

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOZIE A FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



Amaryllidaceae alkaloidy haemanthaminového strukturního typu a jejich polosyntetické deriváty jako potenciální léčiva v terapii Alzheimerovy choroby.

Amaryllidaceae alkaloids of haemanthamine structural type and their semisynthetic derivatives as potential drugs in the treatment of Alzheimer's disease.

Doktorská dizertační práce

Ing. Rozálie Peřinová

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

Studijní obor: Farmakognosie a nutraceutika

## **ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ**

Tímto prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, jež jsem vypracovala samostatně pod vedením své školitelky. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, srpen 2023

Ing. Rozálie Peřinová

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů Univerzity Karlovy SVV 260 662 a projektu: Předaplikační výzkum inovativních léčiv a medicínských technologií (InoMed) vedeným pod registračním číslem CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_069/0010046 v rámci Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání (OP VVV).

Tímto bych poděkovala své školitelce, prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D., vedoucí výzkumné skupiny: Sekundární metabolity rostlin jako potenciální léčiva a Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky, za odborné vedení během celého studia a cenné rady během sepisování práce. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za konzultace a kolegyni PharmDr. Elišce Kohelové, Ph.D. za izolaci a poskytnutí získaného materiálu. Stejně tak děkuji PharmDr. Daniele Hulcové, Ph.D. za pomoc při testování inhibičních aktivit a změření připravených látek vůči cholinesterasám, PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a pomoc při interpretaci NMR spekter, Mgr. Jaroslavu Jenčovi, Ph.D. za analýzu derivátů na HPLC/MS a prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za změření HRMS spekter. Dále velice děkuji RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. a Mgr. Darje Koutové, Ph.D. z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, z Ústavu lékařské biochemie, za uvedení do problematiky spojené s nádorovými liniemi. Poděkování také patří prof. Vincenze Andrisano, Ph.D. z Univesità di Bologna za změření inhibic vůči GSK-3 $\beta$ ; kpt. Mgr. et Mgr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. za provedení dockingové studie; doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D., doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabínové, Ph.D. z Centra biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové za změření farmakokinetických parametrů a PAMPA testu.

Dále děkuji všem ostatním kolegům z katedry za navození přátelského a příjemného pracovního prostředí. Nejvíce však děkuji celé své rodině a nejbližším přátelům za podporu během celé doby studia.

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>11</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
3.1 Rostlinná čeleď Amaryllidaceae: základní charakteristika, rozšíření a tradiční medicína.....	12
3.2 Sekundární metabolity čeledi Amaryllidaceae.....	13
3.2.1. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů: Norbelladinová cesta.....	13
3.2.2. Biologická aktivita haemanthaminu.....	16
3.3 Alzheimerova choroba a její problematika.....	20
3.3.1. Cholinergní hypotéza vzniku Alzheimerovy choroby.....	22
3.3.2. Hypotéza amyloidní kaskády.....	23
3.3.3. Teorie hyperfosforylovaného proteinu.....	24
3.3.4. Terapie Alzheimerovy choroby.....	25
3.4 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae v souvislosti s možným využitím v terapii Alzheimerovy choroby ..	27
3.5 Polosyntetické deriváty haemanthaminu a jejich biologická aktivita.....	30
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>33</b>
4.1 Izolace haemanthaminu pro přípravu polosyntetických derivátů.....	33
4.2 Příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu.....	33
4.2.1. Příprava 1,2-dihydrohaemanthaminu (2).....	33
4.2.2. Příprava esterových derivátů haemanthaminu (1).....	33
4.2.3. Příprava etherových derivátů haemanthaminu.....	34
4.2.4. Převedení derivátů na hydrochloridy.....	35
4.3 Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů.....	35
4.4 Chemikálie, rozpouštědla a detekční činidla.....	35
4.5 Mobilní soustavy pro tenkovrstvou chromatografii (analytická, preparativní).....	37
4.6 Přístrojové vybavení použité při izolaci a identifikaci derivátů haemanthaminu.....	37
4.7 Preparativní a analytická tenkovrstvá chromatografie.....	37
4.8 Strukturní analýza polosyntetických derivátů haemanthaminu.....	37
4.8.1. GC-MS/EI analýza.....	37
4.8.2. HPLC/MS-ESI analýza.....	38
4.8.3. HRMS analýza.....	38
4.8.4. NMR analýza.....	38
4.8.5. Optická otáčivost.....	39
4.9 Biologická aktivita připravených polosyntetických derivátů haemanthaminu.....	39
4.9.1. Inhibiční aktivita derivátů haemanthaminu vůči cholinesterasám.....	39

4.9.2.	Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 $\beta$ .....	39
4.9.3.	Cytotoxická aktivita derivátů haemanthaminu .....	40
4.9.4.	Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru .....	40
4.9.5.	Výpočet logBB.....	40
4.10	Dockingová studie u neaktivnějších látek.....	40
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
5.1	Strukturní identifikace připravených derivátů .....	41
5.2	Strukturní analýza doposud nepublikovaných derivátů .....	47
5.2.1.	11- <i>O</i> -isovalerylhaemanthamin (9) .....	47
5.2.2.	11- <i>O</i> -heptanoylhaemanthamin (10) .....	47
5.2.3.	11- <i>O</i> -oktanoylhaemanthamin (11).....	47
5.2.4.	11- <i>O</i> -(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin (19) .....	48
5.2.5.	11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin (33) .....	48
5.2.6.	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin (34).....	48
5.2.7.	11- <i>O</i> -(3-hydroxybenzoyl)haemanthamin (36).....	49
5.2.8.	11- <i>O</i> -(3-jodobenzoyl)haemanthamin (45) .....	49
5.2.9.	11- <i>O</i> -(2-bromobenzoyl)haemanthamin (37).....	49
5.2.10.	11- <i>O</i> -(4-bromobenzoyl)haemanthamin (39).....	50
5.2.11.	11- <i>O</i> -(2-fluorobenzoyl)haemanthamin (47) .....	50
5.2.12.	11- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)haemanthamin (49) .....	50
5.2.13.	11- <i>O</i> -(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin (56).....	51
5.2.14.	11- <i>O</i> -(3-trifluormethylbenzoyl)haemanthamin (51).....	51
5.2.15.	11- <i>O</i> -benzylhaemanthamin (67).....	51
5.2.16.	11- <i>O</i> -(2-methylbenzyl)haemanthamin (68).....	52
5.2.17.	11- <i>O</i> -(3-methylbenzyl)haemanthamin (69).....	52
5.2.18.	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzyl)haemanthamin (70).....	52
5.2.19.	11- <i>O</i> -(2-bromobenzyl)haemanthamin (73).....	53
5.2.20.	11- <i>O</i> -(3-bromobenzyl)haemanthamin (74).....	53
5.2.21.	11- <i>O</i> -(4-bromobenzyl)haemanthamin (75).....	54
5.2.22.	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzyl)haemanthamin (76).....	54
5.2.23.	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzyl)haemanthamin (77).....	54
5.2.24.	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzyl)haemanthamin (78) .....	55
5.2.25.	11- <i>O</i> -(2-jodobenzyl)haemanthamin (79) .....	55
5.2.26.	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzyl)haemanthamin (80) .....	55
5.3	Biologická aktivita derivátů haemanthaminu ve vztahu k Alzheimerově chorobě.....	57
5.4	Cytotoxická aktivita derivátů haemanthaminu.....	62
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>75</b>

<b>8</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>PŘEHLED PUBLIKACÍ A KONFERENCÍ .....</b>	<b>92</b>
10.1	Původní práce.....	92
10.2	Konference a přednášky.....	94
10.2.1.	Konference .....	94
10.2.2.	Přednášky .....	94
10.2.3.	Postery .....	94
10.2.4.	Národní odborná stáž.....	95

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A2780	buněčná linie karcinomu ovarií
A549	buněčná linie adenokarcinomu plic
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEi	inhibitor acetylcholinesterázy
AICD	amyloidový proteinový prekurzor intracelulární domény
AMK	aminokyselina
APP	amyloidový prekurzorový protein
APP $\alpha$	rozpuštěný fragment amyloidového prekurzorového proteinu
APP $\beta$	nerozpuštěný fragment amyloidového prekurzorového proteinu
A $\beta$	amyloid beta
A $\beta$ 40	amyloid beta o délce 40 aminokyselin
A $\beta$ 42	amyloid beta o délce 42 aminokyselin
B16F10	buněčná linie myšího melanomu
BACE-1	$\beta$ -sekretasa 1
BBB	blood-brain-barrier
BuChE	butyrylcholinesteráza
BJ	buněčná linie lidského fibroblastu
Caco-2	buněčná linie kolorektálního karcinomu
CEM	buněčná linie akutní lymfoblastické leukemie
CNS	centrální nervová soustava
DCM	dichlormethan
DMAP	dimethylaminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G-361	buněčná linie maligního melanomu
GSK-3	glykogen syntasa kinasa-3
GSK-3 $\alpha$	isoforma alfa glykogen syntasy kinasy-3
GSK-3 $\beta$	isoforma beta glykogen syntasy kinasy-3

<i>hAChE</i>	humánní acetylcholinesteráza
<i>hBuChE</i>	humánní butyrylcholinesteráza
HEB	hematoencefalická bariéra
HeLa	buněčná linie adenokarcinomu děložního čípku
Hs683	buněčná linie oligodendrogliomu
HT-29	buněčná linie kolorektálního karcinomu
ChAT	cholinacetyltransferasa
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace
Jurkat	buněčná linie akutní leukemie
K562	buněčná linie chronické myeloidní leukemie
MCF-7	buněčná linie adenokarcinomu prsu
MeOH	methanol
MRC-5	buněčná linie zdravých plicních fibroblastů
NaH	hydrid sodný
NFTs	neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartátové receptory
OE21	buněčná linie esofageálního karcinomu
OVCAR3	buněčná linie adenokarcinomu ovaria
PAMPA	metoda predikce prostupu přes semipermeabilní membránu (z angl. parallel artificial membrane permeability assay)
POP	prolylologopeptidasa
Q-TOF	hybridní analyzátor doby letu
SAR	studium vztahu struktura-aktivita
SKMEL-28	buněčná linie lidského melanomu
SW1573	buněčná linie plicního karcinomu
T-47D	buněčná linie karcinomu prsu
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
To	toluen
U-373	buněčná linie lidského glioblastomu
WiDr	buněčná linie kolorektálního karcinomu



# 1 ÚVOD

Od pradávna se lidé snažili léčit nemoci pomocí přírody. Používání léčivých rostlin jako primární zdroj léčby proti různým nemocem sahá až na začátek vývoje lidstva. Nejstarší písemné doklady o použití rostlin k přípravě léčivých přípravků byly nalezeny na sumerské hliněné desce z Nagpuru staré přibližně 5000 let, která obsahovala 12 receptů zahrnující téměř 250 rostlin, včetně máku nebo mandragory<sup>1</sup>. Mezi nejstarší kultury, které využívaly rostliny pro léčbu různých neduhů, patřili Egypťané a Číňané. Největší průlom nastal v antickém Řecku, kdy byly studovány a popsány vlastnosti celé řady léčivých rostlin. Mezi hlavní průkopníky patřili Hippokrates, zakladatel řeckého lékařství a jeho významným pokračovatelem byl filozof a vědec Theofrastos. Ten je považován za prvního přírodovědce, který se zabýval nejdůležitějšími oblastmi botaniky jako je fyziologie a morfologie rostlin a vytvořil také botanickou systematiku. V jeho díle nesoucí název *De historia plantarum* skládající se z 10 knih také poprvé rozdělil rostliny na stromy, keře a byliny a mimo jiné v díle zmiňuje například skořici, mátu, granátové jablko či kardamom<sup>2,3</sup>. V prvním století našeho letopočtu řecký lékař, botanik a farmaceut Pedanius Dioscorides, napsal dílo *De Materia Medica*, jež se stalo předlohou novodobých lékopisů a v jeho pětidílné knize je popsáno více než 600 druhů rostlin a okolo 1000 léčivých přípravků připravovaných z popsaných rostlin<sup>4</sup>.

Významnou skupinou mezi těmito tradičními zdroji léčiv je čeleď Amaryllidaceae, jejíž zástupci se významně vyskytují v tropickém, subtropickém i mírném páse. Rostliny z čeledi Amaryllidaceae jsou také pěstovány pro okrasné účely a do dnešní doby byla vyšlechtěna celá řada zahradnických kultivarů některých zástupců rodů (např. *Narcissus*, *Hippeastrum* *Amaryllis*). Své uplatnění našli tyto rostliny v tradiční medicíně již ve 4. století před naším letopočtem, kdy Hippokrates z Kósu použil olejový extrakt z rostliny *Narcissus poeticus* k léčbě nádorů dělohy<sup>5</sup>. Rostliny patřící do této čeledi produkují alkaloidy nazývané alkaloidy amarylkovitých rostlin, které jsou předmětem rozsáhlých studií vzhledem k širokému spektru biologických aktivit. Navíc jsou i výrazným chemotaxonomickým rysem podčeledi Amaryllidoideae<sup>6</sup>. Od izolace prvního Amaryllidaceae alkaloidu lykorinu před 140 lety, bylo identifikováno více než 600 strukturně rozmanitých alkaloidů z přibližně 350 druhů rostlin<sup>7</sup>. Mezi nejvýznamnější zástupce amarylkovitých alkaloidů patří galanthamin, jež je díky své anticholinesterasové aktivitě používán k léčbě Alzheimerovy choroby nebo lykorin, který je znám pro svůj cytotoxický a protinádorový účinek<sup>8,9</sup>. Nedávno bylo prokázáno, že montanin má také inhibiční účinek vůči enzymu acetylcholinesteráse, ale vykazuje i antirevmatický, antimikrobiální a antiproliferační efekt. Další zajímavou sloučeninou je alkaloid

haemanthamin, který patří mezi nejrozšířenější amarylkovité alkaloidy. Tato sloučenina vykazuje zajímavý cytotoxický účinek, ale v nedávné době byly popsány polysyntetické deriváty, které disponovaly dalšími biologickými aktivitami. Vzhledem ke snadné dostupnosti tohoto alkaloidu z rostlinných zdrojů, byla tato látka a její deriváty předmětem této dizertační práce <sup>10</sup>.

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění způsobující pokles kognitivních funkcí a je nejčastější příčinou demence. Jen v České republice trpí tímto onemocněním okolo 160 tisíc lidí a celosvětově 44 milionů lidí<sup>11,12</sup>. V roce 1906 Alois Alzheimer, německý psychiatr a neuropatolog, popsal první případ a patologické příznaky nemoci, která byla později jeho kolegou Emilem Kraepelinem nazvána právě jako Alzheimerova choroba. Alzheimer zaznamenal změny v mozkové tkáni u pacientky, která zemřela na neobvyklou duševní chorobu. Mezi její příznaky patřily ztráta paměti, problémy s řečí a nepředvídatelné chování. Poté, co zemřela, prozkoumal její mozek a našel abnormální shluky, nyní nazývané jako amyloidní plaky a spletená vlákna přítomná v mozku, dnes označována jako neurofibrilární klubka (NFTs). Následně nebyla AD věnována pozornost, až roku 1963 kolegové Robert Terry a Michael Kidd provedli elektronovou mikroskopii ve vzorcích tkání mozku od dvou pacientů s pokročilým stadiem nemoci a analýza ukázala přítomnost NFTs <sup>13</sup>. Od té doby byly více než půl století (od roku 1963 do současnosti) prováděny studie o patologických rysech a mechanismech AD a snahy o hledání medikamentózní léčby tohoto onemocnění <sup>14</sup>. Vzhledem k úzkému spektru dostupných léčiv pro terapii AD, je potřebné neustále hledat nové zajímavé molekuly pro potenciální léčbu tohoto závažného neurodegenerativního onemocnění.

Předmětem předložené dizertační práce byla příprava polysyntetických derivátů Amaryllidaceae alkaloidu haemanthaminu a studium jejich biologických aktivit ve vztahu k Alzheimerově chorobě.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této dizertační práce byla příprava polysyntetických derivátů alkaloidu haemanthaminu izolovaného z rostlin *Zephyranthes citrina* a *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master<sup>15,16</sup> a jejich testování biologických aktivit v souvislosti s Alzheimerovou chorobou.

Dílčí cíle:

- a) Zpracování rešerše na téma Amaryllidaceae alkaloidy se zaměřením na Alzheimerovu chorobu a rešerše se zaměřením na alkaloid haemanthamin a příprava jeho polosyntetických derivátů,
- b) v případě potřeby izolace dostatečného množství haemanthaminu z alkaloidních extraktů dodaných firmou TEVA,
- c) vlastní příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu (estery, ethery),
- d) strukturní analýza připravených sloučenin za využití běžných fyzikálně-chemických metod (NMR, MS, HRMS, optická otáčivost),
- e) screening biologických aktivit polosyntetických derivátů v souvislosti s Alzheimerovou chorobou (inhibice cholinesterás, prolyloligopeptidasy, glykogen syntasy kinasy 3-beta), v případě dostatečného množství látek i screening cytotoxické aktivity na panelu nádorových a klidových buněk ve spolupráci s Katedrou lékařské biochemie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy,
- f) výběr derivátů pro podrobné biologické studie,
- g) porovnání vztahu struktury a účinku jednotlivých látek na základě získaných výsledků,
- h) vyhodnocení výsledků.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Rostlinná čeleď Amaryllidaceae: základní charakteristika, rozšíření a tradiční medicína

Rostliny čeledi Amaryllidaceae jsou krytosemenné, víceleté jednoděložné rostliny zahrnující přibližně 80 rodů a nejméně 1600 druhů rostoucích jak v tropických, tak v subtropických lokalitách, včetně Andské Jižní Ameriky, Středomoří a jižní Afriky. Právě v Jižní Africe lze nalézt přes 300 původních rostlinných taxonů z této čeledi, což představuje okolo 10 % místní flóry<sup>7</sup>. V mírném pásu lze nalézt zástupce tří rodů, a to *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus*. Na území České republiky jsou k vidění dva významní zástupci této čeledi, a to bledule jarní (*L. vernum*) a sněženka podsněžník (*G. nivalis*) (Obrázek 1). Obě rostliny jsou řazeny mezi ohrožené druhy, a proto je přísně zakázáno je sbírat nebo jakkoliv poškozovat, chráněn je rovněž i biotop<sup>17</sup>. Z rodu *Narcissus* je na našem území k vidění například narcis žlutý (*N. pseudonarcissus*). Díky velkému množství jak volně rostoucích druhů, tak šlechtěných odrůd, které čítají na tisíce, je tento rod pěstován především pro okrasné účely<sup>18</sup>.



**Obrázek 1:** *Leucojum vernum*, *Galanthus nivalis* a *Narcissus pseudonarcissus*<sup>19-21</sup>.

Celá řada těchto rostlin byla a nadále je intenzivně využívána v tradiční medicíně. Historie využití těchto rostlin především v terapii nádorových onemocnění spadá až do starověkého Řecka. V této době byl Hippokratem z Kósu (asi 370–460 př. n. l.) používán olejový extrakt z rostliny *N. poeticus* k léčbě nádoru v oblasti dělohy. Touto cestou šli i jeho nástupci, lékaři Pedanius Dioscorides (asi 40–90 n.l.) a Soranus z Efezu (98–138 n.l.). Lokální použití extraktů z rostlin *N. poeticus* a *N. pseudonarcissus* jako protinádorového léčiva, byla zaznamenána již v prvním století n. l. římským přírodním filozofem známým jako Plinius Starší (23–79 n. l.)<sup>22</sup>. Další zástupce tohoto rodu, *N. tazetta*, vykazoval protinádorové účinky. Aplikace oleje z této rostliny během onemocnění byla používána i ve středověku, a to v arabské medicíně, Číně, Severní Africe a Střední Americe. Nejvíce byly a stále jsou tyto rostliny využívány především

v různých oblastech Afriky, Latinské Ameriky a také v Číně, tedy v oblastech, kde je celá řada lidí stále odkázána na přírodní léčiva <sup>23</sup>.

Příkladem může být *Hymenocallis caribaea*, který je ve formě extraktu používán v léčbě nádorů <sup>22</sup>, dále rostlina *Zephyranthes candida* pocházející z jižní Afriky, jež je hojně používána k léčbě Westova syndromu, epilepsie a tetanu především v Číně <sup>24</sup>. Dalším zástupcem používaným v lidovém léčitelství je *Amaryllis belladonna* (známá také jako *Hippeastrum equestre*), která je v Egyptě pěstována jako okrasná rostlina <sup>25</sup>. Rod *Amaryllis*, zahrnující druhy *A. belladonna* a *A. acuminata* původem z jižní Afriky, je po staletí využíván při léčebných rituálech v kmenech Sotho, Xhosa a Zulu v Jižní Africe a na ostrově Jáva a ve vietnamské lidové medicíně k léčbě nádorů <sup>26</sup>. Další rostlinou využívanou domorodci, zejména kmenů Sotho a Zulu, je *Nerine huttoniae* z rodu *Nerine*. Odvar z cibulí této rostliny je používán při léčbě nachlazení a kašle, onemocnění jater a ledvin, ale také k získání úlevy od bolesti zad a je používán jako léčivý přípravek na neplodnost <sup>27</sup>.

V Senegalu se směs připravená z cibulí *Crinum giganteum* používá k léčbě a prevenci infekce ran, zatímco v Nigérii se léčiva vyráběná z cibulí *C. glaucum* nebo *C. jagus* tradičně využívají pro léčbu různých duševních nemocí <sup>28</sup>. Různé typy extraktů z rostlin rodu *Haemanthus* používají obyvatelé Jižní Afriky k léčbě lepry nebo vředů, ale i na horečnatá nachlazení, astma a kašel <sup>29</sup>. Další rostlina této čeledi, *Apodolirion buchananii*, je užívána při bolestech žaludku a zástupci rodu *Brunsvigia* jsou užívány proti neplodnosti <sup>30</sup>.

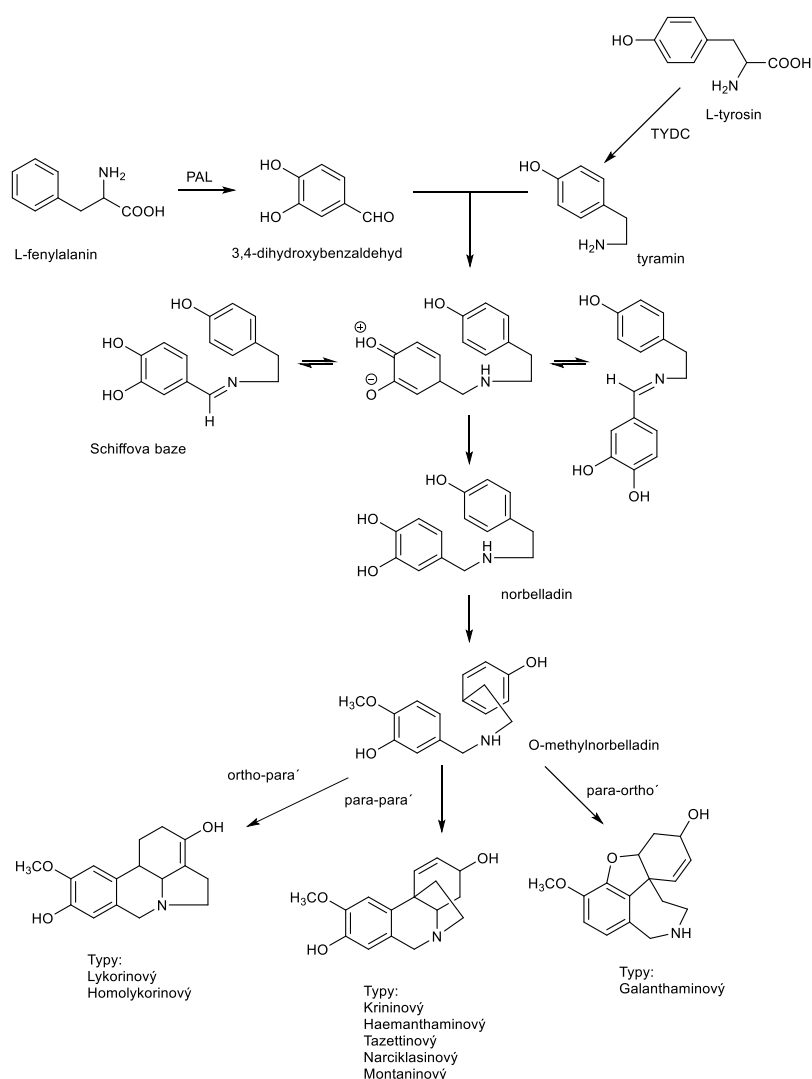
## 3.2 Sekundární metabolity čeledi Amaryllidaceae

Studium sekundárních metabolitů rostlin z čeledi Amaryllidaceae započalo v roce 1877, a to izolací Amaryllidaceae alkaloidu lykorinu z rostliny *N. pseudonarcissus* (Obrázek 1). Od té doby bylo izolováno více než 600 amaryllkovitých alkaloidů, které jsou na základě biosyntetické cesty klasifikovány do 9 hlavních strukturních typů a celé řady dalších, méně rozšířených strukturních typů. Až 80 % doposud izolovaných a identifikovaných amaryllkovitých alkaloidů spadá do hlavních strukturních typů, zástupci minoritních strukturních typů se v rostlinách obvykle vyskytují v nízkých až stopových koncentracích <sup>31</sup>.

### 3.2.1. Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidů: Norbelladinová cesta

Biosyntetická cesta amaryllkovitých alkaloidů vychází ze dvou aminokyselin (AMK), L-fenylalaninu a L-tyrosinu a nazývá se podle klíčového meziprojektu *O*-methylnorbelladinu, norbelladinová cesta. Prvním krokem této biogeneze je vznik 3,4-dihydroxybenzaldehydu,

který vzniká hydroxylací L-fenylalaninu a vznik tyraminu, který je produktem dekarboxylace L-tyrosinu enzymem tyrosin-dekarboxylasou. Kondenzací meziproductů a následnou methylací vzniká *O*-methylnorbelladin, poté následuje intramolekulární oxidační spojení, které v závislosti na kombinaci spojení (*ortho-para'*, *para-ortho'*, *para-para'*) dává vznik základním strukturním typům amarylkovitých alkaloidů. Z nich jsou pak následně odvozeny minoritní strukturní typy (Obrázek 2). Zde je potřebné konstatovat, že biosyntéza většiny minoritních typů nebyla doposud jednoznačně objasněna, v celé řadě případů se jedná o popis procesů, které by mohly pravděpodobně probíhat a vést k formování minoritních strukturních typů.



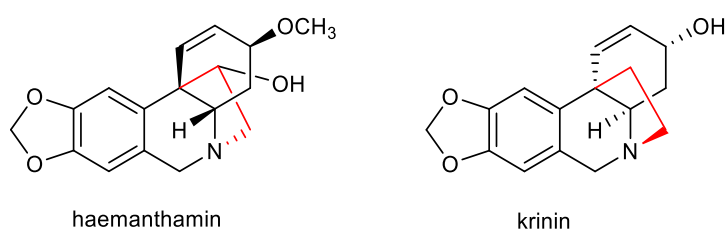
**Obrázek 2:** Vznik základních strukturních typů Amaryllidaceae alkaloidů <sup>7</sup>.

Jak již bylo uvedeno, podle typu intramolekulárního spojení vzniká 9 základních strukturních typů: norbelladinový (norbelladin), galanthaminový (galanthamin), lykorinový (lykorin), homolykorinový (homolykorin), pankratistatinový (pankratistatin),

haemanthaminový (haemanthamin), krininový (krinin), tazettinový (tazettin) a montaninový (montanin)<sup>32</sup>.

Mezi minoritní strukturní typy patří například galasinový, galanthindolový, kripowellinový, plikaminový, secoplikaminový, gracilaminový, isminový, cherylinový, buflavinový. Tyto strukturní typy jsou zastoupeny většinou pouze jedním alkaloidem a v rostlinném materiálu jsou obsaženy jen ve velmi malých množstvích<sup>33</sup>. V nedávné době byly na našem pracovišti izolovány a identifikovány alkaloidy dvou nových strukturních typů a to narcikachninového a karltoninového typu<sup>16,34,35</sup>. A protože někteří zástupci těchto dvou nových typů disponovaly v rámci studií významnou inhibiční aktivitou, budou popsány v dalším textu.

Vzhledem k zaměření práce se v dalším textu budu podrobněji věnovat alkaloidům krinanového strukturního typu. Tento typ v odborné literatuře obecně zastřešuje alkaloidy haemanthaminového a krininového strukturního typu. Hlavním strukturním znakem pro tyto dvě skupiny alkaloidů je 5,10*b*-ethanofenanthridin a přemístění jeho ethanového můstku v polohách N-5 a C-10*b* (Obrázek 3). Ethanový můstek se vyskytuje buď v absolutní konfiguraci alfa ( $\alpha$ -krinany), pak se jedná o haemanthaminový typ amarylkovitých alkaloidů (hlavním představitelem je haemanthamin), nebo v konfiguraci beta ( $\beta$ -krinany), pak jde o alkaloidy krininového strukturního typu (hlavním představitelem je krinin)<sup>29</sup>.



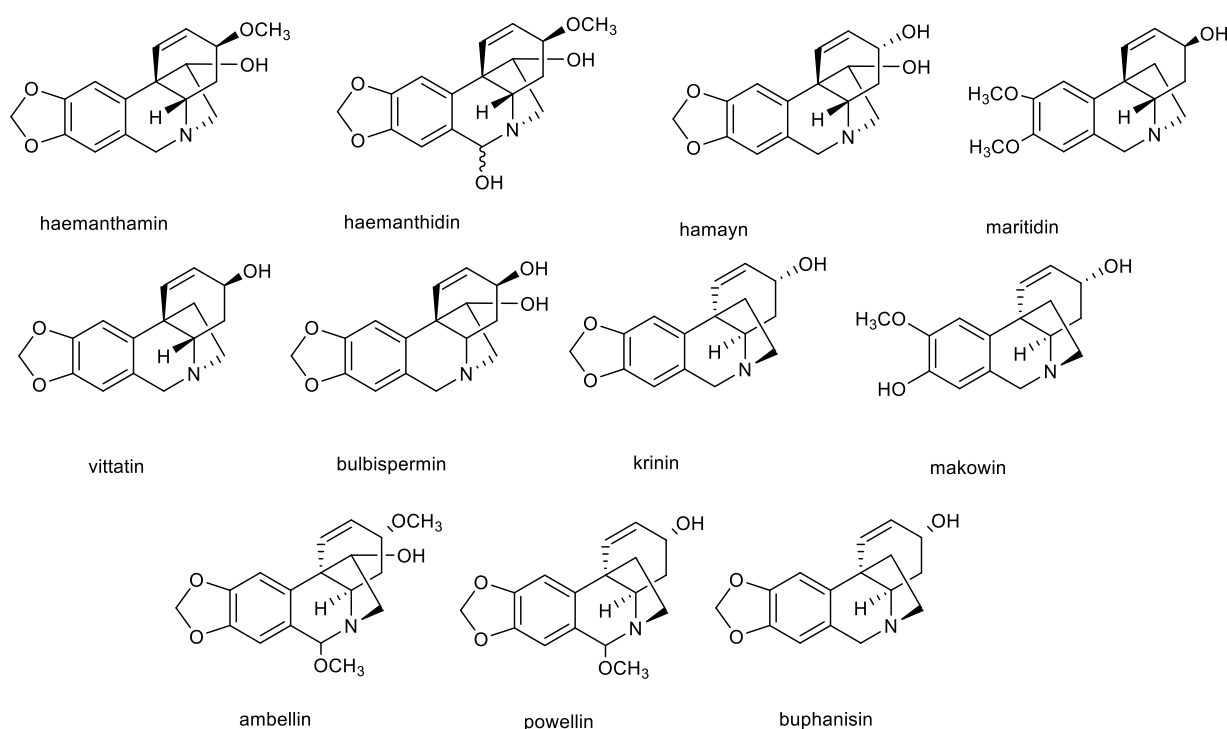
**Obrázek 3:** Struktury haemanthaminu a krininu<sup>7</sup>.

Doposud bylo z rostlin čeledi Amaryllidaceae izolováno a strukturně popsáno více než 160 těchto látek. Jedná se o sloučeniny, které se vyskytují jako hlavní, ale i minoritní složky alkaloidních extraktů. Strukturní rozmanitost těchto látek vychází z rozličných kombinací substituentů na téměř všech atomech uhlíku, ze stupně aromatizace kruhu C a v neposlední řadě z různých možností prostorového uspořádání molekul, které je umožněno přítomností chirálních atomů uhlíku (C-1, C-2, C-3, C-6 a C-11)<sup>7</sup>.

Nejčastějšími substituenty jsou hydroxy-, methoxy- a acetoxy- skupina. Alkaloidy krininového typu jsou substituovány nejčastěji na uhlících C-1, C-2, C-3, a to hydroxy-, methoxy- nebo acetoxy- skupinami. Dalším rysem tohoto strukturního typu je přítomnost

dioxolanového můstku na uhlících C-8 a C-9 (krinin), nebo hydroxy- a methoxy- skupin (makowin).

Mezi nejběžnější alkaloidy haemanthaminového typu patří např. haemanthamin, haemanthidin, hamayn, maritidin, vittatin a bulbispermin. Mezi krininový typ amarylkovitých alkaloidů patří již zmíněný krinin, dále makowin, ambellin, powellin a buphanisin (Obrázek 4)<sup>7,36</sup>. Zajímavostí je, že orientace ethanového můstku je důležitá pro biologickou aktivitu. Tento fenomén bude diskutován v dalším textu.



**Obrázek 4:** Vybrané alkaloidy haemanthaminového a krininového typu<sup>7</sup>.

### 3.2.2. Biologická aktivita haemanthaminu

Haemanthaminu byla věnována pozornost z pohledu jeho celé řady biologických účinků jako jsou cytotoxická, antioxidantní, antimikrobiální, antivirotická, antimalarická a protizánětlivá aktivita<sup>37,38</sup>. Nejvíce biologických studií provedených na haemanthaminu bylo věnováno jeho cytotoxickým účinkům. V provedených studiích bylo prokázáno, že haemanthamin vykazuje jak cytotoxické, tak proapoptotické účinky na široké škále nádorových linií.

V rámci studie z roku 2010 bylo 15 amarylkovitých alkaloidů podrobena cytotoxickému screeningu vůči různým nádorovým liniím. Mezi vysoce účinné látky patřil právě haemanthamin, zajímavou aktivitu vykazaly i další alkaloidy jako haemanthidin, amarbellisin a lykorin. Všechny zmiňované látky vykazaly inhibiční účinek růstu u šesti nádorových linií



s  $IC_{50}$  v mikromolárních hodnotách (4,0-8,5  $\mu M$ ). Mezi testované linie patřily A549 (adenokarcinom plic), OE21 (esofageální karcinom), Hs683 (oligodendrogliom), U-373 (lidský glioblastom), SKMEL-28 (lidský melanom) a B16F10 (myší melanom) <sup>39</sup>. Následující publikační výstup z roku 2015 navazuje na antiproliferační efekt již dříve studovaných amarylkovitých alkaloidů. Nově byly studii podrobeny i některé jejich deriváty vůči 4 nádorovým liniím, a to A278 (ovariální karcinom), SW1573 (plicní karcinom), T-47D (karcinom prsu) a WiDr (kolorektální karcinom) <sup>40</sup>.

V další práci, která byla provedena na našem pracovišti, bylo testováno 13 amarylkovitých alkaloidů a jejich cytotoxicita vůči gastrointestinálním nádorovým liniím Caco-2 a HT-29. Jako kontrola byly použity zdravé lidské intestinální buňky FHs 74 Int <sup>41</sup>. Z testovaných alkaloidů vykázaly pouze haemanthamin, haemanthidin a lykorin výraznou toxicitu vůči nádorovým buňkám. Toxicita vůči linii FHs 74 byla až 20krát nižší oproti nádorovým buňkám (Tabulka 1). Z alkaloidů haemanthaminového typu vykázal nejlepší výsledky právě samotný haemanthamin.

**Tabulka 1:** Cytotoxická aktivita haemanthaminu, haemanthidinu a lykorinu vůči gastrointestinálním nádorovým liniím <sup>41,42</sup>.

Alkaloid	Nádorové linie		Zdravá linie
	Caco-2 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	HT-29 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	FHs 74 Int $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
Haemanthamin	0,99 ± 0,14	0,59 ± 0,01	19,5 ± 0,9
Haemanthidin	3,3 ± 0,9	1,7 ± 0,1	8,9 ± 11,6
Lykorin	0,99 ± 0,08	1,2 ± 0,0	22,7 ± 0,1

\* hodnoty jsou průměrem se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření

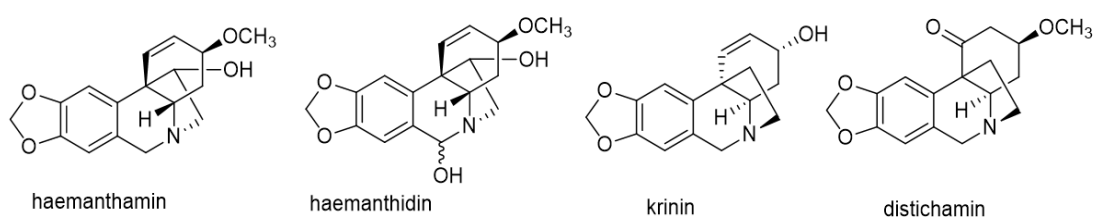
Vzhledem k tomu, že cytotoxická aktivita haemanthaminu byla testována na celé řadě buněčných linií, jejichž rozbor by byl nad rámec této práce, tak pro přehlednost následující tabulka shrnuje vybrané aktivity (Tabulka 2).

Důležitým zjištěním různých screeningových studií je, že pro cytotoxickou aktivitu krinanových alkaloidů je zásadní  $\beta$  uspořádání 5,10*b*-ethanového můstku, který obsahují právě alkaloidy haemanthaminového strukturního typu. Alkaloidy krininového strukturního typu, obsahující  $\alpha$  konfiguraci 5,10*b*-ethanového můstku ve struktuře, nevykazují žádnou výraznou cytotoxickou aktivitu <sup>43</sup>. Jedinou výjimkou je alkaloid distichamin (Obrázek 5), který byl do dnešní doby izolován pouze z rostliny *Boophone disticha*, jež vykázal zajímavou cytotoxickou aktivitu vůči 6ti liniím, a to CEM (akutní lymfoblastická leukemie), K562 (chronická myeloidní leukemie), MCF-7 (adenokarcinom prsu), G-361 (maligní melanom), HeLa (adenokarcinom děložního čípku) a BJ (lidský fibroblast) s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmezí 2,2-14,7  $\mu M$  <sup>44</sup>.

**Tabulka 2:** Souhrnná tabulka vyjadřující *in vitro* cytotoxickou aktivitu haemanthaminu<sup>40,45,46</sup>.

	Buněčná linie	Hodnota IC <sub>50</sub> (μM)	Metoda
HL-60	akutní promyelocytární leukémie	0,9 ± 0,1	WST-1 (48 h)
Jurkat	akutní leukemické buňky	1,4 ± 0,3	WST-1 (48 h)
MOLT-4	T-lymfoblasty	1,2 ± 0,1	WST-1 (48 h)
A549	karcinom plic	1,1 ± 0,2	WST-1 (48 h)
H1299	karcinom plic	1,2 ± 0,2	WST-1 (48 h)
COLO-201	adenokarcinom tlustého střeva	1,0 ± 0,1	WST-1 (48 h)
HT-29	kolorektální karcinom	0,3 ± 0,1	WST-1 (48 h)
SW-480	adenokarcinom tlustého střeva	0,7 ± 0,1	WST-1 (48 h)
AGS	adenokarcinom žaludku	1,0 ± 0,2	WST-1 (48 h)
PANC-1	karcinom slinivky	9,8 ± 0,4	WST-1 (48 h)
A2780	ovariální karcinom	0,7 ± 0,4	WST-1 (48 h)
HeLa	adenokarcinom děložního čípku	0,6 ± 0,1	WST-1 (48 h)
BT-549	metastatický karcinom prsu	1,0 ± 0,2	WST-1 (48 h)
MCF-7	adenokarcinom prsu	0,8 ± 0,1	WST-1 (48 h)
MDA-MB-231	triple negativní karcinomy prsu	9,5 ± 0,2	WST-1 (48 h)
SAOS-2	osteosarkom	1,1 ± 0,4	WST-1 (48 h)
NHDF	kožní fibroblast	0,5 ± 0,1	WST-1 (48 h)
HL-60	akutní promyelocytární leukémie	1,6 ± 0,06	MTT (24–72 h)
HSC-2	skvamocelulární karcinom	28,4 ± 1,56	MTT (24–72 h)
SW1573	karcinom plic	2,1 ± 2,0	MTT (24–72 h)
T47-D	karcinom prsu	0,9 ± 0,4	RB (48 h)
WiDr	adenokarcinom tlustého střeva	1,2 ± 0,5	RB (48 h)

\* hodnoty jsou průměrem se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření



**Obrázek 5:** Struktury haemanthaminu, haemanthidinu, krininu a distichaminu<sup>7,44</sup>.

Kromě negativního vlivu na proliferaci a životaschopnost nádorových buněk, vykazoval haemanthamin v koncentraci 1 mg/ml výraznou antioxidační aktivitu v rámci DPPH testu<sup>47</sup>. Na základě tohoto zjištění je možné předpokládat, že antioxidační aktivita haemanthaminu může přispívat k jeho antiproliferativnímu a cytotoxickému účinku pozorovanému u nádorových buněk. V další studii bylo prokázáno, že haemanthamin je schopen tvořit komplex s RNA na multirezistentních myších lymfomových buňkách L5178, což vede k výrazné inhibici

růstu nádorových buněk<sup>48</sup>. Ačkoli molekulární mechanismus haemanthaminu ještě nebyl plně identifikován, předchozí studie ukázaly, že haemanthamin může inhibovat syntézu proteinů vazbou na centrum peptidyl transferasy, ribozomální podjednotky 60S a zabránit tak tvorbě peptidových vazeb<sup>44,49</sup>. Haemanthamin může také indukovat nukleární stres a inhibovat biogenezi ribozomů, čímž aktivuje protinádorovou odpověď závislou na p53<sup>49</sup>. Kromě toho může haemanthamin indukovat apoptózu u celé řady nádorových linií, včetně buněk karcinomu vaječníků A2780, stejně jako u p53-negativních T-buněčných leukemických buněk Jurkat aktivací kaspas<sup>50-52</sup>.

V roce 2016 byly provedeny farmakokinetické studie, které bohužel prokázaly krátký poločas haemanthaminu a jeho rychlou eliminaci z organismu, a to především močí<sup>53</sup>. V rámci této studie byl haemanthamin podáván formou intravenózního bolusu (10 mg/kg) samicím krys s Lewisovým nádorem. Haemanthamin se v těle rychle distribuoval, přičemž maximální plazmatická koncentrace byla dosažena během 4 minut po podání. Bylo zjištěno, že rychlá eliminace haemanthaminu z těla probíhá právě močí, protože jeho koncentrace byla o dva řády vyšší než koncentrace ve žluči nebo v plazmě (Hroch et al. 2016). Takové farmakokinetické vlastnosti haemanthaminu naznačují potenciální renální toxicitu, a proto je nutné dosáhnout formy s pomalejší eliminací tak, aby se prodloužila doba trvání účinku léčiva. Díky poznatkům z této studie je tedy potřebné hledat vhodnější formu tohoto zajímavého alkaloidu.

S ohledem na zaměření této dizertační práce je vhodné také zmínit inhibiční aktivitu haemanthaminu vůči enzymům, které se uplatňují u AD. Tento alkaloid byl poprvé na našem pracovišti testován vůči enzymům acetylcholinesteráse (AChE) a butyrylcholinesteráse (BuChE) v roce 2013 po jeho izolaci z čerstvých cibulí *Zephyranthes robusta*<sup>54</sup>. V rámci těchto studií byl haemanthamin identifikován jako zcela neaktivní ( $IC_{50} > 1$  mM). Následné studie ale prokázaly, že některé polysyntetické deriváty tohoto alkaloidu, vykazují zajímavé inhibiční aktivity vůči oběma zmíněným enzymům. Z těchto důvodů, a i s ohledem na skutečnost, že se jedná o jeden z nejvíce rozšířených amarylkovitých alkaloidů a je možné ho izolovat z rostlinného materiálu v gramových množstvích, byl tento alkaloid vybrán pro optimalizaci jeho struktury s případným využitím v terapii AD<sup>55,56</sup>.

### 3.3 Alzheimerova choroba a její problematika

Alzheimerova choroba je progresivní neurologická porucha a je nejčastější příčinou demence, která představuje odhadem až 70 % všech případů po celém světě<sup>57</sup>.

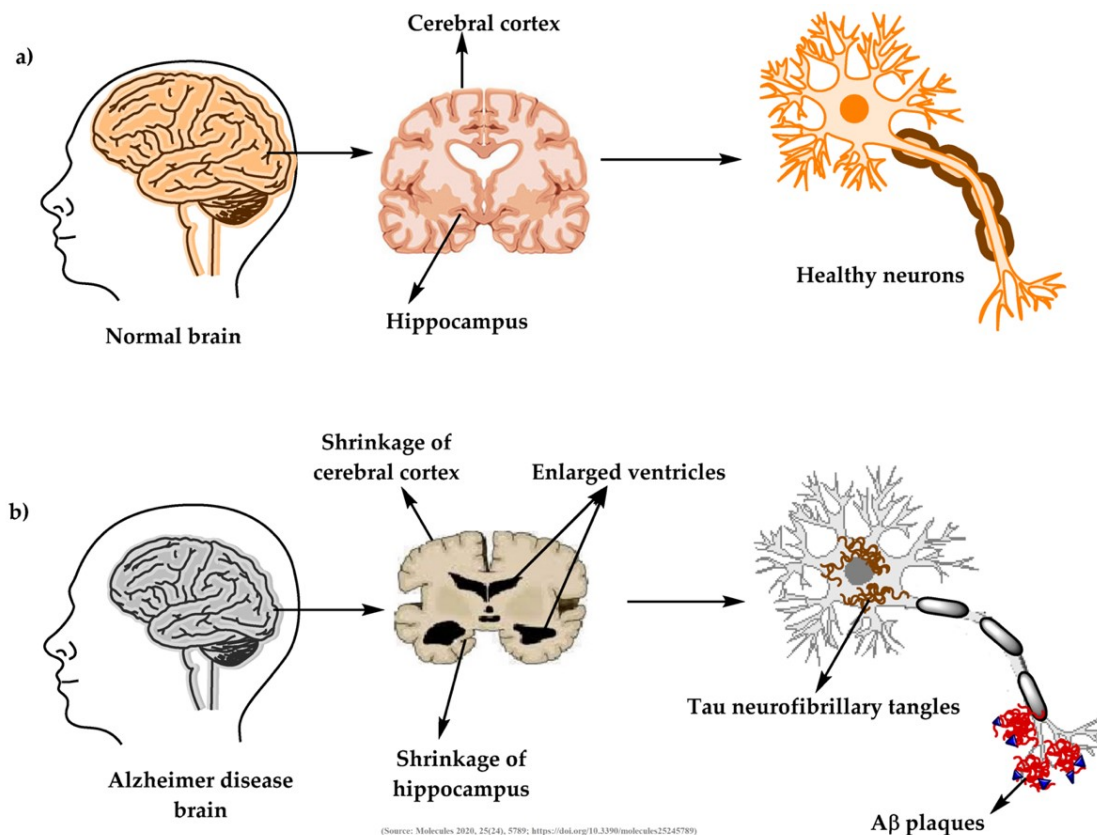
Jako první popsal toto onemocnění německý psychiatr a neuropatolog Alois Alzheimer v roce 1906. Jednalo se o případ 51-leté ženy s poruchami řeči, psychiatrickými problémy a rovněž se u pacientky rapidně zhoršovala paměť. Žena zemřela o čtyři roky později zcela dementní. Po jejím úmrtí byla provedena pitva, která odhalila několik zvláštních plaků, vláken a neuronální úbytek v mozku<sup>57-59</sup>. Alzheimerovy poznatky nebyly zpočátku vědeckou komunitou příliš přijímány, později však po letech výzkumu na mozkových tkáních, bylo toto neurodegenerativní onemocnění po pojmenováno právě něm. Mezi další nemoci způsobující demenci patří Parkinsonova choroba, demence s Lewyho tělísky a Huntingtonova nemoc.

Největším rizikovým faktorem je stárnutí a charakteristickým rysem této nemoci je nenápadný plíživý začátek, kdy si prvních příznaků povšimne spíše okolí než samotný pacient. Klinicky je AD charakterizována progresivní ztrátou paměti a kognitivních funkcí, přičemž rané příznaky zahrnují obtížné vzpomnutí si na nedávné situace, rozhovory, ale i jména či na své nejbližší. S progresí tohoto onemocnění jsou pak spojovány prohlubující se obtížné komunikativní schopnosti, soustředivost, následně změny osobnosti, špatný úsudek, ale i deprese spojené s pesimistickými vzpomínkami<sup>12,60-62</sup>. Na základě statistik až 10 % lidí ve věku nad 65 let trpí AD, u lidí nad 85 let je to více než 30 % osob, které jsou zasaženi tímto onemocněním. Současně se předpokládá, že množství pacientů s neustále se prodlužující se délkou dožití, vzroste v roce 2050 až na 150 miliónů případů. Toto onemocnění se tedy stává i významným sociálním problémem, neboť péče o pacienty v pokročilých fázích je velmi náročná nejen pro samotného pacienty, ale i pro jejich nejbližší okolí.

V současné době je příčina nemoci sice stále nejasná, v minulých letech ale byla popsána celá řada procesů a teorií, které vysvětlují jednotlivé biochemické děje uplatňující se u AD. Nejprve je nutné poznamenat, že existují dvě formy tohoto onemocnění, přičemž první z nich je tzv. familiární forma AD, která se objevuje již v raném věku (často již před 60. rokem života). Zde hrají velký význam genetické předpoklady a tato forma AD je zodpovědná za přibližně 5-10 % případů. Familiární forma AD je obvykle způsobena vrozenými mutacemi v některých důležitých genech<sup>63</sup>. Druhá a častější, je tzv. sporadická forma AD, která tvoří 85 až 90 % všech případů, přičemž příznaky se poprvé objevují typicky mezi 60. a 70. rokem života. Prvotním příčinám sporadické Alzheimerovy choroby rozumí věda méně, předpokládá se, že roli zde hraje obecné opotřebení tkání, jako je patologie lysozomů, dysfunkce mitochondrií, oxidační stres či zánětlivé projevy<sup>63</sup>.

Mezi konkrétní histopatologické znaky toho onemocnění v mozku patří: extracelulární akumulace plaků amyloidu beta ( $A\beta$ ), NFTs obsahující hyperfosforylovaný protein tau, zánětlivé procesy v mozku a atrofie (Obrázek 6). Na patogenezi onemocnění se také významně podílí oxidační stres, dyshomeostáza kovových iontů a další faktory <sup>64,65</sup>. V poslední zmíněné teorii hraje důležitou roli intracelulární vápník, který je klíčový v regulaci neuronálních funkcí. Právě při amyloidogenním štěpení dochází k narušení  $Ca^{2+}$  homeostázy a tím je narušena jeho signalizace, což má za následek ovlivnění mechanismů odpovědných za učení a paměť <sup>66</sup>. Dalším rizikovým faktorem je expozice pacientů v prostředí těžkých kovů. Látky s prokázanými neurotoxickými účinky jsou například olovo a kadmium. S těmi se lze setkat při práci v těžkém průmyslu či silně znečištěném prostředí. Mezi další látky dále patří měď, olovo či zinek, které se objevují v potravinách, jako jsou listová zelenina, obilí či koryši <sup>67</sup>.

AD, jakožto vážné neurodegenerativní onemocnění, je v současné době cílem intenzivního zkoumání. Mechanismus zodpovědný za akumulaci  $A\beta$ , formaci NFTs a jejich ukládání nebyl doposud jednoznačně popsán a z tohoto důvodu je v posledních letech věnována pozornost signálním drahám vedoucích k těmto patofyziologickým procesům, jež jsou možnými terapeutickými cíli v léčbě AD <sup>68</sup>.



**Obrázek 6:** Porovnání mozku zdravého člověka a člověka s Alzheimerovou chorobou <sup>69</sup>.

### 3.3.1. Cholinergní hypotéza vzniku Alzheimerovy choroby

Nejstarší a nejvíce prostudovanou teorií vzniku AD je cholinergní hypotéza, která je charakterizována ztrátou cholinergních funkcí v důsledku poruchy metabolismu acetylcholinu (ACh). Klíčovou roli zde hraje právě neurotransmitter ACh, který je zásadní pro fungování periferního i centrálního nervového systému (CNS). V CNS jsou cholinergní neurony hojně distribuovány téměř ve všech oblastech mozku a z toho vyplývá, že cholinergní transmise je zodpovědná za modulaci důležitých nervových funkcí<sup>70</sup>. Cholinergní systém se podílí na důležitých fyziologických procesech jako jsou paměť, schopnost pozornosti a učení se, bdění, spánek, ale i reakce těla na stres<sup>71</sup>. Syntéza ACh probíhá v cytoplasmě neuronů, kde je syntetizován pomocí enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT, EC 2.3.1.6) z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). Po uvolnění ACh do synaptické štěrbině je nenačlánčený ACh odbouráván na acetát a cholin, a to acetylcholinesterásami, konkrétně enzymem acetylcholinesterásou (EC 3.1.1.7).

U AD je cholinergní systém porušen na více úrovních<sup>72</sup>. Dochází ke snížení hladiny enzymu ChAT, která je zodpovědná za syntézu ACh v mozku, dále je sníženo zpětné vychytávání cholinu, jeho tvorba a uvolnění ACh z presynaptických zakončení. Počet muskarinových receptorů zůstává relativně nezměněn, zatímco počet nikotinových receptorů je naopak snížen<sup>73</sup>. V pozdějších stádiích AD dochází k poklesu aktivity enzymu AChE, který se podílí na odbourávání ACh v organismu. Na odbourávání ACh se nepodílí jen AChE, ale i další enzym butyrylcholinesterása (EC 3.1.1.8)<sup>74,75</sup>. Za normálních podmínek je BuChE zodpovědná asi za 20 % z celkové cholinesterásové aktivity v mozku, v pozdějších fázích AD toto číslo stoupá až na 40–90 % s tím, že naopak aktivita AChE výrazně klesá<sup>76</sup>. Z toho lze usuzovat, že BuChE přebírá roli AChE jako klíčového enzymu při hydrolýze ACh a je tedy považován za „záložní enzym“ při cholinergní neurotransmisí<sup>77</sup>. Histochemická lokalizace BuChE ukázala, že úzce souvisí s progresivní agregací A $\beta$ , což bylo také prokázáno ve studiích u BuChE-knockout myši. Použitím inhibitorů BuChE byly fibrilární A $\beta$  plaky v mozku myši významně sníženy. Výsledky těchto studií naznačují, že inhibice BuChE by mohla být potenciálem pro odstranění abnormální agregace A $\beta$  a novou strategií pro léčbu pokročilejších stádií AD<sup>74,75,78</sup>.

Kromě AD byla zvýšená aktivita BuChE také prokázána i u dalších onemocnění, jako je hypertyreóza, diabetes mellitus 1. a 2. typu, hyperlipidemie, obezita nebo urémie a byla identifikována určitá souvislost s metabolickým syndromem<sup>79,80</sup>.

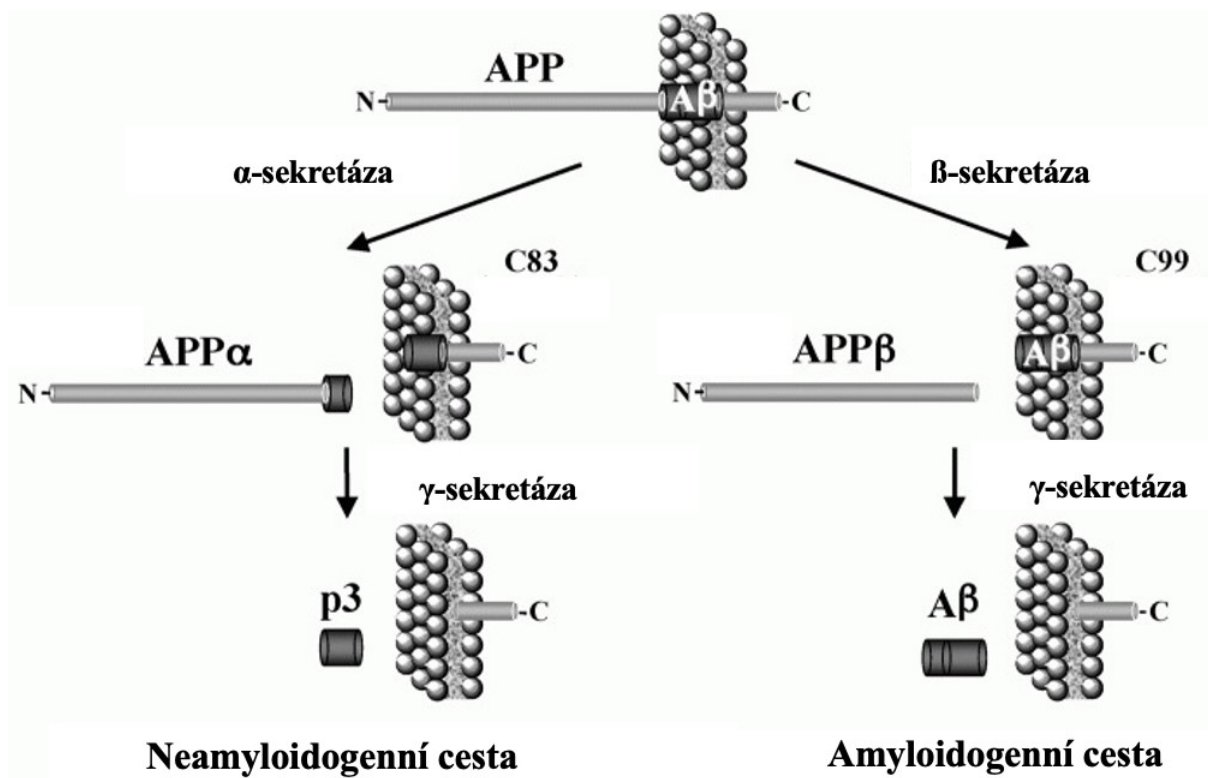
### 3.3.2. Hypotéza amyloidní kaskády

Hypotéza amyloidní kaskády bere v potaz A $\beta$  jako primární příčinu onemocnění. Akumulovaný peptid A $\beta$  je hlavní komponentou senilních plaků a vychází z proteolytického štěpení delšího glykoproteinu zvaného amyloidní prekursorový protein (APP) <sup>81</sup>. APP je transmembránový protein a může být štěpen třemi typy proteas, které jsou označovány jako  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -sekretasa <sup>82</sup>.

U zdravého člověka, je nejčastější cesta štěpení APP prostřednictvím  $\alpha$ -sekretasy, jinak nazývaná jako neamyloidogenní cesta. Štěpení APP tímto typem sekretasy vzniká C-terminální fragment o délce 83 AMK (C93) a rozpustný APP $\alpha$ , který je následně štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku neškodného proteinu p3 o velikosti 3 kDa a APP intracelulární domény (AICD) <sup>83</sup>. Vzniklý APP $\alpha$ , má neuroprotektivní účinky a již v 90. letech bylo prokázáno, že tento protein podporuje růst a přežití neuronů <sup>82,84</sup>.

Při amyloidogenním štěpení APP iniciovaného enzymem  $\beta$ -sekretasou (BACE-1, EC 3.4.23.46) vzniká C-terminální fragment o velikosti 99 aminokyselin (C99) a rozpustné ektodomény APP $\beta$ . Uvolnění A $\beta$  z APP vyžaduje působení nejen BACE-1, ale i  $\gamma$ -sekretasy, která zpracovává APP $\beta$  za vzniku neurotoxických plaků společně s AICD <sup>85</sup>. Výsledkem tohoto proteolytického štěpení jsou extracelulární depozity peptidů o variabilní délce 39 až 42 AMK, v závislosti na místě štěpení (A $\beta$ 40 nebo A $\beta$ 42), které se označují jako amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) (Obrázek 7). Jednotlivé monomery A $\beta$  agregují do různých shluků za vzniku oligomerů, protofibril a fibril. Oligomery jsou rozpustné a mohou se rozšiřovat po celém mozku, připojují se na synapse a poškozují neurony, zatímco amyloidní fibrily jsou větší, nerozpustné, heterogenní a shlukují se do senilních plaků. Ty se nejčastěji nacházejí v mozkové kůře, neokortexu. Seskupováním senilních plaků dochází nejen k poškození mozku, ale následně jsou vyvolávány oxidační a zánětlivé procesy vedoucí k nevratnému poškození tkání v mozku vedoucí ke smrti neuronů <sup>86</sup>. Isoforma A $\beta$ 40 převažuje a je solubilní, naopak forma A $\beta$ 42 snadno podléhá agregaci a je dominantní v senilních placích <sup>87</sup>.

Jak bylo uvedeno výše, na tvorbě A $\beta$  se podílí především enzym BACE-1 a  $\gamma$ -sekretasa. Z těchto důvodů se tyto enzymy staly klíčovými terapeutickými cíli ve vývoji potencionálních léčiv pro nesymptomatickou léčbu AD. Terapeuticky je význam inhibitorů  $\gamma$ -sekretasy vnímán negativně z důvodu jejího zapojení do Notch signální cesty <sup>88</sup>. Tyto inhibitory disponují při dlouhodobém podávání výraznou toxicitou a z těchto důvodů se vývoj zaměřuje především na inhibitory BACE-1. U modelových myší s vypnutým genem pro BACE-1 však byly zaznamenány negativní účinky, jako byl nárůst spontánních nebo indukovaných záchvatů a navíc byla zvýšena i neonatální letalita <sup>89-92</sup>.



Obrázek 7: Teorie amyloidní kaskády <sup>93</sup>.

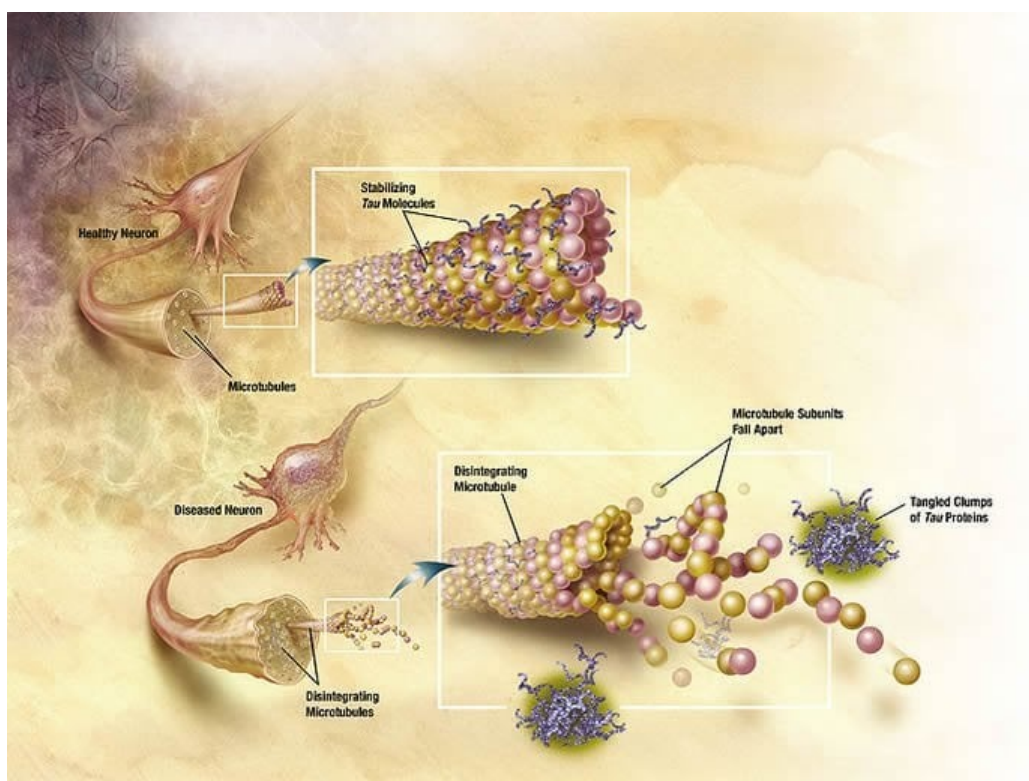
### 3.3.3. Teorie hyperfosforylovaného proteinu

Další hypotézou, která se uplatňuje v patogenezi AD, je přítomnost NFTs, která jsou tvořena párovými helikálními filamenty hyperfosforylovaného tau proteinu <sup>94,95</sup>.

Tau protein je protein přirozeně vyskytující se v lidském těle a za normálních okolností se nachází uvnitř nervových buněk, neuronů. Podílí se především na udržování stability mikrotubulů v axonech a navíc hraje důležitou roli v axonálním transportu. Za patologických podmínek u pacientů s AD, je tau protein nadměrně fosforylován prostřednictvím glykogen synthasy kinasy-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ , E.C. 2.7.11.26). Následně tau protein agreguje (ztráta stability, porušení transportu v axonu, rozpad cytoskeletu) a vytváří NFTs. Výsledkem celého procesu je zánik neuronů a rozvoj demence (Obrázek 8) <sup>96,97</sup>. Glykogen syntasa kinasa-3 (GSK-3) je všudypřítomná kinasa v lidském těle zapojená do regulace mnoha klíčových buněčných drah, z nichž část se právě účastí při neurodegenerativních procesech. Tento enzym byl poprvé popsán v 80 letech 20. století <sup>98</sup>. V lidském těle se vyskytují dvě isoformy GSK-3, a sice GSK-3 $\alpha$  a GSK-3 $\beta$ , které jsou kódovány dvěma různými geny a mají 98% podobnost ve struktuře. V CNS je nejčastěji přítomná isoforma GSK-3 $\beta$  a s rostoucím věkem se zvyšuje její exprese <sup>99</sup>. Studie prokázaly, že APP a presenilin 1, tedy podsložky  $\gamma$ -sekretasy, jsou substráty právě enzymu GSK-3 $\beta$ . <sup>100</sup>.



Nejnovější studie naznačují, že GSK-3 $\beta$  je důležitým a zajímavým terapeutickým cílem nejen u pacientů s AD, ale její inhibice se může uplatnit i u terapie bipolární poruchy, cévní mozkové příhody a u celé řady různých typů nádorových onemocnění<sup>101–103</sup>.



**Obrázek 8:** Teorie hyperfosforylovaného tau proteinu<sup>104</sup>.

Mezi další diskutované příčiny tohoto závažného onemocnění patří teorie oxidačního stresu a nerovnováhy, koncepce mírných kognitivních poruch, teorie oxidu dusnatého a nověji i infekční teorie<sup>105–108</sup>.

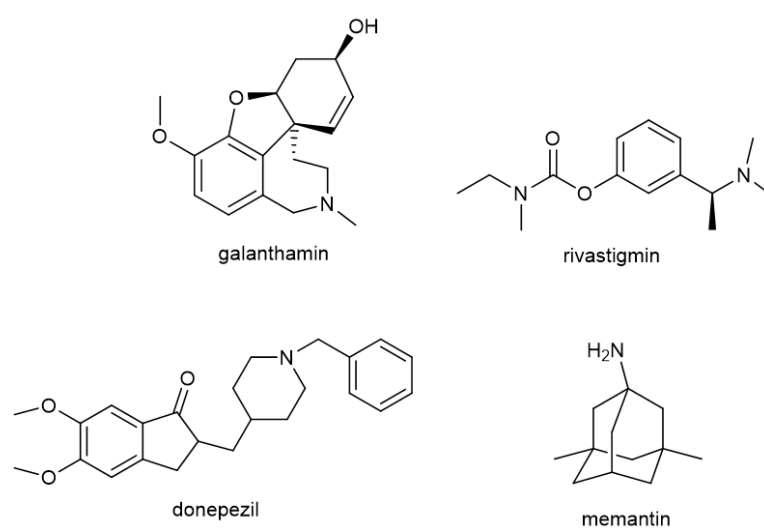
### 3.3.4. Terapie Alzheimerovy choroby

Jak již bylo uvedeno, vzhledem k tomu, že neznáme podstatu AD, jedná se o nevyléčitelnou chorobu. Co je v současné době možné, je zmírnit její příznaky a projevy, a tak zkvalitnit život pacienta co nejvíce. Důležitou roli hraje i včasná diagnostika a co nejrychlejší nasazení podpůrné medicíny<sup>109</sup>.

Současná terapie AD je zaměřena především na cholinergní hypotézu vzniku AD, kdy tzv. inhibitory AChE (AChEi) inhibují AChE, což vede ke snížení odbourávání ACh, a tím dochází ke zvýšení ACh v neuronální štěrbině a úpravě cholinergní transmise. AChEi sice nejsou schopny AD vyléčit ani trvale zamezit progresi onemocnění, ale jsou schopny zpomalit průběh choroby a oddálit tak přechod nemoci do těžkých stadií po dobu několika měsíců. V současné

době jsou používány tři léčiva, které inhibují AChE. Konkrétně se jedná o následující látky: donepezil, galanthamin a rivastigmin. Donepezil (Aricept®) je piperidinový derivát, který působí jako čistý nekompetitivní a reverzibilní AChEi. Rivastigmin (Exelon®) je látka karbamátového typu, která působí jako pseudoireverzibilní AChEi a BuChE a je prozatím jedinou látkou, která působí na oba enzymy. Poslední látkou z této skupiny je galanthamin (Razadyne® v USA a Reminyl® v Evropě a dalších zemích), Amaryllidaceae alkaloid původně izolovaný z cibulí rostliny *Galanthus woronovii*, který působí jako kompetitivním a reverzibilním AChEi a zároveň alostericky moduluje nikotinové acetylcholinové receptory 33,57–59,110.

V patofyziologii AD se také uplatňuje snížená aktivita GABAergního systému a vyšší citlivost k excitotoxicitě vyvolané glutamátem<sup>111,112</sup>. Nadměrnou aktivací ionotropních glutamátových receptorů dochází k nadměrnému vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk a k aktivaci řady enzymů a kaskádám reakcí, kterou mohou končit programovanou buněčnou smrtí neboli apoptózou. Vedle AChEi se v terapii AD používá také memantin (3,5-dimethyladamantan-1-amin), který účinkuje jako antagonist *N*-methyl-D-aspartát (NMDA) glutamátových receptorů; tj. blokuje zvýšenou aktivitu těchto receptorů, a umožňuje jejich fyziologickou funkci nezbytnou pro tvorbu paměťových stop<sup>113,114</sup>. Rozsáhlé studie prokázaly jeho efekt u středně těžkých, až těžkých stádií AD. Uvádí se, že u mírných stádií AD jeho použití nepřináší žádný pozitivní efekt a v roce 2014 byla schválena fixní kombinace donepezilu a memantinu<sup>58,73,110,115</sup>. Struktury jednotlivých látek jsou znázorněny v následujícím obrázku (Obrázek 9).



**Obrázek 9:** Struktury Amaryllidaceae alkaloidů používané v terapii Alzheimerovy choroby<sup>7,116–118</sup>.

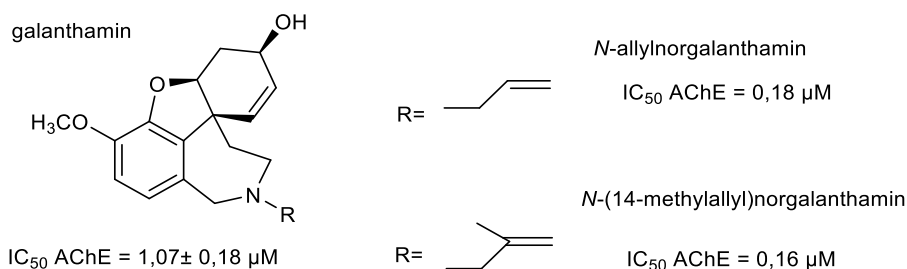
V červnu 2021 byl pro pacienty s mírnou formou AD schválen FDA v USA nový lék s názvem aducanumab, který je na trhu dostupný pod názvem Aduhelm<sup>TM</sup> <sup>119</sup>. Aducanumab je lidská monoklonální protilátka IgG1, která by měla být schopna snižovat depozita A $\beta$  v mozku. Jde o první lék schopný ovlivnit vlastní patofyziologické procesy u pacientů s AD <sup>120</sup>. Na druhou stranu, toto rozhodnutí bylo vysoce kontroverzní a vedlo k rezignaci tří poradců FDA kvůli absenci důkazů o účinnosti léku, neboť klinické studie přinesly protichůdné výsledky <sup>121</sup>. V lednu tohoto roku byla zrychlenou cestou schválena další monoklonální protilátka, lecanemab (Lequembimab<sup>TM</sup>) <sup>122</sup>. Stejně jako u aducanumabu, je u tohoto léčiva uváděna schopnost redukovat depozita A $\beta$  a zpomalit pokles kognice u pacientů s ranou fází AD. Léčba je však spojena s nežádoucími účinky, tudíž další studie o bezpečnosti a účinnosti této látky jsou velmi potřebné <sup>123</sup>.

### **3.4 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae v souvislosti s možným využitím v terapii Alzheimerovy choroby**

V roce 2001 byl agenturou FDA registrován amarylkovitý alkaloid galanthamin, který je dodnes používán ke zmírnění příznaků počátečních a mírných stádií AD <sup>124</sup>.

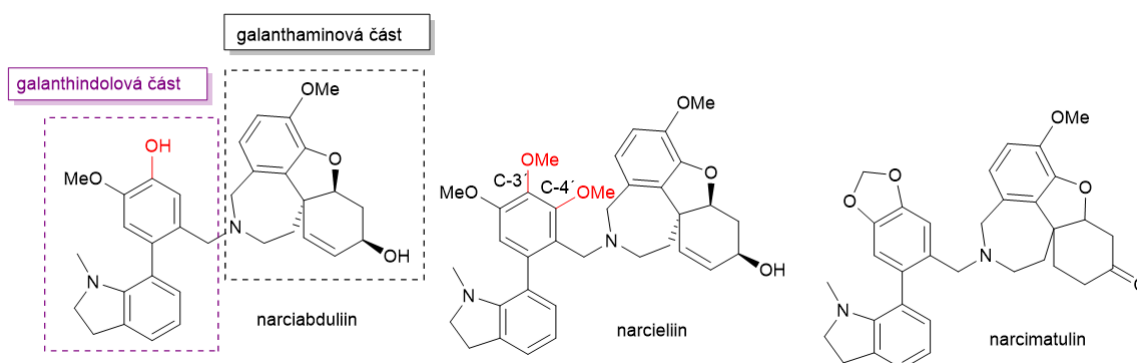
Tato skutečnost byla impulsem pro různé vědecké skupiny k hledání nových, pokud možno ještě aktivnějších inhibitorů cholinesterás z rostlin čeledi Amaryllidaceae. Do dnešní doby bylo izolováno a testováno velké množství těchto sloučenin patřících do různých strukturních typů. Zároveň na toto téma byla publikována celá řada přehledových studií a z těchto důvodů se zde zaměřím pouze na látky se srovnatelnou nebo vyšší inhibiční aktivitou, než je sám galanthamin a dále na amarylkovité alkaloidy izolované na našem pracovišti <sup>5,5,125–128</sup>. Za inhibiční aktivitu galanthaminu jsou zodpovědné čtyři strukturní prvky v jeho molekule: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh sám o sobě, terciální aminoskupina a methoxyskupina.

Mezi nejzajímavější AChEi *in vitro* patří především deriváty galanthaminu, jako je sanguinin, který ve své struktuře má místo methoxyskupiny druhou hydroxyskupinu. Tato záměna je zodpovědná až za desetinásobné zvýšení inhibiční aktivity vůči AChE. Stejný efekt byl popsán u látek s allylovou skupinou na atomu dusíku jako je *N*-allylnorgalanthamin a *N*-(14-methylallylnorgalanthamin) (Obrázek 10) <sup>129</sup>. Problémem většiny těchto látek je jednak jejich velmi nízká dostupnost z rostlinného materiálu a také vyšší polarita, kdy nižší distribuční koeficient brání přestupu přes hematoencefalickou bariéru (HEB) <sup>54,127,129</sup>.



**Obrázek 10:** Deriváty galanthaminu s významnou inhibiční aktivitou vůči AChE včetně hodnot  $IC_{50}$  <sup>62,127,129</sup>.

Jak již bylo dříve uvedeno, v posledních pěti letech byly na našem pracovišti v rámci detailních fytochemických studií izolovány sloučeniny nových strukturálních typů amarylkovitých alkaloidů, a to narcikachninového a karltoninového typu z rostlin *Zephyranthes citrina*, *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carton, *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master a *N. poeticus* cv. Pink Parasol <sup>15,16,130,131</sup>. Alkaloidy narcikachninového typu ve své struktuře kombinují galanthaminový a galanthindolový strukturální typ (Obrázek 11). Jedná se tedy vedle zástupců pallidiflorinového strukturálního typu o další zástupce dimerních amarylkovitých alkaloidů.



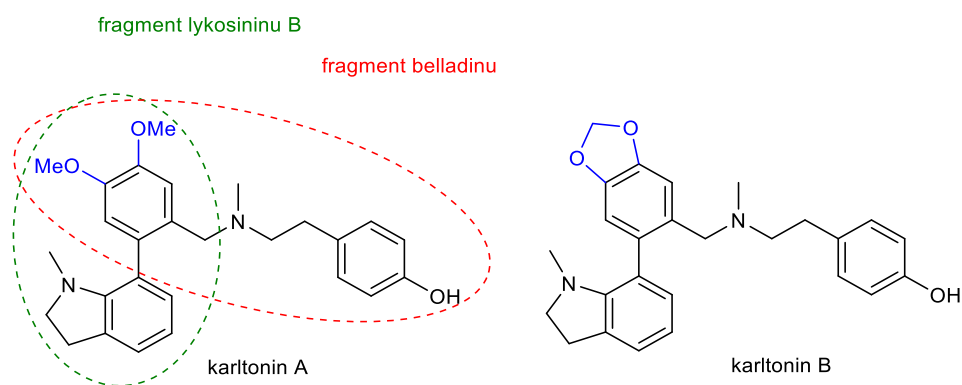
**Obrázek 11:** Vybrané alkaloidy narcikachninového strukturálního typu <sup>126</sup>.

Čtyři z těchto nově izolovaných alkaloidů byly podrobeny screeningu vůči AChE a BuChE. Zajímavým inhibitorem s vyváženou inhibiční aktivitou vůči oběma testovaným enzymům v mikromolárních koncentracích se ukázal být alkaloid narcikachninového typu, narciabdullin, izolovaný z *N. pseudonarcissus* cv. Carton s hodnotami  $IC_{50}$  pro AChE  $3,29 \pm 0,73 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  pro BuChE  $3,44 \pm 0,02 \mu\text{M}$  <sup>130</sup>. Další alkaloid tohoto typu, narcieliin, izolovaný ze *Z. citrina*, se ukázal být také dobrým inhibitorem vůči oběma enzymům s hodnotami  $IC_{50}$  pro AChE  $18,7 \pm 2,3 \mu\text{M}$  a  $IC_{50}$  pro BuChE  $1,34 \pm 0,31 \mu\text{M}$ . Tento alkaloid byl také testován pro svůj inhibiční potenciál vůči POP (prolyloligopeptidasa), kdy zjištěná inhibice narcieliinu ( $IC_{50}$   $163 \pm 13 \mu\text{M}$ )

byla srovnatelná s berberinem ( $IC_{50} 142 \pm 21 \mu M$ ), který je považován za přírodní inhibitor tohoto enzymu <sup>16,132</sup>. Nejvyšší inhibiční účinek vůči POP ze všech amarylkovitých alkaloidů narcikachninového typu byl zjištěn u narcimatulinu, izolovaného z *N. pseudonarcissus* cv. Dutch Master ( $IC_{50} 29,1 \pm 1,0 \mu M$ ). Kromě toho tento alkaloid vykázal také zajímavý inhibiční účinek vůči BuChE ( $IC_{50} 5,9 \pm 0,2 \mu M$ ) a je i mírným inhibitorem enzymu GSK-3 $\beta$  ( $IC_{50} 20,7 \pm 2,4 \mu M$ ) <sup>15</sup>.

I přestože je tato skupina amarylkovitých alkaloidů velice zajímavá díky svým biologickým aktivitám, problémem je však jejich velmi omezená dostupnost z rostlinného materiálu. Z mnoha kilogramů čerstvého rostlinného materiálu se podařilo izolovat vždy do 20 miligramů zmíněných sloučenin <sup>16,34,130</sup>. Je tedy nereálné, že by tyto látky mohly být izolovány z rostlin pro praktické využití. Do budoucna by bylo vhodné se zaměřit na studium možnosti totální syntézy těchto sloučenin a jejich derivátů za účelem podrobných studií vztahu struktura-účinek.

Z rostliny *N. pseudonarcissus* cv. Carton byly navíc izolovány tři nové alkaloidy, které jsou strukturně odvozené od belladinu. V jejich struktuře se překrývá belladinová část s fragmentem lykosininu B (Obrázek 12). Vzhledem k tomu, že se v jejich struktuře vyskytují dva atomy dusíku, čímž se významně odlišují od zmíněných strukturních typů, byl zaveden nový strukturní typ amarylkovitých alkaloidů, a to karltoninový <sup>34</sup>. Dva alkaloidy nově izolovaných sloučenin, karltonin A a karltonin B, navíc disponovaly vysokou selektivní inhibicí vůči *h*BuChE s  $IC_{50}$  v nanomolárních hodnotách (karltonin A  $IC_{50} = 0,913 \pm 0,02 \mu M$ , karltonin B  $IC_{50} = 0,031 \pm 0,002 \mu M$ ). Vzhledem k izolovanému množství byl z těchto látek testován inhibiční potenciál vůči BuChE pouze u karltoninu A, kdy získaná hodnota  $IC_{50} 143 \pm 12$  byla opět srovnatelná s použitým standardem berberinem <sup>34</sup>. U těchto látek se opět setkáváme se stejným fenoménem jako u alkaloidů narcikachninového typu, tedy velmi nízkou dostupností z rostlinného materiálu, na druhou stranu tyto alkaloidy, resp. jejich deriváty je možné připravit relativně jednoduchou polosyntetickou cestou. Veškeré biologické aktivity výše zmíněných alkaloidů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 3). Celá řada derivátů těchto látek byla na našem pracovišti již připravena, ale vzhledem k tomu, že se jedná o jinou problematiku, nebude dále rozebírána. Podrobnější informace je možné nalézt v následujících publikačních výstupech <sup>133,134</sup>.



**Obrázek 12:** Vybrané alkaloidy karltoninového strukturního typu <sup>126</sup>.

**Tabulka 3:** Inhibiční aktivity alkaloidů narcikachninového a karltoninové strukturního typu vůči enzymům uplatňující se u Alzheimerovy choroby <sup>126</sup>.

Alkaloid	Strukturní typ	IC <sub>50</sub> AChE (μM)	IC <sub>50</sub> BuChE (μM)	IC <sub>50</sub> POP (μM)	IC <sub>50</sub> GSK-3β (μM)
narciabduliin	narcikachninový	3,29 ± 0,73	3,44 ± 0,02	-	-
narcieliin	narcikachninový	18,7 ± 2,3	1,34 ± 0,31	163 ± 13	-
karltonin B	karltoninový	>30	0,031 ± 0,001	-	-
karltonin A	karltoninový	>30	0,913 ± 0,020	143 ± 12	-
narcimatulin	narcikachninový	>30	5,9 ± 0,2	29,1 ± 1,0	20,7 ± 2,4

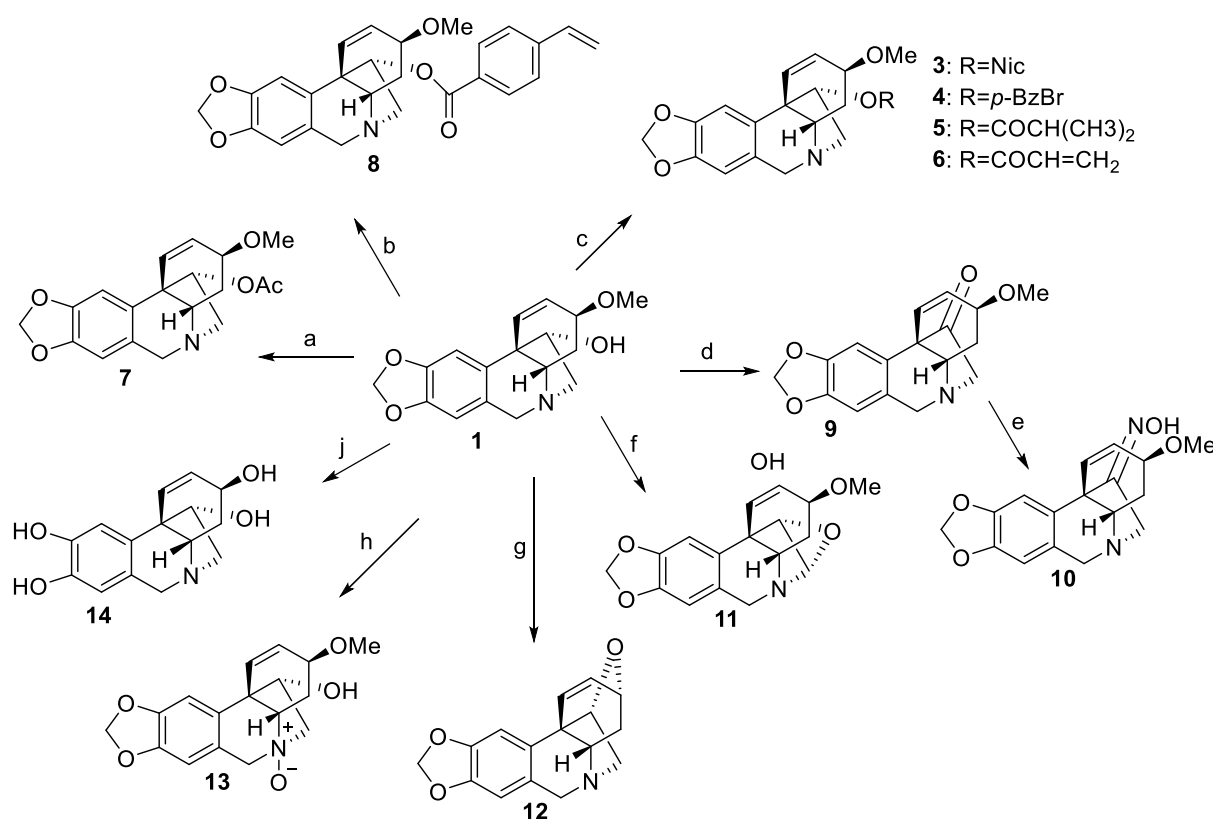
### 3.5 Polosyntetické deriváty haemanthaminu a jejich biologická aktivita

S ohledem na zaměření dizertační práce budou v následující kapitole stručně shrnuty práce, které se zabývaly přípravou derivátů haemanthaminu s následným testováním biologických aktivit. Vzhledem ke skutečnosti, že haemanthamin vykazoval v různých studiích zajímavé biologické aktivity a jeho dostupnost z rostlinného materiálu je možná v gramových množstvích <sup>15,135</sup>, bylo publikováno několik studií zabývajících se přípravou jeho analog s následným testováním jeho biologických účinků.

Ve studii z roku 2012 bylo připraveno 12 pilotních derivátů haemanthaminu <sup>136</sup>, který byl izolován z *Pancreatium canariense* <sup>137,138</sup>. Tyto sloučeniny byly následně podrobeny *in vitro* screeningové studii na antimalarickou aktivitu vůči kmenům *Plasmodium falciparum* citlivým na chlorochin. V rámci studie byl také naznačen vztah mezi strukturou a aktivitou.

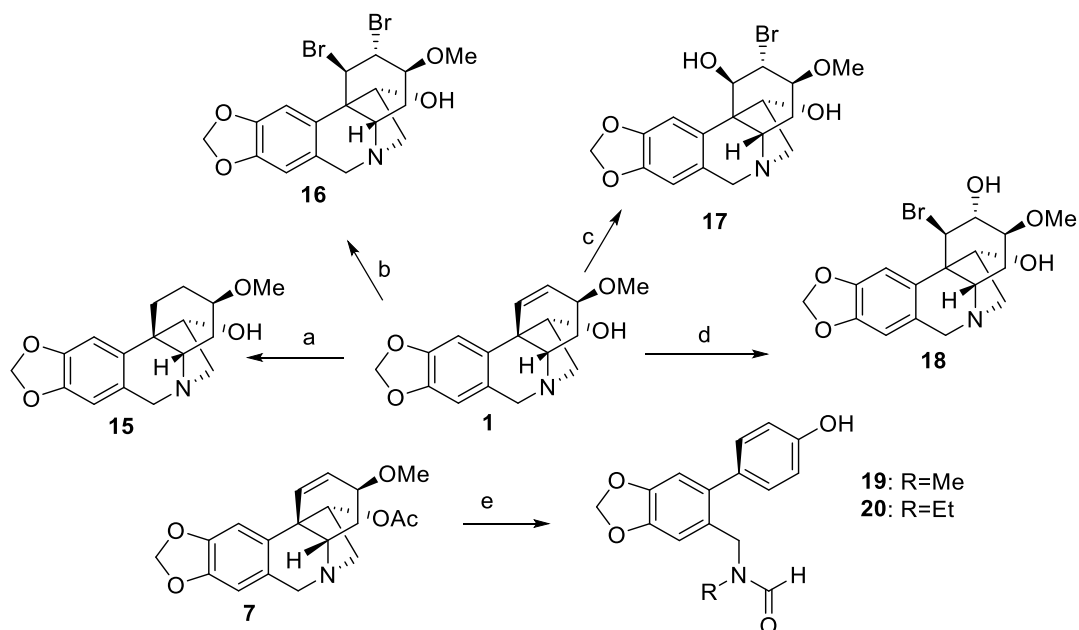
Strukturní obměny haemanthaminu jsou znázorněny v následujícím schématu (Schéma 1). Většina modifikací byla provedena buď na hydroxylové skupině na uhlíku C-1 nebo na dvojně vazbě přítomné v kruhu D. Hydroxylová skupina byla acylována za použití různých acylchloridů (3-6) za vzniku esterů. Anhydrid kyseliny octové byl použit pro přípravu sloučeniny 7 a kyselina *p*-vinylbenzoová pro esterifikaci za vzniku sloučeniny 8. Oxidace

hydroxylové skupiny bylo dosaženo použitím Jonesova činidla za získání odpovídajícího ketonu **9**. Reakce látky **9** s hydrochloridem hydroxylaminu vedla k přípravě látky **10**. Odpovídající epoxid **11** byl připraven reakcí s NBS a apohaemanthamin (**12**) byl získán po reakci haemanthaminu s koncentrovanou HCl. Reakcí s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byl získán odpovídající *N*-oxidový derivát **13**. Polyhydroxylovaný produkt **14** byl získán reakcí látky **1** s BBr<sub>3</sub>.



**Schéma 1:** Strukturální modifikace haemanthaminu (**1**) za účelem testování jejich antimalarické aktivity. Reakční činidla a podmínky (a) Ac<sub>2</sub>O, pyridin; (b) *p*-vinylnbenzoová kyselina, DCC, DCN; (c) RCl, triethylamin, DCM; (d) Jonesovo činidlo, aceton; (e) NH<sub>3</sub>OHCl, NaOAc, EtOH, chladič, 15 h; (f) NBS, DCM; (g) 6M HCl 100 °C, 4 h; (h) 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MeOH, 24 h; (i) BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C <sup>136</sup>.

Hydrogenace a bromace dvojné vazby mezi uhlíky C-1 a C-2 u haemanthaminu vedla k přípravě derivátů **15** a **16**. Deriváty **17** a **18** byly připraveny podle popsaného postupu v práci z roku 2006 <sup>139</sup>. Reakce derivátu **7** s různými alkylhalogenidy následovaná reakcí s *t*-BuOK/*t*-BuOH poskytla další nové deriváty **19** a **20**. Popsané modifikace jsou shrnuty v následujícím schématu (Schéma 2).



**Schéma 2:** Další strukturální modifikace haemanthaminu (**1**) za účelem testování jejich antimalarické aktivity. Reakční činidla a podmínky: (a) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, THF; (b) Br<sub>2</sub>, DCM, 24 h; (c) CH<sub>3</sub>CONHBr, SnCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 0°C; (d) CH<sub>3</sub>CONHBr, SnCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, 0°C; (e) RX, CH<sub>3</sub>CN, 24 h; následně *t*-BuOK/*t*-BuOH, chladič, 4 h<sup>136</sup>.

Analýzou získaných výsledků *in vitro* antimalarického screeningu lze konstatovat, že nejaktivnější látkou ze všech testovaných sloučenin byl haemanthamin (Tabulka 4). Pouze epoxidový derivát **13** vykazoval podobnou antiplasmodiální aktivitu (IC<sub>50</sub> = 1,6 ± 0,1 μM) jako přírodní alkaloid haemanthamin (IC<sub>50</sub> = 1,3 ± 0,2 μM).

**Tabulka 4:** *In vitro* antimalarická aktivita vůči *P. falciparum* F32 haemanthaminu (**1**) a jeho semisyntetických derivátů<sup>136</sup>.

Sloučenina	IC <sub>50</sub> (μM)	Sloučenina	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	1,3 ± 0,2	<b>13</b>	1,6 ± 0,1
<b>7</b>	75,8 ± 8,7	<b>14</b>	73,5 ± 10,0
<b>8</b>	> 100	<b>15</b>	95,5 ± 9,5
<b>9</b>	51,7 ± 4,9	<b>16</b>	92,9 ± 14,8
<b>10</b>	43,3 ± 4,1	<b>18</b>	> 100
<b>11</b>	56,6 ± 8,1	<b>19</b>	9,9 ± 1,3
<b>12</b>	8,4 ± 1,7	<b>20</b>	6,5 ± 0,9

Další biologická aktivita haemanthaminu a jeho polosyntetických derivátů byla studována ve vztahu s Alzheimerovou chorobou. Vzhledem k zaměření této práce a faktu, že většina těchto studií pochází z našeho pracoviště, bude tato problematika shrnuta v rámci diskuse.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

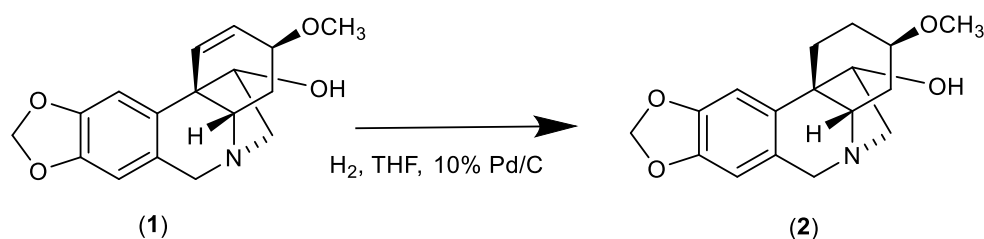
### 4.1 Izolace haemanthaminu pro přípravu polosyntetických derivátů

Haemanthamin (**1**) použitý za účelem přípravy polosyntetických derivátů byl izolován v rámci předchozí fytochemické studie v rámci dizertační práce PharmDr. Elišky Kohelové, Ph.D., přičemž izolace je popsána v následujícím publikačním výstupu.<sup>16,56</sup> Další haemanthamin pro syntetické práce byl získán krystalizací z materiálu, který jsme obdrželi z firmy TEVA (Opava). Pro krystalizaci byla použita směs  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  1:1. Jednalo se o surový haemanthamin, který byl získán během komerční izolace galanthaminu z rostliny *N. pseudonarcissus* cv. Carlton.

### 4.2 Příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu

#### 4.2.1. Příprava 1,2-dihydrohaemanthaminu (**2**)

1,2-Dihydrohaemanthamin (**2**) byl připraven za využití metody, která byla popsána v následující práci<sup>136</sup>. Pro reakci bylo použito 100 mg (0,331 mmol) haemanthaminu, které byly rozpuštěny ve 3 ml bezvodého tetrahydrofuranu (THF). Veškeré sklo bylo před nasazením vlastní reakce umístěno do sušárny, aby nebyla v reakční baňce přítomna zbytková vlhkost. Po rozpuštění alkaloidu bylo do reakční směsi přidáno katalytické množství Pd/C (palladium na aktivním uhlí) a přes gumové septum byl do reakční směsi přiváděn argon po dobu jedné hodiny. Zároveň byl při nasazení reakce umístěn na baňku balonek, který obsahoval vodík pro zajištění inertního prostředí. Reakční směs byla následně míchána při teplotě 40 °C celkem 5 dní. Reakční směs byla následně odpařena a přečištěna za využití preparativní TLC a mobilní fáze S4.

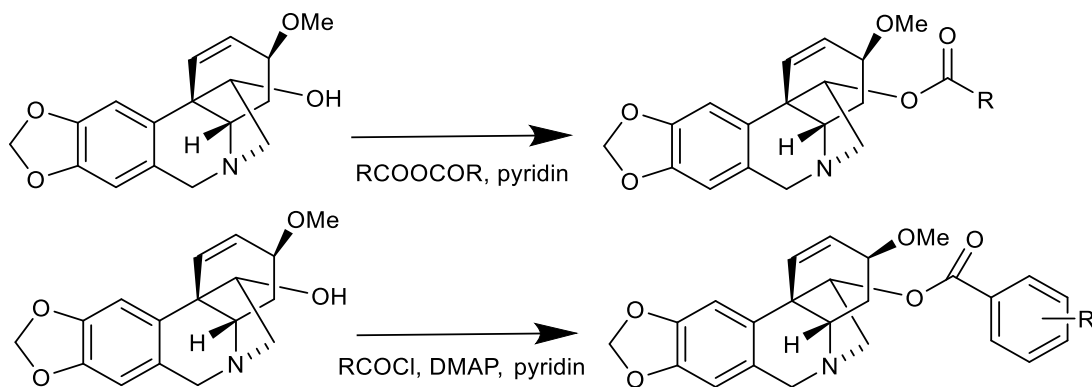


Obrázek 13: Reakční schéma hydrogenace haemanthaminu.

#### 4.2.2. Příprava esterových derivátů haemanthaminu (**1**)

Pro přípravu derivátů esterů **1** byla použita metoda popsána v následujících publikačních výstupech<sup>55,56</sup>. Pro každou reakci bylo naváženo 50 mg (0,166 mmol) **1** a k němu následně přidáno 2-3 ml bezvodého pyridinu do úplného rozpuštění. Poté bylo přidáno 2,5-5 ekvivalentů příslušného acylačního činidla (acylchloridu) a katalytické množství (cca 2 mg) DMAP. Průběh reakce byl monitorován za využití analytické TLC. Reakce byla ukončena po zreagování

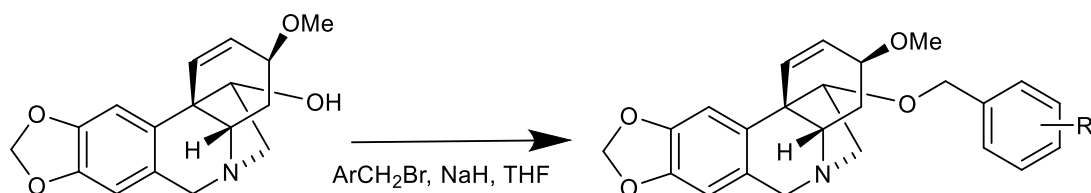
veškeré výchozí látky. Následně byla celá reakční směs odpařena dosucha, poté rozpuštěna v chloroformu a takto připravená směs byla separována pomocí preparativní TLC za využití různých mobilních fází (S1-S5).



**Obrázek 14:** Reakční schéma přípravy esterových alifatických a aromatických derivátů haemanthaminu.

#### 4.2.3. Příprava etherových derivátů haemanthaminu

Pro přípravu etherových derivátů bylo vždy použito 100 mg (0,331 mmol) **1**. Do vysušeného skla byl převeden **1** společně s magnetickým míchadlem a skrz gumové septum byly do baňky pomocí jehly přidány 2 ml bezvodého THF. Skrz septum byla připojena jehla s přívodem argonu pro udržení inertní atmosféry a po úplném rozpuštění **1** byl přidán 1,2 ekvivalent hydridu sodného (NaH). Z důvodu exotermické reakce byl celá baňka ochlazována v ledové lázni (10 minut) a následně bylo přidáno 1,1 ekvivalentu alkylačního činidla (příslušného alkylbromidu). Celá reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě alespoň 8 hodin a během reakce byly prováděny kontrolní TLC. Po ukončení reakce byla celá reakční směs odpařena na vakuové odparce, rozpuštěna ve směsi  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  (1:1) a opět podrobena kontrolní TLC. Následně byla provedena preparativní TLC pomocí mobilních fází (S1-S5) za účelem izolace etherových derivátů.



**Obrázek 15:** Reakční schéma přípravy etherových derivátů haemanthaminu.

#### 4.2.4. Převedení derivátů na hydrochloridy

Pro stanovení biologické aktivity byly připravené deriváty převedeny na hydrochloridy za účelem lepší rozpustnosti. Přesná navážka derivátu byla rozpuštěna v bezvodém diethyletheru tak, aby koncentrace výsledného vzorku byla 1M. Pokud nedošlo k rozpuštění, bylo přidáno co nejmenší potřebné množství bezvodého DCM. Po úplném rozpuštění vzorku byl přidán nadbytek 1M etherového roztoku chlorovodíku a následně bylo ověřeno pH pomocí indikačního pH papírku. Pokud rozpuštěný derivát vykazoval kyselou reakci, byl ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15minutové inkubaci byla zkumavka umístěna na vodní lázeň nastavenou na 40 °C do úplného odpaření rozpouštědla. Následně byl ke vzorku přidán suchý diethylether (3 ml) do opětovného odpaření rozpouštědla. Tento krok byl zopakován 3x za účelem úplného odstranění nadbytečného chlorovodíku.

#### 4.3 Příprava Dragendorffova činidla pro detekci alkaloidů

Zásobní roztok činidla byl připraven smícháním roztoků A a B v poměru 1:1, kdy roztok A byl složen z 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné rozpuštěné v 80 ml vody a roztok B z 16 g jodidu draselného rozpuštěného v 40 ml vody. Pracovní roztok pak byl připraven smíšením 5 ml zásobního roztoku s 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody. Takto připravené detekční činidlo tvoří s alkaloidy na destičkách pokrytých silikagelem okem viditelnou intenzivně oranžovou skvrnu <sup>140</sup>.

#### 4.4 Chemikálie, rozpouštědla a detekční činidla

- acetonitril HPLC gradient (MeCN) (Lach-Ner, Neratovice)
- benzylobromid (Sigma-Aldrich)
- 2-bromobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-bromobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 2-bromobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 3-bromobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 4-bromobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 4-decylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- cyklohexan, p. a. (cHx) (Penta, Praha)
- destilovaná voda (H<sub>2</sub>O)
- diethylamin, p. a. (Et<sub>2</sub>NH) (Penta, Praha)
- diethylether (Penta, Praha)
- 2,4-difluorobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3,4-dichlorobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3,5-diethoxybenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3,5-dimethylbenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- dichlormethan (DCM)(Penta, Praha)
- dimethylaminopyridin, p. a. (DMAP) (Penta, Praha)

- Dragendorffovo činidlo (příprava v laboratoři)
- dusičnan bismutitý zásaditý (Lachema, Brno)
- ethanol 95%, p. a. (Lihovar Chrudim, Chrudim)
- ethylacetát, p. a. (EtOAc) (Penta, Praha)
- 4-fluorobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3-fluorobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 4-fluoro-3-methylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3-fuoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- heptanoyl chlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-heptylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-hexylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- hydrid sodný, suchý (Sigma Aldrich, Praha)
- 2-chloro-5-nitrobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 2-chlorobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3-chlorobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 2-chlorobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 2-chloro-5-nitrobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- chloroform deuterizovaný pro NMR analýzu (CDCl<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, Praha)
- chloroform, p. a. (CHCl<sub>3</sub>) (Penta, Praha)
- 4-isopropylbenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- isovaleryl chlorid (Sigma-Aldrich)
- jodid draselný č. (Lach-Ner, Neratovice)
- 2-jodobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 3-jodobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-jodobenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 2-jodobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- kyselina chlorovodíková, (Penta, Praha)
- kyselina vinná p. a. (Balex, Pardubice)
- methanol HPLC gradient (VWR International, Francie)
- methanol LC/MS gradient (VWR International, Francie)
- methanol p. a. (MeOH) (Ing. Petr Švec – PENTA, Praha)
- methoxyacetyl chlorid (Sigma-Aldrich)
- 2-methylbenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 3-methylbenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- 3-nitrobenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- oktanoyl chlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-pentenoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-pentylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- pyridin, p. a. (Penta, Praha)
- 4-*tert*-butylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 4-*tert*-butylbenzylbromid (Sigma-Aldrich)
- tetrahydrofuran, bezvodý (THF) (Penta, Praha)
- toluen, p. a. (To) (Penta, Praha)
- 3-(trifluoromethyl)benzoylchlorid (Sigma-Aldrich)
- 2,4,6-trimethylbenzoylchlorid (Sigma-Aldrich)

#### **4.5 Mobilní soustavy pro tenkovrstvou chromatografií (analytická, preparativní)**

- S1:** To:Et<sub>2</sub>NH (9:1)  
**S2:** cHx:To:Et<sub>2</sub>NH (30:60:5)  
**S3:** cHx:To:Et<sub>2</sub>NH (50:50:5)  
**S4:** EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:13:10)  
**S5:** cHx:To:Et<sub>2</sub>NH (65:30:5)

#### **4.6 Přístrojové vybavení použité při izolaci a identifikaci derivátů haemanthaminu**

- Spektrometr MS-EI na GC/MS systému Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- Spektrometr MS-ESI Waters Acquity qDa a detektor s diodovým polem Waters 2998 na HPLC systému Waters Autopurification<sup>TM</sup> (Milford, USA)
- Spektrometr HRMS-ESI, Waters Synapt G2Si s hybridním analyzátozem quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) připojený na Waters Acquity I-Class UHPLC System (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
- Spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, California, USA)
- Polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- Rotační vakuová odparka (Laborota 4000 Heidolph, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Německo)
- UV reader Synergy HT (Biotek, USA)
- UV Cabinet 4 (Camag, Švýcarsko)

#### **4.7 Preparativní a analytická tenkovrstvá chromatografie**

Pro preparativní a analytickou chromatografií byly použity hliníkové destičky pokryté silikagelem 60F<sub>254</sub> o vrstvě 0,2 mm s obsahem fluorescenčního indikátoru (Merck, Německo).

#### **4.8 Strukturní analýza polosyntetických derivátů haemanthaminu**

##### **4.8.1. GC-MS/EI analýza**

Pro ověření hmoty u některých připravených derivátů byla použita metoda plynové chromatografie za pomoci plynového chromatografu Agilent 7890A GC 5975 s hmotnostním

detektorem při elektronové ionizaci 70 eV. Pro samotnou analýzu byla použita navážka do 0,3 mg a vzorek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu o LC/MS čistotě. 1 µl methanolového roztoku analyzovaného vzorku při split 1:10 byl analyzován na koloně HP-5 a teplotě nástřiku 280 °C za použití helia jako nosného plynu s průtokem 0,8 ml/min. Následně byl použit teplotní program: 100 °C–180 °C (15 °C/min), 180 °C (1 min), 180–300 °C (5 °C/min), 300 °C (15 min).

#### **4.8.2. HPLC/MS-ESI analýza**

K ověření průběhu reakce a stanovení molekulové hmotnosti nově syntetizovaných derivátů byla použita také LC-MS metoda. Měření bylo provedeno kapalinových chromatografem Waters Autopurification™ HPLC-MS s hmotnostním spektrometrem (MILFORD, USA). Vzorky o navážce do 0,5 mg byly rozpuštěny v 1 ml methanolu a analyzovány na koloně s reverzní fází XSelect® CSHTM C18 OBDTM (100 mm × 4,6 mm, 5 µm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byla použita superčistá voda s 0,1 % kyseliny mravenčí (mobilní směs A) a methanol s 0,1 % kyseliny mravenčí (mobilní směs B) s průtokem 1 ml/min. Gradientová eluce byla nastavena takto (v/v): 0 min 5 % B, 5 min 100 %B, 8,5 min 5 % B, 1,5 min při počátečních podmínkách. Parametry ESI-MS byly: kapilární napětí 0,8 kV, teplota sondy 600 C, kuželové napětí 15V. Hmotnostní spektra byly zaznamenávány v rozsahu 200-800 m/z v pozitivním iontovém režimu.

#### **4.8.3. HRMS analýza**

Vzorky o navážce do 0,5 mg byly rozpuštěny a měřeny v roztoku MeCN. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru s vysokým hmotnostním rozlišením Waters Synapt G2Si s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu a kombinovaným analyzátořem Q-TOF. Následně byly porovnány teoretické m/z s m/z experimentálně zjištěnými.

#### **4.8.4. NMR analýza**

Identifikace a potvrzení struktury byla provedena pomocí nukleární magnetické rezonance, kdy spektra byla měřena v roztocích CDCl<sub>3</sub> při teplotě 25 °C na spektrometru VNMR S500 (Varian) pracujícím při 499,87 MHz pro jádra <sup>1</sup>H a 125,70 pro jádra <sup>13</sup>C a na spektrometru JNM-ECZ600R (Jeol). K ozařování a detekci signálu byla použita širokopásmová dvoukanálová gradientová sonda s regulací teploty (OneNMR). Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ pars per milion (ppm) a byly nepřímo vztaženy k TMS jako standardu pomocí zbytkového

signálu rozpouštědla. Hodnoty chemického posunu pro CDCl<sub>3</sub> jsou u atomů <sup>1</sup>H δ = 7,26 ppm a u atomů <sup>13</sup>C δ = 77,0 ppm. Měřením získaná data jsou uváděna v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita spekter <sup>1</sup>H NMR, multiplicita (s: singlet, d: dublet, dd: dublet dubletu, t: triplet, q: kvartet, m: multiplet) a interakční konstanta J (Hz).

#### 4.8.5. Optická otáčivost

U všech nově připravených derivátů byla změřena optická otáčivost na automatickém polarimetru P3000 (A. Krüss Optronic). K naváženým vzorkům (2 až 5 mg) bylo přidáno 2 ml chloroformu do úplného rozpuštění. Poté byl roztok převeden do kyvety a změřen. Následně byla vypočtena specifická otáčivost dle následujícího vzorce:

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

t – teplota měření [°C]; D – sodíková čára λ = 589,3 nm; α – naměřená otáčivost [°];  
c – koncentrace stanovované látky [g/100 ml]; l – délka kyvety [dm].

## 4.9 Biologická aktivita připravených polosyntetických derivátů haemanthaminu

### 4.9.1. Inhibiční aktivita derivátů haemanthaminu vůči cholinesterasám

Stanovení inhibičních aktivit všech derivátů haemanthaminu vůči humánním cholinesterasám bylo provedeno na Katedře farmakognozie a farmaceutické botaniky s pomocí kolegyně PharmDr. Daniely Suchánkové, Ph.D. za využití modifikované Ellmanovy metody. Podrobný popis celé metodiky je možné nalézt v následujícím publikačním výstupu <sup>141</sup>.

### 4.9.2. Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3β

Stanovení inhibiční aktivity vybraných derivátů haemanthaminu bylo provedeno ve spolupráci s prof. Vincenzou Andrisano a dr. Angelou De Simone z Department for Life Quality Studies University of Bologna během stáže PharmDr. Daniely Suchánkové, Ph.D. v rámci projektu Erasmus. Inhibiční aktivita testovaných látek je vyjádřena jako procento inhibice enzymu při dané koncentraci a byla porovnána s maximální inhibiční aktivitou referenčního standardu SB-415286 a maximální aktivitou enzymu bez použití inhibitoru. Podrobný popis celé metodiky lze nalézt v následujícím publikačním výstupu <sup>142</sup>.

#### 4.9.3. Cytotoxická aktivita derivátů haemanthaminu

Stanovení cytotoxické aktivity bylo provedeno ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Hradci Králové na Ústavu lékařské biochemie, podrobný popis použité metody pro stanovení cytotoxické aktivity derivátů je uveden v následujících publikacích <sup>42,45</sup>. V krátkosti, všechny testované deriváty byly nejprve podrobeny screeningu při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Poté byla u aktivních derivátů připravena koncentrační řada v rozmezí od 0,1 do 100  $\mu\text{M}$  tak, aby množství DMSO nepřekročilo 0,1 % ve vzorku. U látek vykazující zajímavou aktivitu byla stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$ . V rámci experimentů byl jako pozitivní kontrola použit doxorubicin. Celé testování bylo prováděno kolorimetrickou metodou WST-1 za využití následujících buněčných linií Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 a MRC-5.

#### 4.9.4. Predikce průchodu látek přes hematoencefalickou bariéru

Predikce byla provedena pomocí PAMPA-BBB (parallel artificial membrane permeation assay-blood brain barrier) ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové. Díky této *in vitro* metodě lze predikovat průchod potencionálního léčiva přes HEB a pro samotné stanovení byl použit polární lipid z prasečího mozku. Jako negativní kontrola byly zvoleny léčiva, jež nepřestupují HEB (např. cefuroxim či furosemid) a jako pozitivní kontrola naopak léčiva prostupující přes CNS (např. rivastigmin či donepezil). Podrobný popis metodiky je uveden v následujících publikacích <sup>56,143,144</sup>.

#### 4.9.5. Výpočet logBB

Hodnota logBB je logaritmická hodnota poměru koncentrace sledované látky v mozku ku koncentraci látky v krvi. Vypočtená hodnota se získává pomocí vložení molekulárního vzorce ve formátu SMILES do webové stránky <http://www.way2drug.com/geb>.

#### 4.10 Dockingová studie u nejaktivnějších látek

Pro stanovení stěžejních strukturálních aspektů v souvislosti s vysokou inhibiční aktivitou u nejaktivnějších derivátů byla provedena dockingová studie vůči *hAChE* a *hBuChE* ve spolupráci s Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové. Předlohová X-ray struktura proteinu *hBuChE* byla získána z databáze [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) s ID 4EY6 a 4EY7. Poloha s nejvyšším skóre byla dále ověřena a vylepšena 10 ns molekulární dynamickou simulací. Výsledná vazebná pozice testované látky byla porovnána se známým inhibitorem *hBuChE* takrinem428 z originálního X-ray obrazu proteinu a 3D vizualizována. Detailní postup dockingové studie je uveden v následující publikaci <sup>55,56,144</sup>.



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Strukturní identifikace připravených derivátů

Všechny syntetizované látky byly identifikovány za využití výše popsaných metod EI-MS, LC-MS, ESI-HRMS, NMR a optické otáčivosti. Vzhledem ke skutečnosti, že velká část připravených látek byla již předmětem vlastních publikačních výstupů<sup>42,55,56</sup>, jsou v následující tabulce shrnuty názvy, struktury a výtěžky reakcí všech připravených látek (Tabulka 5). U látek, které již byly publikovány, je uveden odkaz na publikační výstup, kde je možné dohledat popisy veškerých spekter. Struktury připravených derivátů jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tabulka 6, Tabulka 7).

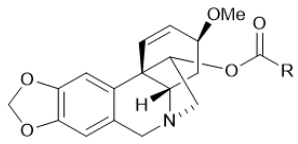
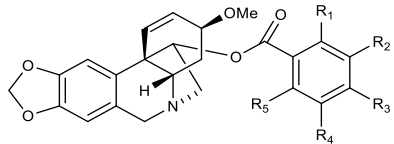
**Tabulka 5:** Přehled syntetizovaných derivátů haemanthaminu.

Látka	Název derivátu	Výtěžek (%)	Reference/kapitola
1	haemanthamin	-	-
2	1,2-dihydrohaemanthamin	20	136
<b>Esterové deriváty haemanthaminu</b>			
3	11- <i>O</i> -acetylhaemanthamin	92	55
4	11- <i>O</i> -propionylhaemanthamin	87	55
5	11- <i>O</i> -isobutanoylhaemanthamin	85	55
6	11- <i>O</i> -pentanoylhaemanthamin	85	55
7	11- <i>O</i> -hexanoylhaemanthamin	90	55
8	11- <i>O</i> -butanoylhaemanthamin	89	55
9	11- <i>O</i> -isovalerylhaemanthamin	96	5.2.1.
10	11- <i>O</i> -heptanoylhaemanthamin	98	5.2.2.
11	11- <i>O</i> -oktanoylhaemanthamin	96	5.2.3
12	11- <i>O</i> -4-pentenoylhaemanthamin	80	42
13	11- <i>O</i> -benzoylhaemanthamin	85	55
14	11- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)haemanthamin	65	55
15	11- <i>O</i> -(3-methylbenzoyl)haemanthamin	81	56
16	11- <i>O</i> -(4-methylbenzoyl)haemanthamin	87	56
17	11- <i>O</i> -(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthamin	80	42
18	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthamin	63	42
19	11- <i>O</i> -(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin	78	5.2.4
20	11- <i>O</i> -(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthamin	65	145
21	11- <i>O</i> -(4-ethylbenzoyl)haemanthamin	80	56
22	11- <i>O</i> -(4-butylbenzoyl)haemanthamin	60	145
23	11- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzoyl)haemanthamin	45	145
24	11- <i>O</i> -(4-pentylbenzoyl)haemanthamin	60	145
25	11- <i>O</i> -(4-hexylbenzoyl)haemanthamin	75	145
26	11- <i>O</i> -(4-heptylbenzoyl)haemanthamin	58	145
27	11- <i>O</i> -(4-decylbenzoyl)haemanthamin	50	145
28	11- <i>O</i> -(2-methoxybenzoyl)haemanthamin	82	56
29	11- <i>O</i> -(3-methoxybenzoyl)haemanthamin	95	55
30	11- <i>O</i> -(4-methoxybenzoyl)haemanthamin	86	56
31	11- <i>O</i> -(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	68	56
32	11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	73	56
33	11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	88	5.2.5.
34	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin	82	5.2.6.
35	11- <i>O</i> -(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthamin	63	42

**Tabulka 5:** Přehled syntetizovaných derivátů haemanthaminu (pokračování).

36	11- <i>O</i> -(3-hydroxybenzoyl)haemanthamin	82	5.2.7.
37	11- <i>O</i> -(2-bromobenzoyl)haemanthamin	92	5.2.8.
38	11- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)haemanthamin	93	55
39	11- <i>O</i> -(4-bromobenzoyl)haemanthamin	96	5.2.9
40	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemanthamin	79	56
41	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)haemanthamin	85	55
42	11- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)haemanthamin	78	56
43	11- <i>O</i> -(3,4-dichlorobenzoyl)haemanthamin	73	42
44	11- <i>O</i> -(2-jodobenzoyl)haemanthamin	60	42
45	11- <i>O</i> -(3-jodobenzoyl)haemanthamin	78	5.2.10.
46	11- <i>O</i> -(4-jodobenzoyl)haemanthamin	67	42
47	11- <i>O</i> -(2-fluorobenzoyl)haemanthamin	98	5.2.11.
48	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzoyl)haemanthamin	74	56
49	11- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)haemanthamin	96	5.2.12
50	11- <i>O</i> -(2,4-difluorobenzoyl)haemanthamin	70	146
51	11- <i>O</i> -(3-trifluormethylbenzoyl)haemanthamin	80	5.2.13
52	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)haemanthamin	69	56
53	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemanthamin	75	56
54	11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemanthamin	65	55
55	11- <i>O</i> -(3,5-dinitrobenzoyl)haemanthamin	72	42
56	11- <i>O</i> -(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin	96	5.2.14
57	11- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin	77	42
58	11- <i>O</i> -(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemanthamin	87	42
59	11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthamin	83	42
60	11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthamin	60	42
61	11- <i>O</i> -(4-fluoro-3-methylbenzoyl)haemanthamin	83	42
62	11- <i>O</i> -(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoyl)haemanthamin	70	42
63	11- <i>O</i> -(2-naphthoyl)haemanthamin	63	42
64	11- <i>O</i> -(1-naphthoyl)haemanthamin	73	42
65	11- <i>O</i> -(2-furoyl)haemanthamin	63	42
66	11- <i>O</i> -(3-furoyl)haemanthamin	80	42
<b>Etherové deriváty haemanthaminu</b>			
67	11- <i>O</i> -benzylhaemanthamin	40	5.2.15
68	11- <i>O</i> -(2-methylbenzyl)haemanthamin	41	5.2.16
69	11- <i>O</i> -(3-methylbenzyl)haemanthamin	36	5.2.17
70	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzyl)haemanthamin	42	5.2.18
71	11- <i>O</i> -(4-isopropylbenzyl)haemanthamin	40	145
72	11- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)haemanthamin	45	145
73	11- <i>O</i> -(2-bromobenzyl)haemanthamin	30	5.2.19
74	11- <i>O</i> -(3-bromobenzyl)haemanthamin	29	5.2.20
75	11- <i>O</i> -(4-bromobenzyl)haemanthamin	26	5.2.21
76	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzyl)haemanthamin	37	5.2.22
77	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzyl)haemanthamin	28	5.2.23
78	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzyl)haemanthamin	41	5.2.24
79	11- <i>O</i> -(2-jodobenzyl)haemanthamin	35	5.2.25
80	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzyl)haemanthamin	41	5.2.26

**Tabulka 6:** Struktury derivátů haemanthaminu připravených v rámci dizertační práce.

Látka	Název derivátu/Struktura	Substituent				
1	haemanthamin	-				
2	1,2-dihydrohaemanthamin					
<b>Esterové deriváty haemanthaminu</b>						
		<b>R</b>				
3	11- <i>O</i> -acetylhaemanthamin	COCH <sub>3</sub>				
4	11- <i>O</i> -propionylhaemanthamin	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>				
5	11- <i>O</i> -isobutanoylhaemanthamin	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				
6	11- <i>O</i> -pentanoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>				
7	11- <i>O</i> -hexanoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>				
8	11- <i>O</i> -butanoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>				
9	11- <i>O</i> -isovalerylhaemanthamin	CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>				
10	11- <i>O</i> -heptanoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>				
11	11- <i>O</i> -oktanoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>				
12	11- <i>O</i> -4-pentenoylhaemanthamin	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>				
13	11- <i>O</i> -benzoylhaemanthamin	COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>				
		<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
14	11- <i>O</i> -(2-methylbenzoyl)haemanthamin	Me	H	H	H	H
15	11- <i>O</i> -(3-methylbenzoyl)haemanthamin	H	Me	H	H	H
16	11- <i>O</i> -(4-methylbenzoyl)haemanthamin	H	H	Me	H	H
17	11- <i>O</i> -(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthamin	Me	Me	H	H	H
18	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthamin	H	Me	H	Me	H

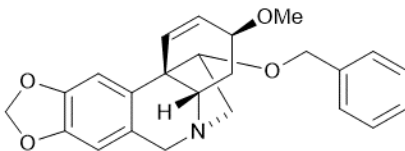
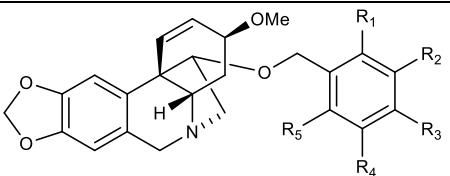
**Tabulka 6:** Struktury derivátů haemanthaminu připravených v rámci dizertační práce (pokračování).

19	11- <i>O</i> -(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin	Me	H	H	H	Me
20	11- <i>O</i> -(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthamin	Me	H	Me	H	Me
21	11- <i>O</i> -(4-ethylbenzoyl)haemanthamin	H	H	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	H	H
22	11- <i>O</i> -(4-butylbenzoyl)haemanthamin	H	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
23	11- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzoyl)haemanthamin	H	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	H
24	11- <i>O</i> -(4-pentylbenzoyl)haemanthamin	H	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	H	H
25	11- <i>O</i> -(4-hexylbenzoyl)haemanthamin	H	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	H
26	11- <i>O</i> -(4-heptylbenzoyl)haemanthamin	H	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	H	H
27	11- <i>O</i> -(4-decylbenzoyl)haemanthamin	H	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub>	H	H
28	11- <i>O</i> -(2-methoxybenzoyl)haemanthamin	OMe	H	H	H	H
29	11- <i>O</i> -(3-methoxybenzoyl)haemanthamin	H	OMe	H	H	H
30	11- <i>O</i> -(4-methoxybenzoyl)haemanthamin	H	H	OMe	H	H
31	11- <i>O</i> -(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	H	OMe	H	OMe	H
32	11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	H	OMe	OMe	H	H
33	11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	OMe	H	H	H	OMe
34	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin	H	OMe	OMe	OMe	H
35	11- <i>O</i> -(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthamin	H	OEt	H	OEt	H
36	11- <i>O</i> -(3-hydroxybenzoyl)haemanthamin	H	H	OH	H	H
37	11- <i>O</i> -(2-bromobenzoyl)haemanthamin	Br	H	H	H	H
38	11- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)haemanthamin	H	Br	H	H	H
39	11- <i>O</i> -(4-bromobenzoyl)haemanthamin	H	H	Br	H	H
40	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemanthamin	Cl	H	H	H	H
41	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)haemanthamin	H	Cl	H	H	H
42	11- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)haemanthamin	H	H	Cl	H	H
43	11- <i>O</i> -(3,4-dichlorobenzoyl)haemanthamin	H	Cl	Cl	H	H
44	11- <i>O</i> -(2-jodobenzoyl)haemanthamin	I	H	H	H	H
45	11- <i>O</i> -(3-jodobenzoyl)haemanthamin	H	I	H	H	H
46	11- <i>O</i> -(4-jodobenzoyl)haemanthamin	H	H	I	H	H
47	11- <i>O</i> -(2-fluorobenzoyl)haemanthamin	F	H	H	H	H
48	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzoyl)haemanthamin	H	F	H	H	H
49	11- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)haemanthamin	H	H	F	H	H
50	11- <i>O</i> -(2,4-difluorobenzoyl)haemanthamin	F	H	F	H	H

**Tabulka 6:** Struktury derivátů haemanthaminu připravených v rámci dizertační práce (pokračování).

<b>51</b>	11- <i>O</i> -(3-trifluormethylbenzoyl)haemanthamin	H	CF <sub>3</sub>	H	H	H
<b>52</b>	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)haemanthamin	NO <sub>2</sub>	H	H	H	H
<b>53</b>	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemanthamin	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H
<b>54</b>	11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemanthamin	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H
<b>55</b>	11- <i>O</i> -(3,5-dinitrobenzoyl)haemanthamin	H	NO <sub>2</sub>	H	NO <sub>2</sub>	H
<b>56</b>	11- <i>O</i> -(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin	Cl	H	H	NO <sub>2</sub>	H
<b>57</b>	11- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin	H	NO <sub>2</sub>	Cl	H	H
<b>58</b>	11- <i>O</i> -(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemanthamin	H	NO <sub>2</sub>	Me	H	H
<b>59</b>	11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemanthamin	H	Br	H	NO <sub>2</sub>	H
<b>60</b>	11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemanthamin	Cl	H	NO <sub>2</sub>	H	H
<b>61</b>	11- <i>O</i> -(4-fluoro-3-methylbenzoyl)haemanthamin	H	Me	F	H	H
<b>62</b>	11- <i>O</i> -(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoyl)haemanthamin	F	Me	H	H	Cl
<b>63</b>	11- <i>O</i> -(2-naphtoyl)haemanthamin					
<b>64</b>	11- <i>O</i> -(1-naphtoyl)haemanthamin					
<b>65</b>	11- <i>O</i> -(2-furoyl)haemanthamin					
<b>66</b>	11- <i>O</i> -(3-furoyl)haemanthamin					

**Tabulka 7:** Struktury etherových derivátů haemanthaminu připravených v rámci dizertační práce.

Látka	Název derivátu/Struktura	Substituent				
Etherové deriváty haemanthaminu						
67	11- <i>O</i> -benzylhaemanthamin					
		<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
68	11- <i>O</i> -(2-methylbenzyl)haemanthamin	Me	H	H	H	H
69	11- <i>O</i> -(3-methylbenzyl)haemanthamin	H	Me	H	H	H
70	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzyl)haemanthamin	H	Me	H	Me	H
71	11- <i>O</i> -(4-isopropylbenzyl)haemanthamin	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
72	11- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)haemanthamin	H	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	H
73	11- <i>O</i> -(2-bromobenzyl) haemanthamin	Br	H	H	H	H
74	11- <i>O</i> -(3-bromobenzyl)haemanthamin	H	Br	H	H	H
75	11- <i>O</i> -(4-bromobenzyl)haemanthamin	H	H	Br	H	H
76	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzyl)haemanthamin	Cl	H	H	H	H
77	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzyl)haemanthamin	H	Cl	H	H	H
78	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzyl)haemanthamin	H	F	H	H	H
79	11- <i>O</i> -(2-jodobenzyl)haemanthamin	I	H	H	H	H
80	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzyl)haemanthamin	H	NO <sub>2</sub>	H	H	H

## 5.2 Strukturní analýza doposud nepublikovaných derivátů

### 5.2.1. 11-*O*-isovalerylhaemanthamin (9)

Výtěžek 48 mg (96 %); bílá amorfni látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +75,2$  ( $c = 0,149$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.91 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.36 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.90 (s, 2H), 4.98 (dd,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.36 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.87–3.82 (m, 1H), 3.73 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.45–3.37 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.32 (td,  $J = 14.2$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 2.11 (dd,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 2H), 2.08–1.99 (m, 2H), 1.94 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 0.95 (d,  $J = 3.7$  Hz, 3H), 0.94 (d,  $J = 3.7$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.1, 146.7, 146.4, 134.4, 129.5, 127.8, 126.4, 106.6, 103.9, 100.9, 80.2, 72.6, 62.9, 61.2, 60.8, 56.5, 49.1, 43.6, 28.3, 25.4, 22.5, 22.4.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_5^+$  386,1962  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 386,1966.

### 5.2.2. 11-*O*-heptanoylhaemanthamin (10)

Výtěžek 49 mg (98 %); bílá amorfni látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +58,5$  ( $c = 0,110$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.91 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.36 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.2$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 4.98 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 4.36 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.87–3.81 (m, 1H), 3.72 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.37 (s, overlap, 3H), 3.45–3.27 (m, overlap, 3H), 2.29–2.15 (m, 2H), 2.09–2.01 (m, 1H), 1.95 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 1.62–1.50 (m, 2H), 1.37–1.23 (m, 6H), 0.90 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.8, 146.6, 146.4, 134.4, 129.4, 127.9, 126.6, 106.6, 104.0, 100.9, 80.2, 72.6, 62.8, 61.3, 60.8, 56.5, 49.2, 34.5, 31.5, 28.8, 28.4, 24.8, 22.5, 14.0.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_5^+$  414,2275  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 414,2280.

### 5.2.3. 11-*O*-oktanoylhaemanthamin (11)

Výtěžek 48 mg (96 %); bílá amorfni látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +68,4$  ( $c = 0,150$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.91 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.36 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 4.98 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 4.36 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.87–3.81 (m, 1H), 3.72 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.45–3.31 (m, overlap, 2H), 3.37 (s, overlap, 3H), 3.30 (dd,  $J = 14.3$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 2.22 (td,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 2.08–2.01 (m, 1H), 1.95 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 1.60–1.53 (m, 2H), 1.35–1.25 (m, 8H), 0.89 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.8, 146.7, 146.4, 134.5, 129.4, 127.9, 126.6, 106.6, 104.0, 100.9, 80.2, 72.7, 62.8, 61.3, 60.8, 56.5, 49.2, 34.5, 31.7, 29.1, 28.9, 28.5, 24.9, 22.6, 14.1.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_5^+$  428,2432  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 428,2437.

#### 5.2.4. 11-*O*-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin (19)

Výtěžek 39 mg (78 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +54,5$  ( $c = 0,110$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.19 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.03 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.53 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.18 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 5.25–5.19 (m, 1H), 4.40 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.81–3.73 (m, 2H), 3.57 (dd,  $J = 14.3$  Hz,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.48–3.39 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.31 (s, 6H), 2.07–1.99 (m, 1H), 1.87 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169.1, 146.7, 146.5, 135.2, 134.6, 133.3, 130.1, 129.4, 127.9, 127.7, 126.6, 106.7, 104.0, 100.9, 81.2, 72.6, 63.0, 61.2, 61.0, 56.5, 49.1, 28.3, 20.0.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_5^+$  434,1962  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 434,1970.

#### 5.2.5. 11-*O*-(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin (33)

Výtěžek 44 mg (88 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +74,6$  ( $c = 0,140$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.26 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.57–6.51 (m, 2H), 6.50–6.44 (m, 2H), 6.14 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.14 (dd,  $J = 7.0$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.79 (s, overlap, 6H), 3.84–3.73 (m, overlap, 2H), 3.63–3.51 (m, 1H), 3.48–3.37 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.05–1.95 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.5, 157.5, 146.6, 146.4, 134.8, 131.0, 129.1, 127.7, 126.6, 112.8, 106.6, 104.1, 103.9, 100.8, 81.4, 72.8, 63.0, 61.4, 61.2, 56.4, 55.8, 48.7, 28.0.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_7^+$  496,1861  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 496,1872.

#### 5.2.6. 11-*O*-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin (34)

Výtěžek 41 mg (82 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +78,7$  ( $c = 0,122$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.18 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.45 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.92–5.87 (m, 2H), 5.14 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 3.86–3.82 (m, 1H), 3.76 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.55 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.47–3.37 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.13 (dd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 2.06 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.9, 152.9, 146.7, 146.5, 142.3, 134.2, 129.3, 128.0, 126.6, 125.0, 106.6, 106.5, 103.8, 103.5, 100.8, 81.0, 72.6, 62.8, 61.2, 60.8, 56.5, 56.1, 49.0, 28.6.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{NO}_8^+$  496,1966  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 496,1976.



### 5.2.7. 11-*O*-(3-hydroxybenzoyl)haemanthamin (36)

Výtěžek 41 mg (82 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +10,5$  ( $c = 0,185$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.50 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.32 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.07 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.42 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.13 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.96–5.91 (m, 2H), 5.26 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.89–3.83 (m, 1H), 3.82 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.60–3.50 (m, 3H), 3.33 (s, 3H), 2.23–2.12 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.5, 156.9, 147.0, 146.8, 133.8, 131.1, 129.9, 129.6, 127.3, 125.5, 121.3, 121.1, 115.7, 106.7, 104.1, 101.0, 80.6, 72.1, 62.9, 60.8, 60.3, 56.5, 49.6, 28.4.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{NO}_6^+$  421,1578  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 421,1597.

### 5.2.8. 11-*O*-(3-jodobenzoyl)haemanthamin (45)

Výtěžek 39 mg (78 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +38,1$  ( $c = 0,105$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.25 (bs, 1H), 7.91–7.84 (m, 2H), 7.18 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.41 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.14 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.94–5.89 (m, 2H), 5.19 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.41 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.90–3.84 (m, 1H), 3.78 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.54 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.50–3.40 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 2.16 (dd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 2.04 (td,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.0, 146.8, 146.6, 141.9, 138.4, 134.1, 132.0, 130.2, 129.8, 128.4, 127.6, 126.5, 106.7, 103.9, 100.8, 93.9, 81.2, 72.4, 62.9, 61.2, 60.9, 56.6, 49.3, 28.6.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{INO}_5^+$  532,0616  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 532,0620.

### 5.2.9. 11-*O*-(2-bromobenzoyl)haemanthamin (37)

Výtěžek 46 mg (92 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +18,5$  ( $c = 0,130$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.67–7.60 (m, 2H), 7.38–7.29 (m, 2H), 6.97 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.46 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.22–5.17 (m, 1H), 4.38 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.84–3.79 (m, 1H), 3.75 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.54–3.45 (m, 2H), 3.41 (dd,  $J = 13.1$  Hz,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 2.10–2.04 (m, 1H), 2.01 (td,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.2, 146.8, 146.6, 134.6, 134.4, 132.7, 132.0, 131.1, 129.9, 127.9, 127.3, 126.8, 121.9, 106.7, 104.2, 101.0, 81.7, 72.6, 63.0, 61.4, 60.7, 56.6, 49.5, 29.6.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BrNO}_5^+$  484,0754  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 484,0765.

### 5.2.10. 11-*O*-(4-bromobenzoyl)haemanthamin (39)

Výtěžek 48 mg (96 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +55,6$  ( $c = 0,180$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.80–7.70 (m, 2H, AA'BB'), 7.58–7.50 (m, 2H, AA'BB'), 6.91 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.38 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.08 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.92–5.84 (m, 2H), 5.16 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.85–3.77 (m, 1H), 3.74 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.50 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.44–3.36 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 2.13–2.07 (m, 1H), 2.01 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.9, 146.8, 146.7, 134.3, 131.9, 130.9, 129.7, 129.2, 128.3, 127.8, 126.8, 106.8, 104.0, 101.0, 81.3, 72.6, 63.0, 61.4, 61.1, 56.6, 49.4, 28.8.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BrNO}_5^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  484,0754, naměřená 484,0757.

### 5.2.11. 11-*O*-(2-fluorobenzoyl)haemanthamin (47)

Výtěžek 49 mg (98 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +9,4$  ( $c = 0.170$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.84 (td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.55–7.47 (m, 1H), 7.19 (td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J = 11.1$  Hz,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.40 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.92–5.87 (m, 2H), 5.23 (dd,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.87–3.81 (m, 1H), 3.76 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.55–3.43 (m, 2H), 3.42 (dd,  $J = 12.4$  Hz,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 2.16–2.05 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 163.5 (d,  $J = 3.7$  Hz), 161.9 (d,  $J = 260.3$  Hz), 146.8, 146.6, 134.6 (d,  $J = 9.0$  Hz), 134.2, 132.1, 129.9, 127.3, 126.5, 124.0 (d,  $J = 3.7$  Hz), 118.5 (d,  $J = 9.9$  Hz), 117.0 (d,  $J = 22.6$  Hz), 106.6, 104.0, 100.9, 81.2, 72.6, 62.9, 61.2, 60.7, 56.5, 49.3, 28.1.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{FNO}_5^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  424,1558, naměřená 424,1555.

### 5.2.12. 11-*O*-(4-fluorobenzoyl)haemanthamin (49)

Výtěžek 48 mg (96 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +52,4$  ( $c = 0,145$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.98–7.90 (m, 2H, AA'BB'), 7.15–7.07 (m, 2H, AA'BB'), 6.95 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.43 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.94–5.89 (m, 2H), 5.19 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.40 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.89–3.83 (m, 1H), 3.78 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.58–3.50 (m, 1H), 3.49–3.38 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.18–2.10 (m, 1H), 2.05 (td,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 165.8 (d,  $J = 254.3$  Hz), 164.5, 146.7, 146.5, 134.2, 131.8 (d,  $J = 9.2$  Hz), 129.5, 127.7, 126.6, 126.3 (d,  $J = 3.0$  Hz), 115.6 (d,  $J = 22.0$  Hz), 106.6, 103.9, 100.9, 81.0, 72.4, 62.9, 61.3, 61.0, 56.5, 49.2, 28.6.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{FNO}_5^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  424,15548, naměřená 424,1559.

### 5.2.13. 11-*O*-(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin (56)

Výtěžek 47 mg (94 %); nažloutlá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +27,8$  ( $c = 0,115$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.57 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.53 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.21 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.95–3.89 (m, 1H), 3.86 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.64 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 3.47 (dd,  $J = 14.5$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 3.43–3.38 (m, 1H), 3.36 (s, 3H), 2.14–2.01 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 163.8, 148.5, 148.4, 147.7, 141.2, 134.9, 133.8, 131.9, 131.3, 128.6, 128.4, 127.4, 127.1, 107.9, 104.7, 102.5, 82.9, 73.7, 64.2, 61.6, 60.9, 56.9, 50.7.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}_7^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  485,1130, naměřená 485,11098.

### 5.2.14. 11-*O*-(3-trifluormethylbenzoyl)haemanthamin (51)

Výtěžek 40 mg (80 %); bílá amorfnní látka,  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -56,7$  ( $c = 0,120$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.19 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.11 (dt,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.86–7.81 (m, 1H), 7.60 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.44 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.15 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.95–5.90 (m, 2H), 5.23 (dd,  $J = 7.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 4.41 (d,  $J = 16.9$  Hz, 1H), 3.87 (td,  $J = 4.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 3.82–3.69 (m, 1H), 3.57 (dd,  $J = 14.4$  Hz,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.46 (dt,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.16 (ddt,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 4.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 2.05 (td,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 3.9$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.2, 146.8, 146.6, 134.1, 132.5, 131.0, 129.8, 129.6 (q,  $J = 3.8$  Hz), 129.2, 127.7, 126.7, 126.3 (q,  $J = 3.8$  Hz), 123.9 (q,  $J = 267.5$  Hz), 106.7, 103.9, 101.0, 81.4, 72.5, 62.9, 61.3, 61.1, 56.6, 49.2, 28.7.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_5^+$  474,1523  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 474,1526.

### 5.2.15. 11-*O*-benzylhaemanthamin (67)

Výtěžek 40 mg (40 %); bílá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +102,9$  ( $c = 0,105$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.33–7.29 (m, 2H), 7.29–7.25 (m, overlap, 1H), 7.26–7.21 (m, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.52 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.25 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.93–5.89 (m, 2H), 4.55 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 4.39 (d, overlap,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 4.36 (d, overlap,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 3.93–3.87 (m, 1H), 3.78 (dd,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 3.74 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.44–3.39 (m, 3H), 3.38 (s, 3H), 2.24 (td,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 2.15–2.09 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.7, 146.3, 138.2, 135.2, 129.7, 128.3, 127.5, 127.4, 127.1, 106.8, 103.9, 103.4, 100.9, 87.7, 72.6, 63.1, 62.7, 62.0, 60.7, 56.6, 50.0, 27.9.

ESI-HRMS *m/z* teoretická hodnota C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 392,1857, naměřená 392,1856.

#### 5.2.16. 11-*O*-(2-methylbenzyl)haemanthamin (68)

Výtěžek 41 mg (41 %); bílá amorfnní látka; [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +3,8 (c = 0,105; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.20 (dd, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.19–7.10 (m, 3H), 6.87 (s, 1H), 6.48 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.18 (ddd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.88 (d, overlap, *J* = 6.2, 1H), 5.88 (d, overlap, *J* = 6.2, 1H), 4.48 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.33 (d, overlap, *J* = 17.3 Hz, 1H), 4.31 (d, overlap, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.88–3.83 (m, 1H), 3.75 (ddd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 4.2 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 3.68 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.39–3.28 (m, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.18 (td, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.04–1.97 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.5, 146.1, 136.3, 136.1, 135.6, 130.0, 129.5, 127.8, 127.6, 126.6, 125.7, 106.7, 103.3, 100.8, 88.5, 73.0, 71.2, 62.9, 62.3, 61.1, 56.5, 49.9, 28.2, 18.8.

ESI-HRMS *m/z* teoretická hodnota C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 406,2013, naměřená 406,2018.

#### 5.2.17. 11-*O*-(3-methylbenzyl)haemanthamin (69)

Výtěžek 36 mg (36 %); bílá amorfnní látka; [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +52,0 (c = 0,100; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.02 (s, overlap, 1H), 7.01 (d, overlap, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.52 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.21 (ddd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.0 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.87 (d, overlap, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.87 (d, overlap, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.31 (d, overlap, *J* = 16.8 Hz, 1H), 4.29 (d, overlap, *J* = 12.0 Hz, 1H), 3.90–3.85 (m, 1H), 3.75–3.70 (m, 1H), 3.66 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.34–3.32 (m, 2H), 3.31 (dd, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.19 (td, *J* = 13.4 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H), 2.04–1.97 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 146.5, 146.0, 138.3, 137.9, 135.7, 129.5, 128.2, 128.2, 128.0, 127.9, 126.7, 124.2, 106.7, 103.3, 100.8, 88.1, 73.0, 72.6, 62.9, 62.3, 61.1, 56.5, 49.9, 28.3, 21.4.

ESI-HRMS *m/z* teoretická hodnota C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 406,2013, naměřená 406,2015.

#### 5.2.18. 11-*O*-(3,5-dimethylbenzyl)haemanthamin (70)

Výtěžek 42 mg (942 %); bílá amorfnní látka, [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +8,6 (c = 0,140; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.88 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.49 (d, *J* = 10.0 Hz,

1H), 6.44 (s, 1H), 6.22 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.90–5.85 (m, 2H), 4.46 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.34 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 4.25 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.88–3.86 (m, 1H), 3.74–3.72 (m, 1H), 3.69 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.38–3.31 (m, 3H), 2.28 (s, 6H), 2.21 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 2.06–2.01 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.6, 146.2, 138.2, 137.9, 135.5, 129.6, 129.2, 127.7, 125.3, 125.1, 106.8, 103.4, 100.9, 87.9, 72.9, 72.8, 63.1, 62.2, 60.9, 56.6, 50.0, 28.0, 21.3.

ESI-HRMS  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_4^+$  420,2169  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , naměřená 420,2176.

### 5.2.19. 11-*O*-(2-bromobenzyl)haemanthamin (73)

Výtěžek 30 mg (30 %); bílá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +177,8$  ( $c = 0,180$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.47 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.33 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.27 (td,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 7.10 (td,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.53 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.19 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 4.32 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.86 (td,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.81–3.76 (m, 1H), 3.68 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.43–3.35 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.33 (dd,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 2.20 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 2.06–1.98 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.5, 146.1, 137.7, 135.5, 132.3, 129.6, 128.7, 128.5, 127.7, 127.3, 126.7, 122.1, 106.7, 103.4, 100.8, 88.7, 72.9, 71.9, 62.9, 62.2, 61.1, 56.5, 49.9, 28.3.

ESI-HRMS  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{BrNO}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  470,0962, naměřená 470,0966.

### 5.2.20. 11-*O*-(3-bromobenzyl)haemanthamin (74)

Výtěžek 29 mg (29 %); bílá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +24,0$  ( $c = 0,150$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.41–7.32 (m, 2H), 7.16 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.14–7.11 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.51 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.21 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.88 (d, overlap,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 4.47 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.31 (d, overlap,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 4.30 (d, overlap,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 3.90–3.85 (m, 1H), 3.75–3.68 (m, 1H), 3.67 (d,  $J = 16.8$  Hz, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.42–3.25 (m, 3H), 2.16 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 2.06–1.98 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.5, 146.1, 140.8, 135.4, 130.5, 130.1, 129.9, 129.7, 127.7, 126.7, 125.4, 122.4, 106.8, 103.3, 100.8, 88.4, 72.9, 71.6, 62.9, 62.2, 61.1, 56.5, 49.9, 28.3.

ESI-HRMS  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{BrNO}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  470,09618, naměřená 470,0968.

### 5.2.21. 11-*O*-(4-bromobenzyl)haemanthamin (75)

Výtěžek 26 mg (26 %); bílá amorfnní látka [ $\alpha$ ]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +15,6 (c = 0,205; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.46–7.37 (m, 2H, AA'BB'), 7.13–7.03 (m, 2H, AA'BB'), 6.86 (s, 1H), 6.51 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.20 (dd,  $J$  = 10.1 Hz,  $J$  = 5.1 Hz, 1H), 5.88 (d, overlap,  $J$  = 4.9 Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J$  = 4.9 Hz, 1H), 4.45 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 4.32 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 4.28 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 3.89–3.83 (m, 1H), 3.70 (dd,  $J$  = 6.8 Hz,  $J$  = 4.0 Hz, 1H), 3.66 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 3.40–3.26 (m, overlap, 3H), 3.35 (s, overlap, 3H), 2.15 (td,  $J$  = 13.5 Hz,  $J$  = 4.0 Hz, 1H), 2.06–1.97 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 146.6, 146.1, 137.4, 135.4, 131.4, 129.7, 128.7, 127.7, 126.6, 121.3, 106.8, 103.3, 100.8, 88.2, 72.9, 71.7, 62.9, 62.3, 61.1, 56.5, 49.9, 28.2.

ESI-HRMS  $m/z$  teoretická hodnota C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>BrNO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 470,09618, naměřená 470,0965.

### 5.2.22. 11-*O*-(2-chlorobenzyl)haemanthamin (76)

Výtěžek 37 mg (37 %); bílá amorfnní látka; [ $\alpha$ ]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +41,9 (c = 0,105; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.36 (dd,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.25 (td,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.21 (td,  $J$  = 7.5 Hz,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.53 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.21 (dd,  $J$  = 10.1 Hz,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 5.93–5.88 (m, 2H), 4.56 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H), 4.48 (d,  $J$  = 13.5 Hz, 1H), 4.37 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 3.92–3.86 (m, 1H), 3.82 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 3.73 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 3.43 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 2H), 3.41–3.35 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.23 (td,  $J$  = 13.5 Hz,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 2.09 (dd,  $J$  = 13.5 Hz,  $J$  = 4.4 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 146.6, 146.2, 136.1, 135.2, 132.3, 129.7, 129.1, 128.4, 128.3, 127.5, 126.7, 126.1, 106.7, 103.4, 100.9, 88.5, 72.8, 69.7, 63.0, 62.1, 60.9, 56.5, 49.9, 28.1.

ESI-HRMS  $m/z$  teoretická hodnota C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>ClNO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 426,1467, naměřená 426,1471.

### 5.2.23. 11-*O*-(3-chlorobenzyl)haemanthamin (77)

Výtěžek 28 mg (28 %); bílá amorfnní látka; [ $\alpha$ ]<sup>24</sup><sub>D</sub> = +57,5 (c = 0,160; CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.23–7.19 (m, 3H), 7.09–7.06 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.51 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.21 (dd,  $J$  = 10.1 Hz,  $J$  = 5.0 Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 5.87 (d, overlap,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 4.48 (d,  $J$  = 12.3 Hz, 1H), 4.31 (d, overlap,  $J$  = 16.9 Hz, 1H), 4.30 (d, overlap,  $J$  = 12.3 Hz, 1H), 3.90–3.85 (m, 1H), 3.71 (ddd,  $J$  = 6.7 Hz,  $J$  = 3.7 Hz,  $J$  = 1.1 Hz, 1H), 3.66 (d,  $J$  = 16.9 Hz, 1H), 3.36 (s, overlap, 3H), 3.39–3.28 (m, overlap, 3H), 2.16 (td,  $J$  = 13.5 Hz,  $J$  = 4.3 Hz, 1H), 2.03–1.97 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.5, 146.1, 140.5, 135.5, 134.2, 129.7, 129.6, 127.8, 127.5, 127.1, 126.8, 125.0, 106.8, 103.3, 100.8, 88.4, 73.0, 71.7, 62.9, 62.3, 61.1, 56.5, 49.9, 28.3.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{ClNO}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  425,1394, naměřená 425,1389.

#### 5.2.24. 11-*O*-(3-fluorobenzyl)haemanthamin (78)

Výtěžek 41 mg (41 %); bílá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +130,5$  ( $c = 0,190$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.29–7.21 (m, 1H), 6.98–6.94 (m, 1H), 6.94–6.89 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 6.50 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.22 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.89 (d, overlap,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 5.88 (d, overlap,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 4.34 (d, overlap,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 4.33 (d, overlap,  $J = 12.5$  Hz, 1H), 3.87 (ddd,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 3.73 (td,  $J = 5.1$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 3.70 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H), 3.42–3.31 (m, 3H), 3.36 (s, 3H), 2.18 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 2.09–2.03 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 163.0 (d,  $J = 245.9$  Hz), 146.7, 146.2, 141.0 (d,  $J = 7.2$  Hz), 135.2, 129.8, 127.5, 126.1, 122.3, 114.3 (d,  $J = 21.5$  Hz), 113.8 (d,  $J = 22.0$  Hz), 106.8, 103.3, 100.9, 88.0, 72.8, 71.7, 63.0, 62.0, 60.9, 56.6, 49.9, 28.0.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{FNO}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  410,1762, naměřená 410,1765.

#### 5.2.25. 11-*O*-(2-jodobenzyl)haemanthamin (79)

Výtěžek 35 mg (35 %); bílá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +58,2$  ( $c = 0,110$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.79 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 7.37–7.28 (m, 2H), 6.97 (td,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.56 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.21 (dd,  $J = 10.1$  Hz,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 5.91 (d, overlap,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 5.90 (d, overlap,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 4.44 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H), 4.35 (d, overlap,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 4.34 (d, overlap,  $J = 13.1$  Hz, 1H), 3.89 (td,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 3.85–3.79 (m, 1H), 3.70 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.42–3.39 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.34 (dd,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 2.22 (td,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 2.03 (dd,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 4.4$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 146.5, 146.1, 140.6, 138.9, 135.5, 129.6, 129.0, 128.3, 128.1, 127.8, 126.8, 106.7, 103.4, 100.8, 97.2, 88.7, 76.5, 73.0, 62.9, 62.3, 61.2, 56.5, 49.9, 28.4.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{INO}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  518,0823, naměřená 518,0826.

#### 5.2.26. 11-*O*-(3-nitrobenzyl)haemanthamin (80)

Výtěžek 41 mg (41 %); nažloutlá amorfnní látka;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +32,6$  ( $c = 0,135$ ;  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.12–8.02 (m, 1H), 7.90–7.80 (m, 1H), 7.42 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H),

7.39–7.36 (m, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.66 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.05 (dd,  $J = 10.0$  Hz,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 5.96–5.88 (m, 2H), 4.57 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.23 (dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 3.90 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H), 3.87–3.79 (m, 1H), 3.72 (dd,  $J = 13.9$  Hz,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 3.45 (dd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 2.79 (ddd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 2.15–2.12 (m, 1H), 1.69 (td,  $J = 13.8$ ,  $J = 4.2$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148.3, 146.4, 146.1, 140.3, 132.8, 132.7, 132.0, 129.1, 126.8, 122.5, 122.1, 106.7, 105.2, 101.0, 93.9, 72.2, 70.6, 64.0, 62.5, 60.2, 56.6, 48.2, 28.7.

**ESI-HRMS**  $m/z$  teoretická hodnota  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  437,1707, naměřená 437,1711.



### 5.3 Biologická aktivita derivátů haemanthaminu ve vztahu k Alzheimerově chorobě

Po potvrzení struktury nově připravených derivátů, byly všechny látky podrobeny screeningu vůči lidským cholinesterasám *hAChE* a *hBuChE*. Screening byl vždy proveden při jednotlivé koncentraci 100  $\mu\text{M}$  pro oba enzymy a u všech látek vykazující inhibiční aktivitu větší než 50 % byla stanovena hodnota  $\text{IC}_{50}$ . U zajímavých látek byl vypočten selektivní index pro *hAChE* a *hBuChE*, který je definován jako poměr  $\text{IC}_{50}$  *hAChE* ku  $\text{IC}_{50}$  *hBuChE* a naopak. Dále byla u vybraných látek také studována inhibiční aktivita vůči enzymu GSK-3 $\beta$ . Následně byla u neaktivnějších látek vypočtena hodnota logBB, jež predikuje průchod látky přes HEB. Ta je definována jako logaritmický poměr mezi koncentrací látky v mozku a krvi <sup>144</sup>. Látky s hodnotou  $\log\text{BB} > 0,3$  snadno přecházejí přes HEB, sloučeniny v rozmezí  $0,3 > \log\text{BB} > -1$  by mely být také schopné přestupu přes HEB, ale látky s hodnotou  $\log\text{BB} < -1,0$  přechází pouze omezeně. U vybraných látek byla stanovena i schopnost jejich přestupu přes HEB prostřednictvím pasivní difúze za využití PAMPA studie. V následující tabulce jsou uvedeny veškeré získané biologické aktivity jednotlivých derivátů.

**Tabulka 8:** Biologické aktivity haemanthaminu a jeho derivátů v souvislosti s AD.

Látka	Název derivátu	Inhibice hAChE při 100 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> hAChE ( $\mu$ M) <sup>i</sup>	SI hAChE <sup>a</sup>	Inhibice hBuChE při 100 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> hBuChE ( $\mu$ M) <sup>i</sup>	SI hBuChE <sup>b</sup>	Inhibice GSK-3 $\beta$ (%)	IC <sub>50</sub> GSK-3 $\beta$ ( $\mu$ M) <sup>i</sup>	logBB <sup>d</sup>	PAMP A-BBB (Pe, 10 <sup>-6</sup> cm s <sup>-1</sup> )
1	haemanthamin										
2	1,2-dihydrohaemanthamin	7,65 $\pm$ 2,43	>100		7,53 $\pm$ 1,35	>100					
<b>Esterové deriváty haemanthaminu</b>											
3	11-O-acetylhaemanthamin	1,18 $\pm$ 2,25	>100		2,01 $\pm$ 1,45	>100					
4	11-O-propionylhaemanthamin	1,76 $\pm$ 2,77	>100		14,57 $\pm$ 1,17	>100		87,82 <sup>e</sup>			
5	11-O-isobutanoylhaemanthamin	2,77 $\pm$ 1,61	>100		13,12 $\pm$ 1,03	>100		76,43 <sup>e</sup>			
6	11-O-pentanoylhaemanthamin	2,98 $\pm$ 0,21	>100		22,12 $\pm$ 0,65	>100		66,81 <sup>f</sup>			
7	11-O-hexanoylhaemanthamin	3,15 $\pm$ 0,88	>100		14,25 $\pm$ 1,45	>100		97,42 <sup>e</sup>	13,5 $\pm$ 2,31		
8	11-O-butanoylhaemanthamin	4,65 $\pm$ 2,24	>100		23,78 $\pm$ 2,14	>100		77,92 <sup>e</sup>			
9	11-O-isovalerylhaemanthamin	6,05 $\pm$ 3,40	>100		8,66 $\pm$ 2,48	>100					
10	11-O-heptanoylhaemanthamin	6,98 $\pm$ 2,02	>100		18,51 $\pm$ 2,71	>100		25,06 <sup>g</sup>			
11	11-O-oktanoylhaemanthamin	9,79 $\pm$ 4,02	>100		10,53 $\pm$ 1,59	>100		59,35 <sup>g</sup>			
12	11-O-4-pentanoylhaemanthamin	15,83 $\pm$ 1,15	>100		20,38 $\pm$ 1,12	>100					
13	11-O-benzoylhaemanthamin	34,97 $\pm$ 1,17	>100	< 0,06	82,15 $\pm$ 2,07	5,80 $\pm$ 0,30	>17,24	11,22 <sup>h</sup>		0,23	8,4 $\pm$ 0,2 CNS+
14	11-O-(2-methylbenzoyl)haemanthamin	74,67 $\pm$ 2,17	18,18 $\pm$ 1,30	0,36	79,89 $\pm$ 0,97	6,59 $\pm$ 1,19	2,76	15,35 <sup>h</sup>		0,18	5,8 $\pm$ 0,9 CNS+
15	11-O-(3-methylbenzoyl)haemanthamin	30,08 $\pm$ 1,76	>100	<0,26	62,91 $\pm$ 2,58	25,88 $\pm$ 2,57	> 3,86				13 $\pm$ 2 CNS +
16	11-O-(4-methylbenzoyl)haemanthamin	14,79 $\pm$ 2,56	>100		26,76 $\pm$ 1,04	>100					
17	11-O-(2,3-dimethylbenzoyl)haemanthamin	48,28 $\pm$ 2,07	>100		46,66 $\pm$ 1,07	>100					
18	11-O-(3,5-dimethylbenzoyl)haemanthamin	20,50 $\pm$ 0,29	>100		42,45 $\pm$ 0,39	>100					
19	11-O-(2,6-dimethylbenzoyl)haemanthamin	31,20 $\pm$ 2,10	>100		37,33 $\pm$ 0,84	>100					
20	11-O-(2,4,6-trimethylbenzoyl)haemanthamin	19,91 $\pm$ 5,51	>100		14,49 $\pm$ 1,84	>100					
21	11-O-(4-ethylbenzoyl)haemanthamin	36,27 $\pm$ 1,10	>100		16,87 $\pm$ 1,55	>100					
22	11-O-(4-butylbenzoyl)haemanthamin	11,73 $\pm$ 2,20	>100		14,41 $\pm$ 0,59	>100					
23	11-O-(4- <i>tert</i> -butylbenzoyl)haemanthamin	7,65 $\pm$ 2,43	>100		7,53 $\pm$ 1,35	>100					
24	11-O-(4-pentylbenzoyl)haemanthamin	1,67 $\pm$ 0,10	>100		2,03 $\pm$ 1,00	>100					

**Tabulka 8:** Biologické aktivity haemanthaminu a jeho derivátů v souvislosti s AD (pokračování).

25	11- <i>O</i> -(4-hexylbenzoyl)haemanthamin	5,56 ± 2,78	>100		8,82 ± 1,69	>100					
26	11- <i>O</i> -(4-heptylbenzoyl)haemanthamin	4,34 ± 2,88	>100		9,58 ± 1,63	>100					
27	11- <i>O</i> -(4-decylbenzoyl)haemanthamin	7,51 ± 1,48	>100		7,56 ± 1,81	>100					
28	11- <i>O</i> -(2-methoxybenzoyl)haemanthamin	51,23 ± 3,25	86,38 ± 6,08	0,04	89,87 ± 0,65	3,34 ± 0,44	25,86			0,09	16 ± 1 CNS+
29	11- <i>O</i> -(3-methoxybenzoyl)haemanthamin	38,3 ± 2,54	>100	<0,76	57,23 ± 0,89	75,48 ± 12,50	>1,32				
30	11- <i>O</i> -(4-methoxybenzoyl)haemanthamin	26,4 ± 1,04	>100		45,62 ± 1,62	>100					
31	11- <i>O</i> -(3,5-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	39,65 ± 1,03	>100		39,64 ± 1,21	>100					
32	11- <i>O</i> -(3,4-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	41,28 ± 1,85	>100		35,92 ± 1,85	>100					
33	11- <i>O</i> -(2,6-dimethoxybenzoyl)haemanthamin	37,04 ± 0,63	>100	< 0,07	86,54 ± 0,64	7,19 ± 0,29	>13,91				
34	11- <i>O</i> -(3,4,5-trimethoxybenzoyl)haemanthamin	26,07 ± 2,63	>100		13,92 ± 0,91	>100					
35	11- <i>O</i> -(3,5-diethoxybenzoyl)haemanthamin	9,50 ± 1,84	>100		5,76 ± 0,63	>100		13,22 <sup>h</sup>			
36	11- <i>O</i> -(3-hydroxybenzoyl)haemanthamin	59,24 ± 2,41	67,28 ± 3,00	0,34	72,86 ± 1,66	22,93 ± 0,43	2,93				
37	11- <i>O</i> -(2-bromobenzoyl)haemanthamin	48,95 ± 0,81	>100	<0,14	76,59 ± 0,34	14,43 ± 1,31	>6,93				
38	11- <i>O</i> -(3-bromobenzoyl)haemanthamin	38,78 ± 1,23	>100		46,32 ± 1,15	>100					
39	11- <i>O</i> -(4-bromobenzoyl)haemanthamin	33,87 ± 1,05	>100		12,94 ± 0,91	>100					
40	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzoyl)haemanthamin	78,31 ± 0,93	13,70 ± 0,76	0,41	91,85 ± 0,87	5,61 ± 0,62	2,44			0,26	15 ± 1 CNS+
41	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzoyl)haemanthamin	55,87 ± 2,06	85,11 ± 6,3	0,94	60,83 ± 1,29	80,1 ± 10,1	1,06			0,43	
42	11- <i>O</i> -(4-chlorobenzoyl)haemanthamin	44,22 ± 2,35	>100		28,18 ± 1,68	>100					
43	11- <i>O</i> -(3,4-dichlorobenzoyl)haemanthamin	29,72 ± 0,58	>100		10,11 ± 1,18	>100					
44	11- <i>O</i> -(2-jodobenzoyl)haemanthamin	24,04 ± 3,32	>100	<0,07	68,35 ± 1,17	6,88 ± 0,91	>14,53				
45	11- <i>O</i> -(3-jodobenzoyl)haemanthamin	17 ± 0,31	>100		35,47 ± 1,58	>100					
46	11- <i>O</i> -(4-jodobenzoyl)haemanthamin	9,04 ± 2,87	>100		30,73 ± 4,36	>100					
47	11- <i>O</i> -(2-fluorobenzoyl)haemanthamin	58,23 ± 0,66	68,67 ± 5,12	0,07	91,00 ± 0,31	4,85 ± 0,78	14,1				
48	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzoyl)haemanthamin	51,41 ± 2,76	79,22 ± 8,12	0,53	86,22 ± 0,78	41,96 ± 3,41	1,89			0,35	
49	11- <i>O</i> -(4-fluorobenzoyl)haemanthamin	14,50 ± 3,30	>100		27,58 ± 0,34	>100					

**Tabulka 8:** Biologické aktivity haemantaminu a jeho derivátů v souvislosti s AD (pokračování).

50	11- <i>O</i> -(2,4-difluorobenzoyl)haemantamin	66,02 ± 0,68	81,45 ± 7,18	3,05	43,30 ± 0,39	>100	< 0,81				
51	11- <i>O</i> -(3-trifluormethyl)benzoylhaemantamin	68,94 ± 3,71	32,75 ± 6,12	<3,05	28,48 ± 3,68	>100	<0,33	12,56 <sup>h</sup>			
52	11- <i>O</i> -(2-nitrobenzoyl)haemantamin	88,04 ± 2,61	9,92 ± 0,45	>10,08	38,53 ± 3,06	>100	<0,10			0,04	21 ± 0 CNS+
53	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzoyl)haemantamin	91,28 ± 0,76	3,99 ± 0,25	>25,06	22,78 ± 2,74	>100	<0,04			0,04	20 ± 0 CNS+
54	11- <i>O</i> -(4-nitrobenzoyl)haemantamin	80,14 ± 1,14	14,70 ± 1,79	>6,80	15,83 ± 1,28	>100	<0,15	27 <sup>h</sup>	34,8 ± 0,88	0,01	7,1 ± 0,3 CNS+
55	11- <i>O</i> -(3,5-dinitrobenzoyl)haemantamin	86,60 ± 2,09	1,07 ± 0,12	>93,46	2,05 ± 2,11	>100	<0,01			-0,09	
56	11- <i>O</i> -(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemantamin	90,73 ± 2,38	0,17 ± 0,01	>588,24	28,04 ± 0,55	>100	<0,002	46,51 <sup>h</sup>		0,27	
57	11- <i>O</i> -(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemantamin	99,29 ± 0,94	0,12 ± 0,01	>833,33	12,54 ± 0,80	>100	<0,001			0,23	
58	11- <i>O</i> -(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemantamin	99,17 ± 0,72	0,17 ± 0,01	>588,24	7,43 ± 0,10	>100	<0,002			-0,04	
59	11- <i>O</i> -(3-bromo-5-nitrobenzoyl)haemantamin	69,38 ± 1,30	12,79 ± 0,53	>7,82	7,35 ± 1,52	>100	<0,13				
60	11- <i>O</i> -(2-chloro-4-nitrobenzoyl)haemantamin	77,53 ± 0,60	9,27 ± 0,40	>10,79	9,60 ± 0,35	>100	<0,09				
61	11- <i>O</i> -(4-fluoro-3-methylbenzoyl)haemantamin	30,13 ± 1,39	>100		37,76 ± 0,65	>100					
62	11- <i>O</i> -(6-chloro-2-fluoro-3-methylbenzoyl)haemantamin	33,15 ± 0,68	>100	<0,43	64,79 ± 0,67	43,19 ± 0,40	<2,32				
63	11- <i>O</i> -(2-naphthoyl)haemantamin	14,55 ± 0,35	>100		26,10 ± 0,16	>100					
64	11- <i>O</i> -(1-naphthoyl)haemantamin	19,63 ± 0,23	>100	<0,12	77,81 ± 0,17	12,34 ± 1,37	<8,10				
65	11- <i>O</i> -(2-furoyl)haemantamin	14,91 ± 0,26	>100		37,61 ± 0,40	>100					
66	11- <i>O</i> -(3-furoyl)haemantamin	26,00 ± 2,78	>100	<0,31	67,39 ± 1,71	31,06 ± 0,87	<3,21	85,96 <sup>e</sup>			
<b>Etherové deriváty haemantaminu</b>											
67	11- <i>O</i> -benzylhaemantamin	29,94 ± 1,41	>100	<0,02	92,11 ± 1,74	2,16 ± 0,41	>46,30			0,23	
68	11- <i>O</i> -(2-methylbenzyl)haemantamin	45,22 ± 1,02	>100	<0,03	88,73 ± 0,16	2,72 ± 0,81	>36,76			-0,13	
69	11- <i>O</i> -(3-methylbenzyl)haemantamin	37,44 ± 3,55	>100	<0,03	65,93 ± 4,52	3,42 ± 0,04	>29,24			0,22	
70	11- <i>O</i> -(3,5-dimethylbenzyl)haemantamin	20,89 ± 2,97	>100	<0,18	79,14 ± 0,91	18,36 ± 1,23	>5,45				
71	11- <i>O</i> -(4-isopropylbenzyl)haemantamin	42,26 ± 4,92	>100	<0,25	65,19 ± 3,65	25,07 ± 0,81	>3,99				
72	11- <i>O</i> -(4- <i>tert</i> -butylbenzyl)haemantamin	34,14 ± 2,06	>100	<0,31	64,80 ± 3,19	30,61 ± 0,63	>3,27				
73	11- <i>O</i> -(2-bromobenzyl)haemantamin	47,18 ± 3,00	>100	<0,02	81,03 ± 1,11	1,62 ± 0,14	>61,73			-0,13	
74	11- <i>O</i> -(3-bromobenzyl)haemantamin	41,5 ± 1,76	>100	<0,04	90,44 ± 0,83	3,58 ± 0,33	>27,93			-0,13	
75	11- <i>O</i> -(4-bromobenzyl)haemantamin	40,77 ± 1,16	>100	<0,25	70,03 ± 0,93	25,45 ± 0,98	>3,93				
76	11- <i>O</i> -(2-chlorobenzyl)haemantamin	48,87 ± 0,44	>100	<0,01	95,79 ± 0,41	1,14 ± 0,10	>87,72			0,23	

**Tabulka 8:** Biologické aktivity haemanthaminu a jeho derivátů v souvislosti s AD (pokračování).

77	11- <i>O</i> -(3-chlorobenzyl)haemanthamin	28,52 ± 0,92	>100	<0,08	79,26 ± 3,19	7,70 ± 0,50	>12,99				
78	11- <i>O</i> -(3-fluorobenzyl)haemanthamin	32,80 ± 1,41	>100	<0,10	88,53 ± 1,41	9,86 ± 0,38	>10,14			-0,13	
79	11- <i>O</i> -(2-jodobenzyl)haemanthamin	27,08 ± 1,31	>100	<0,01	85,36 ± 1,88	0,85 ± 0,06	>117,65			-0,17	
80	11- <i>O</i> -(3-nitrobenzyl)haemanthamin	78,20 ± 2,07	9,20 ± 1,88	>10,87	48,67 ± 1,81	>100	<0,09				
	galanthamin <sup>c</sup>		1,7 ± 0,1	24,90		42 ± 1,3	0,04			0,04	5,10
	eserin <sup>c</sup>		0,063 ± 0,01	2,10		0,13 ± 0,01	0,48			-0,18	
	kofein <sup>c</sup>										0,1 ± 0,1 CNS-
	promazin <sup>c</sup>										8,8 CNS+
	SB-415286 <sup>c</sup>								70 nM		

<sup>a</sup> Selektivní index *hAChE* stanoven jako poměr *hBuChE* IC<sub>50</sub>/*hAChE* IC<sub>50</sub>; <sup>b</sup> Selektivní index *hBuChE* stanoven jako poměr *hAChE* IC<sub>50</sub>/*hBuChE* IC<sub>50</sub>; <sup>c</sup> referenční látky; <sup>d</sup> vypočteno pomocí [www.way2drug.com/geb](http://www.way2drug.com/geb); <sup>e</sup> testováno při koncentraci 10 μM; <sup>f</sup> testováno při koncentraci 25 μM; <sup>g</sup> testováno při koncentraci 50 μM; <sup>h</sup> testováno při koncentraci 100 μM; <sup>i</sup> Koncentrace látky potřebná ke snížení aktivity enzymu o 50 %, hodnoty jsou průměrem s výběrovou směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření.

## 5.4 Cytotoxická aktivita derivátů haemanthaminu

U některých derivátů byla také stanovena cytotoxická aktivita, která byla studována ve spolupráci s Ústavem lékařské biochemie na Lékařské fakultě. Mezi testované linie patřilo 9 nádorových linií (Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS) včetně jedné nenádorové linie (MRC-5). Nejprve byl proveden screening při jednotné koncentraci 10  $\mu$ M. V následující tabulce jsou zvýrazněny látky a linie, u kterých byla viabilita nižší než 25 % (tmavě zelená) a do 50 % (světle zelená).

**Tabulka 9:** Heatmapa derivátů haemanthaminu znázorňující viabilitu nádorových linií.

Látka	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
1	13 $\pm$ 3	1 $\pm$ 1	30 $\pm$ 6	37 $\pm$ 6	42 $\pm$ 3	30 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	28 $\pm$ 3	32 $\pm$ 2
2	104 $\pm$ 22	85 $\pm$ 6	96 $\pm$ 17	89 $\pm$ 6	88 $\pm$ 7	93 $\pm$ 7	99 $\pm$ 6	92 $\pm$ 0	93 $\pm$ 3	112 $\pm$ 4
5	92 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	99 $\pm$ 7	94 $\pm$ 4	88 $\pm$ 3	99 $\pm$ 2	93 $\pm$ 6	93 $\pm$ 5	88 $\pm$ 6	89 $\pm$ 3
6	100 $\pm$ 7	97 $\pm$ 3	105 $\pm$ 9	100 $\pm$ 3	96 $\pm$ 4	106 $\pm$ 5	98 $\pm$ 3	95 $\pm$ 4	96 $\pm$ 8	96 $\pm$ 4
8	81 $\pm$ 9	87 $\pm$ 19	93 $\pm$ 6	93 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2	104 $\pm$ 10	84 $\pm$ 4	91 $\pm$ 13	82 $\pm$ 5	93 $\pm$ 3
12	85 $\pm$ 6	95 $\pm$ 8	103 $\pm$ 9	88 $\pm$ 9	93 $\pm$ 7	85 $\pm$ 12	102 $\pm$ 9	91 $\pm$ 16	93 $\pm$ 5	92 $\pm$ 6
13	58 $\pm$ 7	64 $\pm$ 4	73 $\pm$ 9	75 $\pm$ 3	67 $\pm$ 8	70 $\pm$ 1	96 $\pm$ 8	46 $\pm$ 13	57 $\pm$ 6	61 $\pm$ 9
14	104 $\pm$ 3	100 $\pm$ 11	105 $\pm$ 9	111 $\pm$ 12	100 $\pm$ 5	131 $\pm$ 7	87 $\pm$ 7	94 $\pm$ 8	105 $\pm$ 9	96 $\pm$ 7
15	95 $\pm$ 11	91 $\pm$ 3	96 $\pm$ 8	98 $\pm$ 6	95 $\pm$ 6	129 $\pm$ 11	104 $\pm$ 4	112 $\pm$ 3	97 $\pm$ 17	112 $\pm$ 9
16	127 $\pm$ 14	108 $\pm$ 12	120 $\pm$ 5	118 $\pm$ 5	98 $\pm$ 9	163 $\pm$ 8	94 $\pm$ 4	112 $\pm$ 14	100 $\pm$ 13	91 $\pm$ 5
17	98 $\pm$ 5	98 $\pm$ 6	105 $\pm$ 9	103 $\pm$ 8	92 $\pm$ 3	135 $\pm$ 20	90 $\pm$ 2	114 $\pm$ 14	99 $\pm$ 7	91 $\pm$ 12
18	121 $\pm$ 11	115 $\pm$ 11	118 $\pm$ 6	122 $\pm$ 5	102 $\pm$ 10	147 $\pm$ 10	109 $\pm$ 7	103 $\pm$ 5	108 $\pm$ 7	106 $\pm$ 13
19	94 $\pm$ 4	90 $\pm$ 8	95 $\pm$ 1	98 $\pm$ 10	114 $\pm$ 8	148 $\pm$ 17	106 $\pm$ 6	56 $\pm$ 10	111 $\pm$ 24	87 $\pm$ 8
22	124 $\pm$ 6	102 $\pm$ 4	101 $\pm$ 10	112 $\pm$ 6	119 $\pm$ 9	134 $\pm$ 10	107 $\pm$ 11	114 $\pm$ 6	128 $\pm$ 3	117 $\pm$ 8
24	170 $\pm$ 13	128 $\pm$ 4	119 $\pm$ 14	107 $\pm$ 14	168 $\pm$ 19	213 $\pm$ 34	108 $\pm$ 20	128 $\pm$ 8	130 $\pm$ 14	154 $\pm$ 20
29	93 $\pm$ 1	96 $\pm$ 6	100 $\pm$ 6	101 $\pm$ 8	89 $\pm$ 3	108 $\pm$ 3	94 $\pm$ 6	104 $\pm$ 6	106 $\pm$ 5	89 $\pm$ 6
30	83 $\pm$ 11	94 $\pm$ 18	102 $\pm$ 5	93 $\pm$ 3	88 $\pm$ 5	108 $\pm$ 7	84 $\pm$ 12	100 $\pm$ 2	89 $\pm$ 15	92 $\pm$ 1
31	80 $\pm$ 7	89 $\pm$ 2	102 $\pm$ 6	94 $\pm$ 4	89 $\pm$ 14	97 $\pm$ 6	85 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	91 $\pm$ 7	91 $\pm$ 6
32	80 $\pm$ 7	94 $\pm$ 11	96 $\pm$ 12	86 $\pm$ 5	90 $\pm$ 5	96 $\pm$ 7	74 $\pm$ 2	100 $\pm$ 19	92 $\pm$ 1	85 $\pm$ 7
33	99 $\pm$ 9	85 $\pm$ 4	101 $\pm$ 6	98 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2	102 $\pm$ 1	84 $\pm$ 4	89 $\pm$ 4	97 $\pm$ 14	96 $\pm$ 6
34	108 $\pm$ 2	113 $\pm$ 6	114 $\pm$ 12	109 $\pm$ 7	113 $\pm$ 3	122 $\pm$ 9	94 $\pm$ 8	113 $\pm$ 2	100 $\pm$ 6	118 $\pm$ 7
35	95 $\pm$ 7	86 $\pm$ 7	100 $\pm$ 11	112 $\pm$ 12	99 $\pm$ 10	103 $\pm$ 1	97 $\pm$ 9	76 $\pm$ 10	95 $\pm$ 12	92 $\pm$ 6
36	119 $\pm$ 2	105 $\pm$ 1	97 $\pm$ 6	96 $\pm$ 11	130 $\pm$ 3	131 $\pm$ 9	91 $\pm$ 10	102 $\pm$ 1	110 $\pm$ 16	109 $\pm$ 13
37	95 $\pm$ 8	99 $\pm$ 3	104 $\pm$ 7	84 $\pm$ 9	108 $\pm$ 6	116 $\pm$ 5	86 $\pm$ 10	114 $\pm$ 10	93 $\pm$ 10	113 $\pm$ 11
39	115 $\pm$ 4	85 $\pm$ 2	102 $\pm$ 6	125 $\pm$ 9	174 $\pm$ 8	90 $\pm$ 2	116 $\pm$ 4	101 $\pm$ 6	120 $\pm$ 4	115 $\pm$ 10
41	119 $\pm$ 3	104 $\pm$ 9	104 $\pm$ 12	105 $\pm$ 5	107 $\pm$ 14	142 $\pm$ 17	99 $\pm$ 4	105 $\pm$ 11	104 $\pm$ 10	101 $\pm$ 6

**Tabulka 9:** Heatmapa derivátů haemanthaminu znázorňující viabilitu nádorových linií (pokračování).

42	69 ± 6	135 ± 22	75 ± 25	97 ± 23	118 ± 9	122 ± 24	72 ± 4	90 ± 11	135 ± 6	100 ± 5
43	82 ± 9	91 ± 25	108 ± 6	91 ± 12	109 ± 13	121 ± 38	106 ± 6	107 ± 8	111 ± 2	104 ± 2
44	90 ± 12	101 ± 18	106 ± 12	101 ± 0	99 ± 6	104 ± 8	88 ± 3	96 ± 13	104 ± 7	87 ± 14
52	110 ± 13	111 ± 13	114 ± 13	108 ± 14	97 ± 12	175 ± 2	115 ± 6	89 ± 14	108 ± 33	125 ± 10
53	86 ± 4	88 ± 5	94 ± 4	90 ± 3	76 ± 2	104 ± 4	83 ± 4	88 ± 6	78 ± 4	92 ± 6
54	87 ± 5	78 ± 7	78 ± 2	84 ± 7	779 ± 6	101 ± 9	85 ± 8	61 ± 9	71 ± 5	73 ± 3
55	35 ± 3	8 ± 1	39 ± 5	48 ± 6	39 ± 6	42 ± 3	39 ± 3	11 ± 1	30 ± 4	37 ± 6
56	91 ± 9	62 ± 4	98 ± 5	112 ± 8	143 ± 8	88 ± 9	103 ± 4	76 ± 6	87 ± 8	94 ± 6
57	1 ± 1	1 ± 2	4 ± 4	2 ± 1	31 ± 10	0 ± 2	0 ± 1	3 ± 2	0 ± 0	0 ± 1
59	88 ± 5	66 ± 8	93 ± 5	84 ± 6	89 ± 2	97 ± 5	82 ± 4	83 ± 6	90 ± 10	87 ± 1
60	87 ± 7	58 ± 4	65 ± 4	69 ± 6	79 ± 4	92 ± 5	89 ± 2	45 ± 3	70 ± 7	65 ± 4
61	101 ± 7	92 ± 13	97 ± 3	95 ± 13	96 ± 14	102 ± 2	99 ± 6	88 ± 9	88 ± 6	89 ± 5
62	104 ± 11	91 ± 14	112 ± 9	108 ± 15	103 ± 19	143 ± 17	102 ± 10	81 ± 8	116 ± 19	113 ± 5
63	99 ± 1	101 ± 7	108 ± 6	99 ± 12	103 ± 8	91 ± 17	109 ± 12	96 ± 9	104 ± 4	101 ± 9
64	105 ± 7	88 ± 13	106 ± 8	97 ± 3	116 ± 11	117 ± 11	108 ± 2	97 ± 12	111 ± 3	105 ± 3
65	111 ± 19	91 ± 11	96 ± 11	99 ± 2	137 ± 5	157 ± 14	112 ± 5	81 ± 2	116 ± 5	111 ± 14
66	85 ± 7	94 ± 14	90 ± 3	94 ± 3	98 ± 8	98 ± 9	90 ± 5	88 ± 2	90 ± 5	95 ± 2
67	101 ± 5	99 ± 3	100 ± 9	98 ± 8	105 ± 5	105 ± 2	89 ± 12	101 ± 3	95 ± 13	100 ± 7
DOX	2 ± 0	6 ± 2	37 ± 1	87 ± 4	6 ± 4	7 ± 3	40 ± 1	18 ± 3	56 ± 5	26 ± 3
viabilita 0-25 %		viabilita 25-50 %								

\* DOX - pozitivní kontrola doxorubicin při koncentraci 1 μM

\*\* hodnoty jsou průměrem se směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření

Pro nejzajímavější derivát **57** (11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin) společně s **1** (haemanthamin) byla stanovena hodnota IC<sub>50</sub> (Tabulka 10) <sup>42</sup>.

**Tabulka 10:** Hodnoty IC<sub>50</sub> haemanthaminu (**1**) a 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthaminu (**57**) na panelu vybraných linií <sup>42</sup>.

Látka	Jurkat	MOLT-4	A549	HT-29	PANC-1	A2780	HeLa	MCF-7	SAOS-2	MRC-5
<b>1</b>	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,5	2,5 ± 0,6
<b>57</b>	5,3 ± 0,1	5,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	10,1 ± 0,6	7,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	2,6 ± 0,3	8,3 ± 0,4	2,3 ± 0,2

\* hodnoty jsou průměrem s výběrovou směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých měření

## 6 DISKUZE

Haemanthamin patří nejen mezi nejběžnější alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, ale i mezi nejzajímavější metabolity z pohledu jeho biologických aktivit<sup>10</sup>. V rámci předchozích studií bylo nejvíce pozornosti věnováno cytotoxické a protinádorové aktivitě této látky<sup>49–52,149</sup>. Jedná se o sloučeninu, která je produkována mnoha taxony rostlin čeledi Amaryllidaceae, a tak je její izolace možná i v gramových množstvích. To umožňuje i fakt, že tento alkaloid dobře krystalizuje z běžných rozpouštědel jako je například směs  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  1:1. Jen na našem pracovišti se podařilo v průběhu posledních pěti let izolovat více než 30 g tohoto alkaloidu v rámci fytochemických studií rostlin z rodu *Narcissus*, *Zephyranthes* a dalších<sup>15,16,54,131,147,148</sup>. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o dostupnou sloučeninu a výsledků předchozích studií, byla tato látka původně vybrána pro syntézu polosyntetických derivátů za účelem přípravy sloučenin s pokud možno ještě vyšší cytotoxickou či protinádorovou aktivitou.

Příprava polosyntetických derivátů byla inspirována přípravou derivátů jiného amarylkovitého alkaloidu, a sice lykorinu, který se v rostlinách také vyskytuje ve značných koncentracích<sup>150–154</sup>. Veškeré obměny, kromě 1,2-dihydrohaemanthaminu (**2**), byly provedeny acylací (**3-12**) nebo alkylací hydroxyskupiny (**13-66**) v poloze C-11. V rámci celé studie se podařilo připravit dohromady 80 sloučenin, výtěžnost syntéz esterových derivátů se pohybovala mezi 60 až 98 %, výtěžnost alkylačních reakcí byla o něco nižší a pohybovala se mezi 26-45 % (Tabulka 5).

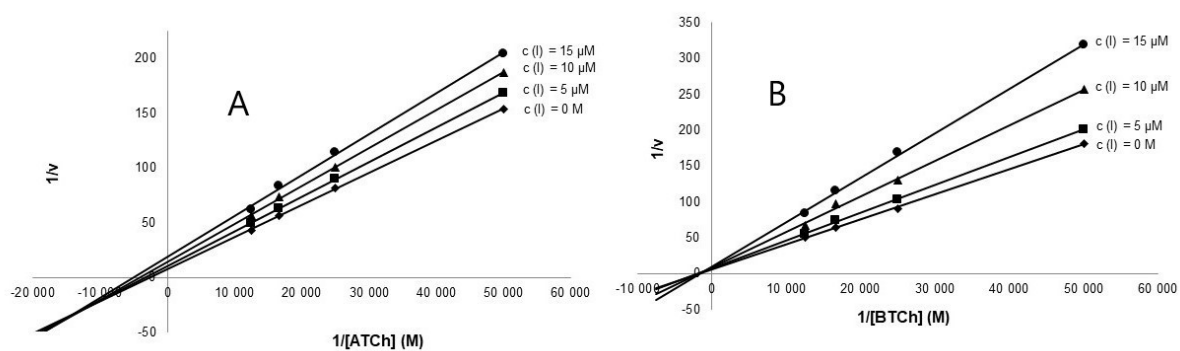
V pilotních screeningových studiích byly deriváty připravené v rámci první série studovány z pohledu jejich cytotoxické aktivity na panelu nádorových buněk. Bohužel derivatizací volné C-11 hydroxyskupiny došlo u všech těchto derivátů (**5-8**, **12-19**) ke ztrátě cytotoxické aktivity (Tabulka 9). Z těchto důvodů byly připravené deriváty screeningově testovány na jejich inhibiční potenciál vůči cholinesterasám. V těchto studiích byly získány zajímavé výsledky. Tento fakt inicioval k přípravě dalších několika sérií derivátů haemanthaminu za účelem podrobných studií vztahu struktura vs. účinek (SAR) ve vztahu k Alzheimerově chorobě.

Všechny připravené deriváty byly nejprve testovány při koncentraci 100  $\mu\text{M}$  na inhibiční potenciál vůči oběma cholinesterasám. Deriváty, které vykazovaly vyšší než padesátiprocentní inhibici, byly vybrány pro následné stanovení hodnot  $\text{IC}_{50}$ . Vzhledem k množství připravených derivátů budou výsledky inhibičních studií vůči cholinesterasám diskutovány podle sérií, v jakých byly tyto deriváty postupně připravovány.

První skupinou jsou deriváty obsahující jako substituent alifatický řetězec (**3-12**) nebo aromatický kruh s žádnou až třemi methylskupinami v různých polohách (**13-20**). Zavedením



alifatického substituentu do struktury haemanthaminu nedošlo k nárustu inhibičního potenciálu. Pokud byl pro přípravu derivátu použit nesubstituovaný benzoyl chlorid, který vedl k přípravě 11-*O*-benzoylhaemanthaminu (**13**), byl zaznamenán významný nárůst inhibičního potenciálu vůči *h*BuChE ( $IC_{50} = 5,8 \pm 0,30 \mu\text{M}$ ). Tato skutečnost iniciovala přípravu aromatických derivátů haemanthaminu se substitucí methylem na aromatickém jádře. Nejprve byly připraveny deriváty s jednou methylskupinou (**14-16**), následně se dvěma methylskupinami v různých polohách (**17-19**) resp. se třemi methylskupinami (**20**). Mezi těmito deriváty byl pozorován zajímavý fenomén, kdy nejsilnější inhibiční aktivita vůči oběma cholinesterasám byla zaznamenána pro derivát s methylskupinou v poloze *ortho* (**14**) na aromatickém jádře. Postupným posouváním této skupiny až do polohy *para* (**16**) docházelo k poklesu inhibice (Tabulka 8). Nejzajímavější sloučeninou z této první série derivátů byl tedy 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin (**14**) s hodnotami  $IC_{50}$   $18,18 \pm 1,30 \mu\text{M}$  pro *h*AChE a  $6,59 \pm 1,19 \mu\text{M}$  pro *h*BuChE. Tento derivát byl také vybrán pro *in vitro* studium za účelem popsání mechanismu inhibice *h*AChE a *h*BuChE. Na základě stanovení reakčních křivek a porovnání všech modelů inhibice bylo zjištěno, že derivát **14** působí vůči oběma cholinesterasám smíšeným typem inhibice (Obrázek 16). Nelineární regresní analýzou byly stanoveny hodnoty afinitního parametru pro oba enzymy ( $K_i = 60,1 \pm 0,68 \mu\text{M}$  pro *h*AChE a  $12,5 \pm 0,45 \mu\text{M}$  pro *h*BuChE) <sup>55</sup>.

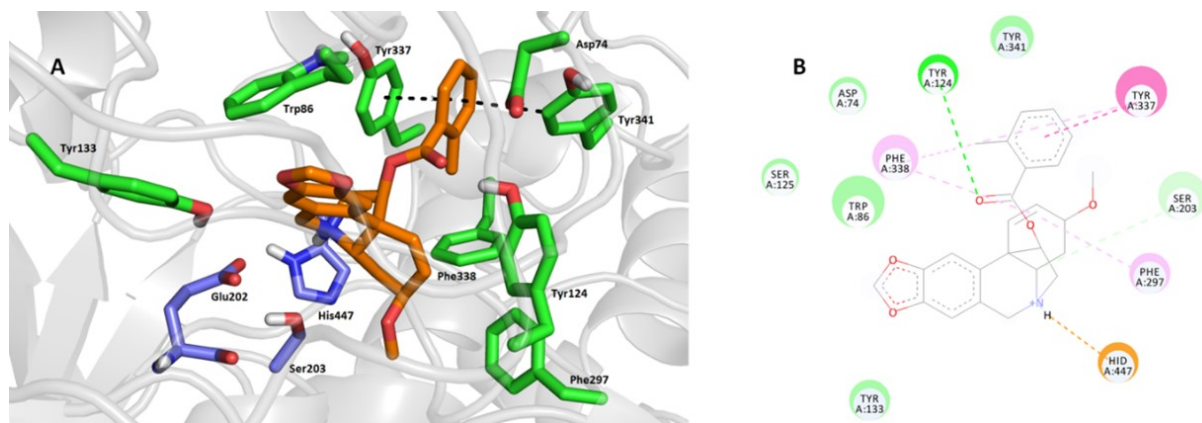


**Obrázek 16:** A: Lineweaver-Burkův graf  $1/v$  vs  $1/[\text{acetylthiocholin}]$  v přítomnosti nebo nepřítomnosti derivátu **14**; B: Lineweaver-Burkův graf  $1/v$  vs  $1/[\text{butyrylthiocholin}]$  v přítomnosti nebo nepřítomnosti derivátu **14** [55].

Vybrané deriváty byly v rámci spolupráce s Univerzitou v Bologni (prof. Vincenza Andrisano) testovány také na jejich inhibiční potenciál vůči GSK-3 $\beta$ . Jak již bylo uvedeno, jedná se o enzym, který hraje významnou roli při hyperfosforylaci tau proteinu a následné tvorbě NTFs. Vzhledem ke skutečnosti, že vybrané deriváty byly testovány v průběhu několika let a docházelo k postupné úpravě metodiky, screeningové studie byly provedeny při různých koncentracích (Tabulka 8). Derivát **14**, který disponoval duální aktivitou vůči oběma

cholinesterasám vykázal bohužel pouze mírnou inhibici GSK-3 $\beta$  (15,35 %) při testované koncentraci 100  $\mu$ M. Slibnou aktivitou naopak disponovaly alifatické deriváty, kdy při testované koncentraci 10  $\mu$ M inhibovaly GSK-3 $\beta$  v rozmezí 76-97 % (Tabulka 8). Hodnota IC<sub>50</sub> byla prozatím stanovena pouze pro 11-*O*-hexanoylhaemanthamin (**7**) s hodnotou IC<sub>50</sub> = 13,5  $\pm$  2,3  $\mu$ M, který v rámci screeningové studie vykazoval nejvyšší inhibiční potenciál.

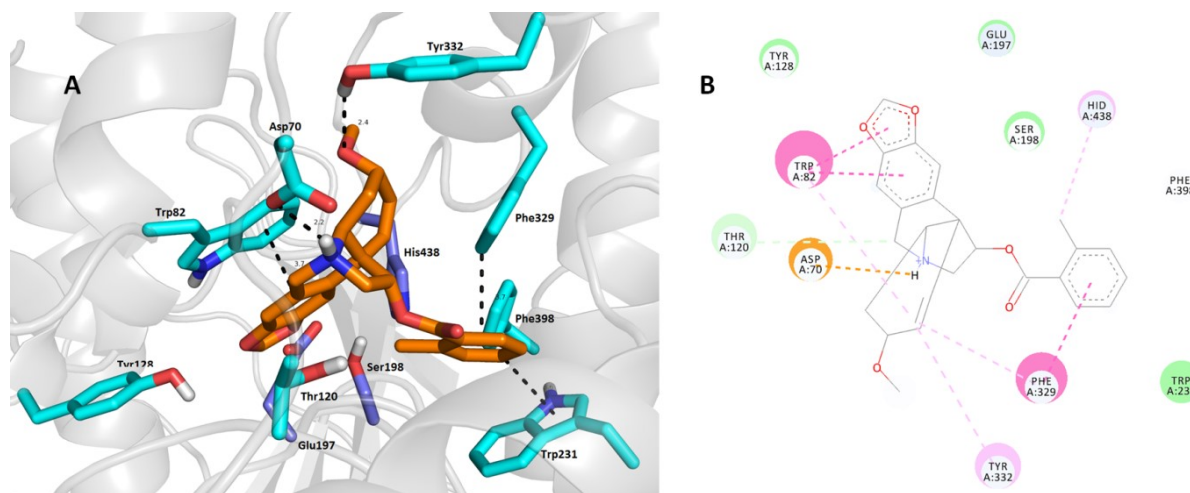
K určení strukturních aspektů zodpovědných za významnou inhibiční aktivitu derivátu **14** vůči oběma cholinesterasám, byla provedena dockingová studie, která odhalila několik významných interakcí zodpovědných za aktivitu ligandu (Obrázky 17 a 18). V případě *hAChE* je ligand **14** ukotven v oblasti katalytické triády na dně dutiny (Obrázek 17). 2-Methylbenzoylová skupina je lokalizována mezi Tyr337 (paralelní  $\pi$ - $\pi$  vrstvení, 3,7 Å) a Tyr341 (zkreslené  $\pi$   $\pi$  vrstvení, 3,7 Å). Mezi Phe338 a 2-methylbenzoylovou skupinou lze také pozorovat určitou  $\pi$  alkylovou interakci. Interakcí karbonylu z esterové skupiny se formulovala vodíková vazba s hydroxylem z Tyr124 (3,1 Å). Jádru ligandu je lokalizováno v blízkosti aromatických zbytků Trp86 a Tyr133 prostřednictvím van der Waalsovy interakce. Ještě důležitější je, že His447 umožnil vytvoření kationtové vazby  $\pi$  s protonovaným dusíkem z tetrahydroisochinolinového skeletu **14** (3,7 Å). Další zbytek z katalytické triády, jmenovitě Ser203, interaguje prostřednictvím van der Waalsovy interakce s cyklickou alifatickou částí molekuly **14**.



**Obrázek 17:** Nejlépe skórovaná pozice derivátu **14** v aktivním místě *hAChE*. Ligand je zobrazen oranžově. Důležitě AMK zbytky zodpovědné za ukotvení ligandu jsou zobrazeny zeleně, katalytická triáda je zobrazena modře. Hlavní interakce různého původu, jsou zobrazeny přerušovanými čarami v obou typech vyobrazení (vodíkové vazby – oranžové čáry, vrstvení  $\pi$ - $\pi$ / $\pi$ -kationtů – růžové/fialové čáry, van der Waalsovy interakce a další hydrofobní síly – zelené čáry); vzdálenosti jsou uvedeny v angströmech (Å). Obrázek 3D prezentace byl generován programem PyMOL Molecular Graphic System, v. 2.4.1. Schrödinger, LLC. 2D zobrazení bylo vygenerováno programem Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016 <sup>55</sup>.

V případě *hBuChE* tak v jejím aktivním místě je možné pozorovat následující interakce (Obrázek 18): tetrahydroisochinolinová skupina je uložena tváří v tvář  $\pi$ - $\pi$  interakcí k Trp82 ve vzdálenosti 3,7 Å; solný můstek mezi Asp70 (2,2 Å) a protonovaným dusíkem

haemanthaminového jádra, a dále interakci benzoylevé skupinou v blízkosti Phe329 prostřednictvím  $\pi$ - $\pi$  interakce ve tvaru T (3,7 Å). Dále se do interakcí zapojují AMK zbytky katalytické triády, tj. Glu197, Ser198 a His438. Významná je také je  $\pi$ -alkylová interakce s Tyr332, která pravděpodobně umožňuje lepší zapadnutí do aktivního místa *h*BuChE a tím i vyšší inhibiční potenciál **14** vůči *h*BuChE než vzhledem k *h*AChE.



**Obrázek 18:** Nejlépe skórovaná pozice derivátu **14** v aktivním místě *h*BuChE. Ligand je zobrazen oranžově. Důležité AMK zbytky zodpovědné za ukotvení ligandu jsou zobrazeny světle modře, katalytická triáda je zobrazena tmavě modře. Hlavní interakce různého původu, jsou zobrazeny přerušovanými čarami v obou typech vyobrazení (vodíkové vazby – oranžové čáry, vrstvení  $\pi$ - $\pi$ / $\pi$ -kationtů – růžové/fialové čáry, van der Waalsovy interakce a další hydrofobní síly – zelené čáry); vzdálenosti jsou uvedeny v angströmech (Å). Obrázek 3D prezentace byl generován programem PyMOL Molecular Graphic System, v. 2.4.1. Schrödinger, LLC. 2D zobrazení bylo vygenerováno programem Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016 <sup>55</sup>.

Vzhledem k tomu, že v rámci dizertační práce byly vyvíjeny sloučeniny, jejichž místem působení je CNS, musí být tyto látky schopné přejít přes HEB a dostat se do mozku. Jednou z rychlých orientačních *in silico* metod je výpočet parametru  $\log BB$  <sup>155</sup>. Na základě této predikce by derivát **14** měl být schopný částečného přestupu přes HEB ( $\log BB = 0,11$ ). Další možnost predikce přestupu přes HEB je využití *in vitro* PAMPA testu. V rámci tohoto testu je na umělé membráně testována schopnost přestupu přes HEB prostřednictvím pasivní difúze. Na základě získaných výsledků ( $Pe = 5,8 \pm 0,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$  (CNS+)) a porovnání s referenčními standardy by měl derivát **14** přestupovat pasivní difúzí přes HEB (Tabulka 8).

Další skupinou jsou deriváty **21** až **27**, které se vyznačují alifatickou substitucí v poloze *para* na aromatickém jádře benzoyl substituentu (Tabulka 6). Všechny tyto deriváty byly z pohledu inhibice *h*AChE/*h*BuChE neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Vzhledem k alifatické části byly látky **24-27** vyvíjeny pro testování jejich antimykobakteriálního potenciálu. V předchozích studiích byly na našem pracovišti syntetizovány různé deriváty isochinolinových alkaloidů, které v rámci antimykobakteriálního screeningu vykazaly zajímavé aktivity <sup>156,157</sup>. Tyto studie pokračují přípravou derivátů amarylkovitých alkaloidů, mezi něž byl zařazen i haemanthamin.

V rámci pilotního screeningu těchto derivátů byla zaznamenána zajímavá antimykobakteriální aktivita pro deriváty **24** a **25**. V následující tabulce jsou shrnuty minimální inhibiční koncentrace vůči testovaným *Mycobacterium* a *Mycolicibacterium* kmenům (Tabulka 18). V rámci následných experimentů budou připraveny další deriváty za účelem podrobných SAR studií.

**Tabulka 6:** *In vitro* antimykobakteriální aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Ra, *Mycolicibacterium aurum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycolicibacterium smegmatis* (MIC), a vypočítaná hodnota ClogP derivátů haemanthaminu **25-27**.

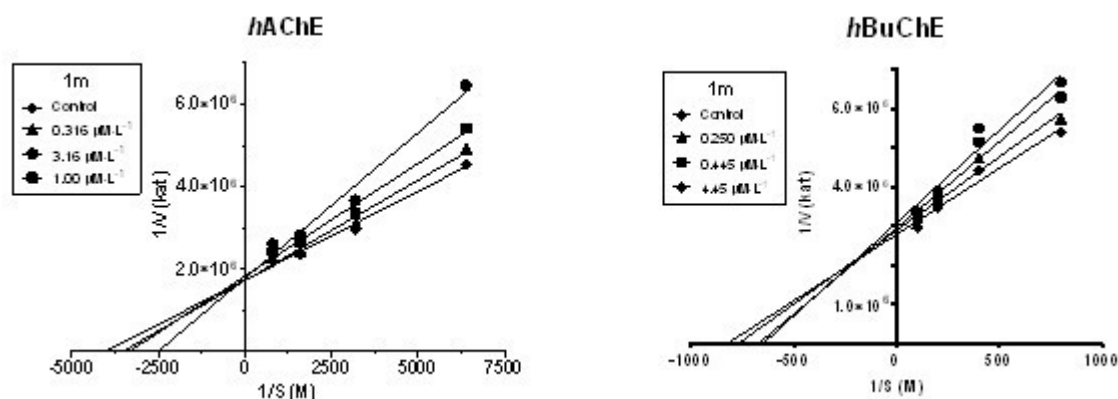
Alkaloid/derivát	<i>Mtb</i> H37Ra ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Mtb</i> H37Ra ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	<i>M. aurum</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. avium</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M.</i> <i>kansasii</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. smegmatis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ClogP <sup>a</sup>
haemanthamin	$\geq 500$	$\geq 1740$	$\geq 500$	$\geq 500$	$\geq 500$	$\geq 500$	1,09
<b>24</b>	31,25	65,7	62,5	31,25	15,625	31,25	6,17
<b>25</b>	3,91	7,99	125	31,25	3,91	$\geq 500$	6,69
<b>26</b>	7,81	15,51	250	31,25	7,81	$\geq 500$	7,22
<b>27</b>	$\geq 500$	$\geq 917$	$\geq 500$	$\geq 500$	$\geq 500$	$\geq 500$	8,81
isoniazid <sup>b</sup>	0,25	1,82	3,91	500	6,25	31,25	-0,67
rifampicin <sup>b</sup>	0,00625	0,0075	0,39	0,125	0,025	12,5	3,71
ciprofloxacin <sup>b</sup>	0,25	0,75	0,015625	0,5	0,25	0,0625	-0,62

<sup>a</sup>ClogP vypočítáno v ChemDraw v18.1.; <sup>b</sup>referenční látky

Třetí skupinou jsou deriváty, které mají na aromatickém substituentu jednu až tři methoxy skupiny v různých polohách (**28-35**). Mezi těmito sloučeninami byla nejaktivnější látka, stejně jako v případě methylbenzoyl substituentů, s methoxyskupinou v poloze *ortho* (**28**). Tento derivát disponoval slabou inhibiční aktivitou proti *hAChE* ( $\text{IC}_{50} = 86,38 \pm 6,08 \mu\text{M}$ ), ale poměrně zajímavou aktivitou vůči *hBuChE* ( $\text{IC}_{50} = 3,34 \pm 0,44 \mu\text{M}$ ). Porovnáním indexů selektivity lze tuto látku považovat za selektivní inhibitor *hBuChE* ( $\text{SI}_{h\text{BuChE}} = 25,86$ ). Opět byla vypočtena hodnota logBB a provedena PAMPA studie. Na základě získaných výsledků by i tento derivát měl přestupovat přes HEB (Tabulka 8).

Další skupinou jsou deriváty, které na aromatickém jádře substituentu obsahují atom halogenu (fluor, chlor, brom nebo jod), opět v různých pozicích. V rámci této skupiny byl stejně jako u předchozích skupin pozorován stejný trend. Pokud se atom halogenu nacházel na aromatickém jádře v poloze *ortho*, vykazoval tento derivát nejvyšší aktivitu s tím, že nejvýhodnější byla v případě inhibice *hAChE* substituce chlorem (derivát **40**,  $\text{IC}_{50} = 13,70 \pm 0,76 \mu\text{M}$ ) a v případě *hBuChE* substituce fluorem (derivát **47**,  $\text{IC}_{50} = 4,85 \pm 0,78 \mu\text{M}$ ). Nejzajímavější látkou byl derivát **40**, který disponoval zajímavou aktivitou vůči oběma enzymům (Tabulka 8). Tato látka byla následně podrobena detailnějším studiím za účelem objasnění mechanismu inhibice a identifikace strukturních detailů zodpovědných za inhibiční

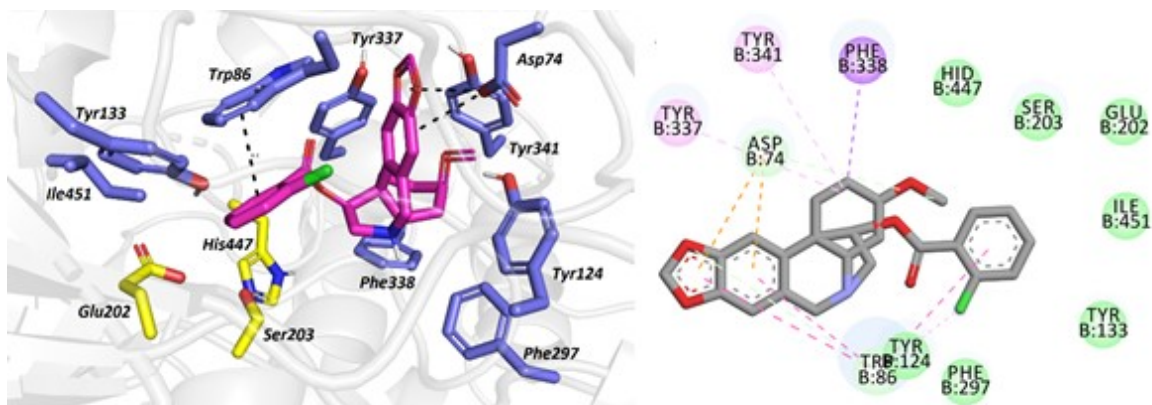
potenciál.



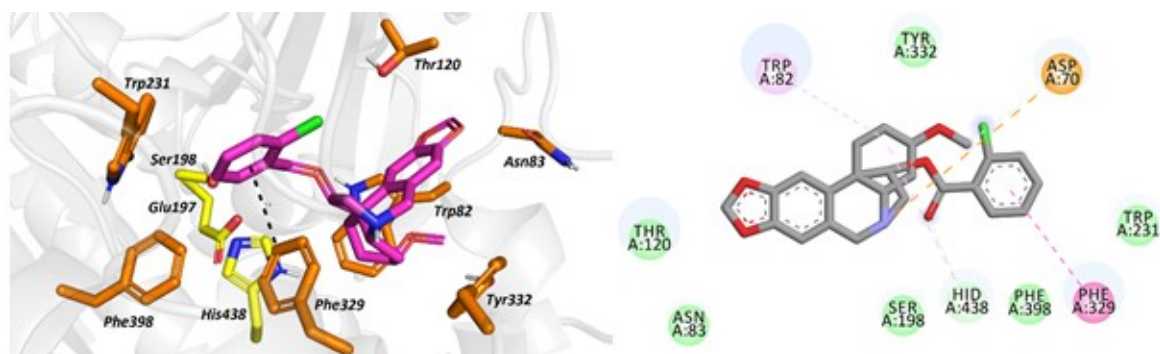
**Obrázek 19:** Lineweaver-Burkův graf  $1/v$  vs  $1/[\text{acetylthiocholin}]$  v přítomnosti nebo nepřítomnosti derivátu **40**; B: Lineweaver-Burkův graf  $1/v$  vs  $1/[\text{butyrylthiocholin}]$  v přítomnosti nebo nepřítomnosti derivátu **40**.

Na základě vynesení reakčních křivek a porovnání všech modelů inhibice bylo zjištěno, že derivát **40** působí vůči oběma cholinesterasám smíšeným typem inhibice (Obrázek 19). Nelineární regresní analýzou byly stanoveny hodnoty afinitního parametru pro oba enzymy ( $K_i = 3,49 \pm 0,48 \mu\text{M}$  pro *hAChE* a  $8,10 \pm 2,90 \mu\text{M}$  pro *hBuChE*)<sup>56</sup>.

Opět byla provedena dockingová studie za účelem identifikace strukturních aspektů zodpovědných za významnou inhibiční aktivitu derivátu **40** vůči oběma cholinesterasám, (Obrázky 20 a 21). V případě *hAChE* (Obrázek 20) byly pozorovány následující interakce: i) paralelní  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi Trp86 a připojeným substituovaným fenylovým kruhem, ii) uložení 5,10*b*-ethanového můstku v blízkosti několika aromatických zbytků, jako je Tyr341, Phe338, Tyr337, Tyr124 a Phe297, které tvoří různé hydrofobní interakce. Atom chloru navíc zvyšuje hydrofobní interakci s Trp86. V případě *hBuChE* je ligand u látky **40** umístěn hluboko v její dutině (Obrázek 21). Byly identifikovány následující interakce: i) interakce  $\pi$ - $\pi$  ve tvaru T mezi substituovaným fenylovým zbytkem a Phe329 a ii) interakce esterové skupiny, která je zapojena do vodíkové vazby, se zbytkem katalytické triády Ser198, iii) dále  $\pi$ -sigma, a van der Waalsovy interakce s 1,3-dioxolanovým kruhem<sup>56</sup>.



**Obrázek 20:** Nejlépe skórovaná pozice derivátu **40** v aktivním místě *hAChE*. Ligand je zobrazen fialově. Důležité AMK zbytky zodpovědné za ukotvení ligandu jsou zobrazeny tmavě modře, katalytická triáda je zobrazena žlutě. Hlavní interakce různého původu, jsou zobrazeny přerušovanými čarami v obou typech vyobrazení (vodíkové vazby, vrstvení  $\pi$ - $\pi$ / $\pi$ -kationtů, van der Waalsovy interakce a další hydrofobní síly). Obrázek 3D prezentace byl generován programem PyMOL Molecular Graphic System, v. 2.4.1. Schrödinger, LLC. 2D zobrazení bylo vygenerováno programem Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016 <sup>56</sup>.



**Obrázek 21:** Nejlépe skórovaná pozice derivátu **40** v aktivním místě *hBuChE*. Ligand je zobrazen fialově. Důležité AMK zbytky zodpovědné za ukotvení ligandu jsou zobrazeny oranžově, katalytická triáda je zobrazena žlutě. Hlavní interakce různého původu, jsou zobrazeny přerušovanými čarami v obou typech vyobrazení (vodíkové vazby, vrstvení  $\pi$ - $\pi$ / $\pi$ -kationtů, van der Waalsovy interakce a další hydrofobní síly). Obrázek 3D prezentace byl generován programem PyMOL Molecular Graphic System, v. 2.4.1. Schrödinger, LLC. 2D zobrazení bylo vygenerováno programem Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016 <sup>56</sup>.

Na základě predikcí přechodu přes HEB ( $\log BB = 0,26$  a PAMPA:  $Pe = 15 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$  (CNS+)), by měl tento derivát také přecházet přes HEB (Tabulka 8) <sup>56</sup>.

Malou skupinkou jsou deriváty, které mají na aromatickém jádře nitroskupinu v různých polohách (**52-54**). Všechny deriváty disponovaly selektivní inhibiční aktivitou vůči *hAChE* (Tabulka 8), přičemž nejaktivnější byl derivát nesoucí nitroskupinu v poloze *meta* ( $IC_{50} = 3,99 \pm 0,25 \mu\text{M}$ ). Všechny deriváty by měly opět být schopny přestupu do CNS na základě pasivní difúze (Tabulka 8.). V rámci rozšíření portfolia testovaných látek byl připraven i derivát mající na aromatickém jádře dvě nitro skupiny: 11-*O*-(3,5-dinitro)benzoylhaemanthamin (**55**). Tato sloučenina disponovala vysoce selektivním inhibičním potenciálem vůči *hAChE* ( $IC_{50} = 1,07 \pm 0,12 \mu\text{M}$ , Tabulka 8), která byla srovnatelná s inhibičním potenciálem samotného galanthaminu ( $IC_{50} = 1,7 \pm 2,07 \mu\text{M}$ , Tabulka 8). Zavedením druhé nitroskupiny do struktury

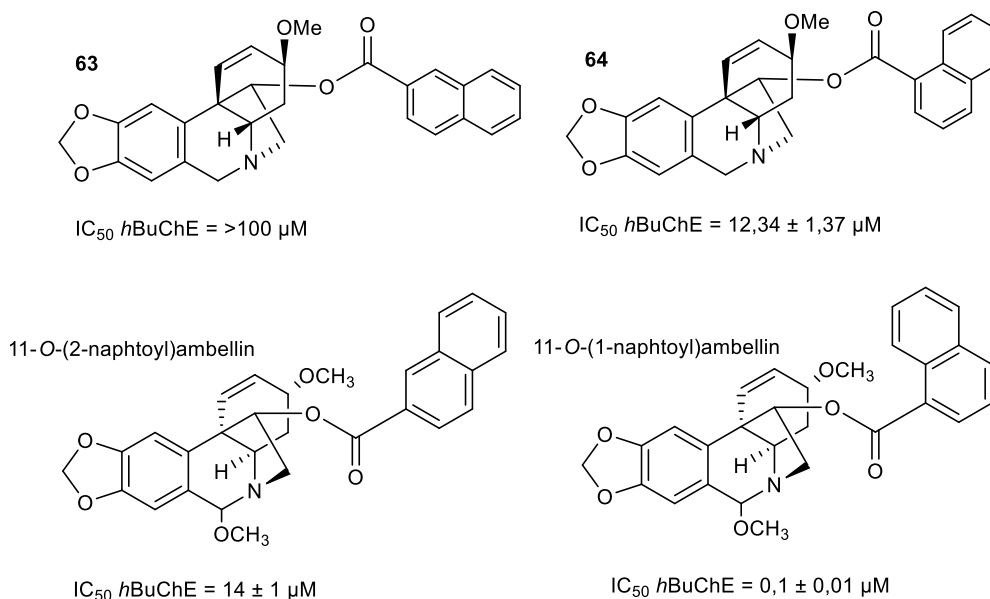
došlo k úplné ztrátě inhibičního potenciálu vůči *h*BuChE (2 % při koncentraci 100  $\mu$ M). Na základě hodnoty logBB je možné, že tato látka by mohla mít problémy s přechodem přes HEB.

Zajímavou skupinou jsou deriváty, které mají na aromatickém jádře nitro skupinu v kombinaci s atomem halogenu nebo methylskupinou (**56-60**). Mezi těmito deriváty tři sloučeniny, jmenovitě: 11-*O*-(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin (**56**), 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin (**57**) a 11-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemanthamin (**58**) disponovaly vysoce selektivní inhibiční aktivitou vůči *h*AChE (( $IC_{50} = 0,17 \pm 0,01 \mu$ M (**56**),  $IC_{50} = 0,12 \pm 0,01 \mu$ M (**57**),  $IC_{50} = 0,17 \pm 0,01 \mu$ M (**58**), Tabulka 8)). Tyto aktivity byly více než desetkrát vyšší než použitý standard galanthamin. Bohužel však nevykázaly inhibiční potenciál vůči *h*BuChE.

Všechny tyto deriváty byly screeningově studovány i z pohledu jejich cytotoxické aktivity, kde byly zjištěny zajímavé výsledky. Zajímavostí je výrazná toxicita derivátu **57** oproti derivátu **58**, který se v rámci studií jevil jako netoxický (Tabulka 9). Tyto dvě sloučeniny se liší pouze substitucí v poloze *para*, kdy u derivátu **58** je místo chloru přítomná methylskupina. Další zajímavostí je struktura sloučeniny **56**, která nese na aromatické jádře stejné substituenty jako derivát **57**, ale v jiných polohách. Tato skutečnost má za následek opět kompletní ztrátu cytotoxické aktivity (Tabulka 9). Této problematice a podrobnějšímu studiu cytotoxického účinku derivátu **57** byla věnována studie z roku 2022 a výsledky této práce budou stručně rozebrány v dalším textu <sup>146</sup>. Z pohledu dalšího vývoje a optimalizace struktury těchto derivátů jako potenciálních látek pro terapii AD, jsou zajímavé deriváty **56** a **58**, jelikož nevykazovaly žádnou cytotoxickou aktivitu. Na základě vypočtených hodnot logBB (**56** = 0,27, **57** log = 0,23 a **58** = -0,04) by tyto deriváty měly přecházet přes HEB s tím, že přestup přes HEB může být problematický. Pro všechny deriváty bude v nejbližší době provedena PAMPA studie. Další studie týkající se identifikace mechanismu inhibice, strukturních detailů zodpovědných za inhibiční potenciál a přestupu přes HEB jsou v současné době rozpracované a budou zveřejněny po jejich dokončení v dalším publikačním výstupu v nejbližší době.

Deriváty **63** a **64** byly připraveny s ohledem na skutečnost, že deriváty ambellinu nesoucí stejné substituenty disponovaly vysoce selektivním inhibičním potenciálem vůči *h*BuChE <sup>158</sup>. Ambellin je amarylkovitý alkaloid, který se liší od haemanthaminu pouze orientací 5,10*b*-ethanového můstku, patří tedy mezi alkaloidy krininového typu (Obrázek 4). Oproti haemanthaminu má ještě v poloze C-7 navíc methoxyskupinu. Cílem těchto experimentů bylo studium vlivu chiralit 5,10*b*-ethanového můstku na inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám. Jak je vidět na následujícím obrázku (Obrázek 22), kde jsou shrnuty biologické aktivity pro všechny čtyři sloučeniny, tak tento vliv je výrazný. Prozatím byly provedeny dockingové studie

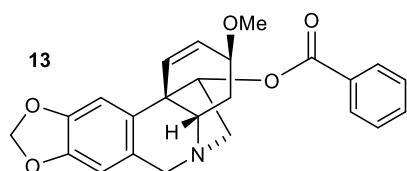
pro deriváty ambellinu, dockingové studie pro naphtoyl deriváty haemanthaminu budou provedeny za účelem podrobné SAR studie. Výsledky dockingových studií pro deriváty ambellinu jsou shrnuty v následujícím publikačním výstupu <sup>158</sup>.



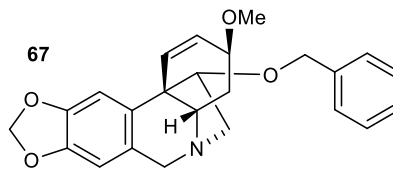
**Obrázek 22:** Porovnání biologické aktivity naphtoyl derivátů haemanthaminu a ambellinu z pohledu jejich inhibiční aktivity vůči *hBuChE*

Protože esterové deriváty mohou být problematické z pohledu jejich stability v organismu, byly od vybraných aktivních derivátů připraveny odpovídající etherová analoga (**67-80**), která by měla být v organismu stabilnější. Všechny tyto deriváty byly opět podrobeny screeningovým *hAChE* a *hBuChE* studiím a následně byly u aktivních látek stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  (Tabulka 8). Lze konstatovat, že všechny etherové deriváty (kromě **80**) disponovaly selektivní inhibicí vůči *hBuChE* v poměrně širokém spektru hodnot  $IC_{50}$  ( $IC_{50} = 0,85-30,61 \mu\text{M}$ ). Pokud porovnáme hodnoty  $IC_{50}$  v případě *hBuChE* pro odpovídající deriváty s benzoyl- (**13**) resp. benzyl-substitucí (**67**), je možné pozorovat mírné navýšení inhibiční aktivity etherového derivátu oproti esterovému (Tabulka 8). Stejný trend byl zaznamenán i u derivátů **68**, **76**, **77** a **78**, ale oproti odpovídajícím esterovým derivátům (**14**, **40**, **41** a **48**) došlo ke ztrátě inhibičního potenciálu vůči *hAChE* (Obrázek 23). Nejméně aktivní sloučeninou z této série derivátů byl 11-*O*-(2-jodobenzy)haemanthamin (**79**) s hodnotou  $IC_{50 \text{ hBuChE}} = 0,85 \pm 0,06 \mu\text{M}$ . Do budoucna musí být provedeny studie týkající se identifikace typu inhibice a dockingové studie, které by vysvětlily, který strukturní aspekt je v případě etherů zodpovědný za ztrátu *hAChE* inhibičního potenciálu.

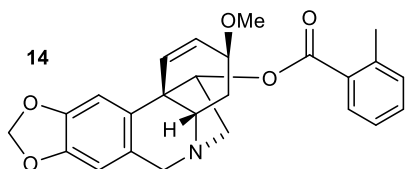




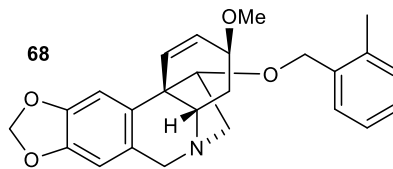
$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $5,8 \pm 0,3$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,23



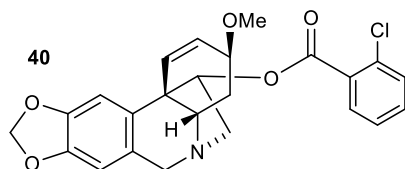
$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $2,16 \pm 0,41$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = -0,13



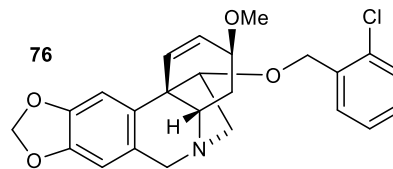
$IC_{50}$  *hAuChE* =  $18,18 \pm 1,3$   $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $6,59 \pm 1,19$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,18



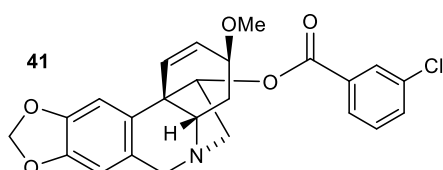
$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $2,72 \pm 0,81$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = -0,13



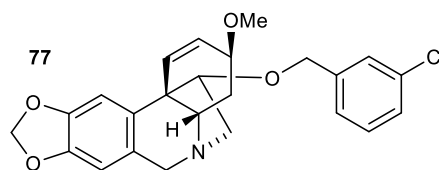
$IC_{50}$  *hAuChE* =  $13,7 \pm 0,76$   $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $5,61 \pm 0,62$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,26



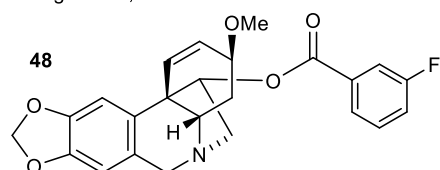
$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $1,14 \pm 0,14$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,23



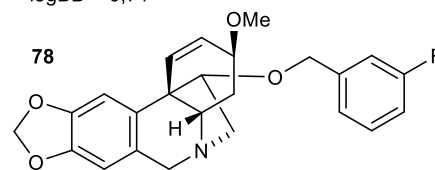
$IC_{50}$  *hAuChE* =  $85,11 \pm 6,3$   $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $80,1 \pm 10,1$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,43



$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $7,7 \pm 0,5$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,71



$IC_{50}$  *hAuChE* =  $79,22 \pm 8,12$   $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $41,96 \pm 3,41$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = 0,35



$IC_{50}$  *hAuChE* = >100  $\mu$ M  
 $IC_{50}$  *hBuChE* =  $9,86 \pm 0,38$   $\mu$ M  
 $\log BB$  = -0,13

**Obrázek 23:** Porovnání hodnot  $IC_{50}$  pro *hAChE* a *hBuChE* esterových a odpovídajících etherových derivátů haemanthaminu.

Deriváty připravené v dostatečných množstvích byly dále podrobeny screeningovým studiím na jejich cytotoxický potenciál. Všechny deriváty byly testovány při koncentraci 10  $\mu$ M (Tabulka 9) na panelu lidských buněčných linií různých histotypů<sup>146</sup>. Vzhledem k tomu, že tato část nebyla součástí předložené dizertační práce, budou výsledky této studie komentovány pouze stručně. Veškeré podrobnosti je možné dohledat v daném publikačním výstupu<sup>146</sup>.

Počáteční zhodnocení cytotoxicity haemanthaminu (**1**) a série dvaceti devíti (Tabulka 9) semisyntetických derivátů ukázalo, že u většiny derivátů došlo substitucí C-11 hydroxyskupiny ke ztrátě cytotoxické aktivity, kterou disponuje samotný haemanthamin (Tabulka 9). Pouze jeden derivát 11-*O*-(4-chlor-3-nitrobenzoyl)haemanthamin (**57**) vykázal zvýšený antiproliferativní účinek, kde průměrná hodnota procenta růstu (GP) byla 5 % ve srovnání s haemanthaminem (GP = 25 %). Mezi deseti testovanými buněčnými liniemi disponoval derivát **57** slibnou cytotoxickou aktivitou pro následující buněčné linie: HeLa ( $IC_{50} = 0,2 \pm 0,1 \mu M$ ), A549 ( $IC_{50} = 1,7 \pm 0,1 \mu M$ ) a HT-29 ( $IC_{50} = 2,2 \pm 0,1 \mu M$ ) buněk (Tabulka 10). Tento derivát byl také vybrán pro podrobnější experimenty za účelem identifikace mechanismu cytotoxického působení. Dalším zajímavým výsledkem této studie je ztráta cytotoxického potenciálu 1,2-dihydrohaemanthaminu, což je důkazem, že přítomnost dvojně vazby cyklohexenového kruhu haemanthaminu je kritická pro jeho aktivitu.

Závěrem je možné konstatovat, že nejen haemanthamin samotný, ale i polosyntetické deriváty, jsou vhodnými kandidáty pro další vývoj jako potenciálních léčiv nebo „lead-structures“ pro další modifikaci a optimalizaci struktury. Nespornou výhodou tohoto amarylkovitého alkaloidu je, že je možné ho izolovat z rostlinného materiálu ve významném množství a není potřebné tuto látku připravovat syntetickou cestou.

## 7 LITERATURA

- (1) Petrovska, B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, *6* (11), 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.
- (2) Baltussen, H. Theophrastus of Eresus. *Classics* **2018**. <https://doi.org/10.1093/obo/9780195389661-0308>.
- (3) Jamshidi-Kia, F.; Lorigooini, Z.; Amini-Khoei, H. Medicinal Plants: Past history and future perspective. *J. Herbmed Pharmacol.* **2018**, *7* (1), 1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>.
- (4) Greppin, J.; Horstmanoff, J.; Stol, M. Magic and rationality in ancient near eastern and Graeco-Roman Medicine. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **2006**, *61* (2), 217–218. <https://doi.org/10.1093/jhmas/jrj021>.
- (5) Cahlíková, L.; Vaněčková, N.; Šafratová, M.; Breiterová, K.; Blunden, G.; Hulcová, D.; Opletal, L. The genus *Nerine* herb. (Amaryllidaceae): Ethnobotany, phytochemistry, and biological activity. *Molecules* **2019**, *24* (23), 4238. <https://doi.org/10.3390/molecules24234238>.
- (6) Singh, A.; Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of the Amaryllidaceae Alkaloids. *Plant Sci. Today* **2014**, *1* (3), 114–120. <https://doi.org/10.14719/pst.2014.1.3.41>.
- (7) Berkov, S.; Osorio, E.; Viladomat, F.; Bastida, J. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoeology of Amaryllidaceae alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* **2020**, *83*, 113–185. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002>.
- (8) de Andrade, J. P.; Giordani, R. B.; Torras-Claveria, L.; Pigni, N. B.; Berkov, S.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Konrath, E.; Bueno, K.; Sachett, L. G.; Dutilh, J. H.; de Souza Borges, W.; Viladomat, F.; Henriques, A. T.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15* (1), 147–160. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9411-7>.
- (9) Reis, A.; Magne, K.; Massot, S.; Tallini, L. R.; Scopel, M.; Bastida, J.; Ratet, P.; Zuanazzi, J. A. S. Amaryllidaceae alkaloids: Identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 8471. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44746-7>.
- (10) Cahlíková, L.; Kawano, I.; Řezáčová, M.; Blunden, G.; Hulcová, D.; Havelek, R. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochem. Rev.* **2021**, *20* (1), 303–323. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09675-8>.
- (11) Alzheimer's association report. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2021**, *17* (3), 327–406. <https://doi.org/10.1002/alz.12328>.
- (12) Alzheimer's association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2019**, *15* (3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>.
- (13) Terry, R. D. The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1963**, *22* (4), 629–642. <https://doi.org/10.1097/00005072-196310000-00005>.
- (14) Hardy, J. A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron* **2006**, *52* (1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.016>.
- (15) Hulcová, D.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hošťálková, A.; Jun, D.; Kuneš, J.; Chlebek,

- J.; Opletal, L.; De Simone, A.; Nováková, L.; Andrisano, V.; Růžička, A.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. *Phytochemistry* **2019**, *165*, 112055. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>.
- (16) Kohelová, E.; Maříková, J.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Kučera, T.; Jun, D.; Chlebek, J.; Jenčo, J.; Šafratová, M.; Hrabínová, M.; Ritomská, A.; Malaník, M.; Peřinová, R.; Breiterová, K.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorganic Chem.* **2021**, *107*, 104567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>.
- (17) Sekerka, P. *Sněženky a Bledule v Přírodě a Zahradách*, Vydání 1.; Edice Strategie AV21, Rozmanitost života a zdraví ekosystémů; Středisko společných činností AV ČR, Praha, **2020**.
- (18) Cantor, M.; Buta, E.; Horț, D. The behavior of some *Narcissus* cultivars in Transylvania region, Romania. *Acta Hortic.* **2013**, *1002*, 171–178. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1002.20>.
- (19) Kocián, P. Sněženka podsněžník. Květena ČR. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=3>. Použito 10.3.2023.
- (20) Kocián, P. Bledule jarní. Květena ČR. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=2>. Použito 10.3.2023.
- (21) *Narcissus pseudonarcissus* (Wild Daffodil). <https://worldoffloweringplants.com/narcissus-pseudonarcissus-wild-daffodil/>. Použito 10.3.2023.
- (22) Kornienko, A.; Evidente, A. Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 1982–2014. <https://doi.org/10.1021/cr078198u>.
- (23) Van Wyk, B.-E.; Gericke, N. *People's Plants: A guide to useful plants of Southern Africa*, 1st ed.; Pretoria, South Africa, **2000**.
- (24) Luo, Z.; Wang, F.; Zhang, J.; Li, X.; Zhang, M.; Hao, X.; Xue, Y.; Li, Y.; Horgen, F. D.; Yao, G.; Zhang, Y. Cytotoxic alkaloids from the whole plants of *Zephyranthes Candida*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (12), 2113–2120. <https://doi.org/10.1021/np3005425>.
- (25) Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A. H.; Touema, S. M.; Hammoda, H. M.; Shawky, E.; Motta, A. Amabellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry* **2004**, *65* (14), 2113–2118. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.020>.
- (26) Tallini, L.; Andrade, J.; Kaiser, M.; Viladomat, F.; Nair, J.; Zuanazzi, J.; Bastida, J. Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L. *Molecules* **2017**, *22* (9), 1437. <https://doi.org/10.3390/molecules22091437>.
- (27) Molander, M.; Christensen, S. B.; Jäger, A. K.; Olsen, C. E.; Rønsted, N. 6-O-methylkrigeine, a new Amaryllidaceae alkaloid from *Nerine huttoniae* Schönland. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26* (1), 56–60. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.533668>.
- (28) Desgagné-Penix, I. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: A review. *Phytochem. Rev.* **2021**, *20* (2), 409–431. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>.
- (29) Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K.-M.; Cang, X.-X.; Kou, Z.-N.; Xiao, W.; Zhu, J.-B.

- Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: A review. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2017**, *19* (1), 53–100. <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332>.
- (30) Abdillahi, H.; Van Staden, J. Application of medicinal plants in maternal healthcare and infertility: A South African perspective. *Planta Med.* **2013**, *79* (07), 591–599. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328504>.
- (31) Evidente, A.; Kornienko, A. Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochem. Rev.* **2009**, *8* (2), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9119-z>.
- (32) Bastida, J.; Lavilla, R.; Viladomat, F. Chapter 3: Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology.* **2006**, *63*, 87–179. [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(06\)63003-4](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(06)63003-4).
- (33) Jin, Z.; Yao, G. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36* (10), 1462–1488. <https://doi.org/10.1039/C8NP00055G>.
- (34) Al Mamun, A.; Maříková, J.; Hulcová, D.; Janoušek, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Korábečný, J.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Biomolecules* **2020**, *10* (5), 800. <https://doi.org/10.3390/biom10050800>.
- (35) Křoustková, J.; Ritomská, A.; Al Mamun, A.; Hulcová, D.; Opletal, L.; Kuneš, J.; Cahlíková, L.; Bucar, F. Structural analysis of unusual alkaloids isolated from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Phytochemistry* **2022**, *204*, 113439. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113439>.
- (36) Luchetti, G.; Johnston, R.; Mathieu, V.; Lefranc, F.; Hayden, K.; Andolfi, A.; Lamoral-Theys, D.; Reisenauer, M. R.; Champion, C.; Pelly, S. C.; van Otterlo, W. A. L.; Magedov, I. V.; Kiss, R.; Evidente, A.; Rogelj, S.; Kornienko, A. Bulbispermine: A crinine-type Amaryllidaceae alkaloid exhibiting cytostatic activity toward apoptosis-resistant glioma cells. *ChemMedChem.* **2012**, *7* (5), 815–822. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100608>.
- (37) Elgorashi, E. E.; Zschocke, S.; van Staden, J.; Eloff, J. N. The anti-inflammatory and antibacterial activities of Amaryllidaceae alkaloids. *South Afr. J. Bot.* **2003**, *69* (3), 448–449. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30329-X](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30329-X).
- (38) He, J.; Qi, W.-B.; Wang, L.; Tian, J.; Jiao, P.-R.; Liu, G.-Q.; Ye, W.-C.; Liao, M. Amaryllidaceae alkaloids inhibit nuclear-to-cytoplasmic export of ribonucleoprotein (RNP) complex of highly pathogenic avian influenza virus H5N1: Amaryllidaceae alkaloids exhibit antiviral activity. *Influenza Other Respir. Viruses.* **2013**, *7* (6), 922–931. <https://doi.org/10.1111/irv.12035>.
- (39) Van Goietsenoven, G.; Andolfi, A.; Lallemand, B.; Cimmino, A.; Lamoral-Theys, D.; Gras, T.; Abou-Donia, A.; Dubois, J.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Kiss, R.; Evidente, A. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (7), 1223–1227. <https://doi.org/10.1021/np9008255>.
- (40) Cedrón, J. C.; Ravelo, Á. G.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Estévez-Braun, A. Antiproliferative, and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Mol.*

- Basel Switz.* **2015**, *20* (8), 13854–13863. <https://doi.org/10.3390/molecules200813854>.
- (41) Doskočil, I.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Benešová, N.; Havlík, J.; Havelek, R.; Kuneš, J.; Královec, K.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochem. Lett.* **2015**, *13*, 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.08.004>.
- (42) Uher, M.; Hroch, M.; Peřinová, R.; Havelek, R.; Křoustková, J.; Řezáčová, M.; Muthná, D.; Koutová, D.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their *in vitro* antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15* (5), 103746. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103746>.
- (43) Cimmino, A.; Masi, M.; Evidente, M.; Superchi, S.; Evidente, A. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* **2017**, *29* (9), 486–499. <https://doi.org/10.1002/chir.22719>.
- (44) Nair, J. J.; Rárová, L.; Strnad, M.; Bastida, J.; Van Staden, J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (19), 6195–6199. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.005>.
- (45) Havelek, R.; Muthna, D.; Tomsik, P.; Kralovec, K.; Seifrtova, M.; Cahlikova, L.; Hostalkova, A.; Safratova, M.; Perwein, M.; Cermakova, E.; Rezacova, M. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis, and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *275*, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.018>.
- (46) Jitsuno, M.; Yokosuka, A.; Hashimoto, K.; Amano, O.; Sakagami, H.; Mimaki, Y. Chemical constituents of *Lycoris albiflora* and their cytotoxic activities. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6* (2), 1934578X1100600. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600208>.
- (47) Cortes, N.; Castañeda, C.; Osorio, E. H.; Cardona-Gomez, G. P.; Osorio, E. Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. *Life Sci.* **2018**, *203*, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.026>.
- (48) Hohmann, J.; Forgo, P.; Molnár, J.; Wolfard, K.; Molnár, A.; Thalhammer, T.; Máthé, I.; Sharples, D. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis festalis*. *Planta Med.* **2002**, *68* (5), 454–457. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32068>.
- (49) Pellegrino, S.; Meyer, M.; Zorbas, C.; Bouchta, S. A.; Saraf, K.; Pelly, S. C.; Yusupova, G.; Evidente, A.; Mathieu, V.; Kornienko, A.; Lafontaine, D. L. J.; Yusupov, M. The Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine binds the eukaryotic ribosome to repress cancer cell growth. *Structure* **2018**, *26* (3), 416–425.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.01.009>.
- (50) Seifrtová, M.; Havelek, R.; Cahlíková, L.; Hulcová, D.; Mazánková, N.; Řezáčová, M. Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, P21 WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine* **2017**, *35*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.019>.
- (51) Havelek, R.; Seifrtova, M.; Kralovec, K.; Bruckova, L.; Cahlikova, L.; Dalecka, M.; Vavrova, J.; Rezacova, M.; Opletal, L.; Bilkova, Z. The effect of Amaryllidaceae

- alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in P53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine* **2014**, *21* (4), 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.005>.
- (52) Nair, J. J.; Van Staden, J. The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *South Afr. J. Bot.* **2021**, *136*, 157–174. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.013>.
- (53) Hroch, M.; Mičuda, S.; Havelek, R.; Cermanová, J.; Cahlíková, L.; Hošťálková, A.; Hulcová, D.; Řezáčová, M. LC-MS/MS method for the determination of haemanthamine in rat plasma, bile and urine and its application to a pilot pharmacokinetic study: Analysis and pharmacokinetics of haemanthamine. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (7), 1083–1091. <https://doi.org/10.1002/bmc.3653>.
- (54) Kulhánková, A.; Cahlíková, L.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Opletal, L. Alkaloids from *Zephyranthes Robusta* and their acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10* (6), 1120–1127. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200144>.
- (55) Kohelová, E.; Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Maříková, J.; Kučera, T.; Martínez González, L.; Hrabínova, M.; Vorčáková, K.; Nováková, L.; De Simone, A.; Havelek, R.; Cahlíková, L. Derivatives of the  $\beta$ -Crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1307. <https://doi.org/10.3390/molecules24071307>.
- (56) Peřinová, R.; Maafi, N.; Korábečný, J.; Kohelová, E.; De Simone, A.; Al Mamun, A.; Hulcová, D.; Marková, J.; Kučera, T.; Jun, D.; Šafratová, M.; Maříková, J.; Andrisano, V.; Jenčo, J.; Kuneš, J.; Martinez, A.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic Chem.* **2020**, *100*, 103928. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103928>.
- (57) Zvěřová, M. *Alzheimerova demence*, Vydání 1.; Grada Publishing: Praha, 2017.
- (58) Amiri, H.; Saeidi, K.; Borhani, P.; Manafirad, A.; Ghavami, M.; Zerbi, V. Alzheimer's disease: Pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4* (11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1021/cn4001582>.
- (59) Castellani, R. J.; Rolston, R. K.; Smith, M. A. Alzheimer's disease. *Dis. Mon.* **2010**, *56* (9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>.
- (60) Bondi, M. W.; Edmonds, E. C.; Salmon, D. P. Alzheimer's disease: Past, present, and future. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2017**, *23* (9–10), 818–831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>.
- (61) Lane, C. A.; Hardy, J.; Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25* (1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
- (62) Soria Lopez, J. A.; González, H. M.; Léger, G. C. Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, **2019**; 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>.
- (63) Crews, L.; Masliah, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19* (R1), R12–R20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>.

- (64) Liu, J.; Chang, L.; Song, Y.; Li, H.; Wu, Y. The Role of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 43. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>.
- (65) Rana, M.; Cho, H.-J.; Arya, H.; Bhatt, T. K.; Bhar, K.; Bhatt, S.; Mirica, L. M.; Sharma, A. K. Azo-stilbene and pyridine–amine hybrid multifunctional molecules to target metal-mediated neurotoxicity and amyloid- $\beta$  aggregation in Alzheimer's disease. *Inorg. Chem.* **2022**, *61* (27), 10294–10309. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c00502>.
- (66) Cascella, R.; Cecchi, C. Calcium dyshomeostasis in Alzheimer's disease pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (9), 4914. <https://doi.org/10.3390/ijms22094914>.
- (67) Bakulski, K. M.; Seo, Y. A.; Hickman, R. C.; Brandt, D.; Vadari, H. S.; Hu, H.; Park, S. K. Heavy metals exposure and Alzheimer's disease and related dementias. *J. Alzheimers Dis.* **2020**, *76* (4), 1215–1242. <https://doi.org/10.3233/JAD-200282>.
- (68) dos Santos Picanco, L. C.; Ozela, P. F.; de Fatima de Brito Brito, M.; Pinheiro, A. A.; Padilha, E. C.; Braga, F. S.; de Paula da Silva, C. H. T.; dos Santos, C. B. R.; Rosa, J. M. C.; da Silva Hage-Melim, L. I. Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25* (26), 3141–3159. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>.
- (69) Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules* **2020**, *25* (24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.
- (70) Woolf, N. J.; Butcher, L. L. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav. Brain Res.* **2011**, *221* (2), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.046>.
- (71) Voytko, M.; Olton, D.; Richardson, R.; Gorman, L.; Tobin, J.; Price, D. Basal forebrain lesions in monkeys disrupt attention but not learning and memory *J. Neurosci.* **1994**, *14* (1), 167–186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00167.1994>.
- (72) Talesa, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122* (16), 1961–1969. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00309-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8).
- (73) Marucci, G.; Buccioni, M.; Ben, D. D.; Lambertucci, C.; Volpini, R.; Amenta, F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **2021**, *190*, 108352. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>.
- (74) Brimijoin, S.; Gao, Y.; Geng, L.; Chen, V. P. Treating cocaine addiction, obesity, and emotional disorders by viral gene transfer of butyrylcholinesterase. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 112. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00112>.
- (75) Xing, S.; Li, Q.; Xiong, B.; Chen, Y.; Feng, F.; Liu, W.; Sun, H. Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41* (2), 858–901. <https://doi.org/10.1002/med.21745>.
- (76) Ciro, A.; Park, J.; Burkhard, G.; Yan, N.; Geula, C. Biochemical differentiation of cholinesterases from normal and Alzheimers disease cortex. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9* (1), 138–143. <https://doi.org/10.2174/156720512799015127>.
- (77) De Vriese, C.; Gregoire, F.; Lema-Kisoka, R.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P.; Delporte, C. Ghrelin. Identification of the cleavage sites. *Endocrinology* **2004**, *145* (11), 4997–5005. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0569>.
- (78) Hartmann, J.; Kiewert, C.; Duysen, E. G.; Lockridge, O.; Greig, N.; Klein, H. Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated



- by butyrylcholinesterase activity. *Neurochem.* **2007**, *100* (5), 1421–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04347.x>.
- (79) Kálmán, J.; Juhász, A.; Rakonczay, Z.; Ábrahám, G.; Boda, K.; Farkas, T.; Penke, B.; Janka, Z. Serum butyrylcholinesterase activity in hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* **2004**, *173* (1), 145–146. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.002>.
- (80) Mushtaq, G.; Greig, N.; Khan, J.; Kamal, M. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol. Disord.* **2014**, *13* (8), 1432–1439. <https://doi.org/10.2174/1871527313666141023141545>.
- (81) Zheng, H.; Koo, E. H. The Amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* **2006**, *1* (1), 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5>.
- (82) Nunan, J.; Small, D. H. Regulation of APP cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. *FEBS Lett.* **2000**, *483* (1), 6–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02076-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02076-7).
- (83) Soderbom, G.; Esterline, R.; Oscarsson, J.; Mattson, M. P. Metabolic and bioenergetic drivers of neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative Disease Research and Commonalities with Metabolic Diseases* **2020**.
- (84) Kojro, E.; Fahrenholz, F. The non-amyloidogenic pathway: Structure and function of  $\alpha$ -secretases. In *Alzheimer's disease*; Harris, J. R., Fahrenholz, F., *Subcellular Biochemistry* Springer US, **2005**, *38*, 105–127. [https://doi.org/10.1007/0-387-23226-5\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-23226-5_5).
- (85) De Strooper, B.; Annaert, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* **2000**, *113* (11), 1857–1870. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1857>.
- (86) Chen, G.; Xu, T.; Yan, Y.; Zhou, Y.; Jiang, Y.; Melcher, K.; Xu, H. E. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38* (9), 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
- (87) Mockett, B. G.; Richter, M.; Abraham, W. C.; Müller, U. C. Therapeutic potential of secreted amyloid precursor protein APP<sub>sa</sub>. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00030>.
- (88) Hampel, H.; Vassar, R.; De Strooper, B.; Hardy, J.; Willem, M.; Singh, N.; Zhou, J.; Yan, R.; Vanmechelen, E.; De Vos, A.; Nisticò, R.; Corbo, M.; Imbimbo, B. P.; Streffer, J.; Voytyuk, I.; Timmers, M.; Tahami Monfared, A. A.; Irizarry, M.; Albala, B.; Koyama, A.; Watanabe, N.; Kimura, T.; Yarenis, L.; Lista, S.; Kramer, L.; Vergallo, A. The  $\beta$ -secretase BACE-1 in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **2021**, *89* (8), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.001>.
- (89) Hitt, B. D.; Jaramillo, T. C.; Chetkovich, D. M.; Vassar, R. BACE1<sup>-/-</sup> mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol. Neurodegener.* **2010**, *5* (1), 31. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-31>.
- (90) Hu, X.; Zhou, X.; He, W.; Yang, J.; Xiong, W.; Wong, P.; Wilson, C. G.; Yan, R. BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (26), 8819–8829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1334-10.2010>.
- (91) Kobayashi, D.; Zeller, M.; Cole, T.; Buttini, M.; McConlogue, L.; Sinha, S.; Freedman, S.; Morris, R. G. M.; Chen, K. S. BACE1 gene deletion: Impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2008**, *29* (6), 861–873.

- <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.01.002>.
- (92) Willem, M.; Garratt, A. N.; Novak, B.; Citron, M.; Kaufmann, S.; Rittger, A.; DeStrooper, B.; Saftig, P.; Birchmeier, C.; Haass, C. Control of peripheral nerve myelination by the BACE1. *Science* **2006**, *314* (5799), 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.1132341>.
- (93) Citron, M.  $\beta$ -Secretase: Progress and Open Questions. *Madame Curie Bioscience Database* **2013**, 2000-2013.
- (94) Kolarova, M.; García-Sierra, F.; Bartos, A.; Rícný, J.; Ripova, D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2012**, *2012*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>.
- (95) Liu, F.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Rossie, S.; Gong, C.-X. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (3), 1790–1796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410775200>.
- (96) Holton, R. A.; Kim, H. B.; Somoza, C.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S. First total synthesis of taxol. Completion of the C and D rings. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (4), 1599–1600. <https://doi.org/10.1021/ja00083a067>.
- (97) Koudelková, M. Praktické Zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, beta amyloidu v likvoru. *Neurologie pro praxi* **2009**, *2009*, 10 (5), 290–293.
- (98) Frame, S.; Cohen, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **2001**, *359* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/bj3590001>.
- (99) Lee, S. J.; Chung, Y. H.; Joo, K. M.; Lim, H. C.; Jeon, G. S.; Kim, D.; Lee, W. B.; Kim, Y. S.; Cha, C. I. Age-related changes in glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) immunoreactivity in the central nervous system of rats. *Neurosci. Lett.* **2006**, *409* (2), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.026>.
- (100) Cai, Z.; Zhao, Y.; Zhao, B. Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9* (7), 864–879. <https://doi.org/10.2174/156720512802455386>.
- (101) Domoto, T.; Uehara, M.; Bolidong, D.; Minamoto, T. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cancer biology and treatment. *Cells* **2020**, *9* (6), 1388. <https://doi.org/10.3390/cells9061388>.
- (102) Li, X.; Friedman, A. B.; Zhu, W.; Wang, L.; Boswell, S.; May, R. S.; Davis, L. L.; Jope, R. S. Lithium regulates glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in human peripheral blood mononuclear cells: Implication in the treatment of bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* **2007**, *61* (2), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.027>.
- (103) Wei, H.; Yao, X.; Yang, L.; Wang, S.; Guo, F.; Zhou, H.; Marsicano, G.; Wang, Q.; Xiong, L. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is involved in electroacupuncture pretreatment via the cannabinoid CB1 receptor in ischemic stroke. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49* (1), 326–336. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8524-5>.
- (104) National Institute on Aging (NIA), Alzheimer's disease and related dementias. <https://www.nia.nih.gov/health/about-adear-center>. Použito 15.7.2023.
- (105) doc. MUDr. Irena Rektorová, Ph.D. Koncepce Mírné Kognitivní Poruchy u Alzheimerovy Nemoci a Parkinsonovy Nemoci. *Neurologie pro praxi.* **2010** (11), 6.

- (106) Itzhaki, R. F.; Lathe, R.; Balin, B. J.; Ball, M. J.; Bearer, E. L.; Braak, H.; Bullido, M. J.; Carter, C.; Clerici, M.; Cosby, S. L.; Del Tredici, K.; Field, H.; Fulop, T.; Grassi, C.; Griffin, W. S. T.; Haas, J.; Hudson, A. P.; Kamer, A. R.; Kell, D. B.; Licastro, F.; Letenneur, L.; Lövheim, H.; Mancuso, R.; Miklossy, J.; Otth, C.; Palamara, A. T.; Perry, G.; Preston, C.; Pretorius, E.; Strandberg, T.; Tabet, N.; Taylor-Robinson, S. D.; Whittum-Hudson, J. A. Microbes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *51* (4), 979–984. <https://doi.org/10.3233/JAD-160152>.
- (107) Kim, G. H.; Kim, J. E.; Rhie, S. J.; Yoon, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, *24* (4), 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>.
- (108) Togo, T.; Katsuse, O.; Iseki, E. Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias. *Neurol. Res.* **2004**, *26* (5), 563–566. <https://doi.org/10.1179/016164104225016236>.
- (109) Reiman, E. M.; Langbaum, J. B.; Tariot, P. N.; Lopera, F.; Bateman, R. J.; Morris, J. C.; Sperling, R. A.; Aisen, P. S.; Roses, A. D.; Welsh-Bohmer, K. A.; Carrillo, M. C.; Weninger, S. Advancing the evaluation of preclinical Alzheimer disease treatments. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12* (1), 56–61. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.177>.
- (110) Prokopová, I. Pharmacotherapy of Alzheimer disease and neuropsychiatric symptoms of dementia. *Psychiatr. Praxi* **2018**, *19* (1), 7–10. <https://doi.org/10.36290/psy.2018.002>.
- (111) Kapogiannis, D.; Mattson, M. P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2011**, *10* (2), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70277-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70277-5).
- (112) Lipton, S. A. Paradigm Shift in NMDA receptor antagonist drug development: Molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J. Alzheimers Dis.* **2005**, *6* (6), 61–74. <https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6S610>.
- (113) Schneider, L. S. Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2011**, *68* (8), 991. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.69>.
- (114) Yang, Z.; Zhou, X.; Zhang, Q. Effectiveness, and safety of memantine treatment for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *36* (3), 445–458. <https://doi.org/10.3233/JAD-130395>.
- (115) Zemek, F.; Drtinova, L.; Nepovimova, E.; Sepsova, V.; Korabecny, J.; Klimes, J.; Kuca, K. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin. Drug Saf.* **2014**, *13* (6), 759–774. <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.914168>.
- (116) Birks, J. S.; Chong, L.-Y.; Grimley Evans, J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001191.pub4>.
- (117) Birks, J. S.; Harvey, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *2018* (6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3>.
- (118) Robinson, D. M.; Keating, G. M. Memantine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* **2006**, *66* (11), 1515–1534. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666110-00015>.
- (119) Woloshin, S.; Kesselheim, A. S. What to know about the Alzheimer drug Aducanumab (Aduhelm). *JAMA Intern. Med.* **2022**, *182* (8), 892. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2022.1039>.

- (120) Lalli, G.; Schott, J. M.; Hardy, J.; De Strooper, B. Aducanumab: A new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13* (8), e14781. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114781>.
- (121) Mahase, E. Three FDA advisory panel members resign over approval of Alzheimer's drug. *BMJ* **2021**, 1503. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1503>.
- (122) Gujral, S. S.; Shakeri, A.; Hejazi, L.; Rao, P. Design, synthesis and structure-activity relationship studies of amyloid aggregation and cholinesterase inhibitors with antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem. Rep.* **2022**, *6*, 100075. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100075>.
- (123) Reardon, S. FDA approves Alzheimer's drug lecanemab amid safety concerns. *Nature* **2023**, *613* (7943), 227–228. <https://doi.org/10.1038/d41586-023-00030-3>.
- (124) Thompson, C. A. FDA approves galantamine for Alzheimer's Disease. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **2001**, *58* (8), 649–649. <https://doi.org/10.1093/ajhp/58.8.649a>.
- (125) Berkov, S.; Atanasova, M.; Georgiev, B.; Bastida, J.; Doytchinova, I. The Amaryllidaceae alkaloids: An untapped source of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochem. Rev.* **2022**, *21* (5), 1415–1443. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09790-0>.
- (126) Cahlíková, L.; Vrabc, R.; Pidaný, F.; Peřinová, R.; Maafi, N.; Mamun, A.; Ritomská, A.; Wijaya, V.; Blunden, G. Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5240. <https://doi.org/10.3390/molecules26175240>.
- (127) López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.* **2002**, *71* (21), 2521–2529. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9).
- (128) Tallini, L. R.; Carrasco, A.; Acosta León, K.; Vinueza, D.; Bastida, J.; Oleas, N. H. Alkaloid profiling and cholinesterase inhibitory potential of *Crinum* genus collected in Ecuador. *Plants* **2021**, *10* (12), 2686. <https://doi.org/10.3390/plants10122686>.
- (129) Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. N-alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (7), 2263–2266. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.03.008>.
- (130) Maříková, J.; Mamun, A. A.; Shammari, L. A.; Korábečný, J.; Kučera, T.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Malaník, M.; Vašková, M.; Kohelová, E.; Nováková, L.; Cahlíková, L.; Pour, M. Structure elucidation and cholinesterase inhibition activity of two new minor Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* **2021**, *26* (5), 1279. <https://doi.org/10.3390/molecules26051279>.
- (131) Šafratová, M.; Hošťálková, A.; Hulcová, D.; Breiterová, K.; Hrabcová, V.; Machado, M.; Fontinha, D.; Prudêncio, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Nováková, L.; Havellek, R.; Seifrtová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Alkaloids from *Narcissus Poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41* (2), 208–218. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4>.
- (132) Tarrago, T.; Kichik, N.; Seguí, J.; Giralt, E. The natural product berberine as a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem* **2007**, *2* (3), 354–359. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600303>.
- (133) Mamun, A. A.; Pidaný, F.; Hulcová, D.; Maříková, J.; Kučera, T.; Schmidt, M.;

- Catapano, M. C.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Múčková, L.; Kuneš, J.; Janoušek, J.; Andrýs, R.; Nováková, L.; Peřínová, R.; Maafi, N.; Soukup, O.; Korábečný, J.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological activity evaluation, and docking Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (15), 8308. <https://doi.org/10.3390/ijms22158308>.
- (134) Pidany, F.; Kroustková, J.; Al Mamun, A.; Suchankova, D.; Brazzolotto, X.; Nachon, F.; Chantegreil, F.; Dolezal, R.; Pulkrabkova, L.; Muckova, L.; Hrabinova, M.; Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Jenco, J.; Kunes, J.; Novakova, L.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids: Design, synthesis, and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *252*, 115301. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115301>.
- (135) Cahlíková, L.; Hrabínová, M.; Kulhánková, A.; Benešová, N.; Chlebek, J.; Jun, D.; Novák, Z.; Macáková, K.; Kuneš, J.; Kuča, K.; Opletal, L. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8* (11), 1934578X1300801. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801110>.
- (136) Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A. Synthesis, and antimalarial activity of new haemanthamine type derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (18), 5464–5472. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.07.036>.
- (137) Cedrón, J. C.; Oberti, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Del Arco-Aguilar, M.; López, M. *Pancratium canariense* as an important source of Amaryllidaceae alkaloids. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72* (1), 112–116. <https://doi.org/10.1021/np800459d>.
- (138) Cedrón, J. C.; Gutiérrez, D.; Flores, N.; Ravelo, Á. G.; Estévez-Braun, A. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (13), 4694–4701. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.023>.
- (139) Yeung; Gao, X.; Corey, E. J. A General Process for the haloamidation of Olefins. Scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (30), 9644–9645. <https://doi.org/10.1021/ja063675w>.
- (140) Raal, A.; Meos, A.; Hinrikus, T.; Heinämäki, J.; Romāne, E.; Gudienė, V.; Jak Tas, V.; Koshovyi, O.; Kovaleva, A.; Fursenco, C.; Chiru, T.; Nguyen, H. T. Dragendorff's reagent: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharm.* **2020**, *75* (7), 299–306. <https://doi.org/10.1691/ph.2020.0438>.
- (141) Hostalkova, A.; Marikova, J.; Opletal, L.; Korabecny, J.; Hulcova, D.; Kunes, J.; Novakova, L.; Perez, D. I.; Jun, D.; Kucera, T.; Andrisano, V.; Siatka, T.; Cahlikova, L. Isoquinoline alkaloids from *Berberis vulgaris* as potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (2), 239–248. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00592>.
- (142) Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.; De Simone, A.; Andrisano, V.; Cahlíková, L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. *Molecules* **2018**, *23* (4), 719. <https://doi.org/10.3390/molecules23040719>.
- (143) Cahlíková, L.; Pérez, D. I.; Štěpánková, Š.; Chlebek, J.; Šafratová, M.; Hošťálková, A.;

- Opletal, L. *In vitro* inhibitory effects of 8-*O*-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood–brain barrier. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (6), 1189–1192. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00191>.
- (144) Vrabc, R.; Maříková, J.; Ločárek, M.; Korábečný, J.; Hulcová, D.; Hošťálková, A.; Kuneš, J.; Chlebek, J.; Kučera, T.; Hrabínová, M.; Jun, D.; Soukup, O.; Andrisano, V.; Jenčo, J.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Opletal, L.; Cahlíková, L. Monoterpene indole alkaloids from *Vinca minor* L. (Apocynaceae): Identification of new structural scaffold for treatment of Alzheimer’s disease. *Phytochemistry* **2022**, *194*, 113017. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113017>.
- (145) Babcová, J. Strukturní obměny haemanthaminu. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, **2022**. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/174301>.
- (146) Uher, M.; Hroch, M.; Peřínová, R.; Havelek, R.; Křoustková, J.; Řezáčová, M.; Muthná, D.; Koutová, D.; Kuneš, J.; Cahlíková, L. Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their *in vitro* antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15* (5), 103746. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103746>.
- (147) Vaněčková, N.; Hošťálková, A.; Šafratová, M.; Kuneš, J.; Hulcová, D.; Hrabínová, M.; Doskočil, I.; Štěpánková, Š.; Opletal, L.; Nováková, L.; Jun, D.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *RSC Adv.* **2016**, *6* (83), 80114–80120. <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>.
- (148) Al Shammari, L.; Al Mamun, A.; Koutova, D.; Majorosova, M.; Hulcova, D.; Safratova, M.; Breiterova, K.; Marikova, J.; Havelek, R.; Cahlíková, L. Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS: Isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Rec. Nat. Prod.* **2019**, *14* (2), 154–159. <https://doi.org/10.25135/rnp.147.19.06.1302>.
- (149) Trujillo, L.; Bedoya, J.; Cortés, N.; Osorio, E. H.; Gallego, J.-C.; Leiva, H.; Castro, D.; Osorio, E. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae plants against cancer cells: Biotechnological, *in vitro*, and *in silico* approaches. *Molecules* **2023**, *28* (6), 2601. <https://doi.org/10.3390/molecules28062601>.
- (150) Wang, P.; Yuan, H.-H.; Zhang, X.; Li, Y.-P.; Shang, L.-Q.; Yin, Z. Novel lycorine derivatives as anticancer agents: Synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules* **2014**, *19* (2), 2469–2480. <https://doi.org/10.3390/molecules19022469>.
- (151) Nair, J. J.; Van Staden, J. Acetylcholinesterase inhibition within the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7* (7), 1934578X1200700. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700741>.
- (152) Roy, M.; Liang, L.; Xiao, X.; Feng, P.; Ye, M.; Liu, J. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.147>.
- (153) Chen, D.; Cai, J.; Cheng, J.; Jing, C.; Yin, J.; Jiang, J.; Peng, Z.; Hao, X. Design, synthesis and structure-activity relationship optimization of lycorine derivatives for HCV inhibition. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 14972. <https://doi.org/10.1038/srep14972>.
- (154) Correa, D. I.; Pastene-Navarrete, E.; Bustamante, L.; Baeza, M.; Alarcón-Enos, J. Isolation of three lycorine type alkaloids from *Rhodolirium speciosum* (Herb.) Ravenna

- using pH zone-refinement centrifugal partition chromatography and their acetylcholinesterase inhibitory activities. *Metabolites* **2020**, *10* (8), 309. <https://doi.org/10.3390/metabo10080309>.
- (155) Kunwittaya, S.; Nantasenamat, Ch.; Treeratanapiboon L.; Srisarin, A. Influence of logBB cut-off on the prediction of blood-brain barrier permeability. *Biomedical and Applied Technology Journal* **2013**, 16–34.
- (156) Maafi, N.; Mamun, A. A.; Jand'ourek, O.; Maříková, J.; Breiterová, K.; Diepoltová, A.; Konečná, K.; Hošťálková, A.; Hulcová, D.; Kuneš, J.; Kohelová, E.; Koutová, D.; Šafratová, M.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Semisynthetic derivatives of selected Amaryllidaceae alkaloids as a new class of antimycobacterial agents. *Molecules* **2021**, *26* (19), 6023. <https://doi.org/10.3390/molecules26196023>.
- (157) Wijaya, V.; Jand'ourek, O.; Křoustková, J.; Hradiská-Breiterová, K.; Korábečný, J.; Sobolová, K.; Kohelová, E.; Hošťálková, A.; Konečná, K.; Šafratová, M.; Vrabc, R.; Kuneš, J.; Opletal, L.; Chlebek, J.; Cahlíková, L. Alkaloids of *Dicranostigma franchetianum* (Papaveraceae) and berberine derivatives as a new class of antimycobacterial agents. *Biomolecules* **2022**, *12* (6), 844. <https://doi.org/10.3390/biom12060844>.
- (158) Maříková, J.; Ritomská, A.; Korábečný, J.; Peřinová, R.; Al Mamun, A.; Kučera, T.; Kohelová, E.; Hulcová, D.; Koblrová, T.; Kuneš, J.; Nováková, L.; Cahlíková, L. Aromatic esters of the crinane Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (5), 1359–1367. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00561>.

## 8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

**Kandidát:** Ing. Rozálie Peřinová

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

**Název práce:** Amaryllidaceae alkaloidy haemanthaminového strukturního typu a jejich polosyntetické deriváty jako potenciální léčiva v terapii Alzheimerovy choroby.

K prohloubení znalostí o amaryllidovém alkaloidu haemanthaminu, který byl izolován na našem pracovišti v rámci předchozích fytochemických studií, byly syntetizovány deriváty tohoto alkaloidu. Nejprve byla připravena série alifatických (3-12) a aromatických esterových derivátů (13-66), a následně pro porovnání vztahu struktura-aktivita, byly od nejaktivnějších substituentů připraveny etherové deriváty (67-80). Všechny syntetizované sloučeniny byly identifikovány za využití následujících metod strukturní analýzy: NMR, HPLC/MS a HRMS, včetně testování fyzikálních vlastností, jako je optická otáčivost. Po potvrzení struktury byly všechny deriváty podrobeny screeningovým studiím na jejich inhibiční potenciál vůči *hAChE* a *hBChE*. Vybrané deriváty byly testovány na jejich inhibiční potenciál i vůči dalšímu enzymu GSK-3 $\beta$ , který hraje významnou roli v patogenezi AD.–V rámci spolupráce s Lékařskou fakultou v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, byla také většina derivátů podrobena cytotoxickému screeningu na panelu nádorových i nenádorových linií. U slibných derivátů byly provedeny dockingové studie za účelem objasnění strukturních aspektů zodpovědných za inhibiční aktivitu.

Ze získaných dat bylo zjištěno, že v rámci *hAChE/hBuChE* se ukázal být dobrým inhibitorem derivát 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamin s hodnotami  $IC_{50}$   $18,18 \pm 1,30$  pro a  $6,59 \pm 1,19$  pro *hBuChE*. Další látkou inhibující oba enzymy byl 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthamin s hodnotami  $IC_{50}$   $13,7 \pm 0,76$  pro *hAChE* a  $5,61 \pm 0,62$  pro *hBuChE*. Oba zmiňované deriváty byly vybrány pro podrobnější farmakokinetické studie za účelem popsání mechanismu účinku inhibice. Velice dobrými selektivními inhibitory *hAChE* se pak ukázaly být deriváty s nitro skupinou společně v kombinaci s chlorem nebo methylskupinou na aromatickém jádře substituentu. Konkrétně látky 11-*O*-(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamin ( $IC_{50} = 0,17 \pm 0,01 \mu M$ ), 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin ( $IC_{50} = 0,12 \pm 0,01 \mu M$ ) a 11-*O*-(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemanthamin ( $IC_{50} = 0,17 \pm 0,01 \mu M$ ) s  $IC_{50}$  v nanomolárních hodnotách vůči



*hAChE* vykázaly dokonce desetinásobně větší inhibici oproti používanému standardu galanthaminu. Pro lepší pochopení vztahu struktura vs. účinek byly od nejaktivnějších látek připraveny etherové deriváty, kde se prohloubila inhibiční aktivita vůči *hBuChE*, naopak vůči *hAChE* nebyl zjištěn téměř žádný inhibiční účinek. Zmiňovaný 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamin vykazoval také velice zajímavý antiproliferativní účinek, kde průměrná hodnota procenta růstu (GP) byla 5 % ve srovnání s haemanthaminem (GP = 25 %). Tento derivát haemanthaminu byl podroben podrobným studiím za účelem objasnění jeho cytotoxického působení (ovlivnění buněčného cyklu, indukce apoptózy, indukce kaspas apod.).

**Klíčová slova:** haemanthamin, Amaryllidaceae alkaloidy, Alzheimerova choroba, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, cytotoxicita.

## 9 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

**Candidate:** Ing. Rozálie Peřinová

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

**Title of doctoral thesis:** Amaryllidaceae alkaloids of haemanthamine structural type and their semisynthetic derivatives as potential drugs in the treatment of Alzheimer's disease.

To deepen the knowledge about the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine, which was isolated at our workplace as part of previous phytochemical studies, derivatives of this alkaloid were synthesized. First, series of aliphatic (**3-12**) and aromatic ester derivatives (**13-66**) were prepared, and then, to compare the structure-activity relationship, ether derivatives (**67-80**) were prepared from the most active substituents. All synthesized compounds were identified using the following structural analysis methods: NMR, HPLC/MS, and HRMS, including testing physical properties such as optical rotatability. After structure confirmation, all derivatives were subjected to screening studies for their inhibitory potential against *hAChE* and *hBuChE*. The selected derivatives were tested for their inhibitory potential against another enzyme, GSK-3 $\beta$ , which plays a significant role in the pathogenesis of AD. In cooperation with the Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University, most of the derivatives were also subjected to cytotoxic screening on a panel of tumor and non-tumor cell lines. Docking studies were performed on promising derivatives to elucidate the structural aspects responsible for the inhibitory activity.

From the obtained data, it was found that the derivative 11-*O*-(2-methylbenzoyl)haemanthamine with IC<sub>50</sub> values of 18.18  $\pm$  1.30  $\mu$ M for *hAChE* and 6.59  $\pm$  1.19  $\mu$ M for *hBuChE* proved to be a good inhibitor within *hAChE/hBuChE*. Another substance inhibiting both enzymes was 11-*O*-(2-chlorobenzoyl)haemanthamine with IC<sub>50</sub> values 13.7  $\pm$  0.76  $\mu$ M for *hAChE* and 5.61  $\pm$  0.62  $\mu$ M for *hBuChE*. Both mentioned derivatives were selected for more detailed pharmacokinetic studies in order to describe the mechanism of action of inhibition. Derivatives with a nitro group together with a chlorine or methyl group on the aromatic core of the substituent turned out to be very good selective *hAChE* inhibitors. Specifically, the substances 11-*O*-(2-chloro-5-nitrobenzoyl)haemanthamine (IC<sub>50</sub> = 0.17  $\pm$  0.01  $\mu$ M), 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamine (IC<sub>50</sub> = 0.12  $\pm$  0.01  $\mu$ M) and 11-*O*-

(4-methyl-3-nitrobenzoyl)haemanthamine ( $IC_{50} = 0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) with  $IC_{50}$  in nanomolar values against *hAChE* showed an even tenfold greater inhibition compared to the standard galantamine used. For a better understanding of the relationship between structure vs. effect, ether derivatives were prepared from the most active substances, where the inhibitory activity against *hBuChE* deepened, on the contrary, almost no inhibitory effect was detected against *hAChE*. The mentioned 11-*O*-(4-chloro-3-nitrobenzoyl)haemanthamine also showed a very interesting antiproliferative effect, where the average growth percentage (GP) value was 5% compared to haemanthamine (GP = 25%). This haemanthamine derivative has been subjected to detailed studies in order to clarify its cytotoxic action (influence of the cell cycle, induction of apoptosis, induction of caspases, etc.).

**Key words:** haemanthamin, Amaryllidaceae alkaloids, Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cytotoxicity.

## 10 PŘEHLED PUBLIKACÍ A KONFERENCÍ

### 10.1 Původní práce

Kohelová, E., Peřinová, R., Maafi, N., Korábečný, J., Hulcová, D., Maříková, J., Kučera, T., Martínez González, L., Hrabínova, M., Vorčáková, K., Nováková, L., De Simone, A., Havelek, R., Cahlíková, L. Derivatives of the  $\beta$ -Crinane Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine as multi-target directed ligands for Alzheimer's disease. *Molecules* **2019** 24(7), 1307. <https://doi.org/10.3390/molecules24071307>

Podíl studentky na publikaci: příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu, strukturní identifikace připravených látek (HPLC-MS, optická otáčivost), převedení derivátů na hydrochloridy a jejich příprava pro biologické testy.

Peřinová, R., Maafi, N., Korábečný, J., Kohelová, E., De Simone, A., Al Mamun, A., Hulcová, D., Marková, J., Kučera, T., Jun, D., Šafratová, M., Maříková, J., Andrisano, V., Jenčo, J., Kuneš, J., Martinez, A., Nováková, L., Cahlíková, L. Functionalized aromatic esters of the Amaryllidaceae alkaloid haemanthamine and their *in vitro* and *in silico* biological activity connected to Alzheimer's disease. *Bioorganic chemistry* **2020**, 100, 103928. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103928>

Podíl studentky na publikaci: příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu, strukturní identifikace připravených látek (HPLC-MS, optická otáčivost), převedení derivátů na hydrochloridy a jejich příprava pro biologické testy.

Uher, M., Hroch, M., Peřinová, R., Havelek, R., Křoustková, J., Řezáčová, M., Muthná, D., Koutová, D., Kuneš, J., Cahlíková, L. Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their *in vitro* antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines. *Arab. J. Chem.* **2022**, 15,103746. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103746>

Podíl studentky na publikaci: příprava polosyntetických derivátů haemanthaminu, strukturní identifikace připravených látek (HPLC-MS, optická otáčivost), převedení derivátů na hydrochloridy a jejich příprava pro biologické testy, screening cytotoxické aktivity derivátů a stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> u neaktivnějších látek.

Maříková, J., Ritomská, A., Korábečný, J., Peřinová, R., Al Mamun, A., Kučera, T., Kohelová, E., Hulcová, D., Koblíková, T., Kuneš, J., Nováková, L., Cahlíková, L. Aromatic esters of the crinine Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of butyrylcholinesterase. *Journal of natural products* **2020**, 83(5), 1359–1367. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00561>

Podíl studentky na publikaci: příprava některých polosyntetických derivátů ambellinu, strukturní identifikace připravených látek (HPLC-MS, optická otáčivost), převedení derivátů na hydrochloridy a jejich příprava pro biologické testy.

Mamun, A. A., Pidaný, F., Hulcová, D., Maříková, J., Kučera, T., Schmidt, M., Catapano, M. C., Hrabínová, M., Jun, D., Múčková, L., Kuneš, J., Janoušek, J., Andrýs, R., Nováková, L., Peřinová, R., Maafi, N., Soukup, O., Korábečný, J., Cahlíková, L. 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. <https://doi.org/10.3390/ijms22158308>

Podíl studentky na publikaci: pomoc při syntézách a příprava podkladů pro publikaci.

Kohelová, E., Maříková, J., Korábečný, J., Hulcová, D., Kučera, T., Jun, D., Chlebek, J., Jenčo, J., Šafratová M., Hrabínová, M., Ritomská, A., Peřinová, R., Breiterová, K., Kuneš, J., Nováková, L., Opletal, L., Cahlíková, L.: Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: isolation, structural elucidation and biological activity. *Bioorg. Chem.* **2021**, 107, 104567. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>

Podíl studentky na publikaci: příprava látek pro biologické testy.

Cahlíková, L., Vrabec, R., Pidaný, F., Peřinová, R., Maafi, N., Mamun, A. A., Ritomská, A., Wijaya, V., Blunden, G. Recent Progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules*, **2021**, 26(17), 5240. <https://doi.org/10.3390/molecules26175240>

Podíl studentky na publikaci: příprava podkladů pro publikaci.

Breiterová, K. H., Ritomská, A., Fontinha, D., Křoustková, J., Suchánková, D., Hošťálková, A., Šafratová, M., Kohelová, E., Peřinová, R., Vrabec, R., Francisco, D., Prudêncio, M., Cahlíková, L. Derivatives of Amaryllidaceae alkaloid ambelline as selective inhibitors of hepatic stage of *Plasmodium berghei* infection *in vitro*. *Pharmaceutics*, **2023**, 15(3), 1007. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15031007>

Podíl studentky na publikaci: příprava některých polosyntetických derivátů ambellinu, strukturní identifikace připravených látek (HPLC-MS, optická otáčivost), převedení derivátů na hydrochloridy a jejich příprava pro biologické testy.

## 10.2 Konference a přednášky

### 10.2.1. Konference

Česká chromatografická škola – HPLC 2019 - Zaječí, Česká republika, květen 2019

10<sup>th</sup> Kongres Slovenské Farmaceutické Společnosti, Bratislava, Slovensko, září 2019

### 10.2.2. Přednášky

9<sup>th</sup> Postgraduální a 7<sup>th</sup> Postdoktorandská konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, leden 2019

Přednáška na téma: SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS POTENTIAL DRUGS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

10<sup>th</sup> Postgraduální and 8<sup>th</sup> Postdoktorandská konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Česká republika, leden 2020

Přednáška na téma: SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS POTENTIAL DRUGS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

11<sup>th</sup> Postgraduální and 9<sup>th</sup> Postdoktorandská konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Česká republika, leden 2021

Přednáška na téma: SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS POTENTIAL DRUGS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

12<sup>th</sup> Postgraduální and 10<sup>th</sup> Postdoktorandská konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Česká republika, leden 2021

Přednáška na téma: SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS POTENTIAL DRUGS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

### 10.2.3. Postery

10<sup>th</sup> Kongres Slovenské Farmaceutické Společnosti, Bratislava, Slovensko, září 2019

Poster na téma: SEMISYNTHETIC DERIVATIVES OF AMARYLLIDACEAE ALKALOID HAEMANTHAMINE AS POTENTIAL DRUGS IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

#### **10.2.4. Národní odborná stáž**

Dvousemestrální stáž v období během zimního semestru 2019 až letního semestru 2020 na Ústavu lékařské biochemie na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V rámci této stáže byl proveden screening protinádorové aktivity polosyntetických derivátů (haemanthaminu a ambellinu) připravených na naší katedře a u nejaktivnějších z nich byla dále změřena hodnota  $IC_{50}$ . Některá naměřená data jsou publikována již ve zmiňovaném publikačním výstupu [42].