assistant Prof. of Medicinal Chemistry, Stem Cell Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4. Pharmacy Student, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.

5. PhD Student of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Petroleum Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract: The acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are effective targets in managing the symptoms of Alzheimer's disease (AD), one of the most common neurological disorders in the elderly. Their inhibitors increase the acetylcholine levels in brain synapses and provide symptomatic treatment for the disease. Therefore, in this study, a series of new thiazolotriazolopyrimidine derivatives containing benzyloxy phenyl groups were synthesized in a three-component reaction with good yields, and their inhibitory activities were evaluated using the Ellman method against AChE and BChE enzymes. The results showed that compound containing 4-Me exhibited the highest inhibitory activity against AChE ($22.15 \pm 1.74 \mu\text{M}$), while compound containing 4-F had the best inhibitory effect against BChE ($11.70 \pm 1.5 \mu\text{M}$). Structure-activity relationships (SAR) analysis revealed that the nature, size, and position of the R substituent on the benzyl ring play a decisive role in the inhibitory activities. Molecular docking studies revealed a nearly identical binding pattern in both enzymes. They also demonstrated that hydrogen bonding and π - π interactions were the most important pharmacophoric interactions in the active sites of both enzymes. Additionally, the evaluation of pharmacokinetic properties according to Lipinski's rule confirmed the favorable drug-likeness of the compounds. These results indicate the high potential of the synthesized derivatives for the development of cholinesterase inhibitors for the treatment of AD.

Keywords: Synthesis, Thiazolotriazolopyrimidine, Cholinesterase inhibitors, Alzheimer's disease, Molecular docking study, Drug-likeness.