

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Petra Škodová

Příprava derivátů protinádorového léčiva ellipticinu a jejich oxidace cytochromy P450

Preparation of derivatives of anticancer drug ellipticine and their oxidation by
cytochromes P450

Diplomová práce

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: Ing. Radek Gažák, PhD.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 8. 2013

Petra Škodová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu a odborné vedení diplomové práce. Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Radku Gažákovi PhD., který mi umožnil vypracovat část diplomové práce týkající se organických syntéz ve své laboratoři. Děkuji mu také za jeho odborné rady a trpělivý přístup během práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za morální podporu a vytvoření dobrého studijního prostředí během celého studia, zejména pak během psaní diplomové práce.

Abstrakt

Ellipticin je rostlinný alkaloid, který vykazuje významnou protinádorovou aktivitu, díky níž byl od 60. let 20. století středem zájmu. Od jeho objevení až po současnost byla publikována řada syntetický přístupů k získání tohoto protinádorového léčiva. Ellipticin je vlastně proléčivo, jehož farmakologické účinky jsou závislé na aktivaci dvěma skupinami enzymů, cytochromy P450 a peroxidasami. Výsledkem působení uvedených skupin enzymů jsou buď detoxikační, nebo aktivační metabolity ellipticinu. 13-Hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin jsou produkty aktivačních reakcí, které se následně spontánně štěpí na karbeniové ionty, v této podobě se váží na deoxyguanosin za tvorby aduktů s DNA.

13-Hydroxyellipticin může mít potenciálně vyšší biologický účinek než ellipticin, a to právě díky tvorbě aduktů s DNA, pro kterou nevyžaduje enzymovou aktivaci. Záměrem diplomové práce byla proto snaha o syntézu tohoto derivátu. Meziproduktem při syntéze 13-hydroxyellipticinu je jiný derivát – 9-nitroellipticin. Výsledky diplomové práce ukazují, že oxidací 9-nitroellipticinu jaterním mikrosomálním systémem, jenž obsahuje cytochromy P450, vznikají minimálně 4 metabolity. 9-Nitroellipticin tak vykazuje podobné chování jako ellipticin. Redukcí nitroskupiny v poloze C-9 ellipticinu byl připraven 9-aminoellipticin. Tento 9-aminoderivát ellipticinu stejně jako 9-hydroxyellipticin nejsou oxidovány potkaními jaterními mikrosomy. Vlastnosti funkční skupiny přítomné v poloze C-9 ellipticinu ovlivňují hydrofobicitu molekuly, a tím i její metabolismus.

Klíčová slova

Ellipticin, 13-hydroxyellipticin, 9-nitroellipticin, cytochromy P450, potkaní jaterní mikrosomy

Abstract

Ellipticine is a plant alkaloid, which exhibits significant antitumor activity; therefore it was a center of interest since 60's of 20th century. There were a lot of ways published to obtain this anticancer drug. Ellipticine is actually a pro-drug, whose pharmacological efficiencies are dependent on the activation of two groups of enzymes, cytochrome P450 and peroxidases. The resulting effect of these groups of enzymes is either detoxification or activation of ellipticine metabolites. 13-Hydroxyellipticine and 12-hydroxyellipticine are products of activation reactions, which subsequently spontaneously cleave to carbenium ions, which in this form are bound to deoxyguanosine while generating DNA adducts.

13-Hydroxyellipticine may have potentially higher biological efficiencies than ellipticine, because it does not need enzymes for its activation and formation of DNA adducts. The aim of the diploma thesis was to synthesize this ellipticine derivative. 9-Nitroellipticin (another derivative of ellipticine) is an intermediate product of the 13-hydroxyellipticine synthesis. Results of this diploma thesis show that 9-nitroellipticine is oxidized by liver microsomal systems, which contain cytochromes P450, forming at least 4 metabolites. 9-Nitroellipticine shows similar behavior as ellipticine. Another ellipticine derivative, 9-aminoellipticine was prepared by reduction of the nitro group in position C-9 of ellipticine. This 9-aminoderivative of ellipticine, similar to 9-hydroxyellipticine, is not oxidized by rat liver microsomes. Properties of functional groups present at the C-9 of ellipticine affects the hydrophobicity of molecule and its metabolism.

Key words

Ellipticine, 13-hydroxyellipticine, 9-nitroellipticine, cytochrome P450, rat liver microsomes

Obsah

Seznam použitých zkratek a značek.....	9
1 Úvod.....	11
1.1 Ellipticin.....	11
1.2 Syntéza ellipticinu.....	12
1.2.1 Syntéza ellipticinu podle strategie III.....	13
1.2.2 Syntéza 13-hydroxyellipticinu.....	15
1.3 Mechanismus protinádorového účinku ellipticinu.....	19
1.4 Biotransformace ellipticinu.....	20
1.4.1 Metabolická přeměna ellipticinu cytochromy P450.....	21
1.4.2 Metabolická přeměna ellipticinu peroxidasami.....	23
1.4.3 Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem po jeho aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami.....	24
2 Cíl diplomové práce.....	29
3 Materiál a metody.....	30
3.1 Použitý materiál a chemikálie.....	30
3.2 Použité přístroje.....	31
3.3 Metody.....	32
3.3.1 Syntéza 9-nitroellipticinu.....	32
3.3.2 Syntéza 9-aminoellipticinu.....	37
3.3.3 Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu.....	39
3.3.4 Pokus o syntézu 13-hydroxyellipticinu.....	40
3.3.5 NMR spektrometrie.....	41
3.3.6 Hmotnostní spektrometrie.....	42

3.3.7	Studium metabolismu ellipticinu a jeho derivátů 9-nitroellipticinu, 9-hydroxyellipticinu a 9-aminoellipticinu jaterním mikrosomálním systémem	42
3.3.7.1	Oxidace ellipticinu	42
3.3.7.2	Oxidace 9-nitroellipticinu	43
3.3.7.3	Oxidace 9-aminoellipticinu	44
3.3.7.4	Oxidace 9-hydroxyellipticinu	45
3.3.8	Separace metabolitů vzniklých oxidací 9-nitroellipticinu a ellipticinu pomocí HPLC	46
3.3.9	Oxidace 9-aminoellipticinu a 9-hydroxyellipticinu potkaním jaterním mikrosomálním systémem analyzovaná pomocí HPLC	46
4	Výsledky	47
4.1	Syntéza 9-nitroellipticinu	47
4.2	Syntéza 9-aminoellipticinu	49
4.3	Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu	50
4.4	Syntéza 13-hydroxyellipticinu	51
4.5	Metabolismus ellipticinu a jeho derivátů jaterním mikrosomálním systémem ...	54
4.5.1	Oxidace ellipticinu	54
4.5.2	Oxidace 9-nitroellipticinu	56
4.5.3	Oxidace 9-hydroxyellipticinu	59
4.5.4	Oxidace 9-aminoellipticinu	59
4.5.5	Vliv různých funkčních skupin v poloze C-9 ellipticinu na metabolismus jednotlivých derivátů	60
5	Diskuze.....	62
5.1	Syntéza 9-nitroellipticinu	62
5.2	Syntéza 9-aminoellipticinu	64
5.3	Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu	64
5.4	Syntéza 13-hydroxyellipticinu	66

5.5	Vliv funkčních skupin (NO ₂ -, OH-, NH ₂ -) v poloze C-9 ellipticinu na metabolismus jednotlivých derivátů	69
6	Závěr	70
	Seznam použité literatury	72

Seznam použitých zkratk a značek

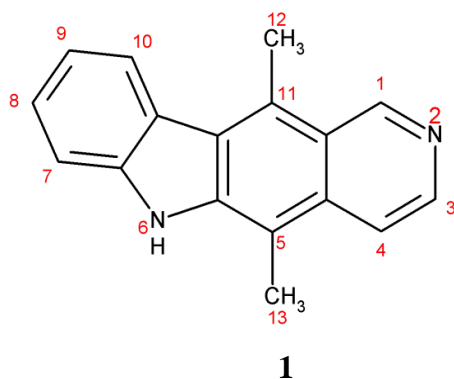
Ac	acetyl
COX	cyklooxygenasa
CYP	cytochrom P450
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EA	ethylacetát
Et	ethyl
EtOH	jaterní mikrosomy potkana indukované ethanolem
HIV	human immunodeficiency virus
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
J_{H-H}	vicinální interakční konstanta atomů vodíku
Kon	kontrolní mikrosomy (neindukované)
LAH	$LiAlH_4$ – tetrahydridohlinitan lithný
LPO	laktoperoxidasa
M	mol/l
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight
M1 - M5	metabolity ellipticinu
m1 - m5	metabolity 9-nitroellipticinu
Me	methyl
MPO	myeloperoxidasa
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NMR	nukleární magnetická rezonance
ODS	oktadecylsilan
<i>p</i>	<i>para</i>
PB	fenobarbital

PCN	pregnelon-karbonitril
Ph	fenyl
Py	pyridin
RPM	počet otáček za minutu
SPE	solid phase extraction
Sud	jaterní mikrosomy potkana indukované Sudanem I
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)

1 Úvod

1.1 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol, obr. 1) patří mezi alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (zástupci této čeledi jsou např.: *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*). Kromě ellipticinu byly z rostlin této čeledi izolovány také další alkaloidy, např. 9-methoxyellipticin. Konkrétně ellipticin byl poprvé izolován z listů stálezeleného stromu, *Ochrosia elliptica*, divoce rostoucího v Oceánii, a to již v roce 1959 [14].



Obr. 1: Struktura ellipticinu

Význam tohoto alkaloidu a některých jeho derivátů spočívá v jejich protinádorové aktivitě [7]. Novější studie také ukázaly působení ellipticinu proti HIV [7, 42, 44, 48, 51]. O klinické využití ellipticinu a jeho rozpustných derivátů je zájem nejen proto, že byla prokázána jejich vysoká účinnost vůči nádorovým onemocněním, ale velmi důležitým důvodem je také relativně nízký výskyt vedlejších cytotoxických účinků [41, 47, 51]. Například hematologická toxicita se prakticky nevyskytuje. Nicméně ellipticin může být nefrotoxický. Mechanismus vzniku nefrotoxicity je podobný mechanismu nefrotoxicity cisplatin [41]. Ellipticin se však spolu se svým derivátem, 9-hydroxyellipticinem, řadí mezi silné mutageny, které svou mutagenní aktivitou působí na kmeny *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* [9, 41].

Struktura ellipticinu byla navržena již ve stejném roce, kdy byl tento alkaloid izolován, výsledkem strukturálních studií Woodwarda a spolupracovníků byla sloučenina uvedená na obrázku 1 [56]. Základ struktury tohoto planárního alkaloidu a jeho derivátů

tvoří karbazolová část, která je spojena s pyridinovým kruhem, což ukazuje na poměrně hydrofobní sloučeninu [4].

1.2 Syntéza ellipticinu

Od objevení protinádorové aktivity rostlinného alkaloidu ellipticinu (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazolu) a jeho derivátů se stal tento alkaloid středem zájmu. Do roku 1977 bylo popsáno 15 různých syntetických cest, kterými je možné připravit pyrido[4,3-*b*]karbazoly. Snahou bylo získat nové deriváty pro farmakologické využití [35]. Právě v roce 1977 Malcolm Sainsbury publikoval práci, ve které shrnul a detailně popsal všech 15 tehdejších syntetických přístupů k přípravě pyrido[4,3-*b*]karbazolů. Sainsbury vytvořil klasifikační systém syntetických přístupů, jednotlivé cesty se řadily do 3 hlavních skupin A, B nebo C, a to podle pořadí vzniku kruhů tetracyklického skeletu [35]. Během následujících několika let přibývaly nové metody syntézy ellipticinu a pyridokarbazolů, proto v roce 1985 zveřejnili Gribble a Saulnier novou souhrnnou práci, ve které shromáždili syntetické přístupy publikované od roku 1977 do roku 1984. Tito autoři dali základ novému klasifikačnímu systému, ve kterém řadili syntetické cesty k 8 hlavním strategiím (I – VIII), podle tvorby klíčových vazeb [15]. V syntéze ellipticinu převládá strategie III (kapitola 1.2.1).

I nadále byly vytvářeny nové přístupy k syntéze ellipticinového skeletu a různých derivátů ellipticinu. V roce 2002 byla proto publikována další velmi rozsáhlá souhrnná práce, ve které Knölker a Reddy zvolili jiný způsob klasifikace dosud publikovaných přístupů. Jejich členění spočívalo v řazení do skupin podle klíčových reakcí dané syntézy (např. katalýza Pd, kondenzace, Diels-Alderova reakce, cykloadice) [21, 26]. Zřejmě nejnovější souhrnná práce byla publikována v roce 2012. Miller a McCarthy v ní skombinovali již známé klasifikace syntetických přístupů, a to kategorie založené na pořadí tvorby jednotlivých kruhů B, C, D nebo B+C typ syntézy, kdy vznikají oba kruhy zároveň [26].

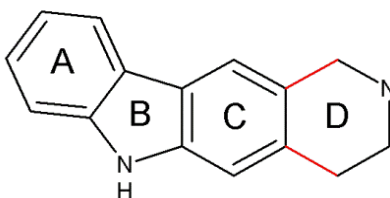
Novější přístup k syntéze ellipticinu publikovaný v roce 2007, který by se řadil k B-typu syntézy [26], vychází z polyfunkčních aryl azidů, jejichž tepelným rozkladem vzniká ellipticin, případně jeho deriváty, jako např. 9-methoxyellipticin [25]. Ellipticin spolu s jeho deriváty je však také možné připravit tandemovou reakcí cyklizace - „cross-coupling“ indolylborátu katalyzovanou Pd, což je klíčová reakce syntézy [18]. Tato

metoda by se tedy řadila právě do kategorie metod katalyzovaných Pd [21]. V roce 2010 byla zveřejněna jednoduchá a účinná syntéza ellipticinu, vyvinutá pomocí Suzuki-Miyaurova spojení stericky bráněné 2-hydroxybenzenborité kyseliny s multifunkčním aryl halidem. Jako katalyzátor této reakce se používá Pd(OAc)₂ v přítomnosti Cu(OAc)₂·H₂O, rozpouštědlem je směs DMSO a H₂O. Poté následuje klíčový krok reakce, kterým je dvojitá *N*-arylace a cyklizace za vzniku ellipticinu [23]. Jiný přístup využívá kaskádu radikálových reakcí, během kterých se používají imidoyl radikály jako meziprodukty pro syntézu aryl a heteroaryl-*[b]*karbazolů a také ellipticinu [29]. Výhodou této metody jsou dobré výtěžky, regioselektivita a mírné reakční podmínky.

Již od objevu protinádorové aktivity ellipticinu nebyla snahou jen syntéza ellipticinu, ale také příprava celé řady různých derivátů ellipticinu, u nichž byla rovněž testována protinádorová aktivita. V roce 1975 Guthrie a spolupracovníci připravili a popsali syntézu mnoha nových acyloxy a alkyl derivátů ellipticinu. Některé deriváty dokonce vykazovaly protinádorovou aktivitu, ta však nedosahovala hodnot, jež vykazovaly v přírodě se vyskytující ellipticin a 9-methoxyellipticin [16].

1.2.1 Syntéza ellipticinu podle strategie III

Jak již bylo uvedeno, v přípravě ellipticinu převažuje strategie III, která je založená na připojení kruhu D na karbazolovou část molekuly (obr. 2).



Obr. 2: Skelet ellipticinu, syntéza podle strategie III [15]

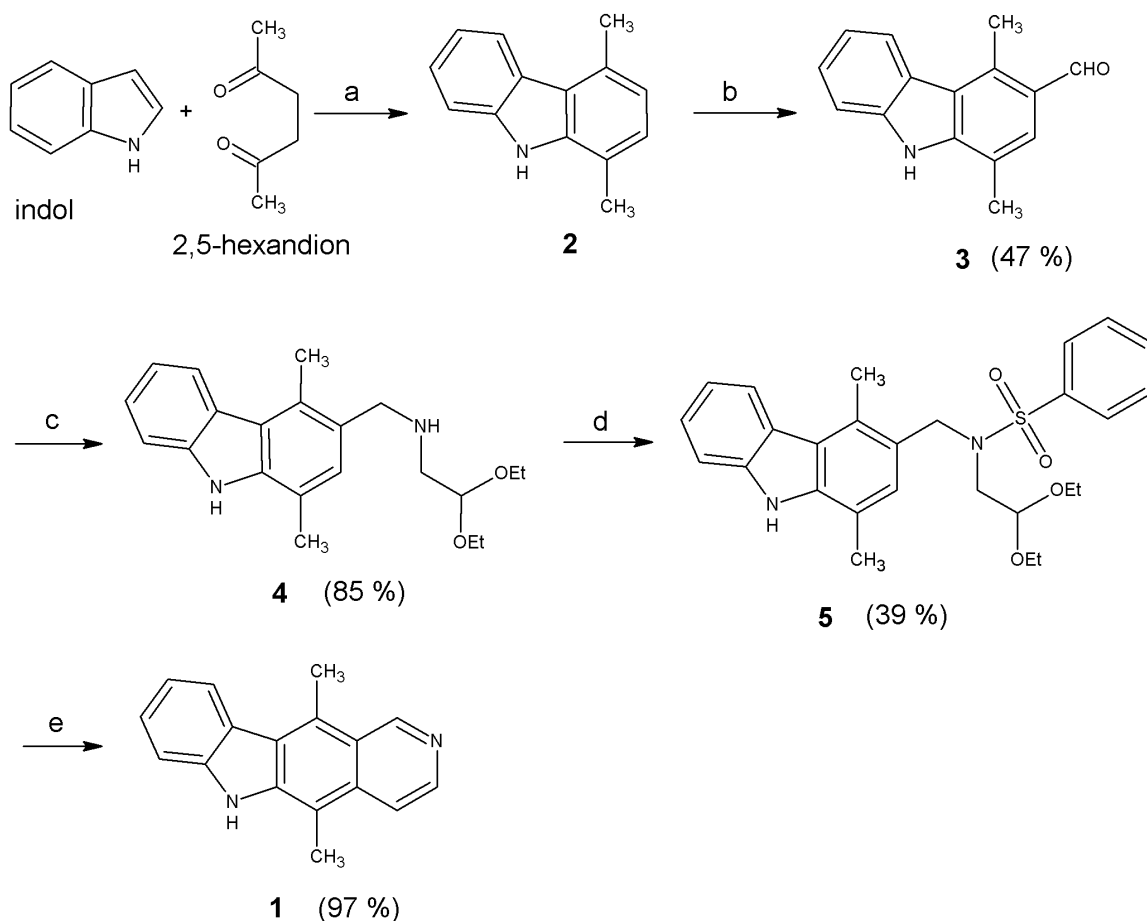
Jako poslední se tvoří kruh D, který se na karbazolovou část připojí pomocí červených vazeb.

Strategie III znázorněná na obrázku 3 (str. 15) byla poprvé popsána Cranwellem a Saxtonem v roce 1962. Patří mezi nejúčinnější konstrukce 6*H*-pyrido[4,3*b*]karbazolu [6, 15, 35]. Uvedená syntéza začíná kondenzací indolu s 2,5-hexandionem za vzniku 1,4-dimethylkarbazolu (**2**). Následuje Vilsmeierova – Haackova formylace, která je založena na společném působení dimethylformamidu nebo *N*-methylformanilidu a fosforylchloridu na elektronově bohatá aromatická jádra za vzniku aromatického aldehydu [58]. V případě 1,4-dimethylkarbazolu (**2**) vzniká touto reakcí 3-formyl-1,4-dimethylkarbazol (**3**). Během

třetího kroku syntézy nejprve dochází ke kondenzaci aromatického aldehydu **3** s 2,2-diethoxyethylaminem za vzniku Schiffovy báze – iminu a následuje redukce tohoto iminu na odpovídající amin **4** [6, 7, 8, 19, 35]. Dále existuje několik způsobů, jak uzavřít kruh za vzniku ellipticinu (**1**) [15].

Jedním ze způsobů cyklizace aminu **4**, vedoucím ke vzniku ellipticinu (**1**), je použití kyseliny chlorovodíkové, kdy relativně snadno dochází ke vzniku 1,2-dihydroellipticinu, v posledním kroku následuje zahřívání s paladiem na aktivním uhlí, extrakce ethylacetátem a nakonec rekrystalizace ze stejného rozpouštědla, výsledkem této syntézy jsou žluté jehličky ellipticinu (**1**) [6, 35]. Jinou možností je zahřívání iminu v kyselině fosforečné, nicméně se ukázalo, že pro tento způsob cyklizace je kritická právě koncentrace kyseliny fosforečné, optimum pro tvorbu pyridokarbazolů leží mezi 90 a 100 % [7, 8]. Předchozí dva způsoby nebyly příliš běžné. Častěji se využívá postup, kde se po přípravě aminu **4** dusík substituuje reakcí s tosylchloridem, takto vzniklý tosylamid cyklizuje v následné reakci, kdy je rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové a dioxanu a reakční směs se zahřívá k varu. Při této reakci se tvoří také malé množství *N*-tosyl-3,4-dihydroellipticinu, který je možno ze směsi snadno separovat pomocí preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu a následně ho opět podrobit hydrolýze s kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu za vzniku dalšího podílu ellipticinu [19]. Jednoduchou modifikací předchozího způsobu syntézy, kdy byl pro substituci dusíku aminoskupiny namísto 4-toluensulfonylu použit benzensulfonyl, bylo dosaženo rychlejší cyklizace vedoucí k ellipticinu (**1**) [11]. Touto modifikací byl získán daleko čistší ellipticin, dokonce také v lepším výtěžku, než u původní syntézy. Takto připravený ellipticin krystalizuje přímo z reakční směsi a není nezbytná jeho další purifikace [11].

Největším problémem při přípravě ellipticinu a práci s ním je špatná rozpustnost tohoto alkaloidu jak v polárních, tak také v nepolárních rozpouštědlech, což ztěžuje purifikaci pomocí chromatografie, např. použití preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu [11].



Obr. 3: Schéma syntézy ellipticinu vycházející ze strategie III

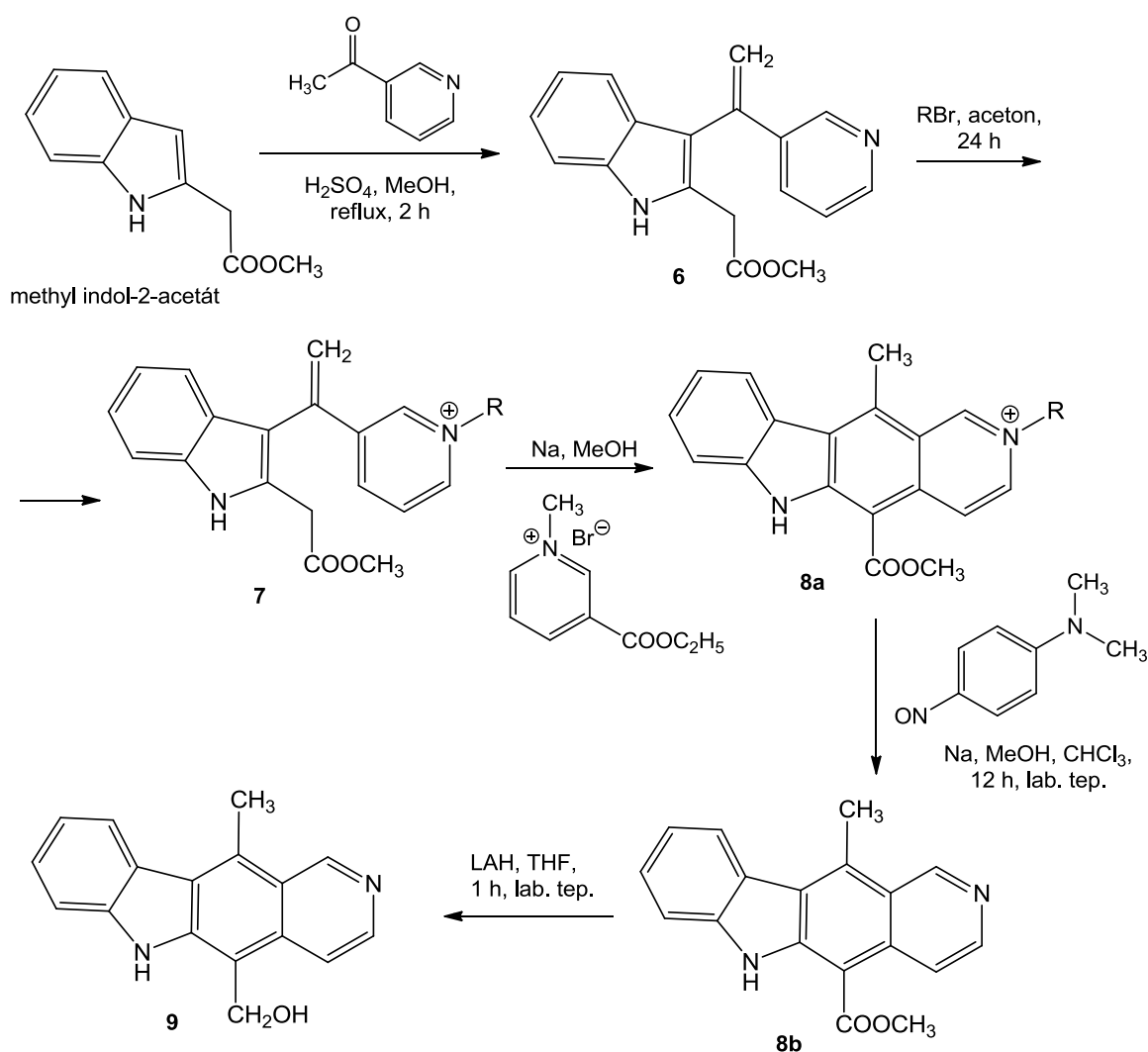
Reakční podmínky: a) kyselina p-toluensulfonová, EtOH, 1,5 h, reflux [10]; b) *N*-methylformanilid, POCl₃, 3,5 h, reflux [6]; c) NH₂CH₂CH(OEt)₂, 2,5 h, vodní lázeň; NaBH₄, MeOH, 1 h, laboratorní teplota [10]; d) PhSO₂Cl, THF/Na₂CO₃, 1 h, laboratorní teplota [11]; e) HCl, dioxan, reflux, 20 min [11].

1.2.2 Syntéza 13-hydroxyellipticinu

13-Hydroxyellipticin (**9**) je velmi významným derivátem ellipticinu, který může být biologicky účinnější než samotný ellipticin [46, 47, 51, 52]. Tato látka vzniká při metabolismu ellipticinu působením různých cytochromů P450 (vznik 13-hydroxyderivátu vlivem detoxifikačních enzymů a jeho působení jsou popsány v kapitolách 1.4.1 a 1.4.3). K tomuto derivátu lze však také dojít syntetickou cestou. V 80. letech byly publikovány dva způsoby jeho syntézy, v obou případech však jde o komplikované vícestupňové syntézy s malými výtěžky [3, 34].

Jeden z možných způsobů přípravy 13-hydroxyellipticinu (**9**) (obr. 4, str. 16) začíná kyselé katalyzovanou kondenzací methyl indol-2-acetátu s 3-acetylpyridinem, která poskytuje vinyllindol **6**. V následujícím kroku dochází s vhodnými halogenidy ke konverzi

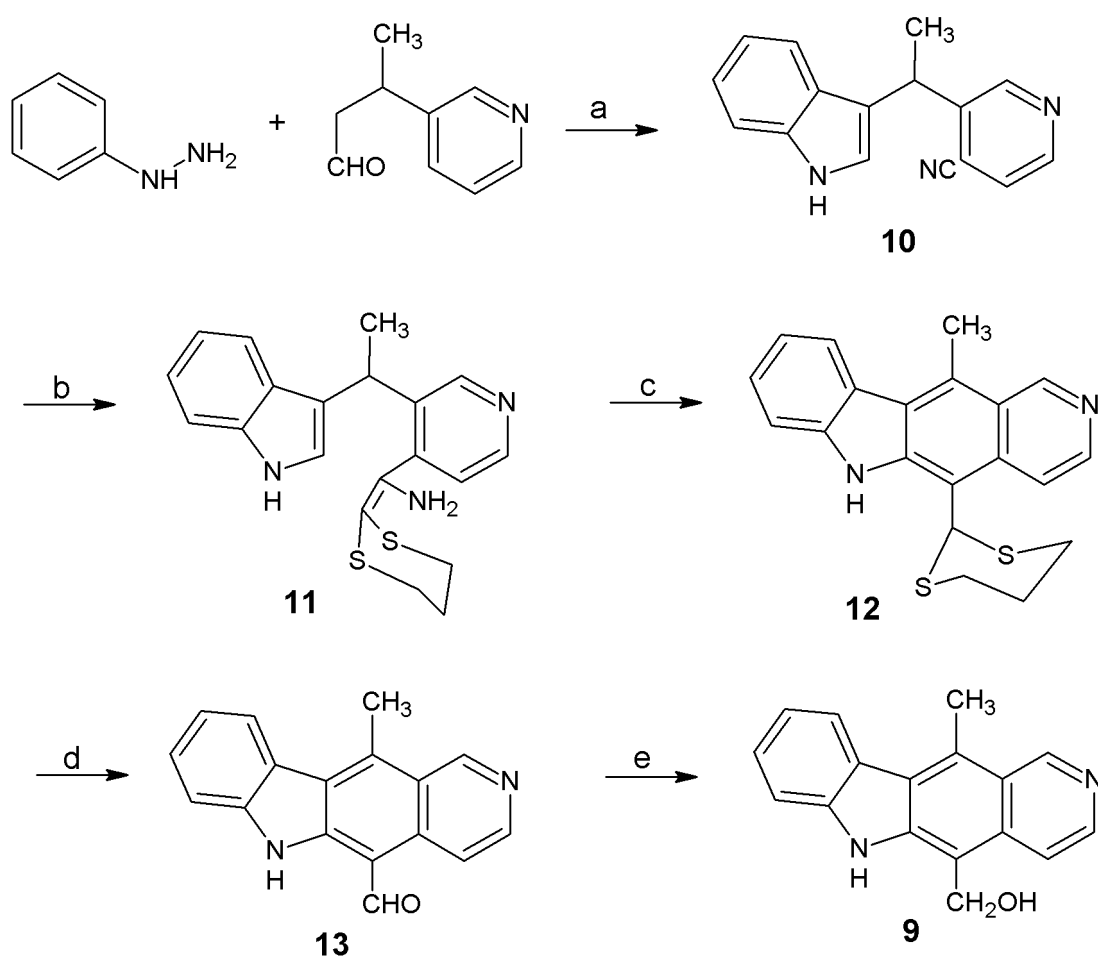
na kvartérní amoniovou sůl **7**. Dále dochází k cyklizaci pomocí kvartérní soli kyseliny ethylnikotinové v methanolu obsahujícím methoxid sodný, jejímž výsledkem je uzavření kruhu a aromatizace sloučeniny. Roztok obsahující sodík, methanol, kvartérní sůl **7** a *p*-nitrosodimethylanilin se míchá pod atmosférou dusíku. Vzniklá suspenze se po odpaření rozpustí v suchém THF, přidáním LiAlH₄ (LAH) dochází k redukci vytvořeného esteru **8b** a získá se tak požadovaný alkohol, derivát ellipticinu – 13-hydroxyellipticin (**9**) ve výtěžku více než 50 % [3].



Obr. 4: Schéma syntézy 13-hydroxyellipticinu podle [3]

Druhý způsob přípravy 13-hydroxyellipticinu (**9**) publikovaný také v 80. letech vycházel z přeměny aldehydové skupiny v poloze C-13 ellipticinu na hydroxylovou skupinu (obr. 5, str. 17). Nejprve se reakcí fenylhydrazinu a 3-(pyridin-3-yl)butanalů

připravil karbonitril **10**, který spolu s 2-lithio-1,3-dithianem poskytl aminoketen thioacetal **11**, jenž při laboratorní teplotě existuje jako pár diastereoisomerů. Kyselou hydrolyzou tohoto produktu zředěnou kyselinou octovou vzniká dithioacetalový derivát ellipticinu **12**. Z něho se následně konverzí připraví aldehyd **13** reakcí dithioacetalu **12** s dusičnanem stříbrným ve vodném roztoku acetonu, tuto reakci popsal Gribble a spolupracovníci. K suspenzi aldehydu **13** v suchém MeOH se přidá kyanotrihydridoboritan sodný. Roztok je míchán při pH 3 za laboratorní teploty 5 dnů. Následně se roztok filtruje přes molekulární síto a čistí chromatografií na silikagelu. Tato cesta vede k získání pevné žluté látky, 13-hydroxyellipticinu (**9**) ve výtěžku 26 % [34].

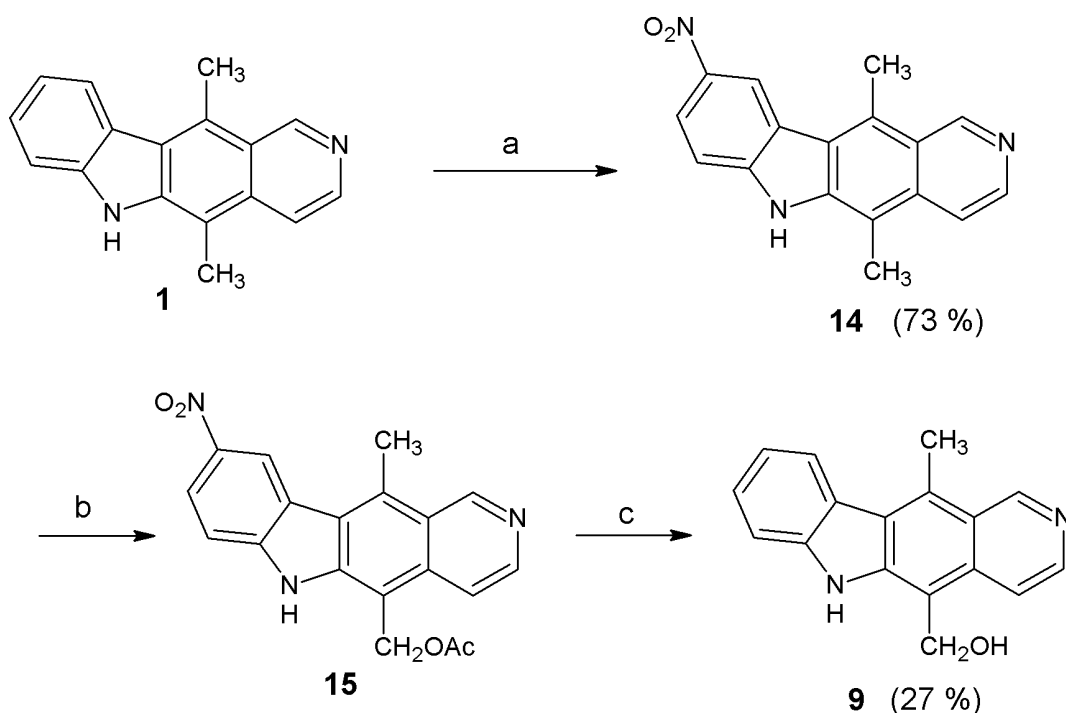


Obr. 5: Schéma syntézy 13-hydroxyellipticinu podle [34]

Reakční podmínky: a) (1) AcOH, (2) MSH, (3) Ac₂O, (4) MeI, (5) KCN, hv; b) THF, 2-lithio-1,3-dithian, 30 min, -78 °C, 15 h, -20 °C, laboratorní teplota, NaCl, CHCl₃; c) AcOH 30 %, 2 h; d) THF, 2 M HNO₃, po 30 min AgNO₃/HNO₃, 20 h, 40 – 50 °C, e) NaBH₃CN, MeOH, pH 3 (HCl/MeOH), 5 dnů, laboratorní teplota

Nejnověji popsanou cestou k přípravě 13-hydroxyellipticinu (**9**), která byla publikována v roce 2007, je oxidace methylové skupiny na uhlíku C-5 ellipticinu. Pro studium této benzylové oxidace s různými oxidačními činidly byla použita jako modelová sloučenina 1,4-dimethylkarbazol (**2**). Některé oxidační metody vedly k polymerizaci, např. použití $K_2S_2O_8$ - $Cu(OAc)_2$ v kyselině octové. Jiná činidla, jako např. použití bromu vedlo k aromatické substituci 1,4-dimethylkarbazolu v polohách 3,6 a 8 [11].

Díky poznatkům z experimentů na modelové sloučenině 1,4-dimethylkarbazolu (**2**) byla publikována úspěšná cesta přípravy 13-hydroxyellipticinu, která je znázorněna na obrázku 6, výtěžek této syntézy byl však poměrně nízký (27 %). Nejprve se nitrací ellipticinu připraví 9-nitroellipticin (**14**), následuje oxidace této nitrosločeniny za použití $K_2S_2O_8$, nitroskupina v poloze C-9 je redukována pomocí $SnCl_2$ za vzniku aminosločeniny (v poloze 9 skupina amino). Aminoskupina je poté diazotována ($NaNO_2$, zředěná HCl) na diazoniovou sůl, která redukcí ethanolem poskytne konečný produkt - 13-hydroxyellipticin (**9**) [11].



Obr. 6: Schéma přípravy 13-hydroxyellipticinu vycházející z ellipticinu, vytvořeno podle [11].

Reakční podmínky: a) HNO_3 , $AcOH$, $0\text{ }^\circ C$, 45 min; b) $K_2S_2O_8$, $CuSO_4$, $AcONa$, $AcOH$, 2 h, reflux; c) (1) $SnCl_2$, HCl , 1 h, $100\text{ }^\circ C$, (2) $NaNO_2$, 10 min, $5\text{ }^\circ C$; (3) $EtOH$, zahřáto k varu, poté necháno zchladnout na lab. teplotu.

1.3 Mechanismus protinádorového účinku ellipticinu

Protinádorové léčivo ellipticin vykazuje několik mechanismů působení vůči nádorovým buňkám. Předpokládá se, že mezi mechanismy protinádorového účinku převládají dva, a to interkalace do dvoušroubovice DNA a inhibice topoisomerasy II [4].

Možné mechanismy protinádorové aktivity ellipticinu jsou následující:

- **Interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA** – molekula ellipticinu je svým tvarem i velikostí velmi podobná komplementárním purin-pyrimidinovým bázím v DNA, splňuje tak potřebné předpoklady pro interkalaci do DNA [4, 17, 22]. Kromě toho se také mohou vytvořit těsné interakce s hydrofobními částmi molekuly DNA, a to díky polycyklickému aromatickému charakteru molekuly ellipticinu [4, 47, 51]. K interakci dochází mezi thyminem a methylovou skupinou ellipticinu, toto působení v interkalačním místě je velmi důležité z hlediska orientace molekuly ellipticinu v DNA [13, 38, 47, 51].
- **Inhibice topoisomerasy II** - ellipticin působí jako inhibitor topoisomerasy II, v důsledku její inhibice dojde zprostředkovaně k rozštěpení DNA. Dochází k vytvoření ternárního komplexu mezi topoisomerasou II, DNA a molekulou ellipticinu, ten je pravděpodobně rozhodujícím faktorem pro tvorbu zlomů v DNA a vede tak k buněčné smrti. Topoisomerasa II se jeví jako primární buněčný cíl tohoto protinádorového léčiva [4, 12, 13, 27].
- **Inhibice fosforylace proteinu p53** – ellipticin a jeho derivát 9-hydroxyellipticin způsobují specifickou inhibici fosforylace proteinu p53, produktu tumor supresorového genu p53, což bylo prokázáno v buňkách SW480 lidské buněčné linie rakoviny tlustého střeva. K selektivní inhibici fosforylace tohoto proteinu pravděpodobně dochází přes inhibici specifické cyklin-dependentní kinasy, která protein p53 fosforyluje [28]. Velká koncentrace defosforylovaného proteinu p53 může mít za následek až indukci apoptozy [28, 41].
- **Inhibice oxidační fosforylace** – touto inhibicí dochází k narušení energetické rovnováhy v buňce. Inhibice oxidační fosforylace totiž způsobuje velmi výrazný pokles ATP v buňkách, což následně vede k apoptose takto postižených buněk [37, 47, 51].

- **Inhibice telomerasy** – 9-hydroxyellipticin významně inhibuje telomerasovou aktivitu v buňkách lidských nádorů slinivky, a to pravděpodobně inhibicí proteinových kinas, nicméně přesný mechanismus není znám [36].

Pro všechny tyto dosud objevené mechanismy protinádorové aktivity ellipticinu je společné nespecifické působení, což znamená, že působí stejně na nádorové i zdravé buňky. To je však v rozporu s jeho relativně úzkou specifitou působení proti nádorovým onemocněním. Specificky účinkuje jen na některé typy neoplasie [41, 57]. Za takové účinky může být zodpovědný další mechanismus působení ellipticinu, kovalentní modifikace DNA po metabolické aktivaci tohoto léčiva.

- **Kovalentní vazba ellipticinu na DNA** – tento mechanismus protinádorového účinku ellipticinu je podrobněji vysvětlen v následující kapitole 1.4.3.

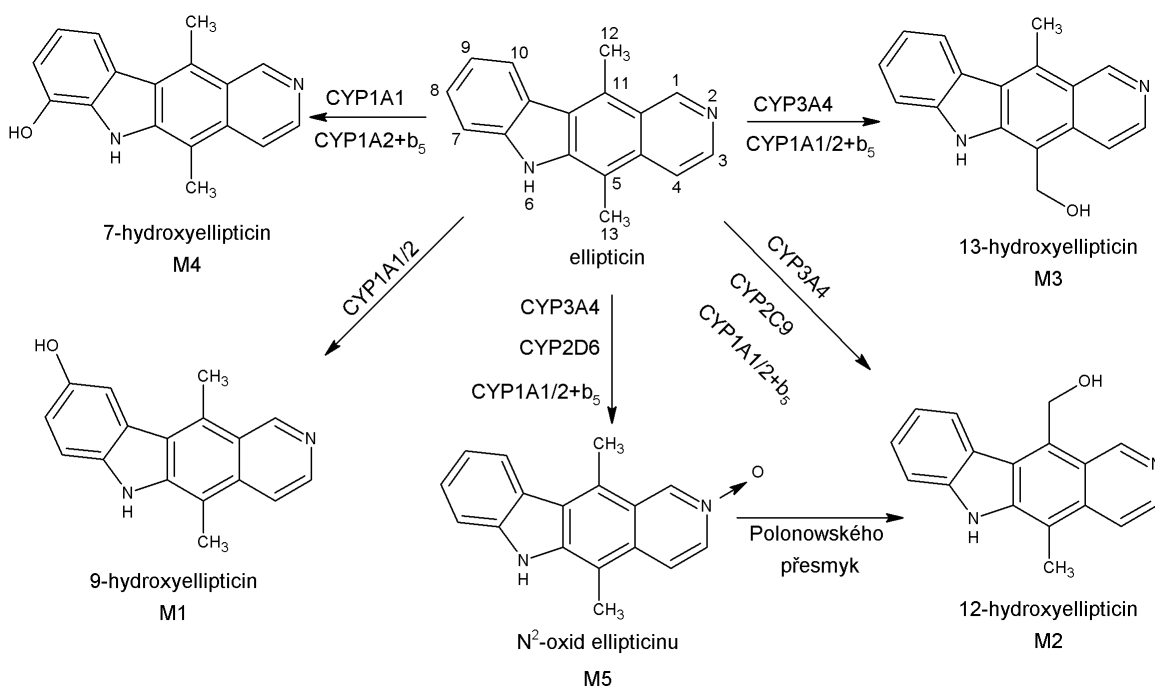
1.4 Biotransformace ellipticinu

Ellipticin v organismu prochází biotransformací, díky níž z něho vznikají polárnější deriváty. Na jeho metabolických přeměnách se podílejí dvě skupiny enzymů, cytochromy P450 a peroxidasy, obě skupiny katalyzují oxidaci ellipticinu [51]. Právě biotransformace je velmi důležitá pro nejnověji popsany mechanismus účinku ellipticinu – tvorbu kovalentních aduktů ellipticinu s DNA. Toto protinádorové léčivo se může kovalentně vázat na DNA jen tehdy, je-li předem enzymově aktivováno na účinnější deriváty. Výše uvedené skupiny enzymů zajišťují metabolickou aktivaci ellipticinu, ale vedou též k jeho detoxikaci [42, 46, 47, 51]. Reakcemi, jejichž výsledkem je detoxikovaný ellipticin, vznikají dva deriváty, 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin. Obě tyto sloučeniny jsou polárnější, pro tělo je tak snazší jejich vyloučení. Metabolity 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu, které vznikají při aktivačních reakcích ellipticinu, vytvářejí kovalentní adukty s DNA, což bylo potvrzeno jak v experimentech *in vitro*, tak také *in vivo*. Cílovou bází pro tvorbu aduktů s DNA byl identifikován deoxyguanosin, na který se aktivované metabolity váží [42, 44, 45, 46, 47, 49, 51].

1.4.1 Metabolická přeměna ellipticinu cytochromy P450

Oxidací ellipticinu katalyzovanou různými isoformami cytochromů P450 bylo zatím identifikováno 5 metabolitů (obr. 7). Během procesu detoxikace vznikají 7-hydroxyderivát a 9-hydroxyderivát ellipticinu. Kromě detoxikace probíhají také aktivační reakce, jejichž výsledkem jsou metabolity 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu.

Bylo zjištěno, že cytochrom b₅ může měnit nejen množství vznikajících metabolitů, ale může také ovlivnit typ metabolitu tvořeného přeměnou jednoho substrátu jedním cytochromem P450. Nedávno bylo totiž zjištěno, že cytochrom b₅ mění poměr metabolitů ellipticinu katalyzovaných CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4. Oxidací ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 1A vznikají převážně 7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin [24, 52]. Jak je však patrné z obrázku 7, tyto dva cytochromy P450 se určitou měrou podílejí na tvorbě všech 5 metabolitů ellipticinu a cytochrom b₅ moduluje jejich aktivitu ve smyslu vyšší tvorby 12-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu [24, 33].



Obr. 7: Biotransformace ellipticinu katalyzovaná cytochromy P450, upraveno podle [24, 46, 51, 52]

Za vznik detoxikačních produktů, 7-hydroxyellipticinu a 9-hydroxyellipticinu, jsou zodpovědné především cytochromy P450 podrodiny 1A. Vznik aktivačních metabolitů, 13-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu, zajišťuje převážně CYP3A4, ale na této oxidaci ellipticinu se podílejí i jiné cytochromy P450.

Vznik detoxikačních metabolitů ellipticinu:

- **7-hydroxyellipticin** a **9-hydroxyellipticin** jsou hlavními detoxikačními metabolity ellipticinu, které vznikají především oxidací ellipticinu CYP1A1 a CYP1A2 *in vitro*, ale také *in vivo*. Právě podrodina cytochromů P450 1A preferuje oxidaci ellipticinu za vzniku těchto dvou detoxikačních metabolitů, na ostatních reakcích se podílí spíše minoritně [46, 51, 52].

Vznik aktivačních metabolitů ellipticinu:

- **13-hydroxyellipticin** vzniká jako majoritní metabolit oxidace ellipticinu katalyzované především CYP3A4, tedy nejvíce exprimovaným cytochromem P450 v lidských játrech. Dále pak v menší míře katalyzují vznik 13-hydroxyellipticinu také CYP1A2, 2D6 a 2C9 [46, 51, 52, 53]. Pomocí molekulového modelování byl vysvětlen mechanismus převládající oxidace ellipticinu za vzniku 13-hydroxyellipticinu cytochromem P450 3A4 [46, 51].

- **N²-oxid ellipticinu** je metabolitem, jehož vznik je rovněž katalyzován CYP3A4, kromě něho se však na jeho oxidaci podílí zejména CYP2D6. Právě lidský CYP2D6 je v tvorbě tohoto metabolitu mnohem účinnější [46, 51, 52, 53].

- **12-hydroxyellipticin** je posledním aktivačním derivátem ellipticinu, od předchozích se liší tím, že může vznikat dvěma různými cestami. Na jeho oxidaci se opět podílí CYP3A4, kromě něho ještě CYP2C9. Druhý způsob vzniku tohoto derivátu spočívá nejprve v tvorbě N²-oxidu ellipticinu, popsané výše. Další krok této cesty již nevyžaduje enzymovou aktivaci, vzniká totiž Polonowského přesmykem právě z N²-oxidu ellipticinu [46, 48, 51, 53].

Díky tomu, že je CYP3A4 nejhojněji exprimovaným cytochromem P450 v lidských játrech, mohly by být metabolické cesty vedoucí ke vzniku 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu v lidských játrech cestami majoritními [51, 53].

Jakmile však vzorek obsahuje izolovaný CYP1A1 nebo CYP1A2, NADPH:P450 reduktasu a také cytochrom b₅, dochází ke změně poměru metabolitů ellipticinu. V přítomnosti cytochromu b₅ preferuje podrodina CYP1A vznik 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu na úkor tvorby detoxikačních produktů, 7-hydroxyellipticinu a 9-

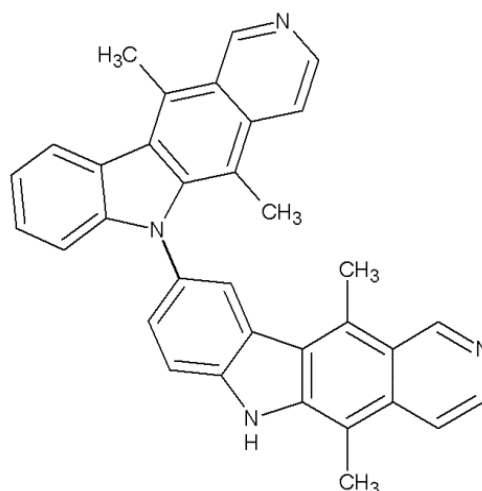
hydroxyellipticinu. Důsledkem této změny v poměru vznikajících metabolitů je zvýšená tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA [24, 52].

Cytochrom b_5 také ovlivňuje množství metabolitů, které vznikají oxidací CYP3A4, jeho přítomnost v enzymovém systému výrazně zvyšuje množství vznikajícího 13-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a také N^2 -oxidu ellipticinu, zatímco tvorba detoxikačních metabolitů zůstává nezměněna [24, 33, 52].

1.4.2 Metabolická přeměna ellipticinu peroxidasami

Farmakologický účinek ellipticinu je závislý na jeho enzymové aktivaci v cílové tkáni, právě v aktivované formě může tvořit kovalentní adukty s DNA. Jak již bylo uvedeno, na oxidaci, která vede k aktivaci ellipticinu a následně k tvorbě kovalentních aduktů s DNA, se podílí zejména cytochromy P450, enzymy exprimované jak ve zdravých buňkách, tak v buňkách nádorových. Bylo však zjištěno, že vůči ellipticinu jsou citlivé i tkáně, v nichž nedosahují cytochromy P450 tak vysokých hladin jako v jiných tkáních, i přesto v nich ellipticin tvoří kovalentní adukty s DNA. Musí tedy existovat další enzymy, které jsou schopny oxidovat ellipticin na jeho aktivní metabolity. Další skupinou enzymů, jež je schopna metabolizovat ellipticin, jsou peroxidasy, které také bývají hojně exprimovány v mnoha nádorových buňkách [30, 31, 47].

V průběhu oxidace ellipticinu peroxidasami, jako jsou laktoperoxidasa (LPO), myeloperoxidasa (MPO), cyklooxygenasa (COX)-1 a COX-2, vznikají *in vitro* převážně dva metabolity a v průběhu reakce dochází k tvorbě intermediátů, které se kovalentně váží na DNA (obr. 9, str. 28). Pomocí NMR byl charakterizován jeden ze vznikajících metabolitů, dimer ellipticinu, a to jako majoritní metabolit oxidace ellipticinu peroxidasami. Je tvořen dvěma ellipticinovými zbytky, které jsou spojeny přes dusíkový atom N-6 pyrrolového kruhu jedné z molekul ellipticinu a uhlíkový atom C-9 druhé molekuly ellipticinu (obr. 8, str. 24). Minoritním produktem oxidace ellipticinu je pak N^2 -oxid ellipticinu, který vzniká též metabolickou aktivací ellipticinu katalyzovanou lidskými cytochromy P450 [30, 31, 48].



Obr. 8: Dimer ellipticinu, majoritní metabolit vznikající oxidací ellipticinu peroxidasami, upraveno podle [48].

1.4.3 Tvorba kovalentních aduktů DNA s ellipticinem po jeho aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami

Pro tvorbu ellipticinových aduktů s DNA je nutná jeho předchozí aktivace, kdy oxidací katalyzovanou dvěma různými skupinami enzymů, cytochromy P450 a peroxidasami, dochází ke vzniku aktivačních metabolitů ellipticinu. Teprve tyto metabolity jsou schopné kovalentní vazby na DNA [30, 42, 46, 47, 48, 49]. Vznik aduktů ellipticinu s DNA byl potvrzen za pomoci dvou nezávislých přímých metod, a to za použití tritiem značeného ellipticinu (^3H – značený ellipticin) a metodou „ ^{32}P – postlabeling“. Nejprve byla tvorba aduktů ellipticinu s DNA pomocí těchto metod potvrzena *in vitro* [42], později bylo metodou „ ^{32}P – postlabeling“ zjištěno, že se ellipticin kovalentně váže na DNA také *in vivo* [44, 49, 50].

Adukty tvořené ellipticinem s DNA mají různou stabilitu, která závisí na faktorech, jako je opravná schopnost DNA a chemická stabilita. Během experimentů *in vivo* bylo prokázáno, že adukty ellipticinu s DNA nepřetrvávají ve zdravých tkáních experimentálního modelu, který napodobuje osud ellipticinu v lidském organismu léčeném ellipticinem (laboratorní potkan). Tyto výsledky naznačují relativně nízké riziko vedlejších genotoxických účinků během léčby nádorových onemocnění ellipticinem u lidí [49, 53].

Za tvorbu aduktů ellipticinu s DNA jsou zodpovědné jeho aktivní metabolity, 13-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu, jejichž vznik katalyzují cytochromy P450, dále pak methylenimin ellipticinu, který vzniká působením peroxidas.

Peroxidasy se též podílejí na vzniku N²-oxidu ellipticinu. Tyto metabolity pak různými cestami tvoří 2 velmi významné adukty, majoritní adukt 1 a minoritní adukt 2. Na cílovou bázi, deoxyguanosin, se tyto metabolity pravděpodobně váží v podobě karbeniových ionů, ellipticin-12-ylia a ellipticin-13-ylia, které vznikají spontánním štěpením, tedy bez enzymové katalýzy, 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu (obr. 9, str. 28) [20, 47, 48, 50, 51, 52, 53].

Ellipticin působí také jako induktor cytochromů P450. U potkanů, kterým byl podáván ellipticin, došlo v analyzovaných orgánech (játra, ledviny a plíce) ke zvýšení hladiny exprese CYP1A1, CYP1A2, CYP3A, dále také NADPH:CYP oxidoreduktasy a cytochromu b₅. Nejvýraznější změna byla pozorována u indukce exprese podrodiny CYP1A, která byla patrná ve všech uvedených tkáních [55]. Indukce podrodiny CYP1A má za následek zvýšenou tvorbu aduktů ellipticinu s DNA, zejména aduktu 1. Indukcí těchto proteinů si ellipticin v potkaních moduluje vlastní metabolismus, čímž určuje svůj farmakologický, ale také genotoxický účinek [1, 2, 51, 55].

Cesty k vytvoření aduktů 1 a 2 (obr. 9, str. 28):

- **Majoritní adukt 1** se může tvořit odlišnými cestami za působení obou skupin enzymů.
 - 1) Oxidací ellipticinu, na které se podílejí lidské cytochromy P450, zejména CYP3A4, CYP1A1 a CYP1A2, vzniká 13-hydroxyellipticin, ten se následně spontánně štěpí na karbeniový ion, ellipticin-13-ylum. V této podobě reaguje s nukleofilními centry deoxyguanosinu v DNA za vzniku aduktu 1 [51]. Nedávno bylo prokázáno, že přítomnost cytochromu b₅ v enzymovém systému obsahujícím CYP3A4 a NADPH, má za následek zvýšenou tvorbu 13-hydroxyellipticinu, s tímto faktem také koreluje objevená zvýšená tvorba aduktu 1 [52]. Cytochrom b₅ ovlivňuje množství tvorby tohoto metabolitu také CYP1A1, a tím následně zvyšuje množství aduktu 1 [24, 53].
 - 2) Jinou cestou, ve které působí na ellipticin peroxidasy, vzniká opět adukt 1, stejně jako při oxidaci ellipticinu lidskými cytochromy P450. Oxidací ellipticinu peroxidasami vzniká nejprve methylenimin ellipticinu, ten je stejně jako karbeniový ion schopen kovalentní vazby na DNA, tedy vytvoření majoritního aduktu 1. Pro tento metabolit je ale také prekursorem 13-hydroxyellipticin,

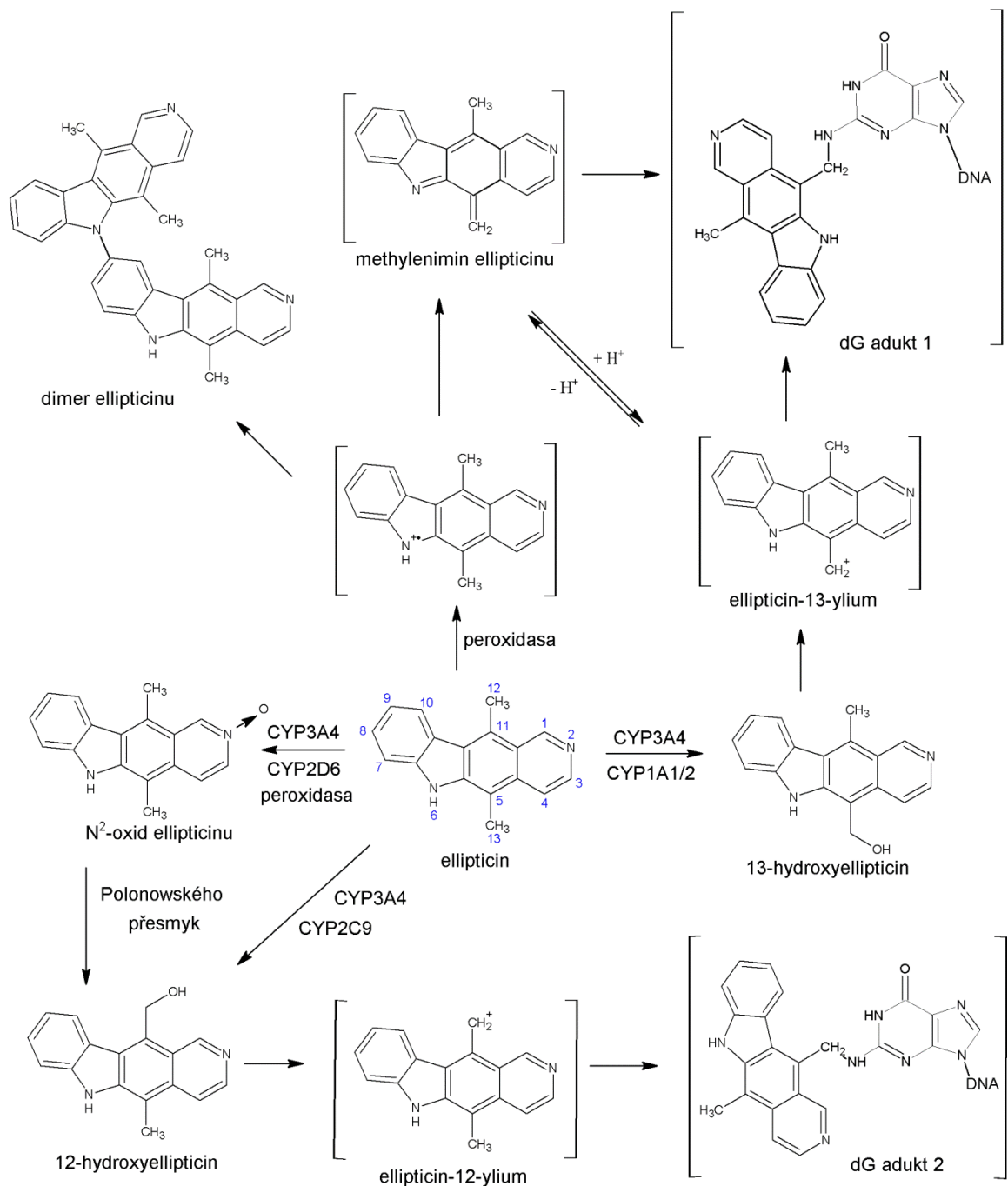
vznikající oxidací ellipticinu cytochromy P450. Z obrázku 9 (str. 28) je také patrná možná cesta, při které vzniká adukt 1, která kombinuje postupné působení obou skupin enzymů [48, 51].

- **Minoritní adukt 2** - také k tomuto aduktu vedou různé cesty:
 - 1) Působením lidských cytochromů P450 vzniká z ellipticinu další metabolit, 12-hydroxyellipticin, jeho vznik katalyzují zejména CYP3A4 a CYP2C9. Podobně jako u 13-hydroxyellipticinu, i 12-hydroxyderivát podléhá spontánnímu štěpení, jehož výsledkem je karbeniový ion ellipticin-12-ylum. V této reaktivní podobě se 12-hydroxyderivát kovalentně váže na DNA [51]. Také u tohoto derivátu platí, že přítomnost cytochromu b_5 v inkubační směsi obsahující CYP3A4 a NADPH způsobuje zvýšenou tvorbu 12-hydroxyellipticinu, což má za následek odpovídající zvýšené množství vznikajícího aduktu 2 [52]. Cytochrom b_5 také zvyšuje tvorbu tohoto derivátu vznikajícího oxidací ellipticinu CYP2C9 [53].
 - 2) Na vzniku posledního aktivačního derivátu, N^2 -oxidu ellipticinu, se podílí jak lidské cytochromy P450, konkrétně CYP2D6 a v menší míře CYP3A4, tak také peroxidasy. Z N^2 -oxidu ellipticinu se následně Polonowského přesmykem vytvoří 12-hydroxyellipticin. Další kroky jsou stejné, 12-hydroxyellipticin se spontánně rozštěpí na ellipticin-12-ylum a v této podobě se kovalentně naváže na deoxyguanosin v DNA za vzniku minoritního aduktu 2 [48]. Vznik N^2 -oxidu ellipticinu může být ovlivněn přítomností cytochromu b_5 , který zvyšuje účinek CYP2D6 [53].

Z výsledků získaných ve výše uvedených studiích lze usuzovat, že ellipticin může být považován za léčivo, jehož farmakologické účinky a vedlejší genotoxické působení jsou závislé na jeho enzymové aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami v cílových tkáních [51]. Nicméně pro vznik reaktivních meziproductů, ellipticin-13-ylia a ellipticin-12-ylia, již nejsou zapotřebí aktivační enzymy (cytochromy P450 a peroxidasy), proto by mohly být 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin díky spontánnímu štěpení vhodnými kandidáty pro „zacílení“ do nádorů, ve kterých uvedené aktivační enzymy chybí [51].

Nové testy však ukázaly, že je ellipticin toxický pro lidské hepatocyty, neboť v nich tvoří stejné adukty s DNA, jaké vznikají z ellipticinu působením čistých CYP a lidských jaterních mikrosomů. Stejně adukty se také tvoří *in vivo* v játrech experimentálních zvířat. Tyto informace jsou velmi důležité pro odhad účinku ellipticinu na játra po orálním podání tohoto léčiva [53].

Bylo provedeno několik studií o tvorbě aduktů v lidských nádorových buněčných liniích, ze kterých vyplývá, že v mnoha z nich k tvorbě aduktů dochází. V lidských buňkách nádoru prsu MCF-7 dochází k bioaktivaci ellipticinu, po které se metabolity ellipticinu váží na DNA za tvorby stejných aduktů, jaké byly pozorovány *in vitro* po aktivaci ellipticinu cytochromy P450 [5]. Adukty ellipticinu s DNA se tvoří také v lidských leukemických buňkách HL-60 a CCRF-CEM [31]. Navíc, právě tvorba aduktů s DNA byla pozorována jako převládající mechanismus vedoucí k cytotoxicitě ellipticinu v lidských buňkách neuroblastomu [32, 54]. Ellipticin je toxický také vůči buněčným liniím nádorů štítné žlázy, jeho toxicita koresponduje tvorbě aduktů v těchto buňkách [33].



Obr. 9: Schéma aktivace ellipticinu oxidací katalyzovanou cytochromy P450 a peroxidasami a následná tvorba aduktů s DNA, upraveno podle [50]

Schéma ukazuje produkty oxidace ellipticinu, na které se podílejí jak cytochromy P450, tak také peroxidasy. Je zde rovněž znázorněná tvorba aduktů 1 a 2 spolu s jejich předpokládanou strukturou.

2 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce byla realizace několika krokové syntézy vedoucí k přípravě potenciálně účinnějších derivátů elliptycinu, jako je 13-hydroxyellipticin či další deriváty, a jejich následné biochemické testování, konkrétně sledování jejich metabolismu cytochromy P450.

Dílčí cíle práce byly následující:

- Syntéza 9-nitroelliptycinu, který je nezbytným meziproduktem při syntéze 13-hydroxyelliptycinu a následná příprava dalšího derivátu elliptycinu s jinou funkční skupinou v poloze C-9 elliptycinu, 9-aminoelliptycinu.
- Studium oxidace syntetizovaných derivátů elliptycinu, 9-nitroelliptycinu a 9-aminoelliptycinu jaterním mikrosomálním systémem laboratorního potkana obsahujícím cytochromy P450.
- Studium vlivu různých funkčních skupin přítomných v poloze C-9 elliptycinu na metabolismus těchto látek. Pro možnost porovnání funkčních skupin byl testován také komerčně dostupný 9-hydroxyellipticin, konkrétně zda podléhá oxidaci jaterním mikrosomálním systémem laboratorního potkana.

3 Materiál a metody

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie použité v této diplomové práci pocházejí z následujících zdrojů:

- **Fluka, Švýcarsko**
K₂S₂O₈
- **Lachema Brno, Česká republika**
dioxan, NaNO₂, NaOAc·3H₂O, CuSO₄·5H₂O
- **Lachner Neratovice, Česká republika**
CH₃COOH, HCl, NaCl, NaHCO₃, Na₂SO₄, NaOH, methanol, KH₂PO₄, MgCl₂
- **Merck Darmstadt, Německo**
ethanol, silikagel (Silica gel 60, 40-63 μm), TLC Silica gel 60 F₂₅₄, acetonitril
- **Penta Chrudim, Česká republika**
dichlormethan, ethylacetát, chloroform, K₂CO₃, petrolether, toluen
- **Sigma-Aldrich, USA**
benzensulfonylchlorid, celit, 2,2-diethoxyethylamin, 1,2-dichlorethan, fosforylchlorid, 2,5-hexandion, HNO₃, indol, kyselina p-toluensulfonová, *N*-methylformanilid, NaBH₄, pyridin, SnCl₂, triethylamin, Zn, heptansulfonát sodný, dimethylsulfoxid (DMSO), glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, glukosa-6-fosfát, NADP⁺, ellipticin, 9-hydroxyellipticin

3.2 Použité přístroje

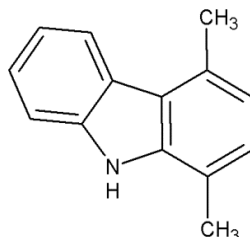
Následující přístroje byly používány v průběhu vypracování diplomové práce.

- **Systém HPLC**
Dionex (USA): P580 Pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S, Degases DG-1210, kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 × 4,6 mm, 5 μm
Program: Chromeleon™ 6.11 build 490
- **Centrifugy**
Spectrafuge™ Mini centrifuge – Labnet (Japonsko), Eppendorf centrifuge 5418 (Německo), Microcentaur MSE, Sanyo (Velká Británie)
- **Automatické pipety**
Nichirio Nichipet EX (Japonsko)
- **Váhy**
Předvážky KERN EW600-2M, analytické váhy Ohaus Discovery DV215CD (USA), analytické váhy Pioneer PA413C Ohaus (USA)
- **Další přístroje**
Vakuová odparka Büchi (Švýcarsko), sonikátor ELMASONIC E 30 H (Česká republika), Thermomixer compact Eppendorf (Německo), MS1 Minishaker – IKA (Německo), magnetické míchačky IKA® C-MAG HS7 a IKA® RCT basic, NMR spektrometr Bruker AVANCE III 600 (Švýcarsko), MALDI-TOF/TOF ultraFLEX III MS Bruker – Daltonics (Německo)

3.3 Metody

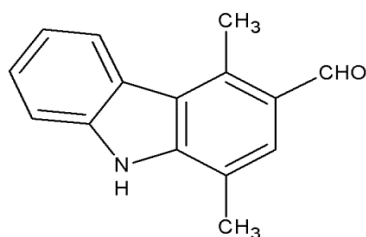
3.3.1 Syntéza 9-nitroellipticinu

- 1,4-Dimethylkarbazol (**2**)



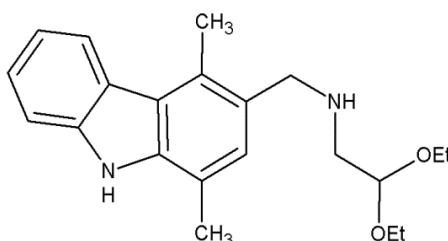
1,4-Dimethylkarbazol (**2**) byl připraven podle publikovaného postupu [10] s následující modifikací zpracování reakční směsi – reakční směs byla po ochlazení na laboratorní teplotu odpařena na asi desetinu původního objemu a zředěna ethylacetátem (10 ml). Vzniklý roztok byl nanesen na fritu se silikagelem, vrstva silikagelu na fritě byla vysoká asi 3 cm a před vlastní filtrací byla zbavena vzduchových bublin a promyta petroletherem. Po nanesení roztoku reakční směsi na fritu se silikagelem a jeho „zasáknutí“ byla vrstva silikagelu postupně promývána mobilní fází petrolether/ethylacetát 5:1, později 3:1 a na závěr čistým ethylacetátem. Filtrát byl postupně jímán do Erlenmeyerových baněk (objem každé frakce byl asi 150 ml), jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC. Frakce obsahující 1,4-dimethylkarbazol byly spojeny, rozpouštědla byla odpařena - ne zcela do sucha, pouze na objem, při kterém začalo docházet k „vypadávání“ krystalů z roztoku, a vzniklý roztok byl nechán krystalizovat při laboratorní teplotě přes noc. Krystaly byly filtrovány a rozpuštěny v horkém petroletheru, získaný roztok byl filtrován přes fritu, koncentrován na vakuové odparce a opět nechán krystalizovat. Krystaly byly odsáty na fritě a promyty studeným petroletherem. Takto byl získán první podíl čistého produktu (11,58 g). Matečné roztoky z krystalizací byly odpařeny do sucha, odparek byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 a přečištěn preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: petrolether/ethylacetát 5:1). Frakce obsahující na základě TLC požadovaný produkt byly spojeny, odpařeny a odparek byl rekrystalizován z petroletheru. Po krystalizaci byl získán druhý podíl čistého produktu (**2**) (5,3 g). Celkem bylo získáno 16,88 g 1,4-dimethylkarbazolu, což odpovídá 56 % teoretického výtěžku. Strukturně-analytická data (NMR, MS) byla ve shodě s daty uvedenými v literatuře [7].

- 3-Formyl-1,4-dimethylkarbazol (**3**)



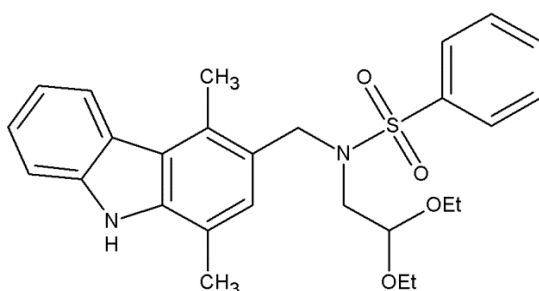
3-Formyl-1,4-dimethylkarbazol (**3**) byl připraven podle dříve publikovaného postupu [10] ve výtěžku 54 %. Strukturně-analytická data (NMR, MS) byla ve shodě s literaturou [7].

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



3-(2,2-Diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**4**) byl připraven podle publikovaného postupu. Reakce 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**3**) s 2,2-diethoxyethylaminem proběhla kvantitativně, výsledkem byla nažloutlá kapalina – amin **4** [10]. Strukturně-analytická data (NMR, MS) byla ve shodě s literaturou [7].

- 3-(Benzensulfonyl-2,2-diethoxyethylaminomethyl)-1,4-dimethylkarbazol (**5**)



K roztoku aminu **4** (3,1 g, 9,105 mmol) v dichlormethanu (50 ml) byl přidán pyridin (4,4 ml, 0,053 mmol) a následně pomalu přikapán benzensulfonylchlorid (1,9 ml, 0,015 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2,5 h, reakce byla prováděna v inertní atmosféře (Ar).

Reakce byla ukončena vytřepáním reakční směsi vodným roztokem HCl (2 × 75 ml, 1,14 mol/l), organická fáze byla promyta roztokem NaHCO₃ (50 ml), vysušena bezvodým

Na₂SO₄ a odpařena do sucha. Odparek byl přečištěn preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: petrolether/ethylacetát 3:1), po které následovala rekrystalizace z EtOH. Tímto způsobem byl získán sulfonamid **5** (2,05 g, 47 %) jako bílá mikrokrytalická látka.

Strukturně-analytická data (NMR – Tabulka 1, MS) byla ve shodě s literaturou [10].

Tabulka 1: ^1H a ^{13}C NMR data sulfonamidu **5** (400,00 MHz pro ^1H , 100,59 MHz pro ^{13}C , CDCl_3 , 303.2 K)

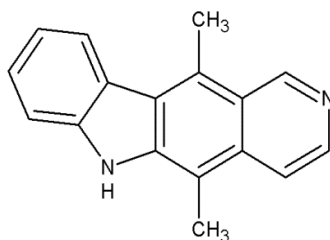
Atom #	δ_{C} [ppm]	$m^{\#}$	δ_{H} [ppm]	n_{H}	$m^{\#}$	$J_{\text{H-H}}$ [Hz]	HMBC
1	130.61	s	-	-	-	-	3, 14, 1-CH ₃
2	124.13	s	-	-	-	-	14, 1-CH ₃ , 4-CH ₃ **
3	128.86	d	6.952	1	s	-	14, 4-CH ₃ , 1-CH ₃ **
4	116.67	s	-	-	-	-	4-CH ₃ , 1-CH ₃ **
5	138.50	s	-	-	-	-	3, 4-CH ₃ , 6**, 14**, 1-CH ₃ **
6	-	-	7.992	1	s	-	-
7	139.73	s	-	-	-	-	9, 11, 6**, 10**
8	110.56	d	7.47*	1	m	-	10, 11*
9	125.08	d	7.411	1	ddd	0.9, 7.1, 8.0	11
10	119.51	d	7.244	1	ddd	1.1, 7.1, 8.0	8
11	122.86	d	8.208	1	br.d	8.0	9
12	124.48	s	-	-	-	-	10, 8**, 6**
13	122.01	s	-	-	-	-	11, 6**
14	50.63	t	4.718	2	s	-	3, 16
15	-	-	-	-	-	-	-
16	49.27	t	3.225	2	d	5.4	14
17	101.91	d	4.425	1	t	5.4	16, 19
18	-	-	-	-	-	-	-
19	63.07	t	3.523	2	dq	7.0, 9.3	17, 20
	-	-	3.295	2	dq	7.0, 9.3	-
20	15.22	q	1.078	6	t	7.0	19
<i>i</i>	140.57	s	-	-	-	-	<i>m</i> , <i>o</i> **
<i>o</i>	127.28	d	7.88*	2	m	-	<i>o</i> , <i>p</i> , <i>m</i> **
<i>m</i>	128.91	d	7.498	2	m	-	<i>m</i>
<i>p</i>	132.30	d	7.570	1	tt	2.3, 7.4	<i>o</i>
1-CH ₃	15.87	q	2.817	3	s	-	-
4-CH ₃	16.44	q	2.419	3	s	-	3

*HSQC odečty

**slabá korelace

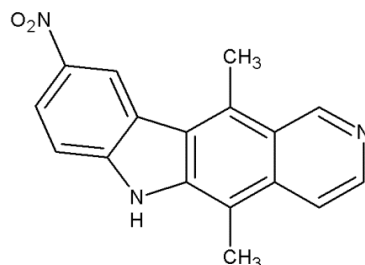
$J_{\text{H-H}}$ – vicinální interakční konstanta atomů vodíku, $m^{\#}$ – multiplicita signálů, n – počet ekvivalentních jader, δ_{C} – chemický posun uhlíku ^{13}C , δ_{H} – chemický posun vodíku ^1H , *i* – ipso, *o* – ortho, *m* – meta, *p* – para, *s* – singlet, *d* – dublet, *t* – triplet, *q* – kvartet, *m* – multiplet, *br s* – široký signál, *dq* – dublet kvartetu, *tt* – triplet tripletu, *ddd* – dublet dublet dubletu.

- Ellipticin (**1**)



Ellipticin (**1**) byl připraven podle postupu popsaného Dračínským [10]. Zpracování reakční směsi bylo upraveno následujícím způsobem: reakce byla ukončena po 20 minutovém zahřívání reakční směsi k varu pod atmosférou argonu, a to přidáním vody a následným nalitím celé směsi na led. Reakční směs byla alkalizována roztokem NaOH, což vedlo k vytvoření sraženiny, která byla následně odsáta a promyta vodou. Filtrát byl 2 × extrahován chloroformem. Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, sušidlo bylo filtrováno a filtrát byl odpařen do sucha. Sraženina byla vysušena na vzduchu za laboratorní teploty, následně rozpuštěna ve směsi CH₂Cl₂/MeOH, vzniklý roztok byl přidán k podílu získanému z extrakce a odpařen do sucha. Takto bylo získáno 1,292 g čistého ellipticinu, což odpovídá 70 % teoretického výtěžku. Strukturně-analytická data (NMR, MS) byla ve shodě s literaturou [7].

- 9-Nitroellipticin (**14**)



9-Nitroellipticin (**14**) byl připraven publikovaným postupem [10, 11] ve výtěžku 75 %. Strukturně-analytická data (NMR – Tabulka 2, MS) byla ve shodě s literaturou [7].

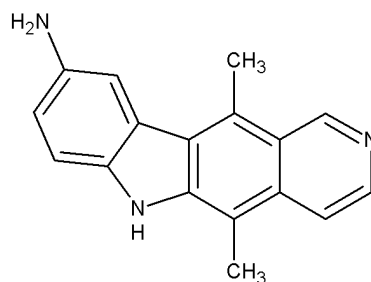
Tabulka 2: ^1H a ^{13}C NMR data 9-nitroellipticinu (**14**) (600,23 MHz pro ^1H , 150,93 MHz pro ^{13}C , DMSO- d_6 , 303.2 K)

Atom #	δ_{C} [ppm]	$m^{\#}$	δ_{H} [ppm]	$m^{\#}$	$J_{\text{H-H}}$ [Hz]
1	149.70	d	9.718	br s	-
3	140.58	d	8.473	d	6.1
4	116.46	d	7.939	d	6.1
4a	133.39	s	-	-	-
5	110.28	s	-	-	-
5a	141.25	s	-	-	-
6	-	-	12.127	br s	-
6a	146.71	s	-	-	-
7	110.66	d	7.607	d	8.9
8	123.32	d	8.301	dd	2.1, 8.9
9	139.99	s	-	-	-
10	119.77	d	9.002	d	2.1
10a	122.73	s	-	-	-
10b	122.54	s	-	-	-
11	129.88	s	-	-	-
11a	122.37	s	-	-	-
5- CH_3	12.03	q	2.748	s	-
11- CH_3	14.33	q	3.211	s	-

$J_{\text{H-H}}$ – vicinální interakční konstanta atomů vodíku, $m^{\#}$ – multiplicita signálů, δ_{C} – chemický posun uhlíku ^{13}C , δ_{H} – chemický posun vodíku ^1H , s – singlet, d – dublet, q – kvartet, br s – široký signál, dd – dublet dubletu.

3.3.2 Syntéza 9-aminoellipticinu

- 9-Aminoellipticin (**16**)



9-Nitroellipticin (**14**) (100 mg, 0,34 mmol) byl spolu s 1,64 g (8,69 mmol) SnCl_2 rozpuštěn v 15,4 ml kyseliny chlorovodíkové a 2 ml destilované vody. Reakční směs byla 1 h zahřívána na 109 °C na olejové lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs alkalizována roztokem hydroxidu sodného, čímž se vytvořila sraženina. Vzniklá sraženina byla odsáta, promyta vodou a ponechána schnout na vzduchu za laboratorní teploty. Podle provedené kontrolní TLC byl požadovaný derivát ellipticinu obsažen pouze ve sraženině, s filtrátem se tedy dále nepracovalo. Sraženina byla rozpuštěna ve směsi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) a získaný roztok byl odpařen do sucha. Následně byl odparek rozpuštěn v 5 ml MeOH a vzniklý roztok byl nanesen na fritu s vrstvou silikagelu (3 cm) zalitého ethylacetátem (EA). Pro promývání byla nejprve použita mobilní fáze EA/MeOH v poměru 5:1 (500 ml) a poté čistý methanol (400 ml). Získané filtráty byly monitorovány pomocí TLC a poté společně odpařeny do sucha. Následovalo konečné přečištění preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu. Vzorek byl opět rozpuštěn v MeOH, odpařen se silikagelem a nanesen na kolonu. Zde byla opět použita mobilní fáze EA/MeOH v poměru 5:1 a na závěr čistý MeOH. Touto metodou bylo získáno 60 mg 9-aminoellipticinu, což představuje 66 % teoretického výtěžku. NMR data 9-aminoellipticinu jsou uvedena v tabulce 3.

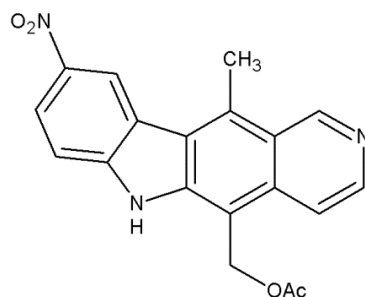
Tabulka 3: ^1H a ^{13}C NMR data 9-aminoellipticinu (**16**) (600,23 MHz pro ^1H , 150,93 MHz pro ^{13}C , DMSO- d_6 , 303.2 K)

Atom #	δ_{C} [ppm]	$m^{\#}$	δ_{H} [ppm]	$m^{\#}$	$J_{\text{H-H}}$ [Hz]
1	149.56	d	9.608	d	0.4
3	140.16	d	8.350	d	6.0
4	115.70	d	7.847	dd	0.4, 6.0
4a	132.12	s	-	-	-
5	107.35	s	-	-	-
5a	141.22	s	-	-	-
6	-	-	11.054	br s	-
6a	135.30	s	-	-	-
7	110.97	d	7.303	d	8.3
8	115.80	d	6.880	dd	2.0, 8.3
9	141.81	s	-	-	-
10	108.41	d	7.655	d	2.0
10a	123.82	s	-	-	-
10b	123.70	s	-	-	-
11	127.57	s	-	-	-
11a	121.57	s	-	-	-
5- CH_3	11.98	q	2.741	s	-
11- CH_3	14.20	q	3.207	s	-

$J_{\text{H-H}}$ – vicinální interakční konstanta atomů vodíku, $m^{\#}$ – multiplicita signálů, δ_{C} – chemický posun uhlíku ^{13}C , δ_{H} – chemický posun vodíku ^1H , s – singlet, d – dublet, q – kvartet, br s – široký signál, dd – dublet dubletu.

3.3.3 Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu

- Oxidace 9-nitroellipticinu – 13-acetoxy-9-nitroellipticin (**15**)

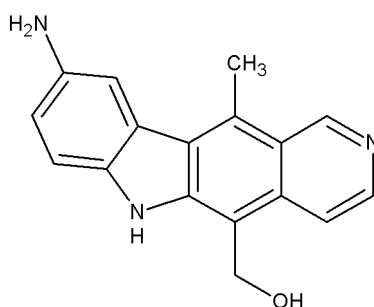


13-Acetoxy-9-nitroelliptin (**15**) byl připraven podle dříve publikovaného postupu [10]. Vzniklá sraženina byla rozpuštěna ve směsi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ a odpařena do sucha. Poté byla rozpuštěna v 5 ml MeOH a pro odstranění anorganických solí byl roztok filtrován přes fritu s vrstvou silikagelu zalitého ethylacetátem (EA). Jako mobilní fáze byla nejprve použita směs EA/MeOH v poměru 5:1 a poté čistý MeOH. Podle výsledků kontrolní TLC byly filtráty spojeny a odpařeny do sucha. Bylo získáno 27 % 13-acetoxy-9-nitroellipticinu.

NMR analýza vzorku, který se na TLC jevil jako čistá látka, prokázala, že se jedná o směs více než 4 látek s oxidovanou methylovou skupinou. Šlo tedy pravděpodobně o směs C-12 a C-13-acetoxy-9-nitro-ellipticinů spolu s dalšími vedlejšími produkty.

3.3.4 Pokus o syntézu 13-hydroxyellipticinu

- Redukce 13-acetoxy-9-nitroellipticinu SnCl_2 - 9-amino-13-hydroxyellipticin (**17**)

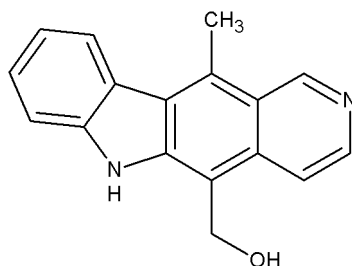


9-Amino-13-hydroxyellipticin (**17**) byl připraven podle dříve publikovaného postupu [10, 11]. Reakční směs byla po ochlazení na laboratorní teplotu alkalizována roztokem NaOH, vzniklá sraženina byla odsáta, promyta vodou a nechána schnout za laboratorní teploty na vzduchu. Podle TLC analýzy filtrát také obsahoval připravovaný derivát. Filtrát byl tedy extrahován ethylacetátem a odpařen do sucha. Sraženina byla rozpuštěna ve směsi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ a odpařena do sucha, poté byla rozpuštěna v 5 ml MeOH. Roztok byl filtrován přes fritu s vrstvou silikagelu zalitého ethylacetátem pro odstranění anorganických solí cínu. Podle výsledků TLC byly filtráty spojeny a odpařeny do sucha. Na základě HPLC analýzy však byla výsledkem neseparovatelná směs produktů velmi blízké polaritě, což vysvětluje, proč se tato směs jevila při TLC jako jediná látka.

- Pokus o redukci 13-acetoxy-9-nitroellipticinu zinkem –
9-amino-13-hydroxyellipticin (**17**)

Oxidovaný 9-nitroellipticin (**15**, 269 mg, 0,77 mmol) byl rozpuštěn v roztoku kyseliny chlorovodíkové (41,4 ml) a destilované vody (5,6 ml). Do roztoku byl po malých částech přisypáván práškový zinek (1,532 g, 23,42 mmol), reakční směs byla míchána 2 h za laboratorní teploty. Reakce byla ukončena ředěním vodou a následným alkalizováním vzniklé směsi roztokem NaOH. Vytvořila se červená sraženina, která byla odsáta a promyta vodou. Filtrát byl 3 × extrahován ethylacetátem, organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄ a následně odpařena do sucha. Sraženina byla po vyschnutí na vzduchu za laboratorní teploty rozpuštěna ve směsi CH₂Cl₂/MeOH, vzniklý roztok byl spojen s podílem získaným extrakcí filtrátu a odpařen do sucha. Analýza reakční směsi pomocí TLC ve srovnání se standardem 9-amino-13-hydroxyellipticinu (získán redukcí látky **15** pomocí SnCl₂) ukázala, že produktem této reakce není požadovaný 9-amino-13-hydroxyellipticin (**17**). Reakční směs proto nebyla dále separována.

- Pokus o syntézu 13-hydroxyellipticinu (**9**)



Pro přípravu 13-hydroxyellipticinu (**9**) byla použita předčištěná směs, získaná redukcí 13-acetoxy-9-nitroellipticinu (**15**) pomocí SnCl₂. Diazotace přítomné aminoskupiny a redukce diazoniové soli ethanolom byla provedena podle publikovaného postupu [10, 11]. Výsledkem této syntézy však byla poměrně komplikovaná, neseparovatelná směs látek.

3.3.5 NMR spektrometrie

NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker AVANCE III 600 (pozorovací frekvence 600,23 MHz pro ¹H, 150,93 MHz pro ¹³C) v DMSO-*d*₆ (99,8 atom % D, ARMAR AG, Döttingen, Švýcarsko) při 30 °C. Jako vnitřní standard sloužil zbytkový signál rozpouštědla (δ_H 2,500; δ_C 39,60). Chemické posuny a interakční konstanty v ¹H

NMR spektrech byly odečítány ze spekter získaných doplněním dat o čtyřnásobný počet bodů paměti a před Fourierovou transformací vynásobených vážicí funkcí zvyšující rozlišení (exponenciála se záporným exponentem plus Gaussova funkce). U ^{13}C NMR spekter bylo naopak použito umělé rozšíření čar (1 Hz) kvůli zvýšení poměru signál/šum. Chemické posuny jsou uváděny v δ -stupnici (ppm), interakční konstanty v Hz. Použité digitální rozlišení opravňuje k udávání chemických posunů protonů s platností na tři, uhlíků na dvě a proton-protonových interakčních konstant na jedno desetinné místo. Přiřazení signálů se opírá o dvojrozměrné NMR experimenty – COSY (Correlation Spectroscopy), gHSQC (gradientová verze Heteronuclear Single Quantum Correlation) a gHMQC (gradientová verze Heteronuclear Multiple Bond Correlation), které byly provedeny pomocí standardních programů dodávaných výrobcem.

3.3.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na MALDI-TOF/TOF ultraFLEX III hmotnostním spektrometru (Bruker-Daltonics, Brémy, Německo). Pozitivní/negativní spektra byla kalibrována externě pomocí monoisotopických $[\text{M}+\text{H}]^+$ iontů kalibrantu PepMixII (Bruker-Daltonics, Brémy). Jako MALDI matrice byl použit roztok dihydroxybenzoové kyseliny (10 mg/ml) v 50 % acetonitrilu s 0,1 % TFA. Pro vlastní MALDI-TOF MS experiment bylo 0,4 μl vzorku rozpuštěného v acetonitrilu nanášeno na krystalizovanou matrici na terčíku a necháno vyschnout při laboratorní teplotě. MALDI-TOF pozitivní spektra byla akumulována v reflektornovém modu.

3.3.7 Studium metabolismu ellipticinu a jeho derivátů 9-nitroellipticinu, 9-hydroxyellipticinu a 9-aminoellipticinu jaterním mikrosomálním systémem

3.3.7.1 Oxidace ellipticinu

Pro studium metabolismu ellipticinu byly připraveny inkubační směsi vždy ve dvou paralelních vzorcích o celkovém objemu 500 μl . Složení jednotlivých inkubačních směsí bylo následující:

- 10 μM ellipticin (1,25 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg proteinu/ml mikrosomální frakce

- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH–generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Množství jednotlivých složek bylo do inkubační směsi dodáno podle potřeby tak, aby jejich výsledná koncentrace ve směsi odpovídala požadovaným koncentracím. Poslední složkou přidanou do inkubační směsi byl NADPH–generující systém (50 µl, což odpovídá 10 % celkového objemu), který startoval reakci. Následně byly připravené roztoky za stálého míchání (450 otáček za minutu, RPM) inkubovány za přístupu kyslíku. Inkubace probíhala 20 minut při 37 °C. Poté byla inkubace jednotlivých vzorků zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu, dále bylo přidáno 2,5 µl fenacetinu, který sloužil jako vnitřní standard pro HPLC (1 mM roztok v methanolu). Inkubační směsi byly extrahovány 2 × 1 ml ethylacetátu při intenzivním třepání (MS 1 Minishaker), následně byly centrifugací při 13000 RPM (Sanyo Microcentaur MSE) po dobu 3 minut obě fáze odděleny. Organická fáze byla odebrána a odpařena do sucha pod atmosférou dusíku. Extrakce a následné odebrání organické vrstvy byly provedeny dvakrát. Odpařené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

3.3.7.2 Oxidace 9-nitroellipticinu

Metabolismu 9-nitroellipticinu byl studován pomocí inkubačních směsí, které byly připraveny vždy ve dvou paralelních vzorcích. Celkový objem inkubační směsi byl vždy 500 µl. Jednotlivé inkubační směsi byly následujícího složení:

- 10 µM 9-nitroellipticin (1,25 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg proteinu/ml mikrosomální frakce
- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH–generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Nejprve byl pipetován příslušný objem fosfátového pufru, do kterého byly postupně přidány jednotlivé složky inkubační směsi v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace v roztoku odpovídala koncentracím uvedeným ve složení inkubační směsi. Poslední přidanou složkou byl NADPH–generující systém (50 µl, tedy 10 % celkového

objemu vzorku), jehož úkolem bylo dodávat NADPH nutný pro reakci. Poté byly připravené roztoky 20 minut inkubovány při 37 °C za přístupu kyslíku a za stálého míchání (450 RPM). Po 20 minutách byla inkubace zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu ke každému vzorku, dále bylo přidáno 2,5 µl fenacetinu (1 mM roztok v MeOH), vnitřního standardu pro HPLC. Inkubační směsi byly celkem 2 × extrahovány 1 ml ethylacetátu při intenzivním třepání (MS 1 Minishaker). Následovala centrifugace při 13000 RPM (Sanyo Microcentaur MSE) po dobu 3 minut, během které byly obě fáze odděleny. Organická fáze byla odebrána a odpařena do sucha pod atmosférou dusíku. Extrakce a následné odebrání organické vrstvy byly provedeny dvakrát. Odpařené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

3.3.7.3 Oxidace 9-aminoellipticinu

Pro studium metabolismu dalšího připraveného derivátu ellipticinu, 9-aminoellipticinu, byly připraveny inkubační směsi ve třech paralelních vzorcích o celkovém objemu 500 µl. Složení jednotlivých inkubačních směsí bylo následující:

- 10 µM 9-aminoellipticin (1,25 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg proteinu/ml mikrosomální frakce
- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH–generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Jednotlivé složky inkubační směsi byly do fosfátového pufru o příslušném objemu přidávány tak, aby jejich výsledná koncentrace ve vzorku odpovídala požadovaným koncentracím uvedeným ve složení inkubační směsi. Jako poslední byl do roztoku přidán NADPH-generující systém (50 µl, což odpovídá 10 % celkového objemu), jehož úkolem bylo dodávat NADPH nutný pro reakci. Následovala inkubace připravených roztoků za přístupu kyslíku za stálého míchání (450 RPM). Takto byly vzorky inkubovány 20 minut při 37 °C. Následovalo zastavení inkubace přidáním 1 ml ethylacetátu, dále bylo přidáno 2,5 µl fenacetinu (1 mM roztok v methanolu), který sloužil jako vnitřní standard pro HPLC. Jednotlivé inkubační směsi byly dvakrát extrahovány 1 ml ethylacetátu při intenzivním třepání (MS 1 Minishaker) a následovalo oddělení obou fází pomocí centrifugace při 13000 RPM (Sanyo Microcentaur MSE) po dobu 3 minut. Ethylacetátová

fáze byla odebrána a odpařena do sucha pod atmosférou dusíku. Extrakce a následné odebrání organické vrstvy byly provedeny dvakrát. Odpařené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

3.3.7.4 Oxidace 9-hydroxyellipticinu

Metabolismus 9-hydroxyellipticinu byl studován v inkubačních směsích, které byly připraveny ve čtyřech paralelních vzorcích, celkový objem inkubačních směsí byl vždy 500 μ l. Jednotlivé inkubační směsi měly následující složení:

- 10 μ M 9-hydroxyellipticin (1,25 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg proteinu/ml mikrosomální frakce
- 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH–generující systém)
- fosfátový pufr (100 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Množství jednotlivých složek bylo do daného objemu fosfátového pufru dodáno podle potřeby tak, aby jejich výsledná koncentrace ve směsi odpovídala požadovaným koncentracím. Poslední složkou, která byla do inkubační směsi přidána, byl NADPH-generující systém (50 μ l, což odpovídá 10 % celkového objemu), jehož úkolem bylo dodávat NADPH nutný pro reakci. Připravené roztoky byly následně inkubovány za přítomnosti kyslíku a stálého míchání (450 RPM). Inkubace probíhala 20 minut při 37 °C. Poté byla inkubace jednotlivých vzorků zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu, dále bylo přidáno 2,5 μ l fenacetinu (1 mM roztok v methanolu), který sloužil jako vnitřní standard pro HPLC. Jednotlivé inkubační směsi byly extrahovány 2 \times 1 ml ethylacetátu při intenzivním třepání (MS 1 Minishaker), následně byly centrifugací při 13000 RPM (Sanyo Microcentaur MSE) po dobu 3 minut obě fáze odděleny. Ethylacetátová fáze byla odebrána a odpařena do sucha pod atmosférou dusíku. Extrakce a následné odebrání organické vrstvy byly provedeny dvakrát. Odpařené vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

3.3.8 Separace metabolitů vzniklých oxidací 9-nitroellipticinu a ellipticinu pomocí HPLC

Metabolity, které vznikly oxidací 9-nitroellipticinu a ellipticinu katalyzovanou potkaními jaterními mikrosomy, byly separovány pomocí HPLC na koloně Ultrasphere (ODS, C18, 250 × 4,6 mm, 5 μm, Beckman-Coulter). Pro separaci na uvedené koloně byla použita mobilní fáze následujícího složení: 64 % methanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová, ze které byl vždy před použitím odstraněn vzduch sonikací. Vzorek uchovaný při teplotě -20 °C byl pro měření rozpuštěn v 25 μl methanolu, aplikace vzorku byla nastavena na 20 μl. Metabolity byly detekovány při vlnové délce 296 nm. Separace metabolitů 9-nitroellipticinu a ellipticinu probíhala při teplotě 37 °C a průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,7 ml/min. Pro vyhodnocení vzniklých metabolitů byla vztažena plocha každého „píku“ k vnitřnímu standardu, tedy ploše „píku“ fenacetinu.

Jednotlivé metabolity vznikající oxidací 9-nitroellipticinu byly postupně jímány do Eppendorfových zkumavek a následně odpařeny pro analýzu vzniklých metabolitů 9-nitroellipticinu pomocí hmotnostní spektrometrie.

3.3.9 Oxidace 9-aminoellipticinu a 9-hydroxyellipticinu potkaním jaterním mikrosomálním systémem analyzovaná pomocí HPLC

Oba uvedené deriváty ellipticinu byly podrobeny oxidaci katalyzované potkaními jaterními mikrosomy. Výsledek této oxidace byl analyzován pomocí HPLC na koloně Ultrasphere (ODS, C18, 250 × 4,6 mm, 5 μm, Beckman-Coulter). Měření probíhalo za stejných podmínek, tedy při teplotě 37 °C a průtoku mobilní fáze kolonou 0,7 ml/min. Složení mobilní fáze bylo následující: 64 % methanol, 5 mM heptansulfonát sodný, 32 mM kyselina octová. Z připravené mobilní fáze byl vždy před použitím odstraněn vzduch sonikací. Vzorek uchovávaný při teplotě -20 °C byl pro měření rozpuštěn v 25 μl methanolu, „nástřík“ vzorku byl nastaven na 20 μl. Detekce byla prováděna při vlnové délce 296 nm.

4 Výsledky

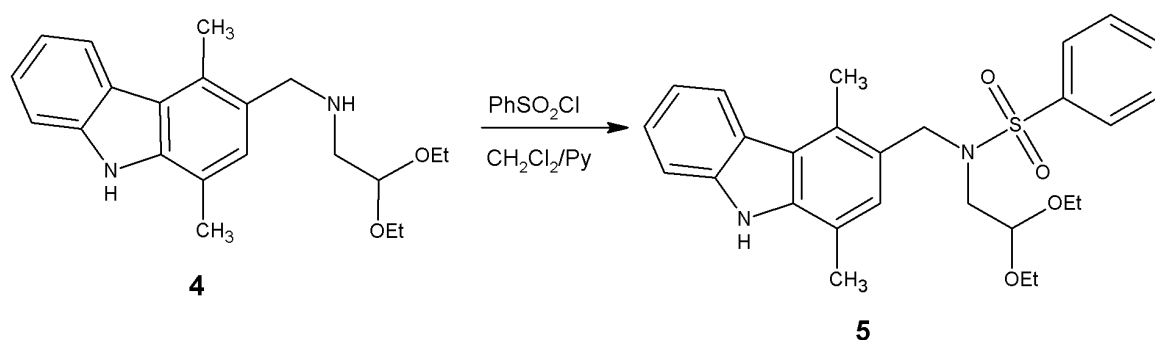
4.1 Syntéza 9-nitroellipticinu

Syntéza tohoto derivátu ellipticinu probíhala přes několik meziproductů. Výchozími látkami celé syntézy byly indol a 2,5-hexandion, jejichž kyselou katalyzovanou kondenzací (kyselinou *p*-toluensulfonovou) v EtOH vznikl 1,4-dimethylkarbazol (**2**). Modifikací zpracování reakční směsi oproti publikovanému postupu bylo dosaženo výtěžku 56 % (výtěžek v původní práci byl 43 %) [10].

Následovala Vilsmeierova-Haackova formylace 1,4-dimethylkarbazolu (**2**), kdy k výchozímu 1,4-dimethylkarbazolu (**2**) byl přidán *N*-methylformanilid a chlorid fosforylu, reakce probíhala v 1,2-dichlorethanu (obr. 3, str. 15). Formylová skupina se vážala přednostně do polohy C-3, minoritním produktem pak byl 9-formyl-derivát. Bylo získáno 54 % teoretického výtěžku 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu (**3**).

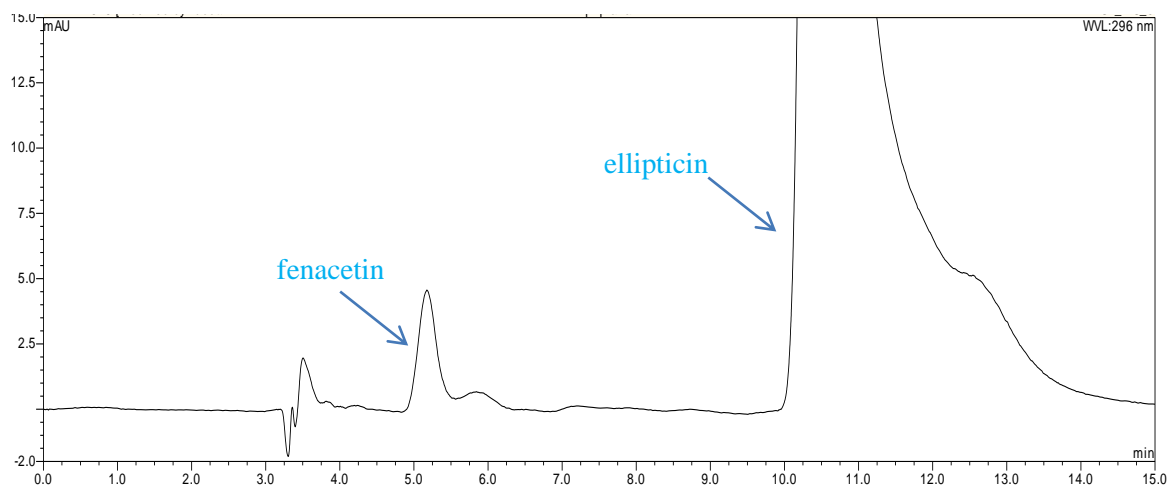
Dalším krokem v syntéze 9-nitroellipticinu (**10**) byla příprava aminu **4**, který vzniká reakcí 3-formyl-1,4-dimethylkarbazolu a 2,2-diethoxyethylaminu. Touto reakcí vznikl nejprve imin, který byl redukován NaBH₄ v suchém MeOH na amin **4** (obr. 3, str. 15).

Pro přípravu následujícího meziproductu, sulfonamidu **5** (obr. 10), byl použit amin **4**. Sulfonylace aminu **4** byla provedena benzensulfonyl chloridem v dichlormethanu v přítomnosti pyridinu, který sloužil jako akceptor vznikajícího chlorovodíku. Touto dosud nepublikovanou reakcí bylo získáno 47 % teoretického výtěžku odpovídajícího sulfonamidu **5**, což představuje zlepšení výtěžku oproti výtěžku deklarovanému v literatuře [11] o zhruba 10 %.



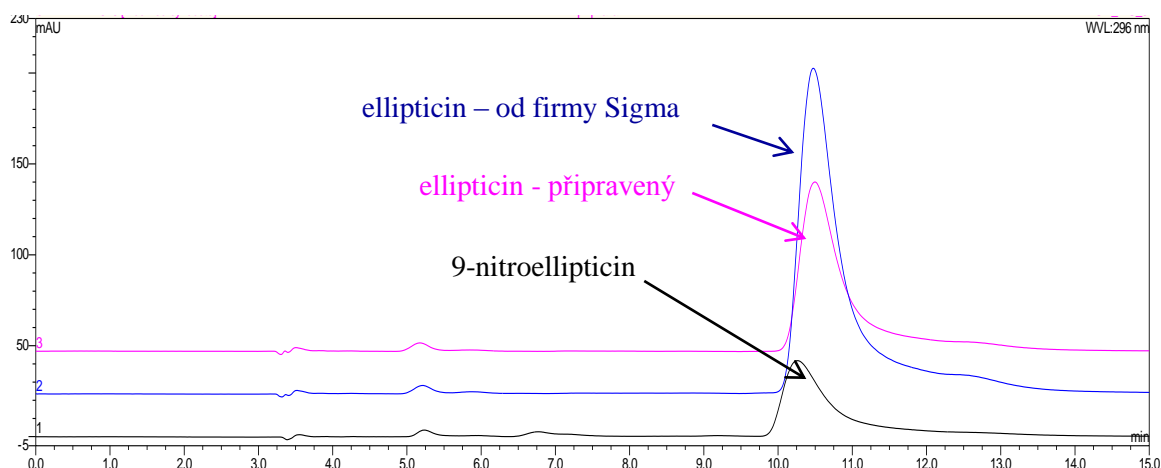
Obr. 10: Schéma přípravy sulfonamidu **5**

Dalším krokem syntézy byla příprava ellipticinu. Ellipticin vznikl kyselou hydrolyzou sulfonamidu **5** za varu ve směsi zředěné kyseliny chlorovodíkové a dioxanu (obr. 3, str. 15). Kyselá hydrolyza vedla spolu s odstraněním benzensulfonylové skupiny k uzavření posledního ze čtyř ellipticinových kruhů (pyridinový kruh). Zpracování reakční směsi bylo modifikováno, což vedlo ke vzniku čistšího ellipticinu (**1**) (obr. 11). Reakce proběhla s výtěžkem 70 %.



Obr. 11: HPLC vzorku připraveného ellipticinu detekovaného při vlnové délce 296 nm. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.

9-Nitroellipticin (**14**) byl připraven nitrací ellipticinu pomocí HNO_3 v prostředí kyseliny octové za chlazení reakční směsi na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Nitrace za těchto podmínek probíhala selektivně na C-9. Bylo získáno 75 % teoretického výtěžku 9-nitroellipticinu, jehož čistota byla určena pomocí HPLC (obr. 12, str. 49).

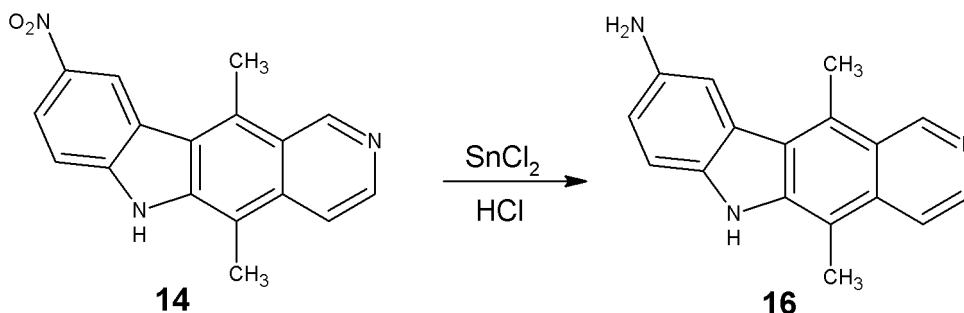


Obr. 12: Porovnání čistoty vzorků 9-nitroellipticinu, připraveného ellipticinu a ellipticinu od firmy Sigma, měřené pomocí HPLC při vlnové délce 296 nm

4.2 Syntéza 9-aminoellipticinu

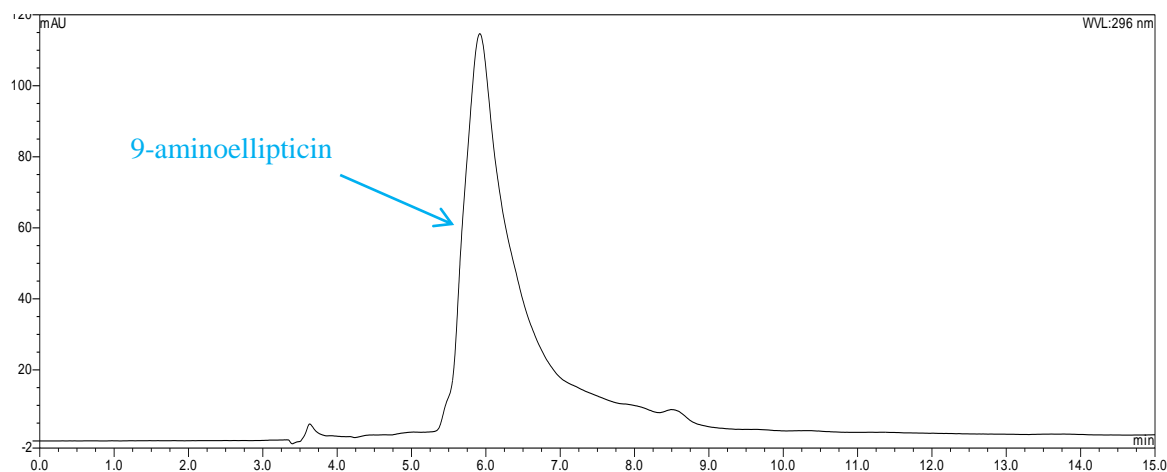
9-Aminoellipticin (**16**) byl připraven z 9-nitroellipticinu (**14**) redukcí nitroskupiny v poloze C-9. Nejprve byla pro redukci nitroskupiny použita redukce zinkem ve zředěné HCl. Výhodou této metody je použití mírnějších reakčních podmínek, konkrétně práce za laboratorní teploty, oproti druhé používané metodě, kdy se k redukci využívá SnCl_2 ve vroucí HCl. Po ukončení této reakce byl vzorek reakční směsi porovnán pomocí TLC se standardem 9-aminoellipticinu. Z tohoto porovnání však vyplynulo, že reakce neposkytla požadovaný produkt, přestože výchozí 9-nitroellipticin ve vzorku reakční směsi přítomen již nebyl. K reakční směsi byl proto přidán další Zn a směs byla zahřívána 30 minut na $50\text{ }^\circ\text{C}$, ani tato modifikace však ke vzniku 9-aminoellipticinu nevedla.

K redukci 9-nitroellipticinu byl proto použit SnCl_2 (obr. 13) a reakční směs rozpuštěná v kyselině chlorovodíkové byla zahřívána 1 h na $109\text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. 13: Schéma přípravy 9-aminoellipticinu (**16**)

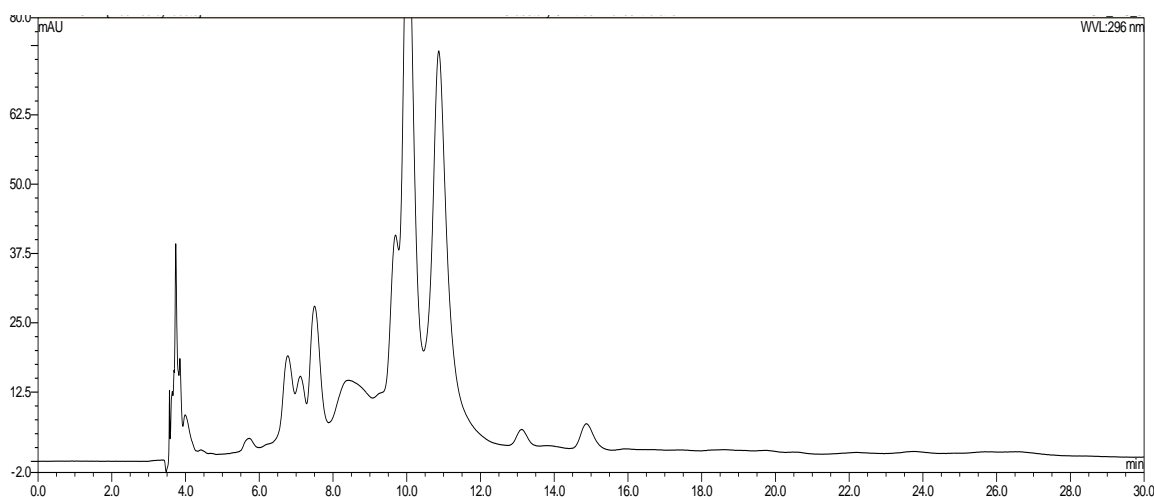
Takto byla připravena směs obsahující 9-aminoellipticin, která byla přečištěna přes vrstvu silikagelu na fritě, tím byly odstraněny přítomné sloučeniny cínu. Následovalo „dočištění“ preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu, čímž byl získán čistý 9-aminoderivát **16** ve výtěžku 66 %. Připravený 9-aminoellipticin (**16**), jehož čistotu ukazuje obrázek 14, byl následně podroben biochemickému testování jeho oxidace jaterními potkaními mikrosomy obsahujícími cytochromy P450.



Obr. 14: HPLC vzorku připraveného 9-aminoellipticinu detekovaného při vlnové délce 296 nm

4.3 Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu

Také při přípravě tohoto derivátu ellipticinu se vycházelo z 9-nitroellipticinu, u kterého bylo třeba oxidovat polohu C-13. Bylo zjištěno, že přítomnost nitroskupiny v poloze C-9 ellipticinu je nezbytná pro úspěšnou oxidaci C-13 ellipticinu, neboť oxidace samotného ellipticinu vede k polymeraci [11]. Benzylová oxidace 9-nitroellipticinu v poloze C-13 byla provedena pomocí $K_2S_2O_8$ a $CuSO_4$ ve vroucí kyselině octové [11].



Obr. 15: HPLC vzorku připraveného 13-acetoxy-9-nitroellipticinu detekovaného při vlnové délce 296 nm

Jak vyplývá z analýzy vzorku pomocí HPLC majoritní látky reakční směsi z této oxidace (obr. 15), který byl získán jako jeden z podílů při jejím zpracování, jednalo se stále o velmi komplikovanou směs látek, přestože z analýzy pomocí TLC byla patrná jediná, mírně znečištěná látka. Finální dočištění tohoto vzorku bylo provedeno pomocí preparativní HPLC, což vedlo k izolaci dvou majoritních látek. Získaná množství obou produktů však na určení jejich struktury pomocí NMR nepostačovala. Z časových důvodů již nebylo možno získat větší množství směsi pro tuto separaci a získat tak potřebná množství obou majoritních produktů, nezbytná pro určení jejich struktury. V dalších reakčních krocích proto byla používána pouze směs těchto látek, obdobně jako tomu bylo v původní práci [11].

4.4 Syntéza 13-hydroxyellipticinu

Syntéza 13-hydroxyellipticinu (**9**) byla provedena podle postupu uvedeného v literatuře [10, 11]. Tato syntéza vycházela z 9-nitroellipticinu, který byl v dalším kroku podroben oxidaci v poloze C-13, jak je uvedeno v kapitole 4.3. Následně bylo nutné odstranit nitroskupinu oxidovaného produktu – 13-acetoxy-9-nitroellipticinu (**15**), aby byl získán požadovaný 13-hydroxyellipticin. Odstranění nitroskupiny spočívalo v tříkrokové syntéze, kdy byla nejprve nitroskupina redukována na aminoskupinu (při redukci dochází současně k hydrolýze acetátu v poloze C-13), která byla následně diazotována dusitanem

sodným za chlazení na 5 °C a vzniklá diazoniová sůl byla poté *in situ* redukována ethanolem.

Redukce nitroskupiny byla v původní literatuře prováděna pomocí SnCl₂ ve vroucí HCl [11], tento postup však v našem případě většinou vedl prakticky k úplnému rozkladu produktu. Snahou tedy bylo nalézt jemnější metodu redukce nitroskupiny než je redukce ve vroucí kyselině chlorovodíkové.

První alternativou bylo použití H₂ na Pd, tento způsob měl navíc umožnit přípravu dalšího derivátu ellipticinu, 13-acetoxy-9-aminoellipticinu, neboť za takto mírných podmínek by nemělo docházet k deacetylaci. Takto získaný 13-acetoxy-9-aminoellipticin měl být po odstranění aminoskupiny a vzniku 13-acetoxyellipticinu podroben biochemickému testování. Nicméně tento způsob redukce nitroskupiny se v našem případě ukázal jako nepoužitelný, protože výchozí 9-nitroderivát **15** se nepodařilo rozpustit v žádném z vhodných rozpouštědel (MeOH, EtOH, THF, ethylacetát), ani v celé řadě směsí rozpouštědel (MeOH/DMF 10:1 – 5:1, MeOH/AcOH 25:1 – 10:1, MeOH/Et₃N 20:1 – 10:1, MeOH/ethylacetát – různé poměry).

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo za použití směsi MeOH/Et₃N (10:1), rozpustnost nitroderivátu **15** zde však byla stále příliš nízká a většina výchozí látky zůstala nerozpuštěná. Očekávalo se, že by mohlo dojít k postupnému rozpuštění 13-acetoxy-9-nitroderivátu **15** v průběhu reakce, tak jak bude rozpuštěný podíl přeměněn na lépe rozpustný 9-aminoderivát **17**. Tento předpoklad se však nenaplnil. Proto byla možnost redukce pomocí H₂ na Pd opuštěna a hledala se nová alternativní cesta.

Poslední variantou redukce nitroskupiny, která byla v této práci použita, byla redukce práškovým zinkem v kyselině chlorovodíkové. Oproti redukcí pomocí SnCl₂ lze tuto reakci provádět za laboratorní teploty, podmínky reakce jsou tedy výrazně mírnější. Navíc byla tato metoda použita jako alternativa při redukcí 9-nitroellipticinu na 9-aminoellipticin [10], tedy látky velice podobné. V naší reakci byl však redukcí 13-acetoxy-9-nitroellipticinu získán produkt, který se podle TLC neshodoval se standardem, získaným pomocí SnCl₂. Aby byla vyloučena možnost, že se jedná o 13-acetoxy-9-aminoellipticin, který by při redukcí za laboratorní teploty mohl vznikat (a jehož polarita na TLC by byla rozdílná od polarit 9-amino-13-hydroxyellipticinu), byla surová reakční směs po redukcí zinkem podrobena bazické hydrolýze (K₂CO₃, MeOH/H₂O 10:1). Produkt po bazické hydrolýze však měl totožnou polaritu jako výchozí látka, získaná redukcí Zn. Bylo tedy

zřejmé, že redukcí pomocí Zn nevzniká požadovaný 9-aminoderivát **17** a tento způsob redukce je v našem případě opět nepoužitelný.

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo nalézt vhodnější metodu redukce nitroskupiny, bylo nutné alespoň zkusit modifikovat podmínky redukce pomocí SnCl_2 . Testovala se redukce za laboratorní teploty, výsledek však nebyl nijak odlišný od reakce ve vroucí kyselině chlorovodíkové – k rozkladu produktu docházelo i zde, navíc se zhoršila konverze (i když není zřejmé, zda k tomu došlo díky zpomalení reakce vlivem nižší teploty nebo zhoršené rozpustnosti 13-acetoxy-9-nitroderivátu za laboratorní teploty). Teprve po mnoha nezdařených experimentech bylo zjištěno, že průběh reakce je poměrně značně závislý na měřítku reakce (množství výchozí látky 13-acetoxy-9-nitroellipticinu), rozklad produktu je tím znatelnější, z čím většího množství látky se vychází. Reakce pak probíhala nejlépe při množství zhruba 100 mg 13-acetoxy-9-nitroellipticinu.

Dalším krokem syntézy 13-hydroxyellipticinu byla diazotace 9-amino-13-hydroxyellipticinu pomocí NaNO_2 spojená s následnou redukcí diazoniové soli ethanolem. Opakováním publikovaného postupu [11] však k požadované transformaci nedošlo a výchozí 9-aminoderivát **17** zůstal nezměněn. Proto byla provedena testovací reakce s 9-aminoellipticinem, kdy byl použit nadbytek NaNO_2 ($6 \times$ větší množství oproti původnímu postupu), výsledkem této reakce bylo odstranění aminoskupiny z polohy C-9 za vzniku ellipticinu.

9-Amino-13-hydroxyellipticin byl proto znovu podroben diazotaci za výše uvedených modifikovaných podmínek. Po ukončení reakce se ukázalo, že došlo k rozkladu látky. Z analýzy pomocí TLC bylo patrné, že vznikla směs několika látek, která vůbec neobsahovala produkt, který by polaritou odpovídal 13-hydroxyellipticinu.

Po několika nezdařích byl opět připraven produkt, který mohl odpovídat 13-hydroxyderivátu. Výsledky NMR-analýzy však ukázaly, že se pravděpodobně jednalo o 9-amino-13-hydroxyellipticin, doprovázený směsí dalších, strukturně podobných látek, které se však nepodařilo oddělit. Během analýzy navíc docházelo k rozkladu produktu, což znemožnilo získání použitelných dat k potvrzení připravené látky. Bylo tak pouze zjištěno, že se jedná o směs více než dvou látek, u nichž je modifikována poloha C-9 ellipticinového skeletu a objevují se zde signály benzylové skupiny (naznačující úspěšnou oxidaci methylové skupiny).

Pro čištění směsí, jež vznikly při pokusech o přípravu 13-hydroxyellipticinu, kde byla redukce 13-acetoxy-9-nitroderivátu provedena SnCl_2 , bylo testováno také použití

kolonky SPE C-18 (Solid Phase Extraction). Kolonka SPE byla použita jako kolona s reverzní fází, kde se směs začíná dělit od polárních látek, nepolární látky „vytékají“ z kolony jako poslední. Ze směsi se sice podařilo odstranit anorganické látky, rozdělení směsi se však nezdařilo. Tento způsob čištění tedy nebyl účinný, navíc byl poměrně zdoluhavý, proto se nadále nepoužíval.

4.5 Metabolismus ellipticinu a jeho derivátů jaterním mikrosomálním systémem

Jedním z meziproductů při syntéze 13-hydroxyellipticinu je 9-nitroellipticin, u něhož bylo studováno, zda v přítomnosti jaterních mikrosomů dochází k oxidaci tohoto derivátu ellipticinu za tvorby metabolitů, podobně jako tomu je právě u ellipticinu. Dalším připraveným derivátem ellipticinu byl 9-aminoellipticin, který byl připraven redukcí 9-nitroellipticinu, také tento derivát byl podroben oxidaci jaterním mikrosomálním systémem. Pro porovnání vlivu funkčních skupin v poloze C-9 ellipticinu byl oxidaci jaterními mikrosomy podroben také 9-hydroxyellipticin, ten však jako jediný z testovaných derivátů ellipticinu nebyl připraven, ale pracovalo se s komerčně dostupnou látkou.

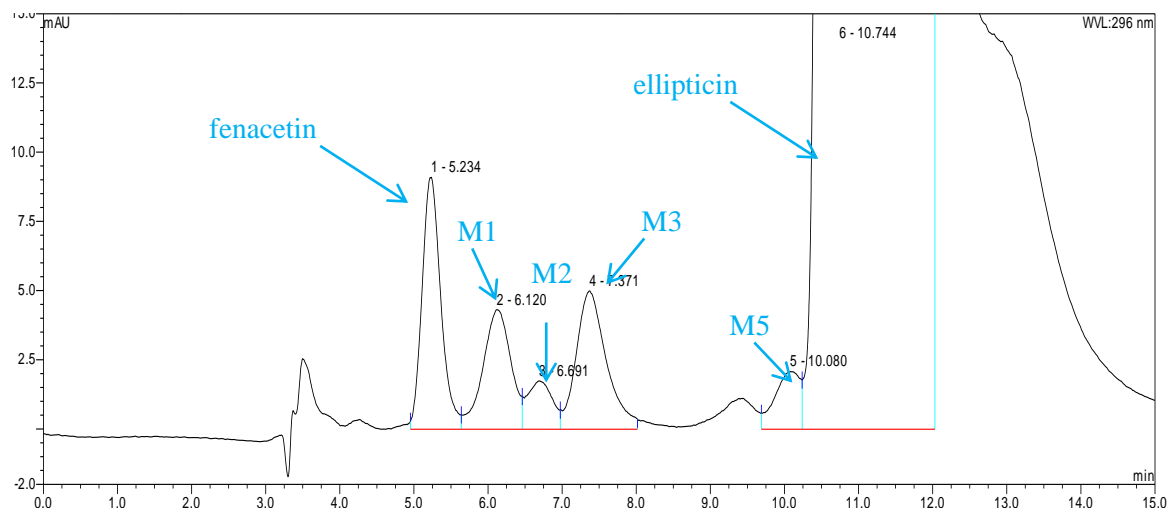
Pro studium metabolismu ellipticinu a jeho derivátů – 9-nitroellipticinu, 9-aminoellipticinu a 9-hydroxyellipticinu byly použity jaterní mikrosomální systémy z potkanů premedikovaných Sudanem I, pregnelon-karbonitrilem (PCN), fenobarbitalem (PB), ethanolem, dále byly také použity kontrolní mikrosomy z nepremedikovaných potkanů.

Uvedené látky použité pro premedikaci potkanů indukují různé podrodiny cytochromů P450, konkrétně: Sudan I je induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A, PCN indukuje enzymy podrodiny 3A [43], zatímco fenobarbital indukuje cytochromy P450 podrodiny 2B [43] a nakonec ethanolem je indukovaný CYP2E1 [39, 40, 43].

4.5.1 Oxidace ellipticinu

Oxidací ellipticinu mikrosomálními systémy indukovanými Sudanem I, PCN, PB, EtOH a kontrolním mikrosomálním systémem bez indukce, vznikaly jednotlivé metabolity ellipticinu, které byly separovány pomocí HPLC. Ellipticin byl tedy metabolizován všemi použitými jaterními mikrosomálními systémy. Již v předchozích studiích byla objasněna struktura 5 vznikajících metabolitů ellipticinu (obr. 16, str. 55) [46]:

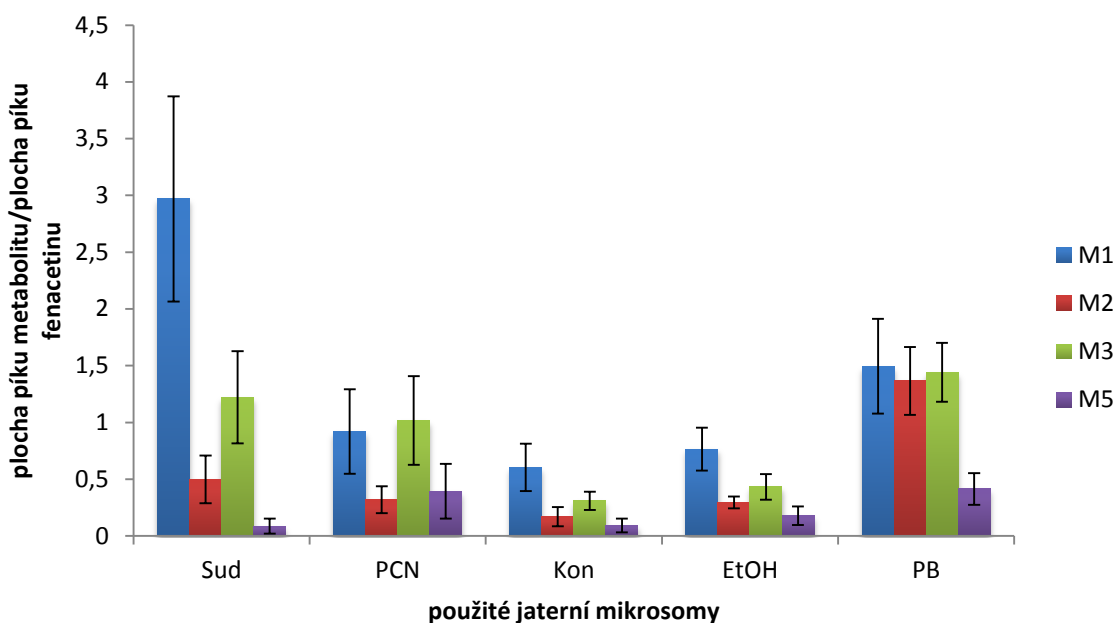
- M1:** 9-hydroxyellipticin
- M2:** 12-hydroxyellipticin
- M3:** 13-hydroxyellipticin
- M4:** 7-hydroxyellipticin
- M5:** N²-oxid ellipticinu



Obr. 16: Metabolity ellipticinu vzniklé oxidací ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem indukovaným PCN separované pomocí HPLC při vlnové délce 296 nm, M4 v tomto měření nebyl patrný

Srovnání tvorby metabolitů ellipticinu vznikajících oxidací ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I, PCN, ethanolom, fenobarbitalem a kontrolním mikrosomálním systémem z nepremedikovaných potkanů ukazuje obrázek 17 (str. 56). Bylo zjištěno, že za přítomnosti NADPH-generujícího systému je celkově nejúčinnější mikrosomální systém indukovaný fenobarbitalem. Oxidací tímto systémem vzniklo největší množství metabolitů M2, M3 a M5. Metabolit M1 (9-hydroxyellipticin) byl nejvíce tvořen oxidací ellipticinu mikrosomy indukovanými Sudanem I, což také odpovídá předchozím studiím, kdy bylo potvrzeno, že 9-hydroxyellipticin vzniká oxidací ellipticinu CYP1A1 a CYP1A2 [46, 51, 53]. Nicméně hned na druhém místě v tvorbě tohoto metabolitu byly právě zmíněné nejúčinnější mikrosomy indukované PB. Naopak nejméně účinný mikrosomální systém byl kontrolní, z nepremedikovaných potkanů. Téměř u všech použitých mikrosomů, kromě těch indukovaných PCN, se oxidací ellipticinu tvořil v největším zastoupení 9-hydroxyellipticin (M1). U zmíněných PCN mikrosomů to byl 13-hydroxyellipticin (M3). U vzorků, pro které

byly použity „Sudanové“, kontrolní a „ethanolové“ mikrosomy bylo shodné zastoupení jednotlivých metabolitů, ačkoli v celkovém množství se u jednotlivých mikrosomů lišily. Nejvíce se tvořil metabolit M1 (9-hydroxyellipticin), druhý v pořadí byl 13-hydroxyellipticin (M3), následoval 12-hydroxyellipticin (M2) a nakonec nejmenší zastoupení v těchto třech případech měl metabolit M5 (N²-oxid ellipticinu).

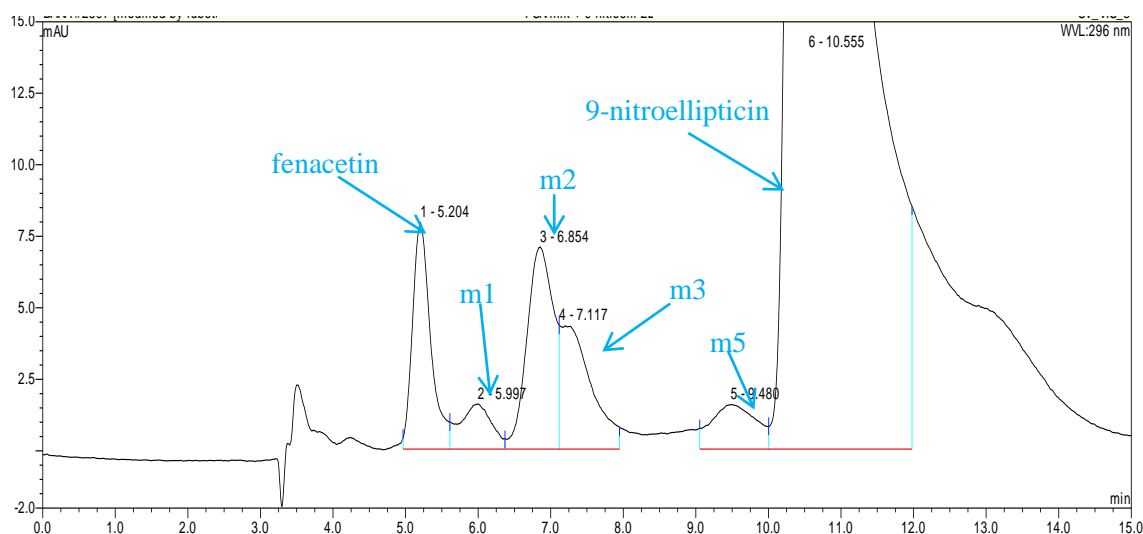


Obr. 17: Metabolity ellipticinu vzniklé oxidací ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky 4 a více paralelních měření (Sud, PCN, Kon, EtOH a PB mikrosomů).

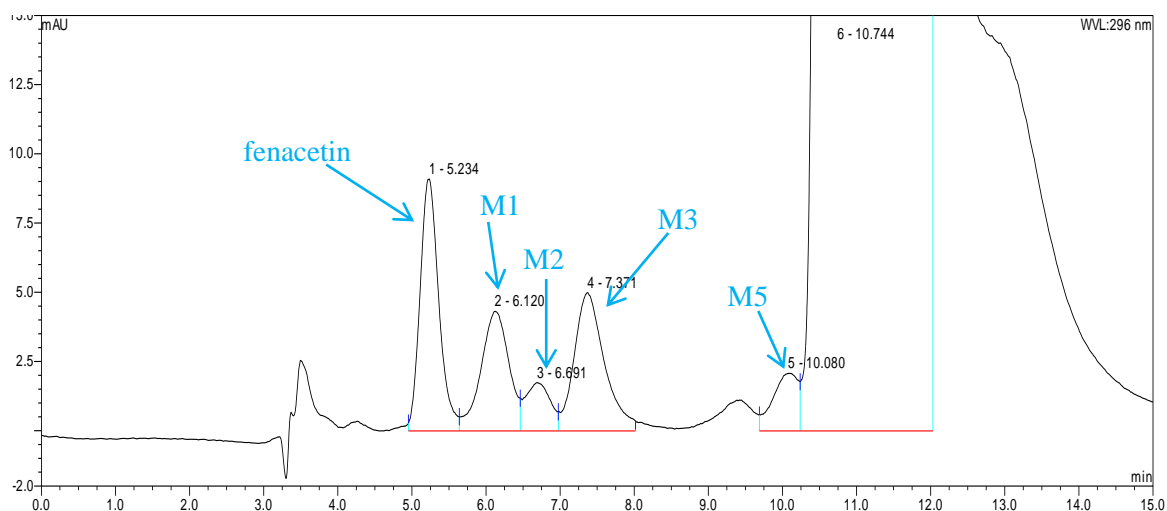
4.5.2 Oxidace 9-nitroellipticinu

Retenční charakteristiky 9-nitroellipticinu zjištěné pomocí HPLC jsou velmi podobné ellipticinu, obrázek 12 (str. 49). To naznačuje, že se tyto dvě látky liší svojí polaritou jen velmi nepatrně. Bylo tedy předpokládáno, že by 9-nitroellipticin mohl podléhat biotransformaci podobně jako je tomu u ellipticinu. 9-Nitroderivát **14** byl proto podroben oxidaci stejnými jaterními mikrosomálními systémy (Sud, PCN, Kon, EtOH, PB) v přítomnosti NADPH-generujícího systému jako ellipticin. Výsledkem tohoto měření bylo zjištění, že za přítomnosti jaterních mikrosomů a NADPH-generujícího systému dochází k oxidaci 9-nitroellipticinu. Jeho oxidací vznikají minimálně 4 metabolity (obr. 18., str. 57; obr. 20, str. 58). Metabolity jsou označeny podobně jako u ellipticinu, liší se jen malým

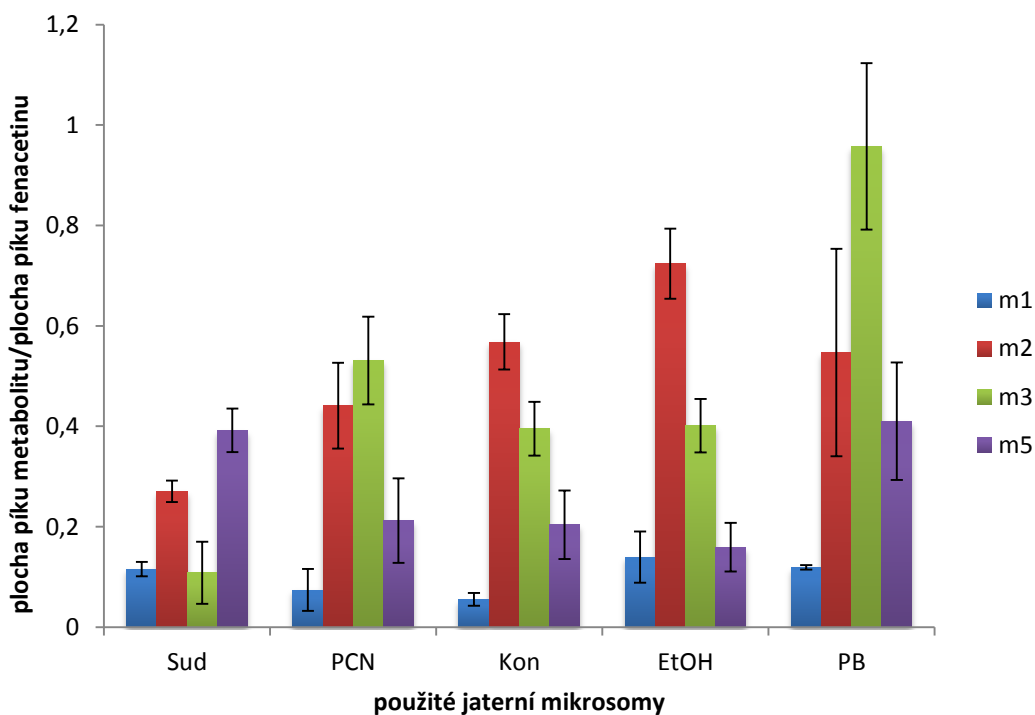
písmenem – m1, m2, m3, m5. Toto označení bylo zvoleno na základě podobnosti separace 9-nitroellipticinu a ellipticinu, jedná se však samozřejmě o jiné sloučeniny, než jsou metabolity ellipticinu. Metabolity 9-nitroellipticinu se od metabolitů ellipticinu liší v retenčním čase jen velmi nepatrně, tyto rozdíly lze porovnat z obrázků 18 a 19 (str. 58), podobně jako je tomu u samotného ellipticinu a 9-nitroellipticinu (obr. 12, str. 49). Struktura metabolitů 9-nitroellipticinu zatím není známa a bude předmětem dalších studií. Nejefektivnější v oxidaci 9-nitroellipticinu byly jaterní mikrosomy potkana premedikovaného PB (obr. 20, str. 58).



Obr. 18: HPLC metabolitů 9-nitroellipticinu vzniklých oxidací 9-nitroellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkana indukovaným PCN detekované při vlnové délce 296 nm.



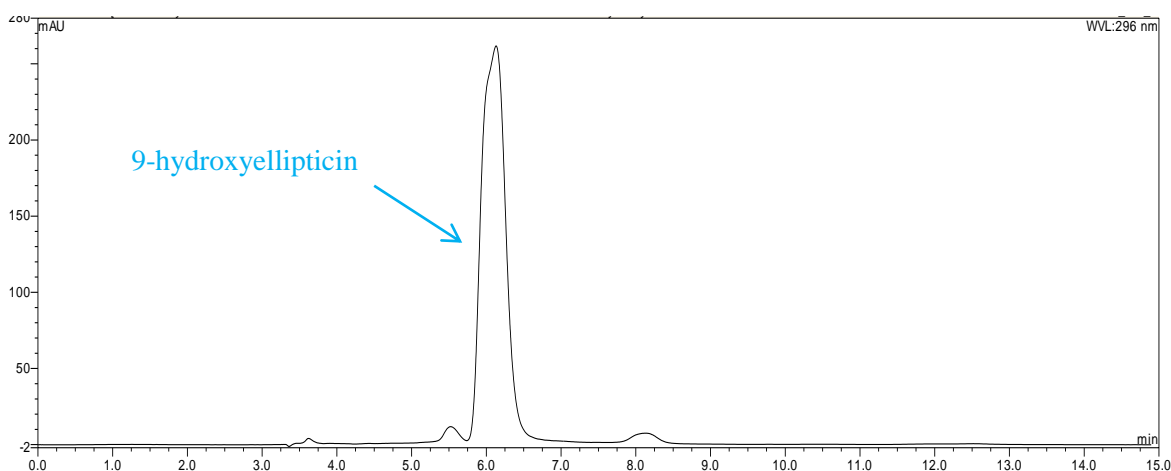
Obr. 19: HPLC metabolitů ellipticinu vzniklých oxidací ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkana indukovaným PCN detekované při vlnové délce 296 nm, M4 v tomto měření nebyl patrný (stejný obrázek jako obr. 16 na str. 55, zde jen pro porovnání vznikajících metabolitů ellipticinu s metabolity 9-nitroellipticinu).



Obr. 20: Metabolity 9-nitroellipticinu vzniklé jeho oxidací jaterními mikrosomálními systémy laboratorního potkana. Výsledky uvedené v obrázku jsou průměry a směrodatné odchylky 3 paralelních měření (Sud, PCN, Kon, EtOH a PB mikrosomů).

4.5.3 Oxidace 9-hydroxyellipticinu

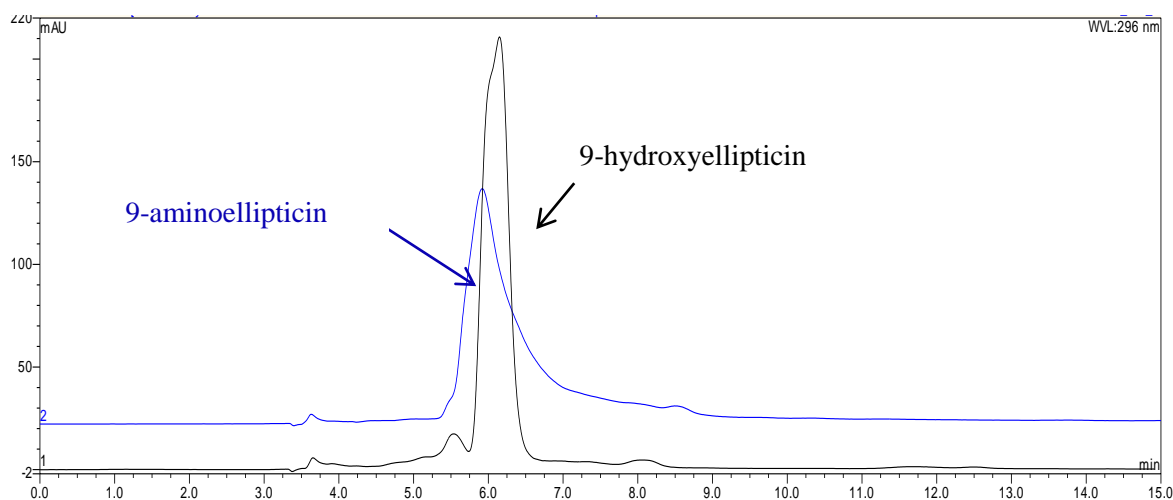
9-Hydroxyellipticin je jedním z metabolitů ellipticinu tvořených jeho oxidací cytochromy P450 podrodiny 1A [46, 51, 53]. Jde o nejpolarnější ze vznikajících metabolitů ellipticinu. 9-Hydroxyellipticin byl jediný z derivátů ellipticinu použitý pro další studie, který byl získán komerčně (od firmy Sigma). Stejně jako ostatní deriváty ellipticinu byl testován, zda je v přítomnosti jaterních mikrosomů oxidován za tvorby metabolitů. Bylo zjištěno, že k oxidaci tohoto derivátu nedochází, netvoří se žádné metabolity (obr. 21).



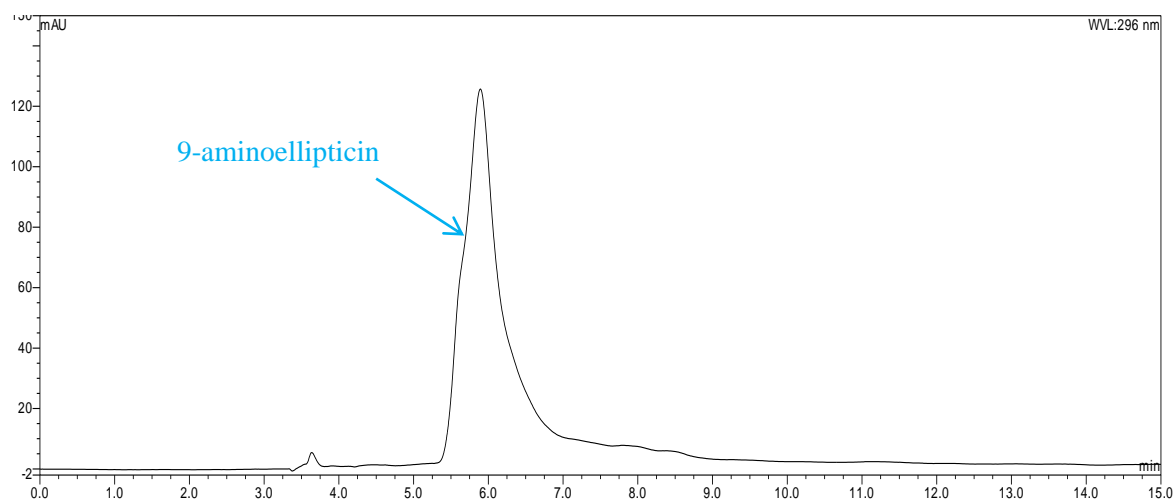
Obr. 21: HPLC 9-hydroxyellipticinu inkubovaného s jaterním mikrosomálním systémem indukovaným Sudanem I, detekce při vlnové délce 296 nm.

4.5.4 Oxidace 9-aminoellipticinu

Porovnáním chromatografických vlastností 9-aminoellipticinu s 9-hydroxyellipticinem pomocí HPLC bylo zjištěno, že 9-aminoellipticin je ještě nepatrně polárnější než 9-hydroxyellipticin (obr. 22, str. 60). Také tento derivát ellipticinu byl podroben oxidaci jaterními mikrosomálními systémy laboratorního potkana (Sud, PCN, Kon, EtOH a PB) za přítomnosti NADPH-generujícího systému. I v případě 9-aminoellipticinu bylo zjištěno, že žádný z použitých mikrosomálních systémů nevede k tvorbě metabolitů 9-aminoellipticinu (obr. 23, str. 60).



Obr. 22: Srovnání retenčních parametrů 9-hydroxyellipticinu a 9-aminoellipticinu pomocí HPLC, detekce při vlnové délce 296 nm.



Obr. 23: HPLC 9-aminoellipticinu inkubovaného s jaterním mikrosomálním systémem indukovaným Sudanem I, detekce při vlnové délce 296 nm.

4.5.5 Vliv různých funkčních skupin v poloze C-9 ellipticinu na metabolismus jednotlivých derivátů

Z výsledků provedených měření bylo možné porovnat chování derivátů ellipticinu, lišících se funkční skupinou v poloze C-9. Srovnání bylo možné provést jak mezi použitými deriváty, tak také se samotným ellipticinem. Přítomnost funkční skupiny v poloze C-9 měla především vliv na polaritu dané sloučeniny. Zatímco nitroskupina dávala sloučenině spíše nepolární charakter, připravený 9-aminoderivát byl naopak velmi polární (obr. 12 str. 49; obr. 22, str. 60). Aminoskupina byla svou polaritou velmi blízko

polaritě hydroxyskupiny navázané v poloze C-9. Všechny tři uvedené deriváty byly testovány, zda mohou být oxidovány jaterními mikrosomálními systémy potkana, které oxidují ellipticin.

Zřejmě nejzásadnějším výsledkem této práce bylo zjištění, že nepolární derivát ellipticinu, 9-nitroellipticin (stejně jako ellipticin), je jaterními mikrosomálními systémy oxidován, zatímco oba polární deriváty, 9-amino- a 9-hydroxyellipticin, tímto systémem oxidovány nejsou. Výsledkem oxidace 9-nitroellipticinu byl vznik nejméně 4 metabolitů, které se svými retenčními charakteristikami na HPLC velmi podobaly metabolitům ellipticinu [46].

5 Diskuze

5.1 Syntéza 9-nitroellipticinu

Sedmikroková syntéza 9-nitroellipticinu (**14**), výchozí látky pro zamýšlenou syntézu 13-hydroxyellipticinu, vycházela z dříve publikovaných postupů [3, 11, 34]. Některé z těchto kroků byly v této práci modifikovány s cílem dosáhnout lepších výtěžků, popř. vyšší čistoty produktů.

Z důvodu nízkého výtěžku první reakce syntézy ellipticinu, přípravy 1,4-dimethylkarbazolu, bylo zpracování této reakce upraveno. Zatímco v původním postupu [10] bylo uvedeno, že se reakční směs po ochlazení na laboratorní teplotu ředí vodou a roztok se následně extrahuje etherem, v této práci byla reakční směs po ochlazení zahuštěna na vakuové odparce a následně filtrována přes vrstvu silikagelu. Tímto postupem byly odstraněny prakticky veškeré polární (barevné) nečistoty, které komplikovaly dočištění produktu v původním postupu. Filtrace směsi přes silikagel se navíc ukázala jako rychlejší, čistší a efektivnější metoda, což také dokazuje dosažený výtěžek této reakce, který byl o 13 % vyšší, než bylo uvedeno v původní literatuře [10] (56 oproti 43 %). Důvod větších ztrát u původního postupu spočíval zřejmě v tom, že po ředění reakční směsi vodou vznikla sraženina, která byla jen částečně rozpustná v diethyletheru. TLC analýza této sraženiny (vzorek byl rozpuštěn v ethanolu) ukázala, že stále obsahuje zbytky 1,4-dimethylkarbazolu. Opětovné rozpuštění této sraženiny v ethanolu a její ředění vodou s následnou extrakcí diethyletherem vedlo k získání dalšího podílu hrubého produktu, opět však zůstala část nerozpuštěná a celý postup bylo nutno ještě opakovat. Získaný hrubý 1,4-dimethylkarbazol v extraktu byl značně znečištěný. Jeho dočištění extrakcí do horkého hexanu s následnou krystalizací bylo zdlouhavé a získaný produkt bylo potřeba ještě jednou překrystalizovat, aby bylo dosaženo uspokojivé čistoty (> 90 %).

Další meziprodukty syntézy ellipticinu byly připraveny postupy popsány v literatuře [10, 11] se srovnatelnými výtěžky jednotlivých produktů. Výjimkou byl sulfonamid **5**, jehož výtěžek byl v původním postupu poměrně nízký (39 %). Původní syntéza spočívala v reakci aminu **4** s benzensulfonyl chloridem ve vodném THF s Na₂CO₃ jako bází. Možným důvodem nízkého výtěžku této reakce mohla být částečná hydrolyza benzensulfonyl chloridu na sodnou sůl kyseliny benzensulfonové, k níž mohlo v použitém prostředí docházet. Vzniklá sůl pak již nebyla schopna sulfonylovat přítomný amin.

Tomuto předpokladu odpovídá také fakt, že chlorid benzensulfonové kyseliny nebyl použit v mírném přebytku, ale pouze v ekvimolárním množství. V diplomové práci byla proto vyvinuta alternativní metoda přípravy látky **5**, kdy se reakce aminu **4** s benzensulfonyl chloridem prováděla v bezvodém prostředí (suchý dichlormethan) s mírným přebytkem chloridu kyseliny. Anorganická báze (Na_2CO_3) musela být v tomto postupu nahrazena bází organickou (pyridin), aby byla zajištěna její dobrá rozpustnost v reakční směsi. Navržená syntéza skutečně vedla ke zlepšení výtěžku této reakce o zhruba 10 %, což je v této fázi syntézy – jednalo se o předposlední krok syntézy ellipticinu – poměrně významné zlepšení.

Další změnou oproti publikovanému postupu [10, 11] bylo zpracování reakce při přípravě ellipticinu. Původní postup zpracování reakční směsi po kyselé hydrolyze sulfonamidu **5** spočíval v ředění reakční směsi vodou, přičemž vzniklá sraženina byla odfiltrována a vysušena. Takto byl získán první podíl ellipticinu. Filtrát byl následně alkalizován vodným roztokem NaOH a extrahován chloroformem. Extrakt po odpaření poskytl druhý podíl ellipticinu. Nevýhodou tohoto postupu je skutečnost, že jsou při něm získány dvě různé formy ellipticinu – první podíl je ellipticin hydrochlorid (sůl ellipticinu, který je slabou bází, s kyselinou chlorovodíkovou), druhý podíl pak „volná báze“ ellipticinu (alkalizování původního roztoku po kyselé hydrolyze pomocí NaOH vede k uvolnění ellipticinu z přítomné soli – ellipticin hydrochloridu). Odlišné chování obou forem ellipticinu se ukázalo při jeho nitraci na 9-nitroellipticin. Zatímco „volná báze“ ellipticinu reagovala při nitraci podle dříve popsaného postupu [10] a poskytla požadovaný produkt ve srovnatelném výtěžku, jaký zde byl uveden, hydrochlorid ellipticinu byl extrémně nerozpustný v nitrační směsi a výtěžek produktu byl proto poměrně nízký. Reakční směs po kyselé hydrolyze sulfonamidu **5** byla proto v této práci nejprve ředěna vodou, poté však byla nalita na led a rovnou alkalizována roztokem NaOH, což vedlo k vytvoření sraženiny. Sraženina byla následně odsáta, promyta vodou a extrahována chloroformem. Ačkoli změna ve zpracování reakční směsi nebyla příliš velká, alkalizace reakční směsi oproti alkalizaci samotného filtrátu vedla k zisku čistšího ellipticinu než v původním postupu, s výtěžkem 70 %. Navíc byla takto získána pouze jediná forma ellipticinu („volná báze“), která poskytuje při následné nitraci na 9-nitroellipticin reprodukovatelné výtěžky a u níž nejsou problémy s rozpustností v nitrační směsi. Přestože je toto zjištění poměrně klíčové pro syntézu 9-nitroderivátu **14**, v literatuře o něm není žádná zmínka.

5.2 Syntéza 9-aminoellipticinu

Pro syntézu 9-aminoellipticinu, která vycházela z 9-nitroellipticinu, byla nejprve zvolena redukce nitroskupiny v poloze C-9 pomocí Zn v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Redukce zinkem v kyselině chlorovodíkové umožňuje použití mírnějších reakčních podmínek ve srovnání s redukcí pomocí SnCl₂ (laboratorní teplota oproti varu). Po srovnání reakční směsi se standardem 9-aminoellipticinu pomocí TLC bylo zjištěno, že vzniklý produkt má odlišnou polaritu. Analogické srovnání produktu redukce s výchozí látkou (9-nitroellipticinem) však zároveň prokázalo, že tyto látky nejsou totožné. Redukce nitroskupiny tedy zřejmě proběhla pouze do stádia nitrosoderivátu v poloze C-9 ellipticinu [59].

Po tomto zjištění tedy musela být použita alternativní metoda. Pro redukcí nitroskupiny byl tentokrát zvolen SnCl₂, jeho použití však vyžadovalo zahřívání reakční směsi po dobu 1 h na 109 °C. Za těchto podmínek již docházelo k částečnému rozkladu produktu. Vzniklá směs proto musela být přečištěna, nejprve byly odstraněny sloučeniny cínu filtrací přes fritu s vrstvou silikagelu, kdy byla směs promývána nejprve směsí EA/MeOH v poměru 5:1 a poté čistým MeOH. Takto předčištěná směs byla poté dočištěna pomocí preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu za použití stejné mobilní fáze. Tímto způsobem se podařilo získat čistý 9-aminoellipticin (obr. 14, str. 50)

5.3 Syntéza 13-acetoxy-9-nitroellipticinu

Příprava tohoto derivátu ellipticinu vycházela z 9-nitroellipticinu, který byl podroben oxidaci polohy C-13. Benzylová oxidace byla prováděna postupem popsáním v literatuře [11] pomocí K₂S₂O₈ v přítomnosti CuSO₄ ve vroucí kyselině octové. Analogická oxidace vycházející přímo z ellipticinu není možná, neboť při ní dochází k polymeraci a dalším nežádoucím reakcím [11].

Po několika nepodařených experimentech bylo zjištěno, že v původním postupu popsáném v literatuře [10, 11] jsou chybně uvedeny jednotky – všechna činidla a výchozí 9-nitroellipticin jsou zde uvedeny v mmol, což však není možné, neboť takto velká množství látek nebylo možno rozpustit v uvedeném množství rozpouštědla. To nás vedlo k závěru, že správná jednotka by měla být v tomto případě μmol, což se také potvrdilo při osobní korespondenci s autorem publikace (Dračínský Martin). Zároveň jsme od autora získaly ještě jednu důležitou informaci – reakce probíhá s rozdílnými výsledky, podstatná

je ovšem ta skutečnost, že probíhá pouze v malém měřítku zhruba do 200 mg výchozího 9-nitroellipticinu (Dračínský M. – osobní sdělení). Tyto informace vysvětlily nezdary předchozích experimentů, nicméně oxidace samotná i podle nových poznatků probíhala poměrně nereprodukovatelně s rozdílnými výsledky. Přesto se nakonec podařilo získat vzorek, který byl podle TLC analýzy téměř čistý (obsahoval pouze stopy nečistot). Následná analýza tohoto vzorku pomocí HPLC a NMR však ukázala, že se jedná o směs několika velice podobných látek. Podle NMR analýzy většina složek této směsi obsahovala charakteristický posun benzylové skupiny, což naznačuje, že k oxidaci skutečně došlo. Skutečnost, že látka jeví se na TLC jako jediný produkt poskytuje při HPLC analýze několik velice blízkých elučních vrcholů, naznačuje, že se jedná o směs chemicky velice podobných látek, pravděpodobně regioisomerů. Podíváme-li se na výsledek biotransformace ellipticinu pomocí cytochromů P450, zjistíme, že ani jednotlivé isoformy těchto enzymů nejsou schopny oxidovat ellipticin na jediný metabolit – vždy zde vzniká směs regioisomerů. Konkrétně CYP1A1/2 poskytují směs 7- a 9-hydroxyellipticinu, CYP3A4 pak figuruje dokonce při tvorbě tří odlišných metabolitů – N²-oxidu ellipticinu, 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu [46, 51]. Jestliže ani poměrně stericky objemný a strukturně komplikovaný oxidant, jakým je enzym, není schopen selektivní oxidace ellipticinu, je velice málo pravděpodobné, že by takto selektivní oxidace bylo schopno jednoduché anorganické oxidační činidlo, jakým je použitý K₂S₂O₈. Na základě získaných analytických údajů a výše uvedených úvah je možno se domnívat, že získaný 13-acetoxy-9-nitroellipticin je ve skutečnosti směsí minimálně dvou velice podobných látek – 12-acetoxy- a 13-acetoxy-9-nitroellipticinu (obr. 15, str. 51 – dvojice elučních vrcholů s maximy v asi 10,5 a 11,3 min). Při oxidaci 9-nitroellipticinu pomocí K₂S₂O₈ je však kromě 13-acetoxyderivátu získáno také určité množství 13-hydroxy-9-nitroellipticinu [11]. Je tedy pravděpodobné, že směs po oxidaci 9-nitroellipticinu obsahuje také dvojici 12-hydroxy- a 13-hydroxy-9-nitroellipticinu (tyto polárnější produkty by mohly odpovídat dvěma z trojice ostrých elučních vrcholů v oblasti 6,5-7,5 min na obr. 15, str. 51). Skutečnost, že v původní publikaci [11] není žádná zmínka o dalších produktech oxidační reakce, lze vysvětlit tím, že oxidace 9-nitroellipticinu zde byla provedena bez separace jednotlivých meziproduktů, tedy až po odstranění nitroskupiny v poloze C-9. Finální reakční směs po oxidaci, redukci nitroskupiny, diazotaci aminoskupiny a redukci diazoniové soli byla separována pomocí HPLC. Pokud byl 13-hydroxyellipticin získán jako majoritní regioisomer, je možné, že vedlejší produkty (např. 12-hydroxyellipticin)

nebyly dále identifikovány. Nicméně, tento přístup nelze považovat za standardní – běžné je izolovat produkt každé následné reakce, pokud touto reakcí vzniká jeho směs s vedlejšími produkty. Na základě postupu uvedeného v literatuře [11] lze nabýt dojmu, že tento postup je selektivní a probíhá bez vedlejších reakcí. Jak ukazují výsledky této práce, tato metoda selektivní není, při oxidaci totiž vždy vznikají minimálně dva různé deriváty.

5.4 Syntéza 13-hydroxyellipticinu

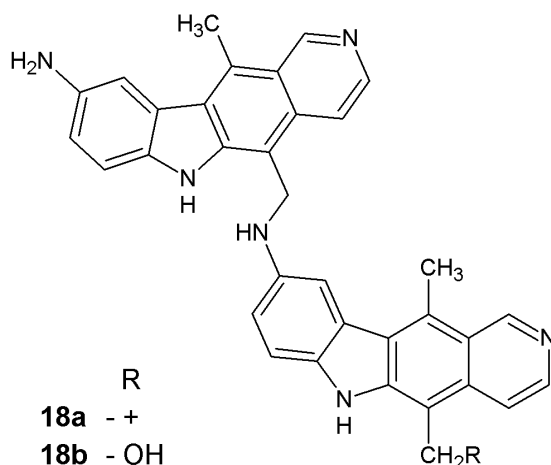
Syntéza 13-hydroxyellipticinu vycházela z 9-nitroellipticinu a podle publikovaného postupu sestávala ze čtyř reakcí – benzylové oxidace v poloze C-13 (kap. 5.3), redukce nitroskupiny v poloze C-9 na aminoskupinu, diazotace aminoskupiny a redukce vzniklé diazoniové soli ethanolem, vedoucí k finálnímu 13-hydroxyellipticinu [11].

Reakční směs získaná po benzylové oxidaci nebyla v původním postupu nijak separována, po jejím zpracování byl hrubý produkt (13-acetoxy-9-nitroellipticin) rovnou podroben dalším třem krokům (redukce nitroskupiny, diazotace aminoskupiny a redukce diazoniové soli). Ani v průběhu těchto následných kroků nebyla v originálním postupu provedena izolace meziproduktů, vše bylo tedy uskutečněno v jedné baňce s postupným přidáváním činidel a změnou teplot [11]. V našem případě se však tento postup neosvědčil, neboť v každém z kroků se tvořily vedlejší produkty, což po třech následných reakcích vedlo k velice bohaté a obtížně separovatelné směsi látek. Kromě toho, bez standardu, který by byl k dispozici, nebylo možno ani odhadnout, zda je v této komplexní směsi produkt vůbec přítomen.

Po této zkušenosti byly uvedené kroky provedeny odděleně, přesněji nejprve byla redukována nitroskupina v poloze C-9, vzniklý aminoderivát **17** byl izolován a následně podroben diazotaci, po které již bez izolace diazoniové soli následovala její redukce ethanolem. Izolace diazoniové soli byla vynechána z důvodu její vysoké polaritě, jež by znesnadňovala extrakci produktu, ale také kvůli její poměrně nízké stabilitě, která by při pokusech o izolaci pravděpodobně vedla k její dekompozici.

Problémy s redukcí nitroskupiny jsou podrobně rozvedeny v kapitole věnované výsledkům práce (kapitola 4.4). Největším problémem při redukcí nitroskupiny 13-acetoxy-9-nitroellipticinu byla na jedné straně velice špatná rozpustnost této látky v naprosté většině rozpouštědel, která se při celé řadě možných metod používají, na straně druhé pak částečný (až téměř úplný) rozklad produktu při použití publikované metody –

redukce pomocí SnCl_2 ve vroucí HCl [11]. Vzhledem k těmto skutečnostem byl již výtěžek 9-amino-13-hydroxyellipticinu velice nízký ($< 20\%$). Dalším problémem této redukce byla také izolace vzniklého 9-aminoderivátu **17** z reakční směsi, neboť SnCl_2 se zde používá v poměrně vysokém přebytku, při zpracování je pak převeden na hydroxid cínatý (a cíničitý), který je odstraněn filtrací spolu s produktem ve formě sraženiny. Hydroxid cínatý poměrně silně interaguje s polárním aminoderivátem **17** a je velice obtížné jej z produktu odstranit. Promývání sraženiny organickými rozpouštědly je zde neefektivní, teprve filtrace přes vrstvu silikagelu vede k izolaci produktu zbaveného anorganických nečistot. Také tento postup však byl spojen s velkými ztrátami (výtěžek hrubého produktu po redukci byl často menší než 20%). Teprve analýza nerozpustného podílu naznačila, v čem spočívá problém této reakce – kromě zmiňované interakce aminoderivátu se sloučeninami cínu, zde pravděpodobně dochází také k oligomeraci popř. polymeraci produktu. Silně kyselé prostředí, které se používá při redukci nitroskupiny, vede totiž k současné hydrolyze acetylové skupiny v poloze C-13 (a pravděpodobně také C-12). Volná hydroxylová skupina pak může být protonizována přítomnou kyselinou, čímž může dojít k jejímu odštěpení ve formě vody a ke vzniku benzyliového karbokationtu (9-aminoellipticin-13-ylia). Tento karbokation se pak může vázat na aminoskupinu druhé molekuly 9-aminoellipticin-13-ylia, popř. 9-amino-13-hydroxyellipticinu, podobně jako v případě tvorby aduktů s bázemi DNA (obr. 24, str. 68). Je zřejmé, že vznikající dimer může dále interagovat s dalšími molekulami reakční směsi za tvorby oligomerních až polymerních produktů, jelikož po dimerizaci stále obsahuje obě funkční skupiny (aminoskupinu i hydroxyskupinu, popř. karbokation vzniklý protonizací a dehydratací hydroxyskupiny), které se interakce účastní.



Obr. 24: Pravděpodobné produkty vznikající z 9-amino-13-hydroxyellipticinu v kyselém prostředí - **18a** (2 molekuly 9-aminoellipticin-13-ylia) a **18b** (spojení 9-aminoellipticin-13-ylia a 9-amino-13-hydroxyellipticinu).

Zdá se tedy, že tento způsob redukce 13-acetoxy-9-nitroellipticinu je velice nevhodný, nicméně vhodná alternativa zatím nebyla popsána. Vzhledem k extrémní nerozpustnosti výchozí látky selhala také metoda, která by uvedené problémy s kyselým prostředím vyřešila, konkrétně redukce H_2 na Pd (kapitola 4.4.).

Rovněž diazotace 9-amino-13-hydroxyellipticinu a následná redukce vzniklé diazoniové soli ethanolom neprobíhaly podle očekávání. První experimenty provedené podle literatury [11] většinou vedly k získání nezměněné výchozí látky – diazotace tedy evidentně neproběhla. Následně tedy bylo použito přebytku $NaNO_2$ ($6 \times$ více oproti literatuře), což sice vedlo k odstranění aminoskupiny, ale také k parciálnímu rozkladu produktu. Reakce byla proto ještě opakována s čerstvě zakoupeným $NaNO_2$. Nejprve bylo použito stejné množství $NaNO_2$ jako v originálním postupu – tentokrát k odstranění aminoskupiny docházelo. Nicméně, také zde byl pomocí TLC pozorován vznik hned několika produktů, přičemž produkt očekávané polarity (13-hydroxyellipticin) byl přítomen pouze jako minoritní složka reakční směsi. Jediným produktem, získaným v této části práce tak byla pravděpodobně směs 9-amino-13-hydroxyellipticinu spolu s 9-amino-12-hydroxyellipticinem, která však obsahovala ještě řadu dalších nečistot. Této směsi však bylo získáno tak malé množství, že její dočištění pomocí HPLC by pravděpodobně neposkytlo ani množství vzorku potřebné na analýzu pomocí NMR. NMR směsi naznačila přítomnost aminoskupiny v poloze C-9 a benzylovou oxidaci, vzhledem k přítomnosti dalších nečistot však nebylo možno získat smysluplná data oxidovaných složek.

5.5 Vliv funkčních skupin (NO₂-, OH-, NH₂-) v poloze C-9 ellipticinu na metabolismus jednotlivých derivátů

Jak je uvedeno v kapitole 4.5.5, 9-nitroellipticin, podobně jako ellipticin, je metabolizován jaterním mikrosomálním systémem za přítomnosti NADPH-generujícího systému. Naproti tomu 9-hydroxyellipticin, a ani 9-aminoellipticin, mikrosomy oxidovány nejsou. Nedochozí k tvorbě žádných metabolitů. Podobné chování ellipticinu a 9-nitroellipticinu a také podobnost mezi 9-hydroxyellipticinem a 9-aminoellipticinem z hlediska jejich oxidace mikrosomy, by mohla souviset právě s polaritou těchto látek. Ellipticin je podobně jako 9-nitroellipticin relativně nepolární látkou, jejich oxidací katalyzovanou použitými mikrosomálními systémy vznikají metabolity těchto látek, které jsou vždy polárnější než původní sloučenina.

9-Hydroxyellipticin a také 9-aminoellipticin jsou však oproti předchozím dvěma látkám mnohem polárnější, což by mohl být důvod, proč nejsou metabolizovány. 9-Hydroxyellipticin vzniká oxidací ellipticinu a jedná se o jeho nejpoleárnější metabolit. Zjištění, že tento metabolit není dále oxidován, odpovídá výsledkům získaným při studiu oxidace ellipticinu, žádné dihydroxyderiváty či dokonce vícenásobně hydroxylované deriváty nevznikaly [46]. Bylo také prokázáno, že právě 9-hydroxyellipticin je produktem, který je metabolitem detoxikačním, tedy metabolitem, který se snadněji vylučuje z organismu [46]. 9-Hydroxyellipticin a 9-aminoellipticin zřejmě nejsou oxidovány právě proto, že jsou už tak polární, že nejsou dobrými substráty cytochromů P450 mikrosomálních systémů.

Hydroxylová a aminoskupina v poloze C-9 ellipticinu tedy na rozdíl od nitroskupiny brání oxidaci těchto sloučenin.

6 Závěr

Na základě výsledků uvedených v této diplomové práci lze říci, že většina stanovených cílů byla splněna. Byly připraveny deriváty ellipticinu modifikované v poloze C-9 – 9-nitroellipticin a 9-aminoellipticin. 9-Nitroellipticin byl připraven nitrací ellipticinu, který byl pro tento účel připraven syntézou, jež vycházela z indolu a 2,5-hexandionu. Takto získaný 9-nitroellipticin byl použit jednak pro přípravu 9-aminoellipticinu, jednak pro syntézu 13-hydroxyellipticinu.

Opakování postupu přípravy 13-hydroxyellipticinu popsané v literatuře [11] však ukázalo, že tato práce obsahuje celou řadu nepřesností a je poměrně obtížně reprodukovatelná. Podařilo se také zjistit, že při oxidaci 9-nitroellipticinu publikovanou metodou vzniká kromě 13-acetoxy-9-nitroderivátu také ještě minimálně jeden další produkt – velmi pravděpodobně 12-acetoxy-9-nitroellipticin, což je zjištění, které se v literatuře zatím neobjevilo. Redukce 13-acetoxy-9-nitroellipticinu publikovanou metodou vedla k zdatelnému rozkladu reakční směsi na velice polární produkty (pravděpodobně oligomery derivátů ellipticinu). V rámci této diplomové práce byla proto vyvíjena nová, vhodnější metoda redukce nitroskupiny 13-acetoxy-9-nitroellipticinu. Velice špatná rozpustnost této látky v naprosté většině rozpouštědel však nakonec vyloučila použití všech výhodnějších alternativních metod redukce, jako např. redukci H_2 na Pd. Vzhledem k uvedeným problémům se proto nepodařilo v této práci reprodukovat postup přípravy 13-hydroxyellipticinu, přestože byl celý postup mnohokrát opakován, což vyžadovalo opakovat poměrně pracnou syntézu 9-nitroellipticinu více než třikrát.

9-Nitroellipticin a 9-aminoellipticin získané v této práci byly spolu s komerčně dostupným 9-hydroxyellipticinem následně využity pro studium jejich metabolismu ve srovnání s nemodifikovaným ellipticinem. Bylo zjištěno, že v přítomnosti jaterního mikrosomálního systému laboratorního potkana premedikovaného Sudanem I, PCN, ethanolem a fenobarbitalem a také v přítomnosti kontrolního jaterního mikrosomálního systému nepremedikovaných laboratorních potkanů dochází k oxidaci 9-nitroellipticinu za tvorby nejméně 4 metabolitů. Porovnáním chromatografických vlastností těchto metabolitů s metabolity ellipticinu bylo zjištěno, že se pouze nepatrně liší v retenčním čase, podobně jako základní látky ellipticin a 9-nitroellipticin. Přítomnost NO_2 skupiny v poloze C-9 ellipticinu totiž v zásadě nemění hydrofobicitu základní molekuly. Naproti tomu 9-amino- a 9-hydroxyellipticin oxidaci uvedenými jaterními mikrosomálními systémy

nepodléhaly. Porovnání chromatografických vlastností těchto dvou polárních derivátů ellipticinu ukázalo, že se jejich retenční časy liší také jen velmi nepatrně (obr. 22, str. 60), stejně jako je tomu u dvojice látek ellipticin a 9-nitroellipticin.

Z uvedených výsledků metabolických experimentů je možno nastínit, jaký vliv má charakter funkční skupiny přítomné v poloze C-9 ellipticinu na metabolismus tohoto derivátu. Je-li tato skupina nepolární, jako v případě 9-nitroderivátu, je takový derivát oxidován mikrosomálními cytochromy P450 podobně jako ellipticin. Struktura metabolitů tvořených oxidací 9-nitroellipticinu mikrosomy bude charakterizována v dalších studiích laboratoře, kde byla předkládaná práce vypracována.

Naopak přítomnost polární skupiny v poloze C-9, konkrétně NH_2 a OH skupiny, vede k substrátu, který nepodléhá oxidaci cytochromy P450. Toto pozorování může mít, poté co bude dostatečně ověřeno, zásadní vliv pro návrh možných chemických modifikací ellipticinu s cílem získat účinnější léčivo. Vhodnou volbou funkční skupiny v poloze C-9 takového derivátu je totiž možno ovlivnit „metabolický osud“ zamýšleného léčiva.

Seznam použité literatury

1. Aimová D., Svobodová L., Kotrbová V., Mrázová B., Hodek P., Hudeček J., Václavíková R., Frei E., Stiborová M.: *Drug Metab Dispos*, **2007**, 35, 1926 – 1934
2. Aimová D., Poljaková J, Kotrbová V., Moserová M., Frei E., Arlt V. M., Stiborová M.: *Interdisc Toxicol*, **2008**, 1, 160 – 168
3. Archer S., Ross B. S., Pica-Mattocchia L., Cioli D.: *J Med Chem*, **1987**, 30, 1204 – 1210
4. Auclair Ch.: *Arch Biochem Biophys*, **1987**, 259, 1 – 14
5. Bořek-Dohalská L., Frei E., Stiborová M.: *Collect Czech Chem Commun*, **2004**, 69, 603 - 615
6. Cranwell P. A., Saxton J. E.: *J Chem Soc*, **1962**, 3482 – 3487
7. Dalton L. K., Demerac S., Elmes B. C. Loder J. W. Swan J. M., Teitei T.: *Aust J Chem*, **1967**, 20, 2715 – 2727
8. Dalton L. K., Demerac S., Teitei T.: *Aust J Chem*, **1969**, 22, 185-195
9. Demarini D. M., Abu-Shakra A., Gupta R., Hendee L. J., Levine J. G.: *Environ Mol Mutagen*, **1992**, 20, 12 – 18
10. Dračínský M.: *Disertační práce*, PŘF UK, 2006, Praha
11. Dračínský M., Sejbal J., Rygerová B., Stiborová M.: *Tetrahedron Lett*, **2007**, 48, 6893 – 6895
12. Froehlich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., Thompson R. B.: *J Biol Chem*, **1995**, 270, 149998 – 15004
13. Garbet N. C., Graves D. E.: *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2004**, 4, 149 – 172
14. Goodwin S., Smith A. F., Horning E. C.: *J Am Chem Soc*, **1959**, 81, 1903 – 1908
15. Gribble G. W., Saulnier M. G.: *Heterocycles*, **1985**, 23, 1277 – 1315
16. Guthrie R. W., Brossi A., Mennona F. A., Mullin J. G., Kierstead R. W., Grunberg E.: *J Med Chem*, **1975**, 18, 755-760
17. Chu Y., Hsu M.-T.: *Nucleic Acids Res*, **1992**, 20, 4033-8
18. Ishikura M., Hino A., Yaginuma T., Agata I, Katagiri N.: *Tetrahedron*, **2000**, 56, 193 - 207
19. Jackson A. H., Jenkins P. R., Shannon P. V. R.: *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, **1977**, 1698 – 1704

20. Kizek R., Adam V., Hraběta J., Eckschlager T., Smutný S., Burda J. V., Frei E., Stiborová M.: *Pharmacol Ther*, **2012**, 133, 26 – 39
21. Knölker H.-J., Reddy K. R.: *Chem Rev*, **2002**, 102, 4303 – 4427
22. Kohn K. W., Waring M. J., Glaubiger D., Friedman Ch. A.: *Cancer Res*, **1975**, 35, 71 -76
23. Konakahara T., Kiran Y. B., Okuno Y., Ikeda R., Sakai N.: *Tetrahedron Lett*, **2010**, 51, 2335 – 2338
24. Kotrbová V., Mrázová B., Moserová M., Martínek V., Hodek P., Hudeček J., Frei E., Stiborová M.: *Biochem Pharmacol*, **2011**, 82, 669 – 680
25. Liu Ch.-Y., Knochel K. R.: *J Org Chem*, **2007**, 72, 7106 – 7115
26. Miller Ch. M., McCarthy F. O.: *RSC Adv*, **2012**, 2, 8883 – 8918
27. Monnot M., Mauffert O., Simon V., Lescot E., Psaume B., Saucier J.-M., Charra M., Belehradek J. Jr., Femandjian S.: *J Biol Chem*, **1991**, 266, 1820 – 1829
28. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Jpn J Cancer Res*, **1995**, 86, 819 – 827
29. Pedersen J. M., Bowman W. R., Elsgood M. R. J., Fletcher A. J., Lovell P. J.: *J Org Chem*, **2005**, 70, 10615 – 10618
30. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2005**, 149, 449 – 453
31. Poljaková J., Frei E., Gomez J. E., Aimová D., Eckschlager T., Hraběta J., Stiborová M.: *Cancer Lett*, **2007**, 252, 270 – 279
32. Poljaková J., Eckschlager T., Hraběta J., Hřebačková J., Smutný S., Frei E., Martínek V., Kizek R., Stiborová M.: *Biochem Pharmacol*, **2009**, 77, 1466 – 1479
33. Poljaková J., Eckschlager T., Činátl J., Kizek R., Frei E., Stiborová M.: *Int J Electrochem Sci*, **2013**, 8, 1573 – 1585
34. Ratcliffe A. J., Sainsbury M., Smith A. D.: *J Chem Soc Perkin Trans I*, **1988**, 2933 – 2943
35. Sainsbury M.: *Synthesis*, **1977**, 437 – 448
36. Sato N., Mizumoto K., Kusumoto M., Niiyama H., Maehara N., Ogawa T., Tanaka M.: *FEBS Lett*, **1998**, 441, 318-321
37. Schwaller M.-A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *J Biol Chem*, **1995**, 270, 22709 – 22713
38. Singh M. P., Hill C., Péoc'h D., Rayner B., Imbach J.-L., Lown J. W.: *Biochemistry*, **1994**, 33, 10271 – 10285

39. Song B. J.: *Alcohol Clin Exp Res*, **1996**, 20, 138A – 146A
40. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem Listy*, **1999**, 93, 229 - 237
41. Stiborová M., Frei E.: *Chem Listy*, **2001a**, 95, 549 – 555
42. Stiborová M., Bieler Ch. A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem Pharmacol*, **2001b**, 62, 1675 – 1684
43. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Cancer Res*, **2002**, 62, 5678 - 5684
44. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int J Cancer*, **2003a**, 107, 885 – 890
45. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem Res Toxicol*, **2003b**, 16, 38 - 47
46. 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 – 8380
47. Stiborová M., Rupertová M., Schmeiser H. H., Frei E.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2006**, 150, 13 – 23
48. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračínský M., Eckschlager T., Frei E.: *Int J Cancer*, **2007a**, 120, 243 – 251
49. Stiborová M., Rupertová M., Aimová D., Ryšlavá H., Frei E.: *Toxicology*, **2007b**, 236, 50 – 60
50. Stiborová M., Arlt V. M., Henderson C. J., Wolf C. R., Kotrbová V., Moserová M., Hudeček J., Phillips D. H., Frei E.: *Toxicol Appl Pharmacol*, **2008**, 226, 318 - 319
51. Stiborová M., Rupertová M., Frei E.: *Biochim Biophys Acta*, **2011**, 1814, 175 – 185
52. Stiborová M., Indra R., Moserová M., Černá V., Rupertová M., Martínek V., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: *Chem Res Toxicol*, **2012a**, 25, 1075 – 1085
53. Stiborová M., Poljaková J., Martínková E., Ulrichová J., Šimánek V., Dvořák Z., Frei E.: *Toxicology*, **2012b**, 302, 233 – 241
54. Stiborová M., Poljaková J., Eckschlager T., Kizek R., Frei E.: *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **2012c**, 156, 115 - 121
55. Vranová I., Moserová M., Hodek P., Kizek R., Frei E., Stiborová M.: *Int J Electrochem Sci*, **2013**, 8, 1586 – 1597
56. Woodward R. B., Iacobucci G. A., Hochstein F. A.: *J Am Chem Soc*, **1959**, 81, 4434 – 4435

57. <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 30.12.2012
58. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-385-1/pdf/204.pdf, 19.12.2012
59. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-385-1/pdf/043.pdf, 15.6.2013

