

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

DERIVÁTY AMARYLLIDACEAE ALKALOIDU HAEMANTHAMINU JAKO
POTENCIÁLNÍ LÉČIVA

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, květen 2019

Ludmila Homolková

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS
POTENTIAL DRUGS

Supervisor: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May 2019

Ludmila Homolková

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné rady, poskytnuté materiály, interpretaci MS spekter a vstřícný přístup při zpracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Elišce Kohelové za odbornou pomoc při praktickém zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za měření biologických aktivit, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. z Katedry organické a bioorganické chemie za změření a interpretaci NMR spekter a RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. z Lékařské fakulty v Hradci Králové za změření protinádorové aktivity. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za pomoc a ochotu při řešení diplomové práce a za příjemné pracovní prostředí.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Tato práce byla zpracována za podpory projektu SVV 260 412.



V Hradci Králové, květen 2019

Ludmila Homolková

OBSAH

1.	Úvod	7
2.	Cíl práce	9
3.	Teoretická část	10
3.1	Charakteristika čeledi Amaryllidaceae	10
3.2	Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů	10
3.2.1	Haemanthaminový a krininový typ	14
3.3	Obecná fakta o haemanthaminu	16
3.3.1	Výskyt haemanthaminu.....	16
3.3.2	Vlastnosti haemanthaminu	16
3.3.3	Chemické vlastnosti haemanthaminu	17
3.3.4	Biologická aktivita haemanthaminu.....	17
3.3.4.1	Protinádorová aktivita haemanthaminu.....	17
3.3.4.2	Inhibiční aktivita proti AChE a BuChE.....	20
3.3.4.3	Inhibice GSK-3 β	20
3.3.4.4	Inhibice POP	21
3.3.4.5	Antiprotozoální aktivita haemanthaminu.....	22
3.3.5	Další biologická aktivita haemanthaminu	24
3.3.5.1	Antimikrobiální aktivita.....	24
3.3.5.2	Antivirová aktivita	24
3.4	Biologická aktivita derivátů haemanthaminu.....	25
3.4.1	Inhibiční aktivita derivátů haemanthaminu proti AChE a BuChE.....	26
3.4.2	Protinádorová aktivita derivátů haemanthaminu	28
3.4.3	Antimalarická aktivita derivátů haemanthaminu	31
4.	Experimentální část.....	35
4.1	Chemikálie, materiály a metody.....	35
4.1.1	Izolace haemanthaminu	35
4.1.2	Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla	35
4.1.3	Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii	36
4.1.4	Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii.....	36
4.1.5	Strukturní analýza připravených derivátů.....	36
4.1.5.1	GC-MS analýza	36
4.1.5.2	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza).....	36
4.1.5.3	NMR analýza	37

4.1.5.4	Optická otáčivost	37
4.1.6	Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin.....	37
4.1.6.1	Stanovení inhibiční aktivity derivátů proti AChE a BuChE	37
4.1.6.2	Stanovení protinádorové aktivity připravených derivátů.....	38
4.2	Přípravy syntetických derivátů haemanthaminu a jejich strukturní identifikace	38
4.2.1	Příprava 11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-74).....	38
4.2.2	Příprava 11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu (LC-91)	40
4.2.3	Příprava 11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-97)	41
4.2.4	Příprava 11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-102)	43
4.2.5	Příprava 11- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)haemanthaminu (LC-90, HN-278).....	45
4.2.6	Příprava 11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-107)	46
4.2.7	Příprava 11- <i>O</i> -(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-109)	48
4.2.8	Příprava 11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-120).....	48
4.2.9	Příprava 11- <i>O</i> -(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-122)	50
4.2.10	Příprava 11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-123)	52
4.2.11	Příprava 11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-124)	53
4.2.12	Příprava 11- <i>O</i> -(benzoyl)haemanthaminu (LC-118).....	55
5.	Výsledky.....	57
5.1	Příprava polosyntetických derivátů	57
5.2	Screening biologických aktivit	58
5.2.1	Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE a jejich přestup přes BBB	58
5.2.2	Protinádorová aktivita derivátů	59
5.3	Optická otáčivost	60
6.	Diskuse a závěr	61
7.	Seznam použitých zkratk	64
8.	Literatura.....	65
	Abstrakt	70
	Abstract	71

1. Úvod

Rostliny byly již v antice pro své účinky využívány v tradičním léčení a medicíně. Přírodní produkty hrají velmi významnou roli při hledání a vývoji nových léků pro léčbu celé řady onemocnění¹. V dnešní době díky technologiím dokážeme účinnost rostlin odhalit, získat obsahové látky nebo je synteticky připravit. V moderní medicíně rostliny představují důležitý zdroj nových látek s vysokým potenciálem pro léčbu různých onemocnění.

Rozsáhlou skupinu látek představují sekundární metabolity rostlin, které se nazývají alkaloidy. Ty se vyskytují především ve vyšších rostlinách, i když byly prokázány také v kapradňorostech – plavuních (např. *Lycopodium* spp.), přesličkách (*Equisetum* spp.) a houbách (*Claviceps purpurea*). U živočichů jsou alkaloidy vzácné a mohou to být strukturální modifikace látek přijímaných rostlinnou potravou, anebo je živočišný organismus syntetizuje z jednoduchých prekursorů. Dosud byly nalezeny alkaloidy ve více než 4 000 rostlinných druhů, odhaduje se, že asi 10 až 20% všech rostlin obsahuje alkaloidy².

Velké množství farmaceuticky zajímavých alkaloidů pochází z čeledi Amaryllidaceae, tzv. amarylkovité alkaloidy. Ty jsou především známy díky galanthaminu, alkaloidu, který byl v roce 2001 zaveden do klinické praxe v terapii Alzheimerovy choroby (AD)³. AD byla poprvé popsána německým lékařem Aloisem Alzheimerem v roce 1907 a je nejčastějším podtypem demence a neurodegenerativních onemocnění charakterizovaných smrtí nervových buněk v mozkové kůře. Toto onemocnění v roce 2000 postihovalo 25 milionů lidí po celém světě a očekává se, že v roce 2050 se zvýší až na 114 milionů⁴.

AD je onemocnění, jehož klinickým projevem je postupný úpadek kognitivních funkcí, který vede až k naprostému rozkladu osobnosti a neschopnosti se o sebe postarat. V současnosti neexistuje kauzální terapie, a je tak možno pouze zpomalit progresi choroby symptomatickou léčbou⁵.

Galanthamin je reversibilní inhibitor acetylcholinesterázy, který inhibuje degradaci neurotransmiteru acetylcholinu⁶.

Z dalších významných zástupců Amaryllidaceae alkaloidů lze uvést například lykorin. Jeho výhodou je značná rozmanitost ve spektru biologických aktivit a v dnešní době je intenzivně zkoumáno zejména jeho protinádorové působení⁷.

Z těchto důvodů je amarylkovitým alkaloidům věnována značná pozornost jako látkám potenciálně využitelným v terapii různých onkologických onemocnění. V současné

době jsou alkaloidy intenzivně zkoumány na mnoha vědeckých pracovištích. Katedra farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové se zabývá výzkumem a hledáním potenciálně využitelných přírodních sloučenin v léčbě AD a zaměřuje se i na protinádorové působení.

Předmětem této diplomové práce bylo připravit další polosyntetické deriváty β -krininového alkaloidu haemanthaminu, který byl izolován z čerstvých cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Tato práce navazuje na předchozí diplomové práce a zejména na disertační práci Mgr. Daniely Hulcové⁸.

2. Cíl práce

Na Katedře farmaceutické botaniky se dlouhodobě pracuje na problematice amarylkovitých alkaloidů. V posledních letech byly započaty i polosyntetické úpravy vybraných alkaloidů a byla zjištěna příznivá aktivita haemanthaminu a jeho různých derivátů v protinádorové, antimalarické léčbě a zejména v léčbě Alzheimerovy choroby. Tohoto tématu se týká předložená diplomová práce.

Hlavními cíli diplomové práce byly:

- 1) Rešerše literatury na téma biologická aktivita haemanthaminu a přípravy jeho derivátů.
- 2) Příprava druhé série aromatických esterů β -krininového alkaloidu haemanthaminu.
- 3) Příprava derivátů pro screening biologických aktivit.
- 4) Vyhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce.

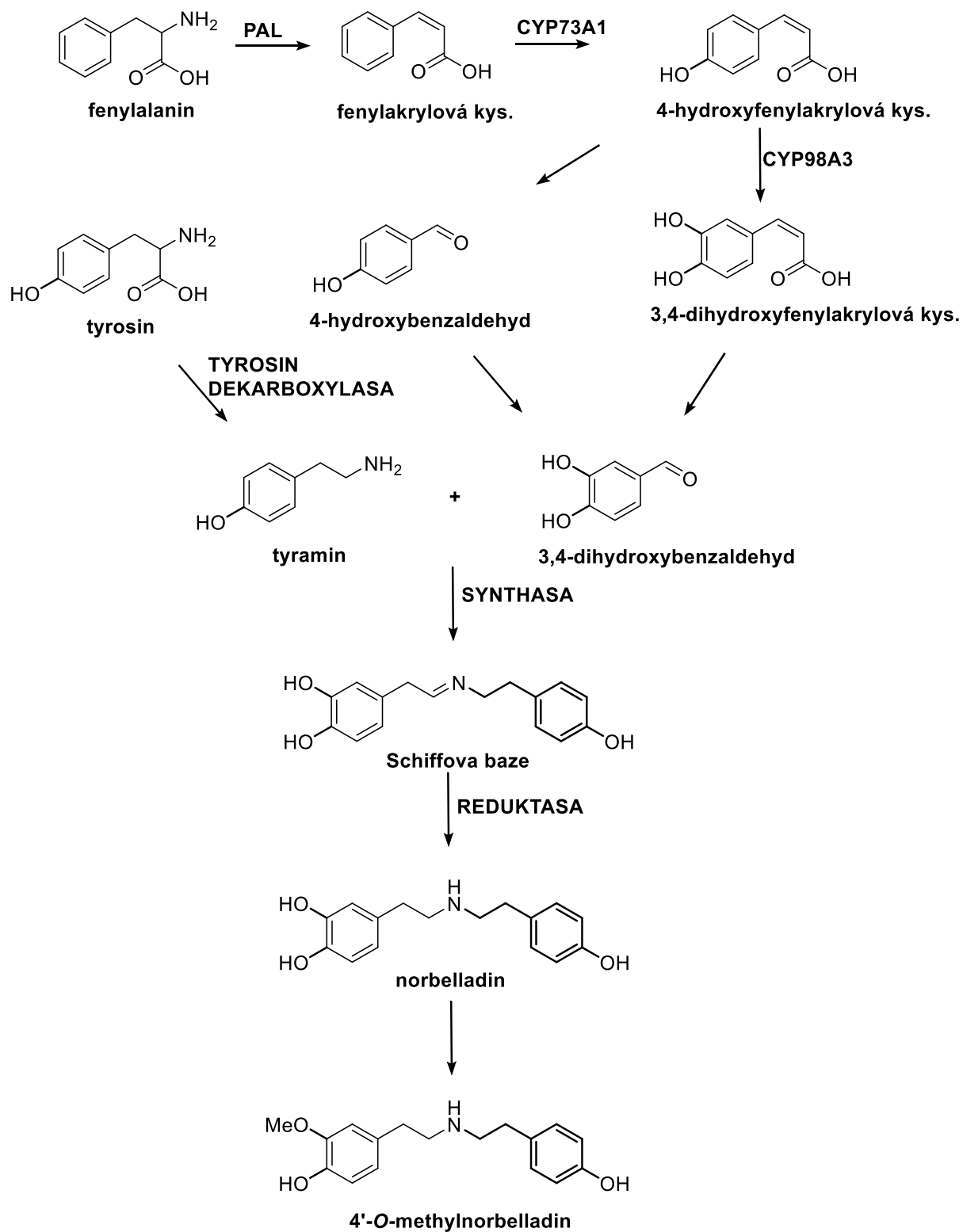
3. Teoretická část

3.1 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Amaryllidaceae je čeleď cibulovitých kvetoucích rostlin pojmenovaná podle rodu *Amaryllis*⁹. Jedná se o vytrvalé rostliny s podzemními cibulemi, oddenky nebo cibulovitými hlízkami. Plodem bývá tobolka nebo bobule¹⁰. Rostlin z čeledi Amaryllidaceae je popsáno přes 85 rodů, které se dělí do 1 000 druhů. Výskyt je typický v tropických a subtropických oblastech po celém světě. Dlouhodobě mají také značné zastoupení v tradiční medicíně a do jisté míry i v západní medicíně¹¹. Některé zdroje uvádějí, že rostliny patřící do Amaryllidaceae byly tradičně používány v Číně pro léčbu hadím kousnutím nebo při léčení akutní laryngeální infekce, revmatoidní artritidy, paralýzy a svalového onemocnění u dětí s paralytickými následky¹². Čeleď zahrnuje řadu rodů např: *Leucojum* L. (bledule), *Galanthus* L. (sněženka), *Narcissus* L. (narcis), *Crinum* L. (křín), *Amaryllis* L. (amarylka), *Clivia* Lindl. (klívie / řemenatka) a další. Rostliny těchto rodů jsou obecně známé trvalky, rostou volně v přírodě střední a jižní Evropy nebo se pěstují pro okrasu¹³.

3.2 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů

Specifickou biosyntetickou cestou amarylkovitých alkaloidů je tzv. norbelladinová cesta (**Obrázek 1**), která vychází z L-fenylalaninu a L-tyrosinu. L-tyrosin se mění na tyramin a L-fenylalanin na 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Z tyraminu a 3,4-hydroxybenzaldehydu po několika reakčních stupních vzniká 4'-*O*-methylnorbelladin¹⁴. Dochází ke spojení aminu a aldehydu, což vede ke vzniku Schiffovy baze. Existence Schiffových bazí v přírodě, stejně jako jejich snadná konverze na různé systémy Amaryllidaceae alkaloidů dokazuje, že počáteční domněnky o této biosyntetické dráze byly správné¹⁵.



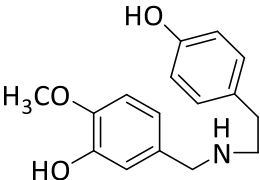
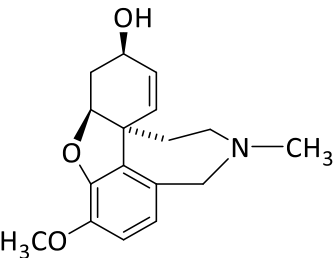
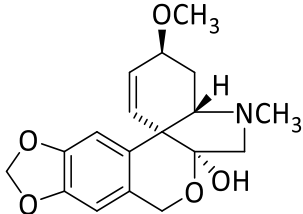
Obrázek 1: Schematické zobrazení norbelladinové cesty¹⁶

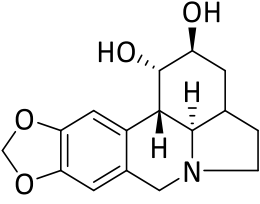
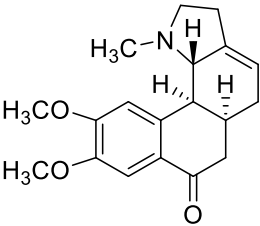
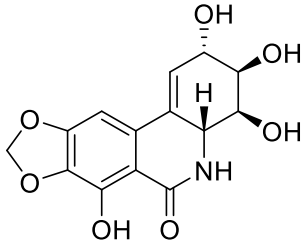
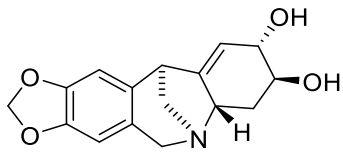
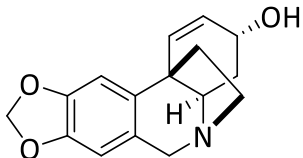
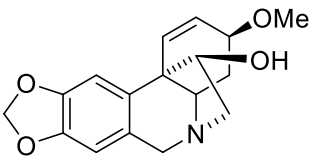
Důležitým prekurzorem je norbelladin, který představuje výchozí strukturu pro vznik ostatních typů alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Podle způsobu intramolekulárního oxidativního spojení vzniká několik základních strukturních typů, které jsou pojmenovány dle svého hlavního reprezentanta¹⁴.

Podle oxidativního spojení rozlišujeme 3 typy cyklizace:

- ortho-para (lykorinový a homolykorinový typ)
- para-para (haemanthaminový, krininový, pankratistatinový a tazettinový)
- para-ortho (galanthaminový typ)¹⁷

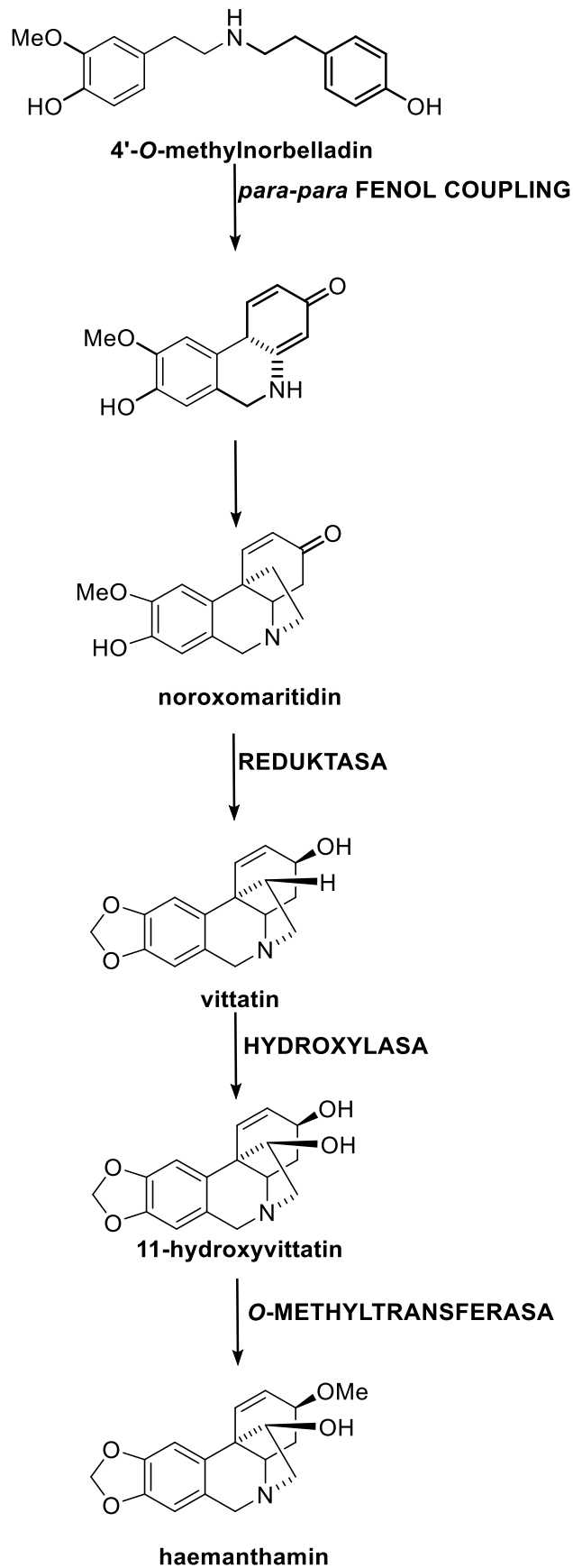
Tabulka 1: Přehled základních strukturních typů alkaloidů čeledi AA a jejich nejčastější významná aktivita

	Strukturní typ	Nejčastější zástupce	Biologická a farmakologická aktivita ¹⁵
I.	norbelladinový	norbelladin 	<ul style="list-style-type: none"> • protizánětlivý¹⁸ • inhibice COX
II.	galanthaminový	galanthamin 	<ul style="list-style-type: none"> • silné analgetikum • kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy • antikonvulzivní • cytotoxický proti antitumorálním LMTK buňkám • hypotenzní
III.	tazettinový	tazettin 	<ul style="list-style-type: none"> • aktivní proti buněčné linii Co12 • slabá hypotenze • slabá cytotoxika proti fibroblastickým LMTK buněčným liniím
IV.	lykorinový	lykorin	<ul style="list-style-type: none"> • specifický inhibitor biosyntézy kyseliny askorbové

			<ul style="list-style-type: none"> • respirační stimulant • inhibitor růstu buněk HeLa • zvyšuje kontraktilitu a rychlost izolovaného perfundovaného srdce
V.	homolykorinový	homolykorin 	<ul style="list-style-type: none"> • cytotoxický proti fibroblastickým LMTK buňkám • induktor opožděné přecitlivělosti u zvířat
VI.	narciklasinový	narciklasin 	<ul style="list-style-type: none"> • antimitotický • silné antibiotikum • inhibitor růstu buněk HeLa • inhibitor růstu nádorových buněk Ehrlich
VII.	montaninový	montanin 	<ul style="list-style-type: none"> • antikonvulzivní¹⁹ • antidepresivní • anxiolytický
VIII.	krininový	krinin 	<ul style="list-style-type: none"> • inhibice AChE²⁰
IX.	haemanthaminový	haemanthamin 	<ul style="list-style-type: none"> • hypertenzní • cytotoxický proti fibroblastickým LMTK buňkám • inhibitor růstu buněk HeLa

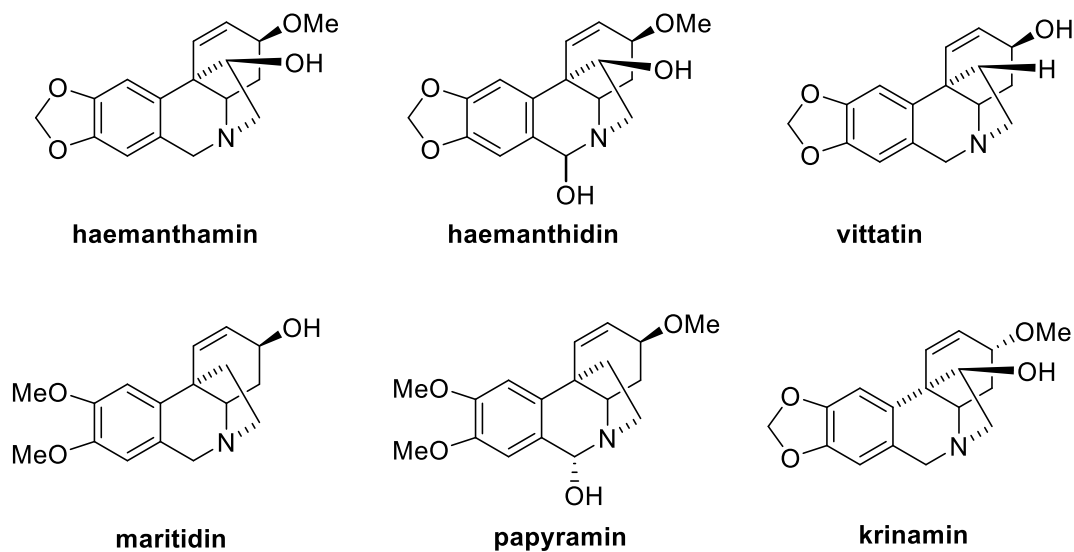
3.2.1 Haemanthaminový a krininový typ

Tento typ alkaloidů je strukturně odvozen od 5,10b-ethanophenanthridinu²¹. V literatuře se někdy slučují do jedné skupiny, kde je haemanthaminový typ označován jako β -krininový a krininový jako α -krininový. Často bývá také souhrnný název jako krinanový typ. V případě krinanových alkaloidů se propojuje ethylový můstek, což vede k vzniku dvou stereometricky definovaných podskupin; -krinanový β a α . Nejnovější statistické údaje ukazují, že přibližně 60 zástupců alkaloidů krinanů bylo podrobeno screeningu cytotoxicity proti stejnému počtu nádorových buněčných linií. Krinamin, haemanthamin a haemanthidin jsou nejčastějšími, zatímco ambellin a buphanisin jsou méně časté ze série β . Haemanthamin byl identifikován jako nejaktivnější alkaloid krinanového typu v lidských rakoviných buňkách s hodnotou $ED_{50} = 0,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ proti fibrosarkomovým buňkám HT1080²².



Obrázek 2: Primární biosyntetická cesta haemanthaminu¹⁶

Hlavní zástupci jsou haemanthamin, haemanthidin, krinamin, papyramin, maritidin a vittatin^{23, 24}.



Obrázek 3: Strukturní vzorce vybraných zástupců haemanthaminového typu

3.3 Obecná fakta o haemanthaminu

3.3.1 Výskyt haemanthaminu

Alkaloid haemanthamin se vyskytuje v několika rodech *Haemanthus*, *Crinum*, *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Zephyranthes* a *Narcissus*²⁵. Příklady rostlinných druhů z rodu *Narcissus*, ze kterých byl tento alkaloid izolován, jsou: *Narcissus* cv. Bridal Crown, *Narcissus asturiensis*, *Narcissus* cv. Sealing, *Narcissus bujei*, *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol a *Narcissus pseudonarcissus* sv. Dutch Master a další^{24, 26}.

Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, avšak nejvyšší množství je obsaženo v cibuli¹⁴.

3.3.2 Vlastnosti haemanthaminu

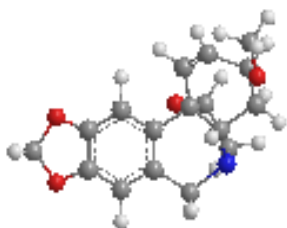
Silné protirakovinné vlastnosti *Narcissus poeticus* L. byly již známy antickému lékaři Hippokratu z Kosu (cca 460-370 před Kristem), který doporučoval pesar připravený z narcisového oleje pro léčbu nádorů v oblasti dělohy²⁷.

Alkaloidy izolované z rostlin Amaryllidaceae mají potenciál jako terapeutika pro léčbu člověka. Haemanthamin byl studován jako nové protirakovinné činidlo díky své schopnosti překonat rezistenci rakovinových buněk na apoptózu. Biochemické experimenty naznačují, že haemanthamin cílí na ribozom. Struktura odhaluje, že haemanthamin se zaměřuje na rozštěp A na velké ribozomální podjednotce přeskupující rRNA, aby zastavila

prodloužení fáze překladu. Dále bylo prokázáno, že haemanthamin a další Amaryllidaceae alkaloidy také inhibují specificky ribozom v biogenezi, vyvolávající reakci na nukleární stres a vedoucí k stabilizaci p53 v rakovinových buňkách²⁸.

3.3.3 Chemické vlastnosti haemanthaminu

3-Methoxy-1,2-didehydrokrinan-11-ol je chemický název pro haemanthamin. Existuje však několik synonym pro triviální název látky, např. 3-epikrinamin, natalensin či NSC-4. Všechny patří ke stejné sloučenině, ale užívají se málokdy.



Obrázek 4: 3D model haemanthaminu

CAS registrační číslo: 466-75-1; souhrnný molekulární vzorec: C₁₇ H₁₉ NO₄; molární hmotnost: 301,34; koeficient podílu oktanol / voda jako logP oktanol / voda: 1,47–1,56 dle propočtu²⁹.

3.3.4 Biologická aktivita haemanthaminu

3.3.4.1 Protinádorová aktivita haemanthaminu

U alkaloidu byla prokázána cytotoxická aktivita proti širokému typu nádorových buněk, jako je typ MOLT-4, HepG2, HeLa, MCF-7, CEM, K562, G-36. Dále proti lidským fibroblastům jako je A549, OE21, Hs683, U373, SKMEL a B16F10³⁰. Seznam zkratk shrnuje

Tabulka 4.

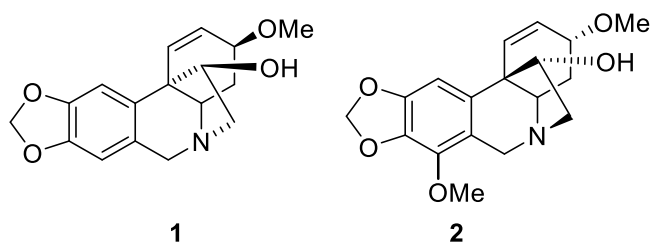
Na indukci apoptózy u lidských leukemických buněk Jurkat v roce 2013 proběhla studie, kde hlavním úkolem bylo zkoumat účinky haemanthaminu a haemanthidinu. V porovnání bylo prokázáno, že haemanthidin je účinnější proti leukemickým T-lymfocytům než haemanthamin. Výzkumem se také zjistilo, že tyto dva alkaloidy u leukemických buněk mají výraznější účinek na apoptózu než je tomu u gama záření³⁰. Po vystavení buněk v koncentracích od 5 do 20 μM těmito dvěma alkaloidům byla pozorována zvýšená apoptóza, která byla doprovázena aktivací kaspáz 3, 7, 8 a 9. Naopak byl snížen mitochondriální membránový potenciál a zastaven buněčný cyklus v G1 a G2/M fázi³¹.

Později byla zjištěna antioxidantní aktivita kvantifikována vychytávacím testem DPPH (2,2-difenyl-1-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazinyl) na předem vytvořených volných radikálech. Další test určil interakci mezi DNA a RNA a odhalil silně rostoucí inhibiční efekt haemanthaminu na L5178 myší lymfom³⁰.

Tabulka 2: Cytotoxická aktivita haemanthaminu na vybraných nádorových a nenádorových buněčných liniích - MTT test³²

Buněčná linie	Haemanthamin IC ₅₀ (μM)
Jurkat	2,4 ± 0,3
MOLT-4	1,2 ± 0,2
A549	1,4 ± 0,5
HT-29	2,4 ± 0,5
PANC-1	2,5 ± 0,6
A2780	2,2 ± 0,2
HeLa	2,1 ± 0,3
MCF-7	1,3 ± 0,2
SAOS-2	2,3 ± 0,5
MRC-5	2,5 ± 0,6

Dle výzkumu z roku 2010 haemanthamin a jeho příbuzný haemanthidin vykázaly velice zajímavé výsledky proti několika buněčným liniím. Naopak alkaloid ambellin, který se od haemathaminu odlišuje pouze v prostorovém uspořádání a má navíc v poloze 7 methoxy skupinu (**Obrázek 5**), nevykázal téměř žádnou aktivitu (**Tabulka 3**)³³.



Obrázek 5: Porovnání struktury haemanthaminu (1) a ambellinu (2)

Tabulka 3: Cytotoxická aktivita u vybraných buněčných linií. Hodnoty jsou uvedeny jako $IC_{50}(\mu M)^{33,34}$

Buněčná linie	Haemanthamin	Haemanthidin	Ambellin
A549	4,5 ± 0,6	4,0 ± 0,4	>100
OE21	6,8 ± 0,7	3,7 ± 0,2	86,0 ± 3,0
Hs683	7,0 ± 0,3	4,3 ± 0,2	>100
U373	7,7 ± 0,5	3,8 ± 0,2	>100
SKMEL	8,5 ± 0,2	4,2 ± 0,2	>100
B16F10	6,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	>100
CEM	2,1 ± 0,4	n.	n.
K562	3,4 ± 1,6	n.	n.
G-361	3,7 ± 0,4	n.	n.
BJ	2,7 ± 0,2	n.	n.

n. – neměřeno

Tabulka 4: Význam zkratk buněčných linií uvedených v **Tabulce 2, 3**

Zkratka	Význam	Zkratka	Význam
Jurkat	akutní leukémie T-lymfocytů	A549	nemalobuněčný plicní karcinom
MOLT-4	akutní lymfoblastická leukémie	OE21	karcinom jícnu
A549	karcinom plic	Hs683	anaplastický melanom
HT-29	kolorektální adenokarcinom	U373	lidský glioblastom
PANC-1	epitheloidní karcinom pankreatu	SKMEL	melanom
A2780	karcinom vaječníku	B16F10	myší melanom
HeLa	adenokarcinom děložního hrdla	CEM	akutní T-lymfoblastoidní leukémie
MCF-7	adenokarcinom prsu	K562	chronická myeloidní leukémie
SAOS-2	osteosarkom	G-361	maligní melanom
Nenádorová buněčná linie		Nenádorová buněčná linie	
MRC-5	plicní lidský fibroblast	BJ	normální lidský fibroblast

3.3.4.2 Inhibiční aktivita proti AChE a BuChE

Acetylcholin (ACh) je mediátor, který působí jako neurotransmitter ovlivňující paměť, učení a další kognitivní funkce či jako neuromodulátor regulující vzdálenější neurotransmitterové systémy. ACh je syntetizován v neuronech z aminokyseliny acetyl-CoA a cholinu pomocí enzymu cholinacetyltransferasy. Hladina tohoto enzymu se snižuje při poškození neuronů a tvorba ACh tak značně klesá³⁵. Snížená úroveň ACh v oblastech mozku souvisí s pamětí a učením (cholinergní hypotéza) a akumulace nebo likvidace amyloidních β plaků (A β) (amyloidní hypotéza) jsou považovány za některé z hlavních příčin onemocnění AD³⁶. Hladiny enzymů acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BuChE), kterými je ACh rozkládán, se zvyšují během AD a tím dochází k jeho rychlejšímu odbourávání³⁵. Oba enzymy jsou schopné hydrolyzovat ACh rychlostí větší než 10 000 molekul za sekundu³⁷.

K terapii AD s lehkým a středním stupněm se využívají inhibitory AChE. Působením inhibitorů cholinesteráz se oddálí přechod do těžkých stádií a zpomalí se průběh AD³⁸.

V současnosti jediný klinicky užívaný alkaloid z čeledi Amaryllidaceae je galanthamin. Standardně se pro porovnávání účinků jednotlivých inhibitorů používá hodnota IC_{50} , která představuje koncentraci dané látky potřebnou pro vyvolání 50% účinku, v tomto případě koncentraci, která způsobí 50% inhibiční efekt.

V roce 2002 byla provedena studie na schopnost inhibice AChE u různých alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae rodu *Narcissus*. Galanthamin v této studii dosáhl IC_{50} (μ M) = 1,07 \pm 0,18. Inhibiční aktivitu vykázal dále sanguinin, alkaloid galanthaminového typu, jehož hodnota byla dokonce lepší (IC_{50} (μ M) = 0,10 \pm 0,01). Haemanthamin nevykázal žádný inhibiční potenciál³⁹.

Na Katedře farmaceutické botaniky se naměřila inhibiční aktivita vůči AChE i BuChE ze specifického druhu *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Z alkaloidů opět galanthamin dosáhl nejvýznamnějších hodnot vůči AChE (IC_{50} (μ M) = 1,70 \pm 0,10). Aktivita proti BuChE byla nejvíce zajímavá u narcimatulinu (IC_{50} (μ M) = 5,90 \pm 0,23). Haemanthamin zatím nedosáhl významných hodnot ani u jedné z cholinesteráz, proto se uvádí IC_{50} (μ M) > 500⁴⁰.

3.3.4.3 Inhibice GSK-3 β

Glykogen syntáza kináza 3 β (GSK-3 β) je všudypřítomný enzym s vysokými hladinami exprese v mozku a je spojen s řadou neurologických poruch, jako je AD, bipolární nemoc,

Huntingtonova choroba a další neurodegenerativní poruchy⁴¹. Hyperfosforylace τ proteinu zprostředkovaná GSK-3 β komplikuje AD a tvoří neuronální klubka⁴². Dochází-li k nadměrné tvorbě A β , aktivita GSK-3 β se zvyší³⁵. Amyloidní plaky i neuronální klubka mohou způsobit nadměrné uvolňování glutamátu v určitých částech CNS, což může vést až k neuronální smrti prostřednictvím N-metyl D-aspartát (NMDA) receptorů⁴³.

V současné době existuje několik inhibitorů GSK-3 β vyvinutých pro AD a bipolární poruchu⁴². Mezi inhibitory GSK-3 β lze dle literatury zařadit strukturně různorodé látky jako deriváty thiazolidindionu, paullony, maleimidy, indirubiny, monovalentní kation lithia a alkaloidy izolované z mořských hub⁴⁴, dále také alkaloidy vyskytující se v rostlinách čeledi Amaryllidaceae⁴⁵.

V rámci studie z roku 2018 byl proveden screening AA alkaloidů se zaměřením na inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β . **Tabulka 5** zobrazuje vybrané alkaloidy haemanthaminového a krininového typu. Haemanthamin vykázal mírnou inhibici ($52,4 \pm 0,1\%$). V **Tabulce 5** je srovnání s masoninem, což je alkaloid homolykorinového typu, který v testování vykazoval nejlepší inhibici⁴⁵.

Tabulka 5: Screening vybraných alkaloidů AA pro jejich schopnost inhibovat GSK-3 β ⁴⁵

Alkaloid	GSK-3 β (% inhibice)	GSK-3 β (IC ₅₀ (μ M))
Haemanthamin	$52,4 \pm 0,1$	n.
Haemanthidin	$33,0 \pm 2,2$	n.
Ambellin	$38,0 \pm 0,8$	n.
Krinin	$39,6 \pm 5,4$	n.
Masonin	$66,0 \pm 4,0$	$27,81 \pm 0,05$

*n. = neměřeno

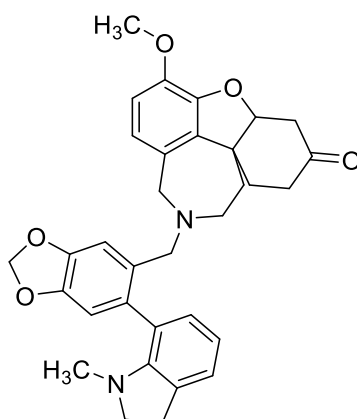
3.3.4.4 Inhibice POP

Prolylová oligopeptidáza (POP) je cytosolová serinová peptidáza, která hydrolyzuje malé peptidy na konci obsahující na karboxyskupině prolinové zbytky jako je vazopresin, substance P a thyrotropin – uvolňující hormony, které se podílejí na procesu učení a paměti. Tyto neuropeptidy jsou známé důležité modulátory v kognitivních funkcích a degradují peptidy pomocí POP a mohou urychlit proces stárnutí a pravděpodobně mohou být zapojeny do neurodegenerativních chorob závislých na výši věku. Bylo zjištěno, že některé

inhibitory POP jsou silná antidemencia, a tudíž inhibice POP by mohla být podpůrným nástrojem při léčbě AD⁴⁶.

V současnosti se používá fenolický flavonoid bajkalin, který je izolován ze šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*) z čeledi Lamiaceae, jako standard inhibiční aktivity. Bajkalin před absorpcí štěpí střevní β -glukuronidasou na aglykon bajkalein, který je lipofilnější. Bajkalein následně vstupuje do krevního řečiště přes gastrointestinální trakt a volně přechází hematoencefalickou bariéru. V závislosti na dávce samotný bajkalein inhibuje POP⁴⁷.

Inhibiční potenciál vůči POP byl nalezen i u některých alkaloidů obsažených v rodu *Narcissus spp*⁴⁸. Nejlepší inhibiční aktivita byla prozatím zjištěna u alkaloidu narcimatulinu (**Obrázek 6**) s hodnotou $IC_{50}(\mu M) = 29,2 \pm 1,0$. Inhibice POP haemanthaminu je velmi nízká $IC_{50}(\mu M) > 500$ ⁴⁰.



Obrázek 6: Struktura narcimatulinu⁸

3.3.4.5 Antiprotozoální aktivita haemanthaminu

Malárie je parazitární infekce přenášená komárem, která způsobuje cyklickou horečku. Jedná se o onemocnění, které způsobuje prvok rodu *Plasmodium*. Z pěti druhů *Plasmodium*, které mohou infikovat lidi, je nejčastější a nejzávažnější *P. falciparum*, druhý nejčastější je *P. vivax*⁴⁹.

Tento prvok je na mnoho používaných léčiv rezistentní, z tohoto důvodu je potřeba neustále hledat a vyvíjet nové látky s antimalarickou aktivitou.

Samotný haemanthamin vykázal ve studii z roku 2010 antiprotozoální aktivitu proti *Plasmodium falciparum* (K₁) ($IC_{50} = 2,29 \mu M$) a vůči *Trypanosoma brucei rhodesiense* ($IC_{50} = 1,62 \mu M$)⁵⁰.

Před několika lety byla provedena studie s cílem prozkoumat antimalarický potenciál u haemanthaminu, krininu a 6-hydroxyhaemanthaminu proti dvěma kmenům *Plasmodium falciparum*, citlivý na chlorochin (T9.96) a rezistentním na chlorochin (K₁).

Uvedené alkaloidy byly testovány ve čtyřech dávkách (0,04, 0,2, 1, 5 µg / ml) a vykazovaly antimalarickou aktivitu způsobem závislým na dávce (**Tabulka 6**). Nejaktivnější byly v dávkách 1 a 5 µg / ml. Z testovaných skupin alkaloidů Amaryllidaceae byl 6-hydroxyhaemanthamin stanoven jako nejúčinnější proti kmeni T9.96 dle hodnoty IC₅₀ (**Tabulka 7**)⁵¹.

Tabulka 6: Antimalarická aktivita testovaných alkaloidů⁵¹

Alkaloid	µg/ml	<i>P. falciparum</i> (T9.96)	<i>P. falciparum</i> (K ₁)
		inhibice v %	inhibice v %
Haemanthamin	5	94,63	96,99
	1	65,77	68,07
	0,2	46,31	51,81
	0,04	30,87	31,93
6-Hydroxyhaemanthamin	5	91,89	95,24
	1	67,60	80,95
	0,2	46,54	64,76
	0,04	39,86	11,43
Krinin	5	73,75	74,28
	1	44,63	63,81
	0,2	36,56	41,90
	0,04	26,49	17,14

Tabulka 7: Hodnoty IC₅₀ testovaných alkaloidů na *Plasmodium falciparum*⁵¹

	IC ₅₀ (µM)	
	<i>P. falciparum</i> (T9.96)	<i>P. falciparum</i> (K ₁)
Haemanthamin	0,703	0,433
6-Hydroxyhaemanthamin	0,348	0,352
Krinin	2,110	1,650

3.3.5 Další biologická aktivita haemanthaminu

3.3.5.1 Antimikrobiální aktivita

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie v roce 2015 byla studována antimikrobiální aktivita AA alkaloidů patřících do různých strukturních typů⁵².

Mezi sloučeninami samotný haemathamin vykazoval antimikrobiální aktivitu pouze proti *C. albicans*, *C. dubliniensis* s MIC₈₀ = 512 µg / mL a proti *L. elongiosporus* s hodnotou MIC₈₀ = 256 µg / mL. V **Tabulce 8** jsou shrnuty hodnoty MIC₈₀ pro další alkaloidy haemanthaminového a krininového typu a lykorinu, který vykazoval v daném testování nejlepší antimikrobiální aktivitu⁵².

Tabulka 8: *In vitro* antimikrobiální účinek izolovaných alkaloidů proti vybraným kvasinkám, grampozitivním a gramnegativním bakteriím⁵².

	MIC ₈₀ /MFC (µg/mL)											MIC ₈₀ (µg/mL)		
	<i>C. a.</i> ^A		<i>C. a. 1</i> ^B		<i>C. a. 2</i> ^B		<i>C. d.</i> ^B		<i>C. g.</i> ^B		<i>L. e.</i> ^B		<i>E. c.</i> ^A	<i>S. a.</i> ^A
Haemanthamin	-	-	512	-	-	-	512	-	-	-	256	-	-	-
Haemanthidin	-	-	-	-	-	-	512	-	-	-	512	-	-	-
Ambellin	-	-	512	-	512	-	512	-	-	-	512	-	-	-
Krinin	-	-	512	-	512	-	512	-	512	-	256	512	-	-
Lykorin	64	512	128	512	256	512	32	256	512	512	64	256	-	-

*MIC₈₀ - minimální inhibiční koncentrace, MFC - minimální fungicidní koncentrace, NA - neaktivní (v kvasinkách: > 512 µg / mL; v bakteriích 48 2048 µg / mL), *C. a.* - *Candida albicans* (1 – ústní dutina; 2 – dolní dýchací trakt), *C. d.* - *Candida dubliniensis*, *C. g.* - *Candida glabrata*, *L. e.* - *Lodderomyces elongiosporus*, *E. c.* - *Escherichia coli*, *S. a.* - *Staphylococcus aureus*, A - kmen typu, B – klinicky izolované.

Mikroorganismy a kultivační média byly vybrány tak, aby zahrnovaly grampozitivní a gramnegativní bakterie a lidské patogenní kvasinky. Kmeny bakteriálního typu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 a jeden kmen kvasinkového typu *Candida albicans* ATCC 10321 a pět klinických kvasinkových izolátů: *C. albicans 1*, *C. albicans 2*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* a *Lodderomyces elongiosporus*⁵².

3.3.5.2 Antivirová aktivita

U některých alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae byla prokázána schopnost inhibovat replikaci viru lidské imunodeficience 1 (HIV-1) *in vitro*. Zejména tato aktivita se zjistila u lykorinu, homolykorinu, trisphaedrinu, ale také u haemanthaminu⁵³.

Alkaloidy byly izolované z různých druhů Amaryllidaceae a následně testovány *in vitro* na inhibici HIV-1 růstu na lidské buněčné linii MT4. Cytotoxicita byla kontrolována v neinfikovaných buňkách pomocí MTT a [³H] thymidinových inkorporačních testů. Protivirové aktivity byly stanoveny testem p24 antigenu a testem reverzní transkriptázy v pevné fázi (RT) na supernatantech buněk sedmý den po infekci a ošetření alkaloidy⁵⁴.

Srovnání haemanthaminu a dalších alkaloidů je uvedeno v **Tabulce 9**, kdy nejzajímavější hodnoty vykázal lykorin.

Tabulka 9: Cytotoxické a antiretrovirotické účinky alkaloidů z čeledi AA^{a 54}

Alkaloid	TC ₅₀ (μg/mL) ^b	ID ₅₀ (μg/mL) ^c	ID ₅₀ (μg/mL) ^d	TI ₅₀ ^e
Haemanthamin	1,00	0,80	-	1,30
Haemanthidin	1,00	-	-	-
Lykorin	0,75	0,40	0,40	1,90
Homolykorin	12,80	7,30	-	1,80

^avšechny hodnoty jsou průměry výsledků pěti nezávislých experimentů

^bTC₅₀ se stanovily pomocí MTT a [³H] thymidinového inkorporačního testu

^curčeno testem antigenu p24, s výjimkou homolykorinu, kde byl použit MTT test

^dstanoveno RT testem

^eTI₅₀ = ID₅₀ / TC₅₀

3.4 Biologická aktivita derivátů haemanthaminu

U haemanthaminu byla zjištěna široká biologická aktivita, a proto byl tento alkaloid využit pro přípravu derivátů za účelem přípravy ještě aktivnějších látek, než je on samotný. To by mohlo vést k usnadnění rozvoje účinného a selektivního protinádorového léčiva. Dosud bylo prozkoumáno několik různých derivátů haemanthaminu a byly testovány na několika různých buněčných liniích.

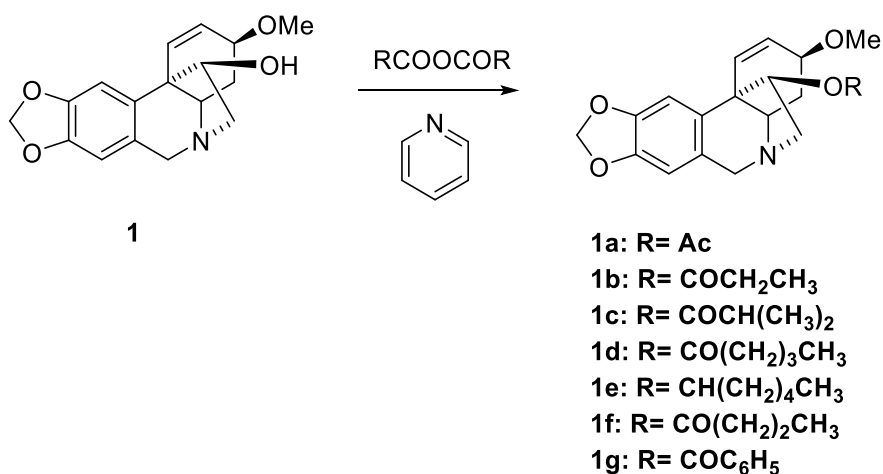
Výzkum je dále zaměřen na léčbu AD, kdy se stanovuje inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE. Nejedná se však pouze o tyto vlastnosti, ale zajímavá je též aktivita antimalarická, antiprotozoální, antimikrobiální a antifungální.

Na začátku roku 2019 byla publikována studie, kde byly navrženy alifatické estery haemanthaminu nebo dihydrohaemanthaminu, které mají za následek změnu fermentace v rumenu⁵⁵.

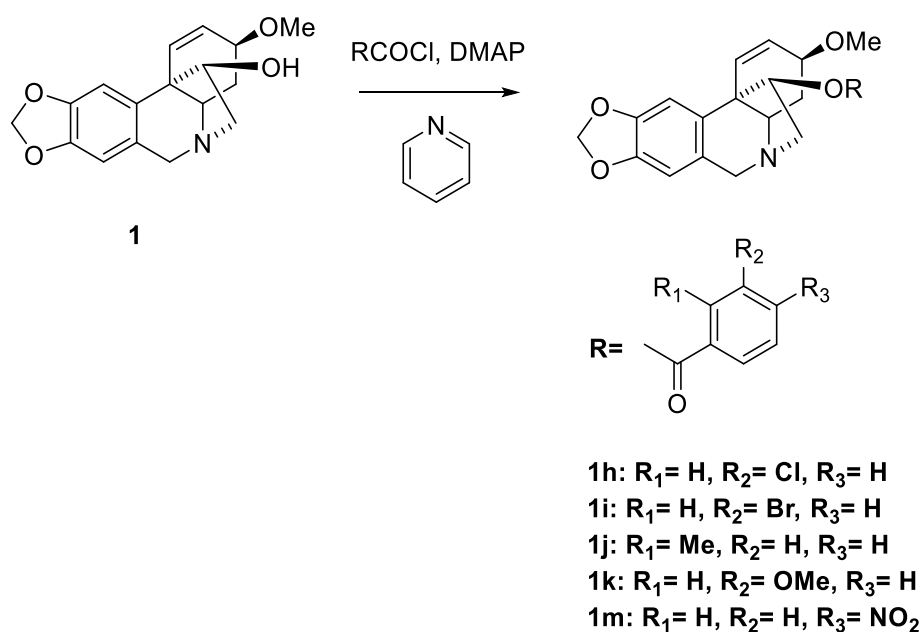
3.4.1 Inhibiční aktivita derivátů haemanthaminu proti AChE a BuChE

Na Katedře farmaceutické botaniky byly provedeny chemické modifikace haemanthaminu, díky jeho velké izolaci z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Příprava derivátů byla inspirována lykorinem, dalším biologicky aktivním alkaloidem Amaryllidaceae. Lykorin sám o sobě disponuje velmi nízkou inhibiční aktivitou vůči cholinesterázám, ale jeho acylované a etherifikované deriváty vykazovaly silné inhibiční aktivity proti AChE i BuChE^{56,57}. V této souvislosti byly studovány alifatické a aromatické substituenty (estery) za účelem stanovení vztahu mezi strukturou a aktivitou⁵⁸.

Uspořádání haemanthaminu umožnilo připravit nové chemické struktury derivatizací jeho volné hydroxylové skupiny v poloze 11. Sloučeniny **1a-1g** byly získány acylací s odpovídajícími anhydridy (**Obrázek 7**). Hydroxylová skupina byla také acylována různými substituovanými benzoylchloridy za vzniku odpovídajících esterů **1h-1m** (**Obrázek 8**). Výtěžek všech reakcí ve všech případech překročil 65 %⁵⁸.



Obrázek 7: Příprava alifatických derivátů haemanthaminu **1a-1g**⁵⁸



Obrázek 8: Příprava aromatických derivátů haemanthaminu **1h-1m**⁵⁸

Pro studium inhibiční aktivity derivátů haemanthaminu byla pro měření použita acetylcholinesteráza lidského původu (hAChE) a lidská sérová butyrylcholinesteráza (hBuChE). Nejméně aktivní inhibitory hAChE byly 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin (**1m**) a 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (**1j**), oba vykazují dvoustupňové mikromolární hodnoty IC₅₀ (**Tabulka 10**). Derivát bez substituce 11-*O*-(benzoyl)haemanthamin (**1g**) ukázal sníženou účinnost (IC₅₀ = 294,0 ± 25,0 μM). Derivát 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (**1j**) vykazoval neselektivní profil pro obě cholinesterázy v mikromolárním měřítku (IC₅₀ = 18,2 ± 1,3 μM)⁵⁸.

Aby se lépe dalo porozumět inhibici hAChE a hBuChE novými semisyntetickými alkaloidy, tak byla provedena docking studie. Jedná se o výpočtovou studii, která identifikuje způsob vazby umožňující počítat experimentální vztah mezi strukturou a aktivitou. Používá se například pro identifikaci správných pozic ligandu ve vazebném místě proteinu, pro stanovení síly interakce protein-ligand⁵⁹.

Výsledky jednotlivých derivátů a porovnání se standardem galanthaminem jsou shrnuty v **Tabulce 10**.

Tabulka 10: Výsledky biologických aktivit spojených s AD u derivátů haemanthaminu (1a-1m)⁵⁸

Sloučenina	<i>h</i> AChE IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a	SI AChE ^b	<i>h</i> BuChE IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a
1	> 500	n.	> 500
1a	> 500	n.	> 500
1b	> 500	< 0,9	437,0 ± 38,0
1c	> 500	< 0,4	203,0 ± 8,0
1d	> 500	n.	> 500
1e	> 500	< 0,5	273,0 ± 18,0
1f	> 500	< 0,3	140,0 ± 21,0
1g	294,0 ± 25,0	0,02	5,8 ± 0,3
1h	85,1 ± 6,4	0,9	80,2 ± 10,2
1i	112,0 ± 21,0	1,1	129,0 ± 25,0
1j	18,2 ± 1,3	0,4	6,6 ± 1,2
1k	180,0 ± 17,0	0,4	75,5 ± 12,5
1m	14,7 ± 1,8	34,0	> 500
galanthamin	1,7 ± 0,1	24,9	42,3 ± 1,3

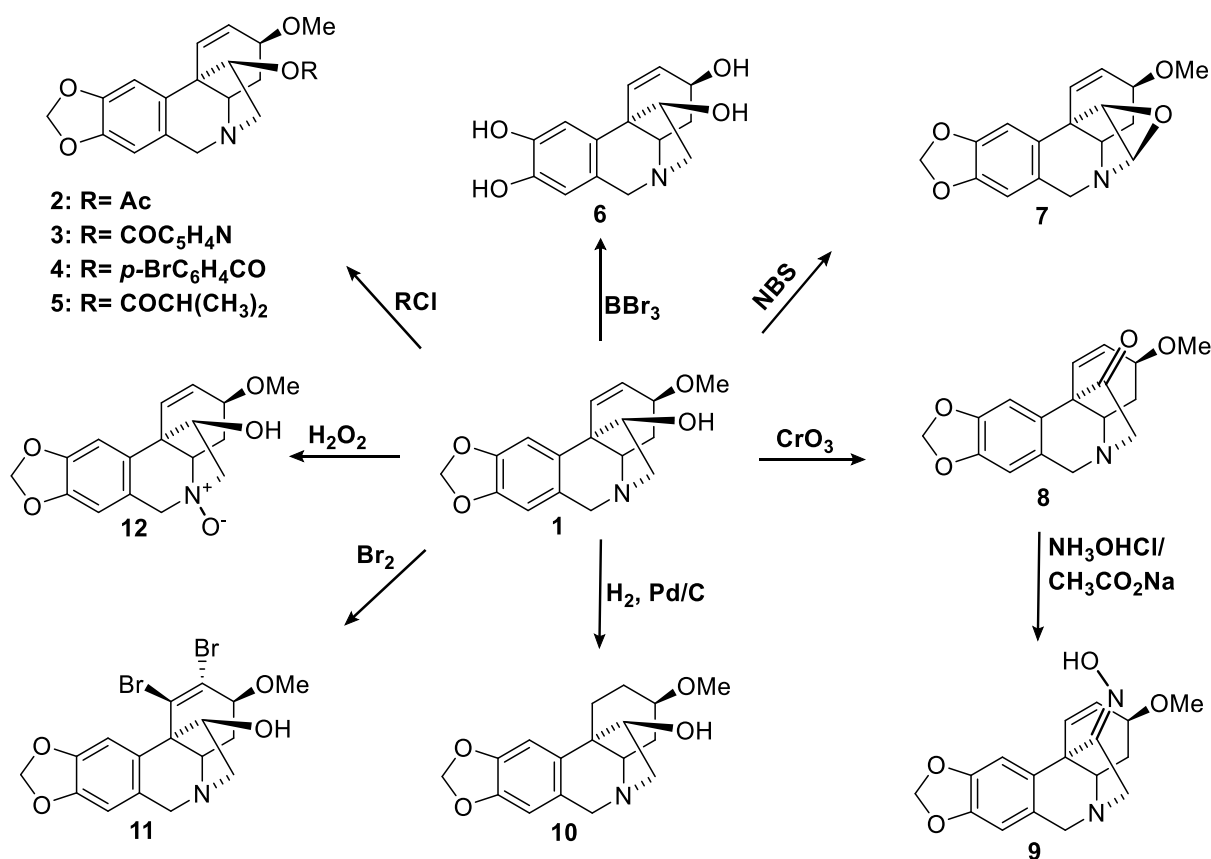
^a Koncentrace sloučeniny potřebná ke snížení aktivity enzymu o 50 %; hodnoty jsou průměrem ± SEM u tří nezávislých měření, z nichž každé se provádí trojmo

^b Selektivní index pro *h*AChE se stanoví jako poměr *h*BuChE IC₅₀ / *h*AChE IC₅₀

3.4.2 Protinádorová aktivita derivátů haemanthaminu

U samotného alkaloidu haemanthaminu byla zjištěna významná antitumorová aktivita³⁰.

Ve studii z roku 2015 se referuje o antiproliferační aktivitě polysyntetických derivátů haemanthaminu proti čtyřem lidským nádorovým buněčným liniím (A2780 – karcinom vaječníků, SW1573 – karcinom plic, T-47D – karcinom prsu, WiDr – karcinom tračnicku). Rovněž byly prezentovány některé vztahy mezi strukturou a aktivitou (**Obrázek 9, Tabulka 11**)⁶⁰.



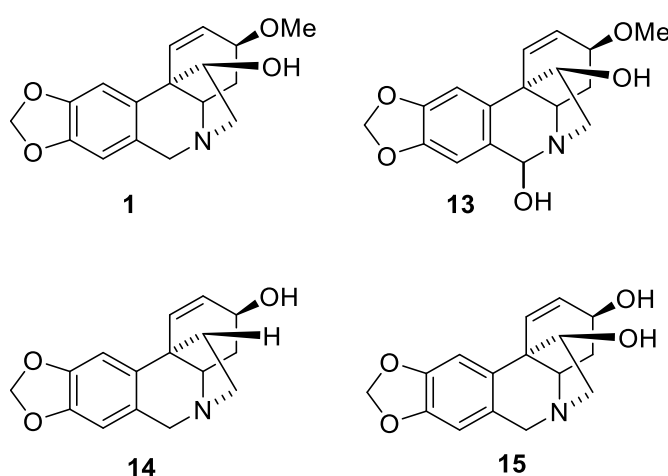
Obrázek 9: Příprava derivátů haemanthaminu **2-12**⁶⁰

Tabulka 11: *In vitro* antiproliferativní aktivita proti lidským nádorovým buňkám u příslušných derivátů^{a 60}

	Molární hmotnost	A2780	SW1573	T47-D	WiDr
1	301	0,68 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 0,4	1,2 ± 0,5
2	343	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
3	406	27,2 ± 10,0	29,5 ± 12,0	72,3 ± 24,0	63,3 ± 35,0
4	484	19,1 ± 1,0	21,9 ± 4,0	46,1 ± 30,0	32,8 ± 22,0
5	383	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6	275	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
7	299	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
8	299	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	4,4 ± 1,5	3,5 ± 2,0
9	314	33,2 ± 2,0	39,1 ± 20,0	78,6 ± 24,0	67,4 ± 34,0
10	301	31,4 ± 7,0	29,8 ± 3,0	≥ 100	58,9 ± 12,0
11	461	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
12	317	27,2 ± 5,0	22,0 ± 20,0	≥ 100	≥ 100

^a Hodnoty jsou uvedené v GI₅₀ (růstová inhibiční dávka) (μM)

Porovnání antiproliferačních účinků přírodních alkaloidů haemanthaminu **1**, haemanthidinu **13**, vittatinu **14** a 11-hydroxyvittatinu **15** ukazuje, jak důležitá je pro aktivitu přítomnost methoxyskupiny na C-3 spolu s hydroxylovou skupinou na C-11. Pro porovnání slouží **Obrázek 10** a **Tabulka 12**. Tyto skutečnosti byly potvrzeny přípravou derivátů **2 – 12**. Získání neaktivních derivátů **10** a **11** ukazuje důležitost dvojně vazby na C1-C2 pro aktivitu. Odstranění methylenedioxy skupiny vedlo k méně aktivní sloučenině **12**, což ukazuje, že tato skupina je také důležitá pro sérii alkaloidu haemanthaminů. Haemanthidin **13**, který má hydroxylovou skupinu na C-6, může být považován za aktivní jako haemanthamin **1**⁶⁰.



Obrázek 10: Strukturální vzorce vybraných testovaných alkaloidů haemanthaminového typu⁶⁰

Tabulka 12: *In vitro* antiproliferativní aktivita proti lidským nádorovým buňkám – porovnání alkaloidů^{a 60}

	Molární hmotnost	A2780	SW1573	T47-D	WiDr
Haemanthamin (1)	301	0,68 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 0,4	1,2 ± 0,5
Haemanthidin (13)	317	1,5 ± 0,1	2,0 ± 1,0	1,8 ± 1,0	2,7 ± 2,0
Vittatin (14)	271	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
11-Hydroxyvittatin (15)	287	21,0 ± 2,0	16,9 ± 4,0	12,5 ± 9,0	21,1 ± 6,0

^a Hodnoty jsou uvedené v GI₅₀ (růstová inhibiční dávka) (μM)

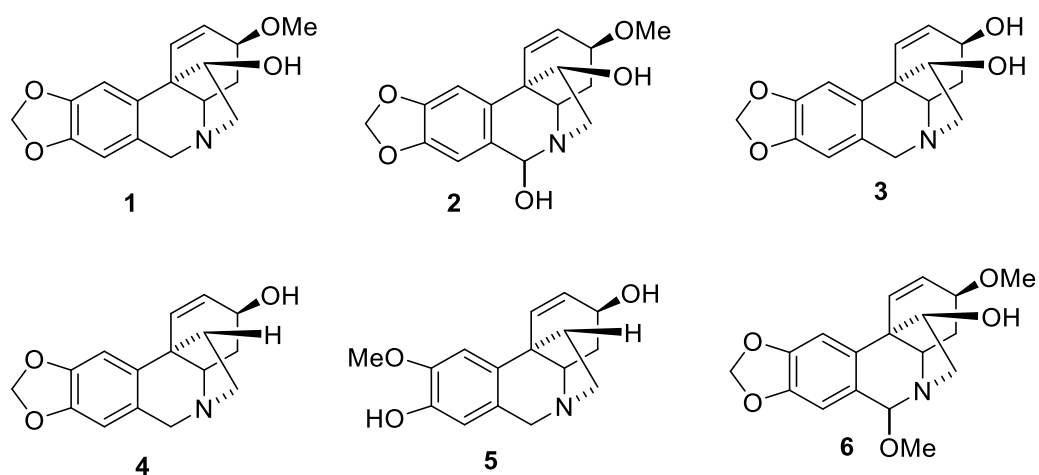
Nejzajímavější výsledky byly získány pro přírodní alkaloidy **1** a **13**, a také derivát **8**. Haemanthamin a haemanthidin jsou tedy slibnými vedoucími sloučeninami pro další vývoj⁶⁰.

3.4.3 Antimalarická aktivita derivátů haemanthaminu

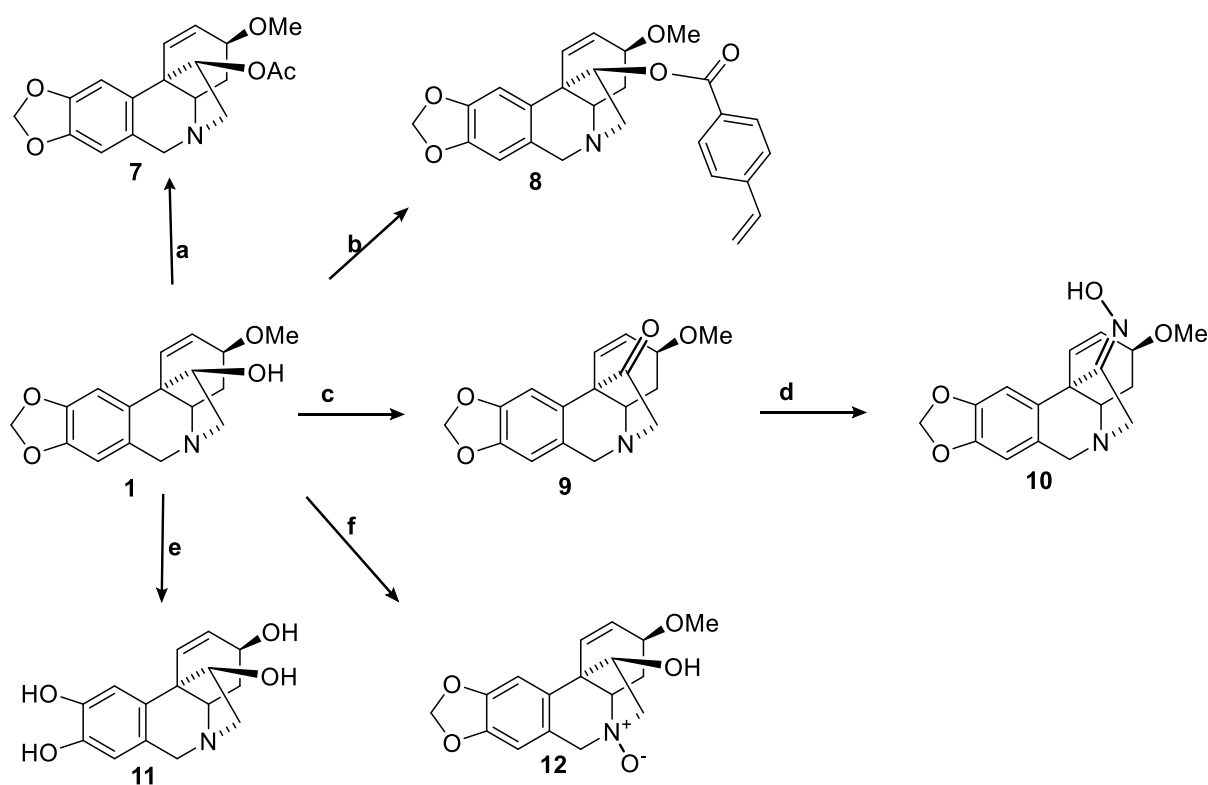
Výzkum prokázal značnou antimalarickou aktivitu ve struktuře tří alkaloidů haemanthaminového typu: haemanthaminu **1**, haemanthidinu **2** a 11-hydroxyvittatinu **3**. V **Obrázku 11** jsou pro srovnání uvedené struktury haemanthaminového typu, které byly testovány na antimalarickou aktivitu vůči *Plasmodium falciparum*⁶¹.

Modifikace provedené ve struktuře haemanthaminu **1** jsou uvedeny v **Obrázku 12** a **13**. Transformace byly provedeny na hydroxylové skupině na C-11 nebo na dvojně vazbě v kruhu D, z větší části za účelem studia jejich úlohy v antiplasmodické aktivitě. Sloučenina **7** byla kvantitativně získána acetylací anhydridem kyseliny octové. Esterifikací kyselinou *p*-vinylbenzoovou vznikl produkovaný derivát **8**, který má terminální vinylovou skupinu. Hydroxylová skupina byla také acylována několika acylchloridy s různou velikostí, lipofilitou a stereoelektronickými vlastnostmi (nikotyl, *p*-brombenzoyl, isobutyryl a akryloylchlorid), čímž byly získány odpovídající estery **14-17**. Při zpracování haemanthaminu s NBS byl získán jeden produkt v dobrém výtěžku, který byl identifikován jako epoxid **20**. Oxidace hydroxylové skupiny na odpovídající keton **9** se dosáhla použitím Jonesova činidla a zpracováním **9** s hydroxylaminhydrochloridem, což vedlo k oximu **10**⁶¹. Zpracování haemanthaminu HCl za refluxních podmínek poskytlo derivát **21**, který byl identifikován jako apohaemantamin. Tato sloučenina se vyskytuje v rostlinách přirozeně a byla izolována například z *Eucharis amazonica*⁶². Polyhydroxylovaná sloučenina **11** byla získána reakcí s BBr₃. Reakce haemanthaminu s H₂O₂ poskytla odpovídající N-oxidový derivát **12**.

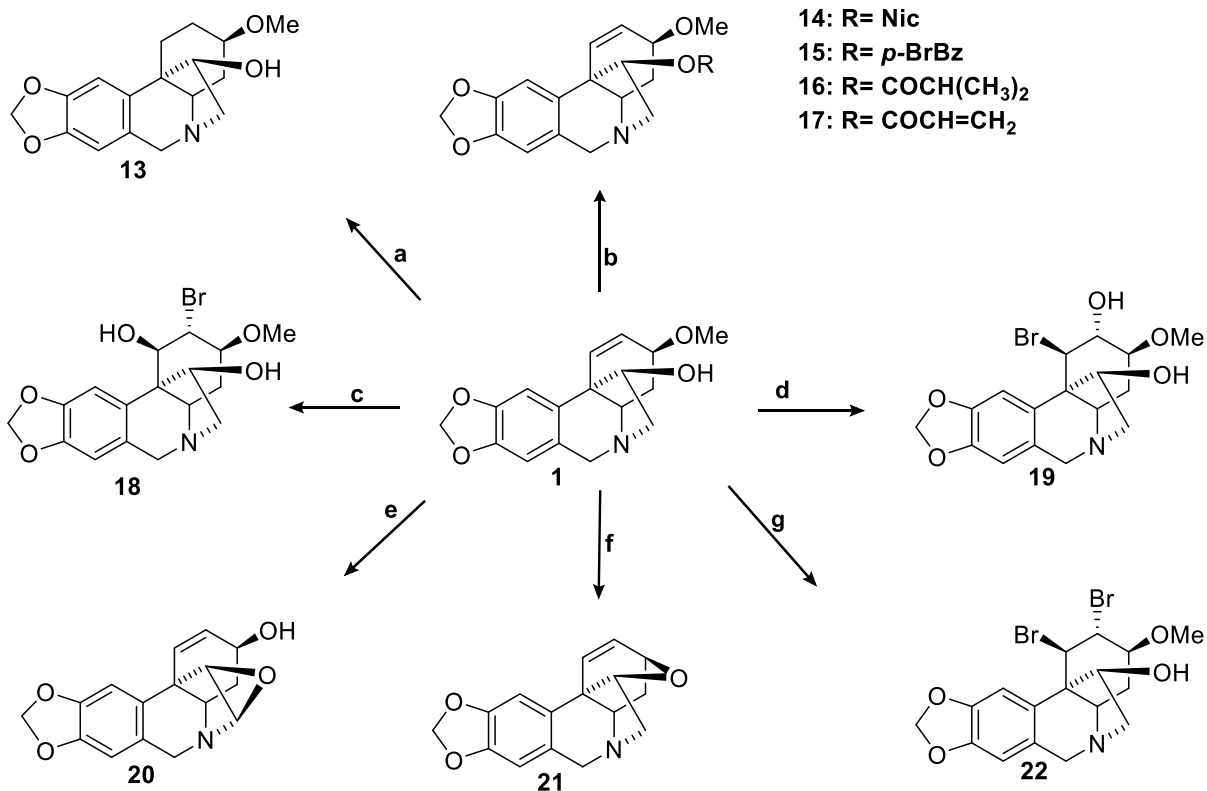
Modifikaci na dvojně vazbě na C-1–C-2 haemanthaminu lze hlavně nalézt v **Obrázku 12**. Hydrogenace a bromace vedly k derivátům **13** a **22**. Zpracování haemanthaminu s N-bromacetamidem podle publikovaných podmínek pro halogenamidaci⁶³ vznikla sloučenina **18**. Když se však tato reakce provádí za bezvodých podmínek, získá se po zpracování pouze jeden produkt **19**⁶¹.



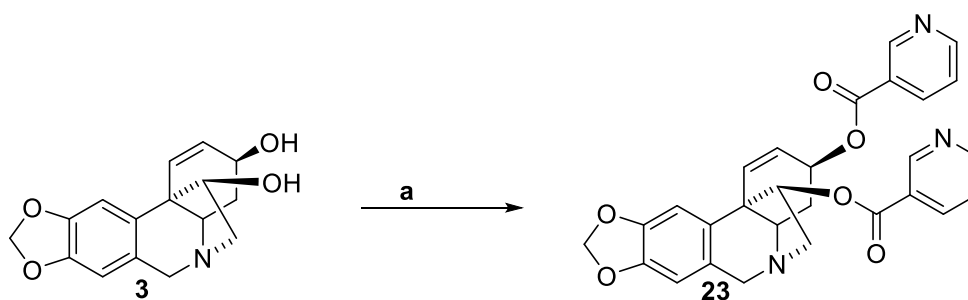
Obrázek 11: Struktury alkaloidů haemanthaminového strukturního typu: haemanthamin (1), haemanthidin (2), 11-hydroxyvittatin (3), vittatin (4), 8-*O*-demethylmaritidin (5), 6-*O*-methylmaritidin (6)⁶¹.



Obrázek 12: Připravené deriváty - reakční činidla a podmínky: Ac₂O, pyridin (a); *p*-vinylbenzoová kyselina, DCC, DCM (b); Jonesovo činidlo, aceton (c); NH₃OHCl, NaOAc, EtOH, reflux, 15 h (d); BBr₃, DCM, 0 °C (e); 30% H₂O₂, MeOH, 24 h (f)⁶¹.



Obrázek 13: Připravené deriváty - reakční činidla a podmínky: H₂, 10% Pd/C, THF (a); RCl, NEt₃, DCM (b); CH₃CONHBr, SnCl₄, H₂O, CH₃CN, 0°C (c); CH₃CONHBr, SnCl₄, H₂O, CH₃CN, 0°C (d); NBS, DCM (e); 6 M HCl, 100°C, 4 h (f); Br₂, DCM, 24 h (g)⁶¹.



Obrázek 14: Příprava derivátu **23** z 11-hydroxyvittatinu (**3**) – reakční činidla a podmínky: nikotináthchlorid, NEt₃, DCM (a)⁶¹.

Tabulka 13: *In vitro* aktivita derivátů proti *Plasmodium falciparum* F32⁶¹

Číslo sloučeniny	IC ₅₀ (μg/ml)
1	1,3 ± 0,2
2	1,2 ± 0,1
3	13,2 ± 1,4
4	7,3 ± 0,1
5	91,5 ± 10,4
6	75,5 ± 9,0
7	75,8 ± 8,7
8	>100
9	73,5 ± 10,0
10	95,5 ± 9,5
11	13,4 ± 1,8
12	>100
13	9,9 ± 1,3
14	51,7 ± 4,9
15	43,3 ± 4,1
16	56,6 ± 8,1
17	8,4 ± 1,7
18	62,6 ± 7,5
19	72,6 ± 5,0
20	1,6 ± 0,1
21	92,9 ± 14,8
22	6,5 ± 0,9
23	0,8 ± 0,1

Výsledky antiplasmodálního hodnocení jsou shrnuty v **Tabulce 13**, což ukazuje, že haemanthamin **1** a haemanthidin **2** jsou neaktivnější přírodní alkaloidy s hodnotami IC₅₀ 1,3 a 1,2 μM. Nicméně, derivát **23** představoval nejlepší antimalarickou aktivitu (**Obrázek 14**), s hodnotou IC₅₀ pod 1 μM⁶¹.

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie, materiály a metody

4.1.1 Izolace haemanthaminu

Použitý alkaloid byl vyizolován z cibule *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master⁸ v dostatečném množství na Katedře farmaceutické botaniky za účelem studia vztahu struktura – účinek. K syntetickým obměnám došlo na β – ethanovém můstku, na základě již provedených studií, které ukázaly potenciál pro využití v chemoterapii.

4.1.2 Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla

- benzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 3-bromo-5-nitrobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- cyklohexan, p. a. (cHx) (Penta)
- diethylamin, p. a. (Et₂NH) (Penta)
- 2,4-dimethoxybenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 2,6-dimethoxybenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 3,4-dimethoxybenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- dimethylaminopyridin, p. a. (DMAP) (Penta)
- 2,3-dimethylbenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 3,5-dimethylbenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- Dragendorffovo činidlo (připravováno v laboratoři)
- ethanol 95%, p. a. (EtOH) (Penta)
- ethyl-acetát, p. a. (EtOAc) (Penta)
- 2-chlorobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- chloroform, p. a. (CHCl₃) (Penta)
- 2-chloro-4-nitrobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 2-methylbenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- 3-nitrobenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)
- pyridin, p. a. (Penta)
- toluen, p. a. (To) (Penta)
- 3,4,5-trimethoxybenzoylchlorid, $\geq 99\%$ (Acros)

4.1.3 Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii

- hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC Kiesel SiO₂ 60 F₂₅₄, Merck, 20 × 20 cm, vrstva 0,2 mm (Německo)

4.1.4 Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii

- S₁ – To:Et₂NH (9:1)
- S₂ – To:cHx:Et₂NH (60:40:5)
- S₃ – To:EtOAc: Et₂NH (60:20:10)

4.1.5 Strukturní analýza připravených derivátů

4.1.5.1 GC-MS analýza

Za účelem stanovení molekulové hmotnosti připravovaných látek byla použita GC-MS analýza. Na měření byl použit plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v EI režimu při 70 eV. K separaci byla použita kolona typu DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Teplotní rozsah byl v rozpětí teplot 100–300 °C, přičemž v rozmezí 100–180 °C vzrůstala teplota o 15 °C/min. Při dosažení 180 °C byla teplota udržována po dobu jedné minuty a následně stoupala do 300 °C rychlostí 5 °C/min a poté opět na této hodnotě udržována, ale 40 minut. Teplota nástřiku vzorku na kolonu byla 280 °C s rychlostí průtoku nosného plynu (hélia) 0,8 ml/min. Detekční rozmezí m/ 35–600. Koncentrace nastříkovaného vzorku v methanolu byla většinou 1 mg/ml. V některém případě bylo nutno použít nástřík s nižší koncentrací 3 μg/ml, aby se daný derivát zobrazil ve spektru. Získané známé látky byly porovnány s daty v literatuře, strukturně nepopsané látky byly charakterizovány poprvé.

4.1.5.2 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza)

Metoda byla použita za účelem určení přesné hodnoty nově připravených, v literatuře dosud nepopsaných sloučenin. Hmotnostní spektra byla měřena spektrometrem s vysokým hmotnostním rozlišením UHPLC Waters Acquity I-Class s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátozem – kvadrupól s analyzátozem doby letu Waters Synapt G7-Si. V roztoku MeCN byly měřeny vzorky. Následně došlo k porovnávání teoretického m/s s experimentálně zjištěným.

4.1.5.3 NMR analýza

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 případně CD_3OD při teplotě 25 °C na spektrometru Varian Iniova 500 pracujícím při 499,87 MHz pro ^1H jádra a 125,70 MHz pro ^{13}C jádra. K ozařování a detekci signálu byla použita OneNMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl_3 jsou u atomů ^1H $\delta = 7,26$ ppm a u atomů ^{13}C $\delta = 77,0$ ppm, pro CD_3OD jsou u atomů ^1H $\delta = 3,30$ ppm a u ^{13}C $\delta = 49,0$ ppm. Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ^1H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

4.1.5.4 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů při 24 °C na automatickém polarimetru ADP 220 BS v prostředí methanolu nebo ethanolu. Poté byla dopočtena specifická otáčivost dle vzorce:

$$[\alpha]_D^t = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

t – teplota měření

D – linie sodíkového světla = 589,3 nm

α – naměřená otáčivost [°C]

c – koncentrace naměřeného alkaloidu [$\text{g} \times 100 \text{ ml}^{-1}$]

l – délka kyvety [dm]

4.1.6 Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin

4.1.6.1 Stanovení inhibiční aktivity derivátů proti AChE a BuChE

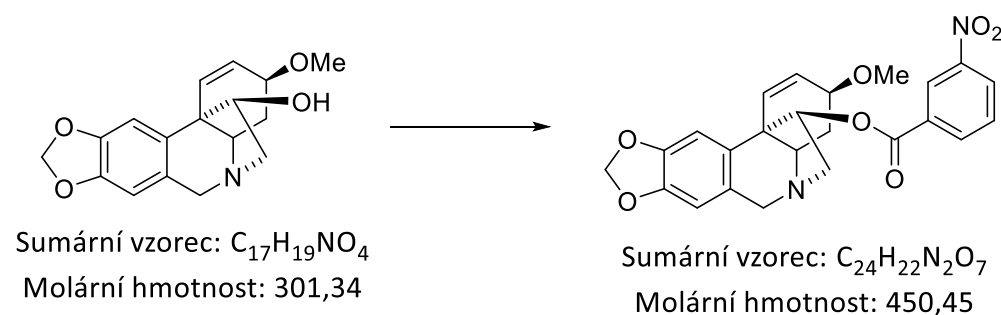
Inhibiční aktivita těchto enzymů byla měřena na Katedře farmaceutické botaniky, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Jednalo se o Ellmanovu metodu a měření prováděl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Podrobný popis této metody je uveden v následující literatuře⁶⁴.

4.1.6.2 Stanovení protinádorové aktivity připravených derivátů

Bylo provedeno stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů na liniích Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2, MRC-5, a to ve spolupráci s Katedrou lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, za využití systému xCELLigence. Testování prováděl RNDr. Radim Havelek, Ph.D. Využití přístroje xCELLigence a popis metody lze nalézt v literatuře⁶⁵.

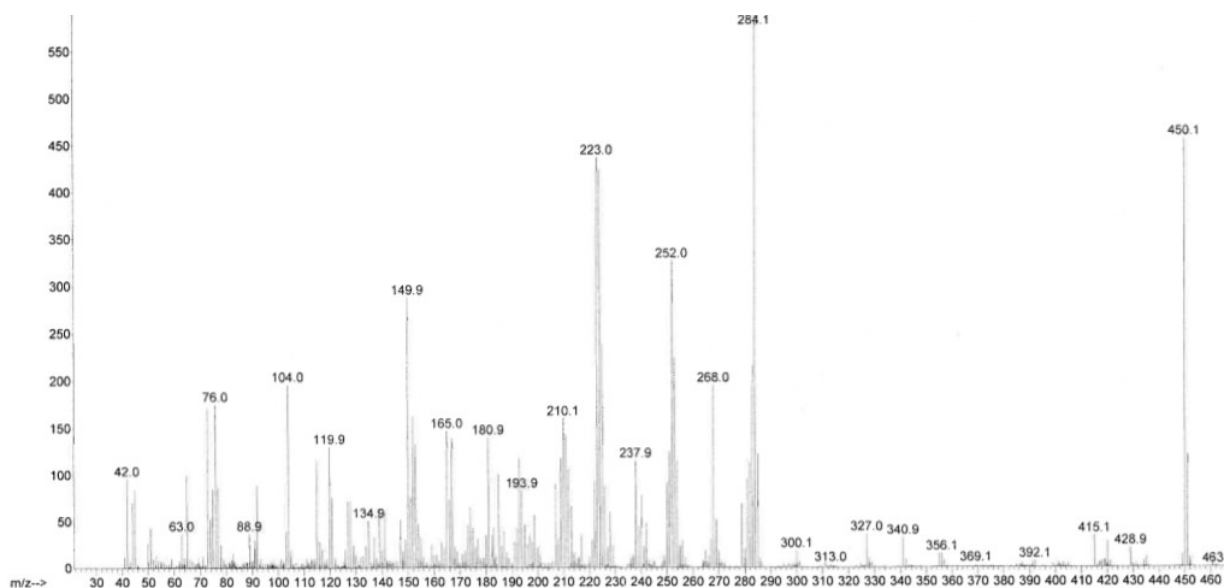
4.2 Přípravy syntetických derivátů haemanthaminu a jejich strukturní identifikace

4.2.1 Příprava 11-O-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-74)



Obrázek 15: Schéma syntézy 11-O-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu

50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l (0,539 mmol) 3-nitrobenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) 4-dimethylaminopyridinu (DMAP). Směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:Et₂NH (9:1). Byly separovány dvě zóny. 1. zóna byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a odpařena. Bylo získáno 43,4 mg produktu 11-O-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-74) v olejovité formě. Výtěžek reakce byl 59 %. Zóna 2 byla také separována z preparační desky. Podle analytické TLC a na základě určení se zjistilo, že se jedná o výchozí látku, tedy haemanthamin. Tento haemathamin byl přenesen do kádinky s dalším haemanthaminem, který byl také získán z reakcí a následně přečištěn a znovu použit u dalších syntéz.



Obrázek 16: GC-MS 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

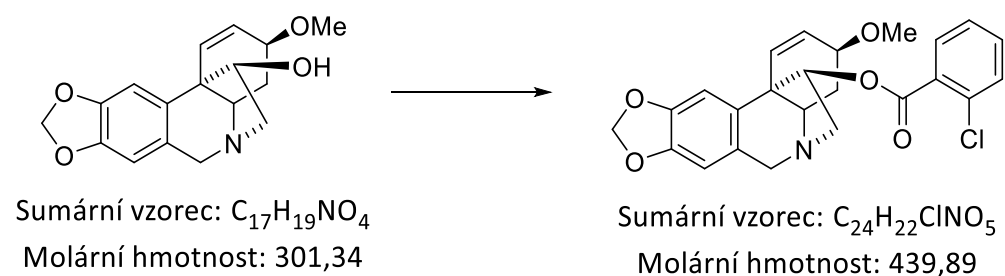
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 8.72 (1H, bs), 8.41 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 8.24 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.65 (1H, t, $J = 7.7$ Hz), 6.93 (1H, s), 6.50 (1H, s), 6.42 (1H, d, $J = 10.1$ Hz), 6.16 (1H, dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.93–5.89 (2H, m), 5.22 (1H, dd, $J = 6.7$ Hz, $J = 3.0$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.93–3.88 (1H, m), 3.77 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.60–3.42 (3H, m), 3.37 (3H, s), 2.17 (1H, dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz), 2.04 (1H, td, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.2$ Hz)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 163.3, 148.2, 146.7, 146.6, 134.9, 133.9, 131.9, 130.0, 129.7, 127.5, 127.4, 126.6, 124.3, 106.7, 103.8, 100.9, 81.6, 72.3, 62.9, 61.2, 60.9, 56.6, 49.2, 28.6

Optická otáčivost:

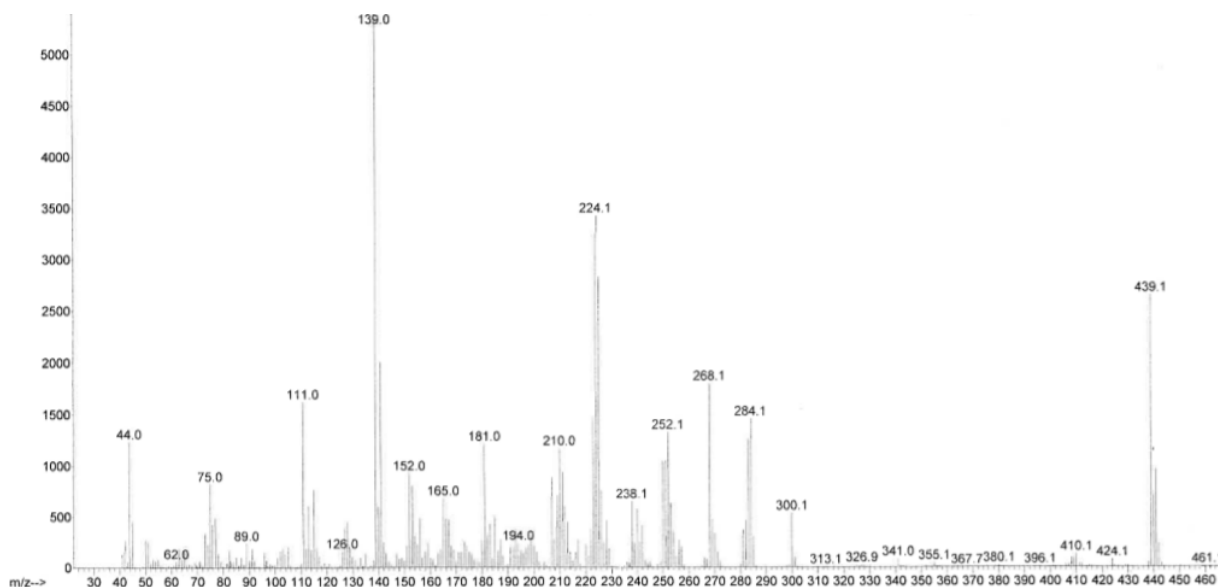
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +17,5^\circ$ ($c = 0,115$; CHCl_3)

4.2.2 Příprava 11-O-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu (LC-91)



Obrázek 17: Schéma syntézy 11-O-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu

50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l (0,571 mmol) 2-chlorobenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 4 hodiny ve zkumavce, která byla ponořena do vodní lázně při teplotě 50 °C. Následně byla reakce odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:Et₂NH (9:1). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí CHCl₃:EtOH (1:1) a odpařena. Bylo získáno 49,2 mg 11-O-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu. Výtěžek reakce byl 68 %.



Obrázek 18: GC-MS 11-O-(2-chlorobenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

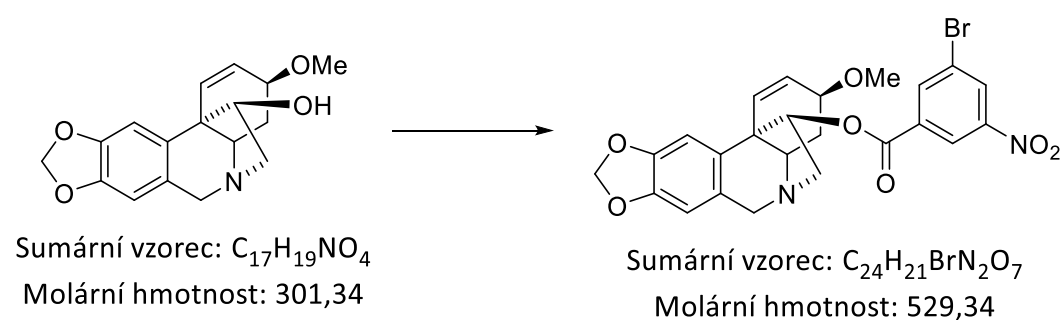
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 7.73–7.69 (1H, m), 7.47–7.40 (2H, m), 7.34–7.29 (1H, m), 6.99 (1H, s), 6.52 (1H, s), 6.44 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 6.17 (1H, dd, $J = 10.3$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.94–5.91 (2H, m), 5.25 (1H, dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 4.48 (1H, d, $J = 16.7$ Hz), 3.86 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, overlapped), 3.85–3.81 (1H, m, overlapped), 3.67–3.61 (1H, m), 3.57 (1H, dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz), 3.53 (1H, dd, $J = 13.5$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 3.35 (3H, s), 2.28–2.20 (1H, m), 2.08 (1H, td, $J = 13.5$ Hz, $J = 4.4$ Hz)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 164.5, 147.1, 146.8, 133.8, 133.6, 132.8, 131.24, 131.21, 130.0, 129.4, 126.9, 126.6, 125.0, 106.7, 104.1, 101.1, 80.8, 72.1, 63.1, 60.6, 60.1, 56.6, 49.5, 27.8

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{24} = +70,8^\circ$ ($c = 0,130$; CHCl_3)

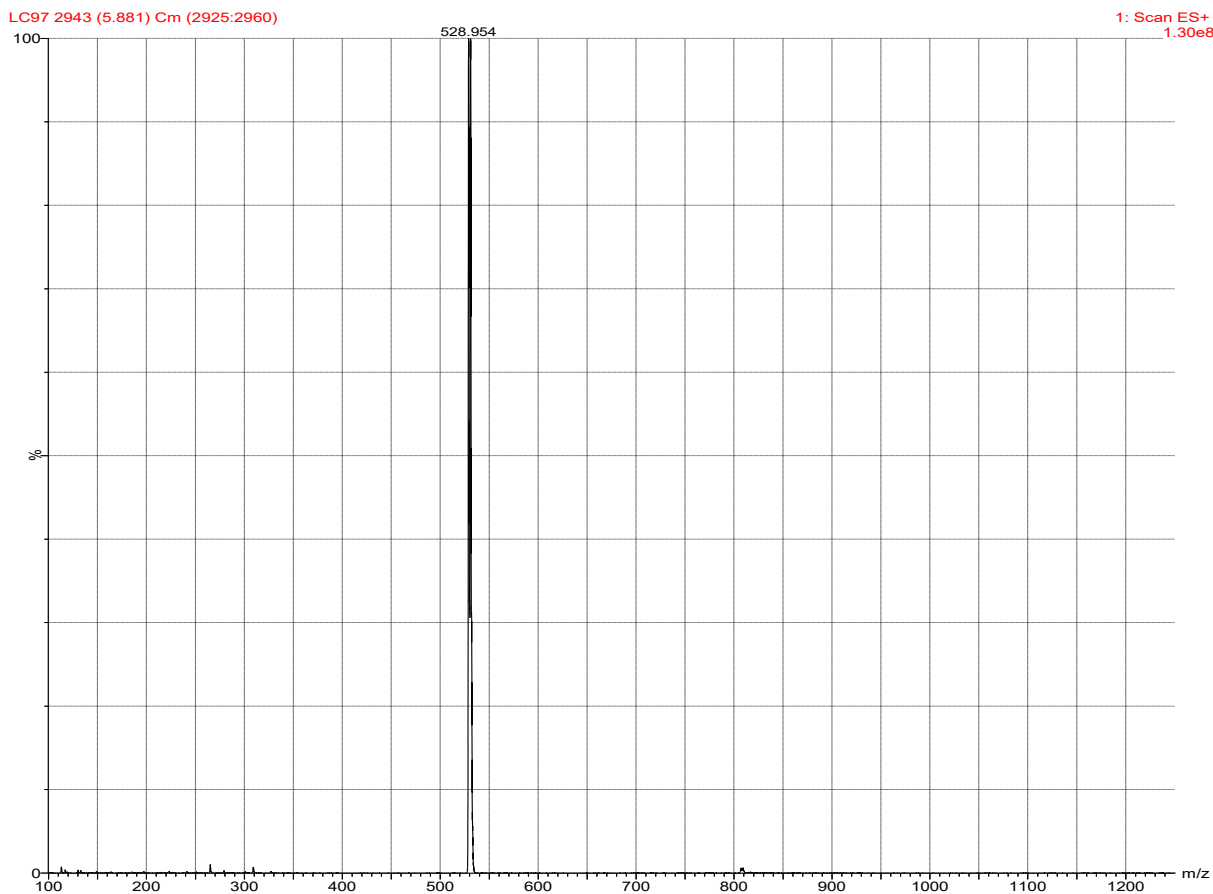
4.2.3 Příprava 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-97)



Obrázek 19: Schéma syntézy 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthaminu

50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 40 μl (0,151 mmol) 3-bromo-5-nitrobenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřátá na 60 $^\circ\text{C}$, míchána 72 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl_3 :EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC pro lepší rozlišení produktu. Použitá mobilní fáze byla $\text{To}:\text{cHx}:\text{Et}_2\text{NH}$ (60:40:5). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí CHCl_3 :EtOH (1:1) a odpařena na vakuové odparce. Bylo

získáno 15,9 mg 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthaminu ve formě světle hnědé olejovité látky. Výtěžek reakce byl 18 %.



Obrázek 20: ESI-MS 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

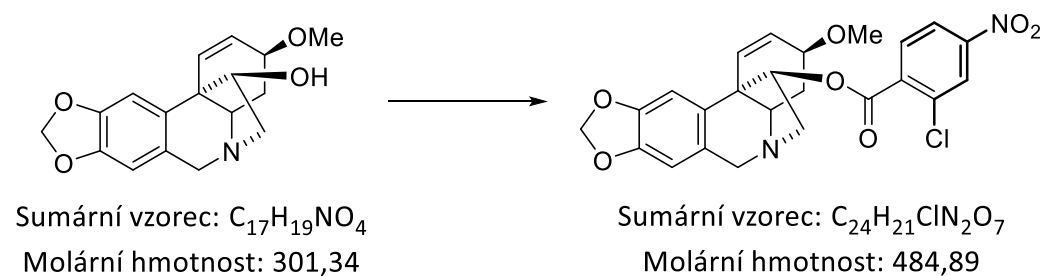
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 8.66–8.63 (1H, m), 8.58–8.55 (1H, m), 8.37–8.35 (1H, m), 6.94 (1H, s), 6.52 (1H, s), 6.42 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 6.19 (1H, dd, $J = 9.8$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.95–5.92 (2H, m), 5.23 (1H, dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 4.42 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.93–3.89 (1H, m), 3.80 (1H, d, $J = 17.1$ Hz), 3.59 (1H, dd, $J = 14.2$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.53–3.45 (2H, m), 3.39 (3H, s), 2.20 (1H, dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 2.00 (1H, td, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.4$ Hz).

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 162.2, 148.8, 146.9, 146.8, 138.0, 133.7, 133.3, 130.6, 130.2, 127.3, 126.5, 123.2, 122.8, 106.8, 103.8, 101.0, 81.9, 72.3, 62.9, 61.2, 60.8, 56.7, 49.3, 28.6.

Optická otáčivost:

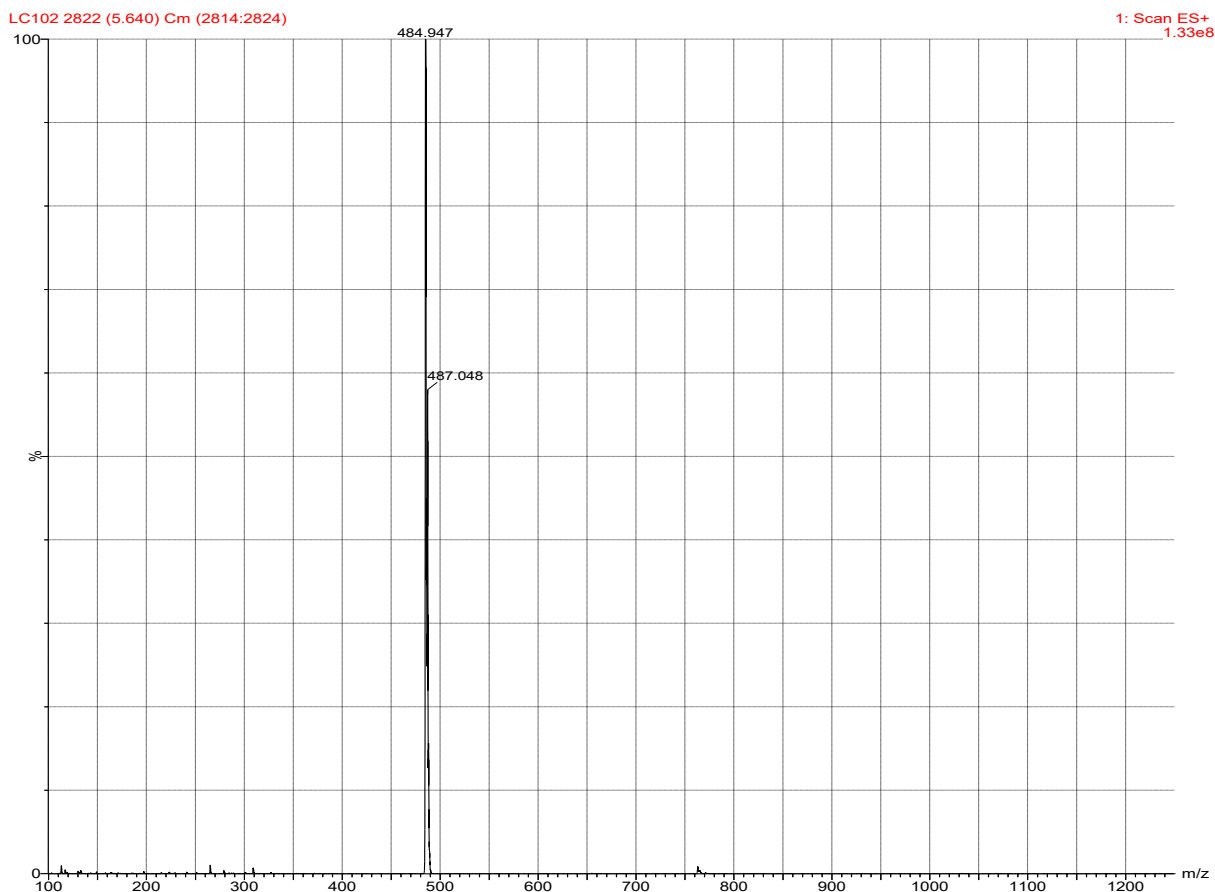
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +100,0^\circ$ ($c = 0,120$; CHCl_3)

4.2.4 Příprava 11-O-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthaminu (LC-102)



Obrázek 23: Schéma syntézy 11-O-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthaminu

60 mg (0,199 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l (0,454 mmol) 2-chloro-4-nitrobenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 80 $^{\circ}$ C, míchána 72 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$:EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs To:cHx:Et₂NH (60:40:5). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí $CHCl_3$:EtOH (1:1) a odpařena na vakuové odparce. Celý proces se průběžně kontroloval pomocí analytických TLC, díky nim se určil správný poměr směsi ve vyvíjecí fázi. Došlo k získání 41,9 mg 11-O-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthaminu ve formě hnědé olejovité látky. Výtěžek reakce byl 43 %.



Obrázek 24: ESI-MS 11-*O*-(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

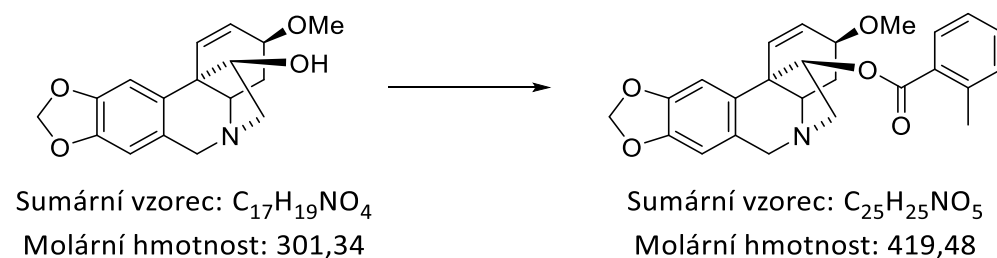
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 8.30 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 8.15 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 7.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.96 (1H, s), 6.50 (1H, s), 6.45 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 6.17 (1H, dd, $J = 10.3$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.93–5.90 (2H, m), 5.23 (1H, dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.82–3.78 (1H, overlapped, m), 3.78 (1H, overlapped, d, $J = 17.0$ Hz), 3.55 (1H, dd, $J = 14.5$ Hz, $J = 6.8$ Hz), 3.50 (1H, dd, $J = 14.5$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 3.44 (1H, dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 3.35 (3H, s), 2.10 (1H, dd, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz), 1.95 (1H, td, $J = 13.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz).

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 163.2, 149.4, 146.8, 146.7, 135.5, 134.7, 133.7, 131.8, 130.1, 127.4, 126.4, 126.1, 121.5, 106.7, 103.9, 101.0, 82.2, 72.3, 62.8, 61.1, 60.4, 56.6, 49.4, 28.3.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +41,7^\circ$ ($c = 0,115$; CHCl_3)

4.2.5 Příprava 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu (LC-90, HN-278)



Obrázek 25: Schéma syntézy 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu

Z důvodu potřeby většího množství 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu pro biologické testy, byla příprava této látky opakována dle postupu uvedeného ve vědecké DP. Ve 2 ml pyridinu se rozpustilo 50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l (0,647 mmol) 2-methylbenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 60 °C, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$:EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát vyvíjena pomocí preparační TLC pro lepší rozlišení produktu. Jako mobilní fáze byla použita směs To:cHx:Et₂NH (60:40:5). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí $CHCl_3$:EtOH (1:1) a odpařena na vakuové odparce. Celý proces se průběžně kontroloval pomocí analytických TLC, díky nim se určil správný poměr směsi ve vyvíjecí fázi. Získalo se 43,0 mg 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthaminu. Výtěžek reakce byl 63 %.

GC-MS a NMR spektra byla ve shodě s dřívější prací.

NMR studie:

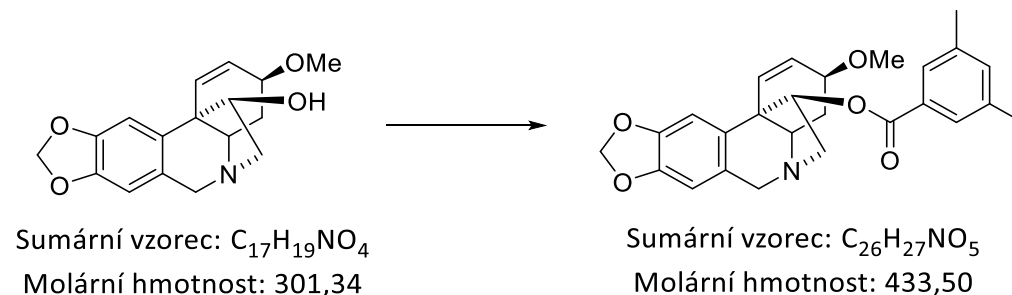
¹H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.76-7.73 (1H, m), 7.42-7.38 (1H, m), 7.25-7.21 (2H, m), 6.98 (1H, s), 6.50 (1H, s), 6.46 (1H, d, $J=10.0$ Hz), 6.15 (1H, dd, $J=10.0$ Hz, $J=4.9$ Hz), 5.91 (2H, s), 5.20 (1H, dd, $J=6.8$ Hz, $J=3.9$ Hz), 4.41 (1H, d, $J=16.6$ Hz), 3.87-3.84 (1H, m), 3.78 (1H, d, $J=16.6$ Hz), 3.56-3.43 (3H, m), 3.36 (3H, s), 2.57 (3H, s), 2.17-2.11 (1H, m), 2.10-2.03 (1H, m).

¹³C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.3, 146.7, 146.5, 140.3, 134.3, 132.0, 131.7, 130.0, 129.5, 129.3, 127.8, 126.3, 125.7, 106.6, 103.9, 100.9, 80.7, 72.4, 62.8, 61.0, 60.7, 56.5, 49.3, 28.3, 21.6.

Optická otáčivost:

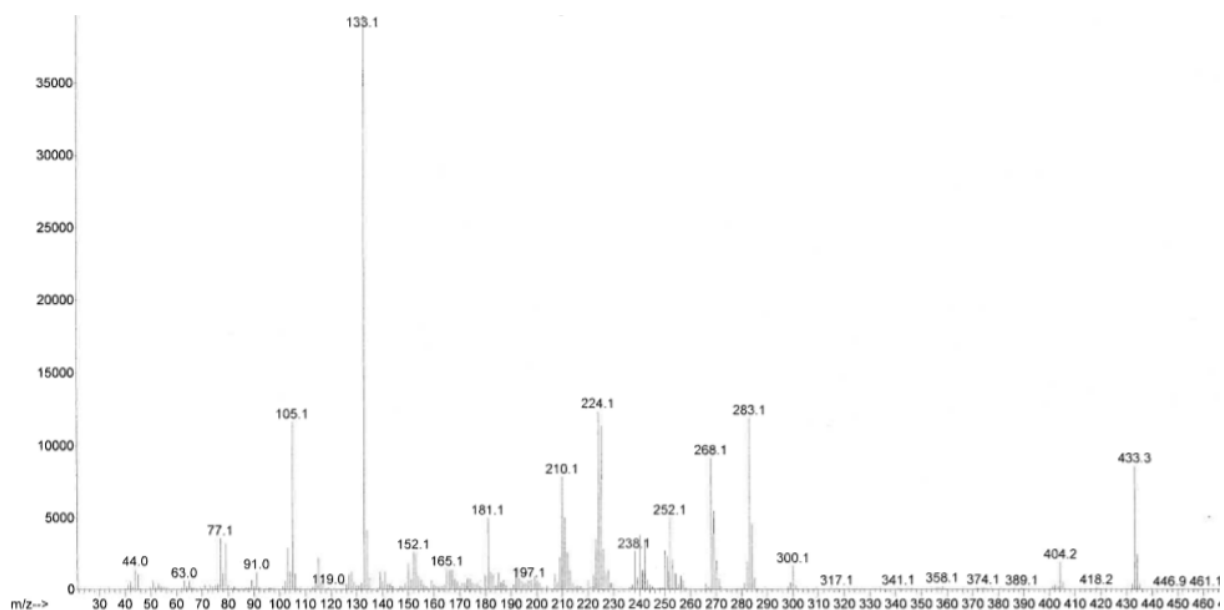
$[\alpha]_D^{24} = +33,0^\circ$ ($c = 0,135$; CHCl_3)

4.2.6 Příprava 11-O-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-107)



Obrázek 26: Schéma syntézy 11-O-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

Ve 2 ml pyridinu se rozpustilo 50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu. Dále k němu bylo přidáno 60 μl (0,356 mmol) 3,5-dimethylbenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na olejové lázni při 80 °C, míchána 48 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl_3 :EtOH (1:1) a následně byla reakce jedenkrát vyvíjena pomocí preparační TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs To:cHx:Et₂NH (60:40:5). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí CHCl_3 :EtOH (1:1), detekce pomocí Dragendorffova činidla a odpařena na vakuové odparce. Celý proces se průběžně kontroloval pomocí analytických TLC, díky nim se určil správný poměr směsi pro vyvíjecí fázi. Získalo se 35,8 mg 11-O-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu. Reakce měla výtěžek 50 %.



Obrázek 27: GC-MS 11-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

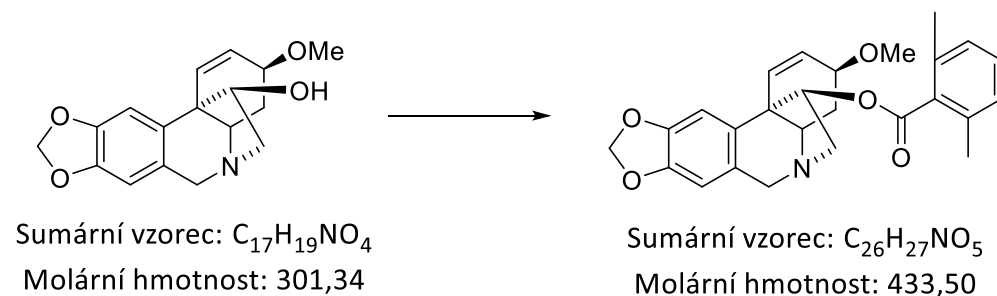
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (2H, s), 7.19 (1H, bs), 6.96 (1H, s), 6.50 (1H, s), 6.43 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.12 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.92–5.90 (2H, m), 5.19 (1H, dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 16.6$ Hz), 3.88–3.83 (1H, m), 3.78 (1H, d, $J = 16.6$ Hz), 3.57–3.41 (3H, m), 3.36 (3H, s), 2.36 (6H, s), 2.18–2.04 (2H, m)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 165.8, 146.7, 146.5, 138.0, 134.7, 134.3, 130.0, 129.4, 127.7, 127.0, 126.5, 106.6, 103.9, 100.9, 80.8, 72.5, 62.9, 61.2, 60.9, 56.5, 49.3, 28.6, 21.2

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +36,7^\circ$ ($c = 0,120$; CHCl_3)

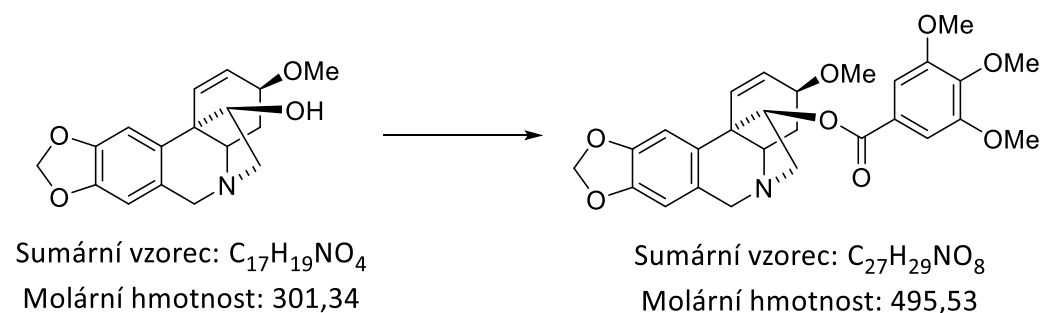
4.2.7 Příprava 11-O-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-109)



Obrázek 28: Schéma syntézy 11-O-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 40 μ l (0,237 mmol) 2,6-dimethylbenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 80 °C, míchána 48 hodin, ale dle analytické TLC bylo vidět, že reakce ještě nezreagovala. Přidalo se opět 40 μ l 2,6-dimethylbenzoylchloridu a katalytické množství DMAP. Reakce byla postavena na olejovou lázeň tentokrát při otáčkách 100 rpm a zahřáta na 90 °C. Za těchto podmínek ponechána dalších 48 hodin. Po několika provedených analytických TLC, kdy bylo stále jasně viditelné, že reakce neproběhla, se odebral vzorek na GC-MS analýzu. Bohužel se zjistilo, že došlo k nezreagování a nedochází tedy k přípravě derivátu 11-O-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthaminu. Z chemické struktury se dá usoudit, že důvodem nezreagování je sterické bránění v poloze 2 a 6.

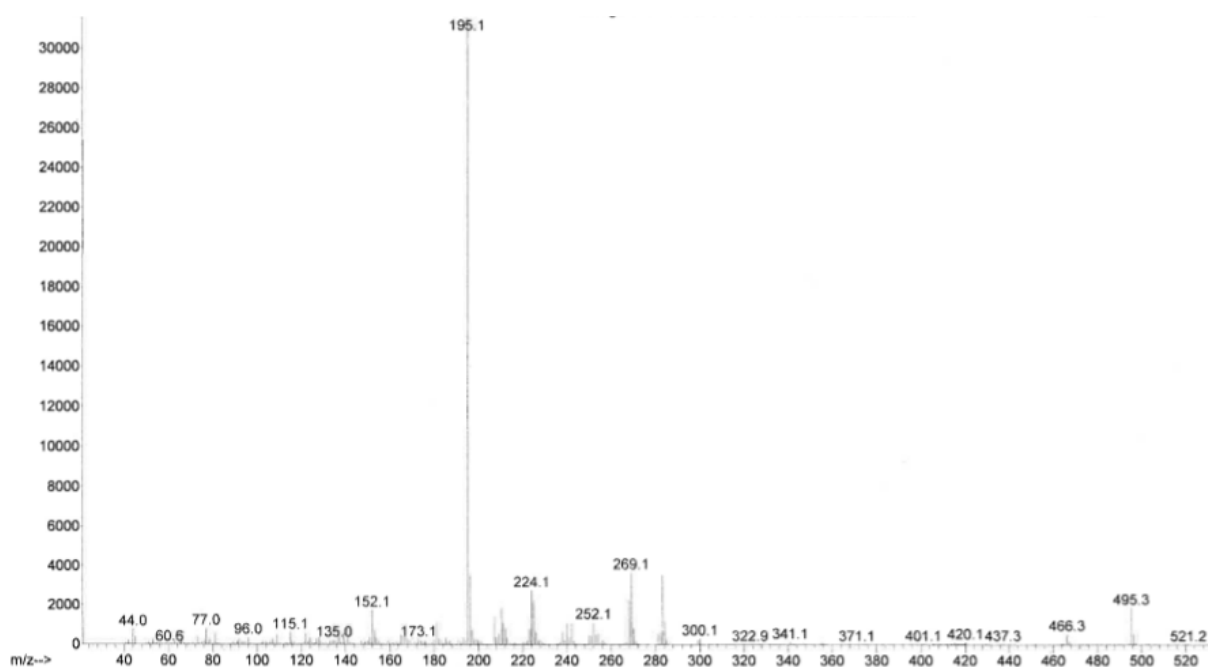
4.2.8 Příprava 11-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-120)



Obrázek 29: Schéma syntézy 11-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthaminu

65 mg (0,216 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 40 μ g (0,173 mmol) 3,4,5-trimethoxybenzoylchloridu a katalytické

množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 50 °C, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl₃:EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC pro lepší rozlišení produktu. Použití mobilní fáze bylo To:Et₂NH (9:1). Na separační desce byly dvě zóny, které by mohly být produktem. Muselo dojít k separaci každé zóny zvlášť a na základě provedené GC-MS analýzy se vyhodnotilo, že 3,4,5-trimethoxybenzoylhaemanthamin je v první zóně. Následně proces probíhal stejně jako u předchozích reakcí a bylo získáno 79,7 mg 11-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthaminu ve formě světle hnědé olejovité látky. Výtěžek reakce byl 75 %.



Obrázek 30: GC-MS 11-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

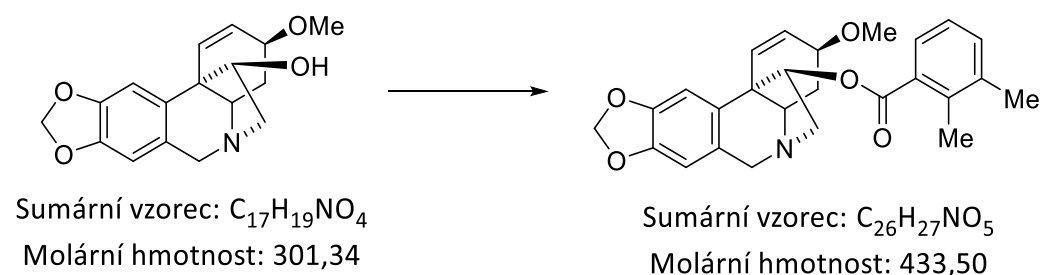
¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ: 7.18 (2H, s), 6.92 (1H, s), 6.49 (1H, s), 6.45 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 6.15 (1H, dd, *J* = 9.8 Hz, *J* = 4.9 Hz), 5.91–5.87 (2H, m), 5.14 (1H, dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 3.2 Hz), 4.38 (1H, d, *J* = 16.6 Hz), 3.89 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.86–3.82 (1H, m), 3.76 (1H, d, *J* = 16.6 Hz), 3.55 (1H, dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 6.8 Hz), 3.46–3.38 (2H, m), 3.34 (3H, s), 2.16–2.10 (1H, m), 2.06 (1H, td, *J* = 13.2 Hz, *J* = 3.9 Hz)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 164.9, 152.9, 146.6, 146.5, 142.3, 134.2, 129.3, 128.0, 126.6, 125.0, 106.6, 106.5, 103.8, 100.8, 81.0, 72.6, 62.8, 61.2, 60.8, 56.5, 56.1, 49.0, 28.5

Optická otáčivost:

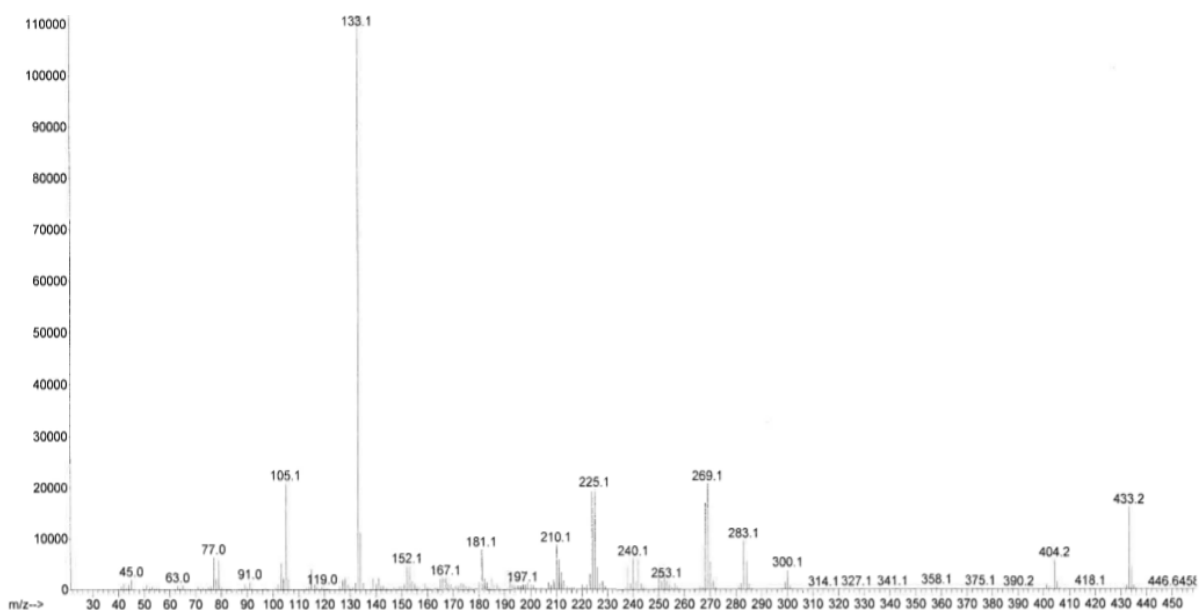
$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +55,0^\circ$ ($c = 0,160$; CHCl_3)

4.2.9 Příprava 11-O-(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-122)



Obrázek 31: Schéma syntézy 11-O-(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

55 mg (0,183 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μl (0,593 mmol) 2,3-dimethylbenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 80 $^\circ\text{C}$, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl_3 :EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC pro lepší rozlišení produktu. Jednalo se o mobilní fázi To:cHx:Et₂NH (60:40:5). Následně proces probíhal stejně jako u předchozích reakcí a bylo získáno 34,0 mg 11-O-(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthaminu. Výtěžek reakce byl 43 %.



Obrázek 32: GC-MS 11-*O*-(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

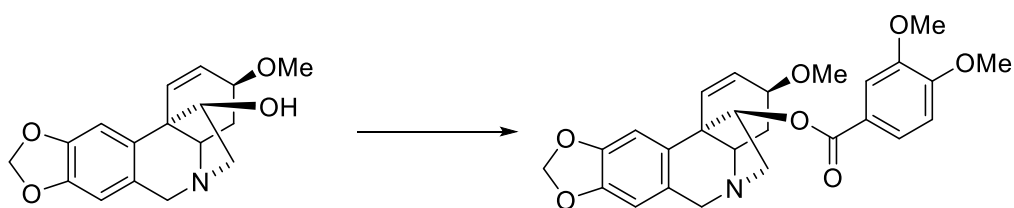
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 7.48 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.29 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.99 (1H, s), 6.50 (1H, s), 6.49 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.16 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.91 (2H, s), 5.19 (1H, dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.88–3.83 (1H, m), 3.77 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.53 (1H, dd, $J = 14.2$ Hz, $J = 7.3$ Hz), 3.49–3.40 (2H, m), 3.36 (3H, s), 2.43 (3H, s), 2.32 (3H, s), 2.13–2.08 (1H, m), 2.04 (1H, td, $J = 13.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 167.4, 146.7, 146.5, 138.0, 137.8, 134.5, 133.2, 130.7, 129.6, 128.0, 127.2, 126.6, 125.1, 106.6, 104.0, 100.9, 80.9, 72.5, 62.9, 61.2, 60.8, 56.5, 49.3, 28.5, 20.5, 16.5

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +67,7^\circ$ ($c = 0,130$; CHCl_3)

4.2.10 Příprava 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-123)



Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$

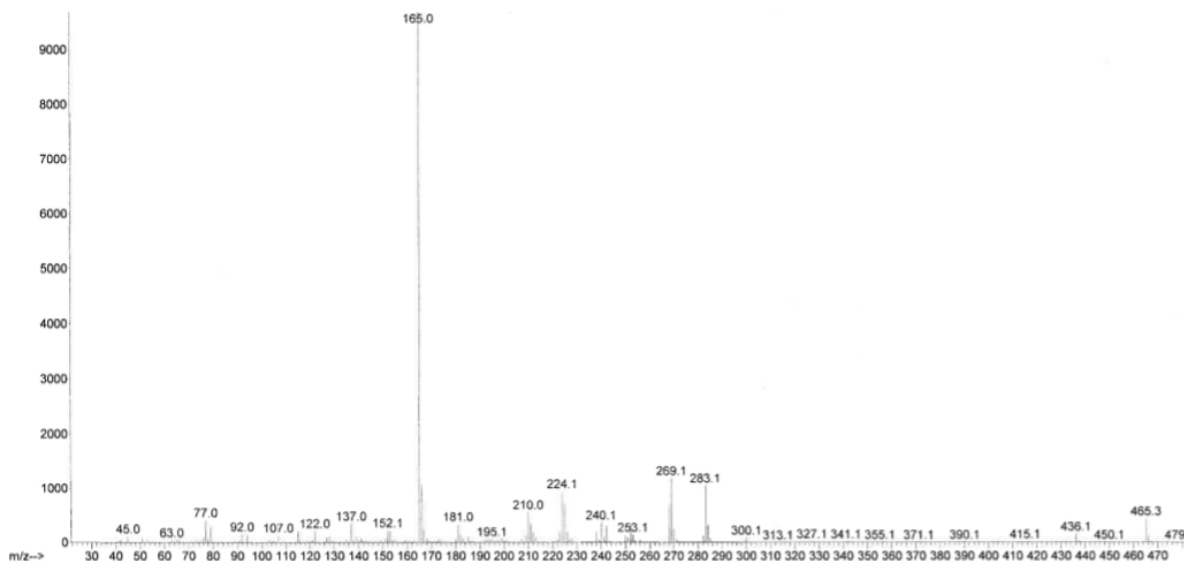
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: $C_{26}H_{27}NO_7$

Molární hmotnost: 465,50

Obrázek 33: Schéma syntézy 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu

50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno cca 40 μ g (0,199 mmol) 3,4-dimethoxybenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla dána na olejovou lázeň a zahřátá na 80 °C, míchána 72 hodin. Následně byla reakce odpařena do sucha a odparek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$:EtOH (1:1). Následovala příprava mobilní fáze To:EtOAc:Et₂NH (60:20:10), kvůli lepšímu oddělení vrstev a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí $CHCl_3$:EtOH (1:1) za pomoci detekce a použití Dragendorffova činidla. Reakce byla odpařena na vakuové odparce a převedena do vialky. Bylo získáno 31,8 mg 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu. Výtěžek reakce byl 42 %.



Obrázek 34: GC-MS 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

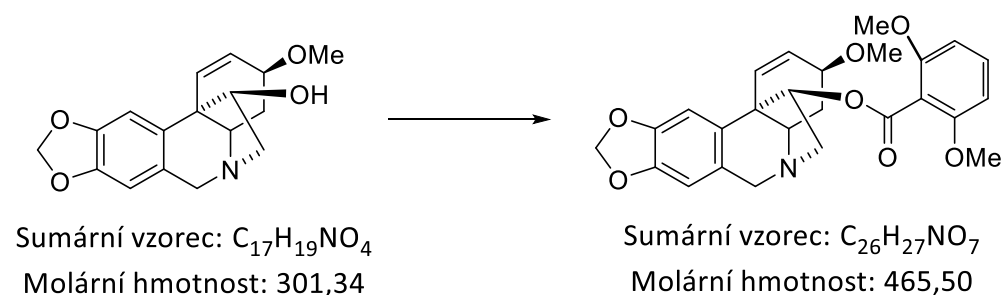
^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 7.54 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.94 (1H, s), 6.88 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.49 (1H, s), 6.44 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 6.12 (1H, dd, $J = 10.3$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.90 (1H, d, overlapped, $J = 5.3$ Hz), 5.90 (1H, d, overlapped, $J = 5.3$ Hz), 5.29 (1H, s), 5.16 (1H, dd, $J = 6.9$ Hz, $J = 3.4$ Hz), 4.39 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.93 (3H, s), 3.91 (3H, s), 3.87–3.83 (1H, m), 3.76 (1H, d, $J = 16.9$ Hz), 3.53 (1H, dd, $J = 14.2$ Hz, $J = 6.9$ Hz), 3.46–3.40 (1H, m), 3.35 (3H, s), 2.16–2.03 (2H, m)

^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 165.2, 153.1, 148.6, 146.7, 146.5, 134.4, 129.3, 127.9, 126.6, 123.1, 122.6, 111.8, 110.3, 106.6, 103.9, 100.8, 80.8, 72.6, 62.9, 61.3, 61.2, 56.5, 56.0, 55.9, 49.1, 28.6

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +78,7^\circ$ ($c = 0,006$; CHCl_3)

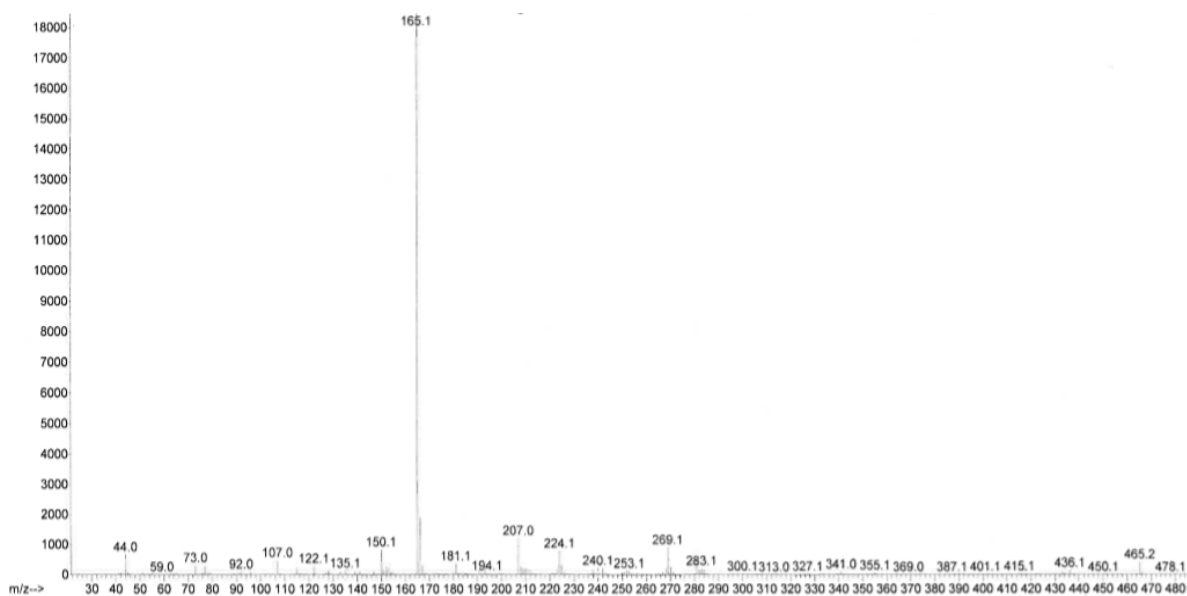
4.2.11 Příprava 11-*O*-(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-124)



Obrázek 35: Schéma syntézy 11-*O*-(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu

55 mg (0,183 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 40 μl (0,199 mmol) 2,6-dimethoxybenzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla dána na olejovou lázeň a zahřátá na 80 °C, míchána 24 hodin při otáčkách 250rpm. Poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi CHCl_3 :EtOH (1:1). Nejprve byly připraveny analytické TLC ve směsi CH_2Cl_2 :EtOAc:MeOH:Et₂NH (45:45:5:5) a druhé TLC ve směsi To:Et₂NH (95:5). Po dvou analytických deskách bylo zjištěno, že reakce ještě nezreagovala dostatečně a bylo nutno ji dále ponechat 48 hodin

reagovat. Následně po dalším analytickém TLC tentokrát ve směsi To:Et₂NH (9:1), bylo zřejmé, že reakce proběhla. Použitá mobilní fáze byla To:Et₂NH (9:1). Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí CHCl₃:EtOH (1:1) a odpařena na vakuové odparce. Bylo získáno 25,0 mg 11-*O*-(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu ve formě světle hnědé olejovité látky. Výtěžek reakce byl 29 %.



Obrázek 36: GC-MS 11-*O*-(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

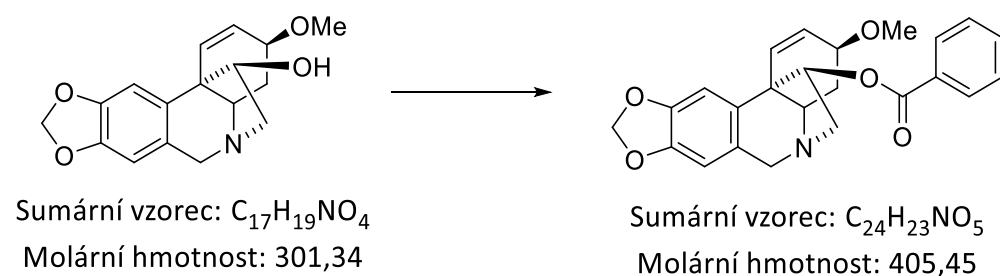
¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ: 7.28 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, overlapped), 6.97 (1H, s), 6.54 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.49 (1H, s, overlapped), 6.48 (1H, d, *J* = 10.3 Hz, overlapped), 6.14 (1H, dd, *J* = 10.3 Hz, *J* = 5.4 Hz), 5.92–5.89 (2H, m), 5.13 (1H, dd, *J* = 6.8 Hz, *J* = 3.4 Hz), 4.38 (1H, d, *J* = 16.9 Hz), 3.80 (6H, s), 3.75 (1H, d, *J* = 16.9 Hz), 3.60–3.52 (2H, m), 3.45–3.36 (2H, m) 3.34 (3H, s), 2.02–1.97 (2H, m)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ: 165.5, 157.5, 146.5, 146.3, 134.8, 131.0, 129.1, 127.7, 126.6, 112.8, 106.5, 104.0, 103.9, 100.8, 81.4, 72.8, 63.0, 61.4, 61.2, 56.4, 55.8, 48.6, 28.0

Optická otáčivost:

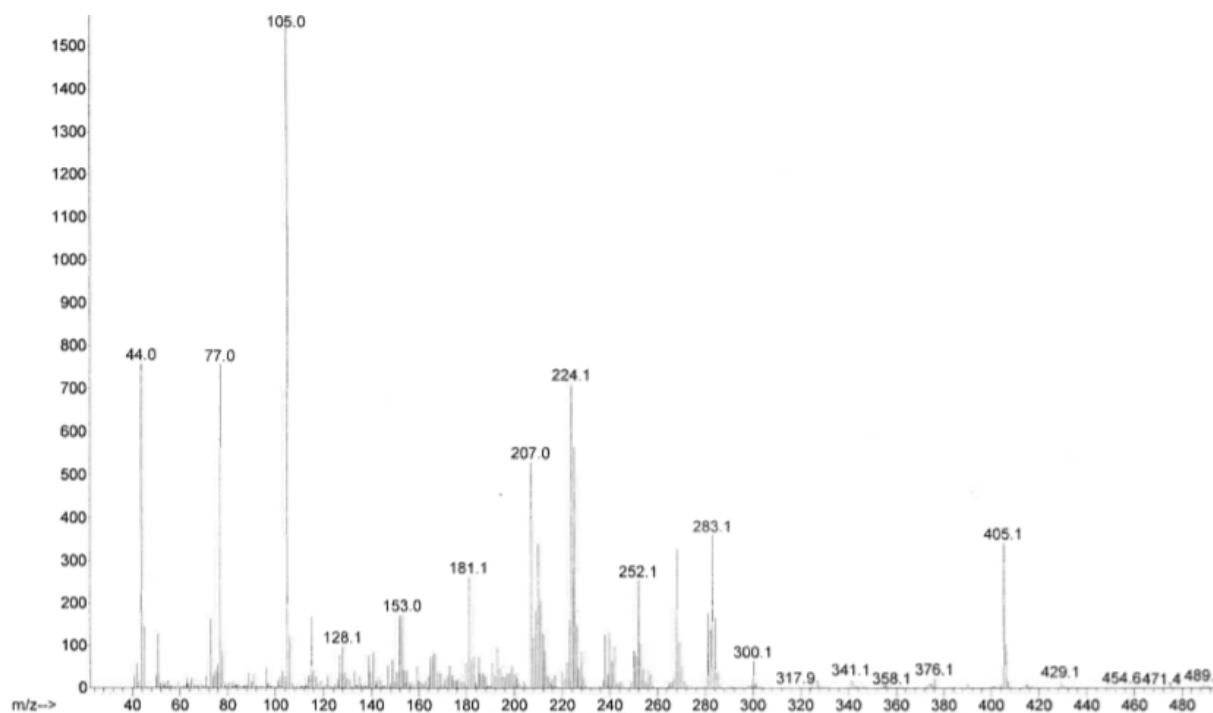
$[\alpha]_D^{24} = +11,9^\circ$ (*c* = 0,135; CHCl₃)

4.2.12 Příprava 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu (LC-118)



Obrázek 37: Schéma syntézy 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu

Z důvodu potřeby většího množství 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu pro biologické testy, byla příprava této látky opakována dle postupu uvedeného ve vědecké DP. 50 mg (0,164 mmol) haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l (0,711 mmol) benzoylchloridu a katalytické množství (2 mg) DMAP. Reakce byla zahřáta na 60 °C, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi $CHCl_3$:EtOH (1:1) a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC pro lepší rozlišení produktu. Jednalo se o mobilní fázi To:cHx:Et₂NH (60:40:5). Následně proces probíhal stejně jako u předchozích reakcí a bylo získáno 64,13 mg 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu. Výtěžek reakce byl 96 %.



Obrázek 38: GC-MS 11-*O*-(benzoyl)haemanthaminu

NMR studie:

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.12-8.07 (1H, m), 7.94-7.90 (2H, m), 7.59-7.54 (1H, m), 7.46-7.41 (2H, m), 6.96 (1H, s), 6.51 (1H, s), 6.43 (1H, d, $J=10.0$ Hz), 6.13 (1H, dd, $J=10.0$ Hz, $J=4.9$ Hz), 5.91 (1H, d, overlapped, $J=4.4$ Hz), 5.91 (1H, d, overlapped, $J=4.4$ Hz), 4.44 (1H, d, $J=16.9$ Hz), 3.89-3.85 (1H, m), 3.82 (1H, d, $J=16.9$ Hz), 3.57-3.54 (2H, m), 3.49 (1H, dd, $J=13.2$ Hz, $J=4.4$ Hz), 3.35 (3H, s), 2.23-2.18 (1H, m), 2.13 (1H, td, $J=13.2$ Hz, $J=4.4$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.4, 146.8, 146.6, 134.0, 133.1, 131.9, 130.0, 129.6, 129.3, 128.4, 128.0, 127.4, 126.0, 106.7, 103.9, 100.9, 80.6, 72.3, 62.8, 60.9, 60.5, 56.5, 49.3, 28.2.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +42,1^\circ$ ($c = 0,133$; CHCl_3)

5. Výsledky

5.1 Příprava polosyntetických derivátů

Tabulka 14: Připravené sloučeniny a jejich procentuální výtěžek z reakcí

Označení látky	Chemický název	Výtěžek (%)
LC-74	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemanthamin	59
LC-91	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemanthamin	68
LC-97	11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthamin	18
LC-102	11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthamin	43
LC-90	11- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)haemanthamin	63
LC-107	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthamin	50
LC-109	11- <i>O</i> -(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin	nezreagovalo
LC-120	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin	75
LC-122	11- <i>O</i> -(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthamin	43
LC-123	11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	42
LC-124	11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	29
LC-118	11- <i>O</i> -(benzoyl)haemanthamin	96

5.2 Screening biologických aktivit

5.2.1 Inhibiční aktivita derivátů proti AChE a BuChE a jejich přestup přes BBB

Tabulka 15: Hodnoty IC_{50} testovaných derivátů haemanthaminu v porovnání se standardem galanthaminem

	AChE (μ M)	BuChE (μ M)	logBB ^a
haemanthamin	> 100	> 100	- 0,309
LC-74	3,99 \pm 0,25	> 100	0,039
LC-91	13,70 \pm 0,76	5,61 \pm 0,62	0,256
LC-97	12,79 \pm 0,53	> 100	0,234
LC-102	9,88 \pm 0,78	> 100	0,220
LC-90	18,18 \pm 1,30	6,59 \pm 1,19	0,175
LC-107	> 100	> 100	0,197
LC-120	> 100	> 100	0,015
LC-122	> 100	> 100	0,030
LC-123	> 100	> 100	0,023
LC-124	n.	n.	0,023
LC-118	> 100	5,85 \pm 0,31	0,285
galanthamin	1,07 \pm 0,18	42,30 \pm 1,30	0,047

n. = prozatím neměřeno, bude se testovat

^a vypočteno přes <http://www.way2drug.com/geb/>

LogBB je nejběžnější číselná hodnota popisující permeabilitu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Je definován jako logaritmický poměr mezi koncentrací sloučeniny v mozku a krvi. Hodnoty logBB vypočtených sloučenin se pohybují od 0,007 do 0,285 až na haemanthamin samotný. Sloučeniny s logBB > 0,3 snadno procházejí HEB, zatímco ty s logBB < -1,0 jsou pouze špatně distribuovány do mozku⁵⁸.

Dále byly neaktivnější deriváty testovány pro pasivní transport PAMPA (**Tabulka 16**).

Tabulka 16: Získané hodnoty pro pasivní transport prostupnosti přes HEB⁵⁸

	PAMPA –HEB propustnost ($10^{-6} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) ^a
LC-74	19,9 \pm 0,9 (CNS+)
LC-90	5,8 \pm 0,9 (CNS+)
LC-91	14,8 \pm 0,4 (CNS+)
LC-118	8,4 \pm 0,2 (CNS+)

^a CNS(+): vysoká HEB propustnost se předpokládá u hodnot > 4,0; CNS(-): nízká HEB propustnost se předpokládá u hodnot < 2,0; CNS(+/-): nejistá propustnost skrz HEB se předpokládá u hodnot od 4,0 do 2,0

5.2.2 Protinádorová aktivita derivátů

Vybrané nádorové buněčné linie a nenádorové buněčné linie jako Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), A549 (karcinom plic), HT-29 (kolorektální adenokarcinom), PANC-1 (karcinom pankreatického epitelu), A2780 (karcinom vaječníku), HeLa (cervikální adenokarcinom), MCF-7 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) and MRC-5 (normální plicní fibroblasty) byly zakoupeny buď od ATCC (Manassas, USA) nebo od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a kultivované podle doporučených postupů. Všechny buněčné linie byly udržovány na teplotě 37 °C a ve zvlhčeném 5% oxidu uhličitém a z 95 % ve vzdušném inkubátoru. Jako standard se uvádí protinádorové chemoterapeutikum doxorubicin²⁷ (**Tabulka 17**, **Tabulka 18**).

Tabulka 17: Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10 μM)

	LC-74	LC-91	LC-97	LC-102	LC-90	LC-107	Doxorubicin
Jurkat	87 ± 5	119 ± 3	87 ± 7	101 ± 7	95 ± 11	94 ± 4	1 ± 0
MOLT-4	78 ± 7	104 ± 9	58 ± 4	92 ± 13	91 ± 3	90 ± 8	1 ± 2
A549	78 ± 2	104 ± 12	65 ± 4	97 ± 3	96 ± 8	95 ± 1	17 ± 6
HT-29	84 ± 7	105 ± 5	69 ± 6	95 ± 13	98 ± 6	98 ± 10	57 ± 4
PANC-1	77 ± 6	107 ± 14	79 ± 4	96 ± 14	95 ± 6	114 ± 8	67 ± 7
A2780	101 ± 9	142 ± 17	92 ± 5	102 ± 2	129 ± 11	148 ± 17	11 ± 2
HeLa	85 ± 8	99 ± 4	89 ± 2	99 ± 6	104 ± 4	106 ± 6	25 ± 11
MCF-7	61 ± 9	105 ± 11	45 ± 3	88 ± 9	112 ± 3	56 ± 10	36 ± 3
SAOS-2	71 ± 5	104 ± 10	70 ± 7	88 ± 6	97 ± 17	111 ± 24	27 ± 5
MRC-5	73 ± 3	101 ± 6	65 ± 4	89 ± 5	112 ± 9	87 ± 8	52 ± 7

Tabulka 18: Testované deriváty na vybrané buněčné linie a jejich hodnoty viability v % (proliferace buněk po 48 hod, koncentrace 10 μ M)

	LC-120	LC-122	LC-123	LC-124	LC-118	Doxorubicin
Jurkat	95 \pm 7	121 \pm 11	99 \pm 9	108 \pm 2	104 \pm 3	1 \pm 0
MOLT-4	86 \pm 7	115 \pm 11	85 \pm 4	113 \pm 6	100 \pm 11	1 \pm 2
A549	100 \pm 11	118 \pm 6	101 \pm 6	114 \pm 12	105 \pm 9	17 \pm 6
HT-29	112 \pm 12	122 \pm 5	98 \pm 1	109 \pm 7	111 \pm 12	57 \pm 4
PANC-1	99 \pm 10	102 \pm 10	100 \pm 2	113 \pm 3	100 \pm 5	67 \pm 7
A2780	103 \pm 1	147 \pm 10	102 \pm 1	122 \pm 9	131 \pm 7	11 \pm 2
HeLa	97 \pm 9	109 \pm 7	84 \pm 4	94 \pm 8	87 \pm 7	25 \pm 11
MCF-7	76 \pm 10	103 \pm 5	89 \pm 4	113 \pm 2	94 \pm 8	36 \pm 3
SAOS-2	95 \pm 12	108 \pm 7	97 \pm 14	100 \pm 6	105 \pm 9	27 \pm 5
MRC-5	92 \pm 6	106 \pm 13	96 \pm 6	118 \pm 7	96 \pm 7	52 \pm 7

5.3 Optická otáčivost

Tabulka 19: Přehled optické otáčivosti u připravených derivátů

	Spec. otáčivost (°)
haemanthamin	59,1
LC-74	17,5
LC-91	70,8
LC-97	100,0
LC-102	41,7
LC-90	33,0
LC-107	36,7
LC-120	55,0
LC-122	67,7
LC-123	78,7
LC-124	11,9
LC-118	42,1

6. Diskuse a závěr

Tato diplomová práce navazuje na předchozí diplomové práce, které byly vypracovány na Katedře farmaceutické botaniky. Diplomové práce Mgr. Jany Markové a Mgr. Zuzany Kavkové se také zabývaly přípravou derivátů alkaloidu haemanthaminu. V rámci těchto prací byly připraveny především alifatické a pilotní aromatické deriváty^{66,67}. Předmětem diplomové práce Viery Bodoríkové byla rovněž příprava aromatických esterů haemanthaminu, připravovala ale odlišné deriváty většinou disubstituované. Zároveň je na katedře studován alkaloid ambellin, který se liší od haemanthaminu pouze orientací 5,10b-ethanového můstku a navíc methoxy skupinou v poloze C-7. Přípravou derivátů a studiem jejich biologické aktivity se zabývá Aneta Ritomská³².

V rámci předložené studie bylo syntetizováno jedenáct aromatických derivátů alkaloidu haemanthaminu. Připravováno bylo celkem dvanáct, bohužel jeden derivát 11-*O*-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin (LC-109) se nepodařilo připravit. Příčinou bylo nejspíše sterické bránění methylových skupin v polohách 2 a 6. Všechny syntézy probíhaly v prostředí bezvodého pyridinu za přítomnosti katalyzátoru DMAP. Pro přípravu esterů byly použity různé substituované benzoylchloridy. Pro získání a přečištění příslušných derivátů byla použita preparační TLC. Připravené sloučeniny byly identifikovány pomocí MS, NMR a optické otáčivosti. Některé deriváty byly získány ve formě bílých až žlutých krystalů a některé měly konzistenci oleje hnědé barvy.

Čtyři deriváty (LC-74, LC-90, LC-123, LC-118) byly již dříve připraveny na Katedře farmaceutické botaniky, ale z důvodu nedostatečného množství a za účelem dalších biologických studií byly syntetizovány znovu. Reakce ostatních derivátů byly provedeny na Katedře farmaceutické botaniky poprvé.

V rámci studií byly deriváty, které se podařilo připravit v dostatečném množství, studovány na jejich inhibiční potenciál vůči lidským cholinesterázám. Účinná inhibice cholinesteráz je spojena s možnou terapií AD⁵. Všechny látky byly nejprve podrobeny screeningové studii při koncentraci 100 μM . Deriváty vykazující inhibice minimálně ve výši 45% vůči AChE a 50% vůči BuChE byly dále vybrány pro stanovení hodnoty IC_{50} . Jako standard byl použit galanthamin, který se již v terapii AD využívá ve formě hydrobromidu⁶. V rámci hAChE studie nejzajímavější inhibiční potenciál vykázal derivát označený jako LC-74 (11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthamin; $\text{IC}_{50} = 3,99 \pm 0,25 \mu\text{M}$). Tato látka navíc vykazovala

selektivitu vůči AChE. Hodnota IC_{50} není příliš vzdálená od hodnoty IC_{50} galanthaminu ($IC_{50} = 1,07 \pm 0,18 \mu M$). Ostatní deriváty vykazovaly spíše slabší hAChE inhibiční potenciál. Oproti tomu v rámci hBuChE studie se podařilo připravit dvě látky s aktivitou významně vyšší než pro galanthamin ($IC_{50} = 42,30 \pm 1,30 \mu M$). Jednalo se o deriváty LC-90 (11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin; $IC_{50} = 6,59 \pm 1,19 \mu M$) a LC-118 (11-*O*-(benzoyl)haemanthamin; $IC_{50} = 5,85 \pm 0,31 \mu M$). V případě derivátu LC-90 se jednalo o látku vykazující inhibiční potenciál vůči oběma cholinesterázám ($IC_{50AChE} = 18,18 \pm 1,30 \mu M$). Látka LC-118 disponuje selektivní inhibicí hBuChE. Selektivní inhibice vůči BuChE by mohla být zajímavým terapeutickým cílem pro léčbu pokročilých stádií AD⁶⁸, kdy aktivita a koncentrace BuChE výrazně narůstá. Inhibiční potenciál BuChE LC-118 je srovnatelný s potenciálem látek izolovaných z *Buxus hyrcana*⁶⁹. Jednalo se o triterpenoidní alkaloidy hyrkatrieninu a *N*_b-dimethylcykloxobuxoviricinu, které selektivně inhibovaly BuChE s hodnotami IC_{50} kolem $1 \mu M$ ⁶⁹.

Deriváty byly dále studovány z pohledu jejich inhibičního potenciálu vůči enzymu GSK-3 β . Tento enzym se uplatňuje především v tvorbě neurofibrilárních klubek, což je jeden z nejvýraznějších patofyziologických projevů AD⁴¹. Prozatím byly studovány pouze tři deriváty, z nichž nejzajímavější aktivitu vykázal již zmíněný derivát LC-74 ($c = 50 \mu M$; $70 \pm 6 \%$; $IC_{50} = 31 \pm 0 \mu M$). Ostatní látky budou studovány v rámci spolupráce s univerzitou v Bologni v nejbližší době.

U látek, které by měly zasahovat do CNS, je již na začátku studie nutné vědět, zda látky budou přestupovat přes HEB a zda budou schopny dosáhnout cílového místa. Z těchto důvodů byl studován i potenciál látek přecházet přes HEB pasivním transportem (**Tabulka 16**) a dále byla počítána hodnota logBB (**Tabulka 15**). Na základě získaných výsledků je možné konstatovat, že všechny aktivní látky 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthamin (LC-74), 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (LC-90), 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthamin (LC-91) a 11-*O*-(benzoyl)haemanthamin (LC-118) jsou schopné přestupovat přes HEB do CNS. Dle studií lze konstatovat, že prozatím je nejlepší substituce na aromatickém jádře do polohy dva a to právě methylovou skupinou⁵⁸.

Všechny připravené deriváty byly studovány také z pohledu jejich cytotoxického působení. Pro tuto studii byl použit panel devíti nádorových buněčných linií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2) a jedna linie zdravých buněk (MRC-5). Bohužel žádný z derivátů nevykázal významnou cytotoxickou aktivitu. Nejzajímavější aktivitu

v testu viability lze nalézt u derivátu 11-*O*-(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthamin (LC-97), a to zejména proti nádorové buněčné linii MCF-7 ($45 \pm 3 \%$), obecně ale lze říci, že látky nejsou z pohledu toxicity vůči nádorovým buňkám zajímavé. Dá se tedy usuzovat, že ve spektru připravených derivátů v rámci této studie substituce v pozici C-11 cytotoxickou aktivitu ruší. Pro objasnění podrobnějších vztahů mezi aktivitou a strukturou je třeba se v budoucnu pokusit o přípravu dalších esterových derivátů. Bylo by vhodné zkusit též přípravu etherových derivátů, které v buňce nepodléhají hydrolýze a tudíž jsou stabilnější.

7. Seznam použitých zkratek

AA	Amaryllidaceae
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba
BuChE	Butyrylcholinesteráza
cHx	Cyklohexan
COX	Cyklooxygenáza
cv.	Kultivar (pěstovaná odrůda)
DCC	Dicyklohexylkarboimid
DCM	Dichloromethan
DMAP	Dimethylaminopyridin
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
GC	Plynová chromatografie
GSK-3 β	Glykogen syntáza kináza - 3 β
hAChE	Lidská sérová acetylcholinesteráza
hBuChE	Lidská sérová butyrylcholinesteráza
HEB	Hematoencefalická bariéra
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace
MeOH	Methanol
NBS	N-bromsukcimid
p-53	Transkripční faktor v buňce
PAL	Fenylalanin-lyáza
Pd/C	Katalyzátor palladia na aktivním uhlí
POP	Prolyl-oligopeptidáza
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
To	Toluen

8. Literatura

1. Ingrassia L., Lefranc F., Mathieu V., Darro F., Kiss R.: Amaryllidaceae isocarbostryl alkaloids and their derivatives as promising antitumor agents, *Translational Oncology* 1, 1-13 (2008).
2. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: *Farmakognozie*, str. 195. Univerzita Karlova – Nakladatelství Karolinum 2016.
3. Doležal M., Kučerová M., Miletín M., Musílek K., Opletalová V., Zimčík P.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*, str. 92. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 2013.
4. Park S.Y.: Potential therapeutic agents against Alzheimer's Disease from natural sources, *Archives of Pharmacal Research* 33, 1590 (2010).
5. Jiráček J.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby, *Klinická Farmakologie a Farmacie* 18, 212-214 (2004).
6. Loy C., Schneider L.: Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *The Cochrane Library* 1, 1-2 (2009).
7. Hao B., Shen S. F., Zhao Q. J.: Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*, *Molecules* 18, 2458-2468 (2013).
8. Hulcová D.: Biologická aktivita alkaloidů *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master (Amaryllidaceae), *Disertační práce*. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
9. Takos A. M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use, *International Journal of Molecular Sciences* 14, 11713-11741 (2013).
10. Opletal L.: Daidalea - Univerzita Karlova [online]. 2019 [cit. 12. 3. 2019]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>
11. Nair J. J., van Staden J.: Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae, *Food and Chemical Toxicology* 62, 262–275 (2013).
12. Wu T-Y., Chen C-P., Jinn T-R.: Traditional chinese medicines and Alzheimer's disease, *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 50, 131-135 (2011).
13. Jahodář L.: *Farmakobotanika – Semenné rostliny*, str. 181. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 2012.
14. Dalecká M., Havelek R., Královec K., Brůčková L., Cahlíková L.: Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění, *Chemické listy* 107, 701-708 (2013).
15. Bastida J., Viladomat F., Codina C.: *Narcissus* Alkaloids, *Studies in Natural Products Chemistry* 20, 323-405 (1998).
16. Kilgore M. B., Kutchan T. M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery, *Phytochemistry Reviews* 15, 317–337 (2015).
17. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni L. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids, *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2, 65-100 (2011).

18. Park J. B.: Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 5381–5384 (2014).
19. Dasilva A., Deandrade J., Bevilaqua L., Desouza M., Izquierdo I., Henriques A., Zuanazzi J.: Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85, 148–154 (2006).
20. Orhan I., Sener B.: Bioactivity-directed fractionation of alkaloids from some Amaryllidaceae plants and their anticholinesterase activity, *Chemistry of Natural Compounds* 39, 383–386 (2003).
21. He M., Qu C., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids, *Royal Society of Chemistry Advances* 5, 16562-16574 (2015).
22. Nair J. J., Bastida J., van Staden J.: *In vivo* cytotoxicity studies of Amaryllidaceae alkaloids, *Natural Product Communications* 11, 121-132 (2016).
23. Das M. K., Kumar N., Bisai A.: Catalytic asymmetric total syntheses of naturally occurring Amaryllidaceae alkaloids, (–)-crinine, (–)-epi-crinine, (–)-oxocrinine, (+)-epi-elwesine, (+)-vittatine, and (+)-epi-vittatine, *Organic Letters* 20, 4421–4424 (2018).
24. Hanks G. R.: *Narcissus* and daffodil: The genus *Narcissus*, CRC Press, 2003.
25. Fales H. M., Wildman W. C.: The structures of haemanthamine and crinamine, *Journal of the American Chemical Society* 82, 197–205 (1960).
26. Šafratová M., Hošťálková A., Hulcová D., Breiterová K., Hrabcová V., Machado M., Fontinha D., Prudêncio M., Kuneš J., Chlebek J., Jun D., Hrabínová M., Nováková L., Havelek R., Seifrtová M., Opletal L., Cahlíková L.: Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity, *Archives of Pharmacal Research* 41, 208-218 (2018).
27. Kornienko A., Evidente E.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners, *Chemical Reviews* 108, 1982–2014 (2008).
28. Pellegrino S., Meyer M., Zorbas C., Bouchta S. A., Saraf K., Pelly S. C., Kornienko A., Yusupov M.: The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth, *Structure* 26, 416–425 (2018).
29. Meloun M., Syrový T., Vrana A.: The thermodynamic dissociation constants of haemanthamine, lisuride, metergoline and nicergoline by the regression analysis of spectrophotometric data, *Analytica Chimica Acta* 543, 254–266 (2005).
30. Havelek R., Seifrtova M., Kralovec K., Bruckova L., Cahlikova L., Dalecka M., Vavrova J., Rezacova M., Opletal L., Bilkova Z.: The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells, *Phytomedicine* 21, 479–490 (2014).
31. Habartova K., Cahlikova L., Rezacova M., Havelek R.: The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity, *Natural Product Communications* 11, 1587-1594 (2016).
32. Bodorikova V., Ritomska A., Homolkova L., Marikova J., Havelek R., Cahlikova L.: Poster from student scientific conference 18. 4. 2018: Semi-synthetic analogues of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and ambelline as potential drugs.

33. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells, *Journal of Natural Products* 73, 1223–1227 (2010).
34. Nair J. J., Rárová L., Strnad M., Bastida J., van Staden J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 6195–6199 (2012).
35. Cahlíková L., Macáková K., Benešová N., Chlebek J., Hošťálková A., Opletal L.: Natural compounds (Small Molecules) as potential and real drugs of Alzheimer's disease, *Natural Products Chemistry* 42, 153–194 (2014).
36. Hanafy D. M., Prenzler P. D., Burrows G. E., Ryan D., Nielsen S., El Sawi S. A., El Alfy T. S., Abdelrahman E. H., Obied H. K.: Biophenols of mints: Antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment, *Journal of Functional Foods* 33, 345–362 (2017).
37. Greig N. H., Utsuki T., Yu Q., Zhu X., Holloway H. W., Perry T., Lee B., Ingram D. K., Lahiri D. K.: A New Therapeutic Target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase, *Current Medical Research and Opinion* 17, 159–165 (2001).
38. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby, *Klinická farmakologie a farmacie* 5, 176–178, 2009.
39. López S., Bastida J., Viladomat F., Codina C.: Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts, *Life Sciences* 71, 2521–2529 (2002).
40. Hulcová D., Maříková J., Korábečný J., Martínez-Gonzalez L., Hošťálková L., Kučera T., I Perez D., Jun D., Kuneš J., Chlebek J., Hrabínová M., Opletal L., Havelek R., de Simone A., Vorčáková K., Nováková L., Andrisano V., Růžička A., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, and their semisynthetic derivatives as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease, *Sci. Rep. submitted manuscript, Revision 2* (2018).
41. Jope R. S., Roh M. S.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions, *Current Drug Targets* 7, 1421–1434 (2006).
42. Rayasam G. V., Tulasi V. K., Sodhi R., Davis J. A., Ray A.: Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake, *British Journal of Pharmacology* 156, 885–898 (2009).
43. Coman H., Nemes B.: New therapeutic targets in Alzheimer's disease, *International Journal of Gerontology* 11, 2–6 (2017).
44. Silva T., Reis J., Teixeira J., Borges F.: Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes, *Ageing Research Reviews* 15, 116–145 (2014).
45. Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., De Simone A., Andrisano V., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase Kinase-3 β inhibitors, *Molecules* 23, 719 (2018).
46. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities, *Natural Product Communications* 8, 1541–1544 (2013).

47. Tarragó T., Kichik N., Claasen B., Prades R., Teixidó M., Giralt E.: Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 7516-7524 (2008).
48. Havlasová J., Šafratová M., Siatka T., Štěpánková S., Novák Z., Ločárek M., Opletal L., Hrabínová M., Jun D., Benešová N., Kuneš J., Cahlíková L.: Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity, *Natural Product Communications* 9, 1151-1155 (2014).
49. O'Brien S. F., Ward S., Gallian P., Fabra C., Pillonel J., Kitchen A. D., Davison K., Seed C. R., Delage G., Steele W. R., Leiby D. A.: Malaria blood safety policy in five non-endemic countries: a retrospective comparison through the lens of the ABO risk-based decision-making framework, *Blood Transfus* 17, 94-102 (2019).
50. Osorio E. J., Berkov S., Brun R., Codina C., Viladomat F., Cabezas, F., Bastida J.: *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae), *Phytochemistry Letters* 3, 161-163 (2010).
51. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae, *Phytotherapy Research* 17, 1220-1223 (2003).
52. Ločárek M., Nováková J., Klouček P., Hošťálková A., Kokoška L., Gábrlová L., Šafratová M., Opletal L., Cahlíková L.: Antifungal and antibacterial activity of extracts and alkaloids of selected Amaryllidaceae species, *Natural Product Communications* 10, 1537-1540 (2015).
53. Reyes-Chilpa R., Berkov S., Hernández-Ortega S., Jankowski Ch. K., Arseneau S., ClotetClodina I., Este J. A., Codina C, Viladomat F., Bastida J.: Acetylcholinesterase inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*, *Molecules* 16, 9520-9533 (2011).
54. Szlávik L., Gyuris Á., Minárovits J., Forgo P., Molnár J., Hohmann J.: Alkaloids from *Leucojum vernalis* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids, *Planta Medica* 70, 871-873 (2004).
55. Ramos-Morales E., Tibble-Howlings J., Lyons L., Ogbu M. O., Murphy P. J., Braganca R., Newbold C. J.: Slight changes in the chemical structure of haemanthamine greatly influence the effect of the derivatives on rumen fermentation *in vitro*, *Scientific Reports* 9, 2440 (2019).
56. Wang Y. H., Wan Q. L., Gu C. D., Luo H. R., Long C. L.: Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Chemistry Central Journal* 6, 96 (2012).
57. McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., Brennan J. D., Bastida J.: Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 5290-5294 (2010).
58. Kohelova E., Perinova R., Maafi N., Korabecny J., Hulcova D., Kucera T., Martinez-Gonzalez L., Marikova J., Hrabínova M., Vorcakova K., Novakova L., De Simone A., Havelek R., Cahlikova L.: Derivatives of the β -crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease, *Molecules* 24, 1307 (2019).
59. Plewczynski D., łażniewski M., Augustyniak R., Ginalski K.: Can we trust docking results? evaluation of seven commonly used Programs on PDBbind database. *Journal Computational Chemistry* 32, 742-755 (2011).
60. Cedrón J., Ravelo Á., León L., Padrón J., Estévez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids, *Molecules* 20, 13854-13863 (2015).

61. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo Á. G., Estévez-Braun A.: Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 5464–5472 (2012).
62. Cabezas F., Ramírez A., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: Alkaloids from *Eucharis amazonica* (Amaryllidaceae), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51, 315-317 (2003).
63. Yeung Y. Y., Gao X., Corey E. J.: A General process for the haloamidation of olefins, scope and mechanism, *Journal of the American Chemical Society* 128, 9644–9645 (2006).
64. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells, *Phytochemistry Letters* 13, 394 - 398 (2015).
65. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells, *Phytochemistry Letters* 13, 394 - 398 (2015).
66. Marková J.: Syntéza derivátů haemanthaminu, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.
67. Kavková Z.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.
68. Mushtaq G., Greig N. H., Khan J. A., Kamal M. A.: Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus, *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 1432–1439 (2014).
69. Choudhary M. I., Shahnaz S., Parveen S., Khalid A., Hassan O. M. M. A., Ayatollahi S. A. M., Rahman A. U.: New Cholinesterase-Inhibiting Triterpenoid Alkaloids from *Buxus Hyrcana*, *Chemistry & biodiversity* 3, 1039–1052 (2006).

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Ludmila Homolková

Školitel: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty Amaryllidaceae alkaloidu haemanthaminu jako potenciální léčiva

Moderní výzkum ukázal, že alkaloidy Amaryllidaceae představují bohatou zásobu potenciálních malých molekul vykazujících několik léčivých vlastností prostřednictvím různých mechanismů. Mezi mnoha alkaloidy Amaryllidaceae byla věnována velká pozornost galanthaminu vzhledem k tomu, že má silnou inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze a je celosvětově distribuován pro léčbu Alzheimerovy choroby.

Jedna ze zajímavých sloučenin je haemanthamin, alkaloid β -krininového typu, který vykazuje významnou cytotoxickou aktivitu vůči několika nádorovým buněčným liniím.

Předmětem této diplomové práce byla příprava derivátů alkaloidu haemanthaminu a studium jeho biologické aktivity v souvislosti s potenciální léčbou nádorových onemocnění a Alzheimerovy choroby. Bylo syntetizováno jedenáct aromatických esterových derivátů haemanthaminu. Připravené deriváty byly identifikovány pomocí MS, NMR a optické otáčivosti. Všechny deriváty byly testovány na cytotoxickou aktivitu u vybraných nádorových a nenádorových buněčných liniích. Bohužel všechny látky byly z pohledu toxicity nezajímavé.

Látky byly také testovány v rámci studie na inhibiční aktivitu vůči hAChE a hBuChE. Tentokrát se podařilo připravit z neaktivního alkaloidu haemanthaminu aktivní deriváty. Nejvýznamnější hodnotu vůči oběma enzymům vykázal derivát 11-O-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (LC-90): hAChE: $IC_{50} = 18,18 \pm 1,30 \mu M$; hBuChE: $IC_{50} = 6,59 \pm 1,19 \mu M$. Selektivní inhibice vůči hBuChE, která je lepší než u galanthaminu, byla zjištěna u 11-O-(benzoyl)haemanthaminu (LC-118) $IC_{50} = 5,85 \pm 0,31 \mu M$.

Klíčová slova: haemanthamin, deriváty, Amaryllidaceae, alkaloidy, protinádorová aktivita

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Ludmila Homolková

Supervisor: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Derivatives of Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as potential drugs

Modern research has shown that Amaryllidaceae alkaloids represent a rich reservoir of potential small molecules exhibiting several medicinal properties through various mechanisms. Among the many Amaryllidaceae alkaloids, galanthamine has been given a great amount of attention due the fact that it possesses potent acetylcholinesterase inhibition activity, and is distributed worldwide for the treatment of Alzheimer's disease.

One of the interesting compounds is haemanthamine, β -crinine-type of Amaryllidaceae alkaloids, which displays significant *in vitro* cytotoxic activity against several different types of cancer cell lines.

The object of this diploma thesis was to prepare several derivatives of alkaloid haemanthamine, and try to find relationship between structure and biological effect. The present work deals with the preparation of haemanthamine derivatives, and their biological activity connected to the treatment of cancer and Alzheimer's disease. Twelve aromatic ester of haemanthamine derivatives were prepared. The chemical structures were elucidated by MS, NMR experiments and optical rotation. Each all, prepared compounds were screened for their cytotoxic activity on a panel of selected cancerous and noncancerous cell lines. Unfortunately for their potential to inhibit, none of the derivatives showed interesting cytotoxic activity.

Substances were also tested to inhibition of hAChE and hBuChE. The most significant value for both enzymes was demonstrated by 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamine (LC-90): hAChE: $IC_{50} = 18.18 \pm 1.30 \mu M$; hBuChE: $IC_{50} = 6.59 \pm 1.19 \mu M$. Selective inhibition of hBuChE, was showed by 11-*O*-(benzoyl)haemanthamine (LC-118) $IC_{50} = 5.85 \pm 0.31 \mu M$.

Keywords: haemanthamine, derivatives, Amaryllidaceae family, alkaloids, antitumor activity