

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY
LÉČIV

CHALKONY A JEJICH ANALOGY JAKO POTENCIÁLNÍ
LÉČIVA VII

Rigorózní práce

Hradec Králové 2007

Mgr. Lucie Švédová

Upřímně děkuji Mgr. Martě Chlupáčové, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a všestrannou pomoc při vzniku této rigorózní práce.

Dále děkuji pracovníkům Laboratoře struktury a interakcí biologicky aktivních molekul za změření a interpretaci NMR spekter, paní Věnceslavě Hronové za změření elementárních analýz a paní Ivě Vencovské za změření IČ spekter.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat pracovníkům mikrobiologické laboratoře Katedry biologických a lékařských věd za zhodnocení mikrobiologické aktivity připravených látek.

OBSAH

Obsah	3
Seznam zkratek	4
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1. Struktura chalkonů	6
2.2. Biologické účinky chalkonů	7
2.3. Antineoplastická aktivita chalkonů	7
2.3.1. P-glykoprotein	8
2.3.2. Buněčný cyklus	9
2.3.3. Regulace buněčného cyklu	13
2.3.4. Nádorová transformace buňky	14
2.3.5. Apoptóza – programovaná smrt buňky	15
2.3.6. Hormon-dependentní nádory	16
2.3.7. Charakteristika nádorové tkáně	18
2.3.8. Chemoprevence	20
2.3.9. Promutagenní vlastnosti chalkonů	24
2.4. Možnosti syntézy chalkonů	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. Syntéza	29
3.1.1. Použité metody a jejich základní charakteristiky	29
3.1.2. Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)propenonů Claisen-Schmidtovou kondenzací	30
3.1.3. Příprava nitrovaných chalkonů Claisen-Schmidtovou kondenzací	35
3.2. Biologické hodnocení	39
3.2.1. Testování antimykobakteriální aktivity	39
3.2.2. Testování antifungální aktivity	40
4. DISKUSE	42
5. ZÁVĚR	44
6. PŘÍLOHY	45
6.1. Příloha 1	45
6.2. Příloha 2	46
6.3. Příloha 3	47
7. LITERATURA	48

SEZNAM ZKRATEK

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
B	báze
BC	buněčný cyklus
CA	<i>Candida albicans</i>
Cdk	cyklin dependentní kinasa
CG	<i>Candida glabrata</i>
CK	<i>Candida krusei</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDF	enzymy druhé fáze eliminace
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ER	estrogenní receptor
FAP	familiární adenomatózní polypóza
GJIC	mezibuněčná komunikace zprostředkovaná gap junctions
GRAS	všeobecně shledáno jako bezpečné
GSH	glutathion
HUVEC	endoteliální buňky lidské umbilikální žíly
ISL	isolikviritigenin
KS	kortikosteroidy
MABA	Microplate Alamar Blue Assay
MDM2	the mouse double minute 2 oncogene
MDR	vícenásobná rezistence
MTT	1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH	National Institute of Health
P-gp	P-glykoprotein
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
SDA	Sabouraudova půda
SERM	selektivní modulátory estrogenových receptorů
TAACF	Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility
TB	<i>Trichosporon beigelii</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Problematika chalkonů a jejich derivátů je na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy dlouhodobě studována, o čemž svědčí bohatá publikační činnost^{1, 2, 3}.

Cílem této rigorózní práce byla příprava dvou sérií derivátů chalkonu. První skupinu sloučenin tvoří pyrazinové analogy 2-methoxychalkonu různě alkylované na kruhu A. Druhou polovinou syntetické části této práce byla příprava polohových izomerů nitrochalkonu, přičemž substituce se týkala pouze kruhu B. Sloučeniny měly být testovány na antifungální a antimykobakteriální aktivitu.

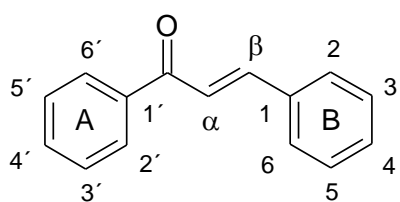
Přestože jsou chalkony široce zastoupeny v přírodě, nejsou jejich terapeutické a patologické účinky na lidský organismus dostatečně prozkoumány a vysvětleny. Studují se antibakteriální, antiprotozoální, antifungální, protivirové, protizánětlivé, antioxidační, cytostatické a další účinky chalkonů. Zmíněné typy biologické aktivity, které jsou v centru našeho zájmu, byly sumarizovány nedávno⁴, proto byla pozornost podrobněji zaměřena na jeden konkrétní typ účinku chalkonů. V teoretické části jsou shrnuty antineoplastické účinky chalkonů s příklady struktur, jsou zde rozebrány některé mechanismy působení a diskutovány další možnosti i úskalí studia chalkonů jako potenciálních cytostatik.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Struktura chalkonů

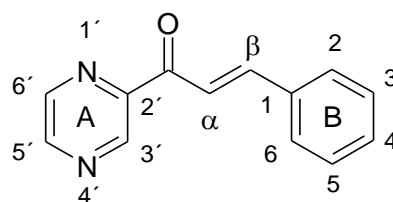
Chalkony neboli 1,3-difenylprop-2-en-1-ony jsou tvořeny dvěma aromatickými kruhy A a B spojenými tříuhlíkatým α,β -nenasyceným karbonylovým systémem. Přirozeně se vyskytující deriváty obvykle zaujímají termodynamicky výhodnější *trans* uspořádání na dvojně vazbě a jsou polyhydroxylované. Izomerizace, např. v důsledku světla, může způsobit změnu biologické aktivity. Vyskytují se v různých konformacích a jejich vlastnosti vychází z alkenonového seskupení a z polohy a typu substituce aromatických cyklů. Chalkony se mohou díky volné rotaci jednoduché vazby mezi karbonylovým uhlíkem a α -uhlíkem vyskytovat jako *s-cis* nebo *s-trans* konformery. Termodynamicky stabilnější je *s-cis* konformace². Molekula chalkonu, stejně jako pyrazinového analogu, je tvořena konjugovaným planárním systémem, kde substituce kruhů může způsobit jejich mírné vytočení⁵. Kruhy A a B se vyznačují různou energetickou bariérou rotace, přičemž kruh A má vyšší rotační flexibilitu a může se odchylovat od planárního seskupení do větší míry a ochotněji než kruh B. Rozměrné substituenty v poloze 2 (NO_2 , Cl) způsobují prudký nárůst torzního úhlu a proto tyto deriváty ztrácejí planární uspořádání⁶.

Chalkon

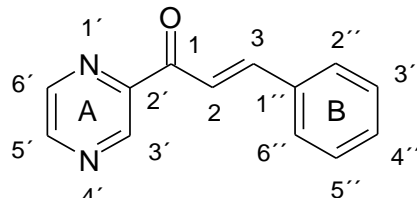
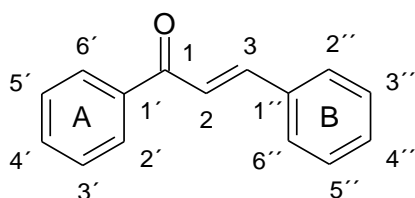


běžně
užívané
značení

Pyrazinový analog



pro potřeby
NMR



2.2. Biologické účinky chalkonů

Chalkony jsou sloučeniny se slibnou biologickou aktivitou a dobrým bezpečnostním profilem. Bylo popsáno široké spektrum účinků, které jsou pravděpodobně zprostředkovány několika mechanismy. Na mnoha pracovištích se studují antibakteriální, antivirové, antiprotozoální, antifungální, protizánětlivé, antioxidační, antikonvulzivní, antineoplastické a další účinky chalkonů². Žádný z nich ale nemůže být považován za dominantní a charakteristický pro všechny deriváty této skupiny sloučenin. Díky působení chalkonů na různé cílové systémy je obtížné stanovit vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou, ale v rámci určitého typu účinku je lze vystopovat. Pro nedostatek znalostí o konkrétních mechanismech účinku jednotlivých sloučenin čelí chalkony prozatím malému zájmu farmaceutického průmyslu⁷. Rozmanitost biologického působení může činit potíže ve smyslu širokého spektra nežádoucích účinků. Spíše než jako vlastní léčiva určená pro praxi mohou chalkony sloužit jako modelové struktury.

2.3. Antineoplastická aktivita chalkonů

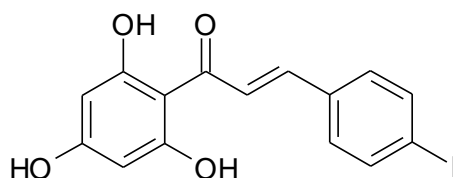
V průběhu posledních dvaceti let se výzkum nových léčiv využitelných v onkologii navrátil zpět k přírodním zdrojům⁸. Do klinické praxe byly zařazeny kamptotekany jako inhibitory topoizomerázy I a antimitoticky účinné taxany. Ve skupině flavonoidů jsou předmětem studia především chalkony. Chalkony jako prekurzory flavonoidů a isoflavonoidů běžně přijímáme v dietě. Mnohé rostlinné druhy bohaté na různé substituované chalkony jsou využívány alternativní medicínou.

Na vzniku nádorového bujení se mohou podílet fyzikální příčiny (např. některé druhy záření), chemické vlivy (tzv. kancerogeny) a biologické faktory (např. onkoviry, mykotoxiny). K základním charakteristikám nádorové buňky patří nekontrolovaná proliferace, ztráta funkčnosti, invazivita a tvorba metastáz. V současnosti používaná léčiva zasahují zejména do proliferace, zatímco invazivitu, tvorbu metastáz a ztrátu diferenciace zatím neumíme ovlivnit. Léčba vychází z typu nádoru, solidní nádory bez metastáz lze léčit radioterapií nebo chirurgicky. Systémový přístup umožňuje chemoterapie cytostatiky. Problémem chemoterapie je absence širokospektrého cytostatika, často nedostatečná selektivita toxicity vůči nádorovým buňkám a postupný vznik rezistence. Závažným následkem léčby cytostatiky je odmítnutí léčby v důsledku

nežádoucích účinků. Ty jsou způsobeny právě neselektivní toxicitou a týkají se zejména rychle se dělicích tkání (kostní dřev, gastrointestinální epitel, vlasové folikuly). Pro zvýšení účinku se podávají kombinace cytostatik s různými cílovými mechanismy, popř. se nasazují vysokodávkové režimy s použitím záchranné léčby. Mezi příčiny vzniku rezistence nádorových buněk patří využívání alternativních metabolických cest, zrychlení reparačních a detoxikačních procesů nebo zvýšená exprese široce diskutovaného P-glykoproteinu.

2.3.1. P-glykoprotein

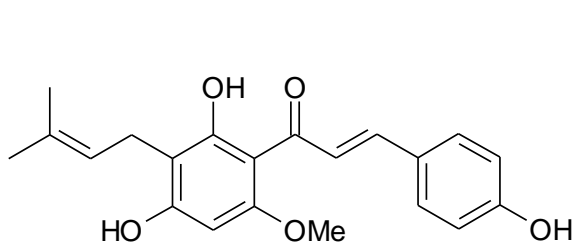
P-glykoprotein⁹ (P-gp) je transmembránový přenašeč, který aktivně vypuzuje cytostatika a je zodpovědný za vícenásobnou rezistenci (tzv. multiple drug resistance, MDR). MDR vzniká jako odpověď nádorové buňky na expozici cytostatikem a postupně se vyvíjí vůči strukturně různým chemoterapeutikům s odlišnými mechanismy účinku¹⁰. Aktivní eflux způsobí pokles intracelulární koncentrace léčiva pod cytotoxickou hladinu. V současnosti je popsáno několik inhibitorů efluxu léčiv způsobeného P-gp. Tzv. MDR modulátory zvyšují citlivost multirezistentních nádorových buněk vůči cytostatikům. Jde o chemicky rozmanitou skupinu léčiv obsahující některé flavonoidy (kvercetin restauruje citlivost vůči adriamycinu), blokátory kalciových kanálů (verapamil) a látky ze skupiny imunosupresiv (cyklosporin A). Mechanismem účinku imunosupresiv je kompetice o vazebné místo na P-gp. Halogenované chalkony se vyznačují vysokou vazebnou afinitou k P-gp. Podle experimentů, které provedl Bois, je hodnota disociační konstanty vzniklého komplexu halogenovaný chalkon/P-gp funkcí lipofility a velikosti halogenu. Nejvyšší vazebná afinita byla zjištěna u jodovaného derivátu¹⁰.



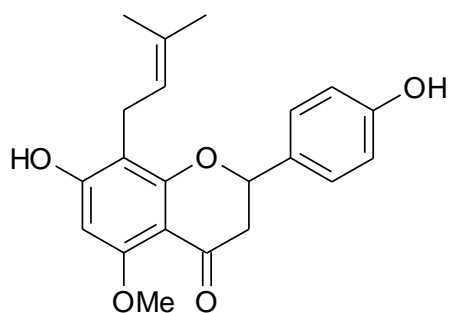
3-(4-jodfenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyfenyl)prop-2-en-1-on

Také některé prenylované chalkony mají schopnost inaktivovat P-gp¹¹. Děje se tak pravděpodobně interakcí se dvěma vazebnými místy proteinu (místo pro navázání ATP

a vazebné místo pro steroidy). Jako potenciální blokátory P-gp jsou studovány xanthohumol, což je nejvíce zastoupený chalkon chmele, a jeho izomerizační produkt isoxanthohumol. Obě látky působily cytostaticky na maligní buňky rakoviny prsu, tlustého střeva a vaječníku, které byly vůči testovaným flavonoidům nejcitlivější. Podstatou antiproliferativní aktivity je na dávce závislá inhibice syntézy DNA a indukce apoptózy.



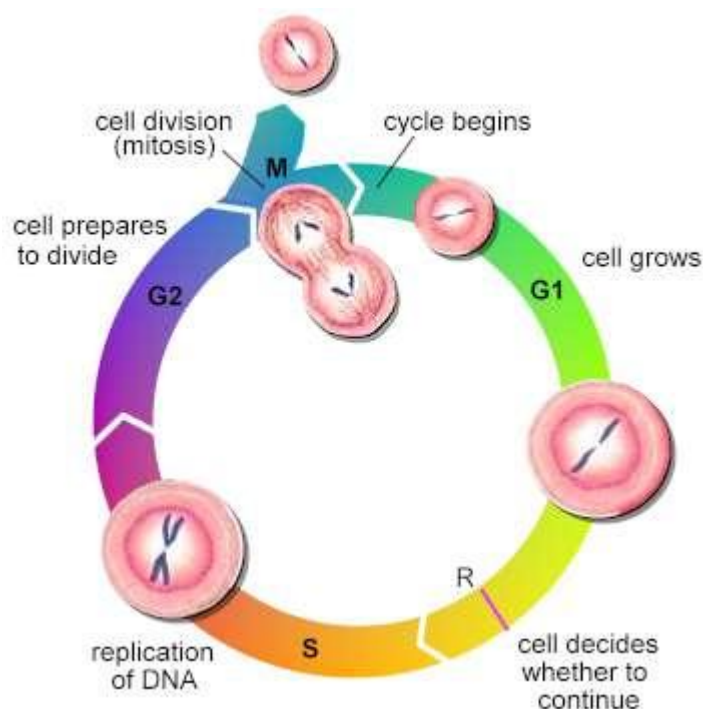
xanthohumol



isoxanthohumol

2.3.2. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus (BC) je sled procesů, které začínají rozdělením mateřské buňky a končí rozdělením dceřiné buňky¹². BC má čtyři navazující fáze: G₁-, S-, G₂- a M-fázi (obr. 1), přičemž u daného druhu buňky je trvání S+G₂+M konstantní, trvání G₁ fáze závisí na vnějších podmínkách a regulaci cyklu.



Obrázek 1

G₁-fáze (first gap phase, první přípravná fáze) tvoří u pravidelně se dělících živočišných buněk 30 – 40 % časového trvání BC. Leží zde hlavní kontrolní uzel (R) a proto je časově nejvariabilnější. Prostřednictvím syntézy RNA a proteinů dochází ke zdvojení buněčné hmoty.

S-fáze (syntetická fáze) trvá 30 – 50 % délky cyklu a dochází zde k replikaci jaderné DNA a k syntéze histonů.

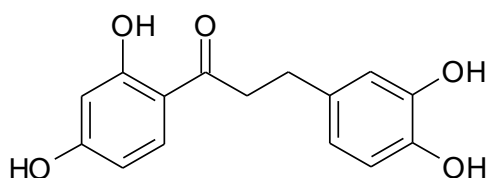
G₂-fáze (second gap phase, druhá přípravná fáze) je relativně krátká, zahrnuje pouze 10 – 20 % trvání cyklu a je charakteristická pokračováním mohutných syntetických procesů a tvorbou buněčných struktur. Leží zde druhý kontrolní uzel, který rozhoduje, zda buňka vstoupí do mitózy.

Jako varianty pro terapii nádorů se nabízí blokáda syntézy nukleových kyselin pomocí tzv. antimetabolitů (methotrexát, merkaptopurin, fluoruracil) nebo poškození struktury již hotových nukleových kyselin. Jako alkylační činidla se využívají dusíkaté yperity (např. estramustin-fosfát), deriváty nitrosomočoviny (fotemustin), komplexní sloučeniny platiny (cisplatina, lobaplatina) a jiné struktury (busulfan, dakarbazin). Z interkalačních látek určitě stojí za zmínku doxorubicin. Inhibitory topoizomeráz způsobují poruchy replikace. Jde o léčiva přírodního původu a ke klinicky významným zástupcům patří deriváty podofylotoxinu (inhibitory topoizomerázy II) a již zmíněné

kamptotekany (inhibitory topoizomerázy I). Bleomycin je glykopeptid, který vyvolává zlomy řetězců DNA a někdy je řazen mezi tzv. radiomimetika.

Polyhydroxylovaný chalkon butein blokuje syntézu DNA, RNA a proteinů inhibicí inkorporace tymidinu, uridinu a leucinu do buněk kolorektálního karcinomu¹³.

Inhibitory proteosyntézy se v praxi prozatím neuplatňují¹⁴.



butein

M-fáze (mitotická) trvá 5 – 10 % délky cyklu, tvoří ji 5 stádií (profáze, prometafáze, metafáze, anafáze a telofáze) a obvykle je zakončena cytokinezí, tedy rozdělením buňky.

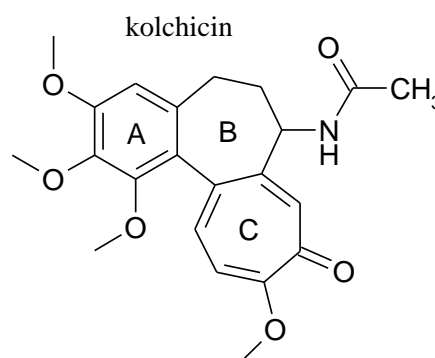
Důležitým prvkem této fáze jsou mikrotubuly. Stavební bílkovinou je tubulin, který je tvořen α a β podjednotkou. Na β podjednotce se nachází vazebné místo pro kolchicin a jiné specifické ligandy. Asociací tubulinu pomocí nevazebných interakcí mezi jednotlivými podjednotkami vznikají tzv. protofilamenta. Ta se řadí vedle sebe za vzniku mikrotubulu. V jednom mikrotubulu je zpravidla 13 protofilament a jeho průměr je 25 nm. Z farmakologického hlediska jsou důležité mikrotubulární toxiny uvedené v tabulce 1¹².

Tabulka 1

Toxin	Mechanismus účinku
kolchicin	inhibice polymerace nebo depolymerace mikrotubulů
vinblastin, vinkristin	indukce tvorby parakrystalických agregátů z nepolymerizovaného tubulinu
taxany	stabilizace mikrotubulů, inhibice depolymerace

Podmínkou reverzibilní vazby kolchicinu k β podjednotce tubulinu je přítomnost methoxyskupin na kruhu A a karbonylu v konjugaci na kruhu C¹⁵. Protože byla

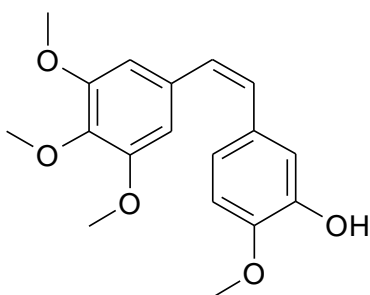
prokázána přítomnost SH-skupiny ve vazebném místě pro kolchicin, výzkum inhibitorů polymerace mikrotubulů se zaměřil na struktury obsahující trimethoxyfenylový zbytek a skupinu schopnou interakce s thiolem. Struktura chalkonu preferenčně reaguje se slabým nukleofilem, např. s thiolovou skupinou, méně ochotně vstupuje do reakce s aminem nebo hydroxylem, tedy se silnými nukleofilními činidly. Výhodou této vlastnosti může být nižší riziko mutagenity a kancerogenity kvůli méně pravděpodobným interakcím s nukleovými kyselinami⁹. Nanomolárních antimitotických koncentrací dosáhly látky z tabulky 2.



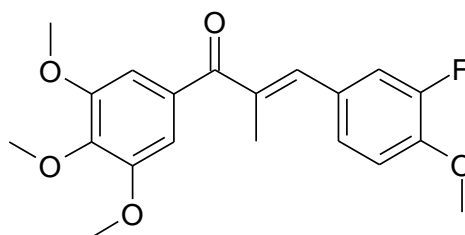
Tabulka 2

R	R'	R''
2,5-(OCH ₃) ₂	H	N(CH ₃) ₂
2,5-(OCH ₃) ₂	CH ₃	N(CH ₃) ₂
2,5-(OCH ₃) ₂	Br	N(CH ₃) ₂
3,4,5-(OCH ₃) ₃	CH ₃	N(C ₂ H ₅) ₂
3,4,5-(OCH ₃) ₃	Br	N(CH ₃) ₂

Modelovou látkou pro antimitoticky účinné chalkony byl tetramethoxylovaný stilben combretastatin A-4. Mikromolární inhibiční koncentrace byla dosažena např. níže uvedeným fluorovaným derivátem (testováno na H460 buňkách)⁷. Antimitotický potenciál zvyšuje přítomnost substituce α -uhlíku methylem. Tato methylace mění konformaci na *s-trans* a způsobuje ztrátu planarity systému. Obecně lze shrnout, že α -methyl deriváty patří mezi chalkony s nejvyšší cytotoxicitou. Náhradou atomu fluoru níže uvedeného chalkonu hydroxylovou skupinou vzniká derivát s IC₅₀ 0.21 nM (testováno na K562 buňkách)⁶.



combretastatin A-4



3-(3-fluor-4-methoxyfenyl)-2-methyl-1-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-en-1-on

Je známo, že inhibice syntézy DNA, RNA a proteinů a inhibice mitózy jsou mechanismy platné na rychle rostoucí nádory, naopak jde o málo efektivní postupy vůči pomalu rostoucím nádorům, jako je např. kolorektální karcinom. Léčba je navíc doprovázena četnými nežádoucími účinky způsobenými toxicitou vůči rychle se dělícím tkáním⁷.

2.3.3. Regulace buněčného cyklu

Podmínkou integrity mnohobuněčného organismu je udržovat počet tkáňových buněk na určité výši, hovoříme o regulaci BC¹². O pozitivní (indukce reprodukce) či negativní regulaci (zástava cyklu) rozhoduje hlavní kontrolní uzel. Druhý kontrolní uzel rozhoduje, zda buňka vstoupí do mitózy.

Primární roli při regulaci cyklu mají regulační proteiny cykliny a na nich závislé proteinkinasy, tzv. cyklin dependentní kinasy (Cdk). Tvorbou komplexu cyklin-Cdk se kinasa aktivuje a spouští fosforylační kaskádu. Výsledkem této kaskády může být spuštění replikace (vstup do S-fáze) nebo zahájení mitózy (vstup do M-fáze).

V mnohobuněčném organismu je dělení buněk kontrolováno místními a centralizovanými mechanismy, které zajišťují integritu organismu. Nádorové buňky se této kontrole vymykají. Homeostáza je udržována regulovaným přírůstkem počtu buněk a programovanou smrtí buněk, tedy apoptózou. Nejvíce zastoupenými regulačními prvky jsou růstové faktory (např. destičkový růstový faktor, epidermální růstový faktor, interleukin-2, erytropoetin) a hormony (zejména somatotropin a steroidní hormony).

Odlišným mechanismem regulace BC je tzv. kontaktní inhibice, kdy buňky při vzájemném dotyku zastavují svůj BC. Nádorové buňky tento efekt nevykazují, což může být příčinou anarchického růstu nádoru¹². Potenciální léčiva, která by zvyšovala

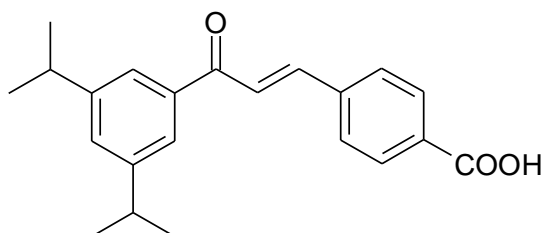
adhezi mezi nádorovými buňkami aktivací adhezivních molekul, jsou také předmětem výzkumu cytostatik.

2.3.4. Nádorová transformace buňky

V organismu mohou vznikat buňky, které nereagují na regulační mechanismy a nekontrolovatelně se rozmnožují, tzn. že se chovají jako pravé reprodukční automaty¹². Takto transformované buňky jsou charakteristické poruchami diferenciací, ploidie a změnami migračních vlastností. Podstatou takového procesu je změna aktivity některých genů, zejména protoonkogenů a tumor supresorových genů.

Produkty protoonkogenů se za normálních okolností podílí na kontrole dělení a diferenciací buňky. Mutací nebo aktivací protoonkogenu, popř. vnesením informace onkoviru, vznikají onkogeny. Produkty onkogenů mají nejčastěji funkci růstových faktorů nebo jejich receptorů, membránových přenašečů signálu, proteinkinas, inhibitorů supresorových genů, blokátorů apoptózy nebo transkripčních faktorů (regulátorů genetické exprese). Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je zmnožen u mnoha typů nádorů. Protože přijatý signál předává dále do buňky prostřednictvím enzymatické tyrozinkinasové aktivity, je inhibice tyrozinkinasy dalším potenciálním mechanismem účinku cytostatik. Některé deriváty chalkonu takto inhibují funkci receptoru pro EGF (např. výše zmíněný butein).

Inhibice exprese onkogenu je jedním z možných terčů chemoterapie a chemoprevence (viz dále). Bylo prokázáno, že níže uvedená kyselina inhibuje expresi onkogenu *c-myc*, indukuje terminální diferenciaci leukemických buněk a blokuje angiogenezi v embryonální tkáni¹³.



4-[3-(3,5-diisopropylfenyl)-3-oxo]prop-2-en-1-ylbenzoová kyselina

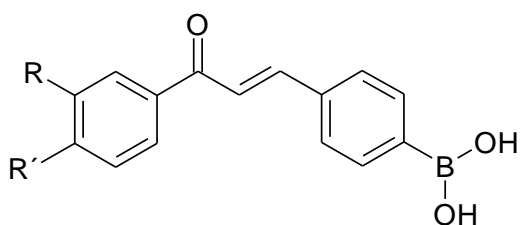
Tumor supresorové geny, nebo také antionkogeny, mohou interagovat s růstovými faktory, inhibovat transkripci nebo např. spouštět apoptózu. Mezi nejznámější zástupce

patří geny Rb a p53. Produkt genu p53 hlídá DNA, někdy je trefně nazýván strážce genomu. Je-li DNA poškozena, zablokuje BC až do doby, kdy dojde k reparaaci. V opačném případě spouští protein p53 apoptózu.

2.3.5. Apoptóza – programovaná smrt buňky

Součástí genomu každé buňky jsou geny, jejichž indukcí se spouští kaskáda procesů vedoucích ke smrti. Jde o aktivní proces vyžadující syntézu proteinů, tzn. že inhibice proteosyntézy tento sebevražedný program blokuje. Programová smrt buňky začíná aktivací specifických proteas (kaspas), které působí rozštěpení klíčových buněčných proteinů. Látky schopné aktivovat kaspasy jsou považovány za potenciální cytostatika. Takové vlastnosti byly popsány např. u série 2,2,2-trifluorethoxychalkonů⁷. Z pohledu apoptózy je důležitý produkt protoonkogenu bcl-2, který potlačuje její navození. Protein p53 snižuje množství bcl-2 proteinu, čímž apoptózu spouští. U některých typů nádorů byl popsán amplifikovaný MDM2 onkogen (the mouse double minute 2 oncogene), jehož funkcí je inhibice proteinu p53¹⁶. Antionkoprotein p53 může být inaktivován mutací nebo navázáním onkoproteinu. Bylo prokázáno, že rozpojení komplexu MDM2/p53 může zvýšit účinnost protinádorové terapie.

Chalkony mají potenciál indukovat apoptózu různých typů buněk právě mechanismem rozštěpení komplexu onkoprotein/p53 protein. V jedné ze studií¹⁶ bylo zkoumáno, zda borité deriváty chalkonů vyvolávají apoptózu pouze transformovaných buněk nádoru prsu, nebo zasahují i do buněčného cyklu elementů zdravé tkáně. Ze závěrů studie vyplynulo, že uvedené deriváty mají nejvíce vyjádřenou specifitu toxického působení vůči nádorovým buňkám v porovnání s ostatními známými chalkony.

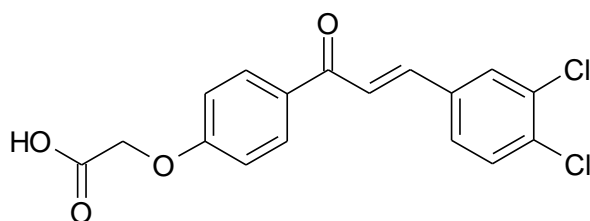


R = H, Cl, F, Br

R' = Cl, F, I

deriváty 4-(3-fenyl-3-oxo)prop-2-en-1-ylfenylborité kyseliny

Také dříve studované karboxymethoxychalkony ruší interakci proteinu p53 s MDM2 onkoproteinem⁷. Uvedená struktura snížila aktivitu MDM2 o více než 70 %.

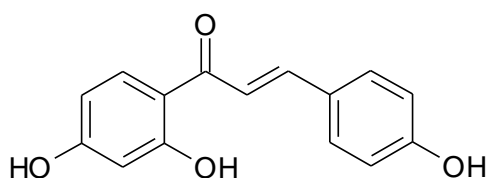


kyselina 4-[3-(3,4-dichlorfenyl)-1-oxo-prop-2-en-1-yl]fenoxyoctová

Apoptóza může být tedy spuštěna aktivací kaspas, amplifikací účinku proteinu p53 nebo inhibicí účinku proteinu bcl-2.

2.3.6. *Hormon-dependentní nádory*

Existují důkazy, že růst některých nádorů je podporován endogenními hormony. Některé chalkony vykazují protinádorovou aktivitu závislou na vazbě na estrogení receptor. Extrakt kořene lékořice a jeho složky jsou předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin. Příčinou fytoestrogeních účinků isolikviritigeninu (ISL) je vhodná vzdálenost hydroxylových skupin a přítomnost aromatického cyklu A.

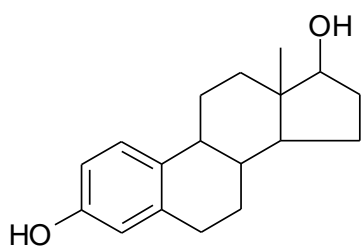


isolikviritigenin

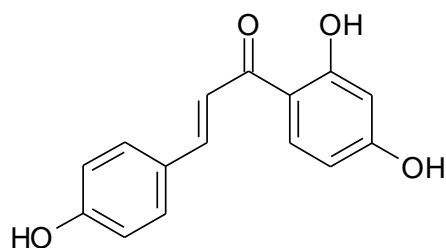
ISL působí stejně jako estradiol prostřednictvím jaderných estrogeních receptorů (ER). Konformační změna receptoru po navázání hormonu vede k regulaci transkripce cílových genů. Výsledkem je fyziologická proliferace a diferenciací prsní tkáň, nebo také vývoj a progresse nádoru prsu¹⁷. Paradox je výsledkem na dávce závislého účinku. Fytoestrogeny jsou považovány za přírodní chemoprotektiva a kořen lékořice byl v USA schválen jako GRAS (Generally Regarded As Safe). Nízké hladiny ISL ($\leq 1 \mu\text{M}$) však stimulují proliferaci hormonálně-závislého nádoru prsu, zatímco relativně vyšší hladiny ISL ($\geq 10 \mu\text{M}$) působí na tytéž buňky cytotoxicky. Mechanismus

cytotoxického účinku nezávisí na ER. Dlouhodobé vystavení nízkým hladinám ISL by mohlo stimulovat progresi hormonálně-závislých ženských karcinomů. Zatím chybí data o sérových koncentracích ISL u žen konzumujících potraviny, léčivé přípravky, nebo potravní doplňky obsahující ISL. Z výše uvedených poznatků vyplývá, že podávání suplementů obsahujících fytoestrogeny by mělo být vždy na individuálním zvážení.

Srovnání prostorového uspořádání estradiolu a přírodního fytoestrogenu ISL.



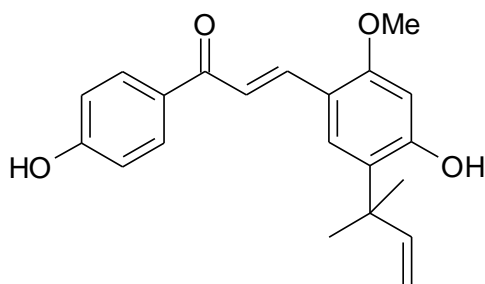
estradiol



isolikviritigenin

V jiné práci je popsán účinek isolikviritigeninu na buňky nemalobuněčného nádoru plic, který se v důsledku nízké odpovědi na radio- a chemoterapii vyznačuje vysokou mortalitou¹⁸. Byla prokázána blokáda BC, zvýšení exprese proteinu p53, indukce apoptózy a inhibice proliferace jako výsledek mnohočetných účinků ISL na nádorovou tkáň. Odlišným popsáním účinkem isolikviritigeninu je aktivace makrofágů.

Další intenzivně studovanou strukturou obsaženou v kořeni lékořice je likochalkon A¹⁹. Jeho antitumorová aktivita byla prokázána na několika buněčných liniích. Při zkoumání mechanismu účinku u rakoviny prostaty byla zjištěna indukce apoptózy a blokáda buněčného cyklu v G₂ fázi doprovázená inhibicí transkripce příslušných cyklinů a Cdk. Snížená míra exprese byla prokázána také u genu pro androgenní receptor a genu pro prostatický specifický antigen. Signifikantní klinický efekt byl popsán u hormon-dependentní i u refrakterní formy karcinomu prostaty. Likochalkon A je nadále studován jako potenciální chemoprotektivum a imunosupresivum. V současnosti neexistuje účinná terapie pro rezistentní karcinom prostaty s metastázami, kde průměrná doba přežití činí 18 měsíců.



likochalkon A

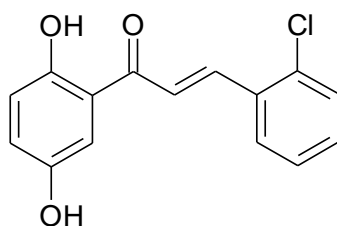
Hydroxylované chalkony jsou studovány pro cytostatický účinek vůči širokému spektru nádorových buněk, včetně karcinomu prsu. Nízkých inhibičních koncentrací dosahovaly obecně 3-fenyl-1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-enony a konkrétně 1-(2,4-dihydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-enon. Uvedené chalkony zpomalují nebo zastavují proliferaci nádorové tkáně, inhibují aromatasovou aktivitu a váží se na estrogenový receptor²⁰.

2.3.7. Charakteristika nádorové tkáně

Samotná aktivace jednoho onkogenu nestačí ke vzniku nádoru. Ve spojení s poruchou reparace DNA a poruchami imunologického rozpoznání transformovaných buněk mohou změněné protoonkogeny či tumor supresorové geny iniciovat vznik nádoru.

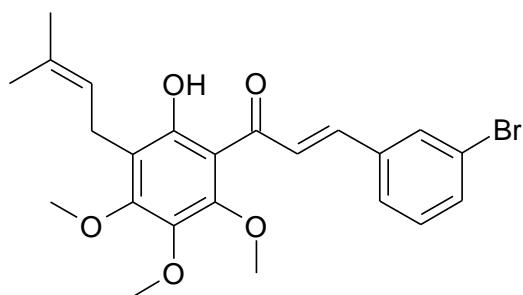
Důležitým faktorem kancerogeneze je novotvorba krevních cév, tzv. angiogeneze²¹. Tento proces se vyskytuje jednak fyziologicky, např. při vývoji plodu nebo jako reparační proces při revaskularizaci rány, jednak patologicky. Růst cév může být stimulován zánětlivým procesem (psoriáza, rosacea, artritida) nebo nádorem. Do určité velikosti je nádor dostatečně okysličován a vyživován difuzí z okolních kapilár, ale po dosažení kritických rozměrů začne vnitřní část nádoru nekrotizovat. Pokud nádor produkuje angiogenetické faktory, může v důsledku neorevaskularizace nadále růst a metastázovat. Mezi následky cévní novotvorby patří také další snížení diferenciací nádorových buněk. Jako faktory podporující angiogenezi se uplatňují např. interleukin-8, vaskulární endoteliální růstový faktor a fibroblastový růstový faktor. Struktury se schopností inhibice angiogeneze jsou předmětem výzkumu, protože mohou zastavit růst nádoru. Byly popsány inhibiční vlastnosti interferonu- α , retinoidů, kurkuminu, thalidomidu a derivátů chalkonu. Protože novotvorba cév se odvíjí od

buněk endotelu, byla testována selektivní toxicita skupiny chalkonů vůči endotelovým buňkám lidské umbilikální žíly (tzv. HUVEC – human umbilical venous endothelial cells)²². HUVEC v tomto případě reprezentují linii buněk endotelu. Chalkony působící toxicky selektivně na buňky endotelu mohou sloužit jako vzorové struktury pro syntézu potenciálních inhibitorů angiogeneze. Ze studia struktury a účinku vyplynuly dvě podmínky inhibice HUVEC: struktura hydrochinonu na kruhu A a přítomnost elektron-akceptorového substituentu na kruhu B, který zvyšuje elektrofilitu na β -uhlíku. Tím roste ochota k alkylaci nukleofilem, např. výše zmíněným thiolem. Nejslibnější výsledky poskytl 1-(2,5-dihydroxyfenyl)-3-(2-chlorfenyl)prop-2-en-1-on.



1-(2,5-dihydroxyfenyl)-3-(2-chlorfenyl)prop-2-en-1-on

Zásadní podmínkou šíření nádoru je jeho invazivita a s ní související tvorba metastáz, které jsou hlavní příčinou úmrtí onkologických pacientů²³. Invazivita je schopnost nádorových buněk migrovat za přirozené hranice tkáně a působit její destrukci. C-prenylované a O-allylované deriváty chalkonu byly podrobeny testu inhibice invazivity²⁴. Histologickou metodou byla hodnocena míra invaze nádorových buněk do zdravé tkáně po inkubaci s konkrétním derivátem chalkonu. Nejlepší profil měl prenylový derivát s bromem v poloze 3 na kruhu B, který reverzibilně inhiboval invazi nádorových buněk a přitom v daných koncentracích nebyl cytotoxický.



3-(3-bromfenyl)-1-[2-hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-4,5,6-trimethoxyfenyl]prop-2-en-1-on

Prenylace je jednou z posttranslačních úprav cytoplasmatických proteinů a pravděpodobně slouží k tvorbě kotvicích míst pro signální molekuly. Předpokládaným mechanismem účinku prenylovaných chalkonů může být interference s některými signálními dráhami v buňkách. Pokud je prenylová skupina v *ortho*-pozici vůči hydroxylové skupině, může v těle za určitých podmínek cyklizovat za vzniku pětičlenného furanu nebo šestičlenného pyranu⁶. Antitumorová aktivita u prenylovaných derivátů může být zvýšena náhradou kruhu B 3-pyridylem nebo 4-pyridylem⁸.

Role oxidačního stresu v rozvoji kancerogeneze je neustále upřesňována. Organické peroxidy a volné radikály poškozují membrány, DNA i proteiny a tím se podílí na procesu stárnutí a propagace nádoru. Antioxidanty a scavengery inhibují biochemické a biologické efekty nádoru. U většiny chalkonů jsou popsány antioxidační vlastnosti a s nimi související potenciální schopnost inhibice kancerogeneze. Nejsilnějšími antioxidanty ze skupiny chalkonů jsou hydroxylované a prenylované deriváty.

2.3.8. Chemoprevence

Chemoprevence spočívá ve využití přírodních nebo syntetických látek (tzv. chemoprotektiv) za účelem snížení rizika vzniku nebo rozvoje nádorového nebo degenerativního onemocnění²⁵.

Mechanismy účinku chemoprotektiv:

- ❖ Inhibice enzymů první fáze eliminace xenobiotik podílejících se na aktivaci prokancerogenů (zejména izoenzymy 1A a 3A jaterního mikrozomálního systému cytochromu P450)
- ❖ Indukce enzymů druhé fáze eliminace xenobiotik, které konjugáčnými reakcemi s kyselinou glukuronovou, sírovou, octovou, popř. s glutathionem zabraňují akumulaci xenobiotik v organismu
- ❖ Indukce apoptózy
- ❖ Antioxidační, protizánětlivá a scavengerová aktivita

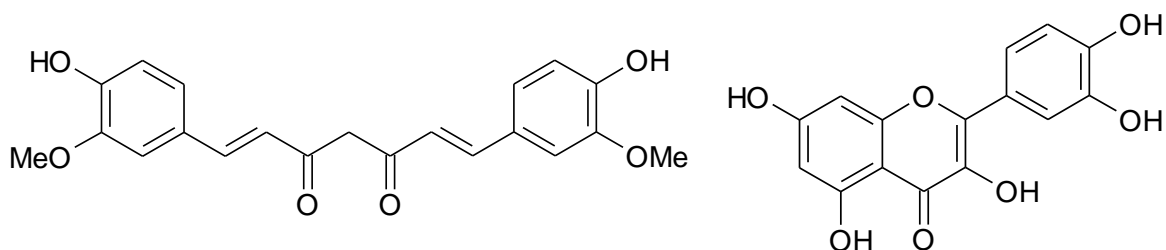
Dalšími cestami k chemoprevenci může být inhibice cyklooxygenasy-2 nebo reakce s PPAR γ (nitrojaderné receptory ovlivňující transkripci a expresi genů)⁶.

Indukce transkripce enzymů druhé fáze (EDF) a glutathionu (GSH) je vysoce účinnou metodou obrany proti toxickým a kancerogenním vlivům²⁶. GSH představuje nejčastější buněčný neproteinový thiol. Bylo popsáno několik typů struktur (tzv. induktory), které zvyšují transkripci EDF a GSH prostřednictvím chemické modifikace buněčného senzoru. Přítomnost hydroxylové skupiny v *ortho*-pozici aromatického kruhu induktoru zvyšuje indukční potenciál. Mezi popsané induktory patří akceptory Michaelových reakcí včetně chalkonů, vicinální thioly, karotenoidy, difenoly, isothiokyanáty a další. Všechny mají potenciál reagovat s thiolovou skupinou (alkylace, oxidace, redukce).

Také inhibitory EDF lze využít v chemoterapii. Zpomalením eliminace cytostatika roste jeho koncentrace a účinek v cílových tkáních, problémem může být současný růst nežádoucích účinků.

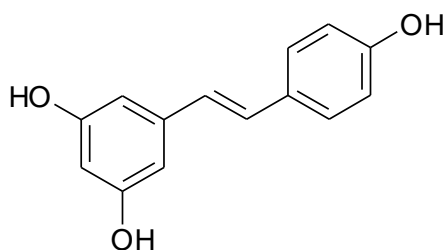
Bylo vyvinuto několik modelových systémů na testování potenciálních chemoprotektiv. Základem jsou buněčné a enzymové soustavy zaměřené na odhalení antioxidačních, protizánětlivých, kancerostatických a metabolismus modulujících účinků²⁷. Řada přírodních látek vykazuje chemoprotektivní účinky. Naděje se vkládají do flavonoidů, chalkonů, kumarinů, terpenů, indolů, fenolů, organosírových sloučenin a některých alkaloidů. Jejich příjem v potravě může ovlivňovat děje související s biotransformací xenobiotik a aktivací prokancerogenů²⁵. Několika chemopreventivními mechanismy působí např. kurkumin, kvercetin, resveratrol nebo

dříve zmíněný xanthohumol. Testovány byly také produkty fermentace vlákniny, např. kyselina máselná, resp. její sodná sůl.



kurkumin

kvercetin



resveratrol

Mezi strukturami studovanými jako potenciální chemoprotektiva má důležité místo skupina látek obsahující alkenonové seskupení jako integrální součást molekuly²⁸. Základem je tedy keton konjugovaný s nenasycenou dvojnou vazbou, což činí chalkony slibnými strukturami v managementu terapie a prevence rakoviny.

Ze syntetických léčiv je studován potenciální chemopreventivní účinek nesteroidních antiflogistik, kortikosteroidů, retinoidů, tamoxifenu nebo finasteridu.

Kyselina acetylsalicylová, piroxicam, celecoxib a sulindak byly testovány samostatně nebo v kombinaci s jinými potenciálními chemopreventivy. Celecoxib snižoval počet kolorektálních polypů u pacientů s familiární adenomatózní polypózou (FAP). FAP je autozomálně dominantně dědičné onemocnění tlustého střeva s výskytem mnohočetných polypů v tlustém střevě, které později malignizují²⁹. Předmětem dalšího výzkumu bude otázka, zda snížení počtu polypů ovlivní počet úmrtí na kolorektální karcinom u pacientů s FAP³⁰.

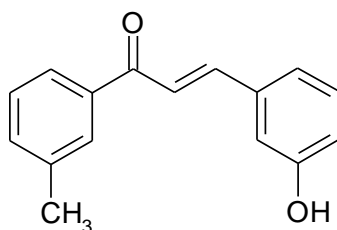
Kortikoidy (KS) jsou účinnými inhibitory kancerogeneze. V souvislosti s rakovinou plic byl sledován preventivní účinek inhalačního budesonidu nebo beklomethasonu v kombinaci s perorálním podáváním *myo*-inositolu³¹. Růst nádoru byl

inhibován v závislosti na dávce o 60 – 80 %. *Myo*-inositol je přirozeně se vyskytující netoxické chemoprotektivum, které je vysoce účinné zejména v kombinaci s KS v postiniciační fázi kancerogeneze. Chemoprevence rakoviny plic předpokládá podobně jako astma dlouhodobé inhalační podávání nízkých dávek KS.

Tamoxifen, obdobně jako raloxifen, patří mezi selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM). V reprodukčních orgánech působí antagonisticky (využití v prevenci a terapii karcinomu prsu) a v jiných orgánech působí agonisticky (léčba osteoporózy).

Finasterid inhibicí 5 α -reduktasy snižuje množství dihydrotestosteronu ve tkáních a používá se jako prevence a léčba benigní hyperplazie prostaty. Zkoumá se také jeho vliv na karcinom prostaty. Finasterid redukuje velikost prostaty až o 25 %, snižuje riziko chirurgického zákroku až o 50 % a snižuje riziko vzniku rakoviny o 25 %³². Některé přirozeně se vyskytující prenylované chalkony jsou účinnými inhibitory 5 α -reduktasy.

Dobře prostudované spektrum účinků má methylovaný hydroxyderivát uvedený níže. Tento jednoduše substituovaný derivát působí silně cytotoxicky na buňky rakoviny žaludku. Další citlivé nádorové buňky pocházely z pankreatu, neuroblastomu a děložního čípku¹³.



3-(3-hydroxyfenyl)-1-(3-methylfenyl)prop-2-en-1-on

Forejtníková a kol.³³ studovala nejen potenciální chemopreventivní, ale také nepříznivé účinky série hydroxy- a methoxychalkonů. Studie vycházela z předpokladu, že inhibice intercelulární komunikace prostřednictvím gap junctions (GJIC, gap junction intercellular communication) je samostatným rizikovým faktorem rozvoje kancerogeneze. Inhibice GJIC působí jako tzv. epigenetický kancerogen, který neovlivní vznik nádorové buňky, ale může podpořit její progresi. Vliv chemoprotektiva na GJIC je zatím nedocenenou a málo studovanou vlastností. Významná část

testovaných chalkonů inhibovala GJIC. Sloučeniny inhibující GJIC mají potenciál chovat se jako promotory kancerogeneze a měly by být vyřazeny z dalšího screeningu chemoprotektiv. Blokace promoce nádoru mechanismem indukce intercelulární komunikace nebo znemožněním inhibice GJIC se nabízí jako další možný mechanismus účinku chemoprotektiv. Vliv sloučeniny na GJIC by měl být zařazen do modelových systémů na testování potenciálních chemoprotektiv. Studie bezesporu upozornila na zajímavou skutečnost, která by neměla být dále přehlížena.

Následující tabulka shrnuje základní mechanismy prevence a terapie nádorového bujení.

Tabulka 3

Kancerogeneze	Chemoprevence a chemoterapie
Aktivace prokancerogenu	Inhibice uptake, inhibice aktivace, indukce deaktivace
Poškození DNA	Inhibice interakce kancerogen-DNA, oprava DNA
Iniciace a promoce	Indukce apoptózy, aktivace kaspas, aktivace supresorových genů, inaktivace protonkogenů
Progrese	Zásahy do BC, inhibice angiogeneze, inhibice tvorby metastáz, inhibice P-glykoproteinu, indukce GJIC

2.3.9. Promutagenní vlastnosti chalkonů

Ochota chalkonů vstupovat do vazebných i nevazebných interakcí s sebou nese riziko mutagenního a kancerogenního působení¹³. Chalkony navíc mohou podléhat metabolizaci na odpovídající epoxidy, které v tomto smyslu představují ještě větší riziko. Vysoký mutagenní potenciál mají nitrované deriváty. Jako nejsilnější mutagenní činidlo byl vyhodnocen 1-fenyl-3-(4-nitrofenyl)prop-2-en-1-on a jeho epoxid. Posun nitroskupiny do poloh 2 a 3 vedl ke snížení mutagenity. Všechny molekuly nesoucí nitrofenylovou skupinu testované jako potenciální léčiva by měly být podrobeny také zkouškám mutagenity.

2.4. Možnosti syntézy chalkonů

Dosud byly syntetizovány nejrůznější modifikace struktury chalkonu. Důraz byl kladen zejména na substituce kruhů A i B, heterocyklické analogy, dále byla zkoumána možnost hydrogenace dvojně vazby spojovacího řetězce nebo substituce α -uhlíku, a v poslední řadě byla využita cyklizace za vzniku konformačně omezených analogů⁶.

Nejčastěji používanou metodou pro syntézu chalkonů a jejich derivátů je Claisen-Schmidtova kondenzace. Claisen-Schmidtova kondenzace, neboli zkřížená aldolová kondenzace, probíhá mezi aldehydem a ketonem (schéma 1). Reakce je zahájena atakem silné báze (B), která vyváže proton z α -uhlíku acetofenonu nebo jeho pyrazinového analogu. Vzniklý karbanion napadá karbonylovou skupinu substituovaného benzaldehydu. Konečný produkt (α,β -nenasycený keton) vzniká dehydratací aldoxidového aniontu.³⁴

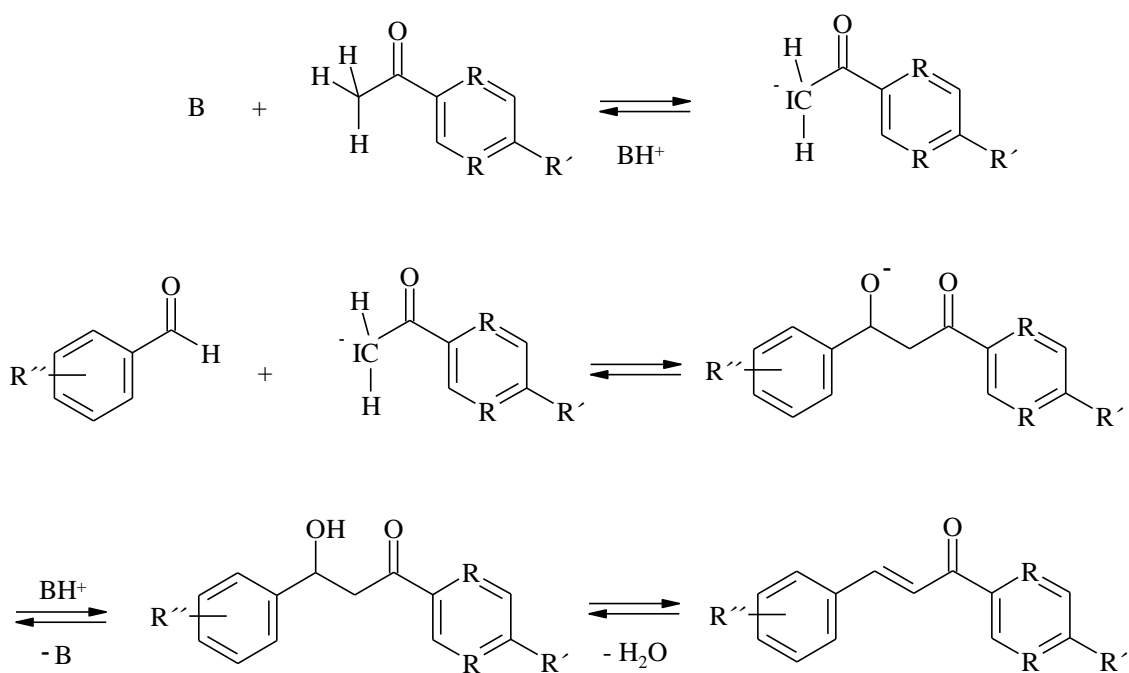


Schéma 1

$R \Rightarrow \text{CH, N}$	$R' \Rightarrow \text{H, alkyl}$	$R'' \Rightarrow \text{OCH}_3, \text{NO}_2$
------------------------------	----------------------------------	---

V této práci byla pro přípravu cílových struktur použita právě Claisen-Schmidtova kondenzace. Pyrazinové analogy byly syntetizovány v prostředí pyridinu

s diethylaminem³ a nitrované chalkony byly většinou připraveny v prostřední methanolu s pevným hydroxidem sodným modifikací postupů Rojase³⁵ a Troebergové³⁶. Při selhání této metody byla použita varianta s pyridinem. Podrobnosti jsou uvedeny v experimentální části.

Díky velkému zájmu o chalkony a jejich deriváty bylo publikováno několik dalších metod přípravy. Kromě již zmíněného NaOH v methanolu může být pro vytvoření bazických podmínek reakce použit KOH³⁷. Mukherjee²⁴ připravoval diarylpropeny za katalýzy Ba(OH)₂ v ethanolu, přičemž ostatní podmínky reakce a následující kroky byly identické s níže popsanou methanolovou metodou. Offenbauer³⁸ syntetizoval 1-fenyl-3-(4-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on a jeho nitrovaný analog v prostředí *m*-xylynu za přítomnosti kyseliny borité. Reakce běžela 65 hodin při pokojové teplotě. Další možností kondenzace v kyselém prostředí je reakce 2-nitrobenzaldehydu s acetofenonem a octanem amonným v kyselině octové pod inertní atmosférou dusíku. Po 3 hodinách byla soustava ochlazená za vyloučení žlutých krystalů³⁹.

Dobrých výtěžků dosahují aldolové kondenzace katalyzované kovovými komplexy⁴⁰. Podle zdrojové literatury patřily k nejefektivnějším zejména komplexy dvojmocného kobaltu, niklu, mědi a zinku s 2,2'-bipyridinem. Reakce probíhaly v aprotickém prostředí dimethylformamidu (DMF). Nejprve byl připraven komplex (zde zinečnatý) reakcí octanu zinečnatého v DMF s bipyridinem. Po změně zbarvení indikující tvorbu katalyzátoru byl přidán benzaldehyd a acetofenon. Soustava byla míchána 18 hodin při 80 °C. Předpoklad pro katalytický účinek kovových komplexů vycházel ze znalosti obdobného mechanismu v biologických systémech. V živých organismech jsou aldolové kondenzace umožněny přítomností aldolas, přičemž některé z nich patří mezi metaloenzymy obsahující zinečnaté ionty.

Z pohledu životního prostředí se jako nejvhodnější jeví syntézy bez použití organických rozpouštědel. Existují publikace o syntéze chalkonů třením surovin s pevným NaOH v třence. Reakce probíhaly rychle, s dobrými výtěžky a s minoritními vedlejšími produkty (ketol a Michaelův adiční produkt)⁴¹.

Pro tvorbu C=C jsou využívány Wittigovy reakce⁴² (schéma 2). Reakce stabilizovaného fenylacetylidenu, zde trifenyl-(2-fenyl-2-oxoethyliden)fosforanu, se substituovaným benzaldehydem poskytuje chalkon.

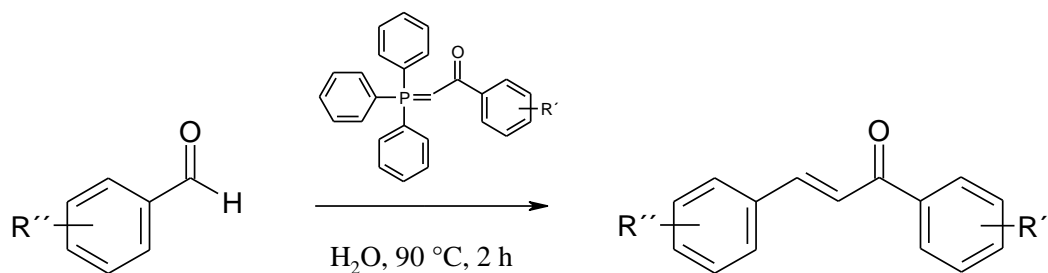


Schéma 2

Je známo, že rychlost této reakce roste s použitím polárního rozpouštědla, konkrétně vody, což činí tento způsob ekonomicky výhodným a současně přijatelným z pohledu „zelené chemie“. Voda patrně stabilizuje polární přechodný stav nebo se svým protickým charakterem přímo podílí na reakci. Do reakce nevstupuje výše uvedená forma fosforanu, ale jeho mezomerní forma s kladným nábojem na fosforu a záporným na uhlíku (schéma 3).

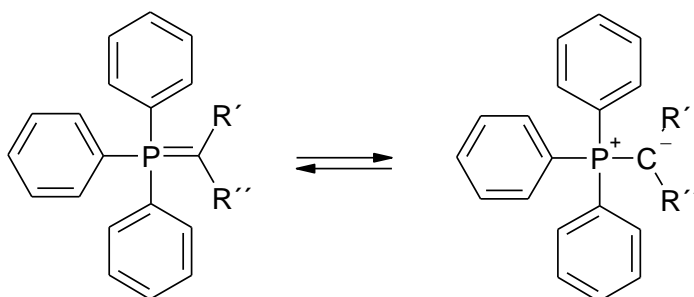


Schéma 3

Karbanion fosforanu reaguje s karbkationem karbonylové skupiny substituovaného benzaldehydu za vzniku dvojné vazby mezi uhlíky. Jako vedlejší produkt může vznikat méně stabilní a vysoce reaktivní epoxid (schéma 4).

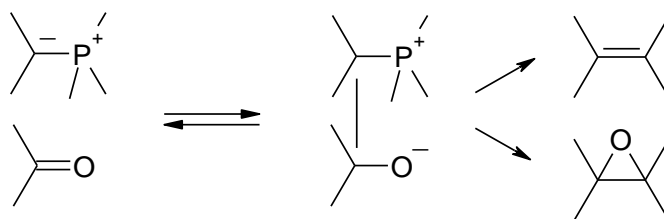


Schéma 4

Méně je známo o využití arsoranů. Johnson⁴³ popsal reakci trifenylo-(2-fenyl-2-oxoethyliden)arsoranu s 4-nitrobenzaldehydem v prostředí benzenu, která do 24 hodin

poskytla žlutý 1-fenyl-3-(4-nitrofenyl)prop-2-en-1-on. Obdobné využití mají analogy se sírou, selenem a tellurem⁴⁴.

Chalkony mohou být syntetizovány pomocí Suzukiho reakce⁴⁵ (schéma 5), kde reaguje kyselina fenylboritá s chloridem kyseliny skořicové, nebo kyselina fenylvinylboritá s chloridem kyseliny benzoové za katalýzy komplexem palladia (0).

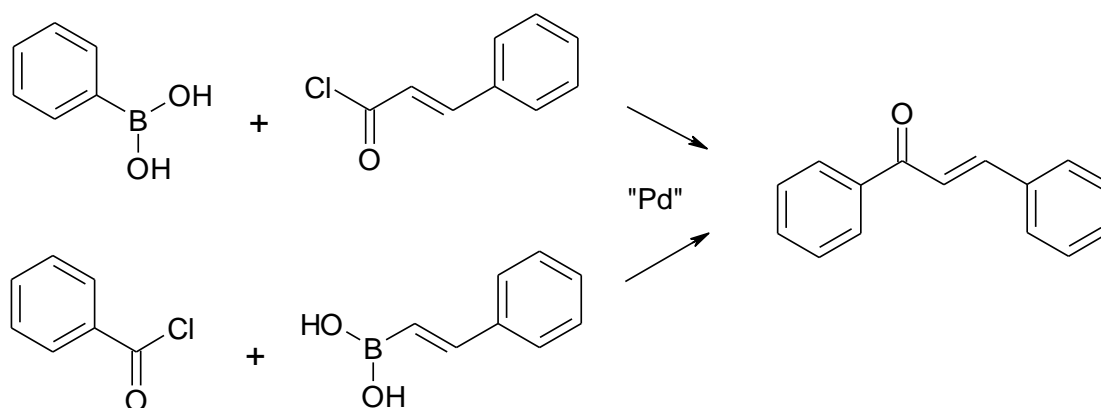


Schéma 5

Reakce probíhají v bezvodém toluenu za katalýzy tetrakis(trifenylfosfin)palladia(0) (PPh_3)₄Pd⁽⁰⁾ v bazickém prostředí uhličitanu cesného (tzv. McCarthyovy podmínky). Tímto způsobem byly připraveny methoxylované i nitrované deriváty.

Chlorid kyseliny skořicové vystupuje také v tzv. Friedel-Craftsových acylacích³⁴ (schéma 6). Acylace aromatických systémů poskytuje arylalkylketony. Jako acylační činidla se používají kromě halogenidů kyselin také jejich anhydridy a reakce je zahájena tvorbou komplexu s Lewisovou kyselinou (katalyzátor). Tato elektrofilní substituce neprobíhá na aromatických jádrech se silně deaktivujícími substituenty (NO_2 apod.).

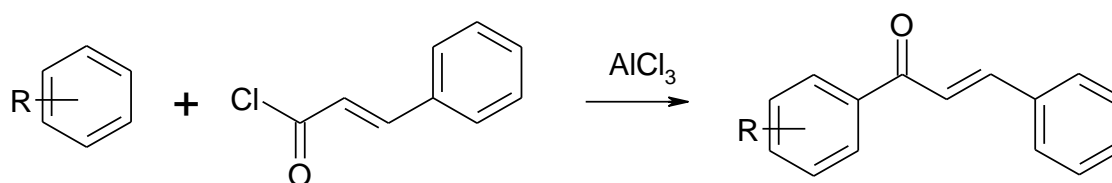


Schéma 6

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Syntéza a analýza

3.1.1. Použité metody a jejich základní charakteristiky

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Sloupcová chromatografie byla prováděna „flash“ technikou za použití vzduchovacího akvarijního motorku jako zdroje přtlaku. Jako stacionární fáze u sloupcové chromatografie byl používán Silpearl pro TLC (Kavalier Votice), složení mobilní fáze je uvedeno u jednotlivých látek.

Vzorky pevných látek byly pro měření teploty tání, elementární analýzy, IČ a NMR spekter sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Bezvodý pyridin pro syntézu byl získán stáním nad hydroxidem draselným, předestilováním a uchováváním nad molekulovými síty. Bezvodý ethanol byl získán vysušením molekulovými síty a předestilováním. Ostatní rozpouštědla byla použita v kvalitě dodané výrobcem.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku podle Bötia a nejsou korigovány.

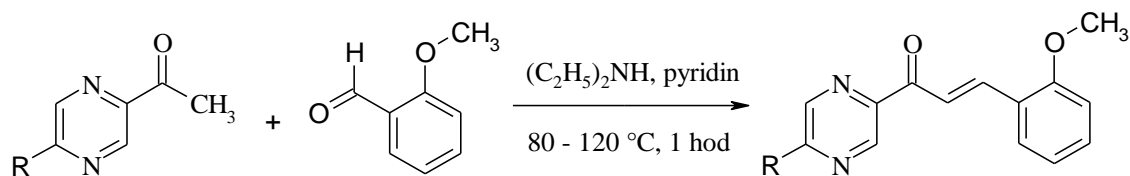
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET IMPACT 400 a vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-Vx BB 300. Chemické posuny δ uvedené v ppm jsou vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) přes signál rozpouštědla (7,26 pro ^1H , 77,0 pro ^{13}C v CDCl_3) a interakční konstanty J jsou uvedeny v Hz.

3.1.2. Příprava 1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)propenonů Claisen-Schmidtovou kondenzací

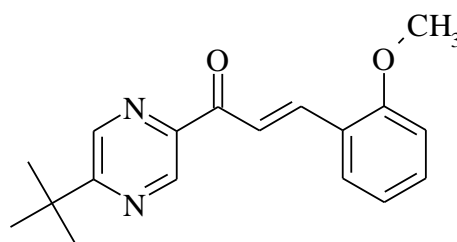
Obecný postup kondenzace v pyridinu za katalýzy diethylaminem:



Jako výchozí surovina byl používán komerčně dostupný 2-methoxybenzaldehyd (Fluka), příslušné alkylované 1-pyrazin-2-ylethanony (acetylpyraziny) byly dříve nasyntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

Acetylpyrazin (0,015 mol) a 2-methoxybenzaldehyd (0,015 mol) byly rozpuštěny v bezvodém pyridinu (6,6 ml). Byl přidán diethylamin (0,015 mol, Aldrich) a směs byla zahřívána 1 hodinu na glycerolové lázni při teplotě 80 – 120 °C. Po zchlazení byla směs nalita do studené vody (300 ml) okyselená kyselinou octovou na pH 3 a uložena na 24 hodin do lednice. Ve všech případech se vyloučila olejová fáze, proto byla reakční směs vytřepána do etheru a chromatograficky dělena na sloupci. Analyticky čistý produkt byl získán krystalizací z bezvodého ethanolu.

(E)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on (Ch-1-o)



Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 80:20 (v/v)

Popis: světle žluté krystaly

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,37

Výtěžek: 0,13 g (3 %)

Teplota tání: 111 – 113 °C

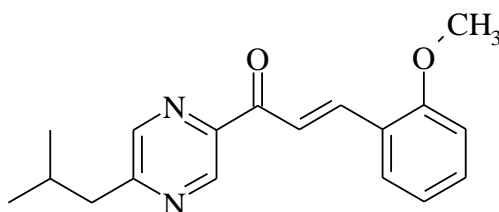
Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Nalezeno	72,77	6,38	9,53

ÍČ spektrum (KBr): 3072, 3041, 3028, 3015 (C-H arom., valenční); 2967, 2941, 2907, 2869, 2840 (C-H alif., valenční); 1671 (C=O, valenční); 1595 (C=C, valenční)

¹H NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-2); 8,34 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3); 9,28 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz, H-3'); 8,73 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz, H-6'); 7,03 – 6,92 (m, 2H, H-3'', H-5''); 7,44 – 7,34 (m, 1H, H-4''); 7,75 (dd, 1H, *J* = 1,7; 7,7 Hz, H-6''); 3,93 (s, 3H, OCH₃); 1,45 (s, 9H, CH₃)

¹³C NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 189,0; 167,4; 159,0; 146,1; 143,3; 140,5; 139,8; 132,1; 129,0; 123,9; 120,7; 120,7; 111,2; 55,5; 37,0; 29,7

(*E*)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on (Ch-2-o)



Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 95:5 (v/v)

Popis: žluté krystaly

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,37

Výtěžek: 0,08 g (2 %)

Teplota tání: 42 – 47 °C

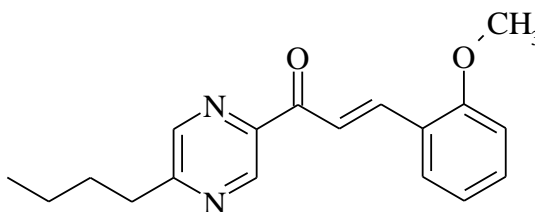
Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Nalezeno	73,34	7,01	9,33

IČ spektrum (KBr): 3071, 3013 (C-H arom., valenční); 2954, 2930, 2867, 2839 (C-H alif., valenční); 1667 (C=O, valenční); 1595 (C=C, valenční)

¹H NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-2); 8,35 (d, 1H, *J* = 16,1 Hz, H-3); 9,29 (d, 1H, *J* = 1,4 Hz, H-3'); 8,49 (d, 1H, *J* = 1,4 Hz, H-6'); 7,03 – 6,92 (m, 2H, H-3'', H-5''); 7,44 – 7,36 (m, 1H, H-4''); 7,76 (dd, 1H, *J* = 1,7; 7,7 Hz, H-6''); 3,93 (s, 3H, OCH₃); 2,78 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, CH₂); 2,26 – 2,09 (m, 1H, CH); 0,97 (d, 6H, *J* = 6,9 Hz, CH₃)

¹³C NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 189,0; 160,2; 159,0; 146,5; 144,1; 143,3; 140,6; 132,2; 129,0; 123,9; 120,7; 120,6; 111,2; 55,6; 44,7; 29,2; 22,4

(*E*)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on (Ch-3-o)



Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 95:5 (v/v)

Popis: jehlicovité žluté krystaly tvořící chomáče

Sumární vzorec: C₁₈H₂₀N₂O₂

Molekulová hmotnost: 296,37

Výtěžek: 0,06 g (1 %)

Teplota tání: 70 – 73 °C

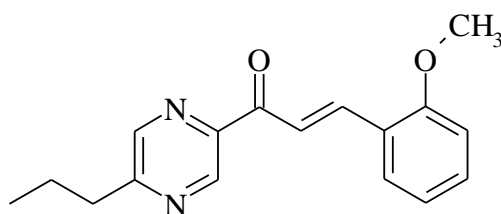
Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	72,95	6,80	9,45
Nalezeno	72,80	6,76	9,42

IČ spektrum (KBr): 3071, 3036, 3002 (C-H arom., valenční); 2961, 2930, 2896, 2872, 2860, 2838 (C-H alif., valenční); 1669 (C=O, valenční); 1593 (C=C, valenční)

^1H NMR spektrum (300 MHz, CDCl_3): δ 8,18 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-2); 8,35 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-3); 9,27 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz, H-3'); 8,53 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz, H-6'); 7,05 – 6,90 (m, 2H, H-3'', H-5''); 7,44 – 7,34 (m, 1H, H-4''); 7,76 (dd, 1H, $J = 1,4; 7,7$ Hz, H-6''); 3,93 (s, 3H, OCH_3); 2,91 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2); 1,85 – 1,70 (m, 2H, CH_2); 1,51 – 1,33 (m, 2H, CH_2); 0,96 (d, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR spektrum (75 MHz, CDCl_3): δ 188,9; 161,0; 159,0; 146,5; 144,0; 142,8; 140,5; 132,2; 129,0; 123,9; 120,7; 120,6; 111,2; 55,6; 35,5; 31,4; 22,4; 13,8

(E)-3-(2-methoxyfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (Ch-4-o)



Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 90:10 (v/v)

Popis: žluté krystaly

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

Molekulová hmotnost: 282,35

Výtěžek: 0,10 g (2 %)

Teplota tání: 68 – 72 °C

Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	72,32	6,43	9,92
Nalezeno	72,82	6,83	10,06

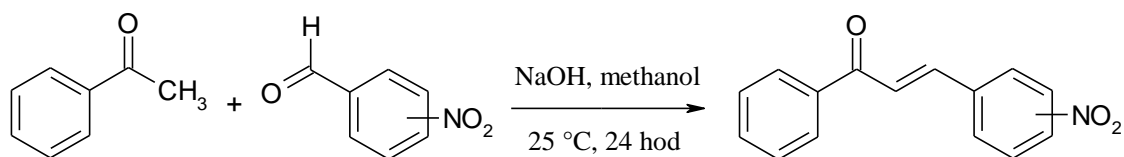
IČ spektrum (KBr): 3081, 3035, 3012 (C-H arom., valenční); 2960, 2931, 2869, 2838 (C-H alif., valenční); 1667 (C=O, valenční); 1596 (C=C, valenční)

^1H NMR spektrum (300 MHz, CDCl_3): δ 8,10 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-2); 8,16 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H-3); 9,13 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-3'); 8,72 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-6'); 7,13 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-3''); 7,51 – 7,42 (m, 1H, H-4''); 7,03 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5''); 7,81 (dd, 1H, $J = 1,4; 7,8$ Hz, H-6''); 3,90 (s, 3H, OCH_3); 2,86 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_2); 1,82 – 1,66 (m, 2H, CH_2); 0,91 (d, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR spektrum (75 MHz, CDCl_3): δ 188,4; 161,1; 158,8; 146,1; 143,5; 143,4; 139,5; 133,0; 129,1; 122,9; 121,1; 120,7; 112,1; 56,0; 36,9; 22,1; 13,8

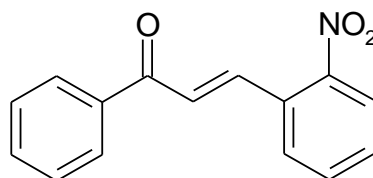
3.1.3. Příprava nitrovaných chalkonů Claisen-Schmidtovou kondenzací

Obečný postup kondenzace v methanolu za katalýzy hydroxidem sodným:



Jako výchozí látky pro syntézu byly používány běžně dostupný acetofenon (0,010 mol) a v příslušné poloze nitrovaný benzaldehyd (0,010 mol). Nitrovaný benzaldehyd byl smíchán s roztokem acetofenonu v 30 ml methanolu. Po rozpuštění benzaldehydu byla reakční směs alkalizována 5 pecičkami NaOH a míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Po oddestilování methanolu byla reakční směs nalita do 100 ml vody, okyselena kyselinou octovou na pH 5 – 7 a uložena na 24 hodin do lednice. Vyloučené pevné látky byly překrystalizovány z bezvodého ethanolu. V případě vyloučení olejové fáze byla reakční směs po vytřepání do etheru chromatograficky dělena na sloupci a analyticky čistý produkt byl získán rekrystalizací z bezvodého ethanolu.

(E)-1-fenyl-3-(2-nitrofenyl)prop-2-en-1-on (Ch-1-n)



Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 80:20 (v/v)

Popis: jemné zelené krystaly

Výtěžek: 0,03 g

Teplota tání: 205 – 210 °C

Tato sloučenina byla připravena z důvodu neúspěchu syntézy v methanolu postupem popsaným v kap. 3.1.2 z molárního množství 0,010 mol výchozích látek.

Mobilní fáze: lékařský benzín – ethyl-acetát 80:20 (v/v)

Popis: žluté krystaly

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 253,26

Výtěžek: 0,03 g (1 %)

Teplota tání: 88 – 115 °C (111 – 112 °C⁴⁶)

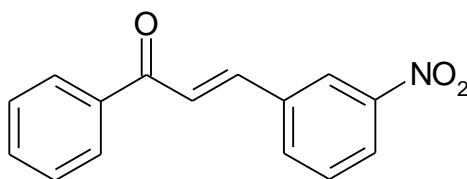
Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	71,14	4,38	5,53
Nalezeno	70,75	4,79	5,56

IČ spektrum (KBr): 3052 (C-H arom., valenční); 1670 (C=O, valenční); 1604 (C=C alif., valenční); 1578 (NO₂ arom., valenční)

¹H NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 7,32 (d, 1H, *J* = 15,7 Hz, H-2) 8,13 (d, 1H, *J* = 15,7 Hz, H-3); 8,10 – 7,93 (m, 3H, Ar); 7,81 - 7,65 (m, 2H, Ar); 7,65 – 7,41 (m, 4H, Ar)

¹³C NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 190,5; 148,5; 140,2; 137,4; 133,6; 133,1; 130,3; 129,2; 128,8; 128,7; 128,2; 127,3; 125,0

(*E*)-1-fenyl-3-(3-nitrofenyl)prop-2-en-1-on (Ch-2-n)



Popis: jemné hnědo-žluté krystalky

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 253,26

Výtěžek: 1,36 g (54 %)

Teplota tání: 141 – 144 °C (141 – 143 °C⁴⁷)

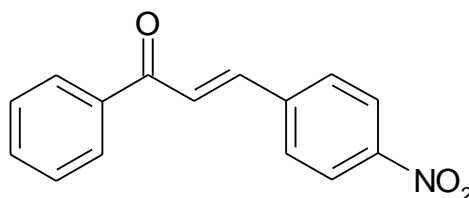
Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	71,14	4,38	5,53
Nalezeno	70,99	4,54	5,61

IČ spektrum (KBr): 3087, 3070 (C-H arom., valenční); 1662 (C=O, valenční); 1609 (C=C alif., valenční); 1577 (NO₂ arom., valenční)

¹H NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 7,65 (d, 1H, překrytý, *J* = 15,8 Hz, H-2); 7,83 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz, H-3); 8,51 (t, 1H, *J* = 2,1 Hz, Ar); 8,25 (ddd, 1H, *J* = 8,2 Hz, *J* = 2,1 Hz, *J* = 1,2 Hz, Ar); 8,09 – 8,01 (m, 2H, Ar); 7,95 – 7,90 (m, 1H, Ar); 7,66 – 7,50 (m, 4H, Ar)

¹³C NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 189,6; 148,7; 141,6; 137,5; 136,6; 134,3; 133,3; 130,0; 128,8; 128,6; 124,6; 124,6; 122,3

(*E*)-1-fenyl-3-(4-nitrofenyl)prop-2-en-1-on (Ch-3-n)



Popis: chomáčkovité žluto-hnědé krystalky

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 253,26

Výtěžek: 1,69 g (67 %)

Teplota tání: 166 – 168 °C (163 – 166 °C³⁸)

Elementární analýza	% C	% H	% N
Vypočteno	71,14	4,38	5,53
Nalezeno	70,64	4,43	5,50

IČ spektrum (KBr): 3076 (C-H arom., valenční); 1658 (C=O, valenční); 1609 (C=C alif., valenční); 1578 (NO₂ arom., valenční)

¹H NMR spektrum (300 MHz, CDCl₃): δ 7,65 (d, 1H, překrytý, *J* = 15,6 Hz, H-2); 7,82 (d, 1H, překrytý, *J* = 15,6 Hz, H-3); 8,33 – 8,22 (m, 2H, AA', BB', Ar); 8,09 – 7,99 (m, 2H, AA', BB', Ar); 7,82 – 7,75 (m, 1H, Ar); 7,63 – 7,59 (m, 2H, Ar); 7,57 – 7,49 (m, 2H, Ar)

¹³C NMR spektrum (75 MHz, CDCl₃): δ 189,6; 148,5; 141,5; 141,0; 137,5; 133,4; 128,9; 128,8; 128,6; 125,7; 124,2

3.2. Biologické hodnocení

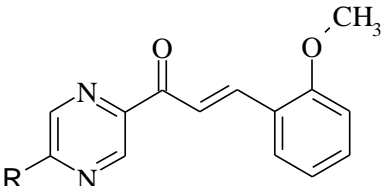
3.2.1. Testování antimykobakteriální aktivity

Smlouva podepsaná roku 1996 mezi Farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové a americkou institucí National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), jež je součástí National Institute of Health (NIH), umožnila zapojení do mezinárodního vyhledávacího programu nových antituberkulotik (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, TAACF).

Primární *in vitro* screening látek je prováděn při koncentraci $6,25 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (případně molární ekvivalent sloučeniny s nejvyšší molekulovou hmotností v sérii příbuzných látek) proti *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) v mediu BACTEC 12B za použití mikrodilučního testu (Microplate Alamar Blue Assay, MABA)⁴⁸. Sloučeniny, které vykazují fluorescenci, jsou testovány v radiometrickém systému BACTEC. Látky, u kterých je v primárním screeningu nalezena vyšší než 90 % inhibice, jsou zařazeny do další fáze testování při nižších koncentracích proti *M. tuberculosis* H₃₇Rv za účelem určení skutečné MIC za použití MABA. MIC je definována jako nejnižší koncentrace vykazující 90 % redukci fluorescence vzhledem ke kontrole.

Sloučeniny, které vykáží slibnou antimykobakteriální aktivitu, jsou pak testovány na cytotoxicitu (IC₅₀) na VERO buňkách v desetinásobné nebo nižší koncentraci odpovídající MIC dané látky. Po expozici buněk dané látky po dobu 72 hodin je zjištěno jejich přežití na základě buněčné konverze 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolia (MTT) na produkt (formazan) za použití Promega CellTiter 96 Non-radioactive Cell Proliferation Assay.

Antimykobakteriální aktivita (*E*)-3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů:

Chalkon	R	MIC ($\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)	% inhibice	
Ch-1-o	C(CH ₃) ₃	>6,25	13	
Ch-3-o	(CH ₂) ₃ CH ₃	>6,25	67	
Ch-4-o	(CH ₂) ₂ CH ₃	>6,25	71	

Výsledky antimykobakteriálních účinků chalkonů Ch-2-o, Ch-1-n, Ch-2-n a Ch-3-n nebyly v době psaní této práce k dispozici.

3.2.2. Testování antifungální aktivity

Antifungální hodnocení chalkonů bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd skupinou doc. RNDr. Vladimíra Buchty, CSc.

In vitro antifungální aktivita připravených sloučenin byla testována mikrodiluční bujónovou metodou na těchto 8 kmenech: *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM). Všechny kmeny byly kultivovány na Sabouraudově půdě (SDA, Difco) a v tomto médiu byly dále udržovány při teplotě 4 °C. Před testováním byl každý kmen naočkován na SDA a houbové inokulum bylo připraveno suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospór ve sterilním 0,85 % roztoku NaCl. Hustota buněk byla určena pomocí Bürkerovy komůrky a byly tak připraveny zásobní suspence o $1,0 \pm 2,0 \times 10^5$ CFU \times ml⁻¹. Použité inokulum bylo získáno zředěním zásobního roztoku testovacím médiem v poměru 1 : 20.

Vzorky látek byly rozpuštěny v DMSO a antifungální aktivita byla určena v médiu RPMI 1640 (Sevapharma, Praha) pufovaném na pH 7,0 pomocí 0,165 M kyseliny 3-(*N*-morfolino)propansulfonové. Se vzorky látek byl připraven zároveň kontrolní vzorek. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) jsou definovány jako 80 % inhibice růstu hub v porovnání s kontrolním vzorkem. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách statické inkubace při 35 °C. V případě *T. mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Ketokonazol (Janssen Pharmaceutica) a flukonazol (Pfizer) byly použity jako porovnávací antimykotika.

Antifungální aktivita (*E*)-3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů vyjádřená jako MIC/IC₈₀ (μmol × l⁻¹):

Kmen	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM
čas inkubace	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	72 h
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	120 h
ketokonazol	0,061	1,95	1,95	0,49	0,061	7,81	15,63	0,49
	0,122	3,91	3,91	1,95	0,122	7,81	31,25	1,95
flukonazol	0,82	1,63	52,24	13,06	3,26	>417,9	>417,9	26,12
	1,63	>417,9	104,47	52,24	6,53	>417,9	>417,9	52,24
Ch-1-o	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
Ch-2-o	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125
Ch-3-o	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
Ch-4-o	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500

Výsledky antifungálních účinků nitrovaných chalkonů nebyly v době psaní této práce k dispozici.

4. DISKUSE

Cílem rigorózní práce byla syntéza potenciálních léčiv ze skupiny derivátů chalkonu. Methoxylovaná série pyrazinových analogů chalkonu navazovala na předchozí diplomovou práci⁴⁹ a isomerní nitroderiváty difenylpropenonu byly připraveny z důvodu srovnání biologických aktivit s dříve získanými pyrazinovými analogy¹.

Pro syntézu pyrazinových analogů chalkonu (kap. 3.1.2) byla aplikována metodika Claisen-Schmidtovy kondenzace používaná dlouhodobě na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Podařilo se získat deriváty různě alkylované v poloze 5 na kruhu A. Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 1 – 3 % teoretického výtěžku a byly sníženy z důvodu opakovaného chromatografického dělení produktu od výchozího 2-methoxybenzaldehydu. Alkylované pyrazin-2-ylethanony byly na katedře připraveny dříve. Všechny pyrazinové analogy chalkonu byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry. Jejich čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou, kde se odchylka pohybovala do 0,5 % vypočteného procentuálního zastoupení prvků. Tyto sloučeniny nebyly v literatuře dosud popsány.

Isomerní chalkony nitrované na kruhu B (kap. 3.1.3) byly připraveny podle metodiky Rojase³⁵, která vyžadovala modifikaci^{4,49} z hlediska množství rozpouštědla a zpracování reakční směsi. Touto metodou se podařilo připravit jen 3- a 4-nitroderivát chalkonu ve výtěžku 54 %, resp. 67 %. Produkty byly čištěny opakovanou krystalizací a byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry. Jejich čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou.

Metoda kondenzace v methanolu s použitím pevného hydroxidu sodného jako bazického katalyzátoru selhala při přípravě 2-nitroderivátu. Chromatografickým čištěním majoritního produktu byly izolovány zelené krystaly v množství 30 mg o teplotě tání 205 – 210 °C. Dle NMR spektra se jedná o směs látek a jejich identifikace by vyžadovala provedení dalších NMR experimentů. V ¹H NMR spektru není patrná násobná vazba α,β -nenasyčeného seskupení chalkonů a signál karbonylového uhlíku je posunut k vyššímu poli, takže kondenzace zřejmě neproběhla. Z důvodu neúspěchu byl pro syntézu 2-nitroderivátu zvolen první postup kondenzace v pyridinu za přídavku diethylaminu (viz kap. 3.1.2). Sloupcovou chromatografií byly izolovány žluté krystaly v množství 0,03 g a ve výtěžku 1 %, které byly identifikovány jako 1-fenyl-3-(2-nitrofenyl)prop-2-en-1-on. Postup byl jedenkrát zopakován s obdobným výsledkem. Pro

zvýšení výtěžku reakce a čistoty produktu by reakce musela být optimalizována. Příprava *ortho*-substituovaných derivátů probíhá z důvodu elektronových a sterických efektů obtížně. Uvedené nitrované chalkony jsou v literatuře popsány sloučeniny.

U všech připravených chalkonů byl NMR spektrem potvrzen *E*-isomer.

Série pyrazinových analogů chalkonu byla hodnocena na antimykobakteriální a antifungální aktivitu.

Chalkony inhibovaly *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) v rozmezí 13 – 71 %. Aktivita látky CH-2-o není zatím známa. Nejúčinnějším antimykobakteriálním derivátem byl 3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-on alkylovaný propylem v poloze 5 kruhu A. Inhibice nealkylovaného derivátu činila 39 % a v porovnání s methoxylovanými difenylpropenony byly pyrazinové analogy méně účinné.⁴

Při antifungálním hodnocení na 8 kmenech hub uvedených v kap. 3.2.2 byla nalezena pouze slabá aktivita.

Výsledky biologické aktivity nitrovaných chalkonů zatím nejsou známy.

5. ZÁVĚR

Claisen-Schmidtovou kondenzací byly připraveny tyto **pyrazinové analogy chalkonů**:

- ❖ (E)-1-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- ❖ (E)-1-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- ❖ (E)-1-(5-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-methoxyfenyl)prop-2-en-1-on
- ❖ (E)-3-(2-methoxyfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on

Claisen-Schmidtovou kondenzací byly připraveny tyto **nitrované chalkony**:

- ❖ (E)-1-fenyl-3-(2-nitrofenyl)prop-2-en-1-on
- ❖ (E)-1-fenyl-3-(3-nitrofenyl)prop-2-en-1-on
- ❖ (E)-1-fenyl-3-(4-nitrofenyl)prop-2-en-1-on

Methoxylované deriváty pyrazinových analogů chalkonu nejsou v literatuře popsány, byly pouze prezentovány formou plakátového sdělení⁵⁰, abstrakt viz příloha 1 (kap. 6.1.).

Nitrované deriváty jsou v literatuře popsány a byly připraveny z důvodu srovnání biologické aktivity s nitrovanými pyrazinovými analogy syntetizovanými jako součást předchozích prací na katedře.

6. PŘÍLOHY

6.1. Příloha 1

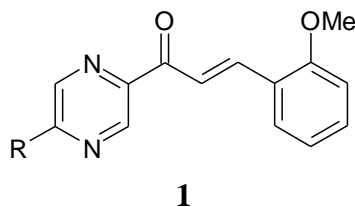
SYNTÉZA A ANTIFUNGÁLNÍ HODNOCENÍ (*E*)-3-(2-METHOXYFENYL)-1-PYRAZIN-2-YLPROP-2-EN-1-ONŮ

CHLUPÁČOVÁ MARTA^a, OPLETALOVÁ VERONIKA^a, DOSEDĚL MARTIN^a, ŠVÉDOVÁ LUCIE^a, SILVA LUÍS^b A BUCHTA VLADIMÍR^b

^aKatedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové; Marta.Chlupacova@faf.cuni.cz

^bKatedra biologických a lékařských věd, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

V rámci studia biologicky aktivních derivátů chalkonu byla na našem pracovišti připravena řada derivátů chalkonu a tyto látky byly testovány na účinky antifungální, antimykobakteriální, antiagregační a na inhibici fotosyntézy [1,2]. V tomto sdělení je prezentována série (*E*)-3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů (**1**, R = H, alkyl), která byla syntetizována klasickou metodou v pyridinu [1].



Antifungální účinky produktů byly hodnoceny mikrodilučním bujónovým testem na 8 kmenech patogenních hub: *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E 28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon beigelii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445. Látky vykázaly střední až slabý účinek v porovnání s flukonazolem. V současné době probíhá hodnocení antimykobakteriální aktivity připravených sloučenin.

Tato práce byla řešena s podporou výzkumného záměru **MSM 0021620822**.

[1] Opletalová, V., Hartl, J., Patel, A., Palát, K., Buchta, V.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 2002, 57, 135-144.

[2] Jun, J., Chlupáčová, M., Opletalová, V., Hronek, M., Opletal, L.: Platelet Antiaggregating Activity of 2',5'-Diazachalcones. 3rd International Symposium on Natural Drugs, Naples, Italy, October 2-4, 2003, p. 152.

6.2. Příloha 2

CHALKONY A JEJICH ANALOGY JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA VII

Lucie Švédová

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové*

Abstrakt rigorózní práce:

Tato práce syntetického charakteru je zaměřena na hledání potenciálních léčiv ze skupiny derivátů chalkonu a navazuje na problematiku dlouhodobě studovanou na katedře. Zkoumanou biologickou aktivitou je především antimykobakteriální a antifungální účinek.

V teoretické části práce jsou aktuálně a přehledně zpracovány jednotlivé mechanismy antineoplastického působení přirozeně se vyskytujících i syntetických derivátů chalkonu. Tato rešerše zahrnuje převážně podklady z poslední dekády. Byly shrnuty možné zásahy do regulačních dějů, proteosyntézy a tvorby nukleových kyselin, vlivy na mitózu, apoptózu a P-glykoprotein a potenciální inhibiční působení na procesy angiogeneze a invazivity. Vedle chemoterapeutických možností byla uvedena také antioxidační aktivita a další mechanismy chemoprevence. Součástí byl popis několika metod syntézy derivátů chalkonu.

V rámci experimentální části práce byly kondenzační reakcí připraveny substituované deriváty chalkonu a dále heterocyklické analogy chalkonu. Všechny produkty byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry. Jejich čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou.

V dílčích výsledcích hodnocení biologické aktivity byla zaznamenána inhibiční aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) v rozmezí 13 – 71 % a slabá antifungální aktivita na 8 kmenech testovaných hub.

6.3. Příloha 3

CHALCONES AND THEIR ANALOGS AS POTENTIAL DRUGS VII

Lucie Švédová

*Department of pharmaceutical chemistry and drug control, Charles University in Prague,
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech
Republic*

Abstract of the rigorous thesis:

This synthetic thesis is focused on searching of potential drugs from the group of chalcone derivatives and links up to the long-term studied topic at our department. Antibacterial and antifungal effects are the main examined biological activities.

In the theoretical part of this thesis there were arranged various antineoplastic effects of naturally occurring or synthetic chalcones. The bibliographic searches involve items from the last decade. Possible interventions on the level of control processes, proteosynthesis and nucleic acid synthesis, influence on mitosis, apoptosis and the P-glycoprotein and the action on angiogenesis and cancer invasivity were summarized. In addition antioxidant activity and other mechanisms of chemoprevention were introduced as well. Different methods of chalcone synthesis were summed up in conclusion.

In the frame of the experimental part substituted derivatives and heterocyclic analogs of chalcones were synthesized by means of condensation reaction. All the synthetic products were characterized by melting points, IR and NMR spectra. Their purity was checked by thin-layer chromatography and elemental analysis.

Inhibition effect against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) in the range of 13 – 71 % and weak antifungal activity on 8 strains of tested fungi were recorded in partial results of biological activity evaluation.

7. LITERATURA

- ¹ Opletalová, V. *et al.*: Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 71/1 (2006) 44 – 58.
- ² Opletalová, V. *et al.*: Conformational analysis of 2-hydroxy-2', 5'-diazachalcones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23/1 (2000) 55 – 59.
- ³ Opletalová, V. *et al.*: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* 57/2 (2002) 153 – 144.
- ⁴ Chlupáčová, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva. *Disertační práce*. Hradec Králové: Univerzita Karlova, 2006.
- ⁵ Alcaráz, L. E. *et al.*: Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.* 205/2 (2000) 231 – 240.
- ⁶ Go, M. L. *et al.*: Chalcones: An update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr. Med. Chem.* 12/4 (2005) 483 – 499.
- ⁷ Ni, L. *et al.*: Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opin. Ther. Patents* 14/12 (2004) 1669 – 1691.
- ⁸ De Vincenzo, R. *et al.*: *In vitro* evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46/4 (2000) 305 – 312.
- ⁹ Manna, F. *et al.*: Synthesis of some pyrazole derivatives and preliminary investigation of their affinity binding to P-glycoprotein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15/20 (2005) 4632 – 4635.
- ¹⁰ Bois, F. *et al.*: Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: Potential modulators of multidrug resistance. *J. Med. Chem.* 41/21 (1998) 4161 – 4164.
- ¹¹ Miranda, C. L. *et al.*: Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 37/4 (1999) 271 – 285.
- ¹² Nečas, O. *et al.*: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vydání. 2000. ISBN 80-86022-46-3.
- ¹³ Dimmock, J. R. *et al.*: Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.* 6/12 (1999) 1125 – 1149.
- ¹⁴ Hartl, J. *et al.*: *Farmaceutická chemie IV*. 1. vydání. 2006. ISBN 80-246-1169-4.
- ¹⁵ Edwards, M. L. *et al.*: Chalcones: A new class of antimitotic agents. *J. Med. Chem.* 33/7 (1990) 1948 – 1954.

- ¹⁶ Kumar, K. S. *et al.*: Design, synthesis and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J. Med. Chem.* 46/14 (2003) 2813 – 2815.
- ¹⁷ Maggiolini, M. *et al.*: Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82/4 – 5 (2002) 315 – 322.
- ¹⁸ Hsu, Y-L. *et al.*: Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31/7 (2004) 414 – 418.
- ¹⁹ Fu, Y. *et al.*: Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322/1 (2004) 263 – 270.
- ²⁰ Pouget, C. *et al.*: Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11/24 (2001) 3095 – 3097.
- ²¹ Bowen, P. J. *et al.*: Chalcone and its analogs as agents for the inhibition of angiogenesis and related disease states. USP 6906105, 2006-10-19 dostupné online <http://www.freepatentsonline.com/6906105.html>.
- ²² Nam, N-H. *et al.*: Cytotoxic 2', 5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. *Eur. J. Med. Chem.* 38/2 (2003) 179 – 187.
- ²³ Parmar, V. S. *et al.*: Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 5/8 (1997) 1609 – 1619.
- ²⁴ Mukherjee, S. *et al.*: Synthetic and biological activity evaluations studies on novel 1,3-diarylpropenones. *Bioorg. Med. Chem.* 9/2 (2001) 337 – 345.
- ²⁵ Lunerová, K. *et al.*: Přírodní látky jako chemoprotektiva. *Česk. slov. farm.* LII /3 (2003) 126 – 130.
- ²⁶ Dinkova-Kostova, A. T. *et al.*: Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98/6 (2001) 3404 – 3409.
- ²⁷ Gerhäuser, C. *et al.*: Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 523 – 524 (2003) 163 – 172.
- ²⁸ Rao, Y. K. *et al.*: Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. *Bioorg. Med. Chem.* 12/10 (2004) 2679 – 2686.
- ²⁹ Vokurka, M. *et al.*: Velký lékařský slovník. 1. vyd. 2002. ISBN 80-85912-43-0.

- ³⁰ Sources of national cancer institute information. 2006-10-19 dostupné online <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/prevention/chemoprevention>.
- ³¹ Wattenberg, L. W. *et al.*: Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by brief exposures to aerosolized budesonide or beclomethasone dipropionate and by the combination of aerosolized budesonide and dietary *myo*-inositol. *Carcinogenesis* 21/2 (2000) 179 – 182.
- ³² Mašek, L. Karcinom prostaty. Seminář na téma Urologie. Pears Health Cyber s.r.o., Olomouc 21. října 2006.
- ³³ Forejtníková, H. *et al.*: Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. *Toxicology* 208/1 (2005) 81 – 93.
- ³⁴ Hrabálek, A. *et al.*: Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty. Dotisk 1. vyd. 2002. ISBN 80-7184-968-5.
- ³⁵ Rojas, J. *et al.*: Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. *Eur. J. Med. Chem.* 37/8 (2002) 699 – 705.
- ³⁶ Troeberg, L. *et al.*: Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Med.* 6/8 (2000) 660 – 669.
- ³⁷ Kumar, S. K. *et al.*: Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J. Med. Chem.* 46/14 (2003) 2813 – 2815.
- ³⁸ Offenhauer, R. D. *et al.*: Aldehyde and ketone condensation reactions catalyzed by boric acid. *J. Org. Chem.* 33/2 (1968) 775 – 777.
- ³⁹ Augustine, R. L. *et al.*: Synthesis of α -monosubstituted indoles. *J. Org. Chem.* 38/17 (1973) 3004 – 3011.
- ⁴⁰ Irie, K. *et al.*: Aldol condensation with metal(II) complex catalysts. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 53/5 (1980) 1366 – 1371.
- ⁴¹ Palleros, D. R. Solvent-free synthesis of chalcones. *J. Chem. Educ.* 81/9 (2004) 1345 - 1347.
- ⁴² Dambacher, J. *et al.*: Water is an efficient medium for Wittig reactions employing stabilized ylides and aldehydes. *Tetrahedron Lett.* 46/26 (2005) 4473 – 4477.
- ⁴³ Johnson, A. W. *et al.*: Chemistry of ylides. XX. Triphenylarsonium phenacylide. *J. Org. Chem.* 35/8 (1970) 2678 – 2680.
- ⁴⁴ Huang, X. *et al.*: Synthetic applications of organotellurium compounds. 1. A facile synthesis of α,β -unsaturated esters, ketones and nitriles. *J. Org. Chem.* 53/20 (1988) 4862 – 4864.

- ⁴⁵ Eddarir, S. *et al.*: An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. *Tetrahedron Lett.* 44/28 (2003) 5359 – 5363.
- ⁴⁶ Lopez, S. N. *et al.*: In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg. Med. Chem.* 9/8 (2001) 1999 – 2013.
- ⁴⁷ Dimmock, J. R. *et al.*: Correlations between cytotoxicity and topography of some 2-arylidenebenzocycloalkanones determined by X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* 45/14 (2002) 3103 – 3111.
- ⁴⁸ Collins, L. A. *et al.*: Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41/5 (1997) 1004 – 1009.
- ⁴⁹ Doseděl, M.: Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VI. *Diplomová práce*. Hradec králové: Univerzita Karlova, 2006.
- ⁵⁰ Chlupáčová, M. *et al*; V.: Syntéza a antifungální hodnocení (*E*)-3-(2-methoxyfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů. *Sborník XXXIV. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, 12. – 14. září 2005, s. 66. ISBN 80-7305-533-3.