

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STRUKTURNÍ OBMĚNY HAEMANTHAMINU

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

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

Hradec Králové, květen 2022

Jitka Babcová

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

STRUCTURAL MODIFICATION OF HAEMANTHAMINE

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

Head of department: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, May 2022

Jitka Babcová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velice poděkovat prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za vřelý přístup, odborné vedení a za poskytnuté materiály pro vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Ing. Rozálii Peřinové za pomoc při práci v laboratoři a zpracování získaných výsledků, PharmDr. Ondřeji Jandourkovi, Ph.D., RNDr. Kláře Konečné, Ph.D., Idě Dufkové a Ing. Janě Vackové a Katedře biologických a lékařských věd za změření antimykobakteriální a antibakteriální aktivity připravených derivátů, a také PharmDr. Daniele Hulcové, PhD. za změření inhibiční aktivity derivátů vůči cholinesterázám a samozřejmě také celému kolektivu Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za příjemné pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat za finanční podporu Specifickému vysokoškolskému výzkumu SVV 260 548.

PROHLÁŠENÍ

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

Tato práce byla zpracována za podpory projektu SVV 260 548.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. Čeleď Amaryllidaceae	12
3.2. Amaryllidaceae alkaloidy a jejich biosyntéza	13
3.3. Alkaloidy haemanthaminového a krininového strukturního typu	16
3.4. Biologická aktivita haemanthaminu a jeho přírodních derivátů	18
3.4.1. Protinádorová aktivita	18
3.4.2. Další biologická aktivita	23
3.5. Biologická aktivita derivátů haemanthaminu	27
3.5.1. Protinádorová aktivita	27
3.5.2. Inhibice AChE, BuChE a GSK-3 β	31
3.5.3. Antimalarická aktivita	35
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1. Chemikálie, materiál a metody	40
4.1.1. Izolace haemanthaminu	40
4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla	40
4.1.3. Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii	41
4.1.4. Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografii	41
4.2. Strukturní analýza připravených derivátů	41
4.2.1. GC-MS analýza	41
4.2.2. ESI-HRMS analýza	42
4.2.3. NMR analýza	42
4.2.4. Optická otáčivost	42
4.3. Metody pro screening biologických aktivit připravených derivátů	43
4.3.1. Stanovení <i>in vitro</i> inhibiční aktivity derivátů vůči hAChE a hBuChE	43
4.3.2. Stanovení <i>in vitro</i> antimykobakteriální aktivity	43
4.3.3. Stanovení <i>in vitro</i> antifungální a antibakteriální aktivity	43
4.4. Příprava semisyntetických derivátů haemanthaminu a jejich strukturní identifikace	44
4.4.1. Příprava 11- <i>O</i> -(4-pentylbenzoyl)haemanthaminu (DP1)	44
4.4.2. Příprava 11- <i>O</i> -(4-hexylbenzoyl)haemanthaminu (DP2)	45
4.4.3. Příprava 11- <i>O</i> -(4-heptylbenzoyl)haemanthaminu (DP3)	46
4.4.4. Příprava 11- <i>O</i> -(4-decylbenzoyl)haemanthaminu (DP4)	47
4.4.5. Příprava 11- <i>O</i> -(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthaminu (RP-1)	48
4.4.6. Příprava 11- <i>O</i> -(4- <i>terc</i> butylbenzoyl)haemanthaminu (RP-18)	49
4.4.7. Příprava 11- <i>O</i> -(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthaminu (RP-23)	51
4.4.8. Příprava 11- <i>O</i> -(1-naftoyl)haemanthaminu (LC-149)	52
4.4.9. Příprava 11- <i>O</i> -(2-naftoyl)haemanthaminu (LC-148)	53
4.4.10. Příprava 11- <i>O</i> -(4-butylbenzoyl)haemanthaminu (LC-155)	54
4.4.11. Příprava 11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-107)	55
4.4.12. Příprava 11- <i>O</i> -(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-59)	56
4.4.13. Příprava 11- <i>O</i> -(4- <i>terc</i> butylbenzyl)haemanthaminu (DP5)	57

4.4.14. Příprava 11- <i>O</i> -(4-isopropylbenzyl)haemanthaminu (DP6)	58
5. VÝSLEDKY	60
5.1. Příprava semisyntetických derivátů haemanthaminu	60
5.2. Screening biologických aktivit	60
5.2.1. Inhibiční aktivita derivátů vůči <i>h</i> AChE a <i>h</i> BuChE a jejich přestup přes HEB	60
5.2.2. Antimykobakteriální aktivita připravených derivátů	61
5.2.3. Antifungální a antibakteriální aktivita připravených derivátů	62
6. DISKUZE A ZÁVĚR	64
7. POUŽITÁ LITERATURA	66
ABSTRAKT	
ABSTRACT	

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAs	amarylkovité alkaloidy
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba
AGS	adenokarcinom žaludku
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
AIV	virus ptačí chřipky
A2780	ovariální karcinom
A549	adenokarcinom plic
ATCC	American Type Culture Collection
B16F10	myší melanom
BuChE	butyrylcholinesteráza
BT-549	karcinom prsu
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
Caco2	karcinom střev
CCM	Czech Collection of Microorganism
CC ₅₀	cytotoxická koncentrace
<i>C.d.</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C.g.</i>	<i>Candida glabrata</i>
CEM	akutní lymfoblastická anémie
CK	<i>Candida krusei</i>
CNS	centrální nervový systém
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
COLO-201	karcinom střev
CT	<i>Candida tropicalis</i>
cv.	kultivar
DMAP	dimethylaminopyridin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DSM	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	efektivní koncentrace
EC ₉₀	efektivní koncentrace
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EO21	esofageální karcinom
GSK-3β	glykogen syntáza kináza 3β
<i>hAChE</i>	acetylcholinesteráza lidského původu
<i>hBuChE</i>	lidská sérová butyrylcholinesteráza
HeLa	cervikální karcinom

HepG2	hepatocelulární karcinom
HIV-1	vir lidské imunodeficiency 1
Hs683	oligodendrogliom
HT-29	kolorektální karcinom
H5N1	virus influenza A
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
ID ₅₀	inhibiční dávka
Jurkat	akutní leukémie T-lymfocytů
<i>KP</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
K562	chronická myeloidní leukémie
<i>L.e.</i>	<i>Lodderomyces elongiosporus</i>
MCF-7	karcinom prsu
MIC ₈₀	minimální inhibiční koncentrace
MFC	minimální fungicidní koncentrace
MOLT-4	akutní lymfoblastická anémie
MRC-5	plicní lidský fibroblast
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid)
MTT test	kolorimetrická metoda k hodnocení viability, proliferace a cytotoxicity buněk
NBS	N-bromsukcinimid
N4OMT	norbelladin-4'-O-methyltransferáza
p-53	buněčný transkripční faktor
<i>PA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAL	fenylalanin-lyáza
PANC-1	karcinom slinivky břišní
POP	prolyloligopeptidáza
RNA	ribonukleová kyselina
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAOS-2	osteosarkom
SB-415256	syntetický derivát arylindolemaleimidu
SEM	směrodatná odchylka
SI	index selektivity
SKMEL	melanom
SW1573	karcinom plic
<i>Ti</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
T47-D	karcinom prsu
TYDC	tyrosindekarboxyláza
U373	glioblastom
WiDr	karcinom tračnicku
WST-1	(4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát
5123tc	hepatocelulární karcinom

1. ÚVOD

Rostliny se pro své léčebné účinky využívají v tradičním léčitelství již od dávných dob. První zmínky o využívání léčivých vlastností rostlin pochází již z období 5 000 let př. n. l. a jsou uchované na sumerské hliněné desce v Nippuru, dále pak ve Starém zákoně, v egyptských papyrech, v knihách starověkých řeckých i římských velikánů. U mnoha rostlin, které byly v minulosti tradičně využívány k léčbě různých onemocnění, byly potvrzeny léčebné účinky vědeckými metodami a mnoho z nich vstoupilo do oficiálních lékopisů a jsou používány i v současnosti.¹

Biologická aktivita rostlin je spojována s přítomností obsahových látek, které jsou klasifikovány do dvou základních skupin: primární metabolity a sekundární metabolity. Zatímco primární metabolity je možné nalézt prakticky v každém rostlinném druhu, sekundární metabolity se vyznačují specifickým výskytem. Mezi základní typy sekundárních metabolitů patří alkaloidy, glykosidy, terpeny a fenolické sloučeniny.^{2,3,4}

Mezi nejvýznamnější sekundární metabolity z pohledu jejich výskytu, ale i biologické aktivity patří bezesporu alkaloidy. Jedná se o přírodní organické látky obsahující obvykle dusík v heterocyklickém kruhu. Biosynteticky jsou alkaloidy většinou odvozeny z různých aminokyselin. Vyskytují se především ve vyšších rostlinách, ale byly prokázány také v kapradřorostech a houbách. U živočichů jsou alkaloidy vzácné – mohou to být strukturní modifikace látek přijímaných rostlinnou potravou, anebo je živočišný organismus syntetizuje z jednoduchých prekursorů jako je tomu například v sekretech žláz mloka.⁵

Jedním z důležitých zdrojů alkaloidů je rostlinná čeleď Amaryllidaceae. Nejznámějším amaryllkovitým alkaloidem (AAs) je galanthamin, původně izolovaný z rostliny *Galanthus woronowii*. Jedná se o inhibitor acetylcholinesterázy, který se od roku 2001 klinicky využívá při terapii degenerativních změn centrálního nervového systému a k léčbě různých typů demencí, zejména pak k léčbě Alzheimerovy demence (AD).⁶ Zmínky o využití rostliny *Galanthus woronowii* v lidovém léčitelství pochází z 50. let 20. století. Odvar z cibulí této rostliny byl využíván na Kavkaze k léčbě dětské obrny.⁷ Úplně první zmínky o využití rostlin čeledi Amaryllidaceae k léčebným účelům se datují do doby působení Hippokrata z Kósu, který již ve 4. století před naším letopočtem využil extrakt z *Narcissus poeticus* na bázi olejové emulze k léčbě nádoru v oblasti dělohy. V roce 1877 byl izolován z rostliny *Narcissus*

pseudonarcissus L. první amarylkovitý alkaloid lykorin⁸, jehož struktura byla objasněna v roce 1956 japonskou pracovní skupinou Nagawaka a spol.⁹

Rostlinná čeleď Amaryllidaceae a její alkaloidy představují zajímavý zdroj přírodních látek potenciálně využitelných v terapii onemocnění různého charakteru. Čeleď si získala pozornost různých vědeckých skupin po celém světě zejména po roce 2001, kdy byl alkaloid galanthamin schválen pro terapii AD. Jednou z vědeckých skupin je i pracovní skupina ADINACO Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která se zabývá zejména studiem a vyhledáváním látek potenciálně využitelných v léčbě AD, ale i maligních a dalších onemocnění. Díky výzkumu posledních let bylo zjištěno, že i další AAs vykazují široké spektrum biologických aktivit.¹⁰ Vzhledem k neustálému technologickému a vědeckému pokroku je nyní výzkum rostlin a jejich obsahových látek stále snazší. Přírodní látky dokážeme z rostlin izolovat, určovat jejich přesnou chemickou strukturu, poukazovat díky tomu na vztah struktury a účinku a vyvozovat tak další vhodné obměny molekul, které by mohly vést např. k lepší účinnosti, ke snížení toxicity nebo k prodloužení účinku. Vedle již zmíněných alkaloidů galanthaminu a lykorinu je věnována mimo jiné pozornost i haemanthaminu, alkaloidu, o kterém pojednává tato diplomová práce. Předmětem této diplomové práce je příprava semisyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu, jejich strukturní analýza a screeningové testování biologických aktivit.

2. CÍL PRÁCE

1. Provedení rešerše v odborné literatuře týkající se alkaloidu haemanthaminu a jeho biologické aktivity.
2. Příprava semisyntetických derivátů haemanthaminu.
3. Strukturní identifikace připravených derivátů.
4. Příprava látek pro screeningové testování biologických aktivit.
5. Sepsání a obhájení diplomové práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Čeleď Amaryllidaceae

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace Amaryllidaceae¹¹

Říše	rostliny (Plantae)
Podříše	cévnaté rostliny (Tracheophyta)
Oddělení	krytosemenné (Magnoliophyta)
Třída	jednoděložné (Liliopsida)
Řád	chřestotvaré (Asparagales)
Čeleď	amarylkovité (Amaryllidaceae)
Podčeledi	Agapantoideae Allioideae Amaryllioideae

Čeleď Amaryllidaceae čítá přibližně 1100 druhů rostlin klasifikovaných do 85 rodů.¹⁰ Jedná se o jednoděložné vytrvalé byliny s podzemními cibulemi, oddenky nebo cibulovými hlízkami. Stonek těchto rostlin je bezlistý a tvoří ho stopka nebo stvol. Listy jsou přízemní, úzké a většinou čárkovité, květy bývají jednotlivé, květenství jsou zpravidla šroubelovitá nebo hroznovitá, květy jsou oboupohlavné se spodním semeníkem, okvětí je tvořeno z 6 lístků. Plodem rostlin této čeledi je tobolka nebo bobule.¹²

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou typické svým výskytem v oblasti tropů, subtropů a nejvíce se s nimi setkáváme v oblasti Jižní Ameriky a Jižní Afriky. Mohou se vyskytovat i v oblastech s mírnějším podnebím, například ve střední a Jižní Evropě. Řada zástupců čeledi je pěstována pro okrasné účely (*Amaryllis*, *Lycoris*, *Hippeastrum*, *Agapanthus*, *Clivia*, *Eucharis*, *Nerine*, *Scadoxus* a další). V České republice se můžeme setkat se zástupci rodů sněženka (*Galanthus*), bledule (*Leucojum*) a narcis (*Narcissus*)(Obr. 1).^{8,13}



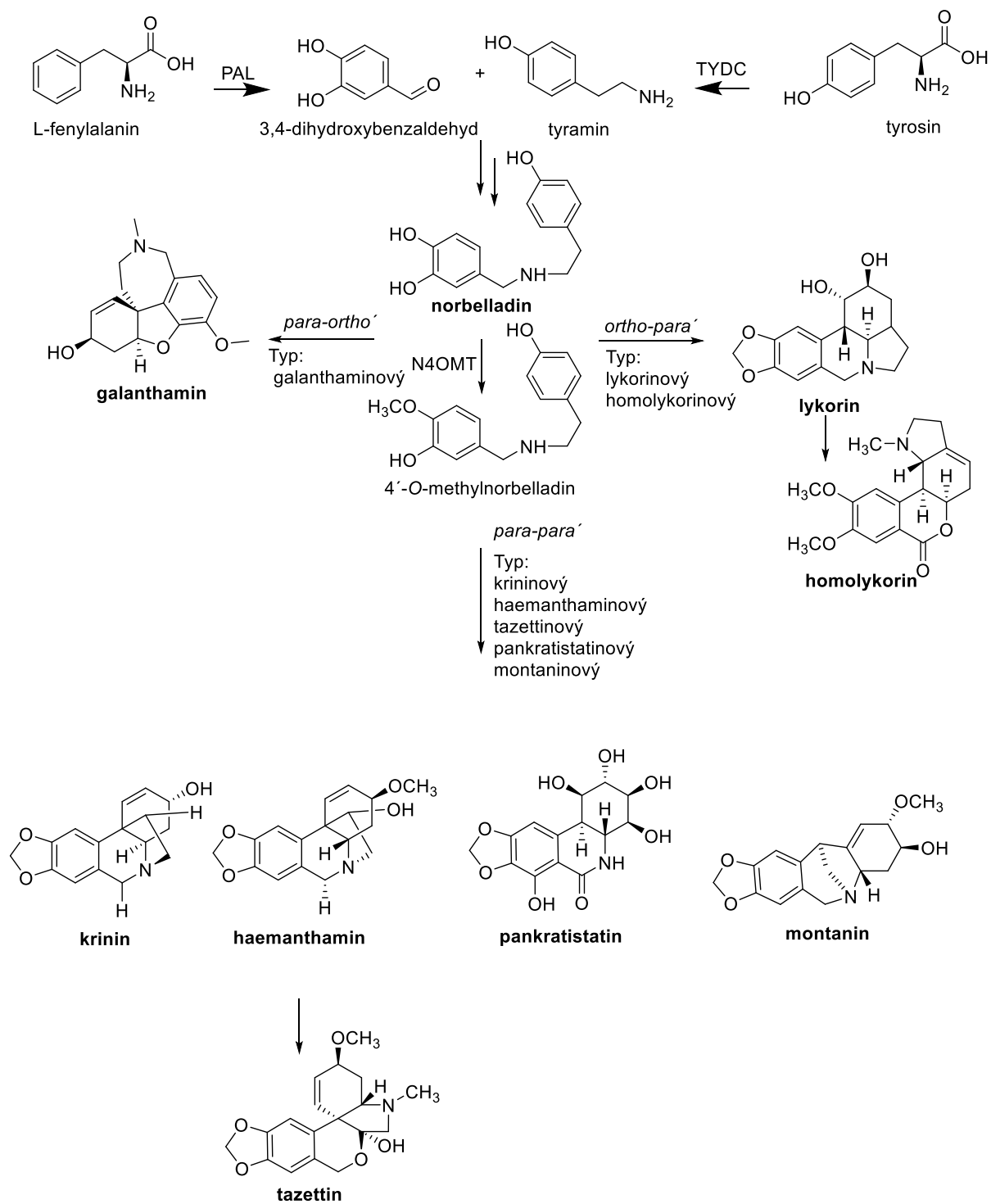
Obrázek 1: Zástupci čeledi Amaryllidaceae¹⁴: sněžienka podsněžník (*Galanthus nivalis*), bledule jarní (*Leucojum vernum*), narcis žlutý (*Narcissus pseudonarcissus*)

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou významné díky svým obsahovým látkám, především strukturně specifickým alkaloidům, které byly izolovány z podčeledi Amaryllidoideae. Tyto sloučeniny se vyskytují v celé části rostliny, přičemž nejvyšší množství nacházíme v cibuli.¹⁵ AAs jsou strukturně jedinečné, vyskytují se pouze v této rostlinné čeledi, navíc vykazují široké spektrum biologických aktivit.^{10,16}

3.2. Amaryllidaceae alkaloidy a jejich biosyntéza

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae můžeme zařadit ke skupině isochinolinových alkaloidů.⁸ Většina izolovaných alkaloidů ve své struktuře obsahuje jeden atom dusíku a můžeme je považovat za slabé báze.¹⁷ AAs jsou význačné svou strukturní rozmanitostí a rozdělujeme je do několika základních strukturních typů¹⁸, které jsou pojmenovány podle svého hlavního zástupce – norbelladinový (norbelladin), galanthaminový (galanthamin), lykorinový (lykorin), homolykorinový (homolykorin), pankratistatinový (pankratistatin), haemanthaminový (haemanthamin), krininový (krinin), tazettinový (tazettin) a montaninový (montanin).¹⁶ Biosyntéza všech zmíněných strukturních typů AAs vychází ze dvou aromatických aminokyselin L-fenylalaninu a L-tyrosinu¹⁹, které jsou v průběhu procesu postupně modifikovány. L-Fenylalanin poskytuje základ benzylové části molekuly vznikajícího alkaloidu, L-tyrosin je odpovědný za vytvoření kruhu C, dále je prekurzorem dusíku a dvouuhlíkatého postranního řetězce. L-Fenylalanin je přeměněn za účasti fenylalanin-lyázy (PAL) na kyselinu *trans*-skořicovou, následně za ztráty dvou uhlíkových atomů vzniká

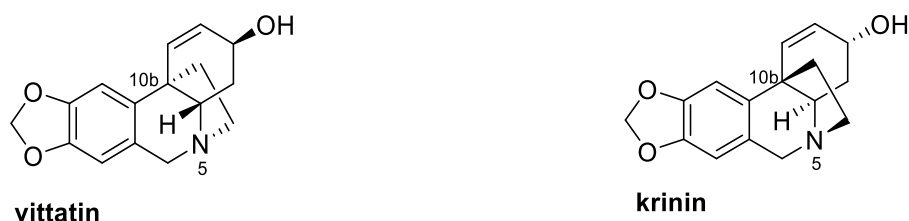
3,4-dihydroxybenzaldehyd.¹³ Přeměna L-tyrosinu na tyramin probíhá za přítomnosti tyrosin-dekarboxylázy (TYDC). Spojením 3,4-dihydroxybenzaldehydu a tyrosinu vzniká Schiffova báze. Po několika reakčních krocích vzniká meziprodukt norbelladin, podle kterého je celá biosyntetická cesta pojmenována.¹⁹ Norbelladin je následně methylován pomocí norbelladin-4'-O-methyltransferázy (N4OMT) za vzniku 4'-O-methylnorbelladinu, který podléhá intramolekulárnímu oxidativnímu spojení.²⁰ Podle způsobu tohoto spojení (*ortho-para'*, *para-ortho'*, *para-para'*) rozlišujeme již výše zmíněné základní strukturní typy AAs.²¹ Na Obr. 2 je zobrazeno schéma biosyntézy základních strukturních typů AAs.^{17,22,23,19,24}



Obrázek 2: Schéma biosyntézy základních strukturních typů AAs (převzato a upraveno)^{17,19,24}

3.3. Alkaloidy haemanthaminového a krininového strukturního typu

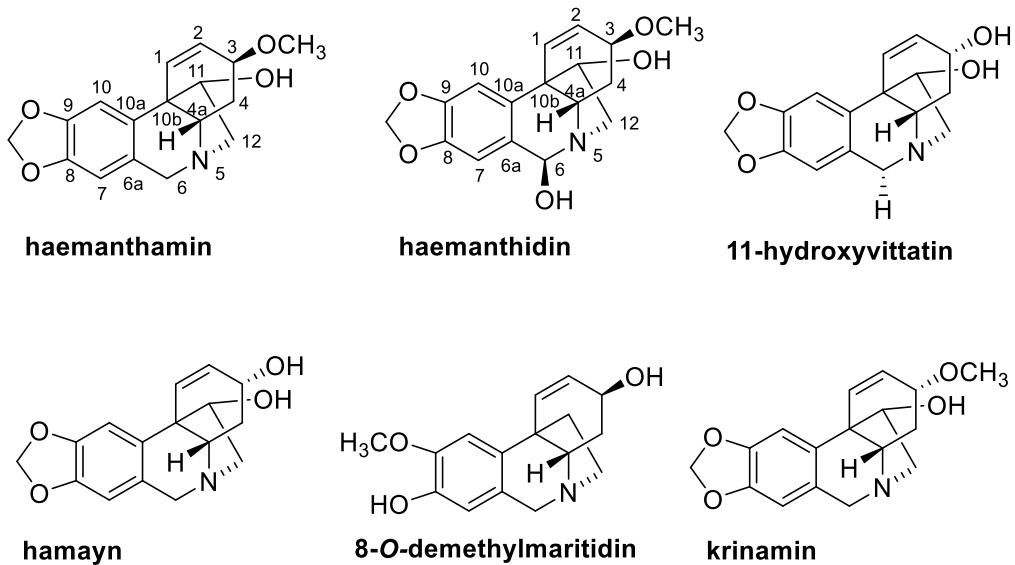
Alkaloidy haemanthaminového a krininového strukturního typu vznikají intramolekulární oxidativní cyklizací 4'-*O*-methylnorbelladinu způsobem *para-para'*.^{23,24} Oba strukturní typy, které můžeme souhrnně nazývat krinanovým strukturním typem, jsou odvozeny od 5,10b-ethanofenantridinu.¹³ Charakteristickým znakem těchto skupin alkaloidů je ethanový můstek, který přemostuje molekulu alkaloidu v polohách N-5 a C-10b. Podle absolutní konfigurace ethanového můstku rozlišujeme α -krinany, které odpovídají alkaloidům haemanthaminového typu a β -krinany, které odpovídají alkaloidům krininového typu (Obr. 3).^{13,19,25}



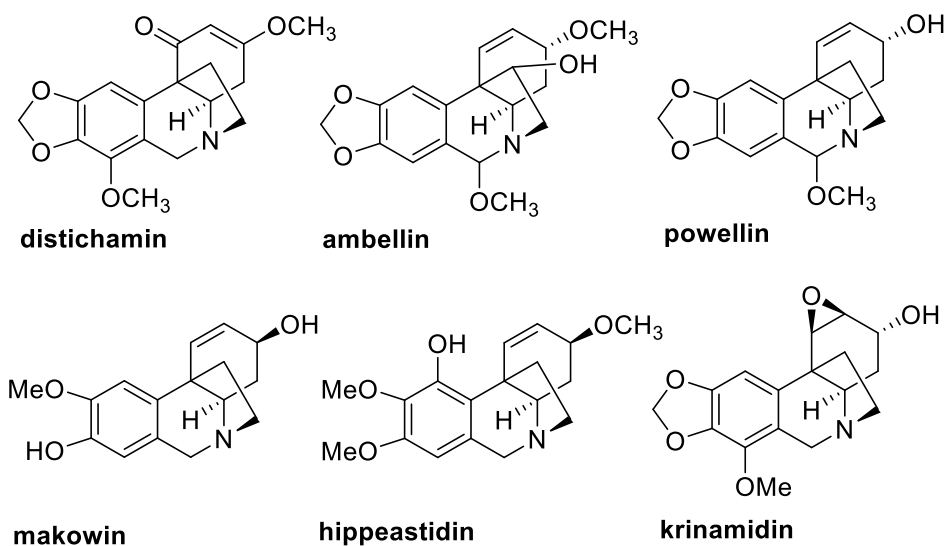
Obrázek 3: Porovnání struktur α -krinanů (vittatin) a β -krinanů (krinin)

Hlavním zástupcem haemanthaminového strukturního typu je haemanthamin, u krininového strukturního typu je to alkaloid krinin. K dalším zástupcům haemanthaminového strukturního typu řadíme haemanthidin, vittatin, krinamin, hamayn, bulbispermin, maritidin, papyramin (Obr. 4). Mezi další zástupce alkaloidů krininového strukturního typu řadíme ambellin, powellin, distichamin, hippeastidin, krinamidin, makowin, bufanisin, bufanidrin, undulatin (Obr. 5).^{19,21,24,26,27}

Alkaloid haemanthamin je terciární amin s alifatickou hydroxylovou skupinou v poloze C-11 a methoxyskupinou v poloze C-3.²⁰ V jeho struktuře najdeme též 1,3-dioxolanový kruh, aromatické jádro a jednu dvojnou vazbu v poloze C1-C2. Haemanthamin se vyskytuje v několika rodech čeledi Amaryllidaceae – *Crinum*, *Haemanthus*, *Hippeastrum*, *Narcissus* a *Zephyranthes*.^{24,28,29}



Obrázek 4: Alkaloidy haemanthaminového strukturního typu



Obrázek 5: Alkaloidy krininového strukturního typu

3.4. Biologická aktivita haemanthaminu a jeho přírodních derivátů

3.4.1. Protinádorová aktivita

Významnou vlastností některých AAs je protinádorová aktivita, která byla prokázána zejména u alkaloidů haemanthaminového, lykorinového a narciklasinového strukturního typu, přičemž výhodou některých látek je selektivní působení na nádorové buňky a zároveň relativně nízké riziko toxického působení na buňky zdravé.^{16,30} Již řadu let je věnována pozornost alkaloidu haemanthaminu a jeho cytotoxickému potenciálu, který byl průběžně dokazován různými vědeckými skupinami po celém světě. Protinádorová aktivita alkaloidu haemanthaminu byla testována na mnoha nádorových a nenádorových buněčných liniích. Díky intenzivnímu testování bylo možné specifikovat určité souvislosti mezi strukturou testovaných látek a jejich účinkem.^{22,31,32}

V roce 2009 byla u několika AAs různých strukturních typů testována cytotoxická aktivita. Pro testování byly vybrány alkaloidy patřící jak k haemanthaminovému strukturnímu typu (haemanthamin, 11-hydroxyvittatin, 8-*O*-demethylmaritidin), tak ke krininovému strukturnímu typu (ambellin, buphanamin, buphanisin). U těchto sloučenin byla hodnocena antiproliferativní aktivita vůči buněčným liniím HeLa (cervikální karcinom) a Vero (karcinom ledvinového epitelu) a také jejich schopnost indukovat apoptózu buněčných linií Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů). Pomocí MTT testu bylo prokázáno, že alkaloid haemanthamin v koncentraci 25 μ M zapříčinil významný pokles životaschopnosti nádorových buněk pravděpodobně pomocí aktivace buněčné apoptózy. Naopak, alkaloid 11-hydroxyvittatin, který se od haemanthaminu liší pouze demethylací v poloze C3, nevykazoval žádnou antiproliferativní aktivitu a pouze mírnou indukci apoptózy. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že důležitým farmakoforem pro protinádorové působení u alkaloidů haemanthaminového strukturního typu je právě methoxy uspořádání v poloze C3 molekuly. Výsledky testování antiproliferativní aktivity jsou shrnuty v Tab. 2.³³

Tabulka 2: Protinádorová aktivita vybraných alkaloidů krinanového strukturního typu³³

alkaloid	životaschopnost buněk ^a		indukce apoptózy ^b			
	[%]		[%]			
buněčná linie	HeLa	Vero	Jurkat			
	5 μM	25 μM	5 μM	25 μM	1 μM	25 μM
haemanthamin	30 ± 2	21 ± 2	44 ± 3	32 ± 2	4 ± 1	22 ± 1
11-hydroxyvittatin	86 ± 3	72 ± 5	64 ± 2	64 ± 6	3 ± 1	4 ± 1
8-O-demethylmaritidin	90 ± 7	82 ± 7	87 ± 4	82 ± 5	5 ± 1	4 ± 1
ambellin	100 ± 9	79 ± 10	95 ± 8	89 ± 6	4 ± 4	4 ± 1
buphanamin	98 ± 4	96 ± 9	83 ± 2	90 ± 10	3 ± 3	3 ± 1
buphanisin	100 ± 8	99 ± 6	74 ± 7	79 ± 6	3 ± 3	5 ± 1

^a Životaschopnost buněk po 48 hodinách MTT testu vyjádřena jako střední hodnota třech nezávislých měření ± standartní odchylka

^b % apoptotických buněk po 24 hodinách vyjádřena jako střední hodnota dvou nezávislých měření ± standartní odchylka

V roce 2010 bylo z *Crinum ornatum* izolováno několik alkaloidů, u kterých byla stanovována antioxidační aktivita. Pomocí DPPH testu bylo zjištěno, že alkaloid haemanthamin v dávce 1 mg/ml vykazuje výrazné antioxidační vlastnosti a je tedy schopen vychytávat volné radikály, což může přispívat k jeho antiproliferativnímu a cytotoxickému účinku. Schopnost vychytávat volné radikály byla u dalších testovaných alkaloidů krinaminu a hamaynu nižší než u haemanthaminu (Tab. 3).^{22,34}

Tabulka 3: Antioxidační aktivita alkaloidů krinanového strukturního typu^a (%)³⁴

koncentrace	haemanthamin	krinamin	hamayn
1 mg/ml	8,82	1,76	1,18
500 μg/ml	3,53	1,18	0,59
250 μg/ml	1,76	0,59	0,59
125 μg/ml	1,18	0	0

^a Pokles absorpance DPPH, měřeno při 517 nm po 10 minutách

Ačkoliv princip cytotoxického účinku haemathaminu nebyl doposud zcela objasněn, mnohé studie poukazují na možné principy jeho mechanismu. Kromě antioxidačního působení a indukce apoptózy se jedná také o schopnost inhibice proteosyntézy vazbou na centrum peptidyltransferázy 60S ribozomální podjednotky. Díky tomu je haemanthamin schopen bránit tvorbě peptidových vazeb, čímž je narušena syntéza proteinů.^{31,35} Haemanthamin je také schopen vyvolat nukleární stres a inhibovat biogenezi ribozomů a aktivovat cytotoxickou odpověď závislou na p-53.^{31,36}

V roce 2015 byly studovány účinky haemanthaminu a haemanthidinu na indukci apoptózy u lidských leukemických buněk Jurkat. Výsledky studie ukazují, že haemanthamin a haemanthidin při koncentracích v rozmezí 5 μM až 20 μM snižují životaschopnost buněk způsobem závislým na dávce. Schopnost snižovat viabilitu buněk byla po 48 hodinách výraznější u alkaloidu haemanthidinu než u alkaloidu haemanthaminu. Oba testované alkaloidy také snižují membránový mitochondriální potenciál, zastavují buněčný cyklus v G1 a G2/M fázi a indukují apoptózu, která je doprovázena aktivací kaspáz 3, 7, 8 a 9.^{31,32,37}

V rámci studie cytotoxické aktivity vůči p53-negativním gastrointestinálním nádorovým buňkám Caco-2 a HT-29 bylo testováno 13 amarylkovitých alkaloidů 5 různých strukturních typů, které byly předem izolovány z různých rostlin čeledi Amaryllidaceae. Z alkaloidů haemanthaminového strukturního typu byly pro testování vybrány alkaloidy haemathamin, haemanthidin a hamayn. Z řady alkaloidů krininového strukturního typu byly testovány alkaloidy ambellin, undulatin, buphanamin a 1-O-acetylbulbisin. Pro kontrolu celkové toxicity byly využity zdravé lidské intestinální buňky FHs 74 Int. Hodnoty IC_{50} pro všechny testované alkaloidy byly stanoveny na základě MTT testu. Nejsilnější cytotoxický potenciál proti oběma testovaným buněčným liniím vykazovaly alkaloidy haemanthamin a haemanthidin, tedy alkaloidy haemanthaminového strukturního typu, které ve své struktuře obsahují 5,10b-ethanofenanthridinový můstek v α konfiguraci. Alkaloidy krininového strukturního typu, jejichž můstek je v postavení β , byly v rámci této studie vyhodnoceny jako neúčinné. Snižená cytotoxická aktivita byla pozorována také u α -krinanu hamaynu, který se od účinného haemanthaminu liší substitucí v poloze C3, kdy hamayn zde místo methoxy skupiny obsahuje pouze hydroxylovou skupinu. Ostatní testované alkaloidy byly vyhodnoceny jako neúčinné s hodnotami $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$. Výsledky testování cytotoxické aktivity neaktivnějších alkaloidů jsou shrnuty v Tab. 4.³⁸

Tabulka 4: Cytotoxická aktivita haemanthaminu a haemanthidinu vůči nádorovým buněčným liniím Caco-2 a HT-29 vyjádřená jako IC_{50} (μM)³⁸

Alkaloid	IC_{50} (μM) ^a		
	Caco-2	HT-29	FHs 74 Int
haemanthamin	0,99 \pm 0,14	0,59 \pm 0,01	19,5 \pm 8,9
haemanthidin	3,3 \pm 0,9	1,7 \pm 0,1	11,6 \pm 0,9

^a výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnoty \pm standardní odchylka tří nezávislých měření

Na důležitost α konfigurace 5,10b-ethanofenantridinového můstku pro cytotoxickou účinnost poukázal již v roce 2007 McNulty.³⁹ Pro svou studii vybral několik alkaloidů z obou řad krinanových alkaloidů a studoval jejich cytotoxické působení vůči nádorovým buňkám potkaního hepatocelulárního karcinomu 5123tc. V rámci studie bylo zjištěno, že alkaloidy s α konfigurací 5,10b-ethanofenantridinového můstku haemanthamin a krinamin jsou schopny iniciovat u těchto nádorových buněk apoptózu. Byla tak stanovena účinná dávka pro indukci apoptózy u 50 % nádorových buněk na dávku 12,5 μM u krinaminu a 15 μM u haemanthaminu, zároveň bylo prokázáno, že oba alkaloidy působí selektivně na nádorové buňky a výrazněji neovlivňují buňky zdravé. Alkaloidy krininového typu byly vyhodnoceny jako neaktivní, což opět vypovídá o důležitosti α konfigurace můstku pro cytotoxickou aktivitu. Z výsledků se dá také usoudit, že stereochemie methoxy skupiny v poloze C3 není pro účinek rozhodující. V rámci studie byla také hodnocena důležitost volné hydroxylové skupiny v poloze C11. Z tohoto důvodu byly připraveny dva deriváty krinaminu s acylovanou hydroxylovou skupinou, které v následujících testech nevykazovaly žádný cytotoxický účinek. Závěrem lze říci, že z hlediska vztahů struktury a účinku je pro cytotoxický účinek důležité α uspořádání 5,10b-ethanofenantridinového můstku a volná hydroxylová skupina v poloze C11.³⁹

V roce 2010 byl testován cytotoxický potenciál 15 AAs vůči šesti nádorovým buněčným liniím. Ze zástupců haemanthaminového a krininového strukturního typu byly pro testování vybrány alkaloidy haemanthamin, haemanthidin, ambellin, buphanamin a buphanisin. Studie prokázala antiproliferativní aktivitu haemanthaminu a haemanthidinu vůči nádorovým buněčným liniím odolným vůči apoptóze A549 (adenokarcinom plic), U373 (glioblastom), OE21 (esofageální karcinom), SKMEL-28 (melanom), Hs683 (oligodendrogliom) a B16F10 (myší melanom). Výsledky studie jsou shrnuty v Tab. 5.⁴⁰

Tabulka 5: *In vitro* cytotoxická aktivita testovaných krinanových alkaloidů³⁷

alkaloid	A549	EO21	Hs 683	U373	SKMEL	B16F10
	IC ₅₀ (μM)					
haemanthamin	4,5 \pm 0,6	6,8 \pm 0,7	7,0 \pm 0,3	7,7 \pm 0,5	8,5 \pm 0,2	6,8 \pm 0,2
haemanthidin	4,0 \pm 0,4	3,7 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	4,2 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2
ambellin	> 10	86 \pm 3	> 10	> 10	> 10	> 10
buphanamin	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
buphanisin	> 10	97 \pm 2	> 10	> 10	> 10	> 10

V roce 2015 byl výzkumnou skupinou ADINACO testován cytotoxický potenciál 22 AAs vůči 16 nádorovým buněčným liniím pomocí testu WST-1 za použití nenádorových lidských fibroblastů jako kontrolní buněčné linie. Alkaloidy haemanthamin a haemanthidin vykazovaly výraznou antiproliferativní aktivitu vůči všem testovaným buněčným liniím. V Tab. 6 jsou shrnuty výsledky testování účinného haemanthaminu a haemanthidinu.⁴¹

Tabulka 6: *In vitro* cytotoxicita haemanthaminu a haemanthidinu v hodnotách IC₅₀ (μM)⁴¹

buněčná linie	haemanthidin	haemanthamin
HL-60	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Jurkat	9,3 ± 0,2	1,4 ± 0,3
MOLT-4	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1
A549	9,6 ± 0,0	1,1 ± 0,2
H1299	9,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2
COLO-201	9,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1
HT-29	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
SW-480	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1
AGS	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2
PANC-1	9,7 ± 0,2	9,8 ± 0,4
A2780	2,3 ± 0,4	0,7 ± 0,4
HeLa	1,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1
BT-549	9,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2
MCF-7	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1
MDA-MB-231	8,5 ± 0,1	9,5 ± 0,2
SAOS-2	9,7 ± 0,4	1,1 ± 0,4
NHDF	1,4 ± 0,4	0,5 ± 0,1

Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnoty ± standardní odchylka ze tří nezávislých měření.

HL-60 (akutní promyelotická leukémie), Jurkat (akutní leukémie T-lymfocytů), MOLT-4 (akutní lymfoblastická anémie), A549 (karcinom plic), H1299 (karcinom plic), COLO-201 (karcinom střev), HT-29 (kolorektální karcinom), SW-480 (kolorektální karcinom), AGS (adenokarcinom žaludku), PANC-1 (karcinom slinivky břišní), A2780 (ovariální karcinom), HeLa (cervikální karcinom), BT-549 (karcinom prsu), MCF-7 (karcinom prsu), MDA-MB-231 (adenokarcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom), NHDF (normální lidské dermální fibroblasty).

Studie z roku 2017 sledovala pomocí WST testu cytotoxický účinek alkaloidu haemanthaminu a butyrátu sodného (NaB), který patří k tzv. inhibitorům histondeacetylázy⁴². Tyto látky jsou potenciálně využitelné v léčbě nádorových onemocnění. NaB je schopen v nádorových buňkách inhibovat proliferaci, indukovat jejich diferenciaci nebo apoptózu. Cílem této studie bylo určit cytotoxický potenciál haemanthaminu, NaB a jejich různých kombinací. Pro testování aktivity byl vybrán kmen nádorových ovariálních buněk A2780 a zdravých lidských MRC-5 fibroblastů jako kontrolní buněčné linie. Bylo zjištěno, že haemanthamin v koncentraci 10 μM inhibuje růst testovaných nádorových A2780 i nenádorových buněk MRC-5. Kombinace haemanthaminu (10 μM) a NaB (5 mM) se projevila nižším

antiproliferativním účinkem na nenádorové buňky MRC-5. Dále bylo zjištěno, že zmíněná kombinace látek způsobuje zvýšenou cytotoxicitu v nádorových buňkách A2780, zároveň ale takový účinek nevyvolává u buněk zdravých. Výsledky studie naznačují, že alkaloid haemanthamin by mohl být využíván v kombinované léčbě s dalšími terapiemi včetně NaB.⁴²

Mnoho dalších studií prokázalo, že alkaloid haemanthamin vykazuje silný antiproliferační a cytotoxický potenciál na široké spektrum různých nádorových buněčných linií. Nejvýraznější cytotoxický účinek haemanthaminu byl prokázán zejména u těchto nádorových buněčných linií: cervikální karcinom (HeLa), akutní lymfoblastická anémii (MOLT-4), hepatocelulární karcinom (HepG2), karcinom prsu (MCF-7), chronická myeloidní leukémie (K562), akutní lymfoblastická anémie (CEM), karcinom střev (Caco2), kolorektální karcinom (HT-29), ovariální karcinom (A2780), karcinom prsu (T47-D) akutní leukémie T-lymfocytů (Jurkat). Hodnoty cytotoxické aktivity vůči těmto nádorovým buněčným liniím jsou shrnuty v Tab. 7.^{22,22,31}

Tabulka 7: Cytotoxická aktivita haemanthaminu *in vitro* proti buněčným liniím vyjádřená jako IC₅₀ (μM)^{22,31}

Buněčná linie	Zkratka	IC ₅₀	Metoda
cervikální karcinom	HeLa	7,2 ± 2,2	MTT test (72 h)
akutní lymfoblastická anémie	MOLT-4	1,2 ± 0,1	WST-1 test (48 h)
hepatocelulární karcinom	HepG2	4,8	MTT test (48 h)
karcinom prsu	MCF-7	0,8 ± 0,1	WST-1 test (48 h)
chronická myeloidní leukémie	K562	2,5	MTT test (48 h)
kolorektální karcinom	HT-29	2,1	MTT test (48 h)
ovariální karcinom	A2780	0,7 ± 0,4	WST-1 test (48 h)
akutní leukémie T-lymfocytů	Jurkat	1,4 ± 0,3	WST-1 test (48 h)

3.4.2. Další biologická aktivita

V rámci studie z roku 2003 bylo zjištěno, že alkaloid haemanthamin a jeho přírodní deriváty vykazují antimalarickou aktivitu. Malárie je život ohrožující parazitární onemocnění způsobené prvoky rodu *Plasmodium*, přičemž nejvíce zastoupenými a zároveň nejvíce nebezpečnými druhy schopnými infikovat člověka jsou druhy *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium vivax*⁴³. Toto onemocnění je rozšířené zejména v sociálně slabých tropických oblastech. Významným problémem je rostoucí rezistence rodu *Plasmodium falciparum* na dostupná antimalarika, proto je vhodné aktivně vyhledávat nové potenciální prostředky

léčby. Antimalarická aktivita haemanthaminu, krininu, 6-hydroxyhaemanthaminu vůči dvěma kmenům druhu *Plasmodium falciparum* (citlivý na chlorochin – T9.96 a resistantní na chlorochin K₁) byla testována v několika různých koncentracích. Nejvýraznější aktivitu proti oběma kmenům *Plasmodium falciparum* vykazovaly alkaloidy haemanthamin a 6-hydroxyhaemanthamin. Výsledky antimalarické aktivity testovaných alkaloidů jsou shrnuty v Tab. 8. Bylo zjištěno, že vyšší antimalarická aktivita se dá předpokládat u AAs s methylenedioxybenzenovým uspořádáním a terciárním dusíkem bez methyly.^{30,43–45}

Alkaloid haemanthamin vykazuje také aktivitu proti prvokům *Entamoeba histolytica*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *Trypanosoma cruzi*. Nejzajímavější antiprotozoální aktivita haemanthaminu byla zjištěna proti prvoku *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC₅₀ = 0,49 µg/ml) a *Entamoeba histolytica* (IC₅₀ = 0,75 µg/ml). Alkaloid haemanthaminového typu haemanthidin vykazoval aktivitu vůči *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC₅₀ = 1,1 µg/ml) a *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ = 1,4 µg/ml).^{22,45–47}

Tabulka 8: Antimalarická aktivita alkaloidů vůči *Plasmodium falciparum* a jejich IC₅₀⁴⁵

alkaloid	µg/ml	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
		T9.96 inhibice %	K ₁ inhibice %
haemanthamin	5	94,63	96,99
IC ₅₀ (µM)	1	65,77	68,07
T9.96 K ₁	0,2	46,31	51,81
0,703 0,433	0,04	30,87	31,93
krinin	5	73,75	74,28
IC ₅₀ (µM)	1	44,63	63,81
T9.96 K ₁	0,2	36,56	41,90
2,110 1,650	0,04	26,49	17,14
6-hydroxyhaemanthamin	5	91,89	95,24
IC ₅₀ (µM)	1	67,60	80,95
T9.96 K ₁	0,2	46,54	64,76
0,348 0,352	0,04	39,86	11,43

U několika AAs byla testována schopnost *in vitro* inhibice replikace viru lidské imunodeficiency 1 (HIV-1) na buňkách MT4.⁴⁸ Cytotoxicita látek (TC₅₀) v neinfikovaných buňkách byla hodnocena pomocí testu MTT a testu inkorporace [³H] thymidinu. Antivirová aktivita byla stanovena pomocí testu antigenu p24 (ID₅₀^a) a testem reverzní transkriptázy na pevné fázi (ID₅₀^b). Vysoké antiretroviróvé účinky a zároveň nízké terapeutické indexy

vykázaly alkaloidy trisfaeridin, lykorin, homolykorin a haemanthamin. V Tab. 9 jsou shrnuty antivirové účinky haemanthaminu a haemanthidinu. Všechny uvedené hodnoty jsou průměrem pěti nezávislých měření. Hodnota terapeutické indexu TI je výsledkem poměru hodnot ID_{50}/TC_{50} .⁴⁸

Tabulka 9: Cytotoxická a antiretrovirová aktivita haemanthaminu a haemanthidinu⁴⁸

Alkaloid	TC_{50} (μg/ml)	ID_{50}^a (μg/ml)	ID_{50}^b (μg/ml)	TI_{50}
haemanthamin	1,00	0,8	-	1,3
haemanthidin	1,00	žádný efekt	-	-

Virus ptačí chřipky (AIV) je jednovláknový RNA virus náležící do čeledi *Orthomyxoviridae*. AIV způsobuje infekci lidí i hospodářských zvířat, nejčastěji drůbeže, prasat a divoké zvěře. Vysoce patogenním kmenem AIV je H5N1. Pro testování antivirové aktivity AAs bylo izolováno 15 alkaloidů z cibulí *Lycoris radiata*, u kterých se testovala jejich *in vitro* účinnost proti viru influenza A (H5N1). Z testovaných alkaloidů pouze 4 vykazovaly antivirovou aktivitu (lykorin, hippeastrin, haemanthamin a 11-hydroxyvittatin) a inhibovaly replikaci viru. Alkaloid haemanthamin navíc pravděpodobně může ovlivnit export ribonukleoproteinu z jádra do cytoplasmy. V Tab. 10 jsou shrnuty výsledky antivirové aktivity haemanthaminu a 11-hydroxyvittatinu v jednotkách cytotoxické koncentrace (CC_{50}), efektivní koncentrace (EC_{50} , EC_{90}) a index selektivity (SI) jako poměr CC_{50}/EC_{50} .⁴⁹

Tabulka 10: Antivirová aktivita haemanthaminu a 11-hydroxyvittatinu proti viru H5N1⁴⁹

Alkaloid	CC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	EC_{90} (μM)	SI
haemanthamin	$50 \pm 0,12$	$1,48 \pm 0,003$	$4,15 \pm 0,052$	34
11-hydroxyvittatin	> 278	$6,7 \pm 0,038$	$13,45 \pm 0,57$	> 41

V roce 2015 byla vědeckou skupinou ADINACO testována *in vitro* antibakteriální a antifungální aktivita alkaloidních extraktů šesti vybraných druhů Amaryllidaceae. Pro testování byli vybráni zástupci různých typů mikroorganismů – grampozitivní a gramnegativní bakterie (*Staphylococcus aureus* (S.a.) ATCC 25923 a *Escherichia coli* (E.c.) ATCC 25922) a lidské patogenní kvasinky *Candida albicans* (C.a.) ATCC 10321. Dále bylo využito 5 kvasinkových klinických izolátů, které byly získány z Katedry lékařské mikrobiologie 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a z FN Motol. Izoláty byly odebrány z různých zdrojů: *Candida albicans* 1 (C.a.1 – ústní dutina), *Candida albicans* 2 (C.a.2 – dolní dýchací cesty), *Candida dubliniensis* 1 (C.d.1 - sputum), *Candida glabrata* 1 (C.g.1 - sputum),

Lodderomyces elongiosporus 1 (*L.e.1*- endotracheální aspirát).⁵⁰ Testované alkaloidy, patřící k 5 různým strukturním typům AAs, byly již dříve izolovány na pracovišti vědecké skupiny ADINACO ze čtyř rostlinných druhů *Zephyranthe robusta*, *Chlidanthus fragrans*, *Nerine bowdenii* a *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol. Slibná antibakteriální aktivita byla zjištěna u lykorinu, který inhiboval *Candida dubliniensis* (MIC₈₀ = 32 µg/ml), *Candida albicans* a *Lodderomyces elongiosporus* (MIC₈₀ = 64 µg/ml). Další slibnou aktivitu vykázal zástupce lykorinového strukturního typu alkaloid karanin. Alkaloid haemanthamin vykazoval slabou antimikrobiální aktivitu proti *Candida albicans* a *Candida dubliniensis* (MIC₈₀ = 512 µg/ml) a proti *Lodderomyces elongiosporus* (MIC₈₀ = 256 µg/ml). *In vitro* antimikrobiální aktivita proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím a vybraným kvasinkám je shrnuta v Tab. 11.⁵⁰

Tabulka 11: Antimikrobiální aktivita *in vitro* vybraných alkaloidů⁵⁰

Alkaloid	MIC ₈₀ /MFC (µg/ml)							
	<i>C.a.</i>	<i>C.a.1</i>	<i>C.a.2</i>	<i>C.d.1</i>	<i>C.g.1</i>	<i>L.e.1</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.a</i>
haemanthamin	-/-	512/-	-/-	512/-	-/-	256/-	-	-
haemanthidin	-/-	-/-	-/-	512/-	-/-	512/-	-	-
hamayn	-/-	-/-	-/-	512/-	-/-	512/-	-	-
ambellin	-/-	512/-	512/-	512/-	-/-	512/-	-	-
krinin	-/-	512/-	512/-	512/-	512/-	256/512	-	-
lykorin	64/512	128/512	256/ 512	32/256	512/512	64/256	-	-
karanin	512/-	512/-	512/-	128/512	512/512	256/512	2048	-

MIC₈₀ minimální inhibiční koncentrace, MFC minimální fungicidní koncentrace

Neaktivní: kvasinky > 512 µg/ml, bakterie > 2048 µg/ml

V roce 2021 se výzkumná skupina ADINACO věnovala také testování antimykobakteriální aktivity.⁵¹ Tuberkulóza je infekční onemocnění způsobené bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis* a patří stále mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí na infekční agens. Testována byla *in vitro* antimykobakteriální aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Ra, *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium smegmatis* za použití isoniazidu, rifampicinu a ciprofloxacinu jako standardů. Bylo testováno 9 AAs různých strukturních typů včetně haemanthaminu. Ani jeden z testovaných AAs nevykazoval antimykobakteriální aktivitu (Tab. 12)⁵¹.

Tabulka 12: *In vitro* antimykobakteriální aktivita proti *Mtb* H37Ra, *Mycolicibacterium aurum* a *Mycolicibacterium smegmatis*⁵¹

Alkaloid	<i>Mtb</i> H37Ra ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Mtb</i> H37Ra (μM)	<i>M. smegmatis</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>M. aurum</i> ($\mu\text{g/ml}$)
haemanthamin	≥ 500	$\geq 1659,3$	≥ 500	≥ 500
3-O-methylpankracin	≥ 500	$\geq 1659,3$	≥ 500	≥ 500
vittatin	≥ 500	$\geq 1842,9$	≥ 500	250
maritidin	≥ 500	$\geq 1740,0$	≥ 500	≥ 500

U haemanthaminu a jeho dalších přírodních derivátů byla také testována schopnost inhibice acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy, prolyloligopeptidázy a GSK-3 β , tedy enzymů ovlivňujících průběh Alzheimerovy choroby.^{52–56} Podle provedených studií, inhibiční aktivita haemanthaminu je vůči těmto testovaným enzymům velmi nízká ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Výzkum tak směřuje k přípravě a testování semisyntetických derivátů haemanthaminu, které by vykazovaly významnější inhibiční efekt.^{52–55,57–60}

3.5. Biologická aktivita derivátů haemanthaminu

Široká biologická aktivita AAs a v některých případech i snadná dostupnost těchto alkaloidů z rostlinného materiálu inspiruje vědce k přípravě a testování jejich semisyntetických derivátů. Z pohledu alkaloidu haemanthaminu se jedná zejména o aktivní vyhledávání derivátů s výhodnější protinádorovou aktivitou, výraznější schopností inhibice acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy, ale i s antiprotozoální a antibakteriální aktivitou.

3.5.1. Protinádorová aktivita

V roce 2015 byla testována protinádorová aktivita 7 přírodních AAs (tazettin, pankracin, hippeastrin, vittatin, 11-hydroxyvittatin, haemanthamin a haemanthidin) izolovaných z *Pancreaticum canariense* a 32 semisyntetických derivátů proti čtyřem nádorovým buněčným liniím A2780 (ovariální karcinom), SW1573 (karcinom plic), T47-D (karcinom prsu), WiDr (karcinom tračnicku). Z připravených semisyntetických derivátů byla nejlepší protinádorová aktivita prokázána u derivátů pankracinové a haemanthaminové řady. Díky získaným výsledkům byly popsány souvislosti mezi strukturou a účinkem pro každou řadu semisyntetických derivátů. Princip přípravy derivátů haemanthaminu zobrazuje Obr. 6.

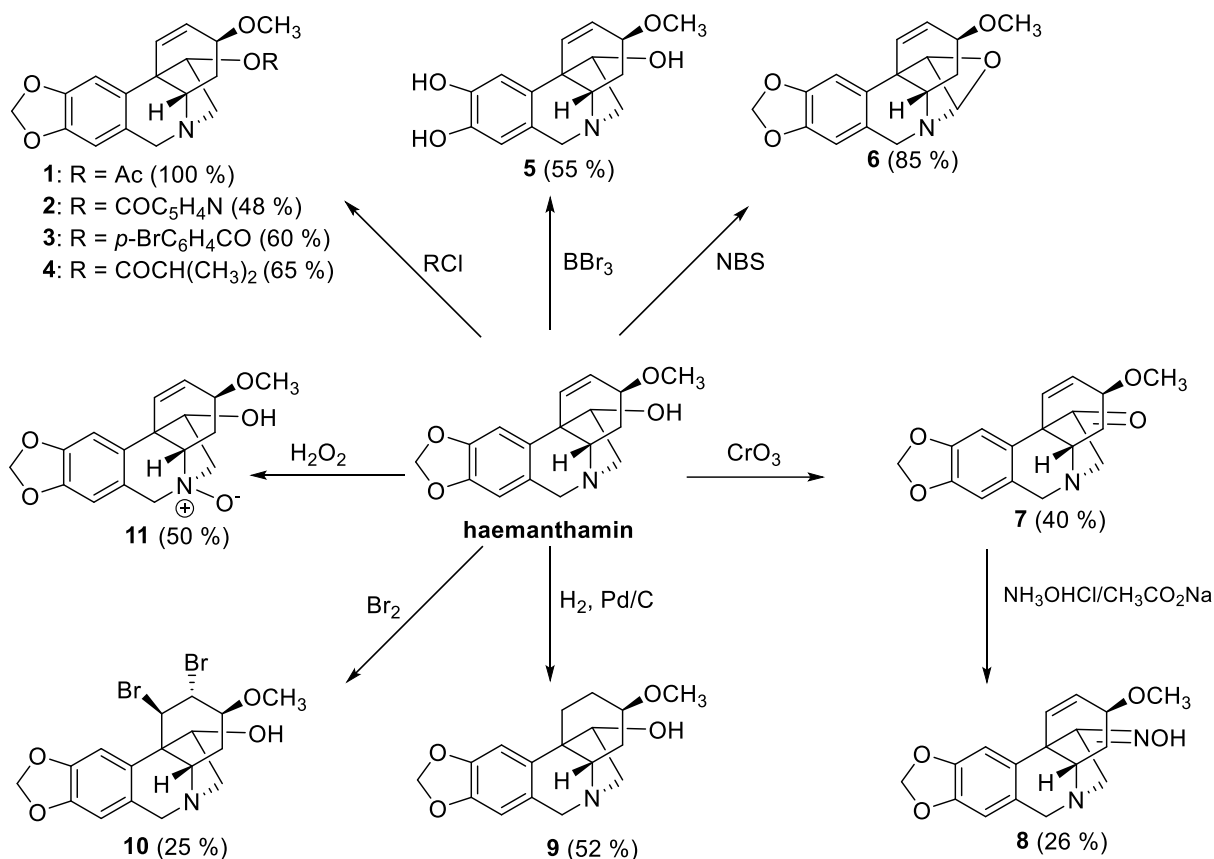
Porovnání protinádorové aktivity uvedené v hodnotách růstové inhibiční koncentrace derivátů haemanthaminu (**1-11**) a dalších testovaných alkaloidů je shrnuto v Tab. 13.⁶²

Nejlepší výsledky protinádorové aktivity byly prokázány u přírodních alkaloidů haemanthaminu a haemanthidinu a derivátu **7**. Po porovnání struktur původních testovaných alkaloidů haemanthaminu, haemanthidinu, vittatinu a 11-hydroxyvittatinu (Obr. 4, 5) a jejich výsledků protinádorové aktivity můžeme uvažovat, že pro účinek je důležitá methoxy skupina v poloze C3 a hydroxy skupina v poloze C11. Bylo zjištěno, že dalším důležitým strukturním prvkem pro protinádorovou aktivitu je dvojná vazba v poloze C1-C2, jelikož deriváty **9** a **10**, které ve své struktuře tuto vazbu neobsahují, byly neaktivní. Pro haemanthaminovou řadu derivátů je také důležité methyendioxy uskupení, jelikož aktivita derivátu **5** byla oproti dalším látkám snižená. Haemanthidin s hydroxylovou skupinou v poloze C6 lze považovat za stejně aktivní jako alkaloid haemanthamin, přičemž acylací hydroxylových skupin v polohách C6 a C11 haemanthidinu vznikají neaktivní deriváty.⁶²

Tabulka 13: *In vitro* protinádorová aktivita alkaloidů a derivátů haemanthaminu⁶²

Látka	GI ₅₀ (μM)			
	A2780	SW1573	T47-D	WiDr
haemanthamin	0,68 ± 0,2	2,1 ± 2,0	0,87 ± 0,4	1,2 ± 0,5
haemanthidin	1,5 ± 0,1	2,0 ± 1,0	1,8 ± 1,0	2,7 ± 2,0
vittatin	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
11-hydroxyvittatin	21,0 ± 2,0	16,9 ± 4,0	12,5 ± 9,0	21,1 ± 6,0
1	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
2	27,2 ± 10,0	29,5 ± 12,0	72,3 ± 24,0	63,3 ± 35,0
3	19,1 ± 1,0	21,9 ± 4,0	46,1 ± 30,0	32,8 ± 22,0
4	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
5	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
6	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
7	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	4,4 ± 1,5	3,5 ± 2,0
8	33,2 ± 2,0	39,1 ± 20,0	78,6 ± 24,0	67,4 ± 34,0
9	31,4 ± 7,0	29,8 ± 3,0	≥ 100	58,9 ± 12,0
10	≥ 100	≥ 100	≥ 100	≥ 100
11	27,2 ± 5,0	22,0 ± 20,0	≥ 100	≥ 100

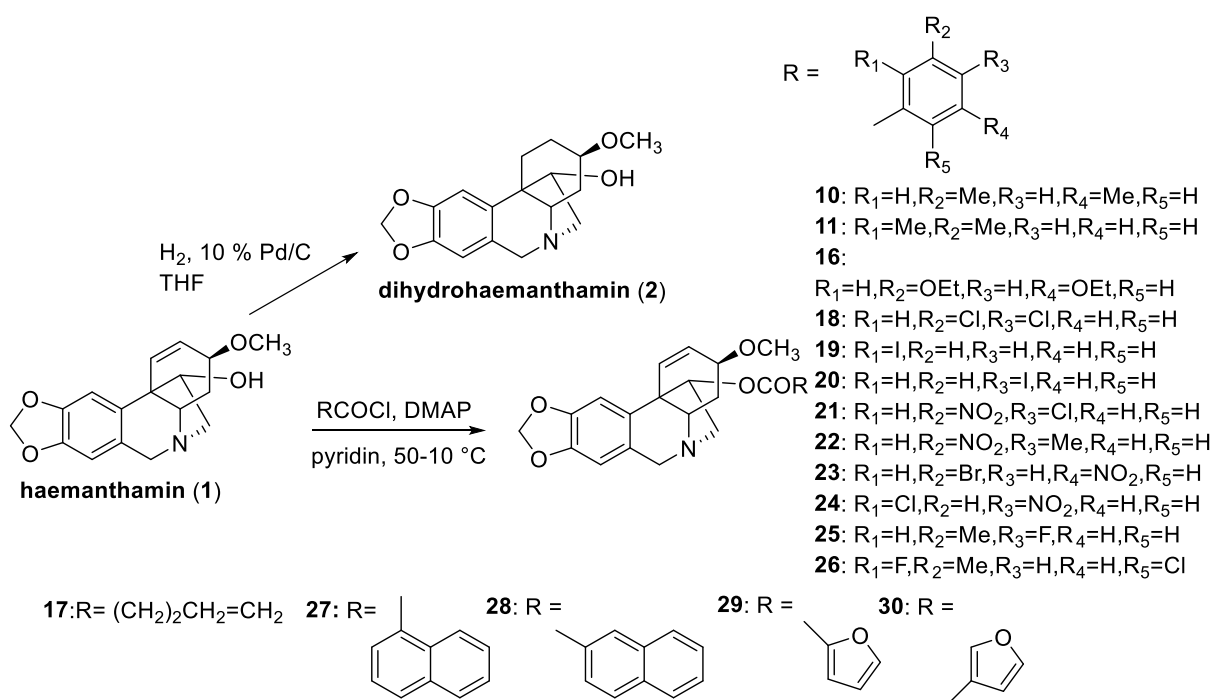
A2780 (ovariální karcinom), SW1573 (karcinom plic), T47-D (karcinom prsu), WiDr (karcinom tračnicku)



Obrázek 6: Příprava derivátů haemanthaminu pro testování protinádorové aktivity (převzato a upraveno)⁶²

V roce 2022 byla publikována studie výzkumné skupiny ADINACO, v rámci které byla syntetizována nová řada alifatických, aromatických a heterocyklických derivátů haemanthaminu (Obr. 7) s cílem zvýšit jeho antiproliferativní a cytotoxický účinek.⁶³ Deriváty byly připraveny modifikací hydroxylové skupiny v poloze C11 a hydrogenací vazby v poloze C1-C2. Příprava derivátů (**3-9**) a (**12-15**), u kterých byla již dříve testována anticholinergní aktivita, je uvedena v následující kapitole Inhibice AChE, BuChE a GSK-3 β . Antiproliferativní účinek byl zjišťován proliferativním testem WST a pomocí stanovení procenta růstu u 9 nádorových buněčných linií (Jurkat – akutní leukémie T-lymfocytů, MOLT-4 – akutní lymfoblastická leukémie, A549 – karcinom plic, HT-29 – kolorektální karcinom, PANC-1 – karcinom pankreatu, A2780 – ovariální karcinom, HeLa – cervikální adenokarcinom, MCF-7 – karcinom prsu, SAOS-2 – osteosarkom) a jedné linie nenádorové (MRC-5 – plicní fibroblast). Z testovaných sloučenin byl nejlepší účinek prokázán u derivátu

11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (**21**), který vykazoval významnou aktivitu zejména proti inhibici růstu nádorové buněčné linie HeLa ($IC_{50} = 0,2 \pm 0,1 \mu M$)⁶³. Derivát (**21**) vykazoval aktivitu i vůči buněčným liniím rezistentních na doxorubicin (HT-29, A549, PANC-1). Dobrých výsledků dosáhl také derivát 11-*O*-(3,5-dinitrobenzoyl)haemanthamin (**7**). Obě tyto látky (**7**, **12**) jsou nitroderiváty, které se vzájemně liší v substituci benzoylové skupiny. U derivátu 1,2-dihydrohaemanthaminu (**2**), který ve své struktuře neobsahuje dvojnou vazbu v poloze C1-C2, by sledován výrazný pokles aktivity, z toho se dá uvažovat, že dvojná vazba ve struktuře látky je pro účinek zásadní. V Tab. 14 jsou shrnuty výsledky antiproliferativní aktivity haemanthaminu (**1**), 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (**21**), 1,2-dihydrohaemanthaminu (**2**), 11-*O*-(3,5-dinitrobenzoyl)haemanthaminu (**7**) a doxorubicinu jako referenční látky, v Tab. 15 jsou shrnuty hodnoty IC_{50} pro nádorové a nenádorové buněčné linie haemanthaminu (**1**) a 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu.⁶³



Obr. 7: Příprava derivátů haemanthaminu pro testování protinádorové aktivity (převzato a upraveno)⁶³

Tabulka 14: Procenta růstu GP^a haemanthaminu, 1,2-dihydrohaemanthaminu, 11-*O*-(3,5-dinitrobenzoyl)haemanthaminu a 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu⁶³

Buněčná linie	haemanthamin (1)	2	7	21	doxorubicin
Jurkat	13 ± 3	104 ± 22	35 ± 3	0 ± 0	2 ± 1
MOLT-4	1 ± 1	85 ± 6	8 ± 1	2 ± 0	0 ± 2
A549	30 ± 6	96 ± 17	39 ± 5	6 ± 8	96 ± 1
HT-29	37 ± 6	89 ± 6	48 ± 6	0 ± 2	109 ± 7
PANC-1	42 ± 3	88 ± 7	39 ± 6	31 ± 10	81 ± 2
A2780	30 ± 5	93 ± 7	42 ± 3	1 ± 1	14 ± 7
HeLa	23 ± 2	99 ± 6	39 ± 3	0 ± 0	13 ± 1
MCF-7	11 ± 1	92 ± 0	11 ± 1	2 ± 1	33 ± 1
SAOS-2	28 ± 3	93 ± 3	30 ± 4	8 ± 14	26 ± 4
MRC-5	32 ± 2	112 ± 4	37 ± 5	0 ± 3	34 ± 4

^a měřené při koncentraci 10 μM pro testované buněčné linie v % proliferace po 48 hodinách⁶¹

Hodnoty jsou vyjádřené jako střední hodnoty alespoň 3 nezávislých měření,

Doxorubicin – referenční látka, koncentrace 1 μM

Tabulka 15: Hodnoty IC₅₀ haemanthaminu a 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (21) vyjádřené v μM⁶³

Buněčná linie	haemanthamin (1)	11- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin
Jurkat	2,4 ± 0,3	5,3 ± 0,1
MOLT-4	1,2 ± 0,2	5,0 ± 0,2
A549	1,4 ± 0,5	1,7 ± 0,1
HT-29	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,1
PANC-1	2,5 ± 0,6	10,1 ± 0,6
A2780	2,2 ± 0,2	7,2 ± 0,3
HeLa	2,1 ± 0,3	0,2 ± 0,1
MCF-7	1,3 ± 0,2	2,6 ± 0,3
SAOS-2	2,3 ± 0,5	8,3 ± 0,4
MRC-5	2,5 ± 0,6	2,3 ± 0,2

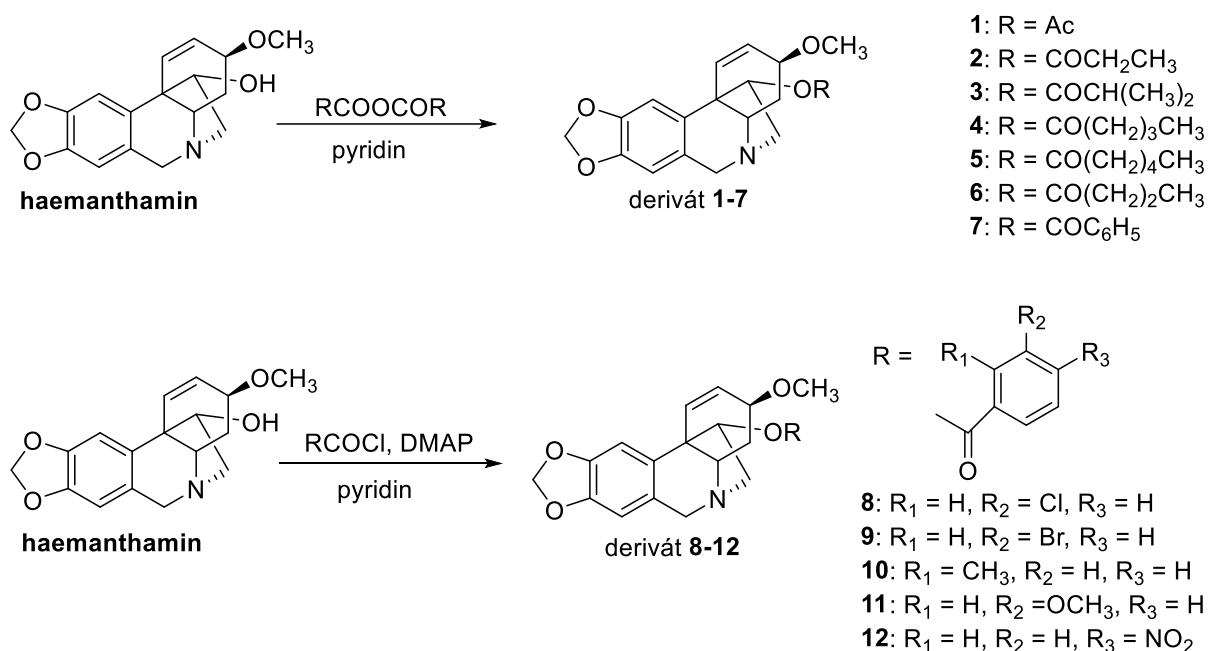
Hodnoty jsou vyjádřené jako střední hodnoty ± standardní odchylky minimálně tři nezávislých měření

3.5.2. Inhibice AChE, BuChE a GSK-3β

V roce 2019 vědecká skupina ADINACO připravila 12 derivátů haemanthaminu a podrobila je testům na jejich inhibiční potenciál proti acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.⁶⁰ Pro testování byla použita acetylcholinesteráza lidského původu (*hAChE*) a lidská sérová butyrylcholinesteráza (*hBuChE*). U aktivních derivátů byla testována jejich účinnost proti GSK-3β. Testována byla také schopnost látek prostupovat hematoencefalickou bariérou a tedy dostupnost do centrálního nervového systému (CNS). Nejzajímavějšího potenciálu dosáhly zejména dva připravené deriváty 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin. Obě sloučeniny vykazují dobrý inhibiční potenciál

vůči oběma cholinesterázám i GSK-3 β a zároveň se u nich předpokládá dobrá permeace do CNS.⁶⁰

Příprava derivátů haemanthaminu byla inspirována lykorinem, amarylkovitým alkaloidem, jehož schopnost inhibice cholinesteráz je nízká, avšak jeho acylované a etherifikované deriváty vykazují silnou inhibiční aktivitu.⁶⁰ Derivatizací volné hydroxylové skupiny haemanthaminu v poloze C11 bylo připraveno 6 alifatických (**1-6**) a 6 aromatických (**7-12**) derivátů. Sloučeniny **1-5** byly připraveny acylací pomocí anhydridů, deriváty **6-12** byly připraveny acylací různě substituovanými acylchloridy za vzniku odpovídajících esterů (Obr. 8).⁶⁰



Obrázek 8: Příprava derivátů haemanthaminu **1-12** (převzato a upraveno)⁶⁰

V rámci *hAChE/hBuChE* screeningu alifatické estery haemanthaminu **1-6** vykazovaly velmi nízkou ($IC_{50} \geq 200 \mu M$) nebo žádnou inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám ($IC_{50} \geq 1000 \mu M$).⁶⁰ Důležitým znakem pro schopnost inhibice cholinesteráz se tak jeví přítomnost aromatického acylu, který nacházíme v molekule derivátů **7-12**. Nejúčinnější deriváty 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (**10**) a 11-*O*-(4-nitrobenzoyl)haemanthamin (**12**) vykazovaly inhibiční aktivitu v dvoumístných mikromolárních hodnotách IC_{50} . Derivát (**10**) navíc vykazoval neselektivní aktivitu v mikromolárních hodnotách vůči oběma cholinesterázám. Výsledky screeningu jsou shrnuty v Tab. 16. U vybraných

haemanthaminových derivátů **7, 10, 12** byl testován inhibiční potenciál vůči GSK-3 β při koncentraci 10 μ M. Nejvyšší inhibiční účinnost byla prokázána u derivátu **12**, u kterého byla následovně stanovena i hodnota IC₅₀, čímž byla prokázána nižší účinnost tohoto derivátu proti dalším nativním AAs masoninu, karaninu a narcimatulinu.⁶⁰

Tabulka 16: Biologická aktivita derivátů haemanthaminu spojená s AD⁶⁰

Sloučenina	<i>hAChE</i> IC ₅₀ (μ M) ^a	<i>hBuChE</i> IC ₅₀ (μ M) ^a	SI AChE ^b	GSK-3 β % inhibice ^c	GSK-3 β IC ₅₀ ^a (μ M)
haemanthamin	> 500	> 500	-	-	-
1	> 500	> 500	-	-	-
2	> 500	437 \pm 38	< 0,9	-	-
3	> 500	203 \pm 8	< 0,4	-	-
4	> 500	> 500	-	-	-
5	> 500	273 \pm 18	< 0,5	-	-
6	> 500	140 \pm 21	< 0,3	-	-
7	294 \pm 25	5,8 \pm 0,3	0,02	11 \pm 2	-
8	85,1 \pm 6,4	80,2 \pm 10,2	0,9	-	-
9	112 \pm 21	129 \pm 25	1,1	-	-
10	18,2 \pm 1,3	6,6 \pm 1,2	0,4	15 \pm 6	-
11	180 \pm 17	75,5 \pm 12,5	0,4	-	-
12	14,7 \pm 1,8	> 500	34,0	27 \pm 9	34,8 \pm 0,01
galanthamin	1,7 \pm 0,1	42,3 \pm 1,3	24,9	-	-

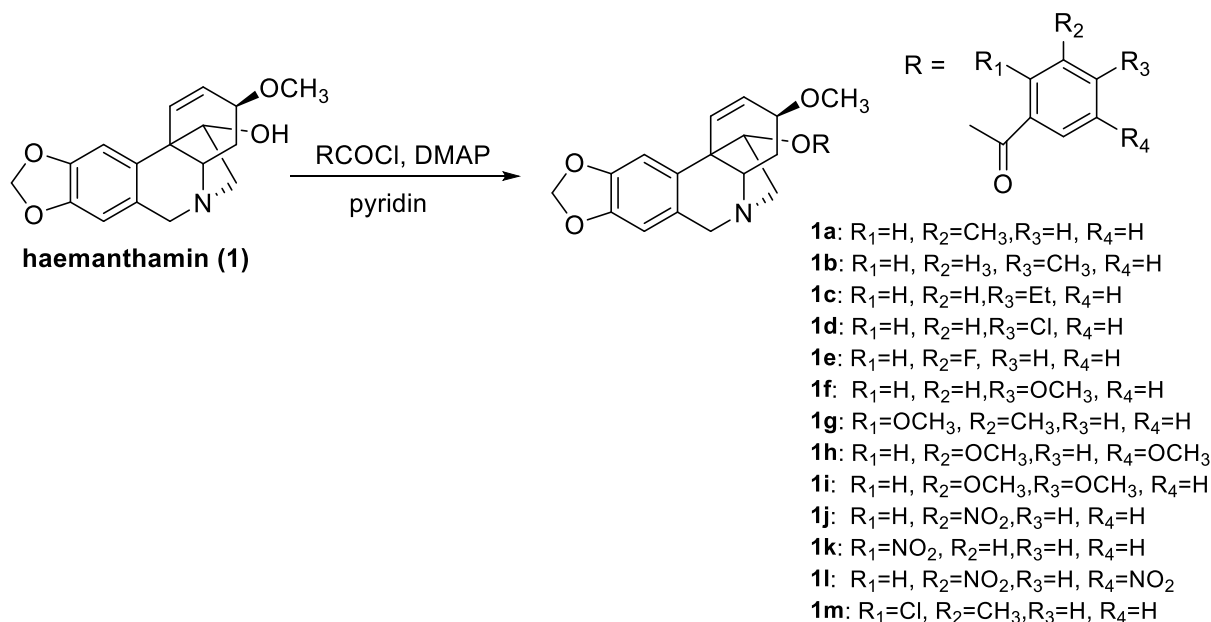
^a koncentrace látky potřebná ke snížení aktivity enzymu o 50 %, hodnota udává průměr \pm SEM tří nezávislých měření, každé provedeno třikrát

^b Selektivní index AChE stanoven jako poměr *hBuChE* IC₅₀/*hAChE* IC₅₀

^c testováno při koncentraci 10 μ M

V roce 2020 stejná vědecká skupina navázala na svůj předchozí výzkum a navrhla, syntetizovala a následně testovala další řadu haemanthaminových derivátů na *in vitro* aktivitu spojenou s Alzheimerovou chorobou.⁶¹ Acylací volné hydroxylové skupiny haemanthaminu v poloze C11 za použití různých benzoylchloridů bylo připraveno dalších 12 aromatických esterů (Obr. 9). Inhibiční vlastnosti sloučenin byly zjišťovány Ellmanovou metodou s použitím galanthaminu a eserinu jako referenčních sloučenin. Dále byla testována schopnost látek pronikat hematoencefalickou bariérou a schopnost působit v CNS. Významná inhibice *hAChE* byla prokázána stejně jako v předchozí studii u derivátu s nitroskupinou u derivátu **1j** 11-*O*-(3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (IC₅₀ = 4,0 \pm 0,3 μ M).⁶¹ Nejsilnější inhibice *hBuChE* byla prokázána u derivátu **1g** 11-*O*-(2-methoxybenzoyl)haemanthaminu (IC₅₀ = 3,3 \pm 0,4 μ M). Pro inhibici *hBuChE* je pravděpodobně rozhodující přítomnost methoxy skupiny v poloze *ortho* na aromatickém jádře. Deriváty substituované methylem v poloze *ortho* na aromatickém jádře vykazovaly

neselektivní schopnost inhibice obou enzymů. Substituce methylem v polohách 3- a 4- na aromatickém jádře vedla k úplné ztrátě nebo výraznému snížení schopnosti inhibovat AChE i BuChE. Substituce v poloze *ortho* na aromatickém jádře zabraňuje pravděpodobně volné rotaci benzoylové skupiny a umožňuje tak vhodnou orientaci do aktivního místa cholinesterázy (Tab. 17).⁶¹



Obrázek 9: Příprava derivátů haemanthaminu **1a-1m** (převzato a upraveno)⁶¹

Tabulka 17: *In vitro* aktivita derivátů haemanthaminu **1a-1m** vůči *hAChE* a *hBuChE*⁶¹

Sloučenina	<i>hAChE</i> + SEM ^a IC ₅₀ (μM)	SI <i>hAChE</i> ^b	<i>hBuChE</i> + SEM ^a IC ₅₀ (μM)	SI <i>hBuChE</i> ^c
haemanthamin	> 100	-	> 100	-
1a	> 100	< 0,26	26 ± 3	> 3,8
1b	> 100	-	> 100	-
1c	> 100	-	> 100	-
1d	> 100	-	> 100	-
1e	80 ± 8	0,52	42 ± 3,4	1,9
1f	> 100	-	> 100	-
1g	90 ± 6	0,04	3,3 ± 0,4	26
1h	> 100	-	> 100	-
1i	> 100	-	> 100	-
1j	4,0 ± 0,3	> 25	> 100	< 0,04
1k	9,9 ± 0,5	> 10	> 100	< 0,09
1m	13 ± 1	0,43	5,6 ± 0,6	2,3
galanthamin	1,7 ± 0,1	24,9	42 ± 1,3	0,04

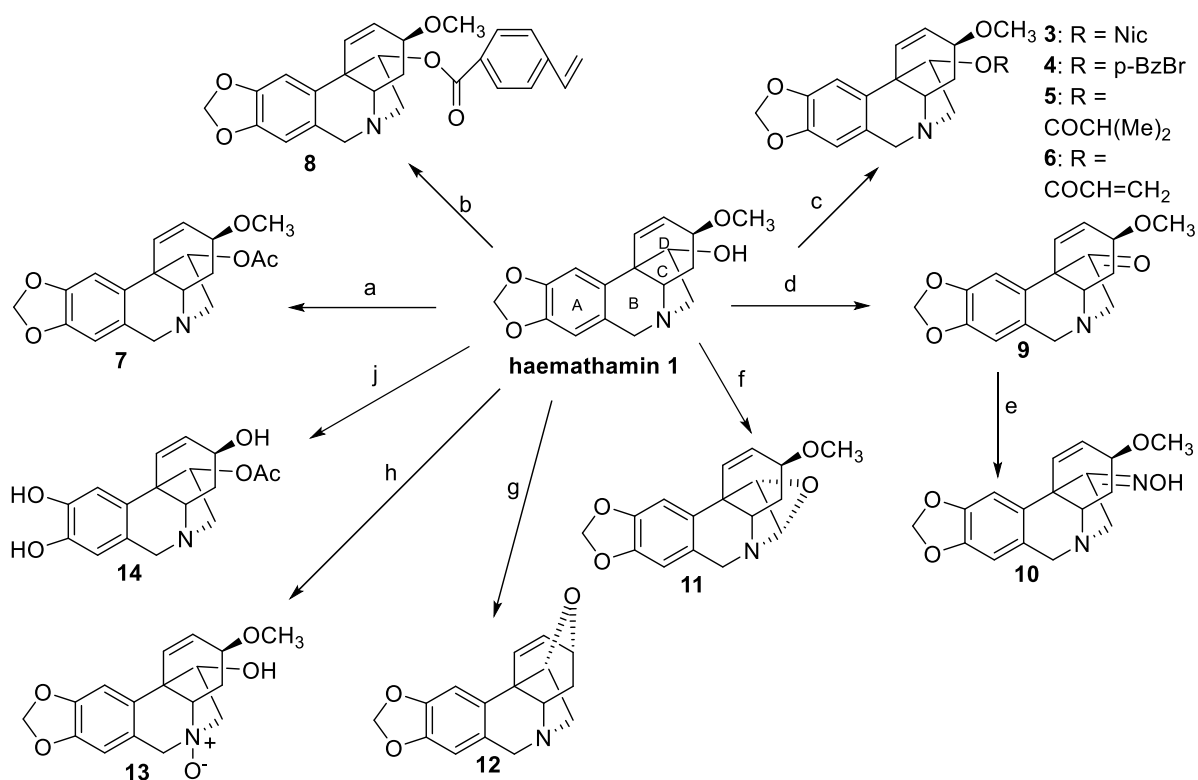
^a koncentrace látky potřebná ke snížení aktivity enzymu o 50 %, hodnota udává průměr ± SEM tří nezávislých měření, každé provedeno třikrát

^b Selektivní index *hAChE* stanoven jako poměr *hBuChE* IC₅₀/*hAChE* IC₅₀

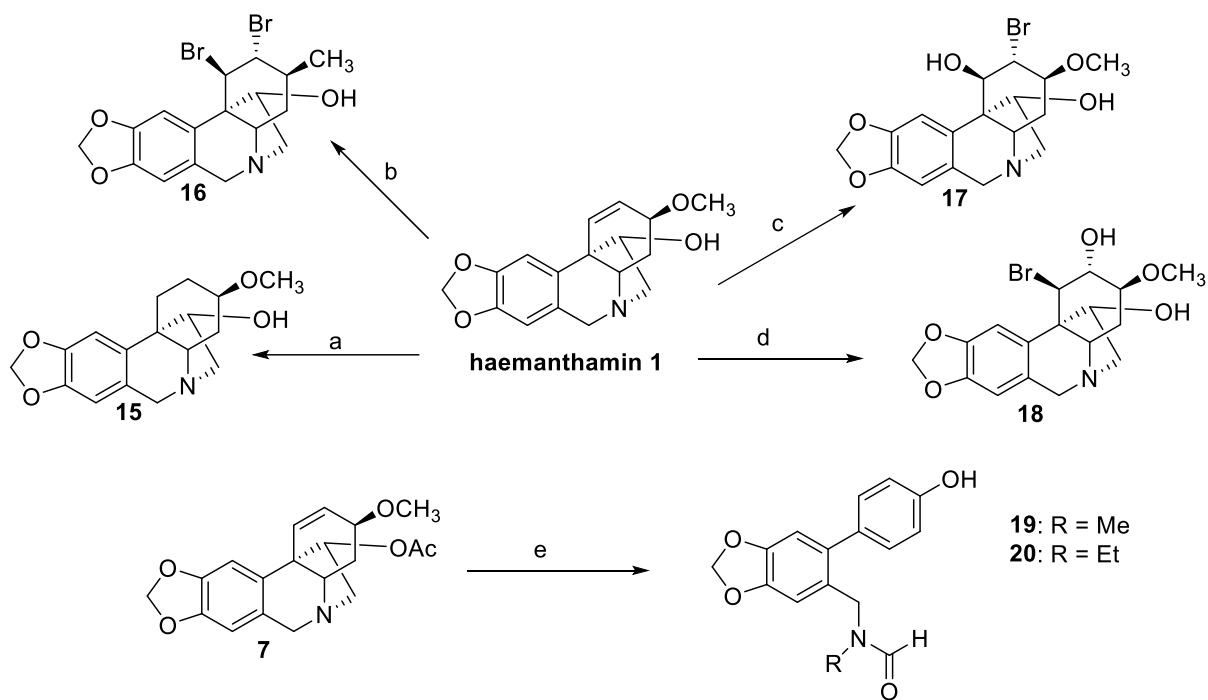
^c Selektivní index *hBuChE* stanoven jako poměr *hAChE* IC₅₀/*hBuChE* IC₅₀

3.5.3. Antimalarická aktivita

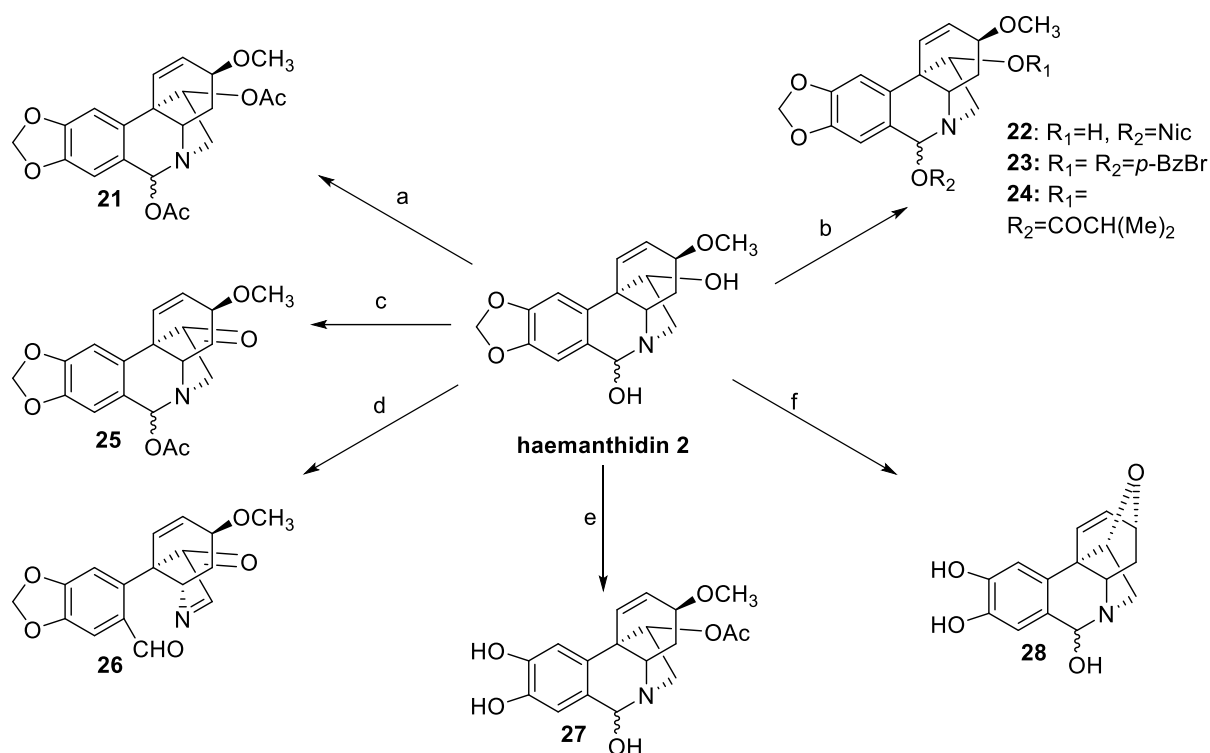
Pro testování *in vitro* antimalarické aktivity proti kmenům *Plasmodium falciparum* F32 citlivých na chlorochin byla v roce 2012 připravena řada derivátů alkaloidů haemanthaminu (**1**) a haemanthidinu (**2**). Tyto přírodní alkaloidy byly předem izolovány z *Pancreatum canariense*.⁶⁴ Strukturní obměny alkaloidů byly provedeny na hydroxylové skupině v poloze C11 nebo na dvojně vazbě v kruhu D. Esterové deriváty **3-6** byly připraveny acylací pomocí různých acylchloridů (nikotyl, *p*-brombenzoyl, isobutyryl a akryloylchlorid). Derivát **7** byl získán acetylací anhydridem kyseliny octové. Esterový derivát **8**, který ve své struktuře obsahuje terminální vinylovou skupinu, vznikl za použití kyseliny *p*-vinylbenzoové. Derivát **9** vznikl oxidací hydroxylové skupiny za vzniku ketonu pomocí Jonesova činidla. Následnou reakcí derivátu **9** a hydroxylaminhydrochloridu vznikl derivát **10**, který ve své struktuře obsahuje oximové uspořádání. Reakcí haemanthaminu s NBS vznikl epoxidový derivát **11**. Apohaemanthamin (**12**) vznikl za použití koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Reakcí haemanthaminu s H₂O₂ vznikl odpovídající *N*-oxidový derivát **13**. Polyhydroxylovaný derivát **14** vznikl reakcí s BBr₃. Hydrogenací a bromací dvojně vazby v kruhu D vznikly deriváty **15** a **16**. Reakcí haemanthaminu s *N*-bromacetamidem by připraven derivát **17**. Derivát **18** vznikl za bezvodých podmínek. Reakcí **7** s různými alkyhalogenidy byly připraveny bifenylové deriváty **19** a **20**. Příprava derivátů haemanthaminu je shrnuta na Obr. 10 a Obr. 11. Deriváty haemanthidinu byly připraveny za využití podobných mechanismů. Princip přípravy derivátů haemanthidinu je shrnut na Obr. 12.^{22,64}



Obrázek 10: Strukturální modifikace haemanthaminu (**1-14**) pro testování *in vitro* antimalarické aktivity. Reakční činidla a podmínky: (a) Ac₂O, pyridin, (b) *p*-vinylbenzoová kyselina, DCC, DCN, (c) RCl, Net₃, DCM, (d) Jonesovo činidlo, aceton, (e) NH₃OHCl, NaOAc, EtOH, reflux, 15 h, (f) NBS, DCM, (g) 6M HCl 100°C, 4 h (h) 30% H₂O₂, MeOH, 24 h, (j) BBr₃, DCM, 0°C. (převzato a upraveno)²²



Obrázek 11: Strukturní modifikace haemanthaminu (15-20) pro testování *in vitro* antimalarické aktivity. Reakční činidla a podmínky: (a) H_2 , 10% Pd/C, THF, (b) Br_2 , DCM, 24 h, (c) CH_3CONHBr , SnCl_4 , H_2O , CH_3CN , 0°C , (d) CH_3 , CONHBr , SnCl_4 , H_2O , CH_3CN , 0°C , (e) RX , CH_3CN , 24 h, $t\text{-BuOK}/t\text{-BuOH}$, reflux, 4 h. (převzato a upraveno)²²



Obrázek 12: Strukturální modifikace haemanthidinu (**21-28**) pro testování *in vitro* antimalarické aktivity. Reakční činidla a podmínky: (a) Ac₂O, pyridin, (b) RCl, Net₃, DCM, (c) Jonesovo činidlo, aceton, (d) TEMPO, NBu₄I, *m*-CPBA, 24 h, (e) BBr₃, DCM, 0 °C, (f) 6 M HCl 100 °C, 4 h (převzato a upraveno)²²

Z výsledků měření antimalarické aktivity (Tab. 18) můžeme vyvodit několik vztahů mezi strukturou a aktivitou. U esterových derivátů haemanthaminu **3-8** byla pozorována výrazně snížená aktivita. Méně aktivní byla také sloučenina **9** s oxidovanou hydroxylovou skupinou. Pro antimalarickou aktivitu je pravděpodobně důležitá dvojná vazba v poloze C1 a C2, jelikož deriváty s modifikací této vazby **15-18** byly méně aktivní než přírodní haemanthamin. U derivátů **19** a **20**, u kterých byla struktura zjednodušena, došlo ke dramatickému snížení aktivity. Epoxidový derivát **11** (IC₅₀ = 1,6 ± 0,1 μM) prokázal podobnou antimalarickou aktivitu jako haemanthamin (IC₅₀ = 1,3 ± 0,2 μM). Všechny připravené deriváty haemanthidinu **21-28** vykazovaly nižší aktivitu než haemanthamin. Diacetylovaný derivát **23** vykazoval z derivátů haemanthidinu nejlepší antimalarickou účinnost (IC₅₀ = 2,9 ± 0,6 μM).^{22,64} Z výsledků studie je možné vyvodit, že některé AAs haemanthaminového strukturního typu jsou dobrými inhibitory *Plasmodium falciparum* a mohou tak být vhodnými kandidáty pro vývoj dalších semisyntetických derivátů s vylepšeným antimalarickým účinkem.^{22,64}

Tabulka 18: *In vitro* antimalarická aktivita proti *Plasmodium falciparum* F32 haemanthaminu, haemanthidinu a jejich semisyntetických derivátů²²

Sloučenina	IC ₅₀ (μM)	Sloučenina	IC ₅₀ (μM)
haemanthamin	1,3 ± 0,2	15	9,9 ± 1,3
haemanthidin	1,2 ± 0,1	16	6,5 ± 0,9
3	51,7 ± 4,9	17	62,6 ± 7,5
4	43,3 ± 4,1	18	72,6 ± 5,0
5	56,6 ± 8,1	19	73,4 ± 10,5
6	8,4 ± 1,7	20	> 100
7	75,8 ± 8,7	21	52,3 ± 7,5
8	> 100	22	7,1 ± 0,9
9	73,5 ± 10,0	23	2,9 ± 0,6
10	95,5 ± 9,5	24	52,5 ± 6,6
11	1,6 ± 0,1	25	85,7 ± 9,5
12	92,9 ± 14,8	26	76,6 ± 9,6
13	> 100	27	72,1 ± 10,0
14	13,4 ± 1,8	28	84,2 ± 10,5

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie, materiál a metody

4.1.1. Izolace haemanthaminu

Výchozí látka haemanthamin byla izolována z cibulí *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master na Katedře Farmakognozie a farmaceutické botaniky (zpracovala PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D.) za účelem studování vztahů struktury a účinku.⁵³

4.1.2. Rozpouštědla, chemikálie, detekční činidla

4-butylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
4-decylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
3,5-diethoxybenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
diethylamin, p. a. (Et₂NH), Penta
3,5-dimethoxybenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
dimethylaminopyridin, p. a. (DMAP), Penta
3,5-dimethylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
N,N-dimethylformamid, p. a. (DMF), Penta
Dragendorffovo činidlo (připraveno v laboratoři)
ethanol 95%, p. a. (EtOH), Penta
ethylacetát, p. a. (EtOAc), Penta
4-isopropylbenzoyl bromid, ≥ 99%, Acros
4-heptylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
4-hexylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
hydrid sodný, p. a. (NaH), Penta
chloroform, p. a. (CHCl₃), Penta
methanol, p. a. (MeOH), Penta
1-naftoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
2-naftoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
4-pentylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
pyridin, p. a. (Py), Penta
4-*terc*butylbenzoyl chlorid, ≥ 99%, Acros
4-*terc*butylbenzoyl bromid, ≥ 99%, Acros

tetrahydrofuran, p. a. (THF), Penta
toluen, p. a. (To), Penta
trimethylbenzoyl chlorid, $\geq 99\%$, Acros

4.1.3. Materiál pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografií

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

4.1.4. Mobilní fáze pro preparativní a analytickou tenkovrstvou chromatografií

S₁ – To:Et₂NH 9:1

S₂ – EtAOc:MeOH:H₂O 100:13:10

4.2. Strukturní analýza připravených derivátů

4.2.1. GC-MS analýza

Za účelem stanovení molekulové hmotnosti připravovaných látek byla použita GC-MS analýza. Na měření byl použit plynový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies 7890 A GC 5975 inert MSD pracujícím v EI režimu při 70 eV. K separaci byla použita kolona typu DB-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Teplotní rozsah byl v rozpětí teplot 100–300 °C, přičemž v rozmezí 100–180 °C vzrůstala teplota o 15 °C/min. Při dosažení 180 °C byla teplota udržována po dobu jedné minuty a následně stoupala do 300 °C rychlostí 5 °C/min a poté opět na této hodnotě udržována 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 nastříkovaného vzorku v methanolu byla většinou 1 mg/ml. V některém případě bylo nutno použít nástřik s nižší koncentrací 3 μg/ml, aby se daný derivát zobrazil ve spektru. Získané známé látky byly porovnány s daty v literatuře, strukturně nepopsané látky byly charakterizovány poprvé.

4.2.2. ESI-HRMS analýza

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

4.2.3. NMR analýza

NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl₃ případně CD₃OD při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 (Varian) pracujícím při 500 MHz pro ¹H jádra a 125,70 MHz pro ¹³C jádra a na spektrometru JNM-ECZ600R (Jeol), pracujícím při 600 MHz pro ¹H a 151 MHz pro ¹³C. K ozařování a detekci signálu byla použita OneNMR sonda, širokopásmová dvoukanálová gradientní sonda s regulací teploty. Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ parts per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl₃ jsou u atomů ¹H δ = 7,26 ppm a u atomů ¹³C δ = 77,0 ppm, pro CD₃OD jsou u atomů ¹H δ = 3,30 ppm a u ¹³C δ = 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).

4.2.4. Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v roztocích alkaloidů při 24 °C na automatickém polarimetru P3000 (Krüss Optronic) v prostředí chloroformu, methanolu nebo ethanolu. Poté byla dopočtena specifická otáčivost dle vzorce:

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

t – teplota měření = 24 °C

D – linie sodíkového světla = 589,3 nm

α – naměřená optická otáčivost [°C]

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

l – délka kyvety = 1 dm

4.3. Metody pro screening biologických aktivit připravených derivátů

4.3.1. Stanovení *in vitro* inhibiční aktivity derivátů vůči hAChE a hBuChE

In vitro inhibiční aktivita těchto enzymů byla měřena na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Jednalo se o Ellmanovu metodu a měření prováděla PharmDr. Daniela Hulcová, Ph.D. Podrobný popis této metody lze nalézt v literatuře.⁶⁰

4.3.2. Stanovení *in vitro* antimykobakteriální aktivity

Antimykobakteriální aktivita připravených derivátů byla testována ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. K měření, které prováděl PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D., bylo vybráno několik kmenů rychle rostoucích mykobakterií *Mycolicibacterium smegmatis* (ATCC 607), *Mycolicibacterium aurum* (ATCC 23366) a několik kmenů netuberkulózních mykobakterií – *Mycobacterium avium* (ATCC 25291), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) a avirulentní kmen *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (ATCC 9431). Podrobný popis metody je popsán v literatuře.⁵¹

4.3.3. Stanovení *in vitro* antifungální a antibakteriální aktivity

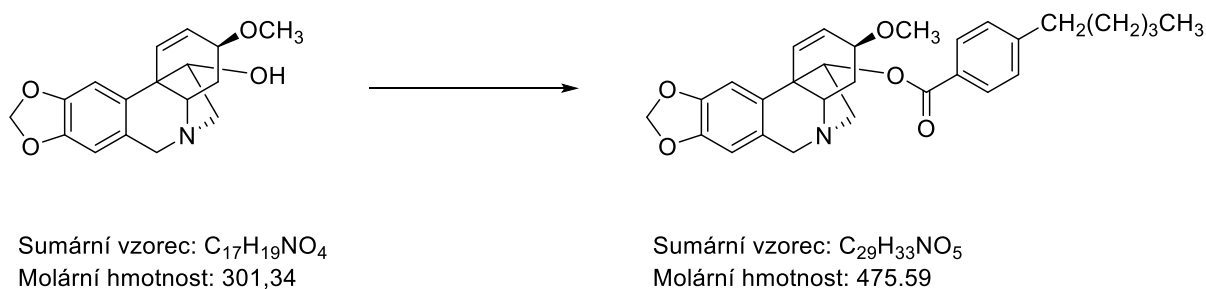
In vitro antifungální a antibakteriální aktivita byla testována ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření prováděla RNDr. Klára Konečná, Ph.D., Ida Dufková a Ing. Jana Vacková. Pro testování *in vitro* antifungální aktivity byly vybrány 4 kmeny kvasinek – *Candida albicans* (ATCC 24443), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750) a 4 kmeny hub – *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspergillus flavus* (CCM 8363), *Lichteimia corymbifera* (CCM 8077), *Trichophyton interdigitale* (ATCC 9533).

Pro stanovení antibakteriální aktivity bylo vybráno 8 bakteriálních kmenů – na meticilin citlivý *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MSSA, ATCC 29213), meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA, ATCC 4330), *Staphylococcus epidermidis*

(ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 2921), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Přesný popis metody lze nalézt v literatuře.⁵¹

4.4. Příprava semisyntetických derivátů haemanthaminu a jejich strukturní identifikace

4.4.1. Příprava 11-O-(4-pentylbenzoyl)haemanthaminu (DP-1)



Obrázek 13: Schéma přípravy 11-O-(4-pentylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μ l reakčního činidla 4-pentylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol ($CHCl_3$:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 18 mg produktu 11-O-(4-pentylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 60 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota $C_{29}H_{34}NO_5^+$ $[M+H]^+$ 475,59, v měření

NMR analýza

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)

δ : 7.84–7.79 (m, 2H, AA'BB'), 7.24–7.20 (m, 2H, AA'BB'), 6.94 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.41 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.14–6.08 (m, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.18 (dd, $J = 7.1$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.88–3.83 (m, 1H), 3.77 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 14.4$ Hz,

$J = 7.1$ Hz, 1H), 3.48–3.40 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.67–2.61 (m, 2H), 2.16–2.05 (m, 2H), 1.66–1.58 (m, 2H), 1.38–1.26 (m, 4H), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

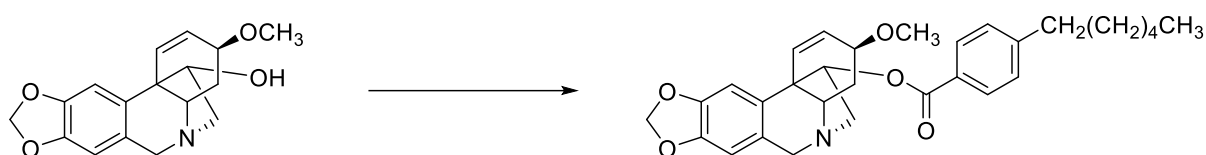
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3)

δ : 165.5, 148.8, 146.8, 146.6, 134.4, 129.5, 129.4, 128.5, 127.7, 127.5, 126.5, 106.7, 104.0, 100.9, 80.7, 72.5, 63.0, 61.3, 61.1, 56.5, 49.2, 36.0, 31.4, 30.8, 28.6, 22.5, 14.0.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +53,3^\circ$ ($c = 0,125$; CHCl_3)

4.4.2. Příprava 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthaminu (DP-2)



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

Sumární vzorec: $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{NO}_5$
Molární hmotnost: 489,61

Obrázek 14: Schéma přípravy 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μl reakčního činidla 4-hexylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl_3 :EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 22 mg produktu 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 75 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 489,61, v měření

NMR analýza

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3)

δ : 7.84–7.79 (m, 2H, AA'BB'), 7.24–7.20 (m, 2H, AA'BB'), 6.94 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.41 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.14–6.08 (m, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.18 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.88–3.83 (m, 1H), 3.77 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.48–3.40 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.67–2.61 (m, 2H), 2.16–2.05 (m, 2H), 1.65–1.57 (m, 2H), 1.35–1.26 (m, 6H), 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

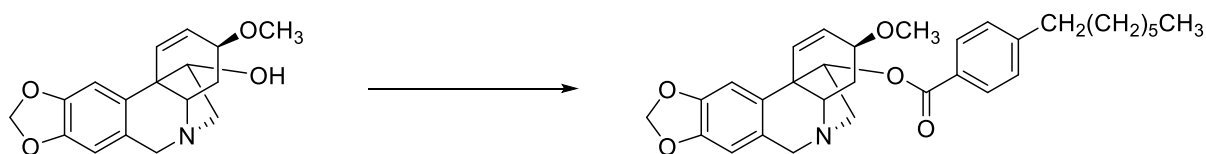
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3)

δ : 165.6, 148.8, 146.8, 146.6, 134.4, 129.6, 129.4, 128.5, 127.7 (2 \times C), 127.5, 106.7, 104.0, 100.9, 80.7, 72.5, 63.0, 61.2, 61.1, 56.5, 49.2, 36.0, 31.6, 31.1, 28.9, 28.5, 22.6, 14.1.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +58,2^\circ$ ($c = 0,125$; CHCl_3)

4.4.3. Příprava 11-*O*-(4-heptylbenzoyl)haemanthaminu (DP-3)



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

Sumární vzorec: $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{NO}_5$
Molární hmotnost: 503,64

Obrázek 15: Schéma přípravy 11-*O*-(4-heptylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μl reakčního činidla 4-heptylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 $^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl_3 :EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 18 mg produktu 11-*O*-(4-heptylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 58 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota $C_{31}H_{38}NO_5^+$ $[M+H]^+$ 503,64, v měření

NMR analýza

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)

δ : 7.83–7.78 (m, 2H, AA'BB'), 7.24–7.20 (m, 2H, AA'BB'), 6.94 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.11 (dd, $J = 10.0$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.92–5.87 (m, 2H), 5.18 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.88–3.83 (m, 1H), 3.78 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.50–3.42 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.66–2.61 (m, 2H), 2.19–2.13 (m, 1H), 2.09 (td, $J = 13.5$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 1H), 1.62–1.59 (m, 2H), 1.34–1.20 (m, 8H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

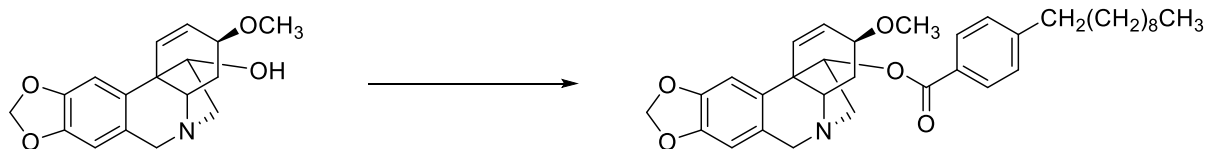
^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$)

δ : 165.5, 148.8, 146.8, 146.6, 134.2, 129.6, 129.4, 128.5, 127.5, 127.5, 126.1, 106.7, 104.0, 100.9, 80.5, 72.4, 63.0, 61.1, 60.9, 56.5, 49.3, 36.0, 31.7, 31.1, 29.2, 29.1, 28.4, 22.6, 14.0.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +61,0^\circ$ ($c = 0,125$; $CHCl_3$)

4.4.4. Příprava 11-*O*-(4-decylbenzoyl)haemanthaminu (DP-4)



Sumární vzorec: $C_{17}H_{19}NO_4$
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: $C_{34}H_{43}NO_5$
Molární hmotnost: 545,72

Obrázek 16: Schéma přípravy 11-*O*-(4-decylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μ l reakčního činidla 4-decylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol ($CHCl_3:EtOH$) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 14 mg

produktu 11-*O*-(4-decylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 50 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota $C_{34}H_{44}NO_5^+$ $[M+H]^+$ 545,72, v měření

NMR analýza

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$)

δ : 7.83–7.78 (m, 2H, AA'BB'), 7.24–7.20 (m, 2H, AA'BB'), 6.94 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.40 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.11 (dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.19 (dd, $J = 7.0$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.89–3.83 (m, 1H), 3.79 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 3.54 (dd, $J = 14.4$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.51–3.43 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.66–2.61 (m, 2H), 2.17 (dd, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H), 2.10 (td, $J = 13.7$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H), 1.64–1.57 (m, 2H), 1.34–1.23 (m, 14H), 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H).

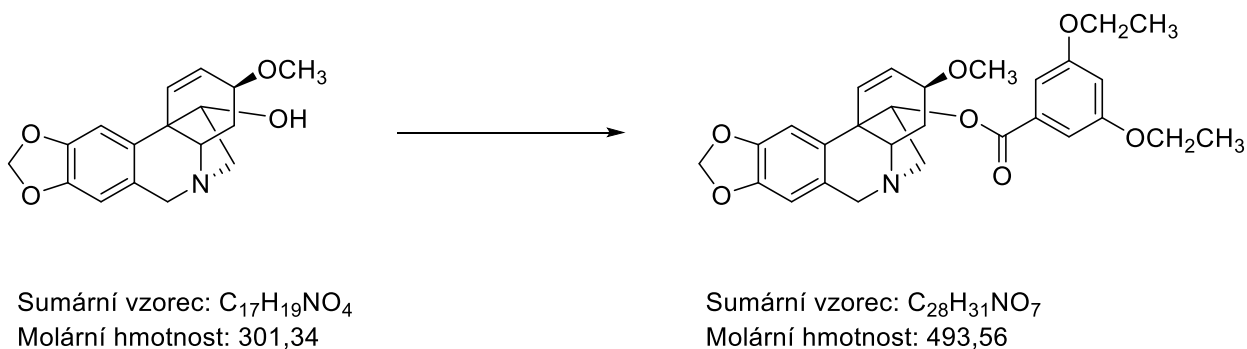
^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$)

δ : 165.5, 148.9, 146.9, 146.6, 134.2, 129.6, 129.4, 128.5, 127.5, 127.4, 126.0, 106.7, 104.0, 101.0, 80.4, 72.4, 63.1, 61.1, 60.9, 56.5, 49.3, 36.0, 31.9, 31.1, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.4, 22.6, 14.1.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +32,0^\circ$ ($c = 0,125$; $CHCl_3$)

4.4.5. Příprava 11-*O*-(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthaminu (RP-1)



Obrázek 17: Schéma přípravy 11-*O*-(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μ l reakčního činidla 3,5-diethoxybenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 $^\circ C$ po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl

rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 19 mg produktu 11-*O*-(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthaminu ve formě bílého amorfního prášku. Výtěžek reakce byl 63 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₈H₃₂NO₇⁺ [M+H]⁺ 494,21, nalezená 494,2181

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ: 7.04 (2H,d, J = 2.4 Hz), 6.96 (1H, s), 6.64 (1H, t, J = 2.4 Hz), 6.51 (1H, s), 6.43 (1H, d, J = 10.2 Hz), 6.14 (1H, dd, J = 10.2 Hz, J = 4.8 Hz), 5.94–5.91 (2H, m), 5.18 (1H, dd, J = 6.8 Hz, J = 3.7 Hz), 4.42 (1H, d, J = 16.8 Hz), 4.05 (4H, q, J = 6.9 Hz), 3.88–3.85 (1H, m), 3.80 (1H, d, J = 16.8 Hz), 3.57–3.43 (3H, m), 3.36 (3H, s), 2.20–2.14 (1H, m), 2.08 (1H, td, J = 4.2 Hz), 1.43 (6H, t, J = 6.9 Hz)

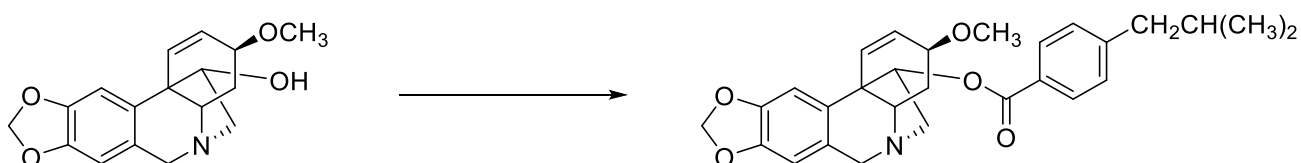
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 165.3, 160.0, 146.8, 146.6, 134.2, 131.8, 129.6, 127.6, 107.5, 106.7, 106.5, 104.0, 101.0, 80.8, 72.4, 63.8, 63.0, 61.1, 60.8, 56.5, 49.3, 28.4, 14.7.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +38.4^\circ$ (c = 0,125; CHCl₃)

4.4.6. Příprava 11-*O*-(4-*terc*butylbenzoyl)haemanthaminu (RP-18)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₈H₃₁NO₅
Molární hmotnost: 461,56

Obrázek 18: Schéma přípravy 11-*O*-(4-*terc*butylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μ l reakčního činidla 4-*terc*butylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 20 mg produktu 11-*O*-(4-*terc*butyllbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 60 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₈H₃₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 461,56, v měření

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ : 7.89–7.83 (m, 2H, AA'BB'), 7.49–7.43 (m, 2H, AA'BB'), 6.96 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.44 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 6.14 (dd, $J = 10.1$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.94–5.90 (m, 2H), 5.20 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.91–3.88 (m, 1H), 3.78 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.58–3.51 (m, 1H), 3.49–3.41 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.17–2.09 (m, 2H), 1.35 (s, 9H).

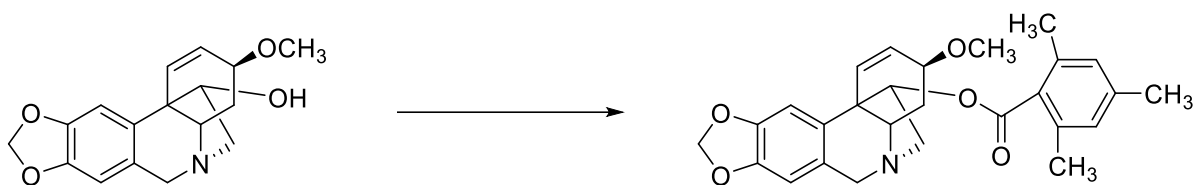
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃)

δ : 165.5, 156.8, 146.7, 146.5, 134.4, 129.5, 129.2, 127.8, 127.3, 126.6, 125.4, 106.6, 104.0, 100.9, 80.7, 72.5, 63.0, 61.3, 61.2, 56.5, 49.2, 35.1, 31.1, 28.6.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +45,6^\circ$ (c = 0,125; CHCl₃)

4.4.7. Příprava 11-*O*-(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthaminu (RP-23)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₇H₂₉NO₅
Molární hmotnost: 447,53

Obrázek 19: Schéma přípravy 11-*O*-(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μ l reakčního činidla 2,4,6-trimethylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 20 mg produktu 11-*O*-(trimethylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 65 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₇H₃₀NO₅⁺ [M+H]⁺ 447,53, v měření

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

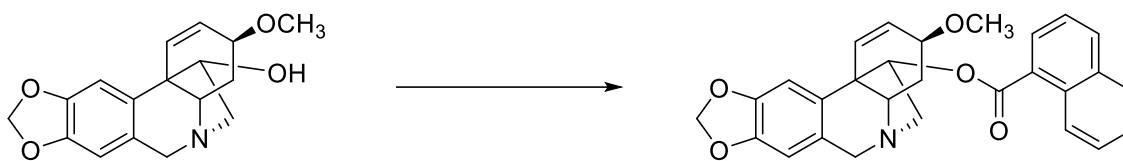
δ : 7.01 (s, 1H), 6.85 (s, 2H), 6.53 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.17 (dd, J = 10.1 Hz, J = 5.1 Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 5.20 (dd, J = 7.2 Hz, J = 3.7 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.81-3.70 (m, 2H), 3.55 (dd, J = 14.3 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 3.48–3.38 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 2.05–1.99 (m, 1H), 1.88 (td, J = 13.6 Hz, J = 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) v měření

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +82,3^\circ$ (c = 0,125; CHCl₃)

4.4.8. Příprava 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthaminu (LC-149)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₈H₂₅NO₅
Molární hmotnost: 455,51

Obrázek 20: Schéma přípravy 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 µl reakčního činidla 1-naftoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 22 mg produktu 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthaminu ve formě bílého amorfního prášku. Výtěžek reakce byl 73 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₈H₂₆NO₅⁺ [M+H]⁺ 456,18, nalezená 456,1810

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ: 8.90 (1H, d, J = 7.9 Hz), 8.03 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.90 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.62 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.55 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.49 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.03 (1H, s), 6.55 (1H, d, J=10.0 Hz), 6.53 (1H, s), 6.16 (1H, dd, J = 10.0 Hz, J = 5.4 Hz), 5.95–5.92 (2H, m), 5.33 (1H, dd, J = 7.0 Hz, J = 3.7 Hz), 4.43 (1H, d, J = 16.7 Hz), 3.90–3.84 (1H, m), 3.81 (1H, d, J = 16.7 Hz), 3.58 (1H, dd, overlap, J = 14.3 Hz, J = 7.0 Hz), 3.55 (1H, dd, overlap, J = 14.3 Hz, J = 3.4 Hz), 3.48 (1H, dd, J = 11.8 Hz, J = 5.9 Hz), 3.36 (3H, s), 2.18–2.07 (2H, m).

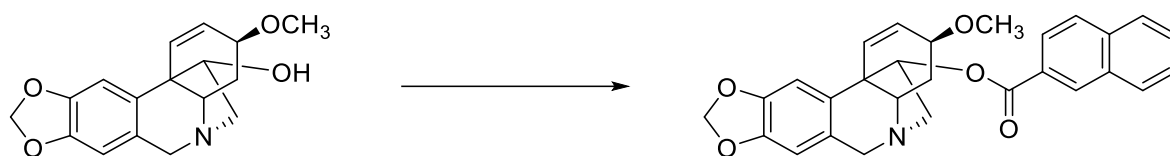
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 166.3, 146.7, 146.5, 134.4, 133.8, 133.5, 131.3, 129.6, 129.6, 128.5, 127.9, 127.8, 126.9, 126.6, 126.3, 125.6, 124.4, 106.6, 104.0, 100.9, 81.1, 72.5, 62.9, 61.2, 60.9, 56.5, 49.4, 28.6.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +71,4^\circ$ ($c = 0.185$, CHCl_3)

4.4.9. Příprava 11-O-(2-naftoyl)haemanthaminu (LC-148)



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

Sumární vzorec: $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{NO}_5$
Molární hmotnost: 455,51

Obrázek 21: Schéma přípravy 11-O-(2-naftoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μl reakčního činidla 2-naftoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol ($\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 19 mg produktu 11-O-(2-naftoyl)haemanthaminu ve formě bílého amorfního prášku. Výtěžek reakce byl 63 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 456,18, nalezená 456,1814

NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)

δ : 8.50 (1H, s), 7.98–7.93 (2H, m), 7.91–7.87 (2H, m), 7.61 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 7.57 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 6.99 (1H, s), 6.52 (1H, s), 6.48 (1H, d, $J = 9.9$ Hz), 6.13 (1H, dd, $J = 9.9$ Hz, $J = 4.9$ Hz), 5.94–5.91 (2H, m), 5.29 (1H, dd, $J = 6.4$ Hz, $J = 3.9$ Hz), 4.43 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.92–3.87 (1H, m), 3.80 (1H, d, $J = 16.8$ Hz), 3.62–3.52 (2H, m), 3.48 (1H, t, $J = 9.2$ Hz), 3.37 (3H, s), 2.21–2.16 (2H, m)

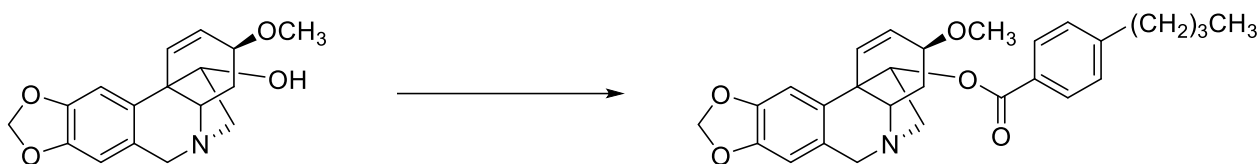
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 165.6, 146.7, 146.5, 135.5, 134.3, 132.4, 130.9, 129.6, 129.3, 128.4, 128.3, 127.8, 127.8, 127.4, 126.7, 126.6, 124.8, 106.6, 104.0, 100.9, 81.1, 72.5, 62.9, 61.3, 61.0, 56.5, 49.4, 28.7.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +76.2^\circ$ (c = 0,105, CHCl₃)

4.4.10. Příprava 11-O-(4-butylbenzoyl)haemanthaminu (LC-155)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₈H₃₁NO₅
Molární hmotnost: 461,56

Obrazek 22: Schéma přípravy 11-O-(4-butylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 µl reakčního činidla 4-butylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 20 mg produktu 11-O-(4-butylbenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 60 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₈H₃₂NO₅⁺ [M+H]⁺ 461,56, v měření

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ: 7.85–7.80 (m, 2H, AA'BB'), 7.26–7.21 (m, 2H, AA'BB'), 6.95 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.43 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.16–6.09 (m, 1H), 5.92–5.87 (m, 2H), 5.22–5.16 (m, 1H), 4.39 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.90–3.84 (m, 1H), 3.77 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 3.53 (dd, J = 14.5 Hz, J = 7.0 Hz, 1H), 3.48–

3.40 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.66 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.17–2.05 (m, 2H), 1.66–1.56 (m, 2H), 1.41–1.30 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

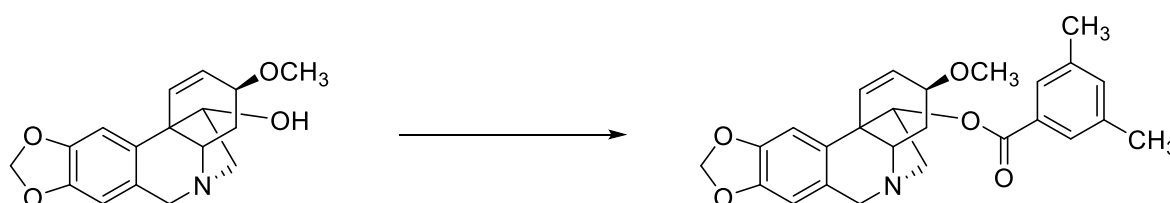
^{13}C (126 MHz, CDCl_3)

δ : 165.5, 148.6, 146.6, 146.4, 134.4, 129.4, 129.3, 128.5, 127.7, 127.5, 126.5, 106.6, 103.9, 100.8, 80.7, 72.5, 62.9, 61.2, 61.0, 56.4, 49.2, 35.6, 33.2, 28.5, 22.2, 13.8.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +38,3^\circ$ ($c = 0,105$, CHCl_3)

4.4.11. Příprava 11-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu (LC-107)



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

Sumární vzorec: $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_5$
Molární hmotnost: 433,50

Obrázek 23: Schéma přípravy 11-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 μl reakčního činidla 3,5-dimethylbenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 $^\circ\text{C}$ po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S_1 . Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl_3 :EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 24 mg produktu 11-*O*-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthaminu ve formě bílého amorfního prášku. Výtěžek reakce byl 80 %.

ESI–HRMS m/z teoretická hodnota $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 434,19, nalezená 434,1968

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

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

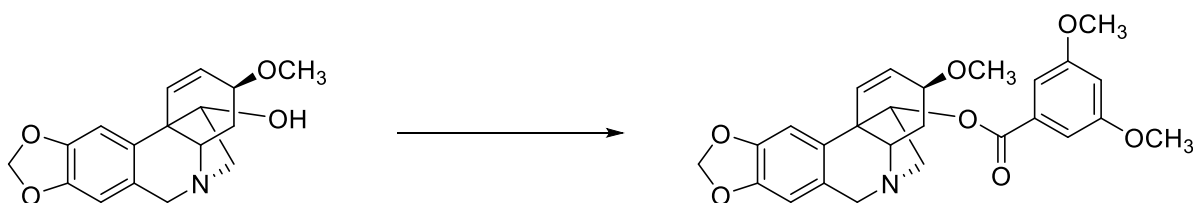
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 165.8, 146.7, 146.5, 138.0, 134.7, 134.3, 130.0, 129.4, 127.7, 127.0, 126.5, 106.6, 103.9, 100.9, 80.8, 72.5, 62.9, 61.2, 60.9, 56.5, 49.3, 28.6, 21.2.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +36.7^\circ$ (c = 0,120, CHCl₃)

4.4.12. Příprava 11-O-(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu (LC-59)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₆H₂₇NO₇
Molární hmotnost: 465,50

Obrázek 24: Schéma přípravy 11-O-(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno ve 2 ml bezvodého pyridinu, dále bylo přidáno 100 µl reakčního činidla 3,5-dimethoxybenzoyl chloridu a katalytické množství 2 mg DMAP. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 48 hodin a následně odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a reakce byla chromatografována pomocí preparační TLC za použití mobilní fáze S₁. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 25 mg produktu 11-O-(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 68 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₆H₂₈NO₇ [M+H]⁺ 466,18, nalezená 466,1862.

NMR analýza

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ: 7.07 (2H, d, J = 2.3 Hz), 6.95 (1H, s), 6.64 (1H, t, J = 2.3 Hz), 6.50 (1H, s), 6.43 (1H, d, J = 9.8 Hz), 6.15 (1H, dd, J = 9.8 Hz, J = 4.9 Hz), 5.93–5.88 (2H, m), 5.17 (1H, dd, J = 7.1 Hz, J = 3.4 Hz), 4.40 (1H, d, J = 16.8 Hz), 3.88–3.85 (1H, m), 3.82 (6H, s), 3.77 (1H, d, J = 16.8 Hz), 3.54 (1H, dd, J = 14.2 Hz, J = 7.1 Hz), 3.48–3.41 (2H, m), 3.36 (3H, s), 2.16–2.11 (1H, m), 2.07 (1H, td, J = 13.1 Hz, J = 3.9 Hz).

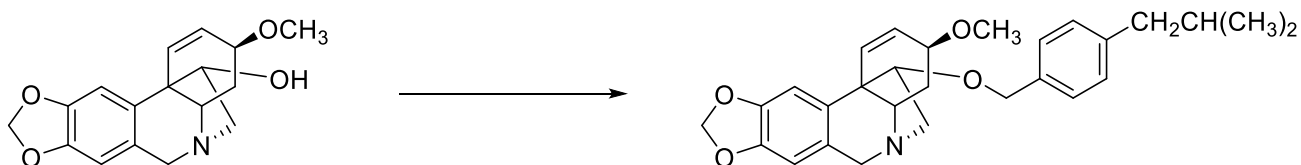
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 165.2, 160.6, 146.7, 146.5, 134.3, 132.0, 129.5, 127.7, 126.6, 107.0, 106.6, 105.4, 103.9, 100.9, 81.0, 72.5, 62.9, 61.2, 61.0, 56.5, 55.5, 49.2, 28.5.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +42.1^\circ$ (c = 0.114, CHCl₃)

4.4.13. Příprava 11-O-(4-tercbutylbenzyl)haemanthaminu (DP-5)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₈H₃₃NO₄
Molární hmotnost: 447,58

Obrázek 25: Schéma přípravy 11-O-(4-tercbutylbenzyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno v 2 ml bezvodého tetrahydrofuranu (THF) do úplného rozpuštění výchozí látky pod inertní atmosférou, následně bylo přidáno 1,2 ekvivalentu hydridu sodného (NaH) a celá reakční směs byla na ledové lázni pod dobu 10 minut. Poté bylo přidáno 1,1 ekvivalentu reakčního činidla (4-tercbutylbenzoyl bromidu) a po odpojení inertního plynu byla směs míchána při laboratorní teplotě 8 hodin. Poté byla celá reakční směs umístěna na vakuovou odparku, kde došlo k odstranění rozpouštědla a zbytek reakční směsi byl podroben preparativní TLC za použití mobilní fáze S2. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol

(CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 12 mg produktu 11-*O*-(4-isopropylbenzyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 45 %.

ESI-HRMS *m/z* teoretická hodnota C₂₈H₃₄NO₄⁺ [M+H]⁺ 447,58, v měření

NMR analýza

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)

δ: 7.18–7.11 (m, 4H), 6.87 (s, 1H), 6.52 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.22 (ddd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.90–5.85 (m, 2H), 4.50 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 3.90–3.85 (m, 1H), 3.76–3.71 (m, 1H), 3.70–3.62 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.35–3.29 (m, 3H), 2.90–2.84 (m, 1H), 2.19 (td, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.3 Hz, 1H), 2.04–1.98 (m, 1H), 1.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

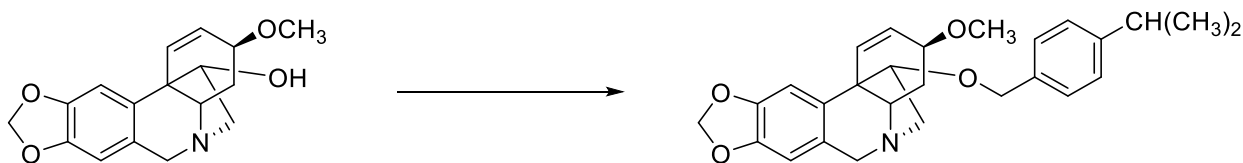
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃)

δ: 148.3, 146.6, 146.2, 135.8, 135.7, 129.6, 128.0, 127.3, 126.9, 126.5, 106.8, 103.5, 100.9, 88.1, 73.1, 72.6, 63.0, 62.3, 61.1, 56.6, 50.1, 33.9, 28.2, 24.1, 24.1.

Optická otáčivost

[α]_D^t = +41,4° (c = 0,105, CHCl₃)

4.4.14. Příprava 11-*O*-(4-isopropylbenzyl)haemanthaminu (DP-6)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₄
Molární hmotnost: 301,34

Sumární vzorec: C₂₇H₃₁NO₄
Molární hmotnost: 433,55

Obrázek 26: Schéma přípravy 11-*O*-(4-isopropylbenzyl)haemanthaminu

50 mg haemanthaminu bylo rozpuštěno v 2 ml bezvodého tetrahydrofuranu (THF) do úplného rozpuštění výchozí látky pod inertní atmosférou, následně bylo přidáno 1,2 ekvivalentu hydridu sodného (NaH) a celá reakční směs byla na ledové lázni pod dobu

10 minut. Poté bylo přidáno 1,1 ekvivalentu reakčního činidla (4-isopropylbenzoyl bromidu) a po odpojení inertního plynu byla směs míchána při laboratorní teplotě 8 hodin. Poté byla celá reakční směs umístěna na vakuovou odparku, kde došlo k odstranění rozpouštědla a zbytek reakční směsi byl podroben preparativní TLC za použití mobilní fáze S2. Z preparační desky byla separována jedna zóna, která byla následně promyta směsí chloroform:ethanol (CHCl₃:EtOH) 1:1 a poté do sucha odpařena. Proces byl průběžně monitorován pomocí analytických TLC a Dragendorffova činidla. Bylo získáno 10 mg produktu 11-*O*-(4-isopropylbenzyl)haemanthaminu hnědé olejovité konzistence. Výtěžek reakce byl 40 %.

ESI-HRMS m/z teoretická hodnota C₂₇H₃₂NO₄⁺ [M+H]⁺ 433,55, v měření

NMR analýza

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃)

δ: 7.35–7.30 (m, 2H, AA'BB'), 7.17–7.12 (m, 2H, AA'BB'), 6.87 (s, 1H), 6.53 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.22 (ddd, *J* = 10.0 Hz, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.90–5.85 (m, 2H), 4.51 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H), 3.91–3.86 (m, 1H), 3.76–3.70 (m, 1H), 3.66 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.36–3.28 (m, 3H), 2.19 (td, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.3 Hz, 1H), 2.01 (t, *J* = 13.3 Hz, 1H), 1.29 (s, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃)

δ: 150.6, 146.6, 146.2, 135.8, 135.5, 129.6, 128.1, 127.0, 126.6, 125.3, 106.8, 103.4, 100.9, 88.3, 73.1, 72.5, 63.1, 62.5, 61.2, 56.6, 50.1, 34.6, 31.4, 28.4.

Optická otáčivost

$[\alpha]_D^{25} = +29,1^\circ$ (c = 0,105, CHCl₃)

5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava semisyntetických derivátů haemanthaminu

Tabulka 19: Připravené sloučeniny a jejich molární hmotnost, výtěžek reakce

Označení látky	Chemický název	Molární hmotnost	Výtěžek [%]
DP-1	11- <i>O</i> -(4-pentylbenzoyl)haemanthamin	475,59	60
DP-2	11- <i>O</i> -(4-hexylbenzoyl)haemanthamin	489,61	75
DP-3	11- <i>O</i> -(4-heptylbenzoyl)haemanthamin	503,64	58
DP-4	11- <i>O</i> -(4-decylbenzoyl)haemanthamin	545,72	50
RP-1	11- <i>O</i> -(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthamin	493,56	63
RP-18	11- <i>O</i> -(4- <i>terc</i> butyllbenzoyl)haemanthamin	461,56	60
RP-23	11- <i>O</i> -(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthamin	447,53	65
LC-149	11- <i>O</i> -(1-naftoyl)haemanthamin	455,51	73
LC-148	11- <i>O</i> -(2-naftoyl)haemanthamin	455,51	63
LC-155	11- <i>O</i> -(4-butylbenzoyl)haemanthamin	461,56	60
LC-107	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthamin	433,50	80
LC-59	11- <i>O</i> -(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	465,50	68
DP-5	11- <i>O</i> -(4- <i>terc</i> butylbenzoyl)haemanthamin	447,58	45
DP-6	11- <i>O</i> -(4-isopropylbenzoyl)haemanthamin	433,55	40

5.2. Screening biologických aktivit

5.2.1. Inhibiční aktivita derivátů vůči *h*AChE a *h*BuChE a jejich přestup přes hematoencefalickou bariéru

K určení inhibiční aktivity připravených derivátů vůči AChE a BuChE byla použita Ellmanova metoda, látky byly testovány při koncentraci 10 μ M. Hodnota logBB byla vypočtena za využití volně dostupné aplikace www.way2drug.com/geb/. LogBB je číselná hodnota, která popisuje permeabilitu látky přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Látky s logBB > 0,3 snadno procházejí HEB, naopak špatně procházející jsou látky s hodnotou logBB < -1,0.⁶⁰

Schopnost inhibovat AChE a BuChE byla testována u několika připravených derivátů. Výsledky testování v porovnání se standardem jsou shrnuty v následující tabulce. Zbývající deriváty jsou v současné době v měření. Zdržení bylo způsobeno problémy s enzymy.

Tabulka 20: *In vitro* inhibiční aktivita připravených derivátů vůči hAChE a hBuChE

Látka	hAChE ± SEM % inhibice	hAChE ± SEM IC ₅₀ (μM)	hBuChE ± SEM % inhibice	hBuChE ± SEM IC ₅₀ (μM)	logBB
DP-1	1,67 ± 0,10	> 10	2,03 ± 1,0	> 10	0,242
DP-5	4,14 ± 2,06	> 10	54,80 ± 3,19	> 10	0,328
DP-6	2,26 ± 4,92	> 10	65,19 ± 3,65	> 10	0,255
RP-1	7,20 ± 2,30	> 10	7,15 ± 1,90	> 10	0,083
RP-18	5,30 ± 2,05	> 10	5,20 ± 1,65	> 10	0,242
RP-23	15,33 ± 3,30	> 10	12,35 ± 2,30	> 10	0,065
LC-148	10,20 ± 2,60	> 10	20,15 ± 0,16	> 10	0,091
LC-149	15,66 ± 1,90	> 10	45,12 ± 0,20	> 10	0,100
LC-155	8,20 ± 2,35	> 10	9,25 ± 2,05	> 10	0,242
LC-107	17,35 ± 4,05	> 10	35,70 ± 1,50	> 10	0,197
galanthamin	98,8 ± 1,1	2,0 ± 0,1	68,2 ± 1,2	29,31 ± 3,49	0,047

Testováno při 10 μM koncentraci, logBB vypočteno pomocí www.way2drug.com/geb/

5.2.2. Antimykobakteriální aktivita připravených derivátů

Připravené esterové aromatické deriváty byly podrobeny testům *in vitro* antimykobakteriální aktivity proti druhům *Mycolicibacterium smegmatis*, *Mycolicibacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Tab. 22) za použití isoniazidu, rifampicinu a ciprofloxacinu jako referenčních látek. Výsledky testování jsou shrnuty v Tab. 21.

Tabulka 21: *In vitro* antimykobakteriální aktivita připravených derivátů v porovnání se standardy v hodnotách MIC (μM, μg/ml)

Látka	<i>Mtb</i> H37Ra μM ^a	μg/ml	<i>M. aurum</i> μg/ml	<i>M. avium</i> μg/ml	<i>M. kansasii</i> μg/ml	<i>M. smeg.</i> μg/ml	cLogP ^b
DP-1	8,22	3,91	125	31,25	3,91	≥ 500	6,17
DP-2	15,95	7,81	250	31,25	7,81	≥ 500	6,70
DP-3	62,05	31,25	250	62,5	15,625	≥ 500	7,22
DP-4	≥ 916,22	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	≥ 500	8,81
RP-1	31,66	15,625	250	n.	n.	≥ 500	4,84
RP-18	16,92	7,81	7,81	n.	n.	31,25	5,51
RP-23	279,31	125	125	n.	n.	≥ 500	5,04
LC-148	34,30	15,625	15,625	n.	n.	250	4,73
LC-149	17,15	7,81	7,81	n.	n.	7,81	4,73
LC-155	16,92	7,81	7,81	n.	n.	250	5,64
LC-107	36,04	15,625	15,625	n.	n.	31,25	4,55
LC-59	67,13	31,25	31,25	n.	n.	≥ 500	3,78
INH	1,82	0,25	3,91	1000	3,125	15,625	-0,67
RFM	0,0075	0,003	0,39	0,0625	0,025	12,5	3,71
CPX	0,75	0,5	0,015	0,5	0,5	0,125	-0,62

INH – isoniazid, RFM – rifampicin, CPX – ciprofloxacin; n. – prozatím netestováno

^a vypočítáno z MIC (μg/ml); ^b vypočítáno pomocí ChemDraw

Tabulka 22: Seznam testovaných kmenů na antimykobakterální aktivitu

Zkratka	ATCC	DSM	Kmen
<i>M. smeg.</i>	607	43465	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>
<i>M. aurum</i>	23366	43999	<i>Mycolicibacterium aurum</i>
<i>M. avium</i>	25291	44156	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. kansasii</i>	12478	44162	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>M. Tbc</i> H37Ra	9431	ITM-M006710	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Ra</i>

5.2.3. Antifungální a antibakteriální aktivita připravených derivátů

Celkem u 7 připravených derivátů byla testována antimikrobiální aktivita proti několika různým druhům mikroorganismů, které zahrnovaly několik kmenů bakterií a kvasinek (Tab. 23). Výsledky *in vitro* antifungální aktivity jsou shrnuty v Tab. 24, výsledky *in vitro* antibakteriální aktivity v Tab. 25.

Tabulka 23: Seznam testovaných kmenů mikroorganismů na antibakteriální a antifungální aktivitu

Zkratka	Kmen	Zkratka	Kmen
CA	<i>Candida albicans</i>	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
CK	<i>Candida krusei</i>	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>	SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EC	<i>Escherichia coli</i>
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>	KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AC	<i>Absidia corymbifera</i>	ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>	PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabulka 24: *In vitro* antifungální aktivita připravených derivátů (MIC $\mu\text{M/l}$)

Kmen		Testovaná látka MIC ($\mu\text{M/l}$)						
		DP-1	DP-2	DP-3	DP-4	LC-149	LC-148	LC-155
CA	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
CK	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
CP	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
CT	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
AF	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
AF_{la}	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
AC	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
TI	72h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125
	120h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125

Tabulka 25: *In vitro* antibakteriální aktivita připravených derivátů (MIC $\mu\text{M/l}$)

Kmen		Testovaná látka MIC ($\mu\text{M/l}$)						
		DP-1	DP-2	DP-3	DP-4	LC-149	LC-148	LC-155
SA	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
MRSA	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
SE	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
EF	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
EC	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
KP	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
ACI	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
PA	24h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125
	48h	> 250	> 250	> 250	> 125	> 125	> 500	> 125

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Amarylkovitý alkaloid haemanthamin, který byl v dostatečném množství izolován na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky Farmaceutické fakulty v Hradci Králové z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master, byl již v minulosti několikrát využit jako výchozí látka pro syntézu semisyntetických derivátů a podroben screeningu biologické aktivity. V rámci této diplomové práce bylo připraveno 14 semisyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu, z toho 12 aromatických esterů a 2 ethery za účelem doplnění knihovny již syntetizovaných látek a tím i odvození podrobnějších vztahů mezi strukturou a aktivitou. Syntéza aromatických esterů probíhala v prostředí bezvodého pyridinu, za přídavku katalyzátoru dimethylaminopyridinu, ethery byly připravovány v prostředí bezvodého tetrahydrofuranu. Derivatizace alkaloidu haemanthaminu probíhala na hydroxylové skupině v poloze C11 pomocí acylačních a alkylačních činidel. Připravené deriváty byly získány a přečištěny pomocí preparativní TLC. Za účelem orientačního stanovení molekulové hmotnosti připravovaných látek byla použita GC-MS analýza. U dosud v literatuře nepopsaných látek byla pro zjištění přesné hodnoty molekulové hmotnosti využita ESI-HRMS analýza (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením). U připravených derivátů byla pro další strukturní identifikaci provedena NMR analýza a změřena optická otáčivost. Deriváty byly získány ve formě hnědé olejovité kapaliny nebo bílého amorfního prášku.

Připravené semisyntetické deriváty haemanthaminu byly podrobeny screeningovému testování biologické aktivity. Celkem u deseti připravených derivátů byla testována schopnost inhibice lidských cholinesteráz při koncentraci 10 μM , čímž bylo navázáno na předchozí práce vědecké skupiny ADINACO, díky kterým bylo připraveno a testováno několik aktivních haemanthaminových derivátů.^{60,61} U připravených látek byla také vypočítána hodnota logBB, která poukazuje na permeabilitu látek přes HEB a je důležitá pro případné působení látky v CNS. V rámci *hAChE/hBuChE* inhibiční studie byly bohužel všechny testované látky vyhodnoceny jako neaktivní ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) (Tab. 20).

U připravených haemanthaminových derivátů byla také testována antimykobakteriální aktivita vůči několika mykobakteriálním kmenům (Tab. 22) za použití rifampicinu, ciprofloxacinu a isoniazidu jako referenčních látek. Antimykobakteriální aktivitou AAs se již v minulosti zabývala vědecká skupina ADINACO, která připravila řadu semisyntetických derivátů několika přírodních alkaloidů, z nichž zejména dva deriváty galanthaminu vykázaly

zajímavou antimykobakteriální aktivitu: 6-*O*-(4-butylbenzoyl)galanthamin a 6-*O*-(2-naftoyl)galanthamin. Bylo také zjištěno, že přírodní alkaloid haemanthamin nevykazuje žádnou antimykobakteriální aktivitu.⁵¹ V rámci diplomové práce bylo navázáno na předchozí studie a bylo testováno 12 derivátů haemanthaminu. U žádné z testovaných látek nebyla prokázána vyšší aktivita než u standardů. Nejzajímavější antimykobakteriální potenciál proti kmenu *Mtb* H37Ra vykázal derivát 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin (MIC = 3,91 µg/ml), proti kmenu *M. aurum*: 11-*O*-(4-*tert*butylbenzoyl)haemanthamin, 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamin a 11-*O*-(4-butylbenzoyl)haemanthamin (MICs = 7,81 µg/ml), proti kmenu *M. avium*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin, 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamin (MICs = 31,25 µg/ml), proti kmenu *M. kansasii*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin (MIC = 3,91 µg/ml), 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamin (MIC = 7,81 µg/ml), proti kmenu *M. smegmatis*: 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamin (MIC = 7,81 µg/ml) (Tab. 21).

U 7 připravených derivátů byla také testována antifungální a antibakteriální aktivita vůči různým druhům mikroorganismů (Tab. 23). Screening antimikrobiální aktivity přírodního alkaloidu haemanthaminu prokázal, že látka vykazuje slabou antimikrobiální aktivitu proti *Candida albicans* a *Candida dubliniensis* (MIC₈₀ = 512 µg/ml) a proti *Lodderomyces elongiosporus* (MIC₈₀ = 256 µg/ml).⁵⁰ V rámci diplomové práce z hlediska antifungální a antibakteriální aktivity byly všechny látky vyhodnoceny jako neaktivní (MICs > 125 µM/l). (Tab. 24).

Závěrem je možné konstatovat, že deriváty haemanthaminu jsou perspektivní i jako „lead-structures“ pro vývoj látek s významnou antimykobakteriální aktivitou. Vzhledem k tomu, že látky s antituberkulotickou aktivitou obecně disponují nebezpečím zvýšené hepatotoxické aktivity, nejaktivnější látky jsou v současné době podrobeny studiu jejich toxického potenciálu vůči buňkám hepatocelulárního karcinomu HepG2.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Šantić, Ž.; Pravdić, N.; Bevanda, M.; Galić, K. The Historical Use of Medicinal Plants in Traditional and Scientific Medicine. *Psychiatria Danubia* 2017, 29 Suppl 4 (Suppl 4), 787–792.
- (2) Movahedi, A.; Almasi Zadeh Yaghuti, A.; Wei, H.; Rutland, P.; Sun, W.; Mousavi, M.; Li, D.; Zhuge, Q. Plant Secondary Metabolites with an Overview of Populus. *International Journal of Molecular Science* 2021, 22 (13), 6890. <https://doi.org/10.3390/ijms22136890>.
- (3) Krmencič P.; Biotox [online] 2022 [cit. 15.1.2022]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/Toxikon/Rostliny/Biosyntesa.Php>
- (4) Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E. Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective. *Plant Science* 2001, 161 (5), 839–851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- (5) Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M.; *Farmakognozie*; 2016, Univerzita Karlova - Nakladatelství Karolinum, 195-196.
- (6) Doležal M., Kučerová M., Miletín M., Musílek K., Opletalová V., Zimčík P.; *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*; 2013, Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 92-93.
- (7) Janssen, B.; Schäfer, B. Galantamine. *ChemTexts* 2017, 3 (2), 7. <https://doi.org/10.1007/s40828-017-0043-y>.
- (8) Cahlíková, L.; Benešová, N.; Macáková, K.; Kučerac, R.; Hrstka, V.; Klimeš, J.; Jahodář, L.; Opletal, L. Alkaloids from Some Amaryllidaceae Species and Their Cholinesterase Activity. *Natural Product Communications* 2012, 7 (5), 1934578X1200700. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700506>.
- (9) 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 Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure–Activity Relationship and Mechanistic Insight. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009, 52 (20), 6244–6256. <https://doi.org/10.1021/jm901031h>.
- (10) Kornienko, A.; Evidente, A. Chemistry, Biology, and Medicinal Potential of Narciclasine and Its Congeners. *Chemical Review*. 2008, 108 (6), 1982–2014. <https://doi.org/10.1021/cr078198u>.
- (11) Stevens P. F.; Angiosperm Phylogeny Website [online] 2022 [cit. 15.1.2022] Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>.
- (12) Opletal L.; Daidalea - Univerzita Karlova [online] 2022 [cit. 16.1.2022] Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/Daidalea/PlantFamily.Asp?Id=2>.
- (13) Takos, A.; Rook, F. Towards a Molecular Understanding of the Biosynthesis of Amaryllidaceae Alkaloids in Support of Their Expanding Medical Use. *International Journal of Molecular Science* 2013, 14 (6), 11713–11741. <https://doi.org/10.3390/ijms140611713>.
- (14) Michalcová, D.; Botanická fotogalerie a další pomůcky k určování rostlin [online] 2022 [cit. 20.1.2022] Dostupné z: <http://www.botanickafotogalerie.cz/>.

- (15) Al Mamun, A.; Maříková, J.; Hulcová, D.; Janoušek, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Korábečný, J.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus Pseudonarcissus* Cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* 2020, 10 (5), 800. <https://doi.org/10.3390/biom10050800>.
- (16) Havlasová, J.; Šafratová, M.; Siatka, T.; Štěpánková, Š.; Novák, Z.; Ločárek, M.; Opletal, L.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Benešová, N.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some *Narcissus* Species and Varieties and Their Biological Activity. *Natural Product Communications* 2014, 9 (8), 1934578X1400900. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900823>.
- (17) Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of Alkaloids in Amaryllidaceae Plants: A Review. *Phytochemistry Reviews* 2021, 20 (2), 409–431. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>.
- (18) Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F. Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of *Narcissus* Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Elsevier, 2006; Vol. 63, pp 87–179. [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(06\)63003-4](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63003-4).
- (19) Ka, S.; Koirala, M.; Mérindol, N.; Desgagné-Penix, I. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 2020, 25 (21), 4901. <https://doi.org/10.3390/molecules25214901>.
- (20) Cimmino, A.; Masi, M.; Evidente, M.; Superchi, S.; Evidente, A. Amaryllidaceae Alkaloids: Absolute Configuration and Biological Activity. *Chirality* 2017, 29 (9), 486–499. <https://doi.org/10.1002/chir.22719>.
- (21) Hu, N.; White, L. V.; Lan, P.; Banwell, M. G. The Chemical Synthesis of the Crinine and Haemanthamine Alkaloids: Biologically Active and Enantiomerically-Related Systems That Serve as Vehicles for Showcasing New Methodologies for Molecular Assembly. *Molecules* 2021, 26 (3), 765. <https://doi.org/10.3390/molecules26030765>.
- (22) Cahlíková, L.; Kawano, I.; Řezáčová, M.; Blunden, G.; Hulcová, D.; Havelek, R. The Amaryllidaceae Alkaloids Haemanthamine, Haemanthidine and Their Semisynthetic Derivatives as Potential Drugs. *Phytochemistry Reviews* 2021, 20 (1), 303–323. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09675-8>.
- (23) Cahlíková, L.; Breiterová, K.; Opletal, L. Chemistry and Biological Activity of Alkaloids from the Genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Molecules* 2020, 25 (20), 4797. <https://doi.org/10.3390/molecules25204797>.
- (24) Munoz-Torrero Lopez-Ibarra, D. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*; Transworld Research Network: Kerala, 2011.
- (25) Nair, J. J.; Bastida, J.; van Staden, J. In Vivo Cytotoxicity Studies of Amaryllidaceae Alkaloids. *Natural Product Communications* 2016, 11 (1), 121–132.
- (26) Masi, M.; Di Lecce, R.; Cimmino, A.; Evidente, A. Advances in the Chemical and Biological Characterization of Amaryllidaceae Alkaloids and Natural Analogues Isolated in the Last Decade. *Molecules* 2020, 25 (23), 5621. <https://doi.org/10.3390/molecules25235621>.
- (27) Das, M. K.; Kumar, N.; Bisai, A. Catalytic Asymmetric Total Syntheses of Naturally Occurring *Amaryllidaceae* Alkaloids, (-)-Crinine, (-)-Epi-Crinine, (-)-Oxocrinine, (+)-Epi-Elwesine,

- (+)-Vittatine, and (+)-Epi-Vittatine. *Org. Lett.* 2018, 20 (15), 4421–4424. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01703>.
- (28) de Andrade, J. P.; Guo, Y.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Dutilh, J.; Viladomat, F.; Codina, C.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J. Crinine-Type Alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry* 2014, 103, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.007>.
- (29) Guerrieri, C. G.; Pigni, N. B.; de Andrade, J. P.; dos Santos, V. D.; Binns, F.; de Souza Borges, W.; Viladomat, F.; Bastida, J. Alkaloids from *Crinum Erubescens* Aiton. *Arabian Journal of Chemistry* 2016, 9 (5), 688–693. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.07.009>.
- (30) Tallini, L.; Andrade, J.; Kaiser, M.; Viladomat, F.; Nair, J.; Zuanazzi, J.; Bastida, J. Alkaloid Constituents of the Amaryllidaceae Plant *Amaryllis Belladonna* L. *Molecules* 2017, 22 (9), 1437. <https://doi.org/10.3390/molecules22091437>.
- (31) Havelek, R.; Seifrtova, M.; Kralovec, K.; Bruckova, L.; Cahlikova, L.; Dalecka, M.; Vavrova, J.; Rezacova, M.; Opletal, L.; Bilkova, Z. The Effect of Amaryllidaceae Alkaloids Haemanthamine and Haemanthidine on Cell Cycle Progression and Apoptosis in P53-Negative Human Leukemic Jurkat Cells. *Phytomedicine* 2014, 21 (4), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.005>.
- (32) Nair, J. J.; Rárová, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; van Staden, J. Apoptosis-Inducing Effects of Distichamine and Narciprimine, Rare Alkaloids of the Plant Family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, 22 (19), 6195–6199. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.005>.
- (33) Evidente, A.; Kireev, A.; Jenkins, A.; Romero, A.; Steelant, W.; Van Slambrouck, S.; Kornienko, A. Biological Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and Their Synthetic Derivatives: Discovery of Novel Leads for Anticancer Drug Design. *Planta Medica* 2009, 75 (05), 501–507. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185340>.
- (34) Oloyede, G. *World Journal of Chemistry*. 2010 (5), 26–31.
- (35) Weniger, B.; Italiano, L.; Beck, J.-P.; Bastida, J.; Bergoñon, S.; Codina, C.; Lobstein, A.; Anton, R. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica* 1995, 61 (01), 77–79. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958007>.
- (36) Pellegrino, S.; Meyer, M.; Zorbas, C.; Bouchta, S. A.; Saraf, K.; Pelly, S. C.; Yusupova, G.; Evidente, A.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Lafontaine, D. L. J.; Yusupov, M. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* 2018, 26 (3), 416–425.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.009>.
- (37) 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* 2010, 73 (7), 1223–1227. <https://doi.org/10.1021/np9008255>.
- (38) 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* 2015, 13, 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.004>.

- (39) McNulty, J.; Nair, J. J.; Codina, C.; Bastida, J.; Pandey, S.; Gerasimoff, J.; Griffin, C. Selective Apoptosis-Inducing Activity of Crinum-Type Amaryllidaceae Alkaloids. *Phytochemistry* 2007, 68 (7), 1068–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.006>.
- (40) 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* 2010, 73 (7), 1223–1227. <https://doi.org/10.1021/np9008255>.
- (41) Havelek, R.; Muthna, D.; Tomsik, P.; Kralovec, K.; Seifrtova, M.; Cahlikova, L.; Hostalkova, A.; Safratova, M.; Perwein, M.; Cermakova, E.; Rezacova, M. Anticancer Potential of Amaryllidaceae Alkaloids Evaluated by Screening with a Panel of Human Cells, Real-Time Cellular Analysis and Ehrlich Tumor-Bearing Mice. *Chemico-Biological Interactions* 2017, 275, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.018>.
- (42) Seifrtová, M.; Havelek, R.; Cahlíková, L.; Hulcová, D.; Mazánková, N.; Řezáčová, M. Haemanthamine Alters Sodium Butyrate-Induced Histone Acetylation, P21 WAF1/Cip1 Expression, Chk1 and Chk2 Activation and Leads to Increased Growth Inhibition and Death in A2780 Ovarian Cancer Cells. *Phytomedicine* 2017, 35, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.019>.
- (43) O'Brien, S. F.; Ward, S.; Gallian, P.; Fabra, C.; Pillonel, J.; Kitchen, A. D.; Davison, K.; Seed, C. R.; Delage, G.; Steele, W. R.; Leiby, D. A. Malaria Blood Safety Policy in Five Non-Endemic Countries: A Retrospective Comparison through the Lens of the ABO Risk-Based Decision-Making Framework. *Blood Transfusion* 2019. <https://doi.org/10.2450/2019.0222-18>.
- (44) Cho, N.; Du, Y.; Valenciano, A. L.; Fernández-Murga, M. L.; Goetz, M.; Clement, J.; Cassera, M. B.; Kingston, D. G. I. Antiplasmodial Alkaloids from Bulbs of *Amaryllis Belladonna* Steud. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2018, 28 (1), 40–42. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.021>.
- (45) Sener, B.; Orhan, I.; Satayavivad, J. Antimalarial Activity Screening of Some Alkaloids and the Plant Extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* 2003, 17 (10), 1220–1223. <https://doi.org/10.1002/ptr.1346>.
- (46) Herrera, M. R.; Machocho, A. K.; Nair, J. J.; Campbell, W. E.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Alkaloids from *Cyrtanthus Elatus*. *Fitoterapia* 2001, 72 (4), 444–448. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00313-0).
- (47) Kaya, G. I.; Sarıkaya, B.; Onur, M. A.; Somer, N. U.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Lauinger, I. L.; Kaiser, M.; Tasdemir, D. Antiprotozoal Alkaloids from *Galanthus Trojanus*. *Phytochemistry Letters* 2011, 4 (3), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.05.008>.
- (48) Szlávik, L.; Gyuris, Á.; Minárovits, J.; Forgo, P.; Molnár, J.; Hohmann, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and Antiretroviral Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta medica* 2004, 70 (9), 871–873. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827239>.
- (49) He, J.; Qi, W.-B.; Wang, L.; Tian, J.; Jiao, P.-R.; Liu, G.-Q.; Ye, W.-C.; Liao, M. Amaryllidaceae Alkaloids Inhibit Nuclear-to-Cytoplasmic Export of Ribonucleoprotein (RNP) Complex of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1: Amaryllidaceae Alkaloids Exhibit Antiviral Activity. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2013, 7 (6), 922–931. <https://doi.org/10.1111/irv.12035>.

- (50) Ločárek, M.; Nováková, J.; Klouček, P.; Hošťálková, A.; Kokoška, L.; Gábrlová, L.; Šafratová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Antifungal and Antibacterial Activity of Extracts and Alkaloids of Selected Amaryllidaceae Species. *Natural Product Communications* 2015, 10 (9), 1934578X1501000. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000912>.
- (51) Maafi, N.; Mamun, A. A.; Jandourek, O.; Maříková, J.; Breiterová, K.; Diepoltová, A.; Konečná, K.; Hošťálková, A.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Kohelová, E.; Koutová, D.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Semisynthetic Derivatives of Selected Amaryllidaceae Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents. *Molecules* 2021, 26 (19), 6023. <https://doi.org/10.3390/molecules26196023>.
- (52) López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts. *Life Sciences* 2002, 71 (21), 2521–2529. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02034-9).
- (53) Hulcová, D.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hošťálková, A.; Jun, D.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Nováková, L.; Andrisano, V.; Růžička, A.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids from *Narcissus Pseudonarcissus* L. Cv. Dutch Master as Potential Drugs in Treatment of Alzheimer's Disease. *Phytochemistry* 2019, 165, 112055. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>.
- (54) Cahlíková, L.; Hrabínová, M.; Kulhánková, A.; Benesová, N.; Chlebek, J.; Jun, D.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kunes, J.; Kuca, K.; Opletal, L. Alkaloids from *Chlidanthus Fragrans* and Their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Natural Product Communications* 2013, 8 (11), 1541–1544.
- (55) Jope, R. S.; Roh, M.-S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. *Current Drug Targets* 2006, 7 (11), 1421–1434. <https://doi.org/10.2174/1389450110607011421>.
- (56) Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae Alkaloids as Potential Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Molecules* 2018, 23 (4), E719. <https://doi.org/10.3390/molecules23040719>.
- (57) Natunen, T. A.; Gynther, M.; Rostalski, H.; Jaako, K.; Jalkanen, A. J. Extracellular Prolyl Oligopeptidase Derived from Activated Microglia Is a Potential Neuroprotection Target. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2019, 124 (1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13094>.
- (58) Habartová, K.; Cahlíková, L.; Řezáčová, M.; Havelek, R. The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications* 2016, 11 (10), 1587–1594.
- (59) Burns, A.; O'Brien, J. Clinical Practice with Anti-Dementia Drugs: A Consensus Statement from British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology* 2006, 20 (6), 732–755. <https://doi.org/10.1177/0269881106068299>.
- (60) Kohelová, E.; Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Maříková, J.; Kučera, T.; Martínez González, L.; Hrabínová, M.; Vorčáková, K.; Nováková, L.; De Simone, A.; Havelek, R.; Cahlíková, L. Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules* 2019, 24 (7), 1307. <https://doi.org/10.3390/molecules24071307>.

- (61) Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Kohelová, E.; De Simone, A.; Al Mamun, A.; Hulcová, D.; Marková, J.; Kučera, T.; Jun, D.; Šafratová, M.; Maříková, J.; Andrisano, V.; Jenčo, J.; Kuneš, J.; Martinez, A.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Functionalized Aromatic Esters of the Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine and Their *in Vitro* and *in Silico* Biological Activity Connected to Alzheimer's Disease. *Bioorganic Chemistry* 2020, 100, 103928. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103928>.
- (62) Cedrón, J.; Ravelo, Á.; León, L.; Padrón, J.; Estévez-Braun, A. Antiproliferative and Structure Activity Relationships of Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules* 2015, 20 (8), 13854–13863. <https://doi.org/10.3390/molecules200813854>.
- (63) Uher, M.; Hroch, M.; Peřinová, R.; Havelek, R.; Křoustková, J.; Řezáčová, M.; Muthná, D.; Koutová, D.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Semisynthetic Derivatives of Haemanthamine and Their *in Vitro* Antiproliferative Activity Evaluation against a Panel of Human Cell Lines. *Arabian Journal of Chemistry* 2022, 15 (5), 103746. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103746>.
- (64) Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A. Synthesis and Antimalarial Activity of New Haemanthamine-Type Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2012, 20 (18), 5464–5472. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.07.036>.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Jitka Babcová

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

Název diplomové práce: Strukturní obměny haemanthaminu

Předmětem této diplomové práce bylo připravit další sérii semisyntetických derivátů haemanthaminu. Bylo připraveno 12 aromatických esterových derivátů haemanthaminu a dva ethery. Látky byly následně identifikovány pomocí MS, NMR analýzy, optické otáčivosti a následně podrobeny screeningu biologické aktivity. Deset připravených derivátů bylo testováno na *in vitro* inhibiční aktivitu vůči *hAChE* a *hBuChE*. Všechny deriváty byly vyhodnoceny jako neaktivní ($IC_{50} > 10 \mu M$). U 12 derivátů haemanthaminu byla testována antimykobakteriální aktivita. Nejzajímavější antimykobakteriální potenciál proti kmenu *Mtb* H37Ra vykázal derivát 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin ($MIC = 3,91 \mu g/ml$), proti kmenu *M. aurum*: 11-*O*-(4-*tert*butyllbenzoyl)haemanthamin, 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamin a 11-*O*-(4-butylbenzoyl)haemanthamin ($MICs = 7,81 \mu g/ml$), proti kmenu *M. avium*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin, 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamin ($MICs = 1,25 \mu g/ml$), proti kmenu *M. kansasii*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin ($MIC = 3,91 \mu g/ml$), 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamin ($MIC = 7,81 \mu g/ml$), proti kmenu *M. smegmatis*: 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamin ($MIC = 7,81 \mu g/ml$). U sedmi derivátů byla testována antimikrobiální aktivita vůči různým kmenům mikroorganismů. Všechny látky byly vyhodnoceny jako neaktivní ($MICs > 125 \mu M/l$). V současné době jsou deriváty s nezajímavější antimykobakteriální aktivitou testovány na jejich toxicitu vůči HepG2 buňkám.

Klíčová slova: haemanthamin, syntéza, analoga, biologická aktivita

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate: Jitka Babcová

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

Title of diploma thesis: Structural modification of haemanthamine

The object of this diploma thesis was to prepare several derivatives of alkaloid haemanthamine. Twelve aromatic esters of haemanthamine and two ethers were prepared. Compounds were identified by MS, NMR analysis and optical rotation and screened for their biological activities. Ten prepared derivatives were screened for *in vitro* inhibitory activity against *hAChE* and *hBuChE*. All derivatives were considered inactive ($IC_{50} > 10 \mu M$). Twelve derivatives of haemanthamine were tested for their antimycobacterial activity, using rifampicin as a standard. The most interesting antimycobacterial potential against *Mtb* H37Ra strain has shown 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamine (MIC = 3,91 $\mu g/ml$), against *M. aurum*: 11-*O*-(4-*tert*butylbenzoyl)haemanthamine, 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamine and 11-*O*-(4-butylbenzoyl)haemanthamine (MICs = 7,81 $\mu g/ml$), against *M. avium*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamine, 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamine (MICs = 31,25 $\mu g/ml$), against *M. kansasii*: 11-*O*-(4-pentylbenzoyl)haemanthamine (MIC = 3,91 $\mu g/ml$), 11-*O*-(4-hexylbenzoyl)haemanthamine (MIC = 7,81 $\mu g/ml$), against *M. smegmatis*: 11-*O*-(1-naftoyl)haemanthamine (MIC = 7,81 $\mu g/ml$). Seven derivatives were tested for antimicrobial activity against variol strains of microorganisms. All derivatives were considered inactive (MIC > 125 $\mu M/l$). Derivatives with the most interesting antimycobacterial activity are currently being tested for their toxicity against HepG2 cells.

Keywords: haemanthamine, synthesis, analogues, biological activity