

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY  
KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE



# DIZERTAČNÍ PRÁCE

SYNTÉZA DERIVÁTŮ ELIPTICINU A STUDIUM  
JEJICH INTERAKCÍ S DNA

Martin DRAČÍNSKÝ

PRAHA 2006

Předložená práce byla vypracována na katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2002 – 2005 pod vedením Doc. RNDr. Jana Sejbala, CSc.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| <b>1. ÚVOD</b> .....                                      | 5  |
| 1.1. ELIPTICIN.....                                       | 5  |
| 1.1.1. Farmakokinetika elipticinu.....                    | 5  |
| 1.1.2. Mechanismy cytostatického působení elipticinu..... | 6  |
| 1.1.3. Syntéza elipticinu a jeho derivátů.....            | 7  |
| 1.2. INTERKALÁTORY.....                                   | 8  |
| 1.3. METODY STUDIA INTERAKCÍ MEZI DNA A LÉČIVY.....       | 9  |
| <b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....                                | 12 |
| <b>3. SYNTETICKÁ ČÁST</b> .....                           | 13 |
| 3.1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....                               | 13 |
| 3.1.1. Syntéza elipticinu podle strategie III.....        | 15 |
| 3.1.2. Syntéza derivátů elipticinu.....                   | 16 |
| 3.2. TEORETICKÁ ČÁST.....                                 | 18 |
| 3.2.1. Benzylové oxidace.....                             | 21 |
| 3.2.2. NMR derivátů karbazolu a elipticinu.....           | 24 |
| 3.3. ZÁVĚR.....   | 30 |
| 3.4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....                             | 31 |
| 3.4.1. Obecné poznámky k experimentální části.....        | 31 |
| 3.4.2. Postupy.....                                       | 32 |
| <b>4. VÝPOČETNÍ ČÁST</b> .....                            | 41 |
| 4.1. ÚVOD.....  | 41 |
| 4.1.1. Metody výpočetní chemie.....                       | 41 |
| 4.1.1.1. <i>Ab initio</i> metody.....                     | 42 |
| 4.1.1.2. Semiempirické metody.....                        | 43 |
| 4.1.1.3. Empirické potenciály.....                        | 43 |
| 4.2. POUŽITÉ METODY VÝPOČTŮ.....                          | 44 |
| 4.2.1. Geometrie.....                                     | 44 |
| 4.2.2. <i>Ab initio</i> interakční energie.....           | 44 |
| 4.2.3. Interakční energie z empirických potenciálů.....   | 45 |
| 4.2.4. Hledání globálního minima.....                     | 46 |
| 4.3. VÝSLEDKY.....  | 46 |
| 4.3.1. Vlastnosti subsystémů.....                         | 46 |

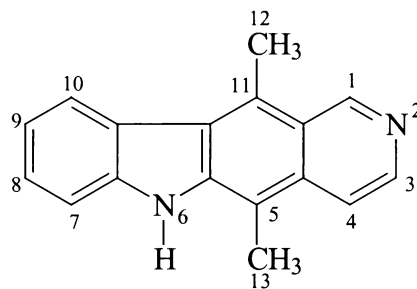
|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4.3.2.    | <i>Ab initio</i> interakční energie.....  | 46         |
| 4.3.2.1.  | Systém AT-E+.....   | 46         |
| 4.3.2.2.  | Další systémy.....  | 48         |
| 4.3.3.    | Porovnání <i>ab initio</i> výpočtů s empirickými potenciály.....                            | 49         |
| 4.3.3.1.  | Systém AT-E+.....   | 49         |
| 4.3.3.2.  | Další systémy.....  | 51         |
| 4.3.4.    | Hledání globálního minima.....  | 54         |
| 4.3.5.    | Účinnost jednotlivých energetických potenciálů.....   | 56         |
| 4.4.      | DISKUSE A ZÁVĚRY.....   | 58         |
| <b>5.</b> | <b>NMR ČÁST.....</b>  | <b>60</b>  |
| 5.1.      | ÚVOD.....   | 60         |
| 5.2.      | NMR ANALÝZA SAMOTNÝCH OLIGONUKLEOTIDŮ.....  | 60         |
| 5.2.1.    | Použité dvoudimenzionální NMR techniky.....   | 61         |
| 5.2.2.    | NMR analýza oligonukleotidů CGCTAGCG a ATAGCTAT.....  | 63         |
| 5.2.2.1.  | Rozbor struktury oligonukleotidů.....   | 68         |
| 5.2.2.2.  | Teplotní závislost chemických posunů.....   | 69         |
| 5.3.      | NMR ANALÝZA INTERAKCÍ OLIGONUKLEOTIDŮ S ELIPTICINY.....                                     | 70         |
| 5.3.1.    | Změny chemických posunů.....  | 71         |
| 5.3.2.    | Teplotní závislosti změn chemických posunů.....   | 72         |
| 5.3.3.    | Změny integrálních intenzit signálů vyměnitelných vodíků.....                               | 74         |
| 5.3.4.    | Kinetika, NMR časová škála a tvar signálů.....  | 76         |
| 5.3.5.    | Signály elipticinu.....   | 78         |
| 5.4.      | ZÁVĚR.....  | 80         |
| 5.5.      | PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO MĚŘENÍ NMR SPEKTER.....   | 81         |
| <b>6.</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>82</b>  |
| <b>7.</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>  | <b>83</b>  |
| <b>8.</b> | <b>PŘÍLOHY.....</b>   | <b>85</b>  |
| 8.1.      | PŘEHLED DOSUD PŘIPRAVENÝCH DERIVÁTŮ ELIPTICINU.....   | 85         |
| 8.2.      | OPTIMALIZOVANÉ GEOMETRIE A DALŠÍ VLASTNOSTI DERIVÁTŮ<br>ELIPTICINU A PÁRŮ BÁZÍ AT A GC..... | 94         |
| <b>9.</b> | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>   | <b>101</b> |



# 1. ÚVOD

## 1.1. ELIPTICIN

Elipticin patří z chemického hlediska mezi pyridokarbazoly, jeho systematický název je 5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol.



elipticin (1)

Elipticiny (elipticin a některé jeho deriváty) jsou alkaloidy s výraznou protinádorovou aktivitou izolované z různých rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*)<sup>1-3</sup>. Farmakologicky jsou již od 70. let využívány (zvláště ve Francii) polárnější deriváty 9-methoxyelipticin a 2-methyl-9-hydroxyelipticin ve formě acetátu (NMHE)<sup>4</sup>, a to k léčbě zejména pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami, akutní myeloblastické leukemie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy<sup>5-7</sup>. Protinádorové účinky derivátů elipticinu jsou i nadále předmětem intenzivního výzkumu<sup>8-14</sup>, zkoumáno je i použití elipticinů při inhibici retrovirové integrázy při léčbě AIDS<sup>15</sup>.

Výhodou elipticinů je jak vysoká účinnost, tak i nízké vedlejší toxické účinky, běžně se projevující asi u třetiny pacientů jen jako nevolnost či zvracení, případně xerostomie (u méně než 20% pacientů)<sup>16</sup>. Hematologická toxicita patrně imunoalergického původu se projevuje až při po dlouhodobém užívání<sup>17,18</sup>, nefrotoxicita, mechanismem vzniku podobná *cis*-platině, je spíše vzácná<sup>7,19</sup>. Kontraindikací pro užívání elipticinů je vedle renální insuficience také těhotenství, neboť u myši a králíků byly popsány jejich teratogenní účinky.

### 1.1.1. FARMAKOKINETIKA ELIPTICINU

Elipticin je pacientům podáván intravenózně v dávce 80 mg/m<sup>2</sup> na den po

dobu 3 dní. Jeho poločas v organismu se pohybuje v rozmezí 8 až 51 hodin, existuje tedy výrazná inter-individuální variabilita. Eliminován z těla je ze 16 % renální cestou, majoritně cestou fekální.

Osud elipticinu v modelových organismech byl rámcově studován u myší, potkanů, psů a opic po intravenózním podání [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]elipticinu v dávce 6 mg na 1 kg hmotnosti experimentálního zvířete (3 mg/kg u opic)<sup>20</sup>.

Bylo zjištěno, že elipticin je velmi rychle distribuován nerovnoměrně do různých orgánů včetně mozku, patrně tedy může překonat bariéru mezi krví a mozkem - buď díky své rozpustnosti v tucích pasivní difúzí<sup>20</sup>, případně díky nějakému aktivnímu transportnímu procesu<sup>21</sup>. Rychlost eliminace z krve, orgánová distribuce i exkrece jsou druhově závislé.

Hlavním místem biotransformace elipticinu jsou játra, kde je elipticin majoritně přeměňován na 9-hydroxyelipticin, který je dále konjugován na glukuronát nebo sulfát a vyloučen žlučí<sup>22</sup>. Vedle 9-hydroxyelipticinu byly nalezeny další čtyři metabolity elipticinu vznikající po inkubaci tohoto léčiva s živočišnými mikrozomy, a sice 7-hydroxyelipticin<sup>17,23,24</sup>, elipticin-*N*-oxid<sup>25</sup> a dále pravděpodobně 12-hydroxyelipticin a 13-hydroxyelipticin<sup>25</sup>. Struktura posledních dvou metabolitů dosud není zcela prokázána. Poslední uvedený metabolit (na základě  $^1\text{H}$  NMR pravděpodobně 13-hydroxyelipticin) je zodpovědný za tvorbu majoritního kovalentního aduktu na DNA<sup>26</sup>.

Elipticin je slabá báze ( $\text{pK}_a=7,4$ <sup>27</sup>), v kyselém pH gastrointestinálního traktu je tedy ionizován a nemůže být resorbován ze střeva. Takto je vyloučeno přibližně 15 % celkové dávky elipticinu. Po 24 hodinách dochází u všech sledovaných biologických druhů k prakticky úplnému vyloučení elipticinu z organismu, ve tkáních se vyskytují jen metabolity ve velice nízké koncentraci.

### 1.1.2. MECHANISMY CYTOSTATICKÉHO PŮSOBENÍ ELIPTICINU

Cytotoxicita elipticinu bývá přisuzována buď parentální molekule (metabolismus elipticinu tedy není považován za proces aktivační, ale detoxifikační)<sup>20</sup>, případně 9-hydroxyderivátu (hydroxylace v poloze 9 zvyšuje a naopak v poloze 7 snižuje cytostatickou účinnost elipticinu)<sup>17,24,28</sup>. Elipticin patří do skupiny protinádorových léčiv, jejichž mechanismus účinku není ještě přesně objasněn. Předpokládá se, že převládajícími mechanismy protinádorového účinku

jsou:

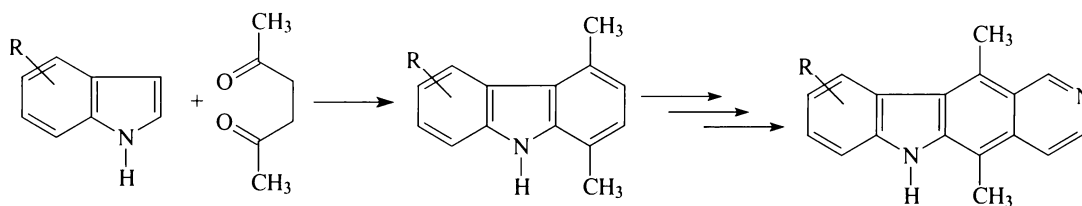
- **Interkalace do dvoušroubovicové molekuly DNA<sup>7,29</sup>**, způsobená slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA<sup>17</sup>.
- **Inhibice topoizomerázy II<sup>17</sup>** Působením elipticinů vzniká doposud ne zcela objasněným mechanismem katalyticky inaktivní komplex topoizomerázy II kovalentně navázané na rozštěpenou DNA<sup>30-35</sup>.
- **Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53<sup>36,37</sup>** Protein p53 je produktem tumor-supresorového genu. Jeho fyziologickou funkcí je indukce apoptózy, k níž dochází po nahromadění defosforylované formy p53. Mutace tumor-supresorového genu p53 vede ke ztrátě jeho funkce, ustává inhibice proliferace a vzniká agresivní forma nádorového onemocnění<sup>7</sup>. Elipticiny, pravděpodobně mechanismem inhibice specifické cyklin-dependentní kinázy<sup>36</sup> nebo aktivací transkripce mutantního p53 jsou schopny obnovit jeho fyziologickou funkci<sup>14,37</sup>.
- **Inhibice oxidační fosforylace<sup>38,39</sup>** Na základě dat získaných mikrospektrofluorometrickými metodami bylo zjištěno, že elipticin je akumulován kromě buněčného jádra také v mitochondriích<sup>40</sup>, kde inhibicí oxidační fosforylace způsobuje letální snížení obsahu ATP v buňce.
- **Inhibice telomerázy<sup>41</sup>**
- **Tvorba kovalentních aduktů s DNA** Na katedře biochemie PŘF UK bylo při studii *in vitro* i *in vivo* pomocí dvou nezávislých metod (použitím [<sup>3</sup>H]elipticinu a metody „<sup>32</sup>P-postlabeling“) zjištěno, že se elipticin kovalentně váže na DNA<sup>42,25</sup>.

### 1.1.3. SYNTÉZA ELIPTICINU A JEHO DERIVÁTŮ

Od objevení biologických účinků elipticinu bylo vypracováno několik strategií jeho syntézy (viz kapitola 3.1.). Jednotlivé způsoby přípravy elipticinu byly shrnuty v několika přehledných článcích<sup>43-49</sup>. Celkové izolované výtěžky elipticinu jsou většinou v jednotkách procent. Problémem většiny syntéz je čistota výsledného produktu. Elipticin je velmi málo rozpustný jak v polárních tak nepolárních rozpouštědlech, proto je jeho chromatografické čištění velmi obtížné.

V posledních přibližně 15 letech je ve většině publikovaných cestách k elipticinu a jeho derivátům využito strategie, kdy se z vhodně substituovaného indolu připraví substituovaný karbazol a dále je dobudován kruh D elipticinu. Ani při

této syntetické cestě ale většinou není získán čistý produkt. Elipticin je i komerčně dostupný, jeho pořizovací cena je ale velmi vysoká.

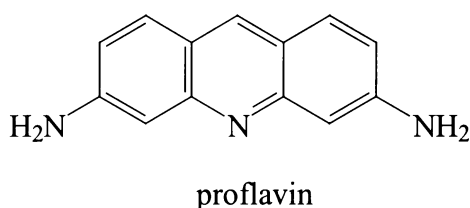
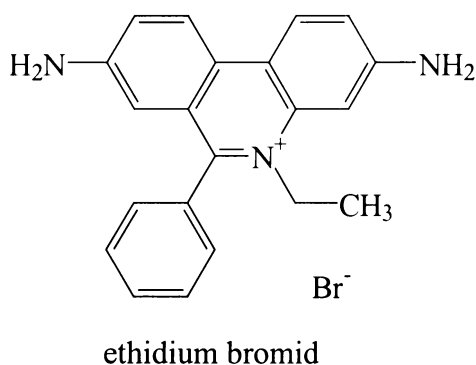


Syntéza derivátů elipticinu se substituenty v benzylových polohách (uhlíky číslo 12 a 13) se v literatuře objevuje poměrně zřídka a dosud nebyla prostudována možnost připravit tyto deriváty přímo benzylovou oxidací elipticinu. Přitom deriváty elipticinu s hydroxylovými skupinami v benzylových polohách jsou pravděpodobně metabolity elipticinu zodpovědné za tvorbu kovalentních aduktů s DNA<sup>26</sup>.

Dosud bylo připraveno přibližně 300 derivátů základního skeletu elipticinu (jejich přehled je v příloze 8.1.), u většiny z nich byla testována jejich biologická aktivita, ale pouze několik derivátů mělo vyšší cytostatické účinky než elipticin samotný.

## 1.2. INTERKALÁTORY

Interkalátory tvoří důležitou skupinu látek, které jsou již několik desetiletí používány ke studiu struktury a funkce DNA a k léčbě různých onemocnění včetně nádorových<sup>50</sup>. Interkalace znamená vsunutí planárního polycyklického aromatického chromoforu mezi páry bází dvoušroubovicové DNA. Klasické interkalátory jako ethidium bromid a proflavin byly mezi prvními látkami, u nichž byla zjištěna schopnost interagovat s DNA. Pionýrské studie Lermana<sup>51</sup> odhalily, že přídavek akridinu nebo proflavinu k DNA způsobuje značné změny ve viskozitě a sedimentačních koeficientech. Tato pozorování vedla Lermana k předpovědi, že se planární akridinový chromofor vmezeří mezi páry bází DNA a to způsobilo změny struktury helixu DNA. V roce 1965 byla poprvé publikována biofyzikální charakterizace komplexu DNA s ethidiem pomocí několika spektroskopických metod<sup>52</sup>. V dalších letech byla zkoumána celá řada interkalátorů včetně mnoha biologicky aktivních látek a léčiv. Elipticin a jeho deriváty patří mezi typické interkalátory.



### 1.3. METODY STUDIA INTERAKCÍ MEZI DNA A LÉČIVY

Metod, jak studovat interakce mezi DNA a léčivý je celá řada, obecně je lze rozdělit do tří základních skupin:

- 1) Biologické a enzymologické metody
- 2) Chemické molekulárně biologické metody
- 3) Biofyzikální metody

Do první skupiny lze zařadit například měření telomerázové aktivity<sup>53,54</sup> (elipticin inhibuje telomerázovou aktivitu<sup>41</sup>), měření relaxace a štěpení DNA při studiu inhibitorů topoizomerázy I<sup>55</sup> nebo *in vitro* analýza HIV-1 integrázy<sup>56</sup>.

Do druhé skupiny lze zařadit například zjišťování kovalentních aduktů léčiv na DNA, nebo tzv. „footprinting“ studie. „Footprinting“ je metoda vyvinutá pro zjišťování sekvenční specifity vazby ligandů k DNA<sup>57</sup> a je založena na schopnosti ligandů chránit DNA před enzymatickým nebo chemickým štěpením v jejich vazebném místě.

Do skupiny biofyzikálních metod patří mnoho technik, z nichž jsou v následujícím přehledu vybrány ty nejdůležitější a ty, které se používají ke studiu interkalace:

**Fluorescenční metody** - vazba chromoforu na nukleovou kyselinu může vyvolat změny v absorpčním a emisním spektru dané látky. Například fluorescence ethidium bromidu je vyšší po navázání na DNA<sup>58</sup>.

**Cirkulární dichroismus** - Cirkulární dichroismus je běžně užívanou technikou pro studium nukleových kyselin a jejich komplexů s ligandy. Mohou být sledovány změny v CD spektrech nukleové kyseliny i vázaného ligandu.

**Viskozimetrické titrace** - Viskozimetrické titrace cirkulární dvoušroubovicové DNA se běžně používají k zjištění interkalace. Interkalující látky způsobují rozvinutí svinutých plasmidů, což způsobuje zvýšenou viskozitu vzorku<sup>59</sup>.

**Kompetitivní dialýza** - Vzorky DNA s různými strukturními motivy jsou dialyzovány proti roztoku studovaného ligandu, po dialýze je množství vázaného ligandu v daných vzorcích DNA měřeno spektrofotometricky. Tímto způsobem se zjišťuje sekvenční specifita ligandů<sup>60</sup>.

**Izotermální titrační kalorimetrie** - jediný způsob, jak přímo zjistit vazebnou entalpii, která může být využita k určení rovnovážné konstanty bimolekulární interakce DNA-ligand<sup>61</sup>.

**Rentgenostrukturní analýza** - Dosud byla popsána pouze jediná krystalová struktura elipticinu interkalovaného do dinukleotidu<sup>62</sup>.

**Molekulární modelování** – Molekulární modelování je široký termín, který zahrnuje *ab initio* kvantově mechanické výpočty, semiempirické výpočty a výpočty pomocí empirických potenciálů (silových polí). Tyto techniky mohou být využity pro studium třídímenzionální struktury a dynamických a dalších vlastností dané molekuly nebo souborů molekul. V poslední době je molekulové modelování mezi chemiky velmi populární a některé programy, které v sobě mají implementovány metody výpočetní chemie najdeme prakticky v každé chemické laboratoři. Molekulární modelování je používáno i pro studium interakcí mezi interkalátory a DNA.

Při používání výpočetních metod je ale třeba znát vhodnost použití a omezení jednotlivých metod. Interakce mezi DNA a interkalátory je pouze slabá nevazebná interakce a je otázka, zda jsou běžně používané empirické potenciály schopny tyto interakce správně popsat.

**Nukleární magnetická rezonance** – Velkou výhodou NMR spektroskopie je, že poskytuje strukturní i dynamické (na rozdíl od rentgenostrukturní analýzy) informace o zkoumaných látkách v roztoku. NMR je stále častěji hlavním zdrojem experimentálních dat o struktuře a vlastnostech komplexů malých molekul s biomolekulami a byla využita i při studiu interkalace do DNA. Rozbor NMR spekter může poskytnout informace o prostorovém uspořádání molekul, o jejich kinetických vlastnostech (například doba života jednotlivých komplexů) a někdy i termodynamické charakteristiky zkoumaných komplexů.

Interakce elipticinu s DNA byly již dříve studovány pomocí  $^1\text{H}$  NMR technik<sup>63</sup>. V této studii ale nebyla použita DNA s definovaným složením ale směs fragmentů DNA izolovaných z kuřecích erythrocytů. Bylo zjištěno, že elipticin je interkalátor a že není sekvenčně specifický. V jiné práci<sup>64</sup> byly učiněny podobné závěry sledováním  $^1\text{H}$  NMR spekter komplexů 9-hydroxy-2-methylelipticinia s dvěma oligonukleotidy.

## 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

### Syntetická část

Vypracovat jednoduchou metodu syntézy elipticinu a jeho derivátů (zejména metabolitů elipticinu), která by byla použitelná i pro přípravu větších množství těchto látek pokud možno bez chromatografického čištění. Prostudovat benzylové oxidace derivátů elipticinu a případně je využít pro syntézu 12-hydroxyelipticinu a 13-hydroxyelipticinu.

### Výpočetní část

Pomocí teoretických výpočtů (porovnáním s *ab initio* daty) zjistit, zda je možné využít jednoduché empirické potenciály pro molekulární modelování interakcí mezi interkalátory a bázemi DNA. Ověřit spolehlivost výpočtu interakčních energií a dalších vlastností (jako je geometrické uspořádání komplexů DNA s interkalátory) těchto systémů pomocí empirických potenciálů.

### NMR část

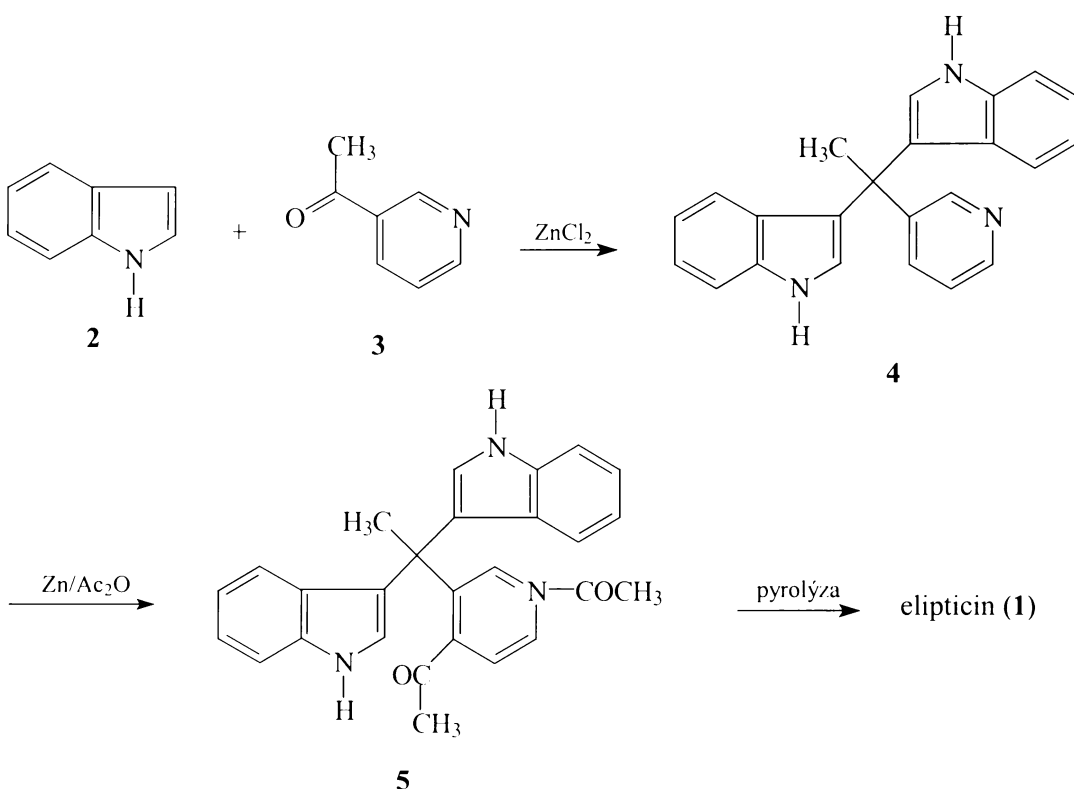
Pomocí  $^1\text{H}$  NMR technik zjistit, jakým způsobem se elipticin váže na oligonukleotidy. Zvolit dva jednoduché oligonukleotidy (jeden bohatý na páry bází guanin – cytosin a druhý na adenin – thymin) a studovat jejich vlastnosti pomocí NMR technik. Studovat vzájemné interakce (sekvenční selektivita, způsob vazby na oligonukleotidy, kinetické vlastnosti komplexů) derivátů elipticinu s oligonukleotidy sledováním změn  $^1\text{H}$  NMR spekter oligonukleotidů po přidavku derivátu elipticinu.



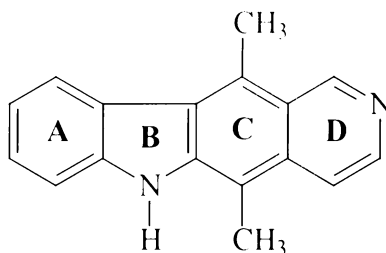
### 3. SYNTETICKÁ ČÁST

#### 3.1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

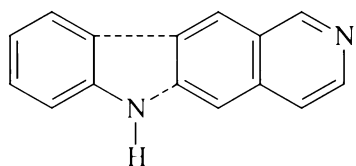
První úspěšná syntéza elipticinu byla publikována v roce 1959<sup>6,5</sup>. Tento přístup vycházel z kondenzace mezi indolem (**2**) a 3-acetylpyridinem (**3**). Ze vzniklé sloučeniny **4** byl redukcí zinkem, reakcí s acetanhydridem a následnou pyrolýzou meziprojektu **5** získán elipticin v 2% výtěžku.



Od objevení protinádorové aktivity tohoto alkaloidu a jeho derivátů bylo popsáno mnoho syntetických postupů vedoucích k pyrido[4,3-*b*]karbazolovému uspořádání. V roce 1977 byl publikován<sup>49</sup> rozsáhlý článek o syntetických cestách k elipticinu, ve kterém bylo popsáno patnáct různých způsobů příprav. Syntézy byly rozděleny do tří skupin: B, C a D, podle toho, který kruh je dobudován jako poslední.

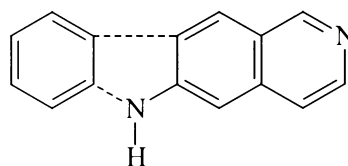


V později publikovaném článku<sup>44</sup> bylo považováno za přehlednější rozdělit syntetické postupy podle toho, která z klíčových vazeb se tvoří jako poslední. V současné době všechny známé syntetické cesty k pyrido[4,3-*b*]karbazolovému uspořádání mohou být rozříděny do osmi hlavních strategií (I-VIII). Ve schématu jsou označeny tvorby klíčových vazeb.



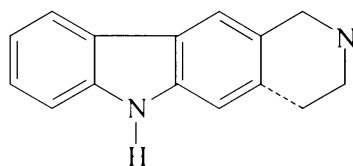
**strategie I**

anilin + isochinolin



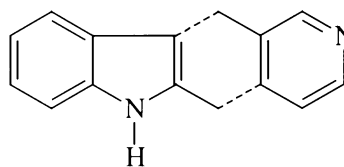
**strategie II**

aminoisochinolin + benzen



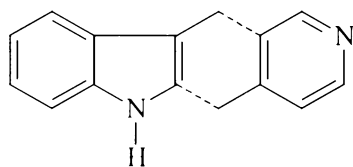
**strategie III**

karbazol + dobudování kruhu D



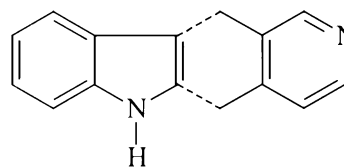
**strategie IV**

2-methylindol + 3-methylpyridin



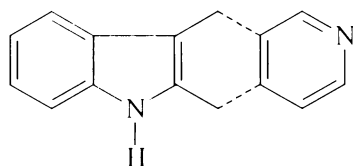
**strategie V**

3-methylindol + 4-methylpyridin

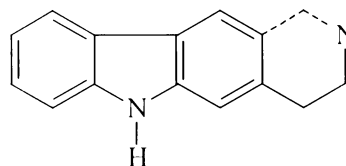


**strategie VI**

indol + 3,4-dimethylpyridin

**strategie VII**

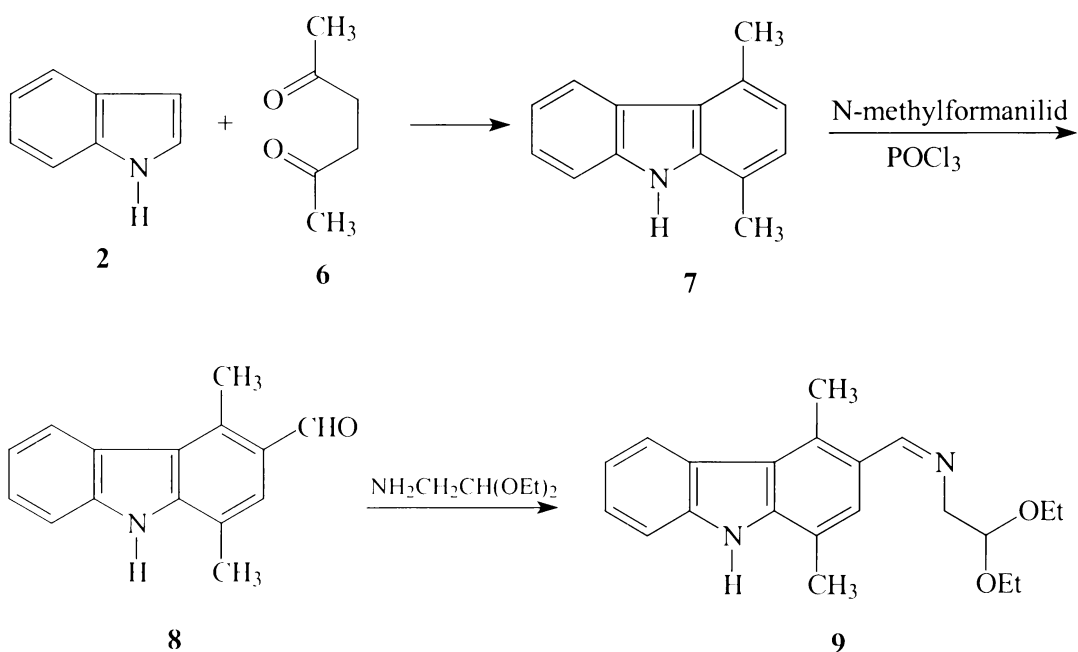
2,3-dimethylindol + pyridin

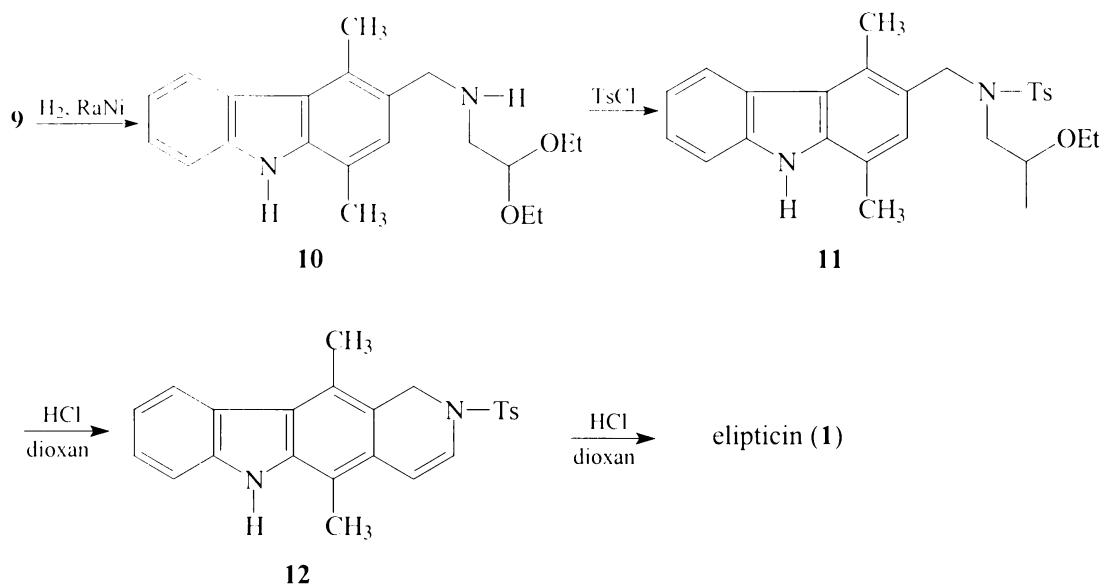
**strategie VIII**

karbazol + dobudování kruhu D

**3.1.1. SYNTÉZA ELIPTICINU PODLE STRATEGIE III**

V poslední době je v literatuře nejrozšířenější způsob přípravy elipticinu podle strategie III. Tato strategie je založena na kondenzaci indolu (**2**) s hexan-2,5-dionem (**6**) za vzniku 1,4-dimethylkarbazolu (**7**). Karbazol **7** je pak formylován za vzniku 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**8**). Následnou reakcí s 2,2-diethoxyethylaminem se získá imin **9** a ten je buď přímo zahříváním v kyselině fosforečné převeden na elipticin<sup>66</sup> (tato reakce je ale závislá na kvalitě použité kyseliny fosforečné a výtěžky jsou obecně malé) nebo se imin **9** redukuje na amin **10**, ten je tosylován za vzniku sulfonamidu **11** a ten varem v dioxanu s kyselinou chlorovodíkovou cyklizuje za vzniku elipticinu<sup>67</sup>. Meziproduktem této reakce je sulfonamid **12**, který byl také izolován z reakční směsi. Touto strategií se dají snadno připravit deriváty elipticinu se substituenty na kruhu A, podle toho který substituovaný indol se použije jako výchozí látka.





Obecným problémem přípravy elipticinu je jeho velmi malá rozpustnost jak v polárních tak nepolárních rozpouštědlech. Z tohoto důvodu je velmi obtížné chromatografické dělení surového produktu.

### 3.1.2. SYNTÉZA DERIVÁTŮ ELIPTICINU

V řadě laboratoří byla připravena široká škála derivátů základního skeletu elipticinu. Účelem takových úprav molekuly elipticinu bylo především:

- 1) zvýšení protinádorového účinku
- 2) modulace hydrofobicity molekuly ve smyslu zvýšené rozpustnosti ve vodě, ale i účinnější absorpce léčiva nádorovými buňkami
- 3) zvýšení selektivity léčiva pro nádorové buňky (příprava cíleně směřovaného léčiva)

V příloze 8.1. v tabulkách P1 – P7 je uveden přehled dosud připravených derivátů elipticinu. V tomto přehledu jsou uvedeny pouze ty deriváty, které byly v literatuře charakterizovány. V tabulkách P1 a P2 jsou uvedeny deriváty elipticinu u nichž byl některý z aromatických vodíků nahrazen alkylem, hydroxylem, halogenem nebo jinou běžnou organickou skupinou a v tabulce P3 jsou deriváty s běžnými organickými substituenty na methylových skupinách v polohách 5 a 11. V tabulce P4 jsou uvedeny deriváty elipticinu substituované takovým způsobem, že se v molekule objevuje další kruh. U většiny těchto derivátů elipticinu byly zkoumány cytostatické aktivity. Zvýšený protinádorový účinek vykazují některé deriváty

elipticinu substituované v poloze 9, a to 9-hydroxyelipticin, který je rovněž majoritním metabolitem elipticinu v lidském organismu, dále pak 9-methoxyelipticin a 9-chlorelipticin. Další místo důležité pro derivatizaci molekuly elipticinu je atom dusíku v poloze 2. 9-Hydroxy-2-methylelipticinium (ve formě acetátu) je neúčinnějším derivátem elipticinu proti nádorům prsu s kostními metastázami i jako protileukemické léčivo. Další derivát, 9-methoxy-2-methylelipticinium-acetát, je cytotoxický vůči buněčným liniím nádorů mozku, experimenty *in vivo*<sup>68</sup> však neprokázaly jeho účinnost vůči pevným nádorům. Naproti tomu 9-chlor-2-methylelipticinium-acetát je vůči pevným nádorům mozku vysoce efektivní. Výše uvedené derivatizace molekuly elipticinu vedou nejen ke změně protinádorové účinnosti, ale derivatizací je silně pozměněn i hydrofobní charakter léčiva. Derivatizace dusíku v poloze 2 vytváří z molekuly elektricky nabitou částici, proto jsou deriváty elipticinu používány ve formě solí, nejčastěji ve formě acetátu. Zmíněnou derivatizací dochází sice k lepší distribuci léčiva v organismu, naopak však k výraznému zhoršení transportních vlastností léčiva přes buněčnou membránu.

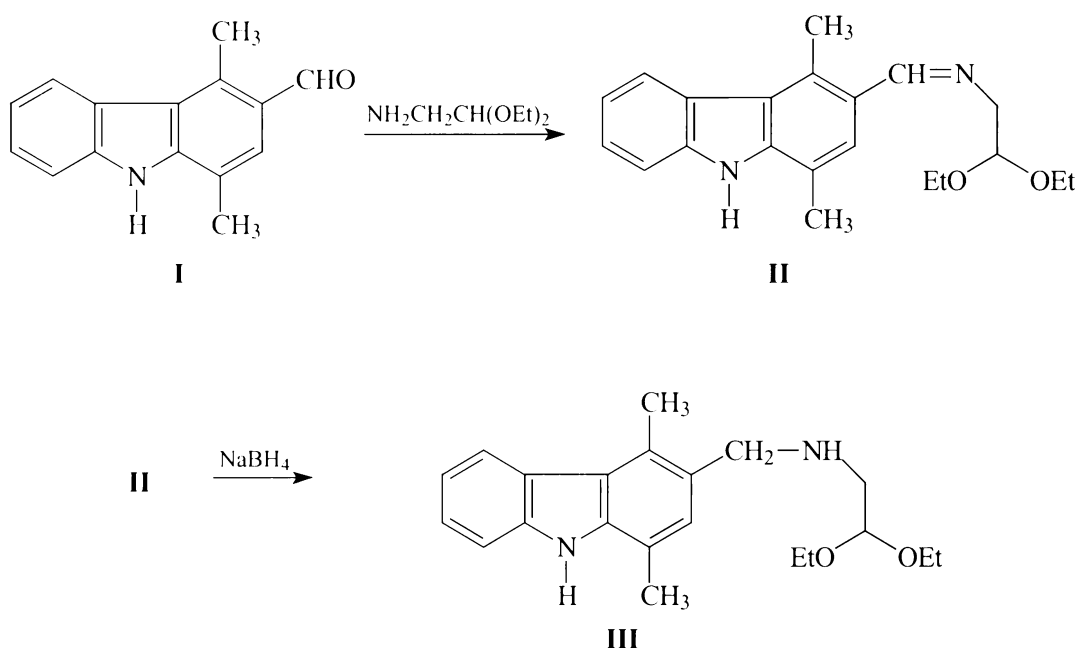
Pro zlepšení transportních vlastností elipticinu přes buněčnou membránu byly připravovány konjugáty elipticinu se sacharidy, steroidy, aminokyselinami, oligonukleotidy nebo porfyriny. Optimálním řešením úpravy molekuly protirakovinného léčiva ve smyslu změny jeho vlastností nejen fyzikálně-chemických, ale i biologických je příprava cíleně směřovaných derivátů léčiv. Do současnosti byla popsána příprava několika konjugátů elipticinu, které byly testovány jako potenciální cíleně směřovaná protirakovinná léčiva. Jedná se například o konjugáty elipticinu s enkefaliny, estradiolem, antiestrogeny a sacharidy. Přehled těchto konjugátů je v tabulkách P5 a P6.

Jinou modifikací, od které se očekával zvýšený protinádorový účinek byla příprava biselipticinů. Spojením dvou molekul elipticinu se zvyšuje afinita k DNA, protože výsledná molekula může interkalovat na dvou místech DNA zároveň. Přehled dosud připravených biselipticinů je v tabulce P7.

Kromě derivátů elipticinu byla připravena i celá řada analog této molekuly. Často se v literatuře objevují aza analoga elipticinu například 3-aza-elipticin<sup>69</sup>, 9-aza-elipticin<sup>70</sup>, dále 2-deaza-elipticin<sup>71</sup>, 13-thia<sup>72</sup> a 6-thia<sup>73</sup> deriváty a několik dalších látek bez methylových skupin v polohách 5 a 11, případně s methylovými skupinami v jiných polohách.

### 3.2. TEORETICKÁ ČÁST

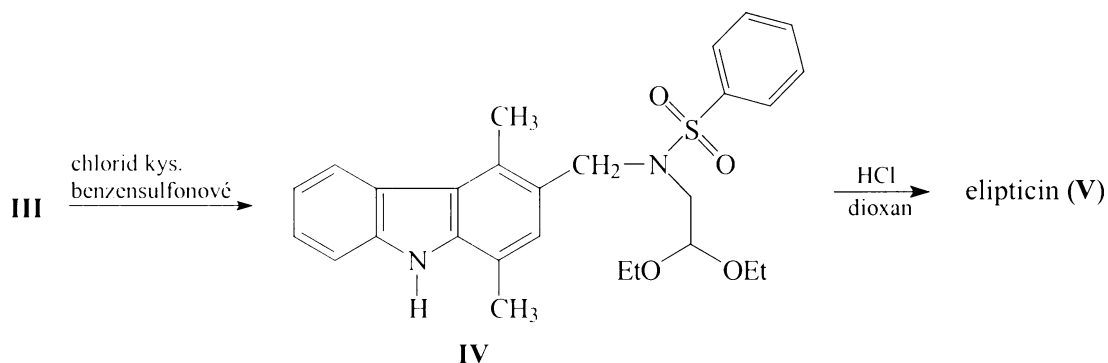
Jako základ pro syntézu elipticinu a jeho derivátů byla použita modifikace dříve publikovaného sledu reakcí<sup>1)</sup> (viz výše). Varem 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**I**) připraveného podle literatury<sup>1</sup> s 2,2-diethoxyethylaminem vznikl 3-(2,2-diethoxyethyliminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**II**), který byl bez izolace použit do další reakce, kde byl tetrahydridoboritanem sodným redukován na 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**III**).



Látka **III** byla v dřívějších pracích (viz literární přehled) tosylována a vzniklý tosylderivát byl šestihodinovým varem v dioxanu s kyselinou chlorovodíkovou převeden na elipticin. Tato konečná cyklizace je sice účinná (výtěžky až 87%), ale v reakční směsi se objevují nečistoty, které lze těžko oddělit. V této práci byl amin **III** reakcí s chloridem kyseliny benzensulfonové převeden na sulfonamid **IV**, který snadno krystaluje z ethanolu. Pouze 20 minutovým varem sulfonamidu **IV** pod dusíkovou atmosférou byl získán elipticin (**V**), který vykrystaloval z reakční směsi, v 97% výtěžku.

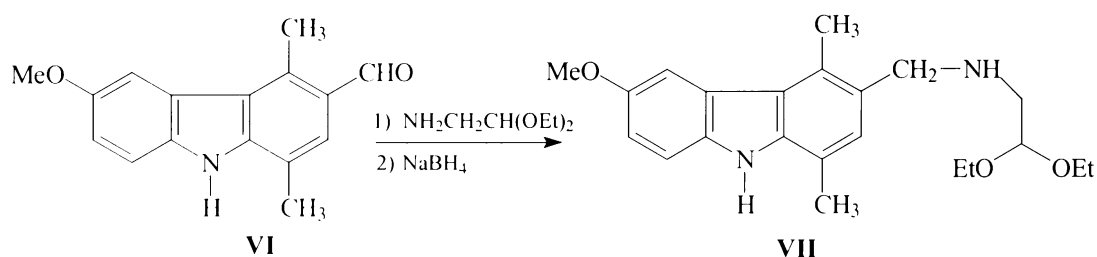
Je zajímavé, že pouhá záměna tosylové skupiny za benzensulfonovou vede k podstatné změně reaktivity látky **IV**. Přesný mechanismus solvolýzy tosylové respektive benzensulfonylové skupiny není znám, je ale pravděpodobné, že

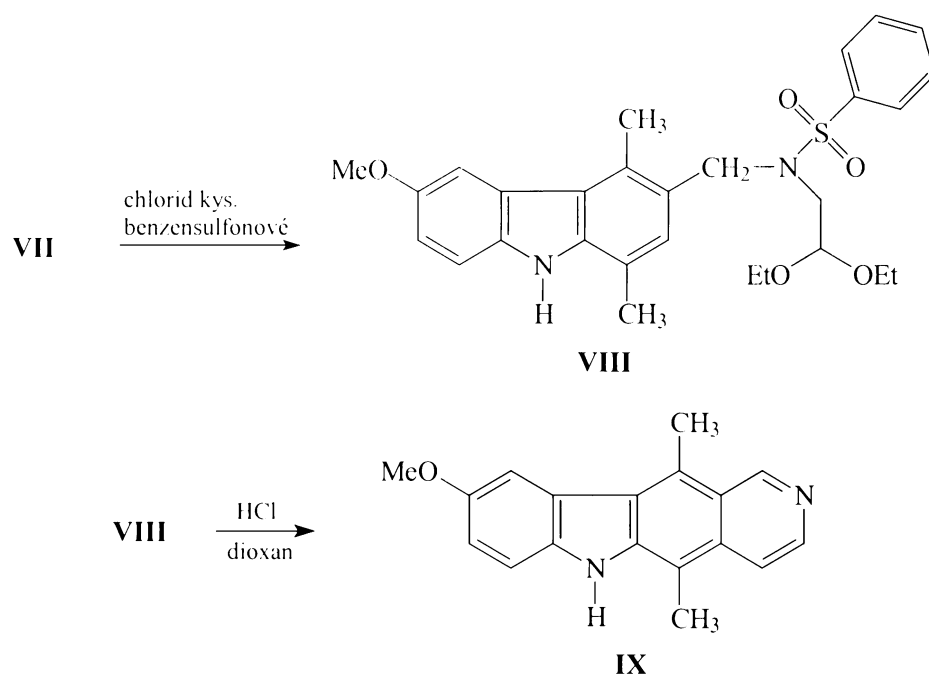
methylová skupina tosylátu svým kladným indukčním efektem zvyšuje stabilitu sulfonamidového uspořádání.



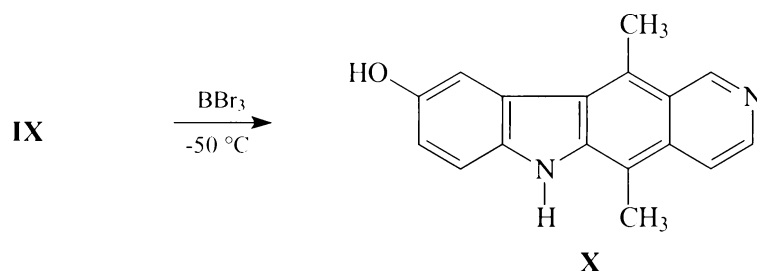
Ukázalo se tedy velmi výhodné v sekvenci reakcí zaměnit tosylovou skupinu za benzensulfonylovou skupinu. Bylo tím dosaženo vyšších výtěžků, zkrácení reakční doby a byl získán čistý produkt, který nebylo nutné dále čistit.

Bylo zajímavé ověřit výhody záměny tosylové skupiny za benzensulfonylovou i při přípravě 9-methoxyelipticinu. Reakcí 3-formyl-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazolu (VI) připraveného podle literatury<sup>1</sup> s 2,2-diethoxyethylaminem a následnou redukcí tetrahydridoboritanem sodným vznikl 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazol (VII) a ten reakcí s chloridem kyseliny benzensulfonové poskytl sulfonamid VIII, který dále varem v dioxanu s kyselinou chlorovodíkovou cyklizoval za vzniku 9-methoxyelipticinu (IX). Produkt IX vykristaloval z reakční směsi s 94% výtěžkem a jeho <sup>1</sup>H NMR spektrum souhlasilo s literárními údaji<sup>1</sup>. V dřívějších pracích<sup>1,74</sup> byl 9-methoxyelipticin (IX) připraven pouze v 55 % výtěžku, opět se tedy ukázalo jako výhodné zaměnit tosylovou skupinu za benzensulfonylovou.

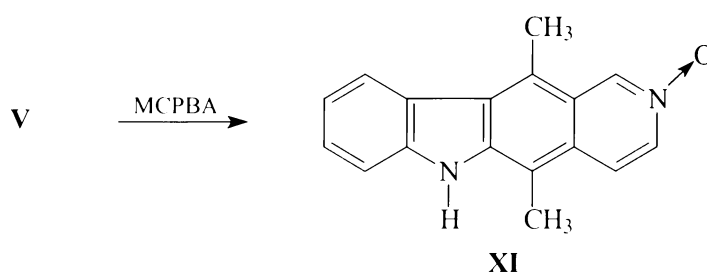




9-Methoxyelipticin byl dále reakcí s bromidem boritým v dichlormethanu při  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  demetylován za vzniku 9-hydroxyelipticinu (**X**).  $^1\text{H}$  NMR spektrum produktu se shodovalo s literárními údaji<sup>1</sup>.

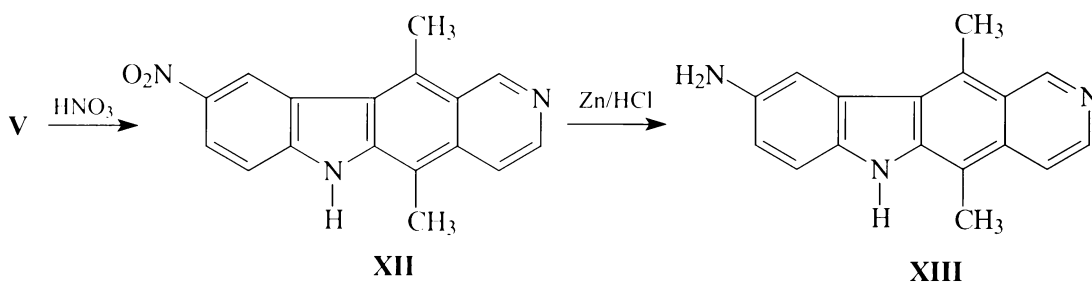


Reakcí elipticinu (**V**) s 3-chlorperoxybenzoovou kyselinou byl získán elipticin-*N*-oxid (**XI**) s výtěžkem 98 %. Syntéza byla prováděna modifikací dříve publikované metody<sup>75</sup>.





Dalším připraveným derivátem byl 9-nitroelipticin, který byl již v dřívě<sup>1</sup> připraven z 5-nitroindolu. V této práci byl 9-nitroelipticin (**XII**) získán nitrací elipticinu (**V**). Při ochlazení reakční směsi na 0 °C dochází k substituci nitroskupinou pouze v poloze 9. Látka **XII** byla dále zredukována zinkem v kyselině chlorovodíkové na 9-aminoelipticin (**XIII**).



Dále jsem se pokoušel připravený 9-aminoelipticin (**XIII**) využít k alternativní přípravě 9-hydroxyelipticinu (**IX**) pomocí diazotace a následného rozkladu diazoniové soli, ale nepodařilo se mi nalézt vhodné reakční podmínky. Podle  $^1\text{H}$  NMR spektra obsahoval výsledný produkt vždy složitou směs, popřípadě elipticin (**V**).

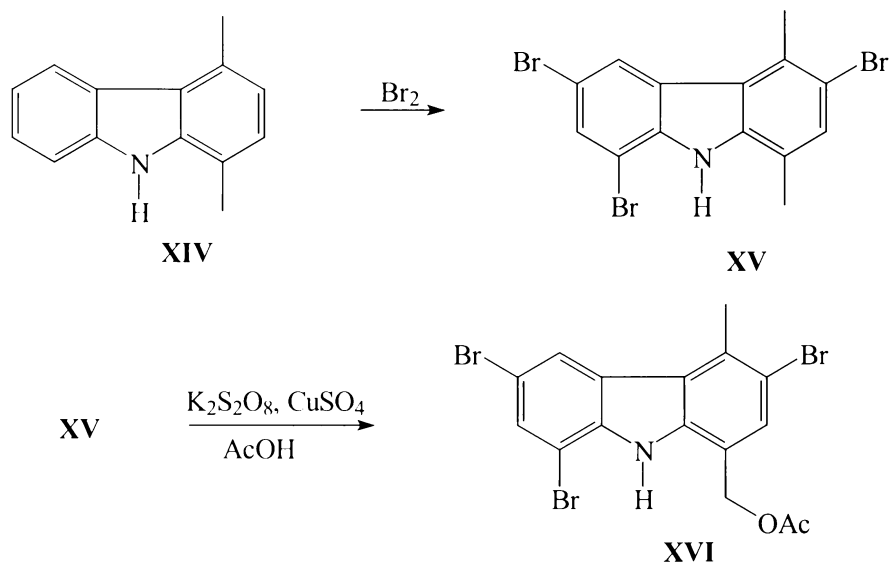
### 3.2.1. BENZYLOVÉ OXIDACE

Jedním z cílů této práce bylo připravit derivát elipticinu s hydroxylovou skupinou v poloze 13. Důvodem zájmu o tuto látku je, že je pravděpodobně jedním z metabolitů elipticinu (na základě hmotového a  $^1\text{H}$  NMR spektra). Tento metabolit je zodpovědný za tvorbu majoritního kovalentního aduktu na DNA<sup>25</sup>, 13-hydroxyelipticin může tedy být spoluodpovědný za protinádorové účinky elipticinu.

V literatuře jsou popsány dva způsoby přípravy 13-hydroxyelipticinu<sup>76,77</sup>, v obou případech jsou ale výtěžky velmi malé a byl získán znečištěný produkt. V lit.<sup>78</sup> je popsáno několik neúspěšných pokusů o přípravu 13-substituovaných derivátů elipticinu.

V této práci byly studovány benzylové oxidace 1,4-dimethylkarbazolu (**XIV**) a jeho derivátů (včetně elipticinu), jakožto jedna ze syntetických možností, jak připravit 13-hydroxyelipticin.

1,4-Dimethylkarbazol (**XIV**) byl oxidován několika oxidačními činidly. V případě reakce s peroxosíranem draselným za přítomnosti měďnatých iontů v kyselině octové (tato reakce byla dříve použita pro oxidaci toluenu<sup>79</sup>) došlo ke zpolymerování reakční směsi. Při reakci s bromem nedošlo k oxidaci benzylových poloh ale k aromatické substituci, vznikl 3,6,8-tribrom-1,4-dimethylkarbazol (**XV**). Struktura látky **XV** byla potvrzena hmotovým spektrem a NMR spektry. Látka **XV** byla následně podrobena reakci s peroxosíranem draselným a v tomto případě nedošlo k polymeraci. Výsledkem reakce byla směs, která obsahovala převážně 1-acetoxymethyl-3,6,8-tribrom-4-methylkarbazol (**XVI**), minoritní složkou směsi byl pravděpodobně 4-acetoxymethyl-3,6,8-tribrom-1-methylkarbazol. V tomto případě tedy došlo k benzylové oxidaci a výsledné hydroxyderiváty se acetylovaly kyselinou octovou přítomnou jako rozpouštědlo.

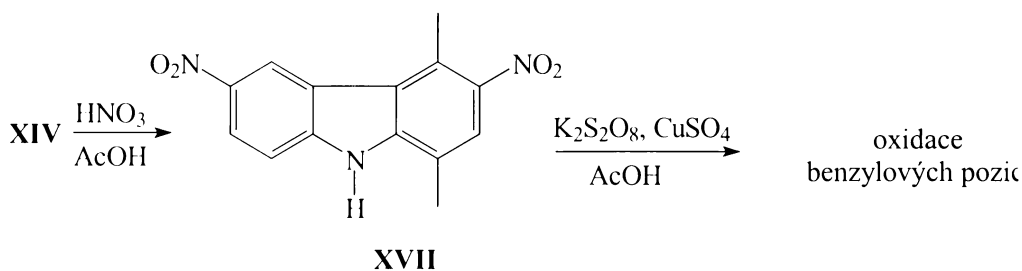


Při reakci látky **XIV** s ekvimolárním množstvím N-bromacetamidu v přítomnosti dibenzoylperoxidu opět nedošlo k benzylové bromaci ale k bromaci aromatických jader. Výsledkem reakce byla směs tří látek (pravděpodobně monobromderivátů). Po dalším přidavku N-bromacetamidu a prodloužení reakční doby se v reakční směsi objevuje 3,6,8-tribrom-1,4-dimethylkarbazol (**XV**).

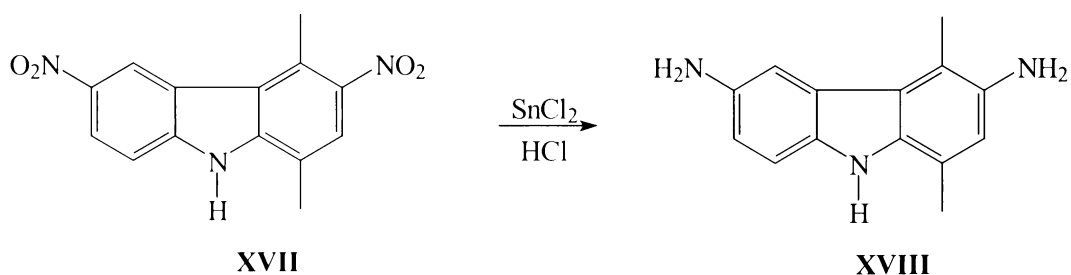
Byl-li 1,4-dimethylkarbazol (**XIV**) podroben Étardově reakci<sup>80</sup>, došlo opět k polymeraci. Při oxidaci 1,4-dimethylkarbazolu oxidem chromovým vznikla bohatá směs, která podle <sup>1</sup>H NMR neobsahovala žádné hydroxymethylové, aldehydicke nebo karboxylové skupiny na aromatickém jádře.

Látka **XIV** byla nitrována, vznikl 1,4-dimethyl-3,6-dinitrokarbazol (**XVII**) a ten byl podroben reakci s peroxosíranem draselným v kyselině octové. V tomto

případě nedošlo k polymeraci reakční směsi, výsledkem reakce byla směs, která kvůli její špatné rozpustnosti nebyla chromatograficky dělena, ale podle  $^1\text{H}$  NMR spektra došlo k oxidaci methylových skupin v poloze 1 a 4. Ve spektru mizí signály  $\text{CH}_3$  skupin u 2,4 a 2,8 ppm a objevují se signály u 5,41 a 5,76 ppm, které odpovídají sloučeninám s acetoxy skupinou v benzylových pozicích a dále se ve spektru objevuje signál u 2,0 ppm odpovídající methylu acetátu.



Redukcí dinitro derivátu **XVII** chloridem cínatým byl získán 3,6-diamino-1,4-dimethylkarbazol (**XVIII**) a ten byl opět podroben reakci s peroxosíranem draselným. Výsledkem bylo opět zpolymerování reakční směsi.

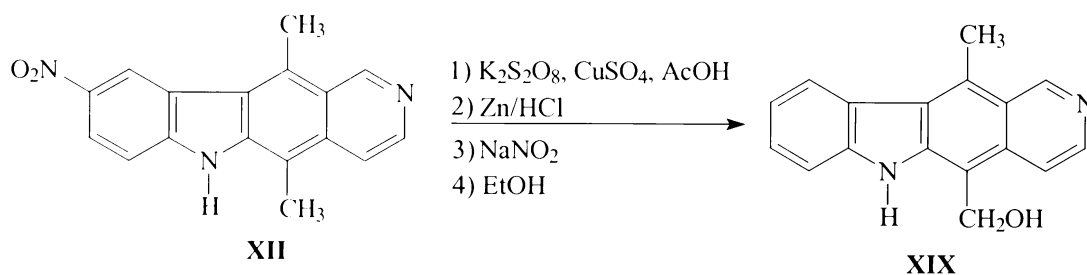


Nitrací 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**I**) byl opět získán 1,4-dimethyl-3,6-dinitrokarbazol (**XVII**). Při nitraci tedy zřejmě došlo i k oxidaci aldehydické skupiny na karboxylovou a k její následné dekarboxylaci a nitraci do polohy 3.

Z výše uvedených experimentů je vidět, že 1,4-dimethylkarbazol (**XIV**) je velmi citlivý na oxidační činidla. Za podmínek benzylové oxidace dochází buď k aromatické substituci nebo zřejmě k radikálové polymeraci. Pokud ale tato látka nese elektronakceptorní substituenty (které navíc blokují místa možné aromatické substituce), může docházet k benzylové oxidaci. Benzylová oxidace probíhá přednostně na methylu v poloze 1. To je pravděpodobně způsobeno jednak větším sterickým bráněním methylu v poloze 4 (v blízkosti je vodík v poloze 5 a substituent v poloze 3) a také větší stabilitou přechodně vznikajícího benzylového radikálu.

V předchozím odstavci shrnuté poznatky byly využity k přípravě 13-hydroxyelipticinu. Elipticin (**V**) byl nitrován za vzniku 9-nitroelipticinu (**XII**) a ten byl oxidován peroxosíranem draselným. Vzniklý 13-acetoxy-9-nitroelipticin byl bez

izolace redukován chloridem cínatým a výsledný aminoderivát byl podroben diazotaci a redukci diazoskupiny ethanolém. Tímto způsobem byl připraven 13-hydroxyelipticin (**XIX**). Společnou analytickou chromatografií takto připraveného 13-hydroxyelipticinu s jedním z metabolitů elipticinu bylo prokázáno, že struktura tohoto metabolitu odpovídá 13-hydroxyelipticinu.



### 3.2.2. NMR DERIVÁTŮ KARBAZOLU A ELIPTICINU

V tabulce 1 jsou uvedeny chemické posuny atomů vodíku a interakční konstanty a v tabulce 2 chemické posuny uhlíkových atomů nově připravených derivátů karbazolu nebo derivátů u nichž nebyla NMR data publikována. V tabulce 1 jsou také uvedeny NMR charakteristiky derivátů karbazolu, u kterých byla dříve publikovaná data nejednoznačná nebo bez interakčních konstant. U uvedených látek bylo přiřazení signálů atomů vodíků a uhlíků provedeno pomocí dvoudimenzionální NMR spektroskopie (H,H-COSY, H,C-HSQC, H,C-HMBC).

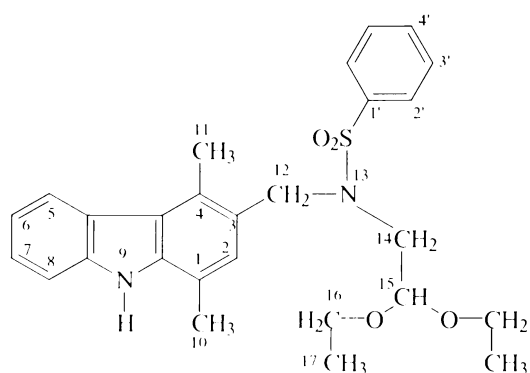
**Tabulka 1.** Chemické posuny, multiplicity a interakční konstanty (v Hz) signálů vodíků derivátů karbazolu.

| Vodík <sup>a</sup> | I <sup>b</sup>              | III <sup>b</sup> | IV <sup>b</sup>  | VI <sup>b</sup>       | VII <sup>b</sup>      | VIII <sup>b</sup>   | XIV <sup>b</sup>            | XV <sup>b</sup> | XVI <sup>b</sup> | XVII <sup>c</sup>     | XVIII <sup>c</sup>    |
|--------------------|-----------------------------|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2                  | 7,77 s                      | 7,34 s           | 6,96 s           | 7,75 s                | 7,18 s                | 6,93 s              | 7,08 d (7,3)                | 7,45 s          | 7,60 s           | 7,82 s                | 6,59 s                |
| 3                  | -                           | -                | -                | -                     | -                     | -                   | 6,90 d (7,3)                | -               | -                | -                     | -                     |
| 5                  | 8,28 d (7,9)                | 8,22 d (8,0)     | 8,20 d (7,9)     | 7,77 d (2,8)          | 7,71 d (2,4)          | 7,71 s              | 8,14 d (7,9)                | 8,16 d (1,4)    | 8,09 d (1,4)     | 8,77 d (2,0)          | 7,38 d (2,1)          |
| 6                  | 7,33 ddd<br>(8,1; 7,1; 1,1) | 7,20 t (7,2)     | 7,24 t (7,0)     | -                     | -                     | -                   | 7,22 ddd<br>(7,9; 5,2; 2,8) | -               | -                | -                     | -                     |
| 7                  | 7,48 ddd<br>(8,2; 7,0; 1,2) | 7,41 t (7,2)     | 7,41 t (7,5)     | 7,12<br>dd (8,8; 2,4) | 7,05 dd<br>(8,6; 2,6) | 7,06<br>m (ΣJ=10,2) | 7,37 m                      | 7,69 d (1,4)    | 7,68 d (1,5)     | 8,25 dd<br>(9,0; 2,0) | 6,68 dd<br>(8,4; 2,0) |
| 8                  | 7,53 ddd<br>(8,1; 1,0; 1,0) | 7,55 d (8,0)     | 7,47 d (7,0)     | 7,44 d (8,8)          | 7,36 d (8,4)          | 7,38 bs             | 7,37 m                      | -               | -                | 7,59 d (8,9)          | 7,13 d (8,3)          |
| 9                  | 8,38 bs                     | 8,79 bs          | 7,99 bs          | 8,22 bs               | 7,95 bs               | 7,92 bs             | 8,00 bs                     | 8,36 bs         | 9,42 bs          | 12,63                 | 10,09 bs              |
| 10                 | 2,58 s                      | 2,54 s           | 2,41 s           | 2,56 s                | 2,46 s                | 2,39 s              | 2,44 s                      | 2,53 s          | 5,39 s           | 2,50 s                | 2,36 s                |
| 11                 | 3,21 s                      | 2,84 s           | 2,81 s           | 3,19 s                | 2,83 s                | 2,80 s              | 2,81 s                      | 2,82 s          | 2,81 s           | 2,82 s                | 2,49 s                |
| 12                 | 10,47 s                     | 4,36 bs          | 4,71 s           | 10,45 s               | 4,04 s                | 4,70 s              | -                           | -               | 2,13 s           | -                     | -                     |
| 14                 | -                           | 2,50 d(5,6)      | 3,21 d(5,5)      | -                     | 2,77 d(5,6)           | 3,20 d(5,6)         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 15                 | -                           | 4,86 t(5,6)      | 4,41 t(5,5)      | -                     | 4,74 t(5,6)           | 4,41 t(5,4)         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 16                 | -                           | 3,52-3,69        | 3,24-3,55 m      | -                     | 3,51-3,73 m           | 3,26-3,54 m         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 17                 | -                           | 1,17 t(7,0)      | 1,07 t(7,0)      | -                     | 1,21 t(6,8)           | 1,07 t(7,0)         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 2'                 | -                           | -                | 7,87 d(7,2)      | -                     | -                     | 7,87 d(7,2)         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 3'                 | -                           | -                | 7,50 t(7,9)      | -                     | -                     | 7,50 t(7,4)         | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| 4'                 | -                           | -                | 7,57 m (ΣJ=14,8) | -                     | -                     | 7,56 m (ΣJ=19,2)    | -                           | -               | -                | -                     | -                     |
| -OCH <sub>3</sub>  | -                           | -                | -                | 3,95 s                | 3,93 s                | 3,93 s              | -                           | -               | -                | -                     | -                     |

<sup>a</sup>Číslování viz obrázek u tabulky 2, <sup>b</sup>měřeno v CDCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>měřeno v DMSO-*d*<sub>6</sub>.

**Tabulka 2.** Chemické posuny uhlíkových atomů derivátů karbazolu.

| Uhlík <sup>a</sup> | III <sup>b</sup> | IV <sup>b</sup> | VI <sup>c,d</sup> | VIII <sup>b</sup> | XV <sup>b</sup> | XVI <sup>b,c</sup> | XVII <sup>c</sup> | XVIII <sup>c</sup> |
|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 1                  | 116,91           | 116,65          | 118,15            | 116,83            | 119,30          | 124,14             | 120,55            | 116,81             |
| 2                  | 124,29           | 124,04          | 127,76            | 123,76            | 131,21          | 132,38             | 123,45            | 116,09             |
| 3                  | 128,12           | 128,84          | 121,17            | 128,90            | 116,10          | 115,51             | 142,25            | 137,48             |
| 4                  | 129,69           | 130,62          | 135,19            | 130,57            | 130,32          | 131,01             | 127,40            | 111,82             |
| 4a                 | 121,96           | 121,95          | 124,02            | 122,01            | 121,83          | 117,75             | 119,75            | 121,20             |
| 4b                 | 124,29           | 124,42          | 125,34            | 125,04            | 125,90          | 125,32             | 122,33            | 124,21             |
| 5                  | 122,73           | 122,84          | 106,17            | 106,91            | 124,19          | 124,09             | 118,67            | 106,59             |
| 6                  | 119,28           | 119,49          | 153,60            | 153,79            | 112,13          | 112,19             | 144,31            | 140,10             |
| 7                  | 125,12           | 125,06          | 114,35            | 113,56            | 129,72          | 130,17             | 121,50            | 113,86             |
| 8                  | 110,69           | 110,54          | 112,17            | 110,97            | 104,48          | 104,95             | 111,84            | 110,82             |
| 8a                 | 138,39           | 138,45          | 135,19            | 134,77            | 136,65          | 137,54             | 140,26            | 133,80             |
| 9a                 | 139,85           | 139,66          | 142,94            | 139,42            | 137,64          | 137,19             | 142,43            | 133,46             |
| 10                 | 16,76            | 16,47           | 16,56             | 16,43             | 16,24           | 62,65              | 16,15             | 16,82              |
| 11                 | 15,83            | 15,87           | 14,61             | 15,82             | 19,55           | 19,88              | 15,88             | 13,49              |
| 12                 | 48,58            | 49,19           | 191,45            | 49,21             | -               | -                  | -                 | -                  |
| 14                 | 50,96            | 50,62           | -                 | 50,57             | -               | -                  | -                 | -                  |
| 15                 | 101,36           | 101,85          | -                 | 101,95            | -               | -                  | -                 | -                  |
| 16                 | 63,32            | 63,08           | -                 | 63,08             | -               | -                  | -                 | -                  |
| 17                 | 15,25            | 15,22           | -                 | 15,23             | -               | -                  | -                 | -                  |
| 1'                 | -                | 140,44          | -                 | 140,63            | -               | -                  | -                 | -                  |
| 2'                 | -                | 127,24          | -                 | 127,28            | -               | -                  | -                 | -                  |
| 3'                 | -                | 128,91          | -                 | 128,90            | -               | -                  | -                 | -                  |
| 4'                 | -                | 132,33          | -                 | 132,29            | -               | -                  | -                 | -                  |



<sup>a</sup>Číslování viz obrázek, <sup>b</sup>měřeno v CDCl<sub>3</sub>, <sup>c</sup>měřeno v DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>d</sup>OCH<sub>3</sub> : 55,67, <sup>e</sup>Acetát: 172,57 a 21,34.

NMR charakteristiky elipticinu a jeho derivátů jsou značně závislé na podmínkách měření (rozpuštědlo, koncentrace, pH). Použité rozpouštědlo může solvatovat různé části molekuly, v kyselém prostředí dochází k protonaci dusíkových atomů a může také docházet ke vzniku agregátů elipticinu, zvláště v rozpouštědlech, kde není příliš rozpustný. Tato závislost je dokumentována v tabulce 3, kde jsou chemické posuny vodíkových atomů elipticinu v různých rozpouštědlech, v různé koncentraci a v kyselém a bazickém prostředí. Tato závislost chemických posunů na podmínkách měření vede také k tomu, že v literatuře uváděná NMR data pro tytéž látky se často liší (chemické posuny v  $^1\text{H}$  NMR až o 0,5 ppm a v  $^{13}\text{C}$  NMR dokonce až o 5 ppm). U NMR charakteristik derivátů elipticinu by se tedy kromě použitého rozpouštědla měla uvádět i koncentrace měřené látky. V tabulce 4 jsou uvedeny chemické posuny vodíků a v tabulce 5 chemické posuny  $^{13}\text{C}$  všech derivátů elipticinu připravených v této práci, kromě  $^{13}\text{C}$  NMR 9-nitroelipticinu (**XII**), který je extrémně nerozpustný a jeho uhlíkové spektrum se nepodařilo změřit.

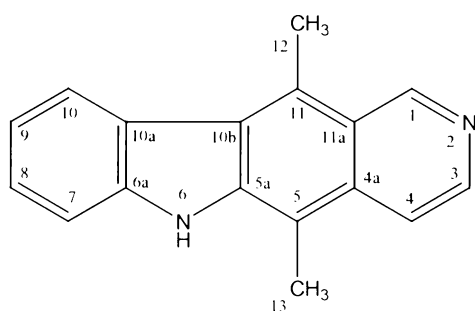
**Tabulka 3.** Chemické posuny vodíků elipticinu.

| Rozpuštědlo                              | Množství<br>(mg/0,6ml) | Vodík |      |      |      |      |      |      |      |      |  |
|--|------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
|  |                        | 1     | 3    | 4    | 7    | 8    | 9    | 10   | 12   | 13   |  |
| $\text{CD}_3\text{OD}$                   | 1 mg                   | 9,72  | 8,34 | 8,19 | 7,60 | 7,58 | 7,33 | 8,42 | 3,33 | 2,86 |  |
| $\text{CDCl}_3$                          | 1 mg                   | 9,71  | 8,20 | 8,08 | 7,60 | 7,62 | 7,38 | 8,27 | 3,17 | 2,75 |  |
| $\text{CD}_2\text{Cl}_2$                 | 1 mg                   | 9,60  | 8,38 | 7,86 | 7,56 | 7,56 | 7,31 | 8,35 | 3,23 | 2,75 |  |
| $\text{CD}_3\text{OD}$                   | 0,1 mg                 | 9,62  | 8,34 | 8,01 | 7,56 | 7,52 | 7,28 | 8,40 | 3,30 | 2,83 |  |
| $\text{CD}_3\text{OD}$ baz. <sup>a</sup> | 0,1 mg                 | 9,62  | 8,34 | 8,01 | 7,57 | 7,52 | 7,28 | 8,40 | 3,31 | 2,84 |  |
| $\text{CD}_3\text{OD}$ kys. <sup>b</sup> | 0,1 mg                 | 9,90  | 8,35 | 8,50 | 7,69 | 7,67 | 7,44 | 8,51 | 3,41 | 2,94 |  |

<sup>a</sup>Bazické prostředí (přídavek jedné kapky 10 M NaOH), <sup>b</sup>kyselé prostředí (přídavek jedné kapky konc. HCl).

**Tabulka 4.** Chemické posuny, multiplicity a interakční konstanty (v Hz) signálů vodíků elipticinu a jeho derivátů. Vzorek byl získán rozpuštěním 2 mg látky v 0,6 ml DMSO- $d_6$ .

| Vodík <sup>a</sup> | V                          | IX                    | X                     | XI                         | XII                   | XIII                  | XIX             |
|--------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| 1                  | 9,70 s                     | 9,68 d (0,4)          | 9,68 bs               | 9,16 s                     | 9,73 s                | 9,62 s                | 9,70 s          |
| 3                  | 8,43<br>d (6,0)            | 7,89<br>dd (0,7; 6,1) | 8,39 bs               | 8,10<br>dd (1,6; 7,4)      | 8,47<br>d (6,1)       | 8,36<br>d (6,0)       | 8,50<br>d (6,0) |
| 4                  | 7,93<br>d (6,1)            | 8,40<br>d (6,0)       | 7,92 bs               | 8,05<br>d (7,3)            | 7,93<br>d (6,2)       | 7,86<br>d (6,0)       | 8,12<br>d (6,0) |
| 6                  | 11,37 s                    | 11,19 s               | 11,10 s               | 11,48 s                    | 12,16 s               | 10,81 s               | 11,40 s         |
| 7                  | 7,57<br>d (8,1)            | 7,48<br>d (8,8)       | 7,39<br>d (8,5)       | 7,52<br>d (7,9)            | 7,65<br>d (9,0)       | 7,28<br>d (8,5)       | 7,51<br>d (7,7) |
| 8                  | 7,51<br>m ( $\Sigma$ 14,9) | 7,19<br>dd (2,4; 8,8) | 7,03<br>dd (2,2; 8,5) | 7,56<br>m ( $\Sigma$ 10,9) | 8,38<br>dd (2,1; 9,0) | 6,89<br>dd (2,0; 8,4) | 7,56<br>t (7,0) |
| 9                  | 7,27<br>t (8,0)            | -                     | -                     | 7,26<br>t (8,0)            | -                     | -                     | 7,26<br>t (6,7) |
| 10                 | 8,40<br>d (7,8)            | 7,87<br>d (2,5)       | 7,77<br>d (2,1)       | 8,37<br>d (8,1)            | 9,07<br>d (2,1)       | 7,66<br>d (2,1)       | 8,39<br>d (8,1) |
| 12                 | 3,28 s                     | 3,26 s                | 3,22 s                | 3,09 s                     | 3,26 s                | 3,22 s                | 3,27 s          |
| 13                 | 2,81 s                     | 2,77 s                | 2,76 s                | 2,80 s                     | 2,81 s                | 2,74 s                | 5,26 s          |



<sup>a</sup>Číslování viz obrázek



**Tabulka 5.** Chemické posuny uhlíkových atomů derivátů elipticinu. Vzorek pro měření byl získán rozpuštěním 2 mg látky v 0,6 ml DMSO-*d*<sub>6</sub>.

| Uhlík <sup>a</sup> | V      | IX     | X      | XI     | XIII   |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1                  | 149,71 | 149,79 | 149,67 | 132,87 | 149,56 |
| 3                  | 140,50 | 140,35 | 140,31 | 134,17 | 141,84 |
| 4                  | 115,92 | 115,97 | 115,78 | 120,23 | 115,75 |
| 4a                 | 132,51 | 132,44 | 132,24 | 125,45 | 132,08 |
| 5                  | 108,01 | 108,04 | 107,62 | 110,10 | 107,29 |
| 5a                 | 140,45 | 141,35 | 141,23 | 139,55 | 140,15 |
| 6a                 | 142,56 | 137,39 | 140,31 | 142,71 | 141,11 |
| 7                  | 110,67 | 111,30 | 111,02 | 110,92 | 110,86 |
| 8                  | 127,15 | 115,33 | 115,90 | 127,52 | 115,75 |
| 9                  | 119,21 | 153,20 | 150,98 | 119,32 | 135,12 |
| 10                 | 123,83 | 107,85 | 109,28 | 123,96 | 108,37 |
| 10a                | 123,11 | 123,63 | 123,52 | 122,63 | 123,82 |
| 10b                | 123,39 | 123,55 | 123,74 | 124,88 | 123,63 |
| 11                 | 128,09 | 128,40 | 127,93 | 124,88 | 127,63 |
| 11a                | 122,00 | 121,76 | 121,61 | 122,63 | 121,55 |
| 12                 | 11,98  | 11,99  | 11,92  | 12,22  | 11,88  |
| 13                 | 14,38  | 14,37  | 14,17  | 14,71  | 14,20  |
| -OCH <sub>3</sub>  | -      | 55,87  | -      | -      | -      |

<sup>a</sup>Číslování viz obrázek u tabulky 4.

### 3.3. ZÁVĚR

V této práci byla vypracována metoda přípravy elipticinu (**V**) a jeho derivátů (9-methoxyelipticin (**IX**), 9-hydroxyelipticin (**X**), elipticin-*N*-oxid (**XI**), 9-nitroelipticin (**XII**), 9-aminoelipticin (**XIII**) a 13-hydroxyelipticin (**XIX**)), která je vhodná i pro přípravu větších množství těchto látek. Tato metoda vychází z dříve publikované strategie III, tedy ze syntézy vhodně substituovaného 1,4-dimethylkarbazolu a následného dobudování kruhu D elipticinu. Záměnou *p*-toluensulfonylové skupiny za benzensulfonylovou v reakční sekvenci se v závěrečném kroku syntézy podařilo získat velmi čistý produkt ve vysokém výtěžku. Takto vzniklý elipticin byl použit pro syntézu dalších derivátů.

Dále byly studovány benzylové oxidace derivátů 1,4-dimethylkarbazolu. Bylo zjištěno, že nesubstituovaný karbazol nebo karbazol substituovaný elektron-donorními skupinami (-NH<sub>2</sub>) je citlivý na oxidační činidla a snadno polymeruje. Naopak 1,4-dimethylkarbazol substituovaný elektronakceptorními skupinami (3,6-dinitro, 3,6,8-tribrom) lze oxidovat v benzylových pozicích. Přednostně dochází k oxidaci methylové skupiny v poloze 1. Těchto zjištění bylo využito při syntéze 13-hydroxyelipticinu.

Struktury všech připravených derivátů karbazolu a elipticinu byly potvrzeny <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektry. U elipticinu byl pozorován vliv rozpouštědla, koncentrace a pH na chemické posuny vodíků.

## 3.4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.4.1. OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian <sup>UNITY</sup> *INOVA* 400. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena při 399,95 MHz, <sup>13</sup>C spektra při 100,58 MHz v deuterovaném chloroformu, dimethylsulfoxidu nebo methanolu. Jako standard byl pro <sup>1</sup>H NMR spektra v CDCl<sub>3</sub> použit tetramethylsilan. Chemické posuny v <sup>13</sup>C NMR spektrech byly referencovány vůči signálu CDCl<sub>3</sub> ( $\delta = 77,00$ ) ppm. U vzorků měřených v dimethylsulfoxidu byly jako standard použity signály rozpouštědla s chemickými posuny  $\delta = 2,50$  (pro <sup>1</sup>H) a  $\delta = 39,5$  (pro <sup>13</sup>C). U vzorků měřených v deuterovaném methanolu byl jako standard použit signál rozpouštědla s chemickým posunem  $\delta = 3,30$  (pro <sup>1</sup>H).

Vodíková COSY spektra byla měřena pomocí standardní dvoupulsní sekvence v absolutním modu. NOESY spektra byla měřena pomocí standardní třípulsní sekvence jako fázově citlivé experimenty (směšovací perioda 0,3 s). Korelace signálů <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C byla provedena pomocí HSQC a HMBC sekvencí využívajících pulsních gradientů magnetického pole.

Čistota vzorků byla sledována pomocí tenkovrstevné chromatografie na fóliích Kieselgel 60 F 254 (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna UV zářením. Pro sloupcovou chromatografii byl používán silikagel Kieselgel 60 (63 – 200  $\mu$ m, Merck).

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií a mobilní fáze pro sloupcové chromatografie na silikagelu jsou vždy uvedeny u experimentu.

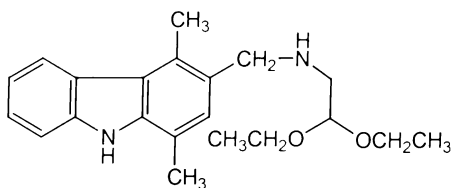
Hmotnostní spektra EI byla měřena na přístroji INCOS 50 (Finnigan MAT), teplota iontového zdroje byla 150 °C. Zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhřívaném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s). Energie ionizujících elektronů byla 75 eV.

IR spektra byla změřena v chloroformu na spektrofotometru Perkin-Elmer 490 při teplotě 23 °C. Elementární analýza byla prováděna na přístroji Perkin Elmer CHN Analyser II.

Běžným zpracováním se rozumí promytí organické fáze vodou, vysušení pomocí bezvodého síranu sodného a následné odpaření na vakuové odparce.

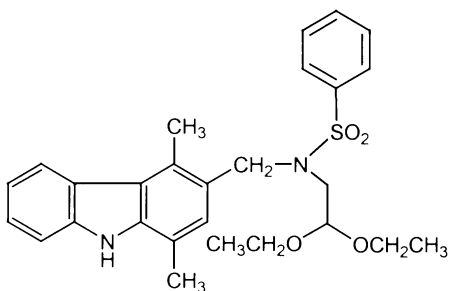
### 3.4.2. POSTUPY

#### 3-(2,2-Diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**III**)



Směs 750 mg (3,36 mmol) 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**I**, připraveno podle literatury<sup>1</sup>) a 0,5 ml (3,44 mmol) 2,2-diethoxyethylaminu byla za míchání zahřívána na vodní lázni po dobu 2,5 hodin. Vzniklý 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**II**) byl rozpuštěn v 15 ml methanolu a poté bylo pomalu přidáno 0,7 g (18,47 mmol) tetrahydridoboritanu sodného k redukci. Vzniklá směs byla za laboratorní teploty míchána po dobu 1 hodiny a následně odpařena na vakuové odparce do sucha. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a 3 x promyt vodou. Organická fáze byla 2 x protřepána se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou v poměru 1:16. Vodná vrstva byla alkalizována roztokem hydroxidu sodného, extrahována 3 x do chloroformu a dále zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 950 mg (84% teorie) produktu (**III**). <sup>1</sup>H NMR se shodovalo s literaturou<sup>1</sup>.

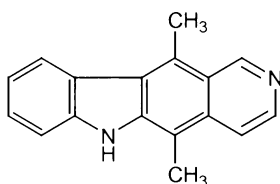
#### 3-(Benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**IV**)



K roztoku 2 g (5,91 mmol) 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazolu (**III**) v 60 ml tetrahydrofuranu bylo přidáno 32 ml 2,5 % vodného roztoku uhličitanu sodného a 0,83 ml (5,91 mmol) chloridu kyseliny benzensulfonové. Vzniklý roztok byl za laboratorní teploty míchán po dobu 1 hodiny. Poté byla přidána voda a reakční směs byla extrahována do chloroformu. Chloroformová fáze byla protřepána nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou, vysušena a na vakuové odparce odpařena do sucha. Odparek podle TLC obsahoval nečistoty, proto byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií za

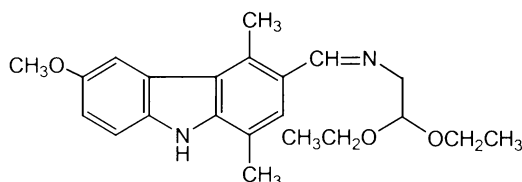
použití 30 g silikagelu, jako eluent byla použita směs diethyletheru a hexanu v poměru 2 : 1. Následnou krystalizací z ethanolu bylo získáno 1,7 g (39% teorie) 3-(benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazolu (**IV**), t.t. 154 °C, IR: 3473, 2978, 1333, 1159, 1059, EI-MS,  $m/z$  (%): 503 ( $M^+ + 23$ , 87), 318 (100), 251 (7),  $^1\text{H}$  NMR data jsou uvedena v tabulce 1,  $^{13}\text{C}$  NMR data jsou uvedena v tabulce 2. Pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  vypočteno: 67,47% C, 6,71% H, 5,83% N, nalezeno: 67,47% C, 6,74% H, 5,58% N.

### 5,11-Dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (elipticin) (**V**)



K roztoku 310 mg (0,65 mmol) 3-(benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazolu (**IV**) v 7,6 ml dioxanu bylo přidáno 0,78 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:1). Tato směs byla 20 minut za míchání zahřívána k varu pod dusíkovou atmosférou. Poté byla přidána voda, vzniklá sraženina byla odsáta a vysušena za laboratorní teploty na vzduchu. Další podíl elipticinu byl získán z filtrátu, který byl alkalizován vodným roztokem hydroxidu sodného a extrahován chloroformem. Chloroformová vrstva byla promyta vodou, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vysušena a odpařena. Bylo získáno 155 mg (97% teorie) elipticinu (**V**).  $^1\text{H}$  NMR spektrum bylo ve shodě s údaji uvedenými v literatuře<sup>1</sup> a je uvedeno v tabulce 4,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 5.

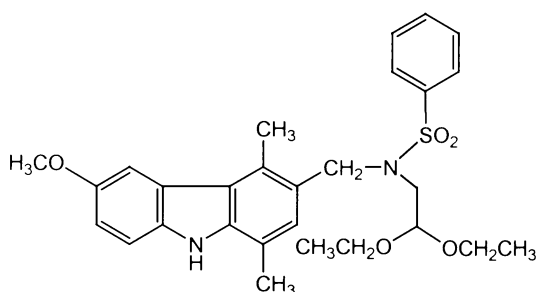
### 3-(2,2-Diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazol (**VII**)



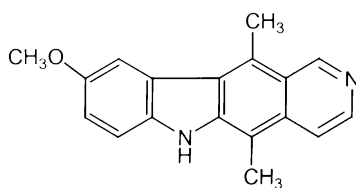
Směs 2,8 g (11,02 mmol) 3-formyl-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazolu (**VI**) a 1,68 ml (11,55 mmol) 2,2-diethoxyethylaminu byla 2,5 hodiny za míchání zahřívána na vodní lázni. Vzniklý 3-(2,2-diethoxyethyliminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazol byl rozpuštěn v 50 ml methanolu a poté bylo pomalu přidáno 2,4 g (63,32 mmol) tetrahydridboritanu sodného k redukci. Reakční směs byla za

laboratorní teploty 1 hodinu míchána a následně odpařena na vakuové odparce do sucha. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a 3 x promyt vodou. Organická fáze byla 2 x protřepána zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1 : 16). Vodná vrstva byla alkalizována vodným roztokem hydroxidu sodného, extrahována 3 x do chloroformu, promyta vodou, vysušena a odpařena do sucha. Bylo získáno 3,4 g (84% teorie) odparku, jehož  $^1\text{H}$  NMR se shodovalo s daty uvedenými v literatuře<sup>1</sup> pro 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazol (**VII**).

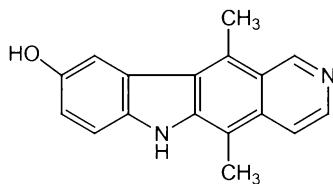
### 3-(Benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazol (**VIII**)



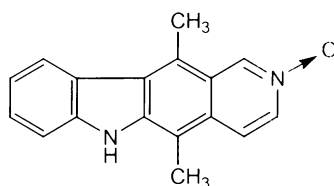
Ve 100 ml tetrahydrofuranu bylo rozpuštěno 3,4 g (9,19 mmol) 3-(2,2-diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazolu (**VII**) a následně bylo přidáno 54 ml 2,5% vodného roztoku uhličitanu sodného a 1,4 ml (10,90 mmol) chloridu kyseliny benzensulfonové. Reakční směs byla míchána 1 hodinu za laboratorní teploty. Poté byla přidána voda a vzniklá směs extrahována do chloroformu. Chloroformová vrstva byla protřepána nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, promyta vodou, vysušena a odpařena za vakua do sucha. Dále byla směs přečištěna přes sloupec silikagelu, jako eluent byla použita směs diethyletheru a hexanu v poměru 2:1. Následnou krystalizací z ethanolu bylo získáno 1,4 g (30% teorie) 3-(benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazolu (**VIII**), t.t. 153 °C, IR: 3475, 2979, 1314, 1158, 1059, EI-MS,  $m/z$  (%): 533 ( $M^+ + 23$ , 87), 318 (100), 413 (5),  $^1\text{H}$  NMR je uvedeno v tabulce 1,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 2. Pro  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  vypočteno: 65,86% C, 6,71% H, 5,49% N, nalezeno: 65,65% C, 6,80% H, 5,22% N.

**9-Methoxy-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (9-methoxyelipticin) (IX)**

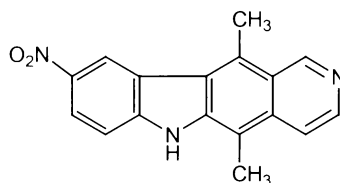
V 32,5 ml dioxanu bylo rozpuštěno 1,4 g (2,73mmol) 3-(benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylamonomethyl)-6-methoxy-1,4-dimethylkarbazolu (**VIII**) a následně přidáno 3,3 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:1). Vzniklá směs byla 15 minut za míchání zahřívána k varu pod zpětným chladičem. Poté byla přidána voda, směs nalita na led a alkalizována vodným roztokem hydroxidu sodného. Vzniklá sraženina byla odsáta, promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a vysušena za laboratorní teploty na vzduchu. Bylo získáno 706 mg (94% teorie) 9-methoxyelipticinu (**IX**).  $^1\text{H}$  NMR spektrum bylo ve shodě s údaji uvedenými v literatuře<sup>1</sup> a je uvedeno v tabulce 4,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 5.

**9-Hydroxy-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (9-hydroxyelipticin) (X)**

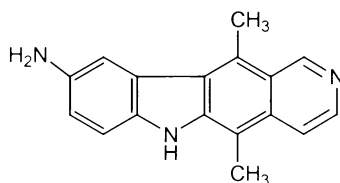
K míchané suspenzi 80 mg (0,31 mmol) 9-methoxyelipticinu (**IX**) a 2 ml dichlormethanu bylo při  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  (pevný  $\text{CO}_2/\text{EtOH}$ ) přidáno 0,48 ml 1 M roztoku bromidu boritého v dichlormethanu. Vzniklá směs byla udržována při této teplotě po dobu 20 minut, poté bylo opět přidáno 0,48 ml 1 M roztoku bromidu boritého a směs byla dále míchána než teplota vystoupila na  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla přidána voda, směs nalita na led a alkalizována koncentrovaným amoniakem. Vzniklá sraženina byla odsáta, promyta vodou a vysušena za laboratorní teploty na vzduchu. Bylo získáno 56 mg (70% teorie) 9-hydroxyelipticinu (**X**).  $^1\text{H}$  NMR spektrum se shodovalo s údaji v literatuře<sup>81</sup> a je uvedeno v tabulce 4,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 5.

**5,11-Dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol-2-oxid (elipticin-*N*-oxid) (XI)**

K roztoku 170 mg (0,65 mmol) elipticinu (**V**) v 34 ml dichlormethanu bylo za chlazení ledem postupně přidáno 255 mg (1,47 mmol) 3-chlorperoxybenzoové kyseliny. Vzniklá směs byla při 0 °C míchána po dobu 6 hodin, poté byl přidán nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného a směs byla míchána ještě 20 minut. Reakční směs byla 2 x extrahována do dichlormethanu, promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a dále zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 167 mg (98% teorie) elipticin-*N*-oxidu (**XI**). <sup>1</sup>H NMR spektrum bylo ve shodě s údaji uvedenými v literatuře<sup>75</sup> a je uvedeno v tabulce 4, <sup>13</sup>C NMR je uvedeno v tabulce 5.

**9-Nitro-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (9-nitroelipticin) (XII)**

V 11 ml kyseliny octové bylo rozpuštěno 220 mg (0,89 mmol) elipticinu (**V**) a následně bylo za chlazení ledem pomalu přidáno 2,2 ml směsi kyseliny octové a kyseliny dusičné v poměru 1:1. Vzniklá směs byla 45 minut míchána při teplotě 0 °C. Poté byla přidána voda, vzniklá sraženina odsáta, promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a vysušena za laboratorní teploty na vzduchu. Bylo získáno 190 mg (73% teorie) 9-nitroelipticinu (**XII**). <sup>1</sup>H NMR spektrum bylo ve shodě s údaji uvedenými v literatuře<sup>1</sup> a je uvedeno v tabulce 4.

**9-Amino-5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (9-aminoelipticin) (XIII)**

Roztok 100 mg (0,34 mmol) 9-nitroelipticinu (**XII**) v 25 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové byl za míchání 3 hodiny zahříván k varu a po půl hodině vždy

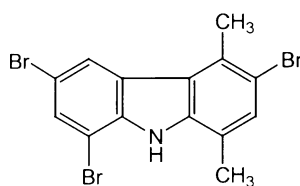


přidáno 100 mg práškového zinku. Po vychladnutí byla reakční směs alkalizována vodným roztokem hydroxidu sodného, vzniklá šedožlutá sraženina odsáta a vysušena. Dále byla sraženina rozpuštěna v methanolu a nerozpuštěná část obsahující zinek odfiltrována. Po odpaření methanolu na vakuové odparce bylo získáno 65 mg (73% teorie) 9-aminoelipticinu (**XIII**).  $^1\text{H}$  NMR spektrum bylo ve shodě s údaji uvedenými v literatuře<sup>82</sup> a je uvedeno v tabulce 4,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 5.

### Pokus o přípravu 9-hydroxyelipticinu diazotací 9-aminoelipticinu

Ve 2 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:2) bylo rozpuštěno 15 mg (0,06 mmol) 9-aminoelipticinu a vzniklý roztok byl ochlazen na 0 °C. Následně bylo postupně přidáno 0,3 ml 10% vodného roztoku dusitanu sodného a reakční směs byla ještě 30 minut za chlazení míchána. Přebytečná kyselina dusitá byla odstraněna postupným přidáváním roztoku močoviny za kontroly pozitivní reakce na jodoškrobový papírek. Poté bylo přidáno 2,5 ml zředěné kyseliny sírové v poměru 1:2 a směs byla za míchání zahřívána k varu po dobu 20 minut. Po vychladnutí byl roztok za chlazení alkalizován vodným roztokem hydroxidu sodného. Vzniklá sraženina byla odsáta, promyta nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, vodou a vysušena za laboratorní teploty na vzduchu. Bylo získáno 11 mg produktu, který podle  $^1\text{H}$  NMR obsahoval převážně elipticin.

### 3,6,8-Tribrom-1,4-dimethylkarbazol (**XV**)



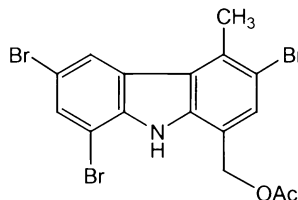
K roztoku 1,4-dimethylkarbazolu (**XIV**, 100 mg, 51 mmol) v 6 ml chloroformu byl přikapáván roztok bromu (1 ml bromu v 9 ml chloroformu). Po přidání 0,7 ml tohoto roztoku se reakční směs přestala odbarvovat. Bylo přidáno ještě 0,3 ml roztoku bromu a reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě 20 minut, poté byla protřepána s roztokem siřičitanu sodného a dále zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 220 mg (51 mmol, 100 %) chromatograficky jednotného 3,6,8-tribrom-1,4-dimethylkarbazolu (**XV**), vzorek pro analýzu byl překrystalován z ethanolu, t.t. 191 °C.  $^1\text{H}$  NMR je uvedeno v tabulce 1,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno

v tabulce 2. Pro  $C_{14}H_{10}Br_3N$  vypočteno: 38,93% C, 2,33% H, 3,24% N, nalezeno: 38,57% C, 2,35% H, 2,90% N.

### Obecný způsob oxidace peroxosíranem draselným

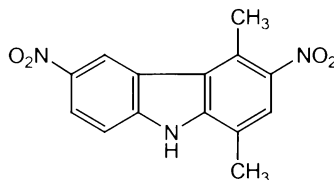
Oxidovaná látka (40 mmol), peroxosíran draselný (60 mmol), pentahydrát síranu měďnatého (30 mmol) a octan sodný (350 mg) byly rozpuštěny v 3 ml kyseliny octové a směs byla dvě hodiny zahřívána k varu. Poté byla přidána voda a vzniklá sraženina byla odsáta a promyta vodou. Filtrát byl 2 x extrahován do diethyletheru a etherická vrstva byla zpracována běžným způsobem. Tak byl získán další podíl produktu.

### 1-Acetoxymethyl-3,6,8-tribrom-4-methylkarbazol (XVI)



Výše popsaná metoda oxidace byla aplikována na 3,6,8-tribrom-1,4-dimethylkarbazol. Odparek po oxidaci peroxosíranem draselným byl dočištěn chromatografií na sloupci silikagelu. Bylo získáno 78 mg 1-acetoxymethyl-3,6,8-tribrom-4-methylkarbazolu (40 %), t.t. 144 °C.  $^1H$  NMR je uvedeno v tabulce 1,  $^{13}C$  NMR je uvedeno v tabulce 2. Pro  $C_{16}H_{12}Br_3NO_2$  vypočteno: 39,22% C, 2,47% H, 2,86% N, nalezeno: 39,05% C, 2,49% H, 2,58% N.

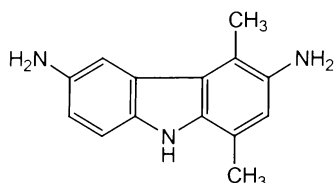
### 1,4-Dimethyl-3,6-dinitrokarbazol (XVII)



K roztoku 1,4-dimethylkarbazolu (XIV, 100 mg, 51 mmol) v 2,5 ml kyseliny octové bylo přidáno 40 mg (58 mmol) dusitanu sodného a směs byla na vodní lázni ohřívána na 90 °C. Poté bylo přidáno 0,4 ml směsi kyseliny octové a kyseliny dusičné v poměru 1 : 1 a směs byla 30 minut za míchání zahřívána na vroucí vodní lázni. Poté byla směs ještě 40 minut míchána bez zahřívání a následně byla přidána voda, vzniklá sraženina byla odsáta a promyta vodou, nasyceným roztokem

hydrogenuhličitanu sodného a opět vodou. Bylo získáno 130 mg (89 %) 1,4-dimethyl-3,6-dinitrokarbazolu (**XVII**), t.t. 342 °C (rozklad).  $^1\text{H}$  NMR je uvedeno v tabulce 1,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 2. Pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$  vypočteno: 58,95% C, 3,89% H, 14,73% N, nalezeno: 58,67% C, 3,92% H, 14,05% N.

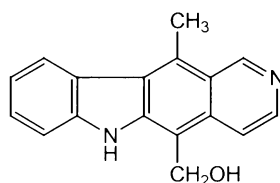
### 3,6-Diamino-1,4-dimethylkarbazol (**XVIII**)



Směs 200 mg (0,7 mmol) 1,4-dimethyl-3,6-dinitrokarbazolu (**XVII**), 4 g chloridu cínatého (21 mmol), 6 ml vody a 34 ml kyseliny chlorovodíkové byla jednu hodinu zahřívána na vroucí vodní lázni. Poté byla přidána voda a směs byla za chlazení ledem alkalizována roztokem hydroxidu sodného. Výsledná reakční směs byla třikrát extrahována dichlormethanem a organická vrstva byla zpracována běžným způsobem. Bylo získáno 98 mg (62 %) amorfního 3,6-diamino-1,4-dimethylkarbazolu (**XVIII**).  $^1\text{H}$  NMR je uvedeno v tabulce 1,  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedeno v tabulce 2. Pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3$  vypočteno: 74,64% C, 6,71% H, 18,65% N, nalezeno: 74,47% C, 6,64% H, 18,58% N.

### 5-hydroxymethyl-11-methyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol

#### 13-hydroxyelipticin (**XIX**)



9-Nitroelipticin (**XII**, 200 mg, 0,69 mmol) byl podroben oxidaci peroxosíranem draselným podle postupu uvedeného výše. K takto získanému odparku (195 mg) byl přidán chlorid cínatý (3,2 g, 17 mmol), 30 ml kyseliny chlorovodíkové a 4 ml vody a směs byla jednu hodinu zahřívána na vroucí vodní lázni. Po ochlazení ledem na 5 °C byl k reakční směsi přidán roztok dusitanu sodného (72 mg, 1 mmol) v 2,4 ml vody. Reakční směs byla 10 minut míchána za chlazení ledem, poté bylo přidáno 20 ml ethanolu a směs byla za míchání zahřáta k varu, poté byla ochlazená na laboratorní teplotu a alkalizována roztokem hydroxidu

sodného. Vzniklá sraženina byla odsáta a promyta vodou. Surový produkt byl přečištěn pomocí HPLC na reverzní fázi, jako mobilní fáze byl použit methanol. Bylo získáno 49 mg (27 %) 13-hydroxyelipticinu (**XIX**).  $^1\text{H}$  NMR bylo ve shodě s literaturou [1] a je uvedeno v tabulce 4.

## 4. VÝPOČETNÍ ČÁST

### 4.1. ÚVOD

Výpočetní chemie se v poslední době stává stále důležitější a populárnější součástí všech chemických a fyzikálně chemických prací. Vždy je ale třeba mít na zřeteli omezení jednotlivých metod a používat pouze takové výpočetní metody, které poskytují relevantní výsledky. Výpočetní chemie (zejména empirické potenciály) se v současnosti běžně používá i pro studium DNA a interakcí mezi DNA a interkalátory nebo léčivy obecně. Pokud je molekulární modelování použito s některými experimentálními daty (získanými např. z rentgenostrukturní analýzy nebo z NOESY experimentu), výsledky jsou důvěryhodné a často v dobré shodě s dalšími experimenty<sup>83</sup>. V současné době je ale velmi rozšířené molekulové modelování bez konfrontace s experimentálními daty. Vzhledem k tomu, že v komplexech DNA – interkalátor se uplatňují slabé nevazebné interakce, je otázkou zda jednoduché empirické potenciály (které jsou součástí současných výpočetních programů) jsou schopny správně určit strukturní a dynamické vlastnosti těchto komplexů. Empirické potenciály byly použity i v dřívějších pracích<sup>84-86</sup> pro modelování interakcí derivátů elipticinu s oligonukleotidy.

Tato práce si klade za cíl porovnat vybrané empirické potenciály s referenčními *ab initio* daty a vyhodnotit vhodnost daných empirických potenciálů pro teoretický popis systémů DNA – interkalátor a zjistit tak, zda je vůbec teoreticky možné využít empirické potenciály pro výpočet interakčních energií systémů interkalátor – báze DNA a pro zjišťování dalších vlastností těchto systémů (jako je geometrické uspořádání komplexů DNA s interkalátory).

#### 4.1.1. METODY VÝPOČETNÍ CHEMIE

Při teoretickém popisu interakční energie mezi paralelně umístěnými aromatickými systémy (tzv. „stacking“ energie, energie, která také stabilizuje komplex DNA bází s interkalátorem) se uvažují čtyři příspěvky k této energii<sup>87</sup> : elektrostatická energie (přitahování nebo odpuzování mezi parciálními náboji molekul), disperzní energie (způsobená fluktuacemi elektronových oblaků, tzv. van

der Waalsova energie), indukční energie (jedna molekula indukuje nové rozložení náboje v druhé, to je dáno polarizovatelností molekul) a přenos náboje.

Metody výpočetní chemie lze rozdělit do tří skupin: *ab initio* metody, semiempirické metody a empirické potenciály.

#### 4.1.1.1. AB INITIO METODY

*Ab initio* metody vycházejí z teorie kvantové mechaniky. Při výpočtu interakční energie systémů s interkalací je nutné do výpočtů zahrnout korelační energii, protože metoda Hartree-Fock a DFT metody nezahrnují disperzní energii<sup>88</sup>.

Výpočty *ab initio* na vyšší úrovni jsou prakticky nemožné pro větší systémy (jako např. fragment DNA a interkalátor), v literatuře se dosud objevila pouze jedna publikace popisující výpočet interakční energie mezi interkalátorem a párem bází<sup>87</sup> a jedna publikace popisující výpočet interakční energie mezi interkalátorem a jednouází<sup>89</sup>. „Stacking“ interakce různých DNA bází a párů bází byly již podrobněji studovány, například v lit.<sup>90</sup> je diskutována interakční energie mezi páry bází v A-DNA a B-DNA.

S výpočtem interakční energie pomocí *ab initio* metod je spojena tzv. chyba způsobená superpozicí bází (basis set superposition error, BSSE). Velikost energie zkoumaného systému je závislá na použité bázi funkcí. Čím větší báze je použita, tím nižší energie je získána. Interakční energie systému se dvěma komponentami se počítá jako rozdíl energie celého systému a energií jednotlivých komponent. Při výpočtu energie celého systému máme ale k dispozici větší bázi než při výpočtu energie komponent. To způsobuje, že výsledná interakční energie je nižší o určitou chybu. Již dříve byl v literatuře ukázán jednoduchý způsob, jak tuto chybu odstranit<sup>91</sup>. Při výpočtu energie komponent se používá stejná báze jako při výpočtu energie celého systému. Funkce (orbitaly), které byly původně umístěné na atomech druhé komponenty jsou umístěny na tzv. „dummy atomech“, to jsou fiktivní atomy, které nenesou žádný náboj a mají nulovou hmotnost. V této práci byla chyba způsobená superpozicí bází systematicky odstraňována touto standardní metodou.

#### 4.1.1.2. SEMIEMPIRICKÉ METODY

Semiempirické metody (například NDO metody, AM1, PM3) zjednodušují výpočet vlnové funkce molekul dosazením některých empirických konstant. Pro výpočty interakčních energií systémů s důležitou rolí disperzní energie jsou ale také nepoužitelné, protože stejně jako metoda Hartree-Fock disperzní energii nezahrnují.

#### 4.1.1.3. EMPIRICKÉ POTENCIÁLY

Empirické potenciály nahrazují výpočet vlnové funkce výpočtem tzv. vnitřní energie. Atomy se rozdělují do typů (například typ CA v programu AMBER označuje aromatický uhlík), jednotlivé typy atomů mají tabelované optimální délky vazeb mezi sebou, valenční a torsní úhly (například optimální délka vazby CA – CA je 1,400 Å, optimální valenční úhel CA – CA – CA je 120°). Jakákoli změna vnitřních parametrů dané molekuly od optimálních hodnot způsobí definovaný nárůst vnitřní energie. Důležitou součástí vnitřní energie jsou také nevazebné interakce mezi atomy, které nejsou vázány chemickou vazbou. Nevazebný příspěvek se většinou počítá jako součet elektrostatické energie a van der Waalovy energie.

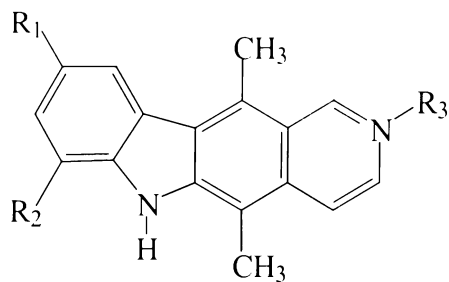
Empirické potenciály jsou výpočetně mnohem méně náročné než *ab initio* metody a umožňují výpočet energie a dalších vlastností i pro velké molekuly nebo soubory molekul (například solvatovaný protein, komplex léčivo – receptor a další). Pro svou jednoduchost jsou empirické potenciály velmi často používány v molekulárně dynamických výpočtech a jsou zabudovány v řadě chemických výpočetních programech (např. HyperChem, AMBER, Sybyl a další).

Jednoduché empirické potenciály sestávající z van der Waalova příspěvku a coulombického příspěvku (s náboji lokalizovanými na atomech) k nevazebné energii (zanedbávají tedy příspěvek indukční energie a přenos náboje) jsou schopné reprodukovat *ab initio* vypočtené interakční energie poměrně dobře<sup>92</sup>. To nicméně neznamená, že všechny empirické potenciály jsou stejně vhodné. Porovnání s *ab initio* vypočtenými daty umožňuje vyhodnotit vhodnost jednotlivých empirických potenciálů<sup>87,93</sup>.

V této práci byly vybrány některé deriváty elipticinu (viz tabulka 6) jako modelové sloučeniny pro studium a vyhodnocení účinnosti jednoduchých empirických potenciálů.

**Tabulka 6.** Vybrané deriváty elipticinu.

| sloučenina | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  |
|------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 9HNME+     | OH              | H              | CH <sub>3</sub> |
| 9HE        | OH              | H              | -               |
| 7HE        | H               | OH             | -               |
| E+         | H               | H              | H               |
| 9AE+       | NH <sub>2</sub> | H              | H               |



V biologické realitě je více faktorů, které zásadně ovlivňují stabilitu komplexů DNA s léčivou (struktura léčiva, charakteristika rozpouštědla a deformabilita DNA vláken)<sup>94</sup>. V této práci byly všechny výpočty prováděny v plynné fázi, takže všechny příspěvky kromě struktury interkalátoru jsou zanedbávány. Věříme, že tento přístup nesnižuje věrohodnost srovnání různých empirických potenciálů.

## 4.2. POUŽITÉ METODY VÝPOČTŮ

### 4.2.1. GEOMETRIE

Struktury a geometrie různých derivátů elipticinu a párů bází adenin-thymin a guanin-cytosin (uspořádaných podle Watsona a Cricka) byly optimalizovány pomocí metody DFT za použití B3LYP funkcionálu s bází 6-31G\*. Struktura páru guanin-cytosin byla optimalizována s předpokladem jeho planarity.

### 4.2.2. *AB INITIO* INTERAKČNÍ ENERGIE

Derivát elipticinu a pár bází byly umístěny v koplanárních „rovinách“ (dané molekuly jsou téměř rovinné) takovým způsobem, že hlavní osy byly paralelní. Vertikální vzdálenost mezi interkalátorem a párem bází byla měněna a energie byla počítána metodou MP2 s bází 6-31G\* s modifikovanými exponenty polarizačních funkcí (0,25 místo běžně používaných 0,8, zkratka 6-31G\*(0,25)). Tato báze je považována za nejvhodnější pro systémy se „stacking“ interakcemi<sup>87,88,95</sup>. Interakční energie byla počítána jako rozdíl mezi energií celého systému a součtu energií subsystémů (interkalátor a pár bází). Tato interakční energie je energie nutná



k separaci interkalátoru a páru bází na nekonečnou vzdálenost. Již dříve bylo v literatuře<sup>87</sup> ukázáno, že jedna molekula interkalátoru a jeden pár bází je dostačující jednoduchý model interkalace.

#### 4.2.3. INTERAKČNÍ ENERGIE Z EMPIRICKÝCH POTENCIÁLŮ

V této práci byly používány tři empirické potenciály. Ve všech třech byla elektrostatická energie počítána podle Coulombova zákona:

$$E_{elst} = 332 \sum q_i q_j / r_{ij}$$

kde  $q_i$  a  $q_j$  jsou náboje atomů a  $r_{ij}$  je vzdálenost mezi atomy  $i$  a  $j$ . Bodové náboje byly umístěny ve středech atomů a byly odvozeny z molekulového elektrostatického potenciálu (ESP)<sup>96</sup> na úrovni HF/6-31G\*, B3LYP/6-31G\* a MP2/6-31G\*(0,25) a z omezeného elektrostatického potenciálu (RESP)<sup>97</sup> na stejných úrovních. Metoda ESP funguje tak, že se z vlnové funkce získané *ab initio* výpočtem odvodí elektrostatický potenciál na několika místech kolem každého atomu molekuly a potom se navrhnou takové bodové parciální náboje, které nejlépe reprodukuje dané elektrostatické potenciály. RESP je modifikace původní metody ESP a v současnosti je nejpoužívanější metodou pro získání bodových nábojů pro molekulové modelování biomolekul (proteinů a DNA).

Ve dvou použitých empirických potenciálech byla van der Waalsova energie počítána pomocí Lennard-Jonesova potenciálu:

$$E_{vdW} = \sum A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6$$

kde  $A_{ij}$  a  $B_{ij}$  jsou empirické van der Waalsovy konstanty. V této práci byly pro výpočet  $A_{ij}$  a  $B_{ij}$  použity parametry silového pole ff86<sup>98</sup> a novějšího ff99<sup>99,100</sup> (empirický potenciál A-ff86 a A-ff99) z programu pro molekulové modelování AMBER. V případě třetího empirického potenciálu (LH) byla van der Waalsova energie počítána pomocí 9-6 Lifson-Haglerova potenciálu:

$$E_{vdW} = \sum A_{ij}/r_{ij}^9 - B_{ij}/r_{ij}^6$$

a van der Waalsovy energie byly násobeny faktorem 0,7. Dříve bylo ukázáno<sup>101</sup>, že tento potenciál je vhodný pro výpočet interakčních energií mezi DNA bázemi.

#### 4.2.4. HLEDÁNÍ GLOBÁLNÍHO MINIMA

V *ab initio* výpočtech i ve výpočtech pro srovnání empirických potenciálů byla vzdálenost mezi interkalátorem a párem bází měněna pouze v jedné dimenzi. Tento přístup nemůže být použit při hledání globálního energetického minima, protože molekuly se mohou pohybovat ve třech dimenzích a mohou se různě natáčet. Proto jsme napsali makro v programu Microsoft Excel, které vyhledává minima. Toto makro mění pozici a orientaci páru bází v blízkém okolí interkalátoru a počítá interakční energii pomocí zvoleného empirického potenciálu a dále počítá analytickou derivaci této energie vzhledem k poloze (osy  $x$ ,  $y$  a  $z$ ) a vzhledem k úhlu pootočení (úhel pootočení je definován jako úhel mezi hlavními osami subsystémů). Potom je poloha páru bází měněna takovým způsobem, aby se minimalizovala interakční energie. Tímto způsobem je postupně prozkoumán celý prostor v okolí interkalátoru. Tento přístup zaručuje nalezení globálního minima interakční energie.

### 4.3. VÝSLEDKY

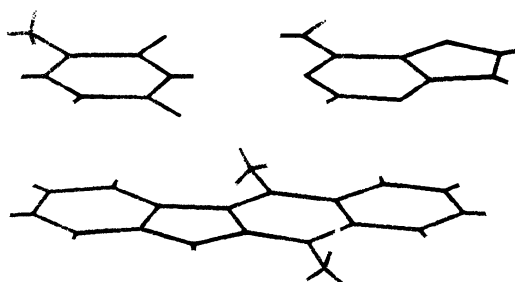
#### 4.3.1. VLASTNOSTI SUBSYSTÉMŮ

Optimalizované geometrie, energie hraničních orbitalů, ESP a RESP náboje (počítané z různých vlnových funkcí), typy atomů (z hlediska programu AMBER) a dipólové momenty pěti vybraných derivátů elipticinu a párů adenin-thymin a guanin-cytosin jsou uvedeny v příloze 8.2. v tabulkách P8 – P14.

#### 4.3.2. *AB INITIO* INTERAKČNÍ ENERGIE

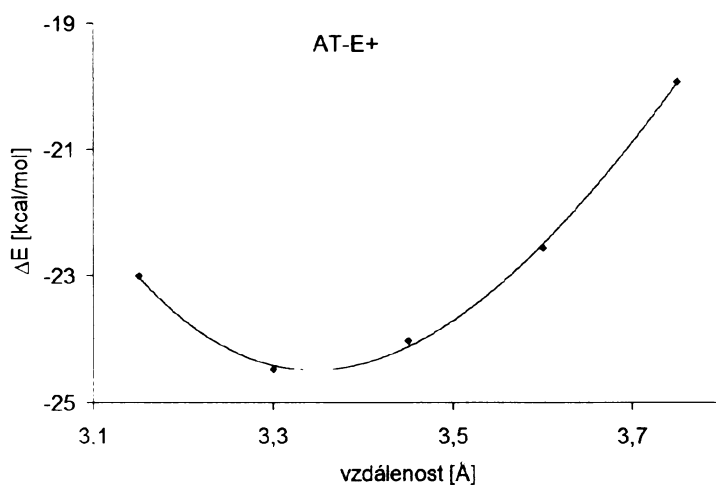
##### 4.3.2.1. SYSTÉM AT-E+

Systém adenin-thymin-E+ (AT-E+) byl studován nejdůkladněji a bude diskutován podrobněji. Struktura systému AT-E+ je zobrazena na obrázku 1.



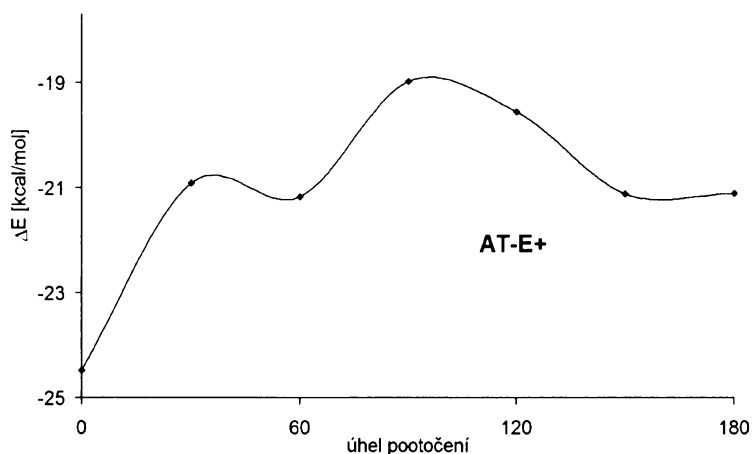
Obr. 1. Struktura komplexu AT-E+

Vzdálenost mezi elipticinem a párem adenin-thymin byla zvyšována od 3,15 do 3,75 Å (s krokem 0,15 Å). Na obrázku 2 je znázorněna závislost interakční energie na vzdálenosti mezi elipticinem a párem bází. Interakční energie má minimum u 3,33 Å, což je typická vzdálenost mezi interkalátory a páry bází<sup>87</sup> a také mezi jednotlivými páry bází v DNA.



Obr. 2. Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+ počítaná *ab initio* (MP2(0.25)).

U systému AT-E+ byla také studována závislost interakční energie na úhlu pootočení. Úhel pootočení (definovaný jako úhel mezi hlavními osami subsystemů) byl měněn od 0 do 180 stupňů s krokem 30°, vzdálenost mezi interkalátorem a párem bází byla konstantní (3,3 Å). Na obrázku 3 je znázorněna závislost interakční energie (vypočtené *ab initio*) na úhlu pootočení.



**Obr. 3.** Závislost interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+ na úhlu pootočení.

Bylo také zajímavé vyhodnotit aditivitu jednotlivých energetických komponent, to znamená odpovědět na otázku, jestli je možné počítat interakční energii systému interkalátor – pár bází jako součet dvou interakčních energií interkalátor – jedna báze. Vyhodnocení tzv. „many body term“ je důležité pro výpočet interakční energie větších systémů. V tabulce 7 jsou uvedeny vypočtené energie systémů thymin-E+, adenin-E+ a porovnány s energií systému adenin-thymin-E+. Z tabulky je vidět, že „many body term“ je poměrně malý, pohybuje se kolem 0,3 kcal/mol, což je asi 1,5 % celkové interakční energie systému AT-E+.

**Tabulka 7.** Interakční energie ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) komplexů thymin-E+, adenin-E+ a adenin-thymin-E+ a tzv. „many body term“  $\Delta_{\Delta E}$ .

| Vzdálenost [ $\text{\AA}$ ] | $\Delta E_{\text{T-E+}}$ | $\Delta E_{\text{A-E+}}$ | $\Delta E_{\text{AT-E+}}$ | $\Delta_{\Delta E}$ |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| 3.15                        | -9,61                    | -13,72                   | -23,00                    | 0,33                |
| 3.30                        | -10,58                   | -14,19                   | -24,48                    | 0,29                |
| 3.45                        | -10,49                   | -13,59                   | -23,82                    | 0,27                |

#### 4.3.2.2. DALŠÍ SYSTÉMY

Pro ostatní deriváty elipticinu a páry bází byla interakční energie počítána pouze pro tři vzdálenosti (3,15, 3,30 a 3,45  $\text{\AA}$ ) a tyto body byly proloženy parabolou. Vzdálenosti v minimu interakční energie jsou prezentovány v tabulce 8. Tyto vzdálenosti v minimu interakční energie jsou vždy blízké 3,35  $\text{\AA}$ , ale absolutní velikost interakční energie v minimu je velmi závislá na struktuře interkalátoru.

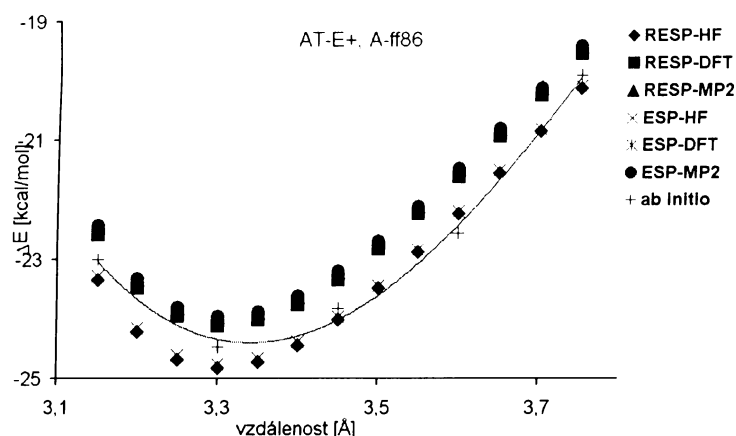
**Tabulka 8.** Vzdálenost v minimu interakční energie a interakční energie v minimu u komplexů interkalátor – pár bází.

| Komplex   | Náboj | $d_{\min}$ [Å] | $E_{\text{int}}$ [kcal/mol] |
|-----------|-------|----------------|-----------------------------|
| AT-E+     | 1     | 3,33           | -24,52                      |
| AT-9HE    | 0     | 3,36           | -18,38                      |
| AT-7HE    | 0     | 3,37           | -17,73                      |
| AT-9HNME+ | 1     | 3,36           | -24,61                      |
| GC-E+     | 1     | 3,35           | -21,82                      |
| GC-9HE    | 0     | 3,36           | -18,63                      |
| GC-9AE+   | 1     | 3,34           | -26,82                      |

### 4.3.3. POROVNÁNÍ *AB INITIO* VÝPOČTŮ S EMPIRICKÝMI POTENCIÁLY

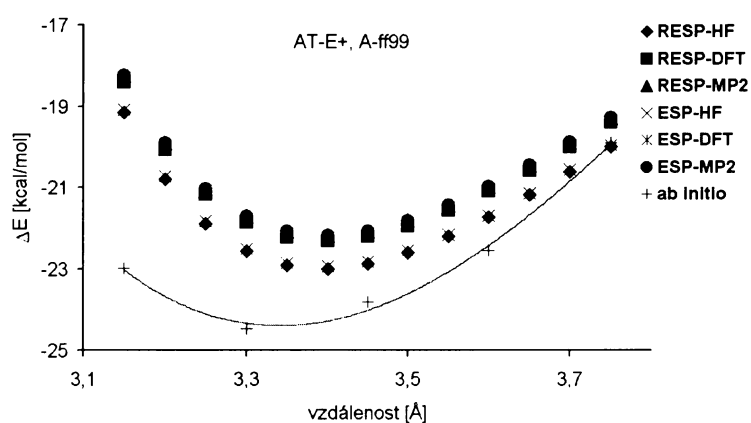
#### 4.3.3.1. SYSTÉM AT-E+

Na obrázku 4 je znázorněna závislost interakční energie na vzdálenosti elipticinu a páru bází vypočtená pomocí empirického potenciálu A-ff86 s různými sadami atomových nábojů, v tomtéž obrázku je znázorněna i referenční křivka získaná *ab initio* výpočty. Z obrázku je zřejmé, že rozdíl mezi body spočtenými pomocí ESP a RESP nábojů (odvozenými ze stejné vlnové funkce) jsou zanedbatelné. Dále je vidět, že se od sebe téměř neliší interakční energie vypočtené pomocí nábojů odvozených z DFT a MP2 vlnových funkcí. V celém rozsahu vzdáleností je souhlas *ab initio* křivky se všemi křivkami A-ff86 velmi dobrý, rozdíly energie jsou vždy menší než  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

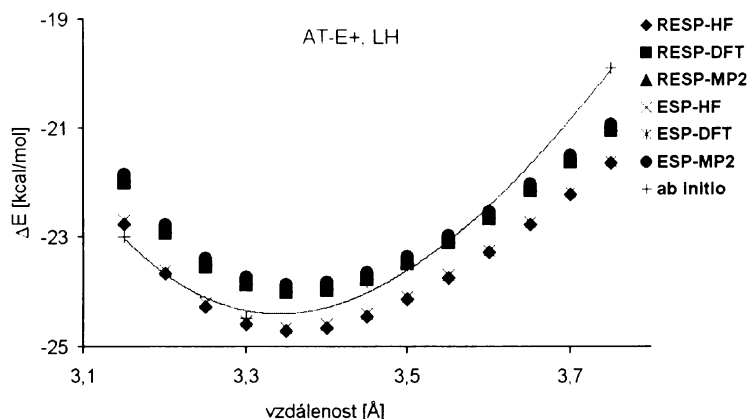


**Obr. 4.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+spočítané *ab initio* MP2 metodou a empirickým potenciálem A-ff86 s různými atomovými náboji.

Interakční energie získané s pomocí silových polí A-ff99 a LH spolu s referenčními *ab initio* daty jsou uvedeny na obrázcích 5 a 6. Opět je vidět, že rozdíly mezi body získanými pomocí ESP a RESP nábojů (odvozených od stejné vlnové funkce) jsou zanedbatelné, a také že rozdíly mezi energiemi vypočítanými pomocí nábojů odvozených od vlnových funkcí DFT a MP2 jsou velmi malé. Souhlas s *ab initio* energiemi je poměrně špatný, zvláště pro krátké vzdálenosti (rozdíl energií pro 3,15 Å je téměř 5 kcal mol<sup>-1</sup>). Naproti tomu souhlas energií vypočítaných pomocí silového pole LH s *ab initio* daty je velmi dobrý.

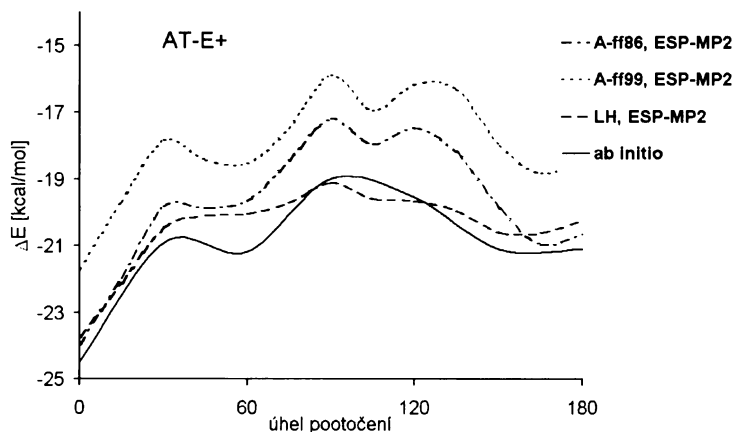


**Obr. 5.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+spočítané *ab initio* MP2 metodou a empirickým potenciálem A-ff99 s různými atomovými náboji.



**Obr. 6.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+ spočítané *ab initio* MP2 metodou a empirickým potenciálem LH s různými atomovými náboji.

Porovnání vybraných empirických potenciálů s *ab initio* daty pro systém AT-E+ s různým úhlem pootočení je na obrázku 7. V tomto případě největší shodu vykazuje empirický potenciál LH.

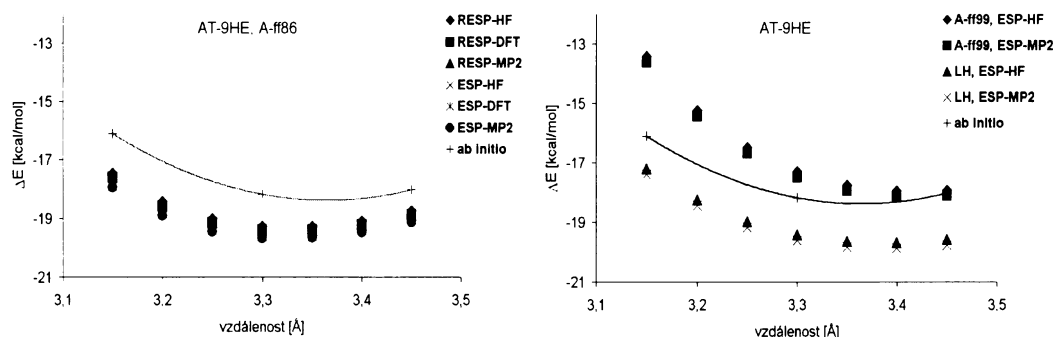


**Obr. 7.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu AT-E+ s různým úhlem pootočení spočítané *ab initio* MP2 metodou a třemi empirickými potenciály.

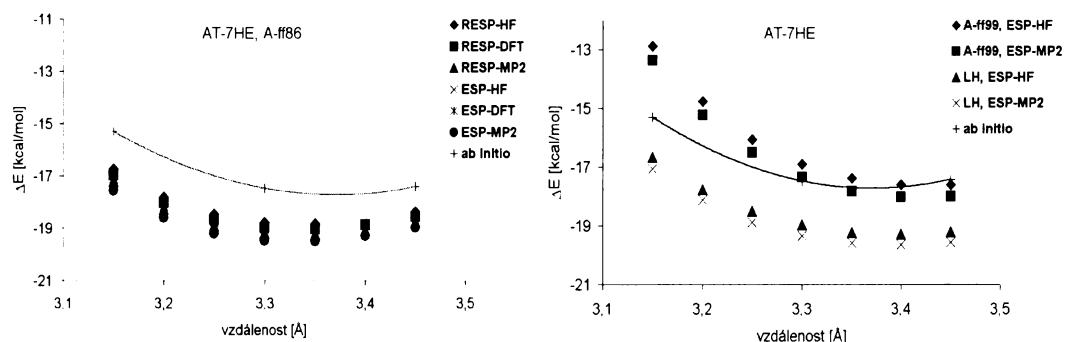
#### 4.3.3.2. DALŠÍ SYSTÉMY

Na obrázcích 8 - 13 jsou znázorněny interakční energie spočtené *ab initio* a empirickými potenciály pro další komplexy interkalátor – pár bází. Pro všechny tyto komplexy platí stejné závěry jako pro systém AT-E+. Rozdíly mezi použitím ESP a RESP nábojů (odvozených ze stejné vlnové funkce) jsou zanedbatelné a rozdíly mezi energiemi vypočítanými pomocí nábojů odvozených z DFT a MP2 vlnových funkcí

jsou též velmi malé. Pro neutrální systémy (AT-9HE, AT-7HE, GC-9HE, obrázky 8, 9 a 13) je elektrostatický příspěvek menší než  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$  a proto jsou také rozdíly mezi použitím HF a MP2 nábojů minimální. Všeobecně lze říci, že empirický potenciál A-ff86 poskytoval nejlepší shodu s referenčními *ab initio* daty. Rozdíl mezi *ab initio* daty a A-ff86 (ESP-MP2) daty jsou vždy menší než  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , pouze pro komplexy AT-9HE a AT-7HE jsou rozdíly blízké  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Účinnost empirického potenciálu LH je také poměrně dobrá, nejhorší výsledky poskytoval empirický potenciál A-ff99, kde se energetické rozdíly pro  $3,15 \text{ \AA}$  pohybovaly mezi  $2 - 5,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

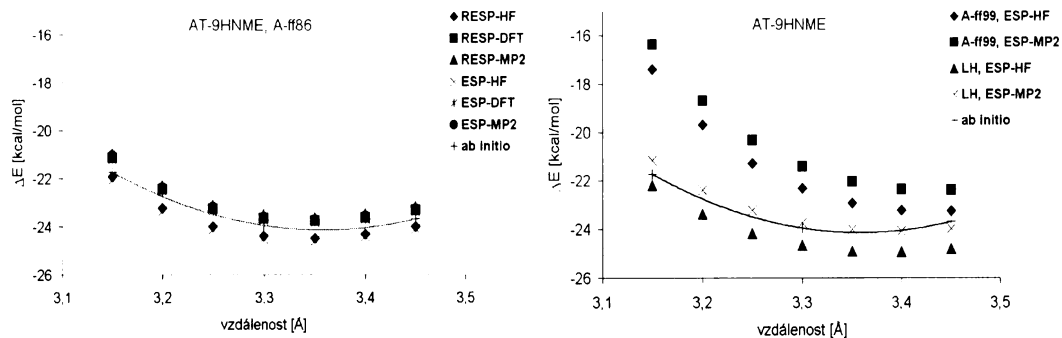


**Obr. 8.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu adenin-thymin-9HE vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.

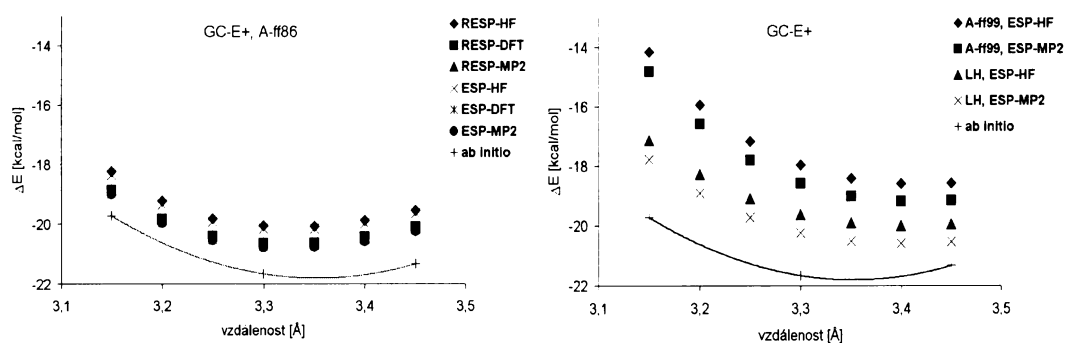


**Obr. 9.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu adenin-thymin-7HE vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.

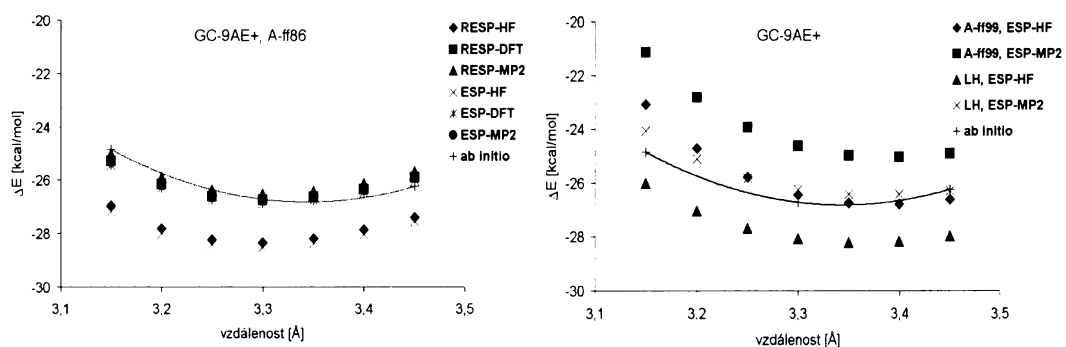




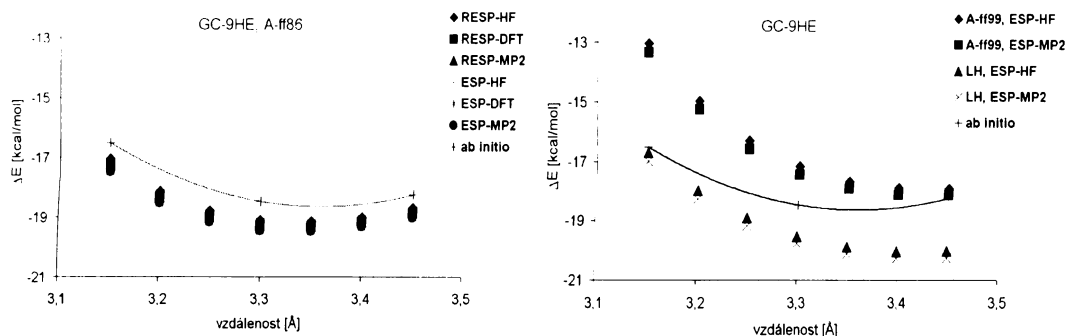
**Obr. 10.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu adenin-thymin-9HNME+ vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.



**Obr. 11.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu guanin-cytosin-E+ vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.



**Obr. 12.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu guanin-cytosin-9AE+ vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.



**Obr. 13.** Interakční energie ( $\Delta E$ ) komplexu guanin-cytosin-9HE vypočítané *ab initio* a pomocí empirických potenciálů A-ff86 (vlevo) a A-ff99 a LH (vpravo) s různými sadami nábojů.

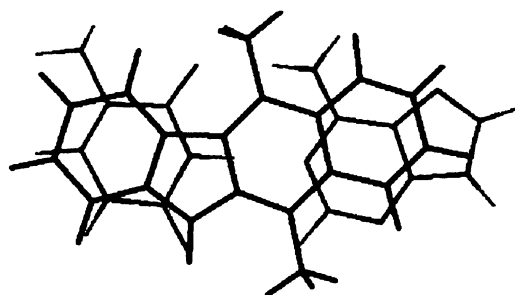
#### 4.3.4. HLEDÁNÍ GLOBÁLNÍHO MINIMA

Pro komplexy AT-E+, AT-9HNME+ a GC-9AE+ byly systematicky hledány geometrie odpovídající globálnímu minimu interakční energie způsobem, který byl popsán výše. Pro vyhledávání minim byl použit empirický potenciál A-ff86 a náboje ESP-MP2. Při systematickém hledání energetických minim bylo u každého komplexu nalezeno několik desítek lokálních minim. Tabulka 9 ukazuje počet všech nalezených minim a globální energetické minimum pro každý komplex. Na obrázcích 14 – 16 jsou znázorněny geometrie komplexů v globálním energetickém minimu nalezené tímto způsobem.

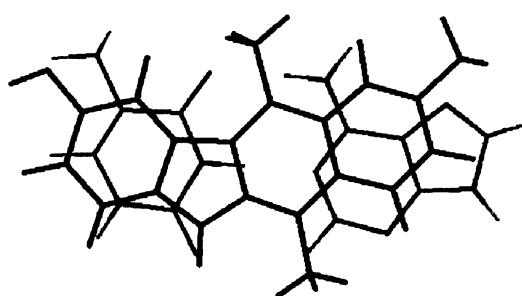
**Tabulka 9.** Výsledky hledání globálního minima<sup>a</sup>.

| Komplex   | Počet nalezených minim | Globalní $E_{\min}$ [kcal/mol] |
|-----------|------------------------|--------------------------------|
| AT-E+     | 32                     | -25,10                         |
| AT-9HNME+ | 56                     | -25,56                         |
| GC-9AE+   | 27                     | -27,17                         |

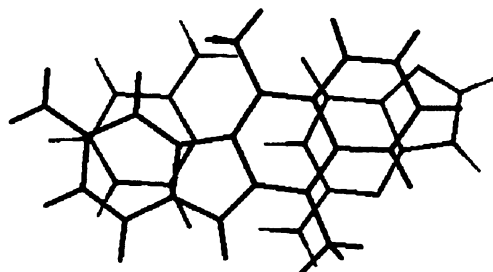
<sup>a</sup> Detaily v textu



**Obr. 14.** Geometrie odpovídající globálnímu energetickému minimu komplexu AT-E+.



**Obr. 15.** Geometrie odpovídající globálnímu energetickému minimu komplexu AT-9HNME+.



**Obr. 16.** Geometrie odpovídající globálnímu energetickému minimu komplexu GC-9AE+.

Pro tři zvolená minima každého komplexu byla interakční energie též přepočítána metodou *ab initio* a ostatními empirickými potenciály. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10. Pořadí velikostí interakčních energií zvolených minim je stejné pro všechny empirické potenciály, ale pořadí velikostí interakčních energií spočítaných *ab initio* je rozdílné. Například pro komplex AT-E+ má minimum číslo 6 (šesté v pořadí energií vypočtených pomocí empirického potenciálu A-ff86) nejnižší *ab initio* interakční energii. Hledání *ab initio* energetických minim je kvůli enormní výpočetní náročnosti prakticky zatím neproveditelné. V této práci bylo ale

ukázáno, že jednoduché empirické potenciály nejsou vhodné pro hledání geometrií odpovídajícím globálnímu minimu interakční energie komplexů interkalátor – báze DNA.

**Tabulka 10.** Interakční energie (kcal mol<sup>-1</sup>) v geometriích odpovídajících zvoleným minimům spočítané třemi empirickými potenciály a *ab initio*.

| Komplex                      | A-ff86,<br>ESP-MP2 | A-ff99,<br>ESP-MP2 | LH,<br>ESP-MP2 | <i>Ab initio</i> |
|------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AT-E+ min 1 <sup>a</sup>     | -25,10             | -22,82             | -24,70         | -25,89           |
| AT-E+ min 3                  | -24,36             | -22,09             | -23,72         | -25,28           |
| AT-E+ min 6                  | -23,69             | -21,36             | -23,03         | -25,92           |
| AT-9HNME+ min 1 <sup>a</sup> | -25,56             | -23,73             | -25,42         | -26,24           |
| AT-9HNME+ min 3              | -24,37             | -22,53             | -24,14         | -24,40           |
| AT-9HNME+ min 4              | -24,35             | -22,57             | -24,68         | -25,09           |
| GC-9AE+ min 1 <sup>a</sup>   | -27,17             | -25,08             | -26,85         | -28,44           |
| GC-9AE+ min 3                | -26,06             | -24,14             | -25,73         | -27,67           |
| GC-9AE+ min 6                | -25,51             | -23,43             | -24,99         | -28,00           |

<sup>a</sup> Min 1 je globální energetické minimum.

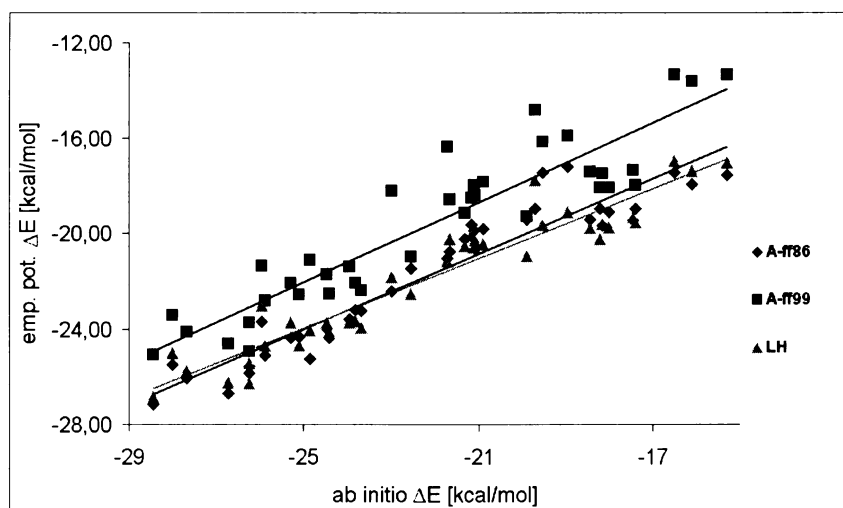
#### 4.3.5. ÚČINNOST JEDNOTLIVÝCH EMPIRICKÝCH POTENCIÁLŮ

Na obrázku 17 je znázorněna korelace mezi *ab initio* daty a daty jednotlivých empirických potenciálů (s ESP-MP2 náboji). Z obrázku je vidět, že potenciály A-ff86 a LH vykazují dobrou shodu s *ab initio* daty. V tabulce 11 jsou uvedeny maximální pozitivní a negativní odchylky, průměrné absolutní odchylky, směrnice a průsečíky s osou y pro empirické potenciály s náboji HF a MP2.

**Tabulka 11.** Účinnost empirických potenciálů.

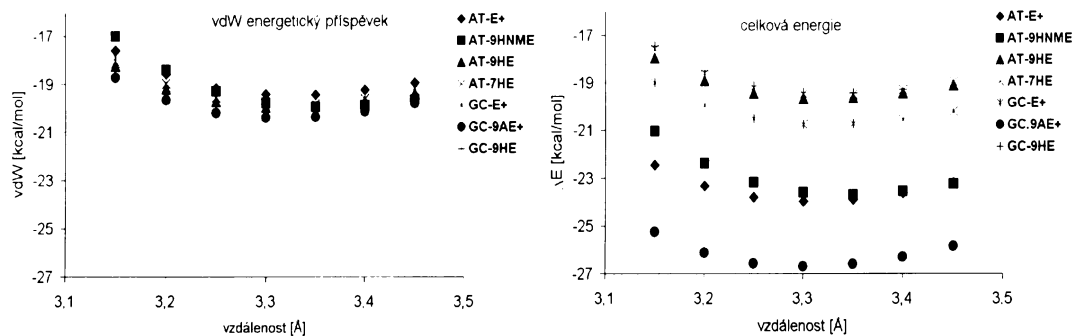
| Silové pole | Min. <sup>a</sup> | Max. <sup>b</sup> | Prům.<br>odchylka. <sup>c</sup> | směrnice | intercept | Korel.<br>koef. |
|-------------|-------------------|-------------------|---------------------------------|----------|-----------|-----------------|
| A-ff86, HF  | -2,34             | 1,97              | 1,02                            | 0,97     | -0,80     | 0,90            |
| A-ff86, MP2 | -2,27             | 2,49              | 1,06                            | 0,79     | -4,29     | 0,91            |
| A-ff99, HF  | -0,38             | 5,55              | 2,02                            | 1,02     | 2,37      | 0,86            |
| A-ff99, MP2 | -0,59             | 5,36              | 2,51                            | 0,84     | -1,12     | 0,84            |
| LH, HF      | -1,81             | 2,49              | 1,01                            | 0,90     | -2,45     | 0,90            |
| LH, MP2     | -2,14             | 3,01              | 1,07                            | 0,73     | -5,75     | 0,90            |

<sup>a</sup> Nejmenší negativní odchylka ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ), <sup>b</sup> největší pozitivní odchylka ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ), <sup>c</sup> průměrná absolutní odchylka ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )



**Obr. 17.** Lineární korelace energií získaných *ab initio* a pomocí empirických potenciálů. V empirických potenciálech byly použity náboje ESP-MP2.

Důležitost elektrostatického příspěvku je ilustrována na obrázku 18. Na obrázku 18 vlevo jsou znázorněny van der Waalovy příspěvky k interakční energii a vpravo jsou znázorněny celkové interakční energie spočtené pomocí potenciálu A-ff86 (ESP-MP2) pro všechny komplexy interkalátor – pár bází z této práce. Z obrázku je vidět, že van der Waalovy příspěvky (dispersní energie) jsou téměř totožné pro všechny komplexy, ale celkové interakční energie se od sebe značně liší (až  $8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) podle struktury interkalátoru. To znamená, že elektrostatický příspěvek má zásadní důležitost ve výpočtech interakční energie mezi interkalátory a DNA.



**Obr. 18.** Van der Waalsův příspěvek k interakční energii (vlevo) a celková interakční energie (vpravo) různých komplexů počítaná empirickým potenciálem A-ff86 (ESP-MP2).

#### 4.4. DISKUSE A ZÁVĚRY

Bylo ukázáno, že některé empirické potenciály jsou vhodné pro výpočet interakční energie mezi interkalátory a páry bází DNA a tedy i pro molekulárně dynamické výpočty, ale geometrii interkalace nejsou schopny empirické potenciály správně určit.

- Empirický potenciál A-ff86 reprodukoval *ab initio* interakční energie velmi dobře. Tento potenciál bere v úvahu pouze elektrostatické a dispersní příspěvky k interakční energii, to znamená, že příspěvek indukční energie a energie přenosu náboje je malý.
- Atomové náboje, získané metodou ESP odvozené z DFT vlnové funkce, poskytovaly téměř shodnou interakční energii jako náboje ESP-MP2.
- Použití RESP nábojů neovlivňuje velikost interakční energie oproti nábojům ESP.
- Empirický potenciál A-ff99 poskytoval horší výsledky než potenciál A-ff86. Může se zdát poněkud překvapivé, že starší parametry (ff86) jsou lepší než nové parametry (ff99), ale parametry ff99 jsou navrženy pro výpočty s explicitně vyjádřenými molekulami vody, kdežto parametry ff86 byly používány pro výpočty ve vakuu (stejně jako *ab initio* výpočty v této práci) a přítomnost rozpouštědla se simulovala dielektrickou konstantou závislou na vzdálenosti.
- Empirický potenciál LH reprodukoval *ab initio* data velmi dobře, obzvláště dobrou shodu poskytoval v případě komplexu AT-E+ s různým úhlem pootočení.
- Empirické potenciály použité v této práci se neukázaly jako vhodné pro hledání geometrií odpovídajícím globálnímu minimu interakční energie. Hyperplocha potenciální energie „stackovaných“ systémů je poměrně plochá<sup>89,101</sup> a energetické

rozdíly mezi jednotlivými minimy jsou malé, takže i malé chyby ve výpočtu interakční energie způsobují nalezení špatné geometrie odpovídající globálnímu minimu interakční energie.

## 5. NMR ČÁST

### 5.1. ÚVOD

Nukleární magnetická rezonance je metoda, která je stále častěji používána pro získávání strukturních informací o biomolekulách. Oproti rentgenostrukturní analýze má výhodu, že měření lze provádět v roztoku a za fyziologických podmínek. Pomocí NMR spektroskopie lze studovat i interakce biomolekul s různými ligandy. Dosud byly studovány například interakce DNA s distamycinem<sup>102</sup>, aktinomycinem<sup>103</sup>, proflavinem<sup>104</sup> a chromomycinem<sup>105</sup>.

V této práci byly studovány interakce elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s dvěma oktadeoxyribonukleotidy, konkrétně s oktanukleotidy CGCTAGCG a ATAGCTAT. Každý z oligonukleotidů je reverzně komplementární (první báze je komplementární s poslední, druhá s předposlední atd.), to znamená, že v roztoku daného oligonukleotidu může vznikat ze dvou molekul téhož oligonukleotidu dvoušroubovice komplementárních vláken. V jednom případě takto vzniká duplex bohatý na GC páry, v druhém případě duplex bohatý na AT páry. Délka oligonukleotidů (8 bází) byla zvolena jako kompromis tak, aby byly oligonukleotidy dostatečně velké na to, aby se v roztoku vytvářela stabilní dvoušroubovicová struktura, na druhé straně oligonukleotidy nemohou být příliš velké, aby byla NMR spektra ještě snadno interpretovatelná.

NMR studie oligonukleotidu CGCTAGCG a jeho interakce s elipticinem byly provedeny v neutrálním prostředí (pH = 7) a v mírně kyselém prostředí (pH = 5,7), kde je elipticin protonován na dusíku v poloze 2. Interakce oligonukleotidu CGCTAGCG s 9-hydroxyelipticinem a oligonukleotidu ATAGCTAT s elipticinem a 9-hydroxyelipticinem byly studovány pouze v kyselém prostředí (pH = 5,7).

### 5.2. NMR ANALÝZA SAMOTNÝCH OLIGONUKLEOTIDŮ

Prvním úkolem bylo provést přiřazení všech signálů vodíkových atomů oligonukleotidů. Oba použité oligonukleotidy obsahují v každé molekule kolem sta vodíkových atomů. Signály vodíkových atomů se v jednodimenzionálních spektrech často překrývají a navíc neexistuje nepřímá spin-spinová interakce mezi vodíky



jednotlivých nukleotidů ani mezi vodíky báze a deoxyribosového zbytku v rámci jednoho nukleotidu. Z těchto důvodů je pro přiřazení signálů nutné použít dvoudimenzionální NMR techniky, detegující jednak nepřímé spin-spinové interakce a jednak přímé dipólové interakce prostorově blízkých atomů.

### 5.2.1. POUŽITÉ DVOUDIMENZIONÁLNÍ NMR TECHNIKY

#### 2D-COSY (Correlation Spectroscopy)

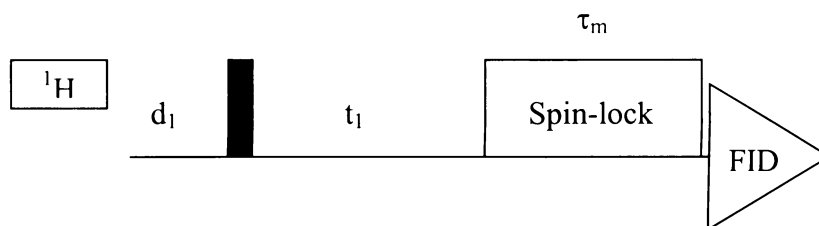
COSY experiment je prvním navrženým a nejjednodušším dvoudimenzionálním NMR experimentem. Krosníky v COSY spektrech představují korelaci mezi jádry s nepřímou spin-spinovou interakcí (kaplinkem). Nejčastější variantou tohoto experimentu je základní COSY-90 sekvence<sup>107</sup> (obr. 19). Pro měření biomolekul ve vodě se v COSY sekvenci používá dvoukvantový filtr (DQF-COSY). Singlet rozpouštědla (vody) nemůže produkovat dvoukvantové koherence a je dvoukvantovým filtrem eliminován. Dvoukvantový filtr je do sekvence zakomponován buď přidáním dalšího pulsu a vhodným cyklováním fází nebo použitím gradientových pulsů.



Obr. 19. Pulsní sekvence COSY-90 experimentu

#### 2D-TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)

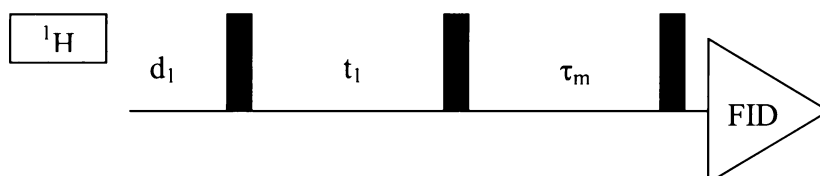
V oblastech překryvu mnoha vodíkových atomů usnadňuje interpretaci spektrum, které ukazuje všechny vodíky patřící k jednomu spinovému systému (například všechny vodíky jednoho deoxyribosového zbytku). Takové spektrum získáme pomocí sekvence označované jako TOCSY<sup>108</sup> experiment (obr. 20). Tato sekvence obsahuje ve směřovací periodě místo jednoduchého pulsu, který je v základní COSY sekvenci, sekvenční blok označovaný jako spin-lock.



Obr. 20. Pulsní sekvence TOCSY experimentu

### 2D-NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)

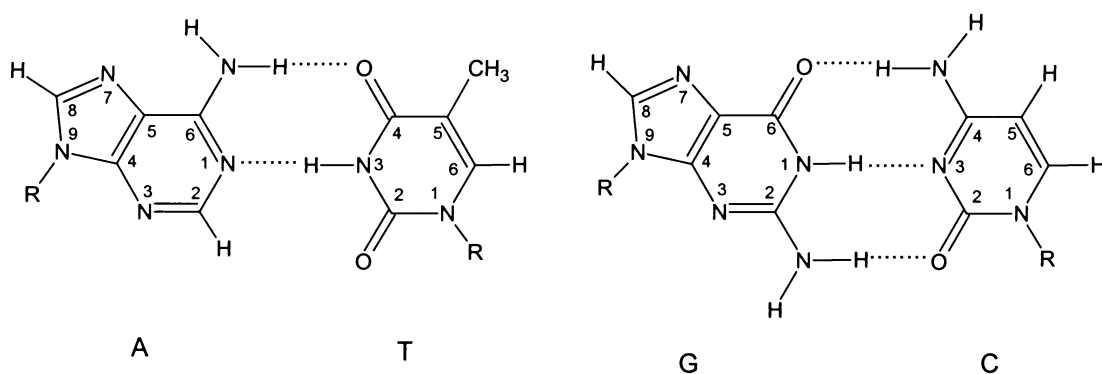
Měření nukleárního Overhauserova efektu (NOE) mezi vodíkovými atomy je pro přiřazování signálů a pro zjištění prostorového uspořádání oligonukleotidů velmi významné. Pro tento účel se nejčastěji používá tzv. NOESY sekvence (obr. 21), která umožňuje měřit NOE mezi všemi vodíky v molekule (i mezi molekulami) v jediném experimentu. Krosníky v NOESY spektru indikují přímé dipolární interakce a představují tedy korelace prostorově blízkých vodíků. Intenzita pozorovaného NOE však závisí na rychlosti pohybu molekul a jejich částí a NOE může být buď kladný (pro malé molekuly) nebo záporný (makromolekuly). NOE je blízký nule nejčastěji pro molekulové hmotnosti 750 – 2000<sup>106</sup>. Oligonukleotidy použité v této práci mají molekulovou hmotnost přibližně 2400, dvoušroubovice vzniklé z těchto oligonukleotidů mají molekulovou hmotnost 4800. V NOESY spektrech jsou tedy krosníky záporné (mají stejnou fázi jako diagonála). Důležitým parametrem NOESY sekvence je směšovací čas  $\tau_m$ . Při použití krátkého směšovacího času (100 ms) je intenzita krosníků nižší, ale takto získaná spektra lze kvantitativně vyhodnocovat (objem krosníků je nepřímo úměrný šesté mocnině vzdálenosti mezi interagujícími atomy). Při použití delšího směšovacího času (300 ms) je ve spektru lepší poměr signálu k šumu, ale ve spektru jsou kvůli spinové difuzi i krosníky mezi prostorově vzdálenějšími atomy a objem krosníků nelze kvantitativně jednoduše vyhodnocovat.



Obr. 21. Pulsní sekvence NOESY experimentu

### 5.2.2. NMR ANALÝZA OLIGONUKLEOTIDŮ CGCTAGCG A ATAGCTAT

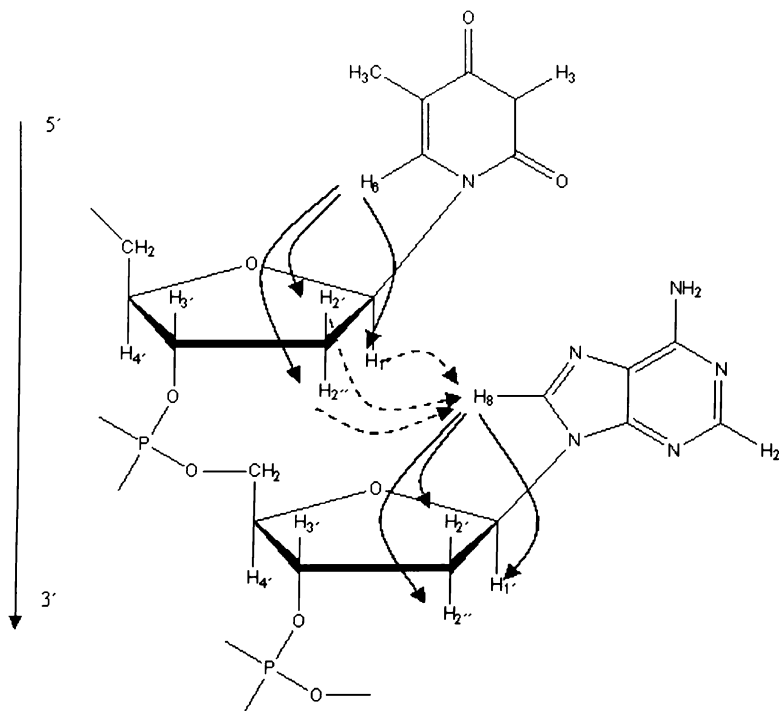
Vodíkové atomy v DNA se rozdělují na takzvané vyměnitelné (amino a imino vodíky, snadno se vyměňují s vodíky protického rozpouštědla) a nevyměnitelné (ostatní vodíky bází a deoxyribosových zbytků). Na obrázku 22 je znázorněna struktura dusíkatých DNA bází spolu s běžným číslováním a naznačenými vodíkovými vazbami, které se uplatňují ve dvojšroubovicovém uspořádání vláken DNA.



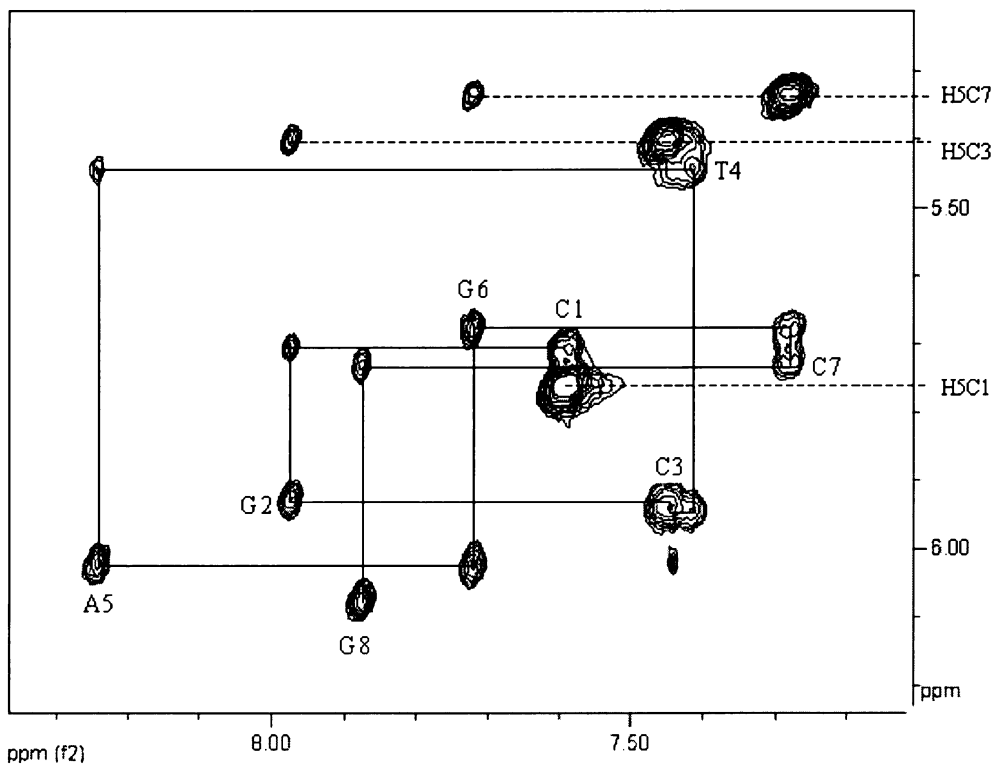
Obr. 22. Struktura DNA bází s číslováním a vodíkovými vazbami mezi bázemi.

**Nevyměnitelné vodíkové atomy:** Jejich přiřazení bylo provedeno pomocí dvoudimenzionálních DQF-COSY, TOCSY a NOESY spekter. Tato spektra byla měřena v  $^2\text{H}_2\text{O}$  fosfátovém pufru. DQF-COSY a TOCSY spektra umožňují přiřadit vodíky patřící jednotlivým deoxyribosovým zbytkům, ale neposkytují informaci o typu báze vázané k deoxyribose. Kompletní přiřazení signálů vodíků jednotlivých oligonukleotidů a informaci o sousedním oligonukleotidu lze získat z NOESY spekter. Aromatické vodíky dusíkatých bází (vodíky H8 adeninu a guaninu a vodíky H6 cytosinu a thyminu) jsou v prostorové blízkosti ( $2 - 3,5 \text{ \AA}$ ) vodíků H-1', H-2' a H-2'' deoxyribosového zbytku téhož nukleotidu a také deoxyribosového zbytku jednoho sousedního nukleotidu (nukleotidu bližšímu k 5' konci řetězce, viz obrázek 23). Například pro oligonukleotid CGCTAGCG lze očekávat, že v NOESY spektru budou mít všechny aromatické vodíky krospek se dvěma vodíky H1', pouze vodík H6 cytosinu C1 bude mít krospek pouze s jedním vodíkem H1' (H1'C1). Podobně by všechny aromatické vodíky měly mít krospek se čtyřmi vodíky z oblasti 1,8 – 3 ppm (oblast vodíků H-2' a H-2''), pouze vodík H6 cytosinu C1 bude mít krospek jen se dvěma vodíky z této oblasti (vodíky H2'C1 a H2''C1). Na obrázcích 24 a 25 jsou

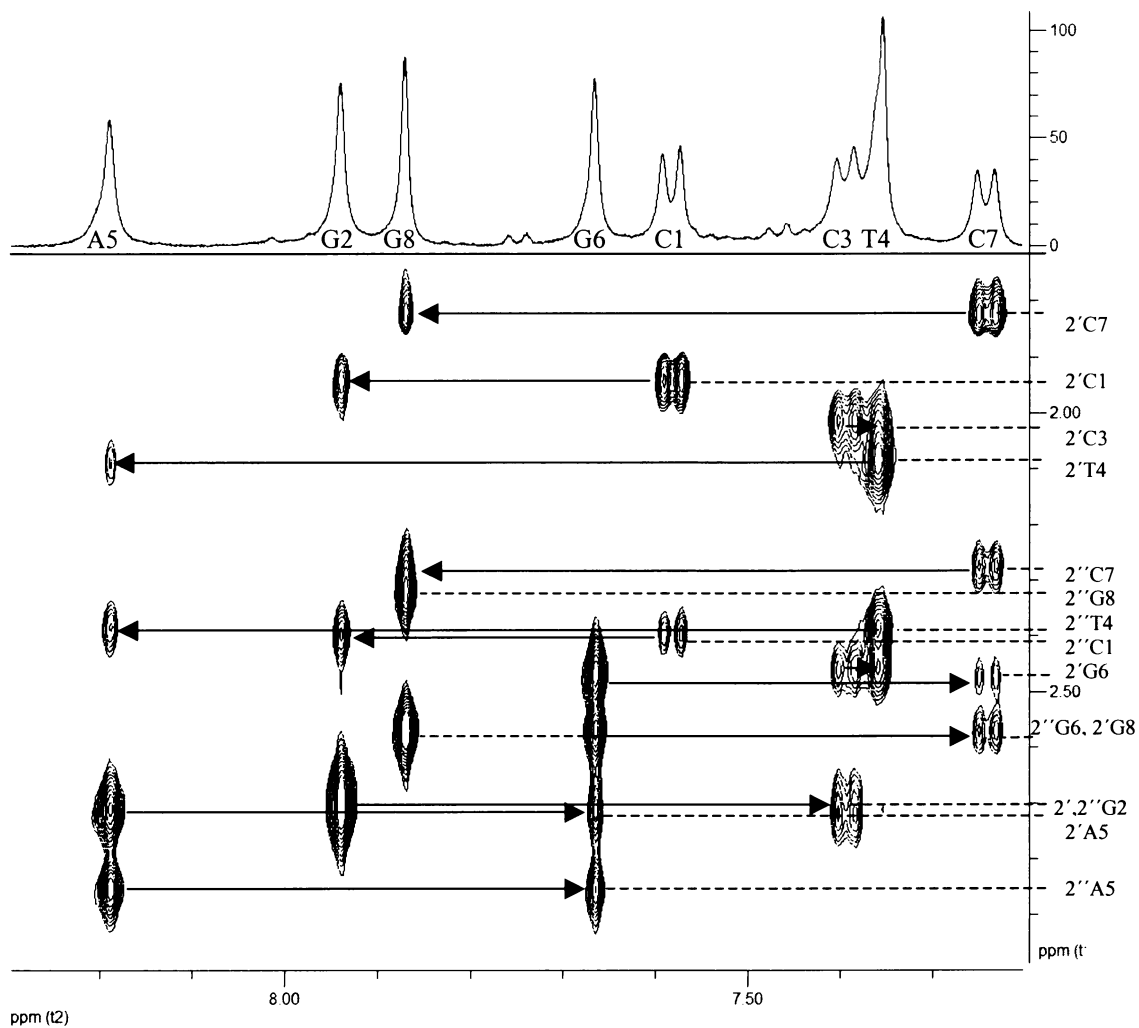
části NOESY spektra oligonukleotidu CGCTAGCG s naznačeným postupem přiřazení.



Obr. 23. Atomy H-2' a H-2'' v prostorové blízkosti vodíku H8 guaninu.



Obr. 24. Část NOESY spektra (oblast krosníků mezi atomy H6/H8 a atomy H1') oligonukleotidu CGCTAGCG při 25 °C a pH = 5,7.

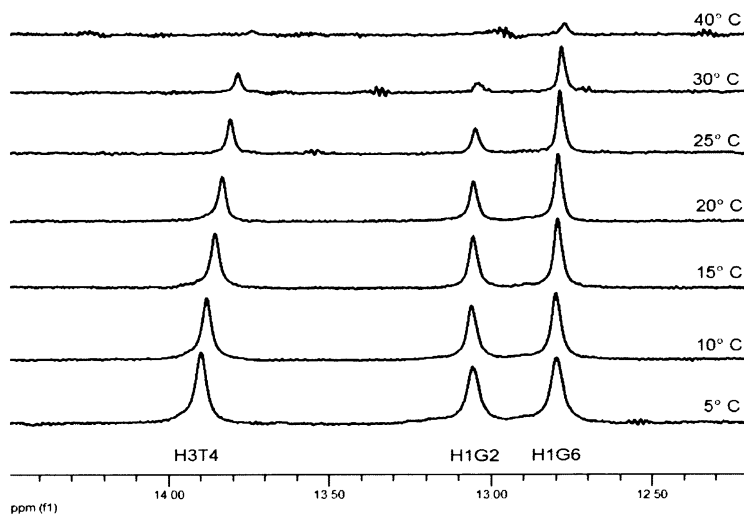


**Obr. 25.** Část NOESY spektra oligonukleotidu CGCTAGCG při 25 °C a pH = 7,0 s naznačeným postupem přiřazení (NOE krospekry mezi H-2', H-2'' a aromatickými vodíky bázi).

**Vyměnitelné protony:** Vyměnitelné protony se snadno vyměňují s protony rozpouštědla (vody) a proto nejsou pozorovatelné v  $^1\text{H}$  NMR spektru, pokud byl pro přípravu vzorku jako rozpouštědlo použit deuterium oxid ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ). NMR spektra byla proto také měřena ve směsi 90%  $\text{H}_2\text{O}$  a 10%  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Při použití  $\text{H}_2\text{O}$  jako rozpouštědla je její signál mnohem intenzivnější než signály zkoumané látky, proto je nutné potlačovat tento signál presaturací. Přiřazení vyměnitelných protonů bylo provedeno pomocí NOESY spekter a pomocí teplotního efektu na intenzity signálů. Snadno přístupné vodíky na krajích oligonukleotidů se rychle vyměňují s protony rozpouštědla a intenzita jejich signálů je nízká nebo nulová. Méně přístupné vodíky uprostřed oligonukleotidu se s protony rozpouštědla vyměňují pomaleji a intenzita jejich signálů je vyšší. Se zvyšující se teplotou roste rychlost výměny s protony rozpouštědla a intenzita signálů vyměnitelných vodíků klesá. Nejrychleji klesá intenzita signálů snadno přístupných vodíků<sup>109</sup>. Na obrázku 26 je zobrazena oblast 12

– 14 ppm (oblast imino vodíků) oligonukleotidu CGCTAGCG při různých teplotách. Samotná existence signálů imino vodíků v této oblasti svědčí o zapojení těchto vodíků do vodíkových vazeb mezi jednotlivými vlákny dvojšroubovicové struktury, je tedy důkazem tvorby duplexu daného oligonukleotidu. Rozdíly mezi chemickými posuny vodíků oligonukleotidu CGCTAGCG v kyselém a neutrálním prostředí jsou malé (většinou v řádu tisícín ppm).

Přiřazení signálů atomů vodíku oligonukleotidu CGCTAGCG je v tabulce 12 a oligonukleotidu ATAGCTAT v tabulce 13. Přiřazení signálů oligonukleotidu CGCTAGCG bylo již dříve publikováno<sup>110</sup>, literární údaje jsou v dobré shodě s NMR daty získanými v této práci.



**Obr. 26.** Teplotní závislost intenzity signálů vyměnitelných protonů oligonukleotidu CGCTAGCG.

**Tabulka 12.** Přiřazení signálů atomů vodíku oligonukleotidu CGCTAGCG v pufru pH = 7,0.

| Vodík             | C1   | G2    | C3   | T4    | A5   | G6    | C7   | G8   |
|-------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------|
| H2                | -    | -     | -    | -     | 7,35 | -     | -    | -    |
| H5                | 5,81 | -     | 5,34 | -     | -    | -     | 5,28 | -    |
| H6                | 7,58 | -     | 7,39 | 7,35  | -    | -     | 7,24 | -    |
| H8                | -    | 7,94  | -    | -     | 8,19 | 7,67  | -    | 7,87 |
| 5-CH <sub>3</sub> | -    | -     | -    | 1,64  | -    | -     | -    | -    |
| H1'               | 5,70 | 5,91  | 5,93 | 5,53  | 5,98 | 5,66  | 5,68 | 6,08 |
| H2'               | 1,94 | 2,67  | 2,01 | 2,08  | 2,71 | 2,46  | 1,82 | 2,57 |
| H2''              | 2,39 | 2,72  | 2,46 | 2,39  | 2,85 | 2,56  | 2,28 | 2,31 |
| H3'               | 4,67 | 4,95  | 4,72 | 4,82  | 5,00 | 4,91  | 4,74 | 4,62 |
| H4'               | 4,02 | 4,34  | 4,20 | 4,08  | 4,35 | 4,31  | 4,09 | 4,12 |
| H5'               | 3,69 | 3,98  | 4,20 | 4,03  | 4,02 | 4,15  | 4,14 | 4,01 |
| H5''              | 3,69 | 4,07  | 4,14 | 4,03  | 4,09 | 4,15  | 4,05 | 4,01 |
| H1                | -    | 12,99 | -    | -     | -    | 12,73 | -    | n    |
| H3                | -    | -     | -    | 13,75 | -    | -     | -    | -    |
| -NH <sup>a</sup>  | n    | n     | 8,23 | -     | n    | n     | 8,30 | n    |
| -NH               | n    | n     | 6,56 | -     | n    | n     | 6,45 | n    |

n – signál nenalezen, <sup>a</sup>-NH je aminovodík, který se účastní vodíkové vazby.

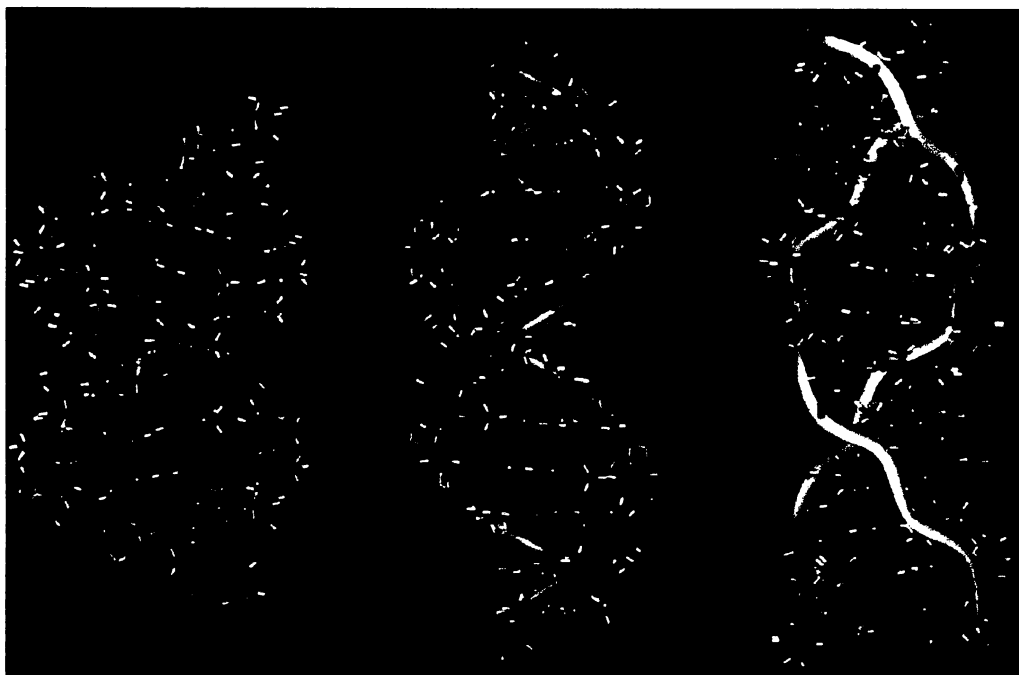
**Tabulka 13.** Přiřazení signálů atomů vodíku oligonukleotidu ATAGCTAT v pufru pH = 5,7.

| Vodík             | A1   | T2    | A3   | G4    | C5   | T6    | A7   | T8   |
|-------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------|
| H2                | 7,77 | -     | 7,44 | -     | -    | -     | 7,54 | -    |
| H5                | -    | -     | -    | -     | 5,18 | -     | -    | -    |
| H6                | -    | 7,32  | -    | -     | 7,34 | 7,36  | -    | 7,19 |
| H8                | 8,07 | -     | 8,19 | 7,67  | -    | -     | 8,28 | -    |
| 5-CH <sub>3</sub> | -    | 1,33  | -    | -     | -    | 1,62  | -    | 1,42 |
| H1'               | 6,09 | 5,53  | 6,06 | 5,76  | 5,84 | 5,74  | 6,27 | 6,06 |
| H2'               | 2,72 | 2,11  | 2,74 | 2,57  | 2,02 | 2,10  | 2,73 | 2,19 |
| H2''              | 2,77 | 2,39  | 2,81 | 2,61  | 2,47 | 2,48  | 2,88 | 2,21 |
| H3'               | 4,84 | 4,87  | 5,06 | 4,98  | 4,69 | 4,87  | 5,02 | 4,52 |
| H4'               | 4,22 | 4,17  | 4,43 | 4,35  | 4,21 | 4,17  | 4,41 | 4,03 |
| H5' <sup>a</sup>  | 3,72 | 4,02  | 3,98 | 4,16  | 4,00 | n     | 4,03 | 4,08 |
| H5'' <sup>a</sup> | 3,72 | 4,04  | 4,12 | n     | 4,09 | n     | 4,10 | 4,08 |
| H1                | -    | -     | -    | 12,76 | -    | -     | -    | -    |
| H3                | -    | 13,55 | -    | -     | -    | 13,71 | -    | n    |

n – signál nenalezen, <sup>a</sup>vodíky H5' a H5'' se nepodařilo rozlišit a jejich přiřazení proto může být zaměněno

### 5.2.2.1. ROZBOR STRUKTURY OLIGONUKLEOTIDŮ

DNA se v roztoku může vyskytovat ve třech základních konformacích (A-DNA, B-DNA a Z-DNA, viz obrázek 27). Jednotlivé formy se liší směrem otáčení (Z-DNA je levotočivá, A- a B-DNA jsou pravotočivé), počtem bází na jeden závit šroubovice, vzdáleností mezi bázemi, velikostí malého a velkého žlábků a dalšími prostorovými vlastnostmi. Za fyziologických podmínek se DNA vyskytuje obvykle ve formě B (nízká koncentrace solí a vysoký stupeň hydratace). Rozhodnout, v jaké konformaci se daný vzorek DNA nachází, umožňují NOESY spektra<sup>111</sup>. Pro každou konformaci existují typické vzdálenosti mezi atomy ze dvou sekvencně sousedních nukleotidů (například vzdálenost aromatických vodíků bází od vodíků 2' a 2'' se výrazně liší u konformací A-DNA a B-DNA, viz tabulka 14). V případě obou oligonukleotidů zkoumaných v této práci bylo pomocí NOESY spekter potvrzeno, že se v roztoku vyskytují v B-DNA konformaci.



**Obr. 27.** Tři základní konformace DNA: A-DNA (vlevo), B-DNA (uprostřed) a Z-DNA (vpravo).



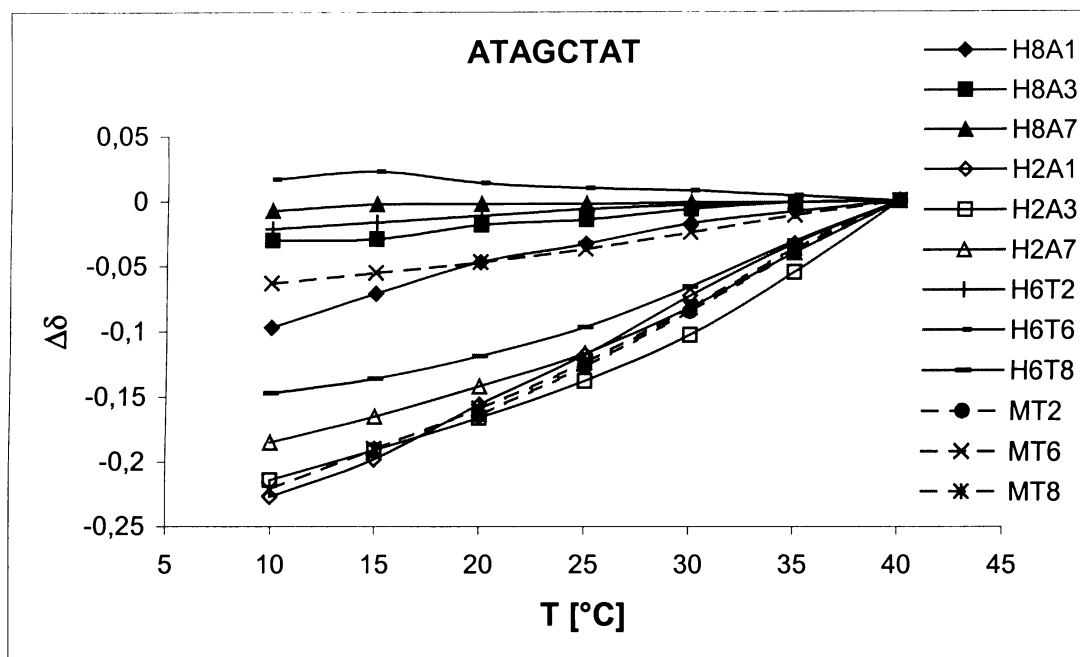
**Tabulka 14.** Krátké sekvenční vzdálenosti mezi protony ve třech standardních DNA konformacích.

| Vzdálenost <sup>a</sup> | A-DNA | B-DNA | Z-DNA |
|-------------------------|-------|-------|-------|
| 1'; 2'                  | 7,3   | 4,1   | 7,0   |
| 2'; 1'                  | 4,6   | 7,2   | >8    |
| 2'; 3'                  | 3,9   | 6,9   | 7,6   |
| 2'; 5''                 | 3,8   | 4,5   | 5,0   |
| 2''; 2'                 | 6,1   | 3,8   | >8    |
| 2''; 5''                | 3,3   | 3,4   | 5,0   |
| 1'; 8                   | 4,0   | 2,8   | 6,4   |
| 2'; 8                   | 1,7   | 3,7   | 3,7   |
| 2''; 8                  | 3,3   | 2,3   | 4,9   |
| 3'; M                   | 3,2   | 5,0   | -     |
| 3'; 8                   | 3,4   | 4,9   | 3,8   |

<sup>a</sup>V popisu vzdáleností je na prvním místě vodík z jednoho nukleotidu a na druhém místě vodík ze sekvenčně následujícího nukleotidu (ve směru 5' → 3'). Vzdálenost je uváděna v Angströmech. Údaje převzaty z lit.<sup>111</sup>. V tabulce jsou vybrány vzdálenosti, které se u jednotlivých konformací významněji liší.

### 5.2.2.2. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST CHEMICKÝCH POSUNŮ

Na obrázku 28 je znázorněna teplotní závislost chemických posunů aromatických vodíků a methylových vodíků thyminů oligonukleotidu ATAGCTAT. Z obrázku je vidět, že ve většině případů se chemický posun se zvyšující teplotou zvyšuje. To lze vysvětlit efektem kruhového proudu (magnetickou anizotropií) aromatických bází. Při nízké teplotě jsou oba nukleotidy více uspořádané, v roztoku se vyskytují převážně v dvojšroubovicové formě, jednotlivé báze jsou tedy paralelně nad sebou a jejich magnetická anizotropie způsobuje snížení chemických posunů vodíků sousedních bází. Při zvyšování teploty dochází k rozvolnění dvojšroubovicové struktury, jednotlivé báze setrvávají kratší dobu paralelně obklopené sousedními bázemi, tím pádem vliv magnetické anizotropie sousedních bází klesá a chemické posuny se zvyšují. Opačnou závislost vykazují signály vyměnitelných vodíků. Se zvyšující se teplotou se rychleji vyměňují s vodíky rozpouštědla, to způsobuje kromě úbytku jejich intenzity také jejich posun směrem k signálu vody (kolem 4,8 ppm). Podobná závislost chemických posunů na teplotě je pozorovatelná i oligonukleotidu CGCTAGCG.



**Obr. 28.** Změny chemických posunů aromatických a methylových vodíků oligonukleotidu ATAGCTAT s teplotou. Křivky jsou posunuty tak, aby se stýkaly při teplotě 40 °C v bodě 0.

### 5.3. NMR ANALÝZA INTERAKCÍ OLIGONUKLEOTIDŮ S ELIPTICINŮ

K roztokům oligonukleotidů byl postupně přidáván elipticin nebo 9-hydroxyelipticin. Derivát elipticinu byl rozpuštěn ve směsi methanolu a dimethylsulfoxidu (protože ve fosfátovém pufru použitým k NMR měření jsou elipticiny nerozpustné) a v jednom kroku bylo přidáno takové množství roztoku, které odpovídá molárnímu poměru 0,5 molekuly elipticinu na dvě molekuly oligonukleotidu (tedy na jednu dvojšroubovici). Výsledný roztok byl několikrát odpařen do sucha na SpeedVacu, aby byla odstraněna všechna rozpouštědla a odparek byl rozpuštěn ve vodě nebo deuteriumoxidu.

Přídavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu způsobuje výrazné změny v  $^1\text{H}$  NMR spektrech. Dochází ke značnému rozšíření linií, po přidání třetího nebo čtvrtého ekvivalentu elipticinu (dvě molekuly elipticinu na dvojšroubovici) jsou pološířky linií většinou větší než 30 Hz a spektrum přestává být interpretovatelné. Chemické posuny vodíků oligonukleotidu se mění a ve spektru se objevují nové linie odpovídající signálům přidaného derivátu elipticinu. Dále dochází ke změnám integrálních intenzit signálů vyměnitelných protonů (to znamená, že se mění jejich

přístupnost pro rozpouštědlo). V následujících kapitolách budou postupně probrány jednotlivé studované směsi oligonukleotidů s deriváty elipticinu.

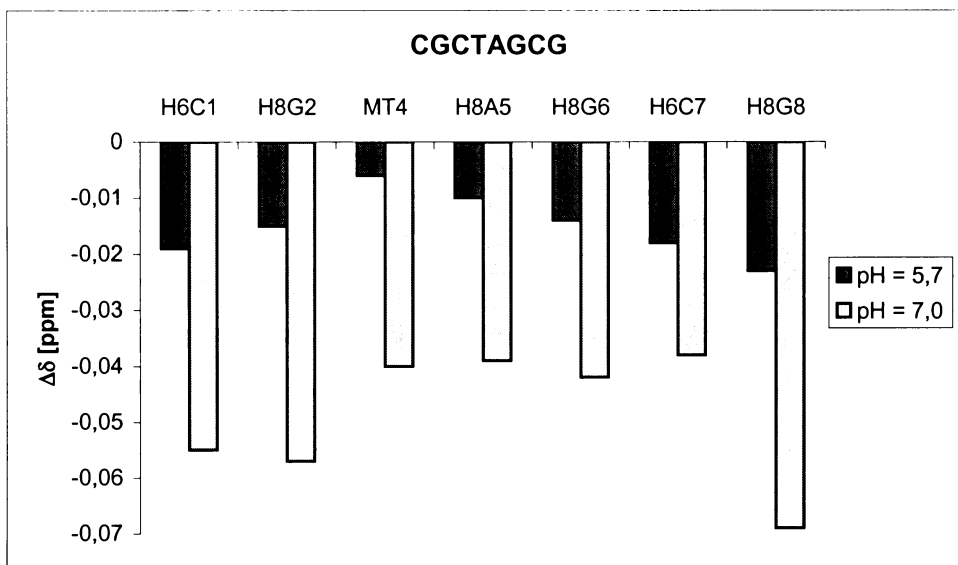
### 5.3.1. ZMĚNY CHEMICKÝCH POSUNŮ

Podrobněji byly sledovány zejména signály aromatických vodíků, vodíků methylů a vyměnitelných protonů. Přídavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu způsobuje většinou (kromě případů, které budou diskutovány dále) snížení hodnot chemických posunů. To je důkazem interkalace, protože interkalovaná molekula způsobuje svým efektem kruhového proudu větší snížení chemických posunů než způsobují okolní báze<sup>63</sup>.

Pokles chemických posunů po prvním přídavku elipticinu se pohybuje většinou mezi 0,01 – 0,07 ppm. Na obrázku 29 jsou zobrazeny změny chemických posunů aromatických a methylových vodíků oligonukleotidu CGCTAGCG po přidání první dávky elipticinu v neutrálním a v kyselém prostředí při teplotě 30 °C. U jednotlivých změn chemických posunů nelze vypozařovat závislost na poloze v oligonukleotidu, to je v souladu s předchozím zjištěním, že elipticin není sekvenčně specifický interkalátor<sup>63</sup>. Je ale jasně patrné, že v neutrálním prostředí dochází k většímu snížení chemických posunů po přídavku elipticinu než v prostředí kyselém. To znamená, že v neutrálním prostředí dochází k interkalaci ve větší míře než v kyselém prostředí, kde je elipticin protonován a zřejmě se váže na oligonukleotid i jiným způsobem než interkalací (například vazbou do velkého nebo malého žlábků duplexu). To je v souladu s dřívějším zjištěním, že nabitá molekula 9-hydroxy-2-methylelipticinu se také může na DNA vázat i jiným způsobem než interkalací.

Přídavek 9-hydroxyelipticinu k oligonukleotidu CGCTAGCG v kyselém prostředí způsobuje také pokles chemických posunů, tento pokles je ale o něco menší než v případě elipticinu. To opět znamená, že 9-hydroxyelipticin se může na daný oligonukleotid vázat i jiným způsobem než interkalací.

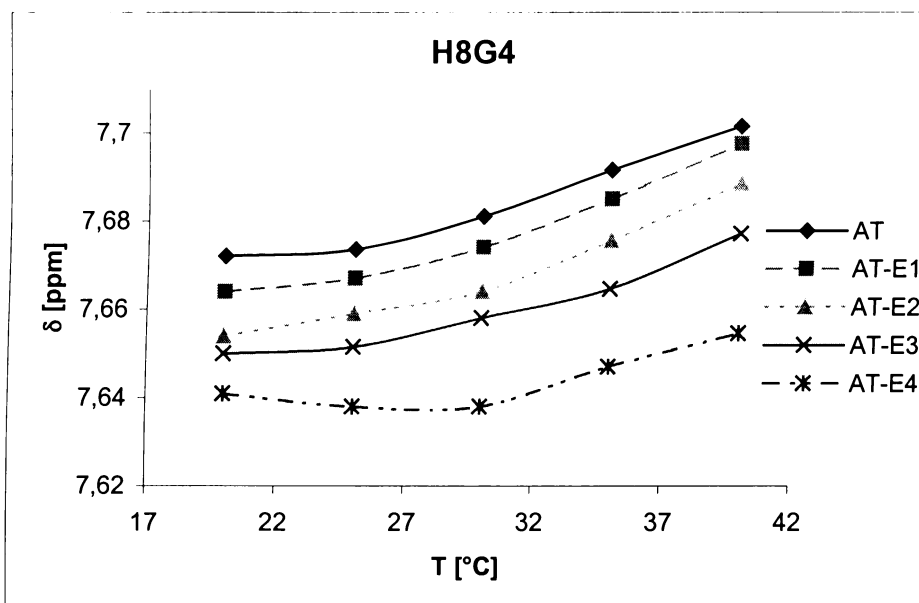
Přídavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu k oligonukleotidu ATAGCTAT v kyselém prostředí také u většiny signálů snižuje chemické posuny (opět elipticin způsobuje větší pokles než 9-hydroxyelipticin). Výjimkou jsou signály krajních nukleotidů (A1 a T8), u nichž přídavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu způsobuje zvýšení chemického posunu. Tento jev bude diskutován v příštím oddílu.



**Obr. 29.** Změny chemických posunů vodíků oligonukleotidu CGCTAGCG vyvolané přidáním elipticinu při pH = 5,7 a pH = 7,0.

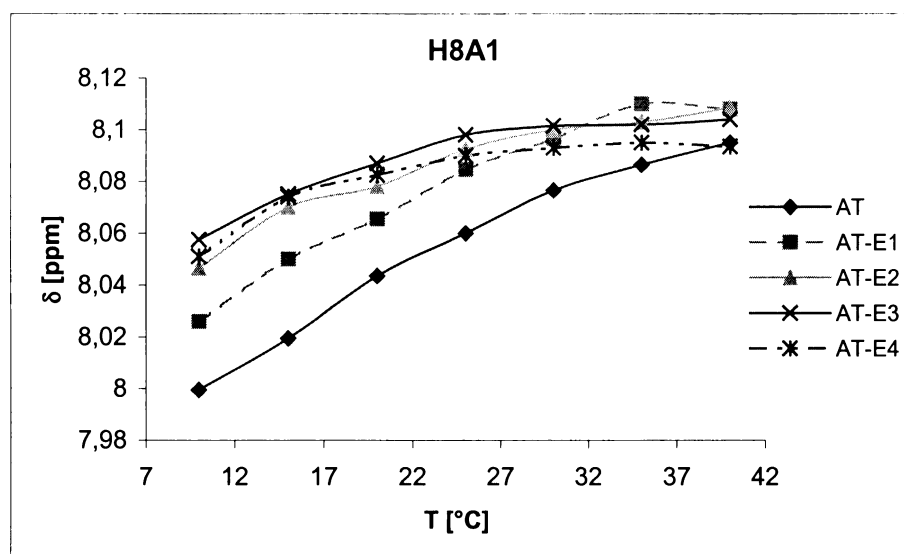
### 5.3.2. TEPLOTNÍ ZÁVISLOSTI ZMĚN CHEMICKÝCH POSUNŮ

Jak bylo již řečeno chemické posuny většiny signálů s rostoucí teplotou stoupají a přidavek elipticinu nebo 9-hydroxyelipticinu způsobuje snížení chemických posunů. Na obrázku 30 je zobrazena závislost chemického posunu signálu vodíku H8G4 oligonukleotidu ATAGCTAT na teplotě. Křivka AT představuje samotný oligonukleotid, křivka AT-E1 oligonukleotid s přidáním prvního množství elipticinu atd. Je vidět, že přidavek elipticinu způsobuje při dané teplotě snížení chemického posunu (způsobeno interkalací), celkový trend zvětšování chemického posunu s teplotou je ale zachován.



**Obr. 30.** Teplotní závislost chemických posunů signálu vodíku H8G4 oligonukleotidu ATAGCTAT a s přidavkem elipticinu. Poměr duplexu oligonukleotidu k elipticinu: 1:0 (AT), 1:0,5 (AT-E1), 1:1 (AT-E2), 1:1,5 (AT-E3), 1:2 (AT-E4).

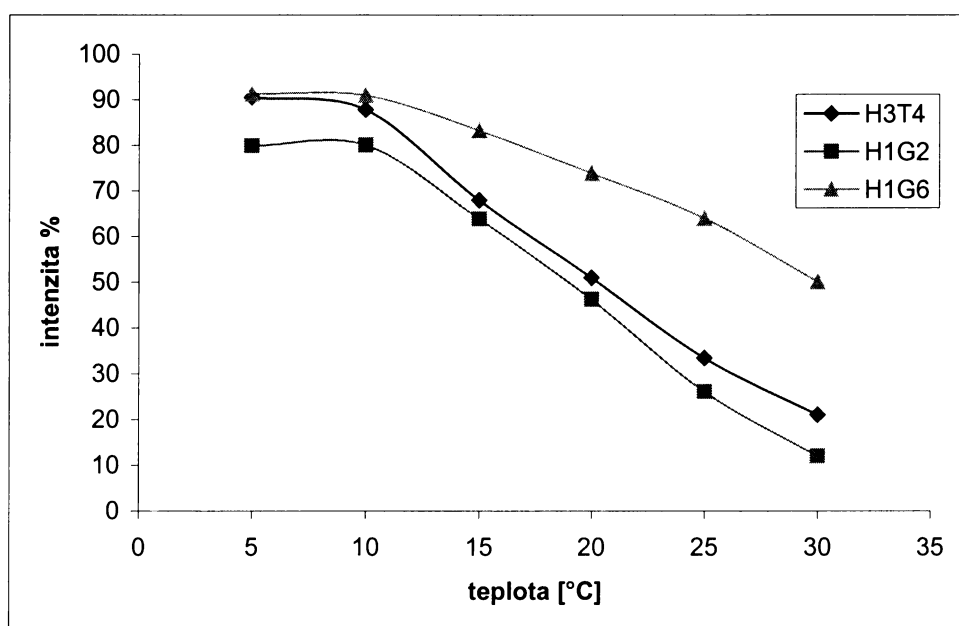
Teplotní závislost chemického posunu signálu vodíku H8A1 oligonukleotidu ATAGCTAT je uvedena na obrázku 31. U tohoto signálu a u signálů thyminu T8 vyvolává přidavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu zvýšení chemických posunů. Důvodem tohoto jevu by mohlo být, že derivát elipticinu způsobuje destabilizaci dvoušroubovicové struktury oligonukleotidu, jinými slovy, že snižuje teplotu tání daného oligonukleotidu. Rozvolnění dvoušroubovicové struktury má za následek oslabení vlivu magnetické anizotropie sousedních bází a tedy zvýšení chemického posunu. Podporou pro toto vysvětlení je i fakt, že chemický posun signálu vodíku H8A1 se se zvyšující teplotou blíží k mezní hodnotě (kolem 8,1 ppm), tato hodnota odpovídá chemickému posunu daného vodíku v jednovláknové struktuře, protože při 40 °C se oligonukleotid ATAGCTAT vyskytuje v roztoku převážně ve formě jednotlivých vláken a ne ve dvoušroubovici. Přidavek elipticinu způsobuje, že již při nižší teplotě se chemický posun signálu vodíku H8A1 blíží hodnotě odpovídající jednovláknové struktuře. Další potvrzení hypotézy o destabilizaci dvoušroubovicové struktury bylo provedeno pomocí rozboru intenzit signálů vyměnitelných vodíků.



**Obr. 31.** Teplotní závislost chemických posunů signálu vodíku H8A1 oligonukleotidu ATAGCTAT a s přidávkem elipticinu. Poměr duplexu oligonukleotidu k elipticinu: 1:0 (AT), 1:0,5 (AT-E1), 1:1 (AT-E2), 1:1,5 (AT-E3), 1:2 (AT-E4).

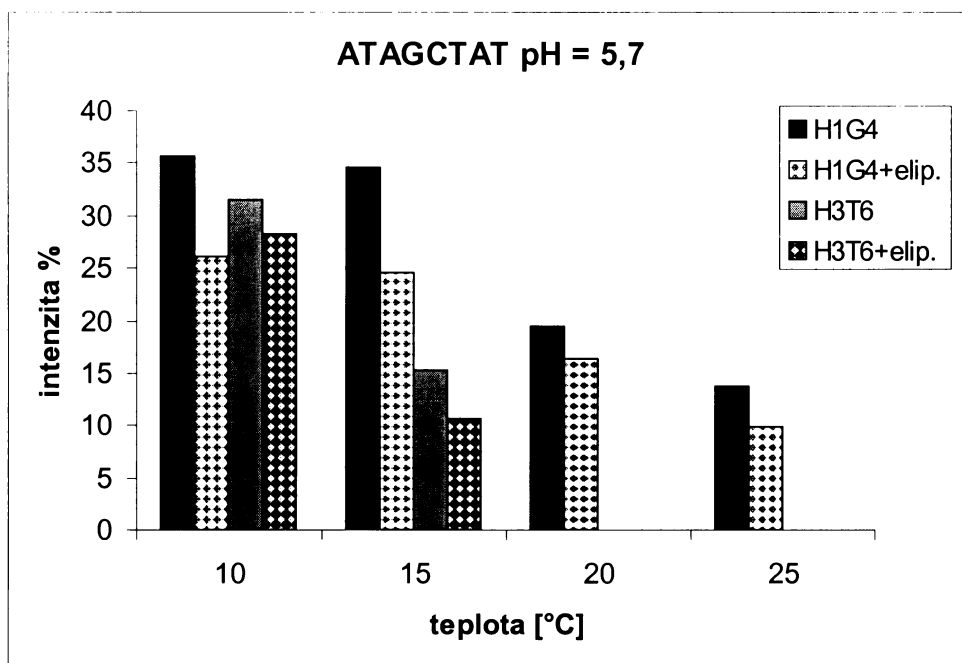
### 5.3.3. ZMĚNY INTEGRÁLNÍCH INTENZIT SIGNÁLŮ VYMĚNITELNÝCH VODÍKŮ

Jak bylo uvedeno výše, intenzita signálů vyměnitelných vodíků (ve spektrech měřených v  $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$  v poměru 9 : 1) je závislá na přístupnosti těchto vodíků pro molekuly rozpouštědla (vody). Vodíkové atomy oligonukleotidu, který je součástí dvoušroubovice, jsou pro molekuly vody méně přístupné než vodíkové atomy jednovláknové struktury. Na obrázku 32 je vynesena závislost integrální intenzity imino vodíků oligonukleotidu CGCTAGCG na teplotě v neutrálním prostředí.



**Obr. 32.** Závislost integrální intenzity imino protonů oligonukleotidu CGCTAGCG při  $\text{pH} = 7,0$  na teplotě.

Přídavek elipticinu nebo 9-hydroxyelipticinu ovlivňuje integrální intenzitu vyměnitelných vodíků. Na obrázku 33 je znázorněna intenzita vodíků H1G4 a H3T6 oligonukleotidu ATAGCTAT v kyselém prostředí bez přídavku elipticinu a s elipticinem. Je vidět, že elipticin způsobuje úbytek integrální intenzity, to znamená, že přídavek elipticinu způsobuje destabilizaci dvoušroubovicové struktury tohoto oligonukleotidu. Podobnou destabilizaci dvoušroubovicové struktury oligonukleotidu ATAGCTAT způsobuje i 9-hydroxyelipticin. Dvoušroubovicová struktura oligonukleotidu CGCTAGCG v kyselém prostředí je naopak elipticinem i 9-hydroxyelipticinem stabilizována. V neutrálním prostředí je duplex oligonukleotidu CGCTAGCG elipticinem destabilizován. Rozdíl v chování oligonukleotidu CGCTAGCG v kyselém a neutrálním prostředí může být vysvětlen tím, že v neutrálním prostředí se elipticin váže na oligonukleotid především interkalací a ta způsobuje narušení dvoušroubovice oligonukleotidu. V kyselém prostředí se protonovaný elipticin na oligonukleotid váže nejen interkalací ale i jiným způsobem (jak bylo ukázáno výše) a tato vazba do malého nebo velkého žlábků dvoušroubovice tuto strukturu stabilizuje. Interkalace elipticinu i 9-hydroxyelipticinu do oligonukleotidu ATAGCTAT způsobuje pravděpodobně větší narušení dvoušroubovicové struktury, které není vyváženo ani neinterkalativní vazbou elipticinu na tento oligonukleotid. Větší narušení dvoušroubovicové struktury tohoto oligonukleotidu interkalací může být způsobeno tím, že páry bází adenin – thymin nejsou planární (vodíky methylových skupin thyminů zasahují nad a pod rovinu páru AT) a aby se mezi ně mohl elipticin vmezeřit, musí se jednotlivé páry bází od sebe více oddálit a tím je více narušena celková struktura dvoušroubovice.



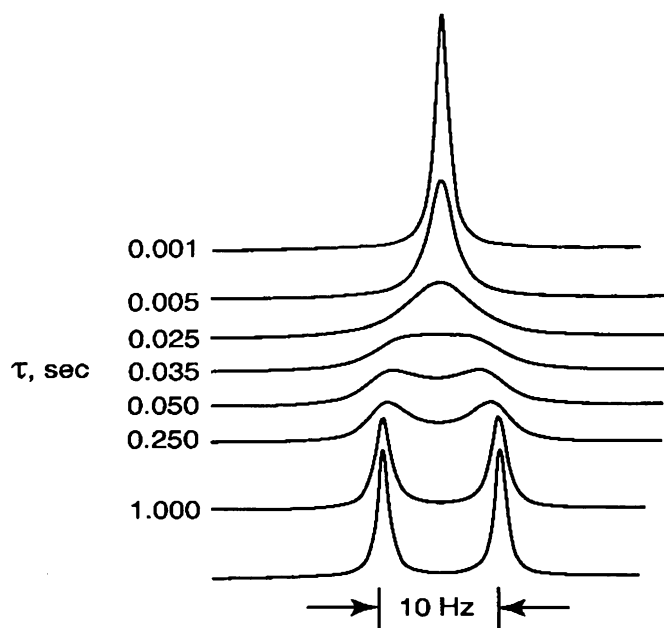
Obr. 33. Změny integrálních intenzit imino vodíků oligonukleotidu ATAGCTAT vyvolané přidávkem elipticinu.

#### 5.3.4. KINETIKA, NMR ČASOVÁ ŠKÁLA A TVAR SIGNÁLŮ

Interkalace derivátů elipticinu do oligonukleotidu je slabá nevázebná a nespecifická interakce. Molekula derivátu elipticinu se tedy může rychle přemisťovat z jednoho vazebného místa na jiné. Tímto způsobem získává jak samotná molekula interkalátoru, tak i jednotlivé atomy oligonukleotidu různé chemické okolí a to se v závislosti na rychlosti této výměny projeví i v  $^1\text{H}$  NMR spektru.

Při výměně molekuly z místa A do místa B se mění chemický posun z  $\delta_a$  na  $\delta_b$  (rezonanční frekvence  $\nu_a$  a  $\nu_b$ ). Pokud pro rychlostní konstantu výměny platí:  $k \ll |\nu_a - \nu_b|$ , jedná se o pomalou výměnu v NMR časové škále, pro  $k \approx |\nu_a - \nu_b|$  mluvíme o středně rychlé výměně a při  $k \gg |\nu_a - \nu_b|$  se jedná o rychlou výměnu. Pokud dochází k rychlé výměně ve spektru pozorujeme jednu linii, jejíž chemický posun odpovídá váženému průměru chemických posunů  $\delta_a$  a  $\delta_b$ . Při pomalé výměně pozorujeme ve spektru dvě linie s chemickými posuny  $\delta_a$  a  $\delta_b$ . Při přechodu od pomalé výměny k rychlé (například zvyšováním teploty) se linie nejprve rozšiřují až dojde k jejich splnutí v jednu širokou linii (takzvaná koalescence) a ta se pak postupně zužuje (viz obrázek 34).





**Obr. 34.** Změny v tvaru NMR linií pro výměnu mezi dvěma stejně populovanými stavy jako funkce doby života stavů. Obrázek převzat z literatury<sup>112</sup>.

Tvar (pološířka) signálu je ale závislý nejen na rychlosti výměny (době života stavu) ale i na relaxačních časech a rychlosti molekulárního pohybu, proto je obtížné z pološířky signálu vyjádřit kvantitativně správně kinetické chování sledovaného systému.

Přídavek elipticinu i 9-hydroxyelipticinu k oběma oligonukleotidům způsobuje značné rozšíření linií. V případě oligonukleotidu CGCTAGCG v neutrálním prostředí při teplotě 40 °C dochází při poměru elipticin : duplex 1 : 2 k rozšíření všech pozorovaných signálů o 10 – 20 Hz. Výjimkou jsou signály vodíků krajních nukleotidů (H6C1 a H8G8), u nichž dochází k rozšíření jen o 3 – 8 Hz (krajní oligonukleotidy jsou interkalací ovlivněny méně a jsou volněji pohyblivé). Se zvyšující se teplotou se linie zužují, to znamená, že interakce elipticinu s tímto oligonukleotidem se pohybuje v oblasti střední až rychlé výměny. Další přídavek elipticinu způsobuje další rozšíření linií. Při poměru elipticin : duplex 2 : 1 je pološířka většiny linií větší než 40 Hz a spektrum přestává být interpretovatelné. Přídavek elipticinu k témuž oligonukleotidu v kyselém prostředí způsobuje o něco menší rozšíření linií (7 – 15 Hz), to znamená, že protonace molekuly elipticinu ovlivňuje kinetiku tvorby komplexů s oligonukleotidem (zvětšuje rychlost přechodů mezi jednotlivými stavy). V případě oligonukleotidu ATAGCTAT a elipticinu

v kyselém prostředí při teplotě 40 °C dochází k ještě menšímu rozšíření linií (1 – 5 Hz), to ale může být důsledkem toho, že při teplotě 40 °C se tento oligonukleotid vyskytuje převážně ve volněji pohyblivé jednovláknové struktuře.

Pološířka signálů vodíků elipticinu se také mění v závislosti na koncentraci a teplotě. Nejzajímavější je signál u 9,2 ppm, který patří vodíku H1 elipticinu. Při teplotě do 20 °C (v neutrálním prostředí s oligonukleotidem CGCTAGCG) jsou ve spektru pozorovatelné dva signály, které se se zvyšující teplotou rozšiřují až při teplotě 25 °C dochází ke koalescenci. Pokud bychom předpokládali, že rozšíření signálů vodíku H1 při teplotě od 5 do 20 °C je způsobeno hlavně kinetickými efekty a krátkou dobou života elipticinu v určitém místě<sup>64</sup>, rychlost výměny by mohla být odhadnuta za použití rovnice  $\Delta\nu = 1/\pi\tau$ , kde  $\Delta\nu$  je velikost rozšíření linií a  $\tau$  je spodní limit doby života komplexu<sup>64</sup>. Při použití této rovnice vychází doba života komplexů elipticinu s oligonukleotidem CGCTAGCG při teplotě 20 °C (kdy se pološířka obou signálů pohybuje kolem 60 Hz) řádově 5 milisekund. Podobná doba života komplexů interkalátoru s DNA byla nalezena i pro 9-aminoakridin (5 ms)<sup>113</sup> a pro ethidium (10 ms)<sup>114</sup>.

### 5.3.5. SIGNÁLY ELIPTICINU

Po přidání elipticinu i 9-hydroxyelipticinu se ve spektru objevují nové signály. Tyto signály patří vodíkům daného derivátu elipticinu. Za podmínek pomalé výměny může dojít i k multiplikaci signálů vodíků oligonukleotidu nebo elipticinu.

V tabulce 15 jsou uvedeny chemické posuny vodíků elipticinu v komplexu s oligonukleotidem ATAGCTAT při teplotě 40 °C v kyselém prostředí v poměru elipticin : duplex oligonukleotidu 2 : 1. Tyto hodnoty chemických posunů nemohou být porovnány s chemickými posuny samotného elipticinu v pufru, ve kterém se měří i interakce s oligonukleotidy, protože samotný elipticin je v něm nerozpustný. Proto jsou v tabulce 15 uvedeny též chemické posuny elipticinu v dimethylsulfoxidu. Je vidět, že elipticin v komplexu s oligonukleotidem má chemické posuny všech svých vodíků výrazně nižší než v DMSO. To je zřejmě způsobeno efektem kruhového proudu aromatických bází, mezi které elipticin interkaluje.

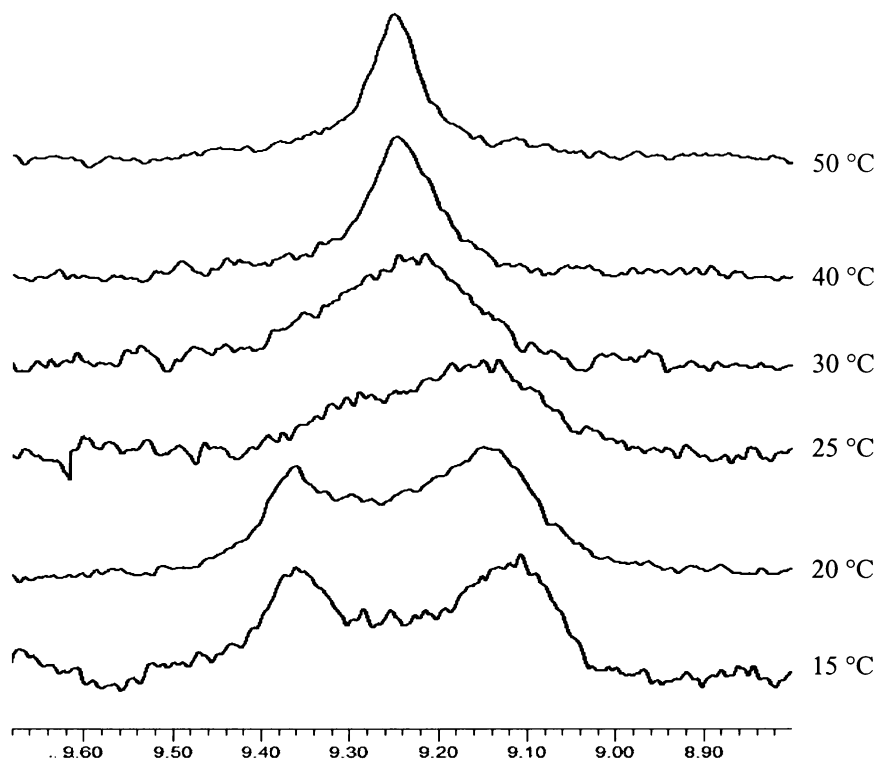
**Tabulka 15.** Porovnání chemických posunů elipticinu samotného (v DMSO) a ve směsi s oligonukleotidem ATAGCTAT při teplotě 25 °C a pH = 5,7.

| Vzorek    | Rozp.            | Chemické posuny vodíků [ppm] |      |      |       |      |      |      |      |      |      |
|-----------|------------------|------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|
|           |                  | H-1                          | H-3  | H-4  | H-6   | H-7  | H-8  | H-9  | H-10 | H-12 | H-13 |
| AT-E2     | D <sub>2</sub> O | 9,18                         | n    | 7,44 | 10,70 | 6,85 | 6,90 | 6,75 | 7,68 | 2,80 | 2,21 |
| Elipticin | DMSO             | 9,70                         | 8,43 | 7,92 | 11,31 | 7,58 | 7,53 | 7,27 | 8,40 | 3,28 | 2,81 |

Chemické posuny vodíků elipticinu a 9-hydroxyelipticinu v komplexu s oligonukleotidy se také mění v závislosti na teplotě a koncentraci derivátu elipticinu, ale tyto změny je těžké sledovat, protože signály jsou velmi široké a málo intenzivní, navíc jsou často v překryvu se signály oligonukleotidů. Zajímavý je signál vodíku H1 elipticinu v oblasti u 9,2 ppm (ten je dobře pozorovatelný, protože v této oblasti nejsou žádné signály oligonukleotidů). V případě interakcí s oligonukleotidem CGCTAGCG v neutrálním prostředí se při teplotách 5 – 20 °C ve spektru objevují dva signály (viz tabulka 16, obrázek 35) a při teplotě 25 °C dochází ke koalescenci a dále je ve spektru patrný pouze jeden signál. Při nízkých teplotách odpovídá pravděpodobně signál s nižším chemickým posunem (kolem 9,13 ppm) molekulám elipticinu, které jsou vmezeřeny mezi páry bází (interkalovány) a signál s vyšším chemickým posunem neinterkalovaným molekulám (ty jsou buď volně v roztoku nebo vázány na oligonukleotid jiným způsobem než interkalací). Poměr intenzit těchto dvou signálů je při teplotě 20 °C přibližně 1 : 0,75 (intenzivnější je signál odpovídající interkalaci) a s klesající teplotou se ještě zvyšuje poměr interkalovaných molekul. Při teplotě 25 °C, kdy dochází ke koalescenci, vypadá signál přibližně jako koalescence dvou signálů o stejné intenzitě, proto lze na rychlost výměny aplikovat přibližný vzorec  $k = \pi\Delta\nu/\sqrt{2}$ , kde  $k$  je rychlostní konstanta výměny a  $\Delta\nu$  je separace signálů v Hz při pomalé výměně. Použitím tohoto vzorce vychází rychlostní konstanta 142 s<sup>-1</sup>, to znamená doba života jednotlivých stavů při 25 °C asi 7 ms (to je ve shodě se závěry z předešlého oddílu).

**Tabulka 16.** Chemické posuny signálů vodíku H-1 elipticinu ve směsi s oligonukleotidem CGCTAGCG při pH = 7.

| T [°C]         | 5    | 10   | 15   | 20   | 25   | 30   | 35   | 40   |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $\delta$ [ppm] | 9,39 | 9,39 | 9,36 | 9,36 | 9,27 | 9,23 | 9,24 | 9,25 |
|                | 9,13 | 9,14 | 9,13 | 9,15 |      |      |      |      |



**Obr. 35.** Signál vodíku H-1 elipticinu ve směsi s oligonukleotidem CGCTAGCG při různých teplotách.

V případě komplexů elipticinu s oligonukleotidem CGCTAGCG v kyselém prostředí dochází ke koalescenci signálů u 9,2 ppm již při 10 °C, to znamená, že protonovaný elipticin se pohybuje rychleji mezi jednotlivými stavy (stejný závěr byl učiněn v předchozím oddíle na základě rozboru pološířek signálů). S oligonukleotidem ATAGCTAT v kyselém prostředí dochází ke koalescenci tohoto signálu při 15 °C. V případě komplexů elipticinu s oběma oligonukleotidy v kyselém prostředí je intenzivnější signál, který odpovídá neinterkalovaným molekulám (například při teplotě 5 °C s oligonukleotidem ATAGCTAT je tento poměr 1 : 1,3). To je v souladu se závěry z oddílu 5.3.1.

## 5.4. ZÁVĚR

Pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie byly studovány interakce elipticinu a 9-hydroxyelipticinu s dvěma oligonukleotidy. Měření bylo prováděno v neutrálním a v kyselém prostředí, v kyselém prostředí je derivát elipticinu protonován.

- Pomocí dvoudimenzionálních NMR technik bylo provedeno přiřazení signálů vodíků oktadeoxyribonukleotidů CGCTAGCG a ATAGCTAT.

- Hlavní způsob vazby elipticinu na oligonukleotidy je interkalace, v kyselém prostředí se ale protonovaný elipticin váže na oligonukleotidy i jiným způsobem (pravděpodobně vazbou do žlábků dvoušroubovice).
- Elipticin i 9-hydroxyelipticin v kyselém prostředí destabilizují dvoušroubovicovou strukturu oligonukleotidu ATAGCTAT a naopak stabilizují dvoušroubovicovou strukturu oligonukleotidu CGCTAGCG, v neutrálním prostředí je duplex oligonukleotidu CGCTAGCG elipticinem mírně destabilizován.
- V neutrálním prostředí je doba života komplexů elipticin - oligonukleotid CGCTAGCG při teplotě 25 °C přibližně 7 ms, v kyselém prostředí se doba života komplexů zkracuje.

## 5.5. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO MĚŘENÍ NMR SPEKTER

Oligonukleotidy CGCTAGCG a ATAGCTAT připravila na zakázku Laboratoř speciálních technik molekulární biologie Masarykovy univerzity v Brně na syntetizátoru oligonukleotidů Expedite 8909 v 15-ti mikromolární škále. Výtěžek syntézy se pohyboval mezi 1 – 2  $\mu\text{mol}$ . Oligomer byl rozpuštěn v 0,5 ml 20 mM fosfátovém pufru (pH = 7 nebo pH = 5,7) obsahujícím 100 mM NaCl, 0,05 mM EDTA a 30 mM  $\text{NaN}_3$ . Pro studium nevyměnitelných vodíků byl vzorek dvakrát odpařen do sucha na přístroji SpeedVac z 99,98%  $\text{D}_2\text{O}$  a poté rozpuštěn v 99,99%  $\text{D}_2\text{O}$ . Pro studium vyměnitelných vodíků byl vzorek rozpuštěn v  $\text{H}_2\text{O}$  s 10%  $\text{D}_2\text{O}$ .

Při titraci elipticinem byl použit roztok 2 mg elipticinu v 200  $\mu\text{l}$  DMSO a 900  $\mu\text{l}$  MeOH. Při titraci 9-hydroxyelipticinem byl použit roztok 2 mg 9-hydroxyelipticinu v 200  $\mu\text{l}$  DMSO a 600  $\mu\text{l}$  MeOH. Po přidání příslušné dávky derivátu elipticinu byl vzorek dvakrát odpařen do sucha a následně rozpuštěn v příslušném rozpouštědle ( $\text{H}_2\text{O}$  nebo  $\text{D}_2\text{O}$ ). Samotný elipticin ani 9-hydroxyelipticin nejsou ve vodě ani v pufrch použitých v této práci rozpustné, proto byl při titraci použit roztok v dimethylsulfoxidu. Následné odpaření vzorku na přístroji SpeedVac zajišťuje dokonalé odstranění všech rozpouštědel včetně DMSO.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian <sup>UNITY</sup> INOVA 400. <sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena při 399,95 MHz, jako interní standard byl použit 2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonát sodný.

## 6. ZÁVĚR

Dílčí závěry jsou uvedeny v kapitolách 3, 4 a 5, zde jsou pouze shrnuty nejdůležitější výsledky této disertační práce:

- Byla vypracována metoda pro syntézu elipticinu a jeho derivátů. Tato metoda umožňuje i syntézu větších množství tohoto alkaloidu bez nutnosti chromatografického čištění. Celkem bylo připraveno sedm derivátů elipticinu. Byly prostudovány benzylové oxidace derivátů karbazolu a elipticinu.
- Bylo zjištěno, že jednoduché empirické potenciály používané v současných výpočetních programech jsou schopny dobře odhadnout interakční energie mezi interkalátory a páry bází DNA, nejsou ale vhodné pro zjišťování geometrie těchto komplexů.
- Pomocí  $^1\text{H}$  NMR technik byly studovány interakce derivátů elipticinu s dvěma oligonukleotidy (CGCTAGCG a ATAGCTAT). Bylo zjištěno, že elipticin i 9-hydroxyelipticin se vážou na oligonukleotidy převážně interkalací, nejsou sekvenčně specifické, mohou měnit stabilitu dvoušroubovicové struktury oligonukleotidů, doba života komplexů oligonukleotidů s elipticinem se pohybuje kolem 7 ms.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|          |  |
|----------|--|
| Ac       | acetyl   |
| AIDS     | syndrom získané imunodeficiency (acquired immune deficiency syndrom) |
| Ala      | alanin   |
| All      | allosa   |
| Ara      | arabínosa  |
| AT       | pár bází adenin - thymin   |
| ATP      | adenosintrijsófat  |
| Bn       | benzyl   |
| Bu       | butyl  |
| Bz       | benzoyl  |
| CD       | cirkulární dichroismus   |
| COSY     | correlated spectroscopy  |
| DFT      | density functional theory  |
| DMSO     | dimethylsulfoxid   |
| DNA      | deoxyribonukleová kyselina   |
| DQF-COSY | double quantum filtered correlated spectroscopy                      |
| Ery      | erythroza  |
| Et       | ethyl  |
| Fuc      | fukosa   |
| <i>f</i> | furanosa   |
| Gal      | galaktosa  |
| Glc      | glukosa  |
| Gly      | glycin   |
| HF       | Hartree-Fock   |
| HPLC     | vysokoučinná kapalinová chromatografie                               |
| GC       | pár bází guanin - cytosin  |
| HIV      | human imunodeficiency virus  |
| HSQC     | heteronuclear single quantum coherence                               |
| HMBC     | heteronuclear multiple bond correlation                              |
| Leu      | leucin   |
| Lyx      | lyxosa   |

---

|          |   |
|----------|---|
| Man      | manosa                                      |
| MCPBA    | 3-chlorperoxybenzoová kyselina              |
| NMR      | nukleární magnetická rezonance              |
| NOESY    | nuclear Overhauser enhancement spectroscopy |
| <i>p</i> | pyranosa                                    |
| Piv      | pivaloyl (2,2,2-trimethylacetyl)            |
| Ph       | fenyl                                       |
| Phe      | fenylalanin                                 |
| RaNi     | Raneyův nikl                                |
| Rha      | rhamnosa                                    |
| Rib      | ribosa                                      |
| Tal      | talosa                                      |
| TLC      | chromatografie na tenké vrstvě              |
| TOCSY    | total correlation spectroscopy              |
| Ts       | tosyl, p-toluensulfonyl                     |
| Tyr      | tyrosin                                     |
| Xyl      | xylosa                                      |

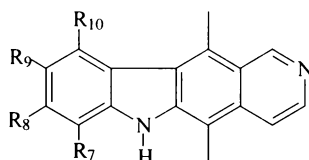


## 8. PŘÍLOHY

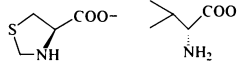
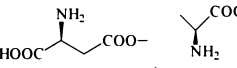
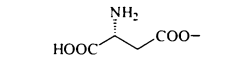
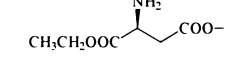
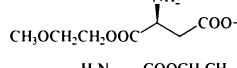
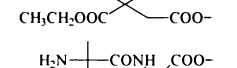
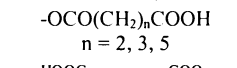
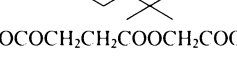
### 8.1. PŘEHLED DOSUD PŘIPRAVENÝCH DERIVÁTŮ ELIPTICINU

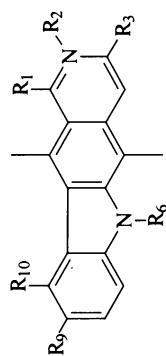
#### Obecné poznámky k tabulkám P1 – P7

V následujícím přehledu jsou uvedeny pouze deriváty, které byly v literatuře charakterizovány (u nichž je uvedeno alespoň  $^1\text{H}$  NMR spektrum). V případě molekul nesoucích náboj není uváděn protiion. Ve sloupci rok je uveden letopočet první publikace popisující syntézu dané látky.



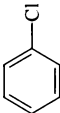


Tabulka P1. Deriváty elipticinu substituované na kruhu A

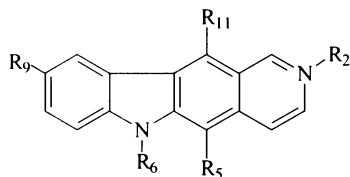
| číslo | R <sub>7</sub>  | R <sub>8</sub>          | R <sub>9</sub>  | R <sub>10</sub>                   | lit.         | rok  |
|-------|---|-------------------------|---|-----------------------------------|--------------|------|
| 1-3   | -F, -Cl, -CH <sub>3</sub>                             |                         |   |                                   | 115          | 1982 |
| 4     | -OCH <sub>3</sub>                                     |                         |   | -OCH <sub>3</sub>                 | 116          | 1997 |
| 5     | -OCH <sub>3</sub>                                     |                         | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 117          | 1992 |
| 6,7   | -OCH <sub>3</sub>                                     | -OH, -OPiv              |   |                                   | 118,119      | 1994 |
| 8     | -OCH <sub>3</sub>                                     | -OCH <sub>3</sub>       | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 120          | 1990 |
| 9     | -CH <sub>3</sub>                                      |                         |   | -CH <sub>3</sub>                  | 121          | 1969 |
| 10,11 | -OH, -OCH <sub>3</sub>                                |                         |   |                                   | 122          | 1978 |
| 12    | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CON(Et) <sub>2</sub> |                         | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 123          | 1988 |
| 13    | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(Et) <sub>2</sub>   |                         | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 123          | 1988 |
| 14,15 |   | -OCH <sub>3</sub> , -OH |   |                                   | 115          | 1982 |
| 16    |   | -OCH <sub>3</sub>       |   | -OCH <sub>3</sub>                 | 124          | 1996 |
| 17    |   | -OCH <sub>3</sub>       | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 81           | 1975 |
| 18    |   | -OCH <sub>3</sub>       | -OCH <sub>3</sub>   | -OCH <sub>3</sub>                 | 125          | 1981 |
| 19    |   | -NO <sub>2</sub>        |   |                                   | 126          | 1982 |
| 20    |   |                         | -OH   | -OCH <sub>3</sub>                 | 127          | 1993 |
| 21    |   |                         | -F  |                                   | 128          | 1993 |
| 22    |   |                         | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 1, 74,76,115 | 1967 |
| 23    |   |                         | -OH   |                                   | 76,81,129    | 1975 |
| 24    |   |                         | -Br   |                                   | 1,130,131    | 1967 |
| 25,26 |   |                         | -CH <sub>3</sub> , -NO <sub>2</sub>   |                                   | 1            | 1967 |
| 27    |   |                         | -Ph   |                                   | 130          | 1975 |
| 28    |   |                         | -NH <sub>2</sub>  |                                   | 82           | 1974 |
| 29-31 |   |                         | -I, -COOH, -COOBu   |                                   | 131          | 1996 |
| 32,33 |   |                         | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O-, -OPh  |                                   | 129          | 1994 |
| 34,35 |   |                         | -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> , -OBz  |                                   | 81           | 1975 |
| 36,37 |   |                         | -OOCCH <sub>3</sub> , -OOCCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   |                                   | 81           | 1975 |
| 38    |   |                         | -OOCCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   |                                   | 81           | 1975 |
| 39    |   |                         | -OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>   |                                   | 81           | 1975 |
| 40    |   |                         | -OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>  |                                   | 81           | 1975 |
| 41    |   |                         | -OOC(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> CH <sub>3</sub>  |                                   | 81           | 1975 |
| 42    |   |                         | -CHO  |                                   | 131          | 1996 |
| 43    |   |                         | -OOC(1-adamantyl)   |                                   | 81           | 1975 |
| 45    |   |                         | -COOCH <sub>3</sub>   |                                   | 131          | 1996 |
| 46,47 |   |                         | -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , -OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                               |                                   | 129          | 1994 |
| 48,49 |   |                         | -OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>                              |                                   | 129          | 1994 |
| 50    |   |                         | -OH   | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> | 129          | 1994 |
| 51    |   |                         | -OCOCH <sub>2</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  |                                   | 132          | 1997 |
| 52    |   |                         | -OCOCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>                               |                                   | 132          | 1997 |
| 53    |   |                         | -OCOCH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O- <i>iso</i> -Bu                              |                                   | 132          | 1997 |
| 54    |   |                         | -OCOCH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |                                   | 132          | 1997 |
| 55,56 |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 57,58 |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 59    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 60    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 61    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 62    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 63    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 64-66 |   |                         | -OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COOH<br>n = 2, 3, 5   |                                   | 132          | 1997 |
| 67    |   |                         |                  |                                   | 132          | 1997 |
| 68    |   |                         | -OCOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> COOH   |                                   | 132          | 1997 |
| 69    |   |                         |   | -OH                               | 118,124      | 1994 |



Tabulka P2. Přehled derivátů se substituenty na kruhu D.

| číslo   | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub> | R <sub>6</sub>          | R <sub>9</sub>                                | R <sub>10</sub> | lit.    | rok  |
|---------|---|--|----------------|-------------------------|---|-----------------|---------|------|
| 70      | -OCH <sub>3</sub>   |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 46      | 1993 |
| 71      | -Cl   |  |                |                         |   |                 | 133     | 2001 |
| 72      | -F  |  |                |                         |   |                 | 134     | 1992 |
| 73,74   | -OH, -Cl  |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 135     | 1978 |
| 75      | -OH   |  |                |                         | -OH   |                 | 135     | 1978 |
| 76      | -CN   |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 136     | 1994 |
| 77      | -CH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>   |  |                |                         |   |                 | 137     | 1982 |
| 78-80   | -CN, -COCH <sub>3</sub> , -CONH <sub>2</sub>  |  |                | -Bn<br>-CH <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 138     | 1994 |
| 81      | -CONH <sub>2</sub>  |  |                |                         |   |                 | 136     | 1994 |
| 82,83   | -CHO, -CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                |  |                | -CH <sub>3</sub>        |   |                 | 138     | 1994 |
| 84,85   | -Bn, -CH <sub>3</sub>   |  |                | -Bn                     |   |                 | 139     | 1980 |
| 86      | -Cl   |  |                | -SO <sub>2</sub> Ph     |   |                 | 133     | 2001 |
| 87,88   | -OH, -Cl  |  |                |                         | -OCH <sub>2</sub> Ph                          |                 | 135     | 1978 |
| 89      | -CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                   |  |                | -CH <sub>3</sub>        | -OH   |                 | 140     | 1999 |
| 90      | -CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                   |  |                | -CH <sub>3</sub>        | -OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH      |                 | 140     | 1999 |
| 91      | -CONHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                   |  |                | -CH <sub>3</sub>        | -OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH      |                 | 140     | 1999 |
| 92,93   | -COOH, -COOEt   |  |                | -CH <sub>3</sub>        | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 140     | 1999 |
| 94      | -COOEt  |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 141     | 1994 |
| 95-97   | -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(Et) <sub>2</sub>                                   |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub> , -OCH <sub>2</sub> Ph, -OH |                 | 135     | 1978 |
| 98,99   | -NHCH <sub>3</sub> , -NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                                   |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 142     | 1988 |
| 100,101 | -NHCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , -NHC <sub>3</sub> H <sub>7</sub> |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 142     | 1988 |
| 102     | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                    |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 142     | 1988 |
| 103     | -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>                                      |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 142     | 1988 |
| 104,105 | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                    |  |                |                         | -Bn, -OH                                      |                 | 142     | 1988 |
| 106     | -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                     |  |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 143     | 1980 |
| 107     |   | -O   |                |                         | -OCH <sub>3</sub>                             |                 | 136,144 | 1994 |
| 108     |   | -O   |                |                         | -OH   |                 | 144     | 1997 |
| 109,110 |   | -O   |                | -H, -Bn                 |   |                 | 75      | 1994 |
| 111,112 |   | -O   |                | -CH <sub>3</sub>        | -COCH <sub>3</sub> , -OCOCH <sub>3</sub>      |                 | 145     | 1989 |
| 113,114 |   | -O   |                |                         | -OH   |                 | 144     | 1997 |
| 115     |   | -OCH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub> , -OCH <sub>2</sub> COC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>        |                |                         | -OH   |                 | 144     | 1997 |
| 116     |   | -OCH(CH <sub>3</sub> )COCH <sub>3</sub>  |                |                         | -OH   |                 | 144     | 1997 |
| 117     |   | -OCH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub><br>-OCH <sub>2</sub> COCH <sub>2</sub> OH |                |                         | -OH   |                 | 144     | 1997 |

| číslo   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub>      | R <sub>6</sub>  | R <sub>9</sub>  | R <sub>10</sub>                   | lit.      | rok  |
|---------|----------------|---|---------------------|---|---|-----------------------------------|-----------|------|
| 118     |                | -OCH <sub>2</sub> COPh  |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 119     |                |    |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 120     |                |    |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 121     |                |    |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 122     |                | -OCH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>                 |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 123     |                | -OCH <sub>2</sub> CO(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> |                     |   | -OH   |                                   | 144       | 1997 |
| 124,125 |                | -CH <sub>3</sub>  |                     |   | -OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> |                                   | 129       | 1994 |
| 126     |                | -CH <sub>3</sub>  |                     |   | -OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                 |                                   | 129       | 1994 |
| 127,128 |                | -CH <sub>3</sub>  |                     |   | -OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , -OPh                           |                                   | 129       | 1994 |
| 129     |                | -CH <sub>3</sub>  |                     |   | -OH   | -OCH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub> | 129       | 1994 |
| 130     |                | -CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   |                     |   | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 146       | 1989 |
| 131     |                | -CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH                                 |                     |   | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 146       | 1989 |
| 132,133 |                | -CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH                                 |                     |   | -H, -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 147       | 1994 |
| 134,135 |                | -CH <sub>2</sub> COOH, -CH <sub>2</sub> CN  |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 136     |                | -CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>   |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 137     |                | -CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>   |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 138     |                | -CH <sub>2</sub> S(O)CH <sub>3</sub>  |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 139     |                | -CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>   |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 140     |                | -CH <sub>3</sub> COO- <i>t</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>                         |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 141     |                | -CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>                 |                     |   |   |                                   | 147       | 1994 |
| 142-    |                | 2,4-dinitrophenyl   |                     |   |   |                                   | 136       | 1994 |
| 144     |                |   |                     |   |   |                                   | 75        | 1994 |
| 145,146 |                |   | -Cl                 | -H, -CH <sub>3</sub> , -Bn  |   |                                   | 148       | 1986 |
| 147     |                |   | -CH <sub>3</sub>    | -H, -CH <sub>3</sub>  |   |                                   | 121       | 1969 |
| 148     |                |   | -CH <sub>3</sub>    |   | -CH <sub>3</sub>  |                                   | 123       | 1988 |
| 149-    |                |   | -CH <sub>2</sub> OH |   | -OCH <sub>3</sub>   |                                   | 1,149,150 | 1967 |
| 151     |                |   |                     | -CH <sub>3</sub> , -Bn, -Boc  |   |                                   | 1,81      | 1967 |
| 152,153 |                |   |                     | -CH <sub>3</sub>  | -OH, -OCH <sub>3</sub>  |                                   | 81        | 1975 |
| 154     |                |   |                     | -OCOCH <sub>3</sub>   | OCH <sub>3</sub>  |                                   | 81        | 1975 |
| 155     |                |   |                     | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> | OCH <sub>3</sub>  |                                   | 81        | 1975 |
| 156     |                |   |                     | -CH <sub>3</sub>  | CH <sub>3</sub> COO-  |                                   | 81        | 1975 |
| 157     |                |   |                     | -CH <sub>3</sub>  | CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COO-                |                                   | 81        | 1975 |
| 158,159 |                |   |                     | -CH <sub>3</sub>  | -CHO, -COCH <sub>3</sub>  |                                   | 145       | 1989 |
| 160     |                |   |                     | -CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>                               |   |                                   | 131       | 1996 |
| 161     |                |   |                     | -CH <sub>2</sub> COOH   |   |                                   | 131       | 1996 |

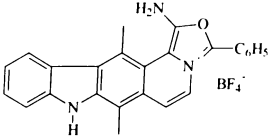
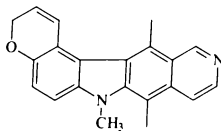
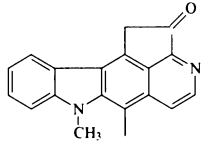
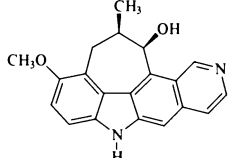
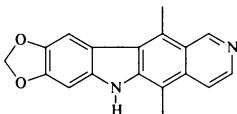
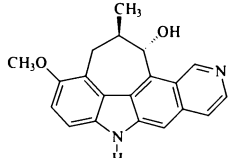
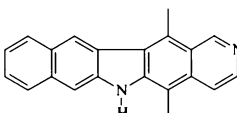
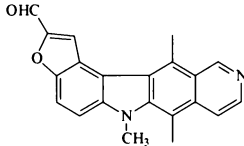
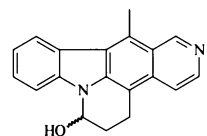
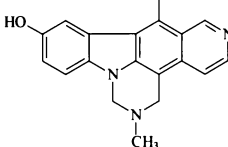
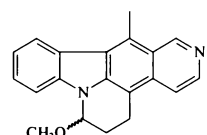
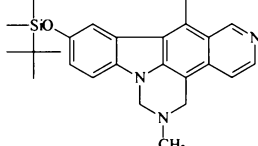
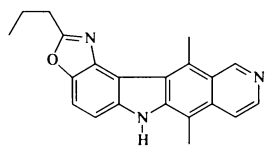
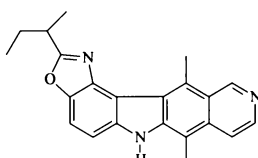
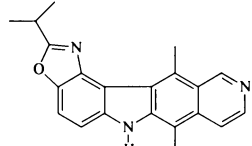


**Tabulka P3.** Přehled derivátů elipticinu se substituenty v polohách 12 a 13.

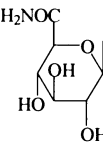
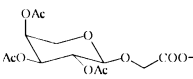
| číslo   | R <sub>2</sub> | R <sub>5</sub>  | R <sub>6</sub>       | R <sub>9</sub>        | R <sub>11</sub>   | lit.        | rok  |
|---------|----------------|---|----------------------|-----------------------|---|-------------|------|
| 162     |                | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 151         | 1979 |
| 163     |                | -Bu   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 74,151, 152 | 1979 |
| 164,165 |                | -CH <sub>2</sub> OH, -CHO   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 76,77       | 1987 |
| 166     |                | -CHO  |                      | -OH                   | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 167     |                | -CHO  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 168     |                | -Bu   |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 169     |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 170     |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHBrCH <sub>3</sub>                                |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 171     |                | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHO  | -Bn                  |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 172     | R              | -COOCH <sub>3</sub>   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 76          | 1987 |
| 173     |                | -COOCH <sub>3</sub>   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 76          | 1987 |
| 174     |                | -CH <sub>2</sub> OOCNHCH <sub>3</sub>   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 76          | 1987 |
| 175     |                |   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 153         | 1991 |
| 176,177 |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub>                                 | -H, -Bn              |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 178     |                | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH <sub>2</sub>                                 |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 179     |                |   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 180     | -O             |   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 181,182 |                |   |                      | -H, -OCH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 183     |                |   | -OCH <sub>3</sub>    |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 184     |                | -CH=NCH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 185     |                | -CH=NCH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 186     |                | -CH=NCH <sub>3</sub>  |                      | -OH                   | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 187     |                | -CH <sub>2</sub> NHCH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 188     |                | -CH <sub>2</sub> NHCH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 189     |                | -CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>   |                      |                       | -CH <sub>3</sub>  | 77          | 1988 |
| 190-192 |                | -CH <sub>2</sub> OH, -COOCH <sub>3</sub> ,<br>-CH <sub>2</sub> OCONHCH <sub>3</sub> |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>3</sub>  | 154         | 1990 |
| 193     |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH                                 | 155,156     | 1987 |
| 194     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CH=CH <sub>2</sub>   | 74          | 1992 |
| 195     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CH(SEt) <sub>2</sub>   | 153         | 1991 |
| 196     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -CHOHCH <sub>3</sub>  | 153         | 1991 |
| 197     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       |   | 153         | 1991 |
| 198     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -COCH <sub>3</sub>  | 153         | 1991 |
| 199     |                | -Bu   |                      |                       | -Bu   | 74, 152     | 1992 |
| 200     |                | -CH=CH <sub>2</sub>   |                      |                       | -CH=CH <sub>2</sub>   | 74          | 1992 |
| 201     |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -CH <sub>2</sub> NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH               | 150         | 1983 |
| 202     |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub> | 150         | 1983 |
| 203     |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl) <sub>2</sub> | 150         | 1983 |
| 204     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>2</sub> OCONHCH <sub>3</sub>                               | 157         | 1992 |
| 205     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CHO  | 157         | 1992 |
| 206     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH <sub>2</sub> OH   | 157         | 1992 |
| 207     |                | -CH <sub>3</sub>  |                      | -OCH <sub>3</sub>     | -CH(SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>                   | 157         | 1992 |
| 208,209 |                | -CF <sub>3</sub>  | -H, -CH <sub>3</sub> |                       | -CF <sub>3</sub>  | 158         | 1995 |
| 210-212 |                | -CH <sub>3</sub>  |                      |                       | -Bu, -CHO, -CH <sub>2</sub> OH                                      | 153         | 1991 |
| 213-215 |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -Bu, -Bn, -Ph   | 150         | 1983 |
| 216,217 |                | -CH <sub>3</sub>  | -CH <sub>3</sub>     |                       | -CH <sub>2</sub> OH, -CH <sub>2</sub> Cl                            | 150         | 1983 |

R = -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-*p*-NO<sub>2</sub>

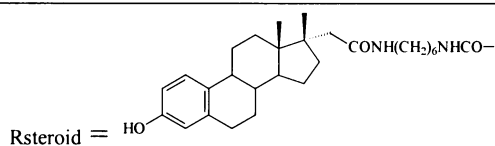
**Tabulka P4.** Přehled derivátů elipticinu s dalším uzavřeným kruhem.

| kruh | vzorec  | lit.   | rok  | vzorec | lit.   | rok |      |
|------|---|--------|------|--------|--|-----|------|
| 218  |    | 139    | 1980 | 226    |    | 160 | 1992 |
| 219  |    | 138    | 1994 | 227    |    | 160 | 1992 |
| 220  |    | 81,159 | 1975 | 228    |    | 160 | 1992 |
| 221  |    | 151    | 1979 | 229    |    | 160 | 1992 |
| 222  |   | 77     | 1988 | 230    |   | 77  | 1988 |
| 223  |  | 77     | 1988 | 231    |  | 77  | 1988 |
| 224  |  | 76     | 1987 | 232    |  | 76  | 1987 |
| 225  |  | 76     | 1987 |        |  |     |      |

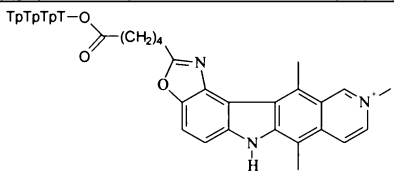
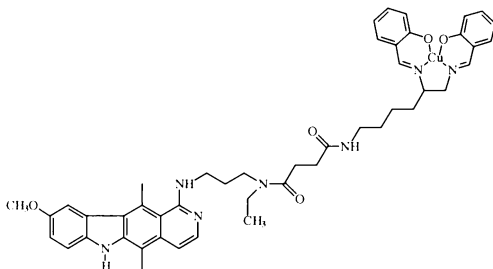
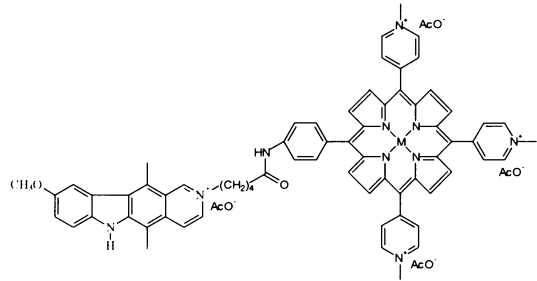
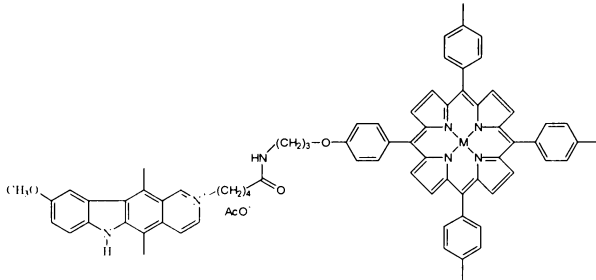
**Tabulka P5.** Přehled konjugátů elipticinu s jinými biologicky aktivními látkami.

| číslo   | R2  | R6   | R9                         | R10   | R11   | lit.        | rok  |
|---------|---|--|----------------------------|---|---|-------------|------|
| 233     | 2,3,4-tri-O-Ac-<br>$\alpha$ -L-Arap   |  |                            |   |   | 147         | 1994 |
| 234     | D-Eryf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 235     | $\alpha$ -L-5dAraf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 236     | $\beta$ -D-5dRibf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 237     | $\beta$ -D-2dRibf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 238     | $\alpha$ -D-Araf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 239     | $\alpha$ -L-Araf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 240     | $\alpha$ -D-Arap  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 241     | $\alpha$ -L-Arap  |  | -OH                        |   |   | 161,<br>147 | 1988 |
| 242     | $\alpha$ -L-Arap  |  | -OCH <sub>3</sub>          |   |   | 161         | 1988 |
| 243     | D-Lyxf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 244     | L-Lyxf  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 245     | $\alpha$ -D-Lyxp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 246     | $\alpha$ -L-Lyxp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 247-249 | $\beta$ -D-Ribf   |  | -H, -OH, -OCH <sub>3</sub> |   |   | 161         | 1988 |
| 250     | $\beta$ -L-Ribf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 251     | $\beta$ -D-Ribp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 252     | $\beta$ -L-Ribp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 253     | $\beta$ -D-Xylf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 254     | $\beta$ -L-Xylf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 255     | D-Xylp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 256     | L-Xylp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 257-259 | $\beta$ -D-Fucp   |  | -H, -OH, -OCH <sub>3</sub> |   |   | 161         | 1988 |
| 260     | $\beta$ -L-Fucp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 261-263 | L-Rhap  |  | -H, -OH, -OCH <sub>3</sub> |   |   | 161         | 1988 |
| 264     | 2,3,4-triAc- $\beta$ -<br>L-Rhap  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 265     | $\beta$ -D-Allp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 266-268 | $\beta$ -D-Galp   |  | -H, -OH, -OCH <sub>3</sub> |   |   | 161         | 1988 |
| 269     | $\beta$ -L-Galp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 270     | $\beta$ -D-Glcp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 271     | $\beta$ -L-Glcp   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 272     | $\alpha$ -D-Manp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 273     | $\alpha$ -L-Manp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 274     | $\alpha$ -D-Talp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 275     | $\beta$ -D-GalNAcp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 276     | $\beta$ -D-GlcNAcp  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 277     |  |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 278     | $\beta$ -L-5dAraf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 279     | $\beta$ -D-Araf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 280     | $\beta$ -L-Araf   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 281     | $\beta$ -L-Rhap   |  | -OH                        |   |   | 161         | 1988 |
| 282     |   | Rsteroid                                     |                            |   |   | 131         | 1996 |
| 283     |   |  | Rsteroid                   |   |   | 131         | 1996 |
| 284,285 | -CH <sub>3</sub> , $\alpha$ -L-<br>Arap   |  |                            | $\alpha$ -L-Arap  |   | 162         | 2003 |
| 286,287 | -CH <sub>3</sub> , $\alpha$ -L-<br>Arap   |  |                            | 2-( $\alpha$ -L-Arap)ethyloxy   |   | 162         | 2003 |
| 288     |   |  |                            |  |   | 162         | 2003 |
| 289     |   | 2, 3, 4-tri-O-<br>Ac- $\beta$ -D-Xylp        |                            |   |   | 163         | 1977 |
| 290     |   | 2, 3, 4-tri-O-<br>Ac- $\beta$ -D-Xylp        | -OAc                       |   |   | 163         | 1977 |
| 291     |   | 2, 3, 4-tri-O-<br>Ac- $\beta$ -L-6-<br>dGalp | -OAc                       |   |   | 163         | 1977 |
| 292     |   | -CH <sub>3</sub>                             |                            |   | 2-(2,3,5-triBz- $\beta$ -D-<br>Ribf-1-yl)-oxyethyl        | 155,<br>156 | 1987 |
| 293     |   | -CH <sub>3</sub>                             |                            |   | 2-(2,3,4,6-tetraAc-<br>$\beta$ -D-Glcp-1-yl)-<br>oxyethyl | 155,<br>156 | 1987 |

| číslo   | R2   | R6               | R9      | R10 | R11   | lit.     | rok  |
|---------|--|------------------|---------|-----|---|----------|------|
| 294     |  | -CH <sub>3</sub> |         |     | 2-(2,3,4,6-tetraAc-β-D-Galp-1-yl)-oxyethyl  | 155, 156 | 1987 |
| 295     |  | -CH <sub>3</sub> |         |     | 2-(β-D-Galp-1-yl)-oxyethyl  | 156      | 1987 |
| 296     |  | -CH <sub>3</sub> |         |     | 2-(β-D-Glcp-1-yl)-oxyethyl  | 156      | 1987 |
| 297     |  | -CH <sub>3</sub> |         |     | 2-(β-D-Ribf-1-yl)-oxyethyl  | 156      | 1987 |
| 298     |  | -CH <sub>3</sub> |         |     | β-D-Ribf-1-yl   | 150      | 1983 |
| 299,300 | Tyr-DAla-Gly-Phe-DLeu-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - |                  | -H, -OH |     |   | 164      | 1989 |
| 301,302 | Tyr-DAla-Gly-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -          |                  | -H, -OH |     |   | 164      | 1989 |
| 303-306 | -CH <sub>3</sub>   |                  | -OH     |     | $\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{---N=C---R} \\ \text{R=H, CH}_3, \\ \text{CH(CH}_3)_2, \\ \text{CH}_2\text{CH(CH}_3)_2 \end{array}$ | 165      | 1984 |



**Tabulka P6.** Další konjugáty elipticinu s biologicky aktivními látkami.

| substituent   | vzorec   | lit. | rok  |
|---|--|------|------|
|   |    | 166  | 1990 |
|   |  | 167  | 1997 |
| 309-311<br>M = Fe <sup>III</sup><br>M = Zn <sup>II</sup><br>M = Mn <sup>III</sup>                                 |  | 168  | 1989 |
| 312-315<br>M = H <sub>2</sub><br>M = Fe <sup>III</sup> -OAc<br>M = Mn <sup>III</sup> -OAc<br>M = Zn <sup>II</sup> |  | 146  | 1989 |



**Tabulka P7.** Přehled dosud připravených biselipticinů.

| bis     | substituent                 | vzorec | lit. | rok  |
|---------|-----------------------------|--------|------|------|
| 316,317 | R=H<br>R=OCH <sub>3</sub>   |        | 77   | 1988 |
| 318,319 | R =<br>R=OCH <sub>3</sub>   |        | 77   | 1988 |
| 320,321 | R= OCH <sub>3</sub><br>R=OH |        | 169  | 1980 |
| 322,323 |                             |        | 170  | 1987 |

## 8.2. OPTIMALIZOVANÉ GEOMETRIE A DALŠÍ VLASTNOSTI DERIVÁTŮ ELIPTICINU A PÁRŮ BÁZÍ AT A GC

**Tabulka P8.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro molekulu E+ (elipticinium).

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| C1   | -2,896 | -1,668 | 0,01   | CA  | -0,003  | -0,033   | -0,04     | 0,144  | 0,026   | -0,019  |
| N2   | -4,16  | -1,219 | 0,037  | NA  | -0,174  | -0,132   | -0,129    | -0,285 | -0,176  | -0,147  |
| C3   | -4,471 | 0,119  | 0,046  | CA  | -0,152  | -0,137   | -0,141    | -0,06  | -0,102  | -0,133  |
| C4   | -3,462 | 1,031  | 0,025  | CA  | -0,104  | -0,075   | -0,063    | -0,221 | -0,112  | -0,046  |
| C4a  | -2,088 | 0,636  | -0,008 | CA  | 0,048   | 0,037    | 0,025     | 0,254  | 0,104   | -0,019  |
| C5   | -1,048 | 1,581  | -0,028 | CA  | 0,006   | 0,023    | 0,071     | -0,11  | 0,005   | 0,148   |
| C5a  | 0,247  | 1,059  | -0,012 | CN  | 0,04    | 0,018    | 0,008     | 0,341  | 0,23    | 0,142   |
| N6   | 1,424  | 1,746  | -0,001 | NA  | -0,344  | -0,267   | -0,295    | -0,571 | -0,45   | -0,448  |
| C6a  | 2,507  | 0,864  | 0,006  | CN  | 0,162   | 0,118    | 0,124     | 0,304  | 0,235   | 0,234   |
| C7   | 3,866  | 1,16   | 0,024  | CA  | -0,244  | -0,179   | -0,173    | -0,341 | -0,262  | -0,252  |
| C8   | 4,752  | 0,083  | 0,031  | CA  | -0,085  | -0,086   | -0,091    | -0,051 | -0,061  | -0,078  |
| C9   | 4,287  | -1,241 | 0,024  | CA  | -0,172  | -0,125   | -0,12     | -0,197 | -0,135  | -0,114  |
| C10  | 2,924  | -1,524 | 0,008  | CA  | -0,175  | -0,141   | -0,155    | -0,222 | -0,2    | -0,235  |
| C10a | 2,008  | -0,461 | -0,004 | CB  | 0,062   | 0,062    | 0,079     | 0,142  | 0,15    | 0,182   |
| C10b | 0,555  | -0,355 | -0,015 | CB  | -0,008  | -0,005   | -0,001    | -0,3   | -0,248  | -0,224  |
| C11  | -0,458 | -1,298 | -0,03  | CA  | 0,009   | 0,021    | 0,046     | 0,282  | 0,239   | 0,257   |
| C11a | -1,805 | -0,799 | -0,012 | CA  | 0,034   | 0,033    | 0,028     | -0,219 | -0,09   | -0,016  |
| C12  | -1,293 | 3,071  | -0,043 | CT  | -0,192  | -0,188   | -0,282    | -0,358 | -0,381  | -0,499  |
| C13  | -0,118 | -2,767 | -0,059 | CT  | -0,181  | -0,188   | -0,247    | -0,399 | -0,408  | -0,524  |
| H1   | -2,789 | -2,744 | 0,013  | HC  | 0,192   | 0,163    | 0,16      | 0,166  | 0,152   | 0,157   |
| H2   | -4,915 | -1,897 | 0,055  | H   | 0,355   | 0,338    | 0,344     | 0,377  | 0,347   | 0,349   |
| H3   | -5,523 | 0,371  | 0,074  | HC  | 0,224   | 0,193    | 0,189     | 0,211  | 0,189   | 0,189   |
| H4   | -3,724 | 2,082  | 0,042  | HC  | 0,167   | 0,149    | 0,152     | 0,187  | 0,153   | 0,145   |
| H6   | 1,51   | 2,752  | 0,031  | H   | 0,362   | 0,331    | 0,336     | 0,419  | 0,378   | 0,376   |
| H7   | 4,226  | 2,184  | 0,031  | HC  | 0,176   | 0,149    | 0,149     | 0,203  | 0,172   | 0,172   |
| H8   | 5,82   | 0,275  | 0,044  | HC  | 0,162   | 0,143    | 0,141     | 0,16   | 0,142   | 0,142   |
| H9   | 5,002  | -2,058 | 0,033  | HC  | 0,158   | 0,138    | 0,14      | 0,168  | 0,145   | 0,144   |
| H10  | 2,592  | -2,556 | 0,01   | HC  | 0,171   | 0,136    | 0,136     | 0,189  | 0,157   | 0,159   |
| H12a | -1,518 | 3,461  | 0,958  | HC  | 0,087   | 0,088    | 0,106     | 0,131  | 0,136   | 0,162   |
| H12b | -0,423 | 3,618  | -0,419 | HC  | 0,081   | 0,08     | 0,106     | 0,122  | 0,123   | 0,15    |
| H12c | -2,125 | 3,341  | -0,7   | HC  | 0,081   | 0,08     | 0,106     | 0,134  | 0,138   | 0,163   |
| H13a | 0,408  | -3,06  | 0,857  | HC  | 0,087   | 0,088    | 0,096     | 0,139  | 0,14    | 0,165   |
| H13b | 0,548  | -2,984 | -0,901 | HC  | 0,087   | 0,088    | 0,096     | 0,14   | 0,141   | 0,166   |
| H13c | -0,982 | -3,425 | -0,162 | HC  | 0,081   | 0,08     | 0,096     | 0,122  | 0,124   | 0,151   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -10,59 | -8,79   | -10,53  |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | -2,23  | -5,60   | -2,16   |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 8,24   | 7,04    | 7,19    |

**Tabulka P9.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro molekulu 9HE (9-hydroxyelipticin).

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| C1   | -3,094 | -1,885 | -0,002 | CA  | 0,253   | 0,214    | 0,203     | 0,528  | 0,446   | 0,430   |
| N2   | -4,390 | -1,646 | -0,008 | NC  | -0,559  | -0,494   | -0,485    | -0,700 | -0,618  | -0,599  |
| C3   | -4,774 | -0,340 | -0,012 | CA  | 0,150   | 0,129    | 0,107     | 0,369  | 0,321   | 0,279   |
| C4   | -3,895 | 0,714  | -0,008 | CA  | -0,225  | -0,166   | -0,142    | -0,537 | -0,420  | -0,352  |
| C4a  | -2,491 | 0,480  | 0,000  | CA  | 0,076   | 0,049    | 0,030     | 0,510  | 0,365   | 0,269   |
| C5   | -1,552 | 1,547  | 0,005  | CA  | -0,032  | -0,011   | 0,029     | -0,277 | -0,160  | -0,043  |
| C5a  | -0,216 | 1,184  | 0,004  | CN  | -0,042  | -0,046   | -0,056    | 0,263  | 0,172   | 0,133   |
| N6   | 0,898  | 2,004  | 0,005  | NA  | -0,284  | -0,218   | -0,242    | -0,459 | -0,358  | -0,376  |
| C6a  | 2,057  | 1,238  | 0,000  | CN  | 0,063   | 0,040    | 0,052     | 0,027  | 0,012   | 0,025   |
| C7   | 3,386  | 1,649  | -0,005 | CA  | -0,272  | -0,235   | -0,234    | -0,197 | -0,172  | -0,183  |
| C8   | 4,379  | 0,668  | -0,007 | CA  | -0,215  | -0,165   | -0,155    | -0,394 | -0,323  | -0,306  |
| C9   | 4,042  | -0,695 | -0,004 | C   | 0,232   | 0,165    | 0,142     | 0,460  | 0,369   | 0,345   |
| C10  | 2,707  | -1,104 | 0,001  | CA  | -0,203  | -0,140   | -0,117    | -0,507 | -0,406  | -0,405  |
| C10a | 1,697  | -0,135 | 0,003  | CB  | 0,048   | 0,025    | 0,039     | 0,349  | 0,276   | 0,324   |
| C10b | 0,238  | -0,183 | 0,005  | CB  | 0,033   | 0,030    | 0,014     | -0,341 | -0,262  | -0,303  |
| C11  | -0,673 | -1,232 | 0,007  | CA  | -0,071  | -0,049   | -0,028    | 0,327  | 0,279   | 0,329   |
| C11a | -2,063 | -0,899 | 0,002  | CA  | -0,037  | -0,021   | -0,021    | -0,531 | -0,408  | -0,374  |
| C12  | -1,999 | 2,989  | 0,008  | CT  | -0,142  | -0,153   | -0,191    | -0,116 | -0,176  | -0,282  |
| C13  | -0,166 | -2,655 | 0,013  | CT  | -0,118  | -0,155   | -0,202    | -0,368 | -0,407  | -0,521  |
| O9   | 4,996  | -1,683 | -0,006 | OH  | -0,606  | -0,527   | -0,527    | -0,643 | -0,561  | -0,560  |
| H1   | -2,825 | -2,938 | -0,001 | HC  | 0,087   | 0,062    | 0,067     | 0,027  | 0,011   | 0,008   |
| H3   | -5,848 | -0,166 | -0,018 | HC  | 0,106   | 0,078    | 0,080     | 0,070  | 0,046   | 0,050   |
| H4   | -4,278 | 1,729  | -0,013 | HC  | 0,116   | 0,092    | 0,095     | 0,172  | 0,135   | 0,127   |
| H6   | 0,877  | 3,011  | -0,021 | H   | 0,321   | 0,291    | 0,294     | 0,387  | 0,347   | 0,349   |
| H7   | 3,654  | 2,702  | -0,007 | HC  | 0,191   | 0,159    | 0,157     | 0,185  | 0,153   | 0,154   |
| H8   | 5,426  | 0,964  | -0,011 | HC  | 0,151   | 0,119    | 0,125     | 0,191  | 0,154   | 0,159   |
| H9   | 5,874  | -1,272 | -0,009 | HO  | 0,443   | 0,414    | 0,404     | 0,440  | 0,412   | 0,401   |
| H10  | 2,495  | -2,165 | 0,002  | HC  | 0,191   | 0,149    | 0,153     | 0,265  | 0,212   | 0,225   |
| H12a | -2,560 | 3,245  | -0,900 | HC  | 0,058   | 0,059    | 0,069     | 0,069  | 0,080   | 0,105   |
| H12b | -2,650 | 3,208  | 0,863  | HC  | 0,058   | 0,059    | 0,069     | 0,071  | 0,082   | 0,108   |
| H12c | -1,155 | 3,683  | 0,069  | HC  | 0,058   | 0,059    | 0,069     | 0,032  | 0,042   | 0,064   |
| H13a | -0,961 | -3,399 | 0,030  | HC  | 0,057   | 0,062    | 0,069     | 0,123  | 0,126   | 0,155   |
| H13b | 0,448  | -2,852 | -0,874 | HC  | 0,057   | 0,062    | 0,069     | 0,104  | 0,114   | 0,132   |
| H13c | 0,469  | -2,836 | 0,889  | HC  | 0,057   | 0,062    | 0,069     | 0,104  | 0,114   | 0,132   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -6,92  | -5,03   | -6,86   |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | 1,94   | -1,37   | 2,00    |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 5,27   | 5,56    | 5,75    |

**Tabulka P10.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro molekulu 7HE (7-hydroxyelipticin).

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| C1   | -3,391 | -1,500 | 0,000  | CA  | 0,216   | 0,182    | 0,165     | 0,499  | 0,431   | 0,410   |
| N2   | -4,610 | -1,000 | 0,000  | NC  | -0,544  | -0,479   | -0,468    | -0,692 | -0,611  | -0,596  |
| C3   | -4,718 | 0,356  | 0,000  | CA  | 0,150   | 0,122    | 0,100     | 0,380  | 0,328   | 0,298   |
| C4   | -3,642 | 1,207  | 0,000  | CA  | -0,244  | -0,175   | -0,164    | -0,556 | -0,433  | -0,395  |
| C4a  | -2,316 | 0,690  | 0,000  | CA  | 0,036   | 0,018    | 0,017     | 0,382  | 0,264   | 0,189   |
| C5   | -1,179 | 1,542  | 0,000  | CA  | 0,035   | 0,049    | 0,101     | -0,005 | 0,072   | 0,211   |
| C5a  | 0,055  | 0,912  | 0,000  | CN  | -0,056  | -0,063   | -0,086    | 0,054  | 0,012   | -0,087  |
| N6   | 1,314  | 1,487  | 0,000  | NA  | -0,341  | -0,268   | -0,289    | -0,421 | -0,342  | -0,343  |
| C6a  | 2,277  | 0,495  | 0,000  | CN  | 0,146   | 0,131    | 0,153     | 0,081  | 0,084   | 0,126   |
| C7   | 3,665  | 0,650  | 0,000  | C   | 0,208   | 0,148    | 0,150     | 0,345  | 0,267   | 0,252   |
| C8   | 4,450  | -0,500 | 0,000  | CA  | -0,245  | -0,192   | -0,188    | -0,409 | -0,338  | -0,320  |
| C9   | 3,851  | -1,772 | 0,000  | CA  | -0,232  | -0,211   | -0,221    | -0,082 | -0,077  | -0,094  |
| C10  | 2,468  | -1,924 | 0,000  | CA  | -0,187  | -0,147   | -0,144    | -0,360 | -0,306  | -0,296  |
| C10a | 1,658  | -0,775 | 0,000  | CB  | 0,023   | 0,015    | 0,014     | 0,186  | 0,162   | 0,137   |
| C10b | 0,219  | -0,519 | 0,000  | CB  | 0,011   | 0,000    | 0,010     | -0,184 | -0,176  | -0,125  |
| C11  | -0,888 | -1,359 | 0,000  | CA  | -0,020  | -0,004   | 0,019     | 0,309  | 0,304   | 0,324   |
| C11a | -2,179 | -0,747 | 0,000  | CA  | -0,025  | -0,016   | -0,016    | -0,481 | -0,395  | -0,362  |
| C12  | -1,317 | 3,045  | 0,000  | CT  | -0,223  | -0,213   | -0,295    | -0,380 | -0,395  | -0,518  |
| C13  | -0,683 | -2,856 | 0,000  | CT  | -0,188  | -0,193   | -0,271    | -0,482 | -0,505  | -0,623  |
| O7   | 4,149  | 1,936  | 0,000  | OH  | -0,610  | -0,534   | -0,544    | -0,653 | -0,575  | -0,586  |
| H1   | -3,344 | -2,586 | 0,000  | HC  | 0,096   | 0,070    | 0,075     | 0,040  | 0,019   | 0,022   |
| H3   | -5,734 | 0,746  | 0,000  | HC  | 0,109   | 0,084    | 0,086     | 0,071  | 0,048   | 0,051   |
| H4   | -3,809 | 2,279  | 0,000  | HC  | 0,129   | 0,100    | 0,107     | 0,190  | 0,149   | 0,149   |
| H6   | 1,522  | 2,472  | 0,000  | H   | 0,358   | 0,321    | 0,331     | 0,400  | 0,361   | 0,367   |
| H7   | 5,118  | 1,907  | 0,000  | HO  | 0,448   | 0,420    | 0,413     | 0,460  | 0,432   | 0,427   |
| H8   | 5,535  | -0,408 | 0,000  | HC  | 0,161   | 0,128    | 0,133     | 0,194  | 0,157   | 0,159   |
| H9   | 4,489  | -2,651 | 0,000  | HC  | 0,173   | 0,148    | 0,150     | 0,150  | 0,128   | 0,130   |
| H10  | 2,036  | -2,917 | 0,000  | HC  | 0,155   | 0,122    | 0,122     | 0,192  | 0,157   | 0,156   |
| H12a | -0,346 | 3,549  | 0,000  | HC  | 0,078   | 0,074    | 0,093     | 0,103  | 0,101   | 0,126   |
| H12b | -1,863 | 3,402  | -0,883 | HC  | 0,078   | 0,074    | 0,093     | 0,123  | 0,125   | 0,152   |
| H12c | -1,863 | 3,402  | 0,883  | HC  | 0,078   | 0,074    | 0,093     | 0,123  | 0,125   | 0,152   |
| H13a | -0,111 | -3,169 | 0,882  | HC  | 0,075   | 0,072    | 0,087     | 0,140  | 0,142   | 0,165   |
| H13b | -1,615 | -3,421 | 0,000  | HC  | 0,075   | 0,072    | 0,087     | 0,146  | 0,146   | 0,174   |
| H13c | -0,111 | -3,169 | -0,882 | HC  | 0,075   | 0,072    | 0,087     | 0,140  | 0,142   | 0,165   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -6,98  | -5,10   | -6,91   |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | 2,01   | -1,32   | 2,07    |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 4,77   | 5,19    | 5,23    |

**Tabulka P11.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro molekulu 9HNME<sup>+</sup> (9-hydroxy-2-methylelipticinium).

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| C1   | -2,893 | -1,398 | -0,004 | CA  | 0,000   | -0,027   | -0,039    | 0,112  | -0,021  | -0,069  |
| N2   | -4,165 | -0,978 | 0,025  | N*  | 0,077   | 0,099    | 0,129     | 0,140  | 0,232   | 0,303   |
| C3   | -4,451 | 0,372  | 0,039  | CA  | -0,134  | -0,112   | -0,120    | -0,165 | -0,198  | -0,249  |
| C4   | -3,447 | 1,288  | 0,021  | CA  | -0,147  | -0,121   | -0,110    | -0,201 | -0,100  | -0,024  |
| C4a  | -2,071 | 0,903  | -0,013 | CA  | 0,049   | 0,037    | 0,022     | 0,228  | 0,076   | -0,053  |
| C5   | -1,030 | 1,847  | -0,028 | CA  | 0,015   | 0,031    | 0,074     | -0,076 | 0,035   | 0,182   |
| C5a  | 0,264  | 1,321  | -0,012 | CN  | 0,021   | 0,006    | -0,003    | 0,262  | 0,169   | 0,074   |
| N6   | 1,442  | 2,004  | 0,003  | NA  | -0,293  | -0,230   | -0,252    | -0,484 | -0,390  | -0,400  |
| C6a  | 2,522  | 1,115  | 0,008  | CN  | 0,112   | 0,097    | 0,109     | 0,168  | 0,158   | 0,215   |
| C7   | 3,884  | 1,389  | 0,028  | CA  | -0,250  | -0,217   | -0,214    | -0,217 | -0,201  | -0,236  |
| C8   | 4,763  | 0,308  | 0,033  | CA  | -0,205  | -0,150   | -0,143    | -0,344 | -0,269  | -0,231  |
| C9   | 4,287  | -1,016 | 0,019  | C   | 0,287   | 0,216    | 0,197     | 0,451  | 0,362   | 0,319   |
| C10  | 2,915  | -1,283 | 0,000  | CA  | -0,225  | -0,154   | -0,135    | -0,403 | -0,317  | -0,270  |
| C10a | 2,018  | -0,208 | -0,009 | CB  | 0,002   | -0,004   | -0,014    | 0,129  | 0,110   | 0,047   |
| C10b | 0,565  | -0,095 | -0,022 | CB  | 0,039   | 0,027    | 0,034     | -0,194 | -0,164  | -0,094  |
| C11  | -0,452 | -1,034 | -0,042 | CA  | 0,012   | 0,023    | 0,045     | 0,288  | 0,245   | 0,248   |
| C11a | -1,797 | -0,530 | -0,022 | CA  | -0,024  | -0,017   | -0,023    | -0,303 | -0,152  | -0,090  |
| C12  | -1,260 | 3,339  | -0,036 | CT  | -0,217  | -0,210   | -0,282    | -0,365 | -0,384  | -0,503  |
| C13  | -0,114 | -2,504 | -0,079 | CT  | -0,144  | -0,156   | -0,219    | -0,378 | -0,388  | -0,482  |
| C2   | -5,286 | -1,936 | 0,048  | CT  | -0,192  | -0,194   | -0,265    | -0,404 | -0,403  | -0,488  |
| O9   | 5,117  | -2,095 | 0,026  | OH  | -0,605  | -0,517   | -0,518    | -0,631 | -0,540  | -0,539  |
| H1   | -2,767 | -2,472 | -0,006 | HC  | 0,188   | 0,154    | 0,157     | 0,171  | 0,154   | 0,160   |
| H2a  | -5,875 | -1,787 | 0,956  | HC  | 0,129   | 0,127    | 0,148     | 0,184  | 0,178   | 0,203   |
| H2b  | -5,918 | -1,780 | -0,830 | HC  | 0,129   | 0,127    | 0,148     | 0,184  | 0,178   | 0,202   |
| H2c  | -4,893 | -2,952 | 0,034  | HC  | 0,129   | 0,127    | 0,148     | 0,173  | 0,170   | 0,191   |
| H3   | -5,501 | 0,634  | 0,067  | HC  | 0,205   | 0,173    | 0,170     | 0,220  | 0,196   | 0,198   |
| H4   | -3,719 | 2,336  | 0,044  | HC  | 0,178   | 0,158    | 0,162     | 0,191  | 0,157   | 0,149   |
| H6   | 1,530  | 3,008  | 0,043  | H   | 0,343   | 0,316    | 0,320     | 0,394  | 0,359   | 0,359   |
| H7   | 4,262  | 2,407  | 0,041  | HC  | 0,200   | 0,171    | 0,168     | 0,201  | 0,176   | 0,178   |
| H8   | 5,835  | 0,492  | 0,048  | HC  | 0,168   | 0,139    | 0,143     | 0,203  | 0,169   | 0,169   |
| H9   | 6,042  | -1,803 | 0,041  | HO  | 0,456   | 0,428    | 0,419     | 0,452  | 0,424   | 0,415   |
| H10  | 2,596  | -2,317 | -0,003 | HC  | 0,216   | 0,171    | 0,177     | 0,254  | 0,206   | 0,210   |
| H12a | -0,422 | 3,866  | -0,503 | HC  | 0,088   | 0,087    | 0,105     | 0,122  | 0,122   | 0,151   |
| H12b | -2,148 | 3,616  | -0,611 | HC  | 0,088   | 0,087    | 0,105     | 0,132  | 0,134   | 0,159   |
| H12c | -1,380 | 3,742  | 0,978  | HC  | 0,088   | 0,087    | 0,105     | 0,130  | 0,134   | 0,160   |
| H13a | 0,408  | -2,803 | 0,838  | HC  | 0,073   | 0,074    | 0,084     | 0,130  | 0,131   | 0,146   |
| H13b | -0,978 | -3,160 | -0,190 | HC  | 0,073   | 0,074    | 0,084     | 0,116  | 0,118   | 0,141   |
| H13c | 0,556  | -2,716 | -0,918 | HC  | 0,073   | 0,074    | 0,084     | 0,131  | 0,132   | 0,148   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -10,20 | -8,21   | -10,12  |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | -1,88  | -5,35   | -1,93   |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 8,18   | 6,70    | 7,16    |

**Tabulka P12.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro molekulu 9AE+ (9-aminoelipticinium).

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| C1   | 3,018  | -1,862 | 0,006  | CA  | -0,011  | -0,042   | -0,044    | 0,147  | 0,026   | 0,006   |
| N2   | 4,325  | -1,556 | 0,030  | NA  | -0,132  | -0,105   | -0,105    | -0,252 | -0,157  | -0,132  |
| C3   | 4,779  | -0,258 | 0,042  | CA  | -0,179  | -0,155   | -0,158    | -0,081 | -0,117  | -0,151  |
| C4   | 3,877  | 0,759  | 0,024  | CA  | -0,090  | -0,066   | -0,046    | -0,216 | -0,110  | -0,038  |
| C4a  | 2,466  | 0,517  | -0,008 | CA  | 0,099   | 0,076    | 0,055     | 0,333  | 0,170   | 0,057   |
| C5   | 1,535  | 1,568  | -0,028 | CA  | -0,067  | -0,039   | 0,004     | -0,220 | -0,089  | 0,049   |
| C5a  | 0,189  | 1,190  | -0,012 | CN  | 0,028   | 0,010    | -0,007    | 0,263  | 0,152   | 0,079   |
| N6   | -0,902 | 1,999  | 0,001  | NA  | -0,232  | -0,174   | -0,194    | -0,401 | -0,307  | -0,327  |
| C6a  | -2,077 | 1,238  | 0,007  | CN  | 0,061   | 0,048    | 0,074     | 0,091  | 0,094   | 0,160   |
| C7   | -3,401 | 1,663  | 0,026  | CA  | -0,270  | -0,228   | -0,238    | -0,240 | -0,224  | -0,280  |
| C8   | -4,395 | 0,692  | 0,029  | CA  | -0,155  | -0,106   | -0,080    | -0,315 | -0,235  | -0,171  |
| C9   | -4,089 | -0,690 | 0,013  | CA  | 0,268   | 0,179    | 0,102     | 0,500  | 0,381   | 0,277   |
| C10  | -2,745 | -1,098 | -0,008 | CA  | -0,246  | -0,161   | -0,141    | -0,492 | -0,371  | -0,348  |
| C10a | -1,730 | -0,132 | -0,009 | CB  | 0,014   | 0,001    | 0,018     | 0,216  | 0,159   | 0,172   |
| C10b | -0,273 | -0,185 | -0,018 | CB  | 0,058   | 0,047    | 0,031     | -0,192 | -0,129  | -0,140  |
| C11  | 0,634  | -1,230 | -0,025 | CA  | -0,029  | -0,011   | 0,008     | 0,196  | 0,147   | 0,182   |
| C11a | 2,028  | -0,880 | -0,010 | CA  | 0,022   | 0,031    | 0,027     | -0,227 | -0,086  | -0,046  |
| C12  | 1,930  | 3,025  | -0,041 | CT  | -0,215  | -0,216   | -0,267    | -0,277 | -0,313  | -0,425  |
| C13  | 0,137  | -2,654 | -0,039 | CT  | -0,119  | -0,147   | -0,188    | -0,304 | -0,332  | -0,429  |
| N9   | -5,112 | -1,625 | 0,079  | N2  | -0,872  | -0,743   | -0,653    | -0,945 | -0,810  | -0,715  |
| H1   | 2,794  | -2,920 | 0,005  | HC  | 0,188   | 0,158    | 0,159     | 0,160  | 0,147   | 0,144   |
| H2   | 5,000  | -2,311 | 0,044  | H   | 0,336   | 0,323    | 0,330     | 0,359  | 0,333   | 0,336   |
| H3   | 5,852  | -0,122 | 0,069  | HC  | 0,222   | 0,188    | 0,185     | 0,209  | 0,185   | 0,186   |
| H4   | 4,253  | 1,774  | 0,045  | HC  | 0,162   | 0,144    | 0,145     | 0,180  | 0,146   | 0,135   |
| H6   | -0,877 | 3,008  | 0,042  | H   | 0,335   | 0,309    | 0,312     | 0,383  | 0,348   | 0,350   |
| H7   | -3,661 | 2,717  | 0,037  | HC  | 0,201   | 0,170    | 0,165     | 0,206  | 0,178   | 0,182   |
| H8   | -5,437 | 1,000  | 0,050  | HC  | 0,177   | 0,149    | 0,157     | 0,214  | 0,180   | 0,181   |
| H9a  | -4,897 | -2,560 | -0,243 | H2  | 0,377   | 0,351    | 0,313     | 0,393  | 0,367   | 0,329   |
| H9b  | -6,029 | -1,315 | -0,212 | H2  | 0,394   | 0,365    | 0,330     | 0,399  | 0,370   | 0,334   |
| H10  | -2,517 | -2,157 | -0,012 | HC  | 0,197   | 0,153    | 0,161     | 0,241  | 0,190   | 0,203   |
| H12a | 1,144  | 3,646  | -0,484 | HC  | 0,091   | 0,091    | 0,104     | 0,102  | 0,107   | 0,133   |
| H12b | 2,122  | 3,408  | 0,970  | HC  | 0,091   | 0,091    | 0,104     | 0,117  | 0,125   | 0,150   |
| H12c | 2,827  | 3,203  | -0,640 | HC  | 0,091   | 0,091    | 0,104     | 0,118  | 0,124   | 0,149   |
| H13a | -0,507 | -2,822 | -0,909 | HC  | 0,068   | 0,072    | 0,077     | 0,110  | 0,116   | 0,130   |
| H13b | 0,927  | -3,404 | -0,077 | HC  | 0,068   | 0,072    | 0,077     | 0,102  | 0,107   | 0,132   |
| H13c | -0,463 | -2,859 | 0,855  | HC  | 0,068   | 0,072    | 0,077     | 0,123  | 0,128   | 0,144   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -9,77  | -7,82   | -9,73   |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | -2,11  | -5,41   | -2,04   |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 8,40   | 6,52    | 6,79    |

**Tabulka P13.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro pár bází adenine-thymin.

| Atom | x      | y      | z      | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|--------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| AN1  | -0,991 | 0,407  | 0,000  | NC  | -0,112  | -0,085   | -0,084    | -0,576 | -0,493  | -0,506  |
| AC2  | -1,619 | 1,598  | 0,000  | CQ  | 0,172   | 0,138    | 0,095     | 0,386  | 0,324   | 0,278   |
| AN3  | -2,929 | 1,841  | 0,000  | NC  | -0,642  | -0,559   | -0,539    | -0,757 | -0,661  | -0,640  |
| AC4  | -3,633 | 0,698  | 0,000  | CB  | 0,492   | 0,418    | 0,408     | 0,702  | 0,610   | 0,601   |
| AC5  | -3,129 | -0,606 | 0,000  | CB  | 0,203   | 0,234    | 0,259     | -0,065 | 0,005   | 0,038   |
| AC6  | -1,720 | -0,733 | 0,000  | CA  | 0,151   | 0,079    | 0,066     | 0,662  | 0,520   | 0,510   |
| AN6  | -1,089 | -1,919 | 0,000  | N2  | -0,562  | -0,483   | -0,475    | -0,921 | -0,798  | -0,800  |
| AN7  | -4,147 | -1,544 | 0,000  | NB  | -0,546  | -0,501   | -0,496    | -0,570 | -0,528  | -0,524  |
| AC8  | -5,241 | -0,823 | 0,000  | CK  | 0,125   | 0,102    | 0,085     | 0,292  | 0,258   | 0,240   |
| AN9  | -5,000 | 0,537  | 0,000  | NA  | -0,440  | -0,377   | -0,376    | -0,618 | -0,548  | -0,550  |
| AH   | -5,682 | 1,283  | 0,000  | H   | 0,363   | 0,336    | 0,339     | 0,411  | 0,382   | 0,387   |
| AH2  | -0,956 | 2,461  | 0,000  | HC  | 0,182   | 0,139    | 0,146     | 0,158  | 0,119   | 0,128   |
| AH61 | -1,640 | -2,765 | 0,000  | H2  | 0,338   | 0,310    | 0,304     | 0,422  | 0,385   | 0,381   |
| AH62 | -0,068 | -1,968 | 0,000  | H2  | 0,295   | 0,272    | 0,257     | 0,455  | 0,414   | 0,406   |
| AH8  | -6,249 | -1,217 | 0,000  | HC  | 0,180   | 0,153    | 0,161     | 0,136  | 0,112   | 0,121   |
| TN1  | 3,884  | 1,580  | 0,000  | N   | -0,329  | -0,251   | -0,280    | -0,548 | -0,434  | -0,470  |
| TC2  | 2,491  | 1,646  | 0,000  | C   | 0,487   | 0,369    | 0,370     | 0,780  | 0,622   | 0,659   |
| TN3  | 1,888  | 0,404  | 0,000  | NA  | 0,043   | 0,045    | -0,007    | -0,423 | -0,361  | -0,491  |
| TC4  | 2,517  | -0,835 | 0,000  | C   | 0,469   | 0,353    | 0,331     | 0,720  | 0,556   | 0,561   |
| TC5  | 3,982  | -0,810 | 0,000  | CM  | -0,018  | 0,020    | 0,076     | -0,091 | -0,005  | 0,066   |
| TC6  | 4,591  | 0,399  | 0,000  | CM  | -0,196  | -0,206   | -0,218    | -0,026 | -0,082  | -0,094  |
| TC7  | 4,717  | -2,119 | 0,000  | CT  | -0,274  | -0,237   | -0,304    | -0,434 | -0,417  | -0,524  |
| TH   | 4,356  | 2,473  | 0,000  | H   | 0,336   | 0,312    | 0,317     | 0,378  | 0,348   | 0,352   |
| TO2  | 1,888  | 2,707  | 0,000  | O   | -0,557  | -0,472   | -0,461    | -0,627 | -0,535  | -0,533  |
| TH3  | 0,843  | 0,409  | 0,000  | H   | -0,161  | -0,111   | -0,048    | 0,160  | 0,176   | 0,286   |
| TO4  | 1,860  | -1,881 | 0,000  | O   | -0,507  | -0,434   | -0,409    | -0,621 | -0,533  | -0,517  |
| TH71 | 5,801  | -1,966 | 0,000  | HC  | 0,093   | 0,083    | 0,096     | 0,121  | 0,115   | 0,138   |
| TH72 | 4,450  | -2,718 | -0,878 | HC  | 0,093   | 0,083    | 0,096     | 0,145  | 0,137   | 0,159   |
| TH73 | 4,450  | -2,718 | 0,878  | HC  | 0,093   | 0,083    | 0,096     | 0,145  | 0,137   | 0,159   |
| TH6  | 5,671  | 0,506  | 0,000  | HC  | 0,228   | 0,190    | 0,194     | 0,205  | 0,176   | 0,179   |
|      |        |        |        |     |         |          | HOMO      | -8,09  | -5,78   | -8,08   |
|      |        |        |        |     |         |          | LUMO      | 3,00   | -0,90   | 2,95    |
|      |        |        |        |     |         |          | dip. mom. | 2,10   | 1,65    | 1,3     |

**Tabulka P14.** Geometrie, typy atomů AMBER, RESP a ESP náboje odvozené z vlnových funkcí Hartree-Fock, DFT (B3LYP) a MP2(0.25), energie hraničních orbitalů [eV] a dipólové momenty [D] pro pár bází guanin-cytosin.

| Atom | x      | y      | z     | typ | RESP-HF | RESP-DFT | RESP-MP2  | ESP-HF | ESP-DFT | ESP-MP2 |
|------|--------|--------|-------|-----|---------|----------|-----------|--------|---------|---------|
| GN1  | 0,734  | 0,251  | 0,000 | NA  | -0,020  | -0,003   | -0,038    | -0,886 | -0,773  | -0,882  |
| GC2  | 1,285  | 1,512  | 0,000 | CA  | 0,523   | 0,389    | 0,348     | 1,081  | 0,893   | 0,899   |
| GN3  | 2,592  | 1,737  | 0,000 | NC  | -0,631  | -0,546   | -0,512    | -0,832 | -0,727  | -0,709  |
| GC4  | 3,307  | 0,593  | 0,000 | CB  | 0,316   | 0,265    | 0,227     | 0,577  | 0,499   | 0,474   |
| GC5  | 2,861  | -0,733 | 0,000 | CB  | 0,108   | 0,152    | 0,196     | -0,088 | -0,021  | 0,010   |
| GC6  | 1,448  | -0,964 | 0,000 | CA  | 0,365   | 0,267    | 0,255     | 0,762  | 0,618   | 0,643   |
| GN7  | 3,926  | -1,619 | 0,000 | NB  | -0,507  | -0,475   | -0,483    | -0,517 | -0,487  | -0,494  |
| GC8  | 4,985  | -0,854 | 0,000 | CK  | 0,100   | 0,091    | 0,080     | 0,219  | 0,202   | 0,192   |
| GN9  | 4,676  | 0,498  | 0,000 | NA  | -0,325  | -0,282   | -0,272    | -0,533 | -0,473  | -0,468  |
| GH1  | -0,295 | 0,161  | 0,000 | H   | -0,116  | -0,090   | -0,036    | 0,453  | 0,410   | 0,503   |
| GN2  | 0,422  | 2,550  | 0,000 | N2  | -0,764  | -0,632   | -0,625    | -1,183 | -1,015  | -1,035  |
| GH21 | -0,595 | 2,434  | 0,000 | H2  | 0,416   | 0,348    | 0,339     | 0,589  | 0,508   | 0,508   |
| GH22 | 0,822  | 3,474  | 0,000 | H2  | 0,370   | 0,334    | 0,332     | 0,468  | 0,424   | 0,427   |
| GO6  | 0,838  | -2,043 | 0,000 | OS  | -0,532  | -0,458   | -0,445    | -0,674 | -0,585  | -0,583  |
| GH   | 5,316  | 1,279  | 0,000 | H   | 0,329   | 0,303    | 0,304     | 0,394  | 0,363   | 0,366   |
| GH8  | 6,011  | -1,199 | 0,000 | HC  | 0,162   | 0,133    | 0,141     | 0,136  | 0,108   | 0,116   |
| CN1  | -4,354 | 0,909  | 0,000 | NA  | -0,169  | -0,093   | -0,106    | -0,627 | -0,474  | -0,485  |
| CC2  | -2,951 | 1,067  | 0,000 | CA  | 0,450   | 0,317    | 0,309     | 1,033  | 0,814   | 0,812   |
| CN3  | -2,200 | -0,065 | 0,000 | NC  | -0,154  | -0,061   | -0,056    | -0,980 | -0,774  | -0,788  |
| CC4  | -2,770 | -1,276 | 0,000 | CA  | 0,467   | 0,281    | 0,259     | 1,316  | 1,019   | 1,009   |
| CC5  | -4,205 | -1,442 | 0,000 | CA  | -0,283  | -0,163   | -0,145    | -0,773 | -0,576  | -0,556  |
| CC6  | -4,955 | -0,312 | 0,000 | CA  | -0,142  | -0,195   | -0,218    | 0,256  | 0,129   | 0,104   |
| CH   | -4,891 | 1,766  | 0,000 | H   | 0,283   | 0,262    | 0,267     | 0,379  | 0,342   | 0,346   |
| CO2  | -2,494 | 2,214  | 0,000 | OS  | -0,611  | -0,511   | -0,500    | -0,762 | -0,642  | -0,633  |
| CN4  | -1,964 | -2,343 | 0,000 | N2  | -0,841  | -0,681   | -0,671    | -1,383 | -1,167  | -1,171  |
| CH41 | -2,352 | -3,274 | 0,000 | H2  | 0,418   | 0,373    | 0,371     | 0,523  | 0,468   | 0,469   |
| CH42 | -0,933 | -2,229 | 0,000 | H2  | 0,409   | 0,355    | 0,349     | 0,646  | 0,571   | 0,573   |
| CH5  | -4,662 | -2,424 | 0,000 | HC  | 0,159   | 0,131    | 0,134     | 0,243  | 0,201   | 0,204   |
| CH6  | -6,040 | -0,319 | 0,000 | HC  | 0,219   | 0,191    | 0,194     | 0,161  | 0,145   | 0,149   |
|      |        |        |       |     |         |          | HOMO      | -7,39  | -5,01   | -7,39   |
|      |        |        |       |     |         |          | LUMO      | 2,66   | -1,21   | 2,65    |
|      |        |        |       |     |         |          | dip. mom. | 6,58   | 6,16    | 5,72    |



## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Dalton L. K., Demerac S., Elmes B. C., Loder J. W., Swan J. M., Teitei T.: *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 2715.
2. Le Pecq J. B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *7*, 5078.
3. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Biomed. Pharmacother.* **1998**, *52*, 391.
4. Le Pecq J. B., Gosse C., Dat Xuong N., Paoletti C.: *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **1975**, *281*, 1365.
5. Acton E. M., Narayanan V. L., Risbood P. A., Shoemaker R. H., Vistica D. T., Boyd M. R.: *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2185.
6. Juret P., Tanguy A., Girard A.: *Nouv. Presse Med.* **1979**, *8(18)*, 1495.
7. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha, **1996**.
8. Hagg M., Berndtsson M., Mandic A., Zhou R., Shoshan M.C., Linder S.: *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 489.
9. Huang Y., Blower P. E., Yang C., Barbacioru C., Dai Z., Zhang Y., Xiao J. J., Chan K. K., Sadee W.: *Pharmacogenomics J.* **2005**, *5*, 112.
10. Liu J., Zeng F., Allen C.: *J. Controlled Release* **2005**, *103(2)*, 481.
11. Malonne H., Farinelle S., Decaestecker C., Gordower L., Fontaine J., Chaminade F., Saucier J. M., Atassi G., Kiss R.: *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3774.
12. Moody T. W., Czerwinski G., Tarasova N. I., Moody D. L., Michejda C. J.: *Regul. Pept.* **2004**, *123*, 187.
13. Moinet-Hedin V., Tabka T., Poulain L., Godard T., Lechevrel M., Saturnino C., Lancelot J. C., Le Talaer J. Y. a Gauduchon P.: *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 109.
14. Peng Y., Li C., Chen L., Sebti S., Chen J.: *Oncogene* **2003**, *22*, 4478.
15. Mathé G., Morette C., Hallard M., Pontiggia P., Blanquet D., Hage F.: *Acta Pharmacol. Sin.* **2002**, *23*, 1.
16. Paoletti C., Le Pecq J. B., Dat-Xuong N., Juret P., Garnier H., Amiel J. L., Rouesse J.: *Recent Results Cancer Res.* **1980**, *74*, 107.
17. Auclair C.: *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *259*, 1.
18. Mondesir J. M., Bidart J. M., Goodman A. et al.: *J. Clin. Oncol.* **1985**, *3*, 735.
19. Fillastre J. P., Moulin B., Godin M., Josse S.: *Pathol. Biol.* **1986**, *34*, 1013.
20. Chadwick M., Silveira D. M., Platz B. B., Hayes D.: *Drug Metab. Dispos.* **1978**, *6*, 528.
21. Vistica D. T., Kenney S., Hursey M. L., Boyd M. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *200*, 1762.

22. Branfman A. R., Bruni R. J., Reinhold V. N., Silveira D. M., Chadwick M., Yesair D. W.: *Drug Metab. Dispos.* **1978**, *6*, 542.
23. Lesca P., Beaune P., Monsarrat B.: *Chem. Biol. Interact.* **1981**, *36*, 299.
24. Lesca P., Monsarrat B., Cros S., Paoletti C.: *J. Natl. Cancer Inst.* **1981**, *67*, 871.
25. Aimová D.: *Disertační práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2005**.
26. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8374.
27. Schwaller M. A., Allard B., Sureau F., Moreau F.: *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4209.
28. Paoletti C., Cros S., Dat Xuong N., Lecoite P., Moisand A.: *Chem. Biol. Interact.* **1979**, *25*, 45.
29. Ashby J., Elliott B. M., Styles J. A.: *Cancer Lett.* **1980**, *9*, 21.
30. Fossé P., René B., Charra M., Paoletti C., Saucier J. M.: *Mol. Pharmacol.* **1992**, *42*, 590.
31. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thopson R. B.: *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14998.
32. Huff A. C., Kreuzer K. N.: *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20496.
33. Monnot M., Mauffret O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J. M., Charra M., Belehradek J., Jr., Femandjian S.: *J. Biol. Chem.* **1991**, *25*, 1820.
34. Ross W. E., Bradley M. O.: *Biochim. Biophys. Acta.* **1981**, *654*, 129.
35. Tewey K. M., Chen G. L., Nelson E. M., Liu L. F.: *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 9182.
36. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn J. Cancer Res.* **1995**, *86*, 819.
37. Sugikawa E., Hosoi T., Yazaki N., Gamanuma M., Nakanishi N., Ohashi M.: *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 3099.
38. Faddeeva M. D., Beliaeva T. N.: *Tsitologiia* **1997**, *39*, 181.
39. Schwaler M. A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22709.
40. Sureau F., Moreau F., Millot J. M., Manfait M., Allard B., Aubard J., Schwaller M. A. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1767.
41. Sato N., Mizumoto K., Kusumoto M., Niiyama H., Maehara N., Ogawa T., Tanaka M.: *FEBS Let.* **1998**, *441*, 318.
42. Stiborová M., Bieler C. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 1675.
43. Waring M. J.: *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 159.
44. Gribble G. W., Saulnier M. G.: *Heterocycles* **1985**, *23*, 1277.
45. Barone R., Chanon M.: *Heterocycles* **1981**, *16*, 1357.
46. Dormoy J.R., Heymes A.: *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2915.
47. Hewlins M.J.E., Oliveira-Campos A.M., Shannon P.V.R.: *Synthesis* **1984**, 289.
48. Kansal V.K., Potier P.: *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2389.

49. Sainsbury M.: *Synthesis* **1977**, 437.
50. Waring M.J.: *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 159.
51. Lerman L. S.: *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18.
52. Waring M. J.: *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269.
53. Morin G. B.: *Cell* **1989**, *59*, 529.
54. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W.: *Science* **1994**, *266*, 2011.
55. Bailly C.: *Methods in Enzymol.* **2001**, *340*, 610.
56. Marchand C., Neamati N., Pommier Y.: *Methods in Enzymol.* **2001**, *340*, 624.
57. Galas D. J., Schmitz A.: *Nucleic Acid Res.* **1978**, *5*, 3157.
58. Mergny J. L., Colier D., Rougée M., Montenay-Garestier T., Hélène C.: *Nucleic Acid Res.* **1991**, *19*, 1521.
59. Marchand C., Bailly C., Nguyen C. H., Bisagni E., Garestier T., Hélène C., Waring M. J.: *Biochemistry* **1996**, *35*, 5022.
60. Ren J., Chaires J. B.: *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067.
61. Rentzeperis D., Marky L. A.: *J. Am. Chem. Soc.*: **1995**, *117*, 5423.
62. Jain S. C., Bhandary K. K., Sobell H. M.: *J. Mol. Biol.* **1979**, *135*, 813.
63. Feigon J., Denny W. A., Leupin W., Kearns D. R.: *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 450.
64. Mauffret O., Rene B., Convert O., Monnot M., Lescot E., Femandijan S.: *Biopolymers* **1991**, *31*, 1325.
65. Woodward R. B., Iacobucci G. A., Hochstein F. A.: *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4434.
66. Cranwell P. A., Saxton J. E.: *J. Chem. Soc.* **1962**, 3482.
67. Jackson A. H., Jenkins P. R., Shannon P. V. R.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 1698.
68. Siriam K., Boyd M. R., Vistica D. T., Ravindranath V.: *Neurotoxicology* **1997**, *18*, 97.
69. Haider N.: *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 511.
70. Rivalle C., Durocq C., Bisagni E.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 138.
71. Fraser H. L., Gribble G. W.: *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1515.
72. Oikawa Y., Tanaka M., Hirasawa H., Yonemitsu O.: *Heterocycles* **1981**, *15*, 207.
73. Fujivara A. N., Acton E. M., Goodman L.: *J. Heterocycl. Chem.* **1968**, *5*, 853.
74. Gribble G. W., Saulnier M. G., Obazanutaitis J. A., Ketcha D. M.: *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5891.
75. Boogaard A. T., Pandit U. K., Koomen G. J.: *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4811.
76. Archer S., Ross B. S., Pica-Mattoccia L., Cioli D.: *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1204.
77. Ratcliffe A. J., Sainsbury M., Smith A. D., Scopes D. I.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 2933.
78. Hogan I., Jenkins P. D., Sainsbury M.: *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2943.

79. Walling C., Zhao C., El-Taliawi G. M.: *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4910.
80. Ferguson L. N.: *Chem. Rev.* **1946**, *38*, 227.
81. Guthrie R. W., Brossi A., Mennona F. A., Mullin J. G., Kierstead R. W.: *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 755.
82. Sainsbury M., Webb B.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 1580.
83. Trent J. O.: *Methods in Enzymol.* **2001**, *340*, 290.
84. Letellier R., Taillandier E., Bertrand J. R., Malvy C.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *9*, 579.
85. Elcock A. H., Rodger A., Richards W. G.: *Biopolymers* **1996**, *39*, 309.
86. Shimamoto T., Imajo S., Honda T., Yoshimura S., Ishiguro M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1331.
87. Řeha D., Kabeláč M., Ryjáček F., Šponer J., Šponer J. E., Elstner M., Suhai S., Hobza P.: *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3366.
88. Hobza P., Šponer J.: *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3247.
89. Bondarev D. A., Skawinski W. J., Venanzi C. A.: *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 815.
90. Alhambra C., Luque F. J., Gago F., Orozco M.: *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 3486.
91. Besler B. H., Merz K. M., Jr., Kollman P. A.: *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 431.
92. Šponer J., Leszczynski J., Hobza P.: *Biopolymers* **2002**, *61*, 3.
93. Hobza P., Kabeláč M., Šponer J., Mejzlík P., Vondrášek J.: *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1136.
94. Hobza P., Šponer J., Leszczynski J.: *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 8038.
95. Boys S. F., Bernardi F.: *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553.
96. Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W. D., Kollman P. A.: *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269.
97. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta S., Jr., Weiner P.: *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765.
98. Weiner S. J., Kollman P. A., Nguyen D. T., Case D. A.: *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230.
99. Wang J., Cieplak P., Kollman P. A.: *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049.
100. Lifson S., Hagler A. T., Dauber P. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5111.
101. Šponer J., Leszczynski J., Hobza P.: *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5590.
102. Pelton J. G., Wemmer D. E.: *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1393.
103. Jones R. L., Scott E. V., Zon G., Marzilli L. G., Wilson W. D.: *Biochemistry* **1988**, *27*, 6021.
104. Tang P., Jong C. L., Harbison G. S.: *Science* **1990**, *249*, 70.
105. Gao X., Patel D. J.: *Biochemistry* **1989**, *28*, 751.
106. Neuhaus D., Williamson M. P.: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2nd ed., str. 37, Wiley-VCH, New York, **2000**.
107. Bax A., Freeman R.: *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542.

108. Braunschweiler L., Ernst R. R.: *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521.
109. Patel D. J., Pardi A., Itakura K.: *Science* **1982**, *216*, 581.
110. Isaacs R.J., Spielmann H.P.: *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 525.
111. Croasmun W. R., Carlson R. M. K.: *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, str. 706 – 711, VCH Publishers, Inc., **1994**.
112. Roberts J. D.: *ABCs of FT-NMR*, University Science Books **2000**.
113. Assa-Munt N., Leupin W., Denny W. A., Kearns D. R.: *Biochemistry* **1985**, *24*, 1449.
114. Patel D. J., Canuel L. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 3343.
115. Sainsbury M., Weerasinghe D., Dolman D.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 587.
116. Dharmasena P., Oliveira-Campos A. M. F., Gueiroz M. J. R. P., Raposo M. M. M., Shannon P. V. R., Webb C. M.: *J. Chem. Res-S* **1997**, *11*, 398.
117. Hall R. J., Shannon P. V. R., Oliveiracampos A. M. F., Gueiroz M. J. R. P.: *J. Chem. Res-S* **1992**, *1*, 2.
118. Dharmasena P. M., Shanon P. V. R.: *Tetrahedron Lett.* **1994**, *38*, 7119.
119. Dharmasena P., Oliveira-Campos A. M. F., Queiroz M. J. R. P., Shannon P. V. R.: *J. Chem. Res-S* **1996**, *12*.
120. Hall R. J., Jackson A. H., Oliveira-Campos A. M. F., Shannon P. V. R.: *J. Chem. Res-S* **1990**, 314.
121. Dalton L. K., Demerac S., Teitei T.: *Aust. J. Chem.* **1969**, *22*, 185.
122. Lallemand J. Y., Lemaitre P., Beeley L., Lesca P., Mansuy D.: *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1261.
123. Sainsbury M., Smith A. D., Vong K. K., Scopes D. I. C.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 2945.
124. Chunchatorasert L., Dharmasena P., OliveiraCampos A. M. F., et al.: *J. Chem. Res-S* **1996**, *2*, 84.
125. Hewlins M. J. E., Jackson A., Oliveira-Campos A. M., Shannon P. V. R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2906.
126. Gansser C., Leveque X., Plat M., Viel C., Meriene C. et al.: *Farmaco Ed. Sci.* **1982**, *37(5)*, 283.
127. Formysin P., Bourgois J.: *Pharmazie* **1993**, *48(5)*, 352.
128. Hall R. J., Dharmasena P., Marchant J., Oliveira-Campos A. M. F., Queiroz M. J. R. P., Raposo M. M., Shannon P. V. R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1879.
129. Anderson W. K., Gopalsamy A., Reddy P. S.: *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1955.
130. Sainsbury M., Webb B., Schinazi R.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1975**, 289.
131. Devraj R., Barrett J. F., Fernandez J. A., Katzenellenbogen J. A., Cushman M.: *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3367.

132. Harada N., Ozaki K., Oda K., Nakanishi N., Ohashi M., Hashiyama T., Tsujihara K.: *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1156.
133. Diaz M., Cobas A., Guitian E., Castedo L.: *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, *23*, 4543.
134. Marsais F., Pineau P., Nivolliers F., Mallet M., Turck A. et al.: *J. Org. Chem.* **1992**, *57(2)*, 565.
135. Bisagni E., Ducrocq C., Lhoste J. M., Rivalle A., Civier A.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1978**, 1706.
136. Rivalle C., Bisagni E.: *Heterocycles* **1994**, *38*, 391.
137. Popp F., Veeraraghavan S.: *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 1275.
138. Boogaard A. T., Pandit U. K., Koomen G. J.: *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2551.
139. Veeraraghavan S., Popp F. D.: *Synthesis* **1980**, *5*, 384.
140. Guillonneau C., Pierre A., Charton Y., Guilbaud N., Kraus-Berthier L., Leonce S., Michel A., Bisagni E., Atassi G.: *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2191.
141. Jasztold H. R., Landras C., Pierre A., Atassi G., Guilbaud N. et al.: *J. Med. Chem.* **1994**, *37(15)*, 2445.
142. Larue L., Rivalle C., Muzard G., Paoletti C., Bisagni E., Paoletti J.: *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1951.
143. Ducrocq C., Wendling F., Tourbez P. M., Rivalle C., Tambourin P. et al.: *J. Med. Chem.* **1980**, *23(11)*, 1212.
144. Harada N., Kawauchi T., Inoue I., et al.: *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 134.
145. Langendoen A., Plug J. P. M., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1759.
146. Etemadmoghdam G., Ding L., Tadj F., Meunier B.: *Tetrahedron* **1989**, *45*, 2641.
147. Jurayj J., Haugwitz R. D., Varma R. K., Paull K. D., Barrett J. F., Cushman M.: *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2190.
148. Wijsmuller W. F. A., Wanner M. J., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Heterocycles* **1986**, *24*, 1795.
149. Ishikura M., Hino A., Yaginuma T., Agata I., Katagiri N.: *Tetrahedron* **2000**, *56*, 193.
150. Wanner M. J., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Tetrahedron* **1983**, *39*, 3673.
151. Driver M., Matthews I. T., Sainsbury M.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 2506.
152. Taylor D. A., Baradarani M. M., Martinez S. J., Joule J. A.: *J. Chem. Res-S* **1979**, *12*, 387.
153. Modi S. P., Michael M. A., Archer S., Carey J. J.: *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6539.
154. Modi S. P., McComb T., Zayed A. H.: *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5555.
155. Langendoen A., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Heterocycles* **1987**, *26*, 69.
156. Langendoen A., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Tetrahedron* **1988**, *44*, 3627.

157. Ruckdeschel J. C., Modi S. P., Elhamouly W., Portuese E., Archer S.: *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4854.
158. Haider N., Mereiter K., Wanko R.: *Heterocycles* **1995**, *41*, 1445.
159. Sainsbury M., Schinazi R. F.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1976**, 1155.
160. Plug J. P. M., Koomen G. J., Pandit U. K.: *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2179.
161. Honda T., Kato M., Inoue M., Shimamoto T., Shima K., Nakanishi T., Yoshida T., Noguchi T.: *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1295.
162. Grummitt A. R., Harding M. M., Anderberg P. I., Rodger A.: *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *1*, 63.
163. Bessodes M., Antonakis K.: *J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* **1977**, *4(3&4)*, 215.
164. Rigaudy P., Charcosset J. Y., Garbay J. C., Jacquemin S. A., Roques B. P.: *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1836.
165. Auclair C., Voisin E., Banoun H., Paoletti C., Bernadou J., Meunier B.: *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1161.
166. Bazile D., Guittet E., Piriou J. M., Lebret M., Paoletti J.: *Biopolymers* **1990**, *29*, 1077.
167. Routier S., Bernier J. L., Catteau J. P., Colson P., Houssier C., Rivalle C., Bisagni E., Bailly C.: *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 789.
168. Ding L., Etemadomoghadam G., Cros S., Auclair C., Meunier B.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *22*, 1711.
169. Pelaprat D., Delbarre A., Le Guen I., Roques B. P., Le Pecq J. B.: *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 1336.
170. Michel S., Tillequin F., Koch M.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, *4*, 229.

## PODĚKOVÁNÍ

Můj největší dík patří mému školiteli Doc. RNDr. Janu Sejbaloovi, CSc bez jehož cenných a inspirativních rad by tato práce nemohla vzniknout. Tímto bych chtěl tuto disertační práci věnovat jeho památce.

Velmi bych chtěl poděkovat Dr. Miloši Buděšínskému a profesoru Tomáši Trnkovi za konzultace při vytváření závěrečné prezentace a paní docentce Marii Stiborové za pomoc při výběru tématu disertační práce a cenné konzultace.

Děkuji RNDr. M. Štíchovi za měření EI-MS, RNDr. S. Hilgardovi za měření IR spekter a Barboře Rygerové za pomoc při syntéze elipticinu ve větším měřítku.

Dále děkuji Hlávkově nadaci Nadání, Fondu mobility Univerzity Karlovy a programu Erasmus za financování mého studijního pobytu na univerzitě Alcalá de Henares ve Španělsku, během kterého vznikla část této disertační práce.

Na závěr bych chtěl poděkovat Mgr. Simoně Hybelbauerové, Dr. Ivě Tišlerové, Prof. Obisi Castañovi, Luis Manuel Frutosovi, Raulu Palmeirovi, Unai Sancho Reyovi a všem ostatním spolupracovníkům za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a oporu během mého doktorského studia. Můj speciální dík patří mojí ženě Heleně.