

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	1
1. ÚVOD	2
1.1 Cytostatické látky.....	2
1.2 Vývoj nových cytostatických látek	15
1.3 Cytostatická aktivita specifického derivátu inkrustoporinu.....	17
2. CÍL PRÁCE	18
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM.....	20
3.1. Syntéza 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu	20
3.2. Možnosti alkylace 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu.....	22
3.3. Vlastní syntéza derivátů 1-fenyl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazolu	22
3.4. Hodnocení biologické aktivity.....	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1. Použité experimentální postupy.....	27
4.2. Syntéza výchozí látky.....	27
4.3. Obecný postup přípravy látek 7 - 12	29
4.4. Syntéza nitroderivátu 4	32
5. ZÁVĚR	33
6. LITERATURA.....	34

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALL	akutní lymfoblastová leukémie
AML	akutní myeloidní leukémie
CLL	chronická lymfatická leukémie
DMF	dimethylformamid
EtOH	ethanol
EtOAc	ethylacetát
HCL	trichocelulární leukémie (hair cell l.) - l. vlasatých buněk
IC	inhibiční koncentrace
Kys.	kyselina
M	mol. l ⁻¹
MeOH	methanol
NMR	nukleární magnetická rezonance
Obr.	obrázek
ORL	otorinolaryngologický
PE	petrolether
Tab.	tabulka
t.t.	teplota tání

1. ÚVOD

1.1 Cytostatické látky

Cytostatické látky (antineoplastika, antitumorózní látky) jsou léčiva používaná při terapii maligních nádorových onemocnění. Mají vliv nejen na nádorové buňky, ale i na další struktury, což je příčinou jejich nežádoucích účinků. Tyto účinky se často projevují v rychle se dělících tkáních (krvetvorné buňky, eliminující orgán, buňky sliznice trávicí soustavy, gonády). Cytostatika zpomalují růst nádorových buněk různými mechanismy:

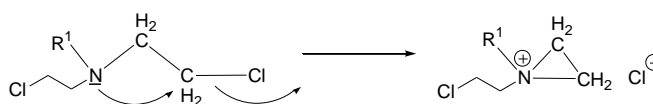
- a) *poškození struktury a funkce DNA* – alkylující látky, látky tvořící komplexy s DNA (interkalační látky), látky způsobující destrukci DNA (radiomimetika)
- b) *inhibice biosyntézy nukleových kyselin* – analogy kyseliny listové, analogy purinových a pyrimidinových bází
- c) *inhibice proteosyntézy*
- d) *inhibice mitózy (poškození struktury a funkce mikrotubulů)* – alkaloidy *Vinca rosea*, taxany (izolovány z určitých druhů tisu), podofylotoxiny (alkaloidy *Podophyllum peltatum*)

V této práci bude dále uveden přehled v současnosti používaných cytostatických látek. Jejich dělení vychází především ze strukturní podobnosti, ale neopomíjí ani jejich původ či mechanismus účinku.

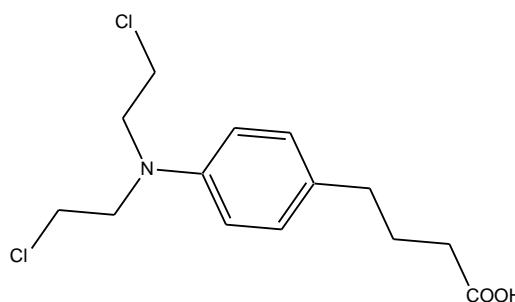
1.1.1 Dusíkaté yperity

Svým mechanismem účinku se tyto látky řadí mezi alkylační léčiva. Chemické změny vyvolané alkylací substrátu (nukleová kyselina, molekula bílkoviny) mohou být několikerého typu. Nejčastější jsou prostá substituční reakce (nejsnáze podléhá alkylaci dusík N₇ guaninu) a bifunkční substituce, která vyžaduje alkylační činidlo se dvěma funkčními skupinami. Ty pak vytvářejí vazbu mezi dvěma sousedními guaniny téhož řetězce nebo řetězců sousedních. Vzniká tak pevná kovalentní vazba mezi řetězci DNA, která brání jejich separaci při replikaci. Tím je inhibováno buněčné dělení. Jelikož struktura DNA má rozhodující úlohu v životě buňky (nejen transformované, ale i somatické), nelze se při použití alkylačních látek vyhnout celkové toxicitě.¹

Charakteristickým rysem této skupiny sloučenin je přítomnost *bis(2-chlorethyl)aminoskupiny* v molekule. Za fyziologických podmínek dochází ke vzniku aziridiniového kationtu (Obr. 1), který je vlastním alkylačním činidlem. Do této skupiny látek patří velmi významná cytostatika. **Cyklofosfamid** vyvolává relativně nejmenší nevolnost z léků této skupiny. Používá se v kombinaci s ostatními kancerostatiky na léčení naprosté většiny nádorů. **Ifosfamid** je isomerem cyklofosfamidu. **Melfalan** se používá pro léčení mnohočetného myelomu, nádoru ovarií a prsu. **Chlorambucil** se užívá v orální lékové formě při léčení CLL (chronická lymfatická leukémie) a nádorů ovarií. **Spiromustin** je určen pro léčení mozkových nádorů, je ale značně neurotoxický. **Trofosfamid**, **mafosfamid** a **4-hydroperoxyklofosfamid** jsou deriváty cyklofosfamidu.²



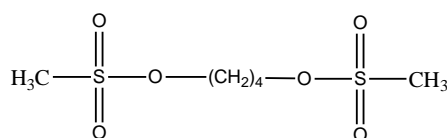
Obr. 1



Chlorambucil

1.1.2 Estery kyseliny methansulfonové (alkylsulfonáty)

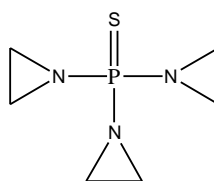
Jedná se opět o alkylační činidla alkylující nukleové kyseliny. Základem jejich struktury jsou dvě *alkansulfonové* kyseliny, oddělené vzájemně různým počtem uhlíků. **Busulfan** je využíván v léčbě primární polycytémie a chronické myeloidní leukémie, je však cytotoxický i pro buňky v klidovém stavu. Sám může působit jako karcinogen. **Treosulfan** je indikován pro nádor ovarií a na ALL (akutní lymfoblastová leukémie). Je to rovněž bifunkční alkylační činidlo.²



Busulfan

1.1.3 Aziridiny (ethyleniminy)

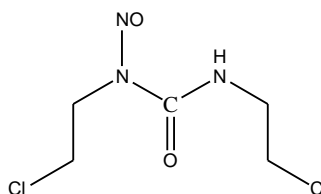
Je to skupina alkylačních látek příbuzných dusíkatým yperitům. Charakteristická je přítomnost *aziridinového* kruhu, jehož elektroneutralita zodpovídá za nižší reaktivitu při alkylacích ve srovnání s yperity (viz Obr. 1). Předpokládá se, že látky vytváří křížovou vazbu mezi oběma komplementárními řetězci DNA stejně jako přírodní antibiotikum **mitomycin C** (obsahuje *chinonové* jádro kondenzované s dalšími dusíkatými heterocykly, včetně aziridinového). Nejpoužívanější z této skupiny je **thiotepa**, a to pro léčení nádorů močového měchýře a u transplantací kostní dřeně. **Triethylenmelamin** a **triazichon** mají jen omezené použití, **diazichon** je perspektivnější. Je dostatečně lipofilní, aby pronikal mozkomíšni bariérou a mohl být využit v léčbě nádorů mozku.²



Thiotepa

1.1.4 Deriváty nitrosomočoviny

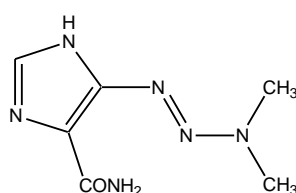
Tato významná alkylační činidla jsou založená na tvorbě 2-*chloroethyldiazoniového* kationtu, ke které dochází ve fyziologických podmínkách vlivem nukleofilního ataku. Nejčastěji alkylují guanin v poloze 6. **Karmustin** se používá k léčení primárního intracerebrálního tumoru (jeho vysoká lipofilita umožňuje průnik do mozku) a mnohočetného myelomu, **lomustin** k léčení nádorů CNS a lymfomů, **semustin** pro gastrointestinální tumory. **Streptosotocin** je přírodní antimikrobiálně účinná látka izolovaná ze *Streptomyces achromogenes*. Přítomnost cukerné složky v jeho molekule zodpovídá za slabší alkylační aktivitu, použití je omezeno vysokou nefrotoxicitou. Semisyntetický **chlorosotocin** je méně neurotoxický. Oblast derivátů močoviny je předmětem intenzivního výzkumu, hledají se látky s nižší toxicitou.^{1,2}



Karmustin

1.1.5 Hydraziny

V této skupině cytostatik nejsou zcela vyjasněné veškeré mechanismy účinku, ale alkylace mezi ně v každém případě patří. **Dakarbazin** obsahuje ve své struktuře *imidazolový* kruh s navázanou *karboxamidovou* a *dimethyltriazenovou* skupinou. Za fyziologických podmínek uvolňuje methylující *diazomethan*, kromě toho jako analog purinu ovlivňuje syntézu DNA dalšími mechanismy. Používá se pro léčení Hodgkinova lymfomu, maligního melanomu a sarkomů. **Prokarbazin** je methylhydrazinový derivát určený pro mnohočetný myelom. V buňce je konvertován na účinné metabolity, aktivuje se z něj methylskupina, která alkyluje DNA.^{1,2}



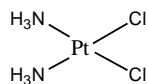
Dakarbazin

1.1.6 Komplexní sloučeniny platiny

Tato skupina anorganických sloučenin má alkylační mechanismus účinku. Obecně se jedná o komplexní sloučeniny platiny s koordinačním číslem 4 nebo 6. Ligandy těchto komplexů mohou být nahrazeny nukleofilními částicemi (thiolovou skupinou, dusíkovými atomy aminoskupin), je tedy vytvářena vazba s dusíkem purinových a pyrimidinových bází v molekule DNA. Efekt těchto látek byl objeven náhodně při studiu vlivu elektrolýzy na růst kultury *E.coli* při použití platinové elektrody a chloridu amonného jako elektrolytu. Bylo zjištěno, že inhibici způsobuje platinový komplex vznikající na elektrodě, který je dnes znám jako **cisplatina**.¹

Protinádorový účinek závisí na geometrii molekuly: *trans*-isomery jsou inaktivní, *cis*-isomery vyměňují své ligandy (chloridové, karboxylátové) za nukleofily. Komplexy s koordinačním číslem 4 jsou planární, komplexy s koordinačním číslem 6 jsou hexaedrální a méně toxické. Reaktivita těchto sloučenin je soustředěna na N7-polohu guaninu. Nejstarší a nejpoužívanější **cisplatina** je vysoce nefrotoxická. Přesto se užívá u nádorů varlat, vaječníků, močového měchýře, většinou v kombinacích s jinými cytostatiky (vincristin, vinblastin), jejichž účinek často zvyšuje. **Karboplatina** se používá v chemoterapii nádorů prsu, ovarií, varlat a ORL (otorinolaryngologických) nádorů, nevýhodou je hematologická toxicita. Karboplatina

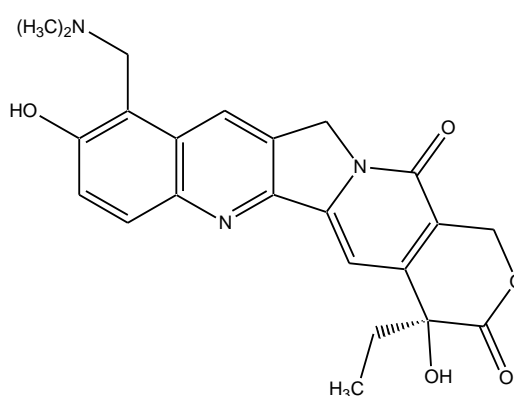
se proto podává v kombinaci s thiosíranem sodným (donátor síry), který váže těžké kovy a snižuje tak toxicitu. **Oxaliplatin** má využití v léčbě kolorektálního karcinomu stejně jako **endoplatina**. **Iproplatin** a **zeniplatina** jsou deriváty se sníženou nefrotoxicitou.¹



Cisplatin

1.1.7 Kamptotecin a jeho analoga

Tyto látky působí mechanismem inhibice topoizomerázy I, což je enzym zásadního významu pro průběh replikace DNA. Dočasným přerušením řetězce DNA umožní topoizomeráza zahájení replikace a řetězec pak opět spojí. Blokádou funkce tohoto enzymu nedojde ke spojení řetězců a vzniklé zlomy v DNA jsou pro buňku letální. **Kamptotecin** obsahuje ve své struktuře aromatický *chinolinový* kruh a *hydroxylakton*, je obsahovou látkou rostlin *Camptotheca acuminata* a *Mappia foetida*. Pro příliš velkou ireverzibilní toxicitu a nízkou rozpustnost bylo od jeho klinické aplikace opuštěno, ale začaly se používat semisyntetické rozpustné deriváty (vznikající substitucí chinolinového kruhu) **irinotekan** a **topotekan**, které mají využití při léčbě kolorektálního karcinomu a karcinomu ovarií. Kamptoteciny nepodléhají mnohočetné lékové rezistenci (multiple drug resistance, MDR), která nepříjemně omezuje protinádorovou terapii některými cytostatiky.^{1,3}



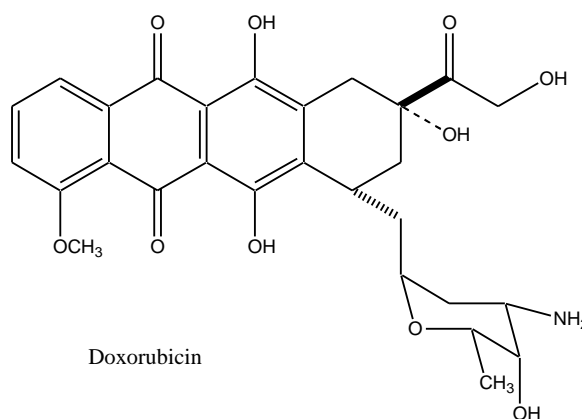
Topotekan

1.1.8 Antracyklinová antibiotika

Mechanismus působení těchto látek a jejich semisyntetických derivátů je schopnost *interkalace* (vmezeření) a z toho vyplývající inhibice topoizomerázy II.

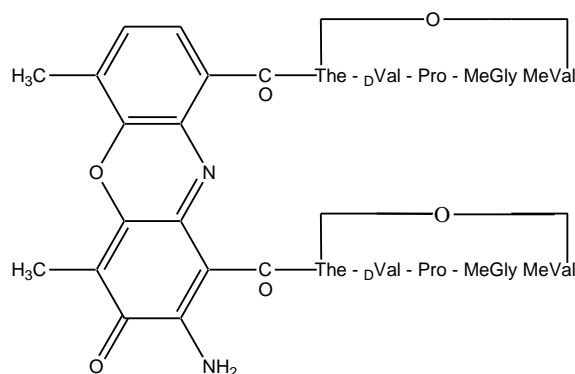
Molekula cytostatika se zasune mezi dvojspirálu DNA, kde se váže vodíkovými můstky a výsledkem je inhibice replikace a transkripce (a samozřejmě znemožnění vazby topoizomerázy). Tuto schopnost interkalace má planární aromatická část molekuly. Obecně mají tyto látky charakter *glykosidů*. Skládají se z *cukerné složky* a *aglykonu*, což je tetracyklický systém obsahující *antrachinon*. Látky byly izolovány z kultur plísně *Streptomyces*. **Doxorubicin (adriamycin)** je jedno ze základních a nepostradatelných cytostatik, jak pro léčbu hematologických malignit, tak pro solidní nádory. Jeho kardiotoxicitu lze omezit podáním kardioprotektiva dexrazoxanu. **Daunorubicin** a **aklarubicin** jsou určeny pro terapii ALL a AML (akutní myeloidní leukémie). **Pirarubicin** je derivát doxorubicinu indikovaný hlavně pro karcinom prsu, endometria a žaludku. Další semisyntetická antrachinonová antibiotika jsou **idarubicin, zorubicin** a **epirubicin**.^{1,3}

Tento dvojí mechanismus účinku můžeme najít i u dalších látek. **Mitoxanthron** se strukturně podobá antracyklinovým antibiotikům. Je to derivát *anthrachinonu* využívaný při léčbě AML a některých solidních tumorů. Jeho analog **ametanthron** je klinicky zkoušen. Ze skupiny *anthrapyrazolů* je významný **pyroxanthron**. **Amsakrin** obsahující *akridinový* kruh se uplatňuje výhradně při léčení leukémií (AML).^{1,2}



1.1.9 Aktinomyciny

Mechanismem účinku je opět interkalace a inhibice topoizomerázy II. Struktura těchto látek obsahuje *2-aminofenoxazin-3-onovou chromoforovou* skupinu a dva *pentapeptidové laktonové* kruhy. Sekvence aminokyselin v peptidovém kruhu má význam pro protinádorovou aktivitu. Dnes už se používá pouze **aktinomycin D** a to u Wilmsova nádoru, Ewingova sarkomu a nádorů varlat. Byl získán z kultur *Streptomyces antibioticus*. Důležitým vedlejším efektem je jeho působení proti reparaci DNA, což někdy synergicky stupňuje efekty jiných cytostatik.^{2,3}



Aktinomycin D

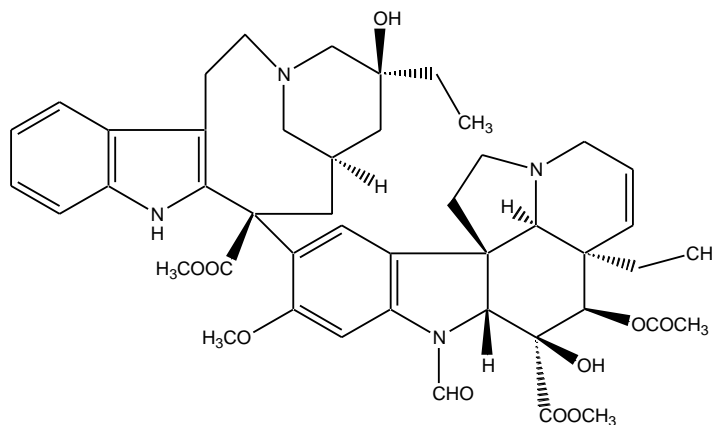
1.1.10 Bleomyciny a peplomyciny

Tato skupina protinádorových antibiotik byla izolována ze *Streptomyces verticillus*. Jedná se o směs glykopeptidů, přičemž hlavní jsou bleomycin A2 a B2. Svým mechanismem účinku se řadí mezi radiomimetika, což jsou látky štěpící vazby mezi nukleotidovými jednotkami v DNA obdobně, jako k tomu dochází vlivem záření. Ke štěpení dochází radikálovým mechanismem na uhlíkových atomech cukerného zbytku 2'-deoxyribonukleotidu. Tento proces je podmíněn přítomností kyslíku a kovových iontů (železo nebo měď) schopných vytvořit redoxní systém. Struktura bleomycinů je složitá. Na DNA se selektivně váže část zvaná „tripeptid S“ složená z threoninu, bithiazolu a C- konce. N- konec zodpovědný za vazbu kovu obsahuje glykosylovaný β -hydroxyhistidin a substituovanou pyrimidinkarboxylovou kyselinu. N- a C- konce bleomycinu jsou spojeny substituovanou kyselinou valerovou. **Bleomycin** je používán pro terapii testikulárních nádorů, kožních karcinomů a karcinomu děložního čípku. **Peplomycin** má obdobné využití, zvláště účinný je u karcinomu prostaty.^{2,3}

1.1.11 Vinka alkaloidy

Tyto látky vykazují antimitotickou aktivitu. Blokáda buněčné mitózy v metafázi nastává v důsledku defektní polymerizace tubulinu. Vinka alkaloidy pocházejí z amerického barvíčku *Vinca rosea*. Mají strukturu dimeru složeného z indolového a indolinového jádra. Liší se v substituentu navázaném na dusík dihydroindolové (indolinové) části. Mají velmi významné uplatnění v klinické praxi. **Vinkristin** se užívá pro léčení Hodgkinova lymfomu, jako složka „koktejlů“ při terapii nádorů vaječníků a karcinomu prsu. **Vinblastin** má širší spektrum použití, v monoterapii

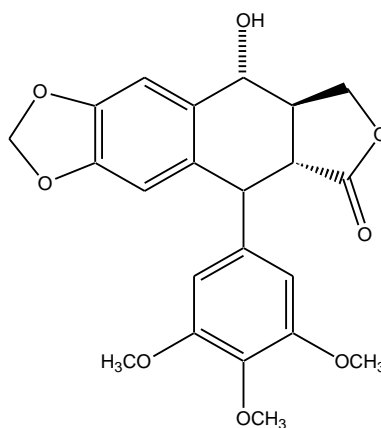
hlavně u ALL jako součást kombinací např. u Ewingova sarkomu. **Vinorelbin** je anhydroderivát vinblastinu, má nižší neurotoxicitu, protože nepůsobí na polymeraci tubulinu v neuronech. Používá se u karcinomu plic, ovaria a prsu. **Vindesin** je deacetylderivát vinblastinu používaný u ALL, AML a maligního melanomu.^{1,2,3}



Vinkristin

1.1.12 Podofylotoxiny

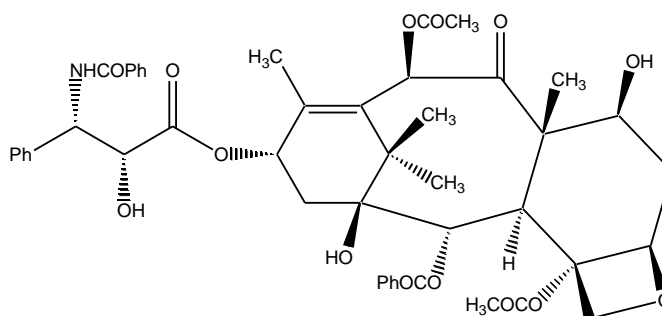
Podofylotoxin je obsahová látka keře *Podophyllum emodii*, *P. peltatum* a *Juniperus virginiana*. Má výrazný inhibiční účinek na mitózu. V praxi se používá jen k topické aplikaci. Jeho struktura je planární. Tvoří ji *tetrahydrónaftalen* kondenzovaný s *1,3-dioxolanovým* a *laktonovým* kruhem. U dále uvedených semisyntetických derivátů došlo strukturními změnami (substituce tetrahydrónaftalenového kruhu cukernou složkou) také k radikální změně mechanismu účinku. Deriváty mají na rozdíl od podofylotoxinu cytostatickou aktivitu vyvolanou inhibicí topoisomerasy II. **Etoposid** je orální preparát používaný u maligních lymfomů, testikulárních nádorů a dalších neoplasií. Jeho analog **teniposid** se užívá pro léčení ALL, nádorů mozku, karcinomu děložního čípku a močového měchýře.^{2,3}



Podofylotoxin

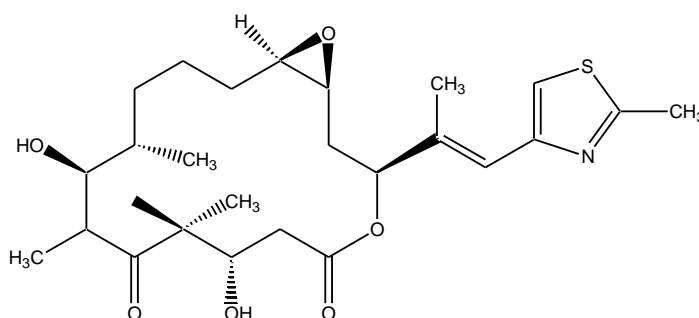
1.1.13 Taxany

Jedná se o látky přírodního původu. Mechanismus jejich účinku je inhibice depolymerizace tubulinu, působí tedy opačně než vinka alkaloidy. Tento efekt stabilizující strukturu mikrotubulů eliminuje nejen jejich funkci při mitóze, ale působí též omezení buněčné motility. **Paklitaxel** (taxol) izolovaný z kůry tisu *Taxus brevifolia* je *diterpenoidní* sloučenina. Z důvodu nízkého obsahu účinné látky v kůře a neobnovitelnosti zdroje byla hledána náhrada. V jehličí *Taxus baccata* byl nalezen **bakatin**, bezprostřední prekurzor paklitaxelu. Dále byly syntetizovány deriváty lišící se charakterem *acylaminových* a *acyloxylových* zbytků na diterpenoidním jádře. **Docetaxel** je jako jediný z nich účinnější než paklitaxel. Hlavní indikací obou látek je karcinom ovaria a prsu, často se podávají v kombinaci s cisplatinou, doxorubicinem apod.^{2,3}



Paklitaxel (Ph.....fenyl)

Stejně jako taxany mají významný účinek proti depolymerizaci tubulinu také další látky přírodního původu, které jsou předmětem intenzivního výzkumu. **Epothilony** (původně izolované z kultur myxobakterie *Sorangium cellulosum*) a jejich semisyntetická analoga jsou látky obsahující *methylthiazolylový* zbytek navázaný na 16-členný *makrolaktonový* kruh. Dále **kryptofyciny**, jejichž strukturu tvoří 16-členný *makrolidový* kruh se dvěma esterovými a dvěma amidovými vazbami.³



Epothilon A

1.1.14 Homoharringtonin

Mechanismem účinku tohoto alkaloidu (druh *Cephalotaxus*) je degradace polyribosomů, ale především je zástupcem látek inhibujících proteosyntézu. Je to látka se silným antileukemickým efektem, jejíž využití v kombinaci s dalšími antineoplastiky je v současnosti podrobováno výzkumu.³

1.1.15 Antimetabolity

Antimetabolity jsou chemicky obměněné přirozené metabolity (analogy metabolitů), které ovlivňují metabolické procesy probíhající v buňce. Jejich působení je vždy spojeno s ovlivněním průběhu enzymové reakce nebo jejího produktu a účinek založen na principu strukturní podobnosti s přirozenou látkou a na rozpoznání této modifikované látky enzymem. Výsledkem vzájemné interakce antimetabolitu s enzymem může být:

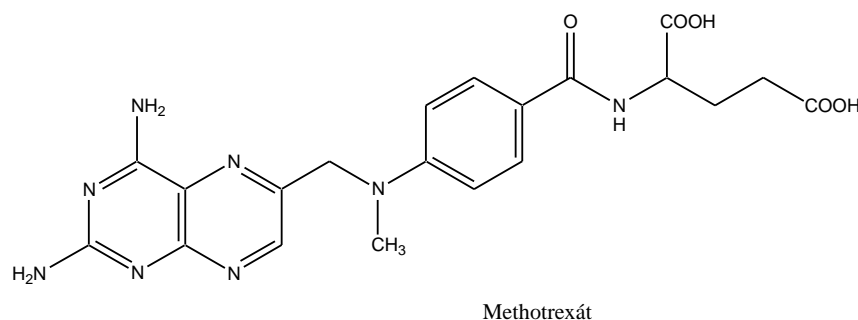
- prostá inhibice enzymem katalyzované reakce
- vznik modifikovaného produktu neschopného další metabolické přeměny
- pevná kovalentní vazba látky s enzymem a jeho ireverzibilní inaktivace
- vznik modifikovaného produktu inhibujícího průběh této nebo další reakce
- vznik modifikovaného produktu jiných fyzikálně-chemických či molekulárně-biologických vlastností
- terminace růstu polymerního řetězce (biosyntéza proteinů nebo nukleových kyselin)²

Je pochopitelné, že se snažíme nalézt takový metabolický proces, který by byl typický jen pro nádorové buňky. Zatím se jej bohužel nepodařilo objevit. V následujících odstavcích budou stručně popsány antimetabolity využívané při léčbě nádorových onemocnění.

Analoga kyseliny listové

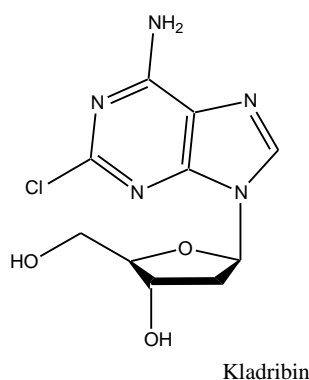
Redukcí kyseliny listové (její struktura se skládá z pteridinu, kys. *p*-aminobenzoové a kys. glutamové) vzniká kys. tetrahydrolistová, což je kofaktor metabolismu jednonukleotidových zbytků nepostradatelných při biosyntéze purinů, thymidinu a methioninu. Enzym katalyzující tuto přeměnu je dihydrofolát-reduktasa (DHF-reduktasa). Mechanismem inhibice tohoto enzymu působí *4-aminopterin*

(kyselina 4-aminopteroylglutamová), což je derivát kyseliny listové vzniklý záměnou hydroxylové skupiny v poloze 4 pteridinového jádra za aminoskupinu. V *p*-aminobenzoylovém zbytku se nachází alkylovatelná NH-funkce, jejíž methylovací získáme významné cytostatikum **methotrexát** (kyselina 4-amino-*N*-10-methylpteroylglutamová). Používá se při léčení solidních tumorů i hematologických neoplazií. **Edatrexát** je určen především pro nádory ORL, **palitrexát** pro kolorektální karcinom.^{1,2}



Analoga purinových bází

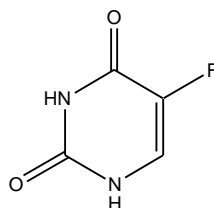
Purinové báze (adenin, guanin), resp. jejich nukleotidy, patří k základním stavebním jednotkám nukleových kyselin. **Kladribin** (2-chlordeoxyadenosin) je v buňce fosforylován na aktivní metabolit, který inkorporací do DNA a RNA působí poruchu jejich syntézy. Inhibuje též opravu poškozené DNA. Používá se u HCL (trichocelulární leukémie), kde má zcela zaručený účinek, dále u ALL, AML a CLL. **Fludarabin** se užívá v terapii CLL. Další významné látky jsou **merkaptopurin** a **thioguanin**.^{1,2}



Analoga pyrimidinových bází

5-Fluorouracil je intracelulárně přeměněn na aktivní antimetabolity, přičemž jeden se inkorporuje do DNA a poškozuje její funkci, druhý je inhibitorem thymidylátsynthasy, způsobí tedy thyminovou smrt buňky. Používá se pro terapii kolorektálních nádorů, karcinomů žaludku a jater, v topické formě i k léčbě kožních

nádorů. Nemá příliš výhodné farmakologické vlastnosti, proto se vyvíjejí a úspěšně používají jeho profarmaka - **tegafur, floxuridin, doxifluridin**. **Cytarabin** (cytosinarabinosid) je analog cytidinu, ve kterém je ribóza nahrazena arabinózou. Je to jedno z nejznámějších cytostatik, používá se pro léčení AML, ALL, maligních lymfomů a v dalších indikacích jako součást kombinované léčby. **Gemcitabin** (2',2'-dideoxydifluorcytidin) patří ke druhé generaci cytosinových cytostatik, je určen hlavně pro bronchogenní karcinom.^{1,2}



Fluorouracil

1.1.16 Hormonální látky

Hormonální léčba se používá v onkologii déle než chemoterapie. Bylo totiž zjištěno, že růst některých nádorových onemocnění je hormonálně závislý. Účinek hormonů je vázán na přítomnost specifických buněčných receptorů a právě ty byly objeveny u buněk hormon-dependentních nádorů. Hormony jsou steroidní látky s malými hydrofobními molekulami.

- **Pohlavní hormony**

Látky používané v terapii karcinomu prostaty, prsu a endometria. Stále více se používají především antihormony. Významný je např. nesteroidní antagonist androgenních receptorů **flutamid** nebo antiestrogen **tamoxifen**.

- **Hormony kůry nadledvin**

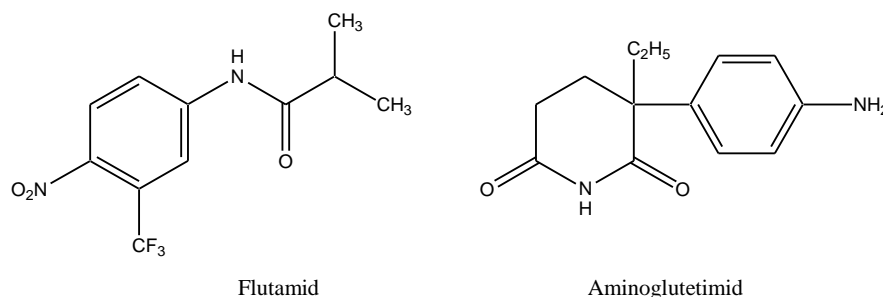
Jedná se o přirozený glukokortikoid **kortizol** a jeho syntetické deriváty, např. **prednizon** a **dexametazon**. Používají se v terapii leukémií a lymfomů.

- **Inhibitory aromatáz**

Aromatázy jsou odpovědné za finální stupeň konverze steroidů (androstendionu, testosteronu) na estron a estradiol. Jejich inhibitory tedy vyvolají depleci estrogenů, což je přínosné při léčbě nádorů závislých na těchto hormonech (karcinom prsu, endometria). Mimořádně účinná a dobře tolerovaná léčiva jsou **fadrozol** a **anastrozol**. **Aminoglutetimid** je nejen inhibítoem aromatáz, ale inhibuje také vznik hormonů v kůře nadledvin.

- **Analoga hypotalamických hormonů**

Somatostatin a gonadoliberin jsou hormony s regulační funkcí. Řídí uvolňování hormonů, např. somatostatin inhibuje uvolňování růstového hormonu, prolaktinu a tyreotropinu. Jeho analog **oktreotid** působí na endokrinně aktivní nádory (např. inzulinomy), na nichž se nacházejí specifické somatostatinové receptory. Tlumí endokrinně vázané symptomy (hypoglykémie).^{1,2}



1.1.17 Vybrané perspektivní látky ve vývoji

Existuje celá řada dalších cytostatických látek potenciálně využitelných v léčbě, které jsou v současnosti podrobovány vědeckému zkoumání. Některé z nich jsou popsány níže.

- **Kombretastatiny**

Tyto látky působí stejným mechanismem jako podofylotoxin, rozvolňují strukturu mikrotubulů a tím inhibují mitózu. **Kombretastatin A4** byl izolován z kůry stromu *Combretum caffrum*. Je to *cis*-stilbenový derivát. Kombretastatiny dělíme do čtyř skupin na základě jejich struktury. Kombretastatiny A (*cis-stilbeny*) a B (*diaryl-ethyleny*) obsahují dvě fenylová jádra spojená dvouuhlíkatým řetězcem, který je buď nenasyčený (v případě stilbenů) nebo nasycený. Fenylové kruhy jsou substituovány *methoxylovými* a *hydroxylovými* skupinami v různých polohách. Kombretastatin C obsahuje *chinonové* jádro. Skupina D má charakteristickou strukturu *makrocyclického laktonu*. Tyto látky jsou podrobovány intenzivním studiím a klinickému testování. Významný je jejich vliv na cévní zásobení tumorů, řada z nich má antivaskulární a antiangiogenní účinky.^{2,3}

- **Bryostatiny**

Jejich 20-členný *makrolaktonový* kruh obsahuje 3 *pyranová* jádra. Vykazují zajímavé biologické aktivity, kromě cytotoxicity např. imunostimulace. Jejich užití v monoterapii se nezdá být přínosné, ale mohly by být součástí kombinované léčby leukémií.³

1.1.18 Další látky

Mitotan je derivát známého insekticida DDT. Jedná se o cytostatikum s vysokým stupněm selektivní toxicity. Působí atrofii určitých částí kůry nadledvin a inhibuje vznik steroidů. Na základě této selektivní účinnosti byl zaveden do terapie adrenokortikálních karcinomů.¹

L-asparagináza je proteinový enzym, katalyzující hydrolyzu extracelulárního asparaginu (na molekulu aspartámu a amoniaku). Leukemické a některé jiné neoplastické buňky nejsou schopny syntetizovat asparagin potřebný pro svůj růst a jsou odkázány na mimobuněčné zdroje. Nedostatek asparaginu indukovaný L-asparaginázou způsobuje jejich destrukci. Látka se používá především v léčbě ALL.⁴

Z předchozího textu je zřejmé, že cytostatické látky jsou látky různých struktur, mezi nimiž nelze najít žádnou podobnost. Při výzkumu a hledání nových potenciálních antineoplastik se tedy můžeme zabývat látkami jakékoliv struktury, ať jsou přírodního nebo syntetického původu.

1.2 Vývoj nových cytostatických látek

Systematické klinické zkoušení farmak s antitumorózním účinkem bylo zahájeno po druhé světové válce, kdy se začaly podávat alkylující látky. Od té doby bylo identifikováno (pokud se týče účinku a toxicity) více než 50 farmak různých farmakologických skupin a struktur.⁴ Mezi nejpoužívanější postupy při hledání nových látek patří modifikace předlokové struktury o určité aktivitě, na základě které lze připravit řadu derivátů a dle jejich aktivit posoudit, jakým směrem by se měly ubírat další strukturní obměny. Lze konstatovat, že při vývoji nových cytostatik se příliš nehledí (na rozdíl od léčiv jiných terapeutických skupin) na parametry toxicity, neboť se jedná o léčiva zachraňující lidské životy.

V dnešní době se stále častěji obracíme k „moudrosti“ přírody. Sama příroda je totiž unikátním zdrojem odlišných biologicky aktivních molekul, jejichž struktura byla optimalizována v průběhu evoluce. Ačkoli význam biosyntézy některých nízkomolekulárních přírodních látek není vždy zcela jasný, zdá se, že mnoho těchto struktur získalo schopnost selektivní vazby na proteiny se strategickými funkcemi

pro živé organismy. Každá látka schopná selektivně se vázat a následně aktivovat či inhibovat tyto klíčové proteiny, je potenciálním léčivem. Role těchto přírodních produktů ve výzkumu a vývoji nových léčiv je tedy zřejmá. Tyto látky mají různé vlastnosti, funkce a účinky, díky nimž se stávají prototypy nových léčiv.

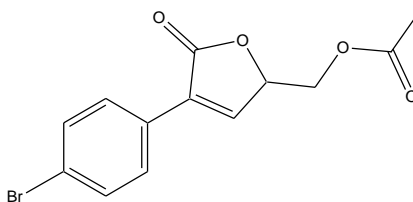
Připravit požadované množství přírodní látky tradiční izolací a čištěním je často obtížný úkol. Potom je výhodné připravit látku chemickou syntézou, která zajistí dostatečné množství pro biologické hodnocení *in vitro* a *in vivo*. Další předností syntézy je možnost zkoumat vztah mezi strukturou a aktivitou látky na molekulární úrovni. Získané poznatky se využijí k systematické úpravě přírodní látky, eliminaci toxických částí molekuly, zlepšení účinnosti a farmakokinetického profilu. Díky těmto možnostem hraje výzkum přírodních produktů v kombinaci s chemickou syntézou významnou roli při hledání a vývoji potenciálních léčiv.⁵

Mezi sekundárními metabolity nacházíme mnoho cenných cytostatických látek. Vykazují také antibakteriální aktivitu, čímž je vysvětlena jejich prospěšnost pro živé organismy. Přítomnost antibakteriálních látek je totiž prokazatelně významná a univerzální evoluční výhoda. Minimálně 60 % látek s cytostatickou aktivitou objevených za posledních 22 let je přírodního původu. Výzkum těchto látek a syntéza jejich analogů se zdá být hodnotnější, než náhodný screening obrovského množství synteticky připravených látek s náhodnou strukturou. Také údaje z klinické praxe svědčí o terapeutické hodnotě přírodních látek. **Paklitaxel**, **vinblastin**, **etoposid** a **adriamycin** patří mezi nejčastěji užívaná a vysoce efektivní léčiva v boji proti rakovině formou chemoterapie. Další analogy přírodních látek (**halichondrin** a **epothilon**) jsou ve fázi klinického testování.⁵

Neustálé zdokonalování diagnostických metod a z toho plynoucí odhalování nových druhů nádorů si žádá výzkum a vývoj nových látek, nehledě na to, že léčiva používaná v současnosti nejsou často v léčbě dostatečně efektivní (jeden z problémů je výskyt mnohočetné lékové rezistence - MDR, kdy pomocí transmembránového P-glykoproteinu dochází k aktivnímu transportu cytostatik ven z buňky a tím se snižuje jejich účinek). Proto je nutný další screening látek nejrůznějších struktur.^{4,5}

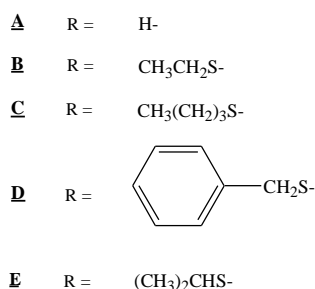
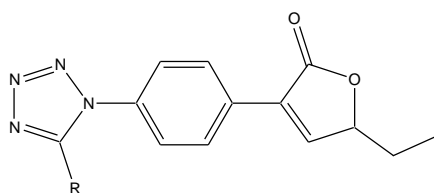
1.3 Cytostatická aktivita specifického derivátu inkrustoporinu

V roce 2003 byly v odborné literatuře ⁶ publikovány výsledky studie, která se zabývala antifungálními látkami typu 3-(halogenfenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-onu, což jsou deriváty přírodní látky *inkrustoporinu*. Specifický derivát 3-(4-bromfenyl)-5-acyloxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-on **1** vykazoval také určitou cytotoxicitu a velmi nízkou akutní toxicitu. Byl podroben testování cytostatické aktivity na 4 typech buněčných kultur, přičemž byla zjištěna významná aktivita proti buňkám lidské akutní lymfoblastické leukémie (CCRF-CEM T lymfoblastové buňky) : MIC =1.5 µg/ml. Struktura tohoto derivátu se stala inspirací při syntéze dalších potenciálně cytostatických látek.

**1**

2. CÍL PRÁCE

V disertační práci Vojtěcha Balšánka⁷ je popsána syntéza látek **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, které se podobají derivátu inkrustoporinu. Shodně obsahují 2,5-dihydrofuran-2-onový (butenolidový) kruh, další částí molekuly je *heterocyklus* (substituovaný tetrazol). Cytostatická aktivita látek **A**, **B**, **C**, **D** byla testována pomocí 4 druhů buněčných kultur. Výsledky jsou patrné z tabulek 1, 2. Tabulka 1 popisuje aktivitu pomocí inhibice růstu vyjádřené v procentech proti nárůstu kontroly, látky byly testovány při koncentraci 1, 5 a 10 μM . Tabulka 2 uvádí hodnoty IC_{50} (látko **A** vykazovala při koncentraci 10 μM minimální inhibiční aktivitu, proto stanovení IC_{50} nebylo provedeno). Obecně platí, že látka dosahující IC_{50} 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a méně, je významně cytostatická a má smysl se jí dále zabývat.



Tab. 1 : Inhibice buněčného růstu (% růstu proti kontrole)

Látka, C [μM]	L1210			HL-60			HeLa S3			CCRF-CEM		
	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10
A	-	-	86	-	-	73	-	-	100	-	-	63,80
B	91	20	16	64	35	33	-	68	46	-	41	28
C	86	23	14	51	35	33	-	-	71	-	56	29
D	94	18	15	56	34	37	-	-	71	-	49	32

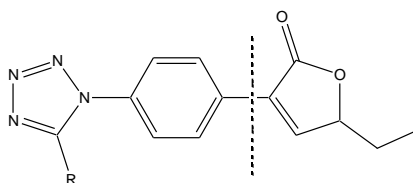
Buňky L1210 myší leukemie (ATCC CCL 219), buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 (ATCC CCL 240), buňky karcinomu děložního čípku HeLa S3 (ATCC CCL 2.2), CCRF-CEM T- lymfoblastická buněčná linie (ATCC CCL 119)

Tab. 2 : Inhibice buněčného růstu (hodnoty IC_{50} , $\mu\text{mol.l}^{-1}$)

Látka	L1210	HL-60	HeLa S3	CCRF-CEM
B	4,6	2,6	8,4	2,3
C	6,3	2,7	>25	3,6
D	6	3,2	>25	3,2

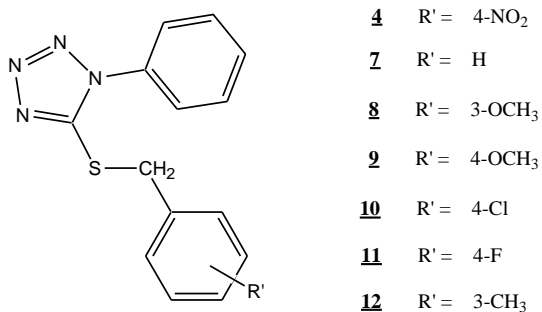
Buňky L1210 myší leukemie (ATCC CCL 219), buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 (ATCC CCL 240), buňky karcinomu děložního čípku HeLa S3 (ATCC CCL 2.2), CCRF-CEM T-lymfoblastická buněčná linie (ATCC CCL 119)

V literatuře neexistují systematické studie, které by se zabývaly cytostatickou aktivitou butenolidů, a ani nebyly nalezeny práce zabývající se tímto u derivátů tetrazolu. Jevilo se tak logické zkoumat cytostatickou aktivitu těchto látek právě po oddělení části butenolidové a heterocyklické, jak naznačuje následující obrázek (Obr. 2)



Obr. 2

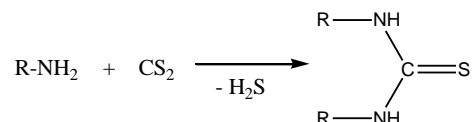
Vlastním cílem práce tedy bylo zjistit, která složka molekuly (butenolidový kruh nebo substituovaný tetrazol) je zodpovědná za cytostatickou aktivitu. Proto jsme navrhli syntézu série níže uvedených derivátů 1-fenyl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazolu a jejich testování za stejných podmínek jako látky **A**, **B**, **C**, **D** (na stejných typech buněčných kultur).



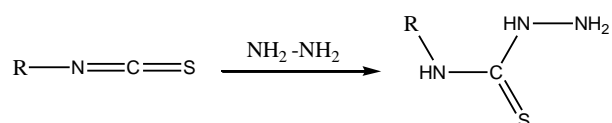
3. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘEM

3.1. Syntéza 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu

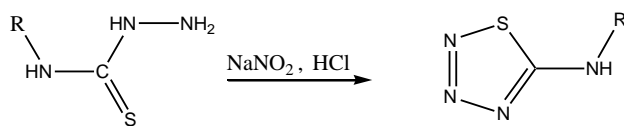
Pro přípravu těchto látek existuje řada různých metod. Výchozím krokem je dle původní metody⁸ reakce aminu se sirouhlíkem, kdy vzniká 1,3-dialkyl-(1,3-diaryl)-2-thiomočovina.



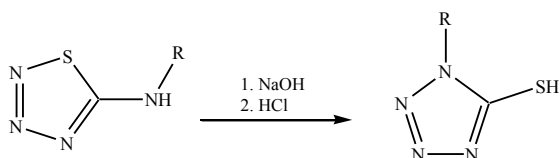
Tato substituovaná thiomočovina dále slouží k přípravě isothiokyanátu buď metodou⁹ destilace thiomočoviny s vodní parou v prostředí kyseliny sírové, nebo metodou¹⁰ zahřívání thiomočoviny s acetanhydridem pod zpětným chladičem. Z připraveného isothiokyanátu vzniká působením hydrazinu odpovídající thiosemikarbazid.



Ten reaguje s dusitanem sodným v kyselém prostředí za vzniku 5-alkylamino-(5-arylamino)-1,2,3,4-thiatriazolu.



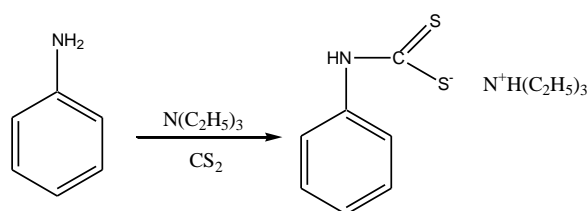
Konečnou fází syntézy je zahřívání tohoto substituovaného 1,2,3,4-thiatriazolu pod zpětným chladičem s hydroxidem sodným. Po okyselení vzniká příslušný 1-alkyl-(1-aryl)-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazol.



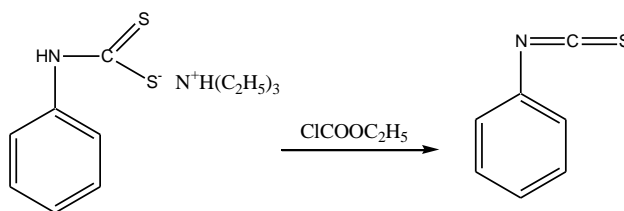
Popsaný způsob syntézy je nevýhodný vzhledem k časové náročnosti a nízké výtěžnosti reakce.

Na KAOCH Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové byl navržen a vyzkoušen modifikovaný způsob syntézy.^{13,14} Jedná se o způsob výhodnější než výše uvedené postupy, proto jsme jej využili pro syntézu výchozí látky.

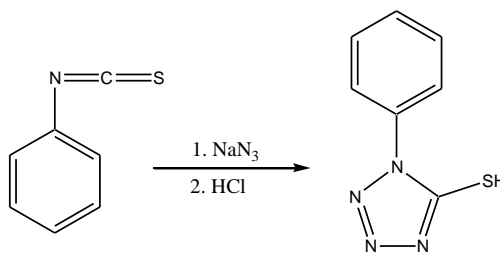
V první fázi reaguje aromatický amin (anilin) se sirouhlíkem a triethylaminem v bezvodém prostředí za vzniku triethylamoniové soli příslušné dithiokarbamové kyseliny.¹¹



Dále tato sůl (dithiokarbamát) reaguje s ethylchlorformiátem za vzniku fenyliothiokyanátu.



Konečnou fází je 1,3-dipolární adice azidu sodného (rozpuštěného ve vodě) na fenyliothiokyanát.¹² Okyselením kyselinou chlorovodíkovou vzniká 1-aryl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazol.



Použití výše uvedeného způsobu syntézy arylisothiokyanátu bylo ověřeno řadou prací v předešlých letech.^{13,14} Základním předpokladem pro průběh reakce se sirouhlíkem a triethylaminem je dostatečná bazicita aromatického aminu. Při této reakci i následném kroku (dithiokarbamát – fenyliothiokyanát) je nutné velmi intenzivní chlazení a míchání reakční směsi.

3.2. Možnosti alkylace 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu

Pro přípravu 5-alkylsulfanyltetrazolů lze využít několik metod. Vzhledem k reaktivní kyselosti –SH skupiny a nukleofilitě atomu síry se logicky nabízí využití substituce nukleofilní (S_N). Ta probíhá dvěma limitními mechanismy: S_N1 (monomolekulární) nebo S_N2 (bimolekulární).¹⁵

Reakce probíhá buď za klasických podmínek, kdy sůl (thiolát S^-) připravená např. rozpuštěním 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu v alkoholátu sodném reaguje s alkyhalogenidem ($R-X$).¹⁶ Reakci podpoříme vhodnou volbou rozpouštědla. V tomto případě je alkylace sodné soli urychlena použitím DMF (dimethylformamidu) nebo DMSO (dimethylsulfoxidu), ale vzhledem k vysoké nukleofilitě atomu síry lze jako rozpouštědlo použít také alkohol.¹⁷

Další možností je reakce 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu s alkyhalogenidem v alkalickém prostředí za přítomnosti katalyzátoru fázového přenosu.¹⁸ Výchozí látka a katalyzátor fázového přenosu (tetraalkylamoniumhalogenid $R^1_4N^+X^-$) se rozpustí v toluenu, přidá se alkylační činidlo (alkylhalogenid R^2Y) a roztok hydroxidu sodného. Ve vodné fázi vzniká z výchozího 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu odštěpením protonu odpovídající sodná sůl. Výměnou sodného kationtu za amoniový vznikne tetraalkylamoniumthiolát, který může, po přenosu do organické fáze (toluen), reagovat s alkylačním činidlem za vzniku 1-fenyl-5-alkylsulfanyltetrazolu.

3.3. Vlastní syntéza derivátů 1-fenyl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazolu

Výchozí látka (1-fenyl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazol) byla připravena a vyčištěna standardním způsobem a následně použita pro syntézu jednotlivých derivátů.

3.3.1. Příprava látek 7, 8, 9, 10, 11 a 12

Při přípravě derivátů 1-fenyl-5-sulfanyltetrazolu se osvědčila metoda využívající katalyzátor fázového přenosu. Tento způsob alkylace je výhodný díky jednoduchosti, menší časové náročnosti (není třeba připravovat nejprve alkoholát) a ve srovnání s metodou alkylace sodné soli v bezvodém prostředí poskytuje vyšší výtěžky.

Syntéza probíhala v prostředí toluenu a 1M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) s různými alkylačními činidly ($\text{Ar-CH}_2\text{-X}$). Jako katalyzátor fázového přenosu byl použit tetrabutylamoniumbromid ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$). Z výchozí látky **2** se nejprve vytvořila sůl s kationtem Bu_4N^+ a po přenosu do toluenové fáze vznikl produkt **3** (schéma 1). Jednotlivé reakce probíhaly řádově hodiny s výtěžky v rozmezí 25 – 94 % (přesné hodnoty uvádí tabulka 3) a byly ukončeny vždy, když TLC analýza ukázala nepřítomnost výchozí látky v reakční směsi (100 % konverze veškeré výchozí látky na produkt).

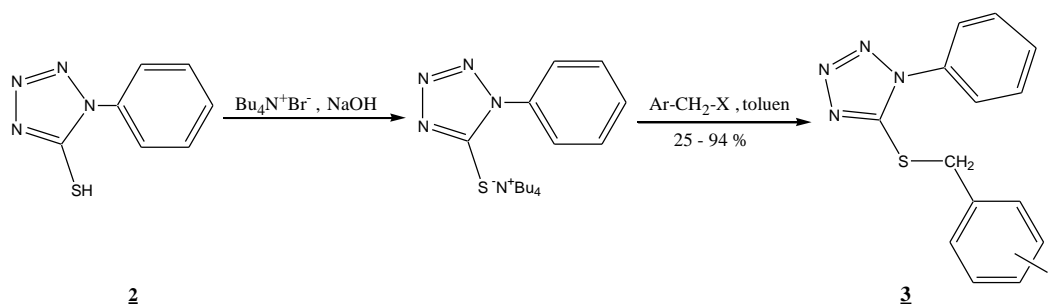


Schéma 1

Tab. 3

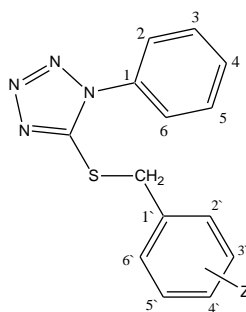
derivát č.	substituce	výtěžek	doba reakce
7	Z = H	84 %	2 hod
8	Z = <i>m</i> - OCH ₃	74 %	4 hod
9	Z = <i>p</i> - OCH ₃	55 %	2 hod 30 min
10	Z = <i>p</i> - Cl	25 %	3 hod
11	Z = <i>p</i> - F	94 %	2 hod 30 min
12	Z = <i>m</i> - CH ₃	92 %	2 hod 30 min

Totožnost lipofilních produktů jsme po vyčištění ověřili na základě jejich ^1H a ^{13}C NMR spekter, která byla shodná se spektry uvedenými v literatuře.^{20,21,22,23}

V ^1H spektrech všech derivátů se objevil singlet dvou vodíků methylenové skupiny (4.58 – 4.67 ppm). V ^{13}C NMR spektrech se signál uhlíku této CH_2 skupiny objevil v rozmezí 36.8 – 37.6 ppm, dále se spektra všech derivátů shodují signálem C_1 uhlíku substituovaného benzyly (153.5 – 154.0 ppm). Uhlíky benzenového jádra navázaného přes $-\text{S}-\text{CH}_2-$ na jádro tetrazolu jsou značeny C^* (viz Obr. 3).

Derivát **7** má v ^1H spektru dva multiplety (7.47 – 7.40, 7.38 – 7.27 ppm) pěti vodíků nesubstituovaného benzenového jádra. Ve spektru látky **8** s methoxyskupinou

v *meta* poloze se objevil singlet vodíků $-OCH_3$ skupiny (3.78 ppm). Analogický signál byl podobný u derivátu **9** s $-OCH_3$ skupinou v poloze *para* (singlet 3 vodíků, 3.79 ppm), *p*- substituce fenylového jádra se projevila vznikem AA'BB' systému. V ^{13}C spektrech látek **8** a **9** má uhlík $-OCH_3$ skupiny signál při 55.2, 55.3 ppm, přičemž C_3' nebo C_4' , na nichž je methoxyskupina navázaná mají signál posunut k nižšímu poli (159.5, 159.8 ppm). Ve spektru derivátu **10** se objevil AA'BB' systém, což je průkaz *p*- substituce fenylového jádra, v tomto případě chlorem. V ^{13}C spektru dochází k posunu signálu vlivem navázaného elektronegativního prvku (chlor) k vyšším hodnotám ppm (k nižšímu poli) (C_4' s navázaným Cl 130.1 ppm). Látka s methylem v *m*- poloze **12** má v alifatické části 1H spektra singlet 3 vodíků (2.33 ppm) této CH_3 skupiny. Uhlík C_3' nesoucí methylovou skupinu je v ^{13}C spektru posunut k vyššímu poli (21.3 ppm). V případě derivátu **11** s fluorem v *p*- poloze byla totožnost potvrzena na základě uhlíkového ^{13}C NMR spektra, kde se přítomnost fluoru projevila štěpením uhlíků. Objevil se dublet C_4' uhlíku s navázaným fluorem (162.5 ppm) a dublety uhlíků sousedních.

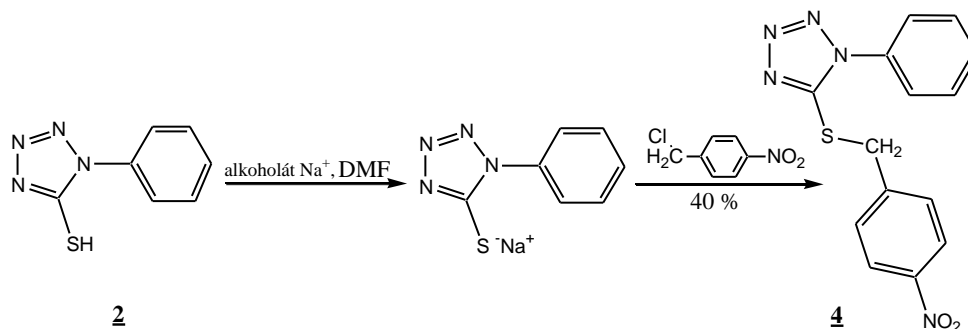


Obr. 3

3.3.2. Příprava nitroderivátu **4**

Nitroderivát se metodou fázového přenosu opakovaně nedařilo připravit, a to ani při změně podmínek, kdy místo toluenu byl použit xylen. Proto byla pro jeho syntézu použita metoda alkylace v bezvodém prostředí. Prvním krokem byla příprava alkoholátu sodného. K vzniklému alkoholátu byl přidán DMF, jehož funkcí bylo poutat kation Na^+ záporně nabitými kyslíkovými konci. Po přidání výchozí látky **2** se vytvořila její sodná sůl reagující s alkylačním činidlem za vzniku nitroderivátu **4** (schéma 2). Reakce probíhala 48 hodin s výtěžkem 40 %, byla opět ukončena na základě TLC analýzy, která ukázala nepřítomnost výchozí látky. Totožnost jsme ověřili pomocí NMR spekter, která se shodovala s výsledky uvedenými v literatuře.²⁰

V ^1H spektru se objevil singlet vodíků methylenové skupiny (4.67 ppm), *p*-substituce fenylového jádra se projevila vznikem AA'BB' systému (2 multiplety u vyšších hodnot ppm). Ve ^{13}C spektru měl uhlík methylenové skupiny, podobně jako u ostatních derivátů, signál při 36.3 ppm.



3.4. Hodnocení biologické aktivity

Cytostatická aktivita byla u připravených derivátů testována na 4 typech buněčných kultur: buňky L1210 myší lymfocytární leukémie (ATCC CCL 219), CCRF-CEM T-lymfoblastická buněčná linie (buňky lidské akutní lymfoblastické leukémie, ATCC CCL 119), buňky HL-60 lidské promyelocytární leukémie (ATCC CCL 240), buňky HeLa S3 lidského karcinomu děložního čípku (ATCC CCL 2.2). Buněčné linie L1210, CCRF-CEM a HL-60 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s fetálním telecím sérem na 24-jamkových destičkách s tkáňovou kulturou. Buněčný nárůst byl odečten 72 hodin po přidání testovaných látek. Buňky HeLa S3 byly suspendovány v buněčném kultivačním médiu RPMI 1640 – HEPES s fetálním telecím sérem. Hodnocení bylo provedeno 48 hodin po aplikaci testovaných derivátů. Buněčný růst byl vyhodnocen v porovnání s paralelně připraveným kontrolním vzorkem, který kvantifikoval buněčnou viabilitu.

Cytostatická aktivita testovaných látek bývá zpravidla vyjádřena hodnotou IC_{50} , což je inhibiční koncentrace látky v $\mu\text{mol/l}$, při které dochází k zamezení růstu 50 % organismů (buněk). Látky s hodnotou IC_{50} nad $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ nejsou zajímavé pro další výzkum a vývoj potenciálních cytostatik, jejich aktivita je příliš nízká.¹⁹ U neprozkoumaných látek se prvotní screening provádí při koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a inhibice růstu buněčných kultur je tak vyjádřena v procentech proti nárůstu kontroly.

Stanovení hodnoty IC_{50} , které je poměrně pracné, se pak provádí pouze u těch látek, u nichž je z prvotního screeningu patrné, že se hodnota nachází pod zmíněnou hranicí $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Vzhledem k tomu, že v případě derivátů tetrazolu se jednalo o první screening na cytostatickou aktivitu, použili jsme koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Z tabulky 4 je zřejmé, že námi připravené deriváty nevykazují inhibiční aktivitu, proto nemělo smysl stanovovat IC_{50} .

Tab. 4 : Cytostatická aktivita –inhibice buněčného růstu
(% proti nárůstu kontroly)

Látka	L 1210	HL-60	HeLa S3	CCRF-CEM
4	86	103	100	97
7	93	83	103	104
8	99	85	107	103
9	79	85	98	84
10	76	86	103	91
11	78	95	107	106

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použití experimentální postupy

Použitá alkylační činidla, tetrabutylamoniumbromid, sirouhlík, chloroform a triethylamin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich a použity bez čištění. Dimethylformamid byl vysušen uchováním nad molekulovými sítí. Anilin použitý při syntéze výchozí látky bylo nutné přechistit.

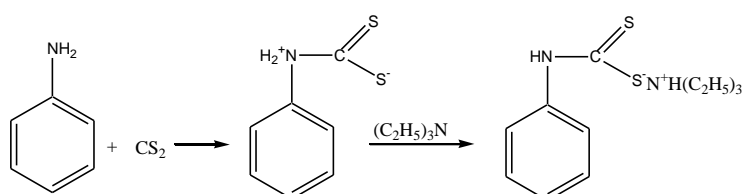
Teploty tání všech látek byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. NMR spektra byla měřena v roztocích CDCl_3 při laboratorní teplotě na přístroji VARIAN MERKURY- Vx BB 300 pracujícím při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly změřeny jako hodnoty δ v *parts per milion* (ppm) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako standardu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 pro ^1H a 77.00 pro ^{13}C). Data jsou presentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), integrovaná intenzita (v protonových spektrech), multiplicita (s: singlet, d: dublet, t: triplet, q: kvartet, qd: kvartet dubletů, bd: široký dublet, dd: dublet dubletů, m: multiplot), interakční konstanty (Hz) a přiřazení (v některých případech).

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie na Silufolu UV 254 (Kavalier) s detekcí pod UV lampou a na aluminiových TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) s pomocí detekčního činidla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$ (4 g), konc. H_2SO_4 (10 ml), H_2O (200 ml) a zahřátí.

Buněčné kultury použité na testování pocházely z American Type Culture Collection (ATCC). Testování bylo provedeno RNDr. I. Votrubou v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, Praha.

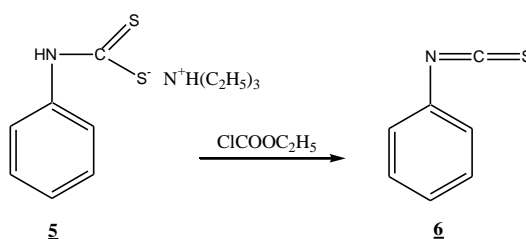
4.2. Syntéza výchozí látky

4.2.1. Příprava triethylamoniové soli fenyldithiokarbamové kyseliny



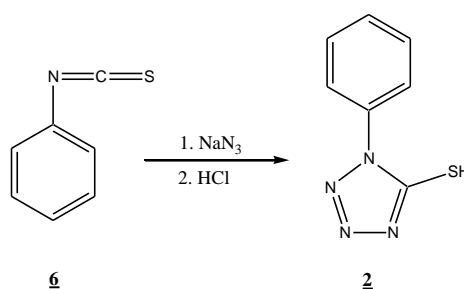
Anilin (26,15 g, 0,28 mol) jsem rozpustila v minimálním množství etheru (27 ml), přidala triethylamin ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (18,3 ml, 0,3 mol), ochladila na $0\text{ }^\circ\text{C}$ a přikapávala sirouhlík (8,6 ml, 0,34 mol) tak, aby teplota nepřesáhla hranici $5\text{ }^\circ\text{C}$. Roztok jsem ponechala 3 dny v lednici, poté jsem odfiltrovala vzniklé krystaly a promyla je etherem. Výtěžek reakce byl 45,5 g (60 %), získala jsem žlutou krystalickou látku **5** a použila ji v následujícím kroku syntézy.

4.2.2. Příprava fenyliothiokyanátu



Připravila jsem roztok dithiokarbamátu **5** (45,5 g, 0,17 mol) v chloroformu (180 ml), přidala triethylamin (22,7 ml, 0,17 mol) a směs ochladila na $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Poté jsem za neustálého míchání pomalu přikapávala ethylchloroformiát (16,6 ml, 0,17 mol). Roztok jsem nechala 15 minut míchat při teplotě $0\text{ }^\circ\text{C}$ a poté hodinu stát, aby se ohřál na laboratorní teplotu. Tuto směs jsem promyla roztokem 3M HCl, třikrát destilovanou vodou a vysušila bezvodým síranem sodným. Chloroform jsem vakuově odpařila. Získala jsem kapalnou látku **6**. Výtěžek reakce byl 21,85 g (95 %).

4.2.3. Příprava 1-fenyl-5-sulfanyl-1, 2, 3, 4-tetrazolu

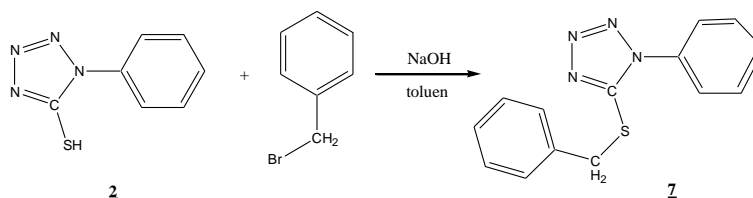


Směs fenyliothiokyanátu **6** (21,85 g, 0,16 mol), azidu sodného (10,5 g, 0,16 mol) a destilované vody (90 ml) jsem za stálého míchání zahřívala pod zpětným chladičem 6 hodin. Reakce proběhla když se vše ve směsi rozpustilo – vznikla polární sodná sůl. Směs jsem dvakrát extrahovala etherem. Vodnou fázi jsem za chlazení okyselila koncentrovanou HCl. Získaný produkt **2** jsem promyla destilovanou vodou a přečistila krystalizací z EtOH. Výtěžek reakce byl 15,68 g (55 %). Látka **2** byla použita jako výchozí látka při syntéze dalších derivátů.

4.3. Obecný postup přípravy látek 7 - 12

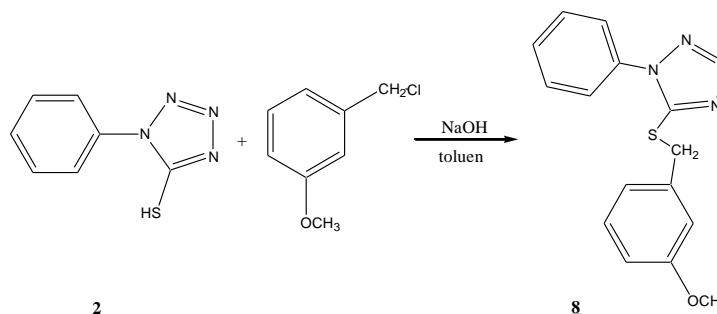
Výchozí látku **2** (1.00 g, 5.6 mmol) a tetrabutylamoniumbromid (0.16 g, 0.5 mmol) jsem rozpustila v toluenu (20 ml), přidala alkylační činidlo (15 mmol) a 1M roztok NaOH (20 ml). Reakční směs jsem za stálého míchání zahřívala pod zpětným chladičem. Po vychladnutí jsem oddělila anorganickou vodnou vrstvu a organickou jsem 3x vytřepala vodou (do neutrální reakce). Po opětovném oddělení vodné fáze jsem směs vysušila bezvodým Na₂SO₄ a rozpouštědlo odpařila. Produkt jsem přečistila. Jednotlivé reakce se lišily dobou trvání, použitým alkylačním činidlem a způsobem čištění výsledného produktu.

4.3.1. 1-fenyl-5-benzylsulfanyl-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: benzylbromid (1.8 ml, 15 mmol), čas reakce 2 hodiny, produkt **7** přečištěn krystalizací ze směsi PE-EtOAc 95:5, výtěžek 0.84 g (84 %). Bílá krystalická látka, t.t. 68 - 69 °C, literatura²⁰ uvádí 68 °C. ¹H NMR: (300 MHz, CD Cl₃) δ 7.56 - 7.50 (5H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 7.47 - 7.40 (2H, m, H₂' , H₆'), 7.38 - 7.27 (3H, m, H₃' , H₄' , H₅'), 4.62 (s, 2H, CH₂).

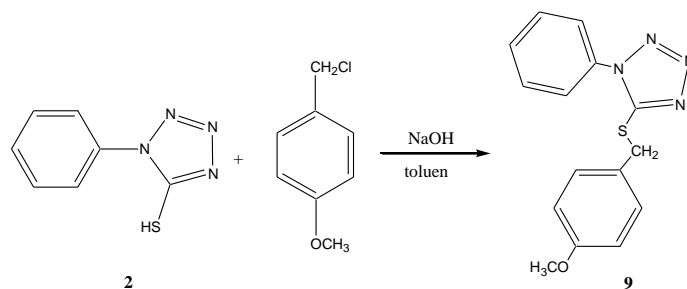
4.3.2. 1-fenyl-5-[(3-methoxybenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: 3-methoxybenzylchlorid (2.35 g, 15 mmol), doba trvání reakce 4 hodiny, čištění produktu **8** pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu eluční soustavou PE-EtOAc 9:1, výtěžek: 1.236 g (74 %). Bílá krystalická látka,

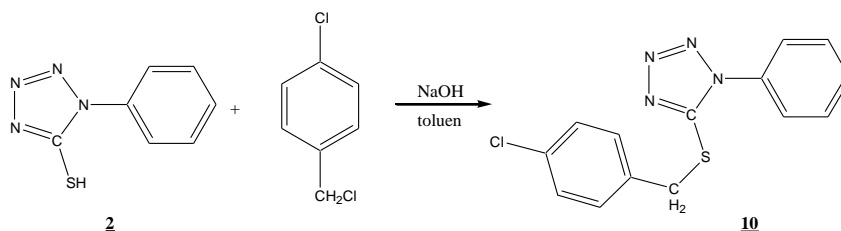
t.t. 79 – 81 °C. Látka není v literatuře popsána. ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.56 - 7.49 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 7.22 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H5'), 7.02 - 6.93 (2H, m, H2', H6'), 6.83 (1H, dd, $J=8.0$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4'), 4.67 (s, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 153.9, 136.6, 133.5, 130.1, 129.8, 129.7, 123.8, 121.5, 114.6, 113.8, 55.2, 37.6.

4.3.3. 1-fenyl-5-[(4-methoxybenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: 4-methoxybenzylchlorid (2.35 g, 15 mmol), čas reakce 2 hodiny 30 minut, produkt **9** zbaven nečistot sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází PE - PE-EtOAc (postupně 95:5, 9:1 a 8:2), výtěžek 0.92 g (55 %). Bílá krystalická látka, t.t. 51 – 53 °C, literatura²³ uvádí vždy olej. ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.55 - 7.50 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 7.38 - 7.31 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 6.87 - 6.82 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 4.59 (s, 2H, CH_2), 3.79 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3) δ 159.5, 154.0, 133.6, 130.5, 130.0, 129.7, 127.0, 123.8, 114.2, 55.3, 37.3.

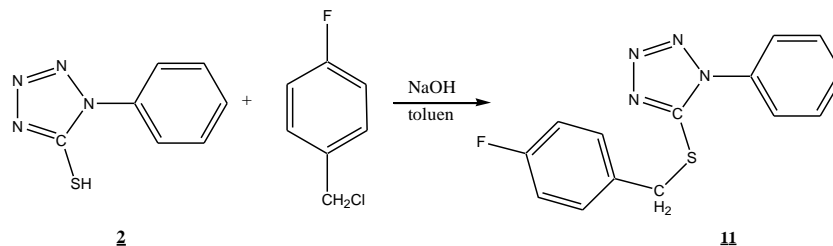
4.3.4. 1-fenyl-5-[(4-chlorbenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: 4-chlorbenzylchlorid (2.42 g, 15mmol), čas reakce 3 hodiny, produkt **10** překrystalizován ze směsi PE-EtOAc 9:1, výtěžek 0.42 g (25 %). Bílá krystalická látka, t.t. 98 – 101 °C. Látka je popsána v literatuře^{21,22,23} zabývající se látkami s antimykotickou aktivitou. ^1H NMR: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.55 - 7.50 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 7.40 - 7.34 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 7.31 - 7.26 (2H, m,

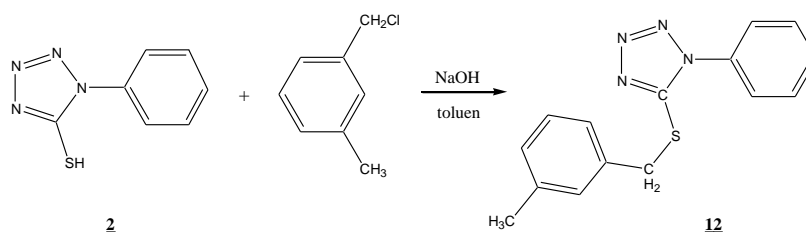
AA'BB', H2', H6'), 4.58 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 153.5, 134.1, 133.9, 133.5, 130.6, 130.2, 129.8, 129.0, 123.7, 36.7.

4.3.5. 1-fenyl-5-[(4-fluorbenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: 4-fluorbenzylchlorid (1.8 ml, 15 mmol)), čas reakce 2 hodiny a 30 minut, po obvyklém zpracování reakční směsi produkt **11** přečištěn krystalizací ze směsi PE-EtOAc 95:5, výtěžek 1.50 g (94 %). Bílá krystalická látka, t.t. 87 – 90 °C, literatura²³ udává hodnotu 91 – 93 °C. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.55 - 7.50 (5H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 7.45 - 7.37 (2H, m, H₃', H₅'), 7.05 - 6.96 (2H, m, H₂', H₆'), 4.59 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 162.5 (d, *J*=247.4 Hz), 153.7, 133.5, 131.1, 131.0 (d, *J*=8.3 Hz), 130.2, 129.8, 123.8, 115.7 (d, *J*=21.8 Hz), 36.8.

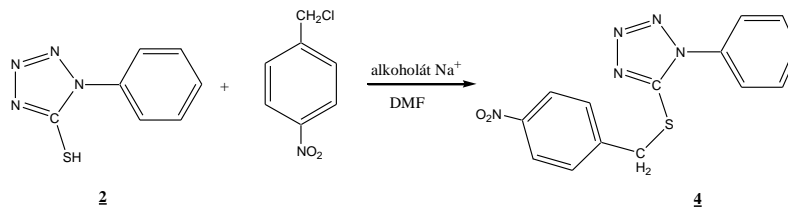
4.3.6. 1-fenyl-5-[(3-methylbenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Alkylační činidlo: 3-methylbenzylchlorid (2.05 ml, 15 mmol), čas reakce 2 hodiny a 30 minut. Z organické fáze se nepodařilo odpařit všechnen toluen, v získané nažloutlé kapalině se v chladu vytvořily krystaly, po promytí směsí PE-EtOAc 9:1 a vysušení nebylo třeba produkt **12** dále čistit, výtěžek 0.72 g (92 %). Bílá krystalická látka, t.t. 71 – 73 °C, látka není v literatuře popsána. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.54 - 7.50 (5H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆), 7.25 - 7.07 (4H, m, H₂', H₄', H₅', H₆'), 4.60 (s, 2H, CH₂), 2.33 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 154.0, 138.6, 135.0, 133.6, 130.1, 129.9, 129.7, 129.0, 128.7, 126.2, 123.8, 37.6, 21.3.

4.4. Syntéza nitroderivátu 4

1-fenyl-5-[(4-nitrobenzyl)sulfanyl]-1,2,3,4-tetrazol



Vlastní přípravě derivátu předcházela příprava alkoholátu sodného: sodík (0.17 g, 7.3 mmol) jsem rozpouštěla za studena a neustálého míchání v uzavřené baňce v 96 % etanolu denaturovaném methanolem (5 % obsah MeOH). Pro úplné rozpuštění sodíku jsem přidala ještě 2 ml MeOH.

Ke připravenému alkoholátu jsem následně přidala DMF (6 ml) a výchozí látku **2** (1.00 g, 5.6 mmol). Po 10 minutách míchání jsem do vzniklého roztoku vpravila činidlo 4-nitrobenzylchlorid (1.44 g, 8.4 mmol). Reakční směs jsem zahřála na 100 °C a za stálého míchání takto ponechala 48 hodin pod vzdušným chladičem. Směs jsem poté kvantitativně převedla do nadbytku vody a vytřepala EtOAc. Z ethylacetátové vrstvy jsem odstranila zásadité nečistoty vytřepáním s 5 % HCl, následně jsem vytřepávala vodou a 5 % roztokem NaHCO₃. Po vysušení a odpaření organické fáze jsem získala produkt s nečistotami nerozpustnými v běžných organických rozpouštědlech (EtOAc, aceton, EtOH, MeOH). Tyto nerozpustné částice jsem odfiltrovala na fritě a produkt **4** vyčistila sloupcovou chromatografií na silikagelu mobilní fází PE-EtOAc 75:25.

Výtěžek 0.19 g (40 %). Nažloutlá krystalická látka, t.t. 151 – 153 °C, literatura²⁰ uvádí 157 – 158 °C. ¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.21 - 8.14 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 7.69 - 7.61 (2H, m, AA'BB', H2', H6'), 7.58 - 7.48 (5H, m, H2, H3, H4, H5, H6), 4.67 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 153.0, 147.6, 143.1, 133.3, 130.4, 130.2, 129.9, 123.9, 123.7, 36.3.

5. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo syntetizováno několik derivátů 1-fenyl-5-sulfanyl-1,2,3,4-tetrazolu. Všechny látky byly charakterizovány svými ^1H NMR a ^{13}C NMR spektry a teplotou tání.

Z výsledků hodnocení cytostatické aktivity těchto námi připravených látek je patrné, že substituované tetrazoly nevykazují signifikantní inhibiční aktivitu. Je tedy zřejmé, že cytostatická aktivita konjugátů butenolidů s heterocykly je způsobena butenolidovou částí těchto molekul. Pro další vývoj cytostatických látek je tedy podstatné, aby obsahovaly butenolidovou část, další substituenty nebo části molekuly ovlivňují především transport.

Toto spojení jednoduché syntézy derivátů tetrazolu s testováním jejich aktivity je přínosné také proto, že tetrazol je metabolicky stabilní náhrada karboxylové skupiny, použitelná v řadě léčiv.²⁴

6. LITERATURA

1. Klener P., Protinádorová chemoterapie. Praha, Galén, **1996**. 65 - 79, 283 - 371.
2. Holý A., Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik. Univerzita Palackého v Olomouci, **2004**. 149 - 165, 221 - 260.
3. Cragg G., Kingston D., Newman D., Anticancer Agents from Natural Products. Taylor & Francis Group, **2005**.
4. Lincová D., Farghali H., Základní a aplikovaná farmakologie. Praha, Nakladatelství Galén a Karolinum, **2002**. 497 - 511.
5. Young Shin Cho, Kai-Da Wu, Malcolm A.S. Moore, Ting-Chao Chou, Danishefsky S. J., *Drugs of the Future* **2005**, 30 (7), 737 - 738.
6. Buchta V., Pour M., Kubanová P., Silva L., Votruba I., Vopršálová M., Schiller R., Fáková H., Špulák M., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 873-878.
7. Balšánek V., Doktorská disertační práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **2002**.
8. Lieber E., Pillai G. N., Hites R. D., *Can. J. Chem.* **1957**, 35, 832 – 842.
9. Chattaway F. D., Hardy R. K., Watts H. G., *J. Chem. Soc.* **1924**, 1552.
10. Werner A., *J. Chem. Soc.* **1891**, 396.
11. Hodgkins J. E., Reewes W. P., *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3089-99.
12. Atlant H. W., *J. Org. Chem.* **1979**, 41, 3395 – 3399.
13. Krábková M., Diplomová práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **1995**.
14. Pilař M., Diplomová práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **1997**.
15. Čeladník M. a kol., *Organická Chemie*. Praha, Avicenum, **1990**, 118.
16. Tvrdíková H., Diplomová práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **1988**.
17. March J., *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, **1992**.
18. Kuneš J., Doktorská disertační práce. UK v Praze, FaF v Hradci Králové, **1992**.
19. RNDr. Ivan Votruba. osobní sdělení.
20. Gol'tsberg M. A., Koldobskii G. I., *Russ. J. Org. Chem.* **1996**, 32, 1194 – 1201.
21. Waisser K., Adamec J., Doležal R., Kaustová J., *Fol. Microb.* **2005**, 50(3), 195-197
22. Waisser K., Adamec J., Kuneš J., Kaustová J., *Chem. Papers* **2004**, 58(3), 214-219
23. Adamec J., Waisser K., Kuneš J., Kaustová J., *Arch. Pharm. Chem. Life* **2005**, 338, 385 – 389.
24. Hartl J., Palát K., *Farmaceutická chemie I*. UK v Praze, Karolinum, **2001**, 28.