

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

AMARYLLIDACEAE ALKALOIDY JAKO INSPIRACE PRO PŘÍPRAVU SELEKTIVNÍCH INHIBITORŮ
BUTYRYLCHOLINESTERASY I

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

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

Hradec Králové, květen 2022

Matěj Wisura

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND PHARMACEUTICAL BOTANY



DIPLOMA THESIS

AMARYLLIDACEAE ALKALOIDS AS INSPIRATION FOR PREPARATION OF SELECTIVE
BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITORS I

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

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

Hradec Králové, May 2022

Matěj Wisura

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. Veškerá literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, květen 2022

Matěj Wisura

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za veškeré užitečné rady a poskytnutý čas, který věnovala této práci. Dále chci poděkovat Mgr. Filipovi Pidanému za stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE a za trpělivost a odbornou konzultaci v průběhu vypracovávání experimentální části této práce. Následně bych také rád poděkoval PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. za měření a interpretaci NMR spekter. Poděkování patří také Mgr. Rudolfu Vrabcovi za provedení dockingové studie.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 548.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část.....	10
3.1 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae	10
3.2 Biosyntéza a strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů	11
3.2.1 Norbelladinový typ	16
3.2.2 Karltoninový typ.....	18
3.3 Inhibiční aktivita Amaryllidaceae alkaloidů vůči cholinesterázám.....	19
3.4 Alkaloidy karltoninového typu jako inspirace pro vývoj vysoce selektivních inhibitorů butyrylcholinesterázy.....	26
4. Experimentální část.....	28
4.1 Materiály a metody	28
4.1.1 Syntéza selektivních inhibitorů butyrylcholinesterázy	29
4.1.2 Dockingová studie.....	32
5. Výsledky	33
5.1 Příprava látek FC012, FC013, FC014, FC015, FC017, FC018, FC019, FC020, FC021, FC022	33
5.1.1 4-(2-((3-(benzyloxy)benzyl)amino)ethyl)fenol (FC012)	33
5.1.2 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(2-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC013).....	34
5.1.3 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-3-fenylpropan-1-amin (FC014)	34
5.1.4 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-2-fenylethan-1-amin (FC015).....	34
5.1.5 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(4-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC017).....	34
5.1.6 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(3-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC018).....	35
5.1.7 <i>N</i> -benzyl-1-(3-(benzyloxy)fenyl)methanamin (FC019)	35
5.1.8 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-2-fenylpropan-1-amin (FC020)	35
5.1.9 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-1-(3,4-dimethoxyfenyl)methanamin (FC021) ...	35
5.1.10 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-3-chloranilin (FC022).....	36
5.2 Příprava látek FC012-1, FC012-2, FC014-1, FC015-1, FC019-1.....	36
5.2.1 4-(2-(allyl(3-(benzyloxy)benzyl)amino)ethyl)fenol (FC012-1)	36
5.2.2 <i>N</i> -(4-(allyloxy)fenethyl)- <i>N</i> -(3-benzyloxy)benzylallylamin (FC012-2).....	36
5.2.3 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)- <i>N</i> -(3-fenylpropyl)allylamin (FC014-1)	37
5.2.4 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)- <i>N</i> -fenethylallylamin (FC015-1).....	37
5.2.5 <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)allylamin (FC019-1).....	37
5.3 Příprava látek FC014-2, FC015-2, FC019-2	38
5.3.1 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)-3-fenyl- <i>N</i> -propylpropan-1-amin (FC014-2).....	38
5.3.2 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)- <i>N</i> -fenethylpropan-1-amin (FC015-2)	38
5.3.3 <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)propan-1-amin (FC019-2)	38
5.4 Příprava látek FC014-3, FC015-3, FC019-3	39
5.4.1 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)- <i>N</i> -ethyl-3-fenylpropan-1-amin (FC014-3).....	39
5.4.2 <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)- <i>N</i> -ethyl-2-fenylethan-1-amin (FC015-3)	39
5.4.3 <i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -(3-(benzyloxy)benzyl)ethanamin (FC019-3).....	39

5.5	Inhibice acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a schopnost přestupu přes hematoencefalickou bariéru	40
5.6	Cytotoxicita	41
5.7	Dockingová studie FC020.....	41
6.	Diskuze a závěr.....	44
7.	Seznam použitých zkratk.....	49
8.	Literatura.....	50

1. Úvod

Již od prvopočátků lidstva existovala potřeba vypořádávat se s nemocemi, které naše předky sužovaly a které dnes často trápí také nás. Vzhledem k omezeným možnostem se pozornost tehdejších lidí pochopitelně upínala především k přírodním zdrojům léčiv, a proto se není čemu divit, že právě rostliny zaujaly na dlouhou dobu nenahraditelné místo v léčitelství. Léčivé vlastnosti rostlin byly zjišťovány především na základě empirie, tedy metodou pokus-omyl, díky čemuž byly objeveny i jejich toxické vlastnosti, které byly našimi předky využívány (např. kurare) a také zneužívány (např. *Conium maculatum*) [1].

Znalost léčivých rostlin si lidé zpočátku předávali ústně, ale už v nejstarších civilizacích, po vynálezu písma, si své vědomosti začali také zapisovat. Asi nejstarším dokladem je hliněná destička ze sumerského Nagpuru [2] (případně přepisováno také jako město Nippur) [1] stará zhruba 5000 let, která obsahuje popis 12 receptů s odkazem na přibližně 250 rostlin. Z dalších, výrazně mladších, písemností lze uvést například Pen T'Sao (císař Šen Nung, Čína, 2838 př. n. l.) [1], Ebersův papyrus (Egypt, cca 1500 př. n. l.) [2] nebo součásti Ayurvědy – Charaka, Sushruta, Samhitas (Indie, cca 1000 př. n. l.) [3].

Vlivem rozvoje přírodních a technických věd lidstvo získalo nové možnosti, jak zajišťovat léčiva, a začala se připravovat léčiva syntetická. I přes existenci množství nových způsobů jsou téměř dvě třetiny nově schvalovaných léčiv založené na příbuznosti s přírodními látkami [4], které jsou tedy i dnes cenným zdrojem inspirace. Očekává se, že tento trend bude nadále pokračovat [5].

S neustálým vývojem poznání docházelo, a stále dochází, k objevování nových rostlinných druhů a jejich obsahových látek, které by mohly mít potenciál pro léčebné využití. Velká pozornost je věnována například čeledi Amaryllidaceae, která je bohatá na výskyt strukturně specifických alkaloidů. Do dnešní doby bylo popsáno více než 600 těchto sloučenin, které jsou v literatuře označovány jako Amaryllidaceae alkaloidy (AAs) [6]. Tyto sekundární metabolity jsou známé především pro své rozmanité farmakologické vlastnosti, mezi které patří například analgetická, antitumorová, antivirová a antimikrobiální aktivita a také inhibiční aktivita vůči cholinesterázám. Zatím jediný alkaloid, který našel své terapeutické využití, je galanthamin, používaný pro symptomatickou léčbu lehčích a středně

závažných stádií Alzheimerovy nemoci (AD). Jedná se o selektivní inhibitor acetylcholinesterázy (AChE) [7].

Výzkum se v dnešní době nezaměřuje pouze na hledání nových potenciálně využitelných rostlinných druhů, ale také na pátrání po nových látkách, případně i nových strukturních typech AAs (příkladem mohou být karltonin A-C [8], narcieliin, narciabduliin [9, 10] a kliniatin A-C [11]). Tyto sloučeniny bývají v rostlinách většinou zastoupeny pouze ve velmi malém množství, ale nově objevené skelety mohou posloužit jako inspirace pro vývoj semisyntetických nebo plně syntetických derivátů, které mají často výhodnější vlastnosti než původní alkaloid.

Studium AAs a jiných látek potenciálně využitelných v terapii Alzheimerovy nemoci má na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové dlouhou tradici, která se odráží ve stále nových poznatcích a zajímavých výsledcích získaných pracovní skupinou ADINACO fungující na katedře Farmakognozie a farmaceutické botaniky.

2. Cíl práce

Hlavním cílem předložené diplomové práce byla příprava série sloučenin strukturně odvozených od minoritních alkaloidů karltoninového strukturního typu a následné studium jejich inhibičního potenciálu vůči cholinesterázám s důrazem na butyrylcholinesterázu (BuChE).

Dílčí cíle této práce byly následující:

- 1) Rešerše literatury zabývající se AAs a sloučeninami strukturně inspirovanými těmito látkami, jakožto potenciálními inhibitory BuChE.
- 2) Syntéza látek a jejich derivátů selektivně inhibujících aktivitu BuChE na základě přírodní předlohy.
- 3) Stanovení biologické aktivity připravených látek.
- 4) Vyhodnocení vztahu struktura-účinek u připravených látek, případně návrh dalších strukturních obměn.

3. Teoretická část

3.1 Charakteristika čeledi Amaryllidaceae

Čeleď Amaryllidaceae sdružuje jednoděložné rostliny vyskytující se především v tropických a subtropických oblastech světa (Jižní Afrika, Jižní Amerika, Středozeří) [12]. Zatím bylo popsáno přibližně 1100 druhů, které jsou klasifikovány do 85 rodů [13]. V našich podmínkách se můžeme setkat například s rody *Leucojum spp.*, *Narcissus spp.* či *Galanthus spp.* [14] Největší množství (asi třetina) známých druhů se vyskytuje v Západním Kapsku [15]. Jedná se o vytrvalé rostliny tvořící cibule, oddenky nebo cibulové hlízy. Stonek je, až na výjimky, neolistěný. Listy jsou povětšinou přízemní a úzké, květy jednotlivé, květenství mívají charakter šroubelovitý, případně hroznovitý. Plodem je tobolka nebo bobule [16].

Charakteristickými sekundárními metabolity, které se ukládají především v podzemních orgánech těchto rostlin, jsou AAs. Jedná se o specifickou skupinu látek, která se vyskytuje téměř výhradně v rostlinách této čeledi. Ačkoliv jsou strukturně dosti jedinečné, bývají řazeny do skupiny isochinolinových alkaloidů na základě stejného biosyntetického původu. První z těchto alkaloidů, lykorin, byl izolován již v roce 1877 z *Narcissus pseudonarcissus* [12]. Od té doby bylo identifikováno již více než 600 alkaloidů [17], čímž se čeleď Amaryllidaceae řadí mezi 20 nejvýznamnějších čeledí obsahujících alkaloidy [18].

AAs si svou pozornost vysloužily díky svému širokému spektru biologických účinků. Jsou spojovány s antivirovými, antifungálními, antiparazitickými, antioxidačními a protizánětlivými účinky. Kromě toho také inhibují aktivitu cholinesteráz, biosyntézu kyseliny askorbové a RNA [19].

V praxi je až do současnosti oficiálně využíván pouze jeden AA – galanthamin. Ten byl zaveden do praxe na začátku tisíciletí pod obchodním názvem Reminyl®, ačkoliv byl izolován už v roce 1952 [20]. Z padesátých let také pocházejí první zmínky o jeho využití v lidovém léčitelství – na Kavkaze se používal odvar z místní sněženky *Galanthus woronowii* k léčbě poliomyelitidy. Kromě toho je známo také používání blízce příbuzné *Galanthus nivalis* v Rumunsku, na Ukrajině a Balkánském poloostrově k léčbě bolestí hlavy [21]. Galanthamin nachází v dnešní době uplatnění při symptomatické léčbě lehkých až středně těžkých stádií Alzheimerovy nemoci, a to díky duálnímu mechanismu účinku. Zaprvé kompetitivně inhibuje acetylcholinesterázu (AChE) a zadruhé je u něj prokázána schopnost allosterické modulace

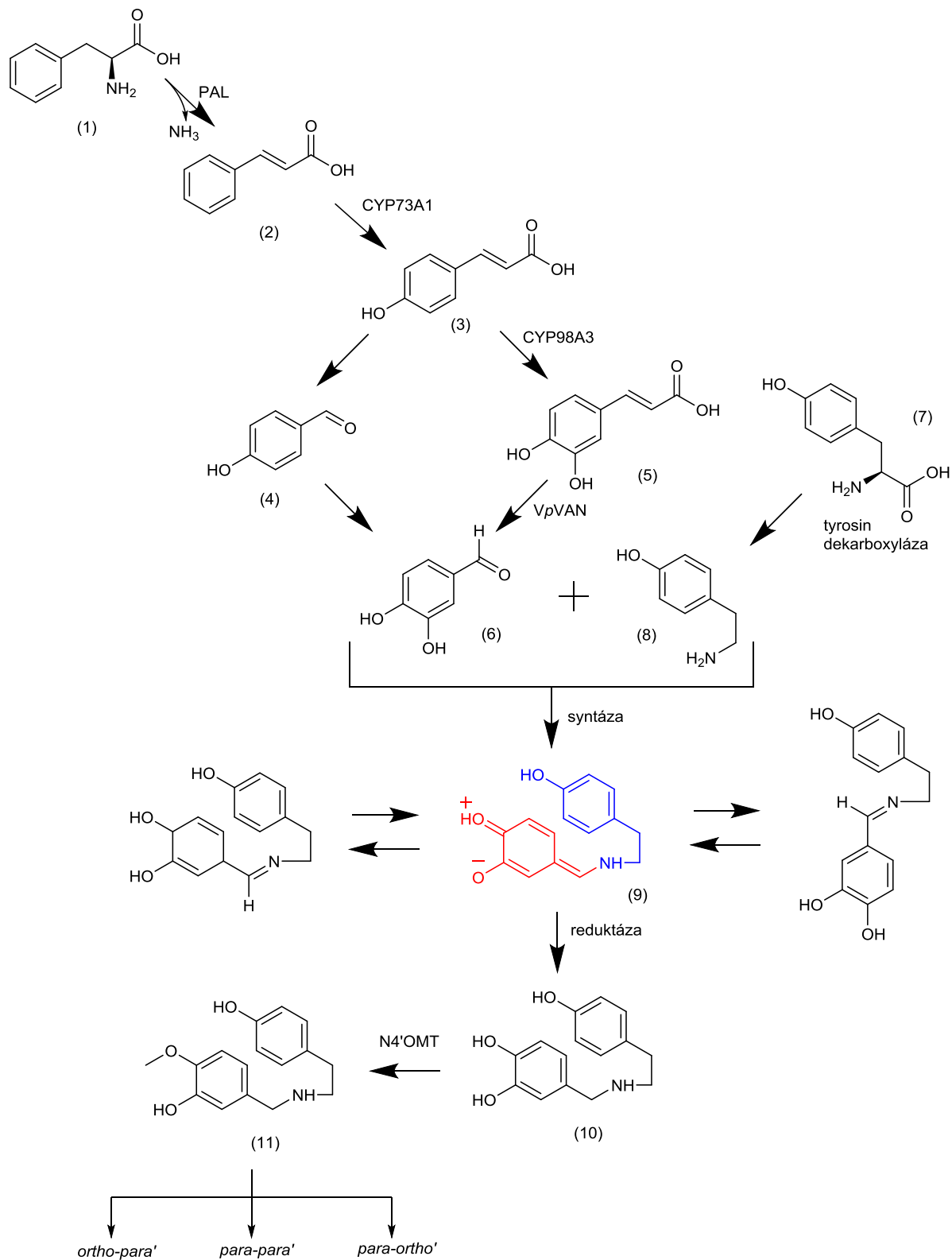
nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs). Díky tomu dochází ke zvýšení citlivosti a následné aktivaci presynaptických nikotinových receptorů a zvýšení nabídky acetylcholinu [22]. Tím přispívá ke zmírnění následků (zhoršená centrální cholinergní neurotransmise) po snížení počtu nAChRs při AD [23]. Vzhledem k bezproblémové dostupnosti galanthaminu z rostlinného materiálu jsou v posledních letech studovány i jeho polosyntetické deriváty, jakožto látky potenciálně využitelné v terapii rozličných chorob [24]. Kromě galanthaminu se také intenzivně studují i deriváty haemanthaminového [25], pankratistatinového a lykorinového typu [26, 27].

Mezi další intenzivně studované AAs patří lykorin, haemanthamin a narciklasin, kterým se věnuje pozornost z hlediska jejich protinádorové aktivity. [17] Nespornou výhodou těchto látek je jejich relativní selektivita vůči nádorovým buňkám a zároveň nižší toxicita pro buňky zdravé. [28]

3.2 Biosyntéza a strukturní typy Amaryllidaceae alkaloidů

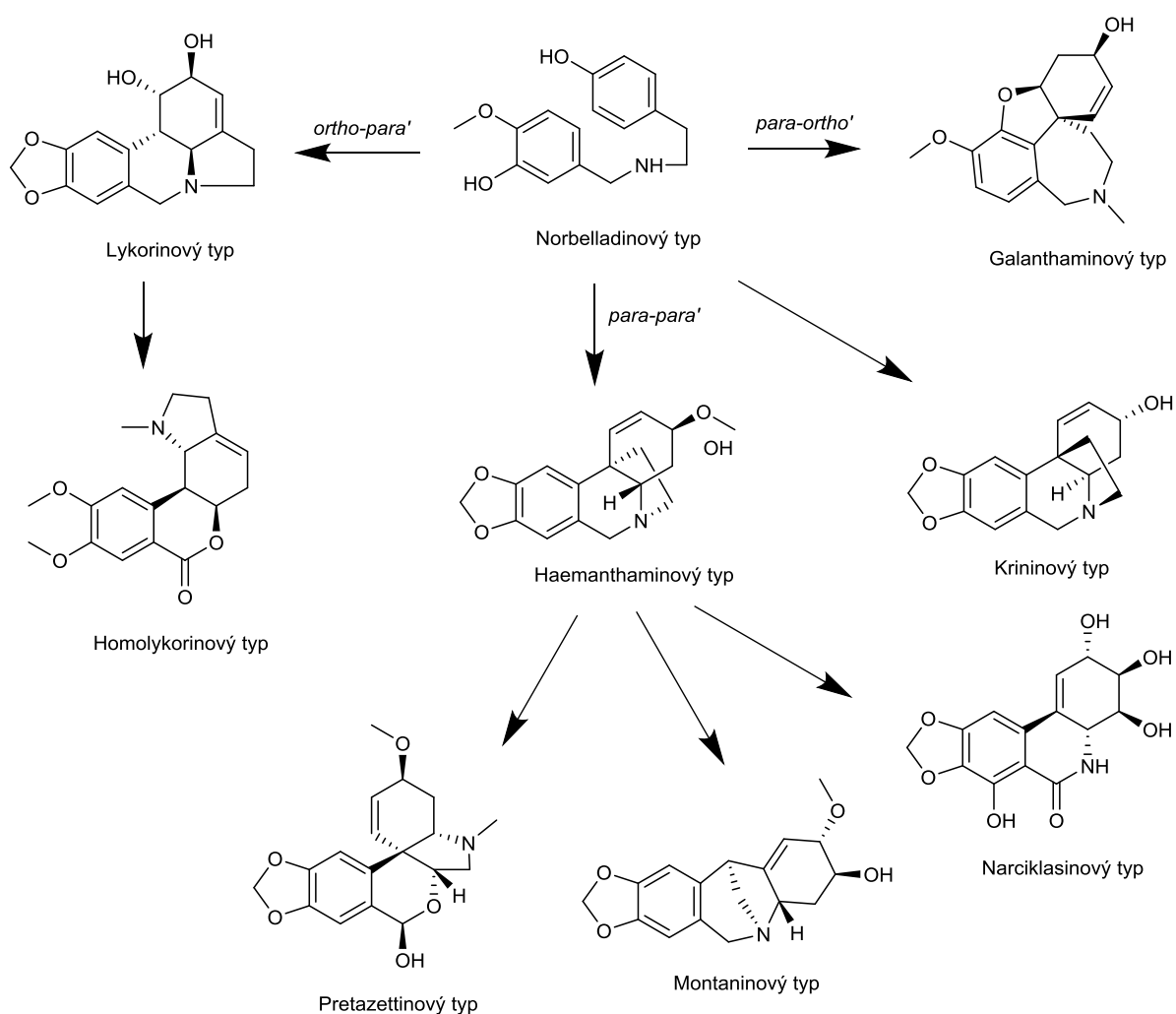
Biosyntéza AAs je unikátním procesem vycházejícím ze dvou aminokyselin, L-fenylalaninu a L-tyrosinu. Tento způsob biosyntézy se označuje jako norbelladinová cesta [28]. L-Fenylalanin je prekurzorem pro fragment C₆-C₁, tvořící kruh A a reprezentující benzylovou část molekuly (ve schématu zobrazeno červeně). L-Tyrosin je prekurzorem pro kruh C, dvouuhlíkatý postranní řetězec a dusík (ve schématu zobrazeno modře). V prvním kroku dochází k přeměně L-fenylalaninu **(1)** pomocí fenylalanin ammonium-lyázy (PAL) na kyselinu *trans*-skořicovou **(2)** a amoniak [12]. Kyselina skořicová je dále přeměňována pomocí enzymu *trans*-cinnamát monooxydásy (CYP73A1) na kyselinu *para*-kumarovou **(3)**, ze které následně vzniká 4-hydroxybenzaldehyd **(4)** nebo kyselina kávová **(5)**, v závislosti na činnosti enzymu kumarát 3-hydroxylázy (CYP98A3). Z obou těchto molekul může následně vzniknout protokatechový aldehyd **(6)**, kyselina kávová je transformována působením homologu vanillin syntázy (VpVAN). L-Tyrosin **(7)** se přeměňuje působením tyrosin-dekarboxylázy na tyramin **(8)**. Tyramin následně kondenzuje s aldehydem za vzniku Schiffovy baze **(9)**, která je redukována na norbelladin **(10)**. Norbelladin je následně přeměněn působením norbelladin-4'-O-methyltransferasy (N4'OMT) na 4'-O-methylnorbelladin **(11)**. Klíčovým krokem pro syntézu různých strukturních typů AAs je cyklizace 4'-O-methylnorbelladinu pomocí CYP96T. Tato cyklizace probíhá prostřednictvím oxidativního fenol-fenol spojení třemi způsoby – *para-para'*, *ortho-para'* a *para-ortho'* [12,

17, 29, 30]. Pro přehlednost jsou popsané biosyntetické kroky zobrazeny na následujícím obrázku (Obrázek 1).



Obrázek 1 Schéma biosyntézy 4'-O-methylnorbelladinu [12]

V literatuře je rozlišováno 9 základních strukturních typů AAs. *Para-para'* cyklizace je zprostředkován enzymem CYP96T1 a tímto způsobem vzniká krininový a haemanthaminový typ. Přestavbou haemanthaminového typu vznikají dále pretazettinový (dříve tazettinový), narciklasinový a montaninový typ. Při *ortho-para'* cyklizaci vzniká lykorinový typ, ze kterého následně vychází homolykorinový typ. *Para-ortho'* cyklizací vzniká galanthaminový typ. U *ortho-para'* a *para-ortho'* spojení zatím nebyly popsány enzymy, které je zajišťují, ale předpokládá se, že se také jedná o enzymy cytochromu P450. Posledním zmíněným, z pohledu biosyntézy prvním, základním typem je belladinový, který vzniká methylací norbelladinu [17]. Přehled základních strukturních typů je uveden níže (Obrázek 2).



Obrázek 2 Přehled základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů [17]

Vedle těchto 9 základních typů, ke kterým lze přiřadit 80 % dosud známých AAs, existuje ještě dalších asi 15 až 20 strukturních typů. Většina z nich je však reprezentována jen

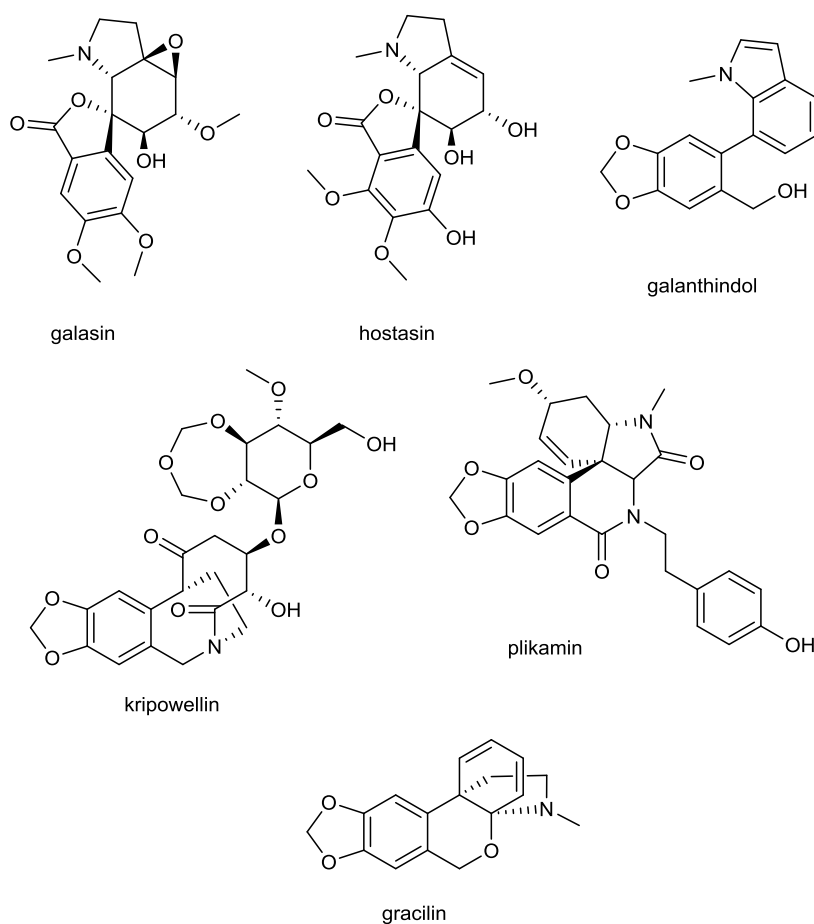
jedním nebo několika málo alkaloidy, které bývají často zastoupeny pouze ve velmi nízkých koncentracích [17]. Z významnějších lze uvést galasinový typ, který je příbuzný lykorinovému typu. Jedná se o skupinu alkaloidů, jejichž skelet tvoří 15-uhlíkatý řetězec, substituovaný hydroxy- a methoxyskupinami. Typickým strukturním znakem je γ -laktonový kruh [17]. Tento typ alkaloidů byl izolován z rostlin *Galanthus elwesii* (galasin) [31] a *Lycoris radiata* (7-demethoxyhostasin) [32], a z rostliny *Hosta plantaginea* (hostasin, 8-demethoxyhostasin, 8-demethoxy-10-*O*-methylhostasin, 10-*O*-methylhostasin) z čeledi Liliaceae. Otázkou však zůstává, zda se jednalo opravdu o tuto rostlinu, jelikož se jedná o jedinou zmínku izolace AAs u tohoto rodu rostlin. 8-Demethoxy-10-*O*-methylhostatin vykazoval při studiích vysokou inhibiční aktivitu vůči AChE ($IC_{50} = 2,32 \mu M$), zároveň se jedná o vůbec první zjištěný alkaloid s AChEi aktivitou v této strukturní skupině [33].

Dalším typem jsou galanthindolové alkaloidy, které jsou tvořeny 14-uhlíkatým skeletem s hydroxy-, methoxy- a glykosylovými substituenty. Strukturně vycházejí z homolykorinového typu, mají otevřený kruh B a kruh C je v různém stupni nenasycení [17]. Zajímavostí u tohoto strukturního typu je, že v závislosti na počtu substituentů je ovlivněna rotace na vazbě mezi dvěma aromatickými kruhy, přičemž většina tetra-*O*-substituovaných alkaloidů kvůli tomu netvoří racemáty při pokojové teplotě. [34] Tyto alkaloidy byly izolovány z *Galanthus elwesii* a rostlin rodů *Clivia* [17], *Hippeastrum*, *Lycoris* [32] a *Narcissus* [34].

Menší skupinou jsou alkaloidy kripowellinového typu, které pravděpodobně vycházejí z haemanthaminového typu. Od předchozích dvou typů se odlišují především tím, že byly doposud izolovány pouze z rostlin rodu *Crinum*. Poprvé byly izolovány z druhu *C. powellii* kripowellin A a B, které vykazují insekticidní vlastnosti [35]. Následně byly při hledání nových antimalarických látek izolovány z *C. erubescens* kripowellin C a D [36].

Podstatně větší skupinou jsou alkaloidy plikaminového typu. Jedná se asi o 23 látek, jejichž základem je 15-uhlíkatý skelet se dvěma atomy dusíku. Tato struktura vychází z pretazettinového typu, kde je kyslík v poloze 5 nahrazen dusíkem. Příkladem těchto alkaloidů jsou plikamin a obliquin, které byly izolovány z rodů *Galanthus*, *Narcissus*, *Cyrtanthus* a *Zephyranthes* [37–41]. Velice podobnou, ale menší, skupinou jsou alkaloidy sekoplikaminového typu, které ve své struktuře také obsahují 2 atomy dusíku. Tyto sloučeniny se často vyskytují spolu s plikaminovým typem ve stejných rodech [37, 38, 40].

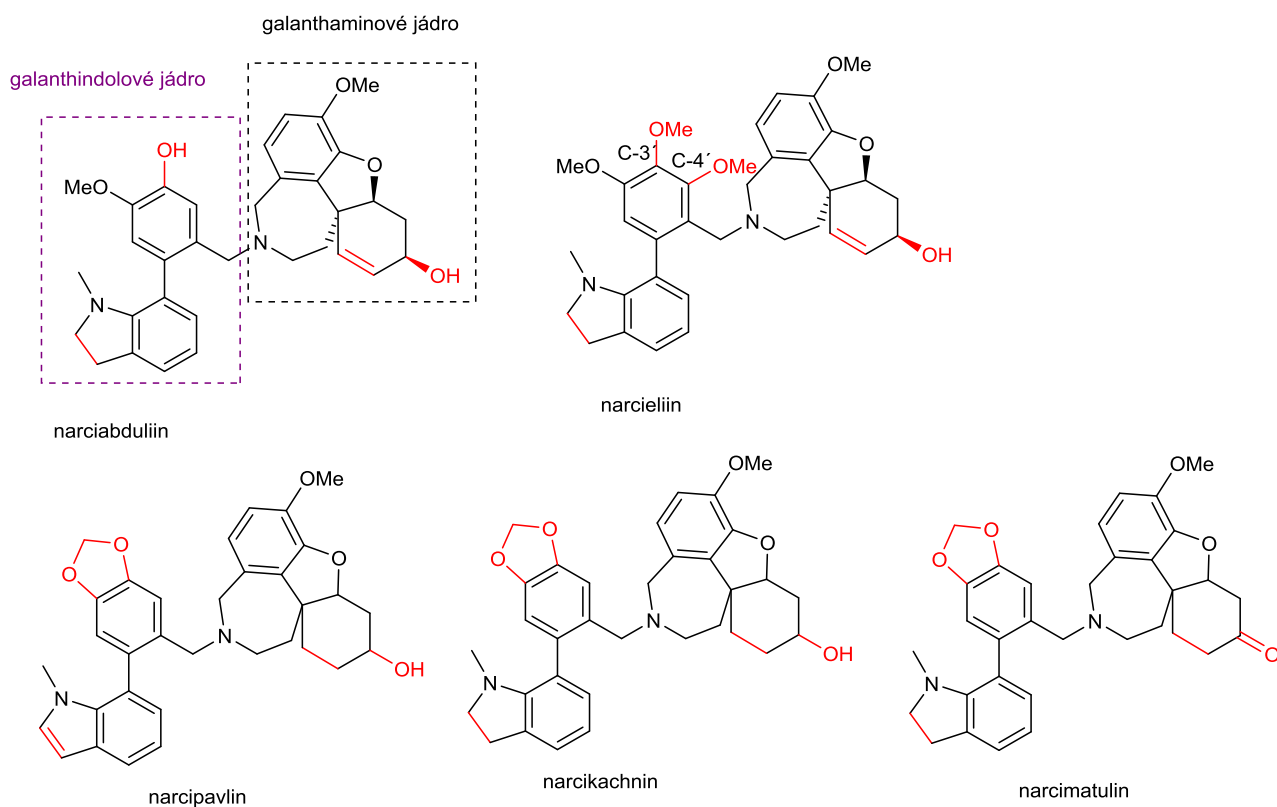
Poměrně malou skupinou jsou alkaloidy gracilinového typu tvořené skeletem z 15 uhlíků, který je obvykle substituovaný v poloze 3 a 11. Předpokládá se, že tato struktura vychází z 6-hydroxyderivátů haemanthaminového typu [17]. Tento speciální typ alkaloidů byl zatím izolován pouze z rodu *Galanthus* (*G. gracilis*, *G. x valentinei* nothosubsp. *subplicatus* [42], *G. plicatus* subsp. *byzantinus* [43], *G. elwesii* [44]) a rostliny *Pancratium maritimum* [45]. Biologická aktivita tohoto strukturního typu zatím nebyla studována. Vybrané zástupce výše zmíněných typů představuje následující obrázek (Obrázek 3).



Obrázek 3 Struktury vybraných Amaryllidaceae alkaloidů minoritních strukturních typů [17]

Nedávno popsaným strukturním typem AAs je heterodimerní narcikachninový strukturní typ. Ten je tvořen kombinací dvou typů, galanthaminového a galanthindolového. Poprvé byly tyto alkaloidy izolovány z *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol a pojmenovány narcikachnin a narcipavlin. U narcipavlinu byla testována jeho biologická aktivita a zjistilo se, že vykazuje zajímavou inhibiční aktivitu vůči BuChE [46]. Dalším izolovaným alkaloidem z této skupiny byl narcimatulin získaný z *N. pseudonarcissus*

L. cv. Dutch Master [47]. U všech těchto látek se vzhledem k malému izolovanému množství nepodařilo určit absolutní konfiguraci. V roce 2021 byl z rostliny *Zephyranthes citrina* izolován narcieliin [9] a nedlouho poté z *N. pseudonarcissus* cv. Carlton další alkaloid této skupiny, narciabduliin [10]. U těchto alkaloidů se za využití 2D-NMR technik a cirkulárního dichroismu podařilo objasnit absolutní konfiguraci. Alkaloidy narcikachninového typu se mezi sebou liší především rozdílnými substitucemi v polohách C-3' a C-4', dvojnou vazbou a substitucí v cyklohexanovém kruhu galanthaminové části a dvojnou vazbou v pětičlenném heterocyklu. Tyto rozdíly jsou shrnuty v následujícím obrázku (Obrázek 4). Všechny nově popsané alkaloidy byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE, která bude podrobněji popsána v kapitole 3.3. Ačkoliv mají alkaloidy narcikachninového typu zajímavý biologický potenciál jakožto možná léčiva využitelná při AD, je jejich velkou nevýhodou to, že jsou v přírodních zdrojích zastoupeny pouze ve velmi



malých množstvích [22].

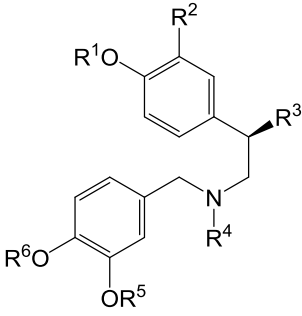
Obrázek 4 Alkaloidy narcikachninového typu se zvýrazněnými rozdíly ve struktuře [22, 46]

3.2.1 Norbelladinový typ

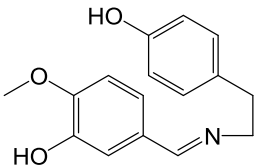
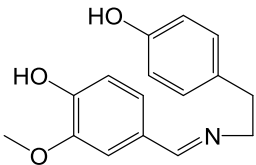
Norbelladin, který stojí na začátku vlastní biosyntézy AAs, není ve své podstatě pravým alkaloidem. Jedná se o protoalkaloid, terciární amin, jelikož dusík není součástí

heterocyklu. K isochinolinovým alkaloidům jsou látky odvozené od norbelladinu řazeny formálně na základě jejich stejného prekursoru (aminokyseliny tyrozinu). K norbelladinovému typu lze zařadit v podstatě 13 látek, které jsou tvořeny 15-uhlíkatým skeletem. Tyto alkaloidy byly izolovány především z rodů *Crinum*, *Nerine*, *Pancreatum* a asijských druhů rodu *Lycoris*. Jedná se o norbelladin, 4'-*O*-methylnorbelladin, latisodin, 4-*O*-demethylnorbelladin, *O,N*-dimethylnorbelladin, β *R*-hydroxy-*O,N*-dimethylnorbelladin, *N*-demethylbelladin, belladin, 3'-*O*-demethylbelladin, ryllistin, latisolin, kraugsodin a *iso*-kraugsodin. Prvních 11 sloučenin si je velmi strukturně podobných, ve většině případů se liší pouze v poloze a počtu methylových skupin, jak znázorňuje tabulka níže (Tabulka 1) [17]. Vzhledem ke skutečnosti, že se tyto alkaloidy vyskytují v rostlinách v nízkých koncentracích, nebyla jim věnována významná pozornost z pohledu jejich biologické aktivity.

Tabulka 1 Alkaloidy norbelladinového typu [17]

						
Název	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
norbelladin	H	H	H	H	H	H
4'- <i>O</i> -methylnorbelladin	H	H	H	H	H	Me
latisodin	H	H	H	H	Me	Me
4- <i>O</i> -demethylnorbelladin	H	H	H	Me	Me	Me
<i>O,N</i> -dimethylnorbelladin	H	H	H	Me	H	Me
β <i>R</i> -hydroxy- <i>O,N</i> -dimethylnorbelladin	H	H	OH	Me	H	Me
<i>N</i> -demethylbelladin	Me	H	H	H	Me	Me
belladin	Me	H	H	Me	Me	Me
3'- <i>O</i> -demethylbelladin	Me	H	H	Me	H	Me
ryllistin	Me	OMe	H	H	Me	Me

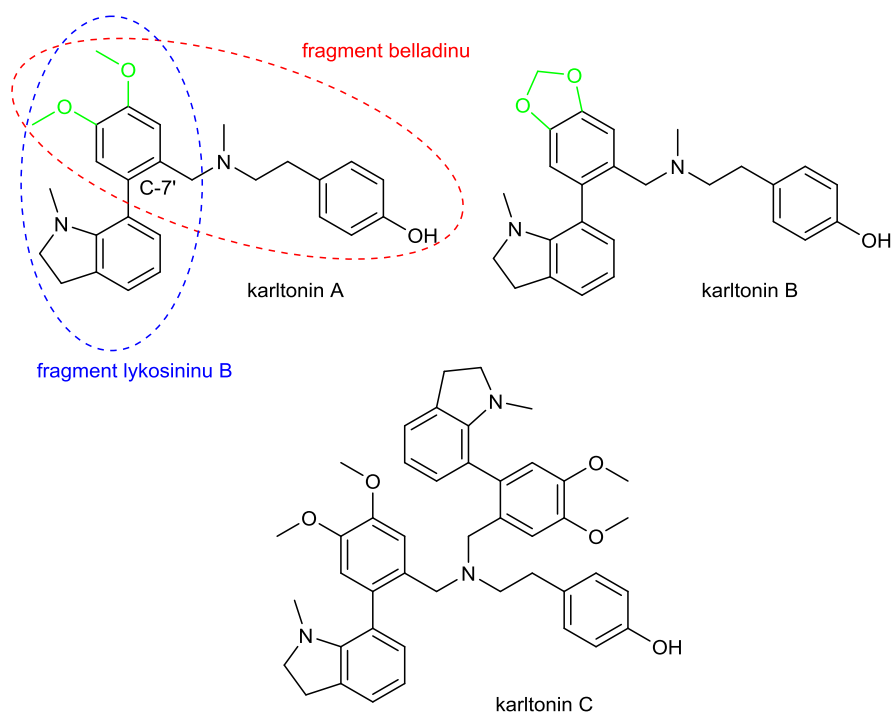
Tabulka 1 Alkaloidy norbelladinového typu [17] (pokračování)

latisolin	Glc	H	H	H	Me	Me
<p>kraugsodin</p> 			<p>iso-kraugsodin</p> 			

3.2.2 Karltoninový typ

Karltoninový typ bývá někdy řazen mezi alkaloidy norbelladinového typu [30]. Jedná se o malou skupinu AAs, v jejichž struktuře se kombinují, resp. překrývají, dva strukturní typy, a to belladinový a lykosininový. U doposud izolovaných sloučenin tohoto typu jsou přítomny dva nebo tři atomy dusíku (Obrázek 5). Tento strukturní typ byl zaveden po izolaci pilotních alkaloidů karltoninu A-C z *N. pseudonarcissus* cv. Carlton. Pro tyto látky platí to samé, co pro alkaloidy narcikachninového typu, v rostlinách se vyskytují pouze ve stopových množstvích (z 30 kg čerstvých cibulí *N. pseudonarcissus* cv. Carlton bylo izolováno 70 mg karltoninu A, 6 mg karltoninu B a 7 mg karltoninu C [8]).

Tyto látky byly studovány z pohledu inhibičního potenciálu vůči AChE, BuChE a POP, což bude popsáno v kapitole 3.3.



Obrázek 5 Karltonin A-C se zvýrazněnými důležitými strukturálními prvky [8]

3.3 Inhibiční aktivita Amaryllidaceae alkaloidů vůči cholinesterázám

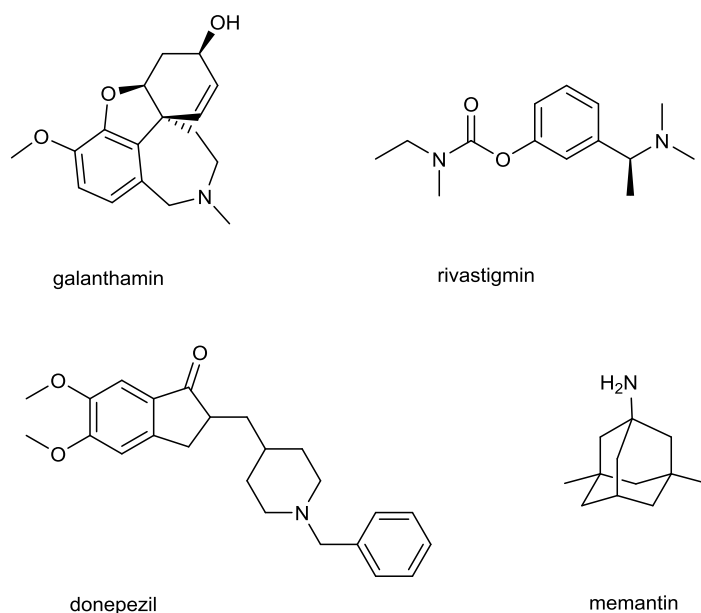
Cholinesterázy jsou základními enzymy vyskytujícími se jak v periferním, tak i v centrálním nervovém systému. Skupina cholinesteráz je reprezentována dvěma enzymy – AChE a BuChE. Na principu hydrolýzy esterové vazby zajišťují za normálních fyziologických podmínek ukončení cholinergní neurotransmise na synapsích. Kromě toho se AChE uplatňuje také při diferenciaci embryonálních kmenových buněk, neuritogenezi, buněčné adhezi, synaptogenezi, aktivaci dopaminových neuronů, seskupování vláken amyloidu beta, hematopoezi, trombopoezi a regulaci glutamátem ovlivňované aktivitě hipokampu [48].

Úloha BuChE stále není dostatečně objasněna, ale kromě ovlivňování cholinergní transmise se podílí na neurogenezi a má detoxikační účinky na různá xenobiotika, což je pravděpodobně dáno její nižší substrátovou specifitou [48]. Jako příklad lze uvést interakci BuChE s alkaloidy rodu *Solanum*, heroinem [49], kokainem a kyselinou acetylsalicylovou. Kromě toho se BuChE také podílí na vychytávání přírodních (fyzostigmin) i syntetických (organofosfáty) látek s anticholinergní aktivitou [50].

Při některých patologických stavech, jako je například AD, dochází k významnému snížení cholinergní neurotransmise vlivem neregulované vyšší aktivity cholinesteráz. Z těchto důvodů se reverzibilní inhibice těchto enzymů nabízí jako vhodná strategie terapie, díky

kteřé dojde alespoň k dočasnému zpomalení progresu onemocnění a zlepšení kognitivních schopností pacientů. Uvádí se, že v pokročilejších stádiích AD dochází v určitých oblastech mozku ke zvýšení aktivity BuChE o 40-90%, přičemž aktivita AChE se sníží až o 33-45%. Tato změna poměru AChE a BuChE zvýrazňuje roli BuChE při hydrolýze acetylcholinu a činí z ní tedy možný cíl terapie v pokročilejších stádiích AD [51]. Změny v aktivitě cholinesteráz jsou patrné i u pacientů s parkinsonskou demencí, naopak u pacientů s demencí s Lewyho tělísky žádné změny v aktivitě cholinesteráz nebyly pozorovány [52].

V současnosti používaná léčiva při terapii AD (Obrázek 6) cílí především na AChE. Galanthamin a donepezil jsou reverzibilní nekompetitivní inhibitory AChE, zatímco rivastigmin má duální reverzibilní nekompetitivní inhibiční aktivitu [53, 54]. Kromě inhibitorů cholinesteráz se v terapii AD dále využívá memantin (antagonista NMDA receptorů), a to i v kombinaci s donepezilem [55]. Toto portfolio bylo v roce 2021 (po téměř 20 letech) rozšířeno po schválení FDA o monoklonální protilátku aducanumab cílící na amyloidní plaky [56].

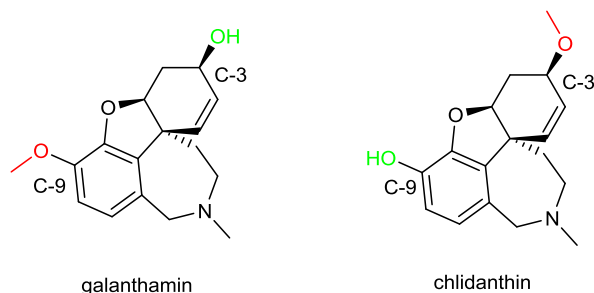


Obrázek 6 V současnosti užívaná léčiva při terapii Alzheimerovy nemoci [57]

Jediným v současné době využívaným AA je galanthamin, který disponuje selektivní reverzibilní nekompetitivní inhibiční aktivitou vůči acetylcholinesteráze. Kromě galanthaminu bylo do současné doby izolováno a identifikováno větší množství AAs, které mají v některých případech dokonce i silnější inhibiční aktivitu vůči AChE. V roce 2002 bylo testováno 22 alkaloidů patřících k lykorinovému, homolykorinovému, haemanthaminovému,

galanthaminovému a tazettinovému typu a mesembrenon (celkem tedy 23 alkaloidů) na jejich schopnost *in vitro* inhibovat AChE, přičemž galanthamin byl použit jako pozitivní kontrola. Z této studie vyplynulo, že inhibiční aktivitu vykazují především alkaloidy náležící k lykorinovému a galanthaminovému typu. Zdá se, že schopnost alkaloidu vázat se v aktivním místě AChE do značné míry ovlivňuje přítomnost a poloha hydroxyskupiny. Z alkaloidů galanthaminového typu se jako nejvíce potentní jevil sanguinin, který měl 10x vyšší aktivitu oproti galanthaminu, pravděpodobně díky přítomnosti další hydroxyskupiny. Dalším zajímavým alkaloidem byl 11-hydroxygalanthamin, který měl aktivitu jen o málo slabší než kontrolní galanthamin. Z alkaloidů lykorinového typu vykazoval nejvyšší aktivitu assoanin (přesto se však jednalo o hodnoty zhruba 4x nižší než u galanthaminu) a oxoassoanin. Vzhledem k tomu, že se od ostatních studovaných alkaloidů lykorinového typu liší přítomností aromatického kruhu C, předpokládá se, že je schopnost inhibice AChE dána především vyšší planaritou molekuly [58]. Ve starší literatuře je dále uváděn také 1-*O*-acetyllykorin s hodnotami $IC_{50} = 0,96 \mu M$ [59]. Takto vysoká inhibiční aktivita však nebyla potvrzena v pozdější fytochemické studii *Nerine bowdenii* Watson, v rámci které byl tento alkaloid izolován [60]. Někteří autoři však na tuto hodnotu stále odkazují i v současné literatuře [61].

V roce 2011 byla provedena fytochemická studie *Zephyranthes concolor*, při které byl izolován chlidanthin, polohový isomer galanthaminu. Chlidanthin má ve své struktuře oproti galanthaminu prohozeny substituenty v polohách C-3 a C-9 (Obrázek 7). Ten alkaloid byl poprvé izolován již v padesátých letech minulého století z *Chlidanthus fragrans*, později byl izolován ještě z *Haemanthus multiflorus* a *Hippeastrum aulicum* var. *robustum*. Na rozdíl od galanthaminu, který je přítomen v mnoha druzích čeledi Amaryllidaceae, se jedná o látku, která se v rostlinách vyskytuje pouze v nízkých koncentracích. Chlidanthin byl testován na inhibiční aktivitu vůči AChE, která byla v porovnání s galanthaminem podstatně nižší. Důvodem nižší aktivity chlidanthinu je pravděpodobně nemožnost tvorby vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou na C-3 a kyslíkem na dihydrofuranovém kruhu, což u galanthaminu možné je [62].



Obrázek 7 Porovnání struktury galanthaminu a chlidanthinu [62]

Kromě chlidanthinu byl při fytochemické studii v roce 2013 izolován z *Chlidanthus fragrans* také alkaloid krininového typu, undulatin. Ačkoliv jsou alkaloidy krininového typu obecně považovány z pohledu inhibice AChE za velmi slabě aktivní až neaktivní, undulatin je výjimkou. Jeho inhibiční aktivita byla v této studii stanovena jako $IC_{50} = 23 \pm 1 \mu M$ [63]. Ve stejném roce byl ze *Zephyranthes robusta* získán a otestován další alkaloid krininového typu, 8-*O*-demethylmaritidin, který také vykazoval slibnou inhibiční aktivitu ($IC_{50} = 28,02 \pm 0,91 \mu M$) [64]. O dva roky později byly oba alkaloidy opět testovány na schopnost inhibovat AChE, přičemž undulatin vykazoval výrazně lepší hodnoty než v minulé studii ($IC_{50} = 7,4 \pm 0,03 \mu M$), zatímco získaná hodnota pro 8-*O*-demethylmaritidin byla horší ($IC_{50} = 57,4 \pm 0,1 \mu M$). Rozdílné hodnoty IC_{50} jsou s velkou pravděpodobností dány tím, že v rámci těchto studií byly použity různé zdroje AChE. V prvních dvou studiích byla použita erytrocytární AChE, ve třetí studii se jednalo o enzym izolovaný z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*). U obou alkaloidů se také zjišťovala schopnost přestupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB) prostřednictvím pasivního transportu. Na základě získaných výsledků je pasivního transportu přes HEB schopen pouze undulatin [65]. V roce 2016 byl izolován z *Nerine bowdenii* W. Watson třetí krininový alkaloid, který měl schopnost inhibovat AChE, powellin ($IC_{50} = 29,1 \pm 1,6 \mu M$). Zároveň s powellinem byl získán také undulatin, který byl znovu otestován. Výsledek odpovídal spíše hodnotě z první provedené studie ($IC_{50} = 23,5 \pm 1,2 \mu M$) [66].

Dalšími zajímavými látkami jsou *N*-alkylované deriváty galanthaminu, *N*-allylnorgalanthamin a *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin, které byly izolovány z *Leucojum aestivum*. Ty ve studii vykazovaly asi 10x vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE v porovnání s galanthaminem. Výhodné je, že ve své molekule na C-9 obsahují methoxylovou skupinu a alkyl navázaný na atom dusíku, což oproti galanthaminu zvyšuje lipofilitu a tím také

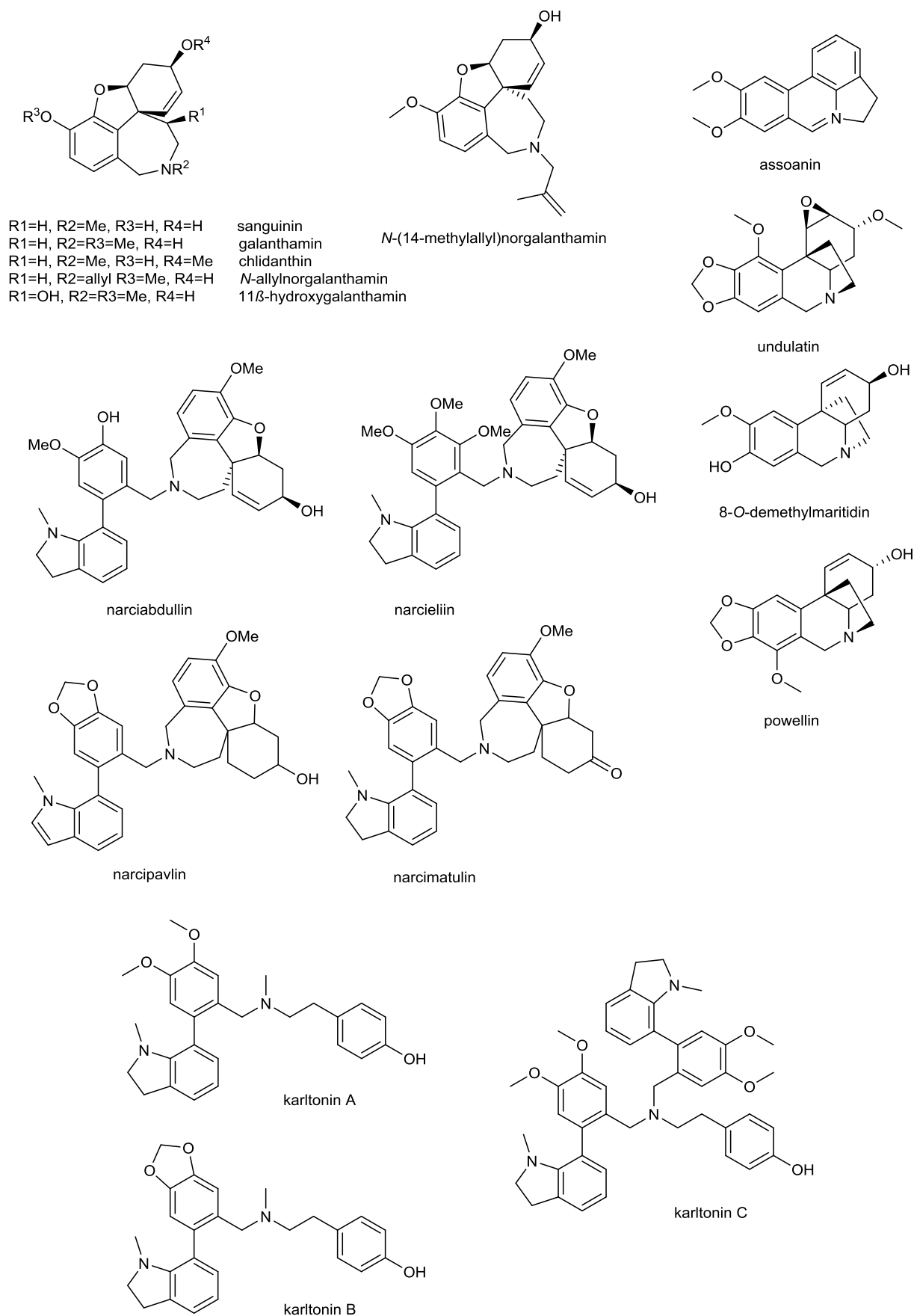
biodostupnost v mozkové tkáni. Jedná se však o přírodní látky, které jsou v rostlinném materiálu obsaženy pouze ve velmi malém množství a je tedy obtížné je izolovat [67].

Ačkoliv hrají inhibitory AChE v současné době hlavní roli v terapii AD, BuChE je vnímána jako potenciální terapeutický cíl již 20 let. Jedním z důvodů může být to, že v pokročilejších stádiích nemoci získává BuChE podstatně důležitější úlohu v hydrolýze acetylcholinu, neboť se aktivita AChE dramaticky snižuje. Kromě toho BuChE hraje roli v počátečních stádiích při tvorbě amyloidních plaků a zvyšuje jejich neurotoxicitu [68]. Existují navíc důkazy, že kromě zlepšení kognitivních funkcí vlivem vyšší hladiny acetylcholinu (ACh) v mozku nedochází při selektivní inhibici BuChE k výskytu nežádoucích účinků spojených s ovlivněním parasymptiku [69, 70].

Zvýšená aktivita BuChE byla zaznamenána kromě AD také při uremii, hyperthyroidismu, obezitě, diabetu obou typů, hyperlipidemii a steatóze, což z ní činí významný marker. Všechny tyto skutečnosti jsou důvodem pro hledání a studium selektivních inhibitorů BuChE. Až do nedávné doby by se za hlavní skupiny inhibitorů BuChE daly považovat fyzostigmin a jeho deriváty a látky odvozené od takrinu, jejichž aktivita byla objevena víceméně náhodně při studiu inhibiční aktivity vůči AChE [71].

V posledních několika letech byl však učiněn značný posun v poznání selektivních inhibitorů BuChE mezi přírodními látkami, a to především ve skupině AAs. První významnou skupinou jsou již zmíněné alkaloidy narcikachninového typu, kterých bylo od roku 2018 izolováno prozatím pět (Obrázek 4). Narciabdullin izolovaný z *N. pseudonarcissus* cv. Carlton vykazoval podobnou aktivitu vůči oběma cholinesterázám, s hodnotou IC_{50} $3,29 \pm 0,73 \mu M$ pro AChE a $3,44 \pm 0,02 \mu M$ pro BuChE. Nejlepší aktivita AA narcikachninového typu vůči BuChE byla naměřena u narcieliinu (IC_{50} $1,3 \pm 0,3 \mu M$). Jediným strukturálním rozdílem od narciabdullinu je substituce v polohách C-3' a C-4' v galanthindolové části molekuly. Narcieliin byl také podroben analýze enzymové kinetiky k určení kinetiky inhibice AChE/BuChE. Tato studie odhalila kompetitivní typ inhibice vůči AChE a smíšený typ inhibice vůči BuChE. Narciabdullin nebyl studován z pohledu mechanismu inhibice, neboť byl izolován pouze v malém množství. Za účelem identifikace strukturálních detailů zodpovědných za inhibici AChE/BuChE byly u narcieliinu a narciabdullinu provedeny studie molekulového modelování [22].

Druhým nově popsaným strukturním typem jsou alkaloidy karltoninového typu, karltonin A-C. Tyto látky nevykazovaly nijak významnou inhibici AChE, ale inhibiční aktivita vůči BuChE byla velmi slibná. Karltonin A i B vykazovaly inhibiční aktivitu již v nanomolárních množstvích (IC_{50} naměřené pro karltonin A bylo 910 nM, pro karltonin B 31 nM). Tyto dva alkaloidy se strukturně liší pouze v substituci na C-5' a C-6'. Přítomnost 1,3-dioxalanového kruhu v molekule karltoninu B je pravděpodobně zodpovědná za asi třicetinásobně vyšší aktivitu vůči BuChE v porovnání s otevřeným dimethoxybenzenovým analogem přítomným v molekule karltoninu A. Poslední alkaloid karltoninového typu, karltonin C, obsahuje ve své molekule navíc jeden lykosininový fragment, jehož přítomnost významně snižuje aktivitu vůči BuChE (IC_{50} $14,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$). K odhalení základních interakcí a identifikaci strukturních detailů zodpovědných za vyšší aktivitu karltoninu B v porovnání s karltoninem A byly provedeny studie molekulového modelování. Vyšší aktivita karltoninu B je pravděpodobně dána tím, že 2*H*-1,3-benzodioxolový kruh má rozšířené aromatické vlastnosti, které zvětšují rozsah hydrofobních interakcí mezi ligandem a enzymem. Vzhledem k tomu, že se tyto sloučeniny vyskytují v rostlinném materiálu pouze ve stopových množstvích, je jejich totální syntéza výzvou pro farmaceutickou chemii [8, 22].



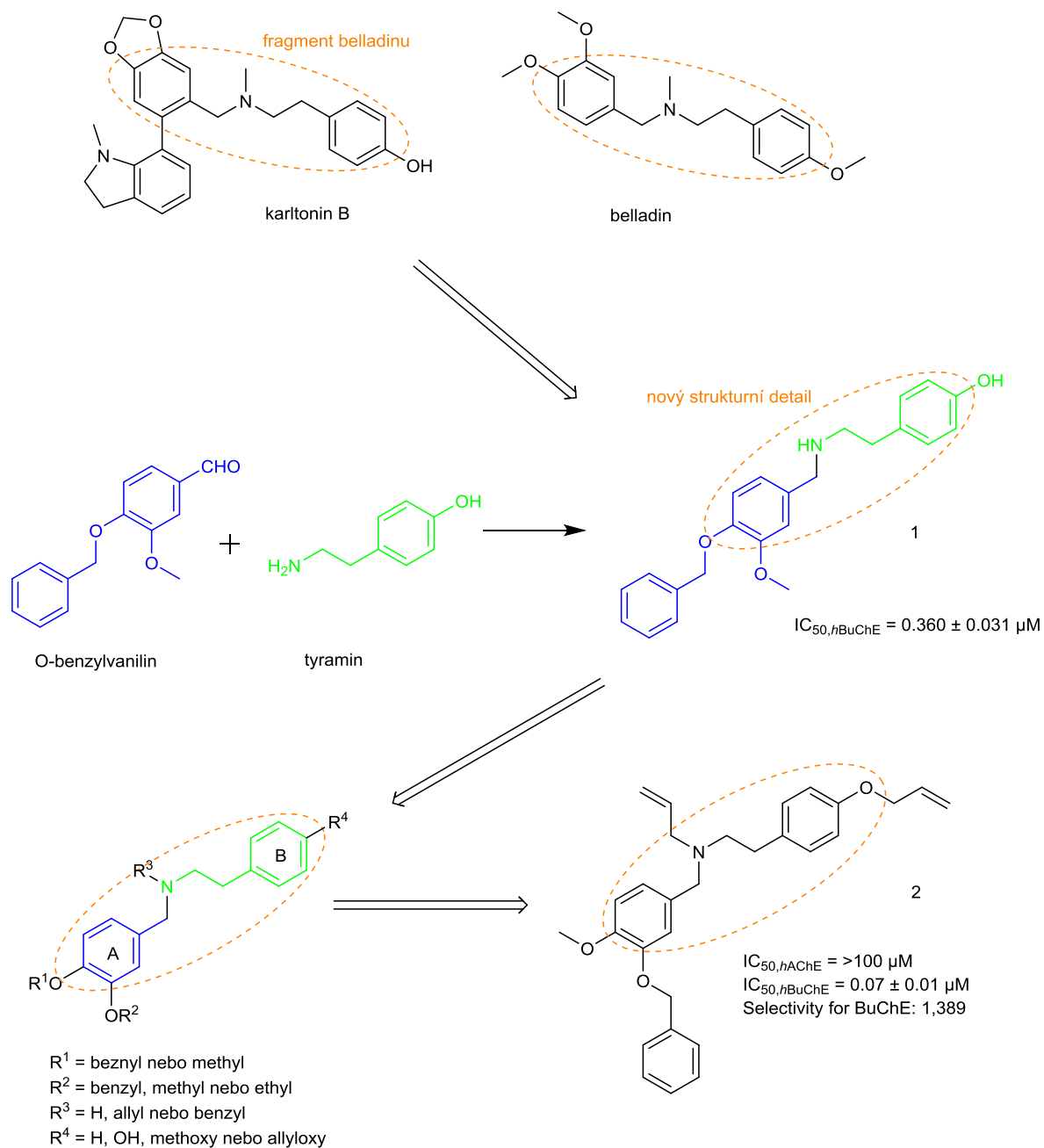
Obrázek 8 Struktury alkaloidů s významnou inhibiční aktivitou vůči cholinesterázám [8, 22, 58, 62, 65, 67]

Tabulka 2 Přehled alkaloidů s významnou inhibiční aktivitou vůči cholinesterázám

Alkaloid	Strukturní typ	IC ₅₀ AChE (μM)	IC ₅₀ BuChE (μM)	Reference
sanguinin	galanthaminový	0,10 ± 0,01	neměřeno	[58]
<i>N</i> -(14-methylallyl)norgalanthamin	galanthaminový	0,16 ± 0,01	neměřeno	[67]
<i>N</i> -allylnorgalanthamin	galanthaminový	0,18 ± 0,01	neměřeno	[67]
11β-hydroxygalanthamin	galanthaminový	1,61 ± 0,21	neměřeno	[58]
galanthamin	galanthaminový	1,7 ± 0,1	42,3 ± 1,3	[66]
chlidanthin	galanthaminový	147 ± 6	422 ± 15	[63]
narciabduliin	narcikachninový	3,29 ± 0,73	3,44 ± 0,02	[10]
narciellin	narcikachninový	18,7 ± 2,3	1,34 ± 0,31	[9]
narcipavlin	narcikachninový	208 ± 37	24,4 ± 1,2	[46]
narcimatulin	narcikachninový	489 ± 60	5,9 ± 0,2	[47]
asosanin	lykorinový	3,87 ± 0,24	neměřeno	[58]
undulatin	krininový	23,5 ± 1,2	> 1000	[66]
8- <i>O</i> -demethylmaritidin	krininový	28,02 ± 0,91	neaktivní	[64]
powellin	krininový	29,1 ± 1,6	394,0 ± 4,8	[66]
karltonin A	karltoninový	> 100	0,913 ± 0,02	[8]
karltonin B	karltoninový	> 100	0,031 ± 0,001	[8]
karltonin C	karltoninový	> 100	14,8 ± 1,1	[8]

3.4 Alkaloidy karltoninového typu jako inspirace pro vývoj vysoce selektivních inhibitorů butyrylcholinesterázy

Na základě významné inhibice BuChE u karltoninů A a B a skutečnosti, že se tyto látky vyskytují v rostlinném materiálu pouze ve stopových množstvích, byla připravena pilotní série dvaceti látek strukturně vycházejících z norbelladinového typu AAs. Základní strukturní detail, ze kterého tato studie vychází, je vyobrazen níže (Obrázek 9). Sedm z těchto látek vykazovalo velmi silnou aktivitu (< 1 μM) vůči BuChE. V této sérii se vycházelo z kondenzace *O*-benzylvanilinu, *O*-benzylisovanilinu a 3-ethoxy-4-methoxybenzaldehydu s primárními aminy [72]. Podobná studie, syntéza substituovaných *N*-benzyl-2-fenylethanaminů odvozených od norbelladinového typu, byla provedena zcela nezávisle již v roce 2020, avšak nebyly připraveny látky, které by měly tak významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE. Hodnoty IC₅₀ byly vždy vyšší než 10 μM [73].



Obrázek 9 Karltoninový strukturální typ jako inspirace pro přípravu selektivních inhibitorů butyrylcholinesterázy [72]

Z norbelladinového, resp. karltoninového strukturálního typu a práce „Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies“ (Al Mamun, A. et al., 2021) vychází i tato diplomová práce, která se zaměřuje především na studium vztahu struktury a účinku u připravených derivátů.

4. Experimentální část

4.1 Materiály a metody

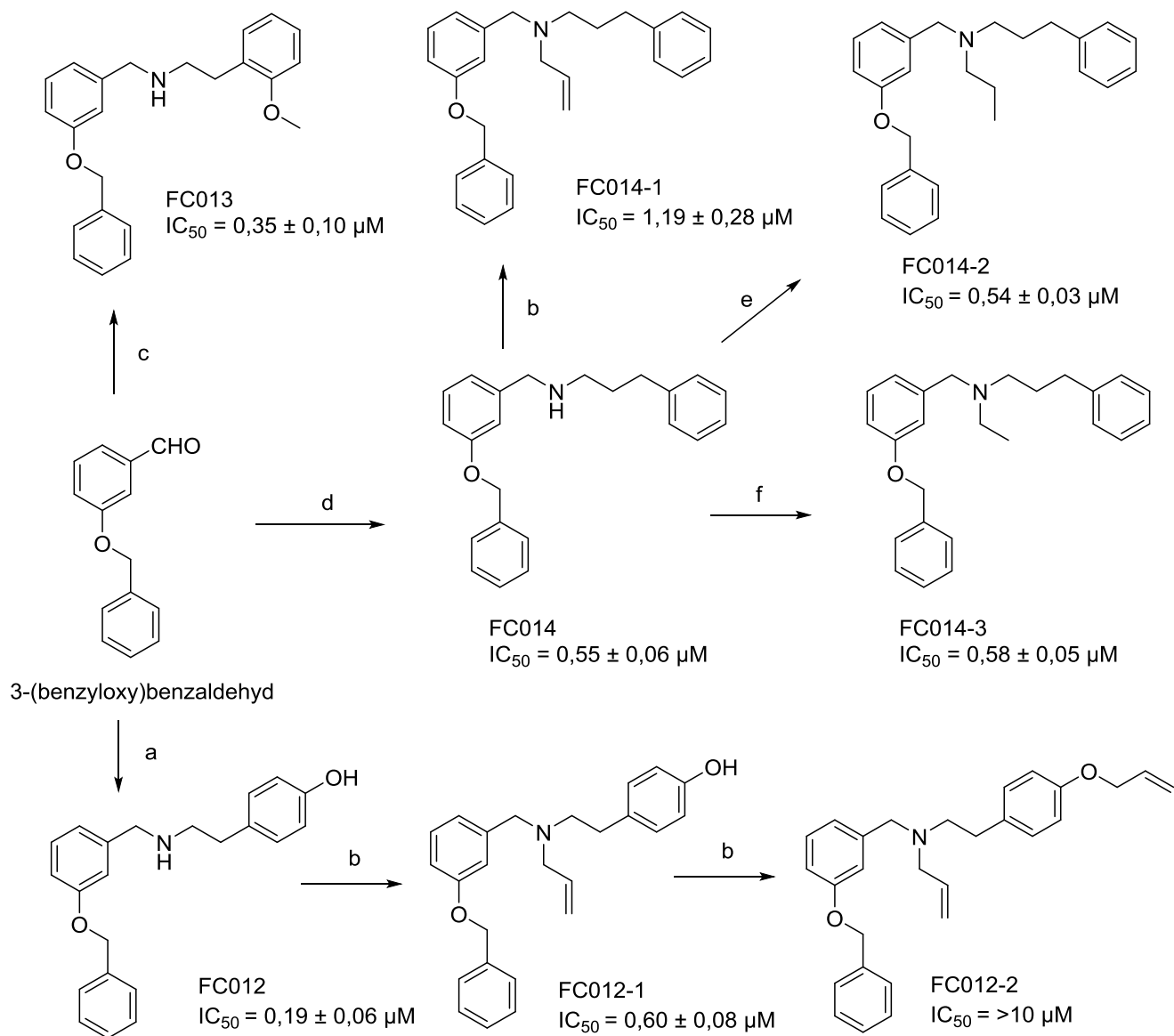
V rámci této diplomové práce byly pro přípravu a identifikaci meziproduktů a finálních sloučenin používány výhradně metody dříve popsané v článcích vycházejících z pracoviště skupiny ADINACO, proto je není třeba popisovat [72]. Ze syntetického hlediska tato práce vychází z článku publikovaného v roce 2021, který se zabývá přípravou pilotní série derivátů odvozených od AA norbelladinového, resp. karltoninového strukturního typu. Konkrétní podmínky reakcí a reakční činidla následujících reakčních schématech (Obrázek 10-12). Výtěžky jednotlivých reakcí jsou uvedeny u každé konkrétní látky.

Se všemi použitými rozpouštědly se před použitím zacházelo dle standardních technik. Všechny reagující látky a katalyzátory byly zakoupeny z komerčních zdrojů (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika) a použity bez přečištění. NMR spektra byla měřena v CDCl_3 při pokojové teplotě na spektrometru VNMR S500 (Varian) pracujícím při 500 MHz pro ^1H a 125,7 MHz pro ^{13}C a na spektrometru JNM-ECZ600R (Jeol) pracujícím při 600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách parts per million (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) skrz signál rozpouštědla (CDCl_3 -7,26 ppm pro ^1H a 77,0 ppm pro ^{13}C). Vazebné konstanty (J) jsou uvedeny v Hz. ESI-HRMS byly získány hybridním hmotnostním analyzátozem typu quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) Waters Synapt G2-Si spojeným s Waters Acquity I-Class UHPLC systémem. TLC byly prováděny na litých skleněných deskách 15x15 cm za použití silikagelu Kieselgel 60 GF 254 a na komerčních hliníkových deskách s vrstvou silikagelu 0,2 mm značeného fluorescenčním indikátorem F_{254} (Merck, Německo). Látky byly na deskách pozorovány pod UV světlem vlnové délky 254 nm a detekovány pomocí Dragendorffova činidla. Zóna s produktem byla separována z použité desky, promytá směsí $\text{EtOH}:\text{CHCl}_3$ 1:1, která byla následně odpařena, a získaný produkt byl dosušen v exsikátoru. U roztoku látky FC020 byla měřena optická otáčivost při 24 °C na automatickém polarimetru Kruss Optronic Polarimeter P 3000 v prostředí methanolu. Hodnocení inhibiční aktivity vůči rekombinantní AChE a BuChE bylo provedeno za použití modifikované Ellmanovy metody. Cytotoxicita byla studována u tří nejaktivnějších látek za použití neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y (za stejných podmínek, jako ve výše jmenovaném článku [72]) a hepatocelulární buněčné linie

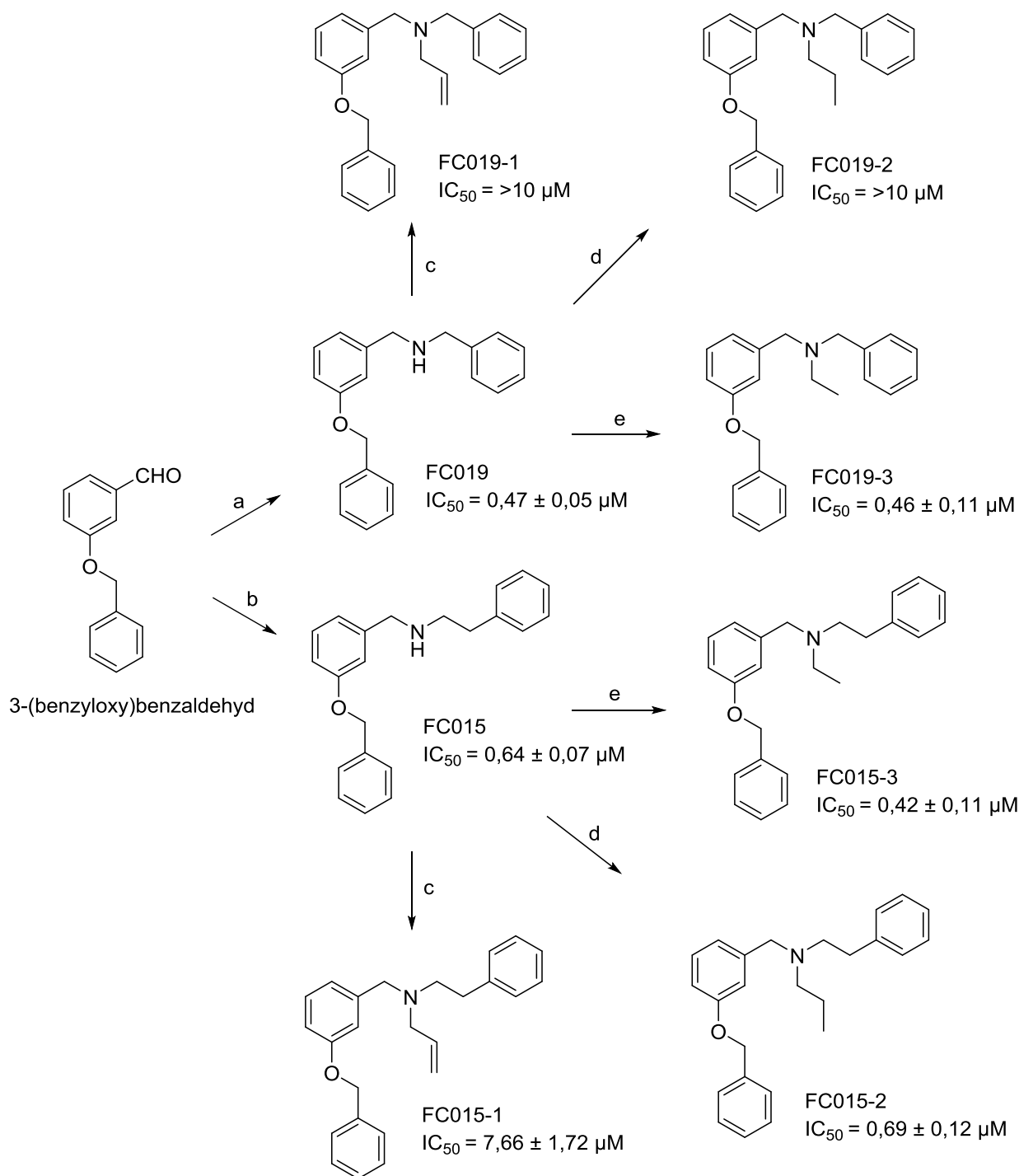
HepG2 (dle podmínek uvedených v [24]). Hodnota BBB skóre byla vypočtena podle nedávno vytvořené metody, přičemž všechny látky s BBB skóre vyšším než 4,0 by měly být schopny procházet přes HEB [74]. Na látce FC020 byla provedena dockingová studie.

4.1.1 Syntéza selektivních inhibitorů butyrylcholinesterázy

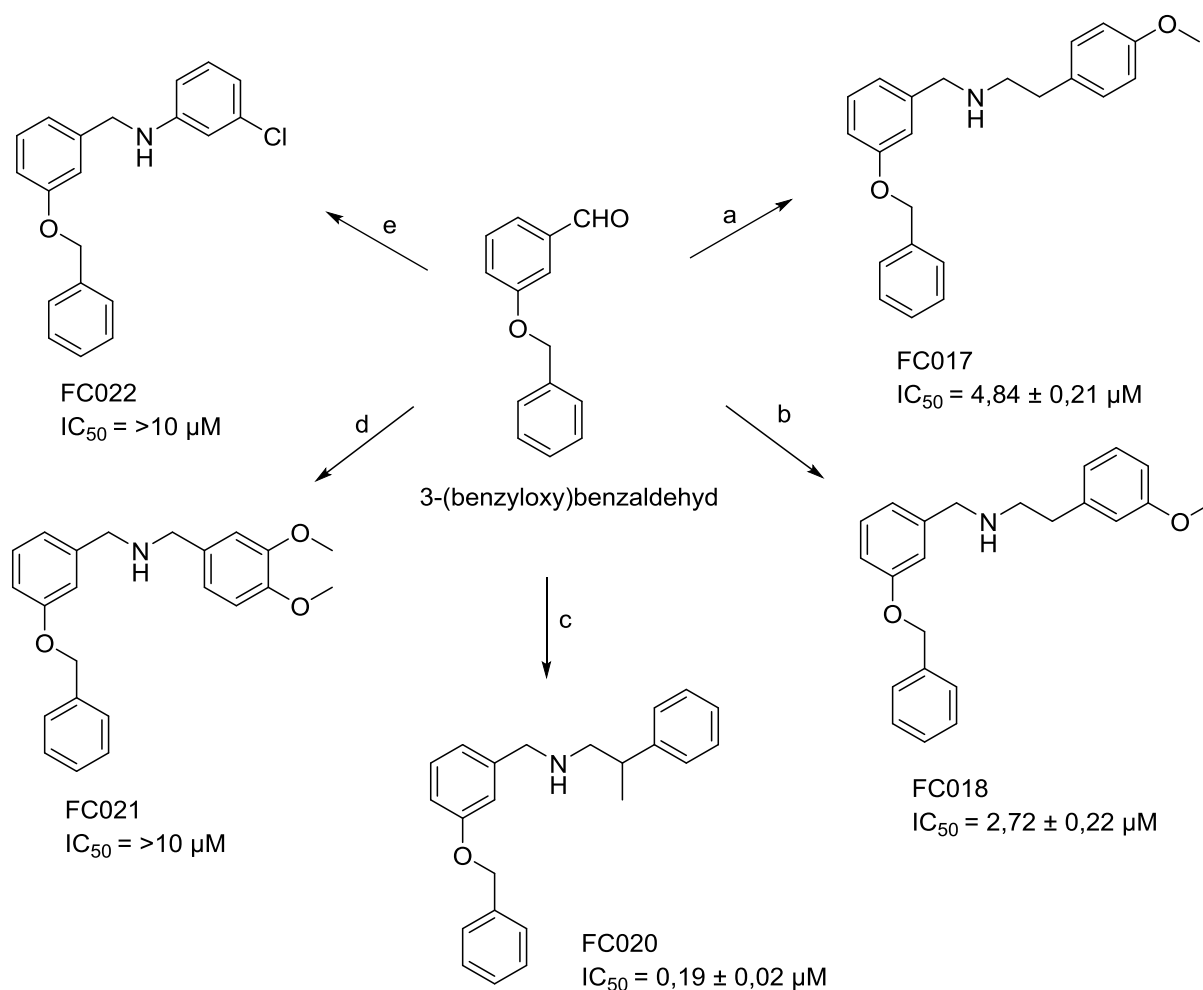
Při určování reakčních podmínek syntéz se vycházelo především z práce „Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies“ (Al Mamun, A. et al., 2021), v případě propylací a ethylací se vycházelo z reakčních podmínek využitých v práci [75].



Obrázek 10 Syntéza FC012, FC012-1, FC012-2, FC013, FC014, FC014-1, FC014-2, FC014-3. Reagenty a podmínky: **(a)** (1) tyramin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3 h; **(b)** allylbromid (1,3 ekv.), NaH (1,2 ekv.), THF, rt, 24 h; **(c)** 2-methoxyfenethylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3 h; **(d)** (1) 3-fenyl-1-propylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3 h; **(e)** propylbromid, K₂CO₃ (2 ekv.), CH₃CN, katalyzátor KI, rt, 48 h, 70 °C; **(f)** ethyljodid, K₂CO₃ (2 ekv.), CH₃CN, rt, 24 h, 70 °C.



Obrázek 11 Syntéza FC015, FC015-1, FC015-2, FC015-3, FC019, FC019-1, FC019-2, FC019-3. Reagenty a reakční podmínky: **(a)** (1) benzylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3 h; **(b)** (1) fenethylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3 h; **(c)** allylbromid (1,3 ekv.), NaH (1,2 ekv.), THF, rt, 24 h; **(d)** propylbromid, K₂CO₃ (2 ekv.), CH₃CN, katalyzátor KI, rt, 48 h, 70 °C; **(e)** ethyljodid, K₂CO₃ (2 ekv.), CH₃CN, rt, 24 h, 70 °C.



Obrázek 12 Syntéza FC017, FC018, FC019, FC019-1, FC019-2, FC019-3, FC020, FC021, FC022. Reagenty a podmínky: (a) (1) 4-methoxyfenethylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3h; (b) (1) 3-methoxyfenethylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3h; (c) (1) 3-methylfenethylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3h; (d) (1) 3,4-dimethoxybenzylamin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3h; (e) (1) 3-chloranilin, MeOH; (2) NaBH₄, rt, 3h.

4.1.2 Dockingová studie

Krystalická struktura *h*BuChE v komplexu s kokrystalizovaným inhibitorem byla získána z proteinové databanky (PDB) www.rcsb.org pod kódem ID: 6QAA [76]. Pro molekulární dockování byla struktura proteinu vyčištěna od všech iontů, kokrystalizovaných ligandů a zbytkového rozpouštědla kromě několika molekul vody, jež v aktivním místě proteinu mohou přispívat k vazbě ligandu. Vyčištěný protein byl poté připraven pomocí funkce DockPrep softwaru Chimera v. 1.15 [77] a programem AutoDockTools v. 1.5.7 [78]. Molekula ligandu FC020 byla připravena pomocí programu ChemDraw Professional v 20.0 (PerkinElmer Informatics, Inc.). Její geometrie potom byla optimalizována pomocí Avogadro v. 1.2.0 [79] a pro dockování konvertována pomocí OpenBabel v. 2.3.1 [80]. Samotné

molekulární dockování v aktivním místě *h*BuChE proběhlo pomocí nástroje AutoDock Vina v. 1.1.2 [81], který používá semi-flexibilní metodu (flexibilní ligand, rigidní protein) s nastavením: exhaustiveness = 8, num_modes = 9, velikost grid boxu = 20×20×20 Å. Pro zvýšení šance optimálního výsledku byl experiment proveden dvacetkrát. Na základě dockovacího skóre výsledných pozic a vizuální inspekce výsledných poloh pomocí programů The PyMOL Molecular Graphics System v. 2.5.0 (Schrödinger, LLC.) a Discovery Studio Visualiser v. 4.5 (BIOVIA, San Diego) byla vybrána nejpravděpodobnější vazebná pozice látky FC020 v aktivním místě *h*BuChE. Metoda byla validována redockingem původního kokrytalizovaného ligandu 6QAA (RMSD = 1,036 Å).

5. Výsledky

5.1 Příprava látek FC012, FC013, FC014, FC015, FC017, FC018, FC019, FC020, FC021, FC022

80 mg 3-(benzyloxy)benzaldehydu (0,3772 mmol) bylo rozpuštěno v 5 ml methanolu, byl přidán odpovídající amin (0,3772 mmol) a reakční směs se míchala 24 hodin. Po této době byl přidán borohydrid sodný (0,3395 mmol) při teplotě 0 °C a reakční směs se míchala další 3 hodiny. Reakční směs byla následně vypařena do sucha a oddělena pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Pro látku FC012 byla použita směs To:cHx:DEA v poměru 8:2:3, pro látky FC013 a FC021 byla použita směs cHx:DEA v poměru 9:1,5, pro látky FC014, FC015, FC017, FC018, FC019, FC020 a FC022 byla použita směs cHx:DEA v poměru 9:0,7. Charakterizace těchto látek pomocí NMR a HRMS je uvedena níže.

5.1.1 4-(2-((3-(benzyloxy)benzyl)amino)ethyl)fenol (FC012)

Výtěžek: 120,0 mg (95,41 %); žlutohnědá amorfnní pevná látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.43–7.36 (m, 3H), 7.35–7.29 (m, 1H), 7.24–7.19 (m, 1H), 7.03–6.97 (m, 2H), 6.96–6.92 (m, 1H), 6.90–6.84 (m, 2H), 6.72–6.66 (m, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.70 (bs, 1H), 3.80 (s, 2H), 2.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 159.0, 155.1, 140.3, 136.9, 130.3, 129.7, 129.5, 128.5, 127.9, 127.5, 120.9, 115.7, 114.6, 114.0, 69.8, 53.4, 50.0, 34.6; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₂H₂₃NO₂ [M+H]⁺: teoretická 334,1802; experimentální 334,1809.

5.1.2 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(2-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC013)

Výtěžek: 125,1 mg (95,45 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48–7.44 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 1H), 7.30–7.15 (m, 4H), 7.03–6.97 (m, 1H), 6.95–6.90 (m, 2H), 6.90–6.85 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.96–2.84 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 157.6, 141.8, 137.1, 130.3, 129.3, 128.5, 128.2, 127.9, 127.5, 127.4, 120.7, 120.4, 114.4, 113.4, 110.3, 69.9, 55.2, 53.5, 48.9, 30.6; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 348,1958; experimentální 348,1966.

5.1.3 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-3-fenylpropan-1-amin (FC014)

Výtěžek: 123,3 mg (98,62 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49–7.45 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 1H), 7.32–7.26 (m, 3H), 7.22–7.19 (m, 3H), 7.03–6.99 (m, 1H), 6.96–6.93 (m, 1H), 6.92–6.89 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 2.72–2.66 (m, 4H), 2.10 (bs, 1H), 1.92–1.83 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 142.0, 141.7, 137.0, 129.4, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.5, 125.8, 120.7, 114.5, 113.4, 69.9, 53.7, 48.7, 33.6, 31.5; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 332,2009; experimentální 332,2021.

5.1.4 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-2-fenylethan-1-amin (FC015)

Výtěžek: 111,7 mg (93,29 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49–7.44 (m, 2H), 7.44–7.38 (m, 2H), 7.37–7.30 (m, 3H), 7.28–7.21 (m, 4H), 7.00–6.96 (m, 1H), 6.94–6.86 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 2.97–2.83 (m, 4H), 2.27 (bs, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 141.4, 139.8, 137.0, 129.4, 128.7, 128.5, 128.4, 127.9, 127.5, 126.2, 120.7, 114.4, 113.5, 69.9, 53.6, 50.3, 36.1; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 318,1852; experimentální 318,1859.

5.1.5 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(4-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC017)

Výtěžek: 130,4 mg (99,50 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.45–7.41 (m, 2H), 7.40–7.36 (m, 2H), 7.34–7.30 (m, 1H), 7.24–7.20 (m, 1H), 7.13–7.09 (m, 2H), 6.96–6.92 (m, 1H), 6.90–6.80 (m, 4H), 5.04 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 159.0, 158.0, 141.9, 137.1, 132.0, 129.6, 129.4, 128.5, 127.9, 127.5, 120.7, 114.4, 113.9, 113.4, 69.9, 55.2, 53.7, 50.6, 35.3; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 348,1958; experimentální 348,1963.

5.1.6 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-2-(3-methoxyfenyl)ethan-1-amin (FC018)

Výtěžek: 126,3 mg (96,37 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.46–7.42 (m, 2H), 7.40–7.36 (m, 2H), 7.34–7.30 (m, 1H), 7.23–7.18 (m, 2H), 6.96–6.92 (m, 1H), 6.91–6.84 (m, 2H), 6.81–6.78 (m, 1H), 6.77–6.73 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.91–2.88 (m, 2H), 2.83–2.79 (m, 2H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 159.7, 159.0, 141.6, 141.5, 137.1, 129.4, 129.4, 128.5, 127.9, 127.5, 121.1, 120.7, 114.4, 113.5, 111.5, 69.9, 55.1, 53.6, 50.2, 36.2; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 348,1958; experimentální 348,1964.

5.1.7 *N*-benzyl-1-(3-(benzyloxy)fenyl)methanamin (FC019)

Výtěžek: 110,1 mg (96,21 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49–7.45 (m, 2H), 7.44–7.39 (m, 2H), 7.38–7.33 (m, 5H), 7.31–7.25 (m, 2H), 7.06–7.02 (m, 1H), 7.01–6.94 (m, 1H), 6.93–6.87 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 2.02 (bs, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 159.0, 141.9, 140.1, 137.1, 129.4, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9, 127.5, 127.0, 120.7, 114.6, 113.4, 69.9, 53.0, 53.0; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 304,1696; experimentální 304,1700.

5.1.8 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-2-fenylpropan-1-amin (FC020)

Výtěžek: 114,4 mg (91,50 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48–7.44 (m, 2H), 7.44–7.38 (m, 2H), 7.38–7.31 (m, 3H), 7.25–7.21 (m, 4H), 6.94–6.90 (m, 1H), 6.89–6.84 (m, 2H), 5.06 (s, 2H), 3.79 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 3.04–2.94 (m, 1H), 2.86–2.76 (m, 2H), 1.67 (bs, 1H), 1.28 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 145.3, 142.0, 137.1, 129.3, 128.5, 127.9, 127.5, 127.2, 126.4, 120.6, 114.3, 113.3, 69.9, 56.2, 53.6, 40.0, 20.1; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 332,2009; experimentální 332,2014. Optická otáčivost $[\alpha]_D^{24} = -38,3^\circ$ ($c = 0,105$; MeOH).

5.1.9 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-1-(3,4-dimethoxyfenyl)methanamin (FC021)

Výtěžek: 108,8 mg (79,36 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48–7.43 (m, 2H), 7.43–7.38 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 1H), 7.29–7.24 (m, 1H), 7.05–7.00 (m, 1H), 6.97–6.92 (m, 2H), 6.91–6.82 (m, 3H), 5.09 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 2.01 (bs, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 159.0, 148.9, 148.0, 141.8, 137.0, 132.6, 129.4, 128.5, 127.9, 127.5, 120.7, 120.3, 114.6, 113.3, 111.4, 111.0, 69.9, 55.9, 55.8, 52.9, 52.7; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 364,1907; experimentální 364,1910.

5.1.10 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-3-chloranilin (FC022)

Výtěžek: 86,9 mg (71,15 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.47–7.38 (m, 4H), 7.38–7.33 (m, 1H), 7.32–7.27 (m, 1H), 7.12–7.05 (m, 1H), 7.03–6.99 (m, 1H), 6.99–6.95 (m, 1H), 6.94–6.91 (m, 1H), 6.73–6.67 (m, 1H), 6.64–6.60 (m, 1H), 6.53–6.47 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.14 (bs, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 159.1, 149.1, 140.5, 136.8, 135.0, 130.2, 129.8, 128.6, 128.0, 127.5, 119.9, 117.4, 113.9, 113.7, 112.5, 111.1, 70.0, 48.0; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 324,1150; experimentální 324,1153.

5.2 Příprava látek FC012-1, FC012-2, FC014-1, FC015-1, FC019-1

Příslušná výchozí látka (35,5 mg FC012, 26,5 mg FC014, 24,8 mg FC015 a 21,4 mg FC019) byla rozpuštěna ve 3 ml THF. Hydrid sodný (1,2 ekv.) byl přidán při 0 °C a celá směs byla míchána v argonové atmosféře. Po 30 minutách byl přidán allylbromid (1,3 ekv.). Reakční směs se nechala míchat dalších 24 hodin při pokojové teplotě. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a separována pomocí TLC. Pro látky FC012-1 a FC012-2 byla použita směs $\text{To}:\text{cHx}:\text{DEA}$ v poměru 8:2:3, pro látky FC014-1, FC015-1 a FC019-1 směs $\text{cHx}:\text{DEA}$ v poměru 9:0,5. Charakterizace těchto látek pomocí NMR a HRMS je uvedena níže.

5.2.1 4-(2-(allyl(3-(benzyloxy)benzyl)amino)ethyl)fenol (FC012-1)

Výtěžek: 17,7 mg (44,49 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.45–7.40 (m, 2H), 7.39–7.35 (m, 2H), 7.33–7.27 (m, 1H), 7.23–7.18 (m, 1H), 7.03–6.99 (m, 1H), 6.98–6.95 (m, 2H), 6.93–6.89 (m, 1H), 6.88–6.85 (m, 1H), 6.74–6.68 (m, 2H), 5.89 (ddt, $J = 17.4$ Hz, $J = 10.1$ Hz, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.19 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.76–2.67 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 154.1, 140.1, 137.1, 134.8, 132.0, 129.8, 129.2, 128.5, 127.9, 127.5, 121.6, 118.2, 115.3, 115.2, 113.8, 69.9, 57.9, 56.5, 55.1, 32.1; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 374,2115; experimentální 374,2119.

5.2.2 *N*-(4-(allyloxy)fenethyl)-*N*-(3-benzyloxy)benzyl)allylamin (FC012-2)

Výtěžek: 22,5 mg (51,09 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49–7.43 (m, 2H), 7.42–7.38 (m, 2H), 7.36–7.32 (m, 1H), 7.25–7.20 (m, 1H), 7.12–7.05 (m, 2H), 7.03–7.00 (m, 1H), 6.95–6.90 (m, 1H), 6.90–6.86 (m, 1H), 6.86–6.81 (m, 2H), 6.05 (ddt, $J = 17.5$ Hz, $J = 10.6$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.95–5.84 (m, 1H), 5.41 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 5.28 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.52–4.49 (m,

2H), 3.66 (s, 2H), 3.18 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.79–2.68 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 156.8, 141.1, 137.1, 135.6, 133.4, 132.7, 129.6, 129.1, 128.7, 128.5, 127.9, 127.5, 121.4, 117.5, 115.0, 114.5, 113.5, 69.9, 68.8, 57.9, 56.7, 55.3, 32.5; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 414,2428; experimentální 414,2432.

5.2.3 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-*N*-(3-fenylpropyl)allylamin (FC014-1)

Výtěžek: 20,4 mg (68,64 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.51–7.44 (m, 2H), 7.42–7.38 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 1H), 7.29–7.22 (m, 3H), 7.21–7.15 (m, 3H), 7.08–7.03 (m, 1H), 6.98–6.92 (m, 1H), 6.92–6.86 (m, 1H), 5.89 (ddt, $J = 17.3$, $J = 10.0$, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.19 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.11 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.67–2.60 (m, 2H), 2.56–2.49 (m, 2H), 1.88–1.79 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 142.5, 137.2, 135.8, 129.1, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9, 127.5, 125.6, 121.5, 117.3, 117.2, 115.2, 113.3, 69.9, 58.0, 56.7, 53.0, 33.6, 28.9; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 372,2322; experimentální 372,2328.

5.2.4 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-*N*-fenethylallylamin (FC015-1)

Výtěžek: 18,6 mg (66,62 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.46–7.42 (m, 2H), 7.40–7.36 (m, 2H), 7.33–7.30 (m, 1H), 7.28–7.23 (m, 2H), 7.22–7.12 (m, 4H), 7.01–6.97 (m, 1H), 6.92–6.88 (m, 1H), 6.87–6.84 (m, 1H), 5.87 (ddt, $J = 16.9$, $J = 10.2$, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.19 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.64 (s, 2H), 3.16 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.82–2.70 (m, 4H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 141.2, 140.6, 137.2, 135.7, 129.1, 128.8, 128.5, 128.2, 127.9, 127.5, 125.8, 121.4, 117.3, 115.0, 113.5, 69.9, 58.0, 56.7, 55.1, 33.4; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 358,2165; experimentální 358,2169.

5.2.5 *N*-benzyl-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)allylamin (FC019-1)

Výtěžek: 15,9 mg (65,68 %); žlutá olejovitá látka; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.49–7.45 (m, 2H), 7.44–7.30 (m, 7H), 7.27–7.23 (m, 2H), 7.10–7.05 (m, 1H), 7.01–6.95 (m, 1H), 6.90–6.84 (m, 1H), 5.92 (ddt, $J = 16.9$, $J = 10.0$, $J = 6.2$ Hz, 1H), 5.23 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.08 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 158.9, 141.4, 139.6, 137.2, 135.9, 129.1, 128.7, 128.6, 128.2, 127.9, 127.5, 126.8, 121.3, 117.3, 115.1, 113.2, 69.9, 57.7, 57.7, 56.3; ESI-HRMS m/z pro $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: teoretická 344,2009; experimentální 344,2013.

5.3 Příprava látek FC014-2, FC015-2, FC019-2

Příslušná výchozí látka (23,5 mg FC014, 28,5 mg FC015 a 23,6 mg FC019) byla rozpuštěna ve 3 ml suchého CH₃CN. Následně byl přidán K₂CO₃ (2 ekv.) a katalyzátor KI, po 30 minutách byl přidán propylbromid (2 ekv.). Celá reakční směs se nechala míchat 48 hodin v argonové atmosféře v olejové lázni při teplotě 70 °C. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a separována pomocí TLC (CH_x:DEA v poměru 9:0,5). Charakterizace těchto látek pomocí NMR a HRMS je uvedena níže.

5.3.1 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-3-fenyl-*N*-propylpropan-1-amin (FC014-2)

Výtěžek: 25,1 mg (94,68 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.46–7.43 (m, 2H), 7.40–7.36 (m, 2H), 7.33–7.30 (m, 1H), 7.28–7.24 (m, 2H), 7.24–7.20 (m, 1H), 7.19–7.14 (m, 3H), 7.06–7.02 (m, 1H), 6.96–6.91 (m, 1H), 6.89–6.84 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.64–2.58 (m, 2H), 2.51–2.46 (m, 2H), 2.42–2.37 (m, 2H), 1.83–1.75 (m, 2H), 1.52–1.43 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 158.8, 142.5, 137.2, 129.1, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9, 127.5, 125.6, 121.4, 115.1, 113.3, 69.9, 58.6, 55.8, 53.4, 33.6, 28.9, 20.1, 11.9; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₆H₃₁NO [M+H]⁺: teoretická 374,2478; experimentální 374,2483.

5.3.2 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-*N*-fenethylpropan-1-amin (FC015-2)

Výtěžek: 22,4 mg (25,33 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.48–7.44 (m, 2H), 7.43–7.39 (m, 2H), 7.36–7.32 (m, 1H), 7.30–7.26 (m, 2H), 7.25–7.15 (m, 4H), 7.05–7.00 (m, 1H), 6.96–6.90 (m, 1H), 6.90–6.86 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 2.84–2.70 (m, 4H), 2.52 – 2.46 (m, 2H), 1.57–1.46 (m, 2H), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 158.9, 137.2, 129.0, 128.8, 128.5, 128.2, 127.9, 127.5, 125.8, 121.3, 114.9, 113.4, 69.9, 58.5, 55.8, 55.6, 33.5, 20.2, 11.9; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₅H₂₉NO [M+H]⁺: teoretická 360,2322; experimentální 360,2326.

5.3.3 *N*-benzyl-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)propan-1-amin (FC019-2)

Výtěžek: 27,2 mg (101,19 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.49–7.45 (m, 2H), 7.44–7.37 (m, 3H), 7.36–7.29 (m, 3H), 7.29–7.20 (m, 3H), 7.12–7.08 (m, 1H), 7.01–6.96 (m, 1H), 6.90–6.85 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.76–3.49 (m, 4H), 2.42 (s, 2H), 1.57 (s, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) vzhledem k obtížné rozpustnosti a možné přítomnosti nečistot je látka podrobena opětovnému měření; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₄H₂₇NO [M+H]⁺: teoretická 346,2165; experimentální 346,2173.

5.4 Příprava látek FC014-3, FC015-3, FC019-3

Příslušná výchozí látka (30,0 mg FC014, 31,3 mg FC015 a 25,3 mg FC019) byla rozpuštěna ve 3 ml suchého CH₃CN. Následně byl přidán K₂CO₃ (2 ekv.) a po 30 minutách ethyljodid (2 ekv.). Reakční směs se nechala míchat 24 hodin v argonové atmosféře v olejové lázni při teplotě 70 °C. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a separována pomocí TLC (cHx:DEA v poměru 9:0,5). Charakterizace těchto látek pomocí NMR a HRMS je uvedena níže.

5.4.1 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-*N*-ethyl-3-fenylpropan-1-amin (FC014-3)

Výtěžek: 20,4 mg (62,69 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.47–7.43 (m, 2H), 7.40–7.36 (m, 2H), 7.34–7.29 (m, 1H), 7.28–7.24 (m, 2H), 7.23–7.20 (m, 1H), 7.18–7.15 (m, 3H), 7.05–7.02 (m, 1H), 6.96–6.91 (m, 1H), 6.89–6.84 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.65–2.59 (m, 2H), 2.56–2.47 (m, 4H), 1.85–1.77 (m, 2H), 1.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 158.9, 142.5, 137.2, 129.1, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.5, 125.6, 121.5, 115.2, 113.2, 69.9, 58.0, 52.7, 47.3, 33.6, 28.8, 11.7; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₅H₂₉NO [M+H]⁺: teoretická 360,2322; experimentální 360,2321.

5.4.2 *N*-(3-(benzyloxy)benzyl)-*N*-ethyl-2-fenylethan-1-amin (FC015-3)

Výtěžek: 25,0 mg (73,40 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.48–7.43 (m, 2H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.34–7.30 (m, 1H), 7.29–7.25 (m, 2H), 7.23–7.14 (m, 4H), 7.04–7.00 (m, 1H), 6.95–6.90 (m, 1H), 6.88–6.87 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.83–2.72 (m, 4H), 2.65–2.59 (m, 2H), 1.07 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 158.9, 140.6, 137.2, 129.1, 128.8, 128.5, 128.3, 127.9, 127.5, 125.9, 121.4, 115.1, 113.5, 69.9, 57.9, 54.9, 47.3, 33.4, 11.7; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₄H₂₇NO [M+H]⁺: teoretická 346,2165; experimentální 346,2171.

5.4.3 *N*-benzyl-*N*-(3-(benzyloxy)benzyl)ethanamin (FC019-3)

Výtěžek: 22,0 mg (79,59 %); žlutá olejovitá látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.50–7.45 (m, 2H), 7.44–7.30 (m, 7H), 7.29–7.21 (m, 2H), 7.11–7.07 (m, 1H), 7.02–6.97 (m, 1H), 6.91–6.85 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.58–2.49 (m, 2H), 1.09 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 158.8, 141.6, 139.7, 137.1, 129.1, 128.7, 128.5, 128.1, 127.9, 127.5, 126.8, 121.3, 115.1, 113.2, 69.9, 57.7, 57.6, 47.1, 11.8; ESI-HRMS *m/z* pro C₂₃H₂₅NO [M+H]⁺: teoretická 332,2009; experimentální 332,2014.

5.5 Inhibice acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a schopnost přestupu přes hematoencefalickou bariéru

Ke zhodnocení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE byla použita modifikovaná Ellmanova metoda [72], látky byly testovány při koncentraci 10 μM . Hodnota BBB skóre byla vypočtena dle metody z roku 2019. Dle této metody se předpokládá, že látky s hodnotou vyšší než 4,0 mají schopnost prostupovat přes HEB [74]. Získané výsledky shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty inhibiční aktivity připravených látek vůči cholinesterázám, BBB skóre

Látka	<i>h</i> AChE (% inh.)	<i>h</i> AChE IC ₅₀ (μM)	<i>h</i> BuChE (% inh.)	<i>h</i> BuChE IC ₅₀ (μM)	SI pro <i>h</i> BuChE	BBB skóre
FC012	0	>10	96,38 \pm 0,79	0,193 \pm 0,06	>51,81	4,89
FC012-1	0	>10	91,51 \pm 0,46	0,600 \pm 0,08	>16,67	5,06
FC012-2	24,77 \pm 0,83	>10	46,31 \pm 1,73	>10	>1	4,98
FC013	0	>10	94,09 \pm 0,35	0,353 \pm 0,10	>28,33	5,15
FC014	0	>10	89,38 \pm 1,84	0,545 \pm 0,06	>18,35	5,25
FC014-1	12,50 \pm 0,29	>10	76,02 \pm 1,74	1,19 \pm 0,28	>8,4	4,97
FC014-2	17,36 \pm 0,25	>10	88,83 \pm 0,78	0,538 \pm 0,03	>18,59	4,94
FC014-3	11,11 \pm 0,09	>10	93,97 \pm 0,57	0,576 \pm 0,05	>17,36	5,00
FC015	2,52 \pm 0,12	>10	91,03 \pm 0,88	0,637 \pm 0,07	>15,70	5,29
FC015-1	10,06 \pm 0,31	>10	59,51 \pm 0,39	7,66 \pm 1,72	>1,31	5,02
FC015-2	13,51 \pm 0,20	>10	80,88 \pm 0,79	0,685 \pm 0,12	>14,60	4,99
FC015-3	2,71 \pm 0,10	>10	90,68 \pm 0,37	0,416 \pm 0,11	>24,04	5,05
FC017	0	>10	73,12 \pm 0,59	4,84 \pm 0,21	>2,07	5,14
FC018	0	>10	77,57 \pm 0,41	2,72 \pm 0,22	>3,68	5,15
FC019	0	>10	92,32 \pm 0,27	0,465 \pm 0,05	>21,51	5,32
FC019-1	20,67 \pm 0,49	>10	36,35 \pm 0,78	>10	>1	5,05
FC019-2	0	>10	46,31 \pm 1,73	>10	>1	5,07
FC019-3	0	>10	88,24 \pm 1,05	0,464 \pm 0,11	>21,55	5,11
FC020	0	>10	96,31 \pm 0,26	0,188 \pm 0,02	>53,19	5,25
FC021	0	>10	48,72 \pm 1,42	>10	>1	4,89
FC022	10,42 \pm 1,00	>10	7,53 \pm 0,41	>10	>1	4,83
galanthamin	81,8 \pm 1,1	2,0 \pm 0,1	40,2 \pm 1,2	>10	0,07	5,01
eserin	99,8 \pm 0,6	0,20 \pm 0,01	99,9 \pm 0,5	0,30 \pm 0,01	0,67	5,02

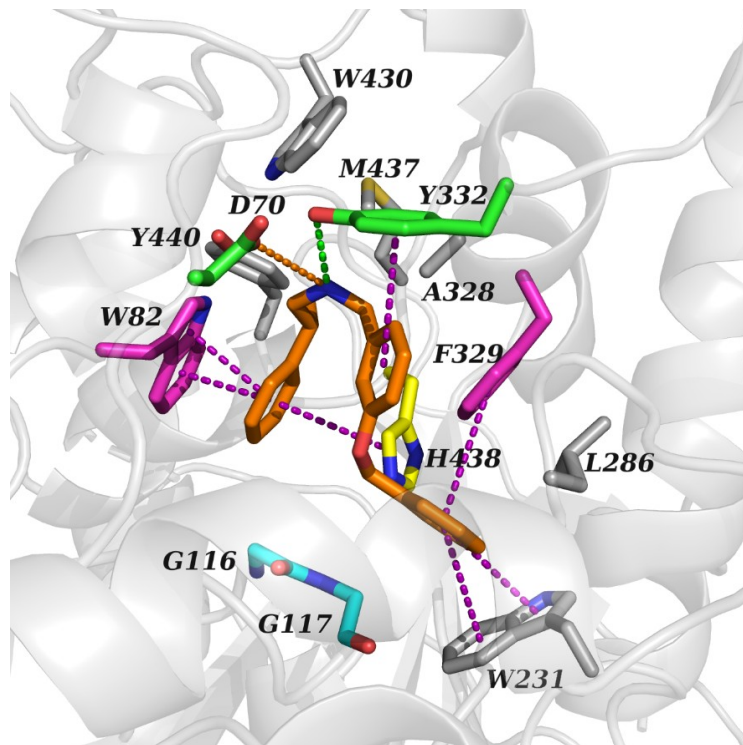
5.6 Cytotoxicita

Tabulka 4 Cytotoxicita vůči neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y a hepatocelulární nádorové linii HepG2

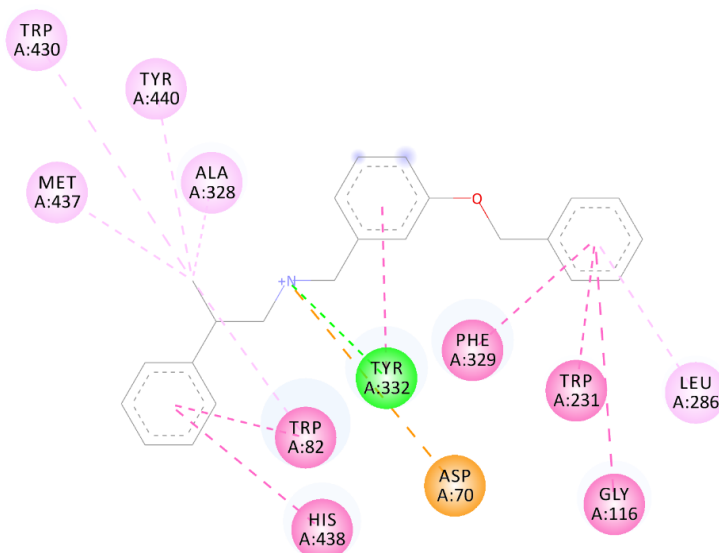
Látka	SH-SY5Y		HepG2	
	IC ₅₀ [μM]	SD [μM]	viabilita při koncentraci 10 μM	SD [μM]
FC012	20,95	2,35	60,09	4,02
FC013	15,59	2,77	51,64	9,63
FC020	36,10	1,42	54,61	6,91

5.7 Dockingová studie FC020

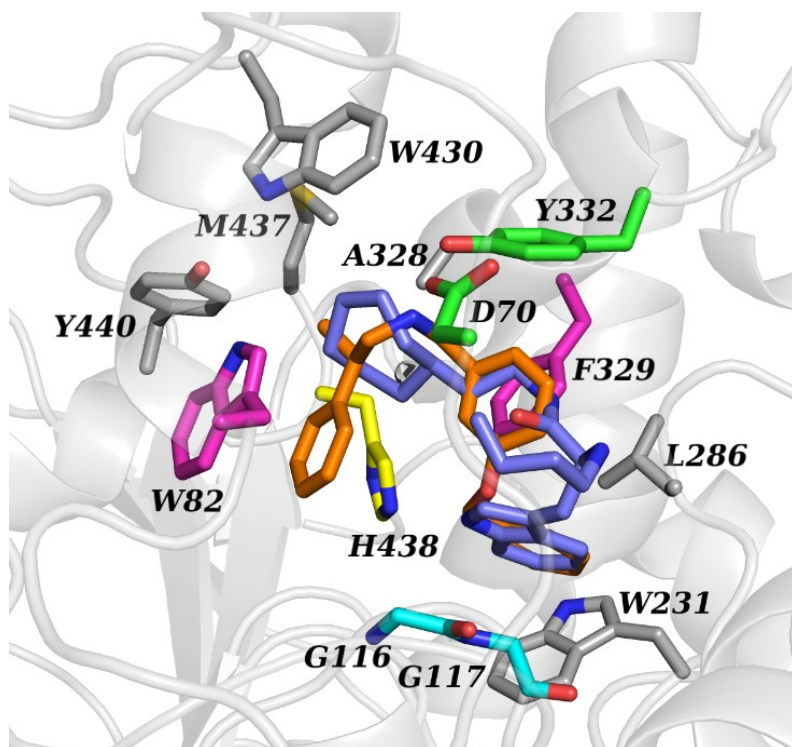
Dockingová studie látky FC020 v aktivním místě enzymu *h*BuChE odhalila několik významných interakcí zodpovědných za vysokou aktivitu (Obrázek 13, 14). Jedna z hlavních interakcí se odehrává na periferní anionické části aktivního místa, kde je iontová vazba mezi protonovaným dusíkem sekundárního aminu FC020 a karboxylovou skupinou postranního řetězce D70. Stejný dusík ligandu může tvořit vodíkovou vazbu s hydroxyskupinou postranního řetězce Y332. Aromatický kruh Y332 rovněž interaguje s prostředním aromatickým jádrem ligandu FC020 π - π interakcí tvaru „T“. Na anionickém místě kavity interaguje ligand s postranním řetězcem W82 sendvičovou π - π interakcí. Stejně jako v případě původního ligandu z 6QAA [76], benzylová část FC020 interaguje „T“ π - π interakcí s F329 a W231 (viz překryv obou ligandů na Obrázek 15). Benzylová část FC020 je dále v aktivním místě enzymu ukotvena hydrofobními interakcemi s G116 a L286 (Obrázek 14). Z katalytické triády interaguje s ligandem FC020 pouze H438 paralelně posunutou π - π interakcí, ostatní AMK katalytické triády S198 a E325 stojí mimo (v obrázcích nezobrazeny). Tato fenylová část ligandu by mohla být místem pro elektrofilně substituční obměny s cílem umožnění dalších interakcí s katalytickou triádou a zvýšením aktivity. Methylová skupina FC020 rovněž okupuje hydrofobní část aktivního místa enzymu tvořenou M437, W430, A328, W82 a Y440.



Obrázek 13 Nejpravděpodobnější pozice derivátu FC020 v aktivním místě *h*BuChE (PDB ID: 6QAA). Ligand je zobrazen oranžově; důležité zbytky aminokyselin zodpovědné za ukotvení ligandů jsou zobrazeny: žlutě aminokyseliny katalytické triády, růžově anionického místa, zeleně periferního anionického místa, modře oxyanionové prolákliny, šedě ostatní aminokyseliny. Hlavní interakce aminokyselin s ligandem jsou vykresleny přerušovanými linkami: růžově jsou znázorněny π - π interakce, oranžově iontová vazba a zeleně vodíková vazba. Zbytek receptoru je zobrazen ve světle šedé kreslené konformaci. Obrázek byl vytvořen programem The PyMOL Molecular Graphics System v. 2.5.0, Schrödinger, LLC.



Obrázek 14 2D reprezentace interakcí ligandu FC020 s *h*BuChE v aktivním místě enzymu. Světle růžově přerušovanými čarami jsou zobrazeny hydrofobní interakce, tmavě růžově π - π interakce, zeleně vodíkové vazby a oranžově iontové interakce. Diagram byl vygenerovaný programem Discovery Studio Visualiser v. 4.5, BIOVIA, San Diego.

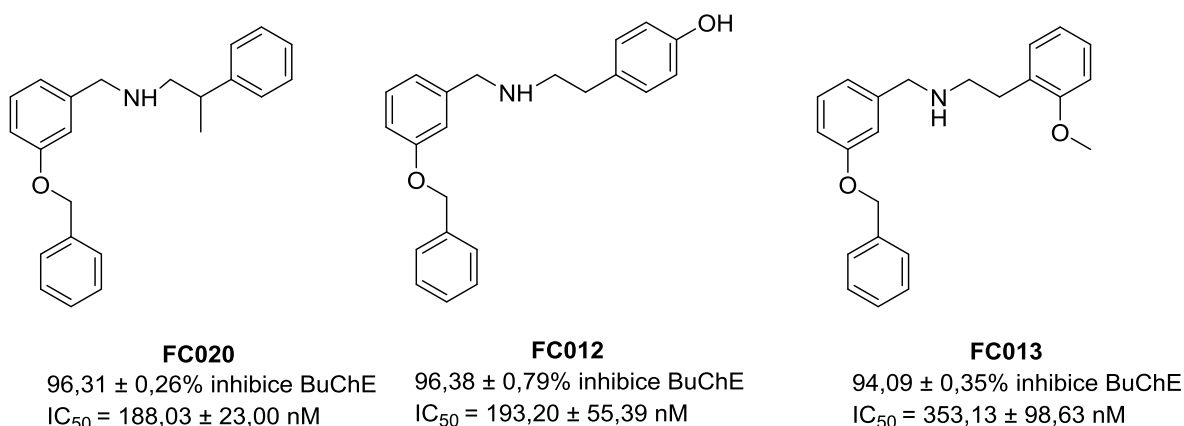


Obrázek 15 Překryv nejlepší dockované pozice FC020 (oranžově) a původního ligandu z krystalické X-ray struktury PDB ID: 6QAA [76] (tmavě modře). Žlutě jsou znázorněny aminokyseliny katalytické triády, růžově anionického místa, zeleně periferního anionického místa, modře oxyanionové prolákliny, šedě ostatní AMK. Obrázek byl vytvořen programem The PyMOL Molecular Graphics System v. 2.5.0, Schrödinger, LLC.

6. Diskuze a závěr

Skupina ADINACO fungující na katedře Farmkognozie a farmaceutické botaniky v Hradci Králové se dlouhodobě věnuje výzkumu Amaryllidaceae alkaloidů a zabývá se také přípravou jejich polosyntetických derivátů [8–10, 22, 46, 47, 51, 63–66, 72]. Tato diplomová práce navazuje na studii z roku 2021, v rámci které je popsána příprava pilotní série 20 látek strukturně inspirovaných norbelladinovým, resp. karltoninovým typem AAs, které vykazovaly selektivní inhibiční aktivitu vůči *h*BuChE [72]. Existují studie, které poukazují na skutečnost, že použití selektivních inhibitorů BuChE v pozdějších stádiích AD by mohlo být přínosnější, než použití selektivních inhibitorů AChE. Kromě zlepšení kognitivních funkcí vlivem zvýšených hladin ACh v mozku by také nemělo docházet k výskytu nežádoucích účinků spojených s ovlivněním parasymptiku při inhibici AChE [69, 70].

V této diplomové práci se oproti původné studii vycházelo z jiného aldehydu (3-(benzyloxy)benzaldehyd), bylo použito více druhů aminů a kromě allyl-derivátů byly připraveny také propyl- a ethyl-deriváty za účelem získání rozmanitějšího spektra látek, což by mělo napomoci k optimalizaci farmakoforu. Bylo připraveno 21 látek, přičemž více než polovina z nich vykazovala vysoce selektivní (nad 80%) a silnou inhibiční aktivitu (hodnoty IC_{50} nižší než 1 μ M) vůči *h*BuChE. Inhibiční účinek vůči *h*AChE se u připravených látek vůbec nevyskytoval, případně byl zanedbatelný. Nejlepší inhibiční aktivitu vůči *h*BuChE v nanomolárních koncentracích vykazovaly látky **FC020** ($IC_{50} = 188,03 \pm 23$ nM), **FC012** ($IC_{50} = 193,2 \pm 55,39$ nM) a **FC013** ($IC_{50} = 353,13 \pm 98,63$ nM), které pro shrnutí zobrazuje Obrázek 16.



Obrázek 16 Struktury nejaktivnějších připravených látek

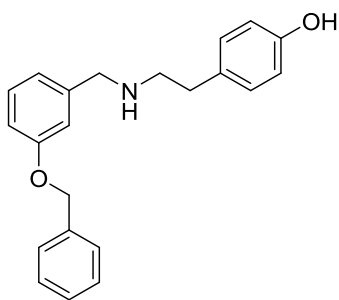
Z pohledu hodnocení vztahu struktura-účinek lze připravené deriváty rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou látky **FC012**, **FC014** (Obrázek 10), **FC015** a **FC019** (Obrázek 11) včetně jejich derivátů. V této skupině lze sledovat vliv rozdílné substituce a zároveň také vliv délky spojovacího řetězce pocházející z molekuly aminu. Z uvedené skupiny bylo nejlepších výsledků dosaženo u látky **FC012**, disponující dvouuhlíkatým spojovacím řetězcem pocházejícím z tyraminu a volnou hydroxylovou skupinou, která může mít pravděpodobně značný vliv na aktivitu. Mezi látkami **FC014**, **FC015** a **FC019** byly získány nejlepší výsledky pro látku **FC019**, která ve své molekule obsahuje jednouhlíkatý spojovací řetězec pocházející z benzylaminu, zatímco nejnižší inhibiční aktivita byla zjištěna u látky **FC014**, která ve své struktuře obsahuje tříuhlíkatý spojovací řetězec, pocházející z 3-fenyl-1-propylaminu. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že čím je řetězec kratší, tím je látka aktivnější. Substitucí látek **FC012**, **FC014**, **FC015** a **FC019** allylem a propylem nedošlo k významnému zvýšení aktivity, ba naopak se aktivita snížila. Substituce ethylem vedla k podobné aktivitě jako u výchozích derivátů, mírné zlepšení nastalo pouze u látky **FC015-3**. Příprava derivátů bohužel nevedla k získání aktivnějších látek, aktivita klesala v řadě ethyl > propyl > allyl.

Druhou skupinou látek jsou **FC013** (Obrázek 10), **FC017**, **FC018** a **FC021** (Obrázek 12). Jedná se o látky vycházející z aromatických aminů, jejichž jádro je substituováno jednou (**FC013**, **FC017**, **FC018**) nebo dvěma methoxyskupinami (**FC021**). Nejaktivnější byla látka **FC013**, u které se methoxyskupina nachází v poloze *ortho*. Aktivita následně klesá u methoxyskupiny v poloze *meta* (**FC018**), **FC017** s methoxyskupinou v poloze *para* má aktivitu nejnižší. **FC021**, v jejíž molekule se nachází dvě methoxyskupiny v polohách *ortho* a *meta*, nevykazovala vůči *hBuChE* významnou aktivitu.

Zbývající dvě látky nelze strukturně přiřadit ani k jedné z uvedených skupin. Látka **FC020** (Obrázek 12), která je zároveň nejaktivnější získanou látkou, má substituovaný spojovací řetězec v poloze β . Látka **FC022** (Obrázek 12), která vychází z 3-chloranilinu, nevykázala významnou inhibiční aktivitu vůči *hBuChE*. Dle získaných poznatků lze tedy předpokládat, že optimální spojovací řetězec je tvořen dvěma uhlíky, přičemž dusík je stericky chráněn buď v podobě menšího substituentu v poloze β spojovacího řetězce, nebo alespoň substitucí aromatického kruhu v poloze *ortho*. Volná aromatická hydroxyskupina v aminové části molekuly má také pravděpodobně určitý vliv na aktivitu. Zajímavá by mohla

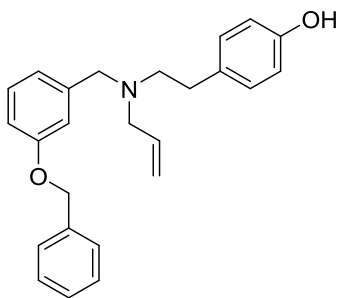
být syntéza látky podobné FC012, akorát s rozvětvením v poloze β spojovacího řetězce jako u látky FC020. Je možné předpokládat, že by tato látka mohla disponovat ještě vyšší *h*BuChE inhibiční aktivitou.

Ve výchozí studii vypracované skupinou ADINACO v roce 2021 [72] byly připraveny sloučeniny, které se od některých látek syntetizovaných v rámci této diplomové práce liší pouze přítomností methoxyskupiny v části molekuly pocházející z aldehydu (Obrázek 17, 18). Ačkoliv se na první pohled jedná pouze o malou změnu, má evidentně zcela zásadní vliv na inhibiční aktivitu vůči BuChE. Zatímco po allylaci látky **FC012** došlo u **FC012-1** a **FC012-2** ke snížení až vymizení *h*BuChE inhibiční aktivity, po allylaci látky **2** došlo naopak u látek **4** a **6** k postupnému zvyšování inhibiční aktivity vůči BuChE (číslování látek vycházejících z *O*-benzylisovanilinu je zachováno tak, jak je uvedeno ve výchozí práci [72]). U látky **FC015-1** lze opět pozorovat trend klesající aktivity po allylaci, ale v rámci předchozí studie u látky **10**, připravené allylací látky **8** (Obrázek 18), *h*BuChE aktivita zůstala prakticky stejná. Při porovnání látky **FC017** a látky **12** je zcela evidentní, že je přítomnost methoxyskupiny v molekule látky **12** spojena s přibližně 4x vyšší aktivitou. Vzhledem k uvedeným skutečnostem je zřejmé, že nelze zcela jistě předpovídat, jakou aktivitu budou mít připravené deriváty a kterým směrem se bude vyvíjet aktivita s měnící se substitucí v původní struktuře. Na základě porovnání výsledků z předložené diplomové práce a předchozí studie se jako vhodnější základní struktura pro další optimalizaci jeví sloučeniny vycházející z *O*-benzylisovanilinu.



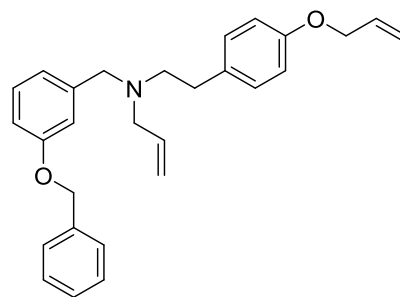
FC012

96,38 ± 0,79 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 193 \pm 60$ nM



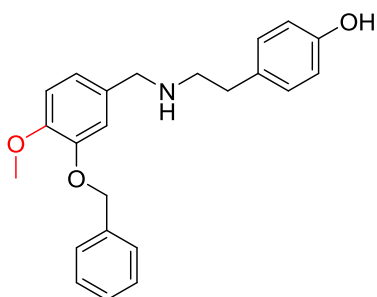
FC012-1

91,51 ± 0,46 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 600 \pm 80$ nM



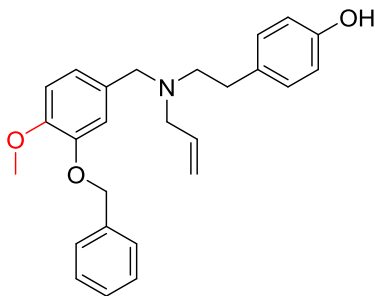
FC012-2

46,31 ± 1,73 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = >10000$ nM



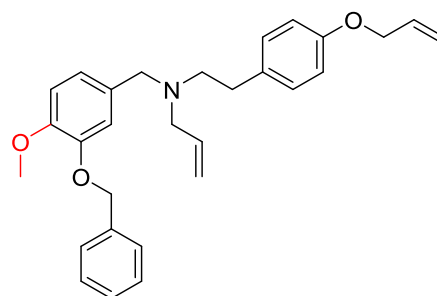
2

97,7 ± 0,5 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 290 \pm 20$ nM



4

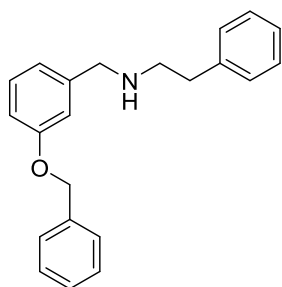
97,9 ± 0,6 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 250 \pm 10$ nM



6

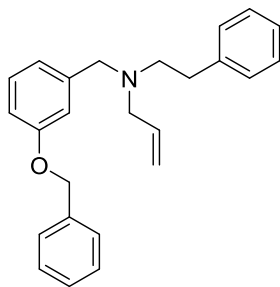
98,6 ± 0,9 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 70 \pm 10$ nM

Obrázek 17 Porovnání struktury a IC_{50} u látek FC012, FC012-1, FC012-2 a látek 2, 4 a 6 z pilotní série z roku 2021 [72]



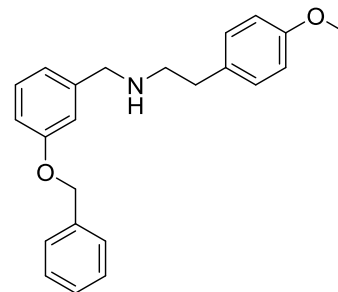
FC015

91,03 ± 0,88 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 640 \pm 70$ nM



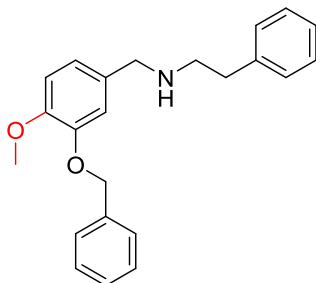
FC015-1

59,51 ± 0,39 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 7660 \pm 1720$ nM



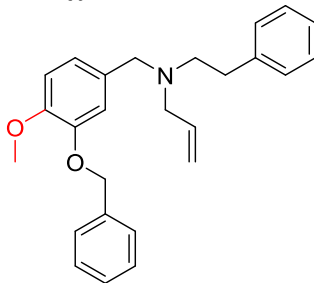
FC017

73,12 ± 0,59 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 4840 \pm 210$ nM



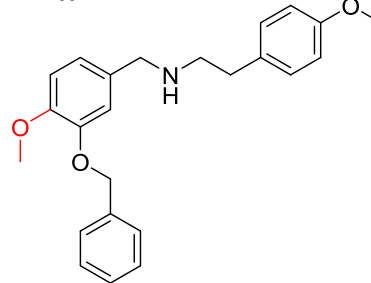
8

96,6 ± 0,4 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 1100 \pm 50$ nM



10

92,0 ± 2,4 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 1170 \pm 40$ nM



12

94,6 ± 0,6 % inhibice BuChE
 $IC_{50} = 1120 \pm 110$ nM

Obrázek 18 Porovnání struktury a IC_{50} u látek FC015, FC015-1, FC017 a látek 8, 10 a 12 z pilotní série z roku 2021 [72]

Tři nejaktivnější látky byly podrobeny testům cytotoxicity vůči neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y a hepatocelulární buněčné linii HepG2, ze kterých vyplynulo, že látky nejsou v účinných koncentracích cytotoxické. Hodnoty IC_{50} byly u všech testovaných látek vyšší než 10 μ M (Tabulka 4).

Při vývoji léčiv potenciálně využitelných v terapii AD je důležité, aby byly tyto látky schopné pronikat přes HEB do mozku a zde působit. Proto byla u všech připravených látek spočítána jejich teoretická dostupnost v CNS pomocí tzv. BBB skóre, které vyjadřuje schopnost látky procházet přes HEB. U všech připravených látek byla vypočtená hodnota vyšší než 4,0, z čehož lze usuzovat, že připravené sloučeniny by měly být schopné přestupu přes HEB [72].

Za účelem identifikace interakcí důležitých pro *h*BuChE inhibiční potenciál byla provedena dockingová studie látky FC020. Ze studie vyplynulo, že by bylo výhodné pro zvýšení aktivity provést elektrofilní substituci na aromatickém jádře v aldehydické části molekuly, aby došlo ke zvýšení počtu interakcí s katalytickou triádou v kavitě enzymu *h*BuChE, kde tato látka interaguje pouze s histidinem (H438).

Tato diplomová práce, v rámci které bylo připraveno několik vysoce selektivních a vysoce účinných inhibitorů BuChE, rozšířila dosavadní poznatky o optimální struktuře norbelladinových derivátů a nastínila tím směr, kterým by se mohla další syntéza derivátů norbelladinového, resp. karltoninového strukturního typu ubírat za účelem přípravy látek potenciálně využitelných v terapii neurodegenerativních chorob.

7. Seznam použitých zkratk

AA	Amaryllidaceae alkaloid
AAs	Amaryllidaceae alkaloidy
AD	Alzheimerova nemoc
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEi	inhibitor acetylcholinesterázy
AMK	aminokyselina
BBB	hematoencefalická bariéra
BuChE	butyrylcholinesteráza
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
cHx	cyklohexan
CNS	centrální nervová soustava
cv.	kultivar
DEA	diethylamin
ekv.	ekvivalent
ESI-HRMS	elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie
FDA	Food and Drug Administration
HEB	hematoencefalická bariéra
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
N4'OMT	norbelladin 4'-O-methyltransferáza
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	fenylalanin ammonium-lyáza
POP	prolyl oligopeptidáza
RNA	ribonukleová kyselina
rt	pokožová teplota
SD	směrodatná odchylka
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan
To	toluen
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
VpVAN	vanilin syntáza

8. Literatura

- [1] ŠANTIĆ, Žarko, Nikolina PRAVDIĆ, Milenko BEVANDA a Kristina GALIĆ. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatria Danubina*. 2017, **29**(Suppl 4), 787–792.
- [2] PETROVSKA, BiljanaBauer. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. 2012, **6**(11), 1. ISSN 0973-7847.
- [3] CRAGG, Gordon M. a David J. NEWMAN. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, **1830**(6), 3670–3695. ISSN 03044165.
- [4] NEWMAN, David J. a Gordon M. CRAGG. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 2016, **79**(3), 629–661. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
- [5] OPLETAL, Lubomír. Prolegomenon české farmakognozie: 21. století. *Česká a Slovenská Farmacie*. 2013, **62**, 99–102.
- [6] DESGAGNÉ-PENIX, Isabel. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2021, **20**(2), 409–431. ISSN 1568-7767, 1572-980X.
- [7] SINGH, Aparna a Isabel DESGAGNÉ-PENIX. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*. 2014, **1**(3), 114–120. ISSN 23481900.
- [8] AL MAMUN, Abdullah, Jana MAŘÍKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Jiří JANOUŠEK, Marcela ŠAFRATOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Tomáš KUČERA, Martina HRABINOVÁ, Jiří KUNEŠ, Jan KORÁBEČNÝ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules*. 2020, **10**(5), 800. ISSN 2218-273X.
- [9] KOHELOVÁ, Eliška, Jana MAŘÍKOVÁ, Jan KORÁBEČNÝ, Daniela HULCOVÁ, Tomáš KUČERA, Daniel JUN, Jakub CHLEBEK, Jaroslav JENČO, Marcela ŠAFRATOVÁ, Martina HRABINOVÁ, Aneta RITOMSKÁ, Milan MALANÍK, Rozálie PEŘINOVÁ, Kateřina BREITEROVÁ, Jiří KUNEŠ, Lucie NOVÁKOVÁ, Lubomír OPLETAL a Lucie CAHLÍKOVÁ. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chemistry*. 2021, **107**, 104567. ISSN 00452068.
- [10] MAŘÍKOVÁ, Jana, Abdullah Al MAMUN, Latifah Al SHAMMARI, Jan KORÁBEČNÝ, Tomáš KUČERA, Daniela HULCOVÁ, Jiří KUNEŠ, Milan MALANÍK, Michaela VAŠKOVÁ, Eliška KOHELOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Lucie CAHLÍKOVÁ a Milan POUR. Structure Elucidation and Cholinesterase Inhibition Activity of Two New Minor Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*. 2021, **26**(5), 1279. ISSN 1420-3049.
- [11] HIRASAWA, Yusuke, Tomoko TANAKA, Shiro HIRASAWA, Chin Piow WONG, Nahoko UCHIYAMA, Toshio KANEDA, Yukihiro GODA a Hiroshi MORITA. Cliniatines A–C, new

- Amaryllidaceae alkaloids from *Clivia miniata*, inhibiting Acetylcholinesterase. *Journal of Natural Medicines*. 2022, **76**(1), 171–177. ISSN 1340-3443, 1861-0293.
- [12] BASTIDA ARMENGOL, Jaume. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: Diego MUÑOZ-TORRERO, ed. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2011, Chapter 3, s. 65–100.
- [13] JIN, Zhong a Guangmin YAO. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*. 2019, **36**(10), 1462–1488. ISSN 0265-0568, 1460-4752.
- [14] SPILKOVÁ, Jiřina, Jan MARTIN a Tomáš SIATKA. Farmakognozie. 2016. ISBN 978-80-246-3294-0.
- [15] NAIR, Jerald J. a Johannes VAN STADEN. The Amaryllidaceae, a chemically and biologically privileged plant family. *South African Journal of Botany*. 2021, **136**, 1–6. ISSN 02546299.
- [16] OPLETAL, Lubomír. *Daidalea - Univerzita Karlova* [online]. 13. říjen 2021. Dostupné z: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantFamily.asp?id=2>
- [17] BERKOV, Strahil, Edison OSORIO, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. In: *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-01-12], s. 113–185. ISBN 978-0-12-820981-3.
- [18] JIN, Zhong. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Product Reports*. 2005, **22**(1), 111. ISSN 0265-0568, 1460-4752.
- [19] NAIR, Jerald J., Anke WILHELM, Susanna L. BONNET a Johannes VAN STADEN. Antibacterial constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017, **27**(22), 4943–4951. ISSN 0960894X.
- [20] PEARSON, Vincent E. Galantamine: A New Alzheimer Drug with a Past Life. *Annals of Pharmacotherapy*. 2001, **35**(11), 1406–1413. ISSN 1060-0280, 1542-6270.
- [21] JANSSEN, Bernd a Bernd SCHÄFER. Galantamine. *ChemTexts*. 2017, **3**(2), 7. ISSN 2199-3793.
- [22] CAHLÍKOVÁ, Lucie, Rudolf VRABEC, Filip PIDANÝ, Rozálie PEŘINOVÁ, Negar MAAFI, Abdullah Al MAMUN, Aneta RITOMSKÁ, Viriyanata WIJAYA a Gerald BLUNDEN. Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and Further Isoquinoline Alkaloids in Connection with Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2021, **26**(17), 5240. ISSN 1420-3049.
- [23] LILIENFELD, Sean. Galantamine - a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews*. 2006, **8**(2), 159–176. ISSN 1080563X.
- [24] MAAFI, Negar, Abdullah Al MAMUN, Ondřej JANĎOUREK, Jana MAŘÍKOVÁ, Kateřina BREITEROVÁ, Adéla DIEPOLTOVÁ, Klára KONEČNÁ, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Jiří KUNEŠ, Eliška KOHELOVÁ, Darja KOUTOVÁ, Marcela ŠAFRATOVÁ, Lucie

- NOVÁKOVÁ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Semisynthetic Derivatives of Selected Amaryllidaceae Alkaloids as a New Class of Antimycobacterial Agents. *Molecules*. 2021, **26**(19), 6023. ISSN 1420-3049.
- [25] CEDRÓN, Juan C., David GUTIÉRREZ, Ninoska FLORES, Ángel G. RAVELO a Ana ESTÉVEZ-BRAUN. Synthesis and antimalarial activity of new haemanthamine-type derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, **20**(18), 5464–5472. ISSN 09680896.
- [26] HAVELEK, Radim, Martina SEIFRTOVA, Karel KRÁLOVEC, Lenka BRUCKOVA, Lucie CAHLIKOVA, Marketa DALECKA, Jirina VAVROVA, Martina REZACOVA, Lubomir OPLETAL a Zuzana BILKOVA. 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. ISSN 09447113.
- [27] DOSKOČIL, Ivo, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Marcela ŠAFRATOVÁ, Nina BENEŠOVÁ, Jaroslav HAVLÍK, Radim HAVELEK, Jiří KUNEŠ, Karel KRÁLOVEC, Jakub CHLEBEK a Lucie CAHLÍKOVÁ. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*. 2015, **13**, 394–398. ISSN 18743900.
- [28] DALECKÁ, Markéta, Radim HAVELEK, Karel KRÁLOVEC, Lenka BRŮČKOVÁ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2013, (107.9), 701–708.
- [29] REIS, Andressa, Kevin MAGNE, Sophie MASSOT, Luciana R. TALLINI, Marina SCOPEL, Jaume BASTIDA, Pascal RATET a José A. S. ZUANAZZI. Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 8471. ISSN 2045-2322.
- [30] KA, Seydou, Manoj KOIRALA, Natacha MÉRINDOL a Isabel DESGAGNÉ-PENIX. Biosynthesis and Biological Activities of Newly Discovered Amaryllidaceae Alkaloids. *Molecules*. 2020, **25**(21), 4901. ISSN 1420-3049.
- [31] LATVALA, A. Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*. 1995, **39**(5), 1229–1240. ISSN 00319422.
- [32] GUO, Ying. Research on the Alkaloids of Amaryllidaceae plants: genera *Lycoris* and *Hippeastrum*. 2015.
- [33] WANG, Yue-Hu, Zhong-Kai ZHANG, Fu-Mei YANG, Qian-Yun SUN, Hong-Ping HE, Ying-Tong DI, Shu-Zhen MU, Yang LU, Ying CHANG, Qi-Tai ZHENG, Ming DING, Jia-Hong DONG a Xiao-Jiang HAO. Benzylphenethylamine Alkaloids from *Hosta plantaginea* with Inhibitory Activity against Tobacco Mosaic Virus and Acetylcholinesterase. *Journal of Natural Products*. 2007, **70**(9), 1458–1461. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
- [34] ŘEZANKA, Tomáš, Pavel ŘEZANKA a Karel SIGLER. Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from *Narcissus* having axial chirality. *Phytochemistry*. 2010, **71**(2–3), 301–306. ISSN 00319422.

- [35] VELTEN, Robert, Christoph ERDELEN, Matthias GEHLING, Axel GÖHRT, Daniel GONDOL, Jürgen LENZ, Oswald LOCKHOFF, Ulrike WACHENDORFF a Detlef WENDISCH. Cripowellin A and B, a novel type of amaryllidaceae alkaloid from *Crinum powellii*. *Tetrahedron Letters*. 1998, **39**(13), 1737–1740. ISSN 00404039.
- [36] PRESLEY, Christopher C., Priscilla KRAI, Seema DALAL, Qingxi SU, Maria CASSERA, Michael GOETZ a David G.I. KINGSTON. New potently bioactive alkaloids from *Crinum erubescens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016, **24**(21), 5418–5422. ISSN 09680896.
- [37] ÜNVER, Nehir, Tekant GÖZLER, Nadja WALCH, Belkis GÖZLER a Manfred HESSE. Two novel dinitrogenous alkaloids from *Galanthus plicatus* subsp. *byzantinus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry*. 1999, **50**(7), 1255–1261. ISSN 00319422.
- [38] DE ANDRADE, Jean Paulo, Natalia Belén PIGNI, Laura TORRAS-CLAVERIA, Strahil BERKOV, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, **70**, 13–25. ISSN 07317085.
- [39] BRINE, Natalie D, William E CAMPBELL, Jaume BASTIDA, Maria R HERRERA, Francesc VILADOMAT, Carles CODINA a Peter J SMITH. A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*. *Phytochemistry*. 2002, **61**(4), 443–447. ISSN 00319422.
- [40] ZHAN, Guanqun, Junfei ZHOU, Rong LIU, Tingting LIU, Guoli GUO, Jianping WANG, Ming XIANG, Yongbo XUE, Zengwei LUO, Yonghui ZHANG a Guangmin YAO. Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and Their Anti-acetylcholinesterase and Anti-inflammatory Activities. *Journal of Natural Products*. 2016, **79**(4), 760–766. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
- [41] LUO, Zengwei, Fuqian WANG, Jinwen ZHANG, Xingyao LI, Mengke ZHANG, Xincan HAO, Yongbo XUE, Yan LI, F. David HORGAN, Guangmin YAO a Yonghui ZHANG. Cytotoxic Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products*. 2012, **75**(12), 2113–2120. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
- [42] KARAKOYUN, Cigdem. Alkaloid profiling in *Galanthus gracilis* Celak. from western Turkey by GC/MS. *Istanbul Journal of Pharmacy*. 2019, **48**(3), 73–75. ISSN 25480731, 25872087.
- [43] UNVER, Nehir. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry Reviews*. 2007, **6**(1), 125–135. ISSN 1568-7767, 1572-980X.
- [44] BOZKURT, B., G. COBAN, G.I. KAYA, M.A. ONUR a N. UNVER-SOMER. Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*. *South African Journal of Botany*. 2017, **113**, 119–127. ISSN 02546299.
- [45] BERKOV, Strahil, Luba EVSTATIEVA a Simeon POPOV. Alkaloids in Bulgarian *Pancreatum maritimum* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2004, **59**(1–2), 65–69. ISSN 1865-7125, 0939-5075.

- [46] ŠAFRATOVÁ, Marcela, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Kateřina BREITEROVÁ, Veronika HRABCOVÁ, Marta MACHADO, Diana FONTINHA, Miguel PRUDÊNCIO, Jiří KUNEŠ, Jakub CHLEBEK, Daniel JUN, Martina HRABINOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Radim HAVELEK, Martina SEIFRTOVÁ, Lubomír OPLETAL a Lucie CAHLÍKOVÁ. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research*. 2018, **41**(2), 208–218. ISSN 0253-6269, 1976-3786.
- [47] HULCOVÁ, Daniela, Jana MAŘÍKOVÁ, Jan KORÁBEČNÝ, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Daniel JUN, Jiří KUNEŠ, Jakub CHLEBEK, Lubomír OPLETAL, Angela DE SIMONE, Lucie NOVÁKOVÁ, Vincenza ANDRISANO, Aleš RŮŽIČKA a Lucie CAHLÍKOVÁ. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry*. 2019, **165**, 112055. ISSN 00319422.
- [48] KORABECNY, Jan a Ondrej SOUKUP. Cholinesterase Research. *Biomolecules*. 2021, **11**(8), 1121. ISSN 2218-273X.
- [49] MASSOULIÉ, Jean, Joel SUSSMAN, Suzanne BON a Israel SILMAN. Chapter 15: Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. In: *Progress in Brain Research*. B.m.: Elsevier, 1993 [vid. 2022-01-12], s. 139–146. ISBN 978-0-444-89717-6.
- [50] DARVESH, Sultan, David A. HOPKINS a Changiz GEULA. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003, **4**(2), 131–138. ISSN 1471-003X, 1471-0048.
- [51] AL SHAMMARI, L., D. HULCOVÁ, J. MAŘÍKOVÁ, T. KUČERA, M. ŠAFRATOVÁ, L. NOVÁKOVÁ, M. SCHMIDT, L. PULKRÁBKOVÁ, J. JANOUŠEK, O. SOUKUP, J. KUNEŠ, L. OPLETAL a L. CAHLÍKOVÁ. Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum x hybridum* cv. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. *South African Journal of Botany*. 2021, **136**, 137–146. ISSN 02546299.
- [52] NORDBERG, Agneta, Clive BALLARD, Roger BULLOCK, Taher DARREH-SHORI a Monique SOMOGYI. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion For CNS Disorders*. 2013, **15**(2). ISSN 2155-7780.
- [53] KANDIAH, Nagaendran, Ming-Chyi PAI, Vorapun SENANARONG, Irene LOOI, Encarnita AMPIL, Kyung Won PARK, Ananda Krishna KARANAM a Stephen CHRISTOPHER. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*. 2017, **Volume 12**, 697–707. ISSN 1178-1998.
- [54] GROSSBERG, George T., G. TONG, A. D. BURKE a P. N. TARIOT. Present algorithms and future treatments for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2019, (67.4), 1157–1171.

- [55] CUMMINGS, Jeffrey L., Gary TONG a Clive BALLARD. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2019, **67**(3), 779–794. ISSN 1875-8908.
- [56] PADDA, Inderbir S. a Mayur PARMAR. Aducanumab. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [vid. 2022-01-12].
- [57] DOLEŽAL, Martin. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2382-5.
- [58] LÓPEZ, Susana, Jaume BASTIDA, Francesc VILADOMAT a Carles CODINA. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*. 2002, **71**(21), 2521–2529. ISSN 00243205.
- [59] ELGORASHI, Esameldin E., Gary I. STAFFORD a Johannes VAN STADEN. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Medica*. 2004, **70**(3), 260–262. ISSN 0032-0943, 1439-0221.
- [60] ŠAFRATOVÁ, Marcela. Studium inhibičního (toxického) vlivu alkaloidů vybraných druhů rostlin z čeledi Amaryllidaceae na některé lidské enzymové systémy (*in vitro* studie) III. Hradec Králové, 2016. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [61] DING, Yan, Dan QU, Kai-Mei ZHANG, Xiao-Xin CANG, Zi-Nong KOU, Wei XIAO a Jing-Bo ZHU. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2017, **19**(1), 53–100. ISSN 1028-6020, 1477-2213.
- [62] REYES-CHILPA, Ricardo, Strahil BERKOV, Simón HERNÁNDEZ-ORTEGA, Christopher K. JANKOWSKI, Sebastien ARSENEAU, Imma CLOTET-CODINA, José A. ESTÉ, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*. 2011, **16**(11), 9520–9533. ISSN 1420-3049.
- [63] CAHLÍKOVÁ, Lucie, Martina HRABINOVÁ, Andrea KULHÁNKOVÁ, Nina BENEŠOVÁ, Jakub CHLEBEK, Daniel JUN, Zdeněk NOVÁK, Kateřina MACÁKOVÁ, Jiří KUNEŠ, Kamil KUČA a Lubomír OPLETAL. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. *Natural Product Communications*. 2013, **8**(11), 1934578X1300801. ISSN 1934-578X, 1555-9475.
- [64] KULHÁNKOVÁ, Andrea, Lucie CAHLÍKOVÁ, Zdeněk NOVÁK, Kateřina MACÁKOVÁ, Jiří KUNEŠ a Lubomír OPLETAL. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chemistry & Biodiversity*. 2013, **10**(6), 1120–1127. ISSN 16121872.
- [65] CAHLÍKOVÁ, Lucie, Daniel I. PÉREZ, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Jakub CHLEBEK, Marcela ŠAFRATOVÁ, Anna HOŠT'ÁLKOVÁ a Lubomír OPLETAL. In Vitro Inhibitory Effects of 8- O -Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted

- Penetration across the Blood–Brain Barrier. *Journal of Natural Products*. 2015, **78**(6), 1189–1192. ISSN 0163-3864, 1520-6025.
- [66] VANĚČKOVÁ, Nina, Anna HOŠT'ÁLKOVÁ, Marcela ŠAFRATOVÁ, Jiří KUNEŠ, Daniela HULCOVÁ, Martina HRABINOVÁ, Ivo DOSKOČIL, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Lubomír OPLETAL, Lucie NOVÁKOVÁ, Daniel JUN, Jakub CHLEBEK a Lucie CAHLÍKOVÁ. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Advances*. 2016, **6**(83), 80114–80120. ISSN 2046-2069.
- [67] BERKOV, Strahil, Carles CODINA, Francesc VILADOMAT a Jaume BASTIDA. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008, **18**(7), 2263–2266. ISSN 0960894X.
- [68] GREIG, Nigel H., Tada UTSUKI, Qian-Sheng YU, Xiaoxiang ZHU, Harold W. HOLLOWAY, Tracyann PERRY, Bong LEE, Donald K. INGRAM a Debomoy K. LAHIRI. A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*. 2001, **17**(3), 159–165. ISSN 14734877, 03007995.
- [69] HARTMANN, Joachim, Cornelia KIEWERT, Ellen G. DUYSEN, Oksana LOCKRIDGE, Nigel H. GREIG a Jochen KLEIN. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity: Acetylcholine in AChE knockout mice. *Journal of Neurochemistry*. 2007, **100**(5), 1421–1429. ISSN 00223042.
- [70] GREIG, N. H., T. UTSUKI, D. K. INGRAM, Y. WANG, G. PEPEU, C. SCALI, Q.-S. YU, J. MAMCZARZ, H. W. HOLLOWAY, T. GIORDANO, D. CHEN, K. FURUKAWA, K. SAMBAMURTI, A. BROSSI a D. K. LAHIRI. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, **102**(47), 17213–17218. ISSN 0027-8424, 1091-6490.
- [71] LI, Qi, Hongyu YANG, Yao CHEN a Haopeng SUN. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, **132**, 294–309. ISSN 02235234.
- [72] MAMUN, Abdullah Al, Filip PIDANÝ, Daniela HULCOVÁ, Jana MAŘÍKOVÁ, Tomáš KUČERA, Monika SCHMIDT, Maria Carmen CATAPANO, Martina HRABINOVÁ, Daniel JUN, Lubica MÚČKOVÁ, Jiří KUNEŠ, Jiří JANOUŠEK, Rudolf ANDRÝS, Lucie NOVÁKOVÁ, Rozálie PEŘINOVÁ, Negar MAAFI, Ondřej SOUKUP, Jan KORÁBEČNÝ a Lucie CAHLÍKOVÁ. Amaryllidaceae Alkaloids of Norbelladine-Type as Inspiration for Development of Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity Evaluation, and Docking Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(15), 8308. ISSN 1422-0067.
- [73] CARMONA-VIGLIANCO, Florencia, Daniel ZARAGOZA-PUCHOL, Oscar PARRAVICINI, Adriana GARRO, Ricardo D. ENRIZ, Gabriela E. FERESIN, Marcela KURINA-SANZ a Alejandro A. ORDEN. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of

- substituted *N*-benzyl-2-phenylethanamines as cholinesterase inhibitors. *New Journal of Chemistry*. 2020, **44**(22), 9466–9476. ISSN 1144-0546, 1369-9261.
- [74] GUPTA, Mayuri, Hyeok Jun LEE, Christopher J. BARDEN a Donald F. WEAVER. The Blood–Brain Barrier (BBB) Score. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019, **62**(21), 9824–9836. ISSN 0022-2623, 1520-4804.
- [75] BATA, Imre, Zsuzsanna TÖMÖSKÖZI, Péter BUZDER-LANTOS, Attila VASAS, Gábor SZELECZKY, Sándor BÁTORI, Veronika BARTA-BODOR, László BALÁZS a György G. FERENCZY. I. Discovery of a novel series of CXCR3 antagonists. Multiparametric optimization of *N*, *N*-disubstituted benzylamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016, **26**(22), 5418–5428. ISSN 0960894X.
- [76] MEDEN, Anže, Damijan KNEZ, Marko JUKIČ, Xavier BRAZZOLOTTO, Marija GRŠIČ, Anja PIŠLAR, Abida ZAHIROVIĆ, Janko KOS, Florian NACHON, Jurij SVETE, Stanislav GOBEC a Uroš GROŠELJ. Tryptophan-derived butyrylcholinesterase inhibitors as promising leads against Alzheimer’s disease. *Chemical Communications*. 2019, **55**(26), 3765–3768. ISSN 1359-7345, 1364-548X.
- [77] PETTERSEN, Eric F., Thomas D. GODDARD, Conrad C. HUANG, Gregory S. COUCH, Daniel M. GREENBLATT, Elaine C. MENG a Thomas E. FERRIN. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. 2004, **25**(13), 1605–1612. ISSN 0192-8651, 1096-987X.
- [78] SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. 1999, **17**(1), 57–61. ISSN 1093-3263.
- [79] HANWELL, Marcus D, Donald E CURTIS, David C LONIE, Tim VANDERMEERSCH, Eva ZUREK a Geoffrey R HUTCHISON. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. 2012, **4**(1), 17. ISSN 1758-2946.
- [80] O’BOYLE, Noel M, Michael BANCK, Craig A JAMES, Chris MORLEY, Tim VANDERMEERSCH a Geoffrey R HUTCHISON. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*. 2011, **3**(1), 33. ISSN 1758-2946.
- [81] TROTT, Oleg a Arthur J. OLSON. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2009, NA-NA. ISSN 01928651, 1096987X.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky

Kandidát: Matěj Wisura

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

Název diplomové práce: Amaryllidaceae alkaloidy jako inspirace pro přípravu selektivních inhibitorů butyrylcholinesterasy I

Čeľad Amaryllidaceae je považována za velice významný zdroj biologicky aktivních přírodních látek, alkaloidů. Tyto látky jsou intenzivně studovány kvůli jejich vlastnostem antivirovým, antifungálním, antiparazitickým, antioxidantním, protizánětlivým a především také jejich schopnosti inhibovat cholinesterázy. O tom, že tento zdroj stále není ani zdaleka vyčerpán, svědčí nedávná izolace zcela nového strukturního typu Amaryllidaceae alkaloidů, karltoninů, z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, které vykazaly významnou inhibiční aktivitu vůči BuChE.

Izolace karltoninů se stala inspirací pro syntézu vysoce selektivních inhibitorů BuChE vycházejících z norbelladinového strukturního typu. Na přípravu pilotní série látek navazuje tato diplomová práce, při které bylo připraveno dalších 21 látek rozšiřujících portfolio a prohlubujících poznání vztahu struktury a účinku ve skupině selektivních inhibitorů BuChE. Připravené látky byly identifikovány pomocí NMR a ESI-HMRS. Všechny látky byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE, byla spočítána jejich schopnost prostupovat přes HEB v podobě BBB skóre. Nejvyšší aktivitu vykazovaly látky FC020 ($IC_{50} = 188,03 \pm 23$ nM, inhibice BuChE $96,31 \pm 0,26\%$), FC012 ($IC_{50} = 193,2 \pm 55,39$ nM, inhibice BuChE $96,38 \pm 0,79\%$) a FC013 ($IC_{50} = 353,13 \pm 98,63$ nM, inhibice BuChE $94,09 \pm 0,35\%$). Tyto tři látky byly následně testovány na cytotoxicitu vůči buněčné linii SH-SY5Y, kde nevykazovaly toxicitu v účinných koncentracích.

Klíčová slova: Amaryllidaceae, alkaloidy, karltoniny, deriváty, cholinesterázy

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany

Candidate: Matěj Wisura

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

Title of diploma thesis: Amaryllidaceae alkaloids as inspiration for preparation of selective butyrylcholinesterase inhibitors I

The Amaryllidaceae family is considered to be very important source of biologically active natural compounds, alkaloids. These compounds are intensively studied because of their antiviral, antifungal, antiparasitic, antioxidative and antiinflammatory properties and especially for their ability to inhibit cholinesterases. This source is still not entirely depleted, which is proved by recent isolation of utterly new structural type of Amaryllidaceae alkaloids, carltonines, isolated from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Carltonines have shown promising inhibitory activity of BuChE.

Isolation of carltonines has become an inspiration for synthesis of highly selective BuChE inhibitors based on norbelladine structural type. This diploma thesis proceeds from pilot series of 20 compounds. During this study, another 21 compounds were prepared, expanding the portfolio and knowledge of structure-activity relationships within selective BuChE inhibitors group. Generated compounds were identified using NMR and ESI-HRMS. All compounds were studied for their inhibitory activity of AChE and BuChE, ability to cross BBB was calculated as BBB score. The most active compounds were FC020 ($IC_{50} = 188,03 \pm 23$ nM, inhibition of BuChE $96,31 \pm 0,26\%$), FC012 ($IC_{50} = 193,2 \pm 55,39$ nM, inhibition of BuChE $96,38 \pm 0,79\%$) and FC013 ($IC_{50} = 353,13 \pm 98,63$ nM, inhibition of BuChE $94,09 \pm 0,35\%$). These three compounds were subsequently tested for cytotoxicity against cell line SH-SY5Y. They did not show any toxicity in active concentrations.

Key words: Amaryllidaceae, alkaloids, carltonines, derivatives, cholinesterases