
Universita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Syntéza, studium a porovnání struktury a účinku
protizánětlivých léčiv na bázi leukotrienů**

disertační práce

studijní program: farmacie
studijní obor: farmaceutická chemie

školitel: doc. RNDr. Jiří Hartl, CSc.
školitel specialista: Ing. Miroslav Kuchař, DrSc.

Praha 2007

Mgr. Richard Junek

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Hartlovi, CSc. za jeho odborné vedení, rovněž tak svému školiteli Ing. Miroslavovi Kuchařovi, DrSc. za neskutečnou trpělivost a ochotu při přípravě této práce. Děkuji také všem kolegům z oddělení VTEI v bývalém VÚFB a.s., zejména panu Petru Hrubému za pomoc při syntetických začátcích, paní Ing. Kateřině Schneiderové, CSc. a paní RNDr. Jindře Mácové za neocenitelnou pomoc při shánění veškerých literárních zdrojů a v neposlední řadě Dr. Ing. Luďkovi Ridvanovi a Ing. Robertovi Rödlingovi za tu spoustu užitečných rad.

Děkuji také Ing. Ivě Obadalové za změření a panu Ing. Jaroslavu Havlíčkovi, CSc. za pomoc při interpretaci všech NMR spekter, panu RNDr. Vladislavovi Kubelkovi, CSc. za změření MS spekter, kolektivu pracovníků centrálních laboratoří v oddělení elementární analýz na VŠCHT Praha za změření všech elementárních analýz a Ing. Ivetě Kloučkové za všechna HPLC měření.

Mé poděkování patří také kolektivu pracovníků laboratoří RE&D VÚFB s.r.o. pod vedením pana RNDr. Antonína Jandery, CSc. a paní RNDr. Vladimíry Panajotové, PhD za zhodnocení antileukotrienových a protizánětlivých aktivit připravených substancí, a také panu MUDr. Miloslavovi Kverkovi a paní prof. MUDr. Heleně Tlaskalové, DrSc. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR za zhodnocení aktivit připravených látek v modelu ulcerativní kolitidy.

Sluší se poděkovat také Ing. Josefu Jirmanovi CSc. za shovívavost při dokončování této práce v mém nynějším zaměstnání. Velké dík patří i mé rodině za trpělivost a neutuchající podporu.

Děkuji také všem ostatním z bývalého VÚFB a.s. a nynější Zentiva a.s. za podporu, pomoc a vytvoření adekvátního prostředí pro výzkum.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu č. LN00B125 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Obsah

Seznam zkratk	4
1 Úvod	6
1.1 Úloha leukotrienů v zánětlivém procesu	6
1.1.1 Úloha leukotrienů v astmatu	11
1.1.2 Úloha leukotrienů v revmatoidní artritidě	13
1.1.3 Úloha leukotrienů v psoriáze	14
1.1.4 Úloha leukotrienů u idiopatických zánětů střev	14
1.2 Terapeutické možnosti antileukotrienik	17
1.2.1 Antagonisté na receptorech	18
1.2.2 Inhibice enzymů	19
1.3 Terapie astmatu	22
1.3.1 Antagonisté na leukotrienových receptorech	22
1.3.2 Inhibitory 5-lipoxygenázy	23
1.4 Terapie idiopatických zánětlivých střevních chorob	24
2 Cíl práce	34
3 Experimentální část	35
3.1 Syntéza látek	35
3.1.1 Vlastní provedení syntézy	37
3.1.2 Syntetické postupy	38
3.2 Biologické hodnocení	41
3.3 Hodnocení lipofility	43
3.4 Analýza kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou	43
4 Diskuse	44
4.1 Hodnocení biologické aktivity	44
4.2 QSAR analýza	47
4.2.1 Hodnocení lipofility	47
4.2.2 Regresní analýza antileukotrienových aktivit	48
5 Závěry	51
6 Souhrn	53
7 Summery	54
8 Seznam publikovaných prací	55
9 Literatura	57

Seznam zkratek

5-ASA	5-aminosalicylová kyselina
5-HPETE	5-hydroxyperoxyeikosatetraenová kyselina
5-LO	5-lipoxygenáza
15-LO	15-lipoxygenáza
BAL	bronchoalveolární laváž
BLT ₁	leukotrienový receptor 1
BLT ₂	leukotrienový receptor 2
CD	Crohnova choroba
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
COX	cyklooxygenáza
CysLT ₁	cysteinylleukotrienový receptor 1
CysLT ₂	cysteinylleukotrienový receptor 2
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAR	brzká astmatická reakce na antigen
ERK	extracelulární signál regulující kináza
FEV1	usilovný expirační objem za 1 sekundu
FLAP	5-lipoxygenázu aktivující protein
IBD	idiopatické záněty střeva
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula 1
ICE	interleukin 1 konvertující enzym = kaspáza 1
IL-1	interleukin 1
IL-1 β	interleukin 1-beta
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
I κ B	inhibitor NF- κ B
LAR	pozdní astmatická reakce na antigen
LT	leukotrieny
LTA ₄	leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotrien B ₄
LTC ₄	leukotrien C ₄
LTD ₄	leukotrien D ₄
LTE ₄	leukotrien E ₄
MAPk	mitogeny aktivovaná protein kináza
MMP	matrix metaloproteinázy
NF- κ B	jaderný faktor kappa-B
NIK	NF- κ B indukovaná kináza
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
PAF	faktor aktivující destičky
PEFR	vrchol výdechové průtokové rychlosti
PG	prostaglandiny
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	prostaglandin F _{2α}
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PLA ₂	fosfolipáza A2

PGI ₂	prostacyklin
PPAR α	proliferátory peroxizómů aktivovaný receptor α
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
SD	směrodatná odchylka
SRS-A	pomalou regující substance anafylaxe
TACE	TNF-alfa konvertující enzym
TM	transmembránové domény
TMS	tetramethylsilan
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
TX	tromboxany
TXA ₂	tromboxan A ₂
UC	ulcerativní kolitida
VCAM-1	vaskulární buněčná adhezní molekula 1

1 Úvod

1.1 Úloha leukotrienů v zánětlivém procesu

Různé produkty odvozené z metabolismu arachidonové kyseliny nejsou biochemicky nebo strukturálně příbuzné klasickým glykoproteinovým cytokinům, které jsou produkovány buňkami imunitního systému. Nicméně obě skupiny sdílejí důležité imunoregulatorní a prozánětlivé vlastnosti a společně se podílí na střevní zánětlivé reakci u ulcerativní kolitidy (UC – ulcerative colitis) a Crohnovy choroby (CD – Crohn's disease). A tak metabolity arachidonové kyseliny hrají důležitou roli úzce související s patogenezí idiopatických střevních zánětů (IBD – inflammatory bowel disease)¹.

Arachidonová kyselina je 20-uhlíkatá nenasycená mastná kyselina se čtyřmi dvojnými vazbami a je běžnou součástí fosfolipidů v buněčné membráně. Jako odpověď na určitý stimul se volná arachidonová kyselina odštěpí z buněčné membrány působením enzymů fosfolipáz. Většina buněčných dějů, které končí uvolněním arachidonové kyseliny, začíná navázáním ligandů na receptory plazmatické membrány. Vazba ligandu na receptor vede ke G-proteinem zprostředkované signální transdukci s mobilizací vápníku a aktivací fosfolipázy². Prvotní cestou uvolnění kyseliny arachidonové je aktivace fosfolipázy A₂ (PLA₂), která umí štěpit mastné kyseliny z sn-2 pozice mnoha fosfolipidů. Je mnoho fosfolipáz A₂, každá specifická pro různé substráty. Existuje tedy i jedna cytosolická PLA₂, která je selektivní pro fosfolipidy obsahující arachidonát³. Alternativní cesta pro uvolnění kyseliny arachidonové využívá fosfolipázu C, která odštěpí z membránového fosfolipidu diacylglycerol, z něž je arachidonát uvolněn působením diacylglycerol lipázy. Produkty metabolismu kyseliny arachidonové se obecně nazývají eikosanoidy.

Ikosanoidy se hojně vyskytují v lidském střevě. Mezi jejich biologické účinky patří vedle regulace střevní pasáže, transportu iontů a průtoku krve mukózou i tlášení zánětlivé odpovědi při různých chorobných stavech. Výraz „eikosanoid“ má svůj původ v řeckém slově *eicosa*, znamenající dvacet, a zahrnuje množství produktů, které vznikají rozpadem membránového fosfolipidu na arachidonovou kyselinu a následnou produkcí bioaktivních látek^{4,5,6,7}. Mezi ty nejdůležitější patří prostaglandiny

(PG), tromboxany (TX) a leukotrieny (LT). Všechny výše jmenované lipidické mediátory působí přes specifické plasmatické membránové receptory. Teoreticky se může účinek konkrétního eikosanoidu lišit pro různé buňky v závislosti na aktivaci přítomného receptoru a použité signální transdukční cesty^{4,7}.

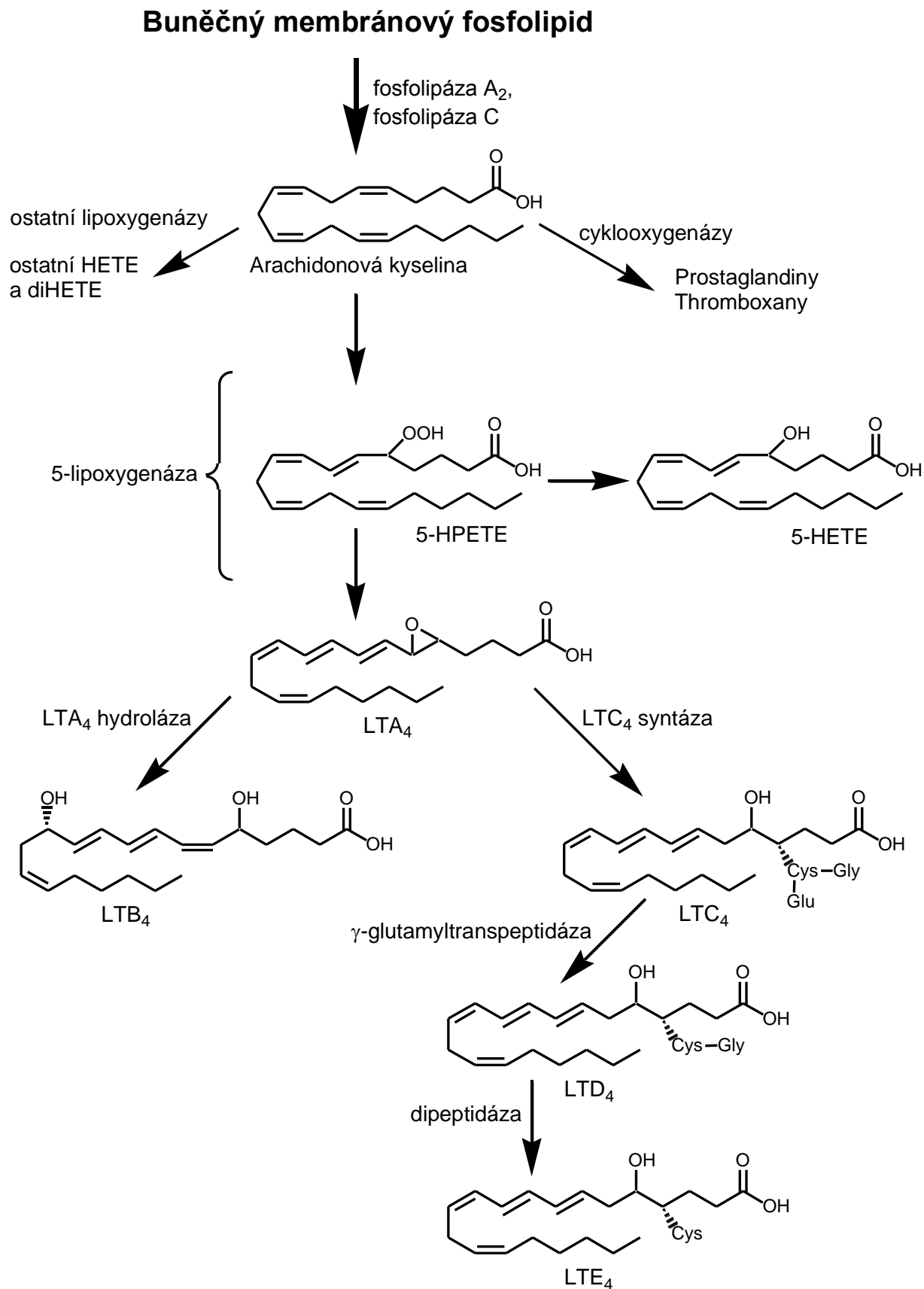
Jakmile je arachidonová kyselina uvolněna z buněčné membrány, může být metabolizována cyklooxygenázovou metabolickou cestou a nebo jednou z několika lipoxygenázových metabolických cest⁸ jak je vidět na obrázku 1⁹. Produkce eikosanoidů se liší jak u jednotlivých typů buněk, tak také například i mezi epiteliálními a sub-epiteliálními vrstvami střeva. Zatímco téměř většina savčích buněk obsahuje enzym cyklooxygenázu, relativně málo buněk obsahuje enzym 5-lipoxygenázu¹⁰. Mezi jednotlivými typy buněk existuje značné množství variant jakou metabolickou cestou bude arachidonová kyselina transformována, ale určité buňky jsou v tomto směru relativně selektivní jak je vidět v přiložené tabulce 1.

Tabulka 1. Buněčné zdroje lipidických mediátorů zánětu

	Produkty cyklooxygenázy			Produkty lipoxygenázy		PAF
	PGE ₂	Prostacyklin	Tromboxan	LTB ₄	LTC ₄ /LTD ₄	
Krevní destičky	+	-	+	-	-	-
Neutrofilly		-	-	+	-	+
Makrofágy	+	+	+	+	+	+
Žírné buňky		-	-	+	+	+
Eosinofily	+	-	-	-	+	+
Endoteliální buňky	+	+	-	-	-	-
Epiteliální buňky	+	+	+	-	-	-

Oxidace arachidonové kyseliny cyklooxygenázou nejprve vede k tvorbě nestálých endoperoxidů PGG₂ a PGH₂. Tyto meziprodukty mohou být posléze metabolizovány na prostaglandiny (PGD₂, PGE₂ a PGF₂α) a nebo stejně tak na tromboxan A₂ (TXA₂) a prostacyklin (PGI₂). Cyklooxygenáza je inhibována aspirinem a ostatními nesteroidními antiflogistiky (NSAID – nonsteroidal anti-inflammatory drugs). Různé typy buněk tvoří různé arachidonát metabolizující enzymy, což

Obrázek 1. Oxidativní metabolická cesta tvorby leukotrienů



v důsledku vede k různým kombinacím metabolitů. Jak již bylo řečeno dříve všechny savčí buňky obsahují cyklooxygenázu, ale tvorba specifických cyklooxygenázových produktů vyžaduje přítomnost a účast dalších enzymů. V některých buňkách, jako jsou například buňky cévního epitelu, je dominantním produktem cyklooxygenázy prostacyklin, zatímco u ostatních buněk, jako jsou například krevní destičky, je hlavním produktem TXA_2 . Tromboxan syntáza metabolizuje PGH_2 na TXA_2 a prostacyklin syntáza metabolizuje PGH_2 na PGI_2 . Tromboxan A_2 je biologicky aktivní, ale je rychle a neenzymaticky degradován na tromboxan B_2 , který je biologicky neaktivní. Stejně tak je biologicky aktivní prostacyklin rychle a neenzymaticky degradován na 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$. Prostaglandin syntázy D, E a F přeměňují příslušně PGH_2 na PGD_2 , PGE_2 a $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Arachidonová kyselina může být také metabolizována jednou ze tří lipoxygenázových metabolických cest, které jsou tak nazvány pro jejich schopnost zanést molekulární kyslík na určitý uhlík arachidonové kyseliny¹¹. Jeden ze tří enzymů této metabolické cesty, 5-lipoxygenáza, je opravdu mnohem méně rozšířený než cyklooxygenáza a objevuje se primárně u buněk pocházejících z kostní dřeně. Patří sem tedy neutrofile, eosinofily, monocyty, makrofágy a žírné buňky¹². U těchto typů buněk se buněčná specifita projevuje tvorbou leukotrienů⁶. V 5-lipoxygenázové větvi, stejně jako v cyklooxygenázové, jsou pro produkci specifických metabolitů vyžadovány další enzymy. 5-lipoxygenáza spouští přípravu leukotrienů¹³ tvorbou hydroperoxymastné kyseliny (5-HPETE) a poté dalšího meziproduktu LTA_4 ¹⁰. LTA_4 hydroláza metabolizuje LTA_4 na LTB_4 v neurofilech, makrofázích¹² a žírných buňkách, v eosinofilech není přítomna¹⁴. Alternativně může být LTA_4 metabolizován glutathion transferázou na peptidoleukotrieny LTC_4 , LTD_4 a LTE_4 , které jsou syntetizovány žírnými buňkami, eosinofily a makrofágy¹⁵, naopak v neurofilech se nevyskytují¹⁶. Substance LTD_4 a LTE_4 mají extrémně krátkou životnost *in vivo* a tak například pro měření jejich hladin v organismu se používá stanovení urinárních hladin jejich metabolitů¹⁷.

Biologický účinek produktů cyklooxygenázy a leukotrienů je zprostředkován pomocí specifických receptorů. Rozšíření těchto receptorů je předzvěstí biologické odpovědi na působení konkrétního agens. Ze skupiny prostaglandinů má největší vliv na střevní trakt PGE_2 , který má množství biologických účinků, které mohou být důležité v patofyziologii IBD. Efekt PGE_2 na střevní hladkou svalovinu (kontrakce

longitudinálního hladkého svalstva a relaxace cirkulárního svalstva) může přispět k patofyziologii diarei a křečí břicha. PGE₂, zvláště v kombinaci s jinými zánětlivými agens jako je například LTB₄, zvyšuje cévní propustnost a pravděpodobně přispívá k prohloubení tkáňových otoků, které jsou významnými histologickými a endoskopickými projevy zánětu v IBD¹⁸.

Již od objevu leukotrienů v roce 1978¹⁹ se ukazuje, že zvyšují migraci neutrofilů, agregaci neutrofilů a monocytů, adhezi leukocytů na endoteliální buňky, uvolňování lysozomálních enzymů a produkci superoxidu^{7,20}. Zároveň zvyšují kapilární propustnost, kontrakce hladkého svalstva a sekreci iontů a hlenu v mukóze^{6,21}. Leukotrieny jsou považovány za silné mediátory zánětlivých a alergických reakcí a jsou lokálně uvolňovány leukocyty a jinými 5-lipoxygenázu produkujícími buňkami. Tyto prozánětlivé mediátory uplatňují svůj účinek vazbou na specifické membránové receptory a jak bylo prokázáno nedávno i na nukleárním PPAR α receptoru (PPAR α - proliferator-activated receptor- α). Například LTB₄ je považován za endogenní ligand pro PPAR α ²². Biologické účinky LTB₄ jsou omezeny primárně na leukocyty a cévní endotelium. LTB₄ je silný neutrofilní chemoatraktant, který interaguje se specifickými recepty na buněčné stěně neutrofilů²³. Podílí se na aktivaci neutrofilů jak bylo prokázáno produkcí reaktivních kyslíkatých sloučenin a uvolněním proteáz ze sekrečních granulí. Stále neexistuje důkaz pro přímý účinek LTB₄ na epiteliální buňky a není dosud ani žádný důkaz existence příslušných receptorů na epiteliálních buňkách.

Patofyziologická role peptidoleukotrienů je nejlépe prozkoumána u astmatu, kde jsou silnými mediátory bronchokonstrikce. V gastrointestinálním traktu peptidoleukotrieny způsobují kontrakci střevní hladké svaloviny. Mohou také stimulovat pohárkové buňky a vyvolat tak sekreci hlenu ve střevě.

Schopnost leukotrienů účastnit se mechanismu řady patologických procesů a jejich opakované nálezy v místech s probíhajícími zánětlivými reakcemi, silně naznačují jejich potenciální důležitou roli mediátorů spektra zánětlivých a imunitních nemocí²⁴. Prozánětlivý profil leukotrienů vyvolal představu, že inhibitory biosyntézy leukotrienů a antagonisté na LT receptorech mohou mít terapeutický potenciál v mnoha různých zánětlivých chorobách²⁵. Unikátní role enzymu 5-lipoxygenázy v produkci leukotrienů a identifikace a nález leukotrienů v místech zánětlivých procesů vyústil ve vývoj mnoha anti-leukotrienových substancí vhodných pro léčbu

zánětlivých stavů u nemocí jako astma, revmatoidní artritida, mnohé typy sklerotických stavů, uveitida, dna, psoriáza, alergická rýma a IBD²⁴, tedy nemocí u nichž zánětlivý proces hraje významnou roli. Dosavadní klinické studie prokázaly terapeutické možnosti antileukotriénové léčby astmatu, zatímco využití inhibitorů biosyntézy leukotriénů, popř. antagonistů LT receptorů v léčbě IBD byla buď méně úspěšná nebo vyžaduje další vývoj.

Existují důkazy pro tvrzení, že leukotrieny mohou působit jako mediátory i u jiných zánětlivých chorob, jako je revmatoidní artritida²⁶, psoriáza²⁷ a ulcerativní kolitida²⁸. Seznam chorob, ve kterých hrají produkty 5-lipoxygenázy nějakou roli, můžete nalézt v tabulce 2.

Tab. 2. Lokalizace a role produktů 5-lipoxygenázy v některých chorobách

Choroba	Lokalizace a role
Astma	Bronchokonstrikce vyvolaná LTD ₄ LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ a 20-OH LTB ₄ ve sputu, moči a séru astmatiků
Psoriáza	Proliferativní efekt na keratinocyty LTB ₄ , LTC ₄ a LTD ₄ nalezeny v tekutině z psoriatických lézí
Alergická rýma	LTC ₄ , LTD ₄ a LTE ₄ nalezeny v hlenech i slzách
Revmatoidní artritida	LTB ₄ nalezen ve fluidní tekutině
IBD	LTB ₄ nalezen v rektálním sekretu a v biopsii mukózy
Syndrom respirační tísně	LTC ₄ nalezen v bronchiální sekretu
Dna	LTB ₄ nalezen v synoviální tekutině

1.1.1 Úloha leukotriénů v astmatu

Obstrukce dýchacích cest je při astmatu způsobena kombinací faktorů zahrnujících spasmus hladkého svalstva dýchacích cest, edém sliznic dýchacích cest, zvýšenou sekreci hlenu, buněčnou, speciálně eozinofilní infiltraci stěny bronchů a deskvamaci bronchiálního epitelu. Dříve se pozornost soustředila na bronchospasmus způsobený kontrakcí hladkého svalstva jako hlavního prvku bronchiální obstrukce. V současné době je zřejmé, že astma, zejména jeho

chronická forma, je ve skutečnosti zánětlivá choroba dýchacích cest. Bronchoalveolární laváž (BAL) a bioptické studie pacientů s mírným astmatem ukazují přítomnost zánětlivých infiltrátů tvořených eozinofily a lymfocyty a také odloupanými epiteliálními buňkami. Typické je, že všichni astmatici s aktivní chorobou mají konstriční hyperreakci bronchů na nejrůznější podněty. Stupeň hyperreakivity závisí na rozsahu zánětu. Oboje úzce koreluje se závažností choroby a potřebou léků. Výzkum patofyziologie astmatu se v posledních desetiletích soustředil na zánětlivé buňky a jejich mediátory²⁹.

Astma je tedy chronický zánětlivý stav postihující dýchací cesty, který zahrnuje produkci a aktivitu zánětlivých buněk (např. žírné buňky, eosinofily, T lymfocyty, makrofágy, neutrofilů a epiteliální buňky) a několika chemických mediátorů. Žírné buňky se jeví jako důležité pro akutní bronchokonstriční reakci na inhalované alergeny a pravděpodobně i na tělesnou námahu, ale jejich role v patogenezi chronického zánětu je méně významná než jiných buněk speciálně eozinofilů, které obsahují proteiny schopné poškodit epitel dýchacích cest. Počet eozinofilů v periferní krvi a tekutině BAL úzce koreluje se stupněm bronchiální hyperreakce. Makrofágy, lymfocyty a jejich sekreční produkty pomáhají udržet zánět dýchacích cest. Role neutrofilů není jasná²⁹. Četné mediátory zánětu zjištěné v sekretu z dýchacích cest pacientů s astmatem přispívají k bronchokonstrikci, sekreci hlenu a mikrovaskulárnímu prosakování. Konstantní složky zánětlivé reakce vedou později k podslizničnímu edému, zvýšení rezistence dýchacích cest a přispívají k bronchiální hyperreaktivitě. Mediátory zánětu jsou uvolňovány nebo tvořeny jako důsledek alergické reakce v plicích, patří k nim histamin, leukotrieny a prostaglandiny (oba mohou přechodně zvyšovat hyperreakci bronchů), pravděpodobně velmi důležitý faktor aktivující destičky (PAF) a bradykinin³⁰. PAF, substance odvozená od lipidů, může po inhalaci způsobit dlouhotrvající stav bronchiální hyperreakivity (až do 4 týdnů) i u jedinců bez astmatu²⁹.

Důkazy o tom, že leukotrieny hrají jistou roli v astmatu byly podpořeny dalšími pozorováními. Nízké koncentrace (pmol) 6-peptidopeptidových leukotrienů způsobují kontrakce izolovaných hladkých svalových preparátů ze zvířat i lidí^{31,32}. Aerolizovaný LTD₄ je mnohem účinnější než histamin při spouštění bronchokonstrikce u zdravých i astmatem postižených pacientů³³. Současně s účinky na hladký sval bylo u leukotrienů prokázáno zvyšování produkce hlenu a zeslabení ciliární funkce, což

může přispívat k ucpávání dýchacích cest astmatiků hlenem³⁴. Prozáňtlivý účinek leukotrienů na mikrovaskulaturu³¹ a zánětlivé buňky³⁵ je dobře popsán a může tak vysvětlit roli těchto substancí u edémů dýchacích cest. Leukotrieny byly nalezeny ve sputu u astmatiků³⁶ a konečně, byly pozorovány zvýšené koncentrace leukotrienů v krvi u dětí prodávajících akutní astmatický záchvat³⁷.

Buňky zánětu, mediátory uvolněné z těchto buněk nebo syntetizované v jiných buňkách, a biologicky aktivní molekuly uvolňované ze sensorických nervů mají vliv na bronchy a jejich mikrovaskulaturu a přispívají ke speciálnímu obrazu zánětu dýchacích cest, který je pro astma charakteristický²⁹.

1.1.2 Úloha leukotrienů v revmatoidní artritidě

Etiologie revmatoidní artritidy (RA) je neznámá. Imunologické změny mohou být zahájeny vlivem různých činitelů. Je postiženo asi 1 % populace. V chronicky postižených kloubech vytváří synoviální membrána, která je za normálních okolností jemná, mnoho vilózních řas a její tloušťka se zvětšuje v důsledku rostoucího počtu a velikosti buněk synoviální výstelky a osídlení lymfocyty a plazmatocyty. Buňky výstelky tvoří různé látky, např. kolagenázu, interleukin-1 a prostaglandiny. Kolonizující buňky, původně umístěné perivenulárně a později vytvářející lymfoidní uzlíky se zárodečnými centry, syntetizují interleukin-2, různé kininy, revmatoidní faktor (RF) a další imunoglobuliny. Dochází k ukládání fibrinu, fibróze a nekrotickým. Tyto nálezy jsou sice typické, ne však diagnostické. Hyperplastická synoviální tkáň (pannus) může erodovat chrupavku, subchondrální kost, kloubní pouzdro a vazy. Polymorfonukleární leukocyty jsou v synovii jen nenápadné, zato v synoviální tekutině často převládají³⁸.

V postižených kloubech se ukládají imunitní komplexy vyvolávající zánětlivou odpověď, která je zesilována eikosanoidy a PAF. Hlavními eikosanoidy vytvářenými v polymorfonukleárech jsou leukotrieny, zejména LTB_4 ²⁵, které usnadňují proliferaci T buněk a působí jako chemoatraktanty. Makrofágy jsou zodpovědné za syntézu větší části eikosanoidů a PAF. U lidí makrofágy syntetizují kromě velkých množství leukotrienů ještě TXA_2 a PGE_2 . PGE_2 byl u artritidy označen za mediátor zánětu. Tato teorie ovšem nevysvětluje dobře prokázané inhibiční účinky PGE_2 na buňkami zprostředkované imunitní reakce, a proto se nyní považuje toto tvrzení za

spekulativní. Jiná teorie naznačuje, že nepochybně prospěšné účinky nesteroidních antiflogistik u revmatoidní artritidy jsou způsobeny jiným mechanismem, například potlačením tvorby volných radikálů. To, že kortikosteroidy jsou při léčbě revmatoidní artritidy účinnější než nesteroidní antiflogistika, může být částečně vysvětleno tím, že inhibují i tvorbu leukotrienů, která nesteroidními antiflogistiky není ovlivněna vůbec³⁹.

1.1.3 Úloha leukotrienů v psoriáze

Psoriáza je běžná recidivující choroba, charakterizovaná suchými, ostře ohraničenými, stříbřitými papulami a plakami rozdílné velikosti. Typický je průběh ve formě chronických remisí a recidiv (nebo někdy i akutních exacerbací), jejichž frekvence i trvání se mění. Faktory vyvolávající psoriatické erupce jsou např. lokální trauma, někdy přílišná insolace, podráždění, lokálně podané léky, antimalarická terapie chlorochinem, lithium, β -blokátory, interferon- α či odnětí celkově podávaných kortikosteroidů. Psoriáza typicky postihuje vlasatou část hlavy, extenzorové plochy končetin (především na loktech a kolenou), záda a hýždě. Psoriatická artritida se často silně podobá revmatické artritidě a může být stejně zneschopňující, v pacientově séru však není přítomen revmatoidní faktor.

U kožních nemocí, jako je psoriáza, byla popsána přítomnost zvýšených hladin LTB₄ a 6-peptidoleukotrienů v lezích, což naznačuje, že tyto substance mohou zodpovídat za změny permeability, influxu neutrofilů a tvorby Monroeova abscesu nalezených u postižených pacientů⁴⁰. Dále bylo zjištěno, že leukotrieny společně s prostaglandiny vyvolávají proliferaci keratinocytů⁴¹. Pokud byly leukotrieny vloženy do kůže, byly pozorovány některé patofyziologické změny obvykle viditelné u zánětu kůže⁴².

1.1.4 Úloha leukotrienů u idiopatických zánětů střev

Primární formy idiopatického intestinálního zánětu, ulcerativní kolitida a Crohnova choroba jsou společně nazývány IBD, což je chronický recidivující zánět střeva výrazně zhoršující morbiditu. Etiologie této skupiny onemocnění je neznámá. Extenzivně se studovaly imunologické faktory, studie možných infekčních agens zahrnuly nejrůznější střevní bakterie, viry a chlamydie a pozornost se jednu dobu obrátila i k mykobakteriím. Uvažovalo se i o dietních faktorech včetně chemikálií a

bezlákninových diet, konzumovaných v moderních rozvinutých společnostech. Žádná z těchto hypotéz se nepotvrdila⁴³, a tak se v poslední době jako nejpravděpodobnější jeví, že se jedná o přehnanou reakci imunitní odpovědi na antigeny (produkty bakterií) normálně přítomné ve střevním lumen. Leukotrieny hrají významnou roli v IBD kvůli vlastní schopnosti zesílit zánětlivou reakci, která může způsobit rozsáhlé poškození tkání pozorované u pacientů s IBD^{6,7}.

Důkazy o vlivu leukotrienů na patogenezi IBD pochází ze dvou zdrojů. První důkaz spočívá v nálezů těchto mediátorů ve střevě během akutního ataku nemoci⁴⁴ a jejich přítomnost může zodpovídat za hromadění velkého množství neutrofilů nalezených v postižené mukóze. Druhá linie důkazů pochází z publikované aktivity látek, které ovlivňují hladiny leukotrienů u probíhající choroby⁴⁵.

Vztah mezi eikosanoidy a IBD se poprvé ukázal při objevení vysokých hladin prostaglandinů PGE₂ a PGF_{2α}, stejně jako zvýšené aktivity PG syntázy u pacientů s aktivní ulcerativní kolitidou⁴⁶ nebo Crohnovou chorobou, jejichž syntéza byla tlumena používáním sulfasalazinu⁴⁷. Postupně se prokázalo, že také tromboxany, PGI₂ a LTB₄ jsou ve větší míře přítomny u pacientů s ulcerativní kolitidou i Crohnovou chorobou^{48,49}. Profil přítomných eikosanoidů se liší pro každý typ střevního zánětu, ačkoli hladiny všech byly jednotně zvýšeny při zánětu v porovnání s hladinami v normální zdravé mukóze. Také se ukázalo, že koncentrace PGE₂, TXB₂ a LTB₄ jsou výrazně vyšší u ulcerativní kolitidy než při Crohnově chorobě a kolitidě navozené bakterií *Clostridium difficile*⁵⁰.

Přestože IBD je spojována s nárůstem tvorby eikosanoidů v cílové zanícené tkáni, zdá se, že inhibitory cyklooxygenázy IBD zhoršují, vyvolávají relaps choroby a navíc mohou způsobit ulcerativní onemocnění tlustého střeva nerozeznatelné od ulcerativní kolitidy^{4,7,21}. Vysvětlení tohoto jevu nebylo dlouho jasné. Nakonec proběhly studie sledující jak inhibici 5-lipoxygenázové větve 5-aminosalicylovou kyselinou, tak také výrazně zvýšenou produkci LTB₄ v IBD. Malé studie s indometacinem podávaným perorálně i rektálně jasně ukázaly žádný účinek tohoto NSAID na UC. Naopak byla nalezena jistá tendence spíše potíže zhoršovat, přestože byly hladiny PG významně sníženy⁵¹. Interakce mezi makrofágy a leukocyty je důležitou součástí regulace imunitní odpovědi. Na několika systémech bylo prokázáno, že lymfocyty produkují lymfokiny, které aktivují produkci PG makrofágy a naopak, že PG vyprodukované makrofágy slouží jako regulační prvek, který brzdí

funkce lymfocytů. A tak se může zdát, že v IBD PG syntetizované makrofágy mohou být důležité pro tlumení zánětlivé odpovědi. Inhibice produkce PG NSAID může blokovat tento důležitý regulační krok a výsledkem je zvýšená nebo prodloužená zánětlivá aktivita.

U pacientů s aktivní formou IBD se ukázalo, že tlusté střevo produkuje leukotrieny *in vivo*, což bylo odhadnuto díky sledování rovnováhy intermediátů rektální dialýzou a nakonec potvrzeno nalezením pozitivní korelace mezi koncentracemi LTB₄ a aktivitou choroby pomocí klinického, histologického a endoskopického vyšetření^{52,53}. Navíc bylo zjištěno, že současné terapie ulcerativní kolitidy využívající používání glukokortikoidů a 5-ASA, prokazatelně tlumí syntézu LTB₄^{53,54,55}. Stále není jasné, zda zvýšené hladiny leukotrienů jsou primárním jevem nebo jsou výsledkem syntézy v nahromaděných neutrofilech. Mnohé studie naznačují, že LTB₄ zodpovídá za většinu chemoatraktivních stimulů způsobujících pokračování infiltrace neutrofilů, která byla pozorována u pacientů s relapsující chorobou⁴⁹.

1.1.4.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba jinak též nazývaná regionální enteritida, granulomatózní ileitida nebo ileokolitida je nespecifické chronické transmurální zánětlivé onemocnění, nejčastěji postihující distální ileum a tračník, které se však může také objevit v kterékoli jiné části gastrointestinálního systému od úst až po anus a perianální oblast.

Nejčastější makroskopické leze u Crohnovy choroby představují drobné „aftoidní“ slizniční ulcerace, pod nimiž leží uzlíčky lymfoidní tkáně. Někdy tyto změny ustoupí, jindy zánětlivý pochod progreduje, až prostoupí všechny vrstvy střešní stěny, která značně zesílí. Změny jsou nejvýraznější v submukóze, kde se zpočátku vyvine lymfedém s lymfocytovou infiltrací, později extenzivní fibróza. Na sliznici se rozvinou ulcerace nepravidelného tvaru a kombinace podélných a příčných vředů s pronikajícím slizničním edémem často vytváří charakteristický vzhled „dláždění kočičími hlavami“. Transmurální zánět, hluboké ulcerace, edém a fibróza vyvolávají obstrukci, hluboké pruhy záhybů a píštěle nebo dokonce mezenterické abscesy, které představují pro pacienta značnou komplikaci. Pouze ileum samotné je

postiženo v 35 % případů (ileitida), ileum a tračník společně, s predilekcí pravé strany tlustého střeva, jsou postiženy asi ve 45 % (ileokolitida) a tlusté střevo samo asi ve 20 % (granulomatózní kolitida). Občas je zasaženo celé tenké střevo (jejunoileitida) a vzácně také žaludek, duodenum nebo jícen⁴³.

1.1.4.2 Ulcerativní kolitida

Ulcerativní kolitida je nespecifické zánětlivé a ulcerózní onemocnění, vycházející ze sliznice tlustého střeva a nejčastěji charakterizované krvavými průjmy. Název „kolitida“ se může použít jenom pro zánětlivé onemocnění tlustého střeva (např. ulcerózní, granulomatózní, ischemická, zánětlivé změny při bacilární nebo amébové dyzentérii).

Onemocnění obvykle začíná v rektosigmoidální oblasti a může se šířit proximálně, až někdy postihne celý tračník, anebo se vyvine v celém tlustém střevě najednou. Ulcerózní proktitida, velmi častá, benignější a ohraničená, ale často refrakterní forma tohoto onemocnění, obvykle zůstává lokalizovaná na rektum, ale i ona se později může rozšířit. Patologické změny začínají degenerací vazivových vláken na hranici slizničního epitelu, okluzí subepiteliálních kapilár a progresivní infiltrací lamina propria mucosae plazmatocyty, eozinofily, lymfocyty, žírnými buňkami a polymorfonukleáry. Nakonec se vyvíjejí abscesy v kryptách, epiteliální nekrózy a slizniční vředy⁴³.

1.2 *Terapeutické možnosti antileukotrienik*

Leukotrieny jsou syntetizovány z arachidonové kyseliny, která se uvolňuje z fosfolipidové části buněčné stěny působením fosfolipáz. Prvním krokem na cestě vedoucí k biosyntéze leukotrienů je zavedení molekulárního kyslíku enzymem 5-lipoxygenázou následované dehydratací na LTA₄⁵⁶. V tomto momentě může být LTA₄ metabolizována dvěma cestami. Jedna cesta vede k biosyntéze LTB₄ stereoselektivní adicí vody pomocí enzymu LTA₄ hydrolázy (LTB₄ syntázy)⁵⁷. Druhá cesta vede k 6-peptidoleukotrienům pomocí adice glutathionu enzymem LTC₄ syntetázou. Další adice gama-glutamyl transpeptidázou vede k LTD₄ a odstraněním terminálního glycinu dipeptidázou k LTE₄⁵⁶.

Pro omezení patologických změn způsobených leukotrieny byly využity dva postupy buď samostatně nebo společně. Jeden postup spočívá v antagonistickém působení na receptorech, které jsou specifické pro určitý leukotrien. Výhodou tohoto postupu je specifita, resp. ne všechny leukotrieny budou takto postiženy a ovlivněny. Druhá možnost se snaží zaměřit na inhibici různých enzymů objevujících se v metabolické kaskádě kyseliny arachidonové (viz. obr. 1). Inhibice fosfolipáz a jiných enzymů, jako LTA₄ syntáza, ještě nevedla ke kandidátům v klinické praxi. Nicméně jedním enzymatickým přístupem, který se ukázal být účinným, je inhibice nebo deaktivace enzymu 5-lipoxygenáza, tohoto prvního důležitého kroku v biosyntéze leukotrienů. Dnes jedinými klinicky úspěšnými návrhy v regulaci leukotrienové patologie jsou inhibice leukotrienů pomocí tlumení 5-lipoxygenázy a nebo antagonistické působení na receptorech pro LTD₄⁵⁸.

1.2.1 Antagonisté na receptorech

Jedním důležitým cílem pro tlumení aktivity leukotrienů je antagonismus na receptorech. Existují dvě třídy leukotrienových receptorů s podskupinami pro každou třídu. První třídu tvoří receptory pro LTB₄ které byly nalezeny v neutrofilech, eosinofilech a pravděpodobně i lymfocytech, keratinocytech a endoteliálních buňkách⁵⁹. Receptor je zodpovědný za aktivaci chemotaxe neutrofilů a eozinofilů. Předpokládané receptory na lymfocytech, keratinocytech a endoteliálních buňkách se pravděpodobně podílejí na aktivaci těchto buněk během zánětlivé reakce.

Jsou známy dva typy povrchových receptorů pro LTB₄ (BLT₁ a BLT₂). BLT₁-receptor byl klonován a charakterizován jako 43 kDa s G-proteinem spřažený receptor se sedmi transmembránovými doménami (7TM)⁶⁰. Tento receptor je exprimován pouze v zánětlivých buňkách⁶¹ a vykazuje vysokou míru specifity pro LTB₄^{61,62}. Druhý s G-proteinem spřažený 7TM receptor pro LTB₄, BLT₂, byl již také identifikován^{62,63,64}. Tento receptor je homologický s BLT₁, ale má vyšší hodnotu stupně specifity pro LTB₄⁶⁵. Proti BLT₁ receptory je tento receptor rozšířen v mnoha různých tkáních.

Druhou hlavní třídu receptorů tvoří receptory pro cysteinyl-leukotrieny, které jsou k nalezení v různých buňkách, včetně buněk hladkého svaly, lymfocytů a

endoteliálních buněk. Existují dva podtypy (CysLT₁ a CysLT₂) těchto receptorů jak u morčat, tak u lidí⁶⁶ a oba byly klonovány a charakterizovány jako s G-proteinem spřažené 7TM receptory^{67,68,69,70,71}. CysLT₂ receptorovou mRNA můžeme nalézt např. ve slezině, v periferních krevních leukocytech, v plicní tkáni, v buňkách hladké svaloviny a tkáňových makrofázích^{58,60}. Preferovanými ligandy pro CysLT₁ receptor jsou v pořadí s klesající účinností LTD₄, LTC₄ a LTE₄. CysLT₂ receptor se skládá z 34 aminokyselin s přibližně 40% stejných sekvencí jako receptor CysLT₁^{67,69,71}. Tento receptor váže LTC₄ a LTD₄ stejně silně, LTE₄ se váže také, ale má mnohem nižší afinitu. Studie na tkáňové distribuci CysLT₂ receptoru dokumentují vysoké hladiny mRNA v srdci, mozku, periferních krevních leukocytech, slezině, placentě a lymfatických uzlech, zatímco pouze malá množství byla nalezena v plicích. Funkční role tohoto receptoru ještě dosud nebyla objasněna, ale jeho široká tkáňová distribuce umožňuje mnoho variant, včetně regulace funkcí mozku a nebo srdce.

1.2.2 Inhibice enzymů

V celé kaskádě metabolismu kyseliny arachidonové se nachází hned několik potenciálních enzymatických cílů pro terapeutické využití. Dnes existují dvě skupiny antileukotrienik ovlivňující funkci enzymů při biosyntéze leukotrienů. Známe látky, které inhibují enzymovou funkci (katalýzu) 5-lipoxygenázy a nebo blokují (antagonizují) tzv. FLAP⁷² (5-lipoxygenázu aktivující protein – five-lipoxygenase activating protein). Dalšími možnostmi jsou ovlivnění funkcí LTA₄ a nebo LTC₄ syntetázy.

1.2.2.1 Ovlivnění funkcí 5-lipoxygenázy

5-lipoxygenáza (5-LO) katalyzuje první dva kroky v biosyntéze leukotrienů¹⁴. Volná arachidonová kyselina je oxidována na hydroxyperoxid 5-HPETE, který je následně dehydratován na nestabilní epoxidový meziprodukt LTA₄. Enzym, který se převážně nachází v buňkách vznikajících v kostní dřeni, je stimulován Ca²⁺ ionty a ATP. Mimoto obsahuje jeden atom nehemového železa, který se podílí na vlastním katalytickém účinku⁷³. Analýza genové mutace prokázala, že His-372, His-550 a C-terminální Ile-673 jsou ligandy centrálního kovu železa⁷⁴. Již byl rozluštěn

genetický kód stejně jako promoter pro 5-LO a vše podstatné je společně s daty i pro jiné enzymy v leukotrienové kaskádě zdokumentováno v tabulce. Primární struktura 5-LO je známá, ale izolovaná savčí 5-LO je nestabilní a proto stále nebyla získána její krystalická forma pro případné určení sekundární a terciární struktury⁷⁵. Jediná krystalická struktura savčí lipoxygenázy získána je králičí 15-LO⁷⁶. Tento enzym obsahuje C-terminální doménu srovnatelnou s dříve popsány doménami lipáz a také N-terminální β -soudkovou doménu. Role této domény u fosfolipáz je dosud nejasná, ale u 5-LO se ukázalo, že váže Ca^{2+} , který stimuluje enzymatickou aktivitu a pravděpodobně usnadňuje vazbu 5-LO s membránami v průběhu katalýzy⁷⁷. 5-LO je také substrátem pro p38-kinázu dependentní MAPKAP kinázy in vitro, což dokazuje, že fosforylace je dalším faktorem, který určuje přemístění 5-LO a enzymatickou aktivitu⁷⁸.

Aktivací ATP a vápenatými ionty je 5-LO konvertována na aktivní Fe^{3+} formu, která se přesouvá na buněčnou membránu, kde dosedá na transmembránový FLAP protein. V buněčné membráně pak může enzym katalyzovat přeměnu substrátu, tedy arachidonové kyseliny oxidací stereoselektivním radikálovým procesem. Nestabilní hydroxperoxyikosatetraenová kyselina (5-HPETE) vzniká stereoselektivní eliminací vodíku na sedmém uhlíku řetězce a následným začleněním kyslíku. V dalším kroku 5-LO katalyzuje přeměnu 5-HPETE na nestabilní epoxid LTA_4 stereoselektivní eliminací vodíku na desátém uhlíku.

Tab. 3. Vlastnosti enzymů a receptorů v lipoxygenázové kaskádě

Protein	Počet aminokyselin	Prostetická skupina	Velikost genu (kb)	Exon	Chromozom
5-lipoxygenáza	673	Fe	>82	14	10
FLAP	160	-	>31	5	13
LTA4 hydroláza	610	Zn	>35	19	12
LTC4 syntáza	149	-	2,5	5	5
BLT1	351	-	5,5	3	14
BLT2	357	-	ND	1	14
CysLT1	336	-	ND	ND	X
CysLT2	345	-	ND	ND	13

ND - dosud nezjištěno

Na počátku 70. let byla objevena schopnost látky FPL-557121 působit jako antagonistu na leukotrienovém receptoru, tehdy byl ještě považován za antagonistu SRS-A^{79,80}. Nahrazením hydroxylové skupiny v tomto hydroxyacetofenonovém derivátu methoxy skupinou vedlo k posílení antagonistického účinku na LTB₄ receptorech.

Další možnost jak ovlivnit funkci enzymu spočívala ve vyhledávání látek s možností vázat železný iont. Prvními typy modelových struktur byly hydroxámové kyseliny, které mají schopnost vázat železo⁸¹. Ani modifikace struktury těchto derivátů však nevedla k dosažení dobré biologické dostupnosti a hlavně dostatečného biologického poločasu v organismu. Jako dobrou alternativou se ukázala analoga hydroxámového farmakoforu, nejprve deriváty hydroxylaminu a nakonec deriváty *N*-hydroxymočoviny, které vykazaly jak dostatečnou stabilitu v organismu, tak dobrou účinnost. Tento postup je doložen na příkladu látky A-64077 (Zileuton), která patří právě do skupiny inhibitorů derivátů *N*-hydroxymočoviny^{82,83}. Skupina těchto substancí může interagovat s železem, které se nachází v aktivním centru enzymu⁸⁴. Skupina těchto látek je ale zároveň senzitivní na koncentraci substrátu⁸⁴ a tudíž jejich interakce s enzymem může být mnohem složitější než pouhá vazba na iont železa v aktivním centru.

V rámci výzkumu protizánětlivých arylalkanových kyselin ve VÚFB a.s. byla syntetizována série substituovaných bifenyl-4-yloxoalkanových kyselin^{85,86}, vyznačujících se významnou protizánětlivou aktivitou. Nejúčinnější derivát – 4-(2',4'-difluorbifenyl-4-yl)-2-methyl-4-oxobutanová kyselina^{87,88} prošla pod názvem flobufen úspěšně preklinickým a klinickým zkoušením v léčbě revmatoidní artritidy. Bylo prokázáno, že jeho mechanismus účinku není založen na inhibici cyklooxygenázy, ale souvisí s inhibicí biosyntézy LTB₄ v kombinaci s interferencí některých imunitních funkcí⁸⁹.

1.2.2.2 Ovlivnění funkcí FLAP

Buněčná aktivita 5-LO je závislá na malém membránovém proteinu, 5-LO aktivujícím proteinu, který přenáší nebo transportuje arachidonovou kyselinu k 5-LO⁹⁰. Dřívější studie ukázaly, že pokud dojde při buněčné stimulaci ke zvýšení hladin Ca²⁺, 5-LO je aktivována a přesunuta na membránu⁹¹.

Látky, které inhibují transport arachidonové kyseliny k 5-LO, tvoří ve skutečnosti dvě skupiny strukturálně odlišných substancí. První skupina látek obsahuje ve své struktuře chinolylmethoxylový fragment, druhá obsahuje indolový cyklus. První látkou, která měla ověřený efekt na FLAP, byla vyvinuta společností Merck a nesla kódovaný název MK-886⁹². Chinolylmethoxylový fragment se ukázal jako důležitý pro podporu inhibičního účinku a postupnými úpravami bylo získáno několik úspěšných látek, které obsahovali i složku, která měla klasický účinek NSAID (jmenujme např. diklofenak, indometacin, sulindak či flurbiprofen). Bylo tak dosaženo dvojího inhibičního účinku, jak na 5-LO, tak i na cyklooxygenázu⁹³.

1.3 Terapie astmatu

Nejvíce klinických zkušeností je s látkami ovlivňujícími leukotrieny u astmatu. Typický klinický pokus zahrnuje stanovení účinku substance v testech antigenem, studeným vzduchem, cvičením a aspirinem vyvolané zátěže u senzitivních pacientů. V případě úspěchu jsou tyto brzké pokusy následovány 4-6 týdenním zkoušením u mírného až středního astmatu. Používá se mnoho různých parametrů pro stanovení účinnosti terapie u astmatických pacientů. Základními jsou metody spirometrické, ve kterých se měří některé z fyziologických hodnot jako FEV1 či PEFr a nebo se pracuje s modely antigenní zátěže EAR a LAR.

1.3.1 Antagonisté na leukotrienových receptorech

První studie s leukotrienovými antagonisty v terapii astmatu byly velkým zklamáním, neboť testované substance neměly dostatečnou účinnost, hlavně kvůli slabé síle a malé nebo nízké specifitě⁹⁴. Novější antagonisté, jako látka ICI 204,219 (zafirlukast) od firmy Astra-Zeneca, ukázaly své možnosti užití v zátěžových modelech astmatu nebo v několika případech v klinických experimentech.

Několik různých článků popisovalo účinnost zafirlukastu (Accolate[®]) proti inhalovanému antigenu nebo LTD₄ u astmatických pacientů. Výsledky ze studie na astmatických pacientech, kteří prošli inhalací LTD₄, ukázala, že zafirlukast téměř úplně blokoval účinky inhalovaného LTD₄⁹⁵. Zafirlukast inhibuje účinek inhalovaného LTD₄ také u normálních zdravých dobrovolníků a také zmírňuje bronchokonstrikci

vyvolanou antigenem a cvičením. u antigenem vyvolané bronchokonstrikce bylo pozorováno 20% zvýšení změn u FEV1, zatímco u cvičením vyvolané bronchokonstrikce podaný zafirlukast snížil pokles FEV1 o 50 %. Zajímavé je, že jak se ukázalo tak zafirlukast také snížil bronchokonstrikci vyvolanou PAF o 59 %, což vede k domněnce, že PAF může vyvolat uvolnění leukotrienů⁹⁶. Accolate® je užíván pro kontrolu mírného, přetrvávajícího astmatu, pro postupnou terapii přetrvávajícího astmatu středně těžkého, pro astma vyvolané cvičením a v terapii alergické rýmy.

Hlavním léčivem celé skupiny je však montelukast (Singulair®, Montair®). Je to perorálně podávaná účinná látka s vysokou selektivitou k CysLT₁ receptoru (s předností před ostatními farmakologicky důležitými plicními receptory jako jsou prostanoidní, cholinergní nebo β-adrenergní receptory). Inhibuje tak fyziologickou funkci LTD₄ na CysLT₁ receptoru bez jakéhokoliv agonistické aktivity. Inhibice cysteinyl leukotrienového receptoru v dýchacích cestách byla prokázána mimo jiné i tlumením bronchokonstrikce u astmatiků po inhalaci LTD₄. I dávka 5mg stačí pro úplnou blokádu receptorů. V placebo kontrolované, křížené studii, vykazoval Singulair® útlum brzké i pozdní bronchokonstrikce vyvolané antigenem o 75 %, resp. 57 %⁹⁷. Singulair® je doporučován jako alternativa v terapii astmatu za inhalační kortikosteroidy a nebo jako doplňková terapie u mírného a středně těžkého astmatu. V roce 2003 FDA povolila použití Singulairu® jako monoterapie alergické rýmy⁹⁸.

1.3.2 Inhibitory 5-lipoxygenázy

Klinické experimenty s inhibitory biosyntézy leukotrienů se točí kolem inhibitoru 5-lipoxygenázy ziletonu (N-(1-benzo[b]thien-ylethyl)N-hydroxymočovina)⁹⁹ a skupiny inhibitorů FLAP, kam můžeme zařadit látky jako je MKL-591 (3-(1((4-chlorofenyl)methyl)-3((1,1-dimethyl-ethyl)thio)-5(quinolin-2-ylmethyl-oxy)-1H-indol-2-yl)-2,2-dimethylpropanoate)¹⁰⁰. V testech antigenem způsobené zátěže zileton (Zyflo ®) snížil urinační vylučování LTE₄ během EAR, ale nevyvolal významné snížení EAR jako takové¹⁰¹. V dalších experimentech se prokázalo, že zileton snižuje influx eozinofilů na postižené místo a snižuje hladiny albuminu v BAL, což podporuje protizánětlivou účinnost¹⁰². Zileton téměř kompletně snižuje bronchokonstrikci vyvolanou aspirinem u na aspirin senzitivních astmatiků, což naznačuje, že leukotrieny hrají významnou roli i v aspirin senzitivním astmatu¹⁰³. Ve

veliké mezinárodní , u mírného a středního astmatu, Zyflo® vykázal významné zlepšení v FEV₁, možnost snížit užívání β -mimetik a snížení urinárních hladin LTE₄ po 6 týdnech terapie¹⁰⁴. Bylo také pozorováno přibližně 15% zlepšení plicních funkcí 1 hodinu po podání zileuton. Další substancí zkoušenou v této oblasti je rektálně podávaný 2,6-dimethyl -4(1-fenyl-1H-pyrazol-3-yl)aminofenyl acetát (FPL 64170XX).

Ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii (VÚFB a.s.) vedl vývoj antileukotrienik od prvních látek používaných v terapii revmatoidní artritidy⁸⁷ k jejich využití v léčbě astmatu¹⁰⁵. Jako perspektivní antiastmatika byly vybrány chinolinové deriváty^{106,107}, vyznačující se současně inhibicí biosyntézy LTB₄ a antagonismem na LTD₄ receptorech. Jejich předností je nižší lipofilita ve srovnání s jinými připravenými deriváty, jak prokázala studie QSAR antileukotrienových aktivit¹⁰⁸. Rovněž bylo v této sérii látek zjištěno¹⁰⁹, že změna struktury v kyselé části molekuly přechodem od sulfanylbenzoových k sulfanylaryloctovým kyselinám vede od inhibice FLAP k přímé inhibici 5-LO.

1.4 Terapie idiopatických zánětlivých střevních chorob

Zánětlivá onemocnění trávicího traktu zahrnují dvě klasické formy, a to ulcerativní kolitidu, která postihuje výhradně střevo a Crohnovu chorobu, která postihuje ostatní části gastrointestinálního traktu. Vzhledem ke stoupajícímu trendu výskytu těchto chorob, které navíc představují značné nebezpečí vzniku rakovinového bujení, je jejich terapie předmětem výzkumu řady světových farmaceutických firem. V terapii těchto onemocnění byly ještě v nedávné době hlavními léčivy aminosalicyláty^{50,110}, z nichž nejpoužívanější je sulfasalazin^{111,110}. K léčbě IBD jsou dále používány glukokortikoidy^{50,112} (budesonid, prednison) a imunomodulátory^{113,114} (6-merkaptopurin, cyklosporin A), jejichž hlavní použití je obvykle v jiných indikacích. Během posledního desetiletí je značné úsilí věnováno výzkumu etiologie a patogenese chronických IBD, a to především se zaměřením na imunologické aspekty patologie těchto chorob. Byly identifikovány některé imunožánětlivé mediátory, což umožňuje účinně postihnout souvislosti v mechanismu těchto chorob. Rozsáhlá pozornost je soustředěna na ovlivnění tvorby a funkce prozánětlivých cytokinů, především interleukinů IL-6, IL-8 a tumor necrosis faktoru (TNF- α). Strategie výzkumu léčiv s anticytokinovým mechanismem účinku

směřuje k inhibici tvorby cytokinů, blokování jejich receptorů a signálních přenosových cest aktivovaných cytokiny¹¹⁵. V této oblasti jsou studovány i monoklonální protilátky¹¹⁶, z nichž některé jsou již úspěšně zavedeny do klinické praxe (infiximab). Jsou studovány i jiné mechanismy účinku, postihující další mediátory zánětu. Jedná se především o leukotrieny, kde je pozornost věnována inhibitorům 5-lipoxygenázy, LTA₄ hydrolázy a antagonistům LTB₄. Existují také pozitivní výsledky při terapeutickém používání rybího tuku¹¹⁷.

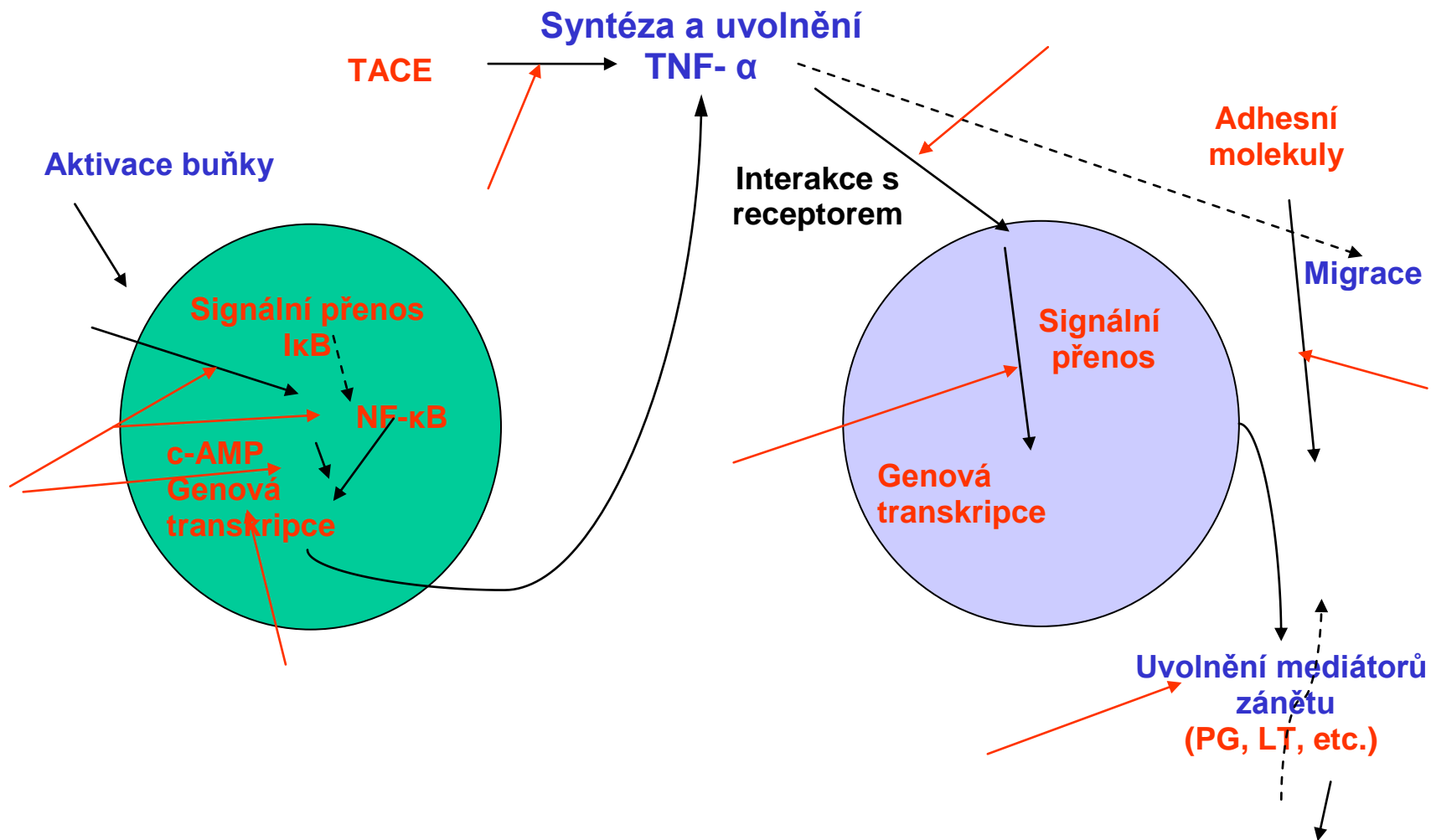
Patogeneze IBD je velmi komplikovaná a rovněž etiologie není zatím zcela vyřešena. Vznik IBD má pravděpodobně multifaktoriální charakter a je výsledkem působení imunologických, genetických i externích faktorů¹¹⁸. Skutečnost, že se jedná o chorobu spojenou s narušením imunitní odpovědi svědčí řada mimointestinálních projevů, např. postižení kloubů, jater a kůže⁴³. Jedním z podnětů imunitní odpovědi střeva by mohla být bakteriální nebo virová infekce. U asi 50 % pacientů byl zjištěn genetický defekt na 16. chromosomu¹¹⁹, což podporuje příčinnou souvislost genetického charakteru. Konečně se hovoří i o zevních faktorech, mezi něž se řadí především kouření (poněkud kontroverzní vliv na UC a CD), perorální kontraceptiva a především toxický vliv hliníku.

Výzkum v posledním desetiletí prokázal, že vývoj těchto zánětlivých onemocnění je výsledkem aktivace komplikované kaskády imunitního systému mukózy. Nerovnováha mezi jednotlivými fenotypy T-lymfocytů a monocytů způsobuje zvýšené uvolňování převážně prozánětlivých cytokinů. Z nich nejvýznamnější jsou TNF- α , IL-18, 1L-1 β , IL-2, IL-8 a IL-12. Jejich prozánětlivý efekt se projevuje řadou patologických jevů, jejichž výsledkem je porušení tkáně.

Schematické znázornění zánětlivého procesu, v němž hlavním prozánětlivým prvkem je TNF- α je uveden na obrázku 2. Má vcelku obecný charakter a platí i pro zánětlivé onemocnění střevního traktu. Schéma rovněž naznačuje možnosti ochrany tkáně před zánětlivým procesem. Tato místa jsou označena červenými šipkami.

Některé z cytokinů - patří mezi ně TNF a IL-1 – nejsou přítomny ve volné formě, ale jako prekurzory, které je nutno aktivovat specifickými enzymy. V případě TNF- α se z proTNF uvolňuje rozpustný TNF- α působením tzv. TACE (TNF-alfa converting enzyme), který patří do skupiny Zn-metaloproteináz. Obdobný enzym (ICE) je nezbytný pro uvolnění aktivní formy IL-1 β ; ICE je znám též pod názvem caspasa-1, patří tedy do široké skupiny caspas. Značný pokrok v poznání TACE

Obrázek 2. Schéma zánětlivého procesu v TNF- α cyklu a potenciální místa jeho ovlivnění



představuje rentgenová studie katalytické domény TACE, která byla provedena s komplexem připraveným kokrytalizací TACE a jeho inhibitoru typu hydroxámové kyseliny. Povaha interakčních míst byla podrobně charakterizována¹²⁰.

Proces uvolňování cytokinů je dále komplikován tím, že impuls způsobený vazbou antigenu na příslušný receptor je přenesen do jádra buňky speciálním signálním systémem. Ten je detailně prostudován v případě TNF- α , kde bylo zjištěno, že na přenosu signálu se podílí specifický inhibiční protein I κ B, který je fosforylován kinázou NIK (NF- κ B Inducing Kinase), která patří do skupiny MAPK (Mitogen Activating Protein kinase) a po částečné proteolýze vzniká transkripční faktor NF- κ B, který reguluje tvorbu TNF- α . Rovněž v tomto případě byly významně rozšířeny znalosti o struktuře transkripčního faktoru NF- κ B rentgenovou analýzou komplexu I κ B – NF- κ B. Získány tak byly informace o aktivním místě NF- κ B při jeho interakci s DNA^{115,120}.

Existuje řada evidencí, že na uvolnění cytokinů se podílí řada dalších kináz aktivujících mitogeny. Patří mezi ně především p44/42 MAP kináza (tzv. ERK, tj. Extra cellular Signal-Regulated Kinase) a p38 kináza¹²¹.

Důsledkem uvolnění prozánětlivých cytokinů je migrace imunitních a zánětlivých buněk do místa výchozího podnětu, což je hlavní znak akutní zánětlivé odpovědi. Migrace je koordinována adhesními molekulami, které se tvoří v endoteliálních a epiteliálních buňkách mukózy a jsou přítomny na jejich povrchu. Syntéza všech adhesních molekul je podporována cytokiny IL-1 a TNF; oxidanty pak prodlužují jejich expresi. Mezi adhesními molekulami významné místo zaujímají ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) a VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1); dále selektiny a integriny, z nichž pravděpodobně nejdůležitější je integrin α 4 β 7, který se účastní specificky migrace lymfocytů¹²².

Mezi důležité mediátory zánětu patří produkty biotransformace kyseliny arachidonové – prostaglandiny a leukotrieny. Z hlediska IBD je nejvýznamnější LTB₄. Již v r. 1984 zjistili Sharon a Stenson⁴⁹, že LTB₄ se ve zvýšené koncentraci vyskytuje ve střevní mukóze u pacientů s UC a CD. Bylo prokázáno, že LTB₄ je účinný aktivátor PMNL a je produkován řadou zánětlivých buněk: granulocyty, monocyty, makrofágy, tracheocyty. LTB₄ stimuluje chemotaxi a chemokinezi těchto buněk, zvyšuje jejich proliferaci a aktivuje enzymy spojené se zánětlivým procesem. Jeho chemotaktický účinek je srovnatelný s většinou chemokinů včetně IL-8^{56,57}.

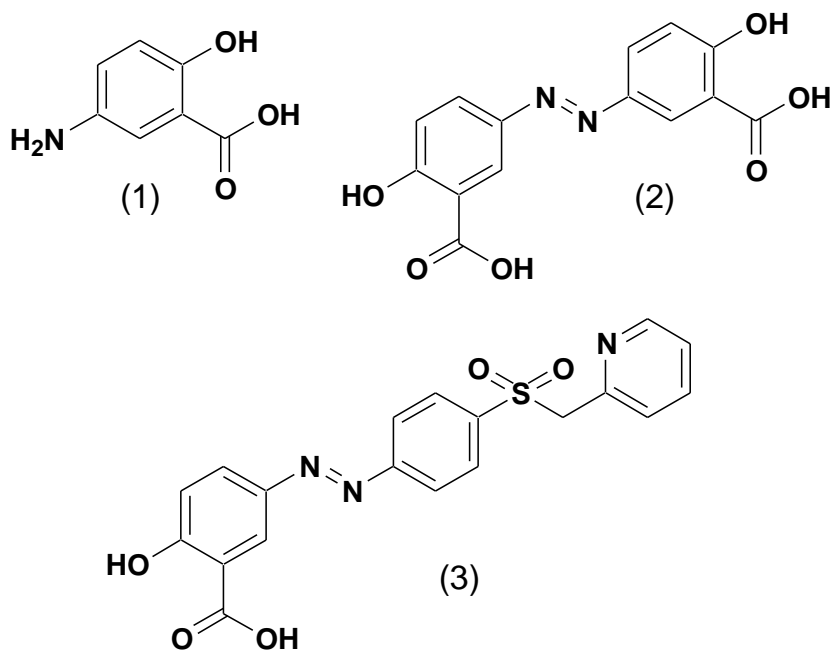
Na základě současných znalostí o mechanismu zánětlivého procesu IBD můžeme hlavní cíle protizánětlivé terapie, které jsou předmětem současného výzkumu charakterizovat čtyřmi postupy.

První mechanismus využívá inhibice enzymů konvertujících cytokiny, jmenovitě TACE a ICE. Vzhledem k tomu, že se jedná o Zn-metaloproteinázy, je zde možnost využít poznatků s inhibitory matrix metaloproteináz (MMP), což je významný směr protizánětlivé terapie především u zánětlivých onemocnění chrupavčitých tkání. Další možností je interference se signálním systémem, který převádí počáteční impuls k jádru buňky a spouští tak proces uvolňování cytokínu. Příslušné enzymy patří do skupiny MAP kináz. Ovlivnit zánětlivý proces lze i Inhibicí adhesních molekul, tj. selektinů a integrinů zodpovědných za migraci prozánětlivých buněk.

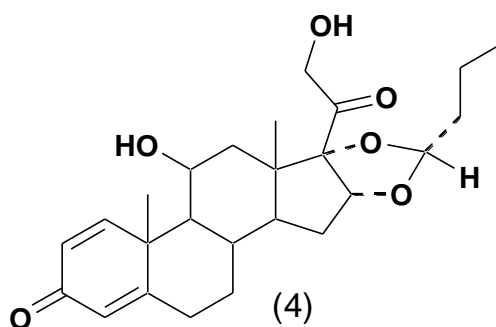
V neposlední řadě lze využít Interference s biosyntézou a funkcí LTB₄. V případě zánětlivých procesů postihujících jiné orgány, zvláště muskuloskeletální či respirační systém, je v jejich terapii věnována pozornost i dalším metabolitům kyseliny arachidonové, tj. prostaglandinům, tromboxanům, a peptido LT.

Vůči LTB₄ lze postupovat dvěma způsoby, a to buď využitím antagonistů LTB₄ receptorů a nebo inhibicí LTA₄ hydrolázy, která blokuje tvorbu LTB₄ a ponechává tvorbu peptido LT nedotčenu. Z hlediska vývoje lze terapii IBD rozdělit do dvou skupin. Do první lze zařadit léčiva, jejichž vývoj měl spíše screeningový charakter, resp. nebyl spojen s cíleným výběrem pro tuto kategorii chorob. Druhá skupina je výsledkem studia mechanismu zánětlivého procesu, jehož cílová místa z hlediska terapie IBD byla shrnuta na předchozím obrázku.

Nejstarší skupinou léčiv^{52,55} IBD je kyselina 5-aminosalicylová (**1** – mesalazin – 5-ASA) a její deriváty: sulfasalazin (**3**) a olsalazin (**2**). Oba deriváty se metabolicky štěpí na 5-ASA působením azo-reduktasy střevních bakterií. Mechanismus působení není zcela jasný – z řady experimentálních nálezů je zřejmé, že se jedná o multifaktoriální působení, a to stimulací tvorby PG v kolonocytech (zde působí protektivně, tedy klasické COX inhibitory nelze použít) a dále inhibicí syntézy IL-1a také negativním vlivem na chemotaxi leukocytů^{110,111}. Obecně se ale tyto látky vyznačují se významnými nepříznivými účinky.



K léčbě IBD jsou využity i některé glukokortikoidy^{52,53}. Terapeutické dávky jsou však významně vyšší než fyziologické, a proto je léčba doprovázena vedlejšími nežádoucími účinky. Značné naděje byly kladeny do kortikoidního analoga budenosidu¹¹² (4), avšak i v tomto případě vedlejší účinky omezují jeho použití. Glukokortikoidy působí především imunosupresivně moderováním tvorby cytokinů, hlavně TNF- α IL-1.



K regulaci imunitní odpovědi při léčbě IBD jsou využívány rovněž některé imunomodulátory, ovšem se všemi riziky, které léčbu těmito preparáty doprovázejí. Jedná se o imunosupresiva azathioprim a 6-merkaptopurin¹¹³, metotrexát, cyklosporin a tacrolimus. Azathioprim rychle metabolizuje na 6-merkaptopurin; oba při

terapii IBD působí inhibici proliferace T a B lymfocytů a limitují tak přítomnost zánětlivých buněk v místě zánětu. To je rovněž hlavní mechanismus účinku cyklosporinu a tacrolimu. Methotrexát byl původně vyvinut jako cytostatikum inhibující dihydrofolát reduktasu v metabolismu kyseliny listové. Při léčbě IBD však působí zřejmě inhibici tvorby LTB₄ a rovněž způsobuje pokles tvorby prozánětlivých cytokinů¹²³.

Cílený výzkum léčiv vůči IBD je spojen především s látkami, které interferují s cytokiny. Vzhledem k tomu, že největší pokrok byl zaznamenán v poznání TNF- α ¹¹⁵, je větší část výzkumu léčiv IBD včetně praktických výsledků v klinice spojena právě s tímto cytokinem. Značný pokrok v léčbě IBD zaznamenala především tzv. „biologická terapie“, tj. preparáty, k jejichž přípravě je využíváno biotechnologických procesů. Jedná se o monoklonální protilátky^{114,116} (vyznačují se koncovkou mab) a další preparáty připravované rekombinantními technikami. Z monoklonálních protilátek zatím největšího rozšíření při léčbě IBD dosáhl infliximab. Jako léčivo je na trh zavedla firma Johnson&Johnson pod názvem Remicade®. V tabulce 4 jsou shrnuty významné biotechnologické preparáty, které jsou v praxi nebo klinickém zkoušení jako léčiva IBD.

Tab. 4. Biotechnologické přípravky v léčbě zánětlivých onemocnění

Látka	Chráněný název	Výrobce	Mechanismus účinku	Stav vývoje
Infliximab	Remicade	Johnson&Johnson	TNF- α Mab	registrován 1998
CDP 571	Humicade	Celltech	TNF- α lidská Mab	2. fáze KZ
Etanercept	Enbrel	Immunex	TNF- α antagonist	registrován 1998
Adalimumab	Humira	Abbott / Eisai	TNF- α lidská Mab	registrován 2003
Natalizumab	-	Athena Neuro	$\alpha_4\beta_7$ MAb	3. fáze KZ
Omalizumab	-	Novartis	Ig G Mab	3. fáze KZ
LDP 02	-	Genetech	$\alpha_4\beta_7$ MAb	3. fáze KZ
ISIS 2302	-	Isis Pharm	inhibitor ICAM-1	3. fáze KZ
Rh TBP-1	-	Serono	TNF- α antagonist*	2. fáze KZ
Anakinra	Kineret	Amgen	IL-1 antagonist*	registrace
Ilodecakin	-	Schering-Plough	rekombinantní IL-10*	3. fáze KZ
Opelvekin	-	Wyeth	rekombinantní IL11*	3. fáze KZ

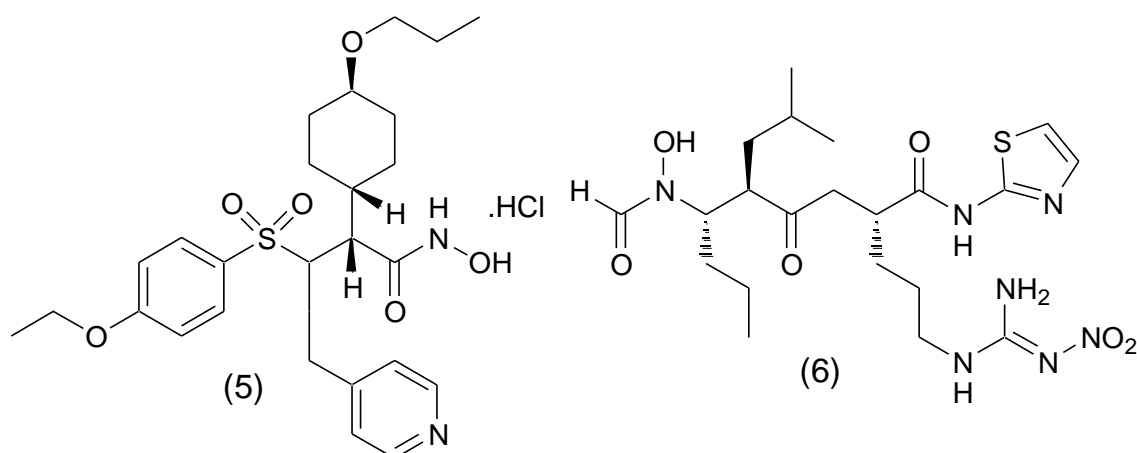
* připraveno rekombinantní technikou

Infliximab byl zaveden do klinické praxe v r. 1998 a kromě Crohnovy choroby je jeho další, rozsáhlejší indikací revmatická artritida. Při léčbě Crohnovy choroby bylo dosaženo u 55% pacientů remise, u 84 % z nich byla remise úplná. Z dalších monoklonálních protilátek je v pokročilém stadiu klinického vývoje přípravek firmy Celltech pod označením CDP 571 s předběžným názvem Humicade®. Ve srovnání s infliximabem má redukovanou imunogenitu, neboť podíl lidské protilátky je zvýšen na 95 % (u infliximabu je 75 %). Dalším léčivem biologické provenience je etanercept vyvinutý firmou Immunex, který pod názvem Embrel® je již v klinickém použití. I v tomto případě ve dvou indikacích (RA a IBD). Etanercept je rekombinantní technikou připravený základní proteinový fragment lidského TNF receptoru a působí jako účinný antagonist TNF- α . Byl zaveden v r. 1998, stejně jako infliximab, z hlediska ročního obratu je však úspěšnější. Dosavadní zkušenosti s použitím biotechnologických preparátů jsou velmi slibné z hlediska jejich účinnosti v případě kauzálního účinku je výsledkem obvykle úplné vymizení choroby, doprovázené minimálními nežádoucími účinky. Je však třeba vidět i některé zásadní nevýhody, mezi něž patří především vysoká cena léčby, která často několika řádově převyšuje klasickou chemoterapii, nemluvě o technické a výrobní náročnosti procesu jejich přípravy.

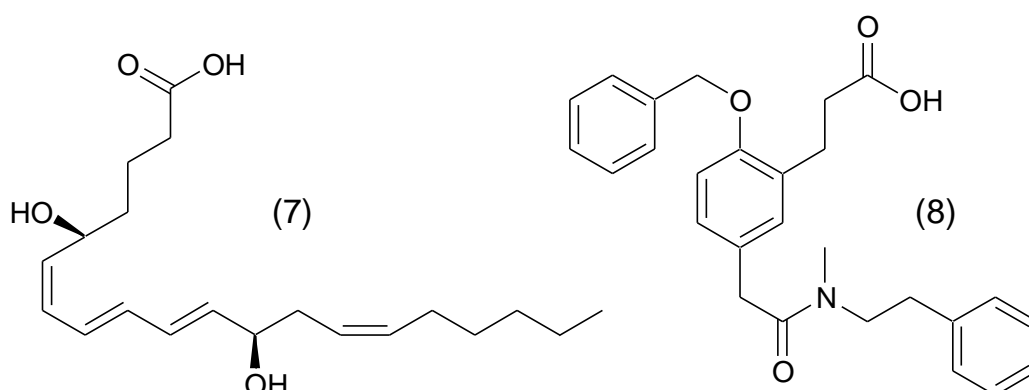
Velmi intenzivní výzkum probíhá rovněž v dalším cílovém místě protizánětlivé terapie, kterým je ovlivnění funkce adhesních molekul – integrinů a selektinů¹²². Vzhledem k tomu, že jsou známy některé aminokyselinové sekvence integrinů zaměřuje se výzkum na studium inhibičních vlastností krátkých peptidů (tetra až pentapeptidů, a to cyklických s S-S můstkem nebo lineárních. Třetí skupinou jsou acylfenylalaniny, jejichž acylový zbytek je strukturně značně komplikovaný.

Z mediátorů zánětu, které jsou produkovány a uvolňovány ze zánětlivých buněk v závěrečném kroku zmíněného procesu jsou hlavními zástupci leukotrieny. V souvislosti se zánětlivým onemocněním střevního traktu (stejně jako s kloubními chorobami artritického charakteru) má hlavní význam LTB₄. Bylo prokázáno, že je významným mediátorem zánětu, neboť aktivuje polymorfonukleární leukocyty, zvyšuje jejich proliferaci do zánětlivé tkáně a aktivuje enzymy spojené se zánětlivým procesem²³. Byl ve zvýšené koncentraci detekován ve střevní mukóze u pacientů s UC a CD⁵⁰. Vůči LTB₄ lze postupovat dvojím způsobem. Můžeme inhibovat LTA₄

hydrolázu a tím omezit produkci LTB_4 , aniž by byla dotčena produkce cysteinyl LTC_4 , LTD_4 a LTE_4 . Druhou možností je antagonismus na LTB_4 receptorech. V dosavadním výzkumu a vývoji se jeví jako úspěšnější druhá cesta, tedy syntéza antagonistů LTB_4 receptorů, i když nutno konstatovat, že ve výzkumu antileukotrienik jsou nejméně zastoupeny látky interferující s LTB_4 . Některé z antagonistů LTB_4 receptorů prošly úspěšně preklinickým vývojem a dokonce byly nebo dosud jsou v klinickém zkoušení v léčbě IBD. Konkrétně se jedná o bifenylylový derivát LY 293,111 (**5** - Eli Lilly) a ONO-LB-457 (**6** - Ono).



Rozsáhlá skupina antagonistů (**8**) LTB_4 receptorů byla syntetizována ve výzkumu firmy Rhone-Poulenc¹²⁴. Charakteristickým prvkem je přítomnost fenethylacetamidového fragmentu. Dalšími nezbytnými prvky jsou přítomnost karboxylu, který je s lipofilním fenethylem spojen přes aromatické jádro, simulující trienový systém přirozeného ligandu LTB_4 . Typický příklad je uveden na následujícím obrázku. Na obrázku je také molekula LTB_4 (**7**) v konformaci, která je považována za energeticky nejstabilnější.



V klinických pokusech sledujících možné účinky inhibitorů 5-lipoxygenázy na IBD byl sledován pouze zileuton. Relativně vysoká denní dávka zileutonu podáván buď s nebo bez sulfasalazinu významně zlepšila symptomatické i histologické skóre, ale nikoli sigmoidoskopické skóre ve srovnání s použitím předléčení a nebo placebem²⁵. Pozitivní efekt zileutonu byl více zvýrazněn u pacientů nedostávajících současně sulfasalazin a bylo dosaženo v průměru 70% inhibice LTB₄ ve střevní tkáni.

2 Cíl práce

Téma disertační práce je pokračováním výzkumu antileukotrienik, který byl ve VÚFB zahájen v první polovině 90. let a poskytl zajímavé výsledky ve vývoji nových látek, které se osvědčily v léčbě revmatoidní artritidy (flobufen) a astmatu vyvolaném ovalbuminem nebo LTD₄ (chinlukast).

Cílem disertační práce je příprava série látek typu 2-[4-(ω-4-[(fenethylkarbamoyl)methyl]fenoxy)alkoxy]fenyl]alkanových kyselin. V návaznosti na práce z předchozích let je předmětem studia vliv substituce a chemických změn na nosiči karboxylu a jejich hydro-lipofilních vlastností na účinnost v *in vitro* antileukotrienových testech a v *in vivo* modelech zánětu a ulcerativní kolitidy.

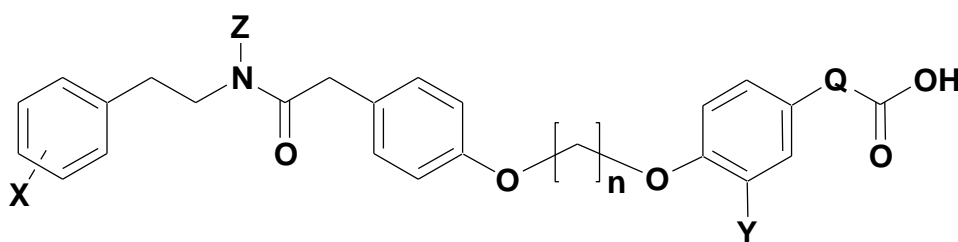
3 Experimentální část

Body tání byly měřeny na Koflerově bodotávku (typ Boetius) a nejsou korigovány. ^1H NMR spektra přibližně 6% roztoků substancí v CDCl_3 (nebo výjimečně v $\text{DMSO}-d_6$) obsahujících TMS nebo 3–(trimethylsilyl)propanovou kyselinu- d_4 jako vnitřní standard stejně jako ^{13}C NMR spektra substancí v $\text{DMSO}-d_6$ byla měřena na přístroji Bruker-250-DXP (250 MHz).

Čistota konečných arylalkanových kyselin i posledních klíčových meziproduktů (příslušných esterů) byla vyhodnocována pomocí HPLC na kapalinovém chromatografu Alliance Waters 2695 (Waters Assoc., Milford, MA, USA) s UV detekcí (Waters 2487 duální detektor) při vlnové délce 225 nm. Chromatografická kolona Cromasil C18 100A (300 mm x 4.6 mm) byla používána při měření esterů i kyselin. Gradientová chromatografie byla prováděna ve směsi vody a acetonitrilu s 0.1 % fosforečné kyseliny jako mobilní fáze. Průtok eluentu kolonou byl obvykle 1ml/min. Čistota konečných kyselin byla vždy vyšší jak 98.0 % a čistota posledních meziproduktů, esterů, byla vždy vyšší než 95.0 %.

3.1 Syntéza látek

Byla připravena série 38 látek, u nichž je lipofilní část molekuly tvořena *N*-methyl-*N*-(arylethyl)amino skupinou a nositelem karboxylové skupiny v druhé části molekuly je arylalkanová kyselina. Struktura látek byla modifikována substitucí na aromatických kruzích fenethylaminu i kyseliny a také délkou spojovacího řetězce mezi oběma strukturními fragmenty. Byly připraveny látky **1c-20c** (viz. tab. 5), s obecnou chemickou strukturou následujícího vzorce:



Přehled všech připravených derivátů je v následující tabulce:

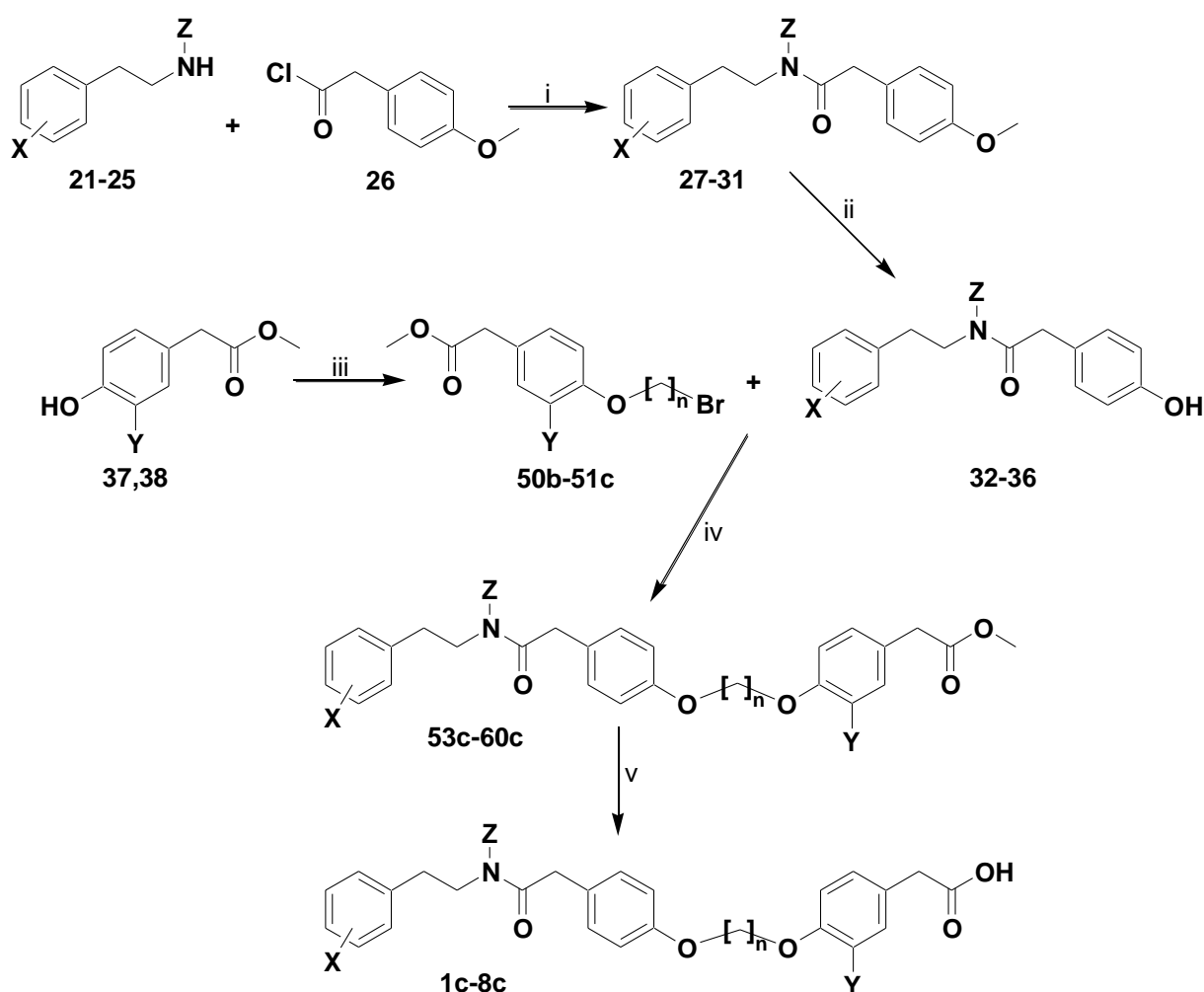
Tabulka 5. Přehled všech připravených substancí

Číslo	Publ.	X	Y	Z	Q	n	Číslo	Publ.	X	Y	Z	Q	n
1c	<i>I-1b</i>	H	H	H	CH ₂	4	13b	<i>II-4b</i>	H	CH ₃ O	CH ₃	CH ₂ CH ₂	3
2c	<i>I-2b</i>	H	OCH ₃	H	CH ₂	4	13c	<i>II-4c</i>	H	CH ₃ O	CH ₃	CH ₂ CH ₂	4
3b	<i>I-3a</i>	H	H	CH ₃	CH ₂	3	14b	<i>II-5b</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)	3
3c	<i>I-3b</i>	H	H	CH ₃	CH ₂	4	14c	<i>II-5c</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)	4
4b	<i>I-4a</i>	H	OCH ₃	CH ₃	CH ₂	3	15a	<i>II-6a</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	2
4c	<i>I-4b</i>	H	OCH ₃	CH ₃	CH ₂	4	15b	<i>II-6b</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	3
5c	<i>I-5b</i>	3-CH ₃	H	CH ₃	CH ₂	4	15c	<i>II-6c</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂	4
6c	<i>I-6b</i>	4-CH ₃	H	CH ₃	CH ₂	4	16a	<i>II-7a</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)	2
7c	<i>I-7b</i>	4-Br	H	CH ₃	CH ₂	4	16b	<i>II-7b</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)	3
8b	<i>I-8a</i>	4-Br	OCH ₃	CH ₃	CH ₂	3	16c	<i>II-7c</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)	4
8c	<i>I-8b</i>	4-Br	OCH ₃	CH ₃	CH ₂	4	17a	<i>II-8a</i>	H	H	CH ₃	COCH ₂ CH ₂	2
9a	<i>I-9a</i>	H	Cl	CH ₃	CH ₂	3	18a	<i>II-9a</i>	H	H	CH ₃	CH=CH	2
9b	<i>I-9b</i>	H	Cl	CH ₃	CH ₂	4	18b	<i>II-9b</i>	H	H	CH ₃	CH=CH	3
10b	<i>II-1b</i>	H	H	CH ₃	CH(CH ₃)	3	18c	<i>II-9c</i>	H	H	CH ₃	CH=CH	4
10c	<i>II-1c</i>	H	H	CH ₃	CH(CH ₃)	4	19a	<i>II-10a</i>	H	CH ₃ O	CH ₃	CH=CH	2
11b	<i>II-2b</i>	H	Cl	CH ₃	CH(CH ₃)	3	19b	<i>II-10b</i>	H	CH ₃ O	CH ₃	CH=CH	3
11c	<i>II-2c</i>	H	Cl	CH ₃	CH(CH ₃)	4	19c	<i>II-10c</i>	H	CH ₃ O	CH ₃	CH=CH	4
12b	<i>II-3b</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂	3	20b	<i>II-11b</i>	H	H	CH ₃	CH(CH ₃)*	3
12c	<i>II-3c</i>	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂	4	20c	<i>II-11c</i>	H	H	CH ₃	CH(CH ₃)*	4

*Zbytek α -propanové kyseliny je součástí naftalenového cyklu v pozici 2, s alkoxy skupinou v poloze 7.

3.1.1 Vlastní provedení syntézy

N-arylethylamidy 4-methoxyarylalkanových kyselin **27-31** byly připraveny kondenzací 4-methoxyfenylacetylchloridu **26** s příslušným arylethylaminem **21-25** a jejich demethylací byly získány klíčové meziprodukty **32-36**. Methyl [4-(ω -bromoalkyloxy)aryl]acetáty **50c-51c** byly připraveny stejně jako jiné synthony ve skupině látek **1c-8c**. Alkylace za podmínek Williamsonovy syntézy¹²⁵ poskytla estery **53c-60c**, které byly hydrolyzovány na korespondující kyseliny **1c-8c**.

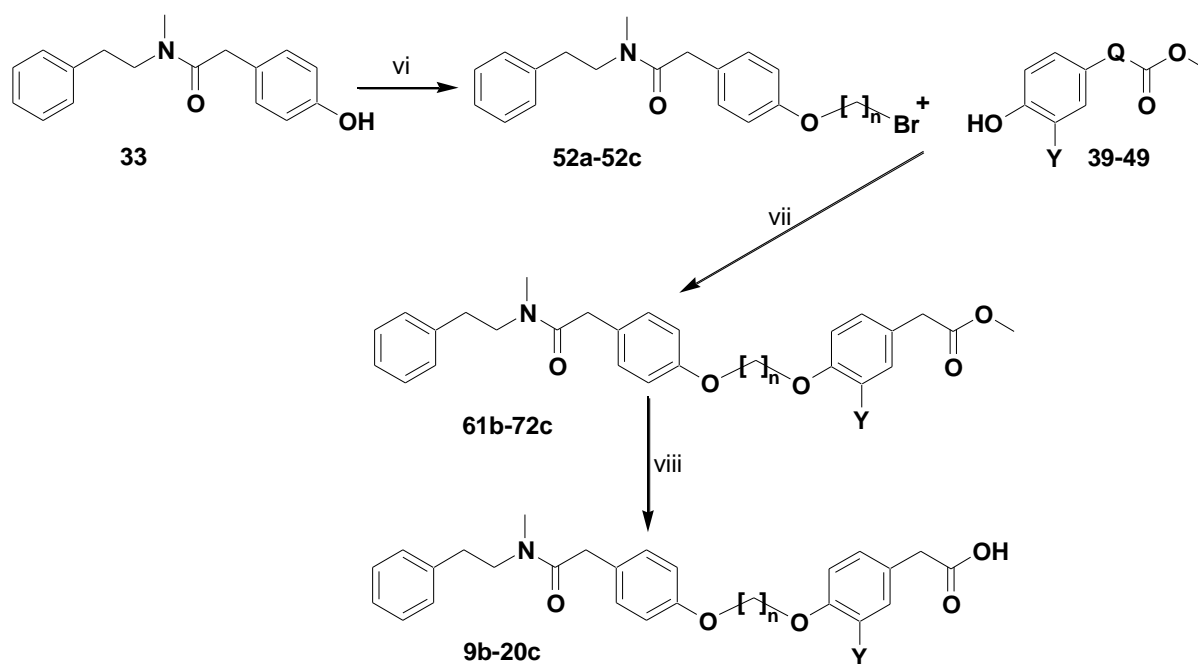


X: H, 3-CH₃, 4-CH₃; Y: H, OCH₃; Z: H, CH₃; n: 3, 4

i: (C₂H₅)₃N, CH₂Cl₂, 20 °C; ii: BBr₃, CH₂Cl₂, -72 °C až 20 °C; iii: K₂CO₃, butan-2-on, 1,3-dibromopropan (1,4-dibromobutan), reflux; iv: K₂CO₃, KI, butan-2-on, reflux; v: tetrahydrofuran/voda 4:1, LiOH, 20 °C

Schéma 1. První syntetická cesta

Obrácená technika alkylace¹²⁶, kde bylo jako alkylačních činitel použito 2-[(4- ω -halogenalkoxy)fenyl]-*N*-methyl-*N*-fenethylacetamidů **52a-52c**, byla použita pro přípravu zbývajících kyselin **9b-20c**. Tento způsob přípravy poskytl estery **61a-71c** ve vyšších výtěžcích, vyšší čistotě a v kratších reakčních časech.



Y: H, Cl; OCH₃; n: 2, 3, 4; Q: zbytky alkanových kyselin

vi: 18-crown-6, K₂CO₃, butan-2-on, 1,3-dibromopropan (1,4-dibromobutan), reflux; vii: K₂CO₃, KI, butan-2-on, reflux; v: tetrahydrofuran/voda 4:1, LiOH, 20 °C

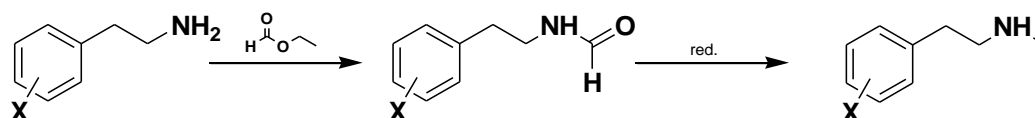
Schéma 2. Druhá syntetická cesta

N-methyl-*N*-fenethylaminy **22-25** byly připravovány z příslušných 2-fenethylaminů formylací a následnou redukcí synhydridem¹²⁷. Methyl estery arylalkanových kyselin **37-49** byly připraveny esterifikací¹²⁸ z příslušných komerčně dostupných kyselin.

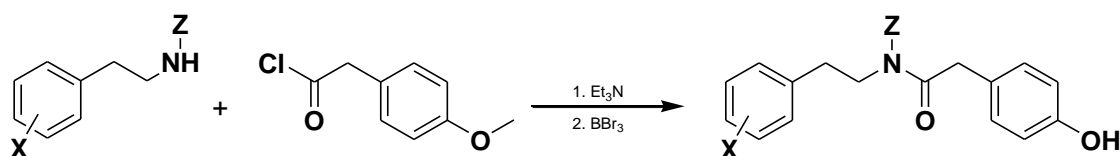
3.1.2 Syntetické postupy

Prvním krokem k syntéze 2-[4-(ω -{4-[(fenethylkarbamoyl)methyl]fenoxy}alkoxy)fenyl]alkanových kyselin, popřípadě jejich solí s cyklohexylaminem, je

příprava výchozích *N*-methyl-*N*-fenethylaminů. Příprava byla prováděna dle Smithe et al.¹²⁷ ve dvou stupních. Nejprve byl fenethylamin podroben formylaci ethylformiátem v toluenu za laboratorní teploty a získaný fenethylformamid byl následně redukován synhydridem v toluenu při -72 °C. Vakuovou destilací surových reakčních směsí byly získány *N*-methyl-*N*-fenethylaminy **22-25** jako bezbarvé čiré viskózní kapaliny s odpovídajícími charakteristikami dle literatury¹²⁹.

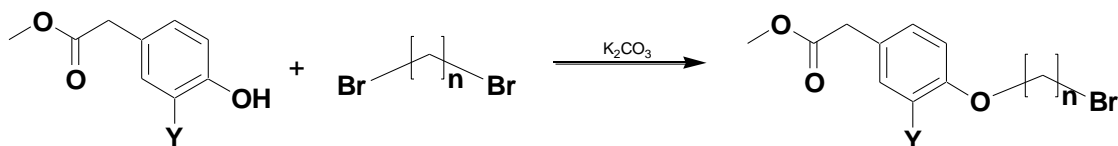


Příprava klíčových meziproductů, tedy derivátů 2-(4-hydroxyfenyl)-*N*-fenethylacetamidů **32-36** byla prováděna taktéž ve dvou stupních. Pro přípravu 2-(4-methoxyfenyl)-*N*-fenethylacetamidů **27-31** bylo použito standardních podmínek pro přípravu amidů, a to kondenzační reakce v dichlormethanu v přítomnosti base, konkrétně triethylaminu. Surová reakční směs byla bez čištění podrobena *o*-demethylaci v dichloromethanu roztokem bromidu boritého v dichloromethanu při -72 °C. Po zpracování reakční směsi byly dvě pevné látky (**32,33**) čištěny krystalizací, zbylé tři čiré viskózní kapaliny (**34-36**) byly použity bez čištění do dalšího reakčního kroku.

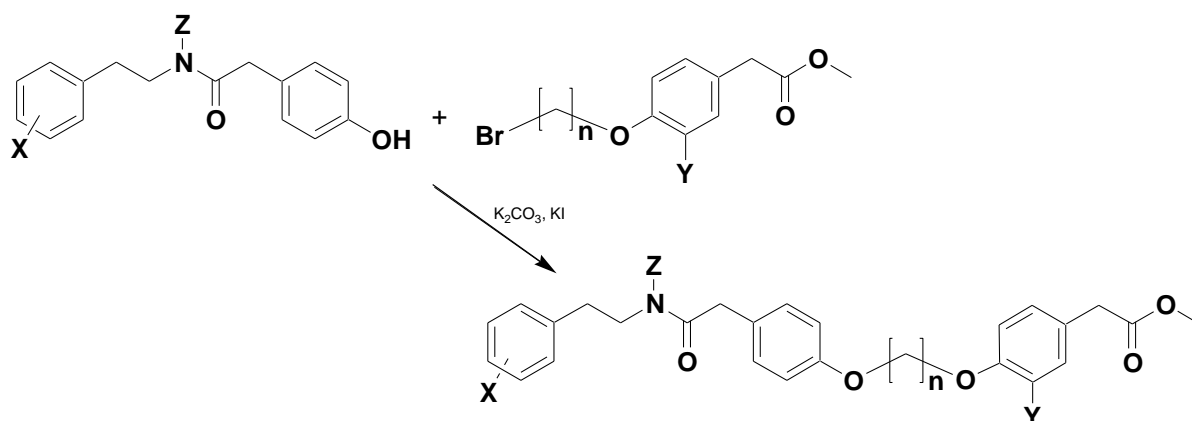


V této fázi dochází k rozdělení syntetické cesty na dvě větve. první verze přípravy konečných kyselin byla použita pro lepší dostupnost methyl 4-hydroxyarylacétátu. V první fázi totiž byly připravovány jednodušší deriváty, kde nositelem karboxylu byla právě tato nejjednodušší arylalkanová kyselina. Jak je vidět na schématu 1, byly připraveny čtyři meziproducty, a to methyl [4-(3-bromopropoxy)fenyl]acetát **50b**, [4-(4-bromobutoxy)fenyl]acetát **50c**, [4-(3-bromopropoxy)-3-methoxyfenyl]acetát **51b** a [4-(4-bromobutoxy)-3-methoxyfenyl]acetát **51c**. Pro přípravu těchto látek byla použita modifikace Williamsonovy syntézy dle Allena a Gatese¹²⁵. K suspenzi methyl 4-

hydroxyfenylacetátu a bezvodého uhličitanu draselného v suchém acetonu byl pomalu přidán 1, ω -dibromalkan a směs byla poté refluxována po dobu 5 hodin. Po zpracování a rekrystalizaci z *n*-hexanu byly získány žádané produkty v přibližně 70% výtěžku jako téměř bílé pevné látky s body tání nepřesahujícími 40 °C.

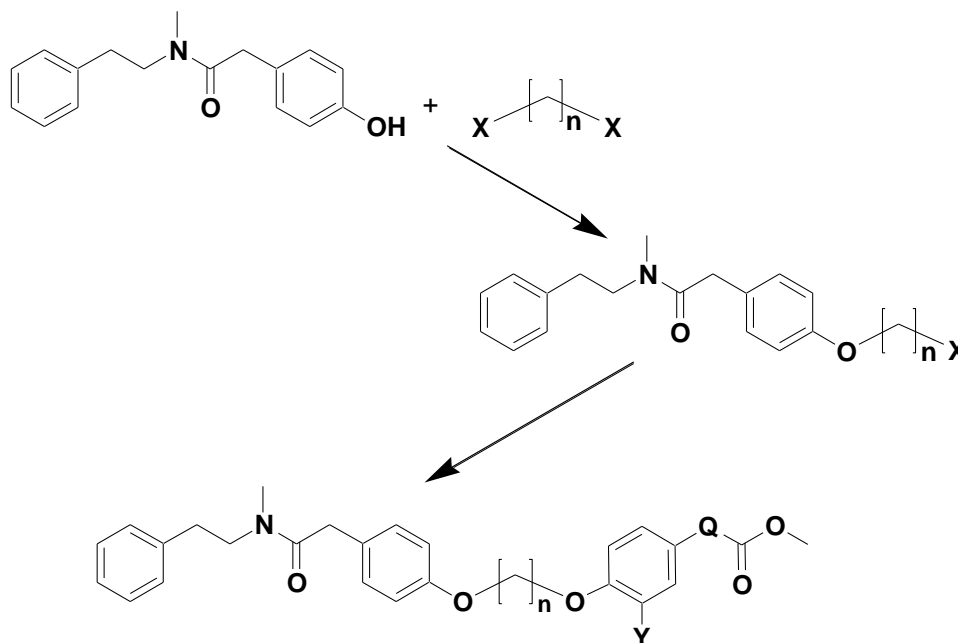


Následnou opakovanou Williamsonovou reakcí s 4-hydroxyfenylacetamidy **32-36**, tentokrát s přidáním jodidem draselným¹²⁶ byl připraveny konečné meziproducty, methyl estery aryloctové kyseliny **53c-60c**.



Druhá syntetická cesta byla poprvé vyzkoušena pro relativně horší dostupnost methyl 4-hydroxy-3-chlorofenylacetátu. Jelikož se do reakce **iii** (schéma 1) přidával 20% nadbytek esteru aryloctové kyseliny a jelikož tou dobou již byla zvládnuta syntéza 2-(4-hydroxyfenyl)-*N*-fenethylacetamidu **33**, byl ten podroben alkylaci 1, ω -dibromalkany, popř. 1-chlorethantosylátem, ve výševroucím ketonu (butan-2-on) v přítomnosti žíhaného uhličitanu draselného, jodidu draselného a 18-Crown-6 etheru. Surová směs po sloupcové chromatografii (SiO₂, ethyl acetát:petrol- ether 1:2) poskytla bezbarvé viskózní kapaliny v dobré čistotě. Příprava esterů **61b-71c** byla prováděna za identických podmínek jako reakce předchozí, tedy za refluxu

v butan-2-onu s K_2CO_3 , KI a crown etherem. Výsledné produkty byly získávány nejen ve vyšších výtěžcích, ale také v kratších reakčních časech (1,5-2 hodiny) a ve vyšší čistotě.



Posledním stupněm byla hydrolýza, kterou byly připraveny konečné produkty 2-[4-(ω -{4-[(fenethylkarbamoyl)methyl]fenoxy}alkoxy)fenyl]alkanové kyseliny **1c-20c**. Jako nejlepší se ukázala hydrolýza hydroxidem lithným ve směsi tetrahydrofuran:voda 4:1, při níž dochází k parciálnímu štěpení esterové vazby bez rozštěpení vazby amidické.

3.2 Biologické hodnocení

Produkce LTB_4 byla stanovena v krysích polymorfonukleárních buňkách z pleurálního exudátu, který byl získán z horkem inaktivovaného krysího séra^{130,131}. Buňky byly stimulovány Ca^{2+} ionoforem A23187 (Sigma) a inkubovány s testovanými látkami v různých koncentracích. LTB_4 pak bylo stanovováno za použití komerčně dostupného RIA kitu (Amersham). *In vitro* aktivita byla vyjádřena jako koncentrace *C* (μ M) způsobující 50 % inhibici LTB_4 biosyntézy, která byla vypočtena pomocí lineární regrese. Pro výpočet *C* bylo použito šest bodů při různých koncentracích.

Pro studie vazby na LTB₄ receptor byla použita mírně modifikovaná metoda dle Chenga et al¹³². Membránové frakce byly připraveny ze samčí sleziny morčat; 2 mg membrány byly inkubovány s 0.3 nM ³H-LTB₄ ve 100 μl inkubované směsi při teplotě 25 °C po dobu 30 min. Nespecifická vazba byla měřena v přítomnosti 0.1 μM LTB₄. Membrány byly poté zfiltrány přes Whatman GF/C papír a třikrát promyty pufrům. Radioaktivita byla měřena na kapalném scintilačním spektrometru. Z výsledných hodnot byla získána specifická vazba ³H-LTB₄ na receptor. Vazebná aktivita byla vyjádřena v koncentracích C (μM), vypočtených pomocí lineární regrese, způsobujících 50 % inhibice LTB₄ vazby na receptor. Pro výpočet C bylo použito šest různých hodnot při různých koncentracích v obou *in vitro* pokusech. Všechny testy, včetně kontrol, byly provedeny dvakrát s vnitřní odchylkou ne vyšší než 10 % a experimentální data byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism (U.S.A.)

Inhibice carrageenového edému byla vyhodnocována metodou dle Wintera¹³³, experimentální podmínky jsou popsány v práci jiné¹³⁴. Velikost míry otoku byla vyjádřena jako ± hodnoty SD ne vyšší než 10 % a jako procento inhibice po dávce 100 mg/kg v porovnání s nezávislou kontrolou.

Ušní zánět vyvolaný kyselinou arachidonovou u myší byl prováděn metodou dle Opase¹³⁵, zánět ušního boltce byl vyvolán aplikací 20 μl roztoku arachidonové kyseliny v acetonu. Substance byly podávány perorálně (200 mg/kg) 1 h před vyvoláním otoku. Stupeň ušní hyperémie a váhy ucha, vyhodnocovaných 1 h po aplikaci roztoku kyseliny arachidonové, byly vyjádřeny jako ± hodnoty SD ne vyšší než 10 % a jako procentuální inhibice vztažená na neléčenou kontrolu.

Hodnocení antileukotrienových aktivit stejně jako hodnocení v obou modelech zánětu byla prováděna panem RNDr. Antonínem Janderou, CSc. a paní RNDr. Vladimírou Panajotovou, PhD na pracovišti RE&D VÚFB s.r.o., Praha 9, ČR.

Ulcerativní kolitida u myší¹³³ byla indukována přidavkem 3 % dextran síranu sodného do pitné vody BALB/c myším s průměrnou váhou 250 g po 7 dní. Testované látky byly podávány jako 0.5% vodné roztoky s (karboxymethyl)celulózou 1 h před vyvoláním ulcerativní kolitidy. Ta byla vyhodnocována klinicky (ztrátou váhy, nálezem rektálních prolapsů, nálezem krve ve stolici, konzistencí stolice), patologicky (krvácením do střeva, změnou délky střeva) jako poměr postižených a celkovým

počtem testovaných zvířat a nebo jako procentuální zastoupení proti kontrole, a histologicky (hodnocení pomocí skóre 0 až 3).

Hodnocení aktivit studovaných látek v modelu ulcerativní kolitidy bylo prováděno panem MUDr. Miloslavem Kverkou a paní. prof. MUDr. Helenou Tlaskalovou DrSc. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, Praha 4, ČR.

3.3 Hodnocení lipofility

Pro hodnocení celkové lipofility studovaných molekul byly použity hodnoty $\log P$, které byly získány výpočtem pomocí programu KOWWIN, ver. 1.63. Tento program využívá aditivity logaritmu rozdělovacího koeficientu a je založen na fragmentovém přístupu dle Lea a Hansche¹³⁶. Pro porovnání byly experimentálně stanoveny hodnoty kapacitních faktorů k , které byly získány metodou HPLC s reverzní fází. Jako stacionární fáze byl použit Thermoquest Hypersil ODS, mobilní fází byla směs acetonitrilu s pufrům o pH 5.75. V regresních rovnicích byl použit $\log k$, který je úměrný změnám Gibbsovy energie při separaci látky v chromatografickém systému.

3.4 Analýza kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou

K vzájemnému porovnání antileukotrienových aktivit, případně k optimalizaci struktury připravovaných látek byla použita metoda regresní analýzy^{137,138}, při čemž jako fyzikálně chemické parametry byly použity hodnoty $\log P$ a $\log k$ k charakterizaci lipofility a hodnoty substituentových polárních konstant σ ke kvantifikaci elektronových efektů. Regresní rovnice byly vypočteny pomocí programu Statgraphics Program U.S. Version 4 (STSC Inc., USA), při čemž k výpočtu regresních koeficientů byla použita vícenásobná regresní analýza. Statistická významnost rovnic byla hodnocena pomocí vícenásobného korelačního koeficientu r , standardní odchylky s , Fischer-Snedecorova kriteria F a jednotlivých regresních koeficientů pomocí Studentova t -testu. Hladina statistické významnosti p byla nižší nebo rovna 0.005 (výjimky jsou v textu uvedeny).

4 Diskuse

4.1 Hodnocení biologické aktivity

Všechny látky **1c-20c** byly podrobeny hodnocení antileukotrienové aktivity *in vitro* testováním inhibice LTB₄ biosyntézy jako měřítka inhibice enzymu 5-lipoxygenázy. První skupina derivátů aryloctové kyseliny **1c-8c** byla také podrobena testu afinity k LTB₄ receptorům, která je nutným předpokladem pro antagonistickou aktivitu k tomuto leukotrienu. Obě antileukotrienová hodnocení byla vyjádřena jako koncentrace IC₅₀ způsobující 50% inhibici LTB₄ biosyntézy nebo 50% vazbu na LTB₄ receptor. Fenethylamido deriváty **1c** a **2c**, nesubstituované methylem na N-atomu, jsou v modelu inhibice LTB₄ biosyntézy neúčinné, lze tedy předpokládat, že přítomnost terciárního dusíku pravděpodobně stimuluje antileukotrienovou aktivitu studovaných látek.

Tabulka 6. Souhrn biologického hodnocení série aryloctových kyselin

Látka číslo	Log P	Log k	vazba na LTB ₄ receptor		LTB ₄ biosyntéza		Carrag. edém % inhibice	Ušní edém	
			IC ₅₀ ^a	Log(1/IC ₅₀)	IC ₅₀ ^a	Log(1/IC ₅₀)		% inhibice	
							A ^b	B ^b	
1c	5.44	0.089	n.d.	-	>100 ^d	-	p > 0.05	23	0
2c	5.01	-0.079	n.d.	-	>100 ^d	-	p > 0.05	23	7.7 (s)
3b	5.16	0.166	17.5	4.757	40	4.398	39	20	p > 0.05
3c	5.65	0.287	4.7	5.328	20	4.699	30	44.5	p > 0.05
4b	4.73	0.013	67.0	4.174	>50 ^d	-	p > 0.05	14	p > 0.05
4c	5.22	0.120	8.6	5.065	32	4.495	0	21	p > 0.05
5c	6.20	0.470	1.1	5.959	10.0	5.000	14	44	p > 0.05
6c	6.20	0.471	0.7	6.180	10.5	4.979	p > 0.05	20	24.0
7c	6.54	0.468	1.7	5.770	14.5	4.839	39	35	0
8b	5.62	0.193	n.d.	-	n.d.	-	3!	38	p > 0.05
8c	6.11	0.354	1.9	5.721	9.5	5.022	27	37.5	p > 0.05
9b	5.81	0.253	2.4	5.620	16	4.796	12	20	p > 0.05
9c	6.30	0.364	1.2	5.921	11.2	4.951	32	23	p > 0.05
zileuton	n.d.	n.d.	>100 ^d	-	0.01 ^d	-	46	p > 0.05	13.0

^a v μM koncentracích; ^b inhibice A: edém ušního boltce, B: hyperémie ušního boltce
^c hodnoceno jako cyklohexylamoniová sůl; ^d nepočítáno do korelace
 nd ... pod mezí stanovení aktivity; (s) ... stimuluje

Studované arylalkanové kyseliny **1c-20c** byly také posléze testovány pro potvrzení protizánětlivého účinku ve dvou *in vivo* modelech zánětu, tj. v carrageenanem vyvolaném otoku u kryš a v ušním zánětu u myši vyvolaném arachidonovou kyselinou. Tyto účinnosti byly vyjádřeny jako procento inhibice ve srovnání s neléčenou kontrolní skupinou.

Tabulka 7. Souhrn biologického hodnocení série arylalkanových kyselin

Látka číslo	Log P	Log k	LTB4 biosyntéza		Carrag. edém	Ušní edém	
			IC50 ^a	Log(1/IC50)	% inhibice	% inhibice	
						A ^b	B ^b
10b ^c	5.58	0.344	100	4.000	9.2	19	3.7 (s)
10c	6.07	0.458	31	4.523	63	19	0
11b ^c	6.22	0.432	9.1	5.041	nd	nd	nd
11c	6.71	0.554	5.6	5.252	44	37	0
12b	6.02	0.324	11	4.959	61	23	3.7 (s)
12c	6.51	0.451	10	5.000	30	13	p > 0.05
13b	5.37	0.175	nd	-	26	12	7.4 (s)
13c	5.86	0.267	8.1	5.092	27	20	11.0 (s)
14b ^c	6.44	0.502	8.2	5.086	nd	nd	nd
14c	6.93	0.604	10	5.000	37	10	7.4
5a	6.02	0.231	9.5	5.022	36	12	p > 0.05
15b	6.51	0.451	12	4.921	30	13	p > 0.05
15c	7.00	0.600	16	4.796	38	22	p > 0.05
16a	6.44	0.380	19	4.721	14	14	3.7(s)
16b	6.93	0.636	7.5	5.125	nd	16	p > 0.05
16c	7.42	0.752	10	5.000	56	22	p > 0.05
17a	4.66	-0.089	20	4.699 ^d	38	16	p > 0.05
18a	5.31	0.081	47	4.328	43	9.4	p > 0.05
18b	5.81	0.336	8.5	5.071	13	21	3.7 (s)
18c	6.30	0.462	8.7	5.060	20	22	6.7
19a	4.88	-0.061	nd	-	10	23	0
19b	5.37	0.166	nd	-	20	16	p > 0.05
19c	5.86	0.274	13	4.886	5.5 (s)	23	0
20b	6.76	0.617	5.7	5.244	30	12	0
20c	7.25	0.755	5.6	5.252	22	26	p > 0.05
zileuton	n.d.	n.d.	0.01 ^d	-	46	p > 0.05	13.0

^a v μM koncentracích; ^b inhibice A:edém ušního boltce, B: hyperémie ušního boltce

^c hodnoceno jako cyklohexylamoniová sůl; ^d nepočítáno do korelace

nd ... pod mezí stanovení aktivity; (s) ... stimuluje

Vybrané látky (celkem 21 substancí) byly rovněž podrobeny hodnocení protizánětlivé aktivity v *in vivo* modelu ulcerativní kolitidy vyvolané dextransulfátem sodným u myší. jako standard byl používán sulfasalazin. Hodnocení ulcerativní kolitidy bylo vyjádřeno klinicky (ztráta váhy, vznik rektálního prolapsu, nález krve ve stolici, konzistence stolice), patologicky (sledování krvácení do tlustého střeva, měření délky střeva) a histologicky. Výsledky hodnocení studovaných potenciálních antileukotrienik a protizánětlivé účinnosti jsou shrnuty v tabulkách 6 a 7, hodnoty dokumentující účinek v modelu ulcerativní kolitidy jsou znázorněny v tabulce 8.

Tabulka 8. Souhrn hodnocení v modelu ulcerativní kolitidy

Látka číslo	Stolice	Rektální prolaps	Střevní krvácení		Ztráta váhy (%)	Délka střeva (%)	Histologie
			small	large			
2c	2/5	0/5	0/5	4/5	19.7	82	1.6
3c	3/5	0/5	0/5	2/5	15.6	106	1.3
5c	4/5	0/5	0/5	3/5	8.6	109	1.5
6c	2/5	0/5	0/5	3/5	21.4	92	1.1
7c	1/5	0/5	0/5	1/5	4.1	122	1.5
8b	2/5	0/5	0/5	3/5	16.5	111	1.0
8c	0/5	0/5	0/5	0/5	15.6	118	0.5
9b	5/5	0/5	0/5	5/5	25.5	86	1.7
10c	5/5	0/5	1/5	5/5	19.9	93	1.4
11c	0/5	0/5	0/5	3/5	17.7	97	1.2
12b	4/5	0/5	0/5	5/5	27.0	84	2.1
13b	5/5	0/5	5/5	5/5	32.6	80	2.2
13c	3/5	0/5	0/5	5/5	19.9	85	1.7
15a	4/5	0/5	0/5	5/5	17.0	96	1.4
15c	3/5	0/5	0/5	5/5	20.6	87	1.3
16b	5/5	0/5	0/5	3/5	95.0	95	1.3
16c	0/5	0/5	0/5	3/5	16.3	99	1.0
17a	0/5	0/5	0/5	1/5	9.9	112	0.5
19a	2/5	0/5	0/5	2/5	16.3	98	1.3
19c	4/5	0/5	0/5	5/5	21.5	82	1.3
20c	1/5	0/5	0/5	4/5	19.2	92	1.2
kontrola	5/5	1/5	2/5	5/5	17.4	100	1.5
sulfasalazin	2/5	0/5	0/5	4/5	16.6	102	1.3

4.2 QSAR analýza

4.2.1 Hodnocení lipofility

Pro hodnocení celkové lipofility studovaných molekul byly použity jednak hodnoty $\log P$, jednak $\log k$, získané metodou RP HPLC. Vztahy mezi vypočtenými hodnotami $\log P$ v systému *n*-oktanol-voda a experimentálními hodnotami $\log k$ jsou vyjádřeny rovnicemi **1** a **2**, kde n_1 je počet aryloctových kyselin **1c-8c** a n_2 je počet arylalkanových kyselin **9b-20c** použitých pro korelace, r , s a F jsou statistická kritéria. Regresní rovnice **1** nevykazuje žádné systematické odchylky od linearity, stejně tak i rovnice **2**. Můžeme tedy tvrdit, že se intramolekulární hydrofobní interakce aromatických kruhů neuplatňují při chromatografickém dělení, neboť při výpočtu hodnot $\log P$ nejsou žádné korekce na intermolekulární hydrofobní vazby uvažovány.

$$\log k = 0.299 (\pm 0.109) \log P + 1.457 (\pm 0.625) \\ n_1 = 13, r = 0.925, s = 0.068, F = 72.0, p = 0.01 \quad (1)$$

$$\log k = 0.305 (\pm 0.052) \log P - 1.490 (\pm 0.320) \\ n_2 = 25, r = 0.966, s = 0.058, F = 336.4, p = 0.005 \quad (2)$$

Použití polárních konstant σ_1 substituentů na fenethylovém jádře a indikátorové proměnné I_{NH} , která charakterizuje přítomnost methylu na atomu dusíku v amidické skupině, jak je vidno v regresní rovnici **3**, výrazně upřesňuje vztah mezi oběma lipofilními parametry pro aryloctové deriváty **1c-8c**. Příčiny častých nepřesností v korelacích mezi $\log P$ a logaritmem retenčního faktoru již byly mnohokrát řešeny^{139,140,141,142}. V regresní rovnici arylalkanových derivátů **9b-20c** zavedení σ konstant substituentů na aromatickém jádře arylalkanových kyselin korelaci nijak výrazně nevylepšilo.

$$\log k = 0.273 (\pm 0.075) \log P + 0.141 (\pm 0.099) I_{\text{NH}} - 0.230 (\pm 0.226) \sigma_1 - 1.422 (\pm 0.404) \\ n = 13, r = 0.973, s = 0.041, F = 73.2, p = 0.01 \quad (3)$$

Kombinací 35 látek (NH deriváty **1c** a **2c** nebyly součástí korelace pro praktický žádný účinek) byla získána regresní rovnice **4**. Tentokrát zavedení σ konstant substituentů na fenethylovém aromatickém kruhu není statisticky významné

na hladině $p = 0.005$, pravděpodobně vzhledem k malému počtu takto substituovaných látek v hodnocené sérii.

$$\log k = 0.294 (\pm 0.041) \log P - 1.420 (\pm 0.252)$$

$$n = 36, r = 0.964, s = 0.056, F = 456.3, p = 0.005 \text{ (4)}$$

4.2.2 Regresní analýza antileukotrienových aktivit

4.2.2.1 Inhibice vazby na LTB₄ receptor

Rovnice **5** a **6** byly odvozeny pro inhibici vazby na LTB₄ receptor; hodnota IC_{50} značí koncentraci, která způsobí 50% inhibici vazby LTB₄ na receptor. Z obou rovnic je zřejmé, že parabolická závislost na lipofilitě je statisticky významnější než závislost lineární. Jelikož tato účinnost byla hodnocena pouze ve skupině aryloctových kyselin **1c-8c**, bude jí věnována samostatná část. Optimální hodnota lipofility vypočtená pomocí rovnice **6**, $\log P_{opt}$ je rovna 6.57. Neaktivní fenethylamino deriváty **1c** a **2c** nebyly do regresní analýzy zařazeny

$$\log (1/IC_{50}) = 0.993 (\pm 0.429) \log P - 0.301$$

$$n = 10, r = 0.932, s = 0.226, F = 60.4, p = 0.01 \text{ (5)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 7.044 (\pm 5.279) \log P - 0.536 (\pm 0.467) (\log P)^2 - 17.199 (\pm 14.785)$$

$$n = 10, r = 0.963, s = 0.169, F = 57.9, p = 0.05 \text{ (6)}$$

4.2.2.2 Inhibice biosyntézy LTB₄

Rovnice **7** a **8** byly odvozeny pro inhibici biosyntézy LTB₄ v sérii aryloctových kyselin. V rovnicích **7** a **8** je IC_{50} hodnota koncentrace působící 50% inhibici biosyntézy LTB₄. Optimální hodnota lipofility, $\log P_{opt}$ je tentokrát rovna 6.24 a byla stejně jako v předchozím případě spočítána z parabolické závislosti vyplývající z rovnice **8**. Jak vidno leží velmi blízko předchozímu optimu. Opět nejsou v regresní analýze zahrnuty neaktivní látky **1c** a **2c**.

$$\log (1/IC_{50}) = 0.411 (\pm 0.287) \log P + 2.369 (\pm 1.703)$$

$$n = 9, r = 0.869, s = 0.112, F = 25.1, p = 0.01 \text{ (7)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 5.936 (\pm 5.627) \log P - 0.476 (\pm 0.471) (\log P)^2 - 13.549$$

$$n = 9, r = 0.954, s = 0.068, F = 41.1, p = 0.01 \text{ (8)}$$

Ve skupině derivátů **9b-20c** bylo zjištěno, že přítomnost methylu v α -poloze na karboxylu značně ovlivňuje inhibici LTB₄ biosyntézy. Vliv methylu se neprojevuje pouze v mírném navýšení aktivity, ale také posunem optima lipofility k vyšším hodnotám. A tak měla dosažená celková regresní analýza všech studovaných substancí nízkou statistickou významnost ($r < 0.7$). Rozdělení do dvou skupin arylalkanových kyselin lišících se ne/přítomností zmiňovaného α -methylu na nosiči karboxylu se nakonec ukázalo jako nutné pro dosažení odpovídajících regresních rovnic. Získány byly dvě rovnice **9** a **10**, první pro α -nesubstituované a druhá pro α -methyl substituované deriváty. Optimální hodnoty lipofility vyjádřené pomocí $\log P_{opt}$ byly dle regresních rovnic spočítány na 6.29 (rovnice **9**) a 6.98 (rovnice **10**). Z rovnic se dá také vypočítat odpovídající optimum účinností $\log (1/IC_{50})_{opt}$, které činí 5.09, resp. 5.17. Tento posun nelineárních závislostí vysvětluje proč se nepodařilo zlepšit statistickou významnost závislosti na lipofilitě použitím linearizovaného bixponenciálního modelu¹⁴³. Dalším důvodem je pravděpodobně asymetrické uspořádání experimentálních dat na ose lipofility.

$$\log (1/IC_{50}) = 8.657 (\pm 6.826) \log P - 0.688 (\pm 0.530) (\log P)^2 - 22.144 (\pm 20.146)$$

$$n = 10, r = 0.877, s = 0.108, F = 16.0, p = 0.005 \text{ (9)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 8.343 (\pm 7.284) \log P - 0.597 (\pm 0.557) (\log P)^2 - 23.979 (\pm 23.706)$$

$$n = 11, r = 0.896, s = 0.170, F = 21.4, p = 0.01 \text{ (10)}$$

Zvětšením celé skupiny α -nesubstituovaných kyselin o skupinu aryloctových kyselin dostaneme regresní analýzou rovnicí **11**. Dosažená statistická významnost je lepší než u rovnice **7**, optimum lipofility přitom zůstává téměř stejné, $\log P_{opt}$ je rovna 6.27. Tato společná rovnice vyjadřující závislost na lipofilitě vypovídá alespoň o stejném místě účinku obou skupin.

$$\log (1/IC_{50}) = 6.574 (\pm 3.284) \log P - 0.524 (\pm 0.274) (\log P)^2 - 15.621 (\pm 9.820)$$

$$n = 19, r = 0.891, s = 0.102, F = 36.6, p = 0.005 \text{ (11)}$$

Porovnání kvadratických rovnic **6** a **8** v sérii aryloctových ukazuje rozdílné vlastnosti vzestupné části paraboly. Bylo proto provedena hodnocení vzestupné lineární části vztahů obou aktivit na lipofilitě. Pro inhibici vazby na LTB₄ receptor byla pro vzestupnou lineární část paraboly získána rovnice **12**. Rovnice **13** odpovídá vzestupné lineární části pro inhibici biosyntézy LTB₄. Směrnice těchto lineárních

závislostí naznačují, že oba modely (rovnice **12** a **13**), mají jiné místo účinku, neboť změna Gibbsovy energie intermolekulárních hydrofobních interakcí je v obou místech očividně různá.

$$\log (1/IC_{50}) = 1.184 (\pm 0.370) \log P + 1.321 (\pm 2.093) \\ n = 8, r = 0.976, s = 0.145, F = 140.8, p = 0.01 \text{ (12)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 0.604 (\pm 0.064) \log P + 1.282 (\pm 1.012) \\ n = 5, r = 0.991, s = 0.025, F = 213.2, p = 0.01 \text{ (13)}$$

Použitím naměřených hodnot $\log k$ vede k rovnicím **14**, **15** a **16**, které mají nízkou celkovou statistickou významnost ve srovnání s rovnicemi **8**, **9** a **10**.

Kvadratické členy rovnic **14** a **15** mají také významně nižší hladinu statistické významnosti ($p = 0.2$). Tato diskrepance může být pravděpodobně vysvětlena faktem, že hodnoty $\log k$ neúplně charakterizují lipofilitu studovaných látek.

$$\log (1/IC_{50}) = 4.491 (\pm 4.490) \log k - 4.912 (\pm 4.411) (\log k)^2 + 3.930 (\pm 0.960) \\ n = 9, r = 0.865, s = 0.113, F = 12.8 \text{ (14)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 6.467 (\pm 6.398) \log k - 5.336 (\pm 4.931) (\log k)^2 - 4.129 (\pm 0.760) \\ n = 10, r = 0.936, s = 0.220, F = 32.7 \text{ (15)}$$

$$\log (1/IC_{50}) = 5.442 (\pm 3.058) \log k - 6.734 (\pm 4.501) (\log k)^2 + 3.907 (\pm 0.482) \\ n = 19, r = 0.841, s = 0.123, F = 22.8, p = 0.005 \text{ (16)}$$

5 Závěry

V rámci disertační práce bylo celkem připraveno několik desítek sloučenin, z nichž většina nebyla dosud popsána v literatuře. Produkty byly charakterizovány teplotami tání, elementární analýzou, ^1H NMR popř. ^{13}C NMR spektry. Všechny látky byly testovány alespoň v jednomu modelu antileukotrienové aktivity a alespoň v jednom z modelů zánětu. Byly provedeny QSAR analýzy vztahů účinků jednotlivých substancí vzhledem k jejich vypočtené i experimentálně získané hodnotě lipofility.

V předchozí kapitole uvedené regresní závislosti naznačovaly, že nejúčinnější budou deriváty 2-arylpropanové kyseliny **1**, **2** či **11**, jejichž lipofilita se velmi blíží té spočítané $\log P_{opt}$ (= 6.97). Ale celkově strukturální změny na nosiči karboxylu studovaných substancí nevykázaly podstatný nárůst inhibice LTB_4 biosyntézy ve srovnání obou skupin derivátů.

Vztahy mezi jednotlivými účinnostmi, hlavně pokud jsou hodnoceny v různých *in vitro* a *in vivo* modelech, mohou být značně ovlivněny různými mechanismy transportu biologickým systémem. Přesto, alespoň v případě protizánětlivých účinků hodnocených *in vivo*, lze konstatovat, že látky účinné v modelech zánětu jsou také účinné v léčbě ulcerativní kolitidy. Toto potvrzují látky **3c**, **7c**, **8c**, **11c**, **16c**, **19a** a **20c**. Bohužel látka **6c** patřící mezi ty účinné v ulcerativní kolitidě, tuto teorii plně nepodporuje. Navíc možný vztah inhibice LTB_4 biosyntézy a ulcerativní kolitidy úplně bourá látka **17a**, která je vysoce účinná v modelu UC, ale téměř neúčinná v inhibici LTB_4 biosyntézy. S ohledem na blízké hodnoty $\log P$, zde nemůže hrát roli transport na místo účinku, a tak tím nelze rozumně vysvětlit objevené odchylky. Některé připravené substance jsou účinné v řádech 10^{-5} až 10^{-7} molárních inhibičních koncentracích (IC_{50}) v obou antileukotrienových aktivitách. Několik již zmiňovaných látek, konkrétně **6c**, **7c**, **8c**, **11c**, **16c** a **20c**, které jsou silně aktivní v inhibici UC jsou taktéž značně účinné v antileukotrienových testech. Také v tomto případě existují výjimky a látky **5c**, **9c**, **13c**, **18b** a **20b** nejsou aktivní v modelu UC, přestože jsou to účinná antileukotrienika v obou *in vitro* testech.

Lze konstatovat, že na určité kvalitativní hladině existuje vztah mezi účinnostmi LTB_4 biosyntézy a účinkem v modelu ušního zánětu, a tedy prvně jmenovaný je podmínkou pro inhibici ušního zánětu. Jedním z možných vysvětlení může být přítomnost další funkční skupiny, např. karboxylu a její pozitivní vliv na

inhibici UC, ale ne tak na dalších dva zbývající modely. Lze také konstatovat, že pokud existuje vztah mezi inhibicí LTB₄ biosyntézy a inhibicí ulcerativní kolitidy, je možná překryt dalším možným mechanismem patologického procesu.

Nicméně v prezentované relativně malé skupině látek se najde hned několik, které vykazují vyšší (**7c**, **8c**, **11c**, **16c**, **17a**, **20c**), a nebo stejnou (**3c**, **6c**, **8b**, **19a**) účinnost v inhibici UC jako standard sulfasalazin.

6 Souhrn

Byla připravena série derivátů arylalkanových kyseliny obsahující methyl(fenethyl)amino skupinu a byly hodnoceny jejich antileukotrienové aktivity úzce související s LTB₄. Regresní analýza první skupiny derivátů arylotové kyseliny ukázala silnou závislost účinností těchto látek na lipofilitě jak v inhibici vazby na LTB₄ receptor, tak v inhibici LTB₄ biosyntézy. Byly získány parabolické závislosti. Hodnoty sklonu vzestupných lineárních částí těchto závislostí ukazují, že existují dva různé typy hydrofobních vazeb v místě interakce ligandu s příslušnou biomakromolekulou v obou modelech. Regresní analýzy α -methyl a α -nesubstituovaných derivátů alkanových kyselin nevykázaly výrazně rozdílné parabolické závislosti aktivit na lipofilitě. Závislost získaná pro α -nesubstituované alkanové kyseliny rozšířená o skupinu derivátů arylotových kyselin byla beze změn regresních koeficientů a statistické významnosti. Lze říci, že nejaktivnějšími jsou deriváty 2-arylpropanové kyseliny s lipofilitou blízkou $\log P_{opt}$, které činí 6.98. Protizánětlivá aktivita studovaných látek byla vyhodnocena ve třech zvířecích modelech zánětu a bylo sledováno jejich případné využití v terapii ulcerativní kolitidy. Lze tvrdit, že na určitém kvantitativní hladině existuje vztah mezi aktivitou v modelu inhibice LTB₄ biosyntézy a aktivitou v modelu ušního uánětu a prvně jmenovaná je podmínkou druhé. Možný vztah mezi inhibicí LTB₄ biosyntézy a inhibicí ulcerativní kolitidy je vážně narušen látkou **8a**, která obsahuje jako další funkční skupinu jeden karbonyl navíc.

7 Summary

A series of arylalkanoic acids derivatives bearing methyl(phenethyl)amino groups were prepared and their antileukotrienic activities involving LTB₄ were evaluated. Regression analysis of the first group of derivatives of arylacetic acid has shown a strong dependence of these activities on lipophilicity for both LTB₄ receptor binding and inhibition of LTB₄ biosynthesis, parabolic relationships were derived. The values of slopes of the ascending linear parts of these dependences indicate various types of hydrophobic binding at the site of ligand interaction with relevant biomacromolecules. Regression analysis showed the slightly different parabolic dependences of this activity on lipophilicity of α -methyl and α -unsubstituted alkanolic acids derivatives. The relationship derived for α -unsubstituted alkanolic acids extended by group of similar derivatives of arylacetic acids was without any change of regression coefficients and statistical criteria. It was concluded, that the most active compounds belong to 2-arylpropanoic acids derivatives with lipophilicity close to $\log P_{opt}$ (= 6.98). The antiinflammatory effect of the compounds under study was evaluated in three animal models of inflammation and their possible utilization in the treatment of ulcerative colitis was followed. It can be stated that the relation between inhibitory activities of LTB₄ biosynthesis and of ear lobe edema exists on some qualitative level and the first one is the prerequisite for ear edema inhibition. Possible relation between LTB₄ biosynthesis inhibition and ulcerative colitis is seriously broken by the compound **8a** including carbonyl as the additional functional group.

8 Seznam publikovaných prací

Publikace

Junek R., Kuchař M.: The use of antileukotrienes with N-methylphenethyl arylacetamido fragment in the treatment of ulcerative colitis (UC). *Inflamm. Res*, 52, Supl. 2, 125 (2003)

Kuchař M., Kmoníček V., Panajotova V., Jandera A., Brůnová B., Junek R., Bucharová V., Čejka J., Šatínský D.: Derivatives of phenylsulfanyl benzoic acids with multiple antileukotrienic activity; *Coll. Czech. Chem. Commun.* 69, 2098 (2004).

Kuchař M., Brůnová B., Junek R., Rödling R., Hájiček J., Panajotová V., Jandera A.: The antileukotrienic derivatives and homologues of (quinolin-2-ylmethoxy)sulfanylbenzoic acids with reduced lipophilicity; *Coll. Czech. Chem. Commun.* 70, 1357 (2005)

Junek R., Brůnová B., Kverka M., Panajotova V., Jandera A., Kuchař M.: Antileukotrienic N-arylethyl-2-arylacetamides in the treatment of ulcerative colitis. *Eur J Med Chem.* 27, 2007 (v tisku)

Junek R., Kverka M., Jandera A., Panajotová V., Šatínský D., Macháček M., Kuchař M.: Antileukotrienic phenethylamido derivatives of arylalkanoic acids in the treatment of ulcerative colitis. *Eur J. Med. Chem.* 2007 (v tisku)

Jirman J., Junek R., Lustig P., Richter J., Plaček L.: Způsob přípravy solifenacinu. (patent) PV 2006-407, 2006.

Junek R., Jirman J.: Způsob přípravy (1S)-(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]okt-3-yl 3,4-dihydro-1-fenyl-2(1H)-isochinolinkarboxylátu (solifenacinu). (patent) PV 2006-828, 2006.

Příspěvky prezentované na mezinárodních vědeckých konferencích

Kuchař M., Junek R.: Research and development of antileukotrienes for the treatment of inflammatory bowel diseases (poster). *12th International Conference on Advances in PG, LT and other Bioactive Lipid Research*, 25.-29. srpen 2002, Istanbul, Turecko

Junek R., Kuchař M.: The use of antileukotrienes with N-methylphenethyl arylacetamido fragment in the treatment of ulcerative colitis (poster), *6th World Congress on Inflammation*, 2. – 6. srpen 2003, Vancouver, Kanada

Junek R., Brůnová B., Panajotová V., Jandera A., Kuchař M.: Derivatives of antileukotrienic (Quinolin-2-ylmethoxy)sulfanyl benzoic acids with reduced lipophilicity (poster), *2nd International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 10 – 14. říjen 2004, Antalya, Turecko

Příspěvky prezentované na domácích vědeckých konferencích

Kučař M., Junek R., Jandera A., Panajotová V., Palát K., Sokol D., Tlaskalová H.: Výzkum a vývoj antileukotrienik v léčbě ulcerativní kolitidy (poster). 31. *konferencia „Syntéza a analýza liečiv“*, 11.- 13. září 2002, Bratislava, Slovenská Republika

Junek R., Kučař M., Panajotová V., Sokol D., Rossmann P., Tlaskalová H.: Pokroky ve výzkumu a vývoji antileukotrienik v léčbě ulcerativní kolitidy (přednáška). 32. *konference „Syntéza a analýza léčiv“*, 16. – 19. září 2003, Velké Karlovice, Česká Republika
Junek R., Jandera A., Panajotová V., Kverka M., Kučař M.: Fenethylarylacetamido deriváty aryloctových kyselin s antileukotrienovým účinkem v léčbě ulcerativní kolitidy (poster), 57. *sjezd chemických společností*, 4. – 8. září 2005, Tatry, Slovenská Republika

9 Literatura

1. Stenson W.F. Arachidonic Acid Metabolites in Inflammatory Bowel Disease. In: Claudio Fiocchi, eds. *Cytokines in Inflammatory Bowel Disease*. R.G. Landes Company: Liss: 157-176.
2. Denis E.A. Cell activation and signal initiation: Receptor and phospholipase control of inositol phosphate, PAF and eicosanoid production. In: E.A. Denis, A. Hunter, and M. Berridge, eds. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology-New Series*, New York: Liss: 1989:106
3. Clark J.D., Milona N., Knopf J.L. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from human monocytic cell line U937. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:7708-7712
4. Lauritsen K., Laursen L.S., Bukhave K., Rask-Madsen J. Inflammatory intermediaries in inflammatory bowel disease. *Int. J. Color. Dis.* 1989; 4:75-90
5. Eberhart C.E., Dubois, R.N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995; 109:285-301
6. Nielsen C.E., Rask-Madsen J. Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996; 31(Suppl. 216):149-159
7. Krause W, Dubois R.N. Eicosanoids and the large intestine. *Prostaglandins Other Lipid Med.* 2000; 61:145-161
8. Needleman P., Turk J., Jakschik B.A. et al. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 1986;55:69-102
9. Harris R.R., Carter G.W., Bell R.L., Moore J.L., Brooks D.W. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int. J. Immunopharmac.* 1995; 17:147-156
10. Henderson W.R. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Int. Med.* 1994; 121:684-697
11. Sigal E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol.* 1991;260:L13-L28
12. Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220:568-575
13. Piper, P.J. Formation and action of leukotrienes. *Physiol. Rev.* 1984; 64:744-761
14. Rouzer C.A., Matsumoto T., Samuelsson B. Single protein from human leukocytes processes 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:857-861.
15. Dahlen S.E., Hedqvist P., Hammarstrom S. et al. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 1980;288:484-486
16. Murphy R.C., Hammerström S., Samuelsson B. Leukotriene C, a slow reacting substance (SRS) from murine mastocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76:4274-4279
17. Maclouf J., Folco G., Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constructive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb. Haemost.* 1998; 79:691-705
18. Stenson W.F., Chang K., Williamson J.R. Tissue differences in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ in the rat. *Prostaglandins* 1986;32:5-17

19. Samuelsson B., Borgeat P., Hammerström S., Murphy R.C. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. *Prostaglandins* 1979;17:785-7
20. Ford-Hutchinson A.W. Leukotriene antagonist and inhibitors: clinical applications. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 1995; 23:69-74
21. Krause W., Dubois R.N. Eicosanoids and the small intestine. *Prostaglandins Other Lipid Med.* 2000; 61:125-143
22. Ricote M., Li A.C., Wilson T.M., Kelly C.J., Glass C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391:79-82
23. Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doing M.V. et al. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980;286:264-265
24. Hartus R.R., Carter G.W., Bell R.L., Moore J.L., Brooks D.W. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int. J. Immunopharmac.* 1995; 17, 2:147-156
25. Rask-Madsen J., Bukhave K., Larsen L.S., Lauritsen K. 5-lipoxygenase inhibitors in ulcerative colitis. *Lancet* 1990;335:683-685.
26. Belch J.J. Eicosanoids and rheumatology: inflammatory and vascular aspects. *Prostaglandins Leukot. Essent. fatty Acids* 1989; 36:219-234
27. Fogh K., Hertlin T. et al. Eicosanoids in acute and chronic psoriatic lesions: leukotriene B₄, but not 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, is present in biologically active amounts in acute guttate lesions. *J. invest. Dermat.* 1989; 92:837-841
28. Shumert R., Towner J. et al. Role of eicosanoids in human and experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 1988; 33(suppl. 3):58S-64S.
29. Ellis E.F. Asthma. In *MSD kompendium klinické medicíny*. R. Berkow, A.J. Fletcher, Eds., str. 2108-2117, 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
30. Lasley M. New treatments for asthma. *Pediatrics in Review* 2003;24(7):222-232
31. Drazen J.M., Austen K.F. et al. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D *in vivo* and *in vitro*. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77:4354-4358
32. Dahlen S.E., Bjork J. et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: *in vivo* effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78:3887-3891
33. Bisgaard H., Groth S. Bronchial effects of leukotriene D₄ inhalation in normal human lung. *Clin. Sci.* 1987; 72: 585-592
34. Marom Z., Shelhamer J.H. et al. Slow-reacting substances, leukotrienes C₄ and D₄, increase the release of mucus from human airways *in vitro*. *Am. Rev. resp. Dis.* 1982; 126:449-451
35. Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A. et al. Lipoxygenase products and the polymorphonuclear leukocyte. *Agents Actions* 1980; 10:548-550
36. Zarkiewski J.T., Barnes N.C. The detection of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products in sputum of patients with chronic bronchitis and bronchiectasis. *Prostaglandins* 1987; 33:663-674
37. Schwartzberg S.B., Shelov S.P. Blood leukotriene levels during acute asthma attack in children. *Prostaglandins Leukot. Med.* 1983;20:1-13
38. Shumacher H.R. Revmatoidní artritida. In *MSD kompendium klinické medicíny*. R. Berkow, A.J. Fletcher, Eds., str. 1158-1165, 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ

39. Hecker M., Foegh M.L., Ramwell P.W. Eikosanoidy: prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny a další příbuzné sloučeniny. In Základní & klinická farmakologie. Katzung B.G., Eds, str. 273-285, 1995, Prentice Hall International, Inc.
40. Greaves M.W., Camp R.D. Prostaglandins, leukotrienes, phospholipase, platelet activating factor, and cytokines: an integrated approach to inflammation of human skin. Arch. Dermatol Res. 1988;280(suppl.):S33-S41
41. Voorhees J.J. Leukotrienes and other lipoxygenase products in the pathogenesis and therapy of psoriasis and other dermatoses. Arch. Dermatol. 1983; 119:541-547
42. Soter N.A., Lewis R.A. et al. Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄ and LTB₄) in human skin. J. Invest. Dermatol 1983; 80:115-119
43. Walfish J.S., Sachar D.B. Chronická zánětlivá onemocnění střev. In MSD kompendium klinické medicíny. R. Berkow, A.J. Fletcher, Eds., str. 733-742, 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
44. Stenson W.F. Role of eicosanoids as mediators of inflammation in inflammatory bowel disease. Scand. J. Gastroenterol. 1990; 172 (suppl.):13-18
45. Rask-Madsen J., Bukhave K. et al. 5-lipoxygenase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease. Agents Actions 1992 (special issue): C37-C45
46. Gould S.R. Letter: Prostaglandins, ulcerative colitis, and sulphasalazine. Lancet 1975;2:988
47. Sharon P., Ligumsky M., Rachmilewitz D., Zor U. Role of prostaglandins in ulcerative colitis, enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine, Gastroenterology 1978; 75:638-640
48. Ligumsky M., Karmeli F., Sharon P, Zor U., Cohen F., Rachmilewitz D. Enhanced thromboxane A₂ and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. Gastroenterology 1981; 81:444-449
49. Sharon P., Stenson W.F. Enhanced synthesis of leukotriene B₄ by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1984; 86:453-460
50. Lauritsen K., Laursen L.S., Bukhave K., Rask-Madsen J. In vivo profiles of eicosanoids in ulcerative colitis, Crohn's colitis, and *Clostridium difficile* colitis. Gastroenterology 1988; 95:11-17
51. Lauritsen K. Drug treatment and formation of eicosanoids in patients with chronic inflammatory bowel disease. Dan. Med. Bull. 1989;36:378-393
52. Lauritsen K., Laursen L.S., Bukhave K., Rask-Madsen J. Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. Gastroenterology 1986; 91:837-844
53. Lauritsen K., Laursen L.S., Bukhave K., Rask-Madsen J. In vivo effects of orally administered prednisolone on prostaglandin and leukotriene production in ulcerative colitis. Gut 1987; 28: 1095-1099
54. Dreyling K.W., Kozuschek W., Shaarschmidt K., Goebell H., Peskar B.M. Role of endogenous leukotriene system in chronic inflammatory bowel disease. Prostaglandins Clin. Res. 1987; 242:309-315
55. Lauritsen K., Laursen L.S., Bukhave K., Rask-Madsen J. Use of colonic eicosanoid levels as predictors of relapse in ulcerative colitis: double blind placebo controlled study on sulphasalazine maintenance treatment. Gut 1988; 29:1316-1321

56. Samuelsson B., Dahlen S.E. Leukotrienes and lipoxines: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987; 237: 1171-1176
57. Samuelsson B., Claesson H.E. Leukotriene B₄: biosynthesis and role in lymphocytes. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 1990; 20: 1-13
58. Hartus R.R., Carter G.W., Bell R.L., Moore J.L., Brooks D.W. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int. J. Immunopharmac* 1995; 17 (2):147-156
59. Cohen N., Yagaloff K.A: Recent progress in the development of leukotriene B₄ antagonists. *Curr. Opin. Inv. Drugs* 1994; 3: 13-22
60. Yokomizo T., Izumi T., Chang K., Takuwa Y., Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 1997;387:620-624
61. Kato K., Yokomizo T., Izumi T., Shimizu T. Cell specific transcriptional regulation of human leukotriene B(4) receptor gene. *J. Exp. Med.* 2000;192:413-420
62. Yokomizo T., Kato K., Terawaki K., Izumi T., Shimizu T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* 2000;192:421-431
63. Kamohara M., Takasaki J., Matsumoto M., Saito T., Ohishi T., Ishii H., Furuichi K. Molecular cloning and characterization of another leukotriene B₄ receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:27000-27004
64. Tryselius Y., Nilsson N.E., Kotarsky K., Olde B., Owman C. Cloning and characterization of cDNA encoding a novel human leukotriene B₄ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;274:377-382
65. Yokomizo T., Kato K., Hagiya H., Izumi T., Shimizu T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B₄ receptor, BLT₂. *J. Biol. Chem.* 2001;276:12454-12459
66. Labat C., Ortiz J.L. et al. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 1992; 263: 800-805
67. Heise C.E., O'Dowd B.F., Figueroa D.J., Sawyer N., Nguyen T., Im D.-S., Stocco R., Bellefeuille J.N., Abramovitz M., Cheng Jr., Williams R., Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M.K., Coulombe N., Liu Y., Austin C.P., George S.R., O'Neil G.P., Metters K.M., Lynch K.P., Evans J.F. Characterization of human cysteinyl leukotriene 2 (CysLT₂) receptor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:30531-30536
68. Lynch K.R., O'Neill G.P., Liu Q., Im D.S., Sawyer N., Metters K.M., Coulombe N., Abramowitz M., Figueroa D.J., Zeng Z., Connolly B.M., Bai C., Austin C.P., Chatauneuf A., Socco R., Greig G.M., Kargman S., Hooks S.B., Hosfield E., Williams D.L. Jr., Ford-Hutchinson A.W., Caskey C.T., Evans J.F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysTL₁ receptor. *Nature* 1999;399:789-793
69. Nothacker H.P., Wang Z.W., Zhu Y.H., Reinscheid R.K., Lin S.H.S., Civelli O. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol. Pharmacol.* 2000;58:1601-1608
70. Sarau H.M., Ames R.S., Chambers J., Ellis C., Elshoubagy N., Foley J.J., Schmidt D.B., Muccitelli R.M., Jenkins O., Murdock P.R., Herrity N.C., Halsey W., Sathe G., Muir A.I., Nuthulaganti P., Dytko G.M., Buckley P.T., Willson S., Bergsma D.J., Hay D.W. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol. Pharmacol.* 1999;56:657-663

71. Takasaki J., Kamohara M., Matsumoto M., Saito T., Sugimoto T., Ohishi T, Ishii H., Ota T., Nishikawa T., Kawai Y., Masuho Y., Isogai T., Suzuki Y., Sugano S., Furuichi K. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT₂ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;274:316-322
72. Haeggström J.Z., Wetterholm A. Leukotriene mediators. *Handbook of Cell Signaling* 2003;chapter 168:275-280
73. Percival M.D: Human 5-lipoxygenase contains an essential iron. *J. Biol. Chem.* 1991;266:10058-10061
74. Rådmark O. Mutagenesis studies of mammalian lipoxygenase. In *Molecular and Cellular Basis of Inflammation*, C.N. Serhan and P.A. Ward, Eds., pp. 93-108. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
75. Brooks C.D.W., Summers J.B. Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J. Med. Chem.*, 1996;39: 2629-2654.
76. Gillmor S.A. Villaseñoe A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipase and the determinants of structure specificity. *Nature Struct. Biol.* 1997;4:1003-1009
77. Hammarberg T., Provost P., Persson B., Rådmark O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 2000;275:38787-38793
78. Werz O., Klemm J., Samuelsson B., Rådmark O. 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:5261-5266
79. Augstein, J.; Farmer, J.B.; Lee, T.B.; Sheard, P.; Tattersall, M.L. Selective inhibitor of slow reacting substance of anaphylaxis. *Nat. New Biol.*, 1973, 245, 215
80. Jones D.G., Kay A.B. Inhibition of eosinophil chemotaxis by the antagonist of slow reacting substance of anaphylaxis--compound FPL 55712. *J. Pharm. Pharmacol.* 1974;26:917-918
81. Corey E.J., Cashman J.R., Kantner S.S., Wright S.W. Rationally Designed, Potent Competitive Inhibitors of Leukotriene Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 1503-1504.
82. Bell R.L., Zouny P.R., et al. The discovery and development of zileuton: an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *Int. J. Immunopharmac.* 1992; 14:5050-510
83. Carter G.W., Zouny P.R. et al. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 1991; 256:929-937
84. Bell R.L., Brooks D.W. et al. A-78773: a selective, potent 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Lipid. Media.* 1993; 6:259-264
85. Kuchař M., Brůnová B., Grimová J., Rejholec V., Čepelák V: Analysis of quantitative relationships between structure and antiaggregating activity of α -aryloxoalkanoic acids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1986;51:2617-
86. Kuchař M., Maturová E., Brůnová B., Grimová J., Tomková H., Holubek J.: Quantitative relationships between structure and antiinflammatory activity of aryloxoalkanoic acids. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1988;53:1862-
87. Kuchař M., Vosátka V., Poppová M., Kněžová E., Panajotovová V., Taimr J.: Some analogs of 4-(2',4'-difluorobiphenyl-4-yl)-2-methyl-4-oxobutanoic acid (flobufen): synthesis and antiinflammatory activity. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1995;60:1026-

88. Kuchař M., Poppová M., Jandera A., Panajotovová V., Zůnová H., Buděšínský M., Tomková H., Jegorov A., Taimr J.: Chiral forms of Flobufen and its metabolite: Synthesis and basic biological properties. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1997;62:498-
89. Panajotová V., Anděrová E., Jandera A., Kuchař M.: Pharmacological profile of the novel potent antirheumatic flobufen. *Arzneim. Forsch.* 1997;47:648-
90. Ford-Hutchinson A.W., Gresser M., Young R.N. 5-Lipoxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 1994;63:383-417
91. Rouzer C.A., Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 1988;263:10980-10988
92. Young R.N. Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.* 1999;34:671-685
93. Glaser K.B., Carlson R.P., Sung A., Bauer J., Lock Y.-W., Holloway D., Sturm R., Hartman D., Walter T., Woepel S., Howell R., Gray W, Grimes D., Kubrak D., Banker A., Kreft A. Weichman B.M. Pharmacological characterization of WAY-121,520: A potent anti-inflammatory indomethacin-based inhibitor of 5-lipoxygenase (5-LO)/phospholipase A₂ (PLA₂). *Drugs Exp. Clin. Res.* 1991;17:381-387
94. O'Shaughnessy K.M., Taylor I.K. et al. Potent leukotriene D₄ receptor antagonist ICI 204,219 given by the inhaled route inhibits the early but not the late phase of allergen-induced bronchoconstriction. *Am. Rev. resp. Dis.* 1993; 14:A1001
95. Smith L.J., Glass M. et al. inhibition of leukotriene D₄-induced bronchoconstriction in subjects with asthma: a concentration effect study of ICI 204,219. *Clin. Pharmac. Ther.* 1993; 54:430-436.
96. Kidney J.C., Ridge S.M. et al. Inhibition of platelet-activating factor-induced bronchoconstriction by the leukotriene D₄ receptor antagonist ICI 204,219. *Am. Rev. resp. Dis.* 1993; 147:215-217
97. Markham A., Faulds D. Montelukast. *Drugs.* 1998;56:251-256
98. Gonyeau M., Partisano A. A clinical review of montelukast in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Formulary* 2003;38:368-378
99. Laursen L.S., Naesdal J., Bukhave K., Lauritsen K., Rask-Madsen J. Selective 5-lipoxygenase inhibition in ulcerative colitis. *Lancet* 1990; 335:683-685
100. Hillingsø J., Kjeldsen J., Laursen L.S. et al. Blockade of leukotriene production by a single oral dose of MK-0591 in active ulcerative colitis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1995; 57:335-341
101. Hui K.P., Taylor I.K. et al. Effects of 5-lipoxygenase inhibitor on leukotriene generation and airway response after allergen challenge in asthmatic patients. *Thorax* 1991; 46:184-189
102. Kane G., Pollice M. Insights in the mechanism of IgE mediated human lung inflammation derived from segmental antigen challenge; studies employing a 5-lipoxygenase inhibitor. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1994; 147:215-217
103. Izrael E., Fischer A.R. et al. The pivotal role of 5-lipoxygenase products in the reaction of aspirin-sensitive asthmatics to aspirin. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1993; 148:1447-1451
104. Izrael E., Rubin P. et al. The effect of inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in mild-to-moderate asthma. *Ann. Intern. Med.* 1993; 119:1059-1066

105. Kuchař M., Čulíková K., Panajotovová V., Brůnová B., Jandera A., Kmoníček V.: 2,4-Di-hydroxyacetophenone derivatives - antileukotriens with multiple mechanism of action. Coll. Czech. Chem. Commun. 1998;63:103-
106. Kuchař M., Kmoníček V., Zůnová H., Brůnová B., Panajotova V., Jandera A.: Derivatives of hydroxyarylmecaptobenzoic and hydroxyarylmekaptophenylacetic acids with antileukotrienic activities. Czech Pat. Appl. PV (19.6.1998), CZ 290693; US 6,303,612 B1 (2001).
107. Wsól V., Szotáková B., Beliharová V., Šišpera L., Holčapek M., Kolářová L., Suchanová B., Kuchař M., Skálová L.: The phase I biotransformation of the potential antileukotrienic drug quinlukast in rat microsomes and hepatocytes. Coll. Czech. Chem. Commun. 2004;69:689-
108. Kuchař M., Kmoníček V., Panajotova V., Jandera A., Brůnová B., Junek R., Bucharová V., Čejka J., Šatínský D.: Derivatives of phenylsulfanyl benzoic acids with multiple antileukotrienic activity. Coll. Czech. Chem. Commun. 2004;69:2098-
109. Kuchař M., Brůnová B., Junek R., Rödling R., Hájiček j., Panajotová V., Jandera A.: The antileukotrienic derivatives and homologues of (quinolin-2-ylmethoxy)sulfanylbenzoic acids with reduced lipophilicity. Coll. Czech. Chem. Commun. 2005;70:1357-
110. Lauritsen K., Hansen J., Bytzer P., Bukhave K., Rask-Madsen J. Effects of sulfasalazine and disodium azodisalicylate on colonic PGE₂ concentrations determined by equilibrium *in vivo* dialysis of faeces in patients with ulcerative colitis and healthy controls. Gut 1984;25:1271-1278
111. Sharon P., Ligumsky M., Rachmilewitz D. et al. Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. Gastroenterology 1978;75:638-640
112. Lamers C.B., Wagtmans M.J., van der Sluys Veer A., van Hogezaand R.A., Griffioen G. Budesonide in inflammatory bowel disease. Neth. J. Med. 1996;48:60-63
113. Nielsen O.H., Vainer B., Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. Aliment. Pharmacol. Ther. 2001;15:1699-1708
114. Nguyen G.C., Harris M.L., Dassopoulos T. Insights in immunomodulatory therapies for ulcerative colitis and Crohn's disease. Curr. Gastroenterol. Rep. 2006;8:499-505
115. Stokkers P.C., Camoglio L., van Deventer S.J. Tumor necrosis factor (TNF) in inflammatory bowel disease: gene polymorphisms, animal models, and potential for anti-TNF therapy. J. Inflamm. 1995-1996;47:97-103.
116. D'Haens G., Daperno M. Advances in biologic therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease. Curr. Gastroenterol. Rep. 2006;8:506-512
117. Belluzzi A., Brignola C., Campieri M., Pera A., Boschi S., Miglioli M. Effects of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. N. Engl. J. Med. 1996; 334:1557-1560
118. Kuchař M.: Výzkum a vývoj antileukotrienik v léčbě ulcerativní kolitidy (přednáška). 31. konference „Syntéza a analýza léčiv“. 11.- 13. září 2002, Bratislava, Slovenská Republika

119. Hugot J.P., Thomas G. Genome-wide scanning in inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis.* 1998;16:364-369
120. Wang J., Fu Y.X. Tumor necrosis factor family members and inflammatory bowel disease. *Immunol. Rev.* 2005;204:144-155
121. Peifer C., Wagner G., Laufer S. New approaches to the treatment of inflammatory disorders small molecule inhibitors of p38 MAP kinase. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006;6:113-149
122. Danese S., Semerano S., Marini M., Roberto I., Armuzzi A., Papa A., Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig. Liver. Dis.* 2005;37:811-818
123. Van Dieren J.M., Kuipers E.J., Samson J.N., Nieuwenhuis E.E., van der Woude C.J. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, methotrexate, and mycophenolate mofetil: their mechanisms of action and role in the treatment of IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* 2006;12:311-327
124. Chan W.K., Huang F.C., Morrissette M.M., Warus J.D., Moriarty K.J., Galemno R.A., Dankulich W.D., Poli G, Sutherland C.A. Structure-activity relationships study of two series of leukotriene B4 antagonists: novel indolyl and naphthyl compounds substituted with a 2-[methyl(2-phenethyl)amino]-2-oxoethyl side chain. *J. Med. Chem.* 1996;39:3756-3768
125. Allen C.F.H., Gates J.W. Jr. O-n-Butoxynitrobenzene. *Organic Syntheses.* 1945;25:49
126. Davis R., Muchowski J.M. 2,4-Dimethylbenzyl: A Compliant Phenol Protecting Group. *Synthesis* 1982:987-988
127. Smith J.R.L., Norman R.O.C., Rowley A.G. Amine oxidation. Part VI. Metal-ion induced dehydrative cyclisation, reduction, and reductive fragmentation of aryethyl-dimethylamine *N*-oxides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* 1972:228
128. M. Kuchař, B. Brůnová, V. Rejholec, J. Grimová, O. Němeček, Substituted benzyloxyarylacetic acids: synthesis and quantitative relations between structure and antiinflammatory activity. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 42 (1977) 1723-1735
129. Titley A.F. Conditions of formation of rings attached to the o-, m-, and p-positions of the benzene nucleus. Part II. The reduction of m- and p-phenylene-diacetonitrile. *J. Chem. Soc.* 1926:508-519
130. Palmer R.M., Salmon J.A. Release of leukotriene B4 from human neutrophils and its relationship to degranulation induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, serum-treated zymosan and the ionophore A23187. *Immunology* 1983;50:65-73
131. Cabré F., Carrabaza A., Suesa N., Garcia A.M., Rotlland E., Gómez M., Tost D., Mauleon D., Carganico G. Effect of manoalide on human 5-lipoxygenase activity. *Inflamm. Res.* 1996;45:218-223
132. Verdu E.F., Bercik P., Cukrowska B., Farré-Castany M.A., Bouzourene H., Monson R.H., Saraga E., Blum A.L., Corthesy-Theulaz I., Michetti P., Tlaskalová-Hogenová H. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice *Clin. Exp. Immunol.* 2000;120:46-50
133. Winter C.A. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962;111:544-547
134. Grimová J., Kuchař M., Pavlíková I., Němeček O. A new potential non-steroidal antirheumatic agent. Benzofenac VUFB. *Cesk. Farm.* 1980;29:305-308

-
135. Opas E.E., Bonney E.Y., Homes J.L. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* 1985;84:253-256
 136. Hansch C., Leo A.: *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley, New York, 1979.
 137. Hansch C., Muir R.M., Fujita T., Maloney P.P., Geiger C.F., Streich M.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 1963;85:2817-
 138. Kuchař M., Rejholec V.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*, Academi, Nakl. ČSAV, Praha, 1987.
 139. Palmer R.M.J., Salmon J.A. Release of leukotriene B₄ from human neutrophils and its relationship to degranulation induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, serum-treated zymosan, and the ionophore A23187. *Immunology* 1983;50:65-73
 140. Cabré F., Carrabaza A., Suesa N., Garcia A.M., Rotlland E., Gómez M., Tost D., Mauleon D. Effect of manoolide on human 5-lipoxygenase activity. *Carganico, Inflamm. Res.* 1996;45:218-223
 141. Cheng J.B., Cheng E.I.-P., Kohi F., Townley R.G. [³H]leukotriene B₄ binding to the guinea-pig spleen membrane preparation: a rich tissue source for a high-affinity leukotriene B₄ receptor site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986;236:126-132
 142. Winter C.A. et al. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1962;11:544-547
 143. Buchwald P. General linearized biexponential model for QSAR data showing bilinear-type distribution. *J. Pharm. Sci.* 2005;94:2355-2379