

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutickej botaniky

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Syntéza derivátov haemathamínu a ich biologická aktivita
Synthesis of haemanthamine derivatives and their biological
activity

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

Vedúci diplomovej práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, máj 2019

Viera Bodoríková

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú adekvátne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, máj 2019

.....

Podpis

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektu Špecifického vysokoškolského programu SVV 260 412.

Týmto by som rada poďakovala doc. Ing. Lucii Cahlíkovej, PhD. za odborné vedenie, cenné rady, poskytnuté materiály a milý prístup pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Ďakujem Mgr. Daniele Hulcovej za poskytnutie alkaloidu haemanthaminu pre prípravu derivátov. Ďalej ďakujem doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, PhD. za zmeranie štruktúrnych charakteristík pripravených látok, prof. RNDr. Lubomírovi Opletalovi, Csc. a RNDr. Radimu Havelkovi, PhD. za zmeranie biologických aktivít derivátov. V neposlednom rade ďakujem všetkým pracovníkom Katedry farmaceutickej botaniky za vytvorenie príjemného pracovného prostredia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. CIEĽ PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČASŤ	8
3.1. Všeobecná charakteristika rastlín čeľade Amaryllidaceae a ich sekundárnych metabolitov	8
3.2. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov	9
3.3 Výskyt, izolácia a biologická aktivita haemanthamínu	13
3.3.1 Vlastnosti haemanthamínu a izolácia	13
3.3.2 Biologická aktivita alkaloidov haemanthamínového štruktúrneho typu	15
3.3.2.1 Protinádorová aktivita	15
3.3.2.2 Antimalarická aktivita.....	21
3.3.2.3 Ďalšia biologická aktivita	22
3.4 Príprava a biologická aktivita polosyntetických derivátov haemanthamínu	22
3.4.1 Protinádorová aktivita derivátov haemanthamínu	22
3.4.2 Antimalarická aktivita derivátov haemanthamínu	28
3.4.3. Anticholinergná aktivita derivátov haemanthamínu	34
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	36
4.1. Materiál, chemikálie a metódy	36
4.1.1 Amaryllidaceae alkaloidy	36
4.1.2. Rozpúšťadlá, chemikálie, detekčné činidlo.....	36
4.1.3. Vytváracie systémy pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu	37
4.1.4. Štruktúrna analýza pripravených derivátov.....	37
4.1.4.1 GC-MS analýza.....	37
4.1.4.2 ESI-MS analýza.....	37
4.1.4.3 Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (ESI-HMRMS analýza).....	37
4.1.4.4 NMR analýza.....	38
4.1.4.5 Optická otáčavosť.....	38
4.1.5 Metódy pre screening biologických aktivít pripravených zlúčenín	39
4.1.5.1 Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči erytrocytarnej HuAChE a sérovej HuBuChE	39

4.1.5.2 Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči POP.....	39
4.1.5.3 Stanovenie cytotoxickéj aktivity pripravených derivátov	39
4.1.5.4. Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči GSK-3 β	39
4.2 Príprava polosyntetických derivátov alkaloidu haemanthamínu a ich štruktúrna identifikácia	40
4.2.1 Príprava 11- <i>O</i> -hexanoylhaemanthamínu (LC-52)	40
4.2.2 Príprava 11- <i>O</i> -pentanoylhaemanthamínu (LC-53)	42
4.2.3 Príprava 11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu (LC-55)	44
4.2.4. Príprava 11- <i>O</i> -(4-metylbenzoyl)-haemanthamínu (LC-57)	46
4.2.5. Príprava 11- <i>O</i> -(3-brombenzoyl)-haemanthamínu (LC-58)	48
4.2.6. Príprava 11- <i>O</i> -(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamínu (LC-59)	50
4.2.7. Príprava 11- <i>O</i> -(3-fluorbenzoyl)-haemanthamínu (LC-60)	52
4.2.8 Príprava 11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu (LC-68)	54
4.2.9. Príprava 11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu (LC-74)	57
4.2.10. Príprava 11- <i>O</i> -(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu (LC-78)	59
5. VÝSLEDKY	61
5.1 Príprava derivátov haemanthamínu	61
5.2. Screening biologických aktivít pripravovaných zlúčenín	62
5.2.1. Inhibičné aktivity voči HuAChE, HuBuChE a POP	62
5.2.2. Cytotoxická aktivita voči panelu vybraných bunkových líní	63
5.2.3. Inhibičná aktivita voči GSK-3 β	64
6. DISKUSIA A ZÁVER	65
7. POUŽITÁ LITERATÚRA.....	67
8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	72

1. ÚVOD

Rastliny sa už od dávnych dôb využívali pre svoje pozitívne liečebné účinky na organizmus v tradičnom liečiteľstve či medicíne. Disponujú totiž obsahovými látkami, ktoré vieme v dnešnej dobe úspešne izolovať alebo dokonca synteticky pripraviť.

Postupom času sa samozrejme študovala biologická aktivita týchto látok. Medzi takéto látky patria aj sekundárne metabolity rastlín čeľade Amaryllidaceae, tzv. Amaryllkovité alkaloidy (AA). Sú veľmi rozmanité vo svojej štruktúre, tak i účinkami.

Tieto alkaloidy a ich deriváty sú zdrojom látok, ktoré majú inhibičný účinok na cholinesterázy, ďalej protirakovinový, antibakteriálny, antivírusový, antimykotický, antimalarický a analgetický účinok.¹ Od izolácie prvého alkaloidu, ktorým bol lykorín v roku 1877, bol v posledných troch desaťročiach učený veľký pokrok v izolácii a príprave týchto látok. Bolo izolovaných vyše 500 alkaloidov. Stále sú objavované nové alkaloidy tejto skupiny a dokonca nové uhľovodíkové základy s veľkým potenciálom zaradiť sa do známych biologicky aktívnych zlúčenín.²

Najznámejším alkaloidom je galantamín, ktorý je jedným z 3 hlavných liečiv, ktoré sa používajú v terapii Alzheimerovej choroby a do klinickej praxe bol zavedený v roku 2001.³

Nádorové ochorenia sú v rozvinutých štátoch jednou z hlavných príčin úmrtí.⁴ Ďalší alkaloid, lykorín, zastavuje bunecný cyklus a indukuje apoptózu v rakovinových bunkách.⁵

Predmetom tejto diplomovej práce bola príprava polosyntetických derivátov alkaloidu haemanthamínu, presnejšie esterifikovaných derivátov, ich štruktúrna analýza a screeningové testovanie biologických aktivít.

2. CIEĽ PRÁCE

Hlavné ciele tejto diplomovej práce boli:

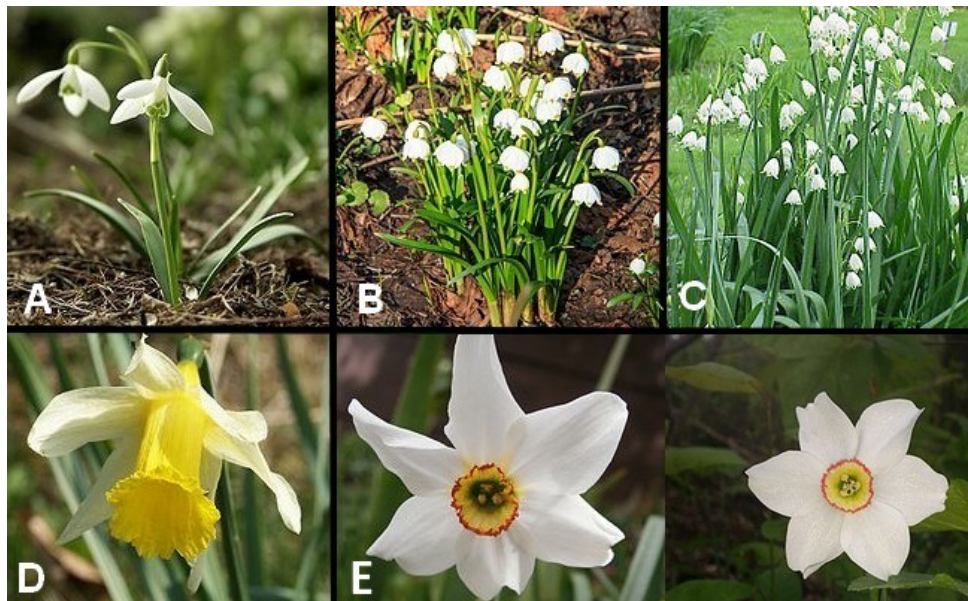
- 1) Vypracovanie rešerše k problematike využitia alkaloidov čeľade Amaryllidaceae a ich syntetických derivátov v terapii civilizačných ochorení.
- 2) Príprava polosyntetických derivátov alkaloidu haemanthamínu čeľade Amaryllidaceae pre biologické testovanie podľa literárnej rešerše.
- 3) Stanovenie základných fyzikálne-chemických charakteristík pripravených derivátov.
- 4) Biologické testovanie pripravených derivátov na domácom pracovisku, alebo aj v spolupráci s inými vedeckými inštitúciami.
- 5) Vyhodnotenie výsledkov a spísanie diplomovej práce.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Všeobecná charakteristika rastlín čeľade Amaryllidaceae a ich sekundárnych metabolitov

Čeľaď Amaryllidaceae je rozsiahlou a pestrou čeľaďou, do ktorej radíme okolo 75 rodov a viac než 1100 botanických druhov rastlín.⁶ Tieto údaje sa však líšia podľa použitého zdroja. Táto čeľaď bola pomenovaná v roku 1805, kedy Jean Henri Jaume Saunt-Hilaire použil termín Amaryllidae a neskôr John Lindley v roku 1836 použil termín Amaryllidaceae.⁷ Jedná sa o kvitnúce jednoklíčnolistové vytrvalé byliny s oddenkami, hlúčami alebo najčastejšie cibuľami. Byliny tvoria samostatný stôl a samostatné spravidla úzke čiarkovité hrubé listy.⁸ Kvety sú obojpohlavné so spodným semenníkom a sú jednotlivé alebo v šrúbovitých kvetenstvách. Plodom je tobolka alebo bobuľa.

Rastliny čeľade Amaryllidaceae sú rozšírené najčastejšie v tropickej a subtropickej Afrike, sú však zastúpené aj v miernejších pásmach ako je stredná a južná Európa. Na území Českej republiky sa najčastejšie vyskytujú jarné rastliny *Galanthus nivalis* (snežienka jarná), *Leucojum vernum* a *aestivum* (bleduľa jarná a letná), *Narcissus pseudonarcissus* a *poeticus* (narcis žltý a biely).⁴ Fotky spomínaných rastlín sú na Obr. 1. Ďalšími zaujímavými rodmi, ktoré sú častokrát využívané aj ako okrasné rastliny, sú *Amaryllis*, *Clivia* a *Haemanthus*.⁹



Obr. 1 *Galanthus nivalis*,^{10a)} *Leucojum vernum*,^{10b)} *Leucojum aestivum*,^{10c)} *Narcissus pseudonarcissus*,^{10d)} *Narcissus poeticus*^{10e)}

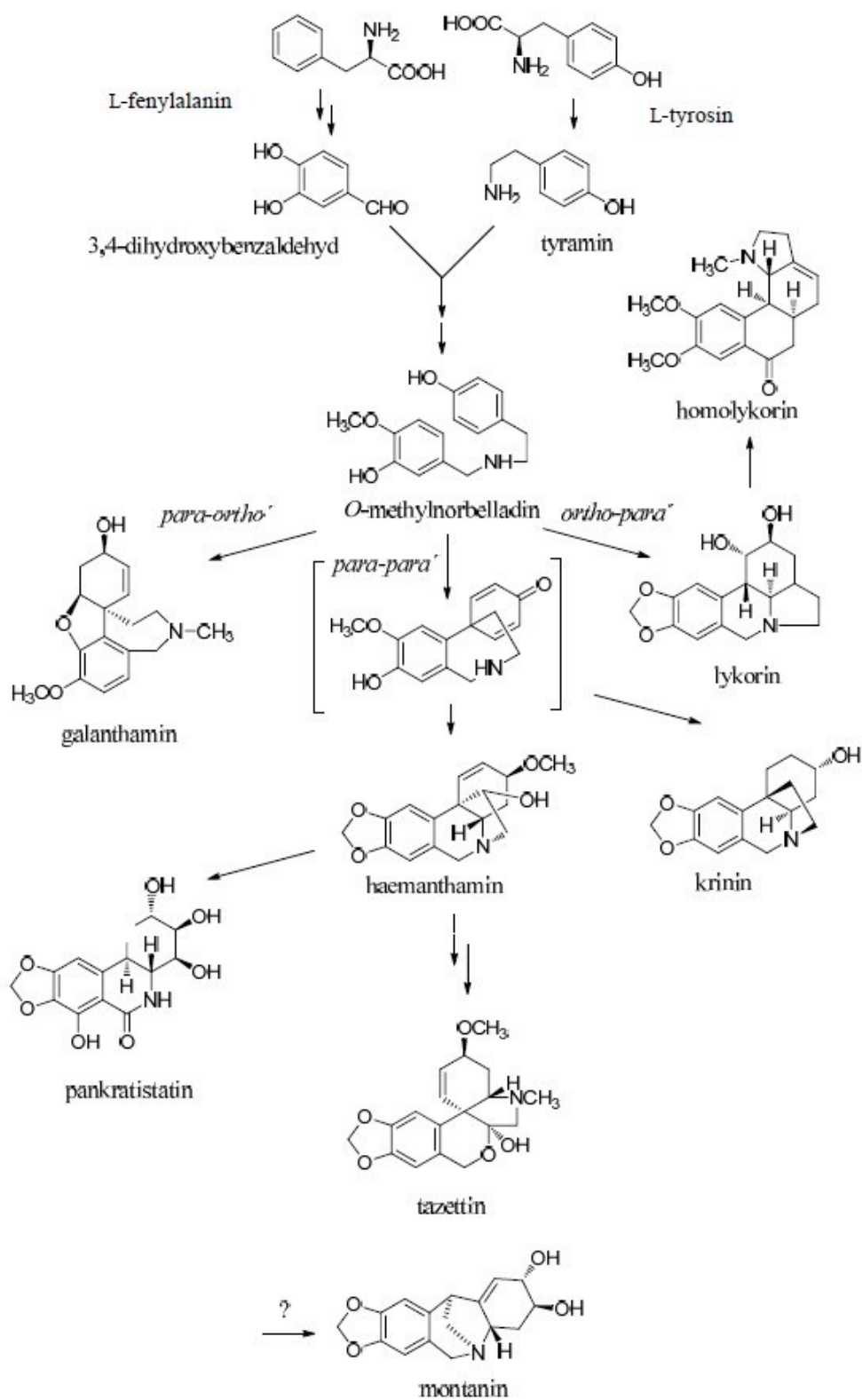
Táto čeľaď sa teší veľkému záujmu vďaka svojim obsahovým látkam, tzv. Amaryllidaceae alkaloidom (AA). Chemicky sa jedná o isochinolínové alkaloidy a nájdeme ich v celej rastline, no najviac ich obsahuje cibuľa. Prvýkrát ich použil Hippokrates z Kósu v 4. storočí pred našim letopočtom, ktorý vďaka extraktu z *Narcissus poeticus* na báze olejovej emulzie liečil nádor maternice. Následne sa tieto alkaloidy začali používať v rôznych krajinách sveta – v Severnej Afrike, Číne, v Strednej Amerike a taktiež na Arabskom poloostrove.¹¹

Vedecká komunita sa čoraz častejšie zameriava na skúmanie biologickej aktivity a účinkov AA. Prvým úspešne izolovaným alkaloidom z tejto čeľade bol v roku 1877 lykorín z rastliny *Narcissus pseudonarcissus* L. Biologická aktivita týchto alkaloidov je veľmi bohatá a zahŕňa aktivitu cytotoxickú, antivírusovú, antibakteriálnu, antiprotozoálnu (antimalarickú) a inhibičnú voči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Jednotlivé biologické účinky sú viazané na konkrétne štruktúrne typy alkaloidov. Pozornosť je venovaná najmä príprave ich polosyntetických derivátov.¹¹

3.2. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov

Biosyntéza AA je špecifická a nazýva sa tzv. norbelladinová cesta. Schématicky je biosyntéza znázornená na Obr. 2. Jej vstupnými látkami sú L-fenylalanín a L-tyrozín. Fenylalanín tvorí C1-C6 časti aromatického kruhu A a polohu benzylu na C6. Tyrozín je prekursorom dusíku na C2-C6 a prekursorom kruhu C s dvoma uhlíkmi C11, C12 v postrannom reťazci.¹²

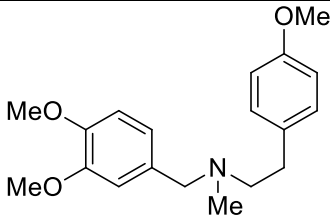
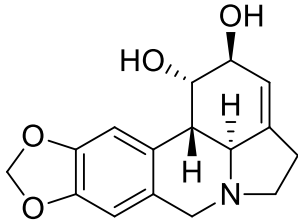
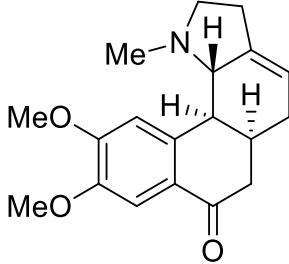
Tieto dve látky cez niekoľko medzistupňov poskytujú vlastný prekursor AA 4'-*O*-metylnorbelladín. Oxidatívnym spojením kruhov *O*-metylnorbelladínu v polohách *orto'*-*para'* vzniká lykorínový a homolykorínový typ, poloha *para'*-*orto'* pripadá galantamínu a polohu *para'*-*para'* nachádzame u krininového, haemanthamínového, tazettínového a pankratistatínového typu.¹³



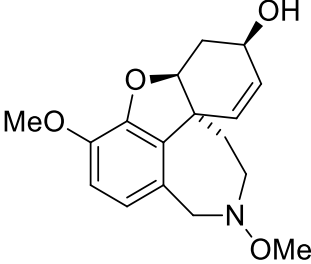
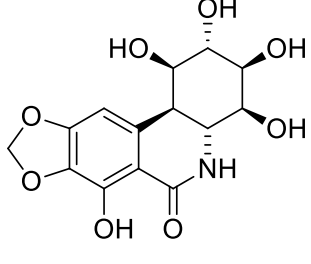
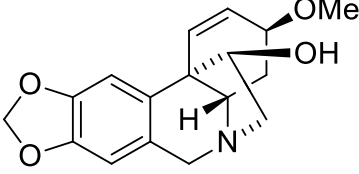
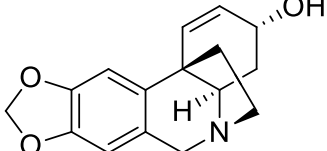
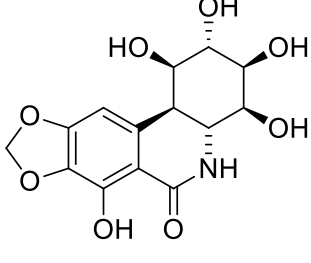
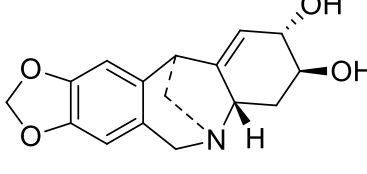
Obr. 2 Biosyntéza hlavných štruktúrnych typov AA¹¹

Podľa spôsobu intramolekulového oxidatívneho spojenia vzniká 9 základných štruktúrnych typov. Každá skupina má svojho hlavného predstaviteľa: lykorínový (lykorín), galantamínový (galantamín), haemanthamínový (haemanthamín), homolykorínový (homolykorín), pankratistatínový (pankratistatín), krinínový (krinín), tazettínový (tazettín) a montanínový (montanín). Jednotlivé štruktúrne typy sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (tabuľka 1).

Tabuľka 1 Prehľad základných štruktúrnych typov Amaryllidaceae alkaloidov, ich hlavný zástupcovia a príklady rodov, z ktorých boli izolované¹⁴

Štruktúrny typ	Hlavný zástupca	Rod
norbelladínový	 <p>norbelladín</p>	<i>Crinum</i> <i>Galathus</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Nerine</i>
lykorínový	 <p>lykorín</p>	<i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i>
homolykorínový	 <p>homolykorín</p>	<i>Clivia</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i>

Tabuľka 1 (pokračovanie)

galantamínový	 <p style="text-align: center;">galantamín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Crinum</i> <i>Cyrtanthus</i> <i>Galanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Zephyranthes</i></p>
pankratistatínový	 <p style="text-align: center;">pankratistatín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Boophane</i> <i>Heamanthus</i> <i>Hymenocallis</i> <i>Narcissus</i> <i>Pancratinum</i> <i>Zephyranthes</i></p>
haemanthamínový	 <p style="text-align: center;">haemanthamín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Ammocharis</i> <i>Brunsvigia</i> <i>Clivia</i> <i>Crinum</i> <i>Cyrhanthus</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hippeastrum</i> <i>Leucojum</i> <i>Lycoris</i> <i>Narcissus</i> <i>Nerine</i> <i>Zephyranthes</i></p>
krinínový	 <p style="text-align: center;">krinín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Clivia</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hypeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Zephyranthes</i></p>
tazettínový	 <p style="text-align: center;">tazettín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Clivia</i> <i>Eucharis</i> <i>Galanthus</i> <i>Hypeastrum</i> <i>Chlidanthus</i> <i>Leucojum</i> <i>Zephyranthes</i></p>
montanínový	 <p style="text-align: center;">montanín</p>	<p style="text-align: center;"><i>Hippeastrum</i> <i>Lycoris</i> <i>Pancratinum</i> <i>Scadoxus</i></p>

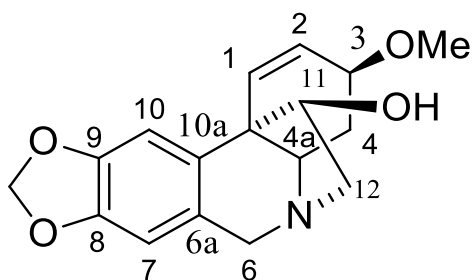
3.3 Výskyt, izolácia a biologická aktivita haemathamínu

Haemanthamínový typ AA spoločne s lykorínovým typom predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce skupiny alkaloidov.¹⁵ Bol izolovaný už z veľkého množstva rodov ako sú *Ammocharis*¹⁶, *Galanthus*¹⁷, *Crinum*¹⁸, *Hippeastrum*¹⁹, *Narcissus*²⁰, *Nerine*¹⁵, *Zephyranthes*²¹ či *Lykoris*¹⁵. Štruktúra haemanthamínu bola objasnená W.S. Wildmanom a H. M. Falesom v roku 1958.²²

3.3.1 Vlastnosti haemanthamínu a izolácia

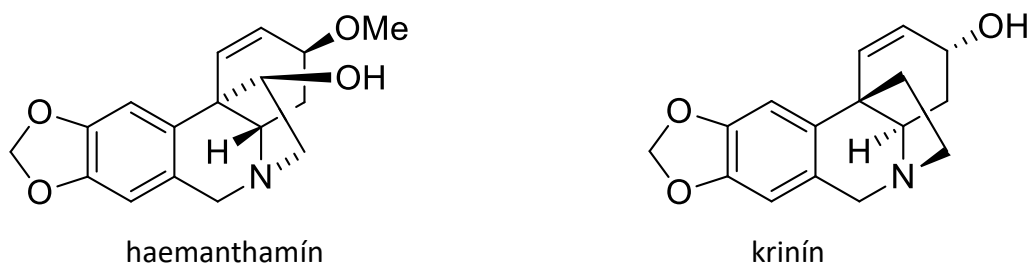
Sumárny vzorec haemanthamínu je C₁₇H₁₉O₄N. Systematický názov je (3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-ol.

Relatívna molekulová hmotnosť je 301,342.²³ Jedná sa o terciárny amín a vo svojej štruktúre má ďalej jednu alifatickú hydroxylovú skupinu, jednu metoxyskupinu, 1,3-dioxolánový kruh, jeden aromatický kruh a dvojnú väzbu. Ako čistá látka tvorí bezfarebné kryštály.



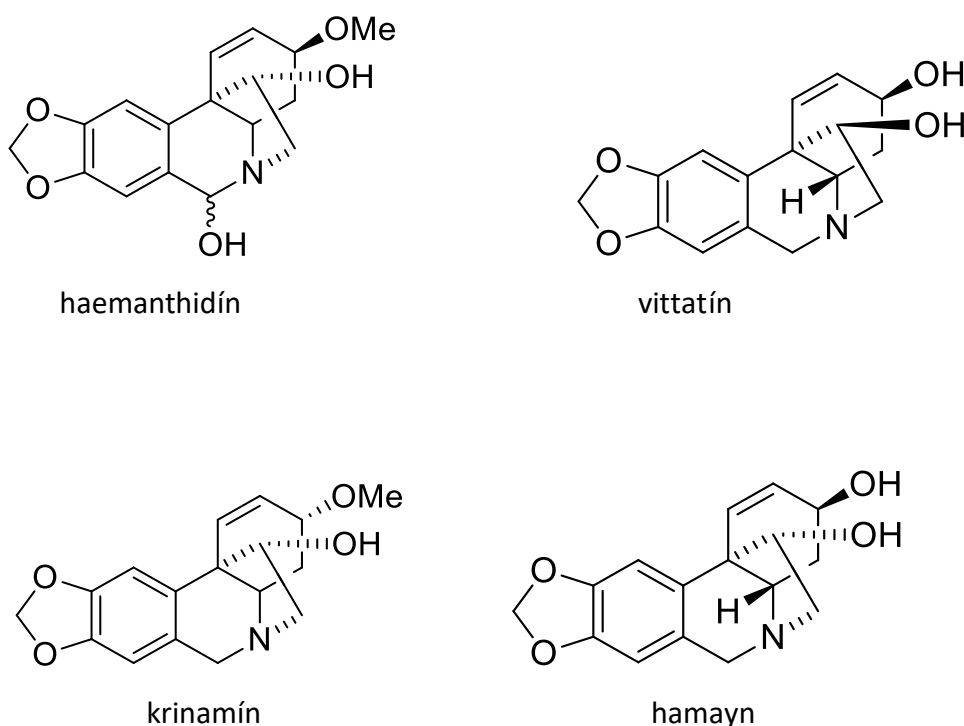
Obr. 3 Štruktúra haemanthamínu

Haemanthamínový typ štruktúrne vychádza z 5,10b-etanofenantridínu, ktorý vzniká z norbelladínu *para*'-*para*' oxidatívnou cyklizáciou.²⁴ Takto vzniká aj krinínový typ, ktorý sa odlišuje len konfiguráciou 5,10b-etanového mostíka,¹⁵ ktorá je navzájom opačná (jedná sa teda o enantioméry)²⁵ Na Obr. 4 sú zobrazené štruktúry haemanthamínu a krinínu, na ktorých je možné vidieť rozdiel v priestorovom usporiadaní.



Obr. 4 Štruktúry haemanthamínu a krinínu

K haemanthamínovému typu patria alkaloidy haemanthidín, vittatín, krinamín, hamayn a bulbispermín.¹⁸



Obr. 5 Vybrané štruktúry haemanthamínového typu

Základná stratégia extrakcie alkaloidov z rastlín prebieha tak, že sú v kyslom prostredí (napr. zriedená HCl, H₂SO₄) prevedené alkaloidné bázy na soľ, ktorá je rozpustná vo vodnej fáze. Organická fáza sa odstráni a s ňou ďalšie organické nečistoty. Potom sa k vodnej fáze pridá bazická látka (napr. Na₂CO₃), pomocou ktorej sa zvýši pH prostredia aspoň na 9-10, aby z alkaloidu opäť vznikla voľná báza a alkaloidy následne môžu prejsť do organickej fázy. Vodná fáza sa odstráni a s ňou i nečistoty rozpustné vo vode. Tým získame organickú fázu obsahujúcu

len alkaloidy. Z tohto sumárneho alkaloidného extraktu sa za využitia bežných chromatografických metód izolujú jednotlivé alkaloidy. Celý proces izolácie je samozrejme zložitejší. Uvedený zjednodušený popis je len základnou stratégiou pre izoláciu alkaloidov.

3.3.2 Biologická aktivita alkaloidov haemanthamínového štruktúrneho typu

3.3.2.1 Protinádorová aktivita

V poslednej dobe sa veľká pozornosť venuje protinádorovej aktivite haemanthamínu a ďalších alkaloidov haemanthamínového štruktúrneho typu.

Haemanthamín a haemanthidín vykazujú značnú *in vitro* cytotoxicitu voči niekoľkým nádorovým bunkovým líniam. Protinádorová aktivita bola testovaná na bunkových líniam A549, OE21, U373, Hs683, SKMEL a B16F10 (tabuľka 2). Haemanthidín dokonca vykazoval vyššiu cytotoxickú aktivitu než lykorín.²⁶ Zistilo sa, že dôležitým štruktúrnym znakom pre protinádorovú aktivitu je prítomnosť β usporiadania 5,10*b*-etanového mostíka, ktorým disponujú práve alkaloidy haemanthamínového štruktúrneho typu. Krinínový štruktúrny typ, ktorý má α usporiadanie, bol už neaktívny.²⁶

Tabuľka 2 Protinádorová aktivita lykorínu, haemanthamínu a haemanthidínu voči vybraným nádorovým líniam²⁶

Alkaloid	Bunkové línie <i>in vitro</i> IC ₅₀ (μ M) inhibícia rastu					
	SKMEL	A549	OE21	Hs683	U373	B16F10
Lykorín	8,4 \pm 0,2	4,3 \pm 0,3	5,1 \pm 0,4	6,7 \pm 0,3	7,6 \pm 0,2	6,3 \pm 0,2
Haemanthamín	8,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,6	6,8 \pm 0,7	7,0 \pm 0,3	7,7 \pm 0,5	6,8 \pm 0,2
Haemanthidín	4,2 \pm 0,2	4,0 \pm 0,4	3,7 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2

SKMEL – melanóm, A549 – karcinóm pľúc, OE21 – nádor dlaždicobunkového epitelu pažeráku, Hs683 – glióm, U373 – glioblastóm astrocytov, B16F10 – myší melanóm

V ďalšej štúdii²⁷ bolo testovaných 13 AA a ich cytotoxicita voči p53-negatívnym gastrointestinálnym nádorovým bunkám Caco-2 a HT-29. Popri tom boli zdravé ľudské intestinálne bunky FHs 74 Int použité ako kontrola celkovej toxicity. Spomedzi všetkých testovaných alkaloidov, len haemanthamín, haemanthidín a lykorín vykázali značnú toxicitu voči nádorovým bunkám a nízku toxicitu voči bunkám zdravým ako môžeme vidieť v tabuľke 3. Z alkaloidov haemanthamínového typu vykázal najlepšie výsledky práve haemanthamín.

Tabuľka 3 Protinádorová aktivita lykorínu, haemanthamínu a haemanthidínu voči gastrointestinálnym nádorovým bunkám a jednej zdravej bunkovej línii v porovnaní so štandardom vinorelbínom.²⁷

Alkaloid	Bunkové línie in vitro IC ₅₀ (μM) inhibícia rastu		
	Caco-2	HT-29	FHs 74 Int
Lykorín	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,1	22,7 ± 0,1
Haemanthamín	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 8,9
Haemanthidín	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	11,6 ± 0,9
Vinorelbín	0,03 ± 0,1	netestované	4,0 ± 0,3

Caco-2 – kolorektálny adenokarcinóm, HT-29 – črevný adenokarcinóm, FHs 74 Int - bunky zdravých črevných fibroblastov

V štúdii, ktorá bola publikovaná v roku 2007²⁸ boli testované alkaloidy krinanového typu a len haemanthamín a krinamín mali schopnosť selektívne iniciovať apoptózu u nádorových buniek potkanieho hepatocelulárneho karcinómu 5123tc a zároveň nepôsobiť cytotoxicky voči línii ľudských embryonálnych buniek obličiek HEK 293T v rovnakých koncentráciách.²⁹ Na základe tejto štúdie bola stanovená účinná dávka k indukcii apoptózy u 50 % nádorových buniek na 12,5 μM pre krinamín a 15 μM pre haemanthamín.³⁰

Ďalšími testovanými líniami boli HL-60 (bunky ľudskej promyelocytárnej leukémie), HSC-2 (dlaždicobunkový karcinóm) a leukemická línia Jurkat, u ktorých haemanthamín a haemanthidín indukovali apoptózu. Expozícia haemanthamínu vyvolala apoptózu (bunky Annexin V a propidium jodid dvojito pozitívne) u 4 ± 1 % po pôsobení v koncentrácii 1 μM, resp. 22 ± 1 % po pôsobení v koncentrácii 25 μM³¹

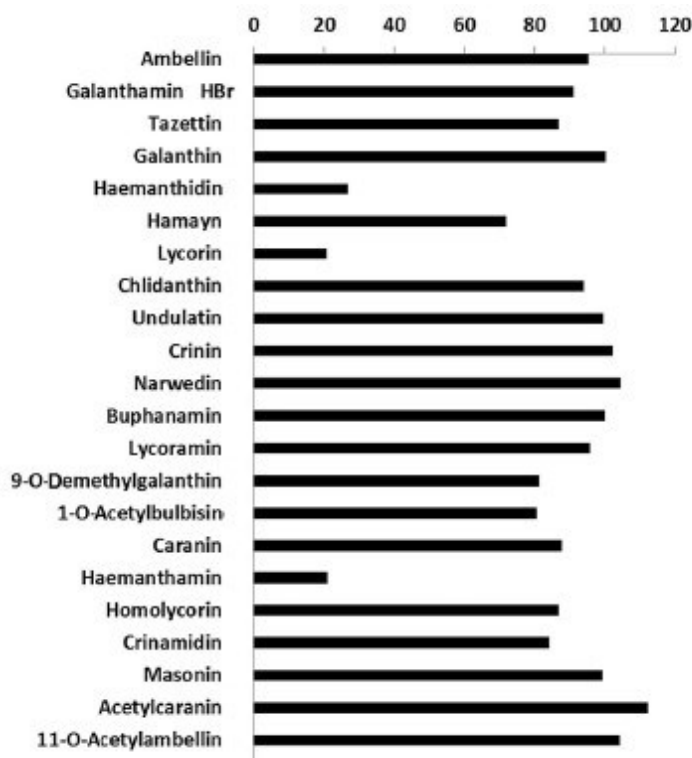
V nedávnej štúdii³² bolo testovaných 22 AA a ich protinádorový potenciál. Použilo sa 17 ľudských bunkových línii rôznych tkanív. Medzi alkaloidmi bol aj haemanthamín a haemanthidín, ktoré spoločne s lykorínom mali najvyššie cytotoxické aktivity voči všetkým testovaným líniam ako je možné vidieť v tabuľke 4 a na obrázku 6.

Tabuľka 4 Proliferácia buniek po ovplyvnení alkaloidom v 17 bunkových líniách. Čísla sú uvedené v percentách.³²

		Ambellin	Galanthamin HBr	Tazetin	Galanthin	Haemanthidin	Hamayn	Lycorin	Childanthin	Undulatin	Crinin	Narwedín	Buphanamin	Lycoramin	9-O-demethyl-galanthin	1-O-acetyl-bulbisin	Cararin	Haemanthamin	Homolycorin	Crinanidin	Masonin	Acetyl-cararin	11-O-acetyl-ambellin	Doxorubicin	DMSO
1	HL-60	111	99	113	106	4	92	2	110	102	107	108	100	117	87	100	103	4	103	96	100	99	98	2	109
2	Jurkat	99	94	93	98	23	80	5	97	101	113	115	108	102	95	100	99	18	103	101	105	132	115	4	113
3	MOLT-4	93	89	95	103	11	80	9	100	104	109	117	109	105	89	104	99	6	107	98	110	119	113	2	115
4	A549	95	94	83	93	38	72	27	96	105	105	96	106	96	98	99	111	33	102	100	112	113	106	46	106
5	H1299	91	101	85	83	28	60	18	85	86	95	97	98	92	76	76	71	20	77	68	82	100	94	28	87
6	COLO-201	97	89	70	84	14	59	14	90	93	96	106	96	101	78	79	77	12	79	80	97	82	98	46	91
7	HT-29	83	74	57	64	7	34	5	73	98	98	107	105	83	58	61	58	5	66	67	82	107	102	16	87
8	SW-480	92	85	84	94	25	57	20	93	104	96	107	101	93	78	82	90	21	89	78	96	108	105	29	97
9	AGS	100	84	92	94	33	72	22	91	94	109	108	99	95	82	74	82	21	67	66	79	113	103	5	83
10	PANC-1	94	81	76	97	38	65	36	91	97	102	107	102	102	85	86	82	37	80	81	98	119	103	63	95
11	A2780	96	98	101	163	52	93	39	97	94	85	90	90	92	92	88	102	38	91	100	91	141	95	45	98
12	HeLa	92	82	84	93	25	68	15	93	97	104	105	93	82	60	66	68	16	74	72	81	98	100	30	89
13	BT-549	92	92	76	90	27	76	25	92	91	96	97	95	89	70	67	73	17	69	70	79	107	88	14	80
14	MCF-7	98	94	94	114	24	76	27	104	112	112	113	104	101	87	81	99	17	101	88	106	131	110	52	99
15	MDA-MB-231	92	92	92	119	37	74	27	85	97	102	102	94	90	85	96	104	27	85	90	93	123	96	48	94
16	SAOS	96	100	92	97	35	87	27	105	107	98	100	96	97	80	83	77	34	85	87	95	95	105	23	102
17	NHDF	99	98	87	112	36	78	34	96	108	115	103	103	93	81	84	98	32	95	88	99	119	104	48	93

0-25%
26-50%
51-75%

HL-60 – promyelocytárna leukémia, Jurkat – T-bunková leukémia , MOLT-4 – akútna lymfoblastická leukémia , A549 – karcinóm pľúc , H1299 – karcinóm pľúc , COLO-201 – adenokarcinóm hrubého čreva, HT-29 – kolorektálny adenokarcinóm , SW-480 – adenokarcinóm hrubého čreva , AGS – karcinóm žalúdka , PANC-1 – karcinóm pankreasu , A2780 – ovariálny karcinóm , HeLa - adenokarcinóm krčka maternice, BT-549 – karcinóm prsníka , MCF-7 – karcinóm prsníka , MDA-MB-231 – karcinóm prsníka , SAOS - osteosarkóm , NHDF – ľudské dermálne fibroblasty



Obr. 6 Celkový antiproliferatívny efekt alkaloidov v percentách.³²

Lykorín už preukázal protinádorovú aktivitu v mnohých zvieracích modeloch, no protinádorový potenciál haemanthamínu ešte stále nie je dostatočne preskúmaný. Keďže dosiahol veľmi dobré výsledky, bol vybraný na hodnotenie *in vivo* s cieľom posúdiť jeho protinádorový potenciál. Vo všetkých experimentoch boli použité modely s Ehrlichovým karcinómom, ktorý sa pôvodne objavil ako karcinóm prsníka u myší. *In vitro* testy protinádorovej aktivity potvrdili, že haemanthamín vykazuje dobrú aktivitu voči ľudským nádorovým bunkám prsníka. Nepreukázal však žiadnu aktivitu na myších modeloch s Ehrlichovým tumorom. Tieto *in vivo* experimenty sú v rozpore s predchádzajúcimi pokusmi vedeckej skupiny Furosava a kolektívu a sú potrebné ďalšie štúdie. V tomto výskume s *in vivo* modelmi bolo dokázané, že haemanthamin má antileukemickú aktivitu voči bunkám NIH/3T3 a predĺžil prežitie myší s Rauscherovou leukémiou.³³

Neuspokojivé výsledky u myší s Ehrlichovým tumorom môžu mať súvislosť s nedávnou farmakokinetickou štúdiou osudu haemanthamínu u potkanov. Podanie jediného intravenózneho bolusu v dávke 10 mg/kg viedlo k nadmernej distribúcii haemanthamínu v plazme, po ktorej nasledoval rýchly pokles plazmatickej koncentrácie alkaloidu a prevládalo

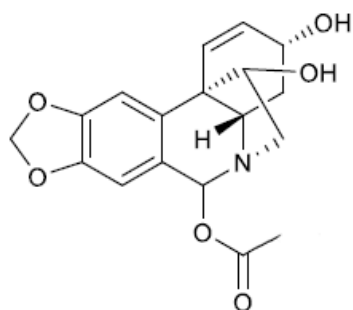
vylúčené do moču. To nasvedčuje tomu, že haemanthamín sa neviaže v tkanive, ale namiesto toho je priamo vylúčený z organizmu.³⁴

V ďalšej štúdií z roku 2017 bol testovaný vplyv samotného haemanthamínu alebo v kombinácii s butyrátom sodným na nádorové ovariálne bunky A2780, pričom boli ako kontrolná línia požitá nenádorové bunky ľudských MRC-5 fibroblastov.

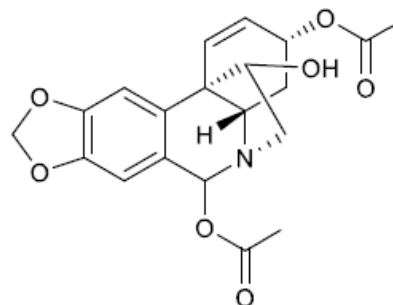
Kombinácia haemanthamínu a butyrátu sodného spôsobila značné zníženie proliferácie buniek A2780 v porovnaní so samostatnou liečbou butyrátom sodným alebo haemanthamínom. Súčasná aplikácia nemala významný vplyv na bunky fibroblastov MRC-5.³⁵

Ďalším študovanými alkaloidom haemanthamínového typu bol vittatín, ktorý bol testovaný na bunkových líniách črevného adenokarcinómu HT-29 ($IC_{50} = 21,91 \mu M$), pľúcneho karcinómu H460 ($IC_{50} = 15,88 \mu M$) a obličkového karcinómu RFX393 ($IC_{50} = 29,57 \mu M$). Bohužiaľ však nedosahoval také hodnoty IC_{50} ako haemanthamín a haemanthidín.³⁶

Testované boli aj $3\alpha,6\beta$ -diacetylbulbispermín a 3α -hydroxy- 6β -acetylbulbispermín (Obr. 7). U týchto látok bola zistená aktivita na nádorové bunkové línie HL-60 (promyelocytárna leukémia) a mierne pôsobili i na CCF-STTG1 (astrocytóm), CHG-5 (glióm) a U251 (glioblastóm).³⁷



3α -hydroxy- 6β -acetylbulbispermín



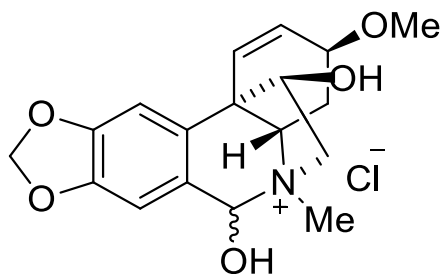
$3\alpha,6\beta$ -diacetylbulbispermín

Obr. 7 Ďalšie alkaloidy haemanthamínového typu študované z pohľadu cytotoxického účinku

Nedávno bol izolovaný nový štruktúrny analóg *N*-methylhaemanthidín (Obr. 8.) z rastliny *Zephyranthes candida*.³⁸ Zistilo sa, že táto látka dokáže znížiť viabilitu buniek niekoľkých pankreatických nádorových línií (AsPC-1, BxPC-3 a Mia PaCa-2) a disponuje cytotoxickým potenciálom väčším než má gemcitabín a 5-fluoruracil.

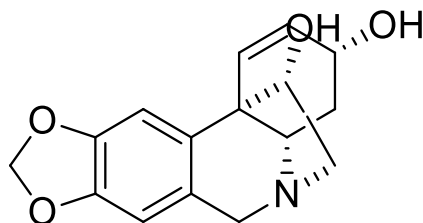
Tento analóg zastavuje bunkový cyklus vo fáze G2/M, indukuje apoptózu, inhibuje glukózový metabolizmus a inhibuje migráciu buniek v uvedených nádorových bunkových líniiach.

Molekulárny mechanizmus protinádorového účinku spočíva, aspoň čiastočne, v inhibícii signálnej dráhy proteín kinázy B.³⁹



Obr. 7 Štruktúra *N*-methylhaemanthidínu

Posledným študovaným alkaloidom haemanthamínového typu bol bulbispermín (Obr. 8.). V roku 2012 prebehla štúdia, v ktorej sa zistilo, že tento alkaloid inhibuje v koncentrácii 10 μ M proliferáciu glyoblastómových nádorových buniek T98G a U373, ktoré sú rezistentné na apoptózu. Bulbispermín má taktiež silnú cytotoxickú aktivitu voči nádorovým bunkám ľudskej leukémie HL-60.⁴⁰



Obr. 8 Štruktúra bulbispermínu

Mechanizmus protinádorového účinku alkaloidov haemanthamínového typu bol preštudovaný len minimálne. Celkový mechanizmus pravdepodobne spočíva v tom, že haemanthamín inhibuje proteosyntézu blokovaním tvorby peptidovej väzby v kroku, kedy sa peptidyltransferáza viaže na ribozomálnu podjednotku 60S.⁴¹

Neskôr prebehla štúdia, v ktorej haemanthamín inhiboval rast buniek myšieho lymfómu L5178, ktoré sú rezistentné voči viacerým liečivám, prostredníctvom tvorby komplexu s RNA.⁴²

V ďalšej štúdii z roku 2014 bolo preukázané, že haemanthamín a haemanthidín indukujú apoptózu u buniek T-lymfoblastómovej leukémie Jurkat. Získané údaje nasvedčujú tomu, že

apoptóza bola sprevádzaná aktiváciou kaspáz 3, 7, 8 a 9, ďalej znížením mitochondriálneho membránového potenciálu a zastavením bunkového cyklu v G1 a G2/M fáze.³¹

Haemanthamín v kombinácii s butyrátom sodným zdržiaval bunky v G1 fáze a spôsobil akumuláciu buniek v S a G2 fáze. Potlačila sa fosforylácia kináz Chk2 na treoníne 68 a Chk1 na seríne 345 v ovariálnych nádorových bunkách A2780. Zároveň bola pozorovaná down-regulácia inhibičného proteínu p21^{WAF1/Cip1}. Citlivosť buniek na dvojkombinačnú liečbu vyzerá byť doprevádzaná zvýšením histónovej acetylácie.³⁵

3.3.2.2 Antimalarická aktivita

Ďalší výskum⁴³ ukázal, že niektoré alkaloidy haemanthamínového štruktúrneho typu majú antimalarické účinky. Tieto alkaloidy majú vysoký inhibičný potenciál proti druhu *Plasmodium falciparum*. Bolo testovaných 5 skupín AA, a to lykorínového, krinínového, haemanthamínového, tazettínového a galantamínového typu. Prebehlo testovanie aj na rastlinných výťažkoch z rastlín *Panocratinum maritimum*, *Leucojum aestivum* a *Narcissus tazetta* ssp. *tazetta*, ktoré boli *in vitro* vyhodnotené ako schopné inhibovať *Plasmodium falciparum*. Za najúčinnnejšie alkaloidy boli určené haemanthidín, haemanthamín a lykorín, naopak najslabšie boli galantamín a tazettín ako môžeme vidieť v tabuľke 5.

Na základe týchto zistení môžeme povedať, že pre antimalarický účinok je dôležitá metyléndioxobenzénová časť molekuly a terciárny dusík bez metylu.⁴³

Tabuľka 5 Hodnoty inhibičných koncentrácií IC₅₀ testovaných alkaloidov a štandardu chlorochínu voči *P. falciparum* T9,96 a K1⁴³

Alkaloid	IC ₅₀ (µg/ml)	
	<i>P. falciparum</i> (T9,96)	<i>P. falciparum</i> (K1)
Haemanthamín	0,703	0,433
Haemanthidín	0,348	0,352
Lykorín	1,026	0,379
3-Epihydroxybulbispermín	1,139	0,553
Krinín	2,110	1,650
Galantamín	4,38	15,93
Tazettín	5,420	5,080
Chlorochín	-	6,06

3.3.2.3 Ďalšia biologická aktivita

Nedávne štúdie ukázali, že haemanthamín a jeho polosyntetické deriváty s metoxyskupinou na uhlíku C3 vykazujú silnú *in vitro* aktivitu proti influenza A vírusu N5H1 s hodnotou EC₅₀ - 6,7 μM.^{44, 45}

O haemanthamíne sa ďalej zistilo, že má antioxidačné a antikonvulzívne účinky.⁴⁶

V roku 2013 boli alkaloidy haemanthamínového typu testované aj na inhibičnú aktivitu voči HuAChE a HuBuChE, no vykázali len veľmi slabé inhibičné aktivity.⁴⁷

Haemanthidín má protizápalové a analgetické účinky s aktivitou vyššou než kyselina acetylsalicilová.⁴⁸ Taktiež pôsobí *in vitro* proti *Trypanosoma brucei rhodesiense* a v menšej miere aj proti *T. cruzi*.⁴⁹

3.4 Príprava a biologická aktivita polosyntetických derivátov haemanthamínu

Keďže haemanthamín disponuje širokou škálou biologických aktivít a jeho izolácia z rastlinného materiálu je pomerne jednoduchá, bol tento alkaloid použitý pre prípravu ďalších látok, ktoré by boli ešte aktívnejšie než je samotný haemanthamín.

V prvom rade sa vedie snaha o vyvinutie účinného a selektívneho protinádorového liečiva odvodeného od haemanthamínu. Zatiaľ však bolo pripravených len niekoľko derivátov a sú potrebné ďalšie štúdie.

Okrem protinádorovej aktivity, záujem vedeckých skupín vyvolala aj antimalarická aktivita a inhibičná aktivita voči HuAChE a HuBuChE.

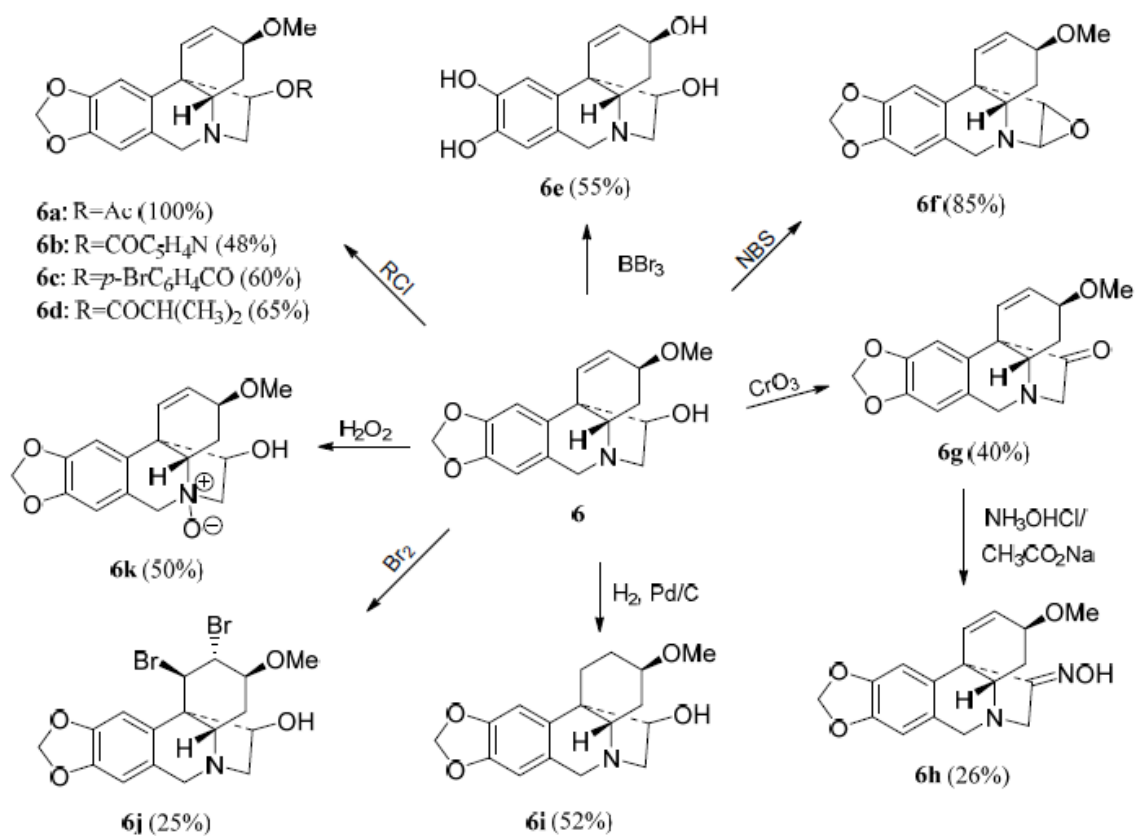
3.4.1 Protinádorová aktivita derivátov haemanthamínu

Nádorové ochorenia patria celosvetovo medzi hlavné príčiny úmrtí vo vyspelých krajinách a navyše sa predpokladá, že incidencia nádorov v rozvinutých krajinách neustále porastie.²⁷

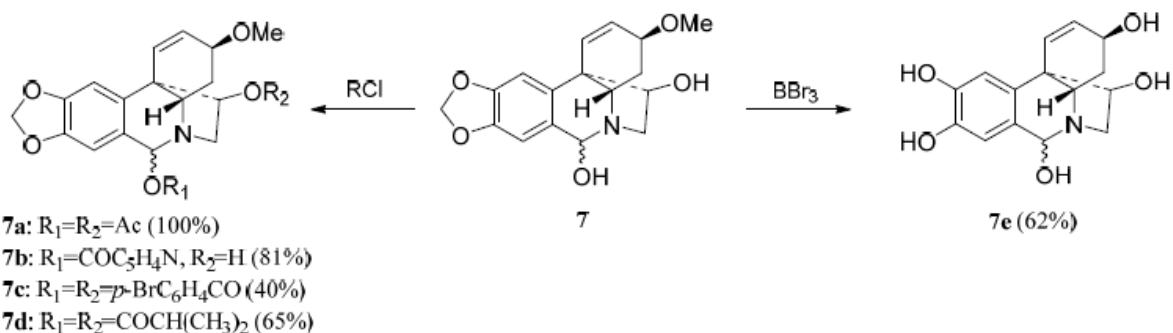
Ukázalo sa, že niektoré AA majú protinádorovú aktivitu so schopnosťou indukovať apoptózu. Medzi tieto alkaloidy patrí aj samotný haemanthamín, ktorý vykazuje selektivitu k nádorovým bunkám, pričom jeho toxicita na bunky nenádorové a kľudové je relatívne nízka.^{27,29} Tieto

zistenia viedli k príprave niekoľkých sérií derivátov haemanthamínu, za účelom preskúmať vzťah medzi štruktúrou a účinkom a pripraviť látky s čo najlepšimi vlastnosťami.

Štúdia z roku 2015⁵⁰ sa zaoberá hodnotením protinádorových aktivít siedmich prírodných AA a 32 polosyntetických derivátov, ktoré od nich boli odvodené. Z alkaloidov haemanthamínového typu boli najaktívnejšie deriváty haemanthamínu (**6**) a haemanthidínu (**7**). Schémy príprav sú zobrazené na Obr. 9 a 10.



Obr. 9 Schéma prípravy derivátov z haemanthamínu (**6**)⁵⁰



Obr. 10 Schéma prípravy derivátov z haemanthidínu (**7**)⁵⁰

Všetky deriváty boli testované na ich protinádorovú aktivitu voči nádorovým bunkovým líniam A2780, SW1573, T-47D a WiDr. Výsledky sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6 *In vitro* antiproliferatívna aktivita derivátov haemanthamínu (**6**) a haemathidínu (**7**)⁵⁰

Látka	GI ₅₀ (μM)			
	A2780	SW1573	T47-D	WiDr
6	0,68 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 0,4	1,2 ± 6,0
6a	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6b	27,2 ± 10,0	29,5 ± 12,0	72,3 ± 27,0	63,3 ± 35,0
6c	19,1 ± 1,0	21,9 ± 4,0	46,1 ± 30,0	32,8 ± 22,0
6d	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6e	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6f	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6g	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	4,4 ± 1,5	3,5 ± 2,0
6h	33,2 ± 2,0	39,1 ± 20,0	78,6 ± 24,0	67,4 ± 34,0
6i	31,4 ± 7,0	29,8 ± 3,0	≥ 100	58,9 ± 12,0
6j	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6k	27,2 ± 5,0	22,0 ± 20,0	≥ 100	≥ 100
7	1,5 ± 0,1	2,0 ± 1,0	1,8 ± 1,0	2,7 ± 2,0
7a	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
7b	6,9 ± 1,0	4,5 ± 0,7	8,2 ± 1,2	10,1 ± 0,5
7c	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
7d	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
7e	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100

A2780 – ovariálny karcinóm, SW1573 – pľúcny karcinóm, T-47D – karcinóm prsníka, WiDr – karcinóm hrubého čreva

Z týchto výsledkov môžeme vyvodiť zopár vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou. Dôležitá je metoxyskupina na uhlíku C3 spolu s hydroxylovou skupinou na uhlíku C11.

Neaktivita derivátov **6i** a **6j** preukázala dôležitosť dvojitej väzby medzi uhlíkmi C1 a C2. Odstránenie metylendioxy skupiny taktiež viedlo k menej aktívnej látke (**6k**), čo naznačuje, že táto skupina je taktiež dôležitá pre účinok. Haemanthidín (**7**), ktorý má hydroxyskupinu na uhlíku C6 sa považuje za rovnako aktívny ako haemanthamín (**6**). Acylácia hydroxylových skupín na uhlíkoch C6 a C11 vyprodukovala menej aktívne deriváty (**7a**, **7c**, **7d**) oproti látke **7b**, ktorá ma voľnú hydroxylovú skupinu na uhlíku C11 a nikotínovú skupinu na uhlíku C6.

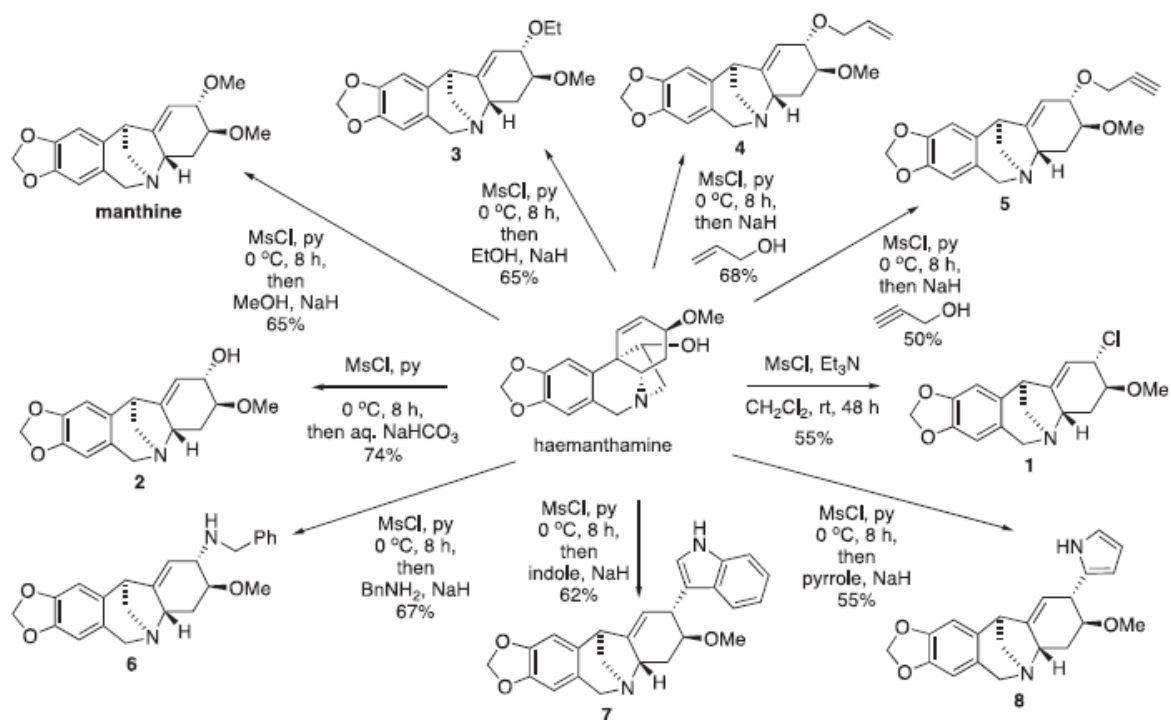
V novej štúdií z roku 2018⁵¹ bola štruktúra haemanthamínu pozmenená na deriváty montanínového typu. Mechanizmus reakcie spočíva v nukleofilnom ataku časti molekuly s aktivovanou hydroxylovou skupinou na uhlíku C11 a vytvorí sa väzba medzi uhlíkmi C10a-C11, čo vedie k vzniku aréniového iónu B. Väzba medzi C10a-C10b zanikne vplyvom nukleofilu na uhlíku C2, čo spôsobí translokáciu C1-C2 alkénu do pozície C1-C10b a vzniká montanínový skelet. Celý mechanizmus reakcie je zobrazený na Obr. 11.



Obr. 11 Mechanizmus zmeny haemanthamínu na montanínový štruktúrny typ.⁵¹

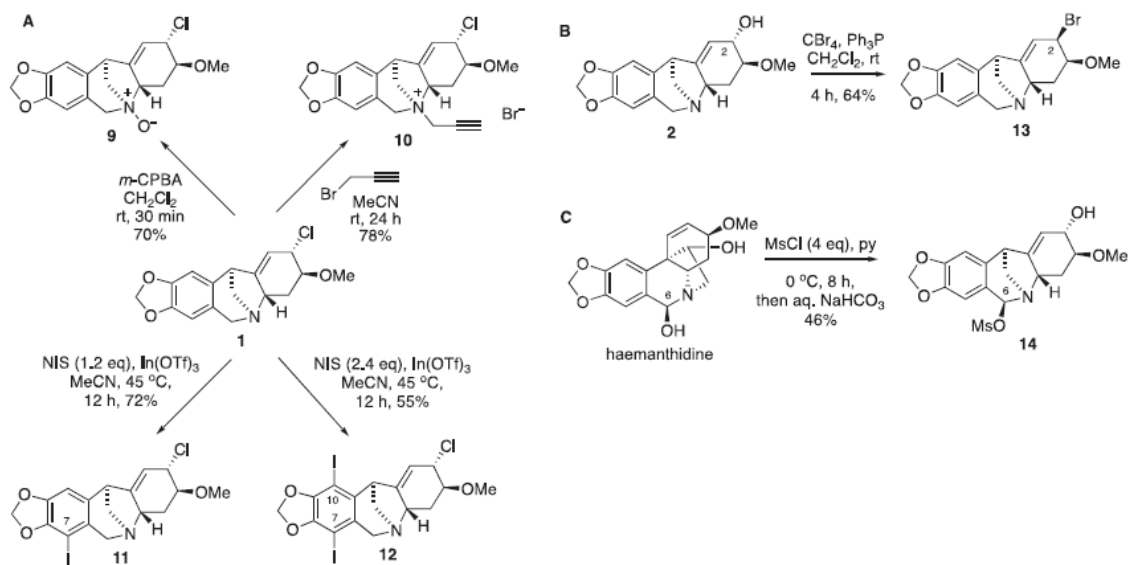
Týmto spôsobom boli pripravené C2-substituované deriváty montanínového typu ako môžeme vidieť na Obr. 12. Adícia metoxydovej skupiny vedie k príprave alkaloidu **mantínu**. Tento alkaloid už bol pripravený⁵², no jeho syntéza zahŕňala 24 krokov. Preto je táto jedнокroková syntéza z haemanthamínu celkom významná.

Medzi ďalšie nukleofily, ktoré môžu byť použité pri tejto transformácii, patria etanol, allylové a propargylové alkoholy, čo viedlo k látkam **3**, **4** a **5**. Navyše do polohy C2 môžu byť veľmi ľahko pridaný primárny amín, indol a pyrol (**6**, **7**, **8**). V prípade indolu bola pozorovaná len alkylácia na uhlíku C3, i keď sú možné alkylácie na dusíku N1 aj uhlíku C3.



Obr. 12 Schéma prípravy derivátov montanínového typu z haemanthamínu⁵¹

Kedže chlorid **1** bol ľahko pripraviteľný, bol použitý pre prípravu ďalších derivátov (**9**, **10**, **11**, **12**), ako je možné vidieť na Obr. 13A. Z derivátu **2** môžeme pripraviť bromid (**13** - Obr. 13B). Nakoniec bolo zistené, že transformácia krinínového na montanínový štruktúrny typ môže prebehnúť aj s **haemanthidínom**, pričom vzniká mesylovaný produkt na uhlíku C6. (**14** - Obr. 13C)



Obr. 13 Modifikácie látky **1** (A), **2** (B) a **haemanthidínu** (C)⁵¹

Pripravené deriváty boli testované na 6 nádorových bunkových líniah. Bunkové línie A549, SKMEL-28 a U373 sú rezistentné voči apoptóze, zatiaľ čo MCF7, Hs683 a B16F10 sú senzitívne. Výsledky sú uvedené v tabuľke 7.

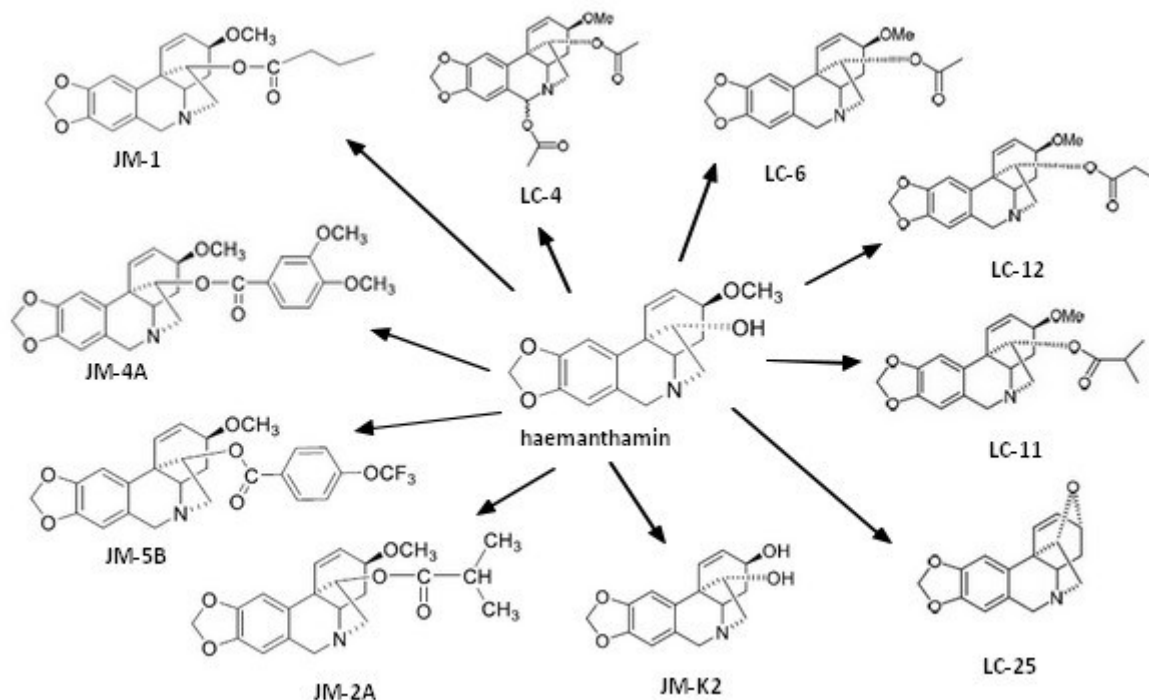
Tabuľka 7 *In vitro* antiproliferatívna aktivita pripravených derivátov⁵¹

Látka	GI ₅₀ (μM)					
	A549	SKMEL-28	U373	MCF7	Hs683	B16F10
1	6	26	51	17	6	7
2	5	8	31	13	4	8
Mantín	3	4	5	4	3	3
3	59	> 100	> 100	82	> 100	40
4	10	14	20	20	7	7
5	23	28	42	28	24	10
6	59	65	72	44	67	10
7	18	9	9	23	24	4
8	86	67	> 100	68	95	11
9	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
10	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
11	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
12	78	> 100	> 100	78	71	39
13	9	18	25	19	5	7
14	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	72

A549 – pľúcny karcinóm, SKMEL-28 – ľudský melanóm, U373 – glioblastóm, MCF7 – adenokarcinóm prsníka, Hs683 – oligodendroglióm, B16F10 – myšičí melanóm

Z uvedených výsledkov vidíme, že niektoré deriváty skutočne inhibovali proliferáciu nádorových buniek v mikromolárnych koncentráciách. Medzi najúčinnšie látky patrí mantín a deriváty s hydroxylovou a indolovou skupinou na uhlíku C2. Vybrané látky boli taktiež aktívne proti glioblastómovým bunkám exprimujúcim markery kmeňových buniek. Tieto výsledky naznačujú, že zlúčeniny montanínového štruktúrneho typu by mali byť podrobené ďalším experimentom.

Protinádorovej aktivite derivátov haemanthamínu sa venovali aj 2 diplomové práce^{53,54}. Zatiaľ bolo pripravených 10 derivátov reakciou haemanthamínu s príslušným acylačným činidlom (acylchloridom, poprípade anhydridom) v prostredí pyridínu alebo tetrahydrofuranu za prídania katalyzátoru dimetylaminopyridínu. Všetky pripravené deriváty sú na Obr. 14.



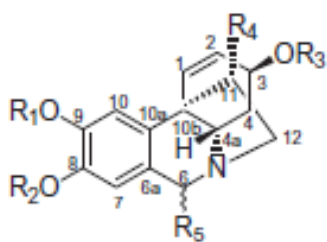
Obr. 14 Schéma prípravy derivátov haemanthamínu

Deriváty boli testované na črevných nádorových bunkových líniiach Caco-2, HT-29 a línii zdravých buniek FHS-74 Int. Žiaden z derivátov však nevykázal významnú aktivitu.

3.4.2 Antimalarická aktivita derivátov haemanthamínu

Malária je jedno z najzávažnejších parazitárnych ochorení na svete. Je spôsobená prvokmi rodu *Plasmodium*, medzi najznámejšie patrí *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*.⁵⁵ Najrozšírenejším druhom je *P. falciparum*, ktorý býva zároveň rezistentný na liečbu chlorochínom.⁵⁶ Prvými príznakmi malárie sú horúčka, triaška, bolesť kĺbov, bolesti brucha, zvracanie. Môže sa objaviť aj pocit mravenčenia v pokožke.⁵⁷

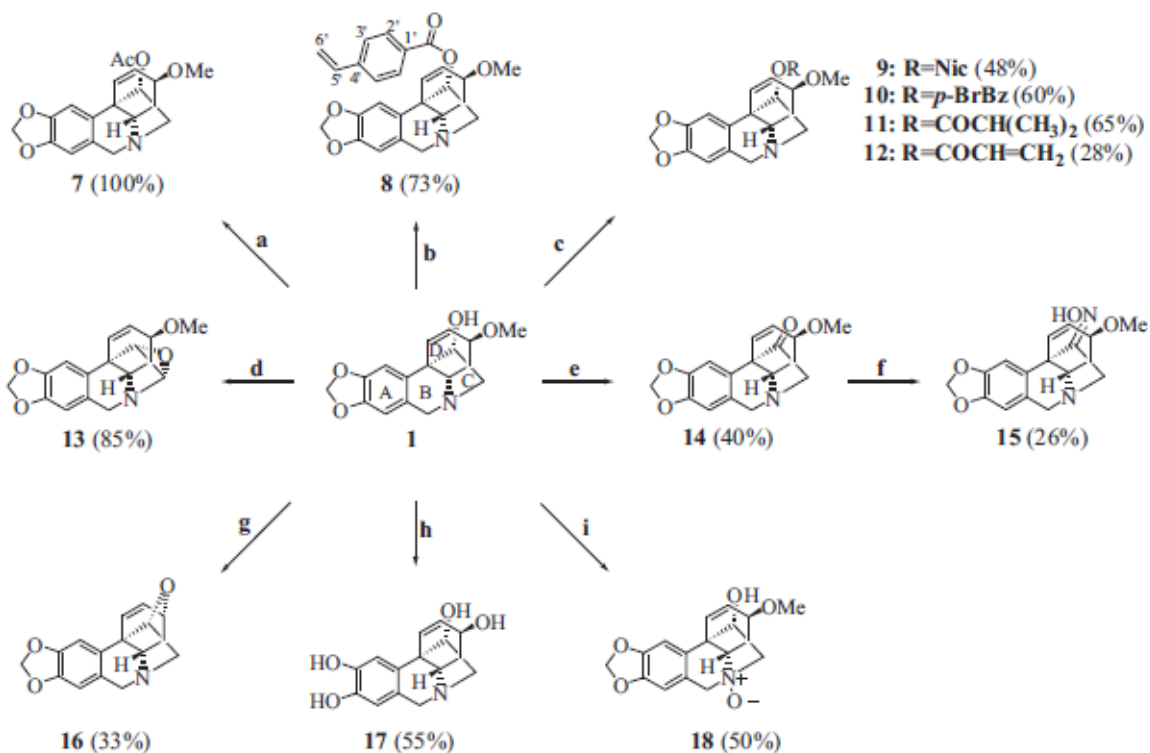
Výskum ukázal, že alkaloidy haemanthamín a haemanthidín majú vysoký inhibičný potenciál proti druhu *P. falciparum*.⁴³ Počas štúdie z roku 2012⁵⁸ boli tieto dve alkaloidy podrobené ďalšiemu výskumu. Pripravených bolo 31 derivátov haemanthamínu (**1**), haemanthidínu (**2**), ale aj 11-hydroxyvittatínu (**3**), ktorý taktiež patrí medzi alkaloidy haemanthamínového štruktúrneho typu. Ďalej boli spoločne s týmito alkaloidmi izolované a testované alkaloidy vittatín (**4**), 8-O-demetylmartidín (**5**) a 6-O-metylmartidín (**6**). Všetky alkaloidy boli izolované z rastliny *Pancratium canariense* a ich štruktúry sú uvedené na Obr. 15.



haemanthamin (1): $R_1+R_2=-CH_2-$, $R_3=Me$, $R_4=OH$, $R_5=H$
 haemanthidin (2): $R_1+R_2=-CH_2-$, $R_3=Me$, $R_4=R_5=OH$
 11-hydroxyvittatin (3): $R_1+R_2=-CH_2-$, $R_3=R_5=H$, $R_4=OH$
 vittatin (4): $R_1+R_2=-CH_2-$, $R_3=R_4=R_5=H$
 8-O-demethylmaritidin (5): $R_1=Me$, $R_2=R_3=R_4=R_5=H$
 6-O-methylmaritidin (6): $R_1+R_2=-CH_2-$, $R_3=Me$, $R_4=OH$, $R_5=OMe$

Obr. 15 Štruktúry alkaloidov haemanthamínového typu testovaných na antimalarickú aktivitu⁵⁸

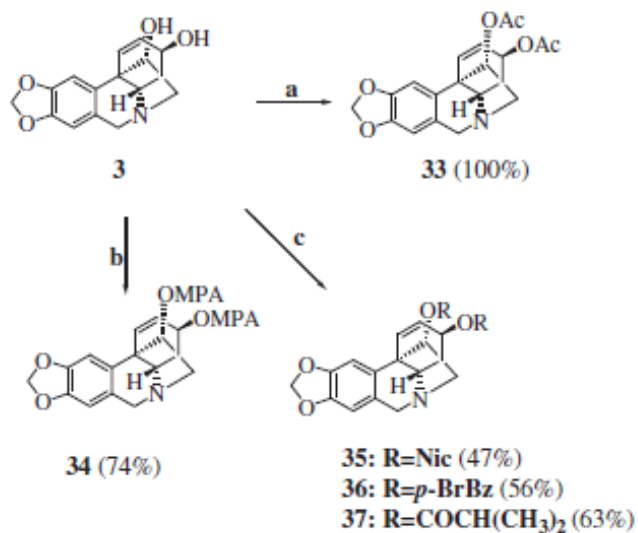
V prvej fáze experimentu boli vykonané modifikácie derivátu haemanthamínu na hydroxylovej skupine, ktorá sa nachádza na uhlíku C11. Schémy takto pripravených derivátov sú na Obr. 16. 11-Acetylhaemanthamín (7) boli pripravený acetyláciou acetanhydridom. Esterifikácia s *p*-vinylbenzoovou kyselinou poskytla derivát 8, ktorý má terminálnu vinylovú skupinu. Hydroxylová skupina bola taktiež acylovaná niekoľkými chloridmi rozličných vlastností, čo viedlo k príprave esterov (9 až 12). Reakciou haemanthamínu (1) s *N*-bromsukcínimidom vznikol epoxid (13). Oxidácia hydroxylovej skupiny Johnsonovým činidlom viedla k vzniku ketónu (14) a keď bol tento derivát (14) vystavený hydroxylamín hydrochloridu, vznikol derivát 15. Reakciou 1 s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou vznikol derivát 16, ktorý bol identifikovaný ako prírodný alkaloid apohaemanthamín. Polyhydroxylovaný derivát 17 bol získaný reakciou s bromidom boritým. Reakciou 1 s peroxidom vodíka vznikol *N*-oxid (18).



Obr. 16 Schémy prípravy derivátov haemanthamínu modifikáciou hydroxylovej skupiny na uhlíku C11⁵⁸

Dvojitá väzba haemanthamínu medzi uhlíkmi C1-C2 bola modifikovaná podľa schém na Obr. 17. Hydrogenácia a bromácia viedla k derivátom **19** a **20**. Reakciou s *N*-bromoacetamidom vznikla látka **21**. Avšak ak táto reakcia prebiehala za bezvodných podmienok, vznikol derivát **22**. Hoffmanovou elimináciou 11-acetylhaemanthamínu (**7**) s dvoma alkylhalogenidmi vznikli bifenylové deriváty **23** a **24**. Pri týchto reakciách došlo k aromatizácii kruhu C a otvoreniu kruhu D.

Boli učené aj modifikácie hydroxylovej skupiny na uhlíku C11 alkaloidu 11-hydroxyvittatínu (**3**) ako je možné vidieť na Obr. 19. Acetylácia **3** viedla k príprave látky **33**. Derivát **34** bol získaný esterifikáciou za použitia (*R*)-(-)-metoxyfenyloctovej kyseliny (MPA). Acyláciou **3** niekoľkými odlišnými acylchloridmi vznikli príslušné deriváty **35** až **37**.



Obr. 19 Schéma prípravy derivátov 11-hydroxyvittatínu⁵⁸

Všetky izolované alkaloidy a pripravené deriváty boli testované na *in vitro* antiplasmodiálnu aktivitu voči *P. falciparum* F32. Výsledky sú uvedené ako inhibičné koncentrácie IC₅₀ v tabuľke 7. Najlepšie výsledky dosiahli alkaloidy haemanthamín (**1**) a haemanthidín (**2**) s hodnotami IC₅₀ 1,3 μM a 1,2 μM. Avšak, derivát **35** sa prezentoval s najlepšou antiplasmodiálnou aktivitou s IC₅₀ hodnotou pod 1 μM.

Tabuľka 7 *In vitro* aktivita proti *P. falciparum* F32 v porovnaní so štandardom chlorochínom.⁵⁸

Látka	IC ₅₀ (μM)
1	1,3 ± 0,2
2	1,2 ± 0,09
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	51,7 ± 4,9
10	43,3 ± 4,1
11	56,6 ± 8,1
12	8,4 ± 1,7
13	1,6 ± 0,1
14	73,5 ± 10,0
15	95,5 ± 9,5
16	92,9 ± 14,8
17	13,4 ± 1,8
18	> 100
19	9,9 ± 1,3
20	6,5 ± 0,9
21	62,6 ± 7,5
22	72,6 ± 5,0
23	73,4 ± 10,5
24	> 100
25	52,3 ± 7,5
26	7,1 ± 0,9
27	2,9 ± 0,6
28	52,5 ± 6,6
29	85,7 ± 9,5
30	76,6 ± 9,6
31	72,1 ± 10,0
32	84,2 ± 10,5
33	> 100
34	5,1 ± 0,7
35	0,8 ± 0,06
36	3,0 ± 0,6
37	7,0 ± 1,2
Chlorochín	0,04

Z výsledkov môžeme predpokladať niektoré vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou pre látky haemanthamínového typu. Prítomnosť dvojitej väzby medzi uhlíkmi C1-C2 v kruhu D a metylendioxy skupiny na kruhu A hrajú dôležitú úlohu v antiplasmodiálnej aktivite, keďže sú prítomné v najviac aktívnych zlúčeninách. Z výsledkov acylovaných derivátov haemanthamínu **(7-12)**, haemanthidínu **(25-28)** a 11-hydroxyvittatínu **(33-37)**, môžeme usúdiť, že voľná hydroxylová skupina na uhlíku C11 je esenciálna u derivátov haemanthamínu s len jednou hydroxylovou skupinou na uhlíku C11. U derivátov 11-hydroxyvittatínu s hydroxylovými skupinami na uhlíkoch C3 a C11, povaha acylskupín na uhlíkoch C6 a C3 moduluje stratu antiplasmodiálnej aktivity, ktorá je spojená s acyláciou hydroxylovej skupiny na uhlíku C11. Prítomnosť dvoch aromatických esterových skupín na uhlíkoch C3 a C11 má za následok dobrú inhibičnú aktivitu.

Výsledky tejto štúdie nasvedčujú tomu, že niektoré deriváty haemanthamínu sú dobré inhibítory *P. falciparum* a príprava ďalších derivátov má zaujímavú budúcnosť.

3.4.3. Anticholinergná aktivita derivátov haemanthamínu

Alzheimerova choroba (AD) je atroficko degeneratívne ochorenie šedej kôry mozgovej⁵⁹ zatiaľ neobjasnenej etiológie. Hlavným znakom je rozvíjajúca sa demencia. Jedná sa o najčastejší typ demencie, ktorý spôsobuje problémy s pamäťou, myslením a chovaním, ktoré sa stupňujú s vekom až tak, že výrazne zasahujú do bežného života.⁶⁰

Príčiny AD sú zatiaľ neznáme. Na vzniku sa podieľajú vnútorné a vonkajšie príčiny. Medzi faktory, ktoré sa zúčastňujú neurodegenerácie patrí tvorba amyloidu β , degenerácia τ -proteínu a kyslíkové radikály. Podľa cholinergnej hypotézy sú tieto symptómy spôsobené nedostatočnou aktivitou acetylcholínu (ACh) v mozgu z dôvodu jeho rozkladu enzýmom acetylcholinesterázou (HuAChE).⁶¹

Súčasná liečba nedokáže zastaviť demenciu, ale dokáže dočasne spomaliť zhoršovanie symptómov AD.⁶² V súčasnosti sú v terapii využívané inhibítory HuAChE a svoje využitie majú aj inhibítory butyrylcholinesterázy (HuBuChE), ktoré taktiež dokážu zabrániť rozkladu ACh⁶¹, pomáhajú pri znížení amyloidu β ^{63,64} a rastu neurofibrilárneho plaku.⁶⁵

Anticholinergná aktivita haemanthamínu bola testovaná, no tento alkaloid bol neaktívny. Keďže sa na Katedre farmaceutickej botaniky pravidelne testujú látky na anticholinergnú

aktivitu, otestované boli aj pripravené deriváty haemanthamínu^{53,54}, ktoré boli zobrazené na Obr. 14 a zistilo sa, že tieto látky sú aktívne. Hodnoty IC₅₀ sú uvedené v tabuľke 8.

Tabuľka 8 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátov voči HuAChE a HuBuChE v porovnaní so štandardom galantamínom^{53,54}

Látka	IC ₅₀ (μM)	
	HuAChE	HuBuChE
Haemanthamín	> 1000	> 1000
LC-12	> 1000	> 1000
LC-11	876,63 ± 101,01	120,53 ± 14,59
JM-1	835 ± 129	203 ± 8
JM-4A	289 ± 30	298 ± 42
JM-5B	538 ± 67	> 1000
JM-2A	632 ± 46	140 ± 21
Galantamín	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3

Z pohľadu inhibície HuAChE nevykázala žiadna z látok zaujímavú aktivitu. Medzi inhibičnými aktivitami voči HuBuChE sa najlepšou aktivitou prezentoval derivát LC-11, vďaka ktorému sa naskytá možnosť ďalšieho testovania.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Materiál, chemikálie a metódy

4.1.1 Amaryllidaceae alkaloidy

Alkaloid haemanthamín bol izolovaný z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master na katedre Farmaceutickej botaniky (spracovala PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.) vrámci fytochemických prác. Výber alkaloidu sa uskutočnil na základe prebiehajúcich štúdií AA, v ktorých boli pripravené deriváty za účelom štúdia vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou.^{53,54}

4.1.2. Rozpúšťadlá, chemikálie, detekčné činidlo

Etanol, p.a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Pyridin, p.a. (Penta)

Etylacetát, p.a. (Penta)

Dimetylamino-pyridin (DMAP), p.a. (Penta)

Pentanoylanhydrid, ≥ 99% (Acros)

Hexanoylanhydrid, ≥ 99% (Acros)

m-Toluoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

p-Toluoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

3-Brombenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

3,5-Dimetoxybenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

3-Fluorbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

2-Nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

3-Nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

2-Metoxybenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)

Dragendorffovo činidlo (pripravované v laboratóriu)

Materiál pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu

Kiesel SiO₂ F254, Merck, 20 × 20 cm, hliníková doska s vrstvou silikagelu pre TLC; vrstva 0,2 mm

4.1.3. Vyvíjacie sústavy pre analytickú a preparatívnu tenkovrstvú chromatografiu

S1: To:cHx:DEA 60:40:5

S2: To:cHx:DEA 50:50:5

S3: To:DEA 95:5

4.1.4. Štruktúrna analýza pripravených derivátov

4.1.4.1 GC-MS analýza

GC-MS analýza bola použitá pre určenie molekulovej hmotnosti pripravených látok. K analýzam bol použitý plynový chromatograf v spojení s hmotnostným spektrometrom Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujúcim v EI režime pri 70 eV. K separácii bola použitá kolona typu DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Teplotný rozsah bol od 100-300 °C, pričom v rozmedzí teplôt od 100-180 °C vzrastala teplota o 15 °C/min. Pri dosiahnutí 180 °C bola táto teplota udržiavaná po dobu jednej minúty a následne stúpala do 300 °C rýchlosťou 5 °C/min a potom bola na tejto hodnote opäť udržiavaná 40 minút. Teplota nástreku vzorku na kolonu bola 280 °C s rýchlosťou prietoku nosného plynu (hélia) 0,8 ml/min. Detekčné rozmedzie m/z 40-600. Koncentrácia nastrekovaného vzorku v metanole bola 1 mg/ml. Získané známe látky boli porovnané s dátami v literatúre, štruktúrne nepopísané látky boli charakterizované po prvýkrát.

4.1.4.2 ESI-MS analýza

Látky, ktoré obtiažne ionizovali za podmienok EI spektier, boli analyzované za účelom získania hodnôt Mr pomocou ESI ionizácie na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iónová pasca, ionizácia elektrosprejom v kladnom móde (ESI+). MS/MS spektrá sa merali pri kolíznej energii 40 eV. Látky boli pre experimenty rozpustené v metanole (1 mg/ml).

4.1.4.3 Hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (ESI-HMRMS analýza)

Táto metóda bola použitá pre určenie presnej hodnoty novo pripravených a v literatúre doposiaľ neuvedených zlúčenín. Hmotnostné spektrá sa merali spektrometrom s vysokým hmotnostným rozlíšením UHPLC Waters Acquity I-Class s ionizáciou elektrosprejom v kladnom móde a kombinovaným analyzátorom – kvadrupól s analyzátorom doby letu Waters Synapt

G7-Si. Vzorky boli merané v roztoku MeCN. Potom došlo k porovnávaniu teoretického m/s s experimentálne zisteným.

4.1.4.4 NMR analýza

NMR spektrá boli merané v roztokoch CDCl₃ prípadne CD₃OD pri teplote 25 °C na spektrometre Varian Innova 500 pracujúcom pri 499,87 MHz pre ¹H jadrá a 125,70 MHz pre ¹³C jadrá. K ožarovaniu a detekcii signálu bola použitá OneNMR sonda, širokopásmová dvojkanálová gradientová sonda s reguláciou teploty. Chemické posuny boli zmerané ako hodnoty δ pars per milion (ppm) a boli nepriamo vzťahnuté k TMS ako štandardu pomocou zbytkového signálu rozpúšťadla. Hodnoty chemického posunu pre CDCl₃ sú u atómov ¹H δ = 7,26 ppm a u atómov ¹³C δ = 49,0 ppm. Meraním získané dáta sú prezentované v nasledujúcom poradí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ¹H NMR spektier, multiplicita (S: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletov, m: multiplet, bs: široký singlet) a integračná konštanta (Hz).

4.1.4.5 Optická otáčavosť

Optická otáčavosť bola meraná v roztokoch alkaloidov pri 20 °C na automatickom polarimetri ADP 220 BS v prostredí chloroformu alebo metanolu a špecifická otáčavosť bola dopočítaná podľa vzorca:

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

t – teplota merania = 20 °C

D – línia sodíkového svetla = 589,3 nm

α – nameraná optická otáčavosť [°C]

c – koncentrácia nameraného alkaloidu [g × 100 ml⁻¹]

l – dĺžka kyvety = 1 dm

4.1.5 Metódy pre screening biologických aktivít pripravených zlúčenín

4.1.5.1 Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči erytrocytarnej HuAChE a sérovej HuBuChE

Inhibičná aktivita týchto enzýmov bola meraná na Katedre farmaceutickej botaniky, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Merali ich prof. RNDr. Lubomír Opletal a PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. Podrobný popis tejto metódy je možné nájsť v literatúre.⁶⁶

4.1.5.2 Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči POP

Meranie inhibičnej aktivity voči prolyloligopeptidáze prebehlo v spolupráci s Katedrou toxikológie a vojenskej farmácie, Fakulty vojenského zdravotníctva, Univerzity obrany Hradec Králové. Merala ich Mgr. Martina Hrabínová. Podrobný popis metódy je možné nájsť v literatúre.⁶⁷

4.1.5.3 Stanovenie cytotoxickéj aktivity pripravených derivátov

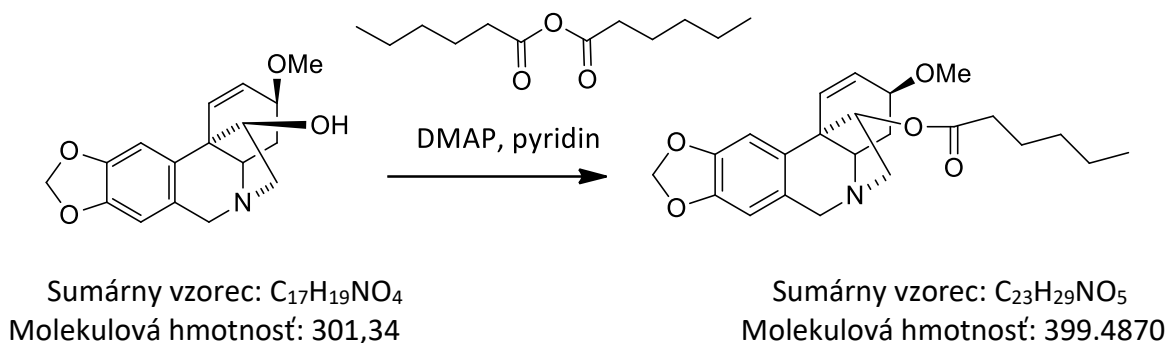
Stanovenie cytotoxickéj aktivity pripravených derivátov prebehlo v spolupráci s Katedrou lekárskej biochémie, Lekárskej fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovej, za využitia systému xCELLigence. Testoval ich RNDr. Radim Havelek, Ph.D. Popis metódy merania za využitia prístroja xCELLigence je popísaný v literatúre.²⁷

4.1.5.4. Stanovenie inhibičnej aktivity pripravených derivátov voči GSK-3β

Stanovenie inhibičnej aktivity voči tomuto enzýmu prebehlo v rámci zahraničného pobytu v Taliansku. Merala ich Mgr. Daniela Hulcová. Podrobný popis metódy merania je možné nájsť v literatúre.⁶⁸

4.2 Príprava polosyntetických derivátov alkaloidu haemanthamínu a ich štruktúrna identifikácia

4.2.1 Príprava 11-O-hexanoylhaemanthamínu (LC-52)



Obr. 20 Schéma syntézy 11-O-hexanoylhaemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μ l hexanoylanhydridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 3 hodiny. Potom sme pridali ďalších 100 μ l hexanoylanhydridu a miešali pri teplote 80 °C 2 hodiny. Reakčná zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:cHx:DEA 60:40:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 59 mg 11-O-hexanoylhaemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 90 %.

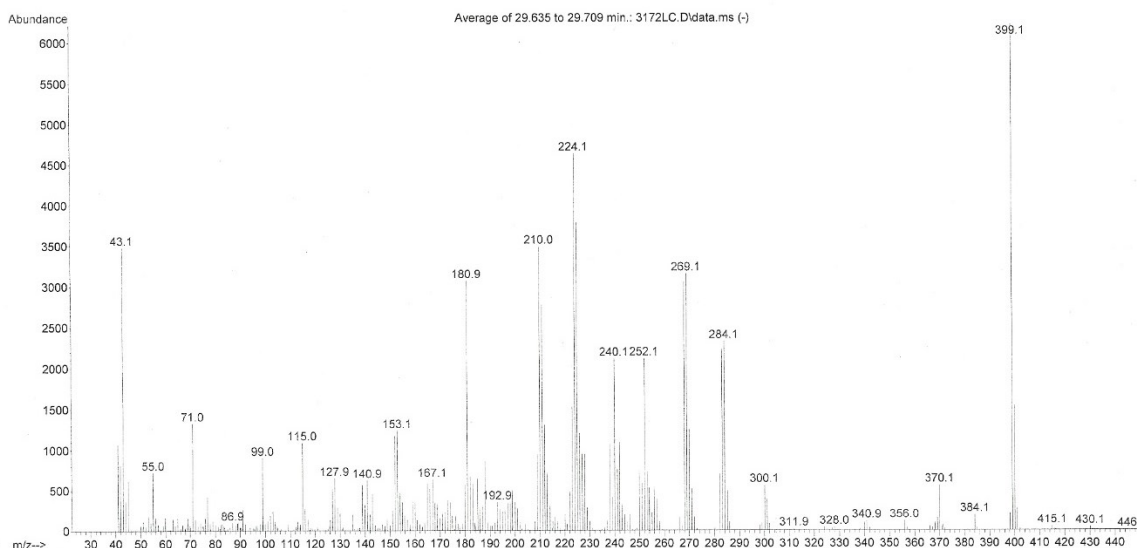
Štruktúrna analýza 11-O-hexanoylhaemanthamínu

Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-methoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-ethano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl hexanoát

EI-MS štúdia:

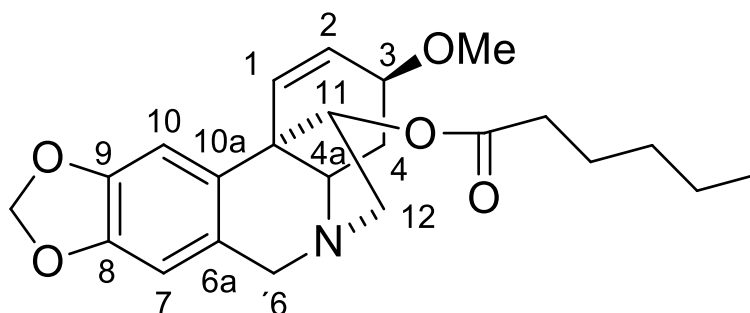
EI/MS m/z (%) 399 (100), 370 (10), 300 (10), 284 (37), 269 (51), 252 (34), 240 (35), 224 (74), 209 (57), 181 (50).



Obr. 21 EI-MS štúdia 11-*O*-hexanoylhaemanthaminu

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for $C_{23}H_{29}NO_5$ $[M+H]^+$ 400.2124 found 400.2126

NMR štúdia:



Obr. 22 Štruktúra 11-*O*-hexanoylhaemanthamínu

1H NMR (500 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

6,91 (1H, s), 6,46 (1H, s), 6,35 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), 6,14 (1H, ddd, $J = 10,0$ Hz, $J = 4,7$ Hz, $J = 1,0$ Hz), 5,90 - 5,88 (2H, m), 4,97 (1H, ddd, $J = 7,4$ Hz, $J = 3,4$ Hz, $J = 1,0$ Hz), 4,35 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 3,85 - 3,81 (1H, m), 3,71 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 3,44 - 3,26 (3H, m), 3,36 (3H, s), 2,24 - 2,18 (2H, m), 2,07 - 2,01 (1H, m), 1,94 (1H, td, $J = 13,7$ Hz, $J = 4,7$ Hz), 1,60 - 1,53 (2H, m), 1,36 - 1,23 (4H, m), 0,90 (3H, t, $J = 6,8$ Hz).

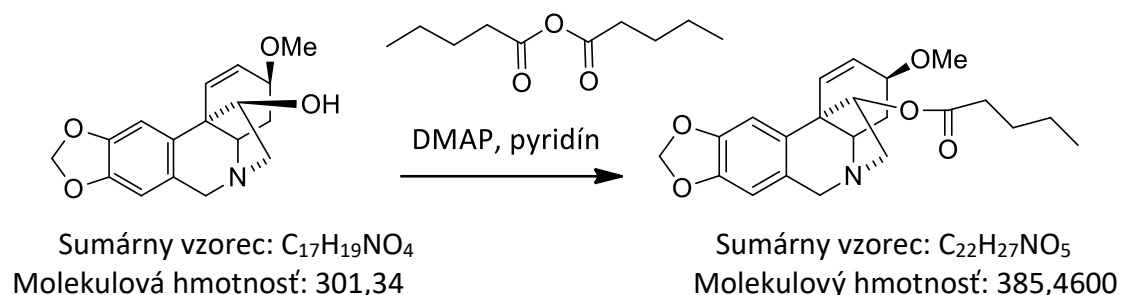
^{13}C NMR (126 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

172,7; 146,6; 146,4; 134,4; 129,4; 127,8; 126,6; 106,5; 103,9; 100,8; 80,1; 72,6; 62,8; 61,2;
60,7; 56,5; 49,2; 34,4; 31,2; 28,4; 24,5; 22,2; 13,8.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9,8^\circ$ (c 0,449 CHCl_3)

4.2.2 Príprava 11-O-pentanoylhaemanthamínu (LC-53)



Obr. 23 Schéma syntézy 11-O-pentanoylhaemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μl pentanoylanhydridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 3 hodiny. Reakčná zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola $\text{To}:\text{cHx}:\text{DEA}$ 50:50:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 54 mg 11-O-pentanoylhaemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 58 %.

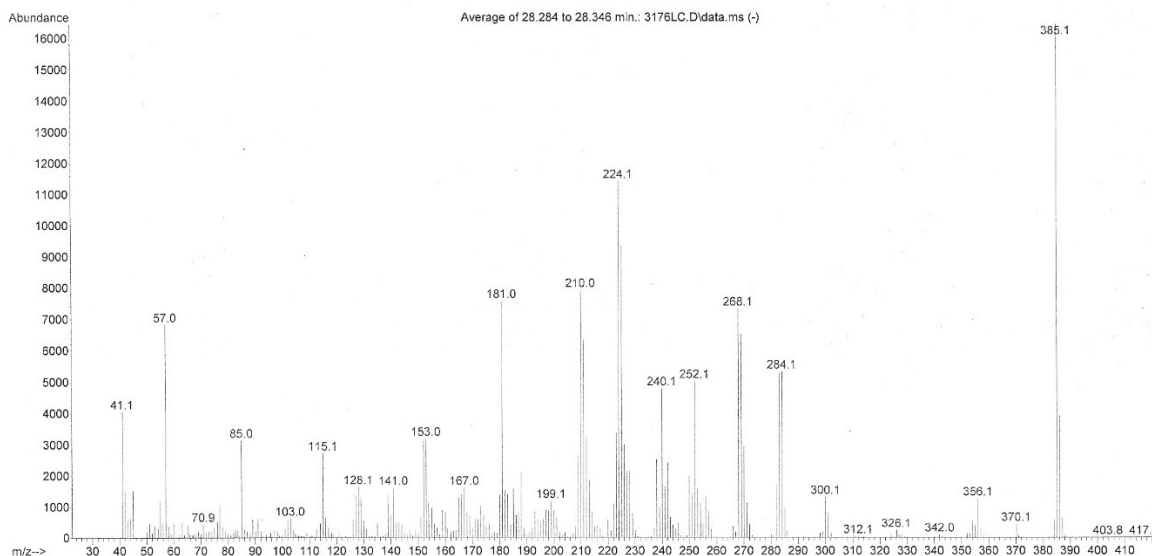
Štruktúrna analýza 11-O-pentanoylhaemanthamínu

Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl pentanoát

EI-MS štúdia:

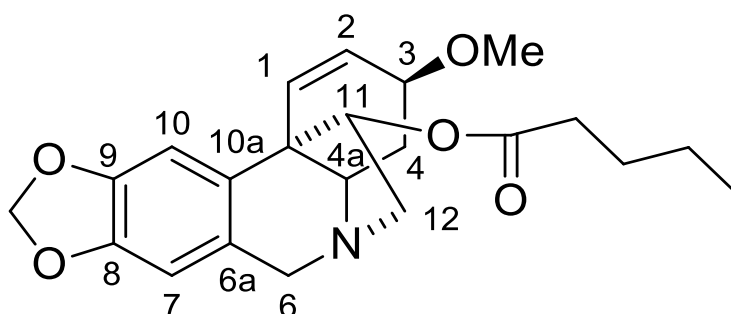
EI/MS m/z (%) 385 (100), 356 (10), 300 (12), 284 (28), 283 (28), 268 (45), 252 (30), 240 (29), 224 (70) 210 (48), 181 (46).



Ob. 24 EI-MS štúdia 11-*O*-pentanoylhaemanthamínu

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for $C_{22}H_{27}NO_5$ $[M+H]^+$ 386.1967 found 386.1968

NMR štúdia:



Ob. 25 Štruktúra 11-*O*-pentanoylhaemanthamínu

1H NMR (500 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

6,91 (1H, s), 6,47 (1H, s), 6,35 (1H, d, $J = 10,3$ Hz), 6,15 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,91 – 5,88 (2H, m), 4,98 (1H, dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz), 4,36 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 3,86 – 3,81 (1H, m), 3,73 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 3,43 – 3,29 (3H, m), 3,36 (3H, s), 2,22 (2H, td, $J = 7,3$ Hz, $J = 3,9$ Hz), 2,08 – 2,03 (1H, m), 1,98 – 1,91 (1H, m), 1,59 – 1,50 (2H, m), 1,38 – 1,28 (2H, m),

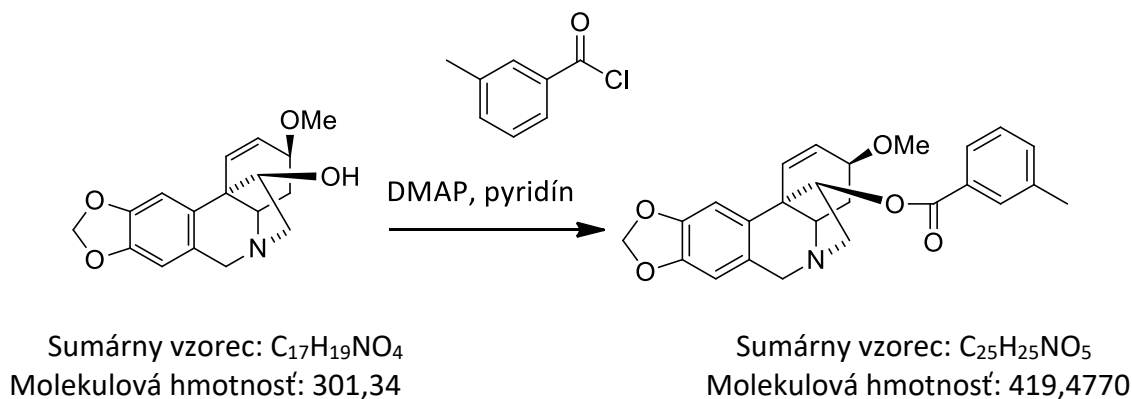
^{13}C NMR (125 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

172,7; 146,7; 146,4; 134,3; 129,5; 127,7; 126,4; 106,6; 103,9; 100,9; 80,0; 72,6; 62,8; 61,1; 60,6; 56,5; 49,2; 34,2; 28,3; 26,9; 22,2; 13,7.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20} = + 15,7^\circ$ (c 0,508 CHCl_3)

4.2.3 Príprava 11-O-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu (LC-55)



Obr. 26 Schéma syntézy 11-O-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μl *m*-toluoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 3 hodiny. Na základe analytickej TLC bolo pridaných ďalších 100 μl *m*-toluoylchloridu a miešali pri teplote 80 °C 2 hodiny. Reakčná zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 56 mg 11-O-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 81 %.

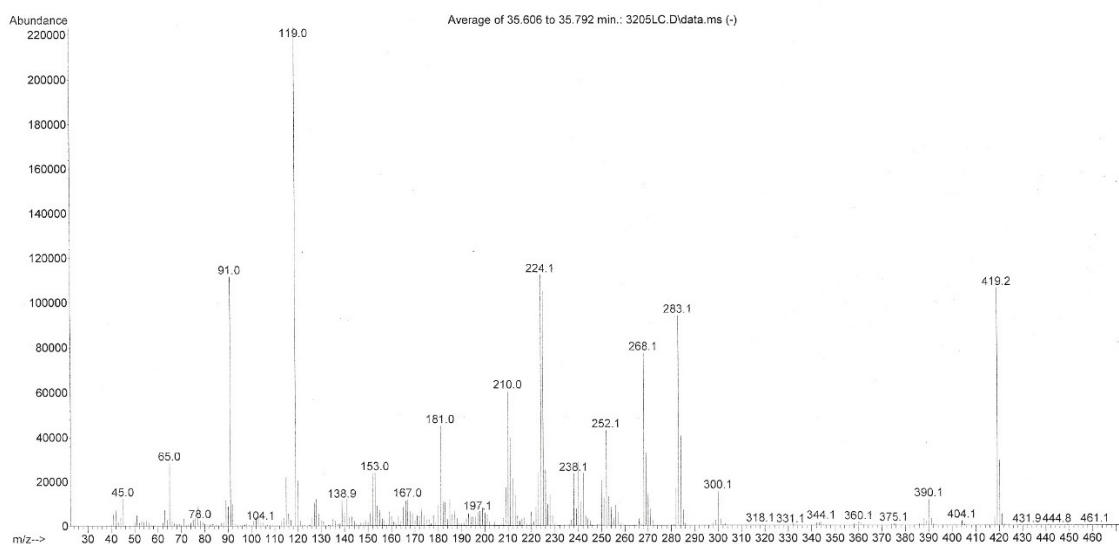
Štruktúrna analýza 11-O-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu

Systematický názov:

(3*S*,5*S*,11*bS*)-3-metoxy-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-12-yl 3-metylbenzoát

EI-MS štúdia:

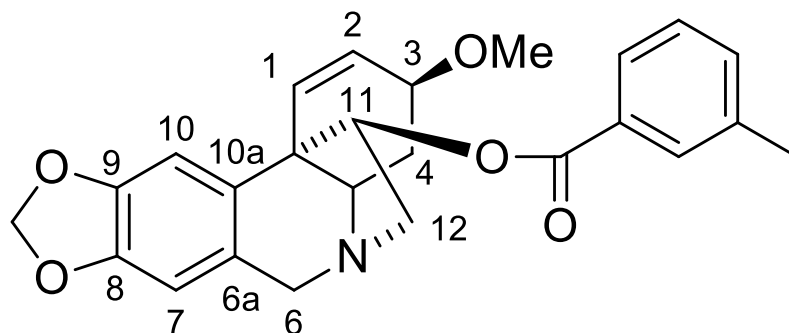
EI/MS m/z (%) 419 (49), 390 (5), 283 (43), 268 (35), 252 (20), 225 (47), 224 (50), 225 (47), 181 (20), 119 (100).



Obr. 27 EI-MS štúdia 11-*O*-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for $C_{26}H_{26}NO_5$ $[M+H]^+$ 420.1811 found 420.1806

NMR štúdia:



Obr. 28 Štruktúra 11-*O*-(3-metylbenzoyl)-haemanthamínu

1H NMR (500 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

7,75 (1H, bs), 7,71 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,37 (1H, d, $J = 7,4$ Hz), 7,31 (1H, t, $J = 7,4$ Hz), 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 – 5,89 (2H, m), 5,20 (1H, dd, $J = 6,8$ Hz, $J = 3,9$ Hz), 4,40 (1H, d, $J = 16,7$ Hz), 3,88 – 3,84 (1H, m), 3,77 (1H, d, $J = 16,7$ Hz), 3,56 – 3,41 (3H, m), 3,36 (3H, s), 2,40 (3H, s), 2,17 – 2,04 (2H, m).

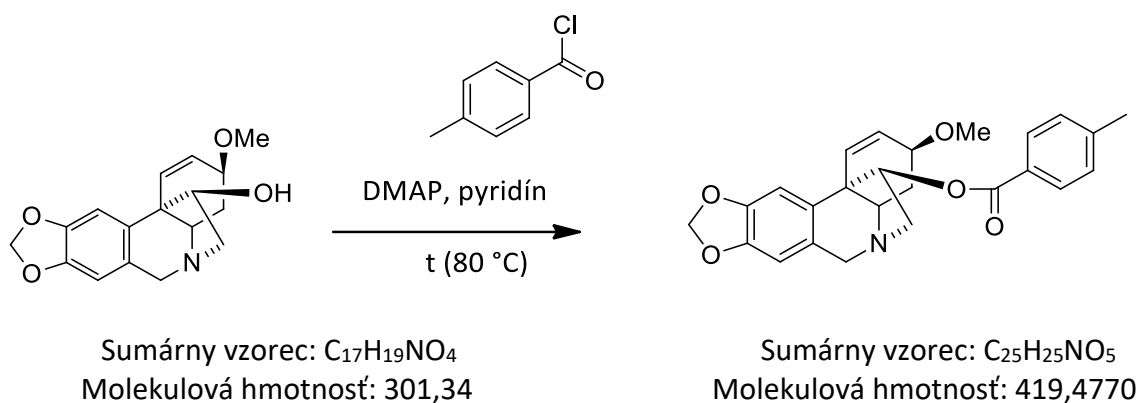
^{13}C NMR (125 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

165,6; 146,7; 146,5; 138,2; 134,3; 133,8; 130,0; 129,9; 129,5; 128,3; 127,7; 126,5; 126,3; 106,6; 103,9; 100,8; 80,8; 72,5; 62,9; 61,2; 60,9; 56,5; 49,2; 28,5; 21,3.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 32^\circ$ (c 0,1 CHCl_3)

4.2.4. Príprava 11-O-(4-metylbenzoyl)-haemanthamínu (LC-57)



Obr. 29 Schéma syntézy 11-O-(4-metylbenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μl *p*-toluoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri zvýšenej teplote 80 °C 3 hodiny. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 61 mg 11-O-(4-metylbenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 87 %.

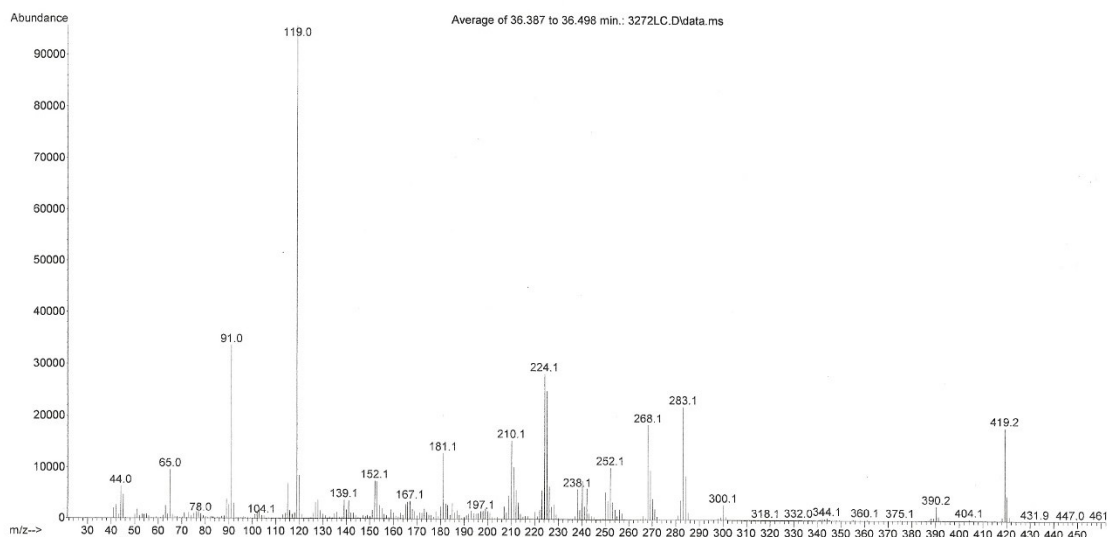
Štruktúrna analýza 11-O-(4-metylbenzoyl)-haemanthamínu

Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxo-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 4-metylbenzoát

EI-MS štúdia:

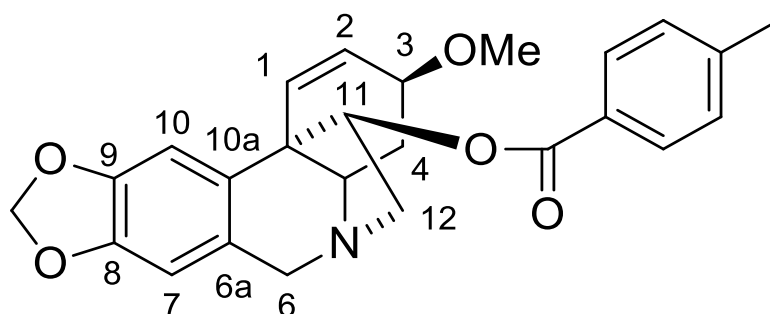
EI/MS m/z (%) 419 (20), 390 (3), 283 (23), 268 (20), 224 (30), 225 (26), 181 (14), 119 (100), 91 (36).



Obr. 30 EI-MS štúdiá 11-*O*-(3-methylbenzoyl)-haemanthamínu

ESI-HRMS štúdiá: m/z calcd for $C_{26}H_{26}NO_5$ $[M+H]^+$ 420.1811 found 420.1802

NMR štúdiá:



Obr. 31 Štruktúra 11-*O*-(3-methylbenzoyl)-haemanthamínu

1H NMR (500 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

7,83 – 7,80 (2H, m, AA'BB'), 7,25 – 7,22 (2H, m, AA'BB'), 6,95 (1H, s), 6,50 (1H, s), 6,43 (1H, d, $J = 10,1$ Hz), 6,11 (1H, dd, $J = 10,1$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,92 – 5,87 (2H, m), 5,20 (1H, dd, $J = 7,3$ Hz, $J = 3,6$ Hz), 4,40 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,88 – 3,84 (1H, m), 3,78 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,53 (1H, dd, $J = 14,2$ Hz, $J = 6,8$ Hz), 3,49 – 3,41 (2H, m), 3,36 (3H, s), 2,42 (3H, s), 2,17 – 2,06 (2H, m).

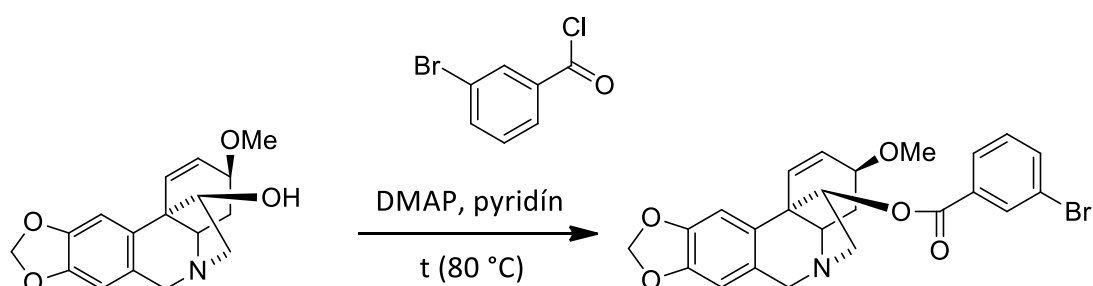
^{13}C NMR (125 MHz, δ $CDCl_3$, 25°C):

165,5; 146,7; 146,5; 134,3; 129,5; 129,4; 129,1; 127,7; 127,4; 126,5; 106,6; 104,0; 100,9; 80,7; 72,5; 62,9; 61,2; 61,0; 56,5; 49,3; 28,5; 21,6.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20} = + 18^\circ$ (c 0,25 CHCl₃)

4.2.5. Príprava 11-O-(3-brombenzoyl)-haemanthamínu (LC-58)



Sumárny vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molekulová hmotnosť: 301,34

Sumárny vzorec: C₂₄H₂₂BrNO₅
Molekulová hmotnosť: 484,3460

Obr. 32 Schéma syntézy 11-O-(3-brombenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μ l 3-brombenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote 80 °C 3 hodiny. Na základe analytickej TLC bolo pridaných ďalších 100 μ l 3-brombenzoylchloridu a zmes sa miešala ďalšie 3 hodiny. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 75 mg 11-O-(3-brombenzoyl)-haemanthamínu vo forme bieleho oleja. Výťažok reakcie bol 93 %.

Štruktúrna analýza 11-O-(3-brómbenzoyl)-haemanthamínu

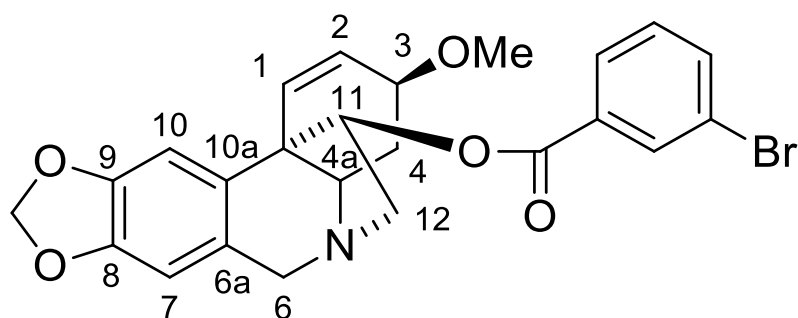
Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 3-brómbenzoát

EI-MS štúdia: v meraní

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for C₂₄H₂₂BrNO₅ [M+H]⁺ 484.0760 found 484.0763

NMR štúdia:



Obr. 33 Štruktúra 11-O-(3-brómbenzoyl)-haemanthamínu

¹H NMR (500 MHz, δ CDCl₃, 25°C):

8,04 – 8,01 (1H, m), 7,84 – 7,81 (1H, m), 7,68 – 7,65 (1H, m), 7,30 (1H, t, $J = 7,8$ Hz), 6,93 (1H, s), 6,48 (1H, s), 6,40 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 6,12 (1H, dd, $J = 9,8$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,90 – 5,88 (2H, m), 5,17 (1H, dd, $J = 6,8$ Hz, $J = 3,4$ Hz), 4,38 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 3,87 – 3,83 (1H, m), 3,75 (1H, d, $J = 16,6$ Hz), 3,55 – 3,48 (1H, m), 3,46 – 3,40 (2H, m), 3,35 (3H, s), 2,13 (1H, dd, $J = 13,5$ Hz, $J = 4,4$ Hz), 2,02 (1H, td, $J = 13,5$ Hz, $J = 4,4$ Hz).

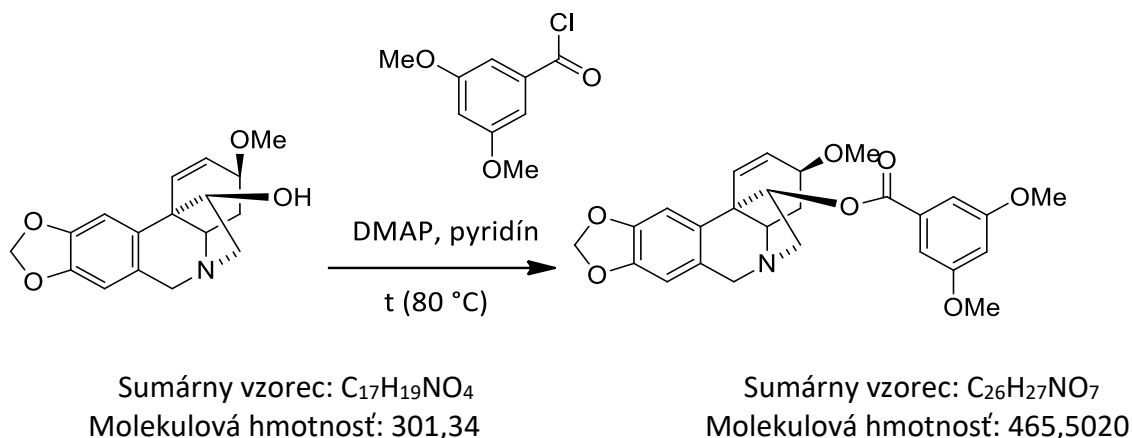
¹³C NMR (125 MHz, δ CDCl₃, 25°C):

164,0; 146,6; 146,5; 134,9; 134,0; 132,3; 132,0; 129,9; 129,6; 127,7; 127,5; 126,5; 122,4; 106,6; 103,8; 100,8; 81,2; 72,3; 62,8; 61,1; 60,8; 56,5; 49,2; 28,5.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20} = + 66,9^\circ$ (c 0,202 CHCl₃)

4.2.6. Príprava 11-O-(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamínu (LC-59)



Obr. 34 Schéma syntézy 11-O-(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50 mg 3,5-dimetoxybenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote 80 °C 6 hodín. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 52 mg 11-O-(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 68 %.

Štruktúrna analýza 11-O-(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamínu

Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 3,5-dimetoxybenzoát

EI-MS štúdia:

EI/MS m/z (%) 466 (100), 284 (25), 252 (20)

^1H NMR (500 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

7,07 (2H, d, $J = 2,3$ Hz), 6,95 (1H, s), 6,64 (1H, t, $J = 2,3$ Hz), 6,50 (1H, s), 6,43 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 6,15 (1H, dd, $J = 9,8$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,93 – 5,88 (2H, m), 5,17 (1H, dd, $J = 6,9$ Hz, $J = 3,4$ Hz), 4,40 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 3,88 – 3,85 (1H, m), 3,82 (6H, s), 3,77 (1H, d, $J = 16,8$ Hz), 3,54 (1H, dd, $J = 14,2$ Hz, $J = 7,3$ Hz), 3,48 – 3,41 (2H, m), 3,36 (3H, s), 2,16 – 2,11 (1H, m), 2,07 (1H, td, $J = 13,1$ Hz, $J = 3,9$ Hz).

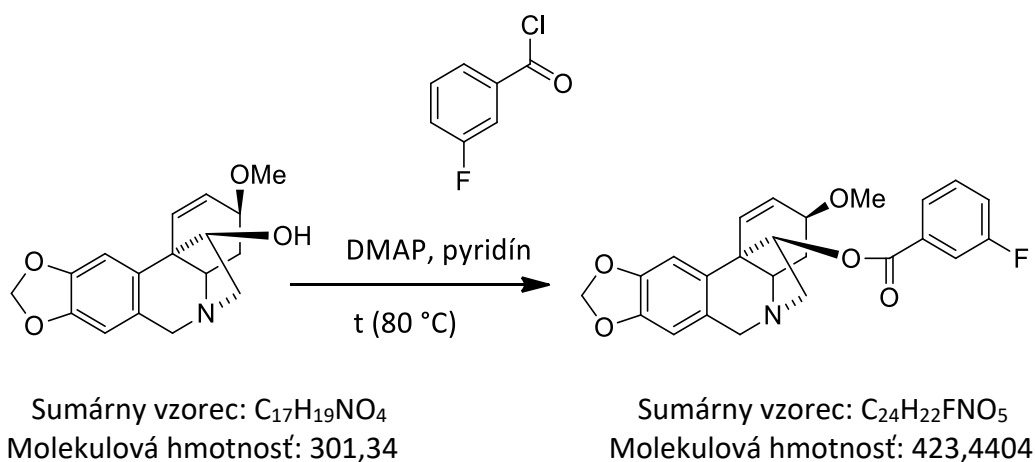
^{13}C NMR (125 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

165,2; 160,6; 146,7; 146,5; 134,2; 132,0; 129,5; 127,7; 126,6; 107,0; 106,6; 105,4; 103,9; 100,9; 81,0; 72,5; 62,9; 61,2; 61,0; 56,5; 55,5; 49,2; 28,5.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} =$ v meraní

4.2.7. Príprava 11-O-(3-fluorbenzoyl)-haemanthamínu (LC-60)



Obr. 37 Schéma syntézy 11-O-(3-fluorbenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μl 3-fluorbenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 3 hodiny. Na základe analytickej TLC bolo pridaných ďalších 100 μl 3-fluorchloridu a miešaných pri teplote 80 °C 2 hodiny. Reakčná zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá

a odparená. Získalo sa 32 mg 11-*O*-(3-fluórbenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 44 %.

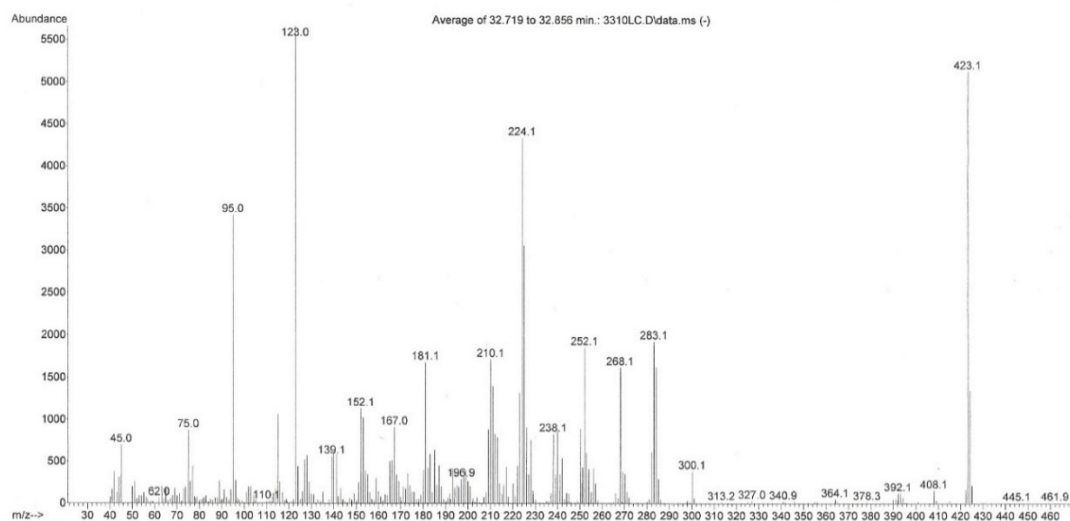
Štruktúrna analýza 11-*O*-(3-fluórbenzoyl)-haemanthamínu

Systematický názov:

(3*S*,5*S*,11*bS*)-3-metoxy-4,4*a*-dihydro-3*H*,6*H*-5,11*b*-etano[1,3]dioxolo[4,5-*j*]phenanthridin-12-yl 3-fluórbenzoát

EI-MS štúdia:

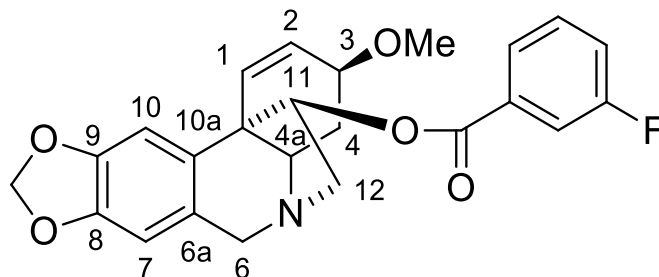
EI/MS *m/z* (%) 423 (90), 283 (36), 268 (30), 252 (33), 224 (77), 181 (30), 123 (100), 95 (61).



Obr. 38 EI-MS štúdia 11-*O*-(3-fluórbenzoyl)-haemanthamínu

ESI-HRMS štúdia: *m/z* calcd for C₂₄H₂₃FNO₅ [M+H]⁺ 424.1560 found 424.1561

NMR štúdia:



Obr. 39 Štruktúra 11-*O*-(3-fluórbenzoyl)-haemanthamínu

^1H NMR (500 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

7,72 (1H, dt, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,1$ Hz), 7,61 – 7,57 (1H, m), 7,42 (1H, td, $J = 7,8$ Hz, $J = 5,4$ Hz), 7,27 (1H, ddd, $J = 16,6$ Hz, $J = 2,5$ Hz, $J = 1,1$ Hz) 6,95 (1H, s), 6,51 (1H, s), 6,42 (1H, d, $J = 10,0$ Hz), 6,14 (1H, dd, $J = 10,0$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,93 – 5,91 (2H, m), 5,20 (1H, dd, $J = 6,7$ Hz, $J = 3,4$ Hz), 4,40 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,89 – 3,85 (1H, m), 3,78 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,57 – 3,52 (1H, m), 3,49 – 3,42 (2H, m), 3,37 (3H, s), 2,18 – 2,12 (1H, m), 2,05 (1H, td, $J = 13,2$ Hz, $J = 4,4$ Hz).

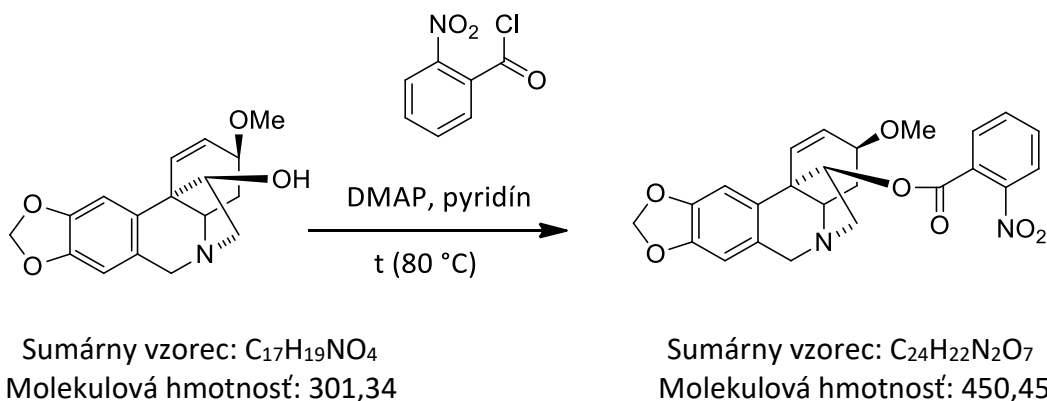
^{13}C NMR (125 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

162,5 (d, $J = 247,1$ Hz); 146,7; 146,6; 134,1; 132,3 (d, $J = 77,0$ Hz); 130,1 (d, $J = 77,0$ Hz); 129,7; 127,6; 126,5; 125,0 (d, $J = 2,9$ Hz); 120,1 (d, $J = 17,6$ Hz); 116,2 (d, $J = 23,9$ Hz); 106,7; 103,9; 100,9; 81,2; 72,4; 62,9; 61,2; 60,9; 56,5; 49,2; 28,5.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \text{v meraní}$

4.2.8 Príprava 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu (LC-68)



Obr. 40 Schéma syntézy 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 200 μl 2-nitrobenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote 80 °C 10 hodín. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 47 mg 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 79 %.

Štruktúrna analýza 11-O-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

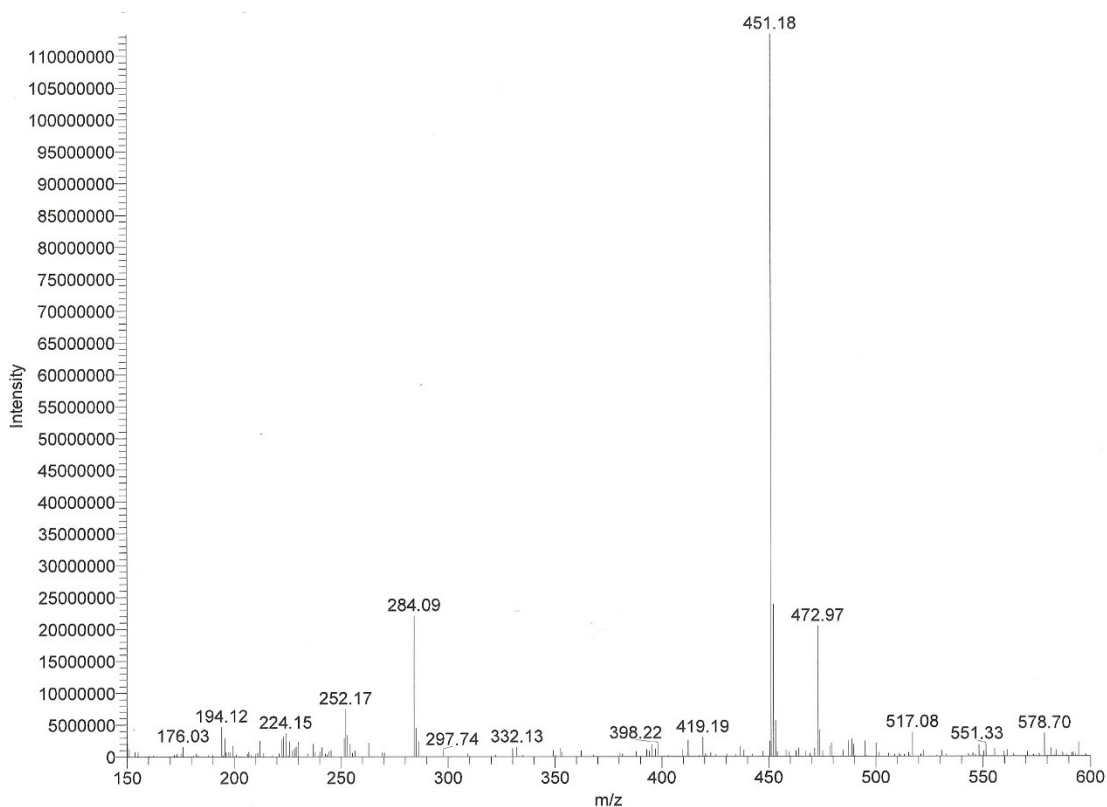
Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 2-nitrobenzoát

EI-MS štúdia:

EI/MS m/z (%) 450 (100), 284 (47), 281 (39), 268 (18), 253 (20), 252 (25), 224 (23), 223 (29), 207 (7), 150 (25).

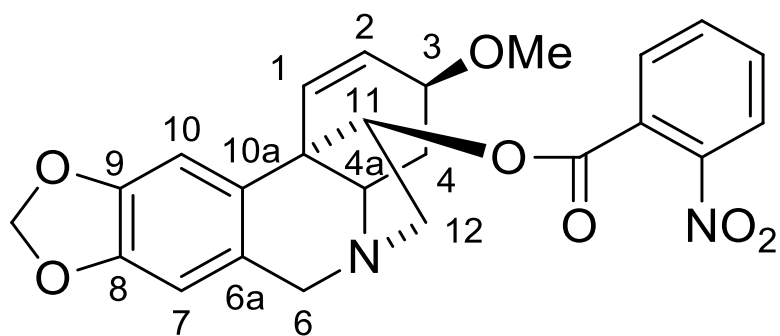
EI-MS štúdia:



Obr. 41 EI-MS štúdia 11-O-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for C₂₄H₂₃N₂O₇ [M+H]⁺ 451.1505 found 451.1500

NMR štúdia:



Obr. 42 Štruktúra 11-*O*-(2-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

¹H NMR (500 MHz, δ CDCl₃, 25°C):

7,82 (1H, dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,6$ Hz), 7,71 – 7,60 (3H, m), 6,93 (1H, s), 6,48 (1H, s), 6,42 (1H, d, $J = 10,3$ Hz), 6,17 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,91 – 5,88 (2H, m), 5,13 (1H, dd, $J = 6,9$ Hz, $J = 3,9$ Hz), 4,36 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,81 – 3,77 (1H, m), 3,75 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,52 (1H, dd, $J = 14,5$ Hz, $J = 6,9$ Hz), 3,42 – 3,36 (2H, m), 3,33 (3H, s), 2,06 – 2,00 (1H, m), 1,79 (1H, td, $J = 13,7$ Hz, $J = 4,4$ Hz).

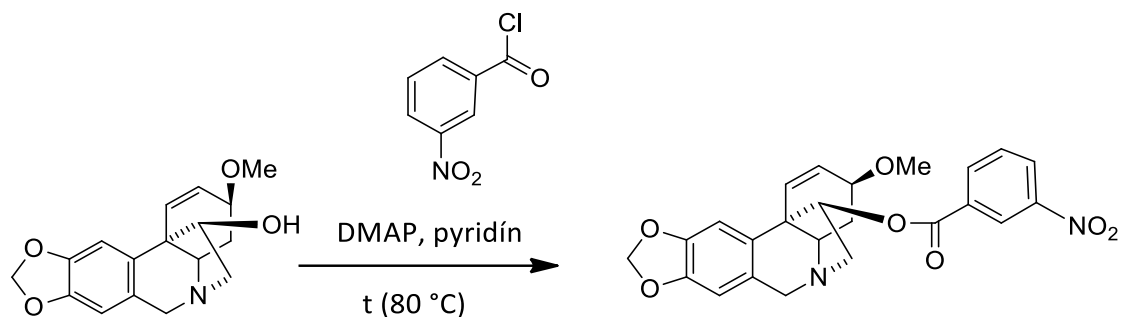
¹³C NMR (125 MHz, δ CDCl₃, 25°C):

164,1; 148,5; 146,7; 146,5; 134,1; 132,6; 132,0; 130,0; 129,9; 127,2; 126,7; 126,5; 123,8; 106,6; 103,8; 100,9; 82,2; 72,4; 62,8; 61,0; 60,5; 56,5; 48,9; 28,1.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_D^{20} = + 24,5^\circ$ (c 0,101 CHCl₃)

4.2.9. Príprava 11-O-(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu (LC-74)



Sumárny vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$
Molekulová hmotnosť: 301,34

Sumárny vzorec: $C_{24}H_{22}N_2O_7$
Molekulová hmotnosť: 450,44

Obr. 43 Schéma syntézy 11-O-(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 50 mg 3-nitrobenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote 80 °C 10 hodín. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 47 mg 11-O-(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 62 %.

Štruktúrna analýza 11-O-(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

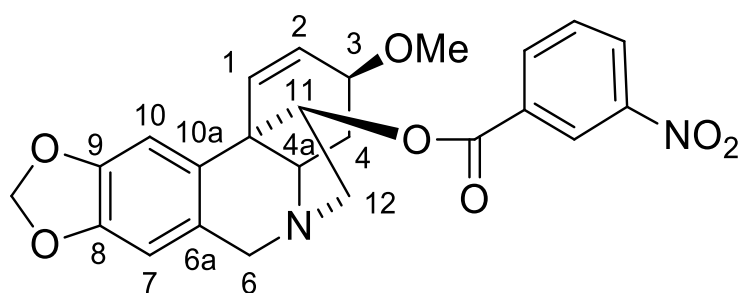
Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 3-nitrobenzoát

EI-MS štúdia: v meraní

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for $C_{24}H_{23}N_2O_7$ $[M+H]^+$ 451.1505 found 451.1506

NMR štúdia:



Obr. 44 Štruktúra 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)-haemanthamínu

^1H NMR (500 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

8,72 (1H, bs), 8,41 (1H, dd, $J = 7,7$ Hz, $J = 1,4$ 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).

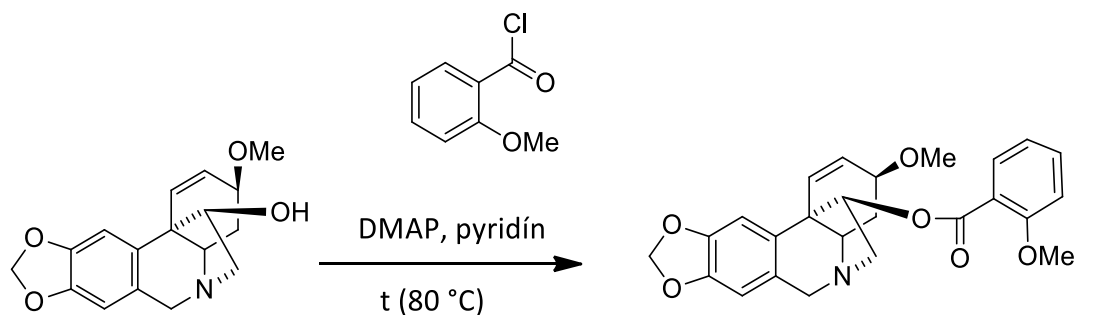
^{13}C NMR (125 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

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 otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 21,8^\circ$ (c 0,27 CHCl_3)

4.2.10. Príprava 11-O-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu (LC-78)



Sumárny vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$
Molekulová hmotnosť: 301,34

Sumárny vzorec: $C_{25}H_{25}NO_6$
Molekulová hmotnosť: 435,47

Obr. 45 Schéma syntézy 11-O-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu

50 mg haemathamínu (0,16 mmol) sa rozpustilo v 3 ml suchého pyridínu. Následne bolo pridaných 100 μ l 2-metoxybenzoylchloridu a katalytické množstvo DMAP (2 mg). Reakčná zmes bola miešaná pri teplote 80 °C 10 hodín. Zmes bola odparená do sucha a chromatografovaná pomocou preparačnej TLC. Použitá mobilná fáza bola To:DEA 95:5. Zóna s produktom bola separovaná z preparačnej dosky, premytá a odparená. Získalo sa 59 mg 11-O-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu vo forme bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol 82 %.

Štruktúrna analýza 11-O-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu

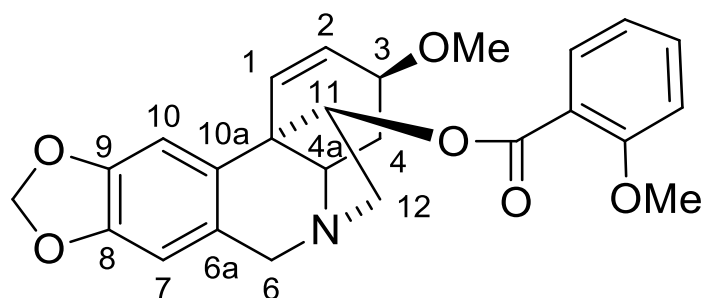
Systematický názov:

(3S,5S,11bS)-3-metoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-etano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl 2-metoxybenzoát

EI-MS štúdia: v meraní

ESI-HRMS štúdia: m/z calcd for $C_{25}H_{26}NO_6$ $[M+H]^+$ 436.1760 found 436.1758

NMR štúdia:



Obr. 46 Štruktúra 11-*O*-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamínu

^1H NMR (500 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

7,69 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,48 – 7,44 (1H, m), 6,97 – 6,94 (3H, m), 6,48 (1H, s), 6,45 (1H, d, $J = 10,3$ Hz), 6,12 (1H, dd, $J = 10,3$ Hz, $J = 4,9$ Hz), 5,90 – 5,87 (2H, m), 5,18 (1H, dd, $J = 6,8$ Hz, $J = 3,4$ Hz), 4,38 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,87 (3H, s), 3,85 – 3,82 (1H, m), 3,75 (1H, d, $J = 17,1$ Hz), 3,52 – 3,39 (3H, m), 3,35 (3H, s), 2,17 – 2,05 (2H, m).

^{13}C NMR (125 MHz, δ CDCl_3 , 25°C):

164,9; 159,4; 146,6; 146,4; 134,4; 133,7; 131,4; 129,3; 127,9; 126,4; 120,0; 119,4; 111,9; 106,5; 104,0; 100,8; 80,7; 72,6; 62,8; 61,1; 60,8; 56,4; 55,7; 49,2; 28,2.

Optická otáčavosť:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 41,5^\circ$ (c 0,265 CHCl_3)

Boli pripravené ešte ďalšie látky (LC-70, LC-73 a LC-80). Niektoré z týchto derivátov vykázali zaujímavú biologickú aktivitu, či už išlo o štúdiu potencionalnej aktivity voči Alzheimerovej chorobe alebo cytotoxickú aktivitu. V súčasnej dobe sa uvažuje o podaní patentovej prihlášky, ktorej obsahom by boli tieto látky, preto v tejto diplomovej práci nemôžu byť uvedené ich štruktúry. Podrobný popis príprav zmienených látok bude súčasťou patentovej prihlášky alebo vedeckého článku.

5. VÝSLEDKY

5.1 Příprava derivátov haemanthamínu

V nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 9) sú uvedené pripravené deriváty haemanthamínu so svojimi výťažkami.

Tabuľka 9 Pripravené zlúčeniny a ich výťažok

Kód zlúčeniny	Názov zlúčeniny	Výťažok
LC-52	11- <i>O</i> -hexanoylhaemanthamín	90 %
LC-53	11- <i>O</i> -pentanoylhaemanthamín	58 %
LC-55	11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)-haemanthamín	81 %
LC-57	11- <i>O</i> -(4-metylbenzoyl)-haemanthamín	87 %
LC-58	11- <i>O</i> -(3-brombenzoyl)-haemanthamín	93%
LC-59	11- <i>O</i> -(3,5-dimetoxybenzoyl)-haemanthamín	68 %
LC-60	11- <i>O</i> -(3-fluorbenzoyl)-haemanthamín	44 %
LC-68	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)-haemanthamín	79 %
LC-70	-	60 %
LC-73	-	94 %
LC-74	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)-haemanthamín	62 %
LC-78	11- <i>O</i> -(2-metoxybenzoyl)-haemanthamín	82 %
LC-80	-	58 %

5.2. Screening biologických aktivit připravovaných zlúčenín

5.2.1. Inhibičné aktivity voči HuAChE, HuBuChE a POP

Tabuľka 10 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátov voči HuAChE, HuBuChE a POP

Testovaná látka	IC ₅₀ (μM)		
	HuAChE	HuBuChE	POP
LC-52	> 500	> 100	t
LC-53	> 1000	> 500	t
LC-55	> 100	25,90 ± 2,60	t
LC-57	> 100	> 100	t
LC-58	> 100	> 100	t
LC-59	79,00 ± 8,00	42,00 ± 3,00	t
LC-60	80,00 ± 8,00	41,90 ± 3,40	t
LC-68	9,92 ± 0,45	> 100	t
LC-70	0,12 ± 0,01	> 500	t
LC-73	0,17 ± 0,01	> 500	t
LC-74	3,99 ± 0,25	> 500	t
LC-78	86,00 ± 6,00	3,34 ± 0,44	t
LC-80	t	t	t
Galantamín^a	2,00 ± 0,10	42,00 ± 1,30	t

a = referenčná látka

t = v meraní

5.2.2. Cytotoxická aktivita voči panelu vybraných bunkových líní

Tabuľka 11 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátov na vybrané nádorové bunkové línie

Kód látky	IC ₅₀ (μM)									
	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A-2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
HAEM	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,6
LC-52	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-53	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-55	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-57	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-58	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LC-60	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-68	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-70	5,3 ± 0,1	5,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	> 10	7,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,3	8,3 ± 0,4	2,3 ± 0,2
LC-73	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-74	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-78	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
LC-80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DOX^a	0,05 ± 0,02	< 0,01	0,43 ± 0,06	0,77 ± 0,24	-	< 0,01	0,55 ± 0,05	0,44 ± 0,10	0,10 ± 0,17	0,72 ± 0,23

HAEM = haemanthamín

DOX^a = doxorubicín (referenčná látka)

Jurkat - T-bunková leukémia, MOLT-4 - akútna lymfoblastická leukémia, A549 - karcinóm pľúc, HT-29 - kolorektálny adenokarcinóm, PANC-1 - karcinóm pankreasu, A-2780 - ovariálny karcinóm, HeLa - adenokarcinóm krčka maternice, MCF-7 - karcinóm prsníka, SAOS-2 - osteosarkóm, MRC-5 - ľudské fibroblasty

5.2.3. Inhibičná aktivita voči GSK-3 β

Tabuľka 12 Hodnoty IC₅₀ doteraz testovaných derivátov voči GSK-3 β

Názov látky	IC ₅₀ (μ M)
11- <i>O</i> -(3-metylbenzoyl)-haemanthamín	32,9 \pm 9,78
11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)-haemanthamín	31,5 \pm 1,9
11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)-haemanthamín	31,0 \pm 0,2
11- <i>O</i> -(2-metoxybenzoyl)-haemanthamín	26,2 \pm 5,0
SB-415286 ^a	70,0 nM

a = referenčná látka

6. DISKUSIA A ZÁVER

Rastliny čeľade Amaryllidaceae sú známe tým, že obsahujú špecifický druh látok, ktoré sa nazývajú Amaryllidaceae alkaloidy. Jedným z nich je aj haemanthamín, izochinolínový alkaloid, ktorý disponuje širokým a dôležitým spektrom biologických aktivít ako je protinádorová²⁶, antivírusová^{44,45}, antioxidačná⁴⁶, antimalarická⁴³ a antikonvulzívna aktivita⁴⁶.

Nedávne štúdie ukázali, že haemanthamín má taktiež apoptotický účinok na bunky leukémie³¹ a silný cytotoxický potenciál proti rakovinovým gastrointestinálnym bunkám.²⁷ Taktiež bola testovaná inhibičná aktivita voči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze (IC_{50} HuAChE, HuBuChE > 1000 μ M).⁴⁷

Keďže je haemanthamín z pohľadu biologickej aktivity veľmi zaujímavou molekulou a podarilo sa ho izolovať v pomerne veľkom množstve (viac než 10 g), bol použitý pre prípravu derivátov, aby sa mohol preštudovať vzťah medzi štruktúrou a biologickou aktivitou. Syntéze derivátov haemanthamínu sa doteraz venovalo len zopár štúdií, v ktorých boli pripravené látky testované na protinádorovú aktivitu^{50,51,53,54}, antimalarickú aktivitu⁵⁸ a inhibičnú aktivitu voči acetylcholinesterázam^{53,54}.

Predložená diplomová práca naväzuje na predošlé diplomové práce vypracované na Katedre farmaceutickej botaniky (Mgr. Zuzana Kavková⁵³, Mgr. Jana Marková⁵⁴), ktoré sa taktiež sústredili na prípravu derivátov rôznych Amarillidaceae alkaloidov.

Primárnym cieľom tejto diplomovej práce bolo pripraviť látky s vyššou cytotoxickou aktivitou voči nádorovým bunkám so zachovaním nízkej toxicity na bunky zdravé. Všetky látky boli pripravené na Katedre farmaceutickej botaniky po prvýkrát.

V prvom kroku boli pripravené alifatické estery haemanthamínu. Modifikácia prebehla na voľnej hydroxylovej skupine na uhlíku C11. Látky boli pripravené reakciou haemanthamínu s anhydridom príslušnej kyseliny za katalýzy DMAP. V minulosti už bolo pripravených niekoľko alifatických esterov haemanthamínu^{53,54}, ktoré boli testované na cytotoxickú aktivitu, no žiaden z derivátov nevykázal zaujímavé výsledky. Vrámci tejto diplomovej práce boli pripravené 2 alifatické deriváty, ktoré boli testované na nádorových liniách Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A-2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a MRC-5. Bohužiaľ, ani v tomto prípade nebola pozorovaná zaujímavá aktivita.

V druhom kroku boli pripravené aromatické estery. Látky boli pripravené reakciou haemanthamínu s chloridom príslušnej kyseliny. Aromatické estery pripravené vrámci predošlej štúdie⁵⁴ nevykázali zaujímavú cytotoxicitu. Preto sa v tejto diplomovej práci pokračovalo v syntéze ďalších 11 aromatických derivátov s rozličnými substituentmi v rôznych polohách na aromatickom jadre. Z doteraz otestovaných derivátov, vykázal zaujímavú cytotoxickú aktivitu voči všetkým testovaným bunkovým líniam derivát LC-70, ktorého štruktúra nie je uvedená v tejto práci z dôvodu plánovaného podania patentovej prihlášky.

Inhibícia enzýmov HuAChE a HuBuChE je dôležitá v liečbe AD. Takmer všetky deriváty boli testované na Katedre farmaceutickej botaniky na inhibičnú aktivitu voči obom cholinesterázam. Ostatné deriváty budú študované v najbližšej dobe. V minulosti už prebehlo testovanie niekoľkých derivátov haemanthamínu^{53,54}.

Z pohľadu inhibície HuAChE boli najaktívnejšie deriváty LC-70 ($IC_{50} = 0,12 \pm 0,01 \mu M$) a LC-73 ($IC_{50} = 0,17 \pm 0,01 \mu M$). Štruktúry týchto látok nemôžu byť popísané v tejto práci kvôli patentovej prihláške. Avšak, z údajov, ktoré môžu byť zverejnené, sa dajú vyvodiť niektoré vzťahy medzi štruktúrou a inhibičnou aktivitou voči HuAChE. Aktivita bola zvýšená pri nitrobenzoylderivátoch. Najaktívnejšia pozícia nitroskupiny bola poloha 3 na benzénovom jadre.

V testoch inhibície voči HuBuChE bol najaktívnejší derivát 11-*O*-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamín ($IC_{50} = 3,34 \pm 0,44 \mu M$). Z výsledkov môžeme usúdiť, že najlepšie aktivity mali deriváty s metoxyskupinou na benzénovom jadre, pričom najaktívnejšia bola poloha 2.

Prvýkrát boli deriváty otestované aj na inhibičnú aktivitu voči GSK-3 β . Testované boli zatiaľ 4 látky. Najlepšiu aktivitu vykázal 11-*O*-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamín ($IC_{50} = 26,2 \pm 5,0 \mu M$). Ostatné deriváty budú ešte testované v najbližšej dobe.

Vzhľadom k role POP ako podpornej terapie liečby AD, bude snaha testovať pripravené deriváty aj na inhibičnú aktivitu voči POP.

Aromatické deriváty haemanthamínu sú z pohľadu potencionálneho využitia v terapii AD zaujímavé a príprave ďalších typov derivátov (étery, amíny) bude v budúcnosti venovaná pozornosť.

7. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Kilgore M.B., Kutchan T.M.: The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry Reviews* 15, 317-337 (2016).
2. He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5, 16562-16574 (2015).
3. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Martin Doležal et, al. Karolinum, Praha 2013.
4. World Health Org [online].
Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (stiahnuté 22. 11. 2018)
5. Liu J., Hu W., He L. F., Ye M., Li Y.: Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Febs Letters* 578, 245-250 (2004).
6. Jin Z.: Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports* 33, 1318 (2016).
7. World Public Library [online].
Dostupné z: <http://www.worldlibrary.org/eBooks/WPLBN0003031944-Amaryllidaceae.aspx>. (stiahnuté 22. 11. 2018)
8. Rostliny Net [online].
Dostupné z: <http://www.rostliny.net/celed/Amaryllidaceae>. (stiahnuté 22. 11. 2018)
9. Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.: Farmakognozie, Karolinum, Praha (2016).
10. (a) *Galanthus nivalis* – Wikipedia. [online].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Galanthus_nivalis. Stiahnuté 22. 11. 2018
(b) *Leucojum vernalis* – Wikipedia [online].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Leucojum_vernalis. Stiahnuté 22. 11. 2018
(c) *Leucojum aestivum* – Wikipedia [online].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Leucojum_aestivum. Stiahnuté 22. 11. 2018
(d) *Narcissus pseudonarcissus* – Wikipedia [online].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus_pseudonarcissus. Stiahnuté 22. 11. 2018
(e) *Narcissus poeticus* – Wikipedia [online].
Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Narcissus_poeticus. Stiahnuté 22. 11. 2018
11. 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).
12. Nekolná P.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod *Lycoris*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.

13. Habartová K. a kolektív.: The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications* 11, 1-8 (2016).
14. Hanusová P.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita. III, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.
15. Jin Z., Xu X. Amaryllidaceae Alkaloids. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, 479-522. (2013).
16. Machocho A., Chhabra S. C., Viladomat F., Codina C., Bastida J.: Alkaloids from *Ammocharis tinneana*. *Phytochemistry* 51, 1185-1191 (1999).
17. Bozkurt-Sarikaya B., Kaya G.I., Onur M.A., Bastida J., Berkov S., Unver-Somer N.: GC/MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chemistry of Natural Compounds* 50, 573-575 (2014).
18. Refaat J., Kamel S.M., Ramadan A.M., Ali A.A.: Crinum; an endless source of bioactive principles: A review. Part II - Crinum alkaloids: Crinine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 3 , 3091-3100 (2012).
19. Giordani R. B., Andrade de J. P., Verli H., Dutilh J. H., Henriques A. T., Berkov S., Bastida J., Zuanazzi J. A. S.: Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry* 49, 668-672 (2011).
20. Kornienko A., Evidente A.: Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* 108, 1982-2014 (2008).
21. Kintsurashvili L., Vachnadze V.: Plants of the Amaryllidaceae family grown and introduced in Georgia: a source of galanthamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41, 38-40 (2007).
22. Fales H. M., Wildman W.C.: Structure of haemanthamine. *Chemistry and Industry* 19, 561-562 (1958).
23. Pubchem [online].
Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441593>. (stiahnuté 23. 11. 2018)
24. Bastida J., Berkov S., Torras L., Belén Pigni N., Andrade de J.P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 65-100 (2011).
25. Andrade de J. P., Guo Y., Font-Bardia M., Calvet T., Dutilh J., Viladomat F., Codina C., Nair J. J., Zuanazzi J.A. S., Bastida J.: Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptrotum*. *Phytochemistry* 103, 188-195 (2014).
26. 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).
27. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13, 394-398 (2015).

28. McNulty J., Nair J. J., Codina C., Bastida J., Pandey, Gerasimoff J., Griffin C.: Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* 7, 1068-1074 (2007).
29. Van Goietsenhoven 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* 7, 1223-1227 (2010).
30. Cahlíková L., Pérez D., Štěpánková Š., Chlebek J., Šafratová M., Hošťálková A., Opletal L.: *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Journal of Natural Product* 78, 1189-1192 (2015).
31. Havelek R., Seifrtová M., Královec K., Bručková L., Cahlíková L., Dalecká M., Vávrová J., Řezáčová M., Opletal L., Bílková 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).
32. Havelek R., Muthna D., Tomšík P., Královec K., Seifrtová M., Cahlíková L., Hošťálková A., Šafratová M., Perwein M., Čermáková E., Řezáčová M.: Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interaction* 275, 121-132 (2017).
33. Furusawa E, Irie H., Combs D., Wildman W. C.: Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: comparison with the related Amaryllidaceae alkaloids. *Chemotherapy* 26, 36-45 (1980).
34. Hroch M., Mičuda S., Havelek R., Cermanová J., Cahlíková L., Hošťálková A., Hulcová D., Řezáčová M.: LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* 30, 1083-1091 (2016).
35. Seifrtová M., Havelek R., Cahlíková L., Hulcová D., Mazánková N., Řezáčová M.: Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine* 35, 1-10 (2017)
36. Nair J. J., Rárová L., Strnad, M., Bastida, J., Staden J.: Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 26, 6195-6199 (2012).
37. Hao B., Shen S. F., Zhao Q. J.: Cytotoxic and antimalarial Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Molecules* 18, 2458-2468 (2013).
38. Luo Z., Wang F., Zhang J., Li X., Zhang M., Hao X., Xue Y., Li Y., Horgen F. D., Yao G., Zhang Y.: Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* 75, 2113-2120 (2012).
39. Guo G., Yao G., Zhan G., Hu Y., Yue M., Cheng L., Liu Y., Ye Q., Qing G., Zhang Y., Liu H.: N-methylhemeanthidine chloride, a novel Amaryllidaceae alkaloid, inhibits pancreatic cancer cell proliferation via down-regulating AKT activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280, 475-483 (2014).

40. Luchetti G., Johnston R., Mathieu V., Lefranc F., Hayden K., Andolfi A., Lamoral-Theys D., Reisenauer M. R., Champion C., Pelly S. C., van Otterlo W. A., Magedov I. V., Kiss R., Evidente A., Rogelj S., Kornienko A.: Bulbispermine: a crinine-type Amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem* 7, 815-822 (2012).
41. Nair J. J., Bastida J., Viladomat F., van Staden J.: Cytotoxic agents of the crinine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Natural Product Communications* 8, 553-564 (2013).
42. Hohmann J., Forgo P., Molnár J., Wolfard K., Molnár A., Thalhammer T., Máthé I., Sharples D.: Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Medica* 68, 454-457 (2002).
43. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 17, 1220-1223 (2003).
44. He J., Qi W. B., Tian J., Jiao P. R., Liu G. Q., Zhang CH. and Liao M.: Amaryllidaceae alkaloids exhibit anti-influenza activity in MDCK Cells, an investigation of Amaryllidaceae alkaloids and MDCK cells insight. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11, 2485-2492 (2012).
45. He J., Qi W. B., Wang L., Tian J., Jiao P. R., Liu G. Q., Ye W. C., Liao M.: Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 922-931 (2013).
46. Oloyede G.K., Oke J. M., Raji Y., Olugbade T. A.: Antioxidant and anticonvulsant alkaloids in *Crinum ornatum* bulb extract. *World Journal of Chemistry* 5, 26-31 (2010).
47. Kulhánková A., Cahlíková L., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Opletal L.: Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1120-1127 (2013).
48. Citoglu G., Tanker M., Gumusel B.: Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytotherapy Research* 12, 205-206 (1998).
49. Habartová K., Cahlíková L., Řezáčová M., Havelek R.: The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications* 11, 1587-1594 (2016).
50. Cedrón J. C., Ravelo Á. G., León L. G., Padrón J. M., Estévez-Braun A.: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* 20, 13854-13863 (2015).
51. Govindaraju K., Ingels A., Hasan M. N., Sun D., Mathieu V., Masi M., Evidente A., Kornienko A.: Synthetic analogues of the montanine-type alkaloids with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28, 589-593 (2018).
52. Hong A. W., Cheng T. H., Raghukumar V., Sha CH. K.: An expedient route to montanine-type Amaryllidaceae alkaloids: total syntheses of (-)-brunsvigine and (-)-manthine. *The Journal of Organic Chemistry* 73, 7580-7585 (2008).
53. Kavková Z.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.
54. Marková J.: Syntéza derivátů haemanthaminu, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.

55. Likhitwitayawuid K., Angerhofer C. K., Chai, H., Pezzuto J. M., Cordell A. G., Ruangrunsi, N.: Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products* 56, 1331-1338 (1993).
56. Jíra J., Vařeka I.: *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. Galén: Praha (2001).
57. Wikipedia [online].
Dostupné z: <https://sk.wikipedia.org/wiki/Mal%C3%A1ria>. (stiahnuté 10. 12. 2018)
58. 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).
59. Pidrman V.: *Demence*, str. 13-15. Grada, Praha 2007.
60. ALZ Org [online].
Dostupné z: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-alzheimers>. (stiahnuté 11. 12. 2018)
61. Wikiskripta [online].
Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Alzheimerova_choroba. (stiahnuté 11. 12. 2018)
62. Walsh R., Roockwood K., Martin E., Darvesh S.: Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galanthamine and citalopram. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810, 1230-1235 (2011).
63. Greig N. H., Utsuki T., Ingram D. K., Wang Y., Pepeu G., Scali C., Yu Q. S., Mamszarz J., Holloway H. W., Giordano T.: Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 17213-17218 (2005).
64. Furukawa-Hibi Y., Alkam T., Nitta, Matsuyama A., Mizoquchi S., Suzuki K., Moussaoui S., Yu Qs, Greig N. H., Nagai T.: Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorative cognitive dysfunction induced by amyloid-[beta] peptide in mice. *Behavioural Brain Research* 1, 222-229 (2011).
65. Darvesh S., Cash M. K., Reid G. A., Martin E., Mitnitski A., Geula C.: Butyrylcholinesterase is associated with β -amyloid plaques in the transgenic 81 APPSWE/PSEN1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71, 2-14 (2012).
66. Cahlíková L., Macáková K., Zavadil S., Jiroš P., Opletal L., Urbanová K., Jahodář L.: Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS. *Natural Product Communications* 6, 603-606 (2011).
67. Cahlíková L., Hulová L., Hrabínová M., Chlebek J., Hošťálková A., Adamcová M., Šafratová M., Jun D., Opletal L., Ločárek M., Macáková K.: Isoquinoline alkaloids as potential prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* 103, 192-196 (2015).
68. Hulcová D., Breiterová K., Siatka T., Klímová K., Davani L., Šafratová M., Hošťálková A., Simone A., Andrisano V., Cahlíková L.: Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules* 23, 719 (2018).

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
BnNH ₂	benzylamín
cH _x	cyklohexán
DEA	dietylamín
DMAP	dimetylamínopyridín
Et ₃ N	trietylamín
EtOH	etanol
GI ₅₀	inhibičná koncentrácia rastu
GSK-3β	enzým glykogensyntáza kináza 3 beta
HuAChE	ľudská erytrocytická acetylcholínesteráza
HuBuChE	ľudská sérová butyrylcholínesteráza
IC ₅₀	inhibičná koncentrácia
In(OTf) ₃	trifluorometánsulfonát india
MeCN	acetonitril
<i>m</i> -CPBA	kyselina <i>m</i> -chlórperoxybenzoová
MeOH	metanol
MsCl	metánsulfonyl
NBS	<i>N</i> -brómsukcínimid
NIS	<i>N</i> -jodosukcínimid
Ph ₃ P	trifenylfosfín
POP	prolyl-oligopeptidáza
Pd/C	katalyzátor paládium na aktívnom uhlí
Py	pyridín
p-53	transkripčný faktor v bunke
To	toluén

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej botaniky

Kandidát: Viera Bodoríková

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

Názov diplomovej práce: Syntéza derivátov haemanthamínu a ich biologická aktivita

Haemanthamín, izochinolínový alkaloid čeľade Amaryllidaceae, disponuje širokým a dôležitým spektrom biologických aktivít ako je protinádorová, antivírusová, antioxidantná, antimalarická a antikonvulzívna aktivita.

Biologická aktivita haemanthamínu úzko súvisí s jeho štruktúrou. Modifikovaním rozličných častí jeho molekuly môžeme identifikovať vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou. S týmto cieľom bolo pripravených 13 derivátov alkaloidu haemanthamínu za použitia analytickej a preparatívnej TLC. Získané látky boli podrobené štruktúrnej analýze použitím MS, HRMS, 1D a 2D NMR spektroskopických techník.

Pripravené látky boli testované na ich inhibičnú aktivitu voči ľudskej erytrocytickej acetylcholinesteráze (HuAChE) a ľudskej sérovej butyrylcholinesteráze (HuBuChE).

Najlepšiu aktivitu vykázali aromatické estery LC-70 ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$) a LC-73 ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$).

Cytotoxická aktivita bola testovaná na líniách zdravých a nádorových buniek. Zaujímavú aktivitu vykázal analóg LC-70. Štyri deriváty boli otestované aj na GSK-3 β inhibičnú aktivitu. Najlepšie výsledky mal 11-O-(2-metoxybenzoyl)-haemanthamín ($IC_{50} = 26,2 \pm 5,0 \mu\text{M}$).

Výsledky nasvedčujú tomu, že niektoré deriváty haemanthamínu môžu slúžiť ako „lead structures“ pri vývoji potencionálnych liečiv.

Kľúčové slová: alkaloid, haemanthamín, deriváty, Alzheimerova choroba, cytotoxicita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Viera Bodoríková

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

Title of Diploma thesis: Synthesis of haemanthamine derivatives and their biological activity

Haemanthamine, an isoquinoline Amarillidaceae alkaloid, exhibits a wide and important range of biological activities, including antitumor, antiviral, antioxidant, antimalarial and anticonvulsant.

Biological activity of haemanthamine relates closely with its structure. By modifying the different parts of the molecule, we can identify some structure-activity relationships. With this aim, the thirteen semisynthetic analogues of alkaloid haemathamine were prepared and purified using analytic and preparative TLC methods. The obtained substances were then subjected to structural analysis, specifically, there were used MS, HRMS, 1D and 2D NMR spectroscopic techniques.

Prepared compounds were tested on its possibility to inhibit human erythrocytic acetylcholinesterase (HuAChE) and human serum butyrylcholinesterase (HuBuChE).

The most promising biological activities have been shown by aromatic esters labelled as LC-70 ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$) and LC-73 ($IC_{50 \text{ HuAChE}} = 0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$).

The cytotoxic activity of prepared compounds has been studied on panel of cancerous and noncancerous cells. Interesting activity have been shown by analogue LC-70. Four derivatives have been tested for its GSK-3 β inhibitory activity. The best activity had 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)-haemanthamine ($IC_{50} = 26,2 \pm 5,0 \mu\text{M}$). The results suggest that some haemanthamine analogues can be used as a "lead structures" for potential drugs.

Key words: alkaloid, haemanthamine, derivatives, Alzheimer disease, cytotoxicity