

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické botaniky

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita

Preparation of lycorine derivatives and their biological activity

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

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

Hradec Králové, květen 2018

Kamila Lipovská

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

Hradec Králové, 2018

.....

podpis

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

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odbornou pomoc, poskytnuté materiály, ochotu, cenné rady, vstřícnost a hlavně trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Anežce Klátilové (roz. Krčmářové) za podporu a pomoc při práci v laboratoři. Veliký dík patří také celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky za pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE.....	8
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae.....	9
3.1.1. Čeleď Amaryllidaceae.....	9
3.1.2. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů a jejich strukturní typy	11
3.2. Výskyt, izolace a biologická aktivita lykorinu	15
3.2.1. Vlastnosti lykorinu a izolace	15
3.2.2. Biologická aktivita lykorinu.....	16
3.3 Příprava a biologická aktivita derivátů lykorinu	20
3.3.1. Protinádorová aktivita derivátů lykorinu	20
3.3.2 Inhibiční aktivita derivátů lykorinu vůči AchE a BuchE.....	36
3.3.3 Další biologická aktivita derivátů lykorinu.....	39
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1. Materiál, chemikálie a metody.....	45
4.1.1. Lykorin	45
4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla.....	45
4.1.3. Materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii	45
4.1.4 Vyvíjecí soustavy pro analytickou a preparativní	46
tenkovrstvou chromatografii.....	46
4.1.5. Strukturní analýza připravených derivátů	46
4.1.5.1. GC-MS analýza.....	46
4.1.5.2. ESI-MS analýza.....	46
4.1.5.3. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (ESI-HRMS analýza).....	47
4.1.5.4. NMR analýza.....	47
4.1.5.5. Optická otáčivost.....	47
4.1.6. Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin	48
4.1.6.1. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči erythrocytární AchE a	48
4.1.6.2. Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů	48
4.2. Přípravy syntetických derivátů lykorinu a jejich strukturní identifikace	49
4.2.1. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -propionyllykorinu (LC-37).....	49
4.2.2. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -isobutanoyllykorinu (LC-38)	53

4.2.3. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -benzoyllykorinu (LC-50).....	57
4.2.4. Příprava 1,2- di- <i>O,O'</i> -(3-methyl)benzoyllykorinu (LC-51).....	59
4.2.5. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -pentanoyllykorinu (LC-65).....	64
4.2.6. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -hexanoyllykorinu (LC-66).....	67
4.2.7. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(2-nitro)benzoyllykorinu (LC-69)	70
4.2.8. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-ethyl)benzoyllykorinu (LC-71).....	74
4.2.9. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(3-nitro)benzoyllykorinu (LC-75)	77
4.2.10. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-metyl-3-nitro)benzoyllykorinu (LC-76)	80
4.2.11. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-nitro)benzoyllykorinu (LC-79)	83
4.2.12. Příprava 1,2-di- <i>O,O'</i> -(2-chloro)benzoyllykorinu (LC-82).....	86
5. VÝSLEDKY.....	89
5.1. Příprava polosyntetických derivátů.....	89
5.2. Screening biologických aktivit	89
5.2.1 Cytotoxická aktivita	89
5.2.2. Inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze	90
5.2.3 Antimalarická aktivita.....	91
6. DISKUZE A ZÁVĚR	92
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	94
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	99

1. ÚVOD

Úplně prvním zdrojem léčivých látek byly rostliny. Už od doby kdy vzniklo lidstvo, se nejprve používaly jako potrava (med, česnek atd.) a později byly objeveny jejich léčebné účinky. Tato tzv. etapa přírodních léčiv ve vývoji chemických léčiv trvala až do 16. století.¹ V dnešní době se přírodním léčivům věnuje věda, která se nazývá farmakognozie, zabývá se hlavně, mimo jiné, obsahovými látkami těchto rostlin, o kterých se ještě před rozvojem chemických léčiv a chemie nevědělo. Jsou to především tzv. sekundární metabolity, které mají vlastní terapeutický efekt. Nejedná se tedy jen o odpadní produkty, které vznikají primárním metabolismem, jak se dříve předpokládalo. Tyto látky se z rostlin izolují, nebo se syntetizují, a buď se používají přímo v terapii (např. alkaloidy morfin, kodein a papaverin z *Papaver somniferum* L., kardioaktivní glykosid digoxin z rodu *Digitalis* L., diterpenické alkaloidy taxany z rodu *Taxus*, alkaloidy chinin a chinidin z rodu *Cinchona*, alkaloidy vinblastin a vinkristin z *Catharantus roseus* (L.) G. Don.),² nebo jsou jedním ze zdrojů nových chemických léčiv, které vznikají obměňováním struktur látek přírodního původu (např. kyselina acetylsalicylová z kyseliny salicylové získané oxidací aglykonu salicinu z rodu *Salix* L., chlorochin odvozen z chininu, prokain z kokainu, deriváty odvozené od morfinu např. oxykodon atd.). I přes to, jak dlouhou dobu už se lidstvo zabývá terapeutickými účinky rostlin, byl terapeutický efekt prozkoumán dosud pouze u méně než 20% známých rostlin.³ Vzhledem k tomu, že podříše vyšší rostliny zahrnuje okolo 500 000 druhů rostlin,⁴ je jejich studium stále aktuální a může přinést zajímavé výsledky i přes rozvoj nových syntetických léčivých látek. Díky rozvoji nových analytických a identifikačních metod, je mnohem snadnější sekundární metabolity rostlin studovat a objevovat dosud neznámé účinky a připravovat jejich analoga s ještě lepšími farmakoterapeutickými vlastnostmi. Přírodní látky slouží tedy také jako předloha k přípravě nových látek, které mohou mít mnohem výhodnější vlastnosti, než látka původní. Mohou mít vyšší biologickou aktivitu, nižší toxicitu, vyšší biologickou dostupnost atd. Díky rozvoji organické a farmaceutické chemie můžeme studovat vztahy mezi strukturou a aktivitou látek a připravovat cíleně molekuly podle žádané aktivity.

Tato práce se zabývá látkou přírodního původu, lykorinem, a přípravou jeho derivátů. Lykorin je alkaloid, který pochází z rostlin čeledi Amaryllidaceae. Je znám hlavně pro svoji cytotoxickou aktivitu, kterou je možné využít v terapii nádorových onemocnění. Tato

onemocnění jsou u nás podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR druhou hlavní příčinou úmrtí po kardiovaskulárních nemocích.⁵ V léčbě nádorových onemocnění mají přírodní léčiva velký význam. V roce 1969 v časopisu *Lloydia Hartwell* publikoval první ze série článků, kde bylo uvedeno nad 3000 druhů rostlin, které vykazují protinádorový účinek a tyto rostliny byly takto i tradičně využívány.⁶ Mezi nimi i rostliny čeledi *Amaryllidaceae*. Jednalo se hlavně o oblasti Jižní Ameriky, Jižní Afriky a oblast středozeří, to znamená tam, kde se tyto rostliny přirozeně vyskytují.⁷ Příkladem takového využití je léčba nádoru v oblasti dělohy extraktem z narcisu *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze, kterou připravil Hippokrates už v 4. století před naším letopočtem.⁸

Některé deriváty lykorinu, které byly připraveny v rámci různých studií, vykazaly také inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BChE), která se využívá na terapii Alzheimerovy choroby. V roce 2014 byla demence diagnostikována u 152,7 tisíc obyvatel ČR⁹ a je to onemocnění, které významně snižuje kvalitu života.

Tyto dvě oblasti, jak protinádorová, tak inhibiční aktivita vůči AChE a BChE stojí v popředí zájmu studia biologické aktivity *Amaryllidaceae* alkaloidů (AA). Lykorin a jeho deriváty, vykazují ale i další biologické aktivity, o kterých se práce také zmiňuje.

2. CÍL PRÁCE

Hlavní cíle této diplomové práce byly:

1. zpracování literatury na téma deriváty lykorinu a jejich biologická aktivita,
2. příprava alifatických a aromatických derivátů alkaloidu lykorinu (estery),
3. strukturní identifikace připravených derivátů (MS, NMR, optická otáčivost),
4. příprava látek pro biologické studie,
5. analýza výsledků, sepsání diplomové práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

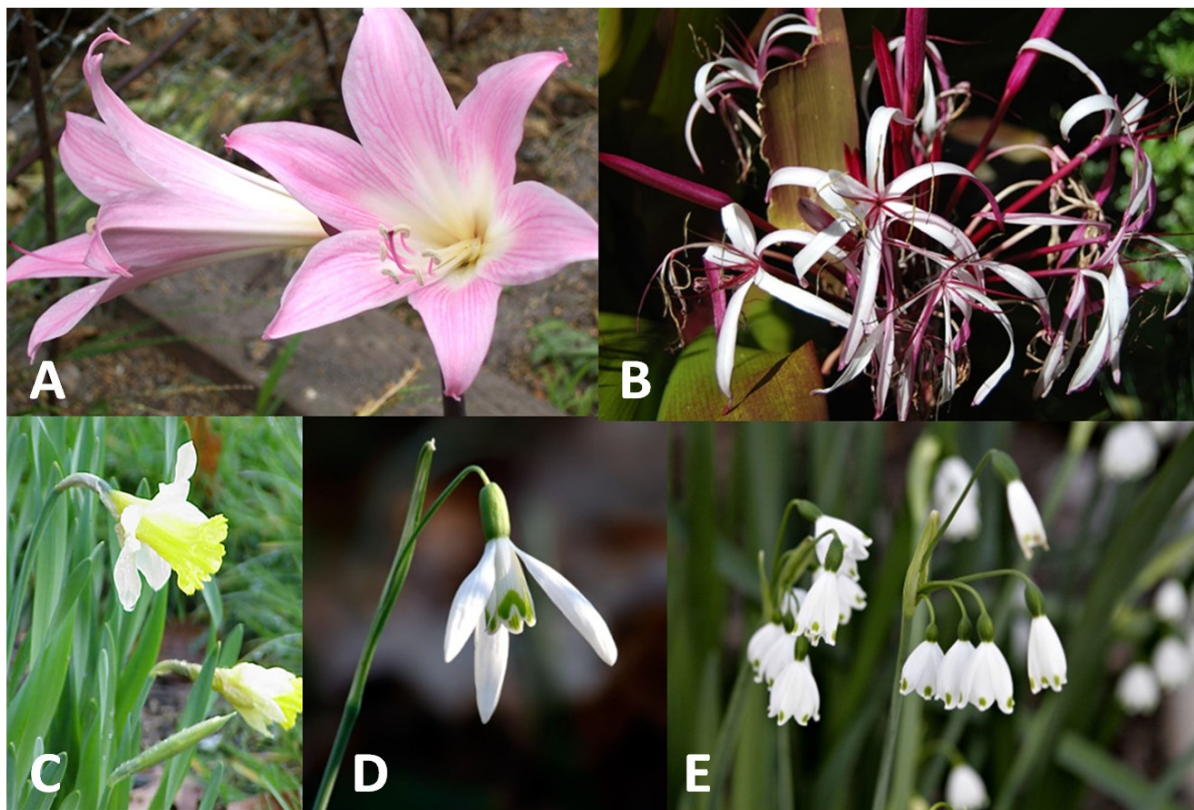
3.1. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy jsou látky, které patří mezi sekundární metabolity rostlin. Vznikají z prekurzorů primárního metabolismu a to konkrétně z aminokyselin. Vedle těchto látek existují i např. purinové alkaloidy, jako je kofein, které nevznikají z aminokyselin ale z purinových nukleotidů.¹⁰ Alkaloidů bylo dosud z rostlin izolováno a strukturně objasněno několik tisíc. Jedná se o bazické organické sloučeniny s alespoň jedním heterocyklicky vázaným atomem dusíku. Alkaloidy mají velmi vysokou fyziologickou aktivitu a často se jedná o látky toxické. Díky těmto vlastnostem je možné je využívat v medicíně například na léčbu nádorových onemocnění. Čeleď Amaryllidaceae je jedním z významných zdrojů alkaloidů.¹¹ Význam alkaloidů pro rostliny ještě nebyl úplně objasněn, ale pravděpodobně se jedná o látky, které mohou rostlinu chránit před býložravci, nebo se může jednat o tzv. alelopatické látky, které brzdí růst dalších rostlin v okolí.^{12,13}

3.1.1. Čeleď Amaryllidaceae

Rostliny čeledi Amaryllidaceae (amarylkovité) jsou vytrvalé byliny s oddenky, hlízkami nebo cibulemi, listy mají čárkovité, buď jen přízemní, nebo také lodyžní. Květy mají oboupohlavné. Plodem těchto rostlin je tobolka nebo bobule.² Podle následující literatury Jahodář (2011),² která vychází z práce Takhtajan (2009),¹⁴ je čeleď řazena do oddělení Magnoliophyta (krytosemenné), třídy Liliopsida (jednoděložné), podtřídy Lillidae a řádu Amaryllidales. Podle skupiny Angiosperm Phylogeny group je čeleď nově řazena do Asparagales a dělena na podčeledi Amaryllidoideae, Agapanthoideae a Allioideae.¹⁵ Alkaloidy, kterými se tu zabýváme, jsou strukturálně jedinečné alkaloidy, charakteristické pro původní čeleď Amaryllidaceae, tzn. nově pro podčeleď Amaryllidoideae. Zahrnuje více než 850 druhů rostlin klasifikovaných do přibližně 60 rodů.¹² Tyto údaje se ale liší podle použitého zdroje. Pojmenování této čeledě vychází z roku 1805, kdy Jean Henri Jaume Saint-Hilaire použil termín Amaryllidae a poté John Lindley v roce 1836 použil termín Amaryllidaceae.¹⁶

Čeleď v sobě zahrnuje rody jako je např. *Leucojum* L., bledule, *Galanthus* L., sněženka, *Narcissus* L., narcis, *Amaryllis* L., amarylka, *Crinum* L., křín a další. Tyto rostliny jsou obecně známé, rostou volně v přírodě nebo se pěstují z důvodů okrasných květů.



Obr. 1 *Amaryllis belladonna* L.,^{17a)} *Crinum augustum* L.,^{17b)} *Narcissus pseudonarcissus*,^{17c)} *Galanthus nivalis*,^{17d)} *Leucojum aestivum* L.^{17e)}

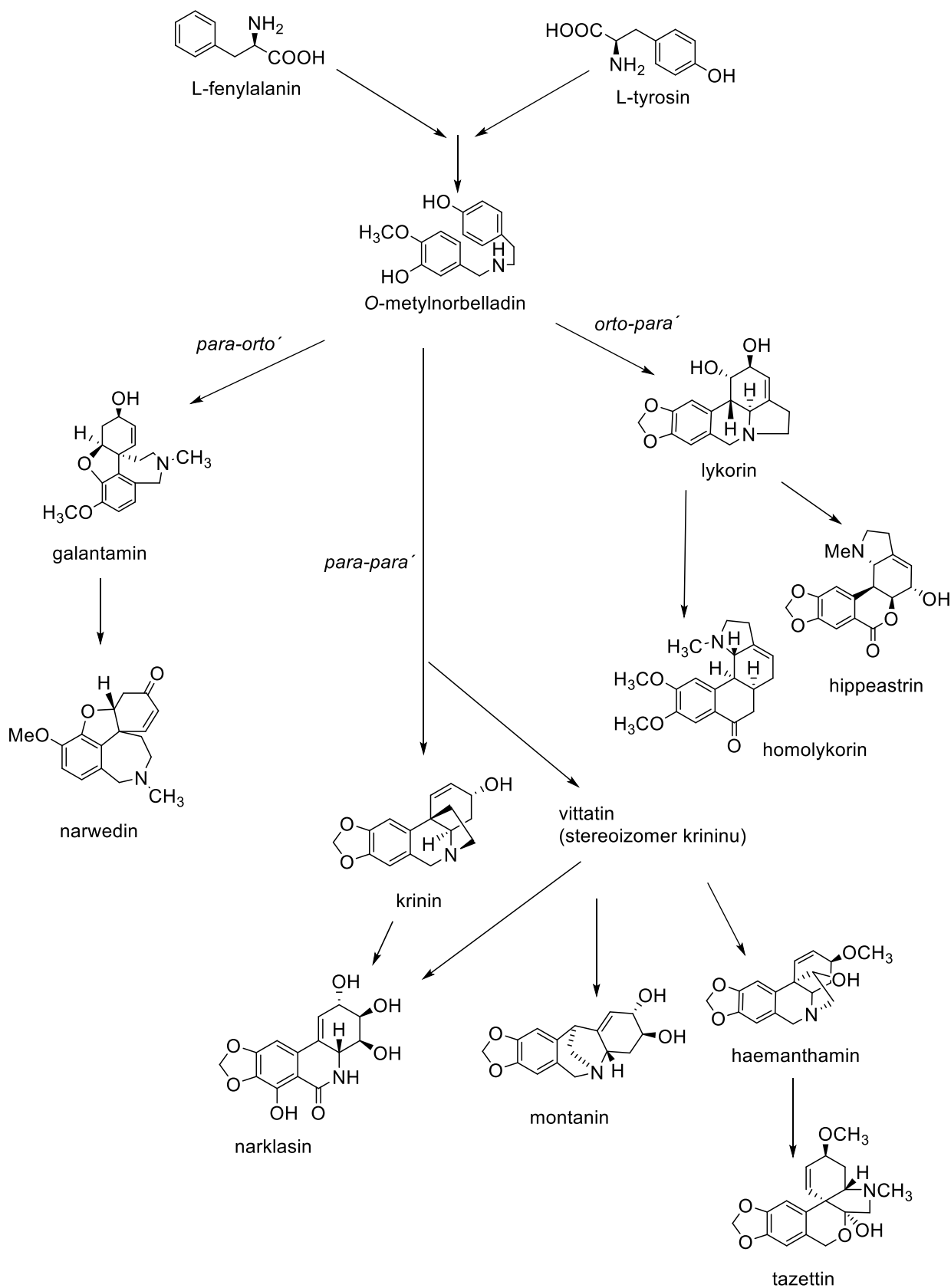
Všechny rostliny této čeledi obsahují alkaloidy, které se vyskytují v celé rostlině, ale nejvíce se nachází v podzemním orgánu, v cibuli. Bude to pravděpodobně z důvodu, že podzemní orgán je také zásoba energie v podobě sacharidů a alkaloidy tento orgán chrání právě před býložravci nebo před mikroorganismy. AA jsou sloučeniny s velmi jedinečnou strukturou. Jedná se o velkou skupinu alkaloidů a dosud jich bylo izolováno více než 600.¹⁸ Podle obsahu AA mohou mít rostliny různé účinky. V literatuře jsou popsány účinky protinádorové, analgetické, hypotenzní, inhibující enzym acetylcholinesterázu, antibakteriální, antifungální, antimalarický, antivirový a další. V tradiční medicíně se využívají navíc některé rostliny této čeledi pro svůj protizánětlivý účinek na ošetření ran, hemoroidů, a dokonce i na léčbu kašle a nachlazení.¹³

3.1.2. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů a jejich strukturní typy

Jak již bylo uvedeno výše, AA je velké množství, izolováno jich bylo více než 600 a jsou strukturně velmi rozdílné. Chemicky se jedná o isochinolinové alkaloidy.

Biosyntéza těchto alkaloidů vychází z tzv. norbelladinové cesty.¹¹ Je to komplexní síť enzymatických kroků, které ještě nejsou všechny dostatečně vysvětleny. Tyto enzymatické kroky se liší v závislosti na druhu rostliny, kultivaru a dokonce i mezi tkáněmi téže rostliny. Je to dáno pravděpodobně rozdílností v substrátové specifitě enzymů a rozdílnou genovou expresí. Informace o všech enzymech nám chybí. Znalosti na genetické úrovni nemáme a velmi by nám mohly pomoci při šlechtění kultivarů a v metodách genetického inženýrství ke zvýšení dostupnosti alkaloidů a jejich využití v medicíně.¹² Ačkoliv došlo k velkému pokroku ve studiu těchto alkaloidů, tak rostliny z této čeledi zůstávají v oblasti medicíny stále relativně nevyužité.

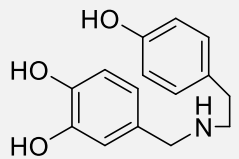
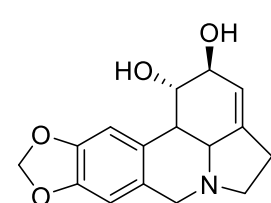
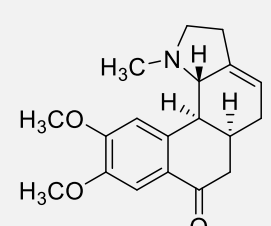
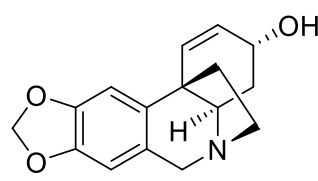
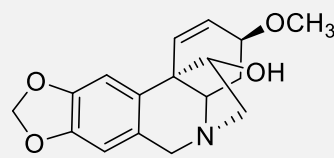
Na počátku biosyntézy AA jsou dvě aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrozin, ze kterých několika kroky vzniká hlavní prekurzor AA *O*-methylnorbelladin. Klíčovým krokem je poté oxidativní cyklizace *O*-methylnorbelladinu třemi různými způsoby. Jedná se o spojení *orto-para'*, *para-para'* a *para-orto'*. Vznikají produkty, které jsou prekurzory k dalším typům alkaloidů, prostřednictvím reakcí jako je hydroxylace, oxidace, redukce, methylace, demethylace a další.^{7,11,12,13} Na obrázku (Obr. 2) je znázorněné zjednodušené schéma biosyntézy hlavních strukturních typů alkaloidů.

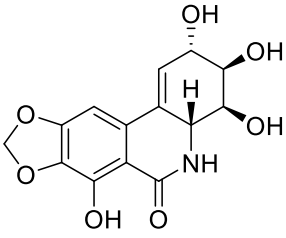
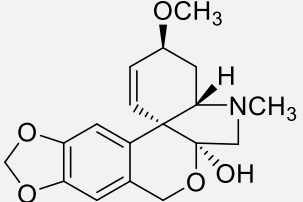
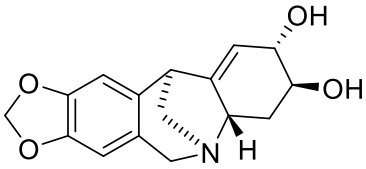
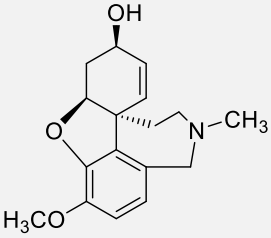


Obř. 2 Šchéma biosyntězy Amaryllidaceae alkaloidů⁷

Na základě jejich biosyntézy je můžeme klasifikovat do celé řady strukturních typů. Bastida a kol.^{7,12} rozdělili amarylkovité alkaloidy do devíti základních typů, toto rozdělení se dnes používá nejčastěji. Dělí se podle základního skeletu a jsou pojmenovány podle hlavního alkaloidu, který danou skupinu reprezentuje. V následující tabulce (Tabulka 1) jsou shrnuty základní strukturní typy AA společně s hlavním alkaloidem daného strukturního typu.

Tabulka 1: Rozdělení alkaloidů podle struktury a jejich hlavní alkaloid podle Bastida⁷

strukturní typ	hlavní alkaloid
norbelladinový typ	norbelladin 
lykorinový typ	lykorin 
homolykorinový typ	homolykorin 
krinanový typ	krinin 
haemanthaminový typ	haemanthamin 

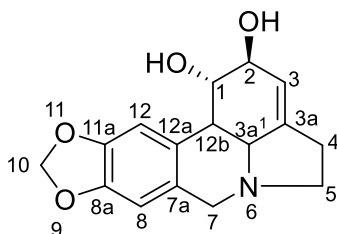
narciklasinový typ	narciklasin	
tazettinový typ	tazettin	
montaninový typ	montanin	
galantaminový typ	galantamin	

3.2. Výskyt, izolace a biologická aktivita lykorinu

Lykorin je nejdostupnější AA a z pohledu biologické aktivity nejvíce studovaný zástupce AA. Je také vůbec prvním izolovaným alkaloidem z této čeledi. Poprvé byl izolován v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus*.⁷ Jedná se o pyrrollofenantridinový cyklický alkaloid, jehož struktura byla popsána o 80 let později.

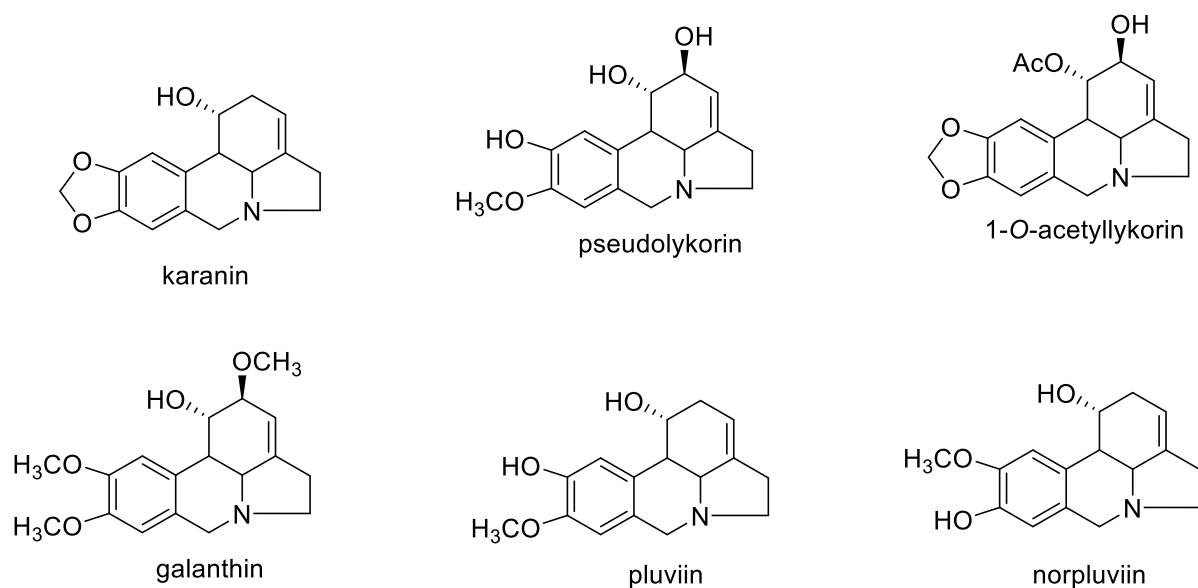
3.2.1. Vlastnosti lykorinu a izolace

Sumární vzorec lykorinu je $C_{16}H_{17}O_4N$, systematický název je (1*S*,2*S*)-2,3a¹,4,5,7,12b-hexahydro-1*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*j*]pyrrolo[3,2,1-*d,e*]fenantridin-1,2-diol. Relativní molekulová hmotnost lykorinu je 287,31.¹⁹ Jedná se o terciární amin, který obsahuje dvě alifatické hydroxylové skupiny (výhodné pro přípravu derivátů), 1,3-dioxolanový kruh, jeden aromatický kruh a jednu dvojnou vazbu. Jako čistá látka tvoří bezbarvé krystaly. Jako hydrochlorid taje při teplotě 260-262 °C.¹⁹



Obr. 3 Struktura lykorinu

V rostlinách vzniká biosyntetickou cestou tzv. *orto-para'* oxidativní cyklizací meziprojektu a je to hlavní alkaloid lykorinového strukturního typu alkaloidů. Další alkaloidy patřící do tohoto strukturního typu jsou karanin, pseudolykorin, 1-*O*-acetyllykorin, galanthin, pluviin, norpluviin a další alkaloidy (Obr 4).^{7,11} Rody, ze kterých byl lykorin doposud izolován jsou *Ammocharis*, *Brunsvigia*, *Crinum*, *Cyrtanthus*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Chlidanthus*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Zephyranthes* a další.²⁰



Obr. 4 Struktury vybraných alkaloidů lykorinového typu.

Základní strategie extrakce alkaloidů z rostlin probíhá tak, že jsou v kyselém prostředí (např. H₂SO₄) převedeny alkaloidní baze na sůl, která je rozpustná ve vodné fázi. Organická fáze se odstraní a s ní další organické nečistoty. Poté se k vodné fázi přidá bazická látka (např. Na₂CO₃), pomocí které se zvýší pH prostředí alespoň na 9-10, aby z alkaloidu opět vznikla volná base a alkaloidy následně mohou přejít do organické fáze. Vodná fáze se odstraní a s ní i nečistoty rozpustné ve vodě. Tím získáme organickou fázi obsahující pouze alkaloidy. Z tohoto sumárního alkaloidního extraktu se za využití běžných chromatografických metod izolují jednotlivé alkaloidy. Celý proces izolace je samozřejmě složitější. Uvedený zjednodušený popis je pouze základní strategií pro izolaci alkaloidů.

3.2.2. Biologická aktivita lykorinu

Nejdůležitější vlastností lykorinu je jeho protinádorová aktivita, která již byla několikrát prokázána jak *in-vitro*, tak *in-vivo* na různých typech nádorových buněk.²¹⁻²⁴

Zajímavé je, že při testování lykorinu na protinádorové vlastnosti bylo prokázáno, že je selektivní k nádorovým buňkám, dokáže zpomalit jejich buněčný růst ovlivněním buněčného cyklu a vyvolat apoptózu, zatímco zdravé buňky jsou ovlivněny lykorinem jen velmi málo.^{22,24-27} To bylo prokázáno v rámci studie z roku 2015, v rámci které byl lykorin testován

na p53 mutované buněčné linie Caco-2 a HT-29 kolorektálního karcinomu, vůči kterým vykazoval cytotoxické účinky a zároveň vykazoval nižší vliv na zdravé lidské buňky epitelu tenkého střeva FHs 74 Int.²⁵ Selektivita na nádorové buňky se potvrdila také ve studii ze stejného roku jako předchozí studie, kdy byl lykorin testován *in-vivo* na hormon-dependentní karcinom prostaty.²⁴

Další pozitivní vlastností lykorinu je, že vykazuje protinádorovou aktivitu vůči buňkám, které nereagují na proapoptotické stimuly. To bylo zjištěno ve studii z roku 2009,²² v rámci které se testoval efekt lykorinu na buněčné linie lidského glioblastomu U373, nemalobuněčného plicního karcinomu A549, rakoviny jícnu OE21 a melanomu SkMEL-28. Tyto buněčné linie patří mezi linie, které nereagují na proapoptotické stimuly a byly porovnávány se dvěma liniemi anaplastického melanomu Hs683 a myšího melanomu B16F10, které reagují na proapoptotické stimuly. U obou typů buněk se prokázala protinádorová aktivita.²²

Molekulární mechanismy působení lykorinu nejsou stále zcela objasněny. Lykorin dokáže navodit apoptózu tzv. vnitřní cestou, která začíná uvolněním cytochromu C z mitochondrií a také vnější cestou přes tzv. receptory smrti.^{21,24,26,27} V terapeutických koncentracích má lykorin na nádorové buňky pouze cytostatický efekt vyvolaný ovlivněním organizace aktinových vláken, které tvoří jednu ze složek cytoskeletu.^{21,28}

Doposud víme, že lykorin umí způsobit down-regulaci Mcl-1 v lidských leukemických buňkách.²⁷ Mcl-1 je protein, který patří do rodiny proteinů Bcl-2. Tyto proteiny inhibují apoptózu a zvyšují přežití buněk. Lykorin jeho „down-regulací“ dokáže přežití buněk zastavit a následně vyvolat apoptózu. Pro buněčné linie HL-60 (buňky akutní promyelocytární leukémie) bylo zjištěno, že lykorin dokáže zastavit jejich buněčný cyklus v G2/M fázi a zároveň dokáže zvýšit aktivitu kaspáz 8, 9 a 3 a snížit expresi Bcl-2 a zvýšit expresi Bax.²⁶ U buněčných linií K562 a KM3 bylo zjištěno, že lykorin dokáže zablokovat jejich buněčný cyklus v G0/G1 fázi „down-regulací“ cyklinu D1, CDK4, inhibicí HDAC (histondeacetylázy) a up-regulací proteinů p53 a p21.^{29,30} Lykorin dále působí jako inhibitor růstu a metastáz hormon-dependentního karcinomu prostaty *in-vivo* aktivací EGF-indukované JAK/STAT signální dráhy. Lykorin inhibuje fosforylaci STAT3, ke které dochází stimulací EGF a tímto se snižuje proliferace a přežívání nádorových buněk.²⁴

Studie na aktivaci vnější cesty apoptózy byla provedená na buněčné linii lidských nádorových buněk prsu MCF-7. Se zvyšující se dávkou lykorinu se zvyšovala aktivita proteinů Fas, FasL, kaspázy 8 a Bid. To znamená, že lykorin je schopen indukovat apoptózu přes cestu receptoru

smrti.³¹ V dalších literárních zdrojích byla popsána „up-regulace“ TNF- α a inhibice tvorby cév u nádorových buněk.¹⁹ U lidského metastazujícího melanomu C8161, umí potlačit jak *in-vitro* tak *in-vivo* jeho růst redukcí VE-cadherinu. Tím se snižuje buněčný povrch pro interakci mezi buňkami, která je nezbytná pro růst nádoru.^{19,21}

Tabulka 2: Hodnoty IC₅₀ lykorinu na několika nádorových liniích^{22,25,26,30}

Buněčná linie	IC ₅₀ (μ M)
Caco-2	0,99 \pm 0,08
HT-29	1,02 \pm 0,01
U373	7,6 \pm 0,2
A549	4,3 \pm 0,3
OE21	5,1 \pm 0,4
SKMEL-28	8,5 \pm 0,3
Hs683	6,7 \pm 0,3
B16F10	6,3 \pm 0,4
KM3	1,25
HL-60	1

Caco-2 – nádorová linie buněk tlustého střeva, HT-29 – nádorová linie buněk tlustého střeva, U373 – lidský glioblastom, A549 – nemalobuněčný plicní karcinom, OE21 – rakovina jícnu, SKMEL-28 – melanom, Hs683 – anaplastický melanom, B16F10 – myší melanom, KM3 – lidský mnohočetný myelom, HL-60 – buňky lidské promyelocytární leukémie

V literatuře je uvedeno, že pro protinádorovou aktivitu lykorinu je nezbytná konformační volnost kruhu C, stereochemie spojení kruhů C/D a volné diolové skupiny na kruhu C.²¹ Z AA není lykorin jediný, který disponuje protinádorovými účinky, ty byly popsány i u pseudolykorinu, dihydrolykorinu, narciklasinu, haemanthaminu a pankratistatinu.³² Naproti tomu, lykorin-1-O- β -D-glukosid podporuje růst buněk, klíčení semen a rychlost vývoje kořenů ve vyšších rostlinách.³³

Kromě protinádorové aktivity byly prokázány další účinky lykorinu. Je schopný inhibice biosyntézy kyseliny askorbové v rostlinách, je to silných inhibitor aktivity L-galaktono- γ -laktondehydrogenázy.³⁴ Brání dýchání rezistentní ke kyanidu, což je rostlinné specifikum.^{7,22} Lykorin také umí zastavit syntézu proteinů v eukaryotních buňkách tím, že inhibuje vznik peptidové vazby,³⁵ může se jednat o interakci s tRNA.⁷ Byla také provedena studie, za využití

počítačového modelu, kde se zjistila možnost, že cílovou molekulou lykorinu v buňce je elongační faktor 1A (eEF1A), a tím dojde k zabránění prodlužování peptidového řetězce.³⁶

Co se týče inhibice AchE, tak tato aktivita je spojena s galantaminovým a lykorinovým strukturním typem alkaloidů, avšak kromě lykorinu samotného. Lykorinový typ je méně aktivní než galantaminový. Aktivita lykorinu je v případě této biologické aktivity spojena se substitucí v polohách C1 a C2.³⁷

Dalšími biologickými vlastnostmi je aktivita proti růstu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*,¹⁹ a obecně má antifungální vlastnosti.³⁸ Lykorin také indukuje smrt u prvoka *Trichomonas vaginalis*, který způsobuje STD trichomoniázu.^{39,40} Vykazuje také protimalarickou aktivitu.⁴¹

Dalšími popsánymi vlastnostmi lykorinu jsou vlastnosti protizánětlivé, protiedémové, hepatoprotektivní (což pravděpodobně souvisí s jeho antioxidační aktivitou), analgetické,⁴² protivirové,¹⁹ fytotoxické a antifidantní⁴³.

V terapii se dosud tyto jeho vlastnosti nevyužívají. Avšak má také prokázané broncholytické účinky, a je proto terapeuticky využíván jako expektorans k léčbě zánětlivých onemocnění plic v Rusku.^{27,42}

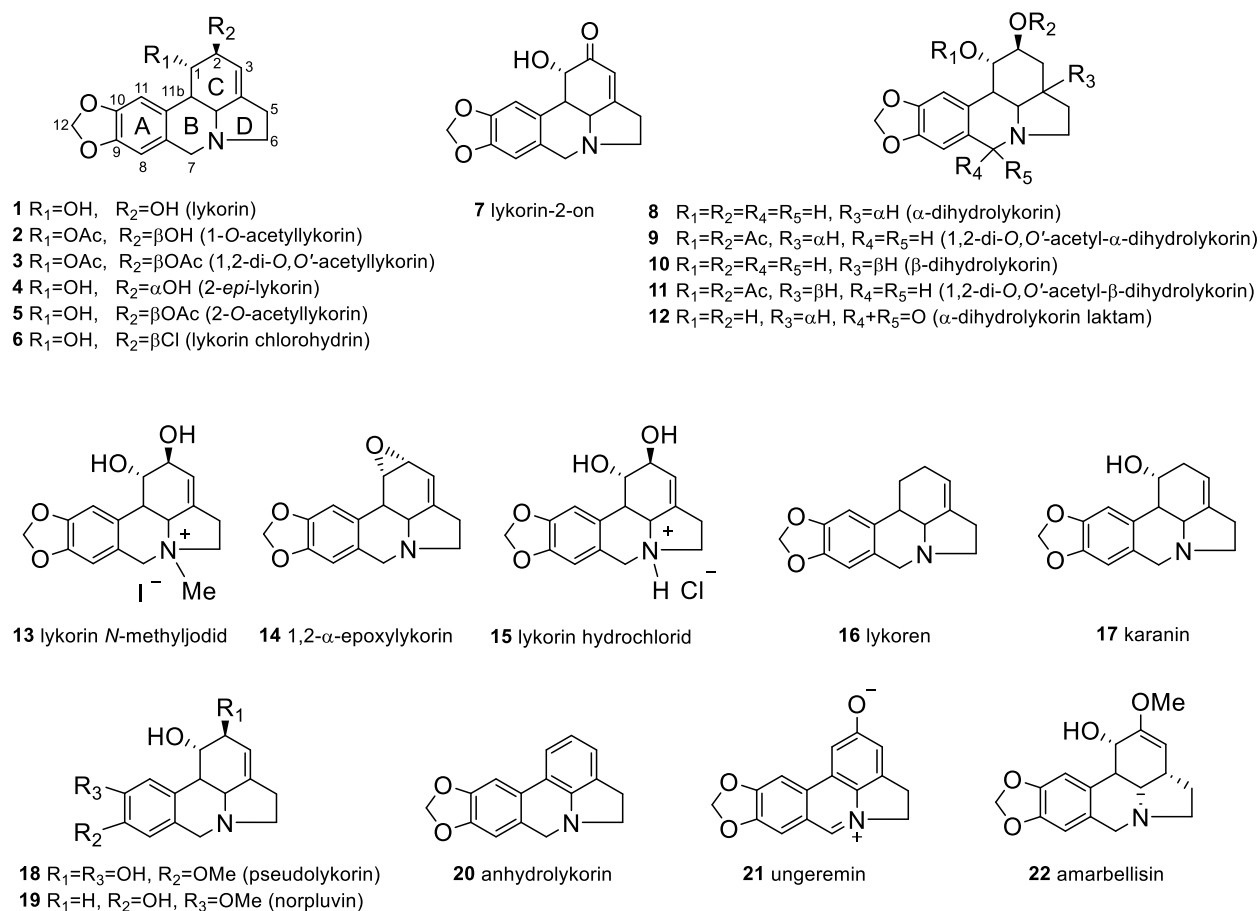
3.3 Příprava a biologická aktivita derivátů lykorinu

Vzhledem k široké biologické aktivitě lykorinu a jeho snadné dostupnosti z rostlinného materiálu, byl tento alkaloid využit pro přípravu celé řady derivátů za účelem přípravy ještě aktivnějších látek, než je sám lykorin. Tyto snahy by měly vést k usnadnění rozvoje účinného a selektivního protinádorového léčiva odvozeného od lykorinu na klinický trh. Cytotoxický potenciál lykorinu a jeho derivátů si získává velkou pozornost a jejich studium se neustále zvyšuje. Dosud ale žádný z této skupiny látek není klinicky využíván jako protinádorové léčivo. Dosud bylo prozkoumáno přes sto různých derivátů lykorinu, včetně alkaloidů odvozených od lykorinu, a byly testovány na více než sto buněčných linií.⁴⁴ Nejedná se však pouze o protinádorové vlastnosti, které jsou v popředí zájmu. Velký zájem vzbuzuje i inhibiční aktivita derivátů lykorinu vůči AchE a BuchE, antiplasmodiální, antivirová a antitrichomonální aktivita.

Kromě derivátů, připravených chemickou reakcí, je důležité hodnocení biologických aktivit i u přirozeně se vyskytujících alkaloidů, které jsou od lykorinu strukturně odvozeny např. pseudolykorin, amarbellisin a další. Výsledky jejich aktivity spolu s výsledky derivátů lykorinu mohou přispět k ujasnění vztahů mezi strukturou a aktivitou.

3.3.1. Protinádorová aktivita derivátů lykorinu

Studie z roku 2009²² se zabývala hodnocením protinádorových vlastností dvaceti dvou látek odvozených od lykorinu (**1**).²² Jednalo se o čtyři přirozeně se vyskytující alkaloidy (**18**, **19**, **21**, **22**), které mají strukturu odvozenou od lykorinu, sedmnáct derivátů připravených chemickou modifikací lykorinu (**2-17**, **20**) a pro porovnání s nimi byla hodnocena i výchozí látka lykorin (**1**). Veškeré testované sloučeniny jsou uvedeny na následující obrázku (Obr. 5). Sloučeniny k testování byly získány izolací (**1**, **21**, **22**), chemickou obměnou lykorinu (**2-12**, **14-17**, **20**) a dodáním z Instituto di Chimica z Milána (**13**, **18**, **19**).



Obř. 5 Struktury sloučenin testovaných na protinádorovou aktivitu²²

Acetylace lykorinu (**1**) byla provedená za obvyklých podmínek reakcí s anhydridem kyseliny octové v pyridinu, která vedla k získání 1,2-di-*O*,*O'*-acetyllykorinu (**3**).⁴⁵ Ten byl převeden na 1-*O*-acetyllykorin (**2**) slabou kyselou hydrolýzou.⁴⁵ Lykorin-2-on (**7**) byl získán oxidací lykorinu s DCC v suchém DMSO okyselený H_3PO_4 . Katalytickou hydrogenací lykorinu s 5% Pt/C byl získán α -dihydrolykorin (**8**).⁴⁵ Tento derivát bez dvojné vazby byl poté převeden na 1,2-*O*,*O'*-diacetyl- α -dihydrolykorin (**9**) stejnou acetylací uvedenou výše.⁴⁵ Lykoren (**16**) byl získán redukcí lykorinu (**1**) reakcí se sodíkem v pentanolu, tato reakce vedla v menším množství i ke karaninu.⁴⁵ Popis přípravy dalších derivátů z této studie je popsán v literatuře.⁴⁵⁻⁴⁸

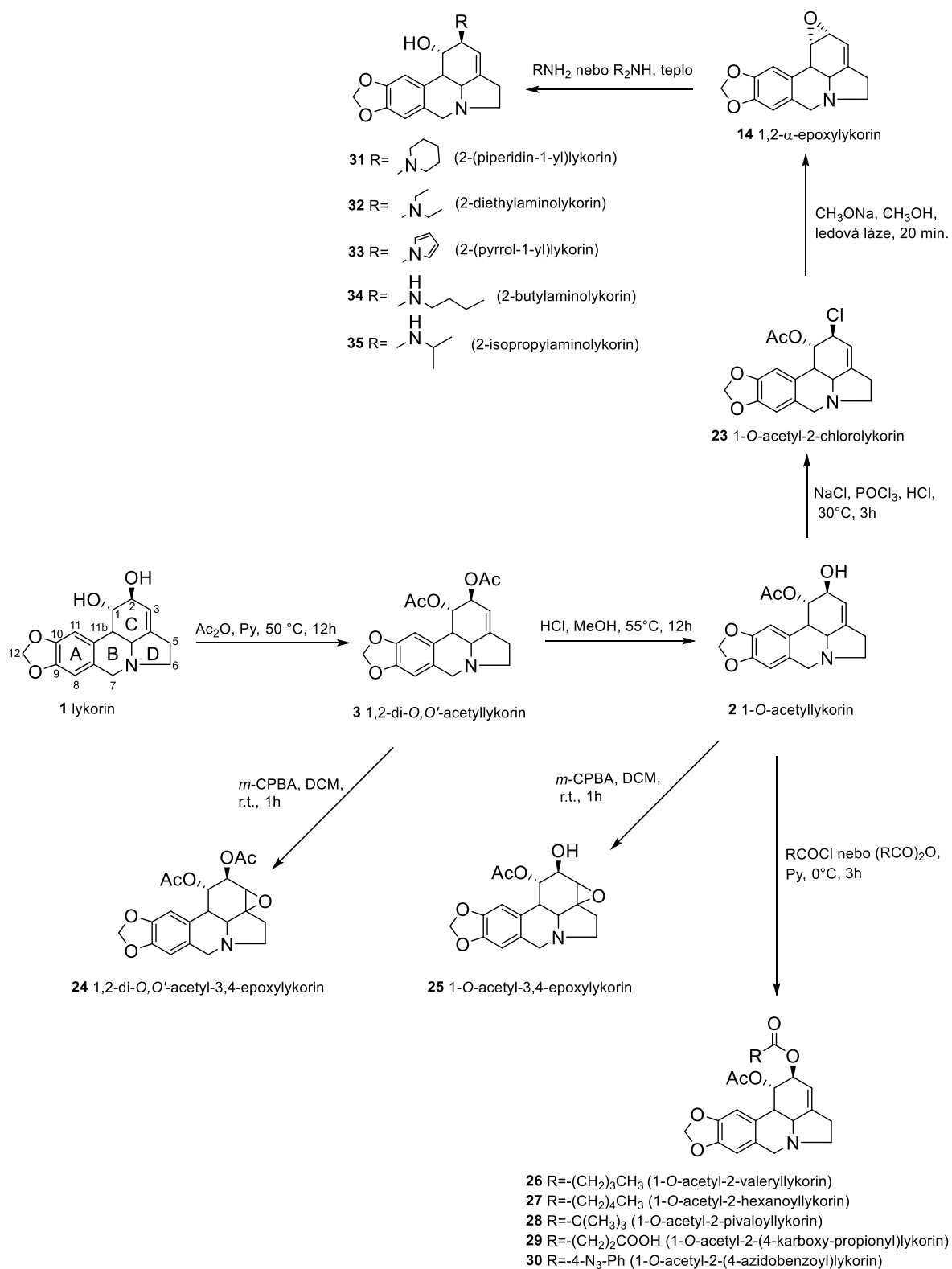
Studium cytotoxické aktivity derivátů bylo provedeno na čtyřech buněčných liniích, které jsou rezistentní na apoptotické stimuly U373, A549, OE21, SKMEL-28 a na dvou buněčných liniích, které jsou citlivé na apoptotické stimuly Hs683, B16F10. Nejvíce aktivní sloučeniny (**1**,

5, 6, 14, 15, 18, 20, 22) byly testovány ještě na třech zdravých buněčných liniích WI38, WS1, NHDF.²²

Výsledky byly uvedeny jako hodnoty IC₅₀, které se u lykorinu (**1**) při testování na nádorové buňky pohybovaly mezi 4,3 – 8,5 μM. Lykorin chlorohydrin (**6**), 1,2-α-epoxylykorin (**14**), lykorin hydrochlorid (**15**), pseudolykorin (**18**), amarbellisin (**22**) byly silně aktivní s hodnotami IC₅₀ v rozmezí 2 - 10 μM.²² Ostatní vykazovaly nízkou aktivitu s IC₅₀ nad 10 μM. Výsledné hodnoty všech derivátů jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 3) na konci kapitoly.

V další studii autorů Wang a kol.⁴⁹ bylo připraveno šestnáct analogů lykorinu (**1-3, 14, 23-35**), jejichž schéma přípravy a jejich struktury jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 6). Nejprve byl připraven 1,2-di-*O,O'*-acetyllykorin (**3**) acetylací s acetanhydridem v pyridinu, který byl použit jako výchozí látka pro další modifikace. Klíčovým krokem tohoto sledu reakcí byla kyselá hydrolýza acetylové skupiny v pozici C2 z 1,2-di-*O,O'*-acetyllykorinu (**3**) v prostředí methanolu, kterou došlo ke vzniku 1-*O*-acetyllykorinu (**2**), protože substituenty v pozici C1 jsou méně reaktivní, z důvodu nižší sterické dostupnosti této skupiny. Hydroxylová skupina 1-*O*-acetyllykorinu (**2**) byla podrobena reakcím s několika acylchloridy případně anhydridy za vzniku sloučenin **26-30**. Další sloučenina 1-*O*-acetyl-2-chlorolykorin (**23**) byla připravena s použitím chloridu fosforylu jako halogenační látky, a ta byla podrobena reakci s methoxidem sodným za vzniku 1,2-α-epoxylykorinu (**14**). Látky **31-35** byly získány otevřením epoxidové skupiny za použití skupiny aminů, které působí jako nukleofilní činidla, a umožní tak otevření epoxidové skupiny za vzniku aminu a hydroxylové skupiny. Sloučeniny **24** a **25** byly získány oxidací dvojně vazby pomocí silného oxidačního činidla *meta*-chloroperoxybenzoové kyseliny.⁴⁹

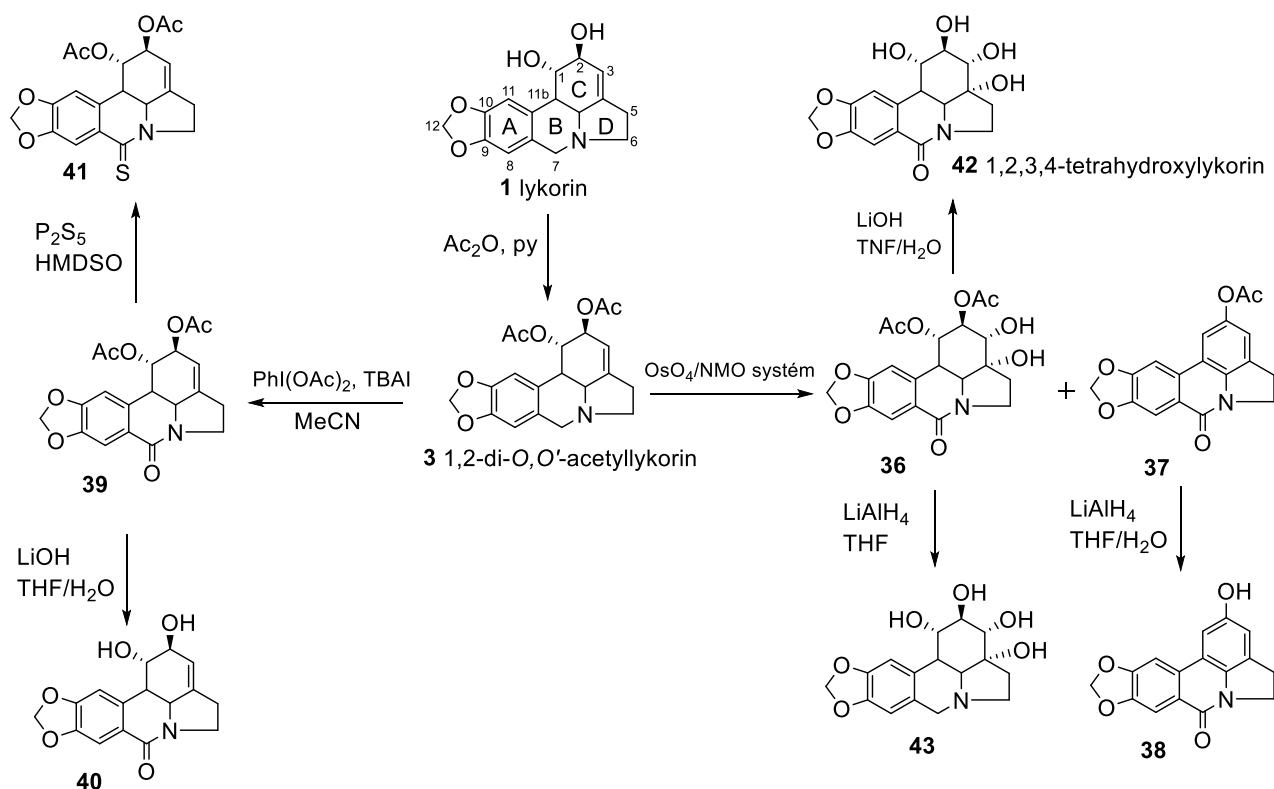
Protinádorová aktivita těchto látek byla testována na sedmi nádorových liniích A549, HCT116, SK-OV-3, NCI-H460, K562, MCF-7 a HL-60.⁴⁹ Výsledky jsou ve studii uvedeny jako hodnoty IC₅₀ (Tabulka 3). Některé z testovaných derivátů vykazovaly dobrou aktivitu, opět to ale byla výchozí látka lykorin (**1**), která měla nejlepší výsledky od 3 μM (u HCT 116 a SK-OV-3) do 7,5 μM (u K562). Velice zajímavou aktivitu také vykázal 1,2-α-epoxylykorin (**14**), jehož hodnoty IC₅₀ se pohybovaly od 2,7 μM (u NCI-H460 a HL-60) do 6,2 μM (u A549).⁴⁹



Obr. 6 Schéma přípravy derivátů lykorinu v rámci studie z roku 2014 ⁴⁹

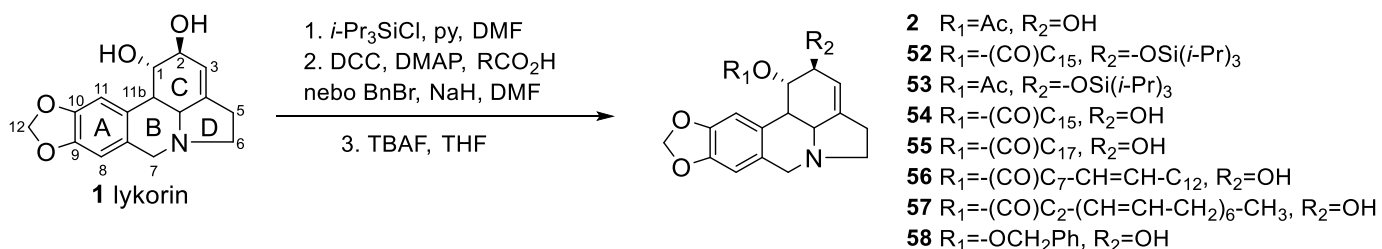
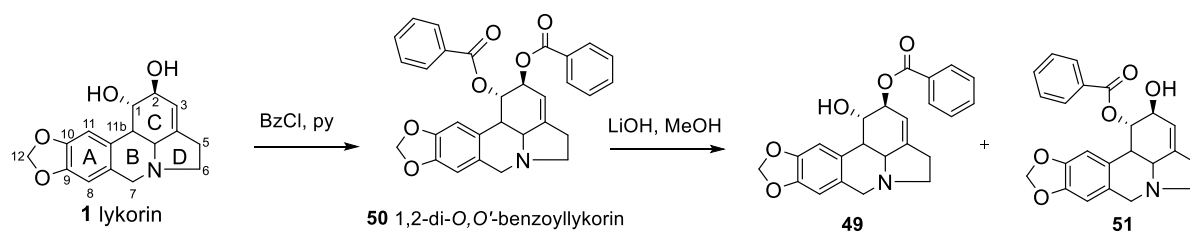
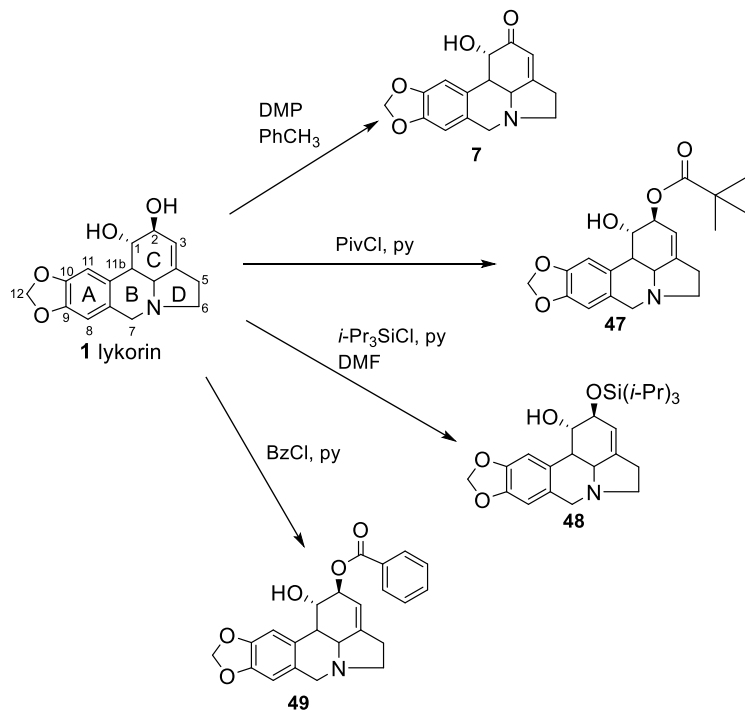
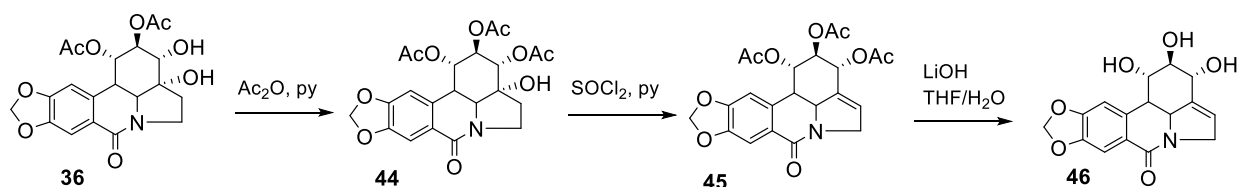
V další práci, která se zabývala protinádorovou aktivitou derivátů lykorinu,²⁸ bylo syntetizováno třicet dva nových sloučenin (**2**, **3**, **7**, **37-65**). Pro porovnání byla testována i výchozí látka lykorin (**1**). Schémata jejich syntézy a jejich struktury jsou popsány na následujících obrázcích (Obr. 7, 8 a 9).²⁸

Na obrázku (Obr. 7) byl lykorin (**1**) převeden za obvyklých podmínek na diacetyl derivát (**3**). Ten byl následně převeden za využití OsO₄/NMO systému na diol (**36**). V této reakci NMO slouží na regeneraci OsO₄, který je po proběhnutí reakce redukován na OsO₃. Aromatizovaný derivát **37** byl získán jako vedlejší produkt této reakce a byl převeden na fenolický derivát. Sloučenina **3** byla podrobena reakci s (diacetoxyiodo)benzenem za vzniku cyklického amidu - laktamu **39**, který byl následně hydrolyzován na laktam-diol derivát **40** a také byl převeden na diacetylthiolaktamový derivát **41**. Derivát **36** byl hydrolyzou převeden sloučeninu **42**, a jeho redukcí s tetrahydridohlinitanem litným vznikla sloučenina **43**.²⁸



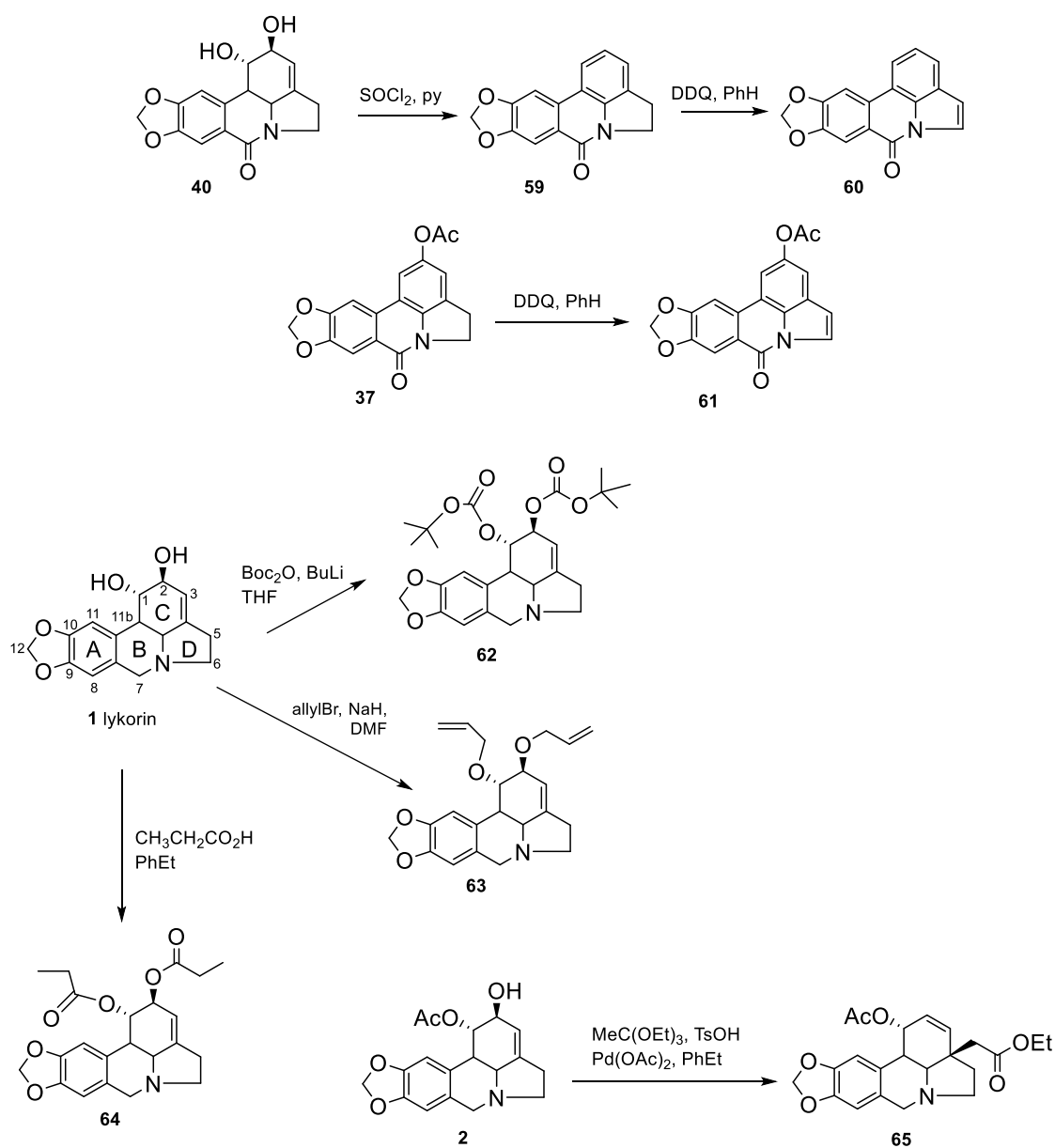
Obr. 7 Schéma přípravy derivátů lykorinu (**3**, **36-43**)²⁸

Na obrázku (Obr. 8) je popsán sled reakcí začínající sloučeninou **36** za vzniku látek **44-46**. Nejprve byla provedena acetylace, poté eliminační reakce a nakonec hydrolyza. Výchozí látka lykorin (**1**) byla použita pro přípravu derivátu **7** s využitím Dess-Martina činidla. Dále byl lykorin (**1**) využit pro přípravu derivátu 2-pivaloyllykorinu (**47**) z chloridu kyseliny pivalové, pro přípravu C2-*tri*-isopropylsilylether derivátu (**48**) z *tri*-isopropylsilylchloridu a pro přípravu derivátu 2-*O*-benzoyllykorinu (**49**) z benzoylchloridu 1:1 v pyridinu. Benzoyl deriváty byly připraveny také s větším množstvím benzoylchloridu 1:3 za vzniku 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu (**50**) a tento derivát byl rozdělen řízenou hydrolyzou s hydroxidem lithným v methanolu na mono-deriváty (**49**, **51**). Příprava C1 derivátů lykorinu (**2**, **54-58**) byla provedena nejprve reakcí s *tri*-isopropylsilylchloridem, aby byla ochráněna C2 pozice. Tyto silyletery byly podrobeny acylaci a alkylaci. Tyto byly poté desilylovány za vzniku palmitátu (**54**), acetátu (**2**), stearátu (**55**), oleátu (**56**), dokosaheptaenoátu (**57**) a benzylether derivátu (**58**). Meziprodukty **20** a **21** s neodstraněnou silylovou skupinou byly také podrobeny hodnocení na protinádorové vlastnosti.²⁸



Obř. 8 Schéma připravı hodnocených derivátů lykorinu²⁸

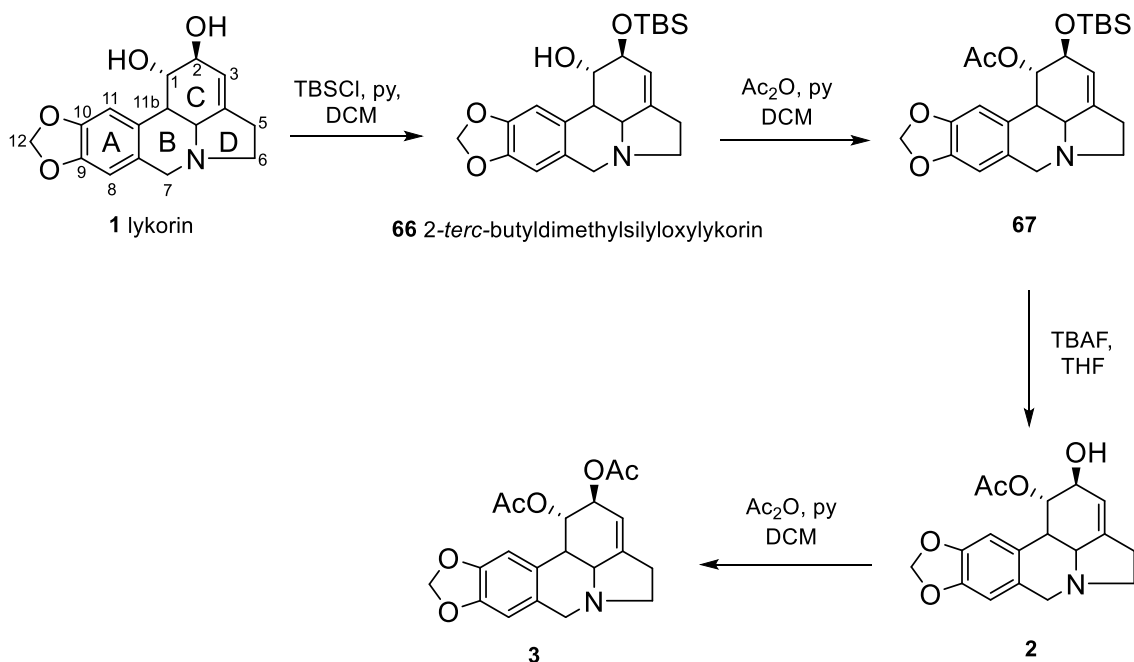
Na obrázku (Obr. 9) je zobrazena příprava derivátů s aromatickým kruhem C, podrobením sloučeniny **40** reakci s thionylem chloridu v pyridinu za vzniku indolin-laktamového derivátu (**59**) a tento byl oxidován 2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinonem na indol-laktamový derivát (**60**). Stejná oxidace byla využita pro přípravu derivátu **61**. Pro přípravu di-*tert*-butyl karbonát derivátu (**62**) byl využit lykorin (**1**) a di-*tert*-butyl dikarbonát. Z lykorinu (**1**) byl připraven také diallylether derivát lykorinu (**63**) z allylbromidu a z lykorinu byl připraven i dipropionylderivát lykorinu (**64**). Sloučenina **65** byla získána reakcí se sloučeninou **2**, triethyl-*ortho*-acetátem a kyselinou *p*-toluensulfonovou.²⁸



Obr. 9 Schéma přípravy hodnocených derivátů lykorinu²⁸

Všechny výše zmíněné deriváty z této studie byly hodnoceny na protinádorovou aktivitu pomocí osmi rakovinných buněčných linií, zahrnující linie, které jsou rezistentní na proapoptotické stimuly (U373, T98G, A549, SKMEL-28) a ty, které jsou citlivé k proapoptotickým stimulům (Hs683, PC3, B16, MCF-7). Výsledky jsou uvedeny jako GI_{50} (který je zaměnitelný s IC_{50}). Výchozí látka lykorin byla aktivní u všech buněčných linií s hodnotami GI_{50} od 0,9 μM do 4 μM . Velmi aktivní látka byla bis-allyl derivát (**63**) s hodnotami GI_{50} od 0,03 μM pro U373 do 6 μM . Veškeré hodnoty pro každý derivát jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 3).

První, kdo použil výše uvedenou reakci se silylchloridem, konkrétně s *tert*-butyldimethylsilyl chloridem, pro selektivní přípravu C1 a C2 derivátů lykorinu byl McNulty a kol. v studii z roku 2009.⁵⁰ Lykorin (**1**) tu byl podroben reakci s *tert*-butyldimethylsilyl chloridem v pyridinu a dichloromethanu za vzniku monosilyletheru v pozici C2 lykorinu. Tento produkt byl acetylován za obvyklých podmínek, jak je již výše popsáno, a desilylován pomocí tetrabutylamoniumfluoridu v tetrahydrofuranu. Takto byl selektivně získán 1-*O*-acetyllykorin (**2**). Schéma selektivní přípravy vedoucí k tomuto derivátu je zobrazeno na obrázku (Obr. 10).



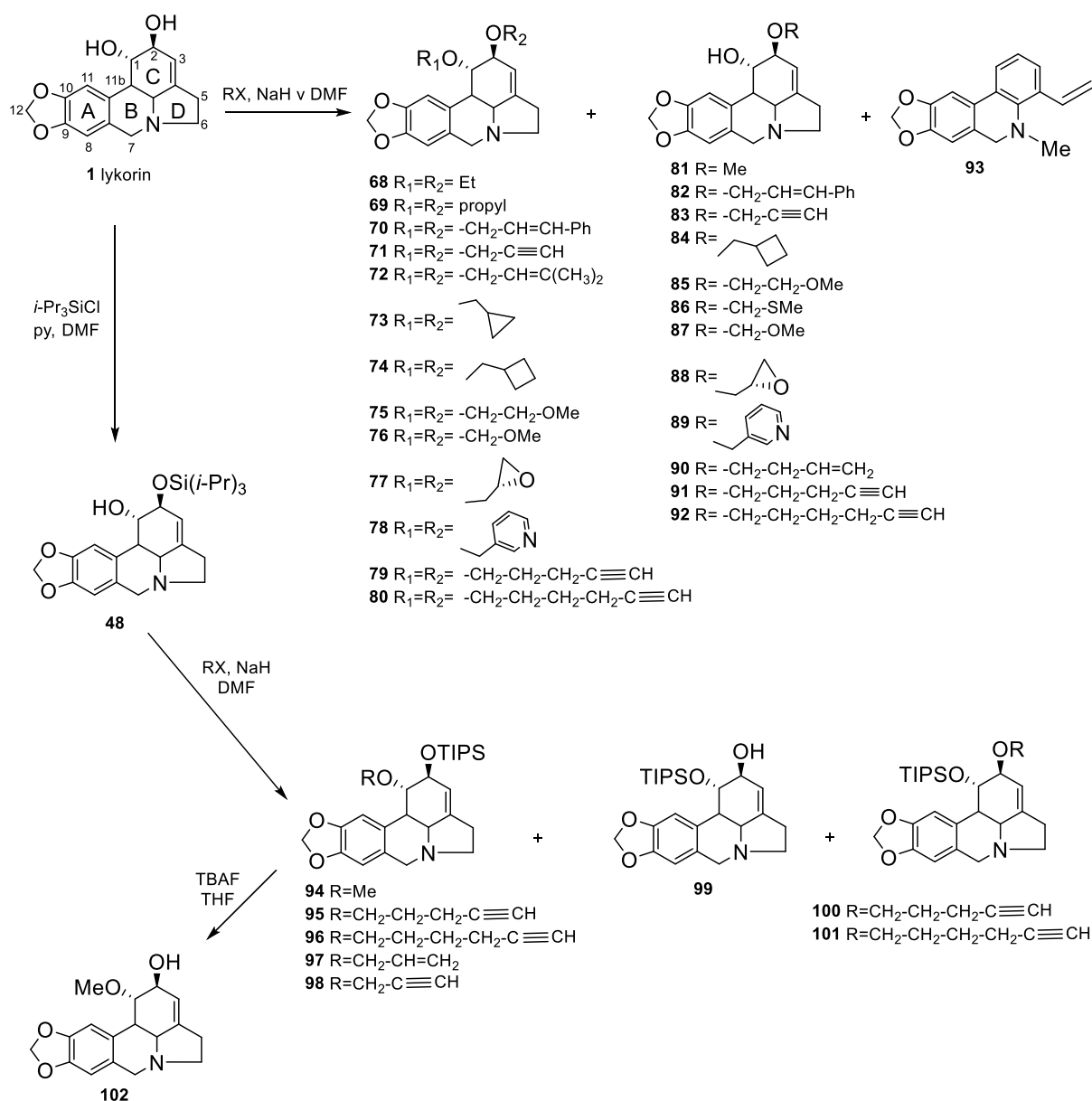
Obr. 10 Schéma selektivní přípravy 1-*O*-acetyllykorinu⁵⁰

Hodnocena byla schopnost těchto sloučenin **1-3**, **66**, **67** a **18** (pseudolykorin) vyvolat apoptózu u lidských leukemických (Jurkat) buněk v třech koncentracích (1, 5, a 10 μM). Výsledky byly vyjádřeny jako apoptotický index tzn. vyjádřený jako % buněk jevící apoptózu. Statisticky významný měly apoptotický index v koncentraci 5 μM lykorin (**1**) a pseudolykorin (**18**). V koncentraci 10 μM měly statisticky významný apoptotický index lykorin (**1**), pseudolykorin (**18**) a 1-*O*-acetylylykorin (**2**).⁵⁰ Apoptóza byla sledována mikroskopicky za pomoci Hoechstova barviva, díky kterému bylo umožněno sledovat kondenzaci buněčného jádra, ke kterému dochází u buněčné apoptózy. Nekrotické buňky byly sledovány pomocí tropanové modře, která obarví buňky s narušenou plazmatickou membránou, zatímco zdravé buňky zůstávají neobarvené.

Na předchozí studie navázala studie autorů Dasari a kol.⁵¹, ve které se rozhodli z lykorinu syntetizovat deriváty C1 a C2 ethery. V předchozí studii byla příprava zaměřená na syntézu esterů. Vzhledem k tomu, že estery podléhají v buňce hydrolýze za vzniku výchozí látky lykorinu, není možné s jistotou říct, zda estery jsou látky, které se podílí přímo na protinádorovém účinku. Etery jsou látky, které nelze v buňce hydrolyzovat, a proto bylo v této studii připraveno třicet pět C1 a C2 ether-derivátů lykorinu (**68-102**) hodnocených na protinádorové vlastnosti. Jejich příprava a struktury jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 11).

C1 a C2-alkyl ethery byly syntetizovány přímo reakcí s alkylchloridem a hydridem sodným, který působí jako redukční činidlo. Byla tak získána směs monoderivátů a diderivátů. Produkt **93** byl získán reakcí s CH_3I za otevření kruhu D. Klíčovým krokem dalších reakcí byla silylace v pozici C2 za vzniku látky **48**, která umožnila selektivně připravit ether-deriváty v žádoucí pozici. Náhodně se podařilo připravit i 1-*tri*-isopropylsilyloxylykorin, s chránicí skupinou v poloze C1. Desilylace sloučeniny **94** pomocí tetrabutylamoniumfluoridu v tetrahydrofuranu vedla k vzniku látky **102**, která je strukturním izomerem látky **81**.⁵¹

Všechny tyto látky včetně lykorinu byly testovány na šesti typech nádorových buněk majících různý stupeň rezistence k apoptóze (A549, MCF7, T98G, Hs683, SKMEL-28, B16F10). Výsledná inhibice byla vyjádřena jako hodnota GI_{50} . Nejlepší hodnoty byly dosaženy v rámci testování linie lidského nemalobuněčného plicního karcinomu A549 s hodnotami GI_{50} od 0,6 μM do 72 μM . Není překvapivé, že výchozí látka lykorin (**1**) vykazuje nejstabilnější výsledky napříč všemi šesti buněčnými liniemi (Tabulka 3).⁵¹



Obr. 11 Schéma přípravy C1 a C2 ether-derivátů lykorinu⁵¹

Hodnoty IC_{50} a GI_{50} , ve kterých jsou uváděny výsledky studií, se testují za využití tzv. MTT testu. MTT test je stanovení, založené na redukci žlutého rozpustného barviva 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan, který vytváří modré krystalky. Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpouští přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku pak odpovídá množství živých buněk.⁵²

Tabulka 3: Protinádorová aktivita derivátů lykorinu vůči různým typům nádorových linií

Číslo látky	Buněčné linie a hodnoty IC ₅₀ a GI ₅₀ (μM) ^{22,28,44,49,51}													
	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL-28	B16F10	HCT-116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	MCF-7	HL-60	T98G	PC3
1	4,3; 6,5; 0,9	5,1	6,7; 0,9	7,6; 3	8,5; 4; 3,7	6,3; 2	3,0	3,0	3,3	7,5	3,9; 4; 10,9	4,1	3; 5,2	4
2	>10; 3	>10	>10	>10; 4	>10; 3	>10	9,4	18,2	10,6	18,6	19,5; 4	>20	2	3
3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>20	16,4	>20	>20	>20	>20		
4	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
5	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
6	3,8	9,6	3,1	2,3	>10	6,9								
7	9,9; 4	>10	>10; 3	45	>100	16					35		38	92
8	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
9	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
10	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
11	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
12	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
13	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
14	3,4; 6,2	8,5	3,3	2,4	9,5	4,6	3,9	3,3	2,7	3,4	4,5	2,7		
15	4,3	4,6	6,5	8,6	8,3	5,5								
16	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
17	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
18	7,5	7,7	7,9	7,8	>10	7,5								
19	>10	>10	>10	>10	>10	>10								
20	4,5	8,8	7,1	5,1	>10	>10								
21	>10	>10	>10	8,3	>10	>10								
22	7,2	6,7	8,3	7,3	8,3	6,7								
23	>20						>20	>20	>20	>20	>20	>20		
24	>20						9,8	>20	>20	>20	>20	>20		
25	0,69						>20	>20	>20	>20	>20	>20		
26	>20						10,2	>20	17,8	>20	18,1	>20		

Pokračování tabulky 3

Číslo látky	Buněčné linie a hodnoty IC ₅₀ a GI ₅₀ (μM) ^{22,28,44,49,51}													
	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL-28	B16F10	HCT-116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	MCF-7	HL-60	T98G	PC3
27	19,2						13,6	10,1	13,1	>20	17,8	>20		
28	>20						13,5	16,7	14,3	20,9	19,1	>20		
29	>20						>20	>20	>20	>20	>20	>20		
30	18,7						13,8	17,2	19,7	18,5	>20	>20		
31	14,2						7,9	4,5	9,9	>20	>20	8,3		
32	15,2						6,4	16,8	8,0	12,8	5,2	>20		
33	>20						>20	15,5	8,1	12,0	20,9	9,1		
34	16,3						10,1	12,6	6,5	6,1	>20	9,7		
35	>20						20,5	13,4	19,8	>20	19,7	>20		
36	>100		>100	>100	>100	86					>100		>100	>100
37	23		20	21	>100	20					50		29	33
38	44		40	49	>100	38					9		41	48
39	36		49	39	99	75					>100		32	>100
40	>100		>100	>100	>100	>100					>100		>100	>100
41	57		52	46	47	30					35		57	>100
42	>100		>100	>100	>100	>100					96		>100	>100
43	>100		>100	>100	>100	83					>100		>100	>100
44	>100		>100	>100	>100	>100					>100		>100	>100
45	>100		>100	>100	>100	83					>100		>100	>100
46	>100		>100	>100	>100	16					>100		>100	>100
47	7		15	9	10	5					36		12	12
48	15		22	13	26	22					24		11	18
49	70		6	1	60	21					23		70	34
50	54		10	1	29	24					20		54	11
51	32		4	0,6	4	8					5		32	5
52	9		21	13	38	38					25		3	20
53	18		36	15	34	30					27		6	26
54	26		27	24	35	28					32		7	29

Pokračování tabulky 3

Číslo látky	Buněčné linie a hodnoty IC ₅₀ a GI ₅₀ (μM) ^{22,28,49,44,51}													
	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL-28	B16F10	HCT-116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	MCF-7	HL-60	T98G	PC3
55	23		24	8	34	23					38		16	26
56	14		14	4	30	21					30		0,8	22
57	15		20	8	25	18					21		3	19
58	67		80	50	>100	57					74		34	97
59	24		14	4	33	8					16		24	38
60	96		19	27	>100	34					27		96	>100
61	18		14	5	21	5					7		18	21
62	3		9	4	20	4					5		4	22
63	4		2	0,03	6	4					0,2		4	1
64	4		8	3	43	29					22		0,6	41
65	>100		>100	>100	>100	79					>100		>100	>100
68	4		5,9		35	18					17		8,1	
69	4,9		8,1		19	13					19		24	
70	5,5		11		8,7	4,2					4,2		22	
71	23		27		52	28					32		68	
72	4,4		9,7		10	5,3					9,5		24	
73	4,2		23		33	27					28		37	
74	5,7		14		22	8					25		18	
75	29		>100		68	38					44		33	
76	33		>100		78	31					55		53	
77	39		44		70	70					77		44	
78	72		>100		>100	85					88		87	
79	1,3		32		25	17					22		7,1	
80	2,8		29		16	10					16		6,8	
81	31		36		92	40					>100		84	
82	1,5		8,6		14	42					3,8		10	
83	48		81		>100	42					>100		>100	
84	27		50		41	22					37		50	

Pokračování tabulky 3

Číslo látky	Buněčné linie a hodnoty IC ₅₀ a GI ₅₀ (μM) ^{22,28,49,44,51}													
	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL-28	B16F10	HCT-116	SK-OV-3	NCI-H460	K562	MCF-7	HL-60	T98G	PC3
85	26		>100		91	40					74		47	
86	60		86		>100	51					70		>100	
87	35		>100		85	55					85		48	
88	54		>100		>100	51					>100		49	
89	40		>100		81	66					80		75	
90	11		67		42	21					7,7		39	
91	0,6		69		19	2,6					21		4,2	
92	11		55		49	34					32		34	
93	54		>100		59	34					82		89	
94	19		41		28	8,9					28		19	
95	19		33		28	7,6					27		21	
96	21		35		26	6,4					28		24	
97	4,5		7,6		2,4	0,8					5		6,6	
98	3,6		27		8,2	6,2					8,3		4,9	
99	15		24		24	9,5					23		20	
100	5,9		40		32	9					31		16	
101	4,2		23		25	8,7					19		13	
102	43		>100		>100	39					>100		64	

Zkratky buněčných linií: A549 (lidský nemalobuněčný plicní karcinom), B16F10 (myší melanom), HCT-116 (lidský karcinom tlustého střeva), HL-60 (lidská promyelocytární leukémie), Hs683 (lidský mozkový gliom), K562 (lidská myeloidní leukémie), MCF-7 (lidská rakovina prsu), NCI-H460 (lidský velkobuněčný karcinom plic), OE21 (karcinom jícnu), PC3 (lidská rakovina prostaty), SKMEL-28 (lidský melanom kůže), SK-OV-3 (ovariální karcinom), T98G (lidský glioblastom mozku), U373 (lidský glioblastom astrocytom).

Na výše shrnutých výsledcích (Tabulka 3) lze vidět, že lykorin má výraznou inhibiční aktivitu na viabilitu/růst všech testovaných nádorových buněk. Pro většinu případů platí, že substituce v pozicích C1 a C2 snižují aktivitu lykorinu. V případě 2-*epi*-lykorinu (**4**) je patrné, že změna prostorového uspořádání v pozicích C1 a C2 vedla k výraznému snížení aktivity.²² Na aktivitě lykorenu (**16**), která je nízká, je patrné, že hydroxyskupiny v pozici C1 a C2 jsou pro aktivitu nezbytné.²² Snížení aktivity oproti lykorinu bylo prokázáno také u lykorinu chlorohydrinu (**6**), kde je kyslíková funkce v pozici C2 zaměněna za chlor. To vede k myšlence,

že substituent obsahující kyslík je pro protinádorovou aktivitu mnohem výhodnější.²² Významnou aktivitu naproti tomu vykazoval 1,2- α -epoxylykorin (**14**). Jeho dobrá aktivita, stejně tak aktivita lykorinu chlorohydrinu může souviset s intracelulární přeměnou na lykorin (**1**) nukleofilní substitucí vodou.²² Epoxid v pozicích C3 a C4 naproti tomu není pro protinádorové vlastnosti důležitý, jak lze vidět na aktivitě derivátů **24**, **25**.⁴⁹ Esterové substituce v pozicích C1 a C2 vedou obecně k méně aktivním derivátům. U esterů se předpokládá, že mohou být v buňkách hydrolyzovány na původní lykorin, proto pravděpodobně plně neztrácí svou aktivitu.²⁸ Tento předpoklad může být potvrzen porovnáním aktivity esteru 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu (**50**) a etheru 1-*O*-benzyloxylykorinu (**58**). Aktivita hydrolyzovatelného esteru je vyšší než etheru.²⁸ Z tohoto důvodu předpokládáme, že velké hydrofobní substituenty v této pozici nejsou součástí farmakoforu lykorinu, ale hrají pouze roli při penetraci derivátu do buňky.²⁸ Prostup do buněk je nezbytný pro aktivitu těchto látek. Deriváty s nižší lipofilitou např. ester, který má karboxylový konec (**29**) nebo tetraol (**43**) ztrácí svoji aktivitu, pravděpodobně z důvodu nižší schopnosti prostupu do buněk.²⁸ Nízká aktivita 1-*O*-acetyllykorinu (**2**), 2-*O*-acetyllykorinu (**5**) a 1,2-di-*O,O'*-acetyllykorinu (**3**) je přičítána velkému sterickému bránění esterové vazby, která vede k neschopnosti buněk tuto vazbu hydrolyzovat.²² Jako velmi překvapující se ukázala aktivita 1,2-di-*O,O'*-allyllykorinu (**63**), která je srovnatelná s výchozí látkou lykorinem (**1**) a má 100 × vyšší aktivitu než lykorin na nádorové buňky U373. Protože je nepravděpodobné, že by allyletherová skupina byla odstraněna intracelulární hydrolýzou, předpokládá se, že je důležitou součástí farmakoforu lykorinu.²⁸ Návázání aminů do pozice C1 a C2 u derivátů **31-35** zvyšuje aktivitu oproti esterům **26-30**, hodnocených ve stejné studii.⁴⁹ Alifatické aminy vykazovaly vyšší aktivitu v porovnání s aromatickými aminy.⁴⁹

Dalším důležitým znakem pro aktivitu je přítomnost dvojné vazby v kruhu C. Deriváty bez dvojné vazby **8-12** jsou neaktivní.²² Aromatický kruh C vede ke snížení aktivity, jak lze vidět u derivátů **20** a **21**. Vyšší aktivita derivátů, které mají dvojnou vazbu, je pravděpodobně způsobena tím, že látky bez dvojné vazby jsou hůře metabolizovány, než ty, s dvojnou vazbou.⁵³

Substituce na kruhu A lykorinu může být zhodnocena porovnáním aktivity lykorinu (**1**) a pseudolykorinu (**18**). Lykorin (**1**) se zdá být více aktivní než pseudolykorin (**18**). Rozdíl není výrazný, ale 1,3-dioxolanový kruh pravděpodobně hraje roli v protinádorovém účinku.²²

Aktivitu ztrácí i deriváty s oxidací v pozici C7 na kruhu B, která vede k vytvoření cyklického amidu - laktamu. Příkladem je derivát 7-oxolykorin (**40**), u kterého nebyla zjištěna protinádorová aktivita (s $IC_{50} > 100 \mu M$), stejně jako u dalších derivátů (např. **37**, **38**, **59**, **60**, **61**) nebyla zjištěna aktivita laktamu.²⁸ Bazický amin je tedy pro protinádorové vlastnosti nezbytný.⁵³

Efekt přítomnosti náboje v látce je těžké určit, neutrální sloučeniny totiž mohou být transformovány metabolismem na látky s nábojem.⁵³ Nicméně, lykorin hydrochlorid (**15**) vykázal aktivitu srovnatelnou s lykorinem.

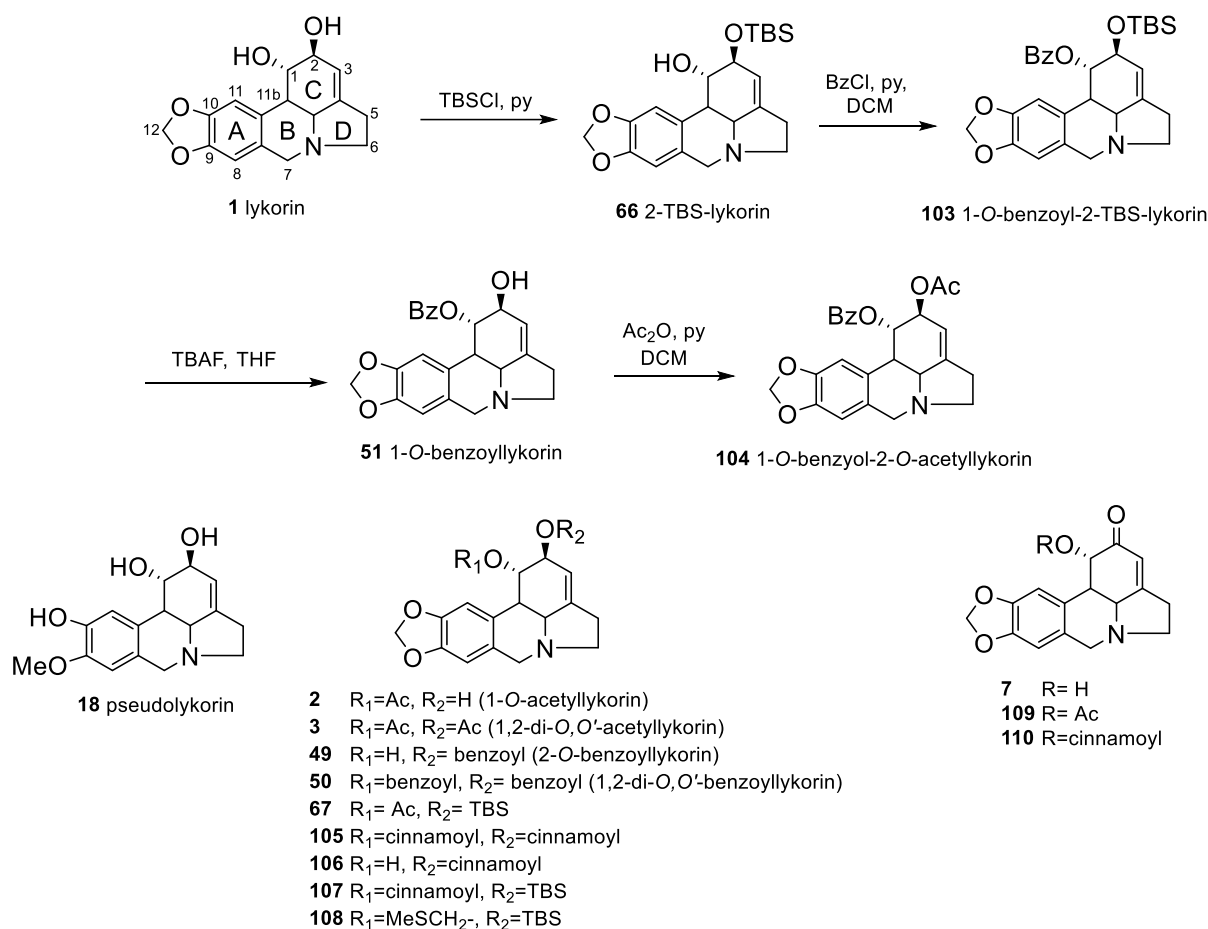
Pokud bychom shrnuli důležité strukturní znaky pro protinádorovou aktivitu, jedná se o původní konfiguraci C1 a C2 substituentů, dvojnou vazbu v kruhu C, bazický amin, alespoň jednu kyslíkatou funkční skupinu – alkoholická či fenolická⁵³ a lipofilitu sloučeniny pro umožnění prostupu derivátů do buněk. Lykorin patří sice k látkám s nižší lipofilitou, ale u něj se předpokládá, že je do buněk transportován facilitovaným transportním systémem.⁵¹

3.3.2 Inhibiční aktivita derivátů lykorinu vůči AchE a BuchE

Alzheimerova nemoc (AD) bývá nejčastější příčinou demence. Její etiologie není dosud známá. Typické pro AD je přítomnost tzv. senilních plaků z β -amyloidu, které se ukládají extracelulárně a hyperfosforylovaný τ -protein, který tvoří neurofibrilární klubka a narušuje funkci cytoskeletu. Tyto změny vedou k apoptotickému zániku neuronů. U AD je narušena produkce acetylcholinu (Ach) v cholinergních synapsích a zvyšuje se aktivita cholinesteráz. Z tohoto důvodu se zabýváme inhibiční aktivitou AchE a BuchE. Jsou to enzymy, které se podílí na cholinergní transmissi a ukončují přenos nervového impulzu vyvolaný Ach. Do procesu AD může být pravděpodobně zahrnuta i zvýšená aktivita POP (prolyl-oligopeptidáza), která hydrolyzuje peptidy, které se účastní na procesech učení a paměti a zasahuje do metabolismu IP_3 . Proto je snaha hledat látky, které tento enzym dokážou inhibovat.³⁷

V současné době se v léčbě AD používají inhibitory AchE. Jedním z nich je reverzibilní inhibitor AchE, který patří mezi AA, galantamin. Je to také první AA, který se používá v klinické praxi. Z tohoto důvodu je snaha hledat další látky z této skupiny alkaloidů, které mají inhibiční aktivitu vůči AchE a BuchE, včetně aktivních semi-syntetických derivátů. Ačkoliv lykorin má velmi slabou schopnost inhibovat AchE a BuchE, byly připraveny a studovány jeho

deriváty. U některých z nich byla prokázána výrazná inhibiční aktivita.^{54,55} Testované deriváty lykorinu jsou shrnuty na následujícím obrázku (Obr. 12).



Obr. 12 Deriváty lykorinu, připravené v rámci studie jejich inhibiční aktivity vůči AchE a BuchE^{54,55}

Podrobný popis přípravy jednotlivých derivátů je uveden v literatuře.^{54,55} Inhibiční efekt vůči AchE a BuchE testovaných derivátů je shrnutý v následující tabulce (Tab. 4). Lykorin (**1**) má velmi slabou inhibiční aktivitu vůči AchE. 2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-O-(methylthio)methyllykorin (**108**) vykazoval duální inhibici vůči oběma esterázám a jeho síla byla čtyřnásobná oproti galantaminu u BuchE.⁵⁵ Sloučeniny **50**, **105-108** a **110** vykazovaly dobrý efekt na BuchE.⁵⁵ Obecně jde vidět, že acylované nebo etherifikované deriváty mají větší inhibiční aktivitu vůči BuchE než AchE. Aktivita 1-O-*trans*-cinnamoyllykorinu (**5**) vykazuje zhruba dvakrát vyšší aktivitu než 1-O-*trans*-cinnamoyllykorin-2-on, což naznačuje, že oxidace lykorinu v pozici C2 snižuje aktivitu.⁵⁵ Ve studii z roku 2010⁵⁴ vykazoval připravený

derivát 1-*O*-acetyl-2-*O*-*terc*-butyldimethylsilyllykorin (**67**) významnou inhibiční aktivitu ($K_i=0,34 \mu\text{M}$), ale ve studii z roku 2012⁵⁵ toto tvrzení vyvrátili, a tento derivát určili jako neaktivní ($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$) proti oběma esterázám. 1-*O*-Acetyllykorin (**2**) se ukázal jako silný inhibitor AchE. Toto tvrzení se nepodařilo potvrdit ve studii z roku 2016.¹⁸ Předpokládá se, že výsledek záleží na zdroji AchE, vůči které je inhibiční aktivita testována.¹⁸ 1,2-Di-*O*,*O'*-acetyllykorin (**3**) byl neaktivní.⁵⁴

Tabulka 4 Inhibiční efekt derivátů lykorinu vůči AchE a BuchE^{18,54,55}

název sloučeniny	číslo sloučeniny	IC_{50} (μM)		K_i (μM)
		AchE	BuchE	
Galantamin		1,60	18,30	0,3
lykorin	1			na
1- <i>O</i> -acetyllykorin	2	> 1000	176,2	0,43
1,2-di- <i>O</i> , <i>O'</i> -acetyllykorin	3			na
lykorin-2-on	7	> 50	> 50	
pseudolykorin	18			na
2- <i>O</i> -benzoyllykorin	49	> 50	> 50	
1,2-di- <i>O</i> , <i>O'</i> -benzoyllykorin	50	> 50	7,72	
1- <i>O</i> -benzoyllykorin	51			0,54
2-TBS-lykorin	66			0,86
1- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -TBS-lykorin	67	> 50	> 50	0,34
1- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>O</i> -TBS-lykorin	103			0,39
1- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>O</i> -acetyllykorin	104			0,97
1,2-di- <i>O</i> , <i>O'</i> - <i>trans</i> -cinnamoyllykorin	105	46,76	17,45	
2- <i>O</i> - <i>trans</i> -cinnamoyllykorin	106	> 50	19,74	
1- <i>O</i> - <i>trans</i> -cinnamoyllykorin	107	> 50	12,13	
1- <i>O</i> -(methylthio)methyl-2- <i>O</i> - <i>terc</i> -butyldimethylsilyl-lykorin	108	11,40	4,17	
1- <i>O</i> -acetyllykorin-2-on	109	> 50	44,46	
1- <i>O</i> - <i>trans</i> -cinnamoyllykorin-2-on	110	> 50	20,91	

na= bez aktivity; K_i je inhibiční konstanta enzymu vůči AchE

Podle výsledků se předpokládá, že objemný, lipofilní substituent v poloze C2 lykorinu (TBS) je nezbytný pro inhibiční aktivitu lidských cholinesteráz.^{54,55} Kromě toho, substituce v pozici C1, především acylace, je velice důležitá pro aktivitu, jak můžeme vidět u

1-*O*-acetyllykorinu (**2**).⁵⁴ Efekt lipofilního substituentu v C2 pozici a substituentu v pozici C1, který je polární a schopný vodíkové vazby, je aditivní.⁵⁵ Toto tvrzení prokazuje inhibiční aktivita derivátů, které mají oba tyto strukturní znaky, jsou jimi 1-*O*-acetyl-2-*O*-TBS-lykorin (**67**), a 1-*O*-benzoyl-2-*O*-TBS-lykorin (**103**).⁵⁴ Inhibiční aktivita derivátů vůči cholinesterázám je podle výsledků nepřímo úměrná protinádorové aktivitě u 1-*O*-benzoyllykorinu (**51**).⁵⁴

3.3.3 Další biologická aktivita derivátů lykorinu

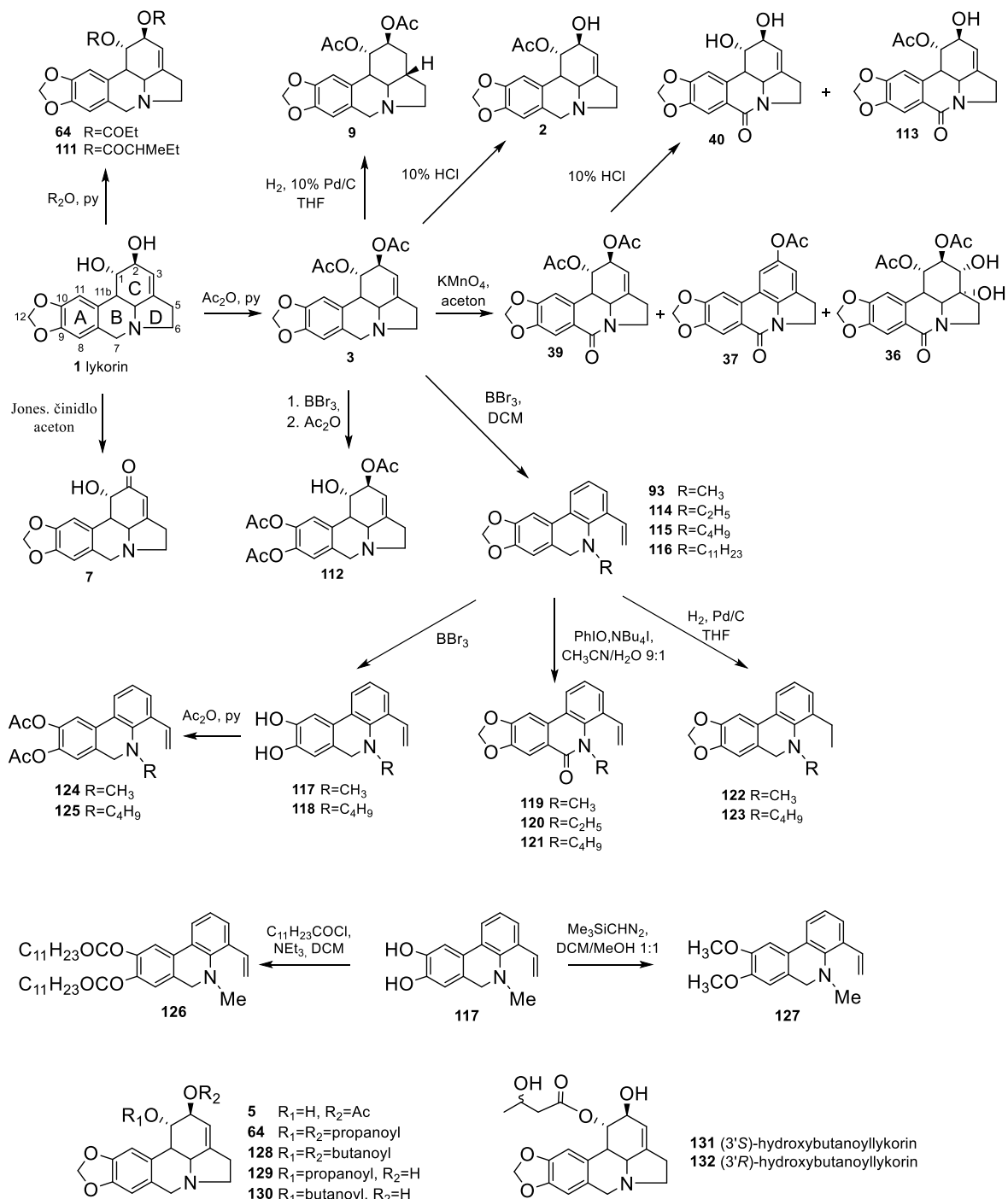
Mezi další biologické aktivity, na které byly deriváty lykorinu testovány, jsou antimalarická aktivita, antitrypanosomální aktivita, antivirová aktivita a aktivita proti prvokovi *Trichomonas vaginalis*.

Malárie je onemocnění, které způsobuje prvek rodu *Plasmodium*. Existuje několik typů malárie a ten nejdůležitější typ způsobuje prvek *Plasmodium falciparum*.⁵⁶ Z důvodu rezistence tohoto prvoka na používaná léčiva je potřeba hledat stále nové látky s antimalarickou aktivitou.⁵⁶ Lykorin je jedním z alkaloidů, který má tyto vlastnosti,⁴¹ a proto byla sledována antimalarická aktivita některých připravených derivátů.^{56,57} Hodnocené deriváty jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 13). Podrobný popis přípravy je uveden v literatuře.^{56,57}

Testování bylo provedeno na třech kmenech a to K1 (rezistentní na chlorochin), FCR3 (citlivý na chlorochin) a F32 (citlivý na chlorochin). Výsledky této studie jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulce 5).

Lykorin byl nejvíce aktivní alkaloid z testovaných derivátů. Vysoce aktivní deriváty byly také 1,2-di-*O,O'*-acetyllykorin (**3**), 1,2-bis(2-methylbutyryl)lykorin (**111**), 1-*O*-acetyllykorin (**2**), deriváty **124** a **125**, které měly IC₅₀ hodnoty pod 1 μM.⁵⁶ Další testované deriváty s vysokou aktivitou byly 1,2-di-*O,O'*-butanoyllykorin (**128**), 1-*O*-propanoyllykorin (**129**), 1-*O*-(3'*R*)-hydroxybutanoyllykorin (**132**) a 1-*O*-(3'*S*)-hydroxybutanoyllykorin (**131**) s IC₅₀ 0,67; 0,37; 0,62 a 0,60 μg/ml.⁵⁷ Ze získaných výsledků se předpokládá, že pro antimalarickou aktivitu je důležitá hydroxylová skupina lykorinu v pozici C1 nebo C2, protože acylací byla aktivita snížena, ačkoliv se stále jednalo o silně aktivní deriváty.⁵⁷ Pokud se porovná derivát **3** a **9**, je patrné, že pro aktivitu je nezbytná dvojná vazba mezi C3 a C4.⁵⁶ Oxidace uhlíku za vzniku laktamu v pozici C7 také výrazně snižuje aktivitu. U sekolykorinových derivátů je vidět,

že nejlepší aktivita byla dosažena u derivátu s hydroxylovými skupinami na aromatickém kruhu A místo 1,3-dioxolanového kruhu např. u derivátu **117** vs. **93** a stejně tak záměna za dvě acetylové skupiny **124** vs. **93** nebo dvě methoxy skupiny **127** vs. **93**.⁵⁶



Obr. 13 Struktury a schéma přípravy derivátů lykorinu testovaných na *Plasmodium falciparum*^{56,57}

Tabulka 5 *In vitro* aktivita lykorinu a jeho derivátů proti *Plasmodium falciparum*^{56,57}

číslo látky	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μg/ml)		číslo látky	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μg/ml)	
	F32	K1	FCR3		F32	K1	FCR3
chlorochin ^a	0,04			115	9,7		
artemisinin ^a		0,0057	0,006	116	7,4		
1	0,13			117	1,1		
2		0,36	0,3	118	> 100		
3	0,26	7,6		119	> 100		
5		8,21		120	> 100		
7	14,7			121	> 100		
9	34,8			122	> 100		
36	> 100			123	7,4		
37	9,2			124	0,9		
39	> 100			125	0,8		
40	netestován			126	47,0		
64	2,7	4,2		127	12,4		
93	11,3			128		0,67	0,53
111	0,6			129		0,37	0,3
112	8,4			130		0,41	0,32
113	> 100			131		0,6	0,45
114	86,0			132		0,62	0,49

^a existující protimalarická léčiva – pozitivní kontrola

Některé z výše uvedených derivátů byly testovány proti prvoku *Trypanosoma brucei* který způsobuje spavou nemoc.⁵⁷ Konkrétně byl pro testování vybrán poddruh *Trypanosoma brucei brucei* kmen GUTat 3.1, který není pro člověka nebezpečný.⁵⁷ Výsledky hodnocení jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6 *In vitro* aktivita derivátů lykorinu proti *Trypanosoma brucei brucei*⁵⁷

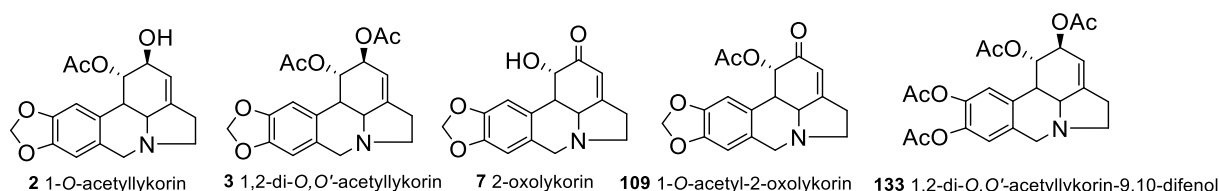
číslo látky	IC ₅₀ (μg/ml)	číslo látky	IC ₅₀ (μg/ml)
pentamidin ^a	0,00158	5	0,15
suramin ^a	1,58	129	1,34
eflornitin ^a	2,27	130	1,38
3	> 12,5	131	1,9
2	5,22	132	2,45

^a existující antitrypanosomální léčiva – pozitivní kontrola

Nejvýznamnější antitrypanosomální aktivitu vykazoval 2-*O*-acetyllykorin (**5**), zatímco 1-*O*-propanoyllykorin (**129**), 1-*O*-butanoyllykorin (**130**) a 1-*O*-(3'*S*)-hydroxybutanoyllykorin

(131) vykazovaly mírnou aktivitu. Nízkou aktivitu vykazovaly 1-*O*-acetyllykorin (**2**), 1,2-di-*O,O'*-acetyllykorin (**3**) a 1-*O*-(3'*R*)-hydroxybutanoyllykorin (**132**).⁵⁷

Lykorin má prokázané protivirové účinky.¹⁹ Jeho použití proti virům ale není bezpečné kvůli jeho cytotoxické aktivitě. Z tohoto důvodu je snaha vyhledávat deriváty lykorinu s vysokou protivirovou aktivitou a zároveň s nízkou cytotoxickou aktivitou. Protivirová aktivita derivátů lykorinu byla hodnocena proti viru, který patří do virů rodu Flavivirus a způsobuje horečku dengue (DENV), kterou přenášejí komáři.⁵⁸ Nejlepší aktivitu z testovaných derivátů, které jsou uvedeny v literatuře⁵⁸ vykazoval derivát 1-*O*-acetyllykorin (**2**) s $CC_{50} > 300 \mu\text{M}$ (koncentrace, která způsobila 50% snížení přežívání buněk) a s $EC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ (koncentrace, která inhibuje 50% produkce virových antigenů). To znamená, že má vysokou aktivitu proti virům a nízkou cytotoxickou aktivitu. Deriváty 1-*O*-acetyl-2-oxolykorin (**109**) s $EC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$ a 2-oxolykorin (**7**) s $EC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$ také vykazovaly výbornou inhibiční aktivitu s nízkou cytotoxickou aktivitou.⁵⁸ Z tohoto důvodu se předpokládá, že změny substituce v pozici C1 se zachováním ketonu v pozici C2 by mohly vést k inhibitorům s vylepšenými celkovými vlastnostmi.⁵⁸ Dalším virem, vůči kterému byla testována protivirová aktivita lykorinu a jeho derivátů je virus, který také patří do virů rodu Flavivirus a způsobuje hepatitidu C (HCV).⁵⁹ Nejlepší aktivitu s nejnižší cytotoxicitou proti HCV vykazovaly 1,2-*O,O'*-diacetyllykorin (**3**), 2-oxolykorin (**7**) a 1,2-*O,O'*-diacetyllykorin-9,10-difenol (**133**).⁵⁹ Z výsledků této studie⁵⁹ je patrné, že oxoskupina v pozici C2 má pozitivní efekt a diacetylace v pozici C1 a C2 a narušení 1,3-dioxolanového kruhu vede ke snížení cytotoxicity. Struktury derivátů s nejvyšší aktivitou jsou uvedeny na obrázku (Obr. 14) a výsledné hodnoty v tabulce (Tabulka 7). Ostatní deriváty a jejich výsledné hodnoty jsou uvedeny v literatuře.^{58,59}



Obr. 14 Deriváty lykorinu s nejvyšší protivirovou aktivitou^{58,59}

Inhibiční mechanismus účinku lykorinu a jeho derivátů proti různým virům zůstává dosud neobjasněný. V rámci studie z roku 2016⁶⁰ byl sledován efekt derivátů lykorinu proti Enteroviru 71 (EV71). Většina látek z této studie nevykazovala proti tomuto viru z čeledi

Picornaviridae žádný efekt až na 1-*O*-acetylylykorin (**2**) a 1,2-di-*O,O'*-acetylylykorin (**3**) s CPE₅₀ 2,5 μM (koncentrace látky v μM, která způsobí ochranu 50% ochranu buněk před cytopatickým efektem) a CC₅₀ > 100 μM.⁶⁰ Následně byl sledován efekt 1-*O*-acetylylykorinu na molekulární úrovni. Zjistilo se, že v průběhu působení 1-*O*-acetylylykorinu dochází ke snížení produkce VP1 proteinu v EV71 kapsidě.⁶⁰ Dále se zjistilo, že rezistence virů vůči 1-*O*-acetylylykorinu je způsobena mutací v RNA, která vede k změně aminokyselin v 2A^{pro} (proteáza viru EV71), jejíž hlavní strukturní části vykazují vysokou podobnost s HCV NS3 proteázou.⁶⁰ Z tohoto důvodu se předpokládá stejné působení na tyto dva viry. Tyto výsledky podporují potenciální použití kombinační terapie 1-*O*-acetylylykorinu s jinými inhibitory pro léčbu infekcí EV71 a HCV.⁶⁰

Tabulka 7 *In vitro* aktivita derivátů proti DENV a HCV^{58,59}

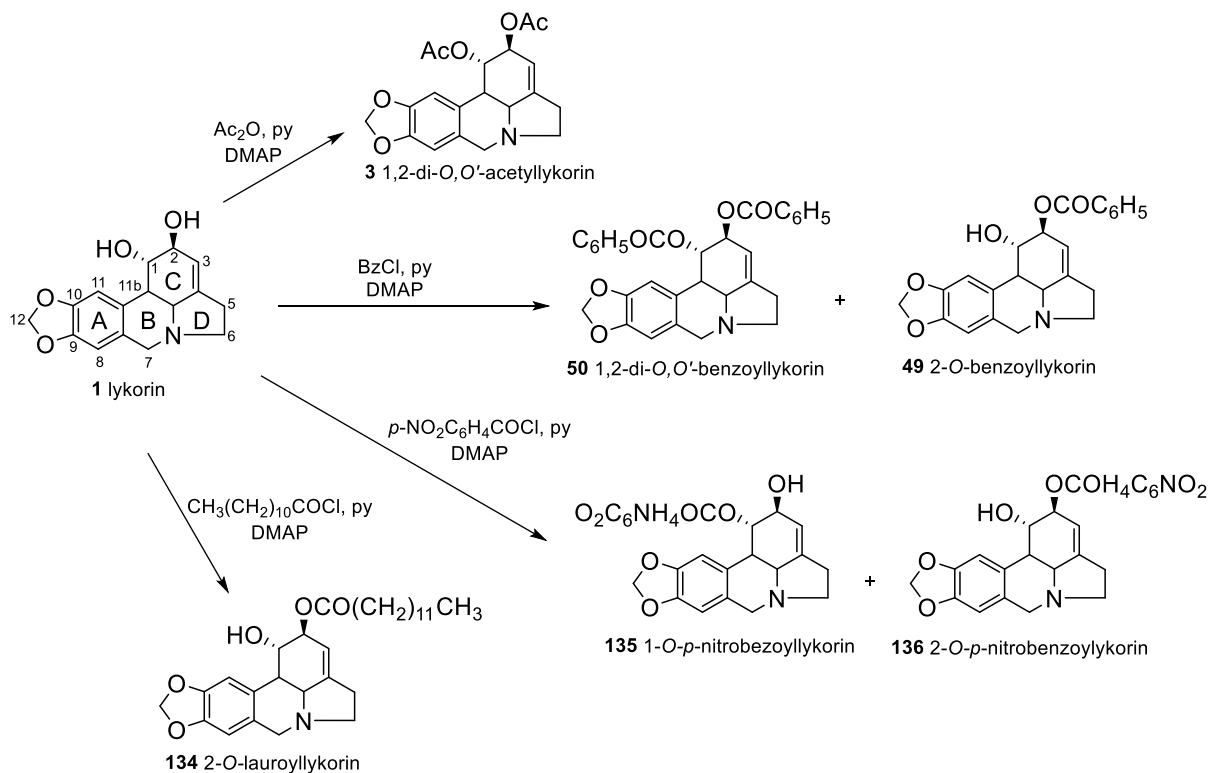
Číslo látky	DENV		HCV	
	CC ₅₀ ^a (μM)	EC ₅₀ ^b (μM)	CC ₅₀ ^a (μM)	EC ₅₀ ^b (μM)
lykorin	25,1	0,8	6,10	0,316
2	> 300	0,4		
3			23,55	0,512
7	56,6	0,5	8,69	0,11
109	> 300	1,8		
133			51,0	0,24

^aCC₅₀ je koncentrace látky, která způsobí smrt nejméně 50% buněk. ^bEC₅₀ je koncentrace potřebná ke snížení produkce virových antigenů alespoň o 50%.

Poslední, ze zmíněných aktivit, je aktivita proti *Trichomonas vaginalis*. Je to prvok, který napadá urogenitální trakt člověka. Bylo připraveno a testováno šest derivátů lykorinu proti *Trichomonas vaginalis*, jejichž schéma přípravy je uvedené na následujícím obrázku (Obr. 15). Aromatické a alifatické estery připravené z lykorinu byly získány reakcí s acetanhydridem nebo acylchloridy v pyridinu a za použití katalytického množství DMAP.⁶¹ Testování bylo provedeno v koncentracích 125 a 250 μM a výsledky jsou uvedeny v procentech přežívajících organismů po 24 hodinách působení derivátu. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 8).⁶¹

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že nezáleží na tom, zda je substituent aromatický nebo alifatický, jak je vidět u látek **3** a **50**. Nitrosloučeniny vykazují vyšší aktivitu než lykorin. Nitrosubstituce je součástí nitroimidazolových léčiv, které se používají v léčbě onemocnění způsobených *Trichomonas vaginalis*, a pravděpodobně hraje roli v mechanismu

účinku. To potvrzuje i porovnání sloučeniny **49** a **136**, kde je vidět, že nitro-derivát je aktivnější, než derivát bez nitro- skupiny. Velmi vysokou aktivitu vykazoval 2-*O*-lauroyllykorin (**134**). Předpokládá se tedy, že lipofilita hraje důležitou roli pro účinek z důvodu lepší penetrace do buňky a –OH skupiny v C1 a C2 pozici nejsou pro aktivitu nezbytné.⁶¹



Obr.15 Schéma přípravy derivátů lykorinu testovaných proti *Trichomonas vaginalis*⁶¹

Tabulka 8 Antitrichomonální aktivita lykorinu a jeho derivátů⁶¹

Číslo látky	Aktivita proti <i>Trichomonas vaginalis</i> (% žijících trofozoitů)	
	125 μM	250 μM
1	70	60
3	77	81
49	51	65
50	68	66
134	16	3
135	80	42
136	40	21

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál, chemikálie a metody

4.1.1. Lykorin

Lykorin byl izolován na Katedře farmaceutické botaniky z rostliny *Zephyranthes robusta*.⁶²

4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla

- anhydrid kyseliny hexanové, ≥ 99% (Acros)
- anhydrid kyseliny propionové, ≥ 99% (Acros)
- anhydrid kyseliny valerové, ≥ 99% (Acros)
- anhydrid kyseliny izobutanové, ≥ 99% (Acros)
- benzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- DMAP, p.a. (Penta)
- ethanol, p.a. (Penta)
- 4-ethylbenzoylchlorid, ≥99% (Acros)
- 2-chlorobenzoylchlorid, ≥99% (Acros)
- chloroform, p.a. (Penta)
- 3-methylbenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-metyl-3-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 2-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 3-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- 4-nitrobenzoylchlorid, ≥ 99% (Acros)
- pyridin, p.a. (Penta)
- Dragendorffovo činidlo (připravováno v laboratoři)⁶³

4.1.3. Materiál pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

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

4.1.4 Vytvářecí soustavy pro analytickou a preparativní tenkovrstvou chromatografii

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

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

S3: To:DEA - 95:5

S4: cHx:DEA - 95:5

4.1.5. Strukturní analýza připravených derivátů

4.1.5.1. GC-MS analýza

GC-MS analýza byla použita 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/z 35-600. Koncentrace nastříkaného vzorku v methanolu byla 1 mg/ml. Získané známé látky byly porovnány s daty v literatuře, strukturně nepopsané látky byly charakterizovány poprvé.

4.1.5.2. 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 byla měřena při kolizní energii 40 eV. Látky pro prováděné experimenty byly rozpuštěny v methanolu (1 mg/ml).

4.1.5.3. 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.

4.1.5.4. NMR analýza

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

4.1.5.5. 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

D – linie sodíkového světla

α – naměřená otáčivost [°C]

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

l – délka kyvety [dm]

4.1.6. Metody pro screening biologických aktivit připravených sloučenin

4.1.6.1. Stanovení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

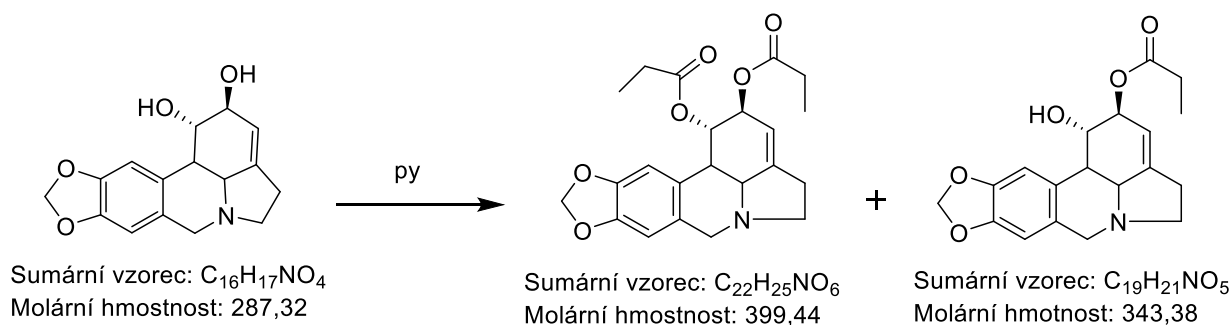
Inhibiční aktivita těchto enzymů byla měřena na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření prováděl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Podrobný popis této metody je lze najít v literatuře.⁶⁴

4.1.6.2. Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů

Stanovení cytotoxické aktivity připravených derivátů na liniích MOLT-4, MCF-7, Jurkat, HeLa, SAOS-2, A2780, A549, MRC-5, HT-29, PANC-1 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.²⁵

4.2. Přípravy syntetických derivátů lykorinu a jejich strukturní identifikace

4.2.1. Příprava 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu (LC-37)



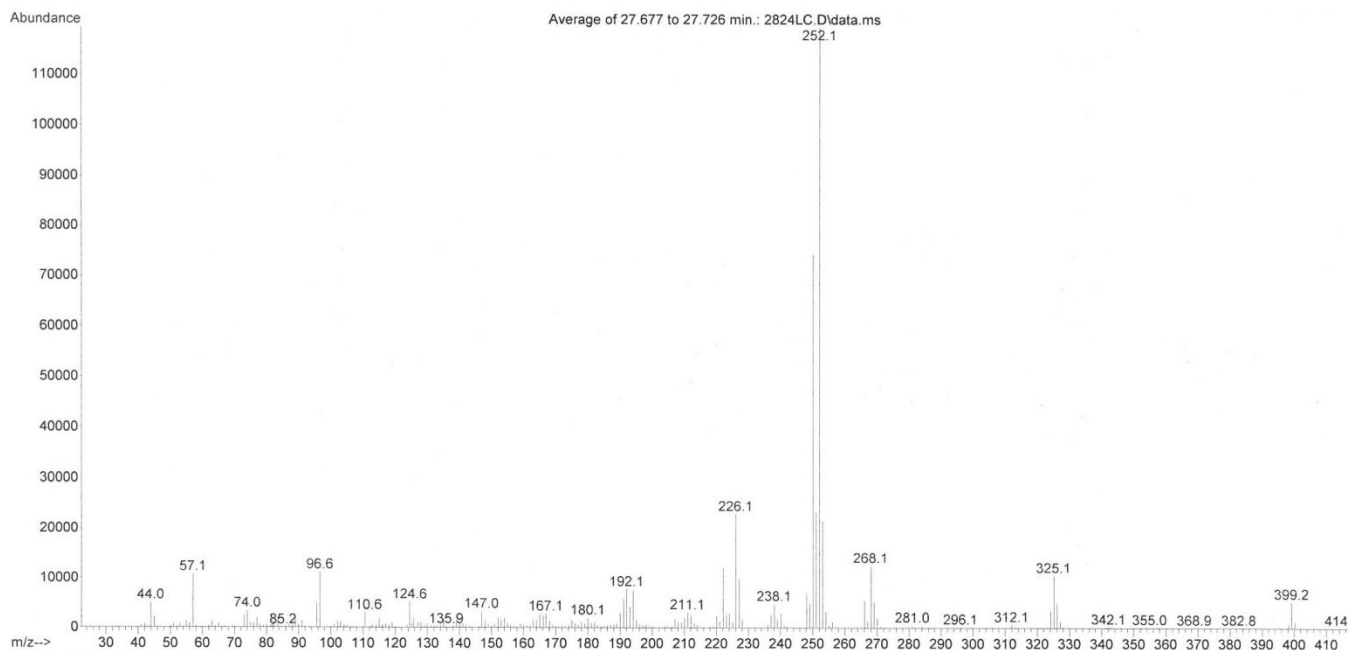
Obr. 16 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu

50 mg lykorinu (174 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l anhydridu kyseliny propionové (780 μ mol). Směs byla míchána při pokojové teplotě 3 hodiny a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethanolu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:DEA 95:5. Byly separovány dvě zóny s produktem. Zóna 1 byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 25 mg produktu 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu (LC-37) ve formě nažloutlých krystalů. Výtěžek reakce byl 36 %. Zóna 2 byla také separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 2 mg vedlejšího produktu reakce ve formě bílých krystalů (LC-37/a). Výtěžek nebyl počítán vzhledem k tomu, že se jednalo o vedlejší produkt reakce.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu (LC-37, hlavní produkt reakce)

EI-MS studie:

EIMS m/z (%): 399 ($[M]^+$, 7); 325 (13); 268 (11); 252 (100); 226 (19); 194 (5).

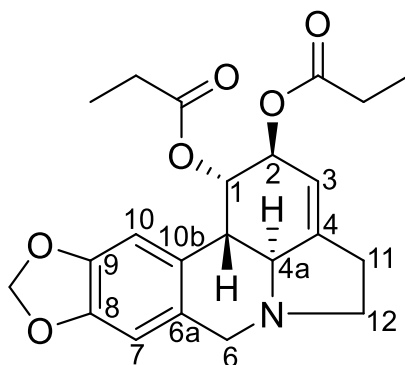


Obr. 17 EI-MS analýza 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu

ESI-HRMS studie:

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

NMR studie:



Obr. 18 Struktura 1,2-di-*O,O'*-propionyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C): ⁵⁶

6.73 (1H, s, H-10), 6.56 (1H, s, H-7), 5.90 (2H, br s, OCH_2O), 5.73 (1H, s, H-1), 5.52 (1H, s, H-3), 5.24 (1H, s, H-2), 4.15 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.52 (1H, d, $J = 14.1$ Hz, H-6), 3.36 (1H, ddd, $J = 4.7$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, H-12), 2.88 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-10b), 2.78 (1H, $J = 10.4$ Hz, H-

4a), 2.63 (2H, br s, H-11), 2.41 (1H, m, H-12), 2.33 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3) 2.19 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3), 1.14 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3) 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):⁵⁶

173.2 (s, C=O), 172.9 (s, C=O), 146.1 (s, C-8), 146.0 (s, C-9), 145.6 (s, C-4), 129.0 (s, C-6a), 126.4 (s, C-10a), 113.7 (d, C-3), 107.0 (d, C-7), 104.8 (d, C-10), 100.7 (t, OCH_2O), 70.5 (d, C-2), 68.8 (d, C-1), 61.0 (d, C-4a), 56.6 (t, C-6), 53.4 (t, C-12), 40.3 (d, C-10b), 28.4 (t, C-11), 27.3 (t, CH_2CH_3), 27.2 (t, CH_2CH_3), 8.7 (q, CH_2CH_3), 8.7 (q, CH_2CH_3).

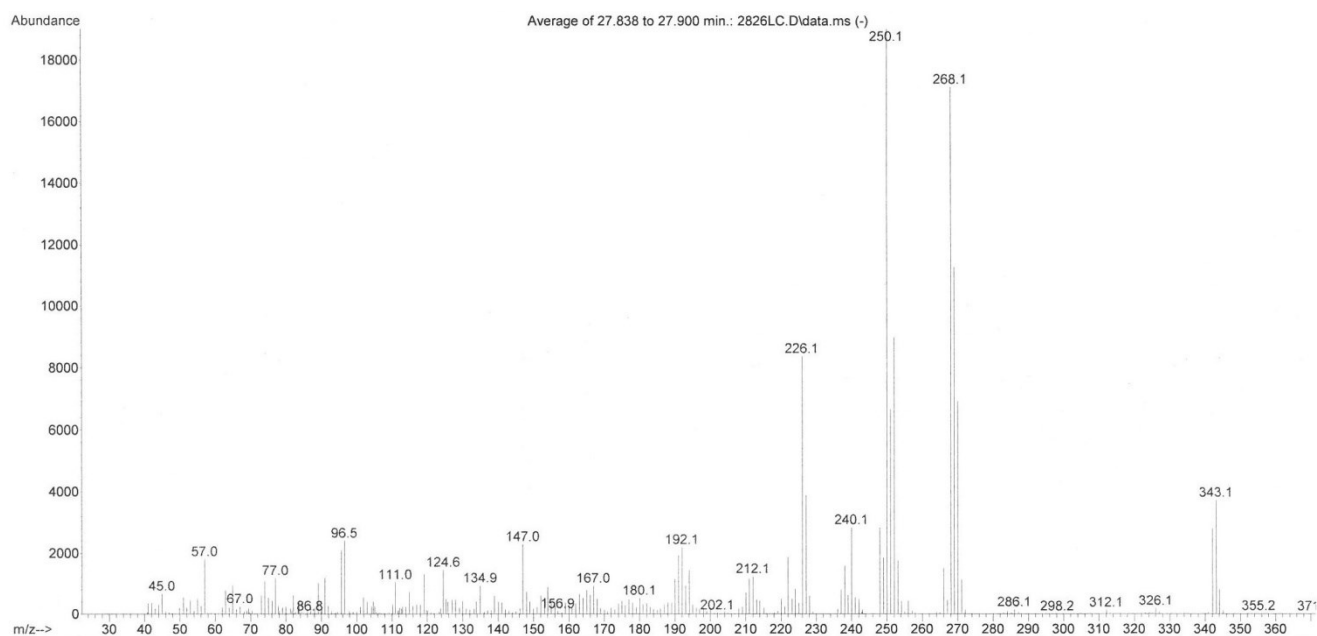
Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +111,2^\circ$ (c 0.16 MeOH)

Strukturní analýza 2-O-propionyllykorinu (LC-37/a, vedlejší produkt reakce)

EI-MS studie:

EI/MS m/z (%): 343 ($[\text{M}^+]$, 19); 268 (90); 250 (100); 240 (15); 226 (44); 192 (12); 147 (12); 96 (12).

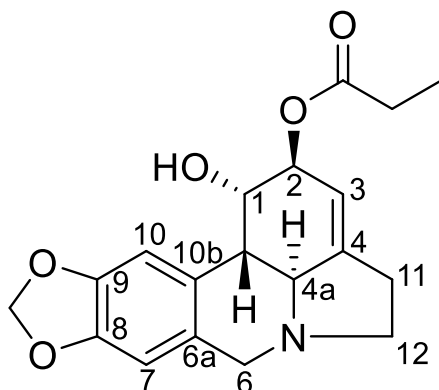


Obř. 19 EI-MS 2-O-propionyllykorinu

ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 344,1506 (m/z teoretická – $C_{19}H_{21}NO_5$ $[M+H]^+$ 344,1492)

NMR studie:



Obr. 20 Struktura 2-*O*-propionyllykorinu

1H NMR (500 MHz, δ , $CDCl_3$, 25°C):

6.82 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, s, H-7), 5.94 (2H, dd, $J = 11,3$ Hz, $J = 1,5$ Hz, OCH₂O), 5.50–5.47 (1H, m, H-1), 5.36–5.33 (1H, m, H-3), 4.52 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, d, $J = 13,7$ Hz, H-6), 3.55 (1H, d, $J = 13,7$ Hz, H-12), 3.41–3.34 (1H, m, H-4a), 2.83 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-10b), 2.72 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-12), 2.69–2.64 (2H, m, H-11, H-6), 2.37 (2H, q, $J = 7,5$ Hz, OCOCH₂), 1.17 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, CH₃).

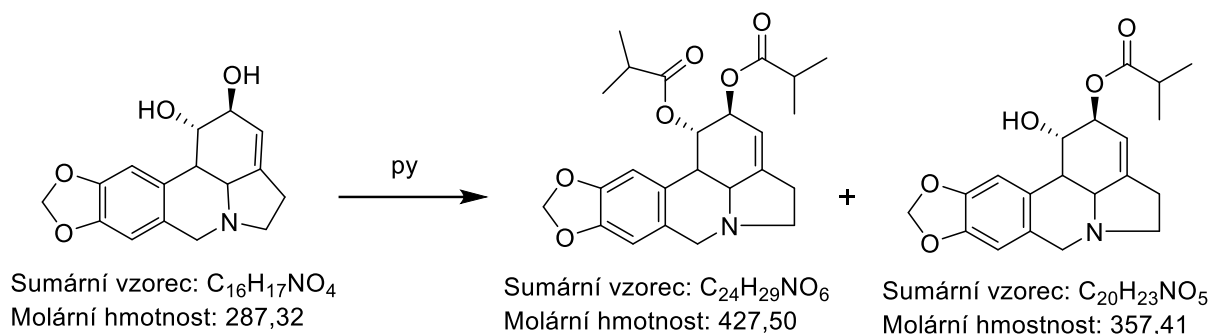
^{13}C NMR (125 MHz, δ , $CDCl_3$, 25°C):

174.0 (OCOCH₂CH₃), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 145.9 (C-4), 130.0 (C-6a), 127.1 (C-10a), 113.8 (C-3), 107.7 (C-7), 104.6 (C-10), 101.0 (OCH₂O), 73.5 (C-2), 69.4 (C-1), 60.7 (C-4a), 57.0 (C-6), 53.7 (C-12), 41.8 (C-10b), 29.7 (C-11), 28.7 (OCOCH₂), 9.1 (CH₃).

Optická otáčivost:

$[\alpha]_D^{20} = -36,4^\circ$ (c 0.121, $CHCl_3$)

4.2.2. Příprava 1,2-di-*O,O'*-isobutanoyllykorinu (LC-38)



Obr. 21 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-isobutanoyllykorinu

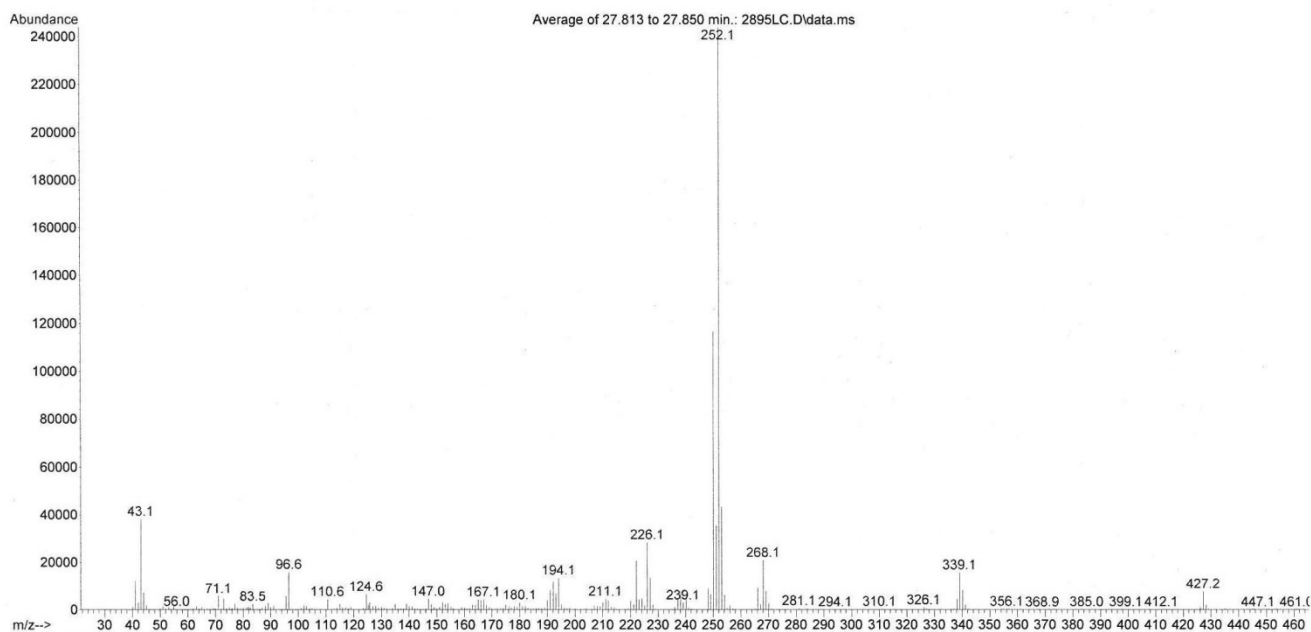
50 mg lykorinu (174 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l isobutanoylanhydridu (603 μ mol). Směs byla míchána při pokojové teplotě 3 hodiny a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethanolu a reakce následně byla chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:DEA 95:5. Byly separovány dvě zóny s produktem. Zóna 1 byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 20 mg produktu 1,2-di-*O,O'*-isobutanoyllykorinu (LC-38) ve formě nažloutlých krystalů. Výtěžek reakce byl 27 %.

Zóna 2 byla také separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 1 mg vedlejšího produktu reakce (LC-38/a). Výtěžek nebyl počítán vzhledem k tomu, že se jednalo o vedlejší produkt reakce.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-isobutanoylchloridu (LC-38, hlavní produkt reakce)

EI-MS studie:

EI/MS m/z (%): 427 ([M⁺], 3); 339 (7); 268 (9); 252 (100); 226 (12); 194 (6); 96 (7); 43 (15).

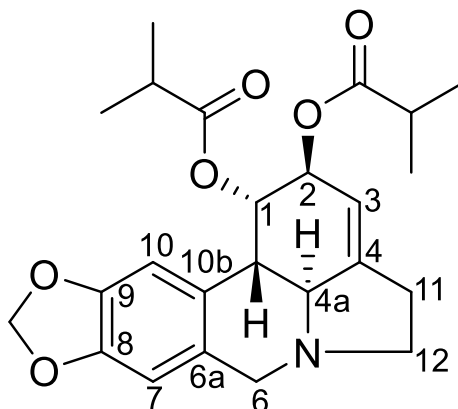


Obr. 22 EI-MS 1,2-di-*O,O'*-isobutanoyllykorinu

ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 428,2074 (*m/z* teoretická – C₂₄H₂₉NO₆ [M+H]⁺ 428,2068)

NMR studie:



Obr. 23 Struktura 1,2-di-*O,O'*-isobutanoyllykorinu

¹H NMR (500 MHz, δ, CDCl₃, 25°C):

6.81 (1H, s, H-10), 6.61 (1H, s, H-7), 5.94 (2H, dd, *J* = 9,3 Hz, *J* = 1,5 Hz, OCH₂O), 5.49–5.46 (1H, m, H-1), 5.34–5.31 (1H, m, H-3), 4.49 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, d, *J* = 13,7 Hz, H-6), 3.56 (1H, d, *J* = 14,2 Hz, H-6), 3.41–3.35 (1H, m, H-12), 2.85 (1H, d, *J* = 10,8 Hz, H-4a), 2.73 (1H, d, *J* = 10,8 Hz, H-10b), 2.70–2.65 (3H, m, H-11, H-12), 2.60–2.53 (1H, m, OCOCH), 1.19 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, CH₃), 1.18 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, CH₃).

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

176.6 ($\text{OCOCHCH}_3\text{CH}_3$), 146.6 (C-9), 146.4 (C-8), 145.7 (C-4), 129.9 (C-6a), 127.1 (C-10a), 113.8 (C-3), 107.7 (C-7), 104.6 (C-10), 101.0 (OCH_2O), 73.2 (C-2), 69.3 (C-1), 60.6 (C-4a), 56.9 (C-6), 53.7 (C-12), 41.7 (C-10b), 34.0 (C-11), 28.7 (OCOCH), 19.0 (CH_3), 18.9 (CH_3).

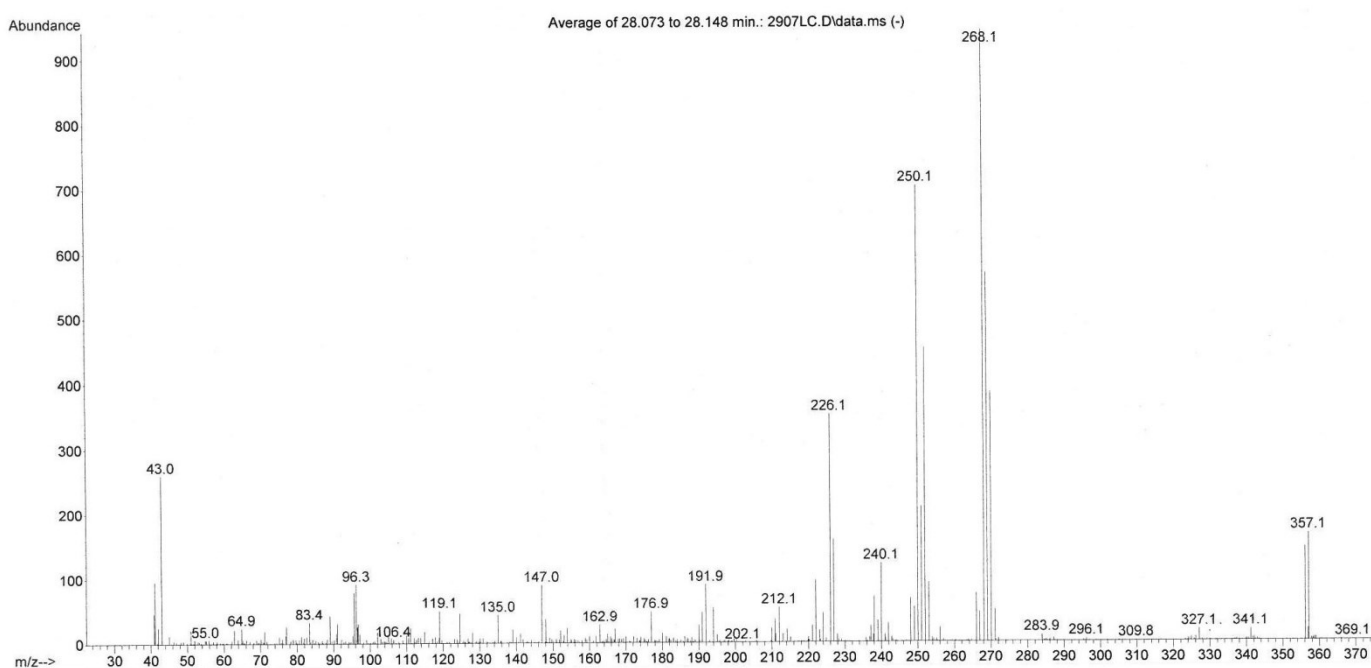
Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -41,1^\circ$ (c 0.112, CHCl_3)

Strukturní analýza 2-O-isobutanoyllykorinu (LC-38/a, vedlejší produkt reakce)

EI-MS studie:

EI/MS m/z (%): 357 ($[\text{M}^+]$, 20); 268 (100); 250 (75); 240 (14); 226 (38); 191 (10); 147 (10); 96 (10); 43 (29).

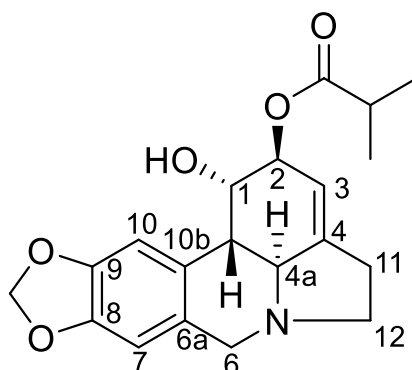


Obr. 24 EI MS 2-O-isobutanoyllykorinu

ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 358,1653 (m/z teoretická – $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 358,1649)

NMR studie:



Obr. 25 Struktura 2-*O*-isobutanoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

6.73 (1H, s, H-10), 6.57 (1H, s, H-7), 5.90 (2H, dd, $J = 3,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz, OCH_2O), 5.71 (1H, s, H-1), 5.53–5.50 (1H, m, H-3), 5.23–5.20 (1H, m, H-2), 4.17 (1H, d, $J = 14,2$ Hz, H-6), 3.53 (1H, d, $J = 14,2$ Hz, H-6), 3.41–3.35 (1H, m, H-12), 2.89 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-4a), 2.79 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-12), 2.69–2.63 (2H, m, H-11), 2.61–2.51 (2H, m, OCOCH), 2.45–2.36 (1H, m, H-10b), 1.19 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3), 1.16 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, CH_3), 1.03 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3), 0.94 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, CH_3).

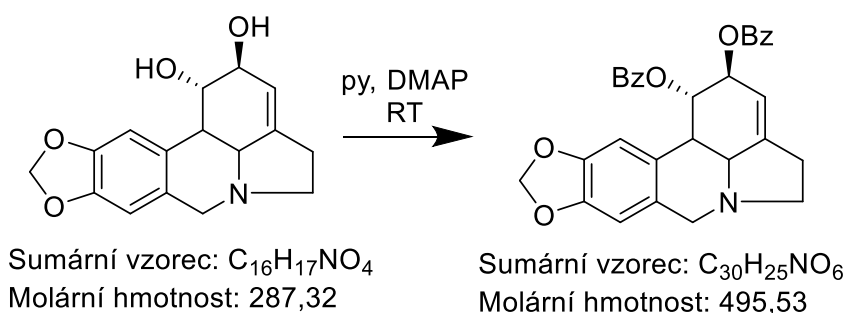
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

175.9 (OCO), 175.8 (OCO), 146.3 (C-9), 146.2 (C-8), 145.8 (C-4), 129.3 (C-6a), 126.6 (C-10a), 113.9 (C-3), 107.2 (C-7), 105.1 (C-10), 100.9 (OCH_2O), 70.7 (C-2), 69.0 (C-1), 61.3 (C-4a), 56.9 (C-6), 53.6 (C-12), 40.7 (C-10b), 33.9 (C-11), 33.8 (OCOCH), 28.6 (OCOCH), 18.9 (CH_3), 18.8 (CH_3), 18.7 (CH_3), 18.6 (CH_3).

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = nezměřeno (nedostatečné množství látky)

4.2.3. Příprava 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu (LC-50)



Obr. 26 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu

50 mg lykorinu (174 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l benzoylchloridu (861 μ mol) a katalytické množství DMAP. Směs byla míchána při pokojové teplotě 3 hodiny. Reakce byla poté zfiltrována přes vatku, promyta suchým pyridinem a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:CHx:DEA 50:50:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 20 mg látky ve formě nažloutlých krystalů. Výtěžek reakce byl 17 %.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu (LC-50)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

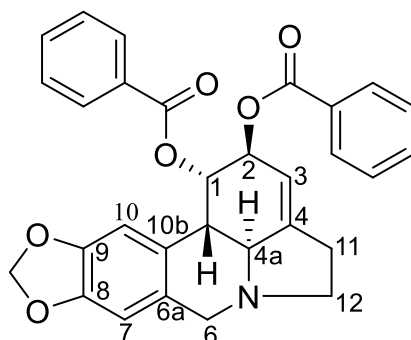
ESI-MS studie:

m/z : 496 $[M + H]^+$

ESI-HRMS studie:

Nebylo měřeno, tato látka již byla dříve připravena, identifikace byla provedena porovnáním naměřených a publikovaných spekter.

NMR studie:



Obr. 27 Struktura 1,2-di-O,O'-benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

8.10-8.05 (2H, m), 7.93-7.89 (2H, m), 7.60-7.55 (1H, m), 7.55-7.51 (1H, m), 7.47-7.43 (2H, m), 7.42-7.37 (2H, m), 6.87 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.16-6.13 (1H, m), 5.88 (1H, d, $J=16.6$ Hz, overlapped), 5.88 (1H, d, $J=16.6$ Hz, overlapped), 5.71-5.68 (2H, m), 4.22 (1H, d, $J=14.0$ Hz), 3.62 (1H, d, $J=14.0$ Hz), 3.48-3.43 (1H, m), 3.22-3.19 (1H, m), 3.04 (1H, d, $J=10.6$ Hz), 2.80-2.69 (2H, m), 2.52 (1H, dt, $J=8.8$ Hz, $J=8.8$ Hz).

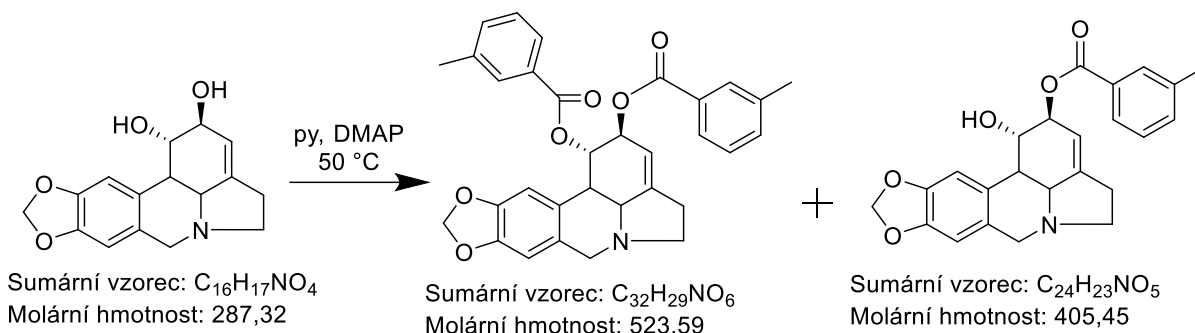
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

165.4, 165.2, 146.5, 146.4, 146.3, 133.1, 129.9, 129.8, 129.8, 129.7, 129.3, 128.3, 128.3, 126.4, 114.0, 107.3, 105.1, 100.9, 71.1, 69.7, 61.7, 56.9, 53.7, 41.0, 28.8.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -119,5$ (c 0.077, CHCl_3)

4.2.4. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu (LC-51)



Obr. 28 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu

50 mg lykorinu (174 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 150 μ l 3-methylbenzoylchloridu (1135 μ mol) a katalytické množství DMAP. Směs byla zahřátá na 50°C, míchána 3 hodiny a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v ethanolu a reakce následně byla chromatografována pomocí preparační TLC. Použitá mobilní fáze byla To:DEA 95:5. Byly separovány tři zóny s produktem označené jako zóna 1, 2 a 3. Zóna 1 byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 40,0 mg 1,2-di-*O,O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu ve formě žlutých krystalů. Výtěžek reakce byl 44%.

Zóna 2 byla také separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 7 mg vedlejšího produktu reakce 2-*O*-benzoyllykorinu (LC-51/a) ve formě bílých krystalů. Výtěžek nebyl počítán vzhledem k tomu, že se jednalo o vedlejší produkt reakce.

Zóna 3 nebyla dále zpracovávána z důvodu velmi malého množství produktu.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu (LC-51, hlavní produkt reakce)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

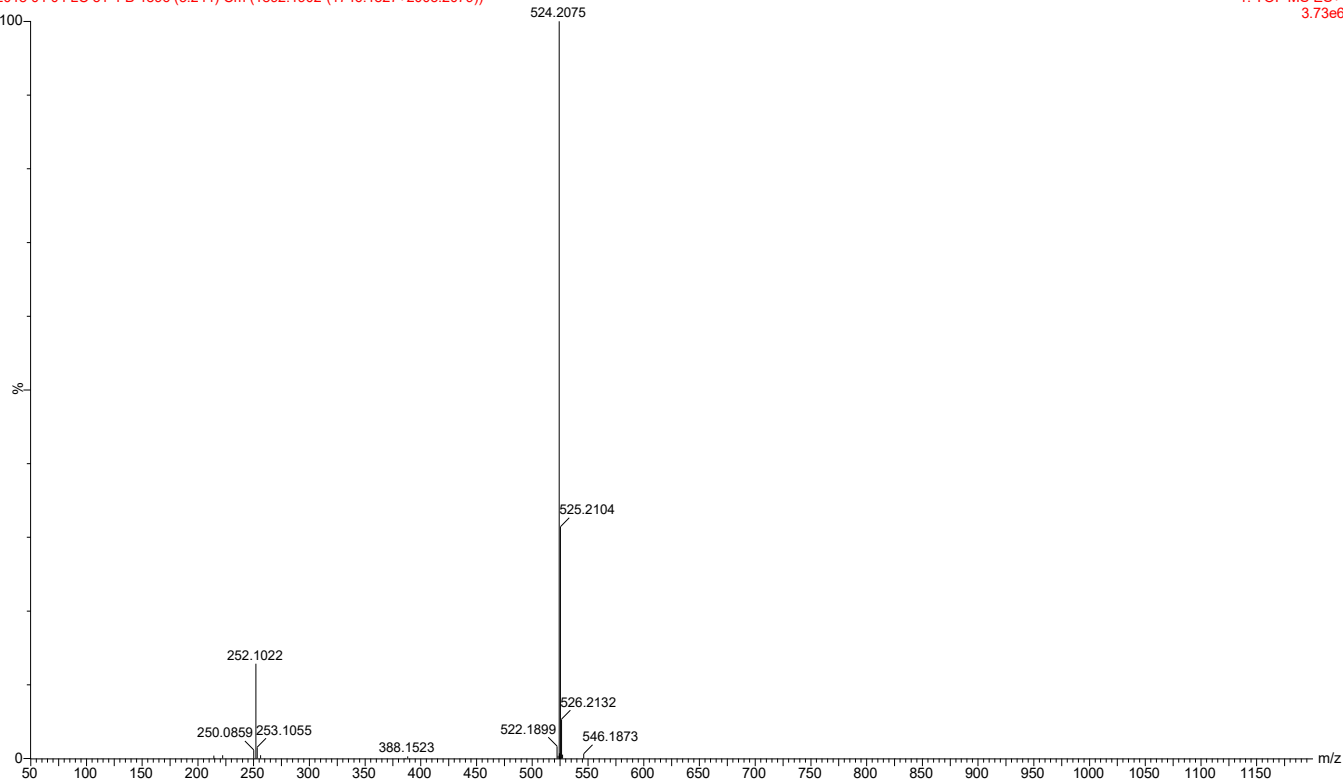
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální 524,2075 (*m/z* teoretická – $C_{32}H_{29}NO_6$ $[M+H]^+$ 524,2073)

524.2073

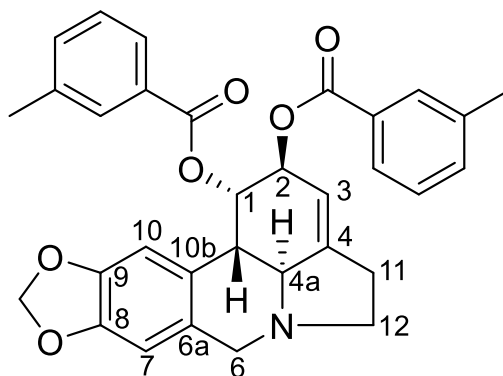
2018 04 04 LC 51-1 B 1896 (3.244) Cm (1892:1902-(1746:1827+2003:2079))

1: TOF MS ES+
3.73e6



Obr. 29 ESI-HRMS 1,2- di-*O, O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 30 Struktura 1,2-di-*O, O'*-(3-methyl)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

7.89-7.85 (2H, m), 7.74 (1H, bs), 7.68 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.35-7.30 (2H, m), 7.27 (1H, t, $J = 7.8$ Hz), 6.88 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.15 (1H, bs), 5.87 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, overlapped), 5.87 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, overlapped), 5.71-5.66 (2H, m), 4.22 (1H, d, $J = 14.2$ Hz),

3.63 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.48-3.41 (1H, m), 3.18 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 3.05 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 2.79-2.71 (2H, m), 2.53 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz), 2.40 (3H, s), 2.37 (3H, s).

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

165.5, 165.4, 146.5, 146.4, 146.1, 138.1, 138.1, 133.9, 130.4, 130.3, 129.8, 129.6, 129.2, 128.2, 128.2, 127.0, 126.9, 126.5, 114.1, 107.3, 105.2, 100.9, 71.0, 69.5, 61.6, 56.9, 53.7, 41.0, 28.8, 21.2, 21.2.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 114,9$ (c 0.094, CHCl_3)

Strukturní analýza 2-O-(3-methyl)benzoyllykorinu (LC-51/a, vedlejší produkt reakce)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

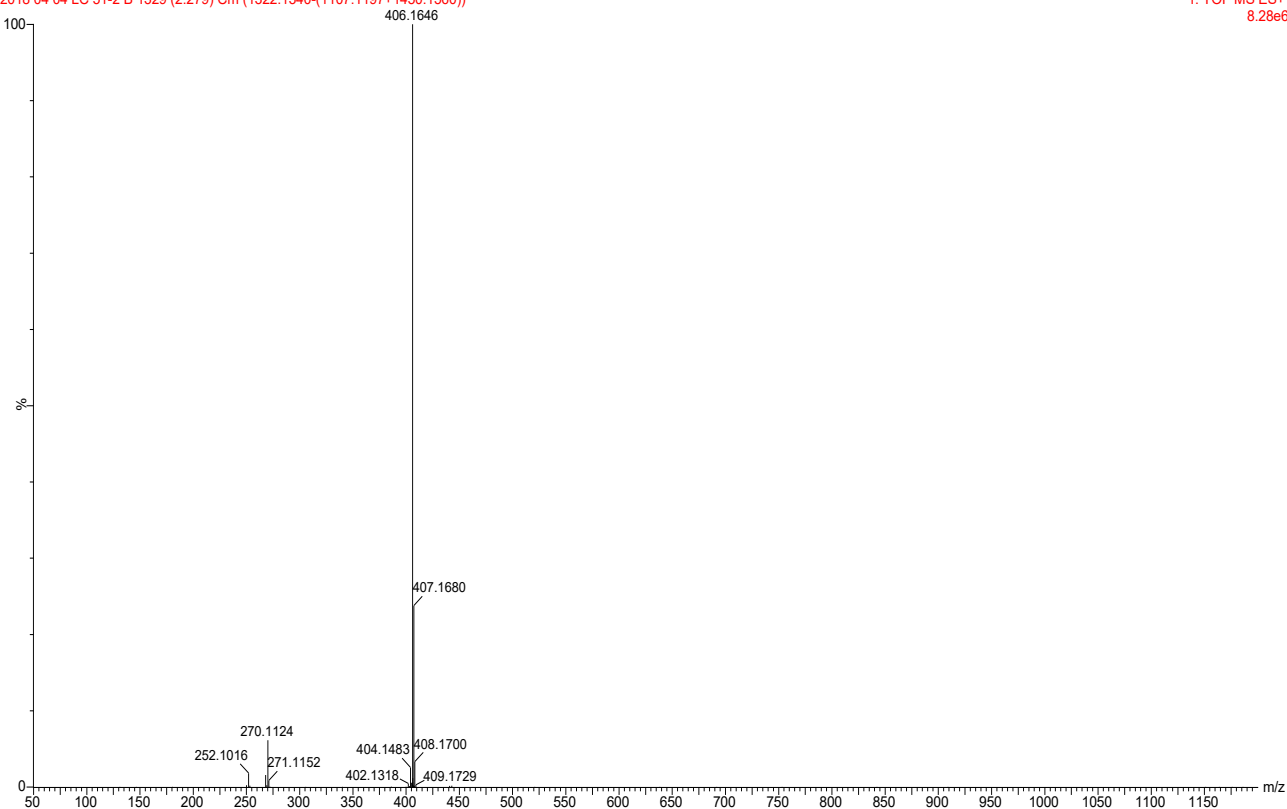
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 406, 1646 (m/z teoretická – $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 406, 1654)

406.1654

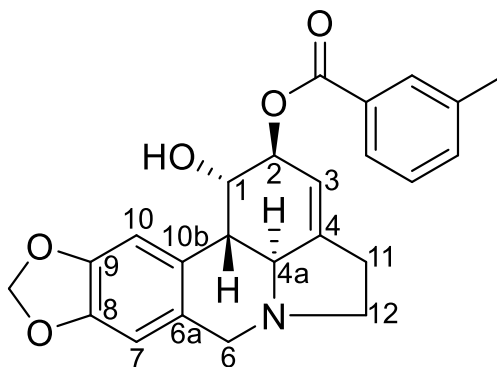
2018 04 04 LC 51-2 B 1329 (2.279) Cm (1322:1340-(1107:1197+1450:1560))

1: TOF MS ES+
8.28e6



Obr. 31 ESI-HRMS 2-O-(3-methyl)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 32 Struktura 2-O-(3-methyl)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

7.87-7.83 (2H, m), 7.40-7.36 (1H, m), 7.35-7.30 (1H, m), 6.82 (1H, s), 6.61 (1H, s), 5.92 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, overlapped), 5.92 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, overlapped), 5.63-5.57 (2H, m), 4.68-4.65 (1H, m), 4.20 (1H, d, $J = 14.4$ Hz), 3.56 (1H, d, $J = 14.4$ Hz), 3.45-3.38 (1H, m), 2.94-2.83 (3H, m), 2.74-2.68 (2H, m), 2.43 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz), 2.39 (3H, s).

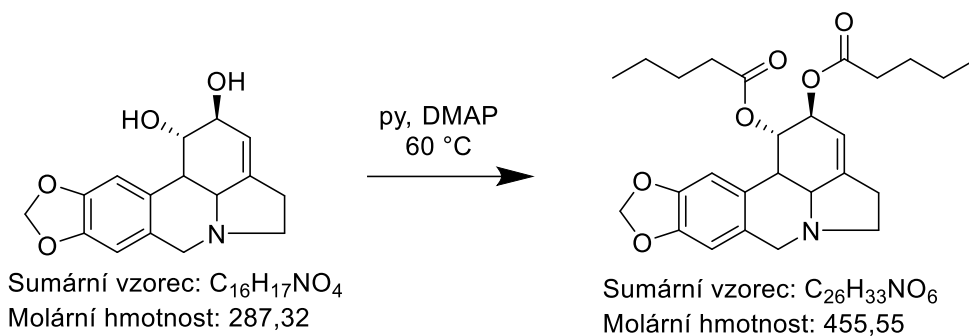
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

166.2, 146.6, 146.4, 146.2, 138.2, 133.9, 130.2, 130.0, 129.9, 128.3, 127.1, 126.9, 113.8, 107.6, 104.7, 101.0, 73.8, 69.3, 60.8, 57.0, 53.7, 41.9, 28.8, 21.2.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = nezměřeno (nedostatečné množství látky)

4.2.5. Příprava 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu (LC-65)



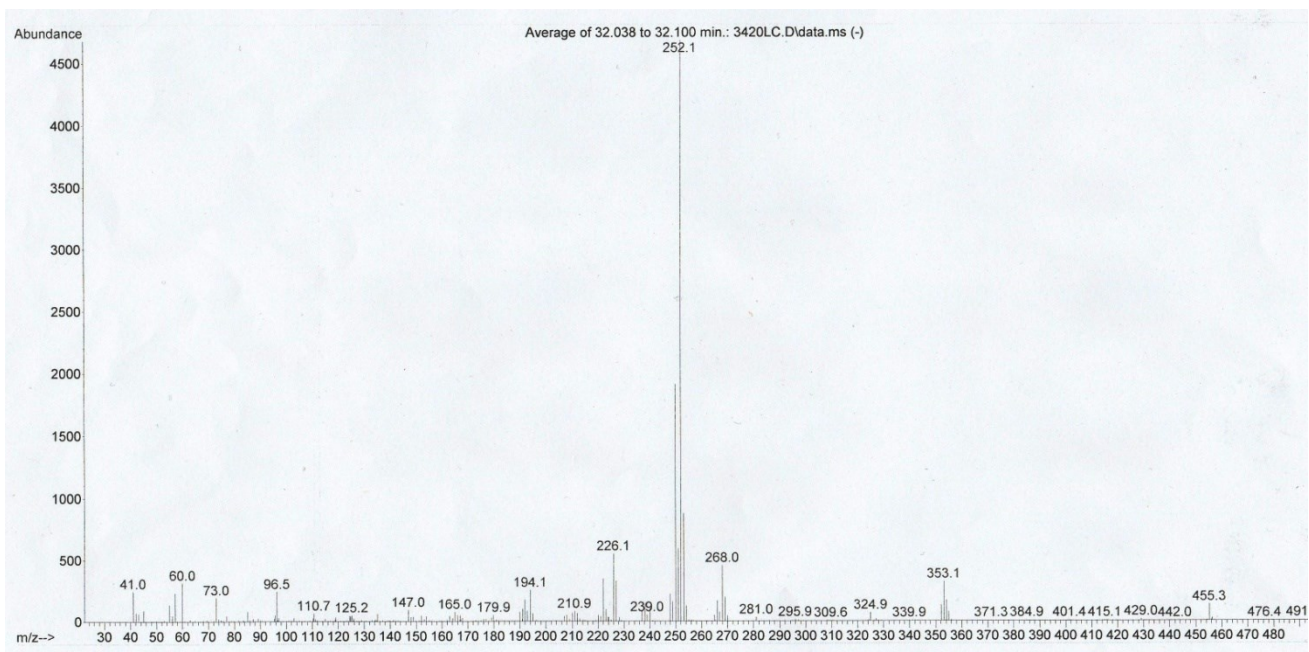
Obr. 33 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu

43 mg lykorinu (150 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l anhydridu kyseliny valerové (507 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 60 °C, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze cHx:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 25,4 mg produktu 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu ve formě hnědé olejovité látky. Výtěžek reakce byl 37%.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu (LC-65)

EI-MS studie:

EI/MS m/z (%): 455 ($[M^+]$, 2); 353 (7); 268 (9); 252 (100); 226 (11); 194 (5); 96 (5); 73 (4); 60 (7); 41 (5).



Obr. 34 EI MS 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu

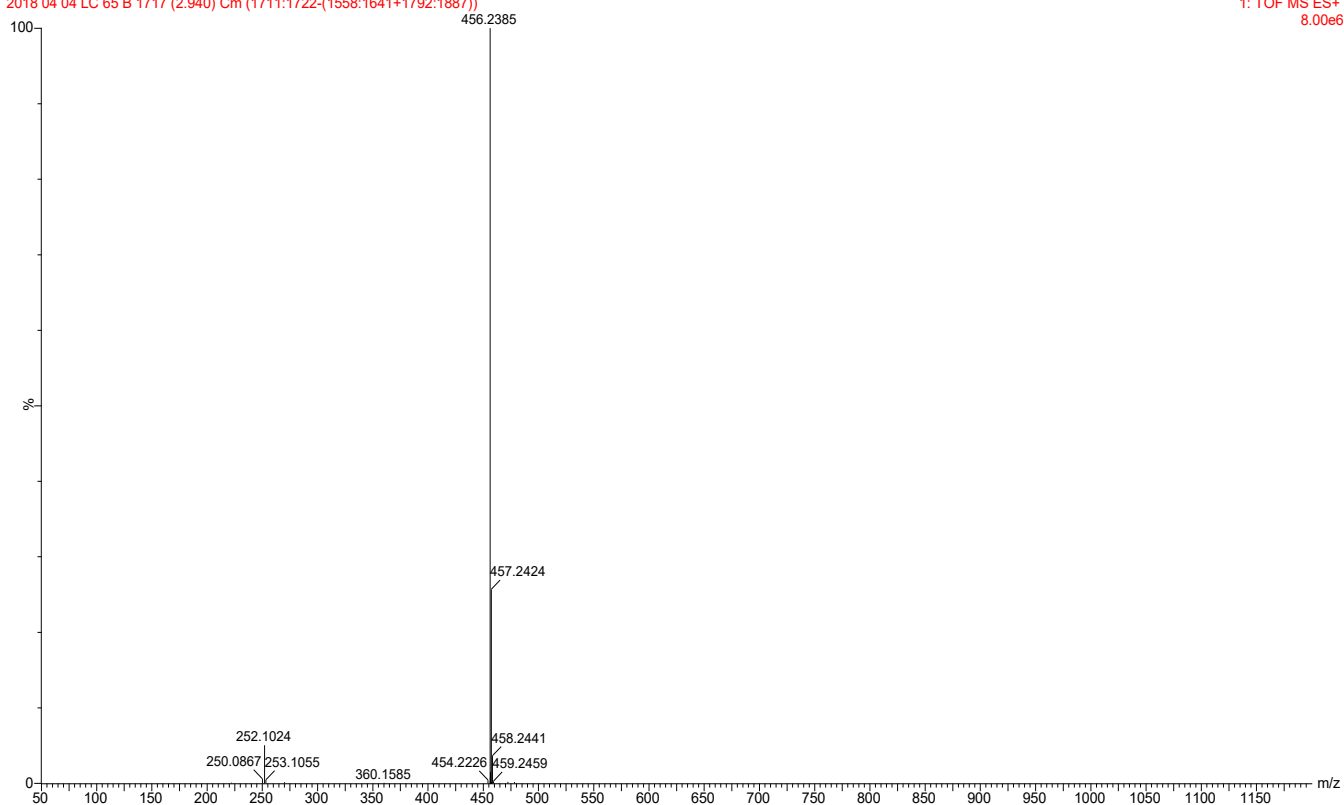
ESI-HRMS:

m/z experimentální – 456,2385 (*m/z* teoretická – C₂₆H₃₃NO₆ [M+H]⁺ 456,2386)

456.2386

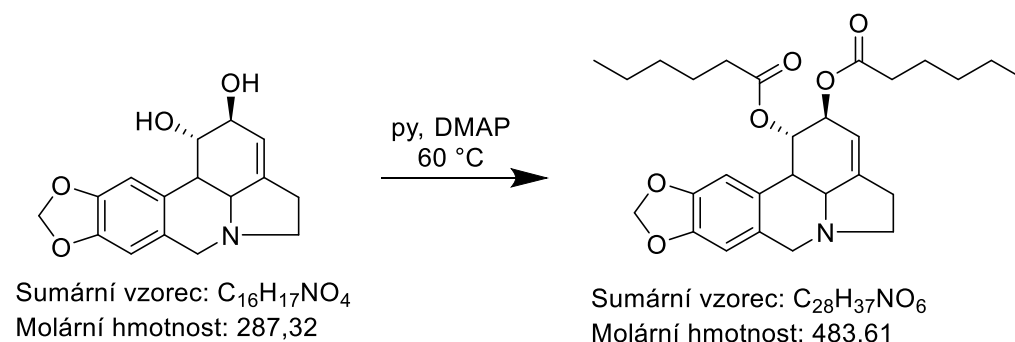
2018 04 04 LC 65 B 1717 (2.940) Cm (1711:1722-(1558:1641+1792:1887))

1: TOF MS ES+
8.00e6



Obr. 35 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-pentanoyllykorinu

4.2.6. Příprava 1,2-di-*O,O'*-hexanoyllykorinu (LC-66)



Obr. 37 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-hexanoyllykorinu

43 mg lykorinu (150 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l anhydridu kyseliny hexanové (433 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 60 $^{\circ}$ C, míchána 24 hodin a poté byla odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze cHx:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 43 mg produktu ve formě nažloutlých krystalů. Výtěžek reakce byl 59 %.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-hexanoyllykorinu (LC-66)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

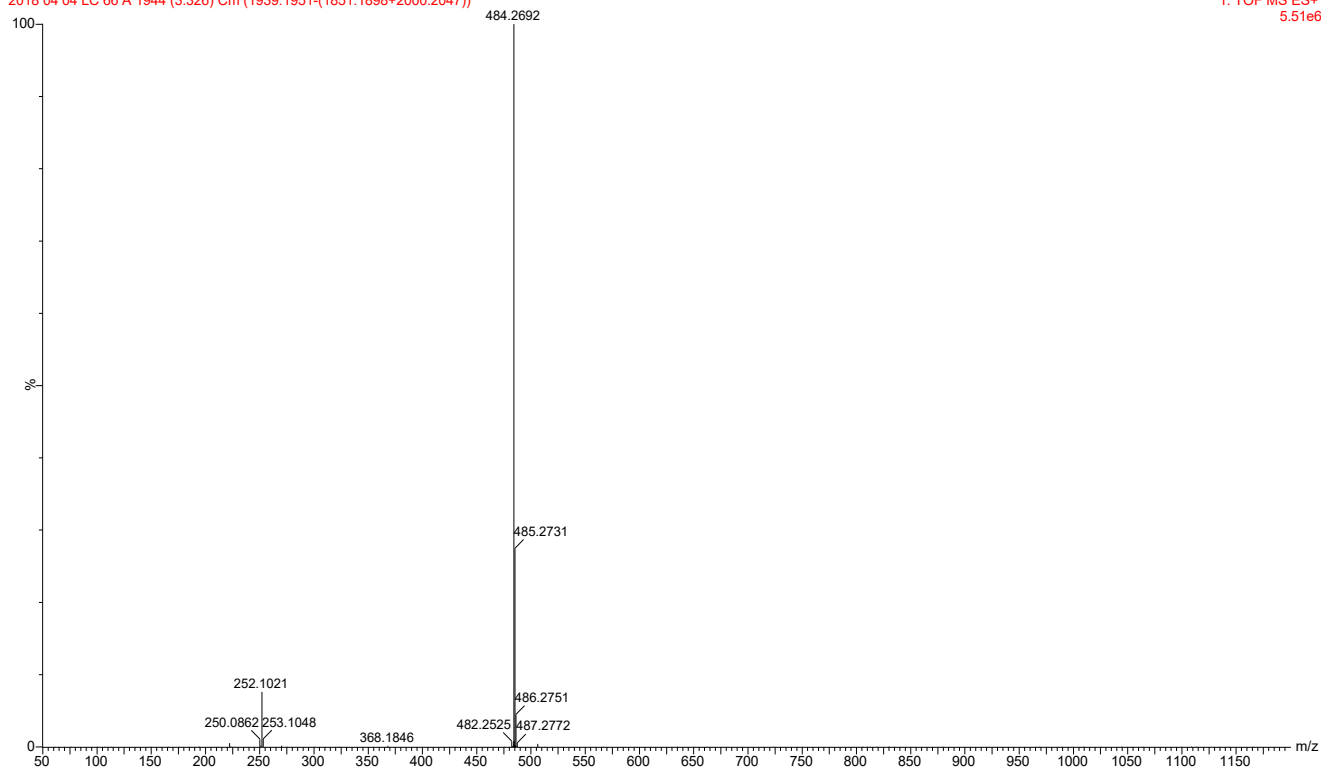
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální 484,2692 (m/z teoretická – $C_{28}H_{37}NO_6$ $[M+H]^+$ 484,2699)

484.2699

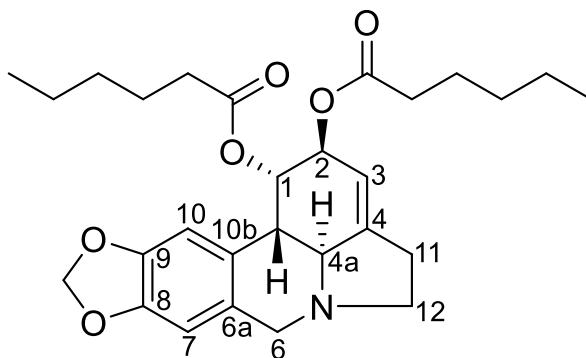
2018 04 04 LC 66 A 1944 (3.326) Cm (1939:1951-(1851:1898+2000:2047))

1: TOF MS ES+
5.51e6



Obr. 38 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-hexanoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 39 Struktura 1,2-di-*O,O'*-hexanoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

6.75 (1H, s), 6.56 (1H, s), 5.90 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, overlapped), 5.74 (1H, bs), 5.54-5.51 (1H, m), 5.26-5.23 (1H, m), 4.16 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.52 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.40-3.35 (1H, m), 2.88 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 2.78 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 2.68-2.62 (2H, m), 2.40 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz), 2.37-2.26 (2H, m), 2.18 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.68-

1.60 (2H, m), 1.50-1.42 (2H, m), 1.34-1.29 (4H, m), 1.21-1.13 (2H, m), 1.13-1.05 (2H, m), 0.89 (3H, t, $J=7.4$ Hz), 0.79 (3H, t, $J=7.4$ Hz).

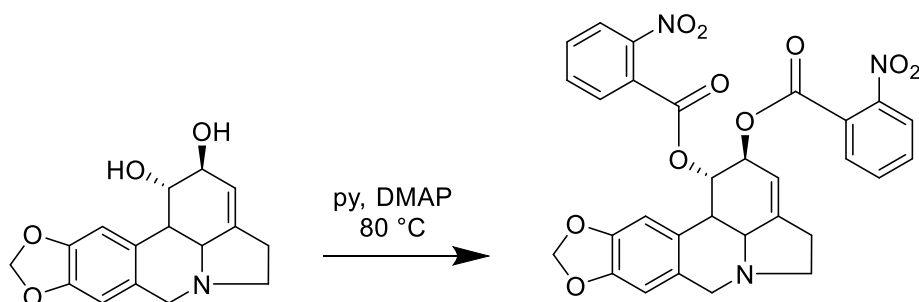
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

172.6, 172.5, 146.4, 146.3, 145.8, 129.3, 126.6, 114.0, 107.2, 105.2, 100.9, 70.7, 69.0, 61.4, 56.9, 53.6, 40.6, 34.3, 34.1, 31.2, 30.9, 28.7, 24.5, 22.2, 22.2, 13.9, 13.7.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11,0$ (c 0.073, CHCl_3)

4.2.7. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu (LC-69)



Sumární vzorec: $C_{16}H_{17}NO_4$
Molární hmotnost: 287,32

Sumární vzorec: $C_{30}H_{23}N_3O_{10}$
Molární hmotnost: 585,53

Obr. 40 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu

40 mg lykorinu (139 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l 2-nitrobenzoylchloridu (757 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 80 °C, míchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze To:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 80 mg produktu ve formě žlutých krystalů. Výtěžek reakce byl 98%.

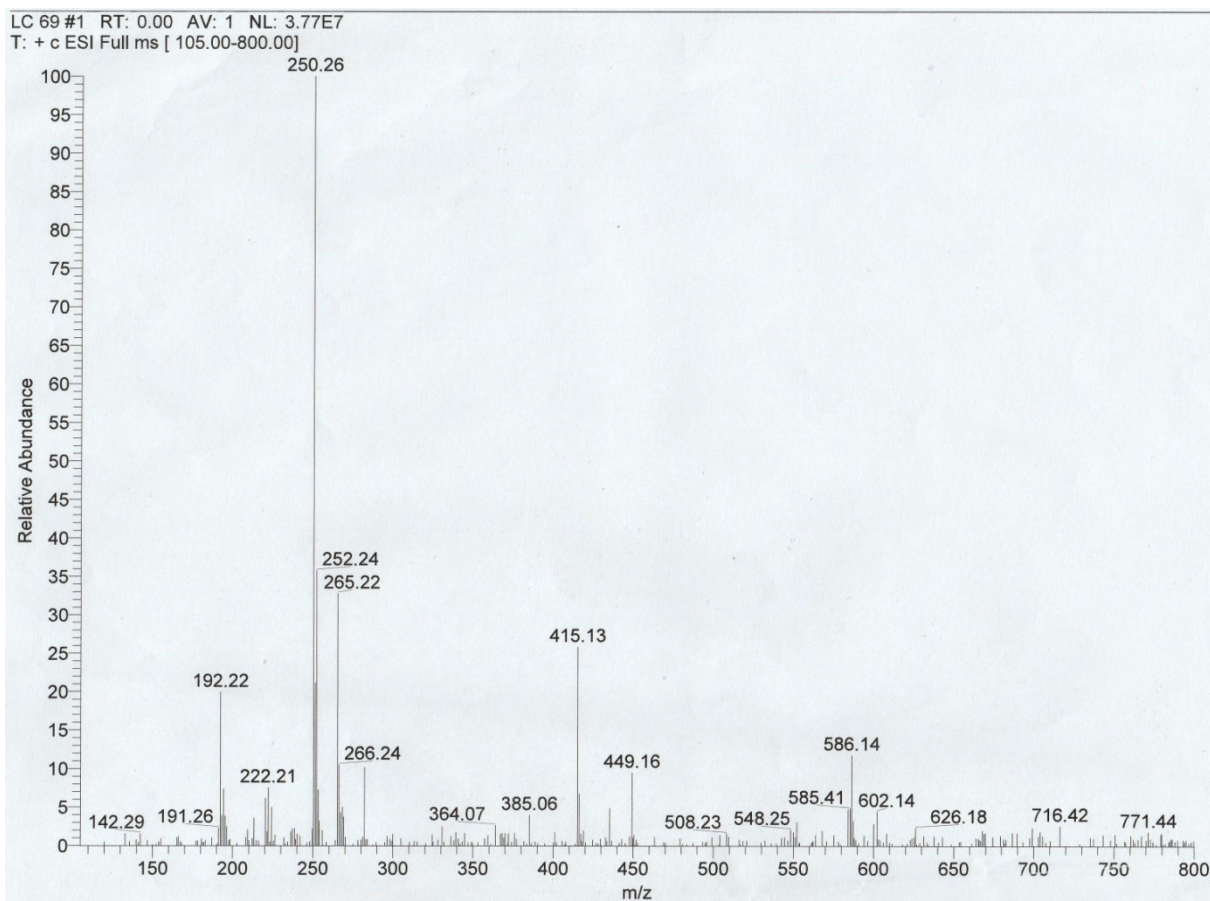
Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu (LC-69)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

ESI-MS studie:

ESI-MS m/z (%) 586 $[M+H]^+$



Obr. 41 ESI-MS 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu

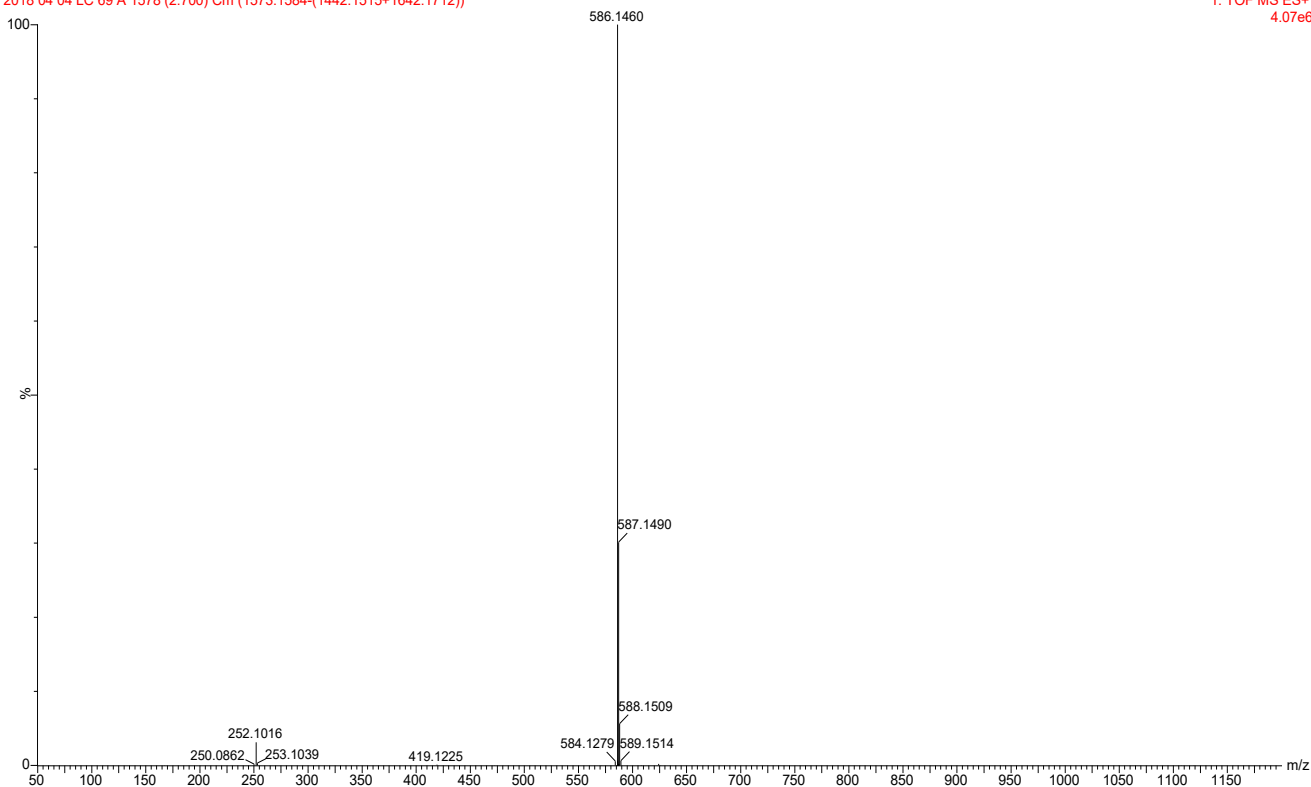
ESI-HRMS:

m/z experimentální – 586,1460 (*m/z* teoretická C₃₀H₂₃N₃O₁₀ [M+H]⁺ 586,1462)

586.1462

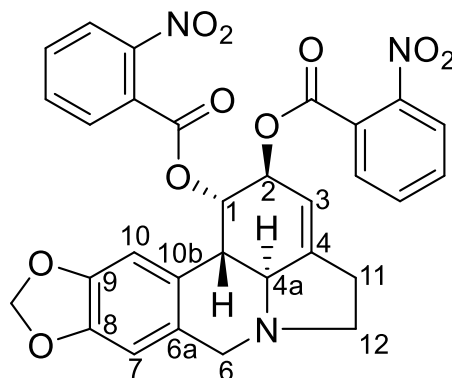
2018 04 04 LC 69 A 1578 (2.700) Cm (1573:1584-(1442:1515+1642:1712))

1: TOF MS ES+
4.07e6



Obr. 42 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 43 Struktura 1,2-di-*O,O'*-(2-nitro)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

7.91 (1H, d, $J= 7.8$ Hz), 7.82 (1H, dd, $J= 7.3$ Hz, $J= 1.2$ Hz), 7.80-7.75 (1H, m), 7.70 (1H, td, $J= 7.3$ Hz, $J= 1.2$ Hz), 7.64 (1H, td, $J= 7.8$ Hz, $J= 1.2$ Hz), 7.61-7.56 (3H, m), 6.91 (1H, s), 6.55 (1H, s), 6.13 (1H, bs), 5.92-5.88 (2H, m), 5.79-5.76 (1H, m), 5.68-5.65 (1H, m), 4.13 (1H, d, $J= 14.2$ Hz), 3.52 (1H, d, $J= 14.2$ Hz), 3.40-3.35 (1H, m), 2.96 (1H, d, $J= 10.3$ Hz), 2.73 (1H, d, $J= 10.3$ Hz, overlapped), 2.70-2.65 (2H, m, overlapped), 2.40 (1H, dt, $J= 8.8$ Hz, $J= 8.8$ Hz).

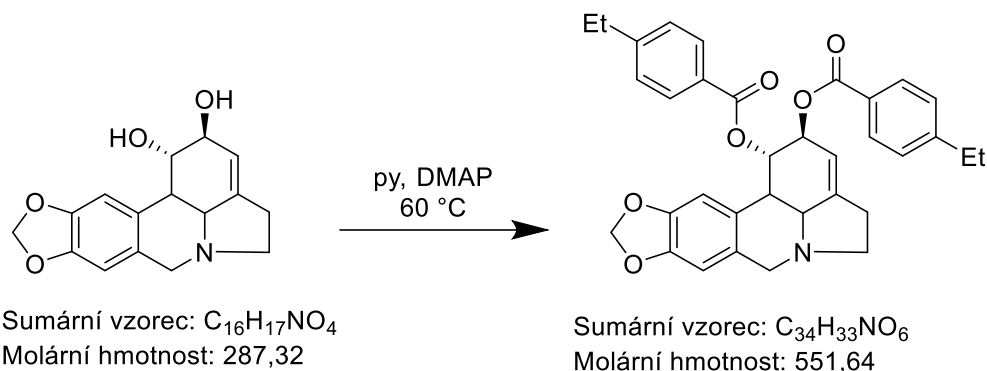
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

164.1, 164.0, 148.3, 148.1, 147.4, 146.4, 146.4, 132.9, 132.6, 132.0, 131.9, 130.3, 130.1, 129.5, 127.2, 126.5, 125.9, 123.9, 123.6, 112.5, 107.2, 105.1, 100.9, 71.9, 70.8, 61.1, 56.8, 53.5, 40.6, 28.7.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = nezměřeno (nedostatečné množství látky)

4.2.8. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(4-ethyl)benzoyllykorinu (LC-71)



Obr. 44 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(4-ethyl)benzoyllykorinu

43 mg lykorinu (150 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l 4-ethylbenzoylchloridu (680 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 60 °C, míchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze $CH_x:DEA$ 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 37,1 mg produktu ve formě žlutých krystalů. Výtěžek reakce byl 45%.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(4-ethyl)benzoyllykorinu (LC-71)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

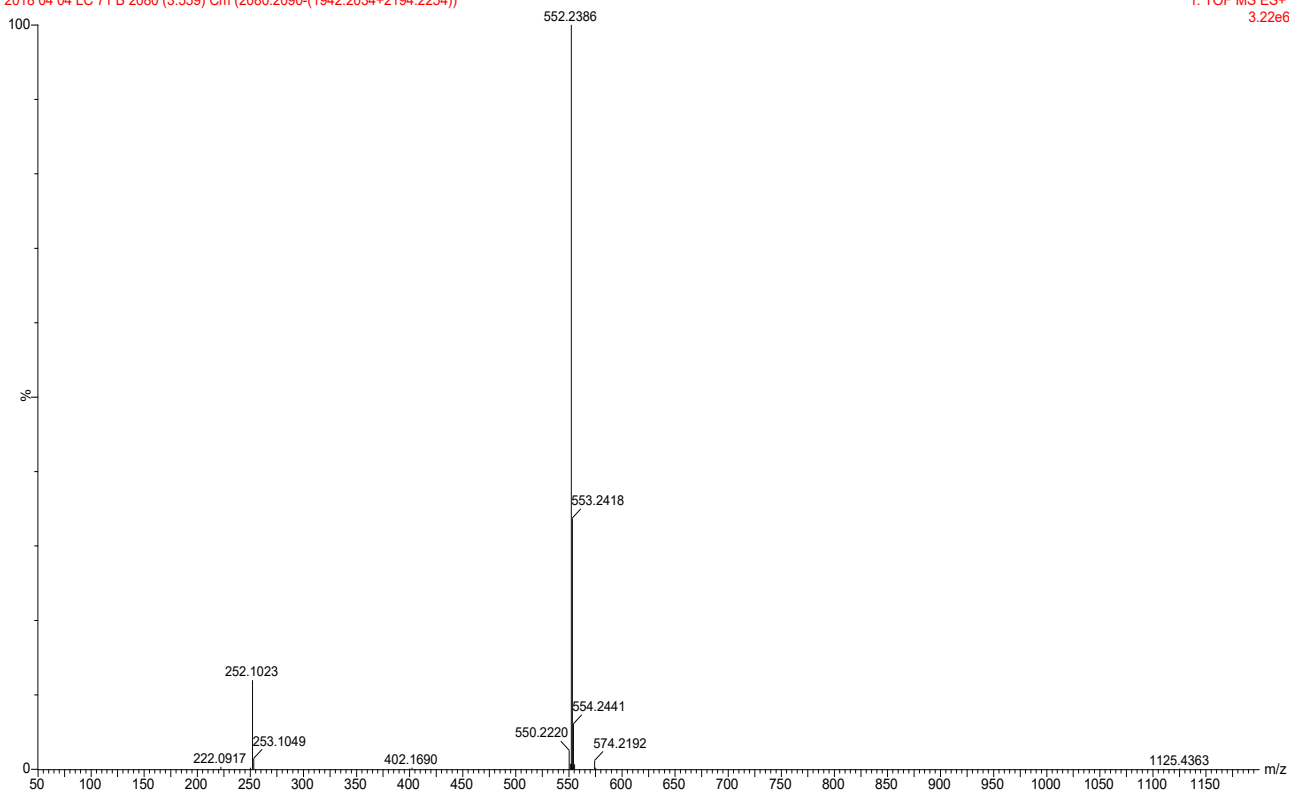
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 552,2386 (m/z teoretická – $C_{34}H_{33}NO_6$ $[M+H]^+$ 552,2386)

552.2386

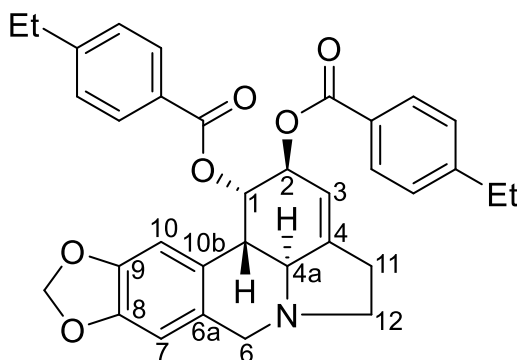
2018 04 04 LC 71 B 2080 (3.559) Cm (2080:2090-(1942:2034+2194:2254))

1: TOF MS ES+
3.22e6



Obr. 45 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-(4-ethyl)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 46 Struktura 1,2-di-*O,O'*-(4-ethyl)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

8.00-7.97 (2H, m, AA'BB'), 7.84-7.81 (2H, m, AA'BB'), 7.28-7.25 (2H, m, AA'BB'), 7.22-7.19 (2H, m, AA'BB'), 6.87 (1H, s), 6.57 (1H, s), 6.13 (1H, bs), 5.86 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, overlapped), 5.86 (1H, d, $J = 18.6$ Hz, overlapped), 5.71-5.65 (2H, m), 4.22 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.61 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.47-3.41 (1H, m), 3.17 (1H, d, $J = 10.6$ Hz), 3.04 (1H, d, $J = 10.6$ Hz), 2.76-2.64 (2H,

m, overlapped), 2.71 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, overlapped), 2.67 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, overlapped), 2.51 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz), 1.26 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.22 (3H, t, $J = 7.5$ Hz).

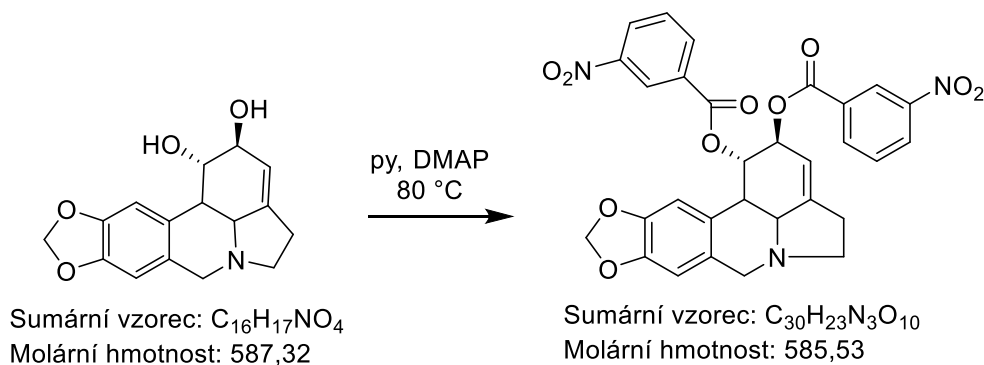
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

165.3, 165.2, 150.0, 146.4, 146.3, 146.1, 129.9, 129.9, 129.2, 127.8, 127.8, 127.4, 127.2, 126.5, 114.1, 107.2, 105.1, 100.9, 70.8, 69.4, 61.6, 56.9, 53.7, 41.0, 28.9, 28.9, 28.7, 15.2.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 119,5$ (c 0.077, CHCl_3)

4.2.9. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorinu (LC-75)



Obr. 47 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorinu

43 mg lykorinu (150 μ mol) bylo rozpuštěno v 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 45 mg (243 μ mol) 3-nitrobenzoylchloridu a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 80 °C, míchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce dvakrát chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze To:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 64 mg produktu ve formě nažloutlých krystalů. Výtěžek reakce byl 73%

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorinu (LC-75)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

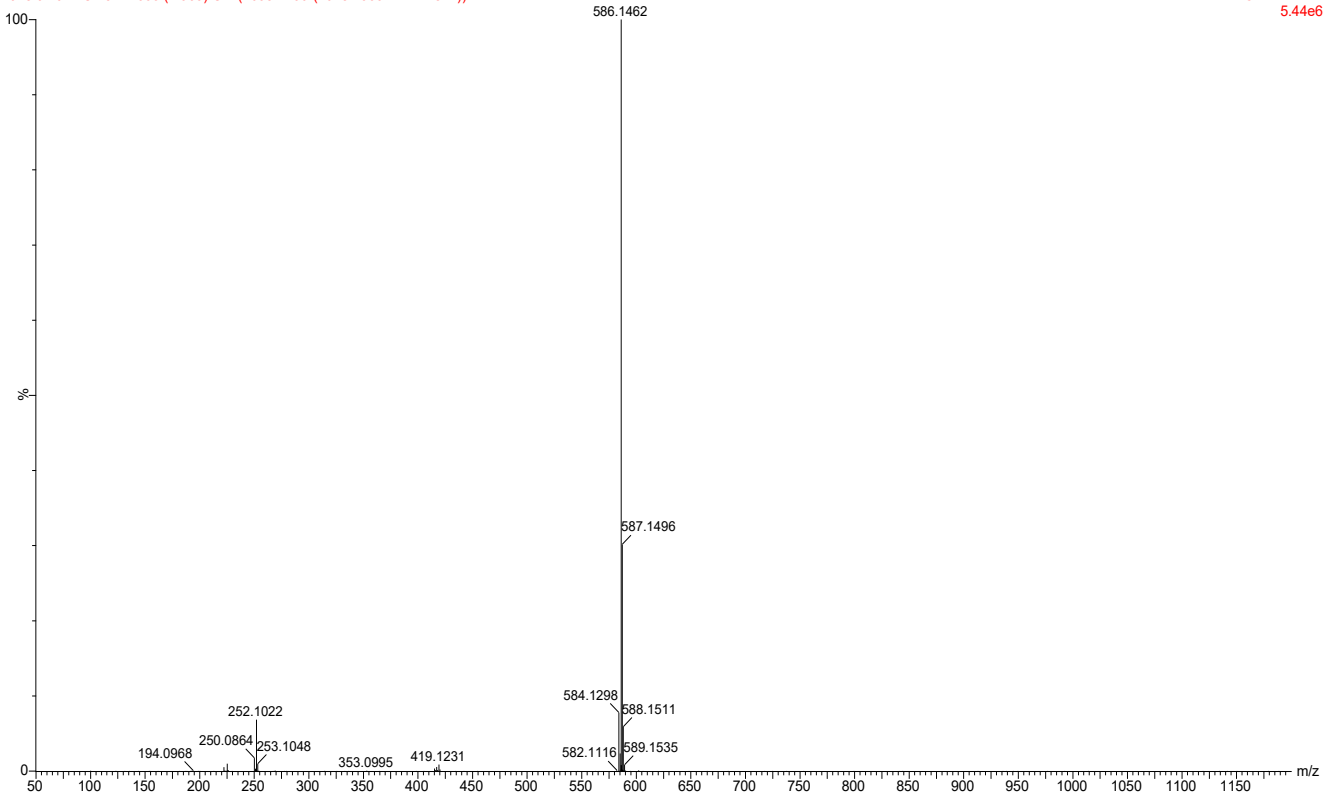
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 586,1462 (m/z teoretická – C₃₀H₂₃N₃O₁₀ [M+H]⁺ 586,1462)

586.1462

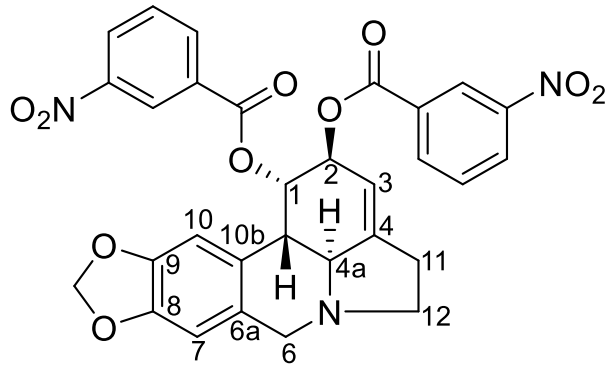
2018 04 04 LC 75 B 1699 (2.909) Cm (1695:1706-(1628:1660+1777:1822))

1: TOF MS ES+
5.44e6



Obr. 48 ESI-HRMS Stuktura 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 49 Stuktura 1,2-di-*O,O'*-(3-nitro)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

8.87 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 8.67 (1H, t, $J = 2.1$ Hz), 8.43 (1H, ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 8.42-8.39 (1H, m), 8.38 (1H, ddd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.1$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 8.25-8.22 (1H, m), 7.67 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 7.61 (1H, t, $J = 8.3$ Hz), 6.82 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.19 (1H, bs), 5.86 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, overlapped), 5.86 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, overlapped), 5.76-5.72 (1H, m), 5.70-5.67

(1H, m), 4.23 (1H, d, $J = 14.1$ Hz), 3.63 (1H, d, $J = 14.1$ Hz), 3.49-3.45 (1H, m), 3.19 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 3.06-2.99 (1H, m), 2.82-2.74 (2H, m), 2.55 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz).

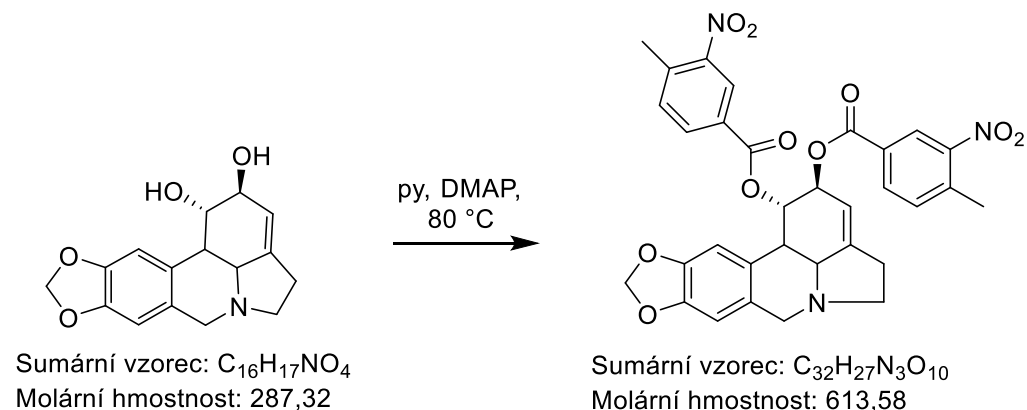
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

163.5, 163.2, 148.3, 148.2, 147.3, 146.5, 135.5, 131.5, 131.2, 129.7, 129.6, 129.4, 127.7, 125.6, 124.7, 124.7, 113.2, 107.5, 104.8, 101.0, 71.9, 70.5, 61.4, 56.7, 53.5, 40.9, 28.8.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -260,5$ (c 0.086, CHCl_3)

4.2.10. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(4-metyl-3-nitro)benzoyllykorinu (LC-76)



Obr. 50 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(4-metyl-3-nitro)benzoyllykorinu

43 mg lykorinu (150 μ mol) bylo rozpuštěno ve 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 100 μ l 4-metyl-3-nitrobenzoylchloridu (686 μ molu) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 80°C, míchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze To:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena. Bylo získáno 57 mg produktu ve formě žlutých krystalů. Výtěžek reakce byl 62%.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(4-metyl-3-nitro)benzoyllykorinu (LC-76)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

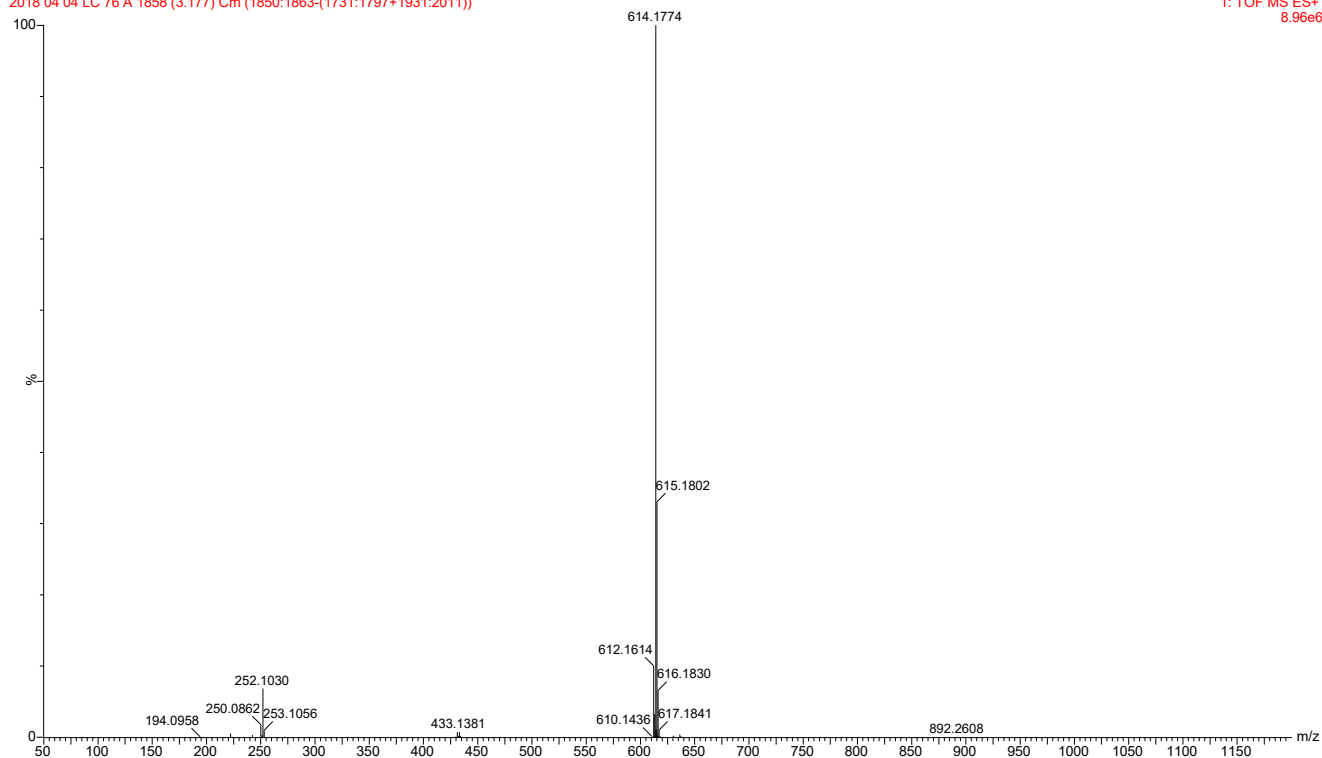
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 614,1774 (*m/z* teoretická – C₃₂H₂₇N₃O₁₀ [M+H]⁺ 614,1775)

614.1775

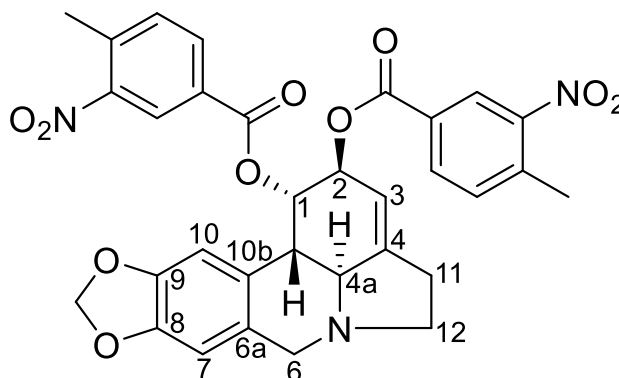
2018 04 04 LC 76 A 1858 (3.177) Cm (1850:1863-(1731:1797+1931:2011))

1: TOF MS ES+
8.96e6



Obr. 51 ESI-HRMS 1,2-di-*O, O'*-(4-methyl-3-nitro)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 52 Struktura 1,2-di-*O, O'*-(4-methyl-3-nitro)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

8.60 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.39 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.17 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.9$ Hz), 8.02 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.9$ Hz), 7.45 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 7.39 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.82 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.15 (1H, bs), 5.87 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, overlapped), 5.87 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, overlapped), 5.72-5.68 (1H, m), 5.68-5.65 (1H, m), 4.22 (1H, d, $J = 14.1$ Hz), 3.63 (1H, d, $J = 14.1$ Hz), 3.48-3.44

(1H, m), 3.16 (1H, d, $J= 10.5$ Hz), 3.00 (1H, d, $J= 10.5$ Hz), 2.80-2.74 (2H, m), 2.67 (3H, s), 2.62 (3H, s), 2.55 (1H, dt, $J= 8.8$ Hz, $J= 8.8$ Hz).

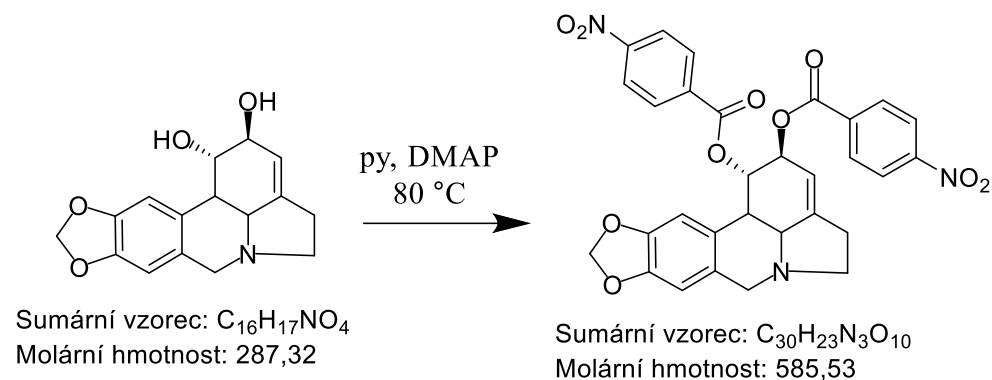
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

163.5, 163.3, 149.2, 149.2, 147.1, 146.5, 138.7, 138.7, 133.6, 133.6, 133.1, 133.0, 129.4, 129.1, 128.7, 125.9, 125.8, 125.8, 113.4, 107.4, 104.9, 101.0, 71.7, 70.3, 61.4, 56.7, 53.5, 40.9, 28.8, 20.6, 20.5.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 338,3$ (c 0.088, CHCl_3)

4.2.11. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorinu (LC-79)



Obr. 53 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorinu

46 mg lykorinu (160 μ mol) bylo rozpuštěno v 2 ml suchého pyridinu. Dále k němu bylo přidáno 45 mg 4-nitrobenzoylchloridu (243 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 80 °C, míchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve směsi chloroform:ethanol 1:1 a následně byla reakce chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze To:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí chloroform:ethanol 1:1 a odpařena do sucha. Bylo získáno 24 mg produktu ve formě žlutých krystalů. Výtěžek reakce byl 26 %.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorinu (LC-79)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmínek měření.

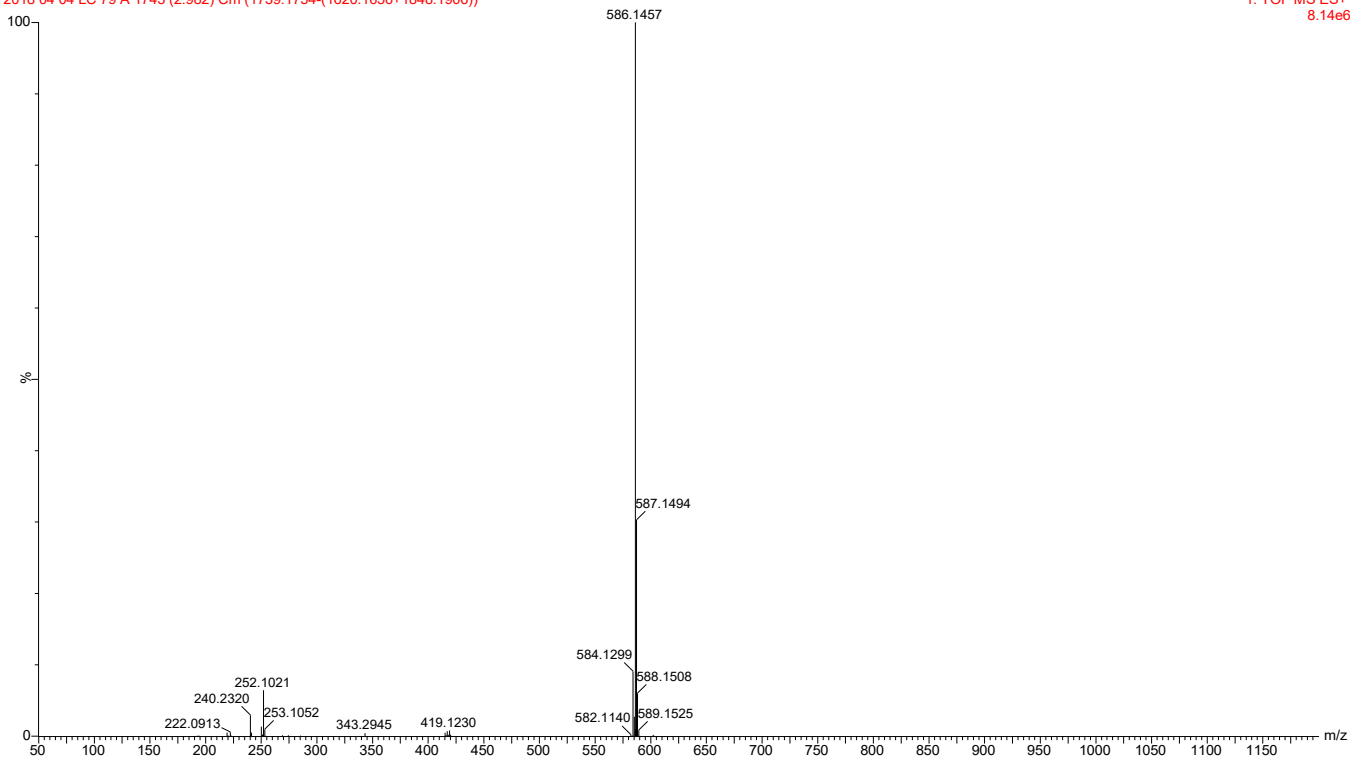
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální – 586,1457 (m/z teoretická – $C_{30}H_{23}N_3O_{10}$ $[M+H]^+$ 586,1462)

586.1462

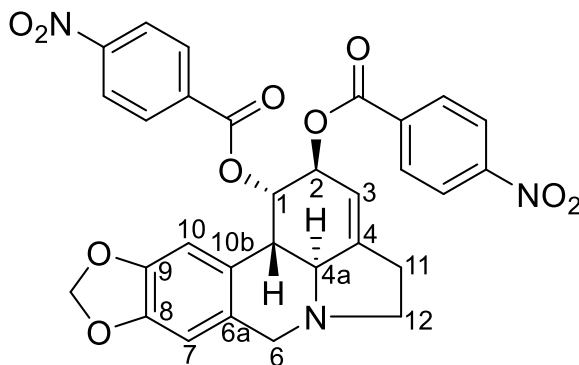
2018 04 04 LC 79 A 1743 (2.982) Cm (1739:1754-(1620:1656+1848:1906))

1: TOF MS ES+
8.14e6



Obr. 54 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 55 Struktura 1,2-di-*O,O'*-(4-nitro)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

8.32-8.29 (2H, m, AA'BB'), 8.27-8.22 (4H, m, AA'BB'), 8.08-8.04 (2H, m, AA'BB'), 6.81 (1H, s), 6.60 (1H, s), 6.16 (1H, bs), 5.88 (2H, d, $J = 13.9$ Hz), 5.75-5.72 (1H, m), 5.71-5.67 (1H, m), 4.25 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.64 (1H, d, $J = 14.2$ Hz), 3.49-3.46 (1H, m), 3.19 (1H, d, $J = 10.4$ Hz), 3.02 (1H, d, $J = 10.4$ Hz), 2.82-2.78 (2H, m), 2.55 (1H, dt, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.8$ Hz).

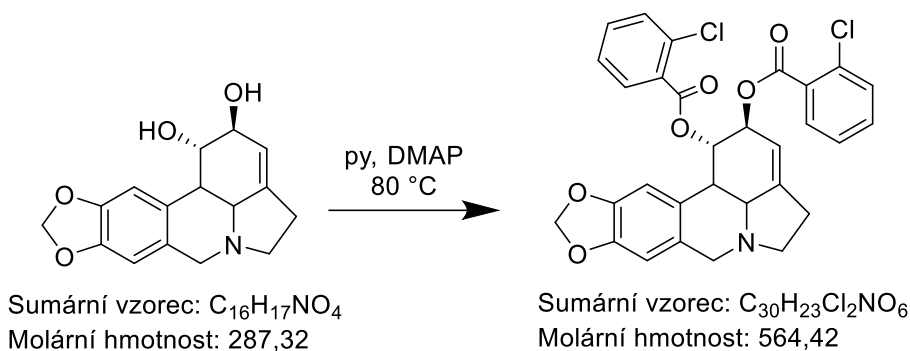
^{13}C NMR (125 MHz, δ , CDCl_3 , 25 °C):

163.7, 163.4, 150.7, 150.7, 147.3, 146.6, 135.1, 134.7, 131.0, 130.9, 129.4, 125.6, 123.6, 123.5, 113.2, 107.5, 104.7, 101.1, 71.8, 70.5, 61.5, 56.8, 53.6, 40.9, 29.7, 28.8.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = nezměřeno (nedostatečné množství látky)

4.2.12. Příprava 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorinu (LC-82)



Obř. 56 Schéma syntézy 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorinu

50 mg lykorinu (174 μ mol) bylo rozpuřtĚno ve 2 ml suchĚho pyridinu. Dále k nĚmu bylo přidáno 200 μ l 2-chlorobenzoylchloridu (1579 μ mol) a katalytické množství DMAP. Reakce byla zahřátá na 80°C, mĚchána 24 hodin a poté odpařena do sucha. Odparek byl rozpuřtĚn ve směsi ethyl-acetát:ethanol 1:1 a následně byla reakce chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze To:DEA 95:5. Zóna s produktem byla separována z preparační desky, promyta směsí ethyl-acetát:ethanol 1:1 a odpařena do sucha. Bylo získáno 22 mg produktu ve formĚ hnĚdé olejovité látky. VýtĚžek reakce byl 22%.

Strukturní analýza 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorinu (LC-82)

EI-MS studie:

Látka neionizovala za podmĚnek mĚření.

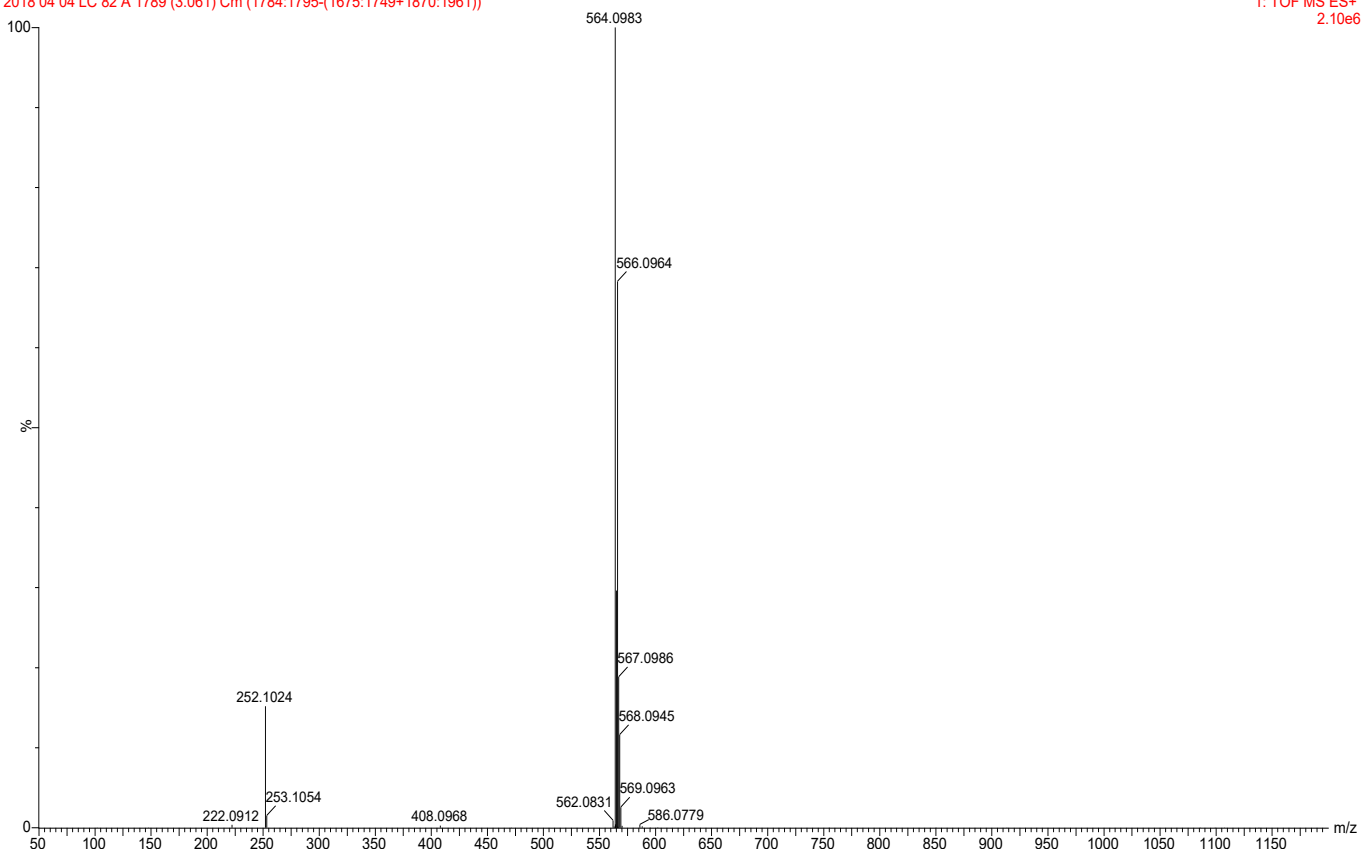
ESI-HRMS studie:

m/z experimentální 564,0983 (*m/z* teoretická – $C_{30}H_{23}Cl_2NO_6$ $[M+H]^+$ 564,0981)

564.0981

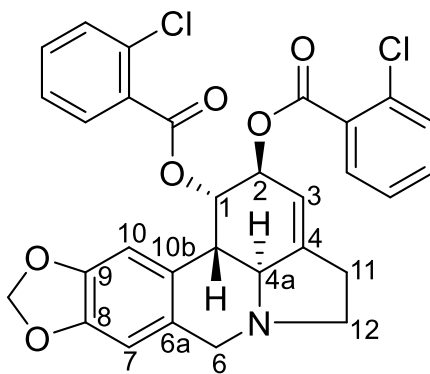
2018 04 04 LC 82 A 1789 (3.061) Cm (1784:1795-(1675:1749+1870:1961))

1: TOF MS ES+
2.10e6



Obr. 57 ESI-HRMS 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorinu

NMR studie:



Obr. 58 Struktura 1,2-di-*O,O'*-(2-chloro)benzoyllykorinu

^1H NMR (500 MHz, δ , CDCl_3 , 25°C):

7.88 (1H, dd, $J=7.8$, $J=1.5$ Hz), 7.65-7.61 (1H, m), 7.48-7.41 (2H, m), 7.39-7.36 (2H, m), 7.35-7.30 (1H, m), 7.27-7.23 (1H, m), 6.88 (1H, s), 6.58 (1H, s), 6.19 (1H, bs), 5.90 (1H, d, $J=8.3$ Hz, overlapped), 5.90 (1H, d, $J=8.3$ Hz, overlapped), 5.76-5.73 (1H, m), 5.73-5.69 (1H, m), 4.20

(1H, d, $J= 14.1$ Hz), 3.59 (1H, d, $J= 14.1$ Hz), 3.44-3.39 (1H, m), 3.17 (1H, d, $J= 10.2$ Hz), 3.04 (1H, d, $J= 10.2$ Hz), 2.76-2.68 (2H, m), 2.49 (1H, dt, $J= 8.8$ Hz, $J= 8.8$ Hz).

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

164.9, 164.4, 146.6, 146.6, 146.4, 134.0, 133.7, 132.8, 132.7, 131.7, 131.6, 131.1, 131.0, 129.8, 129.7, 129.2, 126.6, 126.5, 126.4, 113.6, 107.3, 105.1, 101.0, 71.8, 70.5, 61.5, 56.8, 53.6, 40.7, 28.8.

Optická otáčivost:

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 70,6$ (c 0.085, CHCl_3)

5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava polosyntetických derivátů

Připravené deriváty lykorinu i se svými výtěžky jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 9).

Tabulka 9 Připravené sloučeniny a jejich výtěžek

Číslo látky	Název sloučeniny	Výtěžek (%)
LC-37	1,2-di- <i>O,O'</i> -propionyllykorin	36 %
LC-37/a	2- <i>O</i> -propionyllykorin	np
LC-38	1,2-di- <i>O,O'</i> -isobutanoyllykorin	27 %
LC-38/a	2- <i>O</i> -isobutanoyllykorin	np
LC-50	1,2-di- <i>O,O'</i> -benzoyllykorin	17 %
LC-51	1,2-di- <i>O,O'</i> -(3-methyl)benzoyllykorin	44 %
LC-51/a	2- <i>O</i> -(3-methyl)benzoyllykorin	np
LC-65	1,2-di- <i>O,O'</i> -pentanoyllykorin	37 %
LC-66	1,2-di- <i>O,O'</i> -hexanoyllykorin	59 %
LC-69	1,2-di- <i>O,O'</i> -(2-nitro)benzoyllykorin	98 %
LC-71	1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-ethyl)benzoyllykorin	45 %
LC-75	1,2-di- <i>O,O'</i> -(3-nitro)benzoyllykorin	73 %
LC-76	1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-methyl-3-nitro)benzoyllykorin	62 %
LC-79	1,2-di- <i>O,O'</i> -(4-nitro)benzoyllykorin	26 %
LC-82	1,2-di- <i>O,O'</i> -(2-chloro)benzoyllykorin	22 %

Np = nepočítáno, vedlejší produkt reakce

5.2. Screening biologických aktivit

5.2.1 Cytotoxická aktivita

V následující tabulce (Tabulka 10) jsou shrnuty výsledky protinádorové aktivity připravených derivátů lykorinu vůči buněčným nádorovým liniím MOLT-4 (lidský T-lymfom), MCF-7 (lidské buňky rakoviny prsu), Jurkat (lidský T-lymfoblast), HeLa (lidský cervikální adenokarcinom), SAOS-2 (lidský osteosarkom), A2780 (lidský ovariální karcinom), A549 (lidský plicní karcinom), HT-29 (lidský adenokarcinom tlustého střeva), PANC-1 (buňky rakoviny slinivky) a

vůči zdravým buňkám MRC-5 (fetální lidský fibroblast). Prozatím bylo testováno pouze deset derivátů lykorinu. Bohužel ze získaných výsledků je viditelné, že ani jeden prozatím studovaný derivát lykorinu nevykazuje významnou toxicitu vůči nádorovým buňkám.

Tabulka 10 Hodnoty viability v % testovaných derivátů na vybrané buněčné linie.

látka	Viabilita v % (10 μ M)									
	MOLT-4	MCF-7	Jurkat	HeLa	SAOS-2	A2780	A549	MRC-5	HT-29	PANC
LC-37	69	108	108	101	104	133	104	85	92	95
LC-37/a	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
LC-38	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
LC-38/a	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
LC-50	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
LC-51	87	130	150	113	114	150	114	81	101	126
LC-51/a	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
LC-65	82	106	110	111	107	131	98	87	98	108
LC-66	80	86	118	123	107	113	99	93	95	102
LC-69	91	145	140	109	120	140	128	94	118	125
LC-71	79	126	146	121	121	141	119	106	120	128
LC-75	93	161	161	108	125	146	136	103	119	134
LC-76	100	140	154	120	125	141	130	97	120	137
LC-79	111	150	172	95	119	149	130	90	121	139
LC-82	93	149	175	108	118	155	132	97	124	139

nt = netestováno

5.2.2. Inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie se již dlouhodobě testují látky jak přírodního, tak polosyntetického původu na svou inhibici vůči erythrocytární acetylcholinesteráze, sérové butyrylcholinesteráze. V následující tabulce (Tabulka 11) jsou shrnuty výsledky inhibiční aktivity vůči AchE a BuchE připravených derivátů lykorinu. Prozatím bylo testováno osm derivátů. Dosud provedené měření nevykázalo zajímavou inhibiční aktivitu žádného z derivátů vůči AchE. Zajímavou inhibiční aktivitu vůči lidské butyrylcholinesteráze vykazuje pouze 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin (LC-50).

Tabulka 11 Hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů vůči HuAChE, HuBChE

látka	IC ₅₀ μM	
	HuAChE	HuBChE
lykorin	> 1000	> 1000
LC-37	935 ± 227	511 ± 71
LC-37/a	nt	nt
LC-38	301 ± 22	36,2 ± 3,8
LC-38/a	nt	nt
LC-50	171 ± 16	29,6 ± 6,8
LC-51	150 ± 21	>1000
LC-51/a	nt	nt
LC-65	nt	nt
LC-66	nt	nt
LC-69	146 ± 6	117 ± 7
LC-71	nt	nt
LC-75	149 ± 8	116 ± 6,58
LC-76	191 ± 16	264 ± 32
LC-79	357 ± 10	466 ± 82
LC-82	nt	nt

nt = prozatím netestováno (bude měřeno)

5.2.3 Antimalarická aktivita

V současné době probíhá testování antimalarické aktivity připravených sloučenin v rámci dlouhodobé spolupráce s Univerzitou v Lisabonu.

6. DISKUZE A ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo připraveno celkem patnáct derivátů lykorinu. Z toho bylo připraveno šest alifatických a devět aromatických esterů lykorinu. Látky byly připraveny reakcí lykorinu s anhydridem příslušné kyseliny v případě alifatických derivátů a s chloridem příslušné kyseliny v případě aromatických derivátů. Všechny reakce probíhaly v prostředí bezvodého pyridinu a kromě reakce LC-37 a LC-38 za přidání katalyzátoru dimethylaminopyridinu. Pro získání a přečištění připravených derivátů byla použita preparační TLC. Připravené látky byly identifikovány převážně pomocí MS, NMR a optické otáčivosti. Většina derivátů byla získána ve formě nažloutlých až žlutých krystalů, zbytek látek byl získán ve formě hnědých olejů. Výtěžky jednotlivých reakcí byly v dobré shodě s literaturou. Látky LC-37, LC-37a, LC-38 a LC 38a byly připraveny znovu⁶⁵ za účelem dalších biologických studií. Zbývající deriváty byly na Katedře farmaceutické botaniky připraveny poprvé. Z těchto látek byl pouze 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin připraven v rámci předchozích studií.^{28,55}

U všech látek se podařilo získat dostatečné množství di-derivátů, umožňující strukturní identifikaci a testování na protinádorovou a inhibiční aktivitu vůči AchE a BuchE. Pouze u látek LC-69 a LC-79 bude potřeba syntézu zopakovat z důvodu nedostačujícího množství látky pro změření optické otáčivosti. V některých případech během reakce vznikly dva až tři produkty reakce. V nejvyšší koncentraci vždy vznikal hlavní produkt reakce (di-derivát) a vedle něj i jeden nebo dva vedlejší produkty (C2 případně i C1 ester). Veškeré monoderiváty byly připraveny v tak malém množství, že některé byly pouze izolovány a podrobeny strukturní analýze, ale nebylo získáno dostatečné množství pro biologické studie. Separovány a identifikovány byly následující tři monoderiváty: LC37/a, LC38/a a LC51/a. Pro objasnění vztahů mezi strukturou a aktivitou bude třeba se v budoucnu pokusit o selektivní přípravu monoderivátů a přípravu etherových derivátů, které v buňce nepodléhají hydrolyze.^{28,49,50}

Většina získaných látek byla podrobena biologickým testům na protinádorovou aktivitu u buněčných linií MOLT-4, MCF-7, Jurkat, HeLa, SAOS-2, A2780, A549, MRC-5, HT-29 a PANC-1. Bohužel žádná z testovaných látek nevykázala výraznou protinádorovou aktivitu. Zbývající látky budou studovány v nejbližším možném termínu. Tyto výsledky jsou ve shodě s předchozími studiemi, kde lykorin byl vždy z pohledu cytotoxicity neaktivnější látkou v porovnání s připravenými deriváty.^{22,28,44,49,51}

Inhibice enzymů AchE a BuchE je důležitá v léčbě Alzheimerovy nemoci. Osm derivátů lykorinu bylo testováno na Katedře farmaceutické botaniky na inhibiční aktivitu vůči AchE a BuchE. Ostatní deriváty budou opět studovány v nejbližší možné době. Zajímavou inhibiční aktivitu vykazoval pouze 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin ($IC_{50} = 29,6 \pm 6,8$; LC-50), jehož aktivita vůči AchE je srovnatelná s daty uvedenými v literatuře. Inhibiční potenciál 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorinu vůči BuchE ($IC_{50} = 29,6 \pm 6,8$) je nižší, než inhibiční potenciál stejné látky, který byl získán v předchozí studii ($IC_{50} = 7,72 \pm 0,26$).⁵⁵ Zde je nutné zmínit, že nižší inhibiční aktivita vůči BuchE, která byla získána v naší studii, může být zapříčiněna použitím enzymu odlišného původu. V rámci studie z roku 2012⁵⁵ byl v BuchE studii použit komerčně dostupný enzym (BuchE) izolovaný z koňského séra. V naší studii byl použit enzym izolovaný z lidské plazmy. Na základě výsledků může být 1,2-di-*O,O'*-benzoyllykorin výchozí látkou pro další strukturní modifikace za účelem přípravy aktivnějších inhibitorů vůči AchE a BuchE. Ostatní deriváty vykazaly pouze nízkou biologickou aktivitu.

V současné době také probíhá v rámci spolupráce studium protimalarické aktivity u připravených derivátů lykorinu a je také plánováno studium antimikrobiální aktivity.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Hartl J., Palát K.: *Farmaceutická chemie I.*, str.7. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha 2011.
2. Jahodář L.: *Farmakobotanika*. Univerzita Karlova v Praze- Nakladatelství Karolinum, Praha 2011.
3. Cragg G. M., Grothaus P.G., Newman D. J.: Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews* 109, 3012 - 3043 (2009).
4. Tan G. T., Gylenhaal C., Soejarto D. D.: Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Current Drug Targets* 7, 265 - 277 (2006).
5. *Zemřelí 2015*. ÚZIS ČR, Praha 2016. ISBN 978-80-7472-157-1. ISSN 1210-9967. <http://www.uzis.cz/node/7688>, staženo 16. července 2017.
6. Hartwell J. L.: Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 32, 78 - 107 (1969).
7. Bastida J., Berkov S., Torras L., Pigni L. B., de Andrade J. P., Martínez V., Codina C., Viladomat F.: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2, 65 - 100 (2011).
8. Van Goietsenoven G., Andolfi A., Lallemand B., Cimmino A., Lamoral-Theys D., Gras T., Abou-Donia A., Dubois J., Lefranc F., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products* 73, 1223 - 1227 (2010).
9. Česká alzheimerovská společnost, o.p.s.. dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/>, staženo 16.7.2017
10. Ziegler J., Facchini P. J.: Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59, 735 - 769 (2008).
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. Takos A. M., Rook F.: Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 11713 - 11741 (2013).
13. Kornienko A., Evidente A.: Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews* 108, 1982–2014 (2008).
14. Takhtajan A.: *Flowering plants*. 2nd ed. New York. Springer science + business media B. V. 2009.
15. Angiosperm phylogeny website. [online]. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Staženo 1. 3. 2018.
16. World Public Library [online]. Dostupné z: <http://www.worldlibrary.org/articles/eng/Amaryllidaceae>. Staženo 2. 3. 2018
17. (a) *Amaryllis belladonna* - Wikipedia. [online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Amaryllis_belladonna. Staženo 2. 3. 2018.
(b) *Crinum* - Wikipedia. [online]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Crinum>.

Staženo 2. 3. 2018. (c) Narcis (rostlina) – Wikipedie. [online]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Narcis_\(rostlina\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Narcis_(rostlina)). Staženo 2. 3. 2018. (d) Sněžěnka – Wikipedie. [online]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Sněženka>. Staženo 2.3.2018 (e) Bledule – Wikipedie. [online]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bledule>. Staženo 2. 3. 2018.

18. Vaněčková N., Hošťálková A., Šafratová M., Kuneš J., Hulcová D., Hrabínová M., Doskočil I., Štěpánková Š., Opletal L., Nováková L., Jun D., Chlebek J., Cahlíková L.: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances* 6, 80114 - 80120 (2016).

19. Cao Z., Yang P., Zhou Q.: Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China Chemistry* 10, 1382 - 1391 (2013).

20. Cahlíková L.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva, Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.

21. He M., Qu Ch., Gao O., Hu X., Hong X.: Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Advances* 5, 16562 - 16574 (2015).

22. Lamoral-Theys D., Andolfi A., Van Goietsenoven G., Cimmino A., Le Calvé B., Wauthoz N., Mégalizzi V., Gras T., Bruyère C., Dubois J., Mathieu V., Kornienko A., Kiss R., Evidente A.: Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant anti-tumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: An investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry* 22, 6244 - 6256 (2009).

23. Chongshan W., Qiongren W., Xiezhao L., Zhong J., Peng X., Naijin X., Abai X., Yawen X., Shaobo Z., Junxia Z., Chunxiao L.: Lycorine induces apoptosis of bladder cancer T24 cells by inhibiting phospho-Akt and activating the intrinsic apoptotic cascade. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483, 197 - 202 (2017).

24. Meichun H., Shihong P., Yundong H., Min Q., Xiaonan C., Yajing X., Mingyao L., Zhengfang Y.: Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget* 6, 15348 - 15361 (2015).

25. Doskočil I., Hošťálková A., Šafratová M., Benešová N., Havlík J., Havelek R., Kuneš J., Královec K., Chlebek J., Cahlíková L.: Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* 13, 394 - 398 (2015).

26. Liu J., Hu W. X., 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).

27. Xiao-shan L., Jikai J., Xiao-yang J., Ying-e W., Jing-hua L., Ying-mu C.: Lycorine induces apoptosis and down-regulation of Mcl-1 in human leukemia cells. *Cancer Letters* 274, 16 - 24 (2009).

28. Evdokimov N. M., Lamoral-Theys D., Mathieu V., Andolfi A., Frolova L. V., Pelly S. C., van Otterlo W. A. L., Magedov I. V., Kiss R., Evidente A., Kornienko A.: In search of cytostatic agent derived from the alkaloid lycorine: Synthesis and growth inhibitory properties of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 7252 - 7261 (2011).

29. Li L., Dai H. J., Ye M., Wang S. L., Xiao X. J., Zheng J., Chen H. Y., Luo Y. H., Liu J.: Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell International* 12, 49 - 55 (2012).
30. Li Y., Liu J., Tang L. J., Shi Y. W., Ren W., Hu W., X.: Apoptosis induced by lycorine in KM3 cells is associated with the G0/G1 cell cycle arrest. *Oncology Reports* 17, 377 - 384 (2007).
31. Ji Y., Yu M., Qi Z., Cui D., Xin G., Wang B., Jia W., Chang L.: Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway. *Saudi Pharmaceutical Journal* 25, 633 - 637 (2017).
32. Cimmino A., Masi M., Evidente M., Superchi S., Evidente A.: Amyryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality*. 2017.
33. Ghosal S., Kumar Y., Singh S.: Glucosyloxy alkaloids from *Pancreatium biflorum*. *Phytochemistry* 23, 1167 - 1171 (1984).
34. Arrigoni O., Arrigoni Liso R., Calabrese G.: Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature* 256, 513 - 514 (1975).
35. Jimenez A., Santos A., Alonso G., Vazquez D.: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids. *Biochimica et Biophysica Acta* 425, 342-348 (1976).
36. Van Goietsenoven G., Hutton J., Becker J.-P., Lallemand B., Robert F., Lefranc F., Pirker C., Vandebussche G., Van Antwerpen P., Evidente A., Berger W.: Targeting of eEF1A with Amaryllidaceae isocarboxystyrils as a strategy to combat melanomas. *FASEB Journal* 24, 4575 – 4584 (2010).
37. Cahlíková L., Hrabínová M., Kulhánková A., Benešová N., Chlebek J., Jun D., Novák Z., Macáková K., Kuneš J., Kuča K., Opletal L.: Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications* 8, 1541 - 1544 (2013).
38. Shen J-W., Ruan Y., Ren W., Ma B-J., Wang X-L., Zheng C-F.: Lycorine: A potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 354 - 358 (2014).
39. Giordani R. B., Weizenmann M., Rosemberg D. B., De Carli G. A., Bogo M. R., Zuanazzi J. A. S., Tasca T.: *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase nad ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International* 59, 226 - 231 (2010).
40. Giordani R. B., de Brum Vieira P., Weizenmann M., Rosemberg D. B., Souza A. P., Bonorino C., De Carli G. A., Bogo M. R., Zuanazzi J. A., Tasca T.: Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* 72, 645 - 650 (2011).
41. Sener B., Orhan I., Satayavivad J.: Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 17, 1220 - 1223 (2003).
42. Saltan Çitoğlu G., Bahadır Acıkara Ö., Sever Yılmaz B., Özbek H.: Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia* 83, 81 – 87 (2012).

43. Schrader K. K., Andolfi A., Cantrell C. L., Cimmino A., Duke S. O., Osbrink W., Wedge D. E., Evidente A.: A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential products for pest management. *Chemistry & Biodiversity* **7**, 2261 - 2280 (2010).
44. Nair J. J., van Staden J.: Cytotoxicity studies of lycorine alkaloids of the Amaryllidaceae. *Natural Products Communications* **9**, 1193 - 1210 (2014).
45. Evidente A., Cicala M. R., Randazzo G., Riccio R., Calabrese G., Liso R., Arrigoni O.: Lycorine structure-activity relationships. *Phytochemistry* **22**, 2193 - 2196 (1983).
46. Evidente A., Arrigoni O., Liso R., Calabrese G., Randazzo G.: Further experiments on structure-activity relationships among the lycorine alkaloids. *Phytochemistry* **25**, 2739 - 2743 (1986).
47. Evidente A., Iasiello I., Randazzo G.: An improved method for the large-scale preparation of lycorine. *Chemistry and Industry (London)*, 348 - 349 (1984).
48. Evidente A., Randazzo G., Surico G., Lavermicocca P., Arrigoni O.: Degradation of lycorine by *Pseudomonas* species strain ITEM 311. *Journal of Natural Products* **48**, 564 - 570 (1985).
49. Wang P., Yuan H-H., Zhang X., Li Y-P., Shang L-Q., Yin Z.: Novel lykorine derivatives as anticancer agents: synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules* **19**, 2469 - 2480 (2014).
50. McNulty J., Nair J. J., Bastida J., Pandey S., Griffin C.: Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. *Phytochemistry* **70**, 913 - 919 (2009).
51. Dasari R., Banuls L. M. Y., Masi M., Pelly S. C., Mathieu V., Green I. R., Van Otterlo W. A. L., Evidente A., Kiss R., Kornienko A.: C1,C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: Retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, 923 - 927 (2014).
52. Laboratoř experimentální medicíny [online]. [citováno 8. 3. 2018]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test.htm>.
53. Lamoral-Theys D., Decaestecker C., Mathieu V., Dubois J., Kornienko A., Kiss R., Evidente A., Pottier L.: Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **10**, 41 - 50 (2010).
54. McNulty J., Nair J. J., Little J. R. L., Brennan J. D., Bastida J.: Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 5290 - 5294 (2010).
55. Wang Y-H., Wan Q-L., Gu C.-D., Luo H.-R., Long C.-L.: Synthesis and biological evaluation of lycorine derivatives as dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chemistry Central Journal* **6**, e (1-6) (2012).
56. Cedrón J. C., Gutiérrez D., Flores N., Ravelo G. A., Estévez-Braun A.: Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, 4694 - 4701 (2010).
57. 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 Letters* **16**, 10182 - 10189 (2008).

58. Wang P., Li L.-F., Wang Q.-Y., Shang L.-Q., Shi P.-Y., Yin Z.: Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives. *ChemMedChem* **9**, 1522 – 1533 (2014).
59. Chen D., Cai J., Cheng J., Jing C., Yin J., Jiang J., Peng Z., Hao X.: Design, synthesis and structure-activity relationship optimization of lycorine derivatives for HCV inhibition. *Scientific Reports* **5**, 14972 - 14981 (2015).
60. Guo Y., Wang Y., Cao L., Wang P., Qing J., Zheng Q., Shang L., Yin Z., Sun Y.: A conserved inhibitory mechanism of lycorine derivative against Enterovirus and Hepatitis C virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 913 - 924 (2016)
61. Giordani R. B., Junior C. O. R., de Andrade J. P., Bastida J., Zuanazzi J. A. S., Taska T., de Almeida M. V.: Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chemical Biology & Drug Design* **80**, 129 - 133 (2012).
62. 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).
63. Šafratová. Biologicky aktivní metabolity rostlin 10. Alkaloidy *Fumaria officinalis* a jejich biologická aktivita. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2013.
64. 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).
65. Kavková Z.: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich analoga jako potenciální léčiva, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova choroba
Ach	acetylcholin
AchE	acetylcholinesteráza
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	protein, aktivující apoptotický signál
BnBr	benzylbromid
BoC ₂ O	di- <i>terc</i> -butyl dikarbonát
BuchE	butyrylcholinesteráza
BzCl	benzoylchlorid
CDK4	cyklin-dependentní kináza 4
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -chlorperoxybenzoová kyselina
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylcarbodiimid
DCM	dichlormethan
cHx	cyklohexan
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DEA	diethylamin
DMAP	dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMP	Dess-Martinovo činidlo
DMSO	dimethylsulfoxid
EGF	epidermální růstový faktor
Fas	receptor smrti
FasL	Fas ligand
HDAC	histondeacetyláza
HMDSO	hexametyldisiloxan
IC ₅₀	inhibiční koncentrace
IP ₃	inositol-tri-fosfát
JAK/STAT	buněčná signalizační cesta
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1

MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
NMO	<i>N</i> -methylmorfolin- <i>N</i> -oxide
PivCl	pivaloylchlorid
Ph	fenyl
PhCH ₃	benzyl
POP	prolyl-oligopeptidáza
<i>i</i> -Pr ₃ SiCl	<i>tri</i> -isopropylsilylchlorid
Pt/C	katalyzátor platina na aktivním uhlí
Py	pyridin
p-21	faktor, brání vstupu buněk do dalšího buněčného cyklu
p-53	transkripční faktor v buňce
STAT3	signal transducer and activator of transcription
STD	sexuálně přenosné onemocnění
TBAF	<i>tetra-N</i> -butylammonium fluoride
TBAI	<i>tetra-N</i> -butylammonium jodid
TBS	<i>terc</i> -butyldimethylsilyl
TBSCl	<i>terc</i> -butyldimethylsilyl chlorid
THF	tetrahydrofuran
TIPS	<i>terc</i> -isopropylsilyl
To	toluen
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TsOH	Kyselina <i>p</i> -toluensulfonová
tRNA	transferová ribonukleová kyselina

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Kamila Lipovská

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

Název diplomové práce: Příprava derivátů lykorinu a jejich biologická aktivita

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů biologicky aktivních alkaloidů. Lykorin je fenantridinový alkaloid izolovaný z různých druhů čeledi Amaryllidaceae, kterému je věnována značná pozornost z důvodu jeho významné biologické aktivity. Nejvýznamnější jsou jeho protinádorové vlastnosti, které byly dosud testovány *in vitro* a *in vivo* na různých typech nádorových buněk. Lykorin vykazuje i další biologické aktivity, mezi které patří antivirová, antibakteriální, antifungální, antiplasmodiální, antioxidační, protizánětlivá, antifidantní, inhibiční aktivita vůči biosyntéze kyseliny askorbové a inhibiční aktivita vůči RNA. Dosud byl lykorin použit pro přípravu velkého množství derivátů modifikací různých funkčních skupin v jeho molekule a hodnocen na protinádorovou aktivitu, na inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám, antiplasmodiální, antitrypanosomální, antivirovou, antitrichomonální aktivitu. Tato práce se zabývá přípravou lykorinových derivátů a jejich biologickou aktivitou v souvislosti s léčbou Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění. Bylo připraveno patnáct esterových derivátů lykorinu. Připravené deriváty byly identifikovány pomocí MS, NMR a optické otáčivosti. Některé z derivátů byly testovány na cytotoxickou aktivitu na vybraných nádorových a nenádorových buněčných liniích. Bohužel, žádná z připravených látek nevykázala zajímavou cytotoxicitu. V rámci studie inhibičního potenciálu AchE/BuchE, byla zjištěna zajímavá BuchE inhibiční aktivita pouze u derivátu 1,2-*O,O'*-dibenzoyllykorinu ($IC_{50} = 29.65 \pm 6.81 \mu M$).

Klíčová slova: alkaloid, lykorin, deriváty, biologická aktivita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Kamila Lipovská

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

Title of Diploma thesis: Preparation of lycorine derivatives and their biological activity

The plants of the Amaryllidaceae family are one of the most important sources of biologically active alkaloids. Lycorine, a phenanthridine alkaloid, isolated from various species of the Amaryllidaceae plant family, has attracted considerable attention due to its promising biological activities. Specifically, its anticancer properties have been evaluated *in vitro* and *in vivo* in various preclinical models of human cancers. Further biological effects manifested by lycorine are: antiviral, antibacterial, antifungal, antiplasmodial, anti-oxidant, anti-inflammatory and insect antifeedant effects, as well as ascorbic acid biosynthesis and RNA inhibitory activity. So far, lycorine was used for preparation of many derivatives by modification of different functional groups in its molecule, and screened for a various biological activities such as anticancer activity, inhibition of cholinesterases, antiplasmodial, antitrypanosomal, antiviral and anti-*Trichomonas vaginalis* activity. The present work deals with the preparation of lycorine derivatives and their biological activity connected to the treatment of Alzheimer's disease and anticancer activity. Fifteen ester lycorine derivatives were prepared. The chemical structures were elucidated by MS, NMR experiments and optical rotation. Some of the prepared compounds were screened for their cytotoxic activity on a panel of selected cancerous and noncancerous cell lines. Unfortunately, none of the tested substances has shown required toxicity. In the AchE/BuchE inhibition potential study, interesting BuchE inhibitory activity has been demonstrated only by 1,2-di-*O,O'*-benzoylycorine ($IC_{50} = 29.65 \pm 6.81 \mu M$).

Key words: alkaloid, lycorine, derivatives, biological activity