

## ZÁRÓJELENTÉS

a „Magyarországon előforduló Amaryllidaceae és Ranunculaceae fajok növénykémiai elemzése: biológiailag aktív alkaloidok izolálása, szerkezetfelderítése és farmakológiai vizsgálata” című **T038390** sz. OTKA pályázatról

### A kutatás célja:

A kutatási program keretében bioaktív természetes vegyületek megismerését célozva a Magyarországon fellelhető, natív és dísznövényként előforduló Amaryllidaceae és Ranunculaceae fajok növénykémiai, farmakológiai vizsgálatával foglalkoztunk. Kiemelt helyen az erős fiziológiai hatással rendelkező, szerkezetileg változatos alkaloidok izolálására, kémiai és farmakológiai jellemzésére törekedtünk tekintve, hogy ezeket a vegyületeket az elmúlt években kiemelt érdeklődés kísérte.

Az Amaryllidaceae fajokra családspecifikus, általában 15 szénatomos alapvázal rendelkező alkaloidok előfordulása jellemző. Erősen toxikus vegyületek mellett számos farmakológiailag kedvező hatású alkaloid ismert, ilyen például a galantamin (Nivalin®), melyet az Alzheimer-kór kezelésére ma gyógyszerként alkalmaznak. Ezen felül magas aktivitású antivirális, antitumor és analgetikus hatású vegyületeket is közöltek Amaryllidaceae fajokból, közülük néhány (pankratisztatin, narciklazin) gyógyszerfejlesztések ígéretes molekulája.<sup>1,2</sup>

Ugyancsak jelentős figyelem irányult a Ranunculaceae család Delphiniinae szubtribuszába tartozó *Aconitum*, *Delphinium* és *Consolida* nemzetség diterpénalkaloidjaira is, melyek erős fiziológiai hatása jórészt a feszültségfüggő Na<sup>+</sup>-csatornákra kifejtett, a vegyületek szerkezetétől függően aktiváló vagy gátló hatásnak tulajdonítható. Részben Na<sup>+</sup>-csatorna aktiváló, részben noradrenerg rendszert moduláló hatás következtében több vegyület *in vivo* antinociceptív, antiepileptikus hatást mutat.<sup>3,4,5</sup> Egy másik fontos farmakológiai hatás, mely ehhez az anyagcsoporthoz köthető, a nikotinos acetil-kolin receptoron (nAChR) jelentkezik az  $\alpha$ -bungarotoxin kötőhelyen, néhány vegyület esetén már nanomoláris koncentrációban. Ezek az anyagok új terápiás lehetőségeket nyithatnak az Alzheimer kór kezelésében, a legmagasabb aktivitású ilyen vegyület, a metil-likakonitin ma gyógyszerkutatások fontos vezérmolekulája.<sup>6</sup> Ismeretes néhány diterpénalkaloid GABA<sub>A</sub>-receptor antagonist, inszekticid, rovaratóplálkozás gátló és protozoon-ellenes aktivitása is.<sup>7,8,9</sup>

Munkacsoportunk Amaryllidaceae és Ranunculaceae fajok alkaloidjainak megismerésére törekedve a kutatási programot az alábbi lépésekben valósította meg:

1. Hazai Amaryllidaceae és Ranunculaceae fajok lelőhelyeinek felkutatása, a kísérletekhez szükséges növényi nyersanyag begyűjtése. Kivonatok előállítása, az alkaloidtartalom rétegekromatográfiás szűrővizsgálata, majd ez alapján a fajok kiválasztása preparatív feldolgozásra.
2. Alkaloidok preparatív előállítása különféle extrakciós és kromatográfiás módszerek alkalmazásával.
3. Az izolált anyagok szerkezetfelderítése spektroszkópiai módszerek felhasználásával.
4. A tisztított vegyületek farmakológiai tesztelése hazai és külföldi kooperációk keretében.

Az elért eredményeket a fenti felosztásban ismertetem.

## Elért eredmények:

### 1. *Amaryllidaceae* és *Ranunculaceae* fajok begyűjtése, szűrővizsgálata

Vizsgálatainkhoz három dísznövényként természetelt és egy natív *Amaryllidaceae* faj mintáit szereztünk be. A *Hymenocallis x festalis*, a *Sprekelia formosissima* és a *Lycoris squamigera* hagymáját szegedi dísznövény termesztőktől vásároltuk, a Magyarországon őshonos *Leucojum vernum* hagymáját, mely védett növényfaj, természetvédelmi megfontolásból szintén a dísznövény kereskedeleméből szereztük be (Spalax Kft., Ecser).

Vadon előforduló állományról gyűjtöttük a *Ranunculaceae* családba tartozó *Consolida orientalis*-t, és néhány hazai *Aconitum* fajt. A Bükki és a Balaton-felvidéki Nemzeti Park engedélyével gyűjtöttük a védett fajoként nyilvántartott *A. anthora*, *A. moldavicum*, *A. variegatum subsp. gracile* és az *A. vulparia* mintáit. További Kárpát-medencében endémikus *Aconitum* fajok lelőhelyeinek felkutatásában a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem munkacsoportja - Prof. Dr. Csedő Károly vezetésével - volt segítségünkre. A Görgényi Havasokból származott az *A. toxicum* és az *A. vulparia ssp. lasianthum* mintája, és a Déli-Kárpátok Retyezat hegységéből az *Aconitum firmum* gumója és herbája.

A begyűjtött növénymintákat rétegekromatográfias szűrővizsgálatoknak vetettük alá, ahol lehetőség volt külön-külön analizáltuk a növények egyes szerveit. Az elővizsgálatokhoz metanollal végeztünk kivonást, majd pH-grádiens extrakciót hajtottunk végre. Ez az eljárás az alkaloidok kinyerésén túl alkalmas volt a komponensek bázicitás szerinti elválasztására is. A kapott frakciókat TLC módszerrel vizsgáltuk szilikagél és alumínium-oxid szorbensen Dragendorff illetve Jód-platinát előhívóreagenst alkalmazva. A szűrővizsgálatok egy kivétellel – *A. moldavicum* – valamennyi növény esetén jelentős alkaloidtartalmat mutattak, minden esetben a föld alatti szervekben (hagyma, gumó, gyökér) magasabb volt az alkaloid-koncentráció, mint a föld feletti növényrészekben. Preparatív feldolgozás céljára a magas alkaloidtartalmú, nagyobb mennyiségben gyűjthető mintákat választottuk ki.

### 2. Alkaloidok preparatív előállítása

Az alkaloidokat a szűrővizsgálatokban is alkalmazott eljárással extraháltuk, azaz szobahőmérsékleten történő metanosos kivonás után különböző pH-értéken végeztünk folyadék-folyadék közti megosztást. Minden esetben a bázikus kémhatású (pH 9) kivonatból kloroformos kirázással nyert frakciókban dúsultak fel az alkaloidok, a *Consolida orientalis* és *Aconitum anthora* esetén egy további, összetételében különböző alkaloidfrakciót is nyertünk magasabb pH-értéken (pH 12) történő szerves oldószeres kirázással. Mindössze egy esetben (*A. toxicum* gyökérgumó) végeztünk neutrális körülmények között folyadék-folyadék közti megosztást, és nyertünk alkaloidokban gazdag, kevés ballasztanyagot tartalmazó frakciót.

Az alkaloidfrakció feldolgozására a modern elválasztástechnika különböző preparatív módszereit alkalmaztuk. A vegyületek kinyerésénél sikeresen alkalmaztuk a vákuum-folyadék kromatográfiát (VLC), a gélszűrést Sephadex LH-20 gélen valamint centrifugális rétegekromatográfiát (CPC) és preparatív rétegekromatográfiát (PLC) NP-szilikagélen és alumínium-oxidon. A HPLC technikát a vegyületek rossz detektálhatósága miatt nem tudtuk alkalmazni.

A VLC-hez és a CPC-hez különböző szelektivitású, grádiens mozgófázisokat, míg a PLC-hez és gélkromatográfiához izokratikus oldószerkelegyeket használtunk. Minden esetben soklépéses izolálási protokoll, különféle kromatográfias rendszerek és technikák kombinált felhasználása vezetett el a vegyületek tiszta formában történő izolálásához.

Munkánk eredményeként a *Sprekelia formosissima* (7), a *Hymenocallis x festalis* (6), a *Lycoris squamigera* (3), a *Leucojum vernum* (10), a *Consolida orientalis* (7), az *Aconitum*

*vulparia* (9), az *A. toxicum* (5) és az *A. anthora* (3) fajokból **összesen 50 komponenst**, azaz 43 különböző szerkezetű vegyületet izoláltunk.

### 3. Az izolált anyagok szerkezetfelderítése

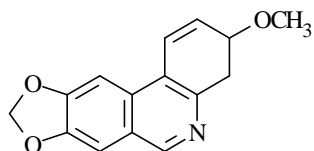
Az izolált anyagok szerkezet-felderítésénél spektroszkópai vizsgálatokat végeztünk. UV-, IR- és tömegspektroszkópiát valamint egy- és kétdimenziós NMR kísérleteket ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR, JMOD,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC, NOESY) alkalmaztunk. Néhány esetben a molekulák NMR spektroszkópia segítségével meghatározott oldatszerkezetét elméleti számítások eredményeivel hasonlítottuk össze. Vizsgálataink eredményeként meghatároztuk a vegyületek jellemzésére szolgáló  $[\alpha]_D$ , UV, MS és NMR adatokat, a vegyületek többségénél elkészítettük a teljes  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  asszignációt, kiegészítve, helyenként korrigálva ezzel a vegyületek korábban közölt irodalmi adatait. Néhány alkaloiddal (tazettin, hemantamin, takaózamin és gigaktonin) modellkísérleteket végeztünk (1D-DPFGSE-COSY, 1D-DPFGSE-TOCSY, 1D-DPFGSE-NOESY, HSQMBC, HSQC-TOCSY, HETLOC,  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQMBC,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE) új NMR technikák alkalmazhatóságának demonstrálására.

Az Amaryllidaceae fajokból 26 vegyületet, a Ranunculaceae fajokból pedig 24 komponenst, tehát összesen 50 alkaloidot azonosítottunk. Ezek közül 7 komponens, a 3-metoxi-8,9-metiléndioxi-3,4-dihydrofenantrén, leukovernin, acetyl-leukovernin, 18-*O*-dezmethyl-pubeszcenin, akovulparin, 14-dezmethyl-szeptentriodin és az akotoxicin új vegyületnek bizonyult, melyet munkánkat megelőzően még sem természetes, sem szintetikus anyagként nem közöltek. Néhány izolált komponens igen ritka előfordulása, így mindössze néhány fajból közöltek korábban  $\text{C}_{18}$  biszorditerpénalkaloidokat (pl. 14-*O*-dezmethyl-tuguakonitin) vagy *N*-szubsztituált-antranoilésztercsoportot tartalmazó norditerpéneket (14-dezmethyl-szeptentriodin, szeptentriodin, finetiadin). Az izolált alkaloidok többségét az adott növényfajból elsőként írtuk le, azaz elsőként vizsgáltuk a *Hymenocallis x festalis*, *Lycoris squamigera*, *Leucojum vernum* és az *Aconitum toxicum* alkaloidkomponenseit. A *Sprekelia formosissima*-ból a hemantamin, hemantidin, tazettin és az izmin, a *Consolida orientalis*-ből a gigaktonin, delkozin és takaózamin, az *Aconitum anthora*-ból az izotalatizidin és az *A. vulparia*-ból a likoktonin korábban már ismert volt.

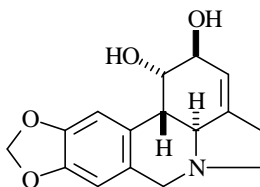
Az egyes növényfajokból nyert vegyületek a következők:

#### AMARYLLIDACEAE ALKALOIDOK

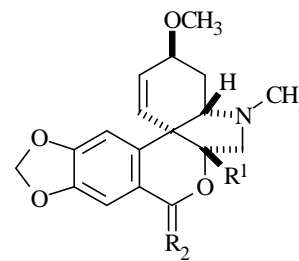
##### *Hymenocallis x festalis*



3-metoxi-8,9-metiléndioxi-3,4-dihydrofenantrén\*

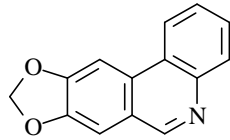


likorin

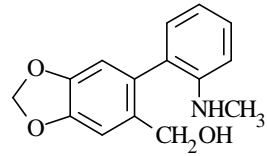


tazettin  
3-epimakronin

R	R <sup>1</sup>
H <sub>2</sub>	OH
O	H

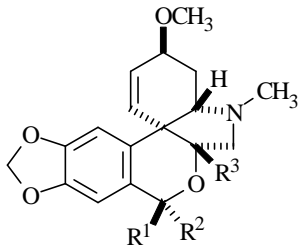


triszferidin

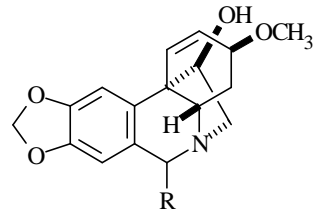


izmin

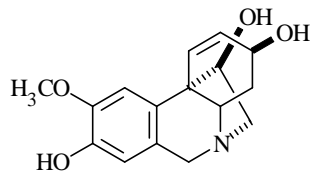
*Sprekelia formosissima*



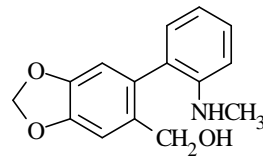
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
tazettin	H	H	OH
pretazettin	OH	H	H
3-epimakronin	=O		H



	R
hemantamin	H
hemantidin	OH

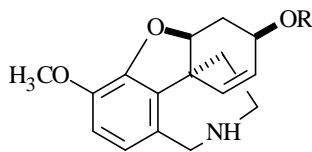


8-O-dezmetil-maritidin

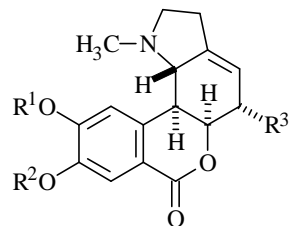


izmin

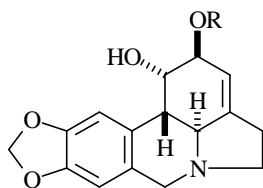
*Leucojum vernum*



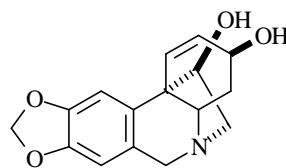
	R
N-dezmetil-galantamin	H
leuovernin*	COCH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>3</sub>
acetyl-leuovernin*	COCH <sub>2</sub> -CH(OAc)-CH <sub>3</sub>



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
homolikorin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
hippeasztrin		-OCH <sub>2</sub> O-	OH
5α-hidroxi-homolikorin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
9-O-dezmetil-homolikorin	CH <sub>3</sub>	H	H

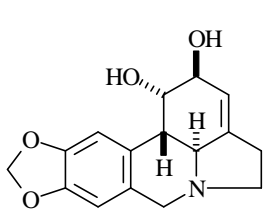


	R
likorin	H
2-O-acetyl-likorin	Ac

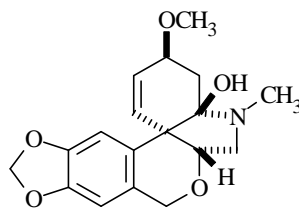


11-hidroxi-vittatin

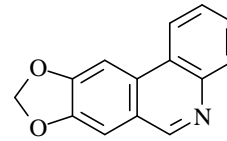
*Lycoris squamigera*



likorin



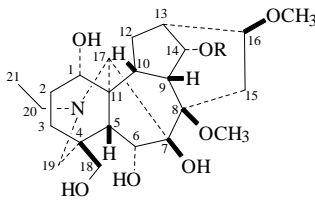
littoralin



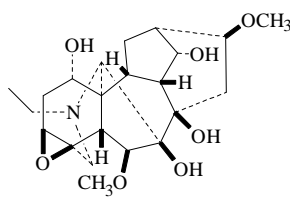
triszferidin

**RANUNCULACEAE ALKALOIDOK**

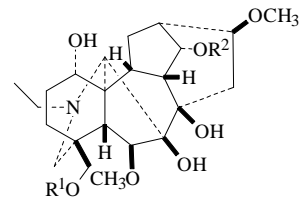
*Consolida orientalis*



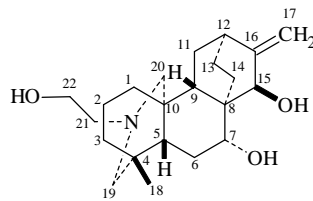
18-*O*-dezmetil-pubeszcenin\* R  
 18-*O*-dezmetil-14-*O*-dezacetil- pubeszcenin H



14-*O*-dezmetil-tuguakonitin

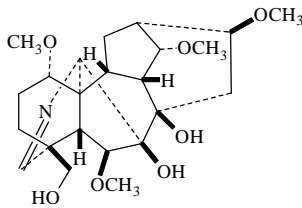


takaózamin R<sup>1</sup> R<sup>2</sup>  
 gigakonin H H  
 delkozin CH<sub>3</sub> H

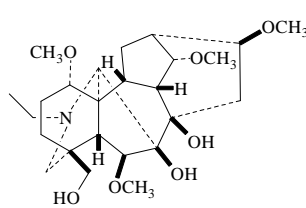


dihidroajakonin

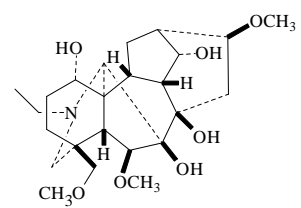
*Aconitum vulparia*



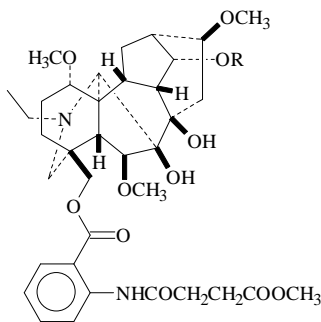
akovulparin\*



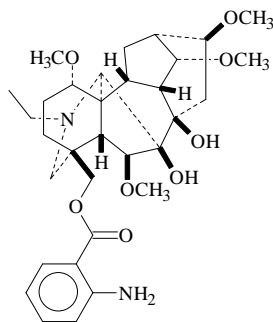
likoktonin



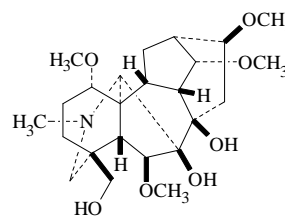
delkozin



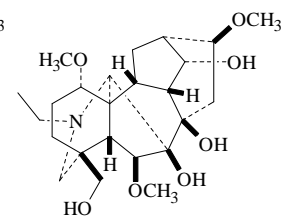
14-dezmetil-szeptentriodin\* R  
 szeptentriodin H  
 finetiadin CH<sub>3</sub>  
 COCH<sub>3</sub>



antranoil-likoktonin

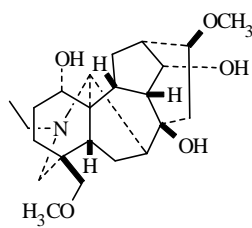


*N*-methyl-*N*-dezetil-likoktonin

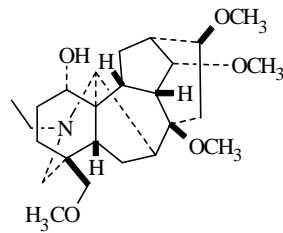


delektinin

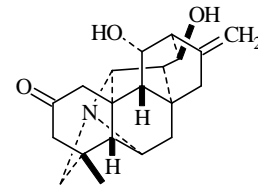
### *Aconitum anthora*



izotalatizidin

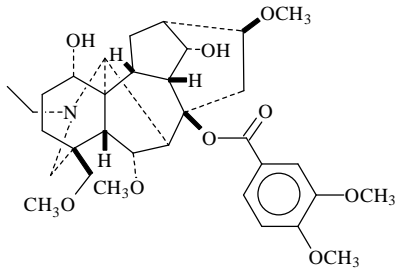


izotalatizidin-8,14-dimetiléter

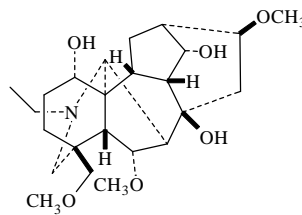


hetizinon

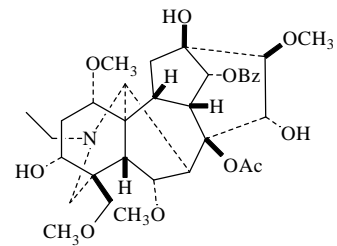
### *Aconitum toxicum*



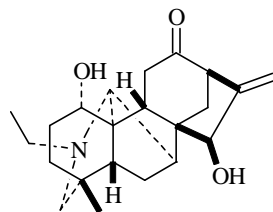
akotoxicin\*



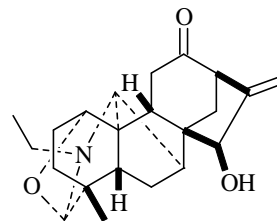
neolin



akonitin



szongorin



szongoramin

## 4. Az izolált vegyületek farmakológiai vizsgálata

### AMARYLLIDACEAE ALKALOIDOK

Az izolált Amaryllidaceae alkaloidok biológiai aktivitását hazai és külföldi kollaborációk keretében tanulmányoztuk. Vizsgáltuk az alkaloidok antiretovirális aktivitását valamint antiproliferatív hatását szenzitív és gyógyszer-rezisztens tumorsejteken.

#### *Citotoxikus aktivitás*

A bécsi (T. Thalhammer) és a manchesteri egyetem munkatársaival (D. Sharples) kollaborációban vizsgáltuk a tazettin, likorin, hemantidin és hemantamin antiproliferatív és multidrog rezisztencia csökkentő hatását L5178 egér limfóma sejteken. A likorin, hemantidin és hemantamin kifejezett sejtnövekedés gátlást mutatott mind gyógyszerrezisztens mind gyógyszer-szenzitív sejteken, ugyanakkor a vegyületek szignifikánsan nem gátolták a rezisztenciáért felelős mdr-1 P-glikoproteint. Az antiproliferatív aktivitás mechanizmusa után kutatva vizsgáltuk az alkaloidok interakcióját nukleinsavakkal és azt találtuk, hogy a vegyületek nem lépnek kölcsönhatásba a DNS-sel, ellenben a *Saccharomyces tRNS*-sel komplexet képeznek. Az antiproliferatív hatás tehát a *tRNS*-sel történő interakció eredményeként jön létre.

\* Új természetes vegyület

Az SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetével kooperációban három humán tumor (HeLa, MCF7 és A431) sejtvonalon vizsgáltuk az Amaryllidaceae alkaloidok citotoxikus hatását MTT teszt alkalmazásával (**1. Táblázat**). Megállapítottuk, hogy a likorin, hemantamin, hemantidin és a pretazettin jelentősen csökkentik a tumorsejtek szaporodását, hatásuk a pozitív kontrol ciszplatinét meghaladó mértékű. A legmagasabb aktivitások az A431 bőrkarcinóma sejteken jelentkeznek.

**1. Táblázat.** Amaryllidaceae alkaloidok citotoxikus aktivitása

Vegyület	EC <sub>50</sub> (μM)		
	HeLa	MCF7	A431
Izmin	>100	>100	NT
Hemantidin	4.455	8.236	3.091
Haemantamin	2.518	3.477	1.707
Tazettin	>100	-	-
Likorin	2.782	3.619	1.395
Homolikorin	>100	-	-
2- <i>O</i> -Acetil-likorin	>30	19.83	14.05
Triszferidin	24.09	21.13	>30
Pretazettin	8.853	7.869	5.373
8- <i>O</i> -Dezmetilmaritidin	>30	-	-
Doxorubicin	0.154	0.279	0.149
Cisplatin	12.43	9.630	2.835

#### *HIV-1 replikációt gátló aktivitás*

A Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Mikrobiológiai Kutatócsoportja dr. Minárovits János vezetésével vizsgálta az izolált Amaryllidaceae alkaloidok HIV-1 vírus ellenes hatását P24 antigén teszt alkalmazásával valamint reverz transzkriptáz és HIV-1 proteáz enzimaktivitás mérésével (**2. Táblázat**).

Az első kísérletben a likorin, homolikorin, triszferidin, hemantamin, hemantidin, tazettin, és 3-epimakronin *in vitro* HIV-1 replikációt gátló hatását vizsgálták MT4 sejteken. Az alkaloidok citotoxikus aktivitását két módszerrel, [<sup>3</sup>H]timidin és MTT-teszten határozták meg. Ezt követően vizsgálták a nem toxikus dózistartományban a vegyületek vírusgátló aktivitást p24 antigén teszten és reverz transzkriptáz módszerrel. A likorin, homolikorin, triszferidin és hemantamin magas HIV-1 replikációt gátló aktivitást mutatott, míg a hemantidin, tazettin és 3-epimakronin inaktív volt. Az aktivitás mértéke egyes esetekben megközelítette a pozitív kontroll AZT hatását, de a terápiás index értékek vegyületeink esetén kedvezőtlenül alacsonyak voltak. A hatásmechanizmus után kutatva megállapították, hogy az alkaloidok sem a HIV sem az AMV reverz transzkriptázra direkt hatást nem fejtenek ki.

2004-ben a 2-*O*-acetyl-likorin, az *N*-dezmetil-galantamin és a 11-hidroxi-vittatin tesztelésére került sor. A legmagasabb HIV-1 replikációt gátló aktivitást a 2-*O*-acetyl-likorin mutatta reverz transzkriptáz módszerrel mérve, ám a hatás mértéke nem érte el az acetylcsoporthoz tartozó likorinét. A szelektivitási index értékek sajnos itt is igen alacsonyak adódtak.

2005-ben a likorin, triszferidin, 2-*O*-acetyl-likorin, *N*-dezmetil-galantamin és a hemantamin HIV-1 proteáz gátló aktivitásának mérésére került sor. A vizsgálatokban rekombináns HIV-1 proteázt és fluorogén csoporttal jelölt szubsztrátot használtak. A kísérlet során pozitív kontrollként acetyl-pepszatint alkalmaztak. A vizsgált alkaloidok közül a

legnagyobb gátlást a triszferidin esetén mérték, ezt követte a likorin és a 2-*O*-acetil-likorin, míg a hemantamin és a *N*-dezmetil-galantamin nem mutatott enzim-gátlást.

## 2. Táblázat Az izolált Amaryllidaceae alkaloidok antiretrovirális aktivitása

Alkaloid	TC <sub>50</sub> μg/ml*	ID <sub>50</sub> μg/ml <sup>+</sup>	ID <sub>50</sub> μg/ml <sup>#</sup>	TI <sub>50</sub> μg/ml	K <sub>m</sub> <sup>±</sup> mol/l	V <sub>max</sub> <sup>±</sup> mol/l*min
Likorin	0.75	0.4	0.4	1.9	2.58x10 <sup>-5</sup>	2.22x10 <sup>-6</sup>
Homolikorin	12.8	7.3 <sup>§</sup>	-	1.8	-	-
Triszferidin	7.50	5.0	5.0	1.5	5.13x10 <sup>-6</sup>	7.84x10 <sup>-6</sup>
Hemantamin	1.00	0.8	-	1.3	inaktív	inaktív
Hemanthidin	1.00	inaktív	-	-	-	-
3-Epimakronin	7.50	inaktív	-	-	-	-
Tazettin	7.50	inaktív	-	-	-	-
2- <i>O</i> -Acetil-likorin	6.00	-	6.00	1.0	1.36x10 <sup>-4</sup>	3.99x10 <sup>-6</sup>
<i>N</i> -Dezmetil-galantamin	43.0	-	inaktív	-	inaktív	inaktív
11-Hidroxi-vittatin	12.0	-	8.0	1.5	-	-
Acetil-pepszatin	-	-	-	-	3.55x10 <sup>-6</sup>	2.47x10 <sup>-6</sup>

\*TC<sub>50</sub> meghatározása MTT és [<sup>3</sup>H]timidin módszerrel történt. <sup>+</sup>ID<sub>50</sub> meghatározása p24 antigen teszten történt. <sup>#</sup>ID<sub>50</sub> meghatározása RT teszten történt. <sup>§</sup>ID<sub>50</sub> meghatározása MTT teszten történt. <sup>±</sup>HIV-1 proteáz gátlás mért értékei

### RANUNCULACEAE ALKALOIDOK

Irodalmi adatok szerint a diterpénalkaloidok elsősorban a Na<sup>+</sup>-csatornára gyakorolt hatásuknak köszönhetően jelentenek ígéretes anyagcsoportot. A korábbi biokémiai, elektrofiziológia vizsgálatok mindössze néhány vegyületre irányultak és azt mutatták, hogy a molekulaszereztől függően jelentősen különböző aktivitások (agonista, antagonist) lehetnek. Az általunk nyert, korábban még nem vizsgált vegyületek tanulmányozását tehát ígéretesnek tartjuk, ezért közös kutatásokat indítottunk a Pécsi Tudományegyetem Kísérletes Állattani és Neurobiológiai Tanszékével (PTE TTK, Biológia Intézet), dr. Hernádi István munkacsoportjával. A diterpénalkaloidok közvetlen idegrendszeri hatásának *in vivo* elektrofiziológiai és neurokémiai vizsgálata ez év februárjában kezdődött meg patkányokon, kísérletes adatok még nem állnak rendelkezésre.

### Irodalom:

- Gabrielsen, B., Monath, T. P., Huggins, J. W., Kefauver, D. F., Pettit, G. R., Groszek, G., Hollingshead, M., Kirsi, J. J., Shannon, W. M., Schubert, N. M., Dare, J., Ugarkar, B., Ussery, M. A., Phelan, M. J. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1569-81 (1992)
- Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Kaya, G. I., Unver, N., Kivcak, B., Ozsoz, M. *J. Pharmaceut. Biomed.* **33**, 295 (2003)
- Friese, J., Gleitz, J., Gutser, U. T., Heubach, J. F., Matthiesen, T., Wilffert, B., Selve, N. *Eur. J. Pharmacol.* **337**, 165-174 (1997)
- Seitz, U., Ameri, A. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 883-888 (1998)
- Ameri, A., Simmet, T. *Eur. J. Pharmacol.* **386**, 187-194 (1999)
- Hardick, D. J., Blagbrough, I. S., Cooper, G., Potter, B. V., Critchley, T., Wonnacott, S. *J. Med. Chem.* **39**, 4860-4866 (1996)
- Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Medinaveitia, A., Guadano, A., Santana, O., Martinez-Diaz, R., Ruiz-Mesia, L., Alva, A., Grandez, M., Diaz, R., Gavin, J. A., de la Fuente, G. *J. Chem. Ecol.* **30**, 1393-1408 (2004)



- 
- <sup>8</sup> Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Guadano, A., Martinez-Diaz, R., Diaz, J. G., Garcia-Rodriguez, J., Alva, A., Grandez, M. *Chem. Biodivers.* **1**, 1327-1335 (2004)
- <sup>9</sup> Gonzalez, P., Marin, C., Rodriguez-Gonzalez, I., Hitos, A. B., Rosales, M. J., Reina, M., Diaz, J. G., Gonzalez-Coloma, A., Sanchez-Moreno, M. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 136-141 (2005)