

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza derivátů haemanthaminu

Synthesis of haemanthamine derivatives

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

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

Hradec Králové, srpen 2017

Jana Marková

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

Hradec Králové, srpen 2017

podpis

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského programu SVV 260 412.

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Janu Němečkovi a doc. Ing. Lucii Cahlíkové, PhD. za odborné vedení, cenné rady, poskytnuté materiály a vstřícný přístup při vypracování této diplomové práce. Děkuji Mgr. Daniele Hulcové za poskytnutí alkaloidu haemanthaminu pro přípravu derivátů. Dále děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, PhD. za změření strukturních charakteristik připravených látek, prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, Csc. a RNDr. Radimu Havelkovi, PhD. za změření biologických aktivit připravených derivátů. V neposlední řadě děkuji všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie a Katedry anorganické a organické chemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE	7
3	TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1	Obecná charakteristika rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich sekundárních metabolitů	8
3.2	Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů	9
3.3	Strukturní typy – rozdělení	12
3.3.1	Alkaloidy lykorinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita	12
3.3.2	Alkaloidy galanthaminového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita	15
3.3.3	Alkaloidy krininového a haemanthaminového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita	18
3.3.4	Alkaloidy tazettinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita	21
3.3.5	Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita	22
3.3.6	Polosyntetické deriváty alkaloidů krininového a haemanthaminového typu a jejich biologická aktivita	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Materiál, chemikálie a metody	29
4.1.1	Amaryllidaceae alkaloidy	29
4.1.2	Rozpouštědla, chemikálie	29
4.1.3	Vyvíjecí soustavy pro analytickou a preparativní tenkovrstvou a sloupcovou chromatografii	30
4.1.4	Strukturní analýza připravených derivátů	30
4.1.5	Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin	32
4.2	Příprava polosyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu a jejich strukturní identifikace	33
4.2.1	Příprava 11- <i>O</i> -butanoylhaemanthaminu (JM-1)	33

4.2.2	Příprava 11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-4A)-----	35
4.2.3	Příprava 11- <i>O</i> -(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-5B) -----	36
4.2.4	Příprava 11- <i>O</i> -isobutanoylhaemanthaminu (JM-2A)-----	38
4.2.5	Příprava 3-demethylhaemanthaminu (JM-K2)-----	41
5	VÝSLEDKY -----	42
5.1	Příprava derivátů haemanthaminu -----	42
5.2	Screening biologických aktivit připravovaných sloučenin -----	42
5.2.1	Inhibiční aktivity vůči AChE, BuChE a POP -----	42
5.2.2	Cytotoxická aktivita-----	43
6	DISKUZE A ZÁVĚR -----	44
7	POUŽITÁ LITERATURA -----	46
8	SEZNAM ZKRATEK -----	52
9	SEZNAM TABULEK -----	54
10	SEZNAM OBRÁZKŮ -----	55

1 Úvod

Již od pradávna se rostliny využívaly k léčení všech možných lidských neduhů a nemocí. Sloužily jak ku prospěchu lidstva, tak k častým travičským záměrům. Ať však úmysly člověka byly dobré či špatné, svědčí o faktu, že rostliny obsahují nepřeberné množství různých účinných látek, které ovlivňují lidské zdraví. S postupem času, rozvojem civilizace, zvyšováním úrovně vzdělání a vývojem nových technologických vymožeností se začalo přicházet na jednotlivé látky, které jsou v rostlinách přítomné. Postupem času se studovala biologická aktivita těchto látek.

Jednou takovou velmi významnou skupinou přírodních látek jsou alkaloidy. Jedná se o sekundární produkty metabolismu rostlin, tzv. sekundární metabolity. V rostlinné říši jsou velmi rozšířeny a disponují fyziologickými účinky na náš organismus. Dříve se považovaly především za odpadní produkty, dnes již víme, že je rostliny mohou používat také na svoji obranu před býložravci. Jejich chemická struktura se může značně lišit, ale společným rysem je bazická povaha s jedním, popřípadě více vázanými atomy dusíku v molekule.

Jeden ze zajímavých zdrojů alkaloidů je rostlinná čeleď Amaryllidaceae. Rostliny této čeledi produkují široké spektrum alkaloidů. Jsou rozmanité jak ve své struktuře, tak ve svém účinku. Počínaje od anticholinergního, pro který je tato čeleď veřejností asi nejvíce známá (alkaloid galanthamin od roku 2001 v klinické praxi jako přípravek Reminyl®)¹, přes cytotoxický až po antimalarický, antibakteriální, antivirotický a antiparazitický. Cytotoxická aktivita alkaloidů resp. jejich protinádorový účinek je v dnešní době předmětem zkoumání řady vědců. Rakovinná onemocnění patří k nejvíce rozšířeným nemocem ve vyspělých zemích a vědecká komunita se snaží najít vhodné alternativy k dnešní zavedené léčbě s co nejvíce benefity pro pacienta a s co nejmenším množstvím nežádoucích účinků. Právě alkaloidy produkované rostlinami čeledi Amaryllidaceae disponují slibnou aktivitou, která je selektivně toxická proti nádorovým buňkám.

Předmětem této diplomové práce byla příprava polosyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu, přesněji esterifikovaných derivátů, jejich strukturní analýza a testování biologických aktivit.

2 Cíl práce

Náplň diplomové práce:

- 1) zpracování rešerše k problematice využití alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a jejich syntetických derivátů v terapii civilizačních onemocnění,
- 2) příprava polosyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu čeledi Amaryllidaceae pro biologické testování dle literární rešerše,
- 3) stanovení základních fyzikálně-chemických charakteristik připravených derivátů,
- 4) biologické testování připravených derivátů jak na domácím pracovišti, tak ve spolupráci s dalšími vědeckými institucemi,
- 5) vyhodnocení výsledků a sepsání diplomové práce.

3 Teoretická část

3.1 Obecná charakteristika rostlin čeledi Amaryllidaceae a jejich sekundárních metabolitů

Čeď Amaryllidaceae je pestrá čeď, do které patří kolem 75 rodů a v níž je popsáno na 1100 druhů rostlin.² Jedná se o jednoděložné vytrvalé byliny s oddenky, hlízami nebo cibulemi. Listy mají čárkovité, přízemní, nebo také lodyžní. Květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem a jsou jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Plodem je tobolka nebo bobule. Čeď zahrnuje například rody: *Leucojum* L., bledule, *Galanthus* L., sněžinka, *Narcissus* L., narcis, *Crinum* L., křín, *Amaryllis* L., amarylka, *Clivia* Lindl., klívie (řemenatka) a další.

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou rozšířeny především v tropické a subtropické Jižní Americe a Africe, jsou však zastoupeny i v mírnějších pásech, například ve střední a jižní Evropě. Pěstují se i pro okrasné účely. Některé zástupce můžeme najít také v České republice.³ Jedná se o *Galanthus nivalis* a *Leucojum vernum*, což jsou rostliny v ČR chráněné v kategorii C2.⁴

Od zavedení galanthaminu do praxe v terapii Alzheimerovy choroby je o rostliny této čeledi široký zájem z pohledu jejich dalších obsahových látek, tzv. Amaryllidaceae alkaloidů.

První zmínky o lékařském využití rostlin z čeledi Amaryllidaceae se datují do doby působení Hippokrata z Kósu, který již ve 4. století před naším letopočtem použil extrakt z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze k léčbě nádorů dělohy. Od této doby se dokumentace o rostlinách čeledi Amaryllidaceae a jejich alkaloidech objevuje napříč rozmanitými kulturami v nejrůznějších částech světa – v Číně, Severní Africe, Střední Americe a také na Arabském poloostrově.⁵

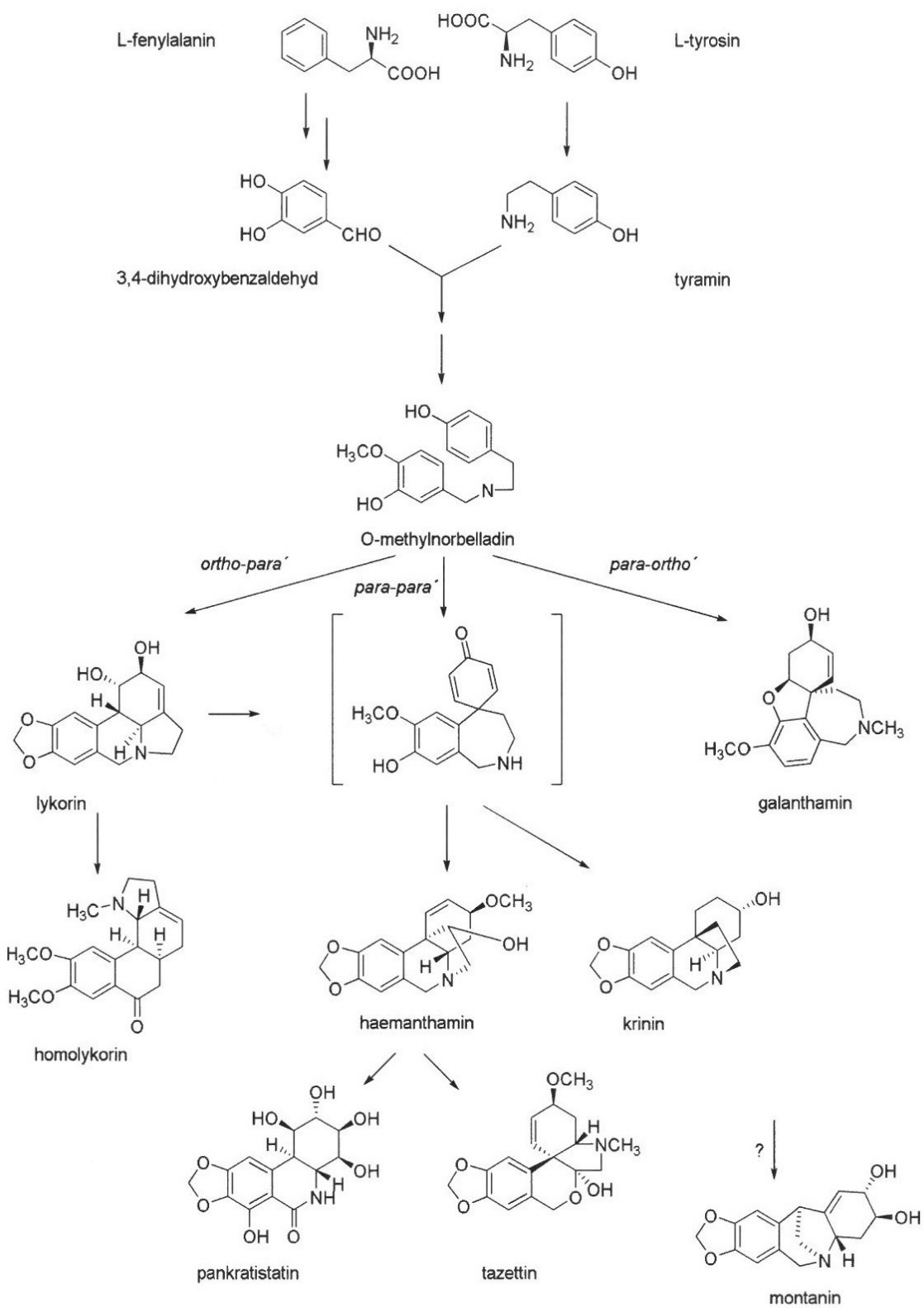
Jak již bylo zmíněno výše, používání rostlin této čeledi má dlouhou tradici v lidovém léčitelství a právě kvůli tomuto faktu vědci věnují pozornost biologické aktivitě a účinkům amarylkovitých alkaloidů. Prvním úspěšně izolovaným alkaloidem této čeledi byl roku 1877 lykorin, izolovaný z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L. Jeho struktura byla objasněna až o mnoho let později v roce 1956 japonskou pracovní skupinou Nagakawa a spol.⁵

Do dnešní doby bylo izolováno a strukturně popsáno přes 500 alkaloidů vyskytujících se jednotlivě nebo ve skupinách napříč celou čeledí Amaryllidaceae. Alkaloidy se vyskytují v celé rostlině, v nejvyšší koncentraci se nacházejí v cibuli. Vzhledem k jejich široké biologické aktivitě, do které patří antivirová, antibakteriální, antiprotozoální (antimalarická), inhibiční vůči acetylcholinesterase a cytotoxická, je vědeckou komunitou věnována také pozornost přípravě jejich polosyntetických derivátů.^{6,7}

3.2 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů

Specifickou biosyntetickou cestu základních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů označujeme jako tzv. norbelladinovou. Schématicky je biosyntéza amarylkovitých alkaloidů znázorněna na Obr. 1. Výchozí látky představují dvě aromatické aminokyseliny L-fenylalanin a L-tyrosin. L-Fenylalanin jako prekurzor tvoří C1–C6 části aromatického kruhu A a polohu benzylu na C6. L-tyrosin je prekurzorem dusíku na C2–C6 a prekurzorem kruhu C se dvěma uhlíky C-11, C-12 v postranním řetězci.⁸

Tyto dvě látky přes několik mezistupňů poskytují vlastní prekurzor amarylkovitých alkaloidů 4'-*O*-methylnorbelladin. Oxidativním spojením kruhů *O*-methylnorbelladinu v polohách *ortho*'-*para*' vzniká lykorinový a homolykorinový typ, poloha *para*'-*ortho*' přísluší galanthaminu a polohu *para*'-*para*' nacházíme u krinového, haemanthaminového, tazettinového a pankrastatinového typu.⁹

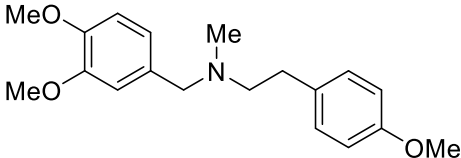
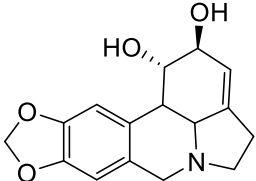
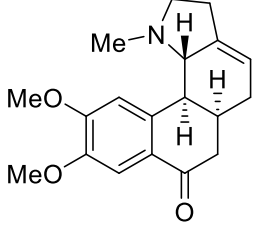
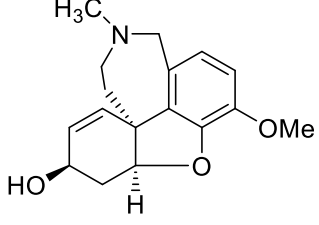


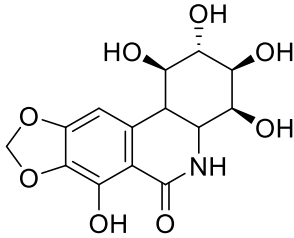
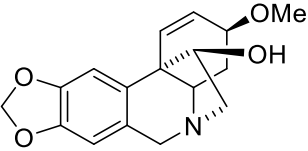
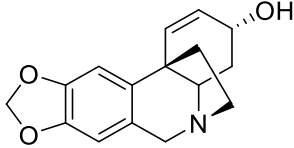
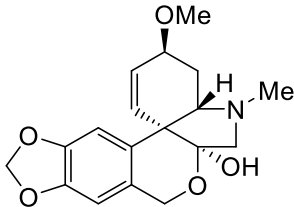
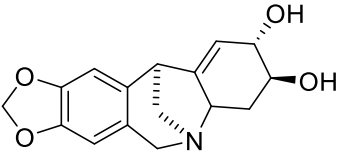
Obr. 1 Biosyntéza hlavních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů (převzato)⁵

Podle oxidativního spojení dvou aromatických kruhů *O*-methylnorbelladinu vzniká devět základních strukturních typů (započítán i výchozí norbelladin a alkaloidy montaninového typu, jejichž biosyntetická cesta nebyla doposud spolehlivě objasněna), které jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce: lykorinový (lykorin), galanthaminový (galanthamin), haemanthaminový (haemanthamin), homolykorinový (homolykorin), pankratistatinový (pankratistatin), krininový (krinin), tazettinový (tazettin) a montaninový (montanin).⁵

Jmenované základní strukturní typy jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, hlavní zástupci a příklady rodů, ze kterých byly izolovány

Strukturní typ	Hlavní zástupce
norbelladinový	 norbelladin
lykorinový	 lykorin
homolykorinový	 homolykorin
galanthaminový	 galanthamin

pankratistatinový		pankratistatin
haemanthaminový		haemanthamin
krininový		krinin
tazettinový		tazettin
montaninový		montanin

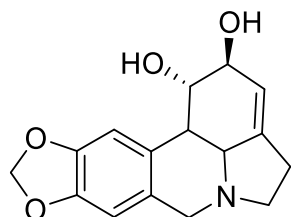
3.3 Strukturní typy – rozdělení

3.3.1 Alkaloidy lykorinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita

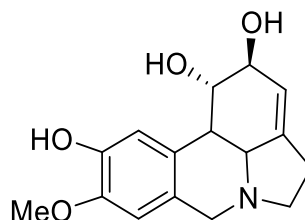
Alkaloidy tohoto strukturního typu jsou odvozeny od pyrollo[de]fenantridinu, který při cyklizaci norbelladinu vzniká způsobem *ortho'-para'*. Hlavním zástupcem této skupiny je

lykorin.¹⁰ Mezi nejvýznamnější rody obsahující alkaloidy lykorinového strukturního typu patří *Crinum*, *Galanthus*, *Chlindanthus*, *Leucojum*, *Lycoris* a *Narcissus*.^{11,12,13,14}

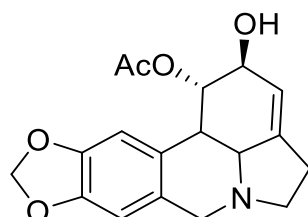
Dalšími zástupci této skupiny jsou např. 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, galanthin, pluviin, norpluviin nebo amarbellisin (Obr. 2).¹⁰



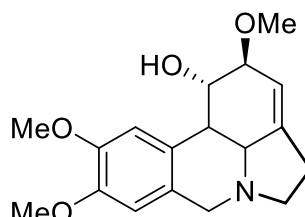
Lykorin



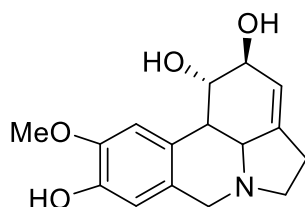
Pseudolykorin



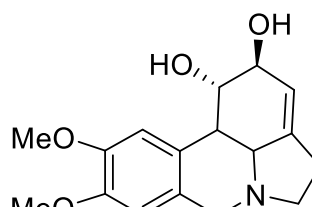
1-*O*-Acetyllykorin



Galanthin



Norpluviin



Pluviin

Obr. 2 Struktury vybraných alkaloidů lykorinového typu

Biologická aktivita lykorinu je široká, pro jeho slibné účinky je studován již několik let. Lykorin působí u rostlin jako inhibitor aktivity terminálního enzymu galaktodehydrogenasy, který přeměňuje L-galaktono- γ -lakton na kyselinu askorbovou, čímž potlačuje její syntézu.¹⁶ Tato skutečnost byla studována *in vivo*, kdy u listů špenátu při koncentraci lykorinu větší než 0,1 mM docházelo ke smršťování mechanického pletiva řapíku a k vadnutí.¹⁵

Lykorin funguje také proti celé řadě virů, jako je enterovirus, virus hepatitidy C¹⁶, poliovirus¹⁷, vaccinia virus pravých neštovic a SARS-asociovaný coronavirus,^{18,19} a některé studie vykazují i jistou aktivitu proti HIV viru.²⁰

Nejvýznamnější je jeho protinádorová aktivita jak *in vitro* tak především *in vivo*. Vztah struktura - aktivita byl studován systematickou změnou různých částí molekuly. Zjistilo se, že pro protinádorové působení na nádorové buňky je rozhodující zachování struktury lykorinu: konformační volnost v kruhu C, stereochemie na spojení kruhů C/D a diolové skupiny na kruhu C. Díky tomuto upořádání se lykorin váže na 60S jednotku ribozomu peptidyltransferasového centra. Další experimenty se strukturou lykorinu ukázaly, že aktivita proti apoptóze rezistentním nádorovým buňkám je velice podobná jak u přírodních derivátů, tak u jeho syntetických derivátů.^{21,22,23,24}

Lykorin ukázal významný terapeutický účinek u myších mozkových melanomů B16F10 při použití netoxických dávek. Bylo dokázáno, že jeho aktivita vůči nádorovým buňkám je dokonce 15x větší než vůči buňkám zdravým a to již při mikromolárních koncentracích. Terapeutický potenciál lykorinu byl prokázán na celé řadě myších modelů lidských nádorů, jako je například Hey1B rakoviny vaječníků, LLC plicní karcinom a leukémie HL-60.²¹

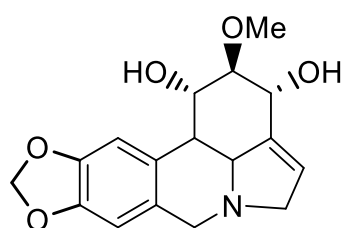
V rámci testování lykorinu na p53-negativní linii lidských leukemických promyelocytů HL-60 *in vitro* byla pozorována aktivita vyvolávající zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi a následná indukce apoptózy doprovázená zvýšenou aktivitou kaspas -3, -8, -9. Podrobněji byl lykorin testován na myších s těžkým imunodeficitem SCID, kterým byly po utlumení krvetvorby působením ionizujícího záření implantovány buňky HL-60. Byla prokázána inhibice růstu buněk promyelotické leukémie *in vivo* po podávání lykorinu ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$) a zároveň bylo pozorováno minimum nežádoucích účinků na zdravé buňky. Další experimenty prokazující protinádorovou aktivitu lykorinu byly provedeny na buňkách lidského mnohočetného myelomu (KM-3), kde aplikace lykorinu vedla naopak k akumulaci buněk v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Zástava buněčného cyklu u buněk KM-3 nevedla k reparaci poškození DNA a v buňkách následně začala probíhat apoptóza.²³

Další studie dokazuje, že lykorin je schopný down-regulace Mcl-1 proteinu v lidských leukemických buňkách, který je zodpovědný za inhibici apoptózy buněk. Studie dále odhalila, že lykorin dokáže snížit enzymatickou aktivitu HDAC (histon deacetylasy) v linii K562 myeloidní leukémie a zvýšit expresi proteinu p53 a jeho cílového produktu proteinu p21 a tím inhibovat proliferaci K562 buněk. Navíc umí lykorin hydrochlorid účinně potlačit metastatický melanom C8161 *in vitro* a *in vivo* různé typy tumorů cév při nízké toxicitě na ostatní zdravé buňky.^{23,24}

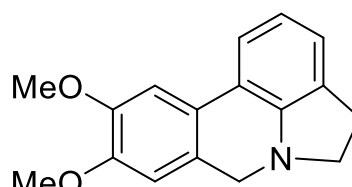
Byla zkoumána také anticholinergní aktivita alkaloidů lykorinového strukturního typu. Lykorin samotný vykazuje nízkou inhibiční aktivitu vůči AChE ($\text{IC}_{50\text{AChE}} = 213 \text{ } \mu\text{M}$). Acylované nebo

etherifikované deriváty lykorinu v poloze C-1, jako je 1-*O*-acetyllykorin a 1-*O*-acetyl-2-*O*-terc-butyl-dimethylsilyllykorin mají mnohokrát silnější inhibiční aktivitu vůči AChE než lykorin, nebyl však zjišťován inhibiční účinek derivátů na BuChE. Naopak 2-*O*-acetylce a 1,2-diacetylce způsobily ztrátu aktivity. Z toho vyplývá, že pro účinek je důležitá přítomnost acetyl skupiny v poloze C-1.²⁵

Dokonce až 6-10krát účinnější proti AChE je lykorinový derivát unginorin s hodnotou $IC_{50} = 0,35 \mu\text{M}$ a assoanin s hodnotou $3,87 \mu\text{M}$. Předpokládá se, že aktivita těchto látek souvisí s planaritou aromatického kruhu C.⁷



Ungiminorin



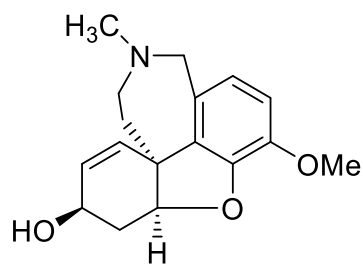
Assoanin

Obr. 3 Struktury lykorinového typu s anticholinergní aktivitou

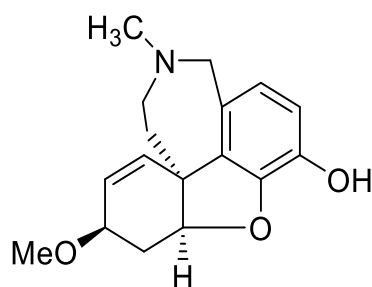
3.3.2 Alkaloidy galanthaminového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita

Alkaloidy galanthaminového typu jsou jedinečné v oxidativním spojení *para'*-*ortho'*. Jejich základní skelet tvoří dibenzofuran.²⁶ Jako první byl roku 1952 z cibule sněženky *Galanthus woronowii* izolován galanthamin, který díky svým biologickým vlastnostem zaujal vědeckou komunitu.⁵ Mezi rody, kde se tyto alkaloidy nacházejí, patří např. *Crinum*, *Galanthus*, *Leucojum*, *Lycoris* a *Narcissus*.¹²

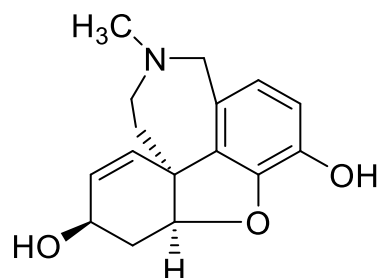
Mezi další alkaloidy, které se nachází v této strukturní skupině, jsou norgalanthamin, narcisin, chlidanthin, sanguinin, norlykoramin nebo narwedín.³ Na následujícím obrázku (Obr. 4) jsou shrnuty vybrané struktury alkaloidů galanthaminového typu.



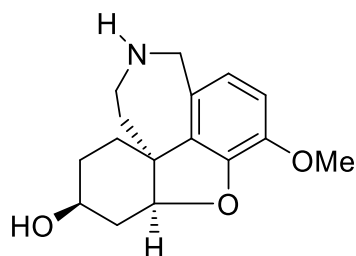
Galanthamin



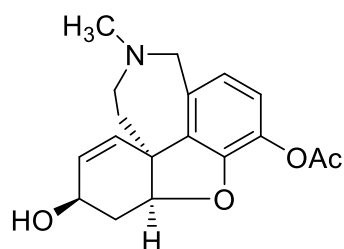
Chlidanthin



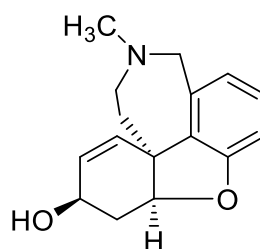
Sanguinin



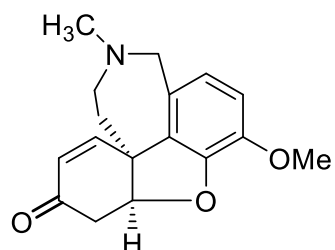
Norlykoramin



Narcisin



Norgalanthamin



Narwedín

Obr. 4 Struktury vybraných alkaloidů galanthaminového typu

Hlavním alkaloidem této skupiny je galanthamin, který byl poprvé izolován z rostliny *Galanthus woronowii*. Galanthamin způsobuje bradykardii či poruchy atrioventrikulárního přenosu, v CNS i na periférii nervového systému selektivně reverzibilně inhibuje cholinesterasy a alostericky moduluje nikotinové receptory, které podporují cholinergní transmissi.¹

V medicíně se používá již od 60. let 20. století, a to převážně ve východní Evropě, k antagonizaci neuromuskulární blokády a pro terapii neurologických poruch. V současné době se využívá především při léčbě Alzheimerovy choroby, neboť signifikantně zlepšuje její kognitivní, funkční i behaviorální symptomy. Jako výhodná se jeví selektivita galantaminu k acetylcholinesterase vs. butyrylcholinesterase, která může snižovat riziko nežádoucích účinků v porovnání s neselektivními inhibitory cholinesteras (typu takrinu či fyzostigminu).²⁷

Galanthamin je terciární alkaloid rezistentní vůči hydrolyze. Pro vazebné schopnosti a biologický účinek galantaminu jsou v jeho molekule důležitá 4 místa: hydroxylová skupina cyklohexanového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina. Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny (např. na kvarterní amoniovou sůl nebo hydrofilní sloučeniny) byly připraveny deriváty, které byly polárnější než původní molekula a vykazovaly větší inhibici AChE. Jejich polarita však brání průniku do CNS, což výrazně limituje jejich použití. Jako nadějný derivát galantaminu se ukazuje jeho ester n-butylykarbamát galantaminu (acylovaná hydroxylová skupina v poloze 6), který je méně toxický než galanthamin, jeho nižší polarita mu umožňuje lepší průnik do CNS a inhibice AChE dosáhla *in vitro* 85 % inhibiční aktivity samotného galantaminu.²⁷

Pro anticholinergní aktivitu byl za perspektivní látku považován izomer galantaminu chlidanthin, izolovaný z rostliny *Chlidanthus fragrans*. V jeho struktuře dochází k záměně hydroxy- a methoxyskupiny. Následné studie bohužel zjistily, že inhibiční efekt na AChE je vůči galanthaminu výrazně nižší.²⁵

Mezi alkaloidy, které se ukazují jako silnější inhibitory cholinesteras, patří sanguinin. Jedná se o 9-hydroxy derivát galantaminu, který byl izolován z *Pancreaticum illyricum* či *Eucharis grandiflora*. Předpokládá se, že příčinou jeho výrazné aktivity je právě záměna methoxy skupiny v poloze 9 galantaminu za skupinu hydroxylovou, která se lépe váže v aktivním místě AChE. Podle studie z roku 2002 je sanguinin ($IC_{50AChE} = 0,1 \pm 0,01 \mu M$) zhruba desetkrát aktivnější než samotný galanthamin ($IC_{50AChE} = 1,07 \pm 0,18 \mu M$). Nevýhodou ovšem zůstává, že sanguinin se vyskytuje velmi vzácně a v malém množství, což výrazně omezuje jeho případné zavedení do praxe. Dále je problematická jeho vyšší polarita a tím pádem obtížnější přestup přes HEB.²⁸

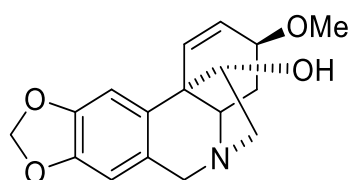
3.3.3 Alkaloidy krininového a haemanthaminového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita

Haemanthaminový a krininový typ strukturně vychází z 5,10b-ethanofenantridinu vzniklého z norbelladinu *para'-para'* oxidativní cyklizací. Tyto dva typy se liší pouze v prostorové konfiguraci 5,10b-ethanového můstku, což znamená, že se jedná o enantiomery. Výsledky experimentů, které probíhaly se značeným krininem a oxovittatinem ukázal dva přirozeně se vyskytující enantiomery v *Nerine bowdenii*, které jsou vzájemně nezaměnitelné.²⁶

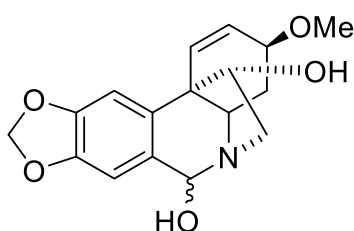
Alkaloidy těchto typů patří s alkaloidy lykorinového strukturního typu k nejrozšířenějším z čeledi Amaryllidaceae. Již název napovídá, že hlavními představiteli těchto dvou skupin jsou krinin a haemanthamin. Ke krininovému typu řadíme dále ambellin, bufanisin, bufanidrin, 6-hydroxykrinamin a undulatin. Rody, kde se tyto látky vyskytují, jsou například *Ammocharis*, *Clivia*, *Crinum*, *Hippeastrum*, *Galanthus* a *Zephyranthes*.^{29,30,31,32,33,14}

K haemanthaminovému typu zase patří haemanthidin, vittatin, krinamin, hamayn a bulbispermin.¹¹

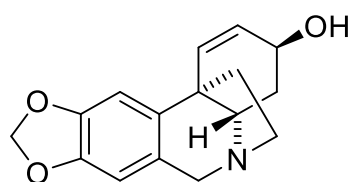
Na obrázku (Obr. 5) jsou uvedeny struktury vybraných alkaloidů krininového a haemanthaminového typu.



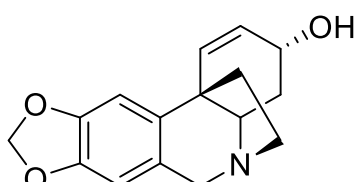
Haemanthamin



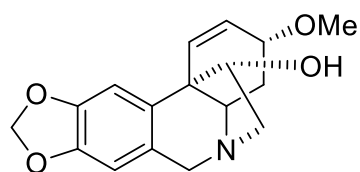
Haemanthidin



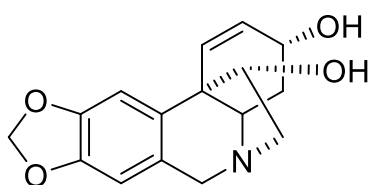
Vittatin



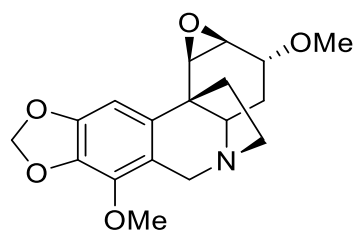
Krinin



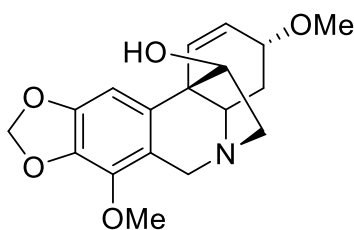
Krinamin



Hamayn



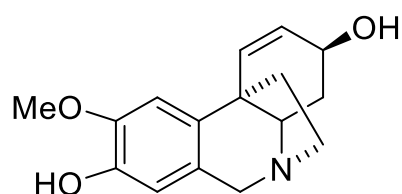
Undulatin



Ambellin

Obr. 5 Vybrané struktury haemanthaminového a krininového typu

V literatuře se uvádí, že alkaloidy krininového a haemanthaminového typu jsou slabé AChE inhibitory. Určitou výjimkou jsou alkaloidy, které se podařilo izolovat v naší laboratoři z rostlin *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans*, undulatin a 8-*O*-demethylmaritidin. Jejich schopnost inhibovat AChE byla sice desetkrát menší než u galanthaminu, ale bylo prokázáno, že i alkaloidy krininového strukturního typu jsou do jisté míry schopny inhibovat AChE. Navíc v rámci provedené PAMPA studie bylo zjištěno, že undulatin přechází přes HEB.³⁴ Ostatní látky tohoto typu izolované ze *Zephyranthes robusta* a *Chlidanthus fragrans* nejsou pro svou nízkou inhibiční aktivitu atraktivní pro využití v terapii Alzheimerovy choroby.²⁵



8-*O*-demethylmaritidin

Obr. 6 Struktura 8-*O*-demethylmaritidinu

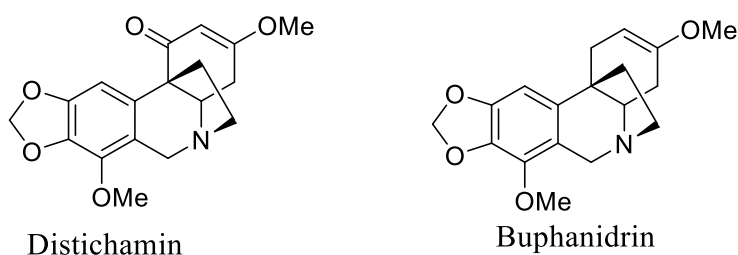
Na druhou stranu alkaloidy patřící do zmíněných strukturních typů disponují výrazným protinádorovým účinkem. Mezi nejdůležitější, resp. nejprozkoumanější, zástupce disponující

těmito účinky patří haemanthamin, haemanthidin, hamayn, krinamin a v poslední době i distichamin, který byl izolován z cibulí *Boophana flava*.³⁵

V rámci různých studií byly dosaženy nadějně výsledky. Ve studii, která byla publikována v roce 2007, bylo zjištěno³⁶, že haemanthidin a krinamin selektivně indukují apoptózu u potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123tc, ale nezpůsobuje ji u lidských embryonálních buněk ledvin HEK-293t.³⁷

Na základě této studie byla stanovena účinná dávka k indukci apoptózy u 50 % nádorových buněk na 12,5 μM pro krinamin a 15 μM pro haemanthamin.³⁴ O mechanismu apoptotického účinku u těchto alkaloidů víme zatím pouze velmi málo. Haemanthamin pravděpodobně inhibuje proteosyntézu tím, že blokuje vznik peptidové vazby v kroku, kdy se peptidyltransferasa váže na 60S podjednotku ribosomu. Později byla prokázána inhibice růstu buněk myšího lymfomu L5178 prostřednictvím tvorby komplexu haemanthaminu s RNA. V nedávné době byla prokázána indukce apoptózy u p53-negativní T-lymfoblastové leukémie Jurkat. Expozice haemanthaminu po dobu 24 hodin vyvolala pozdní apoptózu (buňky Annexin V a propidium jodid dvojité pozitivní) u 4 ± 1 % po působení v koncentraci 1 μM , resp. 22 ± 1 % po působení v koncentraci 25 μM .⁵

Za zmínku stojí z této skupiny také distichamin. Jeho výskyt v čeledi Amaryllidaceae je velmi vzácný a prozatím se ho podařilo získat pouze z afrického rodu *Boophone*. I přes to, že nepatří mezi běžně se vyskytující alkaloidy, byla jeho biologická aktivita testována několikrát a byly získány zajímavé výsledky. Z biologického hlediska je distichamin znám pro svůj výrazný efekt na serotoninové transportéry. Nicméně se z protinádorového hlediska ukázal jako toxický k nádorovým buňkám ($\text{IC}_{50} = 2,2 - 14,7$ μM) MCF-7, HeLa, G-361, K562, BJ a CEM, z čehož HeLa buňky se ukázaly jako nejcitlivější ($\text{IC}_{50} = 2,2$ μM).³⁵ U lidských buněk akutní T-lymfoblastické leukémie CEM dávkově závisle indukoval zvýšenou aktivitu kaspasy -3 a -7.⁵ Do rodu *Boophone* patří pouze dva druhy a to *Boophone disticha*, který je v Africe široce rozšířen, a *Boophone haemanthoides*, který se naopak vyskytuje pouze vzácně. Významná aktivita ovšem není pouze protinádorová, ale také antibakteriální. Testován byl sumární extrakt z cibulí a také dva alkaloidy krininového typu, již zmíněný distichamin a dále buphanidrin (Obr. 7). Byly provedeny testy na dvou grampozitivních bakteriích (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) a dvou gramnegativních bakteriích (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), kde působil pouze samotný extrakt z cibulí. Každý alkaloid zvlášť se ale ukázal jako dvakrát účinnější a nejlepší naměřená MIC (minimální inhibiční koncentrace) byla stanovena na 0,0063 mg/ml.³⁸



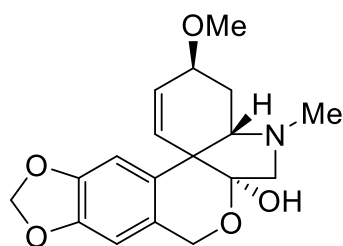
Obr. 7 Struktura distichaminu a buphanidrinu

Dalším potenciálním rodem pro antimikrobní aktivitu je rod *Crinum*, na kterém v roce 2009 probíhala studie extraktu z listů *Crinum purpurascens*. Testovala se účinnost proti patogenům způsobující tyfus a urogenitální infekce. To zahrnovalo šest bakteriálních kmenů: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a *Salmonella paratyphi*.³⁹

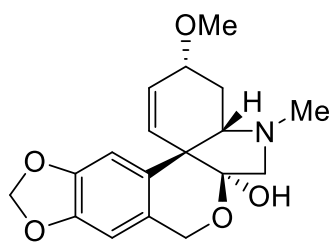
Další zajímavou vlastností alkaloidů tohoto strukturního typu je jejich antimalarická aktivita. Právě alkaloidy haemanthaminového typu disponují vysokým inhibičním potenciálem proti druhu *Plasmodium falciparum*. Bylo testováno pět skupin amarylkovitých alkaloidů, a to lykorinového, krininového, haemanthaminového, tazettinového a galanthaminového typu. Proběhlo testování i na rostlinných výtěžcích z rostlin *Panocratium maritimum*, *Leucojum aestivum* a *Narciss tazetta* ssp. *tazetta*, které byly *in vitro* vyhodnoceny jako schopny inhibovat *Plasmodium falciparum*. Jako nejúčinnější alkaloidy byly zjištěny haemanthidin, haemanthamin a lykorin, naopak nejslabší byly galanthamin a tazettin.⁴⁰

3.3.4 Alkaloidy tazettinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita

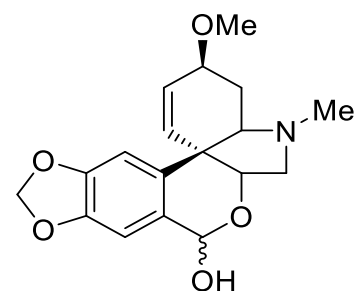
Strukturním kamenem alkaloidů tazettinového typu je 2-benzopyrano [3,4-c]indol, který je stejně jako u alkaloidů krininového a haemanthaminového typu odvozen od norbelladinu oxidativní cyklizací typu *para'-para'*. Hlavním protagonistou této skupiny je tazettin, jehož syntéza vychází z haemanthaminu přes chemicky nestabilní prekurzor pretazettin. Dalšími zástupci, které do této skupiny patří, jsou 3-epitazettin (kriwellin), makronin, ornamin, ornazidin nebo zeylamin (Obr. 5).¹¹ Můžeme je nalézt například v rodech *Eucharis*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Chlidanthus*, *Leucojum* nebo *Zephyranthes*.^{33,41,42}



Tazettin



Kriwellin



Pretazettin

Obr. 8 Vybrané struktury tazettinového typu

Tazettin vykazuje pouze zanedbatelnou cytotoxickou aktivitu. Perspektivnější látkou z této skupiny se zdá být pretazettin, u kterého byla prokázána účinnost proti celé řadě nádorových buněk, především jeho antileukemická aktivita.

Pretazettin vykazuje cytotoxicitu proti buňkám fibroblastu LMTK, inhibuje buněčný růst HeLa buněk, je účinný vůči rozličným onkogenním virům (např. Rauscher virus, způsobující leukemii) mechanismem navázání se na enzym reverzní transkriptázu viru a zablokováním jeho aktivity. Navíc je to jeden z neaktivnějších amarylkovitých alkaloidů proti lymfoidním buňkám Molt-4. Byla potvrzena jeho aktivita proti dalším liniím rakovinných buněk jako: spontánní AKR lymfocytární leukemie, Lewisův plicní karcinom a Ehrlichův ascitický tumor. Dále bylo prokázáno, že v buňkách myšího lymfomu L5178 MDR podporuje antiproliferační aktivitu doxorubicinu zvyšováním jeho intracelulární koncentrace. Na buňkách fibroblastu LMTK ukazoval výrazně vyšší cytotoxickou aktivitu oproti tazettinu.²⁶

Další zajímavostí je, že u prazettinu byla prokázána účinnost proti vybraným RNA flavivirům (japonské encefalitidy, žluté zimnice a horečky dengue) a bunyavirům (Punta Toro a horečka údolí Rift). Jeho aktivita byla také potvrzena u Herpes simplex viru typu 1. Tato účinnost může právě odrážet obecnou schopnost inhibovat syntézu bílkovin v průběhu virové replikace.²⁶

3.3.5 Alkaloidy pankratistatinového strukturního typu: výskyt, biologická aktivita

Do této skupiny patří alkaloidy, které vznikají oxidativní cyklizací *para'-para'*. Hlavním zástupcem je pankratistatin, ale neméně důležitým je narciklasin. Další alkaloidy patřící do tohoto strukturního typu jsou trisferidin, bikolorin, lykoricidin a krinasiadin.⁴³ Rody, ve kterých

můžeme tyto sloučeniny nalézt, jsou například *Boophane*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Narcissus*, *Pancratinum* a *Zephyranthes*.⁴⁴

Alkaloidy této skupiny jsou odvozeny od molekuly fenanthridinu. Nejzajímavějšími strukturami z pohledu cytotoxicity jsou narciklasin a pankratistatin (Obr. 6). Narciklasin je široce rozšířen v rodu *Narcissus* L. a ze zástupců tohoto rodu byl poprvé izolován v roce 1967. Nicméně jak již bylo řečeno výše, jeho účinky znal již sám Hippokrates, který pomocí pesaru připraveného z extraktu z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi oleje léčil rakovinu dělohy. Jeho aktivita byla prokázána na pokusech agresivního myšního sarkomu 180 vyskytujícího se v břišní dutině, když byl podáván jak perorálně, tak subkutánně a peritoneálně. Podkožní podávání se projevilo jako nejefektivnější a vedlo k úplnému zastavení mitózy po čtyřhodinovém podávání dávky 0,9 mg/kg.⁸

Účinek látky byl původně popsán jako antimitotický, další studie odhalily, že se váže na ribozomální jednotku 60S, kde inhibuje peptidyltransferasu, čímž brání vzniku peptidové vazby v nově vznikajícím proteinu. Podobně jako u některých běžně používaných cytostatik, interaguje narciklasin pravděpodobně s molekulou DNA nebo s ní tvoří komplexy.⁷

Slibným přínosem je zjištění, že narciklasin je vysoce selektivní k nádorovým buňkám na rozdíl od zdravých buněk. Tento fakt byl prokázán na šesti liniích lidských nádorových buněk a třech liniích zdravých fibroblastů pomocí MTT testu. Kýžená hodnota IC₅₀, nebo-li indukce apoptózy u nádorových buněk byla dosažena po třídním vystavení koncentraci 30 nM, naproti tomu u zdravých fibroblastů byla stejná hodnota dosažena až při koncentraci 7,5 mM. Díky této skutečnosti můžeme tvrdit, že senzitivita nádorových buněk k narciklasinu je mnohem větší než u buněk zdravých.⁴⁵

Další experimenty byly provedeny na liniích adenokarcinomu prsu (MCF-7, MDA-MB-231) a karcinomu prostaty (PC-3) a dalších.⁴⁵

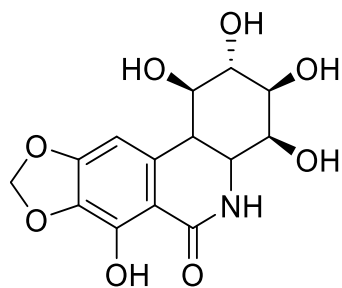
Druhou zajímavou látkou této skupiny je pankratistatin. Byl identifikován v roce 1984 Pettitem a poprvé izolován v roce 1993 z cibulí havajské lilie *Hymenocallis littoralis*.⁴⁶ Působí toxicky na mnoho typů rakovinného bujení, například leukémii, rakovinu prsu, prostaty, tlustého střeva, ledvin, melanomu, osteosarkomu a dalších. Projevuje se aktivitou již při velmi nízkých koncentracích (<1 μM). Podobně jak tomu bylo u prvního zástupce, tak i pankratistatin vykazuje vysokou selektivitu vůči nádorovým buňkám.⁴⁶

Toto bylo potvrzeno v rámci studie, v níž pankratistatin snížil mitochondriální membránový potenciál a indukoval apoptózu u dvou typů kolorektálního karcinomu (p53-mutovaného HT-29 a wild-type HCT116), nestalo se tomu však u zdravých fibroblastů tlustého střeva (CCD-

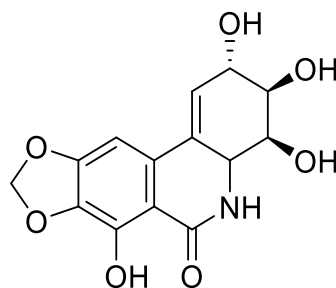
18Co). Kromě toho dokáže pankratistatin vyvolat buněčnou smrt nezávisle na Bax (také Bcl-2-like protein 4), aktivaci kaspáz a nemění rychlost polymerizace β -tubulinu ani nezpůsobuje zlomy dvouřetězové DNA.⁴⁷

Mechanismus účinku pankratistatinu není prozatím úplně znám. Může se jednat o přímé zasažení mitochondrie v nádorové buňce, která hraje zásadní roli v aktivaci apoptózy, kdy mitochondrie náhle sníží produkci ATP rapidním zvýšením reaktivních forem kyslíku v nádorové buňce (u buněk zdravých nebylo pozorováno). Výsledkem je specifické toxické zasažení nádorových buněk.⁴⁸

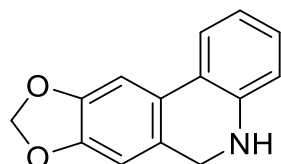
U dalších alkaloidů patřících do této strukturní skupiny (narciklasin-tetraacetát, *cis*-dihydronarciklasin, *trans*-dihydronarciklasin, C10b-*R*-hydroxypankratistatin) byl také prokázán cytotoxický efekt zprostředkovaný apoptózou u leukemických buněk Jurkat.⁴⁹ Problémem je jejich malé množství v rostlinného materiálu, s čímž souvisí jejich obtížná izolace. Pro získání většího množství by bylo zapotřebí zpracovat řádově stovky kg příslušné rostlinné části.⁷



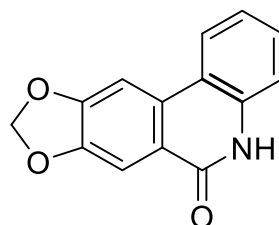
Pankratistatin



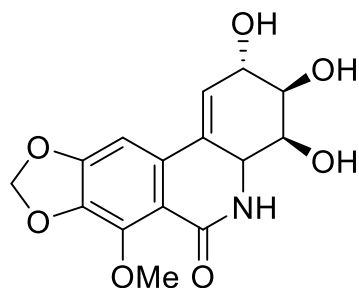
Narciklasin



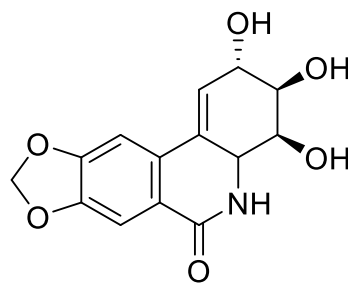
Trisferidin



Bikolorin



Lykoricidin



Krinasiadin

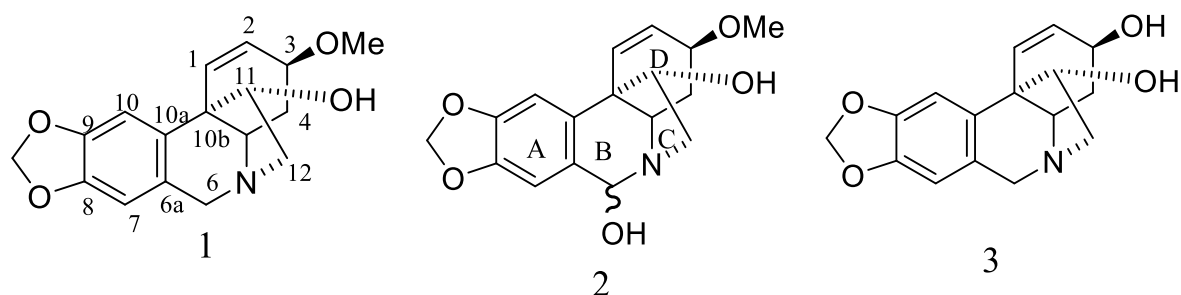
Obr. 9 Vybrané struktury pankratistatinového typu

3.3.6 Polosyntetické deriváty alkaloidů krininového a haemanthaminového typu a jejich biologická aktivita

V experimentální části diplomové práce se během přípravy derivátů vycházelo z doposud jediné práce publikované na toto téma v roce 2012.⁵⁰

Výchozí práce se zabývá potenciální antimalarickou aktivitou přírodních alkaloidů čeledi Amaryllidaceae a jejich polosyntetických derivátů. V rámci této studie bylo připraveno na 31 sloučenin z alkaloidů haemanthaminu (1), haemantihidinu (2) a 11-hydroxyvittatinu (3) (Obr. 9). Tyto alkaloidy byly původně izolovány z cibulí *Pancreatium canariense*. V rámci

provedených experimentů byla hodnocena jejich *in vitro* antimalarická aktivita proti chlorochinin-senzitivním kmenům *Plasmodium falciparum* F32.



Obr. 10 Přehled výchozích struktur alkaloidů

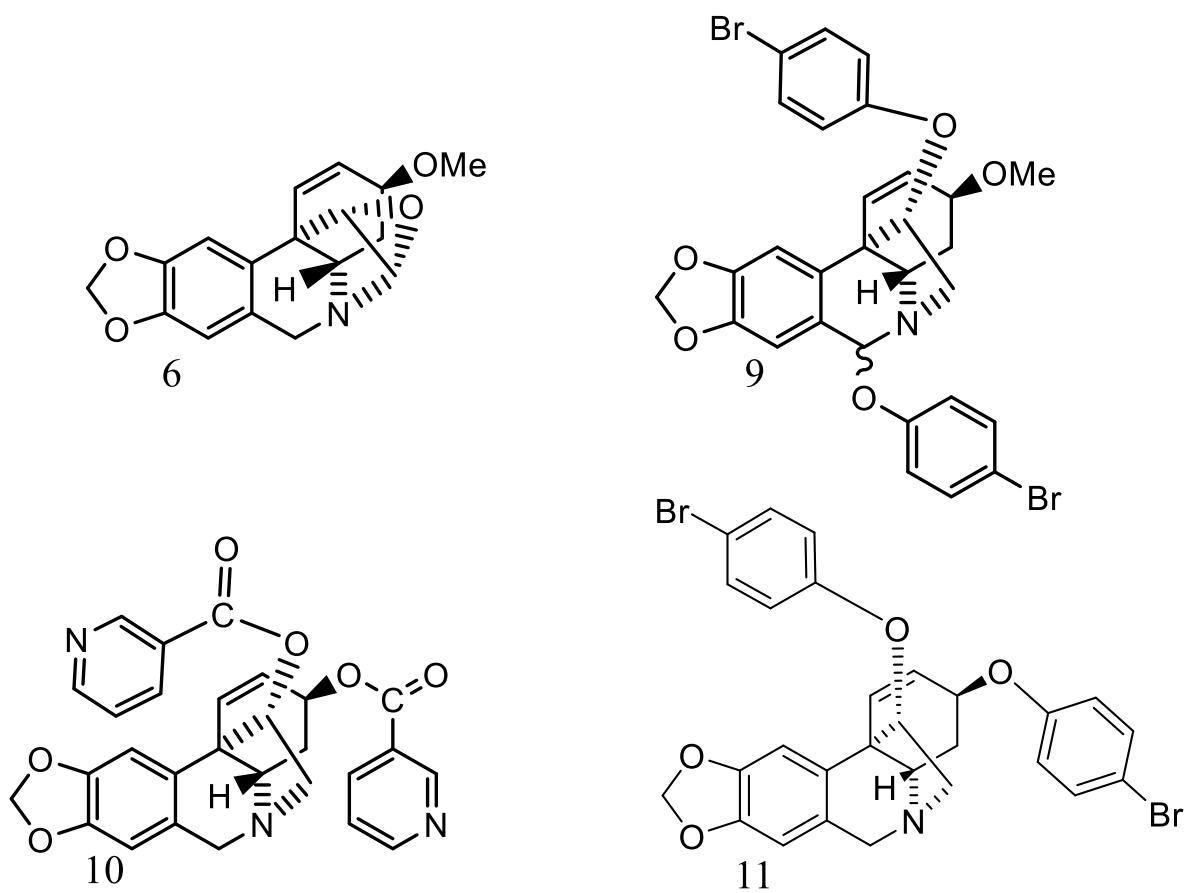
Nejvíce modifikací bylo provedeno na hydroxylové skupině uhlíku C-11 nebo na dvojně vazbě kruhu D za účelem získání poznatků o jejich roli v antiplasmodiální aktivitě. Výsledky antiplasmodiální aktivity připravených derivátů jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 2). Ze získaných výsledků můžeme vyvodit určité vztahy mezi strukturou a účinkem.

Tab. 2 *In vitro* aktivita proti chlorochin-senzitivnímu kmenu *Plasmodium falciparum* F32 (převzato a upraveno).⁵⁰

Sloučenina	Název	IC ₅₀ (μM) ^a
1	Haemanthamin	1,3 ± 0,2
2	Haemanthidin	1,2 ± 0,09
3	11-Hydroxyvittatin	13,2 ± 1,4
4	Vittatine	7,3 ± 0,1
5	11-Acryloylhaemanthamin	8,4 ± 1,7
6	11,12-Epoxyhaemanthamin	1,6 ± 0,1
7	1,2-Dibromohaemanthamin	6,5 ± 0,9
8	6-Nikotylhaemanthidin	7,1 ± 0,9
9	6,11-Bis(<i>p</i> -brombenzyl)-haemanthidin	2,9 ± 0,6
10	3,11-Dinikotyl-11-hydroxyvittatin	0,8 ± 0,06
11	3,11-Bis(<i>p</i> -bromobenzoyl)-11-hydroxyvittatin	3,0 ± 0,6
12	3,11-Diisobutyryl-11-hydroxyvittatin	7,0 ± 1,2
Chlorochin		0,04

^a Hodnoty jsou vyjádřeny se směrodatnou odchylkou ze tří měření

Při modifikaci haemanthaminu na odpovídající acylderivát (sloučenina 12), bylo pozorováno dramatické snížení aktivity oproti výchozímu alkaloidu. Z těchto výsledků lze vyvodit důležitost zachování tzv. hydrogen-bond-donoru na uhlíku C-11 pro antiplasmodiální aktivitu. Stejně se tak oxidací hydroxylové skupiny na C-11 získaly sloučeniny s nižší aktivitou. Nahrazení methoxy skupiny na C-3 za hydroxylovou skupinu mělo za následek také sníženou aktivitu. Pozměnění dvojně vazby mezi C-1 a C-2 kruhu D u sloučenin vedla ke vzniku látek méně aktivních ve srovnání s haemanthaminem. Z tohoto faktu vyplývá vliv přítomnosti dvojně vazby pro účinek. Sloučenina 6 s epoxidickým můstkem jeví podobnou aktivitu jako výchozí alkaloid haemanthamin. Zachování dvojně vazby mezi uhlíky C-1 a C-2 kruhu D a methylenedioxy skupiny na kruhu A hraje důležitou roli v jejich aktivitě, jelikož jsou přítomny v nejméně aktivních sloučeninách. Ze získaných výsledků můžeme vyvodit, že volná hydroxylová skupina v poloze C-11 je nezbytná pro ty haemanthaminové struktury, které na C-11 obsahují pouze jednu hydroxylovou skupinu. Při modifikaci haemanthidinu se diacetylace projevila taktéž snížením aktivity oproti výchozímu alkaloidu (sloučenina 8 a 9). Naproti tomu vedla acylace hydroxylových skupin u 11-hydroxyvittatinu k rozdílným výsledkům, které záležely na typu esterů na C-3 a C-11. Nejvyšší aktivitu vykazovala sloučenina 10 ($IC_{50} = 0,8 \mu M$) s přítomností dvou nikotinátů. Nejméně aktivní sloučeniny jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 10). Tato zajímavá zjištění dávají podnět ke zkoumání a přípravě dalších sloučenin s možnou antiplasmodiální aktivitou.



Obr. 11 Příklady neaktivnějších připravených derivátů

4 Experimentální část

4.1 Materiál, chemikálie a metody

4.1.1 Amaryllidaceae alkaloidy

Výchozí látka haemanthamin byla izolována z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master na katedře Farmaceutické botaniky a ekologie (zpracovala Mgr. Daniela Hulcová) za účelem studování vztahu struktura-účinek. Výběr alkaloidu se uskutečnil na základě již existujících studií Amaryllidaceae alkaloidů, ve kterých byla studována protinádorová aktivita.^{39,40}

4.1.2 Rozpouštědla, chemikálie

Ethanol, p.a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Pyridin, p.a. (Penta)

Tetrahydrofuran, p.a. (Penta)

Ethylacetát, p.a. (Penta)

DMAP, p.a. (Penta)

Triethylamin, p.a. (Acros)

Butyrylchlorid, ≥ 99 % (Acros)

3,4-dimethoxybenzoylchlorid, ≥ 99 % (Acros)

4-trifluormethylbenzoylchlorid, ≥ 99 % (Acros)

Isobutyrylanhydrid, ≥ 99 % (Acros)

Bortrifluordiethylether, ≥ 99 % (Acros)

Bezvodý síran sodný (Acros)

Chlorid sodný, 20 % (Acros)

Uhlíčan sodný, 10 % (Acros)

Materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

Kiesel SiO₂ F254, Merck, 20 x 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC;
vrstva 0,2 mm

Silikagel 60 GF254, Merck; pro přípravu litých desek

4.1.3 Vytvářecí soustavy pro analytickou a preparativní tenkovrstvou a sloupcovou chromatografii

S1: CHCl₃:MeOH 10 : 1

S2: EtOAc:Hx 4 : 1

S3: CHCl₃:MeOH 30 : 1

4.1.4 Strukturní analýza připravených derivátů

4.1.4.1 GC – MS analýza

GC-MS analýza se použila pro určení molekulové hmotnosti připravených látek. K měření byl použit plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v EI režimu při 70 eV. K separaci byla použita kolona typu DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Teplotní rozsah se pohyboval od 100–300 °C, přičemž v rozmezí teplot od 100–180 °C vzrůstala teplota o 15 °C/min. Při dosažení 180 °C byla tato teplota udržována po dobu jedné minuty a následně stoupala do 300 °C rychlostí 5 °C/min a poté byla na této hodnotě opět udržována 40 minut. Teplota nástřiku vzorku na kolonu byla 280 °C s rychlostí průtoku nosného plynu (hélia) 0,8 ml/min. Detekční rozmezí m/35-600. Koncentrace nastříkovaného vzorku v metanolu byla 1 mg/ml. Získané známé látky byly porovnány s daty v literatuře, strukturně nepopsané látky byly charakterizovány poprvé.

4.1.4.2 ESI – MS analýza

Látky obtížně ionizující za podmínek měření EI spekter byly analyzovány za účelem získání hodnot Mr pomocí ESI ionizace na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). MS/MS spektra se měřila při kolizní energii 40 eV. Látky pro prováděné experimenty byly rozpuštěny v methanolu (1 mg/ml).

4.1.4.3 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI – HRMS analýza)

Tato metoda byla použita pro určení přesné hodnoty nově připravených a v literatuře dosud neuvedených sloučenin. Hmotnostní spektra se měřila spektrometrem s vysokým hmotnostním rozlišením UHPLC Waters Acquity I-Class s ionizací elektrosprejem v kladném módu a kombinovaným analyzátozem – kvadrupól s analyzátozem doby letu Waters Synapt G7-Si. Vzorky byly měřeny v roztoku MeCN. Poté došlo k porovnávání teoretického m/s s experimentálně zjištěným.

4.1.4.4 NMR analýza

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl₃ případně CD₃OD při teplotě 25 °C na spektrometru Varian Iniova 500 pracujícím při 499,87 MHz pro ¹H jádra a 125,70 MHz pro ¹³C jádra. K ozařování a detekci signálu byla použita OneNMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl₃ jsou u atomů ¹H $\delta = 7,26$ ppm a u atomů ¹³C $\delta = 77,0$ ppm, pro CD₃OD jsou u atomů ¹H $\delta = 3,30$ ppm a u ¹³C $\delta = 49,0$ ppm. Měřeními získaná data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita ¹H NMR spekter, multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, dd: dublet dubletů, m: multiplet, bs: široký singlet) a integrační konstanta (Hz).

4.1.4.5 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů při 20 °C na automatickém polarimetru ADP 220 BS v prostředí chloroformu nebo methanolu a specifická otáčivost byla dopočtena dle vzorce:

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

t – teplota měření = 20 °C

D – linie sodíkového světla = 589,3 nm

α – naměřená optická otáčivost [°C]

c – koncentrace naměřeného alkaloidu [g × 100 ml⁻¹]

l – délka květy = 1 dm

4.1.5 Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin

4.1.5.1 Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

Inhibiční aktivita těchto enzymů byla měřena na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření prováděl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Podrobný popis této metody je lze najít v literatuře.⁵¹

4.1.5.2 Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči POP

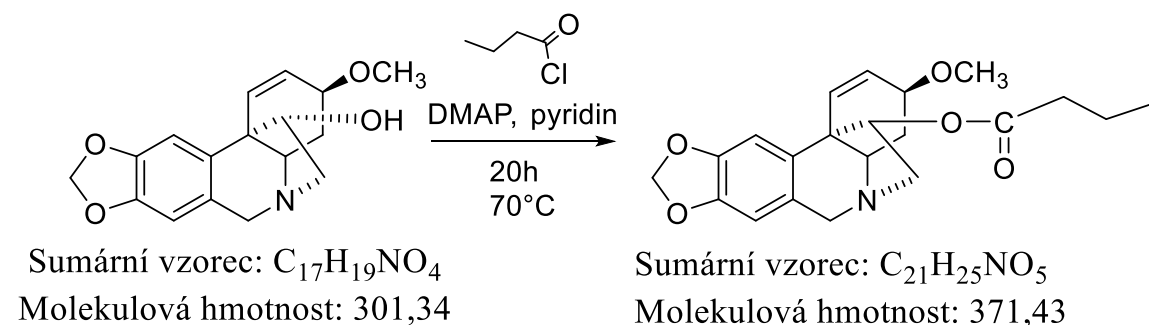
Měření inhibiční aktivity vůči prolyloloigopeptidase proběhlo ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany Hradec Králové. Měření prováděla Mgr. Martina Hrabínová. Podrobný popis metody lze najít v literatuře.⁵²

4.1.5.3 Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů

Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů bylo uskutečněno ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, České zemědělské univerzity v Praze. Testování prováděl Ing. Ivo Doskočil a podrobný popis prováděných experimentů je možno nalézt v literatuře.⁵³ Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů na dalších liniích bylo provedeno ve spolupráci s Katedrou lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, za využití systému xCELLigence. Testování prováděl RNDr. Radim Havelek, Ph.D. Popis metody měření za využití přístroje xCELLigence je popsán v literatuře.⁵³

4.2 Příprava polosyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu a jejich strukturní identifikace

4.2.1 Příprava 11-*O*-butanoylhaemanthaminu (JM-1)



Obr. 12 Schéma syntézy 11-*O*-butanoylhaemanthaminu

50 mg haemanthaminu (0,16 mmol) a 2 mg DMAP (0,016 mmol) se rozpustilo v 10 ml bezvodého pyridinu, poté bylo přidáno 36 μ l acylačního činidla butyryl chloridu. Veškerá práce byla prováděna pod inertní atmosférou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC za využití mob. fáze S1. Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena a odparek rozpuštěn ve 20 ml ethylacetátu (EtOAc). EtOAc byl přenesen do dělicí nálevky a vytřepán s 10% Na_2CO_3 (2 x 20 ml) a s 20% NaCl (1 x 20 ml). Na závěr byl EtOAc vysušen pomocí bezvodého Na_2SO_4 a zahuštěn na vakuové odparce. Cílová látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie. Bylo získáno 47 mg olejovité kapaliny. Výtěžek reakce byl 72 %.

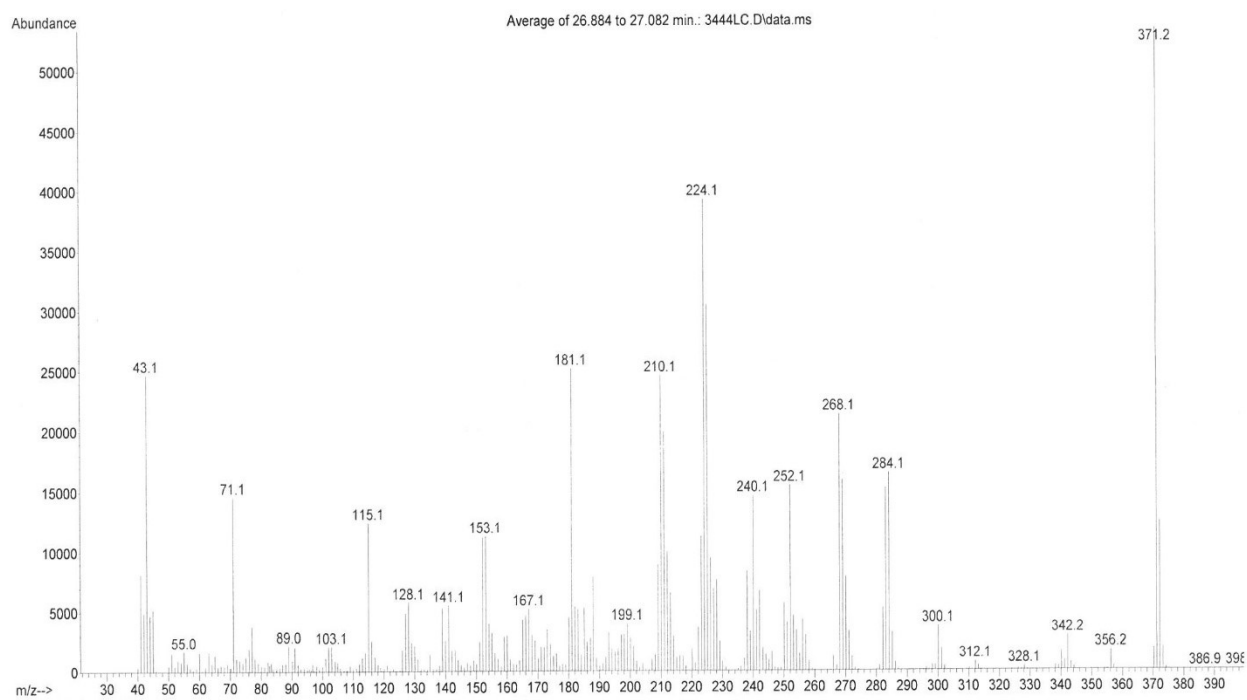
Strukturní analýza 11-*O*-butanoylhaemanthaminu (JM-1)

Systematický název:

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

EI-MS studie:

EI/MS m/z (%) 371 (100), 284 (30), 268 (40), 252 (38), 240 (37), 224 (73), 210 (46), 181 (47), 153 (21), 115 (23).



Obr. 13 EI-MS studie 11-*O*-butanoylhaemanthaminu

HiRes-MS: teoretická hodnota pro $[M+H]^+$ 372, 1813, změřeno 372, 1811

NMR studie:

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

6,91 (s, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,35 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 6,17 – 6,12 (m, 1H), 5,91 – 5,88 (m, 2H), 4,99 – 4,95 (m, 1H), 4,35 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 3,86 – 3,82 (m, 2H), 3,72 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 3,43 – 3,37 (m, 1H), 3,36 (s, 3H), 3,35 – 3,27 (m, 1H), 2,26 – 2,15 (m, 2H), 2,08 – 2,00 (m, 1H), 1,99 – 1,89 (m, 1H), 1,64 – 1,55 (m, 2H), 0,97 – 0,91 (m, 3H).

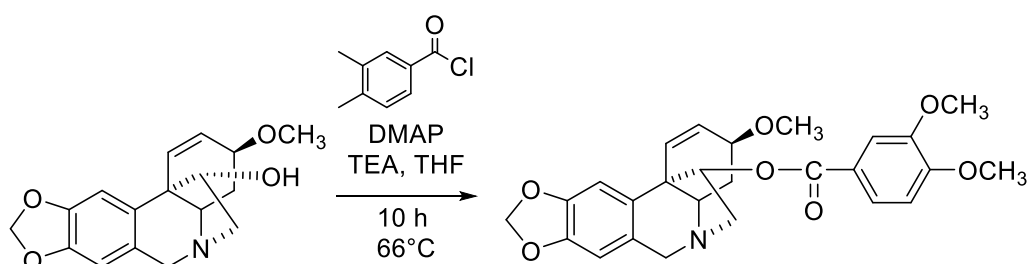
^{13}C NMR (126 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

172,56; 146,60; 146,38; 134,39; 129,41; 127,80; 126,56; 106,54; 103,92; 100,82; 80,13; 72,58; 62,79; 61,24; 60,72; 56,47; 49,15; 36,40; 28,39; 18,27; 13,70.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{20} = -23,6^\circ$ (c 0.01, CHCl_3)

4.2.2 Příprava 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-4A)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molekulová hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₆H₂₇NO₅
Molekulová hmotnost: 433,50

Obr. 14 Schéma syntézy 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthaminu

Bylo naváženo 50 mg haemanthaminu (0,16 mmol) a 2 mg DMAP (0,016 mmol) a poté se baňka umístila na hluboké vakuuum po dobu 30 minut. Dále se přidalo 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu, bezvodý triethylamin (2 μ l, 0,16 mmol) a na závěr 0,1332 g 3,4-dimethoxybenzoyl chlorid jako acylační činidlo. Veškerá práce byla prováděna pod inertní atmosférou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mob fáze S1). Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena a odparek rozpuštěn ve 20 ml EtOAc. EtOAc byl přenesen do dělicí nálevky a vytřepán s 10% Na₂CO₃ (2 x 20 ml) a s 20% NaCl (1 x 20 ml). Na závěr byl EtOAc vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄ a zahuštěn na vakuové odparce. Cílová látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze S3). Bylo získáno 33 mg ve formě olejovité kapalina. Výtěžek reakce byl 43 %.

Strukturní analýza 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-4A)

Systematický název:

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

EI-MS studie: Látka neionizovala.

ESI-MS studie: Látka neionizovala

HiRes-MS: teoretická hodnota pro [M+H]⁺ 466, 1866, změřeno 466, 1871

NMR studie:

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

7,54 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H), 7,46 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,88 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,49 (s, 1H), 6,44 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 6,15 – 6,10 (m, 1H), 5,92 – 5,89 (m, 2H), 5,18 – 5,15 (m, 1H), 4,39 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,91 (s, 3H), 3,87 – 3,84 (m, 2H), 3,76 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 3,53 (dd, $J = 14,3, 7,0$ Hz, 1H), 3,46 – 3,40 (m, 1H), 3,35 (s, 3H), 2,17 – 2,02 (m, 2H).

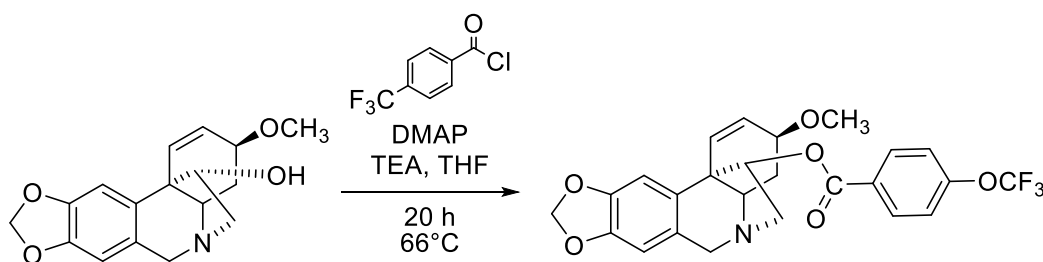
^{13}C NMR (126 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

165,15; 153,05; 148,61; 146,64; 146,44; 134,34; 129,30; 127,92; 126,63; 123,11; 122,57; 111,82; 110,26; 106,60; 103,84; 100,83; 80,78; 72,56; 62,86; 61,27; 61,16; 56,45; 55,97; 55,86; 53,36; 49,12; 28,61.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{20} = +78,66^\circ$ (c 0.006, CHCl_3)

4.2.3 Příprava 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-5B)



Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$
Molekulová hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{NO}_6$
Molekulová hmotnost: 489,21

Obr. 15 Schéma syntézy 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthaminu

Navázilo se 50 mg haemanthaminu (0,16 mmol), 2 mg DMAP (0,016 mmol) a poté se baňka umístila na hluboké vakuu po dobu 30 minut. Dále se přidalo 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu, bezvodý triethylamin (2 μl , 0,16 mmol) a na závěr 0,1043 ml 4-trifluormethylbenzoyl chloridu jako acylačního činidla. Veškerá práce byla prováděna pod inertní atmosférou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mob. fáze S1). Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena a odparek rozpuštěn ve 20 ml EtOAc. EtOAc byl přenesen do dělicí nálevky a vytřepán s 10% Na_2CO_3 (2 x 20 ml) a s 20% NaCl (1 x 20 ml). Na závěr

byl EtOAc vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄ a zahuštěn na vakuové odparce. Cílová látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze S3). Získali jsme 40 mg látky ve formě olejovité kapaliny. Výtěžek reakce byl 51 %.

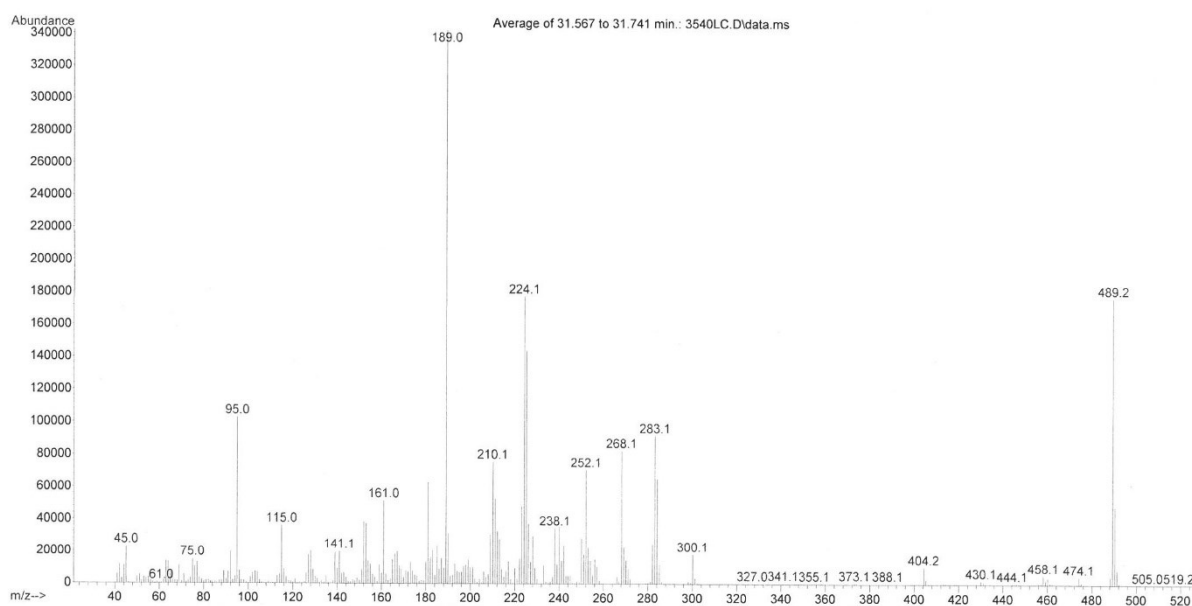
Strukturní analýza 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthaminu (JM-5B)

Systematický název:

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

EI-MS studie:

EI/MS *m/z* (%) 189 (100), 489 (52), 300 (5), 283 (27), 268 (24), 252 (21), 238 (11), 224 (52), 161 (15), 95 (31).



Obr. 16 EI-MS studie 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthaminu

HiRes-MS: teoretická hodnota pro [M+H]⁺ 490, 1490, změřeno 490, 1477

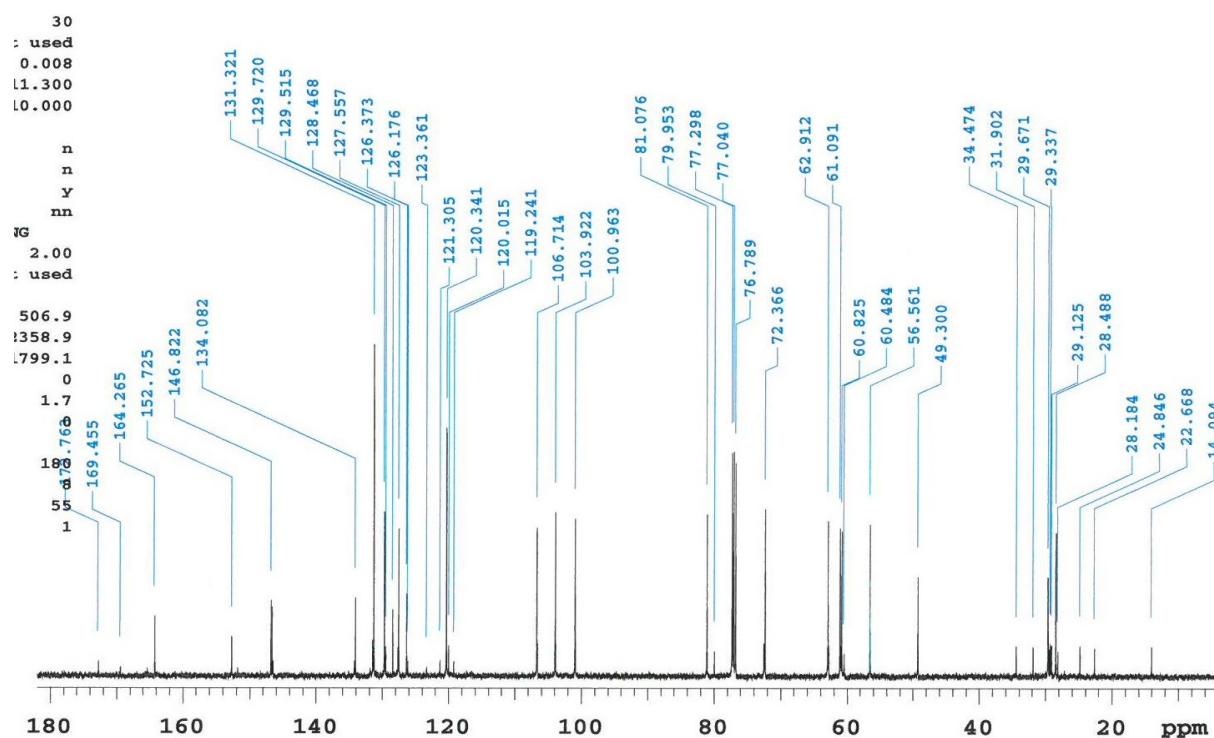
NMR studie:

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25 °C):

7,97 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,26 – 7,25 (m, 2H), 6,95 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 6,42 (d, *J* = 10,1 Hz, 1H), 6,17 – 6,11 (m, 1H), 5,93 – 5,90 (m, 2H), 5,23 – 5,18 (m, 1H), 4,42 (d, *J* = 16,9 Hz, 1H),

3,88 – 3,84 (m, 2H), 3,79 (d, J = 16,9 Hz, 1H), 3,56 (dd, J = 14,5, 7,0 Hz, 1H), 3,51 – 3,44 (m, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,23 – 2,14 (m, 1H), 2,11 – 2,01 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$): Není úplně čisté, bude se přečišťovat.

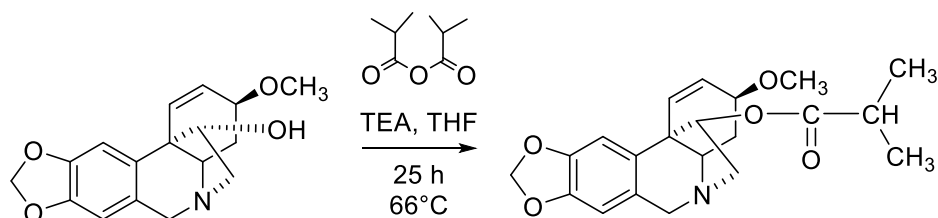


Obr. 17 ^{13}C NMR záznam připraveného derivátu JM-5B

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{20} = +36,4^\circ$ (c 0.01, CHCl_3)

4.2.4 Příprava 11-O-isobutanoylhaemanthaminu (JM-2A)



Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$
Molekulová hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_5$
Molekulová hmotnost: 371,43

Obr. 18 Schéma syntézy 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu

Navážilo se 50 mg haemanthaminu (0,16 mmol), 2 mg DMAP (0,016 mmol) a poté se baňka umístila na hluboké vakuum po dobu 30 minut. Dále se přidalo 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu, bezvodý triethylamin (2 μ l, 0,16 mmol) a na závěr isobutyryl anhydrid (2 μ l, 0,19 mmol). Veškerá práce byla prováděna pod inertní atmosférou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mob. fáze S2). Po ukončení reakce, byla reakční směs odpařena a odparek rozpuštěn ve 20 ml EtOAc. EtOAc byl přenesen do dělicí nálevky a vytřepán s 10% Na₂CO₃ (2 x 20 ml) a s 20% NaCl (1 x 20 ml). Na závěr byl EtOAc vysušen pomocí bezvodého Na₂SO₄ a zahuštěn na vakuové odparce. Cílová látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze S2). Získali jsme 50 mg látky ve formě olejovité kapaliny. Výtěžek reakce byl 81 %.

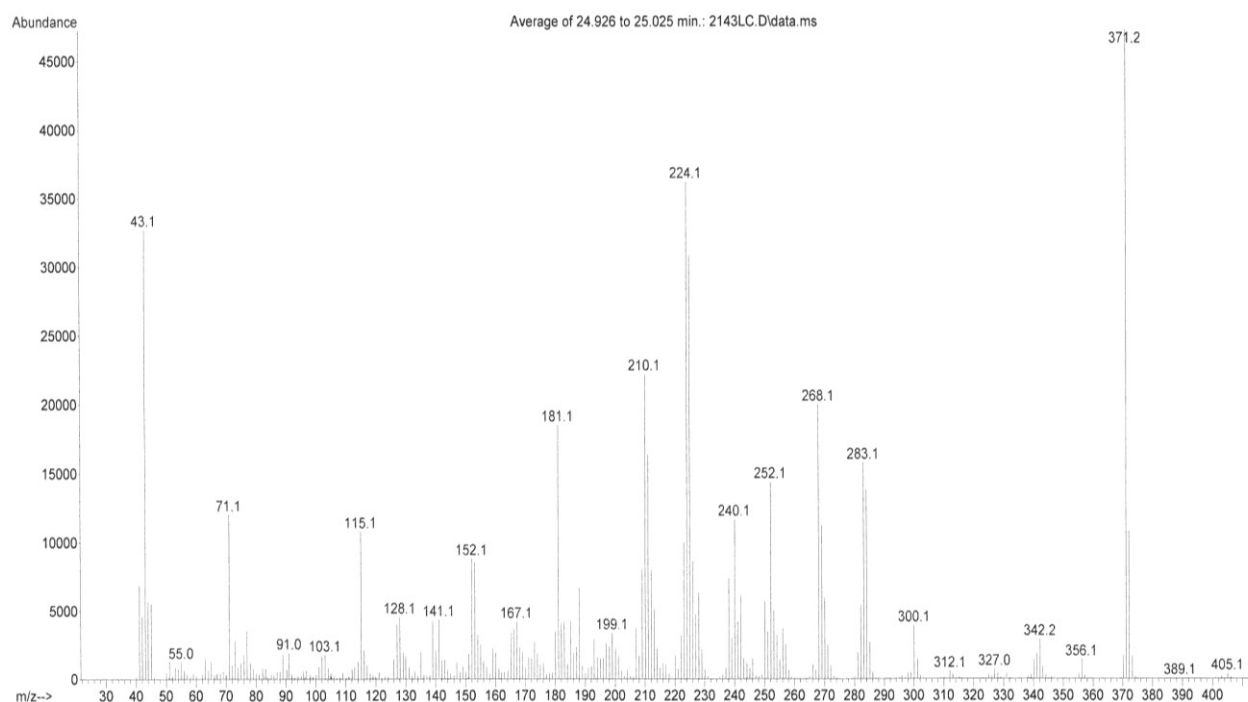
Strukturní analýza 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu (JM-2A)

Systematický název:

3-methoxy-4,4a-dihydro-3H,6H-5,11b-ethano[1,3]dioxolo[4,5-j]phenanthridin-12-yl
isobutyrylát

EI-MS studie

EI/MS *m/z* (%) 371 (100), 284 (30), 268 (40), 252 (38), 240 (37), 224 (73), 210 (46), 181 (47), 153 (21), 115 (23).



Obr. 19 EI-MS studie 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu

ESI – HRMS analýza

ESI-HRMS nebylo měřeno, tato látka již byla dříve připravena, identifikace byla provedena porovnáním naměřených a publikovaných spekter.

NMR studie:

^1H NMR (500 MHz, δ CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

6,89 (s, 1H), 6,45 (s, 1H), 6,32 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H), 6,16 – 6,09 (m, 1H), 5,90 – 5,85 (m, 2H), 4,96 – 4,89 (m, 1H), 4,33 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 3,84 – 3,78 (m, 2H), 3,70 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H), 3,41 – 3,36 (m, 1H), 3,34 (s, 3H), 3,33 – 3,25 (m, 1H), 2,48 – 2,39 (m, 1H), 2,07 – 2,00 (m, 1H), 1,96 – 1,89 (m, 1H), 1,10 (d, $J = 2,7$ Hz, 3H), 1,09 (d, $J = 2,7$ Hz, 3H).

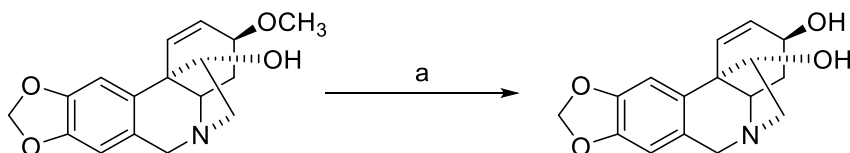
^{13}C NMR (126 MHz, δ , CDCl_3 , 25 $^\circ\text{C}$):

175,81; 146,55; 146,34; 134,30; 129,33; 127,70; 126,49; 106,49; 103,87; 100,76; 79,75; 72,58; 62,72; 61,20; 60,64; 56,42; 49,17; 33,83; 28,34; 18,96; 18,61.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{20} = + 3,8^\circ$ (c 1.3, EtOH)

4.2.5 Příprava 3-demethylhaemanthaminu (JM-K2)



^a Reakční podmínky: BF₃ etherát, THF, 0 °C – rt, 4 h

Obr. 20 Schéma syntézy 3-demethylhaemanthaminu

Navážilo se 50 mg haemanthaminu (0,016 mmol) a umístila se baňka na hluboké vakuu po dobu 30 minut. Poté se baňku dala do ledové lázně a přidalo se 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs byla míchána po dobu 30 minut a poté se opatrně přidal 46% BF₃ etherát (12,9 μ l, 0,048 mmol). Všechny reakční postupy byly prováděny pod inertní atmosférou. Reakční směs byla míchána 3 hodiny v ledové lázni a poté byla vyjmuta a ještě jednu hodinu míchána za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla reakční směs odpařena na vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn ve 20 ml EtOAc. EtOAc byl přenesen do dělicí nálevky, vytřepán s 10% Na₂CO₃ (2 x 15ml) a s 20% NaCl (1 x 15 ml). Na závěr byl ethylacetát vysušen s bezvodým Na₂SO₄ a zahuštěn na vakuové odparce. Finální produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze S2). Získali jsme 23 mg látky ve formě bílých krystalů. Výtěžek reakce byl 48 %.

Strukturní analýza 3-demethylhaemanthaminu

Systematický název:

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

NMR analýza:

Na základě MS a NMR analýzy bylo zjištěno, že nebyla připravena předpokládaná sloučenina.

5 Výsledky

5.1 Příprava derivátů haemanthaminu

Připravené deriváty haemanthaminu i se svými výtěžky jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3).

Tab. 3 Připravené sloučeniny a jejich výtěžek

Kód sloučeniny	Název sloučeniny	Výtěžek (%)
JM-1	11- <i>O</i> -Butanoylhaemanthamin	72%
JM-4A	11- <i>O</i> -(3,4-Dimethoxybenzoyl)-haemanthamin	43%
JM-5B	11- <i>O</i> -(4-Trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamin	51%
JM-2A	11- <i>O</i> -Isobutanoylhaemanthamin	81%
JM-K2	3-Demethylhaemanthamin	0%

5.2 Screening biologických aktivit připravovaných sloučenin

5.2.1 Inhibiční aktivity vůči AChE, BuChE a POP

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie se již dlouhodobě testují látky jak přírodního, tak polosyntetického původu na svou inhibici vůči erytrocytární acetylcholinesterase, sérové butyrylcholinesterase a prolyloligopeptidase.

Byly testovány sloučeniny JM-1, JM-4A, JM-5B a JM-2A vůči AChE a BuChE, měření vůči POP bude provedeno v blízké budoucnosti.

Bohužel vykazalo dosud provedené měření nezajímavou inhibiční aktivitu vůči těmto enzymům pro využití v terapii Alzheimerovy choroby. V následující tabulce (Tab. 4) jsou shrnuty výsledky.

Tab. 4 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů vůči HuAChE, HuBuChE a POP

Testovaná látka	IC ₅₀ (μM)		
	HuAChE	HuBuChE	POP
11- <i>O</i> -Butanoylhaemanthamin	835 ± 129	203 ± 8	*
11- <i>O</i> -(3,4-Dimethoxybenzoyl)-haemanthamin	289 ± 30	298 ± 42	*
11- <i>O</i> -(4-Trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamin	538 ± 67	>1000	*
11- <i>O</i> -Isobutanoylhaemanthamin	632 ± 46	140 ± 21	*
Galanthamin ^a	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	>100

^a Referenční látka

* v měření

5.2.2 Cytotoxická aktivita

V následující tabulce (Tab. 5) jsou shrnuty výsledky protinádorové aktivity připravených derivátů vůči liniím kolorektálního adenokarcinomu Caco-2, HT-29 a vůči zdravým buňkám fibroblastů za použití standardu vinorelbinu. Bohužel lze ze získaných výsledků vidět, že ani jeden derivát nemá dostatečnou toxicitu vůči nádorovým buňkám.

Tab. 5 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů na vybrané střevní buněčné linie

Testovaná látka	IC ₅₀ (μM)*		
	Caco-2	HT-29	FHs-74
11- <i>O</i> -butanoylhaemanthamin	>10	>10	>10
11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthamin	>10	>10	>10
11- <i>O</i> -(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamin	>10	>10	>10
11- <i>O</i> -Isobutanoylhaemanthamin	>10	>10	>10
Vinorelbin	0,04 ± 0,01	-	0,4 ± 0,1

"- " = netestováno, * byla provedena tři měření

6 Diskuze a závěr

Na základě provedených studií na našem pracovišti byl pro přípravu derivátů Amaryllidaceae alkaloidů vybrán alkaloid haemanthamin, který se podařilo v rámci fytochemických studií izolovat v gramovém množství (cca 10 g) z čerstvých cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master. Tato látka vykazovala v rámci biologických studií provedených ve spolupráci s dalšími institucemi zajímavou protinádorovou aktivitu s výraznou toxicitou vůči nádorovým buňkám a nízkou toxicitou vůči buňkám zdravým.⁵³

Primárním cílem předložené diplomové práce byly různé modifikace struktury haemanthaminu, konkrétně příprava esterových derivátů v poloze C-11. Látky byly připraveny reakcí haemanthaminu s příslušným acylačním činidlem (acylchloridem, popřípadě anhydridem) v prostředí bezvodého pyridinu nebo tetrahydrofuranu za přidání katalyzátoru dimethylaminopyridinu. Většina produktů byla získána ve formě bezbarvého oleje, jedna látka krystalizovala ve formě amorfních bílých krystalů (JM-K2).

V rámci diplomové práce bylo připraveno pět derivátů (11-*O*-butanoylhaemanthamin, 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthamin, 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamin, 11-*O*-isobutanoylhaemanthamin), bohužel se jeden derivát (3-demethylhaemanthamin) za podmínek reakce připravit nepodařilo. V rámci této reakce mělo dojít k otevření dioxolanového kruhu A. Byla získána látka, která ale na základě strukturních analýz (MS, NMR) neodpovídala předpokládané struktuře. Podmínky reakce budou muset být v případných dalších experimentech upraveny. Na základě ¹³C NMR analýzy bylo před finalizací DP zjištěno, že látka JM-5B není zcela čistá a musí být pro další experimenty nejprve přečištěna. Kromě 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu, který byl již připraven v roce 2012,⁵⁰ jsou všechny ostatní deriváty originální struktury, které doposud nebyly připraveny. 11-*O*-Isobutanoyl byl v rámci zmíněné práce testován na antimalarickou aktivitu proti kmenu *Plasmodium falciparum*, kde probíhala snaha o nalezení aktivnějšího derivátu oproti výchozímu alkaloidu haemanthaminu. Nicméně byla inhibiční aktivita haemanthaminu ($IC_{50} = 1,3 \pm 0,2 \mu M$) oproti jeho derivátu 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu ($IC_{50} = 56,6 \pm 8,1 \mu M$) mnohonásobně vyšší.

Vzhledem k výzkumnému zaměření pracoviště byly připravené látky testovány na jejich protinádorovou aktivitu. Všechny deriváty byly podrobeny screeningové studii na nádorové

linie buněk střev Caco-2, HT-29 a zdravou linii buněk fibroblastů FHs-74 při koncentraci 10 μM . Bohužel nevykázala ani jedna testovaná látka při této koncentraci požadovanou toxicitu ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$). Dále byla studována inhibiční aktivita derivátů vůči lidských cholinesterasám (AChE, BuChE) a v blízké době bude testován inhibiční potenciál látek vůči prolyl oligopeptidase.

O aktivitě Amaryllidaceae alkaloidů vůči AChE ví vědecká komunita již poměrně dlouhou dobu, stejně tak se ví, že se inhibicí tohoto enzymu dají léčit příznaky Alzheimerovy choroby. Za novější poznatek platí fakt, že v pozdějších stádiích nemoci se uplatňuje další enzym, a to BuChE. Proto se při hledání nových látek zjišťuje inhibice jak AChE, tak BuChE a tyto látky se nazývají tzv. duální inhibitory, patřící do skupiny léčiv kognitiva.^{54,55} Nověji přibyla do měření také inhibiční aktivita vůči prolyl oligopeptidase. Hladina POP hraje důležitou roli v procesech paměti a učení, stejně tak u neurodegenerativních poruch, proto v dnešní době intenzivně probíhá její zkoumání.⁵⁷ Bohužel látky stejně jako v předchozí biologické studii ani v případě inhibice AChE, BuChE nevykázaly žádnou aktivitu. Připravené deriváty budou v rámci spolupráce testovány ještě na antimalarickou a antimikrobiální aktivitu.

7 Použitá literatura

1. Doležal M. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Praha: *Karolinum*, **2013**, ISBN 978-80-246-2382-5.
2. Unver N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, **2007**, 6, 125-135.
3. Gábrlová L. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2016**.
4. Jahodář L. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 3., upr. a dopl. Praha: *Karolinum*, **2011**. ISBN 978-80-246-2015-2.
5. Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy*, **2013**, 107, 701-708.
6. Berkov S, Romani S, Herrera M, Codina C, Momekov G, Ionkova J, Bastida J. Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy Research*. **2011**, 25, 1686-1692.
7. Cahlíková L. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2013**.
8. Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews*, **2008**, 6, 1982-2014.
9. Habartová K a kolektiv. The biological activity of alkaloids from the Amaryllidaceae: from cholinesterases inhibition to anticancer activity. *Natural Product Communications*, **2016**, 11, 1-8.
10. Nekolná P. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae: rod *Lycoris*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. **2015**.
11. Refaat J, Kamel S, Ramadan MA, Ali AA. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review, Part I: Crinum alkaloids: Lykorine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2012**, 7, 1883-1890.
12. Kintsurashvili L, Vachnadze V. Plants of the Amaryllidaceae family grown and introduced in Georgia: a source of galanthamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **2007**, 41, 38-40.

13. Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otaguro K, Yamada H, Omura S, Takayama H. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 10182-10189.
14. Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica*, **2001**, 67, 191-193.
15. Loewus, M, Bedgar D, Saito K, Loewus F A. Conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid by a NADP dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. *Plant Physiology*, **1990**, 94, 1492-1495.
16. Guo Yu, Wang Y, Cao L, Wang P, Qing J, Zheng Q, Shang L, Yin Z, Sun Y. A conserved inhibitory mechanism of a lycorine derivative against enterovirus and hepatitis C virus. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2016**, 60, 913-924.
17. Hwang Y, Chu J, Yang P, Chen W, Maytes. Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Research*, **2008**, 3, 232-236.
18. Deng L, Dai P, Ciro A, Smee D F, Djaballah H, Shuman S. Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. *Journal of Virology*, **2007**, 24, 13392-13402.
19. Li S, Chen C, Zhang H. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Research*, **2005**, 67, 18-23.
20. Szlávik L, Gyuris Á, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*, **2004**, 9, 871-873.
21. He M, QU Ch, Gao O, Hu X, Hong X. Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances*, **2015**, 5, 16562-16574.
22. Evdokimov NM, Lamoral-Theys D, Mathieu V, Andolfi, A., Frolova, LV, Pelly SC, Kiss R, Kornienko A. In search of a cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 7252-7261.
23. Cao Z, Yang P, Zhou Q. Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry*, **2013**, 56, 1382-1389.
24. Liu J, Hu J, Shi B, He Y, Hu W. Up-regulation of p21 and TNF- α is mediated lycorine-induced death of HL-60 cells. *Cancer Cell International*, **2010**, 10, 21177-21186.

25. 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 and Biodiversity*, **2013**, 6, 1120-1127.
26. Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni NB, De Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* **2011**, 65-100.
27. Krejčová G, Ševelová L. Současné poznatky o galanthaminu, reverzním inhibitoru acetylcholinesterázy. Katedra toxikologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové. *Vojenské zdravotnické listy*, **2003**, 1, 37-44.
28. López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life sciences*, **2002**, 21, 2521-2529.
29. Machocho A, Chhabra SC, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Ammocharis tinneana*. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 1185-1191.
30. Refaat J, Kamel S, Ramadan MA, Ali AA. *Crinum*; an endless source of bioactive principles: a review, Part II. Crinum alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2012**, 9, 3091-3094.
31. Bozkurt-Sarikaya B, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berkov S, Unver-Somer N. GC/MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chemistry of Natural Compounds*, **2014**, 50, 573-575.
32. Andrade de JP, Guo Y, Font-Bardia M, Calvet T, Dutilh J, Viladomat F, Codina C, Nair JJ, Zuanazzi JAS, Bastida J. Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptatum*. *Phytochemistry*, **2014**, 103, 188-195.
33. Jin Z, Xu X, Ramawat KG, Mérillon JM. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. *Springer Berlin Heidelberg*, **2013**, 479-522.
34. 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*, **2015**, 78, 1189-1192.
35. Nair J J, Rárová L, Strnad M, Bastida J, Van Staden J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, **2012**, 19, 6195-6199.

36. McNulty J, Nair J J, Codina C, Bastida J, Pandey, Gerasimoff J, Griffin C. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry*, **2007**, 7,1068-1074.
37. 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*, **2010**, 7, 1223-1227.
38. Cheesman L, Nair JJ, Van Staden J. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**, 2, 405-408.
39. Nkanwen E, Gatsing D, Ngamga D, Fodouop S, Tane P. Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (Amaryllidaceae). *African Health Sciences*, **2009**, 4, 264-269.
40. Sener B, Orhan I, Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*, 17, **2003**, 1220–1223.
41. Latvala A, Onur MA, Gozler T, Linden A, Kivcak B, Hesse M. Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1229-1240.
42. Azimova, Shakhnoza S. Natural compounds: plant sources, structure and properties. New York: *Springer*, **2013**. ISBN 9781461405405.
43. Kavková Z. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2016**.
44. Hu Y, Na X, Li J, Yang L, You J, Liang X, Wang J, Peng L, Bi Y. Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in arabidopsis roots. *Planta*, **2015**, 242, 1349-1360.
45. Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S. Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Chemotherapeutics*, **2011**, 1, 57-68.
46. Pettit G, Gaddami G, Cragg D, Herald M, Y Sagawa Y. Isolation and structure of pancratistatin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1984**, 5, 1693-1694.

47. Griffin C, Sharda N, Sood D, Nair J, McNulty J, Pandey S. Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International*, **2007**, 7, 1-7.
48. Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. The Amaryllidaceae isocarbostryril narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **2007**, 9, 766-776.
49. Havelek R, Seifertová M, Kralovec K, Brůčková 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, **2014**, 479-490.
50. Cedrón JC, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo ÁG., Estévez-Braun A. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2012**, 20, 5464-5472.
51. 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*, **2011**, 6, 603-606.
52. 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*, **2015**, 103, 192-196.
53. Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Havelek R, Cahlíková L, Benešová N, Havlík J, Kuneš J, Kralovec K, Chlebek J. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, **2015**, 13, 394-398.
54. Walsh R, Roockwood K, Martin E, Darvesh S. Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galanthamine and citalopram. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, 1810, 1230-1235.
55. Furukawa-Hibi Y, Alkam T, Nitta, Matsuyama A, Mizoquchi S, Suzuki K, Moussaoui S, Yu Qs, Greig NH, Nagai T. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorative cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. *Behavioural Brain Research*, **2011**, 1, 222-229.
56. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mamszarz J, Holloway HW, 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, **2005**, 102, 17213-17218.

8 Seznam zkratek

AChE	Acetylcholinesterasa
ATP	Adenosintrifosfát
BF ₃	fluorid boritý
BuChE	butyrylcholinesterasa
CDCl ₃	Chloroform
CD ₃ OD	tetradeuteromethanol
CHCl ₃	Chloroform
CNS	centrální nervová soustava
DMAP	dimethylaminopyridin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
ESI-HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
HEB	hematoencefalická bariéra
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (angl. human immunodeficiency virus)
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
Hx	Hexan
IC ₅₀	inhibiční koncentrace
JM-1,4-A...	pracovní označení syntetizovaných látek
LC	kapalinová chromatografie
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
Mr	molekulová hmotnost
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
m/z	poměr hmotnosti a náboje

NaCl	chlorid sodný
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
Na ₂ SO ₄	síran sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAMPA	test propustnosti přes umělé membrány
POP	prolyloligopeptidasa
p-53	transkripční faktor v buňce
RNA	ribonukleová kyselina
SARS	těžký akutní respirační syndrom (angl. severe acute respiratory syndrome)
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie (angl. severe combined immunodeficiency disease)
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan

9 Seznam tabulek

TAB. 1 STRUKTURNÍ TYPY ALKALOIDŮ ČELEDI AMARYLLIDACEAE, HLAVNÍ ZÁSTUPCI A PŘÍKLADY RODŮ, ZE KTERÝCH BYLY IZOLOVÁNY	11
TAB. 2 IN VITRO AKTIVITA PROTI CHLOROCHIN-SENZITIVNÍMU KMENU <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> F32	26
TAB. 3 PŘIPRAVENÉ SLOUČENINY A JEJICH VÝTĚŽEK.....	42
TAB. 4 HODNOTY IC ₅₀ TESTOVANÝCH DERIVÁTŮ VŮČI HUACHE, HUBUCHE A POP.....	43
TAB. 5 HODNOTY IC ₅₀ TESTOVANÝCH DERIVÁTŮ NA VYBRANÉ STŘEVNÍ BUNĚČNÉ LINIE	43

10 Seznam obrázků

OBR. 1	BIOSYNTÉZA HLAVNÍCH STRUKTURNÍCH TYPŮ AMARYLLIDACEAE ALKALOIDŮ	10
OBR. 2	STRUKTURY VYBRANÝCH ALKALOIDŮ LYKORINOVÉHO TYPU	13
OBR. 3	STRUKTURY LYKORINOVÉHO TYPU S ANTICHOLINERGNÍ AKTIVITOU.....	15
OBR. 4	STRUKTURY VYBRANÝCH ALKALOIDŮ GALANTHAMINOVÉHO TYPU.....	16
OBR. 5	VYBRANÉ STRUKTURY HAEMANTHAMINOVÉHO A KRININOVÉHO TYPU	19
OBR. 6	STRUKTURA 8- <i>O</i> -DEMETHYLMARITIDINU	19
OBR. 7	STRUKTURA DISTICHAMINU A BUPHANIDRINU.....	21
OBR. 8	VYBRANÉ STRUKTURY TAZETTINOVÉHO TYPU	22
OBR. 9	VYBRANÉ STRUKTURY PANKRATISTATINOVÉHO TYPU	25
OBR. 10	PŘEHLED VÝCHOZÍCH STRUKTUR ALKALOIDŮ	26
OBR. 11	PŘÍKLADY NEJAKTIVNĚJŠÍCH PŘIPRAVENÝCH DERIVÁTŮ.....	28
OBR. 12	SCHÉMA SYNTÉZY 11- <i>O</i> -BUTANOYLHAEMANTHAMINU.....	33
OBR. 13	EI-MS STUDIE 11- <i>O</i> -BUTANOYLHAEMANTHAMINU.....	34
OBR. 14	SCHÉMA SYNTÉZY 11- <i>O</i> -(3,4-DIMETHOXYBENZOYL)-HAEMANTHAMINU.....	35
OBR. 15	SCHÉMA SYNTÉZY 11- <i>O</i> -(4-TRIFLUOROMETHOXYBENZOYL)-HAEMANTHAMINU.....	36
OBR. 16	EI-MS STUDIE 11- <i>O</i> -(4-TRIFLUOROMETHOXYLBENZOYL)-HAEMANTHAMINU	37
OBR. 17	¹³ C NMR ZÁZNAM PŘIPRAVENÉHO DERIVÁTU JM-5B	38
OBR. 18	SCHÉMA SYNTÉZY 11- <i>O</i> -ISOBUTANOYLHAEMANTHAMINU.....	39
OBR. 19	EI-MS STUDIE 11- <i>O</i> -ISOBUTANOYLHAEMANTHAMINU.....	40
OBR. 20	SCHÉMA SYNTÉZY 3-DEMETHYLHAEMANTHAMINU	41

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Jana Marková

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

Název diplomové práce: Syntéza derivátů haemanthaminu

Na základě dřívějších studií byl pro práci vybrán alkaloid haemanthamin, který vykazuje zajímavou protinádorovou aktivitu. Účelem této práce byla příprava jeho aktivnějších derivátů, konkrétně jeho esterů. Bylo připraveno následujících pět esterových derivátů (11-*O*-butanoylhaemanthamin, 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthamin, 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamin, 11-*O*-isobutanoylhaemanthamin) reakcí haemanthaminu s příslušným acylačním činidlem (acylchloridem, popřípadě anhydridem) v prostředí bezvodého pyridinu nebo tetrahydrofuranu za přidání katalyzátoru dimethylaminopyridinu. Většina produktů byla získána ve formě bezbarvého oleje, jedna látka krystalizovala ve formě bílých amorfních krystalů. Bohužel se jeden derivát (3-demethylhaemanthamin) pokusem o otevření dioxolanového kruhu za podmínek reakce nepodařilo připravit. Připravené deriváty byly identifikovány převážně pomocí EI-MS a NMR studií. Všechny látky byly získány v dostatečných výtěžcích v rozmezí 43 - 81 %. Kromě 11-*O*-isobutanoylhaemanthaminu byly všechny sloučeniny připraveny poprvé. Tyto deriváty byly testovány na cytotoxickou aktivitu na střevních nádorových liniích Caco-2, HT-29 a zdravých fibroblastech FHs-74 při koncentraci 10 μM . Bohužel nevykázala ani jedna testovaná látka při této koncentraci požadovanou toxicitu ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$).

Byla rovněž testována inhibiční aktivita vůči AChE a BuChE. Bohužel výsledky ukázaly, že žádný z derivátů nemá dostatečně slibnou inhibiční aktivitu ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) a jeví se pro další experimenty jako neperspektivní.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, AChE, BuChE, protinádorová aktivita, haemanthamin

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Jana Marková

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

Title of Diploma thesis: Synthesis of haemanthamine derivatives

Based on previous studies the haemanthamine alkaloid showing remarkable antitumorous activity was chosen for this thesis. Purpose of the thesis was preparation of its more active derivatives, concretely esters. Preparation concerns these following derivatives: 11-*O*-butanoylhaemanthamine, 11-*O*-(3,4-dimethoxybenzoyl)-haemanthamine, 11-*O*-(4-trifluoromethoxybenzoyl)-haemanthamine, 11-*O*-isobutanoyhaemanthamine. These were created by the reaction of haemanthamine and the relevant acilating agent (acylchloride, anhydride) in the environment of anhydrous pyridine or tetrahydrofuran with adding dimethylaminopyridine as catalyst. Most of the products were obtained in the form of colourless oil, one of the substances crystallized into white amorphous crystals. Unfortunately during the opening dioxolane ring experiment preparation of 3-demethylhaemanthamine derivative was not successful. Prepared derivatives were mostly identified by EI-MS and NMR. All the substances were gained in sufficient outcomes in the scale of 43 – 81 %. All the compounds were prepared for the first time with the exception of 11-*O*-isobutanoylhaemanthamine. These derivatives (concentration 10 μM) were tested for cytotoxic activity against gastrointestinal cancer cells Caco-2, HT-29 and healthy fibroblasts FHs-74. Unluckily has none of the tested substances shown required toxicity ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) at this concentracion.

Inhibitive activity against AChE and BuChE was also tested. Unfortunately the results has shown that none of the derivatives has the adequate inhibitive activity ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) and has no perspective in future experiments.

Key words: Amaryllidaceae, AChE, BuChE, antitumorous activity, haemanthamine

