Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 93
proLékaře.cz | 10.5.2026

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Inhibítory gamma-sekretázy v terapii Alzheimerovej choroby

Gamma-secretase inhibitors in Alzheimer's disease therapy

Katarína Špilovská • Jan Korábečný • Kamil Kuča • Kamil Musílek

Došlo 16. februára 2012 / Přijato 28. mája 2012

Súhrn

Amyloidné plaky, ktoré sa nachádzajú v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou (AD) sú zložené prevažne z peptidu so 40 alebo 42 aminokyselinovými zvyškami a sú označované ako beta-amyloidné plaky (A*β*). A*β* peptidy sú výsledkom enzymatického štiepenia beta amyloidného prekurzorového proteínu (APP). V tzv. amyloidogénnej ceste sa tohto štiepenia zúčastňuje enzým *β*-sekretáza, ktorý poskytuje proteínový fragment (C99) a ten je následne metabolizovaný za účasti ďalšieho enzýmu *γ*-sekretázy. Z monomérnych jednotiek vzniknutého A*β* vznikajú v ďalšej fáze oligomérne formy, ktoré sú príčinou smrti neuronálných buniek u pacientov s AD. Predkladaná práca je zameraná na inhibítory *γ*-sekretázy, ktoré tak môžu pozastaviť tvorbu a ukladanie patologických depozít A*β*. Podrobne sú popísané inhibítory *γ*-sekretázy, ktoré dosiahli klinické štúdie, a taktiež sú predstavené ďalšie zaujímavé skupiny týchto zlúčenín.
Kľúčové slová: Alzheimerova choroba • beta amyloid • sekretáza • inhibítor

Summary

Neuritic plaques, which are situated in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients, are composed mainly of peptides containing 40 or 42 amino acid residues known as *β*-amyloid plaques (A*β*). The A*β* peptide is the result of the enzymatic cleavage of the amyloid precursor protein (APP). In the so-called amyloidogenic pathway, the *β*-secretase enzyme releases a protein fragment (C99), which is subsequently metabolized by the enzyme *γ*-secretase. Monomer forms of A*β* are turned into oligomer forms, which are the main cause of cellular neuronal death in AD patients. The following study is focused on *γ*-secretase inhibitors that can slow down the production or accumulation of pathologic A*β* deposits. *γ*-secretase inhibitors that reached different phases of clinical trials are particularly reported as well as other promising groups of these analogues.
Keywords: Alzheimer's disease • beta amyloid • secretase • inhibitor

K. Špilovská • J. Korábečný • K. Kuča
Univerzita obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra toxikologie

doc. Ing. Kamil Kuča, Ph.D. (✉)
Fakultní nemocnice Hradec Králové
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
e-mail: kucakam@pmfhk.cz

K. Musílek
Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie

Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD – Alzheimer's disease) je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované stratou kognitívnych funkcií a je sprevádzané zmenami v správaní. Je to najbežnejší typ demencie u starších ľudí. Pri veku nad 85 rokov trpí štatisticky jeden z dvoch ľudí AD. V roku 2000 malo okolo 5 miliónov ľudí AD na celom svete, napriek tomu väčšiny neboli diagnostikované a liečené. Do roku 2050 by sa mal počet ľudí trpiacich na AD v USA zvýšiť na 13 miliónov[1)].

Demencia je spôsobená degeneráciou neurónov v mozgovej kôre. Neuropatologické zmeny spájané s AD zahrňujú objavenie amyloidných plakov a neurofibrilárnych spletencov. Hlavnou zložkou amyloidných plakov je malý peptid (beta-amyloid; A*β*), ktorý vzniká proteolytickým štiepením z *β*-amyloidného prekurzorového proteínu (*β*-APP) prostredníctvom aspartyl-proteázových enzýmov *β*- a *γ*-sekretázy.

A*β* je vo svojej monomérnej forme zložený zo 40- alebo 42-aminokyselinového peptidu, ktorý spôsobuje atrofiu neurónov pri AD[2, 3)].

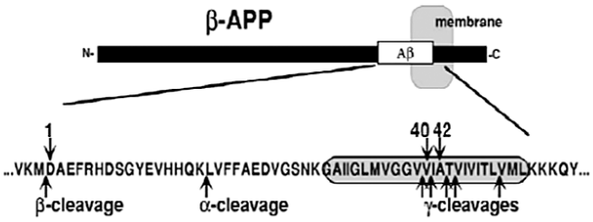
γ-sekretáza sprostredkuje aj vnútromolekulové štiepenie viacerých transmembránových proteínov. Spomedzi známych substrátov *γ*-sekretázy je významný Notch receptor. Proteolýzou je uvoľňovaná intracelulárna časť Notch receptora, známa ako intracelulárna Notch doména (NICD; z angl. Notch Intracellular Domain). NICD sa premiestňuje do jadra a je aktivátorom viacerých signálov pre transdukciu. Zistilo sa, že inhibítory *γ*-sekretázy, ktoré neovplyvňujú Notch, pôsobia v gastrointestinálnych a T bunkách a sú pova-

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 94
proLékaře.cz | 10.5.2026

žované za terapeuticky významné. Za selektívne inhibítory γ-sekretázy považujeme také zlúčeniny, ktoré vykazujú viac ako 15-násobnú selektivitu pre inhibíciu APP voči Notch[4].

Biochemická a genetická charakteristika γ-sekretázy

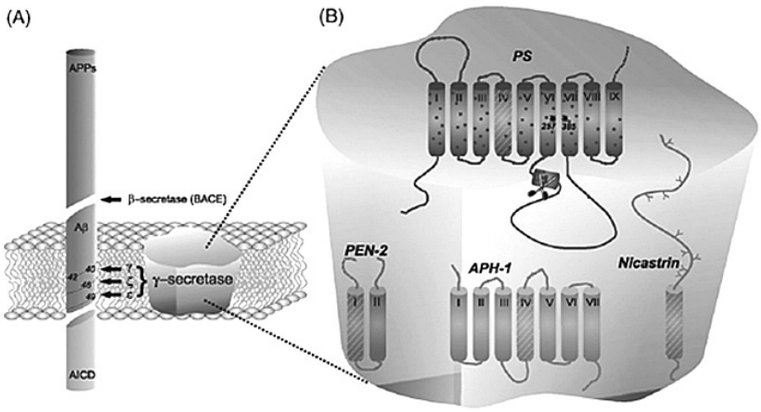
Dva enzýmy sa zúčastňujú uvoľňovania Aβ z β-APP. Sú to proteolytické enzýmy β- a γ-sekretáza. Najprv dochádza ku štiepeniu N-konca β-sekretázou z β-APP za uvoľnenia časti Aβ označovanej ako C99, a potom dochádza ku štiepeniu C-konca γ-sekretázou. β-sekretáza, označovaná aj ako BACE (z angl. β-site cleaving enzyme), bola identifikovaná prostredníctvom biochemických a genetických metód ako aspartyl proteáza (Asp 2), čo je transmembránový proteín typu 1 kódovaný génom BACE1. γ-sekretáza sa zúčastňuje proteolytického štiepenia C-koncov Aβ molekúl v oblasti β-APP (obr. 1).



Obr. 1. β-amyloidný prekurzorový proteín (β-APP)[5]

Na obrázku 1 je znázornený transmembránový proteín typu 1 zložený z 695-770 aminokyselín, ktoré sú kódované génmi na chromozóme 21. Oblasť molekuly vložená do membrány je zobrazená šedou. N-koniec z β-APP je vylučovaný z buniek na základe štiepenia v α- alebo β- mieste. Metaloproteázy ako napríklad ADAM-10 (z angl. A disintegrin and mettaloprotease) alebo TACE (z angl. TNF α-converting enzyme) sa štiepia na α-strane. Metaloproteázy sú proteolytické enzýmy obsahujúce kov. BACE sa zúčastňujú štiepenia na β-strane. Produkty na C-konci, ktoré obsahujú celý alebo časť Aβ peptidu a cytoplazmatický chvost, zostávajú v membráne a sú substrátmi pre γ-sekretázu. Hlavným miestom štiepenia sa zdá byť Val40, no boli objavené aj ďalšie strihy po Ala42, Thr43, Val39 a Leu49. Jedenásť odlišných mutácií nachádzajúcich sa blízko α-, β- a γ- štiepiacich miestach spôsobujú patogenézu[5].

γ-sekretáza je tvorená najmenej štyrmi proteínmi: presenilín (PS), nikastrín, anterior pharynx (Aph-1) a presenilín enhancer (Pen-2) (obr. 2). Presenilíny majú patofyziologický význam, pretože viac ako 150 autozomálnych dominantných mutácií je známych v týchto proteínoch, z ktorých všetky spôsobujú ranné štádium AD. Tieto mutácie majú za následok zvýšenú produkciu $A\beta_{1-42}$. Inhibícia presenilínu pomocou enzymatického komplexu γ-sekretázy sa zdá byť vhodnou stratégiou proti hromadeniu Aβ v mozgu u pacientov s AD[6]. Avšak γ-sekretáza štiepi aj mnohé iné dôležité substráty než len β-APP, z čoho vyplývajú aj možné nežiadúce účinky inhibítorov γ-sekretázy[7].



Obr. 2. Proces štiepenia β-APP (vľavo), γ-sekretázový komplex (vpravo)[8]

Obrázok vľavo predstavuje proces štiepenia β-APP amyloidnou cestou. β-sekretáza (BACE) uvoľňuje rozpustný proteínový fragment APPs (z angl. soluble APP) a následne γ-sekretáza uvoľňuje amyloidné peptidy $A\beta_{40}$ a $A\beta_{42}$. Na obrázku vpravo sú znázornené zložky γ-sekretázového komplexu[8].

Zloženie γ-sekretázového komplexu

Presenilín

Presenilín-1 (PS-1) a presenilín-2 (PS-2) obsahujú katalytickú doménu. Ide o 476- a 448-aminokyselinové proteíny, ktoré pozostávajú z 9 transmembránových domén (TMDs). Tieto domény sú endoproteolyticky štiepené na Aβ molekuly z β-APP, ktoré majú N- a C-konce. Každý z týchto koncov obsahuje aspartátové aktívne miesto. Štiepenie nastáva v cytoplazme medzi TMD6 a TMD7 vnútri krátkej hydrofóbnej domény, ktorá sa nachádza v membráne. Táto endoproteolýza predstavuje autoproteolytický jav[9].

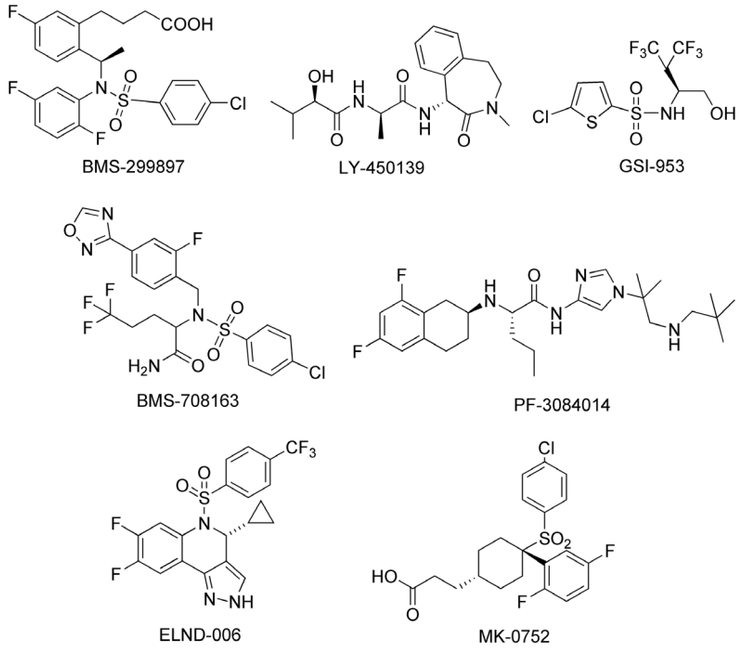
Nikastrín

Nikastrín bol objavený biochemicky afinitnou chromatografiou ako hlavný PS-interagujúci proteín. Je to 709-aminokyselinový glykoproteín typu 1 s veľkou ektodoménou, ktorá môže pôsobiť ako substrátový receptor γ-sekretázy. Existuje hypotéza, že voľný N-koniec substrátu γ-sekretázy sa ako prvý viaže na ektodoménu nikastrínu. Potom interaguje so spojovacím miestom presenilínu a premiestňuje sa do aktívneho miesta PS, kde je štiepený[9].

Aph-1 a Pen-2

Aph-1 proteíny majú 7 TMDs s N- a C-koncami smerom k lumenu a cytozólu. Jeho úloha v aktivite γ-sekretázy nie je celkom jasná, ale je to najstabilnejšia zložka komplexu a mohla by s najväčšou pravdepodobnosťou slúžiť ako počiatok pre zhromaždenie tohto enzýmu.

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 95
proLékaře.cz | 10.5.2026



Obr. 3. Inhibítory γ-sekretázy

U ľudí existujú dva Aph-1 gény, Aph-1a a Aph-1b[10]. Pri génovej duplikácii hlodavcov z Aph-1b bol stanovený tretí gén, a to Aph-1c, ktorý vykazuje 96% podobnosť s Aph-1b na úrovni nukleotidov.

Pen-2 je najmenší membránový proteín γ-sekretázy s dvoma TMDs. Jeho úlohou je stabilizácia PS v γ-sekretázovom komplexe[9].

Inhibítory γ-sekretázy v klinickom vývoji

γ-sekretáza je racionálny cieľ pre liečbu AD, lebo reguluje posledný krok pri vzniku a uvoľňovaní Aβ. Doteraz bolo objavených niekoľko účinných inhibítorov tohto proteolytického komplexu. Štúdiá u transgénnych a netransgénnych zvierat naznačili, že inhibítory γ-sekretázy podané orálne alebo parenterálne sú schopné znižovať mozgovú hladinu Aβ[11].

Šesť zlúčenín (LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006), ktoré sa nachádzajú v rôznych štádiách klinického testovania, je aktívne študovaných na ľuďoch s AD. Je charakterizovaný ich farmakodynamický profil, nielen podľa merania hladiny Aβ v plazme a CSF v čase po podaní, ale aj stanovením účinnosti týchto zlúčenín na Aβ[9].

Historicky prvým inhibítorom γ-sekretázy, ktorý sa dostal do klinického testovania bol BMS-299897. Táto zlúčenina bola pripravená v biofarmaceutickej spoločnosti Bristol-Myers Squibb. Testovanie na ľuďoch začalo v roku 2001, ale klinické údaje neboli nikdy úplne publikované. Kvôli dlhotrvajúcim nedostatkom informácií v klinickom vývoji bolo testovanie ukončené[12].

Najmenej 6 ďalších inhibítorov γ-sekretázy sa dostalo do klinického testovania. Ide o zlúčeniny s označením LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006. Iba pre zlúčeninu LY-450139 boli klinické údaje úplne publikované (obr. 3)[9].

LY-450139 (Semagacestat)

Benzoazepinónový derivát LY-450139 je inhibítor γ-sekretázy vyvinutý v spoločnosti Eli-Lilly. Je trojnásobne selektívny pri inhibícii štiepenia APP s ohľadom na Notch štiepenie (APP: IC_{50} = 15 nM, Notch: EC_{50} = 49 nM). IC_{50} je koncentrácia inhibítora, pri ktorej je inhibovaných 50 % enzýmu. EC_{50} označuje strednú efektívnu koncentráciu potrebnú na dosiahnutie 50% efektu. Ide o najlepšie zdokumentovaný inhibítor γ-sekretázy, ktorý dosiahol klinické testovanie (fáza I, II, III)[13].

Pri testovaní na zvieratách bol u LY-450139 zistený vplyv na hladinu Aβ v mozgu, CSF a plazme. Dobre pozorovaný bol predovšetkým u transgénnych a netransgénnych myší, morčiat a psoch. Liečivo však zlyhalo pri transgénnych myšiach. Bola u nich zistená neurotoxicita. K dispozícii nie sú ani žiadne údaje o behaviorálnych pochodoch u zvierat pri použití LY-450139[14].

LY-450139 efektívne znižuje hladinu Aβ v CSF u zdravých ľudí. Tento inhibítor dosiahol fázu III klinického testovania. Kvôli zhoršeným kognitívnym funkciám a zvyšovaniu výskytu rakoviny kože u ľudí trpiacich AD bolo testovanie prerušené[15].

MK-0752

Spoločnosť Merck vyvinula inhibítor γ-sekretázy nesúci označenie MK-0752, ktorý je neselektívny k APP a Notch. Toto liečivo znižovalo hladinu $A\beta_{1–40}$ v CSF u zdravých dobrovoľníkov. Nevýhodou bolo inhibovanie Notch štiepenia a značná gastrointestinálna toxicita. Tento inhibítor dosiahol fázu I klinického testovania, no testovanie na AD bolo pozastavené[16].

BMS-708163

Benzénový sulfonamid BMS-708163, v ktorom je oxadiazolylbenzylová skupina pripojená k sulfonamidovému dusíku, je účinný inhibítor γ-sekretázy vyvinutý v Bristol-

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 96
proLékaře.cz | 10.5.2026

Myers Squibb. *In vitro* testovania ukázali, že liečivo má 193-násobnú selektivitu k Notch štiepeniu (Aβ_{1-40}: IC_{50} = 0,3 nM a Notch: EC_{50} = 58 nM). Štúdie u potkanov ukázali znižovanie amyloidu Aβ_{1-40} v mozgu a CSF bez Notch-súvisiacej gastrointestinálnej toxicity. Štúdie u psov preukázali znižovanie Aβ_{1-40} hladiny v mozgu a CSF. Po perorálnom podaní došlo k znižovaniu hladín Aβ o 75 % v CSF a 50 % v kortexe v priebehu 24 hodín. U zdravých dobrovoľníkov bolo pozorované znižovanie Aβ hladiny v CSF. V súvislosti s týmto inhibítorom je však nedostatok údajov o ukladaní Aβ plakov v mozku u transgénnych myší, ako aj o ich behaviorálnych pochodoch. Ľudia trpiaci AD vykazovali zlú toleranciu na liečivo obsahujúce túto látku. BMS-708163 dosiahol fázu I-klinického testovania, v súčasnosti prebieha II. fáza[17].

PF-3084014

Nový aminotetralínový derivát PF-3084014 vyvinutý firmou Pfizer je účinný inhibítor γ-sekretázy, bez vplyvu na Notch. *In vitro* je to nekompetitívny, reverzibilný inhibítor γ-sekretázy s IC_{50} = 6,2 nM[18]. V tkanivových kultúrach je hodnota IC_{50} = 1915 nM a javí sa ako slabý inhibítor voči Notch. Výhodou je dobrý prienik cez hematoencefalickú bariéru, dlhotrvajúci efekt na redukcii hladiny Aβ u zvierat a žiadny rebound fenomén pre plazmatický amyloid Aβ. Podobne ako pri BSM-708163 je aj pre tento inhibítor nedostatok údajov o ukladaní Aβ plakov v mozgu u transgénnych myší, ako aj o ich behaviorálnych pochodoch. Testovanie tohto inhibítora na AD bolo tiež prerušené.

GSI-953 (Begacestat)

Tiofénový sulfonamid je účinný inhibítor γ-sekretázy vyvinutý firmou WEYTH. Inhibuje produkciu Aβ a jeho inhibičná koncentračná účinnosť sa prejavuje *in vitro* (IC_{50} = 8 nM) aj *in vivo* (Aβ_{1-42}: IC_{50} = 15 nM)[19]. Bunkové štúdie Notch štiepenia ukázali, že táto zlúčenina je 17-násobne selektívna pre inhibíciu štiepenia APP. (Notch EC_{50} = 208,5 nM). Pri Tg2576 myšiach spôsobili vysoké dávky zníženie Aβ_{1-40} hladiny v mozgu (60% inhibícia), v CSF (90% inhibícia) a v plazme. Nižším dávkovaním sa tieto hladiny zredukovali len v mozgu a plazme. GSI-953 zlepšuje pamäť u transgénnych myší, no neznižuje Aβ_{1-40} hladinu v CSF u ľudí s AD. Toto liečivo je v druhej fáze klinického testovania.

ELND-006

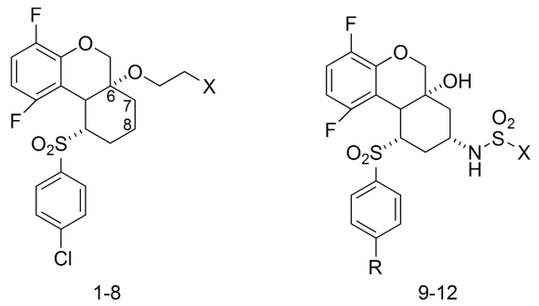
Je to inhibítor γ-sekretázy vyrobený spoločnosťou Elan Pharmaceuticals. U bunkových a enzymatických štúdiách ukazuje ELND-006 selektivitu pre APP, inhibíciu APP a štiepenie Notch s IC_{50} = 0.34 a 5,3 nM[20]. Výhodou tejto látky je to, že je bez Notch vplyvu, má dobrú mozgovú priechodnosť a znižuje hladiny Aβ v mozgu u transgénnych myší. Nevýhodou je rebound fenomén v plazme u zvierat a nedostatok údajov o behaviorálnych pochodoch u AD modeloch zvierat. ELND-006 sa v súčasnosti nachádza v prvej fáze klinického testovania.

Vývoj ďalších potenciálne účinných inhibítorov γ-sekretázy

K ďalším zaujímavým inhibítorom γ-sekretázy patria tricyklické sulfóny[21]. Ich inhibičná aktivita bola skúmaná *in vitro* stanovením agregácie Aβ_{40} a niektoré deriváty boli vybrané pre *in vivo* testy na myšiach[22, 23]. Štruktúry tricyklických sulfónov, ktoré vykazovali najlepšiu aktivitu, sú znázornené na obrázku 4 a ich príslušné hodnoty IC_{50} sú zhrnuté v tabuľke 1.

Pozoruhodné hodnoty IC_{50} vykazovali tricyklické sulfóny, ktoré mali naviazané substituenty v polohe C-6 alebo išlo o kombináciu hydroxy skupiny na uhlíku 6 a sulfonamidovej skupiny na uhlíku 8.

Z derivátov, ktoré mali naviazané substituenty v polohe C-6 boli najúčinnejšie deriváty **1**–**8** s hodnotami IC_{50} v rozmedzí 8–50 nM. Pri porovnaní týchto analógov sa zistilo, že sulfonamidové analógy **4** a **5** boli 5-násobne menej aktívne než ich sulfónové analógy **1**–**3**. Aj aminoskupina má významú úlohu pre aktivitu. Primárny amín **6** mal IC_{50} = 12 nM, no sekundárny amín **7** a terciárny amín **8** boli 3-násobne menej aktívne.



Obr. 4. Tricyklické sulfóny ako inhibítory γ-sekretázy

Tab. 1. Deriváty tricyklických sulfónov a ich inhibičné aktivity[21]

Derivát	X	R	IC50 (nM)
1	SO2Et	H	15
2	SO_2iPr	H	8
3	SO_2Me	H	9
4	SO_2NHMe	H	37
5	SO_2NMe_2	H	50
6	NH_2	H	12
7	NHMe	H	40
8	NMe_2	H	31
9	CF_3	Cl	21
10	C_3H_5	Cl	29
11	CF_3	CF_3	23
12	C_4H_7	Cl	212

Pri použití kombinácie hydroxy skupiny na uhlíku 6 a sulfonamidovej skupiny na uhlíku 8 bola pripravená séria tricyklických sulfónov, z ktorých 3 látky vykazovali hodnoty IC_{50} v nanomolárnej koncentrácii. Ide o deriváty **9** (IC_{50} = 21 nM), **10** (IC_{50} = 29 nM) a **11** (IC_{50} = 23 nM). Zistilo sa, že nahradením cyklopropylsulfonamidu u látky **10** za cyklobutylsulfonamid u látky **12** dôjde k 7-násobnému poklesu inhibičnej aktivity.

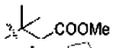
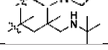
Aj napriek dobrým hodnotám IC_{50} u analógov substituovaných v polohe C-6, tieto neboli testované *in vivo* na

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 97
proLékaře.cz | 10.5.2026

Tab. 2. Hodnoty inhibičných aktivít pri in vitro a in vivo testovaní[21)]

Derivát	IC_{50} (nM) na membráne	IC_{50} (nM) na $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$	$A\beta_{40}$ redukcia v kortexe a plazme (%)
9	21	11, 33	33, 58
10	29	3, 9	71, 77
11	23	80, 51	48, 59

Tab. 4. In vitro a in vivo hodnotenie diamido-amino imidazolov[28)]

Derivát	R^1	IC_{50} (nM)	$A\beta$ redukcia v kortexe a plazme (%)
21		1,2	32
22		0,9	43
23		1,1	50, 60

Tab. 3. Hodnoty IC_{50}, APP/Notch selektivita a metabolická stabilita derivátov 13–20[24)]

Derivát	R	R1	R2	R3	IC_{50} (nM)	APP/Notch selektivita	% látky metabolicky oxidovanej
13	H	H	H	H	2	90	16,46
14		H	H	H	14	276	16,69
15		H	H	H	16	262	33,37
16		H	H	H	29	282	1,0
17		F	H	H	4	147	37,50
18		H	F	H	10	195	55,76
19		H	H	F	22	191	68,92
20		H	H	H	8	216	55,72

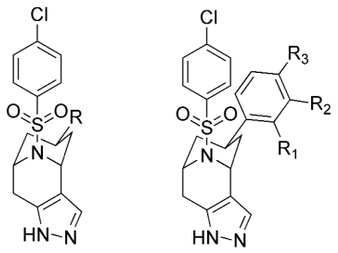
myšiach. Zaujímavá kombinácia hydroxy skupiny na C-6 a sulfonamidovej skupiny na C-8 poskytla deriváty, ktoré boli vybrané pre *in vivo* testovanie. Výsledky sú znázornené v tabuľke 2. Najlepšie výsledky vykazovala molekula **10**, ktorá inhibovala 77 % hladiny $A\beta_{40}$ v plazme a 71% hladiny $A\beta_{40}$ v kortexe 3 hodiny po orálnom aplikovaní myšiam (30 mg/kg) (tab. 2).

Ďalšiu skupinu nových inhibítorov γ-sekretázy predstavujú [3.3.1] bicyklické sulfonamidové pyrazoly[24)]. Na obrázku 5 sú znázornené bicyklické sulfonamidové pyrazoly, ktoré vykazujú vysokú účinnosť, dobrú APP/Notch selektivitu a sú metabolicky stabilné. Hodnoty IC_{50}, APP/Notch selektivita aj metabolická stabilita sú znázornené v tabuľke 3.

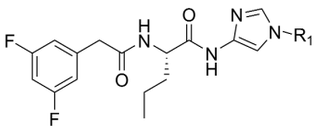
Jedným z derivátov, ktoré vykazujú vysokú *in vitro* účinnosť aj primeranú APP/Notch selektivitu je derivát **13**. V *in vivo* testoch u myší dokázal zredukovať 36 % hladiny $A\beta_{40}$ v kortexe[25)]. Testy *in vivo* s použitím potkaních a ľudských mikrozómov z pečene poukázali na metabolickú stabilitu tohto derivátu[26)].

Zavedenie lipofilnej elektronakceptornej skupiny v para polohe sulfonamidu poskytlo 3 deriváty bicyklických pyrazolov (**14–16**)[27)]. Začlenenie fluóru na uhlík 6 fenylového jadra zohráva dôležitú úlohu pri aktivite resp. stabilite. Deriváty **17** a **18** majú vysoké hodnoty IC_{50} aj dobrú metabolickú stabilitu, no mierny pokles APP/Notch selektivity. Derivát **19** je najlepšou kombináciou účinnosti, oxidačnej stability aj APP/Notch selektivity.

U látky **20**, pri ktorej bol do polohy 6 naviazaný heteroarylový substituent, bola zistená dobrá stabilita, účinnosť aj selektivita. Táto látka spolu s analógom **19** boli testované *in vivo* u myší. Zvieratám sa podávala perorálne dávka 10 mg/kg. Po 3 hodinách sa u látky **19** zistila 21% redukcia $A\beta_{40}$ a u látky **20** 3% redukcia $A\beta_{40}$ v kortexe.



Obr. 5. Bicyklické sulfonamidové pyrazoly



Obr. 6. Diamido-amino imidazoly

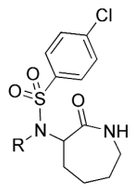
Do série ďalších potenciálne účinných inhibítorov γ-sekretázy patria diamido-amino imidazoly[28)]. DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester), aktívny inhibítor γ-sekretázy, je zaujímavý pre svoju dobrú inhibičnú aktivitu (0,02 µM) a nízku molekulovú hmotnosť[29)]. Na základe farmakokinetických vlastností sa však zistilo, že jeho *terc*-butyl esterová skupina je potenciálne nestabilná. Z tohto dôvodu boli pripravené nové deriváty DAPT, pri kto-

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 98
proLékaře.cz | 10.5.2026

rých sa nahradila esterová skupina inými funkčnými skupinami. Ide o sériu inhibítorov, ktoré obsahujú ß-amín na imidazole (obr. 6).

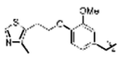
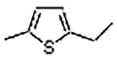
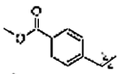
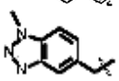
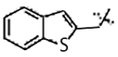
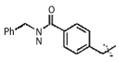
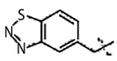
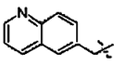
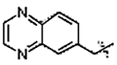
Tieto molekuly boli testované *in vitro* metódou na sledovanie ovplyvnenia hladiny Aβ a aj *in vivo* metódou na morčatách[14, 30]. Zo série pripravených derivátov mali najlepšiu účinnosť deriváty **21**, **22** a **23**. Najlepšie hodnoty sú spájané s tým, že substituenty naviazané na molekule majú rozvetvený reťazec. Pri *in vivo* testovaní na morčatách v priebehu 3 hodín bola u derivátu **21** zaznamenaná 32% redukcia Aβ_{40} a u pyrolidinového derivátu **22** to bola 43% redukcia Aβ_{40} v mozgu. Pri naviazaní sekundárneho amínu mal najlepšiu hodnotu IC_{50} (1,1 nM) analóg **23**. Pri tomto analógu sa zistila 60% redukcia amyloidu v plazme a 50% v kortexe (tab. 4). *In vivo* štúdia naznačili nutnosť ďalšej optimalizácie selektívneho profilu alebo distribučných vlastností na získanie terapeutického indexu.

Analógy amino-kaprolaktámu predstavujú ďalšiu skupinu potenciálne účinných inhibítorov γ-sekretázy[31].



Obr. 7. Amino-kaprolaktámové inhibítory γ-sekretázy

Tab. 5. Hodnoty inhibičnej aktivity a APP/Notch selektivity derivátov 24–32[32]

Derivát	R	IC_{50} (nM)	APP/Notch selektivita	Redukcia Aβ (%)
24		1700	–	–
25		81	–	–
26		3	–	–
27		12	–	–
28		7	6	–
29		9	2	–
30		8	3	32
31		6	0,6	20
32		15	2	26

Tieto molekuly boli odvodené od amino-kaprolaktám-benzénsulfonamidu **24**, ktorý mal priaznivú hodnotu IC_{50} (1,7 μM). Deriváty amino-kaprolaktámu, ktoré vykazovali priaznivé účinnosti, boli pripravené substitúciou benzylového kruhu u sulfonamidu **24** za inú funkčnú skupinu (obr. 7).

Najlepšie účinnosti dosiahli deriváty **25**, **26** a **27**. Kvôli priaznivým hodnotám IC_{50} boli pripravené aj analógy týchto troch derivátov. Substitúcia derivátu **25** poskytla analóg **28**, ktorý ukazoval najlepšiu kombináciu účinnosti a selektivity, ale zaznamenal oxidačnú metabolickú nestabilitu. Benzylamid **29** má najlepšiu účinnosť (IC_{50} = 9 nM) a APP/Notch selektivitu. Tri analógy odvodené z derivátu **27** vykazovali nízku nanomolárnu účinnosť (tab. 5). Išlo o analógy **30**, **31**, **32** a boli poskytnuté na *in vivo* testovanie aj napriek svojej relatívnej APP/Notch selektivite.

V tabuľke 5 sú tiež zobrazené 3 inhibítory γ-sekretázy, ktoré boli testované *in vivo* pre redukciu Aβ_{40} v mozgu u myší. U všetkých troch inhibítoroch bola pozorovaná redukcia hladiny Aβ_{40}.

Táto séria inhibítorov γ-sekretáz dokázala, že okrem toho, že ide o látky, ktoré neovplyvňujú Notch, tak dokážu redukovať Aβ v mozgu[32].

Záver

Aβ je vytváraný proteolytickými pochodmi z transmembránového peptidu APP. Tento peptid môže byť štiepený dvoma proteázami označovanými ako α- a β-sekretázy. Dominantnú úlohu v priebehu AD preberá predovšetkým β-sekretáza. Takéto štiepenie na N-konci vedie k tvorbe rozpustného fragmentu (sAPPβ) a produktu spojeného s membránou, C-koncového fragmentu, ktorý následne podlieha hydrolýze za účasti γ-sekretázy vytvárajúcej Aβ_{40} a Aβ_{42}. Účasť oboch enzýmov je pre patologický priebeh AD špecifická a vedie tak k tvorbe β-amyloidných plakov. Z týchto dôvodov je venované značné úsilie k nájdeniu inhibítorov β- s γ-sekretázy.

γ-sekretáza je nukleoproteínový komplex zložený zo 4 častí, presenilín (PS)-1 a (PS)-2 sa zdajú byť zodpovedné za enzymatické pochody zúčastňujúce sa štiepenia APP. Z predstavených látok dosiahlo 6 klinického testovania (LY-450139, MK-0752, BMS-708163, PF-3084014, GSI-953 a ELND-006) a ďalšie látky ako napr. amino-kaprolaktámové deriváty alebo bicyklické sulfónové pyrazoly sľubujú zaujímavý terapeutický profil. Napriek týmto faktom sa doteraz nepodarilo žiadny z inhibítorov γ-sekretázy zaviesť do klinickej praxe pre boj s AD.

Konflikt záujmu: žiadny.

Literatúra

1. **Alzheimer's Association.** 2011 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimers Dement. 2011; 7, 208–244.
2. **Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K. H.:** A specific amyloid-ß protein assembly in the brain impairs memory. Nature. 2006; 440, 352–357.
3. **Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A.,**

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 99
proLékaře.cz | 10.5.2026

Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., Selkoe, D. J.: Amyloid-ß protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. Nat. Med. 2008; 14, 837–842.

4. **Gordon, W. R., Arnett, K. L., Blacklow, S. C.:** The molecular logic of Notch signaling- a structural and biochemical perspective. J. Cell. Sci. 2008; 121, 3109–3119.
5. **Roberts S. B.:** γ-Secretase inhibitors and Alzheimer's disease. Adv. Drug. Deliver. Rev. 2002; 54, 1579–1588.
6. **Imbimbo, B. P.:** Therapeutic potential of γ-secretase inhibitors and modulators. Curr. Top. Med. Chem. 2008; 8, 54–61.
7. **Lleo, A.:** Activity of γ-secretase on substrates other than APP. Curr. Top. Med. Chem. 2008; 8, 9–16.
8. **Tolia, A., De Strooper, B.:** Structure and function of γ-secretase. Semin. Cell. Dev. Biol. 2009; 20, 211–218.
9. **Imbimbo, B. P., Giarda, G. A. M.:** γ-Secretase Inhibitors and Modulators for the Treatment of Alzheimer's Disease: Disappointments and Hopes. Curr. Top. Med. Chem. 2011; 11, 1555–1570.
10. **Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horre, K., Van Houtvin, T., Esselmann, H., Paul, S., Schafer, M. K., Berezovska, O., Hyman, B. T., Sprangers, B., Sciot, R., Moons, L., Jucker, M., Yang, Z., May, P. C., Karran, E., Wiltfang, J., D'hooge, R., De Strooper, B.:** γ-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. Science. 2009; 324, 639–642.
11. **Guardia-laquarta, C., Pera, M., Lleo, A.:** Gamma-secretase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. Curr. Drug. Targets. 2010; 11, 506–517.
12. **Zheng, M., Wang, J., Lubinski, J., Flint, O. P., Krishna, R., Yao, M., Pursley, J. M., Thakur, A., Boulton, D. W., Santone, K. S., Barten, D. M., Anderson, J. J., Felsenstein, K. M., Hansel, S. B.:** Studies on the pharmacokinetics and metabolism of a gamma-secretase inhibitor BMS-299897, and exploratory investigation of CYP entyme induction. Xenobiotica. 2009; 39, 544–555.
13. **Henley, D. B., May, P. C., Dean, R. A., Siemers, E. R.:** Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. Expert Opin Pharmaco. 2009; 10, 1657–1664.
14. **Lanz, T. A., Karmilowicz, M. J., Wood, K. M., Pozdnyakov, N., Du, P., Piotrowski, M. A., Brown, T. M., Nolan, C. E., Richter, K. E., Finley, J. E., Fei, Q., Ebbinghaus, C. F., Chen, Y. L., Spracklin, D. K., Tate, B., Geoghegan, K. F., Lau, L. F., Auperin, D. D., Schachter, J. B.:** Concentration-dependent modulation of Aß *in vivo* and *in vitro* using the γ-secretase inhibitor, LY-450139. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006; 319, 924–933.
15. **Imbimbo, B. P., Peretto, I.:** Semagacestat, a gamma-secretase inhibitor for the potential treatment of Alzheimer's disease. Curr. Opin. Investig. D. 2009; 10, 721–730.
16. **Bai, F., Tagen, M., Colotta, C., Miller, L., Fouladi, M., Stewart, C. F.:** Determination of the γ-secretase inhibitor MK-0752 in human plasma by online extraction and electrospray tandem mass spectrometry (HTLC-ESI-MS/MS). J. Chromatogr. B. 2010; 878, 2348–2352.
17. **Gillman, K. W., Starrett, J. E., Parker, M. F., Xie, K., Bronson, J. J., Marcin, L. R., McElhone, K. E., Bergstrom, C. P., Mate, R. A., Williams, R., Meredith Jr., J. E., Burton, C. R., Barten, D. M., Toyn, J. H., Roberts, S. B., Lents, K. A., Houston, J. G., Zaczek, R., Albright, C. F., Decicco, C. P., Macor, J. E., Olson, R. E.:** Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable γ-secretase inhibitor. Med. Chem. Lett. 2010; 1, 120–124.
18. **Lanz, T. A., Wood, K. M., Richter, K. E., Nolan, C. E., Becker, S. L., Pozdnyakov, N., Martin, B. A., Du, P., Oborski, C. E., Wood, D. E., Brown, T. M., Finley, J. E., Sokolowski, S. A., Hicks, C. D., Coffman, K. J., Geoghegan, K. F., Brodney, M. A., Liston, D., Tate, B.:** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the γ-secretase inhibitor PF-3084014. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010; 334, 269–277.
19. **Martone, R. L., Zhou, H., Atchison, K., Comery, T., Xu, J. Z., Huang, X., Gong, X., Jin, M., Kreft, A., Harrison, B., Mayer, S. C., Aschmies, S., Gonzales, C., Zaleska, M. M., Riddell, D. R., Wagner, E., Lu, P., Sun, S. C., Sonnenberg-Reines, J., Oganesian, A., Adkins, K., Leach, M. W., Clarke, D. W., Huryn, d., Abou-Gharbia, M., Magolda, R., Bard, J., Frick, G., Raje, S., Forlow, S. B., Balliet, C., Burczynski, M. E., Reinhart, P. H., Wan, H. I., Pangalos, M. N., Jacobsen, J. S.:** Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein γ-secretase for the treatment of Alzheimer's disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009; 331, 598–608.
20. **Quinn, K., Gullapalli, R. P., Merisko-Liversidge, E., Goldbach, E., Wong, A., Liversidge, G. G., Hoffman, W., Sauer, J. M., Bullock, J., Tonn, G.:** A formulation strategy for gamma secretase inhibitor ELND006, a BCS class II compound: Development of a nanosuspension formulation with improved oral bioavailability and reduced food effects in dogs. J. Pharmacol. Sci. 2012; 101, 1462–1474.
21. **Su, J., Tang, H., McKittrick, B. A., Xu, R., Clader, J. W., Greenlee, W. J., Hyde, L., Zhang, L.:** Synthesis and SAR study of tricyclic sulfones as γ-secretase inhibitors: C-6 and C-8 positions. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21, 3447–3451.
22. **Zhang, L., Song, L., Terracina, G., Liu, Y., Pramanik, B., Parker, E.:** Biochemical characterization of the gamma-secretase activity that produces beta-amyloid peptides. Biochemistry. 2001; 40, 5049–5055.
23. **Hyde, L. A., McHugh, N. A., Chen, J., Zhang, Q., Manfra, D., Nomeir, A. A., Josien, H., Bara, T., Clader, J. W., Zhang, L., Parker, E. M., Higgins, G. A.:** Studies to investigate the in vivo therapeutic window of the gamma-secretase inhibitor N2-[(2S)-2-(3,5-difluorophenyl)-2-hydroxyethanoyl]-N1-[(7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-yl]-L-alaninamide (LY411,575) in the CRND8 mouse. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006; 319, 1133–1143.
24. **Aubele, D. L., Truong, A. P., Dressen, D. B., Probst, G. D., Bowers, S., Mattson, M. N., Semko, Ch. M., Sun, M., Garofalo, A. W., Konradi, A. W., Sham, H. L., Zmolek, W., Wong, K., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J.-M., Brigham, E. F., Wallace, W., Nguyen, L., Bova, M. P., Hemphill, S. S., Basi, G.:** Design, synthesis and structure-activity relationship of novel [3.3.1] bicyclic sulfonamide-pyrazoles as potent γ-secretase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21, 5791–5794.
25. **Zhao, B., Yu, M., Neitzel, M., Marugg, J., Jagodzinski, J., Lee, M., Hu, K., Schenk, D., Yednock, T., Basi, G.:** Identification of gamma-secretase inhibitor potency determinants on presenilin. J. Biol. Chem. 2008; 283, 2927–2938.
26. **Truong, A. P., Aubele, D. L., Probst, G. D., Neitzel, M. L., Semko, C. M., Bowers, S., Dressen, D., Hom, R. K., Konradi, A. W., Sham, H. L., Garofalo, A. W., Keim, P. S., Wu, J., Dappen, M. S., Wong, K., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J. –M., Brigham, E. F., Wallace, W., Nguyen, L., Hemphill, S. S., Bova, M. P., Basi, G.:** Design, synthesis, and structure-activity relationship of novel orally efficacious pyrazole/sulfonamide based dihydroquinoline gamma-secretase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009; 19, 4920–4923.
27. **Ye, X. M., Konradi, A. W., Smith, J., Aubele, D. L., Garofalo, A. W., Marugg, J., Neitzel, M. L., Semko, C. M., Sham, H. L., Sun, M., Truong, A. P., Wu, J., Zhang, H., Goldbach, E., Sauer, J.-M., Brigham, E. F., Bova, M., Basi, G. S.:** Discovery of a novel sulfonamide-pyrazolopiperidine series as potent and efficacious gamma-secretase inhibitors (Part II). Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010; 20, 3502–3506.
28. **Brodney, M. A., Auperin, D. D., Becker, S. L., Bronk, B. S., Brown, T. M., Coffman, K. J., Finley, J. E., Hicks, C. D., Karmilowicz, M. J., Lanz, T. A., Liston, D., Liu, X., Martin, B. –A., Nelson, R. B., Nolan, Ch. E., Oborski, Ch. E., Parker, Ch. P., Richter, K. E. G., Pozdnyakov, N., Sahagan, B. G., Schachter, J. B., Sokolowski, Sh. A., Tate, B., Van Deusen, J. W., Wood, D. E., Wood, K. M.:** Diamide amino-imidazoles: A novel series of γ-secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21, 2631–2636.
29. **May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-Mcginty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., Ni, B., Nissen, J. S., Porter, W. J., Potts, B. D., Reel, J. K., Stephenson, D., Su, Y., Shipley, L. A., Whitesitt, C. A., Yin, T., Audia, J. E.:** Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. J. Neurochem. 2001; 76, 173–181.
30. **Lanz, T. A., Salatto, C. T., Semproni, A. R., Marconi, M., Brown, T. M., Richter, K. E., Schmidt, K., Nelson, F. R., Schachter, J. B.:** Peripheral elevation og IGF-1 fails to alter Abeta clearance in multiple in vivo models. Biochem. Pharmacol. 2008; 75, 1093–1103.

Farmacie 3-012 nova 25.6.2012 9:29 Str. 100
proLékaře.cz | 10.5.2026

31. **Thompson, L. A., Liauw, A. Y., Ramanjulu, M. M., Kasireddy-Polam, P., Mercer, S. E., Maduskuie, T. P., Glicksman, M., Roach, A. H., Meredith, J. E., Liu, R. –Q., Combs, A. P., Higaki, J. N., Cordell, B., Seiffert, D., Zaczek, R. C., Robertson, D. W., Olson, R. E.:** Synthesis and evaluation of succinoyl-caprolactam gamma-secretase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 2357–2363.

32. **Neitzel, M. L., Aubele, D. L, Marugg, J. L., Jagodzinski, J. J., Konradi, A. W., Pleiss, M. A., Szoke, B., Zmolek, W., Goldbach, E., Quinn, K. P., Sauer, J. –M., Brigham E. F., Wallace, W., Bova, M. P., Hemphill, S., Basi, G.:** Aminocaprolactam γ-secretase inhibitors showing potential for the treatment of Alzheimer's disease. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011; 21, 3715–3720.

Z ČINNOSTI FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

● Pod ochranou sv. Dymphny – LIV. sympozium z historie farmacie a veterinární medicíny

Jarní setkání historiků farmacie, zvěrolékařství a medicíny, konané 4. dubna 2012 v sále divadla Za plotem v areálu Psychiatrické léčebny Bohnice v Praze 8 bylo věnováno oslavě životních jubileí osobností české farmaceutické historiografie – RNDr. Zdeňka Hanzlíčka a RNDr. Pavla Drábka. Na organizaci se podílely Sekce dějin farmacieČeské farmaceutické společnosti (ČFS) a Společnosti pro dějiny věd a techniky, České farmaceutické muzeum, Česká lékárnická komora, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno a Psychiatrická léčebna Bohnice.

Po zahájení sympozia a zdravicích ředitele Psychiatrické léčebny Bohnice M. Hollého, místopředsedy výboru ČFS P. Grodzy a viceprezidenta České lékárnické komory S. Havlíčka zazněla laudatia obou oslavenců (P. Drábek a M. Lisá). Poděkování za Státní ústav pro kontrolu léčiv se ujala O. Hanzlíčková. První část programu uzavřel milým příspěvkem a blahopřáním J. Solich. Odbornou část programu otevřela H. Richtarová, která se věnovala životu svaté Dymphny, patronky (nejen) duševně nemocných. L. Nováček vystoupil s přednáškou Farmacie v Praze a Brně, J. Květina přítomné seznámil s publikací Farmakologické curriculum na území Čech, Moravy a Slezska. Příspěvek E. Baranyiové Zvířata a Freudovo kanapíčko byl zaměřen na behaviorální poruchy zvířat a vývoj jejich léčby. Vliv pravděpodobného psychického onemocnění na tvorbu sochaře F. X. Messerchmidta ve své práci analyzoval M. Maršálek. Osobě sv. Dymphny a dějinám psychiatrické péče se věnoval také J. Pomykacz. Přednáškové odpoledne uzavřel K. Černý příspěvkem Farmakoterapie v evropské lékařské literatuře o moru v období 1480–1730.

Program završila exkurze areálem a některými odděleními Psychiatrické léčebny Bohnice pod vedením Mgr. Jana Pomykacze, kterému také za organizaci sympozia patří zvláštní poděkování. Příští, 55. sympozium, se uskuteční 21. listopadu 2012 v prostorách VFU Brno.

Jan Babica