



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Laučan

Prirodni spojevi kao inhibitori kolinesteraze izolirani iz morskih organizama

Kemijski seminar 1

Doktorski studij Kemija, smjer: organska kemija

prema radu: Lindon W.K. Moodie, K. Sepčić, T. Turk, R. Frangež, J.Svenson, *Nat. Prod. Rep.* **36** (2019) 1053–1092.

Zagreb, 2025. godina.

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Kolinergički sustav.....	2
2.2. Kolinesteraze	4
2.2.1. <i>Acetilkolinesteraza.....</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Butirilkolinesteraza.....</i>	<i>6</i>
2.2.3. <i>Mehanizam djelovanja kolinesteraza.....</i>	<i>6</i>
2.3. Poremećaji kolinergičkog sustava	8
2.3.1. <i>Alzheimerova bolest.....</i>	<i>8</i>
2.3.2. <i>Miastenija gravis.....</i>	<i>9</i>
2.4. Trenutno korišteni ChE inhibitori	9
2.5. Izazovi pri otkrivanju lijeka.....	12
2.5.1. <i>Krvno-moždana barijera.....</i>	<i>12</i>
2.5.2. <i>Toksičnost i nuspojave</i>	<i>13</i>
2.6. Prirodni inhibitori kolinesteraze izolirani iz morskih organizama	13
2.6.1. <i>Inhibitori kolinesteraze iz mikroorganizama</i>	<i>15</i>
2.6.2. <i>Inhibitori kolinesteraze iz algi</i>	<i>16</i>
2.6.3. <i>Inhibitori kolinesteraze iz spužvi.....</i>	<i>16</i>
2.6.4. <i>Inhibitori kolinesteraze iz mekušaca.....</i>	<i>17</i>
2.6.5. <i>Inhibitori kolinesteraze iz plaštenjka</i>	<i>18</i>
2.6.6. <i>Inhibitori kolinesteraze iz morskih mahovina.....</i>	<i>19</i>
2.6.7. <i>Inhibitori kolinesteraze iz bodljikaša.....</i>	<i>20</i>
§ 3. ZAKLJUČAK	22
§ 4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	23
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	XV

§ 1. UVOD

Morski ekosustavi, koji prekrivaju više od 70 % Zemljine površine, predstavljaju jedno od najbogatijih, ali i najmanje istraženih prirodnih staništa. Zahvaljujući iznimnoj biološkoj raznolikosti te specifičnim i često ekstremnim uvjetima života, morski organizmi razvili su niz jedinstvenih metaboličkih spojeva kao prilagodbu na svoje okolišne izazove. Među tim spojevima posebno se izdvajaju prirodni inhibitori, spojevi koji selektivno ometaju djelovanje enzima, čime pokazuju veliki potencijal za razvoj novih lijekova i terapija.

Posebno značajnu ulogu ovi prirodni spojevi imaju u istraživanju i liječenju neurodegenerativnih poremećaja. Prirodni inhibitori kolinesteraze, izolirani iz različitih izvora, koriste se za ublažavanje simptoma povezanih s disfunkcijom kolinergičkog sustava. Najčešće primjene uključuju ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti i *miastenije gravis*, gdje inhibicija kolinesteraze dovodi do poboljšanja neurotransmisije.¹

Ovaj rad donosi pregled prirodnih inhibitora kolinesteraze izoliranih iz morskih organizama, njihov mehanizam djelovanja te potencijal za primjenu u terapiji neurodegenerativnih bolesti. Neki od tih spojeva pokazuju inhibitorno djelovanje jednako ili čak snažnije od trenutno korištenih kliničkih lijekova.

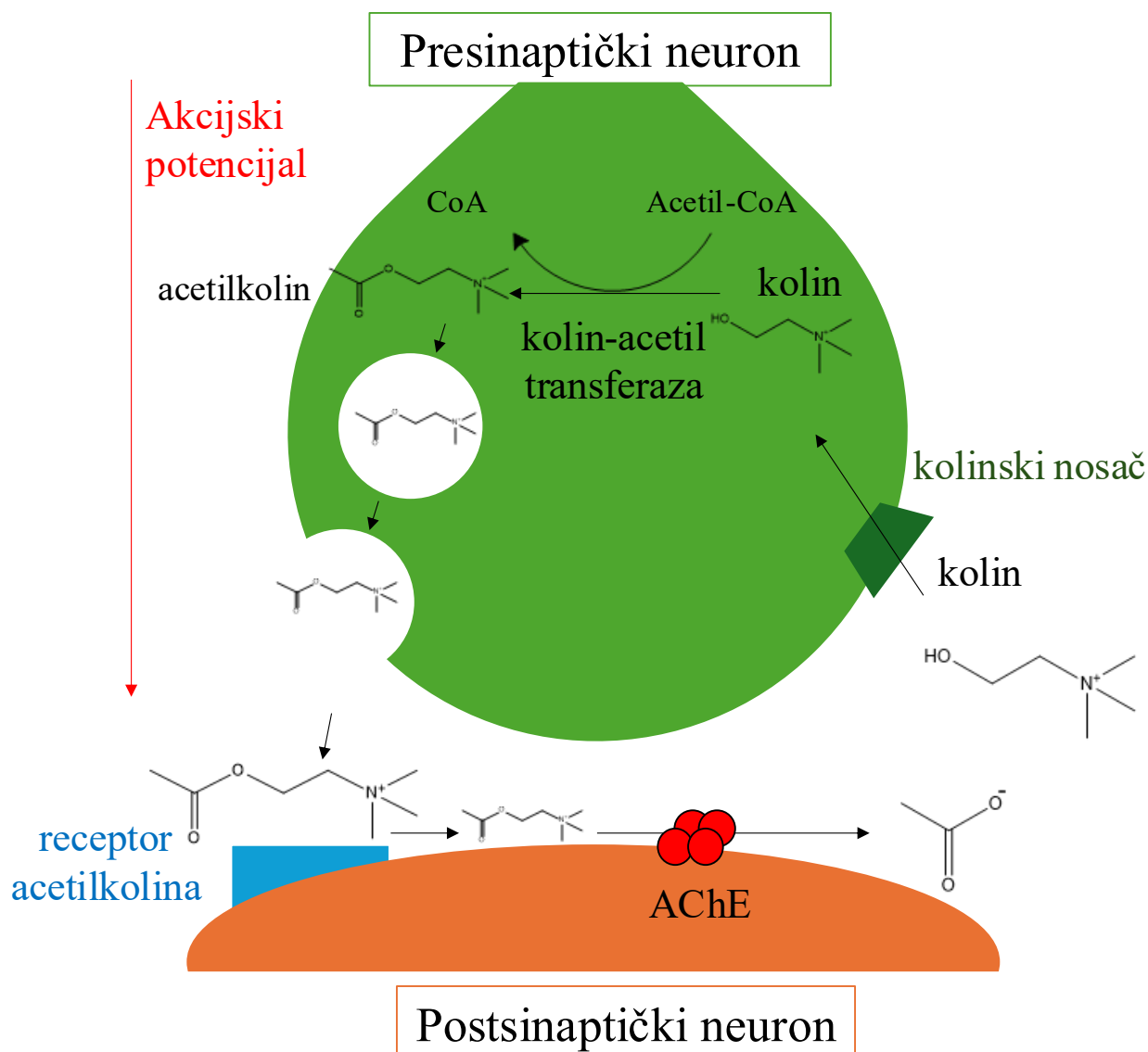
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kolinergički sustav

Kolinergički sustav se temelji na oslobađanju i vezanju neurotransmitera acetilkolina (ACh). Predstavlja ključan modulacijski put, kako središnjeg, tako i perifernog živčanog sustava. Naime, neurotransmiter ACh, koji se sintetizira i otpušta s kolinergičkog neurona, regulira brojne fiziološke funkcije. Primjerice, kolinergički neuroni su, u središnjem živčanom sustavu, uključeni u razne neuronske funkcije kao što su pamćenje, učenje, pažnja i regulacija ciklusa spavanja.²

ACh se sintetizira iz kolina i acetilkoenzima A (acetyl-CoA) u citosolu presinaptičkog kolinergičkog neurona, a reakcija je katalizirana enzimom kolin-acetil-transferazom. Neurotransmiter se zatim pohranjuje u sinaptičke vezikule. Depolarizacija neurona uzrokuje spajanje membrane vezikula s membranom neurona što dovodi do stvaranja otvora kroz koje se neurotransmiteri egzocitozom izbacuju u sinaptičku pukotinu, slika 1.. ACh se u sinaptičkoj pukotini veže na nikotinske i muskarinske receptore, koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani, što dovodi do depolarizacije postsinaptičke membrane te omogućuje daljnji prijenos signala.³

Kako bi se postsinaptička membrana, nakon prijenosa signala, vratila u početno stanje, dolazi do brze razgradnje ACh djelovanjem acetilkolinesteraze (AChE), enzima koji se nalazi u sinaptičkoj pukotini i funkcionalno je povezan s postsinaptičkom membranom. AChE katalizira hidrolizu ACh u acetat i kolin. Kolin se preko kolinskog nosača prenosi ponovno u presinaptički neuron. Razine ACh regulirane su kolin-acetil-transferazom i ponovnom pohranom kolina.⁴



Slika 1. Kolinergička sinapsa. Acetilkinolin (ACh) se, pod djelovanjem kolin-acetil-transferaze, sintetizira iz kolina i acetata te se pohranjuje u vezikulama. Presinaptička membranska depolarizacija uzrokuje egzocitozu sinaptičkih vezikula te dolazi do oslobađanja ACh u sinaptičku pukotinu. ACh se veže za acetilkolinske receptore i omogućuje daljnji prijenos signala. Stimulacija ovih receptora prestaje djelovanjem acetilkolinesteraze koja katalizira hidrolizu ACh u acetat i kolin. Kolin se zatim transportira natrag u presinaptički neuron pomoću kolinskog nosača.

2.2. Kolinesteraze

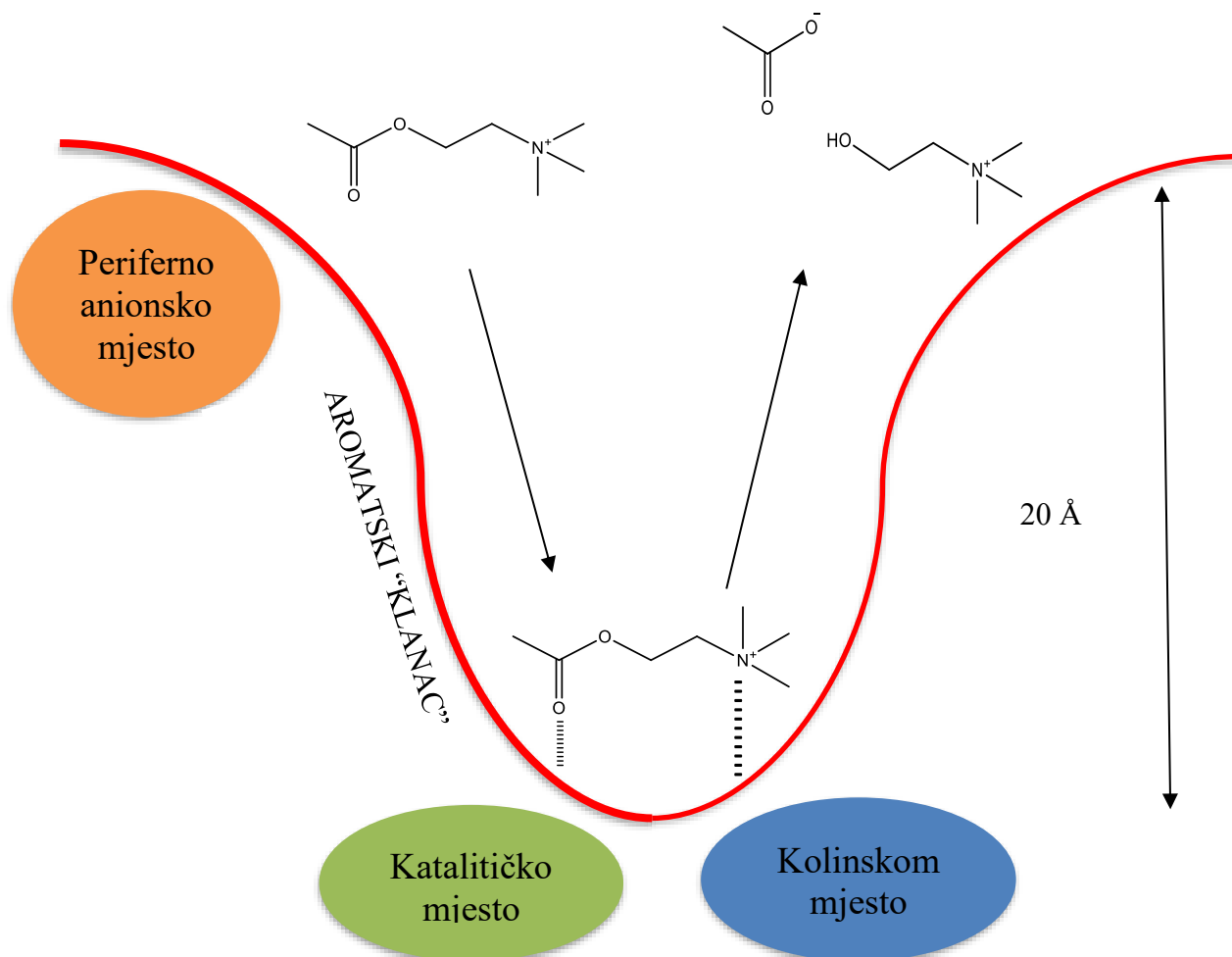
Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) su enzimi koji se intenzivno istražuju u području biomedicine i toksikologije. Razlog tomu njihova uloga u organizmu i rasprostranjenosti u životinjskom i biljnom svijetu. Oba enzima se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina.⁵

Primarna funkcija kolinesteraza je hidroliza estera kolina, uključujući prirodni supstrat acetilkolin, ACh. Osim toga, navedeni enzimi imaju i alternativne funkcije. Do sada je otkriveno da kolinesteraze sudjeluju u staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, u komunikaciji između stanica te razvoju i održavanju sinaptičke i mioneuralne strukture.⁶ Uz navedeno, zabilježena je i uloga AChE u patološkim stanjima.⁷

2.2.1. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C.3.1.1.7) glasi kao jedan od katalitički najučinkovitijih enzima u prirodi. Jedan enzim AChE može hidrolizirati do 5000 molekula ACh u sekundi, što znači da je AChE gotovo savršen enzim, jer brzina reakcije nije ograničena samom katalizom, već difuzijom supstrata u aktivno mjesto.⁶ Glavna funkcija ovog enzima je regulacija neurotransmisije u kralježnjacima kolinergičkim putevima u mozgu, autonomnom živčanom sustavu i skeletnim mišićima. AChE se obično nalazi kao tetramer povezan s plazmatskom membranom u sinaptičkoj pukotini preko specializiranih sidrišnih proteina,⁸ ali može postojati i kao slobodni enzim, koji razgrađuje ACh u ekstracelularnom mediju.⁶

Aktivno mjesto AChE nalazi se na dnu duboke i uske šupljine (aromstaki "klanac") duboke 2 Å, slika 2. Oko 60% površine šupljine je prekriveno aromatskim aminokiselinskim ostacima,⁷ što omogućuje usmjeravanju supstrata prema aktivnom mjestu kroz sukcesivno- π interakcije. Sukcesivno- π interakcije odnose se na niz uzastopnih kationsko- π interakcija između kvaterne amonijeve soli ACh i aromatskih aminokiselinskih ostataka unutar aktivnog mjesta enzima.⁹



Slika 2. Građa aktivnog mjesta AChE

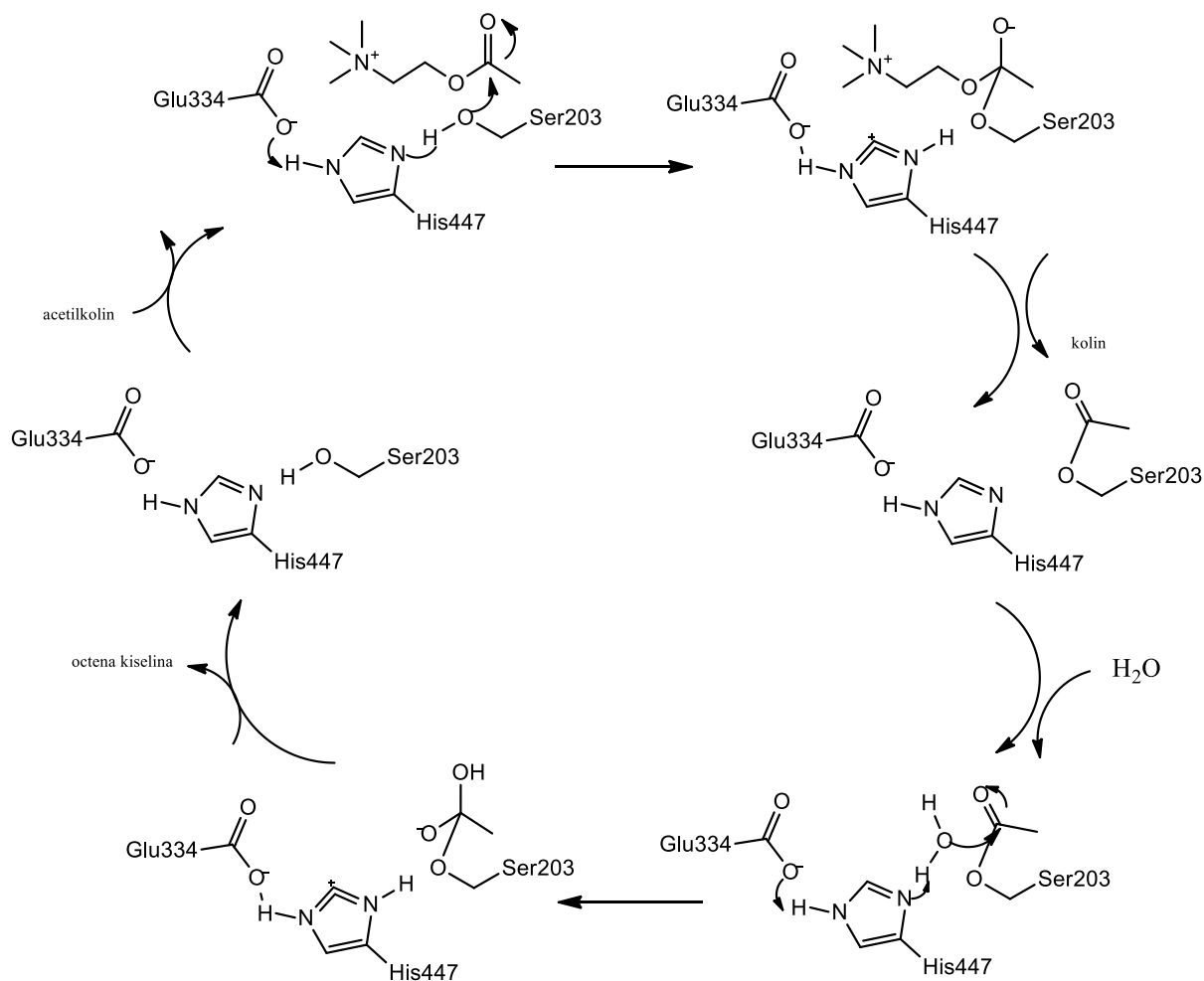
Osim aromatskog "klanaca", aktivno mjesta AChE čine kolinsko, katalitičko i periferno anionsko mjesto. Kolinsko mjesto omogućuje ispravnu orijentaciju ACh preko kationsko- π interakcija između kvaterne amonijeve soli ACh i aromatskih aminokiselinskih ostataka. Katalitičko mjesto sadrži katalitičku trijadu koja izravno sudjeluje u katalizi, a sačinjavaju ju His447, Glu334 i Ser203.^{8,10} Periferno anionsko mjesto nalazi se na samom ulazu u klanac i omogućuje privlačenje, stabilizaciju i usmjeravanje ACh prema aktivnom mjestu na dnu klanca.⁹

2.2.2. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) pripada skupini kolinesteraza. Iako može hidrolizirati neurotransmiter ACh i veći, neprirodni butirilkolin, njen specifični fiziološki supstrat nije pronađen te zbog toga njegova prava fiziološka uloga nije poznata.⁵ Kod odraslog čovjeka prosječne koncentracije BChE kreću od 3,5 do 9,6 mg mL⁻¹, što je deset puta više od koncentracije AChE.¹¹ Postoje pretpostavke da BChE podržava i regulira kolinergički prijenos kada je aktivnost AChE ugrožena ili odsutna.¹² BChE se nalazi u većoj koncentraciji u središnjem i perifernom živčnom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini, plućima, gušterači, crijevima i jetri. Isto tako, otkriveno je da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, diferencijaciji, rastu živčanog tkiva te je uočena pojačana ekspresija enzima kod neurodegenerativnih bolesti. Kao i AChE, predstavlja metu za tretman liječenja Alzheimerove, Parkinsonove bolesti i *miastenije gravis*. Također, pojavljuje se nekoliko drugih zaštitnih i regulatornih funkcija BChE, uključujući biokonverziju nekolicine farmakološki važnih spojeva kao što su heroin i bambuterol (aktivira ih) te aspirin, kokain, sukcinildikolin, amitriptilin (deaktivira ih).⁵

2.2.3. Mehanizam djelovanja kolinesteraza

Kolinesteraze kataliziraju reakciju hidrolize supstrata ACh, slika 3. Mehanizam hidrolize odvija se u tri koraka: nastajanje Michaelisova kompleksa, zatim aciliranje enzima te njegovo deaciliranje vodom. Aciliranje i deaciliranje enzima odvijaju se preko tetraedarskog međuprodukta između Ser203 i ACh.



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma hidrolize kolinesteraza

Enzimi AChE i BChE nastaju kao produkti ekspresije različitih gena, ali dijele veliki postotak homologije u primarnoj strukturi i čak 90 % u terciarnoj strukturi.¹³ Iako postoje razlike u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnog mjesta AChE i BChE, mehanizam hidrolize supstrata je isti.⁴ Ova dva enzima dijele više od 50 % aminokiselinske sekvence, ali se razlikuju po svojim supstratnim specifičnostima. Razlog tome jest činjenica da su određeni aromatski bočni ogranci u aktivnom mjestu AChE zamijenjeni alifatskima kod BChE, čime je njen volumen povećan za 200 Å³, što utječe na suspratnu selektivnost, ali i na interakcije s inhibitorima.¹⁴ Naime, aromatski bočni ogranci kod AChE uzrokuju krutost i sterička smetanja koja vode do izraženije supstratne selektivnosti, dok su alifatski bočni ogranci kod BChE manji te ne tvore jake π - π interakcije, što omogućuje pristup aktivnom mjestu većim suspratima, ali i inhibitorima.¹⁵

Aktivno mjesto duboko je 20 Å i sastoji se od četiri domene: katalitičkog mjesta, kolinskog mjesta, acilnog džepa i perifernog anionskog mjesta na rubu aromatskog „klanca“. Katalitičko mjesto uključuje katalitičku trijadu koja izravno sudjeluje u katalizi, a sačinjavaju ju His447, Glu334 i Ser203 i nalazi se na dnu ždrijela. Specifičnost Ser203 je po tome što je nukleofilniji od drugih serina u proteinu, a razlog tome je stvaranje vodikove veze s dušikovim atomom iz imidazolskog prstena His447. Vodikova veza nastaje i između kisika karbonilne skupine Glu334 i drugog dušikovog atoma iz imidazolskog prstena His447. Ser203 nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom ACh. Prilikom nastajanja tetraedarskog međuprodukta, negativno nabijen kisikov atom karbonilne skupine ACh stabilizira se u oksianionskoj šupljini stvaranjem vodikovih veza s Gly118, Gly119 i Ala201.¹⁶ Kolinsko mjesto sastoji se od aminokiselina Trp86, Tyr337 i Tyr338. U kolinskom mjestu pomoću kation- π interakcija stabilizira se pozitivno nabijeni kvaternizirani dio kolinskog supstrata. Trp86 služi tome da smješta pozitivno nabijeni dio supstrata u kolinsko mjesto omogućavajući time bržu hidrolizu kolinskih supstrata. Za razliku od AChE, kolinsko mjesto kod BChE nije specifično samo za pozitivno nabijene, već i za neutralne i negativno nabijene supstrate. U acilni džep smješta se acilna skupina supstrata tako da on bude orijentiran prema Ser203. U acilnom džepu AChE nalaze se Phe295 i Phe297, dok se kod BChE umjesto aromatskih, nalaze alifatske aminokiseline Leu286 i Val288 te se time smanjuje selektivnost kod BChE.¹⁷ Periferno mjesto smješteno je na rub klanca, kod AChE sastoji se od Tyr72, Tyr124 i Trp286 odgovornih za alosterički mehanizam inhibicije kada je koncentracija acetilkolina visoka.¹⁸

2.3. Poremećaji kolinergičkog sustava

Poremećaji kolinergičkog sustava mogu nastati zbog različitih faktora koji utječu na ravnotežu i funkciju ACh. Nekoliko neuroloških i degenerativnih stanja povezano je sa smanjenjem funkcije kolinergičkog sustava. Glavni razlozi ovakvih stanja povezani su s degeneracijom neurona, autoimunošću i prekidanjem neuromuskularne transmisije. Inhibitori kolinesteraze koriste se za ublažavanje simptoma koji su povezani s nekim od ovih stanja.

2.3.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) je progresivna neurodegenerativna bolest mozga koja pogađa starije osobe i najčešći je uzrok senilne demencije.¹⁹ Kod razvoja bolesti, kolinergički neuroni unutar mozga akumuliraju fosforilirane proteine povezane s mikrotubulama (Tau proteini)²⁰ i

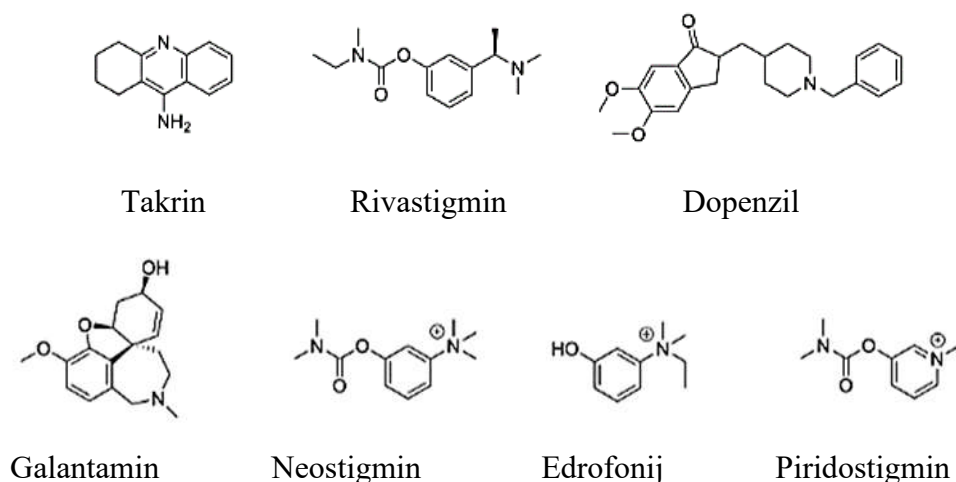
agregirane beta-amiloidne peptide koji tvore senilne plakove i pokazuju pojačanu aktivnost AChE u ranim fazama bolesti. Navedeni mehanizmi dovode do smanjenja ACh i do postupnog gubitka moždanih neurona uključenih u kognitivne funkcije. Degeneracija neurona je posljedica gubitka pamćenja, uz probleme u razumijevanju, učenju i snalaženju u prostoru i vremenu te drugim kognitivnim vještinama koje utječu na sposobnost osobe da učinkovito obavlja svakodnevne poslove.²¹ U kasnijim fazama progresije AD, aktivnost AChE u mozgu opada te dolazi do znatnog povećanja (do 90%) razina BChE u mozgu, što uzrokuje daljnje pogoršanje bolesti.²² Shodno tomu, inhibitori AChE i BChE koji produljuju aktivnost ACh u sinapsama mogu doprinijeti poboljšanju kognitivnih funkcija pacijenata s AD.

2.3.2. *Miastenia gravis*

Myasthenia gravis (MG) je najrasprostranjenija autoimuna neuroimunološka kronična bolest koja pogađa 1 na 20 000 članova populacije.²³ MG utječe na neuromuskularnu sinapsu i karakterizira je slabost i izrazita umornost skeletnih mišića zbog blokiranja neuro-mišićnog prijenosa.²⁴ Najčešći uzrok ometanja neuromuskularnog prijenosa je stvaranje i vezanje autoantitijela za acetilkolinske receptore (AChR) čime dolazi do smanjenja broja funkcionalnih AChR iz postsinaptičke membrane.²⁵ Klinički relevantni tretmani MG uključuju inhibitore AChE koji ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru, što povećava poluživot ACh. Terapija takvim inhibitorima AChE, koji poboljšavaju kontrakcije mišića, ključna je za ublažavanje simptoma MG.

2.4. Trenutno korišteni ChE inhibitori

Odobreno je nekoliko lijekova, odnosno inhibitora kolinesteraza, za liječenje demencije i drugih stanja, od strane FDA²⁶, slika 4. Uzevši u obzir Alzheimerovu bolest, lijekovi ne liječe bolest, već ublažavaju simptome kako bi poboljšali kognitivnu funkciju pacijenata, što se odražava na njihovo pamćenje, pažnju i svakodnevno funkcioniranje.²⁷ Inhibitori kolinesteraze sprečavaju razgradnju ACh. Budući da bolest uzrokuje pad razine ACh, lijekovi pokušavaju ublažiti simptome povećanjem njegove dostupnosti u mozgu.



Slika 4. Trenutno korišteni ChE inhibitori

Prvi lijek za liječenje Alzheimerove bolesti bio je Cognex (akridinski derivat takrin), odobren od strane FDA 1993. godine.²⁸ Iako su klinička ispitivanja pokazala blaga poboljšanja kod ublažavanja simptoma bolesti, spoj je također bio povezan s ozbiljnim nedostacima i problemima toksičnosti, kao što je oštećenje jetre.²⁹ Shodno tomu, takrin je povučen s tržišta 2012. godine te je ostao zapamćen kao pionirski pokušaj farmakološkog liječenja demencije. Navedeni događaj potaknuo je opsežna istraživanja alternativnih AChE inhibitora za liječenje AD, a nekoliko novih AChE inhibitora odobreno je za ulazak na tržište početkom 21. stoljeća.

Rivastigmin (Exelon) odobren je 2000. godine, razvijen je kao karbamatni derivat fizostigmina. Iako snažan inhibitor AChE, postoje određeni razlozi zbog kojih nije najprikladniji lijek za liječenje AD. U prvom redu to je niska podnošljivosti lijeka koja uključuje brojne nuspojave, posebice gastrointestinalne i kardiovaskularne rizike.³⁰ S druge strane, to je snažan lijek za liječenje glaukoma te se koristi u tu svrhu od 1876. godine. Ipak, uz sve nedostatke, priroda karbamatna skela fizostigmina, potaknula je razvoj niza klinički relevantnih sintetičkih pseudo-ireverzibilnih inhibitora kolinesteraze, posebice jer ima dobru oralnu bioraspoloživost i lako prelazi krvno-moždanu barijeru.³¹

Jedan od najčešće korištenih lijekova za simptomatsko liječenje AD je donepezil (Aricept), odobren je 1996. godine.³² Donepezil, u usporedbi s prethodnim tretmanima AD, pokazuje dulje i selektivnije djelovanje, a nuspojave se lakše kontroliraju.³³ Navedeni lijek je piperidinski derivat i reverzibilni je inhibitor AChE sa slabom inhibicijskom snagom protiv BChE.³² U

smislu inhibitorne koncentracije, spoj je vrlo aktivan pri niskim nanomolarnim koncentracijama protiv AChE i lako prelazi krvno-moždanu barijeru.³⁴

Još jedan odobreni inhibitor kolinesteraze, pretežno protiv AChE, koji se koristi u liječenju AD je galantamin (trgovačka imena; Razadyne™, Reminyl™ i Nivalin.³⁵™). Prvobitno je izoliran iz prirodnih izvora, no sada se proizvodi na nekoliko sintetičkih načina.³⁶ Galanthamin je reverzibilni, kompetitivni inhibitor AChE te pokazuje i alosteričko djelovanje na nikotinske receptore, omogućavajući bolje prenošenje živčanih impulsa.³⁷

Osim u liječenju AD, inhibitori AChE također se koriste u liječenju drugih stanja, kao što je MS.³⁸ Neki od ovih spojeva klasificiraju se kao analozi prirodnog fizostigmina koji u svojoj strukturi sadrži karbamat. Strukturne modifikacije uključuju ugradnju pozitivno nabijenog kvartarnog dušika, koji smanjuje mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru te je zbog toga njihova aktivnost usmjerena prema perifernom živčanom sustavu.³¹

Neostigmin, derivat fizostigmina, se koristi za liječenje učinaka neuromuskularnih blokatora i za povećanje tonusa mišića i mišićne snage kod pacijenata s MS, neuroimunološkom kroničnom autoimunom bolešću koju karakterizira slabost skeletnih mišića.³⁹ Bloxiverz, neostigmin metilsulfat, prvi put odobrila je FDA 2013. godine.

Edrofonij je brzo djelujući i kratkotrajni inhibitor kolinesteraze koj se najčešće koristi u dijagnostici *miastenije gravis* putem Tensilonovog testa. Njegovo djelovanje temeljeno je na brzom i privremenoj inhibiciji AChE, što uzrokuje kratkotrajno povećanje koncentracije acetilkolina u neuromuskularnoj sinapsi, omogućujući bolji prijenos signala između živaca i mišića. Općenito se primjenjuje u višim koncentracijama od neostigmina.^{40,41}

Piridostigmin (Mestinon, piridostigmin-bromid) je još jedan sintetski analog fizostigmina, koji su 1945. razvili laboratoriji Hoffmann-La Roche. To je inhibitor AChE koji se koristi protiv *miastenije gravis*, a također se koristi i u profilaktičkoj obradi izloženosti nervnim bojnim otrovima, tako da reverzibilnom inhibicijom AChE štiti enzim od trajnog oštećenja.⁴²

Edrofonij, neostigmin i piridostigmin imaju slične načine djelovanja te se označavaju kao pseudo-ireverzibilni inhibitori s preferencijom vezanja za AChE nad BChE. Iako su ovi lijekovi u osnovi reverzibilni, njihova veza s kolinesterazama može ostati stabilna dovoljno dugo da im se pripiše svojstvo pseudo-ireverzibilnog inhibitora.⁴³ S obzirom da su to kvaterni amonijevi spojevi, što znači da nose pozitivan naboj i hidrofilni karakter, ovi spojevi se suočavaju s nekoliko fizioloških barijera apsorpcije i ne prelaze kroz krvno-moždanu barijeru.³¹

Odobreni lijekovi pokazuju inhibitornu aktivnost prema AChE i BChE.⁴⁴ Iako postoji značajna razlika u inhibitornoj koncentraciji između spojeva, kliničko doziranje se ne razlikuje u velikoj mjeri.³⁸ U Tablici 1. prikazane su IC₅₀ vrijednosti odobrenih lijekova koje ilustriraju raspon inhibitornih svojstava.

Tablica 1. IC₅₀ vrijednosti izračunate za odobrene inhibitore kolinesteraze u reakciji inhibicije hAChE i hBChE.

Lijek	IC ₅₀ / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ hAChE	IC ₅₀ / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ hBChE	Vrsta inhibicije	bolest
Takrin	0,5	0,02	nekompetitivna	AD
Rivastigmin	4,15	0,037	pseudo-ireverzibilna	AD
Donepezil	0,022	4,15	nekompetitivna	AD
Galantamin	0,8	73	kompetitivna	AD
Edrofonij	5,17	1370	reverzibilna	MG
Neostigmin	0,1	0,8	pseudo-ireverzibilna	MG
Piridostigmin	40	16 000	pseudo-ireverzibilna	MG

2.5. Izazovi pri otkrivanju lijeka

2.5.1. Krvno-moždana barijera

Acetilkinolin, prirodni ligand za AChE, te lijekovi koji oponašaju njegovu kationsku strukturu suočavaju se s izazovom prelaska preko krvno-moždane barijere.⁴⁵ Krvno-moždana barijera je složena i vrlo učinkovita barijera koja pogoduje transportu lipofilnih spojeva, a s druge strane predstavlja prepreku nabijenim molekulama.⁴⁶ Zbog navedenih karakteristika, sužava se izbor za odabir ChE inhibitora koji bi se mogli koristiti u liječenju. Većina klinički odobrenih ChE inhibitora dovoljno je lipofilna da prođe krvno-moždanu barijeru. Polarniji ChE inhibitori, koji sadrže kvaterni dušik (piridostigmin i neostigmin), ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru te se koriste u liječenju MG selektivno djelujući na periferni živčani sustav.^{47,48}

2.5.2. Toksičnost i nuspojave

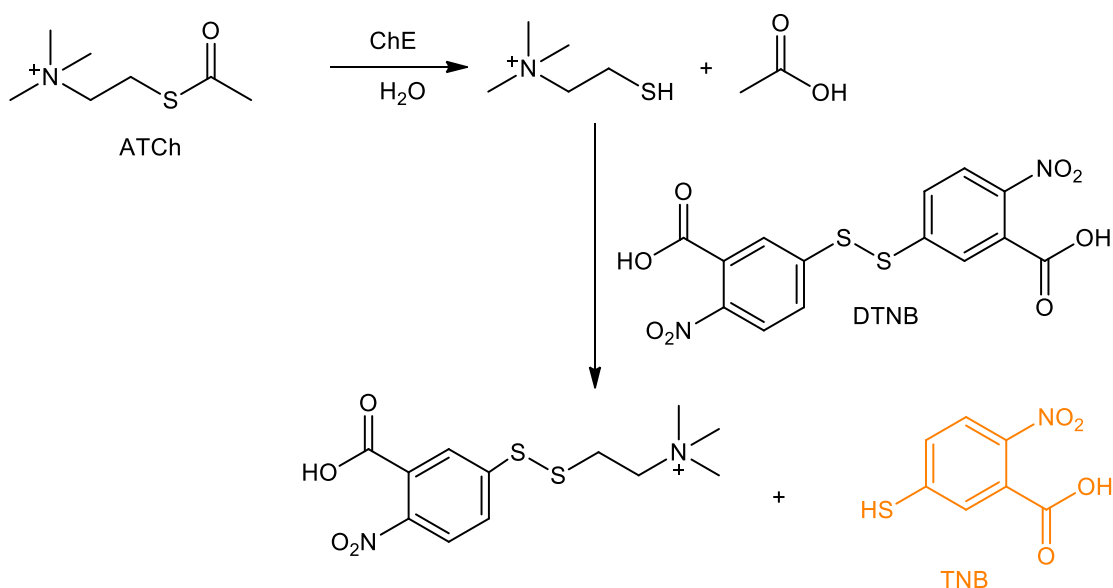
Fizostigmin i takrin primjeri su najranijih ChE inhibitora koji su odobreni u liječenju. Nažalost, pokazalo se da su oba lijeka neprikladna za sustavnu primjenu u liječenju AD. Glavni problemi proizlaze iz kratkog vremena poluraspada (u slučaju fizostigmina) i brojnih nuspojava, kao što su mučnina, povraćanje, dijareja, drhtanje i oštećenje jetre (posebno za takrin). Nažalost, većina korištenih ChE inhibitora izaziva slične nuspojave i probleme s toksičnošću.⁴⁵ Kako bi se smanjile nuspojave, razvijeni su transdermalni flasteri preko kojih se isporučuje rivastigmin.⁴⁶ Isto tako inhibitori koji djeluju na periferni živčani sustav također uzrokuju neželjene nuspojave te se istražuju tehnologije njihove inkapsulacije/kompleksiranja.⁴¹ Shodno tomu, za očekivati je da će se potencijalno novi ChE inhibitori, bilo sintetski ili prirodni, suočiti sa sličnim izazovima.

2.6. Prirodni inhibitori kolinesteraze izolirani iz morskih organizama

Prema dosadašnjim podacima FDA je za kliničku uporabu odobrila sedam spojeva, koji se koriste kao inhibitori ChE te su izolirani iz morskih organizama. Štoviše, približno polovica današnjih lijekova, koji se koriste kao inhibitori enzima, su prirodnog podrijetla ili je njihova struktura poslužila kao inspiracija za sintezu njihovih novih derivata u svrhu poboljšanja njihovih svojstava.⁴⁹

In vitro testovi omogućuju brzu identifikaciju spojeva te su od značajne koristi za razvoj novih lijekova. Ellman i suradnici su 1961. godine razvili pouzdanu i praktično lako primjenjivu kolorimetrijsku metodu za mjerenje aktivnosti ChE.

Prednost ove metode je ta da je vrlo osjetljiva, što znači da su za njenu provedbu potrebne vrlo male količine tkiva ili niske koncentracije enzima. Metoda se temelji na kemijskoj reakciji prikazanoj na slici 5. Kao supstrat u enzimskoj reakciji koristi se acetiltiokolin ATCh, analog prirodnog supstrata. Hidrolizom acetiltiokolina nastaju tiokolin i acetat iz čega slijedi da je brzina enzimске reakcije brzina nastajanja tiokolina hidrolizom. Nadalje, tiokolin reagira s tiolnim reagensom DTNB-om (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoat)) te nastaje žuto obojenje. Žuto obojenje proizlazi iz aniona 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB) čije nastajanje možemo pratiti mjerenjem apsorbancije pri 412 nm (apsorpcijski maksimum TNB). Reakcija s tiolnim reagensom je brža od enzimске hidrolitičke reakcije pa nije korak koji određuje brzinu reakcije.⁵⁰



Slika 5. Prikaz kemijske pozadine Ellmanove metoda

Inhibicijska aktivnost izražava se na nekoliko načina: na temelju IC_{50} vrijednosti i omjera inhibicije (%) pri određenoj koncentraciji uz korištenje odgovarajuće pozitivne kontrole. Spojevi koji pokazuju vrijednosti IC_{50} ispod $10\ \mu M$ klasificirani su kao "moćni", spojevi koji pokazuju vrijednosti IC_{50} u rasponu od 10 do $100\ \mu M$ klasificirani su kao "umjereni" inhibitori, dok su "slabi" inhibitori spojevi s vrijednostima IC_{50} većim od $100\ \mu M$.

Spomenuta Ellmanova metoda, zajedno s bogatom kemijskom raznolikošću, učinili su morski okoliš obećavajućim područjem za istraživanje novih, snažnih i selektivnih inhibitora ChE. Čest je slučaj da su snažni inhibitori, koji su identificirani u *in vitro* testovima, popraćeni lošim farmaceutskim svojstvima i izazivaju neželjene nuspojave. Tome se može doskočiti strukturnim modifikacijama kako bi se poboljšala njihova svojstva, a zadržala njihova osnovna biološka aktivnost. Jedan od takvih primjera je, skelet fisisostigmina biljnog podrijetla koji je poslužio za razvoj klinički korištenih inhibitora rivastigmina, neostigmina i piridostigmina. U nastavku slijedi potpuni pregled prijavljenih inhibitora ChE izoliranih iz morskih izvora.

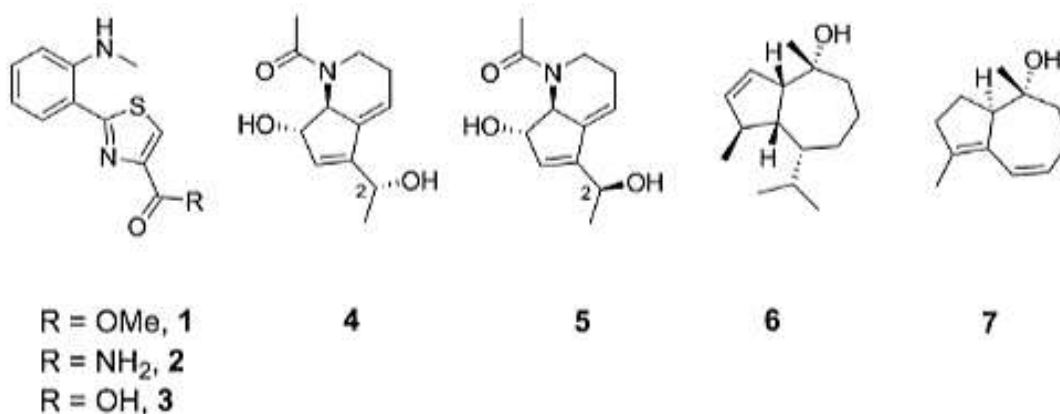
2.6.1. Inhibitori kolinesteraze iz mikroorganizama

Većina prirodnih spojeva bakterijskog podrijetla koji pokazuju inhibitornu aktivnost kolinesteraze izolirana je iz roda *Streptomyces*.

Jedni od njih su 2-feniltiazoli anitiaktini (**1–3**) dobiveni iz mulja kod otoka Jaebu u Južnoj Koreji, slika 6. Spojevi su pokazali sličnu inhibitornu aktivnost AChE (IC_{50} = 63, 53 i 68 μ M za **1–3**). Iz toga se dalo zaključiti da terminalne funkcionalne grupe (ester/amid/kiselina) ne utječe značajno na inhibiciju. Navedene spojeve neovisno su izolirali i Fu i MacMillan iz *Actinomycetospora sp.* iz uzoraka sedimenta močvare u Tongi.⁵¹

Iz istog roda bakterija dobivenog iz sedimenta obale otoka Hainan u Kini, 2017. godine, izolirana su dva nova alkaloida, streptazolin A i B (**4 i 5**), slika 6. Spoj **4** pokazao je umjerenu inhibitornu aktivnost AChE (IC_{50} = 50,6 μ M), dok je spoj **5**, koji se razlikuje samo po stereokemijskoj orijentaciji hidroksilne skupine na C-2, bio neaktivan.⁵²

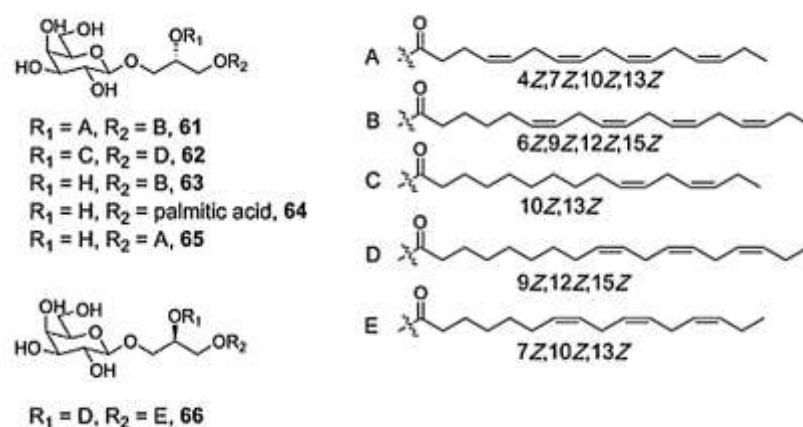
Nadalje, iz istog roda bakterija izoliranog iz kamenitog koralja *Diploria strigosa* u Južnom Kineskom moru dobiveni su spojevi seskviterpeni **6 i 7**, slika 6. Navedeni spojevi pokazali su omjere inhibicije od 82,90%, odnosno 80,17%, što je usporedivo s primijenjenim pozitivnim kontrolnim takrinom (89,72%).⁵³



Slika 6. Strukture inhibitora kolinesteraze iz mikroorganizama

2.6.2. Inhibitori kolinesteraze iz algi

Fang i suradnici su iz zelene alge *Capsosiphon fulvescens* (Korejska obala) izolirali spojeve koji bi se mogli koristiti kao potencijalni inhibitori AChE i BChE. Izolirano je šest glikolipida (61–66), slika 7. Spojevi s dva lipidna lanca pokazali bolju inhibiciju AChE **61**, **62**, **66** (IC_{50} = 53,13, 51,38, 50,90 μ M), od spojeva s jednim lipidnim lancem **63–65** (IC_{50} = 82,54, 82,83, 79,34 μ M). Zabilježena je smanjena inhibitorna aktivnost prema BChE (IC_{50} > 100 μ M).⁵⁴

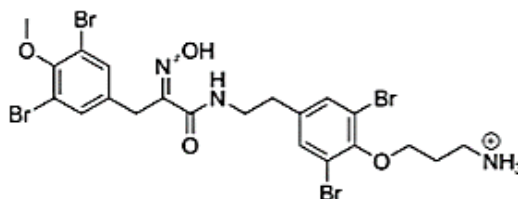


Slika 7. Glikoproteini izolirani iz algi korišteni kao inhibitori kolinesteraze

2.6.3. Inhibitori kolinesteraze iz spužvi

Budući da spužve sadrže velik broj simbiotskih i oportunističkih mikroorganizama, gotovo polovica, do sad izoliranih spojeva iz morskih organizama, izolirano je upravo iz njih. Određeni broj tih izoliranih inhibitora je halogeniran (većinom bromiran).

Jedan od primjera je Aplysamine-4 (113), slika 8., izvorno izoliran 1993. godine iz spužve *Psammaphysilla purpurea*. Kod spoja 113 izmjerena je snažnija inhibitorna aktivnost AChE prema kukcima (beskralježnjacima) K_i = 2 mM, u odnosu na kralježnjake, K_i = 16 mM. Baznom obrada spoja 113 nastaje slobodni bazni amin, te je K_i vrijednost u slučaju AChE kod kukaca (beskralježnjaka) iznosila 22 mM.⁵⁵



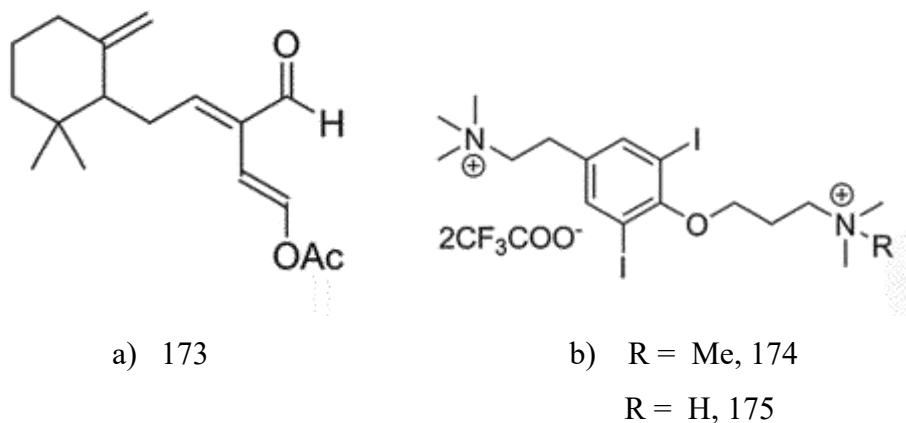
113

Slika 8. Struktura Aplysamina-4, inhibitora kolinesteraze izoliranog iz spužvi

2.6.4. Inhibitori kolinesteraze iz mekušaca

Spoj Onchidal (173), slika 9a, izoliran je iz morskog puža *Onchidella binneyi*, koji pripada skupini mekušaca bez ljuske te obitava na obalnim područjima Pacifika, Kalifornija.⁵⁶ Onchidal je dio obrambenog sustava puža koji se oslobađa iz sekretnih žlijezdi kada se životinja osjeća ugroženom. Utvrđeno je da ovaj spoj ireverzibilno inhibira AChE.⁵⁷ Unatoč relativno visokom K_d za početno stvaranje enzim-onchidnog kompleksa (300 mM), drugi ireverzibilni korak je dovoljno brz ($k_{inact} = 0.1 \text{ min}^{-1}$) za inhibiciju pri niskim koncentracijama. Budući da se nije činilo da je serin aktivnog mjesta bio meta acilacije (oksimski regeneratori nisu reaktivirali enzim), autori sugeriraju da bi α,β -nezasićeni aldehidni motiv 173, zajedno s aldehidom dobivenim iz hidrolize enol-estera, mogao biti odgovoran za kovalentnu inhibiciju.

Morski puž, *Turbo marmoratus*, cijenjen je u japanskoj kuhinji. Prije konzumacije, potrebno je ukloniti njegove otrovne iznutrice. Turbotoksin A i B (174 i 175), slika 9b, su prirodni spojevi izolirani iz ove vrste puža. Oba spoja su derivati diiodotiramina (dva atoma jod povezana tiraminskom jezgrom).⁵⁸ Iako su strukturno vrlo slični, razlikuju se po kemijskoj prirodi amino skupine na terminalnom položaju molekule. Oba spoja su pokazala akutnu toksičnost protiv miševa (vrijednosti LD₅₀ od 1,0 odnosno 4,0 mg kg⁻¹). Utvrđeno je da je 174 inhibitor AChE ($IC_{50} = 28 \text{ } \mu\text{M}$), a autori izvještavaju da početne neurofarmakološke studije sugeriraju da 174 ne ometa periferni živčani sustav.⁵⁹



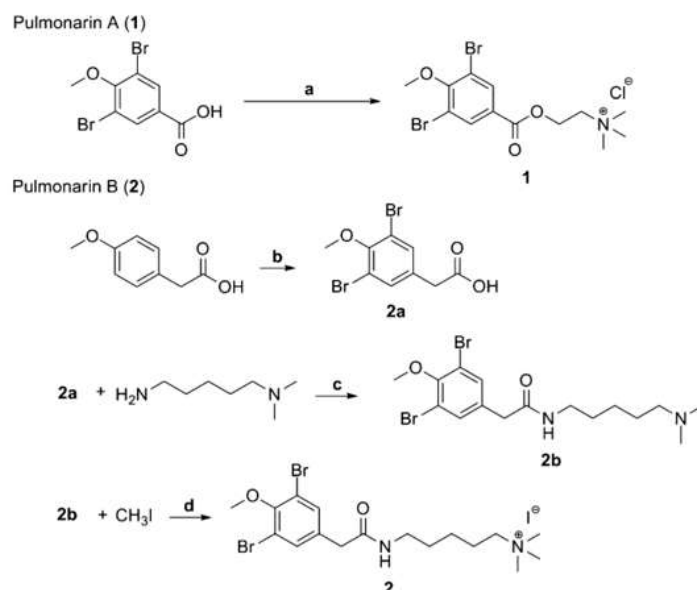
Slika 9. Strukture inhibitora kolinesteraze izoliranih iz mekušaca

2.6.5. Inhibitori kolinesteraze iz plaštenjka

Pulmonarini A i B izolirani su iz *Synoicum pulmonaria* (Norveška). Budući da je pročišćavanje dovelo do gubitka uzorka i nepotpunih NMR podataka spojeva, bila je potrebna totalna sinteza kako bi se stvorilo dovoljno materijala za strukturnu provjeru i biološko ispitivanje, slika 10.

Spoj 1 pripremljen je u jednom koraku. Dicikloheksilkarbodiimid (DCC) korišten je kao spojno sredstvo za reakciju 3,5-dibromo-4-metoksibenzojeve kiseline i kolin-klorida u prisutnosti katalitičke količine 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) u CH_2Cl_2 . Budući da je reakcija bila prilično spora, dovoljne količine spoja 1 mogle su se dobiti tek nakon produljenog vremena reakcije, nakon čega je spoj pročišćen HPLC-om.

Spoj 2 sintetiziran je u tri koraka iz 4-metoksifeniloctene kiseline. Spomenuta kiselina dibromirana je prvo s $\text{Br}_2/\text{FeBr}_3$ te je dobivena 3,5-(dibromo-4-metoksifenil)octena kiselina (2a). Spoj 2a je zatim spojen s 5-(dimetilamino)amilaminom koristeći 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluoro-fosfat (HBTU) kao spojno sredstvo za stvaranje 2-(3,5-dibromo-4-metoksifenil)-N-(5-(dimetilamino)pentil)-acetamida (2b). N-metilacijom 2b s CH_3I dovršena je sinteza 2.⁶⁰



^aReagents, conditions, isolated yield: (a) Choline chloride, DMAP, DCC, CH₂Cl₂, rt, 6 days, 4% (HPLC yield); (b) Br₂/FeBr₃, CHCl₃, rt, 48h, 21%; (c) HBTU, DIPEA, DMF, rt, 16 h, 57%; (d) K₂CO₃, CH₂Cl₂; 16 h, 13% (HPLC yield).

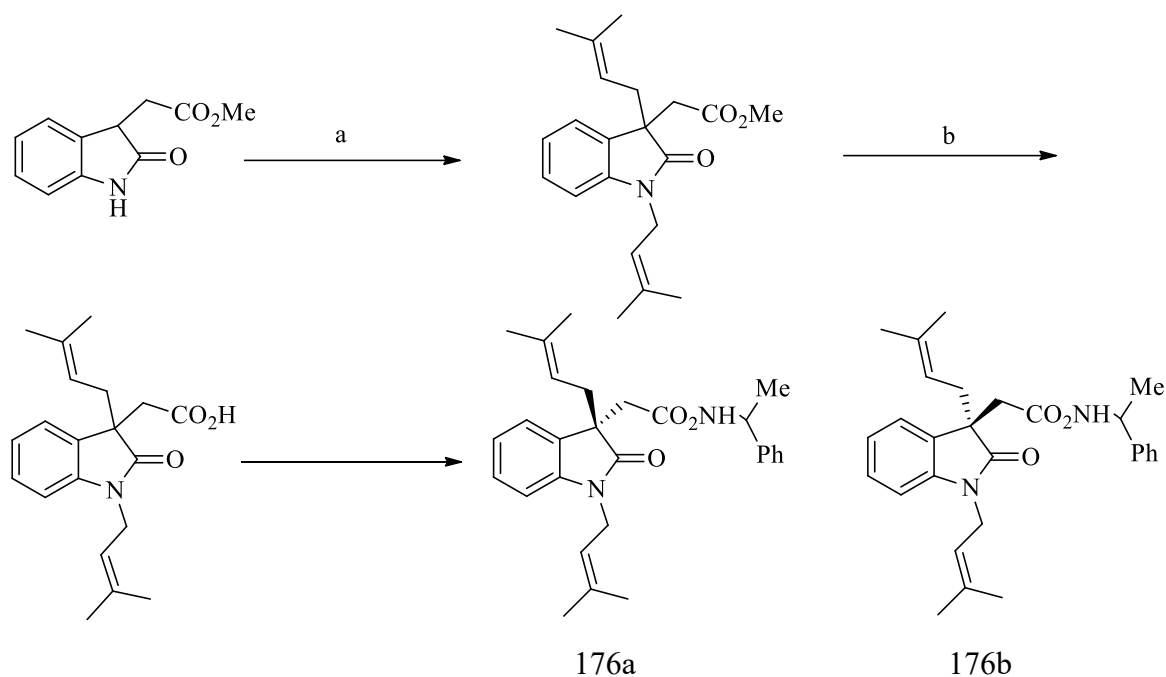
Slika 10. Prikazana je totalna sinteza Pulmonarini A i B

2.6.6. Inhibitori kolinesteraze iz morskih mahovina

Debromoflustramin B (176a), spoj čija struktura sadrži pirolidindolinsku jezgru na koju su vezane dvije prenilne skupine, pronađen je u mahovnjaku *Flustra foliacea*. Ovaj spoj u svojoj strukturi sadrži fizostigminom, snažni inhibitor kolinesteraze. Uz prirodni (-)-debromoflustramin B, Rivera-Becerril i suradnici, sintetizirali su i drugi enantiomer 176b, slika 11.

Racemični indolni alkaloid sintetiziran je iz metil 2-(2-okso-3-indolil)acetata u reakciji s prenil-bromidom u blagim uvjetima prijenosa faze te je dobiven odgovarajući diprenilirani 2-oksoindolin 3 u 76% iskorištenju. Hidrolizom esterske skupine nastala je 2-(1,3-diprenil-2-okso-3-indolil)octene kiseline 4 u 87% iskorištenju. Kako bi se razdvojili enantiomeri, provedena je reakcija karboksilne kiseline 4 s optički aktivnim aminom ((*S*)-1-feniletilamin).

Enantiomerima je određena inhibitorna aktivnost prema kolinesterazi. Prirodni (-)-enantiomer, inhibirao je ljudsku BChE (IC₅₀ = 1,37 μM) dok je (+)-enantiomer bio neaktivan.⁶¹



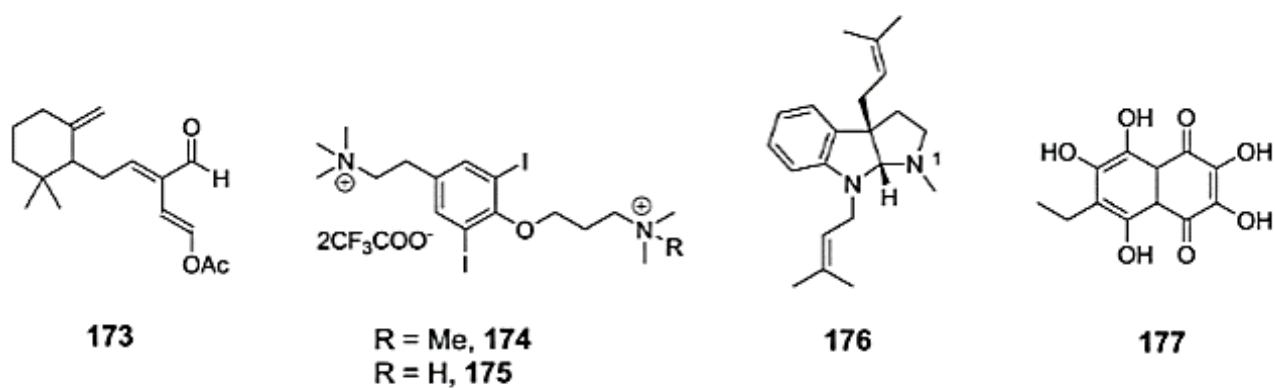
a = 15% aq NaOH/CH₂Cl₂, TBAHS, prenil-bromid, 5 °C, 5 h

b = 15% aq NaOH/MeOH, 40–50 °C, 1.5 h

Slika 11. Sinteza i razdvajanje enantiomera debromoflustramina B

2.6.7. Inhibitori kolinesteraze iz bodljikaša

Ehinokrom A (177) je polihidroksilirani naftokinonski pigment tamnocrvene boje, koji je izoliran iz morskog ježinca *Scaphechinus mirabilis*, slika 12. Spoj 177 sadrži motiv naftazarina (strukturni uzorak s 4 hidroksilne skupine na naftokinonskoj jezgri) omogućuje kelaciju metala i gasi slobodne radikale štiteći stanicu od oksidativnog stresa. Lee i suradnici otkrili su da 177 pokazuje umjerenu inhibitornu aktivnost AChE ($IC_{50} = 16,4 \text{ mM}$) na ireverzibilan, nekonkurentan način.⁶²



Slika 12. Prikaz struktura inhibitora kolinesteraza izoliranih iz bodljikaša

§ 3. ZAKLJUČAK

Prirodni inhibitori kolinesteraze izolirani iz morskih organizama predstavljaju izuzetno vrijedan izvor bioaktivnih spojeva s velikim potencijalom za primjenu u medicini i farmaciji. Zbog jedinstvenih kemijskih struktura i snažnog biološkog djelovanja, mnogi od tih spojeva pokazuju značajne inhibitorne učinke na enzime povezane s neurodegenerativnim poremećajima. Oceani i mora su ogromna prostranstva prepuna biološke raznolikosti, koja kriju još neistražene vrste, što ih čini neiscrpnim izvorom potencijalno korisnih prirodnih tvari. U budućnosti se očekuje da će upravo more, kao nedovoljno istražen izvor, igrati ključnu ulogu u razvoju novih generacija prirodnih inhibitora i inovativnih terapija.

U ovom pregledu istaknuti su neki od inhibitora kolinesteraze koji su izolirani iz morskog okoliša. Neke od klasa spojeva predstavljenih u trenutnom pregledu sadrže spojeve s inhibitornim aktivnostima usporedivim i superiornijim od trenutno odobrenih inhibitora kolinesteraze i mogu predstavljati strukturno raznolike, inspirativne skelete za sljedeću generaciju inhibitora kolinesteraze.

§ 4. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

acetyl-CoA – acetilkoenzim A

ACh – acetilkolin

AChE – acetilkolinesteraza

AChR – acetilkolinski receptor

ATCh – acetiltiokolin

AD – Alzheimerova bolest

BChE – butirilkolinesteraza

ChE – kolinesteraza

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)

MG – *miastenija gravis*

TNB – anion 2-nitro-5-merkaptobenzojeve kiseline

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. P. J. Houghton, Y. Ren, M. J. Howes, *Nat. Prod. Rep.* **23** (2006) 181–199.
2. R. Schliebs, T. Arendt, *Behav. Brain Res.* **221** (2011) 555–563.
3. T. H. Ferreira-Vieira, I. M. Guimaraes, F. R. Silva, F. M. Ribeiro, *Curr. Neuropharmacol.* **14** (2016) 101–115.
4. L. Anglister, J. R. Stiles, M. M. Salpetert, *Neuron* **12** (1994) 783–794.
5. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175–190.
6. I. Silman, J. L. Sussman, *Curr. Opin. Pharmacol.* **5** (2005) 293–302.
7. P. Anand, B. Singh, *Arch. Pharmacol Res.* **36** (2013) 375–399.
8. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **253** (1991) 872–879.
9. I. Silman, J. L. Sussman, *Chem.-Biol. Interact.* **175** (2008) 3–10.
10. H. M. Greenblatt, H. Dvir, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Mol. Neurosci.* **20** (2003) 369–383.
11. O. Lockridge, *Pharmacol. Ther.* **148** (2015) 34–46.
12. B. Li, J. A. Stribley, A. Ticu, W. Xie, L. M. Schopfer, P. Hammond, S. Brimijoin, S. H. Hinrichs, O. Lockridge, *J. Neurochem.* **75** (2000) 1320–1331.
13. A. Ordentlich, C. Kronman, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, D. Marcus, B. Velan, A. Shafferman, *FEBS Lett.* **334** (1993) 215–220.
14. A. Bosak, A. Ramić, T. Šmidlehner, T. Hrenar, I. Primožič, Z. Kovarik, *PLoS ONE* **13** (2018) 1–18.
15. Z.Y. Ha, S. Mathew, K.Y. Yeong, *Curr. Protein Pept. Sci.* **21** (2020) 99–109.
16. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, B. Velan, *Biochem. J.* **318** (1996) 833–840.
17. Z. Radić, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry* **32** (1993) 12074–12084.
18. Z. Radić, E. Reiner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* **39** (1991) 98–104.
19. W. Jagust, *Neuron* **77** (2013) 219–234.
20. T. Arendt, V. Bigl, *Neuroscience* **17** (1986) 277–279.
21. M. Bartolini, C. Bertucci, V. Cavrini, V. Andrisano, *Biochem. Pharmacol.* **65** (2003) 407–416.

22. P. Anand, B. Singh, *Arch. Pharmacol Res.* **36** (2013) 375–399.
23. D. Grob, N. Brunner, T. Namba, M. Pagala, *Muscle Nerve* **37** (2008) 141–149.
24. D. B. Drachman, *N. Engl. J. Med.* **330** (1994) 1797–1810.
25. W. Hoch, J. McConville, S. Helms, J. Newsom-Davis, A. Melms, A. Vincent, *Nat. Med.* **7** (2001) 365–368.
26. B. Ibach, E. Haen, *Curr. Pharm. Des.* **10** (2004) 231–251.
27. W. J. Deardorff, E. Feen, G. T. Grossberg, *Drugs Aging* **32** (2015) 537–547.
28. W. K. Summers, L. V. Majovski, G. M. Marsh, K. Tachiki, A. Kling, *N. Engl. J. Med.* **315** (1986) 1241–1245.
29. J. Patocka, D. Jun, K. Kuca, *Curr. Drug Metab.* **9** (2008) 332–335.
30. R. J. Polinsky, *Clin. Ther.* **20** (1998) 634–647.
31. M. Pohanka, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2014) 9809–9825.
32. D. G. Wilkinson, *Expert Opin. Pharmacother.* **1** (1999) 121–135.
33. S. Rogers and L. Friedhoff, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **46** (1998) 1–6.
34. S. Nochi, N. Asakawa, T. Sato, *Biol. Pharm. Bull.* **18** (1995) 1145–1147.
35. J. J. Sramek, E. J. Frackiewicz, N. R. Cutler, *Expert Opin. Invest. Drugs* **9** (2000) 2393–2402.
36. J. Marco-Contelles, M. do Carmo Carreiras, C. Rodríguez, M. Villarroya, A. G. García, *Chem. Rev.* **106** (2006) 116–133.
37. S. Lilienfeld, *CNS Drug Rev.* **8** (2002) 159–176.
38. Giacobini, *Pharmacol. Res.* **50** (2004) 433–440.
39. E. Caldwell, *CNS Drug Rev.* **80** (1995) 1168–1174.
40. S. M. Rupp, J. W. McChristian, R. D. Miller, J. A. Taboada, R. Cronnelly, *Anesthesiology* **64** (1986) 711–717.
41. V. P. Nair, J. M. Hunter, *BJA Education* **4** (2004) 164–168.
42. C. Pope, S. Karanth, J. Liu, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19** (2005) 433–446.
43. O. Soukup, M. Winder, U. Kumar Killi, V. Wsol, D. Jun, K. Kuca, G. Tobin, *Curr. Neuropharmacol.* **15** (2017) 637–653.
44. J. R. Atack, Q. S. Yu, T. T. Soncrant, A. Brossi, S. I. Rapoport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249** (1989) 194–202.
45. W. A. Banks, *BMC Neurol.* **9** (2009) 1–5.

46. E. Neuwelt, N. J. Abbott, L. Abrey, W. A. Banks, B. Blakley, T. Davis, B. Engelhardt, P. Grammas, M. Nedergaard, J. Nutt, *Lancet Neurol* **7** (2008) 84–96.
47. C. H. Sadowsky, J. L. Micca, G. T. Grossberg, D. M. Velting, *Prim. Care Companion CNS Disord.* **16** (2014) 5.
48. O. Sacan, P. F. White, B. Tufanogullari, K. Klein, *CNS Drug Rev.* **104** (2007) 569–574.
49. W. H. Gerwick, B. S. Moore, *Chem. Biol.* **19** (2012) 85–98.
50. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88–90.
51. H. Kim, I. Yang, R. S. Patil, S. Kang, J. Lee, H. Choi, M. S. Kim, S. J. Nam, H. Kang, J. *Nat. Prod.* **77** (2014) 2716–2719.
52. C. L. Yang, Y. S. Wang, C. L. Liu, Y. J. Zeng, P. Cheng, R. H. Jiao, S. X. Bao, H. Q. Huang, R. X. Tan, H. M. Ge, *Mar. Drugs* **15** (2017) 1–8.
53. C. L. Yang, Y. S. Wang, C. L. Liu, Y. J. Zeng, P. Cheng, R. H. Jiao, S. X. Bao, H. Q. Huang, R. X. Tan, H. M. Ge, *Mar. Drugs* **15** (2017) 1–8.
54. L. Wen, G. Chen, S. Zhang, T. You, F. Liu, Y. Fu, X. Yao, Z. Fang, S. Y. Jeong, H. A. Jung, J. S. Choi, B. S. Min, M. H. Woo, *Chem. Pharm. Bull.* **60** (2012) 1351–1358.
55. F. Pietra, P. Macek, T. Turk, *J. Nat. Toxins* **10** (2001) 181–191.
56. C. Ireland, D. J. Faulkner, *Bioorg. Chem.* **7** (1978) 125–131.
57. S. N. Abramson, Z. Radic, D. Manker, D. J. Faulkner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* **36**, (1989) 349–354.
58. M. M. Cadelis, B. R. Copp, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 2229–2235.
59. H. Kigoshi, K. Kanematsu, K. Yokota, D. Uemura, *Tetrahedron* **56** (2000) 9063–9070.
60. M. Tadesse, J. Svenson, K. Sepčić, L. Trembleau, M. Engqvist, J. H. Andersen, M. Jaspars, K. Stensvag I T. Haug, *J. Nat. Prod.*, **77** (2014) 364–369.
61. M. S. Morales-Ríos, E. Rivera-Becerril, P. Joseph-Nathan, *Tetrahedron: Asymmetry* **16** (2005) 2493–2499.
62. S. R. Lee, J. R. D. Pronto, B.-E. Sarankhuu, K. S. Ko, B. D. Rhee, N. Kim, N. P. Mishchenko, S. A. Fedoreyev, V. A. Stonik, J. Han, *Mar. Drugs* **12** (2014) 3560–3573.

