UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Syntéza analogů dexrazoxanu jako potenciálních kardioprotektiv II

Diplomová práce

Marek Kratochvíl

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jaroslav Roh, PhD.

Hradec Králové 2014

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména svému školiteli PharmDr. Jaroslavu Rohovi, PhD. za pomoc, cenné rady a velikou ochotu, také kolegům z laboratoře a ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie za ochotu a milý přístup.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.

V Hradci Králové 2014 Marek Kratochvíl

Obsah

Poděkování 2

Prohlášení 3

Obsah 4

ABSTRAKT 6

ABSTRACT 7

1. Úvod a cíl práce 8

2. Teoretická část 10

2.1. Anthracykliny 10

2.1.1. Mechanismus účinku anthracyklinových cytostatik 11

2.1.2. Nežádoucí účinky anthracyklinů 11

2.1.2.1. Anthracykliny vyvolaná kardiotoxicita 11

2.2. Dexrazoxan (ICRF-187) a ADR-925 13

2.2.1. Mechanismus účinku 14

2.2.2. Příprava dexrazoxanu 14

2.2.3. Analogy dexrazoxanu 15

2.2.3.1. Sobuzoxan 16

2.3. Syntéza analogu MK-15 16

2.3.1. Publikovaná příprava piperazin-2-onu 16

2.3.2. Navržené postupy syntézy analogu MK-15 17

3. Experimentální část 18

3.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky 18

3.2. Syntéza piperazin-2-onu 19

3.2.1. Syntéza využívající ethyl-bromacetátu 19

3.2.2. Syntéza využívající bromacetylbromidu 21

3.2.3. Syntéza z ethyl-glyoxalátu 22

3.3. Příprava alkylačních činidel 23

3.3.1. Příprava propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátu) 23

3.3.2. Příprava propan-1,2-diyl-bis(tosylátu) 24

3.4. Příprava cílové látky MK-15 25

3.4.1. Reakce piperazin-2-onu s 1,2-dibrompropanem v AcCN 25

3.4.2. Reakce piperazin-2-onu s 1,2-dibrompropanem v DMF 26

3.4.3. Alkylace piperazin-2-onu 1,2-dibrompropanem za přítomnosti NaI 28

3.4.4. Alkylace piperazin-2-onu pomocí reduktivní aminace 29
3.4.5. Alkylace piperazin-2-onu propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátem) v DMF 30
3.4.6. Alkylace piperazin-2-onu propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátem) v AcCN 31
3.5. Příprava 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamidu cyklizací iminodioctové kyseliny 32
3.5.1. Příprava piperazin-2,6-dionu 33
3.5.2. Příprava N-(karbamoyl)iminodiacetamidu 34
4. Výsledky a Diskuze 35
5. Závěr 38
6. Seznam zkratek 39
7. Seznam literatury 40

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická faktulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Marek Kratochvíl

Školitel: PharmDr. Jaroslav Roh, PhD.

Název diplomové práce: Syntéza analogů dexrazoxanu jako potenciálních kardioprotektiv II

Doxorubicin, daunorubicin a další anthracyklinová antineoplastická antibiotika jsou velmi důležité protirakovinné látky. Vzhledem k jejich vysoké toxicitě v srdečním svalu jsou tato vysoce účinná léčiva často spojována s akutní kardiotoxicitou a na dávce závislou kardiomyopathií. Tato kardiomyopathie je charakterizována zvětšením levé komory a celkovou systolickou dysfunkcí. Předpokládá se, že hlavní příčina tohoto vedlejšího účinku je způsobena reaktivními formami kyslíku, jejichž vznik je katalyzován tvorbou komplexu anthracyklinů a iontů železa. Jediné klinicky používané léčivo, které prokazatelně snižuje anthracyklinovou kardiotoxicitu, je dexrazoxan (DEX). DEX se in vivo metabolizuje na látku ADR-925, která chelatuje ionty železa. DEX je rovněž katalytickým inhibitorem topoisomerázy II (TOP2). Zajímavé je, že kardioprotektivní účinky DEX byly objeveny náhodou a bylo publikováno pouze několik studií, které se zabývají vztahy mezi jeho strukturou a kardioprotektivním účinkem. Cílem této práce bylo vyvinout metodu přípravy DEX analogu 4,4'-(propan-1,2-diyl)bis(piperazin-2-onu) (MK-15), který má ve struktuře místo piperazin-2,6-dionových cyklů cykly piperazin-2-onové, a pomocí této metody připravit množství dostačující k *in vitro* a *in vivo* studiím. Nejprve jsme vyvinuli large-scale syntézu piperazin-2-onu. Poté jsme optimalizovali syntézu MK-15 pomocí reakcí piperazin-2-onu s vhodnými alkylačními činidly a v několika šaržích připravili dostatečné množství MK-15. Kardioprotektivní účinky byly studovány *in vitro* na isolovaných neonatálních kardiomyocytech a *in vivo* na králičím modelu chronické anthracyklinové toxicity. Tyto výsledky nám pomohou porozumět mechanismu účinku DEX a potenciálně objasnit úlohu chelatace železa v kardioprotektivním účinku DEX.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Inorganic and Organic Chemistry

Candidate: Marek Kratochvíl

Supervisor: PharmDr. Jaroslav Roh, PhD.

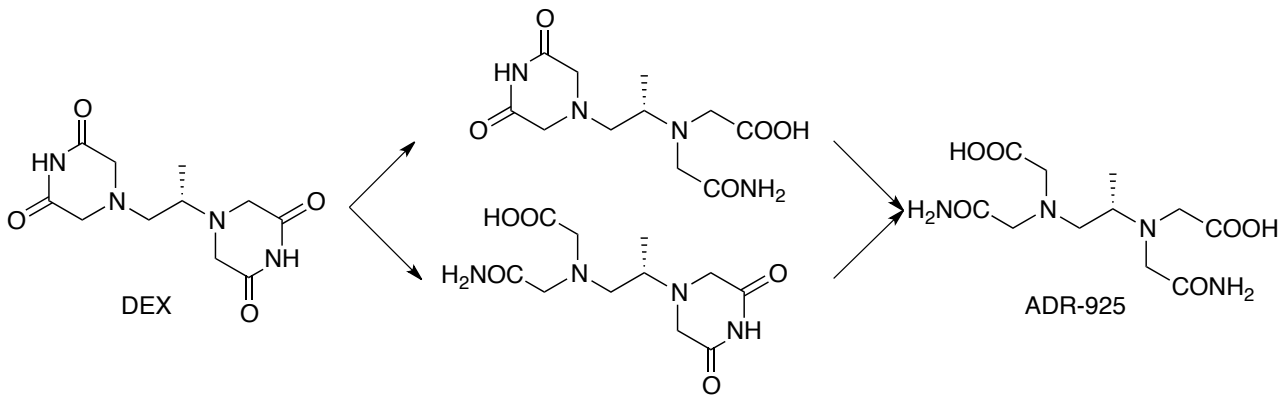
Title of diploma thesis: Syntesis of dexrazoxane analogues as potential cardioprotectants II

Doxorubicin, daunorubicin and other anthracycline antineoplastic antibiotics are very important anticancer agents. Due to their high toxicity in the heart muscle, these highly effective drugs are often associated with acute cardiotoxicity and dose-dependent cardiomyopathy. This cardiomyopathy is characterized by enlargement of the left ventricle and complete systolic dysfunction. It is assumed that this side effect is mainly caused by reactive oxygen species, whose formation is catalysed by complex of anthracyclines and iron ions. The only clinically used drug that significantly reduce anthracycline cardiotoxicity is dexrazoxane (DEX). DEX is *in vivo* metabolised to a substance ADR-925, which chelates the iron ions. DEX is also a catalytic inhibitor of topoisomerase II (TOP2). Interestingly, the cardioprotective effects of DEX were discovered accidentally and only few structure-cardioprotective activity relationships studies were published. The aim of this work was to develop a method for the preparation of DEX analogue 4,4'-(propane-1,2-diyl)bis(piperazin-2-one) (MK-15) bearing piperazin-2-one cycles instead of original piperazin-2,6-dione cycles, and to prepare the sufficient amount of MK-15 for *in vitro* and *in vivo* studies. First, we developed a large-scale synthesis of piperazin-2-one. Then we optimized the synthesis of MK-15 via the reaction of piperazine-2-one with the appropriate alkylating agents. Finally, we prepared sufficient quantities of MK-15 in several batches. Cardioprotective effects were studied *in vitro* on isolated rat neonatal cardiomyocytes and *in vivo* on rabbit model of chronic anthracycline cardiotoxicity. These results will help us to understand the mechanism of action of DEX and potentially elucidate the role of iron chelation in the cardioprotective effect of DEX.

1. Úvod a cíl práce

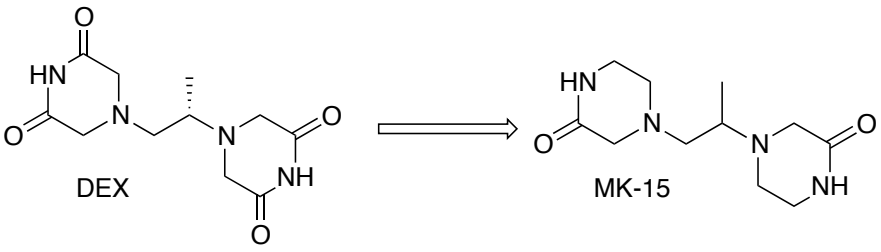
Anthracyklinová cytostatika (ANT) jako doxorubicin, daunorubicin či epirubicin se řadí mezi nejúčinnější antineoplastika používaná při léčbě leukémie. Jejich použití je však limitováno vysokým rizikem kardiotoxicity. Nejzávažnější je chronická forma charakterizovaná trvalým poškozením srdce s následným srdečním selháním. Přestože se patogeneze kardiotoxicity zdá být komplexní, hlavní role je přisuzována železem zprostředkované tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS).[1]

Dexrazoxan (DEX) je jediná klinicky používaná kardioprotektivní látka, která je efektivní při podání v kombinaci s ANT, její využití je ale velmi omezené. DEX může zhoršovat ANT-navozenou hematotoxicitu a zvyšuje se riziko leukopénie. V těle se DEX metabolizuje na látku ADR-925 (Obr. 1), která chelatuje ionty železa navázané v komplexu s ANT. DEX je současně inhibitorem topoisomerásy II (TOP2), vzniká tak daleko více otázek o mechanismu účinku. Kardioprotektivní účinky DEX byly objeveny náhodou, a proto je pro plné pochopení mechanismu účinku třeba syntetizovat další analogy DEX a s jejich pomocí objasnit vztahy mezi jeho strukturou a kardioprotektivním účinkem.[2]



Obr. 1 Dexrazoxan a jeho metabolit ADR-925

Cílem mé práce bylo připravit nový analog MK-15 (Obr. 2). V první řadě bylo nutné vyvinout spolehlivou syntézu piperazin-2-onu a následně pomocí vhodného alkylačního činidla zdvojit piperazin-2-on, čímž bychom získali analog DEX, který bude mít místo koncových imidových vazeb v piperazinovém cyklu vazby amidové. Studium tohoto analogu by následně mohlo pomoci k objasnění mechanismu účinku.



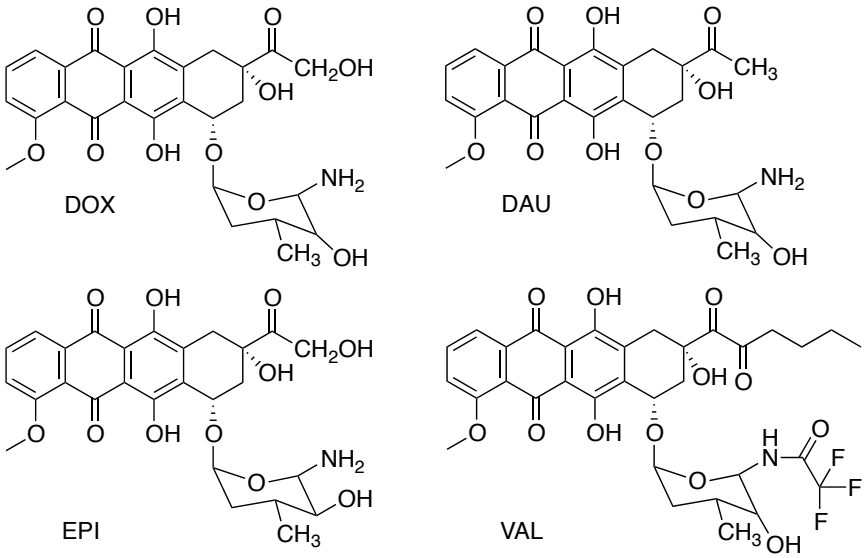
Obr. 2 Dexrazoxan a cílový analog MK-15

2. Teoretická část

2.1. Anthracykliny

Anthracyklinová cytostatika byla prvně izolovována v roce 1962 z druhu *Streptomyces peucetius*. Daunorubicin (DAU) bylo první anthracyklinové (ANT) antibiotikum se zajímavou klinickou aktivitou v léčbě akutní dětské leukémie. Další výzkum v šedesátých letech vedl k izolaci doxorubicinu (DOX) z *S. peucetius var. caesius.* U DOX bylo objeveno velmi široké spektrum terapeutické aktivity proti hematologickým a solidním nádorům, zahrnujícím rakovinu prsu, vaječníku a žaludku, měkkých tkání, kostní sarkom, non-Hodgkinův a Hodgkinův lymphom a mnohočetný myelom. V dalších letech byly vyvinuty nové ANT včetně epirubicinu (EPI) s částečnou cytotoxickou aktivitou v rakovině prsu, žaludku a v karcinomu močových cest. Valrubicin (VAL) je semisyntetický analog DOX, je nevhodný pro systémové podání vzhledem k jeho toxicitě, ale je možné přímé podání do močového měchýře při léčbě jeho malignit.[1]

ANT jsou podávány ve většině případů pouze intravenózními infuzemi. Celá skupina látek ANT typu má velmi vysoké distribuční objemy (~800 l/m^2 DOX) vzhledem k velké distribuci do tkání a jejich vazbou v intracelulárních kompartmentech. Jejich intracelulární koncentrace může být 10 - 500 × vyšší než extracelulární, což se shoduje s velmi dlouhým eliminačním poločasem (24 - 50 h). Eliminace probíhá převážně biliární exkrecí.[1]



Obr. 3 Struktury ANT (DOX - doxorubicin, DAU - daunorubicin, EPI - epirubicin, VAL - valrubicin)

2.1.1. Mechanismus účinku anthracyklinových cytostatik

Dlouho po objevení ANT nebyl definován přesný antineoplastický mechanismus. Prvním předpokládaným mechanismem byla interkalace molekuly mezi páry bazí řetězce DNA a zabráněním replikace rychle se množících buněk. ANT jsou také toxické pro rakovinné buňky v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) a specifickému poškození DNA.[3] ANT v buňce velmi ochotně chelatují ionty Fe^{3+}, dochází k tvorbě komplexních sloučenin ANT-Železo (viz Obr. 4), které katalyzují reakci vzniku volných hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku. Tyto radikály jsou vysoce toxické pro buněčnou stěnu a DNA, dochází k jejich poškození a k zániku buňky. Topoisomerása II (TOP2) je dnes považována za hlavním místo mechanismu účinku. Jedná se o enzym kontrolující změny ve struktuře DNA. ANT se řadí mezi TOP2 jedy, látky inhibující topoisomerásu II (TOP2). Inhibicí TOP2 brání uvolnění nadšroubovicové DNA a tím dochází k blokování transkribce a replikace DNA.[5]

2.1.2. Nežádoucí účinky anthracyklinů

Nežádoucí účinky ANT se rozdělují do 2 skupin - akutní a chronické. Chronické se začínají objevovat po 2 - 3 měsících aplikace. Jako u většiny cytostatik se po 1. aplikaci dostavují gastrointestinální obtíže jako nauzea a zvracení. V průběhu léčby poté dochází k depresi kostní dřeně a leukopénii. K velmi závažným nežádoucím účinkům řadíme karidiotoxicitu, která se vyvíjí postupně v závislosti na podávaných dávkách ANT a délce léčby. Poškození srdeční tkáně, zejména levé komory a síně, je nevratné.[1]

2.1.2.1. Anthracykliny vyvolaná kardiotoxicita

Vzhledem k velmi vysoké kardiovaskulární toxicitě se ANT řadí mezi nejnebezpečnější cytotoxické látky a předpokládá se, že jsou zodpovědné za chemoterapeutiky vyvolanou srdeční dysfunkci. Tento typ je charakterizován nevratnými morfologickými změnami kardiomyocytů a nekrózou srdečních buněk.

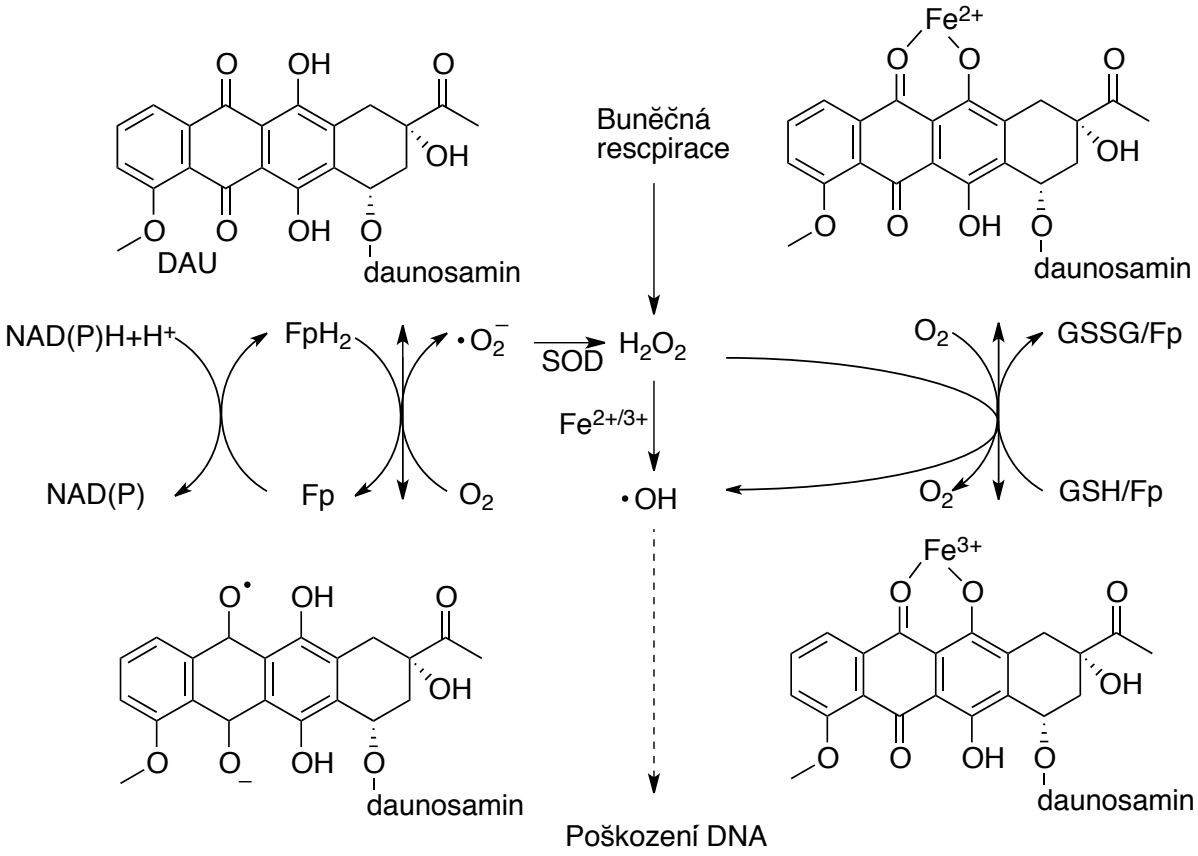
Mezi nejvýznamnější formy kardiotoxicity patří forma chronická. Rozdělujeme ji na časnou formu a formu pozdní. Časná forma se projevuje již během cyklu podávání ANT nebo do 1. roku od ukončení cyklu podávání. Během této doby dochází k signifikantnímu nárůstu levé srdeční komory,

což může progredovat k chronickému srdečnímu selhávání. Dochází ke změnám na strukturách sarkoplasmatického retikula, mitochondriích, myocytech a myofibrilách.

Pozdní chronická forma byla popsána během 90. let na dětských pacientech a může se projevit až desítky let po ukončení protirakovinné léčby.

V dnešní době neexistuje žádný typ léčby následků projevených podáváním ANT. Prognóza u pacientů s projevy je velmi špatná. Léčba probíhá stejně jako u pacientů v konečné fázi srdečního selhání, transplantace srdce zůstává poslední možností.[6]

Mechanismus ANT kardiotoxicity se přisuzuje železem zprostředkované produkci reaktivních forem kyslíku (Obr. 4). ANT mohou indukovat produkci superoxidových radikálů skrze chinonové a semichinonové formy jejich aglykonu, jsou také schopné tvořit komplexy s ionty železa a vstoupit do sledu reakcí, kdy vznikají další hydroxylové radikály, které mohou poškodit



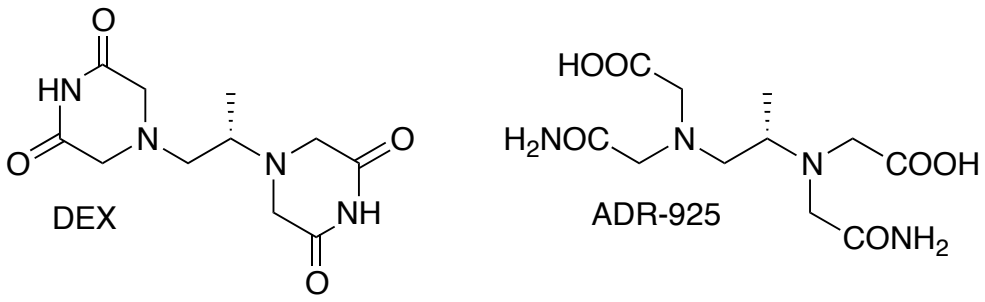
DNA, proteiny, lipidy a způsobit tak buněčnou smrt.[1,4]

Obr. 4 Mechanismus vzniku ANT-vyvolaných a železem indukovaných reaktivních hydroxylových radikálů. (Fp, flavoprotein; GSH, redukovaný glutathion; GSSG, oxidovaný glutathion; NAD(P), nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfát; $\cdot O_2^-$, superoxidový radikál; $\cdot OH$, hydroxylový radikál; SOD, superoxid dismutáza)

2.2. Dexrazoxan (ICRF-187) a ADR-925

Dexrazoxan (DEX) je karidoprotektivní léčivo, jehož kardioprotektivní účinky objevil v roce 1972 německý farmakolog Kurt Hellmann. DEX díky svému lipofilnímu charakteru velmi dobře proniká do buněk myokardu, metabolizuje na otevřený analog ADR-925, který je zřejmě vlastní účinnou substancí. Má velkou afinitu k iontům železa, které vyvazuje z komplexů s ANT a tím napomáhá předcházet vzniku volných radikálů. Je možné, že DEX samotný rovněž přispívá k protektivnímu působení inhibicí TOP2.[2,7]

Během let bylo vyzkoušeno mnoho látek, které by mohly zabraňovat nebo snižovat rizika spojená s podáváním ANT. Velmi silné antioxidanty jako je vitamin A, vitamin C či vitamin E však žádné výsledky nepřinesly. Dexrazoxan a racemická směs obou enantiomerů razoxan byly původně připraveny jako potenciální protirakovinné látky. Předlohou byla ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), která je známá jako silný chelátor kovů a používá se i v terapii odstraňování těžkých kovů z těla.[8] Cyklizací koncových karboxylových skupin a změnou spojovacího řetězce byl připraven dexrazoxan. Ten je oproti EDTA 5 × méně rozpustný ve vodě, a proto se pro aplikaci připravuje hydrochlorid dexrazoxanu. DEX ve formě čistého S enanthiomeru se používá z toho důvodu, že je více rozpustný než racemická směs. [9]



Obr. 5 Dexrazoxan a ADR-925

2.2.1. Mechanismus účinku

Dexrazoxan se podává do těla výhradně intravenózně, předpokládá se, že se chová jako kardioprotektivní proléčivo. V těle je pomocí dihydropirimidináz a dihydroorotáz přeměněn na látku zvanou ADR-925 (Obr. 5.). ADR-925 má velkou afinitu k oběma iontům železa Fe^{2+} i Fe^{3+} a jeho chelatační schopnost je vyšší než mají molekuly anthracyklinů. Bohužel, stejně jako u EDTA, se nejedná o selektivní chelátor. Bylo zjištěno, že účinně chelatuje také měďnaté, manganaté, zinečnaté a vápenaté ionty.[1,2]

2.2.2. Příprava dexrazoxanu

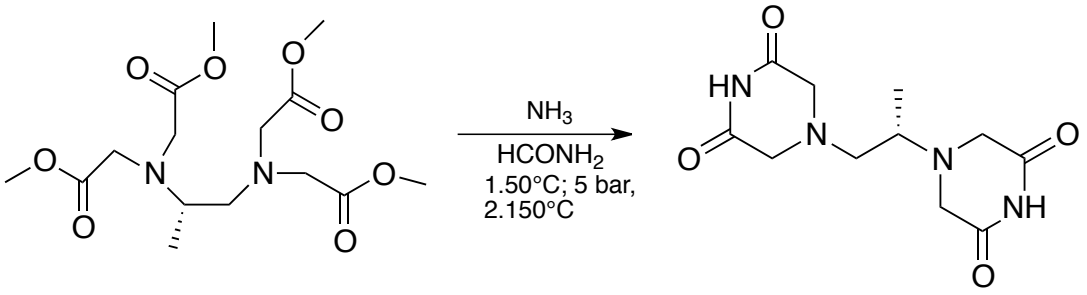


Schéma 1. Příprava DEX z tetramethylesteru kyseliny 1,2-diaminopropan-*N,N,N,N*-tetraoctové

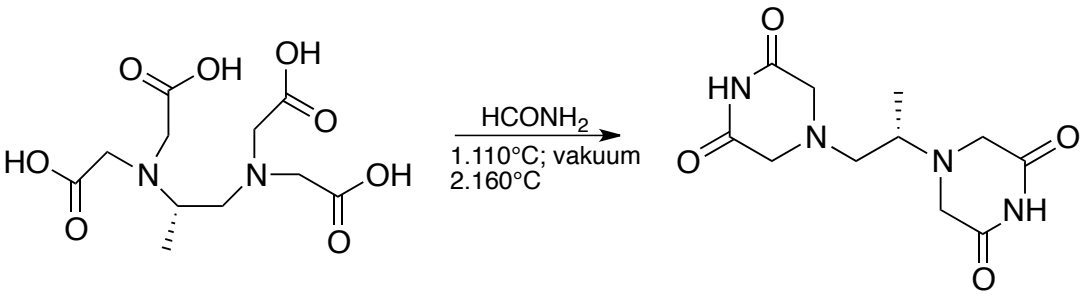
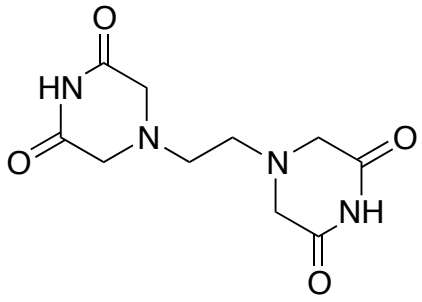


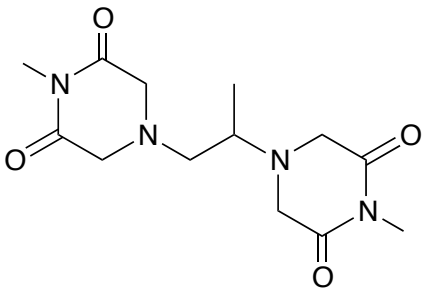
Schéma 2. Příprava DEX z 1,2-diaminopropan-*N,N,N,N*-tetraoctové kyseliny

Jedna z možností přípravy DEX je cyklizace tetramethylesteru kyseliny 1,2-diaminopropan-*N,N,N,N*-tetraoctové amoniakem ve formamidu (Schéma 1). V dnešní době se ve farmaceutickém průmyslu používá reakce, kdy je 1,2-diaminopropan-*N,N,N,N*-tetraoctová kyselina zahřívána v čistém formamidu (Schéma 2).[12, 13]

2.2.3. Analogy dexrazoxanu



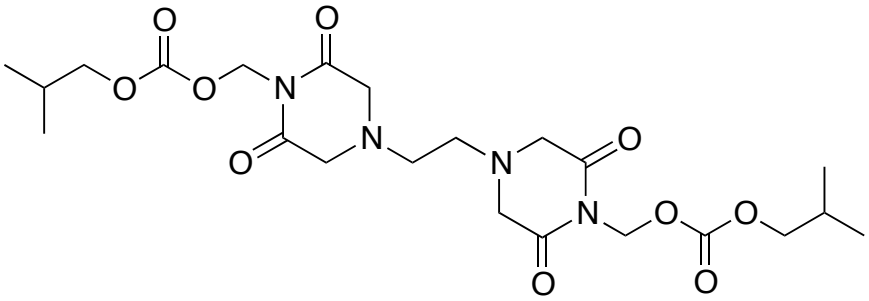
Obr. 6 Analog ICRF-154 s pozměněným spojovacím řetězcem



Obr. 7 Analog ICRF-239

Analog ICRF-154 (Obr. 6) byl podáván skupině potkanů spolu s DOX po dobu 12 týdnů. Při podávání samotného DOX uhynulo před koncem testu 8 z 10 zvířat. Při podávání DEX společně s DOX přežilo 11 z 11 zvířat. Při společném podávání ICRF-154 a DOX uhynulo 2 z 5 zvířat. Analog tedy prokázal jistou míru kardioprotekce, nicméně nedosahuje zdaleka takové účinnosti jako DEX. Analog ICRF-239 (Obr. 7) s koncovými methylovými skupinami nesnížil mortalitu, jelikož 6 z testovaných 6-ti zvířat uhynulo před koncem testu, ale pitva uhynulých zvířat prokázala menší poškození srdce než u kontrolní skupiny.[14, 15]

2.2.3.1. Sobuzoxan



Obr. 8 Sobuzoxan

Sobuzoxan (SBZ; Obr. 8) je analog DEX a inhibitor TOP2, který nebyl vyvinut za účelem kardioprotekce, ale aby zvýšil účinnost cytotoxického působení ANT. Bylo totiž zjištěno, že DOX může, v přítomnosti formaldehydu, tvořit adukty DOX-DNA, které zvyšují poškození buněk. Použití SBZ v kombinaci s ANT má 2 výhody. V první řadě je mechanismus účinku odkloněn od inhibice TOP2 k formaci aduktů doxorubicin-DNA, což umožnuje snížit dávky ANT. V druhé řadě kombinace ANT a SBZ jako kardioprotektivní látky snižuje riziko kardiotoxicity vznikající při léčbě ANT.[16]

2.3. Syntéza analogu MK-15

Syntézu produktu MK-15 jsme rozdělili do 2 fází. V první fázi jsme chtěli vyvinout syntézu piperazin-2-onu, která by umožňovala přípravu větších množství. Čistý meziprodukt poté v 2. fázi zdvojit pomocí propan-1,2-diylového můstku ve výsledný produkt MK-15.

2.3.1. Publikovaná příprava piperazin-2-onu

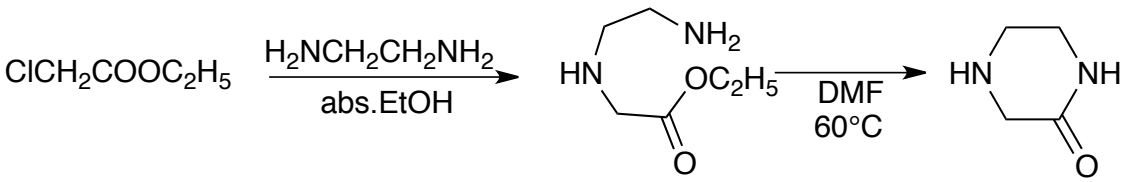


Schéma 3. Publikovaná příprava piperazin-2-onu

Sung-Woon Choi a jeho skupina vyvinula dvoukrokovou syntézu (Schéma 3) spočívající v reakci ethyl-chloracetátu a ethylendiaminu za použití ethoxidu sodného jako baze a následné cyklizaci v DMF. Produkt byl poté získán pomocí sloupcové chromatografie.[17]

Tento postup jsme vyhodnotili jako nevhodný pro naši large-scale syntézu z důvodu složitějšího postupu, vyžadujícího práci v bezvodém prostředí, a časové náročnosti. Rozhodli jsme se vyvinout vlastní syntézu, která nám poskytne piperazin-2-on jednodušším a rychlejším způsobem a ve větších množstvích.

2.3.2. Navržené postupy syntézy analogu MK-15

Pro přípravu finálního produktu jsme navrhli postup, při kterém postupně vyvineme spolehlivou syntézu piperazin-2-onu (Schéma 4). Dvě molekuly piperazin-2-onu poté zdvojíme přes propan-1,2-diylový můstek pomocí vhodných alkylačních činidel (Schéma 5).

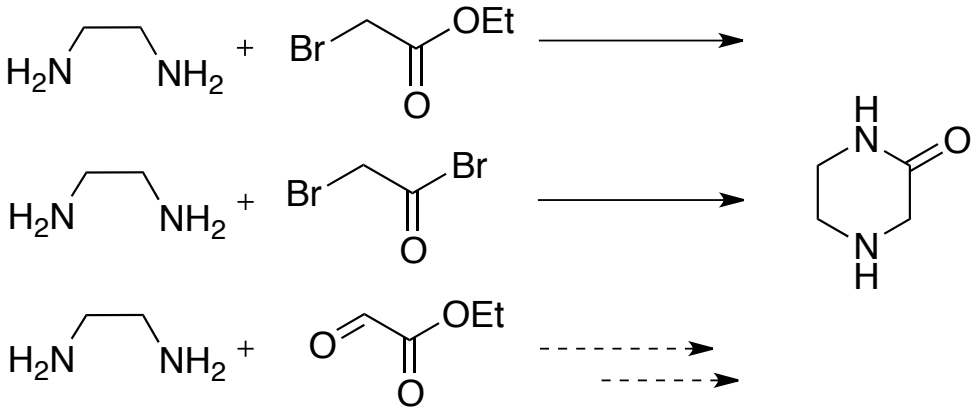


Schéma 4. Námi navržené syntézy piperazin-2-onu

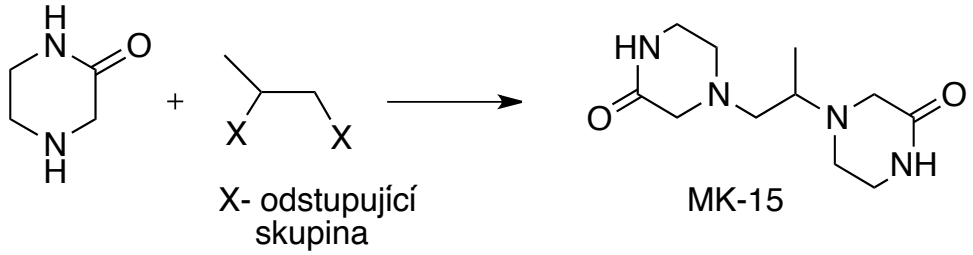


Schéma 5. Schéma syntézy MK-15

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky

Struktury připravovaných sloučenin byly potvrzeny pomocí ^{1}H-NMR ^{13}C-NMR spektroskopie. Čistota sloučenin byla stanovena elementární analýzou a naměřené hodnoty byly s maximální odchylkou 0,4 % od teoretických hodnot. Všechny chemikálie byly nakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) a Penta (Česká republika) a byly použity bez další purifikace. TLC bylo prováděno na deskách Merck Silica gel 60 F_{254}. Merck Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm) byl používán pro sloupcové chromatografie. Body tání byly měřeny na přístroji Büchi B-545 a nejsou korigovány. ^{1}H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500. Chemické posuny byly interpretovány jako δ hodnoty v parts per million (ppm) and byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) pomocí signálu rozpouštědla. Elementární analýza byla prováděna na přístroji Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Miláno, Itálie). Hmotnostní spektrometrie s APCI ionizací byla měřena použitím přístroje Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

3.2. Syntéza piperazin-2-onu

3.2.1. Syntéza využívající ethyl-bromacetátu

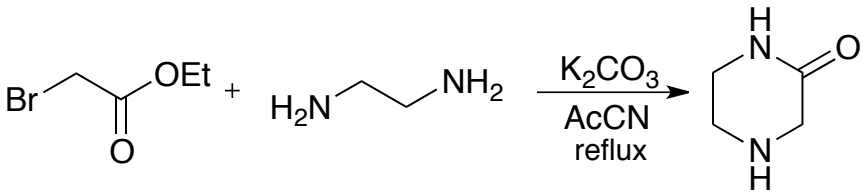


Schéma 6.

1. Do suspenze 3,6 g (4,0 ml; 59,86 mmol) ethylendiaminu, 1 g (7,23 mmol) K_2CO_3 ve 35 ml acetonitrilu byl za stálého míchání přikapán 1 g (0,66 ml; 5,98 mmol) ethyl-bromacetátu. Směs se během přidávání ethyl-bromacetátu zahřála. Poté byla reakční směs umístěna do mikrovlnného reaktoru a zahřívána 4 h při teplotě varu reakční směsi (max. výkon 200 W). Směs byla po ukončení reakce zchlazena a zfiltrována. Odfiltrovaná sraženina byla zkoušena na přítomnost produktu, který zde nebyl prokázán (dle TLC). Filtrát byl vakuově odpařen. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze - ethanol).
Výtěžek 68 % (0,24 g) ve formě žlutých krystalů

2. Do suspenze 35,9 g (40 ml; 0,598 mol) ethylendiaminu, 8,3 g (0,06 mol) K_2CO_3 ve 350 ml acetonitrilu bylo za stálého míchání postupně přikapáno 10 g (6,6 ml; 0,0598 mol) ethyl-bromacetátu. Reakce byla provedena za stejných podmínek jako reakce v bodě 1.
Výtěžek 69 % (4,13 g) ve formě žlutých krystalů.

3. Suspenze 41,4 g (0,247 mol) ethyl-bromacetátu a 144 g (160 ml; 2,4 mol) ethylendiaminu a 33 g (0,239 mol) K_2CO_3 v 1 l acetonitrilu. Reakce byla provedena za stejných podmínek jako reakce v bodě 1.
Výtěžek 62 % (15,5 g) ve formě žlutých krystalů.

4. Do suspenze 144 g (160ml; 2,4 mol) ethylendiaminu a 36 g K_2CO_3 (0,26 mol) v 1 l acetonitrilu bylo za stálého míchání postupně přikapáno 41,5 g (27,5 ml; 0,25 mol) ethyl-bromacetátu. Směs byla poté zahřívána v mikrovlnném reaktoru při teplotě varu reakční směsi po dobu 6 h (maximální výkon 300W). Po skončení reakce byla reakce ochlazena na laboratorní

teplotu a zfiltrována. Filtrát byl vakuově odpařen. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze – $CHCl_3$:MeOH, 4:1) a poté rekrystalován z acetonu.
Výtěžek 65 % (16 g) ve formě nažloutlých krystalů.

5. Reakce byla provedena se stejnými navážkami a za stejných podmínek jako v případě 4. Po skončení reakce byla reakce ochlazena na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Filtrát byl vakuově odpařen. Produkt byl rekrystalován z acetonu bez předchozí sloupcové chromatografie.
Výtěžek 81 % (20,1 g) ve formě nažloutlých krystalů.

Teplota tání: 133 °C
Teplota tání dle literatury: 132-134 °C [17]

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3,40 (s, 2H), 3,38−3,28 (m, 2H), 3,00−2,89 (m, 2H).
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 173,21; 47,88; 41,99; 40,93.

3.2.2. Syntéza využívající bromacetylbromidu

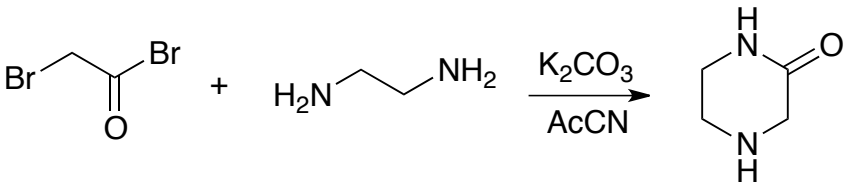


Schéma 7.

Do suspenze 2,97 g (3,31 ml; 49,4 mmol) ethylendiaminu, 0,82 g (5,93 mmol) K_2CO_3 a 35 ml acetonitrilu byl za stálého míchání postupně přikapán 1 g (0,43 ml; 4,95 mmol) bromacetylbromidu. Směs byla zahřívána na 70 °C po dobu 8 h. Po vychladnutí byla odfiltrována sraženina. Filtrát byl vakuově odpařen. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze - EtOH).

Výtěžek 62% (0,3 g) ve formě žlutých krystalů.

3.2.3. Syntéza z ethyl-glyoxalátu

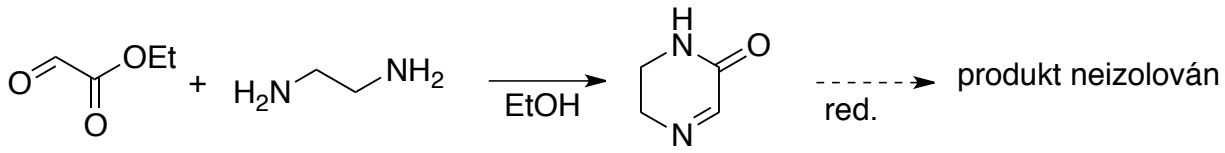


Schéma 8.

Do roztoku 5,88 g (6,54 ml; 97,8 mmol) ethylendiaminu v 40 ml 98% ethanolu byl za stálého míchání přikapán 1 g (1 ml; 9,78 mmol) ethyl-glyoxalátu. Směs se míchala za laboratorní teploty 24h. Již po zahájení reakce TLC vykazovalo velké množství produktů s různým R_f. Z tohoto důvodu produkt nebyl izolován.

3.3. Příprava alkylačních činidel

3.3.1. Příprava propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátu)

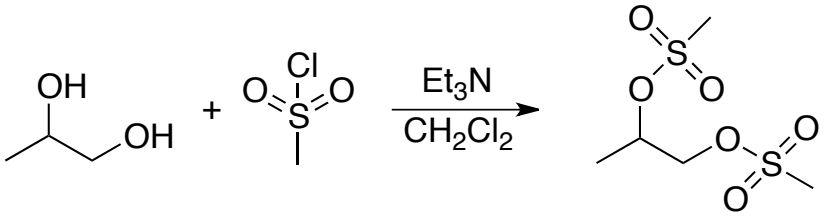


Schéma 9.

1. Do roztoku 1,52 g (20,0 mmol) 1,2-propandiolu a 3,7 ml (52,0 mmol) triethylaminu ve 120 ml dichlormethanu bylo při 0 °C v průběhu 30 minut přikapáváno 3,7 ml (48,0 mmol) methansulfonylchloridu. Po hodině míchání při 0 °C byla směs zředěna roztokem 100 ml etheru a hexanu (1:1) a 2× vytřepána s vodou. Vysušená organická část byla vakuově odpařena. Produkt byl přečištěn rekrystalizací ze směsi ethyl-acetát/hexan.

Výtěžek 84 % (3,98 g) ve formě bílých krystalů.

2. Do roztoku 9,12 g (8,82 ml; 120,0 mmol) 1,2-propandiolu a 43,8 ml (0,288 mol) triethylaminu v 400 ml dichlormethanu bylo při 0 °C v průběhu 30 minut přikapán 22 ml (228,0 mmol) methansulfonylchlorid. Reakce byla provedena se stejným postupem a za stejných podmínek.

Výtěžek 90 % (27,8 g) ve formě bílých krystalů.

Teplota tání: 68 °C

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5,03 – 4,96 (m, 1H), 4,32 (dd, *J* = 11,5, 2,9 Hz, 1H), 4,23 (dd, *J* = 11,5, 6,9 Hz, 1H), 3,08 – 3,06 (m, 6H), 1,46 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl3) δ 75,58; 70,32; 38,63; 37,75; 17,36.

3.3.2. Příprava propan-1,2-diyl-bis(tosylátu)

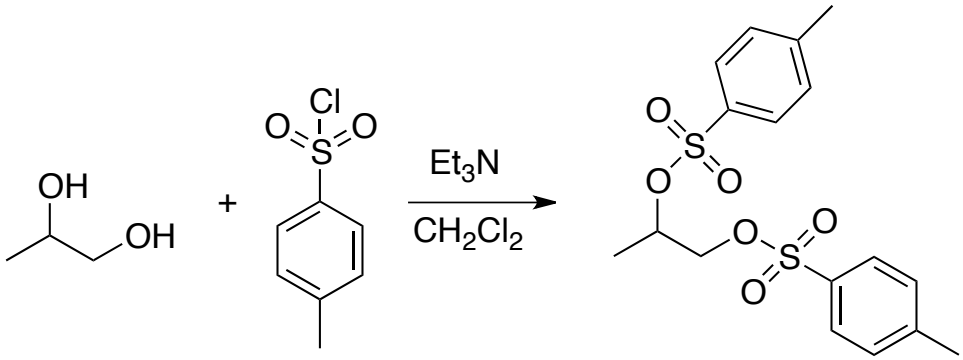


Schéma 10.

Do roztoku 5,18 g (68,06 mmol) 1,2-propandiolu a 16 g (160,00 mmol) triethylaminu v 200 ml dichlormethanu bylo v atmosféře N_2 přikapáno 27 g (136,12 mmol) tosylchloridu v 70 ml dichlormethanu při 0 °C a mícháno další 1 h při 0 °C a poté 2 dny za laboratorní teploty. Vzhledem k nízké konverzi (dle TLC) byla směs zahuštěna na poloviční objem, přidán pyridin (10 ml) a směs byla míchána další den. Poté byla reakční směs vytřepána 1M HCl (2 × 200 ml), H_2O (1 × 200 ml), nasyceným roztokem $NaHCO_3$ (3 × 200 ml) a nakonec s H_2O (1 × 200 ml). Po vakuovém zahuštění směsi byla směs přečištěna 2 × pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze - Hexan:EA 5:1, 4:1).

Výtěžek: 54 % (14 g) jako bílá krystalická látka

Teplota tání: 60-61 °C

Teplota tání dle lit. : 62 °C [18]

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7,77 – 7,66 (m, 4H), 7,36 – 7,29 (m, 4H), 4,76 – 4,64 (m, 1H), 3,99 – 3,96 (m, 1H), 3,96 – 3,94 (m, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,45 (s, 3H), 1,28 (d, J = 6,5 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 145,17; 144,98; 133,35; 132,25; 129,90; 129,81; 127,92; 127,80; 75,29; 70,41; 21,65; 17,25.

3.4. Příprava cílové látky MK-15

3.4.1. Reakce piperazin-2-onu s 1,2-dibrompropanem v AcCN

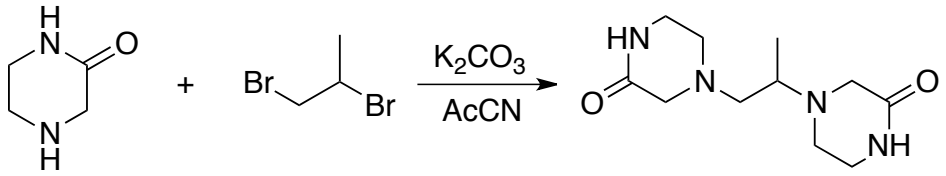


Schéma 11.

Do směsi 0,34 g (3,42 mmol) piperazin-2-onu, 0,47 g (3,4 mmol) K_2CO_3 a 35 ml acetonitrilu byl přikapán za stálého míchání 0,34 g (1,72 mmol) 1,2-dibrompropan. Směs byla umístěna do mikrovlnného reaktoru a zahřívána při teplotě varu směsi 5 h a výkonu 200 W. Po vychladnutí byla suspenze zfiltrována a vakuově zahuštěna. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (stacionární fáze - silikagel, mobilní fáze - ethanol).

Výtěžek 7 % (0,02 g) ve formě nažloutlých krystalů.

3.4.2. Reakce piperazin-2-onu s 1,2-dibrompropanem v DMF

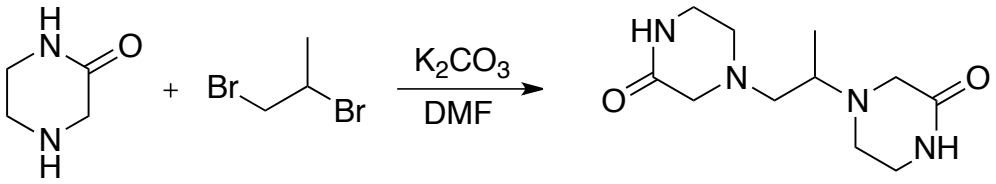


Schéma 12.

1. V 5 ml DMF bylo rozpuštěno 0,48 g (4,8 mmol) piperazin-2-onu. Do roztoku byl přidán 0,66 g (4,8 mmol) K_2CO_3. Poté byl do suspenze za stálého míchání přikapán 1,2-dibrompropan (0,48 g; 0,2 ml; 2,4 mmol). Směs byla poté zahřívána na 100 °C po dobu 10 h. Reakce byla zchlazena a zfiltrována a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze $CHCl_3$/EtOH 4:1).

Výtěžek 26 % (0,148 g) ve formě nažloutlých krystalů.

2. V 80 ml DMF bylo rozpuštěno 11,75 g (0,117 mol) piperazin-2-onu a 11,8 g (6,1 ml; 0,058 mol) 1,2-dibrompropanu a přidáno 16,2 g (0,117 mol) K_2CO_3. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 90 °C po dobu 8 h. Po 8 h byla směs rozředěna 20 ml DMF a zahřívána dalších 8 h. Po ukončení reakce byla směs zchlazena a zfiltrována. Produkt byl získán pomocí sloupcové chromatografie (provedena 2×; 1. mobilní fáze - $CHCl_3$/MeOH 4:1; 2. mobiní fáze - $CHCl_3$/MeOH 5:1)

Výtěžek 24 % (3,4 g) ve formě nažloutlých krystalů.

3. V 100 ml DMF bylo rozpuštěno 14,95 g (0,149 mol) piperazin-2-onu a 15,0 g (7,8 ml; 0,074 mol) 1,2-dibrompropanu a přidáno 20,6 g (0,149 mol) K_2CO_3. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 90 °C po dobu 10 h. Po ukončení reakce byla směs zchlazena a zfiltrována. Produkt byl získán pomocí sloupcové chromatografie (provedena 3×; 1. mobilní fáze - $CHCl_3$/ MeOH 3:1; 2. mobilní fáze - $CHCl_3$/MeOH 5:1; 3. mobiní fáze - $CHCl_3$/MeOH 3:1)

Výtěžek 26 % (4,66 g) ve formě nažloutlých krystalů.

4. V 120 ml DMF bylo rozpuštěno 13,9 g (0,138 mol) piperazin-2-onu a 14 g (7,26 ml; 0,069 mol) 1,2-dibrompropanu a přidáno 19,2 g (0,14 mol) K_2CO_3. Reakce byla provedena za

stejných podmínek jako v bodě 3. Produkt byl získán pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze - $CHCl_3$/MeOH 4:1)

Výtěžek 21 % (3,5 g) ve formě nažloutlých krystalů.

Teplota tání: 155−156 °C

R_f ($CHCl_3$/MeOH, 2:1) 0,42

NMR: ^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ 3,42−3,32 (m, 4H), 3,31 (s, 2H), 3,23 (s, 2H), 3,08 – 2,94 (m, 1H), 2,93−2,81 (m, 3H), 2,80−2,63 (m, 2H), 2,57−2,46 (m, 1H), 1,11 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H);

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7,69 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 3,16−3,02 (m, 6H), 2,93 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 2,91−2,80 (m, 1H), 2,66−2,39 (m, 5H), 2,22 (dd, *J* = 12,5, 7,1 Hz, 1H), 0,91 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H);

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ 172,51; 171,98; 59,69; 56,18; 55,33; 51,83; 48,55; 44,05; 40,99; 40,44; 13,15.

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 168,53; 168,02; 59,90; 57,42; 54,54; 52,82; 49,36; 44,75; 41,06; 40,60; 13,05.

LRMS *m/z* (APCI) 241,4 (100%, $M+H^+$), 242,2 (12%).

3.4.3. Alkylace piperazin-2-onu 1,2-dibrompropanem za přítomnosti NaI

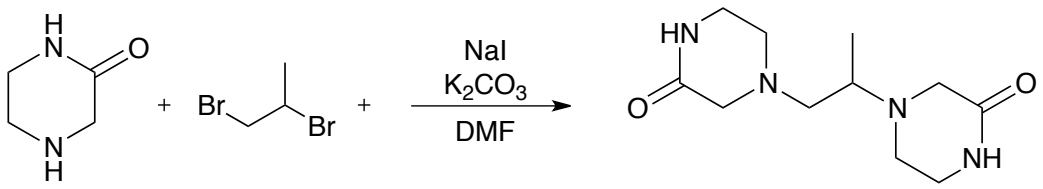


Schéma 13.

Do roztoku 0,24 g (2,4 mmol) piperazin-2-onu, 0,323 g (2,15 mmol) NaI a 0,29 g (2,09 mol) K_2CO_3 v 5 ml DMF byl přikapán 0,11 ml (1 mmol) 1,2-dibrompropan. Směs byla zahřáta na 120 °C po dobu 8 h. Během reakce směs vykazovala velké množství vedlejších produktů. Produkt nebyl izolován.

3.4.4. Alkylace piperazin-2-onu pomocí reduktivní aminace

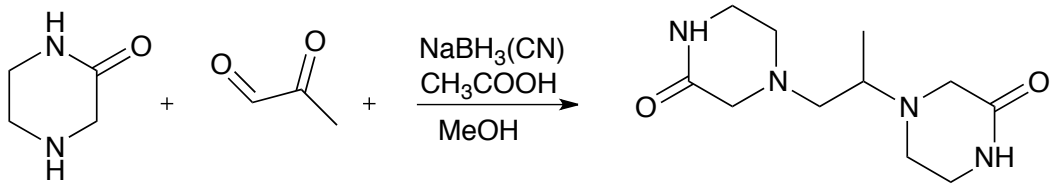


Schéma 14.

Do roztoku 0,215 g (2,14 mmol) piperazin-2-onu a 0,07 g (0,17 ml; 0,97 mmol) pyruvaldehydu v 5 ml methanolu bylo přidáno 0,269 g (4,28 mmol) kyanborohydridu sodného a 5 kapek kyseliny octové. Během ani po ukončení reakce nebyl produkt detekován na TLC. Produkt nebyl izolován.

3.4.5. Alkylace piperazin-2-onu propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátem) v DMF

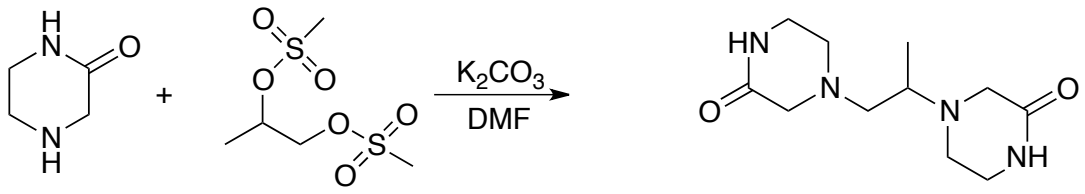


Schéma 15.

1. Do roztoku 0,224 g (2,24 mmol) piperazin-2-onu v 5 ml DMF bylo přidáno 0,309 g (2,24 mmol) K_2CO_3. Do směsi bylo přikapáno za stálého míchání 0,259 g (1,16 mmol) propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátu) v 5 ml DMF. Směs byla zahřívána na 100 °C po dobu 10 h. Po zchladnutí a odfiltrování anorganických meziproduktů byl roztok vakuově zahuštěn. Směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze $CHCl_3$/EtOH 1:1).
Výtěžek 58 % (0,158g) ve formě nažloutlých krystalů.

2. Do roztoku 2 g (19,96 mmol) piperazin-2-onu a 2,31 g (9,98 mmol) propan-1,2-diyl-bis(methansulfonát) v 27 ml DMF bylo přidáno 2,75 g (19,9 mmol) K_2CO_3 a zahříváno za stálého míchání na 90 °C po dobu 2 h. Po 2 h se reakční směs zhoustla až zgelovatěla. Směs byla rozředěna 10 ml DMF a zahřívána další 2 h. Po ukončení reakce byla reakční směs zchlazena a zfiltrována. Směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (stacionární fáze - oxid hlinitý, mobilní fáze - $CHCl_3$/EtOH 8:1).
Výtěžek 14 % (0,648 g) ve formě nažloutlých krystalů.

3. 15 g (0,15 mol) piperazin-2-onu a 17 g (0,73 mol) propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátu) bylo rozpuštěno ve 100 ml DMF a 20 ml DMSO a přidáno 31 g (0,22 mol) K_2CO_3. Reakční směs se za stálého míchání zahřívala na 70 °C po dobu 15 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs zchlazena a zfiltrována. Čištění reakční směsi probíhalo pomocí sloupcové chromatografie v několika fázích. První fáze (stacionární fáze - oxid hlinitý, mobilní fáze - chloroform), následně byla směs vakuově zahuštěna a rozředěna 50 ml etherem a ethyl-acetátem 1:1 a vytřepána 2× s H_2O, vodná fáze byla vakuově zahuštěna a byla přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze - chloroform). Třetí fáze sloupcové chromatografie (mobilní fáze - $CHCl_3$/EtOH 8:1)
Výtěžek 24% (4,26 g) ve formě nažloutlých krystalů

3.4.6. Alkylace piperazin-2-onu propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátem) v AcCN

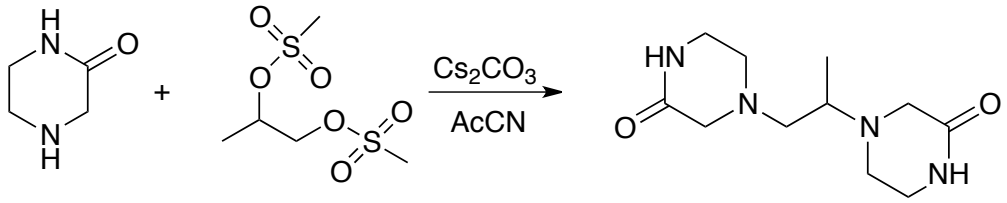


Schéma 16.

Do roztoku 0,17 g (1,7 mmol) piperazin-2-onu a 0,19 g (0,81 mmol) propan-1,2-diyl-bis(methansulfonátu) v 5 ml acetonitrilu bylo přidáno 0,533 g (1,6 mmol) uhličitanu cesného. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 90 °C po dobu 3 dnů. Během ani po ukončení reakce nebyl produkt detekován na TLC. Produk nebyl izolován.

3.5. Příprava 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamidu cyklizací iminodioctové kyseliny

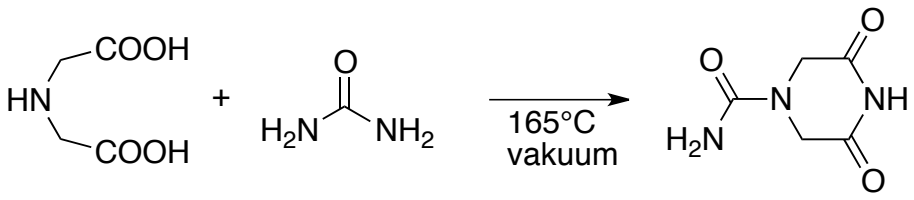


Schéma 17.

1. 10 g (0,075 mol) iminodioctové kyseliny bylo taveno při 165 °C za vakua 1,5 h s 13,5 g (0,225 mol) močoviny. Po ukončení reakce byla směs za horka vlita do 50 ml methanolu. Směs byla zfiltrována, filtrát vakuově odpařen a následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze $CHCl_3$/MeOH 3:1). Na závěr byly krystaly promyty ethanolem.
Výtěžek 34 % (4,1 g) ve formě bílých krystalů.

2. 5 g (0,0376 mol) iminodioctové kyseliny bylo taveno za vakua 2,5 h při 165 °C s 6,75 g (0,113 mol) močoviny. Po vychladnutí reakční směsi došlo k zatvrdnutí. Směs byla postupně ředěna methanolem do rozpuštění. Směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze $CHCl_3$/MeOH 3:1). Na závěr byly krystaly promyty ethanolem.
Výtěžek 33 % (1,94 g) ve formě bílých krystalů.

NMR: ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10,83 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,15 (s, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,80 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172,12; 169,94; 157,68; 51,89; 44,52.

3.5.1. Příprava piperazin-2,6-dionu

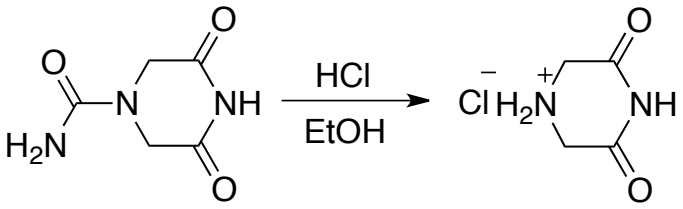


Schéma 18.

Do suspenze 0,5 g (3,2 mmol) 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamidu v 5 ml ethanolu bylo přikapáno 0,5 ml 36% HCl a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu směsi. Po 1 h zahřívání bylo do suspenze přikapáno další 0,5 ml 36%HCl. Po 2 h varu byly detetekovány na TLC pouze reaktanty. Produkt nebyl izolován.

3.5.2. Příprava N-(karbamoyl)iminodiacetamidu

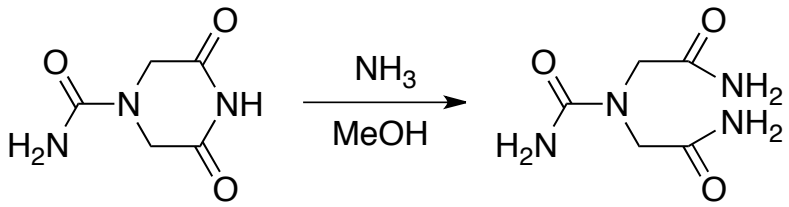


Schéma 19.

Roztok 0,1 g (0,636 mmol) 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamidu v 4 ml methanolu byl probubláván 90 vteřin plynným NH_3. Reakční směs byla hermeticky uzavřena a míchána 24 h. Po ukončení reakce byly na TLC detekovány pouze reaktanty, reakce nebyla dále zpracována.

4. Výsledky a Diskuze

Cílem této práce bylo připravit nový analog dexrazoxanu (Obr. 1), látky, která má zejména kardioprotektivní účinky a účinně brání kardiotoxickému působení anthracyklinů v organismu. Mým cílem bylo vyvinout spolehlivou syntézu, kterou by bylo možné připravit v dostatečném množství analog MK-15 (Obr. 2), který by bylo možné dále studovat *in vitro* a *in vivo*.

V první řadě bylo třeba vyvinout spolehlivou syntézu, kterou bude možné připravit velké množství piperazin-2-onu v dostatečné kvalitě, který bude v další části alkylován vhodným alkylačním činidlem. Přestože je piperazin-2-on komerčně dostupný, rozhodli jsme se, hlavně z finančních důvodů, vyvinout vlastní způsob přípravy z látek běžně dostupných v laboratoři.

Při syntéze jsme využili ethylendiaminu, který jsme nechali zreagovat s dvěma různými deriváty octové kyseliny za vzniku piperazin-2-onu. Ethyl-bromacetát či bromacetylbromid zreagoval v dvou různých reakcích za rozdílných podmínek s ethylendiaminem a po přečištění byl získán požadovaný produkt. Reakce ethyl-glyoxalátu s ethylendiaminem s následnou redukcí dvojné vazby neproběhla tak, jak jsme předpokládali. Pro využití v large-scale syntéze jsme vybrali reakci s ethyl-bromacetátem (Schéma 6.) z důvodu nejvyššího výtěžku a možnosti zpracování. Reakce byla prováděna několikrát z důvodu požadavku na velké množství cílové látky. Metoda byla během času optimalizována o rekrystalizaci, která nahradila sloupcovou chromatografii a zvýšila výtěžek reakce. Celkem bylo připraveno 56,64 g čistého piperazin-2-onu, který byl použit v následujících reakcích.

Dalším krokem bylo najít vhodné alkylační činidlo a vhodné reakční podmínky pro zdvojení dvou molekul piperazin-2-onu pomocí propan-1,2-diylového můstku v cílový analog MK-15. Prvním zamýšleným činidlem byl 1,2-dibrompropan. Již první reakcí jsme získali cílový produkt MK-15, bohužel ale ve velmi nízkém výtěžku. Rozhodli jsme se připravit další alkylační činidla. Byl připraven propan-1,2-diyl-bis(methansulfonát) a propan-1,2-diyl-bis(tosylát). Pro alkylaci byl vybrán propan-1,2-diyl-bis(methansulfonát) z důvodu snadnější přípravy a čištění s ohledem na large-scale syntézu. Touto syntézou bylo získáno 5 g čistého produktu MK-15.

Optimalizace reakce použitím reduktivní aminace, uhličitanu cesného nebo přídavku NaI nevedla k zisku cílové látky. Velkým problémem všech prováděných reakcí byla nemožnost zabránit kvarternizaci bazického dusíku v piperazin-2-onu, což byl zřejmě důvod poměrně nízkých výtěžků. Nicméně pro použití v large-scale syntéze se zdálo jako nejvhodnější činidlo 1,2-dibrompropan. Optimalizací reakce jsme dosáhli výtěžků okolo 25 %. Čistý produkt MK-15 byl připraven v celkovém množství 16,8 g a byl předán kolegům z Katedry biochemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a na Ústav farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové k *in vitro* a *in vivo* studiím.

Ve skupině doc. Tomáše Šimůnka na Katedře biochemie byly provdeny studie látek na isolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytech. Myocyty byly nejprve preinkubovány s MK-15, kontrolní skupina s DEX a po 3 h byl aplikován DAU a následně byly buňky inkubovány v různých časových intervalech. V těchto studiích MK-15 neprokázal schopnost chránit buňky před DAU toxicitou narozdíl od DEX, který signifikantně snižoval nekrózu buněk.

Studium MK-15 na Lékařské fakultě ve skupině doc. Štěrby probíhalo na osvědčeném modelu chronické ANT kardiotoxicity na králících. Kardiotoxicita byla vyvolána DAU. V kontrolní skupině 1 byl aplikován fyziologický roztok, skupině 2 byl aplikován pouze DAU, ve skupině 3 byl aplikován DEX a DAU a 4. skupině byl aplikován MK-15 a DAU. Produkt MK-15 a DEX byl podáván peritoneálně v dávce 60 mg/kg 30 minut před podáním DAU v dávce 3 mg/kg. Po 10-ti týdenním testu byly výsledky vyhodnoceny. Ve 4. skupině, které byl aplikován MK-15 a DAU, přežilo 80 % testovaných zvířat, během testu ztratila zvířata přibližně 5 % tělesné váhy. Skupina 2 s aplikovaným DAU přežila ze 60 % a ztratila na váze přibližně 5 %. Zvířata skupiny 3 přežila ve 100 % a tělesná váha se zvýšila průměrně o 10 %. Kontrolní skupina s aplikovaným fyz. roztokem přežila ze 100 % a přibrala na váze přibližně 20 %. Z výsledků pitvy bylo zjištěno, že MK-15 výrazně nezabraňuje snižování srdeční kontraktility oproti DEX, který prokazatelně chrání srdeční sval před DAU vyvolanou kardiotoxicitou. Tyto výsledky potvrzují i hladiny troponinu T v plazmě, což je důležitý marker srdečního selhání. 2. Skupina zvířat, kterým byl aplikován pouze DAU, měla troponit T výrazně zvýšený. Skupina 4 s aplikovaným MK-15 a DAU měla troponin T také zvýšený oproti skupinám 1 a 3, v kterých nebyl troponin T zvýšen prakticky vůbec.

Produkt MK-15 se neosvědčil pro další studium, neboť jeho kardioprotektivní účinky nedosahovaly zdaleka účinků DEX. Výsledky provedených studií budou publikovány.

Poslední částí naší práce byla příprava piperazin-2,6-dionového cyklu. Těmito dvěma cykly spojenými propan-1,2-diylovým můstkem je tvořen DEX. Spojením piperazin-2,6-dionu a piperazin-2-onu přes propan-1,2-diylový můstek bychom získali velmi zajímavou sloučeninu vhodnou pro další studium. Tavením močoviny s iminodioctovou kyselinou za vakua se podařilo připravit čistý meziprodukt, 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamid v množství 6 g.[19] Následnými reakcemi se však nepodařilo 3,5-dioxopiperazin-1-karboxamid odchránit.

5. Závěr

Anthracyklinová cytostatika patří v dnešní době mezi nejúčinější látky používané v onkologii. Jejich použití je limitováno celou řadou nežádoucích účinků, mezi nejzávažnější patří ANT-vyvolaná kardiotoxicita, která se rozvíjí během terapie.[13] DEX je v dnešní době jedinou používanou látkou, která účinně zabraňuje projevům kardiotoxicity. Jeho kardioprotektivní účinek byl objeven náhodou a dodnes není přesný mechanismus probádán. Cílem této práce byla příprava analogu DEX, který bude mít místo cyklů piperazin-2,6-dionových cykly piperazin-2-onové. Tento analog MK-15 byl úspěšně připraven a studován na kulturách isolovaných neonatálních potkaních kardiomyocytů a modelu chronické ANT kardiotoxicity na králících. Bohužel, provedené studie na látce MK-15 neprokázaly kardioprotektivní účinky.

6. Seznam zkratek

AcCN acetonitril

ANT anthracyklinová antibiotika

DAU daunorubicin

DEX dexrazoxan

DMF *N,N*-dimethylformamid

DMSO dimethylsulfoxid

DOX doxorubicin

EA ethyl-acetát

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

EPI epirubicin

GSH redukovaný glutathion

GSSH oxidovaný glutathion

IDA idarubicin

NAD(P) nikotinamid-adenin-diukleotid fosfát

NMR nukleární magnetická rezonance

R_f retenční faktor

ROS reaktivní formy kyslíku

SOD superoxid dismutása

TOP2 topoisomerása 2

TLC tenkovrstvá chromatografie

TMS tetramethylsilan

VAL valrubicin

7. Seznam literatury

[1]Štěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovsky E, Kovaříková P, Gerlš V, Šimůnek T, Oxidative Stress, Redox Signaling and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection, *Antioxidants & Redox Signaling*, **2012**; 18(8): 899-929

[2]Šimůnek T, Štěrba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina M, Geršl V, Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron, *Pharmacological Reports*, **2009**; 61: 154–171.

[3]Takimoto CH, Calvo E, "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" in Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) Cancer Management: A Multidisciplinary Approach, **2008;** 11 ed.

[4]Muindi JRF, Sinha BK, Gianni L, Myers CE, Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex, *Febs Letters*, 1984; 172(2): 226-230.

[5]Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand, C, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chemistry & Biology*, **2010**; 17(5): 421-433.

[6]Ewer MS, Lippman SM, Type II Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: Time to Recognize a New Entity, *Journal of Clinical Oncology*, **2005**; 23(13): 2900-2902.

[7]Hasinoff BB, Herman EH, Dexrazoxane: How it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?, *Cardiovascular Toxicology*, **2007**; 7(2): 140-144.

[8]Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacological Reviews*, **2004**; 56(2): 185-229.

[9]Repta AJ, Baltezor MJ, Bansal PC, Utilization of an enantiomer as a solution to a pharmaceutical problem: application to solubilization of 1,2-di(4-piperazine-2,6-dione) propane, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**; 65(2): 238-242.

[10]Hochster H , Liebes L, Wadler S, Oratz R, Wernz JC, Meyers M, Green M, Blum RH, Speyer JL, Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICRF-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin, *Journal of National Cancer Institute*, **1992**; 84(22): 1725-1730.

[11]APT Pharmaceuticals, Inc. Patent: US2008/275036 A1, **2008**, Page 21-22.

[12]APT Pharmaceuticals, Inc. Patent: US2008/275036 A1, **2008**, Page 20.

[13]Snapka RM, Woo SH, Blokhin AV, Witiak DT, Inhibition of Topoisomerase II by ICRF-193, the Meso Isomer of 2,3-Bis(2,6-dioxopiperazin-4-yl)butane, *Biochemical Pharmacology* **1996**; 52(4): 543-549.

[14]Herman EH, Zhang J, Hasinoff BB, Chadwick DP, Clark JR, Ferrans VJ, Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, **1997;** 40(5): 400-408.

[15]Hasinoff BB, Hellmann K, Herman EH, Ferrans VJ, Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines, *Current Medical Chemistry,* **1998**; 5(1): 1-28.

[16]Swift LP,Cutts SM, Nudelman A, Levovich I, Rephaeli A, Phillips DR, The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **2008**; 61(5):739–749.

[17]Choi SW, Elmaleh DR, Hanson RN, Fischman AJ, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Non-Piperazine Analogues of 1-[2-(Diphenylmethoxy)ethyl]- and 1-[2-[Bis(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl)piperazines as Dopamine Transporter Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry* , **1999**; 42(18): 3647-3656.

[18]Fryzuk MD, Bosnich B, *Journal of the American Chemical Society*, **1978**; 100(17): 5491 - 5494.

[19]Čapek K, Čapková J, Jarý J, Tříska P, Derivatives of 6-amino-6-*N,N*-bis(carboxymethyl)-6-deoxy-D-galaktose, *Collection Czechoslovak Chemical Communications*, **1984**; 49(8): 1914-1920.