

NOVÉ DERIVÁTY TAXOLU

Marie Příbylová

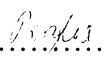
**Školitelé: RNDr. Tomáš Vaněk, CSc.
Doc. Jana Barthová, CSc.**

Diplomová práce

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha 2006

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů RNDr. Tomáše Vaňka, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) a Doc. Jany Barthové, CSc. (PřF UK, Praha) a všechny prameny jsem řádně citovala.“

Praha 28.5.2006

Podpis: .....

Úvodem bych ráda poděkovala svým školitelům RNDr. Tomáši Vaňkovi, CSc. a Doc. Janě Barthové, CSc. za odborné vedení a cenné rady při tvorbě mé diplomové práce.

Mé díky za pomoc nejen v experimentální části patří RNDr. Tomislavu Barthovi, DrSc., RNDr. Jiřímu Velkovi, Ph.D., Mgr. Petru Maršíkovi a Mgr. Marcelu Dvořákové.

Ráda bych také poděkovala panu RNDr. Luděkovi Lepšovi, Ph.D. za syntézu peptidů, RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za měření hmotových spekter, Ing. Davidu Šamanovi, CSc. za změření NMR spektra a RNDr. Ivanu Votrubovi D. Sc. za testování cytostatické aktivity připravených derivátů taxolu.

Tato práce byla podporována grantem AVCR IBS 4055301 a vypracována na ÚOCHB AV ČR v Dejvicích

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1. Úvod	8
1.1. Taxol	8
1.1.1. Vlastnosti taxolu.....	9
1.1.2. Mechanismus působení taxolu.....	9
1.1.3. Protirakovinná aktivita taxolu.....	10
<i>1.1.3.1. Rakovina vaječníků</i>	10
<i>1.1.3.2. Rakovina prsu</i>	11
<i>1.1.3.3. Rakovina plic</i>	11
<i>1.1.3.4. Rakovina v oblasti hlavy a krku</i>	11
<i>1.1.3.5. Jiné druhy rakoviny</i>	11
1.1.4. Toxicita.....	12
<i>1.1.4.1. Hypersensitivita</i>	12
<i>1.1.4.2. Hematologická toxicita</i>	12
<i>1.1.4.3. Neurotoxicita</i>	13
<i>1.1.4.4. Vliv na srdce</i>	13
<i>1.1.4.5. Další toxické efekty</i>	13
<i>1.1.4.6. Rezistence</i>	13
1.1.5. Zdroje taxolu.....	13
1.2. Cílené deriváty taxolu	15
1.3. Můstek	18
1.4. Navigační molekuly	18
1.4.1. GnRH.....	18
1.4.2. Carbetocin, derivát oxytocinu.....	21
1.5. Metody syntézy derivátů taxolu	23
1.5.1. Příprava navigační molekuly.....	23

1.5.2. Kondenzační činidla.....	23
1.5.2.1. Průběh kondezačních reakcí.....	24
1.5.2.2. Použitá kondenzační činidla.....	24
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	27
2. Materiál a metody.....	28
2.1. Syntéza 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu.....	29
2.2. Syntéza 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxolu.....	29
2.3. Syntéza 2'-(Boc-glycyl)taxolu.....	29
2.4. Syntéza 2'-(Phac-glycyl)taxolu.....	30
2.5. Syntéza 2'-(Phac-alanyl)taxolu.....	30
2.6. Syntéza 2'-(chloracetylglycyl)taxolu.....	30
2.7. Odštěpení chránící skupiny Boc z NH ₂ skupiny glycinu	31
2.8. Odštěpení chránící skupiny Phac z NH ₂ skupiny glycinu(alaninu)....	32
2.8.1. Stanovení aktivity penicilinacylasy.....	32
2.8.2. Stanovení rozpustnosti taxolu v prostředí methanol/voda.....	32
2.8.3. Stanovení aktivity penicilinacylasy v roztoku 68 % methanolu.....	33
2.8.4. Enzymatická reakce derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol s penicilinacylasou v prostředí 68 % methanolu.....	33
2.9. Štěpení Carbetocinu chymotrypsinem.....	34
2.10. Syntéza derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH.....	34
2.11. Rozpouštědla.....	34
2.12. Úprava vzorků před HPLC.....	35
2.13. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	35
3.13.1. Analytická HPLC.....	35
3.13.2. Semipreparativní HPLC.....	38
2.14. Hmotnostní spektroskopie.....	41
3.14.1. MS analýza izolovaných vzorků.....	41
3.14.2. LC/MS analýza.....	41
2.15. Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	42
2.16. Spektrofotometrie.....	42

2.17. Stanovení cytostatické aktivity derivátů taxolu <i>in vitro</i>	42
<u>3. Výsledky</u>	43
3.1. Syntéza a izolace 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu	43
3.1.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol.....	44
3.2. Syntéza a izolace 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxolu	45
3.2.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxol.....	46
3.3. Syntéza a izolace 2'-(Boc-glycyl)taxolu	48
3.3.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol.....	49
3.4. Syntéza a izolace 2'-(Phac-glycyl)taxolu	50
3.4.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol.....	51
3.5. Syntéza a izolace 2'-(Phac-alanyl)taxolu	53
3.5.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol.....	54
3.6. Syntéza a izolace 2'-(chloracetylglycyl)taxolu	55
3.6.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(chloracetylglycyl)taxol.....	56
3.7. Odštěpení chránící skupiny Boc z NH₂ skupiny glycinu	58
3.8. Odštěpení chránící skupiny Phac z NH₂ skupiny glycinu(alaninu) ...58	
3.8.1. Stanovení rozpustnosti taxolu v prostředí methanol/voda.....	58
3.8.2. Stanovení aktivity penicilinacylasy v roztoku 68 % methanolu.....	58
3.8.3. Enzymatická reakce derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol s penicilinacylasou v prostředí 68 % methanolu.....	58
3.9. Štěpení Carbetocinu chymotrypsinem	59
3.10. Syntéza a izolace derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH	61
3.10.1. Charakteristika derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH.....	62
3.11. Charakteristika taxolu a 2'-sukcinyltaxolu jako výchozích látek ...63	
3.11.1. Charakteristika taxolu.....	63
3.11.2. Charakteristika 2'-sukcinyltaxolu.....	65
3.12. Test cytostatické aktivity derivátů taxolu <i>in vitro</i>	67
<u>4. Diskuse</u>	68
<u>5. Souhrn</u>	72
<u>7. Seznam použité literatury</u>	73

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN - acetonitril

Boc - tert-butyloxykarbonylová skupina

cAMP - cyklické AMP

DAG - diacylglycerol

DIEA - N,N-diisopropylethylamin

DIPC - Diisopropylkarbodiimid

DMAP - Dimethylaminopyridin

DMF - N,N-dimethylformamid

EGFR - receptory růstového hormonu epidermálního původu

FSH - folikuly stimulující hormon

GnRH - gonadotropiny uvolňující hormon

GTP - guanosintrifosfát

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IP₃ - inositol-3-fosfát

LC/MS - kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektroskopie

MeI - 1-Methylimidazol

MeOH - methanol

MS - hmotnostní spektroskopie

MSNT - (Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol

NaOH - hydroxid sodný

NMR - nukleární magnetická rezonance

Phac - fenylactová kyselina

PIP₂ - fosfatidilinositol-4,5-bisfosfát

PLC - fosfolipasa C

TBTU - N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium
tetrafluoroborát N-oxid

TFA - trifluoroctová kyselina

1. Úvod

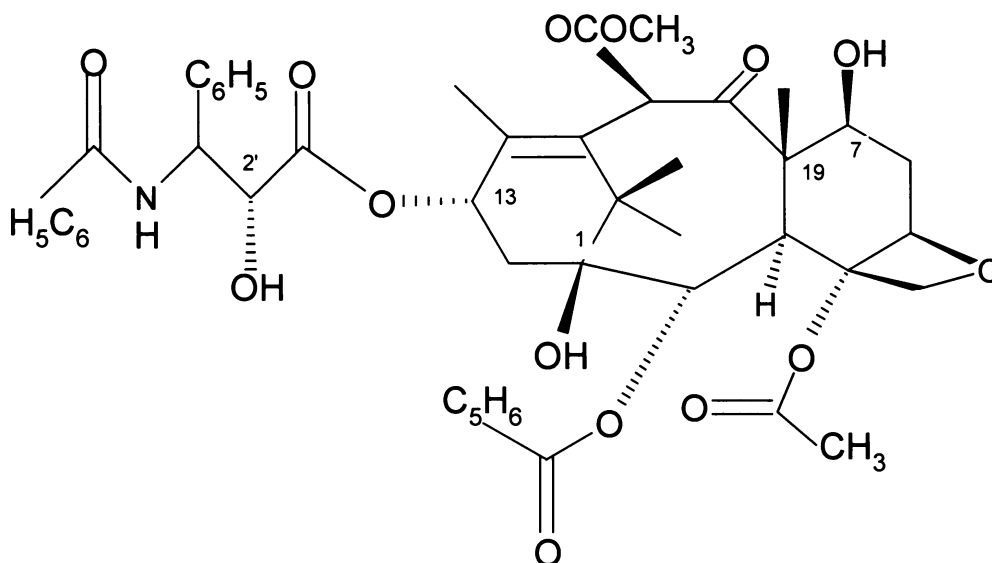
Rakovina je jednou z nejčastějších a nejzávažnějších onemocnění, která většinou končí smrtí. V dnešní době existuje mnoho strategií boje proti rakovině. Mezi ty tradiční patří chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie.

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu a vyhodnocení cytostatické aktivity cílených derivátů taxolu. Proto je hlavní část literárního úvodu věnována cytostatiku taxolu, jeho principu působení, možnostem použití. Část textu je záměrně orientována na vedlejší účinky léčby taxolem. Je jasné, že každá léčba, obzvláště tak zákeřné nemoci jako je rakovina, má vedlejší účinky, ale mnohdy je jimi pacient oslabován až příliš. A právě proto se v dnešní době hledají způsoby jak drastickou léčbu alespoň v mezích možností zmírnit.

Má-li chemoterapeutikum dosáhnout cytostatického účinku, musí jeho koncentrace v rakovinných tkáních dosahovat určité hodnoty. Při klasické chemoterapii se cytostatikum dostává nespecificky do všech tkání, proto je vstupní dávka této látky vysoká. U cílené chemoterapie je cytostatikum vychytáváno pouze na tkáních s receptory pro příslušnou navigační molekulu, kde se koncentruje¹. Dávka cíleného chemoterapeutika podaná pacientům může být tedy mnohem nižší a vedlejší účinky se tak minimalizují.

1.1. Taxol

Taxol (registrovaný název pro paclitaxel firmou Bristol-Myers Squibb Company, New York, N.Y.) byl zvolen jako výchozí látka pro syntézu derivátů pro svoji jedinečnost působení a pro předchozí zkušenost se syntézami derivátů této látky.



Obr. 1. Chemická struktura taxolu

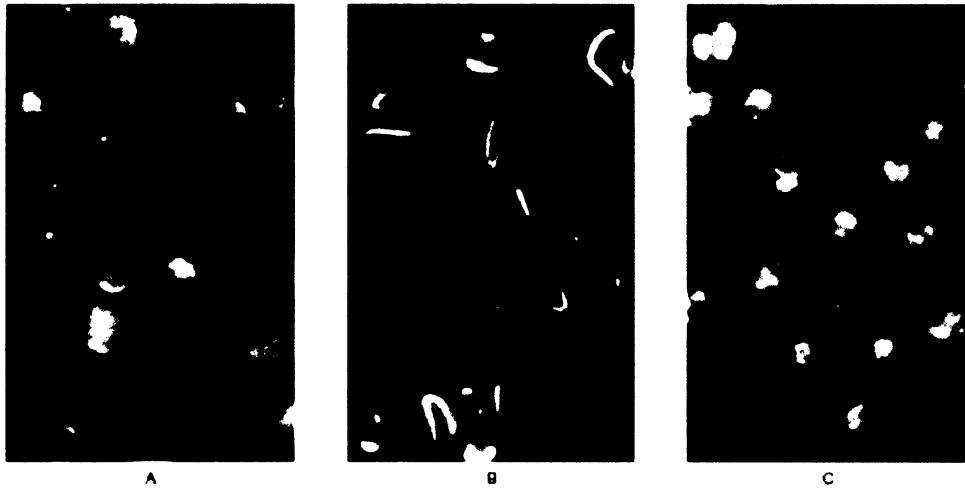
1.1.1. Vlastnosti taxolu

Taxol je diterpenoid se sumárním vzorcem $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ($M_r = 853$). Jeho struktura byla objasněna v roce 1971 (Obr. 1, str. 8)². Je to bílá krystalická látka, vysoce lipofilní, nerozpustná ve vodě a s bodem tání při 216-217°C³. Průměrný poločas rozpadu v lidském těle byl stanoven na 5 hodin⁴. Taxol je v organismu metabolizován především v játrech, enzymy cytochromu P450 a pouze méně než 10 % taxolu vychází z těla v nezměněné formě⁵. Více než 90 % látky se rychle váže na proteiny krevní plazmy⁶. Nejvyšší koncentrace taxolu po 6-hodinové infuzi byla nalezena v plicích, játrech, ledvinách a slezině⁷. Taxol je nerozpustný ve vodě, ale je rozpustný v organických rozpouštědlech jako jsou například dimethylsulfoxid, dimethylformamid, dichlormethan, acetonitril⁸. V molekule taxolu jsou z hlediska derivatizace důležité tři hydroxylové skupiny v poloze 1, 7 a 2⁹.

1.1.2. Mechanismus působení taxolu

Taxol zasahuje do G₂ a M fáze buněčného cyklu. V těchto fázích dochází k rozdělování chromozomů do dceřinných buněk. Přesun chromozomů je uskutečněn za pomoci mitotického vřeténka¹⁰⁻¹³. Mitotické vřeténko je tvořeno mikrotubulinem, přesněji z jeho α a β podjednotek. Taxol se váže na 31. aminokyselinu od N-konce β -tubulinové podjednotky mikrotubulu, tím zabraňuje jeho zpětné depolymerizaci a způsobuje inhibici dělení¹⁴⁻²². Dochází k tvorbě velice stabilní formace shluků mikrotubulů ve formě „hvězd“ (Obr. 2, str. 10)^{23,24}. Tento efekt způsobuje již menší než nanomolární koncentrace taxolu.

Taxol je také induktorem exprese genu buněčné smrti p53. Tento vliv ale není spojen se shlukováním mikrotubulů, tedy se strukturální vlastností taxolu, ale vychází ze zvýšené produkce cytokinů zasažené buňky²⁵⁻²⁷.



Obr. 2. Shlukování mikrotubulů v přítomnosti taxolu

V buňkách taxol indukuje shlukování mikrotubulů A) neléčené buňky K562 (leukemické buňky) B) taxolem léčené buňky HL-60 (lidské promyelocytické buňky leukémie) C) taxolem léčené K562 buňky²³

Léčba taxolem bývá často kombinována s ozařováním, které zvyšuje efektivitu léčby. Tohoto spojení bývá využito k léčbě pacientů s lokálními pokročilými nádory plic, hlavy, hrdla, jícnu, neboť jsou citlivé na tento způsob léčby. Různé kombinace léčby jsou stále zkoumány²⁸⁻³⁰.

1.1.3. Protirakovinná aktivita taxolu

Taxol vykazuje aktivitu proti mnoha druhům rakoviny. Mezi ty nejvýznamnější patří:

1.1.3.1. Rakovina vaječníků

Taxol byl poprvé schválen organizací Food and Drug Administration v roce 1992 pro léčbu žen s rakovinou vaječníků na základě pozitivních výsledků z pokusu 21 hodinové infuze taxolu³¹⁻³⁵. Tyto výsledky daly popud k druhé fázi klinických zkoušek. V první studii se u 30 % žen předběžně potvrdila protinádorová aktivita. Došlo k redukcí nemoci o více jak 50 %³². Odpovídající léčba trvala 1-15 měsíců s průměrem 6 měsíců. 24 % žen je považováno za rezistentní vůči používané léčbě založené na platině, a právě v těchto případech je taxol velmi důležitý^{33,34}.

1.1.3.2. Rakovina prsu

Značnou protinádorovou aktivitu taxol projevila u žen s metastázemi v prsu^{36,37}. 25 žen, které měly diagnostikovanou rakovinu prsu s metastázemi, obdrželo jednu dávku taxolu. U 13 z nich měla léčba pozitivní výsledek. Střední doba, za kterou se nemoc zastavila, byla 9 měsíců³⁶. Průkazná zkouška, při které byl ženám aplikován taxol v dávce 250 mg na m² povrchu těla spolu s granulocyty stimulujícím faktorem, byla pozitivní v 62 % případů³⁷. Taxol má srovnatelné výsledky v léčbě s cytostatikem anthracyklinem, které náleží k nejúčinnějším lékům v léčbě rakoviny prsu^{38,39}.

1.1.3.3. Rakovina plic

Taxol se také osvědčil při léčbě rakoviny plic. Při jedné studii mělo 24 % pacientů pozitivní odezvu na léčbu. Průměrná doba léčby trvala 27 týdnů. Byly také provedeny testy, při kterých byl taxol kombinován s jinými chemoterapeutiky^{40,41}.

1.1.3.4. Rakovina v oblasti hlavy a krku

Jedná se o rakovinu, která se vyskytuje v oblasti hlavy a krku, přesněji v dutině nosní, na rtech, v ústech, slinných žlázách, jícnu a hrtanu. Taxol byl v tomto případě použit s vysokou úspěšností v kombinaci s granulocyty stimulujícím faktorem u pacientů s lokálními a navracejícími se nádory⁴².

1.1.3.5. Jiné druhy rakoviny

U jiných druhů nádorů, jako prostaty, konečníku, ledvin, pankreatu a žaludku, byla odpověď na taxol negativní⁴³⁻⁴⁷. Na druhé straně výrazná odezva na léčbu v kombinaci s granulocyty stimulujícím faktorem se objevila u pacientů s rakovinou varlat, močového měchýře a jícnu. Zajímavé je, že je taxol aktivní u rakoviny jícnu, ale u nádorů gastrointestinálního traktu žádnou aktivitu nevykazuje⁴⁸⁻⁵⁰.

1.1.4. Toxicita

Ačkoli je taxol účinný proti mnoha druhům rakoviny, jeho klinické využití je limitované vedlejšími účinky a také malou rozpustností ve vodném prostředí. Taxol se pacientům aplikuje pro svoji hydrofóbnost rozpuštěný v emulzi Cremorphoru a ethanolu, která je důvodem mnoha vedlejších účinků. Mezi ty nejvýznamnější vedlejší účinky taxolu patří:

1.1.4.1. Hypersensitivita

Hypersensitivita je závažným a častým problémem. U většiny pacientů, kterým je taxol aplikován, se hypersensitivita projevuje dušností, kopřivkou a nízkým tlakem⁵¹. Hypersensitivní reakce se projeví během prvních 10 minut po podání léku, a to především při první nebo druhé aplikované dávce. Bylo zaznamenáno jedno úmrtí způsobené přecitlivělostí. Pacienti se přerušáním aplikace taxolu navracejí do normálního zdravotního stavu. Přípravky na potlačení přecitlivělosti jsou antihistaminika a vasopresin^{52,53}. Výzkumy hned zpočátku poukázaly na to, že tato přecitlivělost může být způsobena buď taxolem nebo doprovodnou emulzí Cremophor/Ethanol. Z pokusů vyšlo najevo, že hypersensitivita může být způsobena touto emulzí⁵⁴. Výzkum, který byl proveden institutem The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group poukázal na to, že na přecitlivělost nemá vliv délka léčby⁵³.

1.1.4.2. Hematologická toxicita

Neutropenie, abnormální snížení počtu neutrofilních bílých krvinek v krvi, je hlavním toxickým efektem taxolu⁵⁵. Objeví se většinou osmý až desátý den po léčbě a navrácí se třináctý až dvacátýprvý den. Neutropenie se během léčby nezhoršuje, neboť taxol neničí nevratně nezralé hematopoetické buňky^{56,57}. Neutropenie je řešena podáváním cytokinů (především granulocytární kolonie stimulující faktor, G-CSF). Závažnost neutropenie je závislá na délce aplikace léku. Taxol může vzácně způsobit anémii, tzn. úbytek červených krvinek v organismu a trombocytopenii, tzn. nedostatek krevních destiček⁵⁸.

1.1.4.3. Neurotoxicita

Taxol způsobuje periferní neuropatii. Toto onemocnění nervů se projevuje poruchou hybnosti^{55,59}. Symptomy se objevují 21 až 73 hodin po započetí léčby a mohou být vyvolány vysokou dávkou taxolu nebo opakováním konvenční léčby. Dalším důvodem neurotoxicity může být předchozí léčba jinou neurotoxickou látkou, jako např. cisplatinou^{56,60,61}.

1.1.4.4. Vliv na srdce

Taxol způsobuje poruchy srdečního rytmu. Problémem je i přechodná asymptomatická bradykardie, zpomalená srdeční činnost. Byly zaznamenány případy srdeční ischemie, infarktu myokardu a srdeční arytmie⁶²⁻⁶⁴.

1.1.4.5. Další toxické efekty

Taxol ojedinele způsobuje gastrointestinální problémy, jako průjem a zvracení⁵⁵. Vysoké dávky taxolu mohou způsobit podráždění a hnisání buněk epitelu zažívacího traktu⁶⁵. Taxol jako i jiná chemoterapeutika způsobuje reverzibilní alopecii tzn. částečnou nebo úplnou ztrátu vlasů a tělesného ochlupení⁵⁵.

1.1.4.6. Rezistence

Dosud byly charakterizovány dva mechanismy rezistence vůči léčbě taxolem. První mechanismus je způsoben narušenou schopností polymerace α - a β - tubulinu v mikrotubuly⁶⁶. Druhý typ je založen na zvýšeném počtu membránových fosfoglykoproteinů, které fungují jako pumpy odvádějící léčivo. Fenotypy buněk rezistentních vůči taxolu vykazují rozličný stupeň rezistence k jiným druhům přírodních cytostatik^{67,68}.

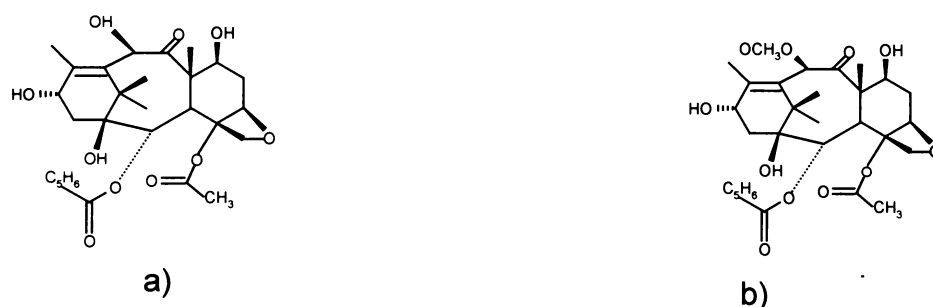
1.1.5. Zdroje taxolu

Tis (Obr. 3, str. 14) obsahuje široké spektrum biologicky aktivních složek. Kůra z tisů jako součást receptisů je známa již z doby Williama Shakespeara⁶⁹. Dnes je zájem upřen především na taxol - nové cytostatikum, které bylo objeveno v kůře pacifického tisu *Taxus brevifolia*.



Obr. 3. Tis červený *Taxus baccata*

Taxol je úspěšně používán při léčbě rakoviny vaječníků a prsu i v pokročilém stádiu nemoci, proto jsou na množství taxolu vysoké nároky, avšak širší aplikace je omezena malým příspěvkem z původního přírodního zdroje, tedy z kůry tisu. Pouze 100-170 mg taxolu může být izolováno z 1 kg kůry. Komplikací je i to, že tis roste velmi pomalu. Ke svému plnému vzrůstu potřebuje asi 200 let. Na 1 kg taxolu by muselo být poraženo okolo 1000 stromů. Na léčbu 1 pacienta s rakovinou je nutné množství nejméně 3 g. Avšak pouze v USA umírá každý rok 50 000 pacientek na rakovinu vaječniku a prsu, z tohoto důvodu bylo nutné hledat nové zdroje taxolu^{69,70}. Jednou z alternativních cest, která zachovává přírodní zdroje, je semisyntéza taxolu a příbuzných taxoidů. Základem této syntézy jsou látky 10-deacetylbaaccatin III a baaccatin III (Obr. 4, str. 15), které jsou izolovatelné z jehličí různých druhů tisů např. *Taxus baccata*. Jehličí je obnovitelný zdroj, při kterém nejsou stromy nenávratně zničeny. Taxol vzniká připojením synteticky připraveného postraního řetězce na tyto látky⁷⁰. Taxol byl také připraven mnoha totálními syntézami, které však nejsou vhodné pro komerční využití. Jedním z nejznámějších přístupů je syntéza provedená Wederem tzv. cesta pinenu⁷¹. Dalším způsobem získání taxolu je jeho produkce endofytickými houbami jako např. *Taxomyces andreanae*⁷², *Fusarium*, *Penicillium úhon* a *Alternaria alternata*^{72,73}, které rostou na pacifickém tisu. Tyto organismy se pravděpodobně „naučily“ biosyntéze transformací genů. Dalším způsobem je získávání taxolu produkcí tkáňovými kulturami. Výzkum biosyntézy taxolu přírodní cestou je důležitý pro optimalizaci cest *in vitro*⁷⁴.



Obr. 4. a) 10-deacetyl baccatin III., b) baccatin III.

1.2. Cílené deriváty taxolu

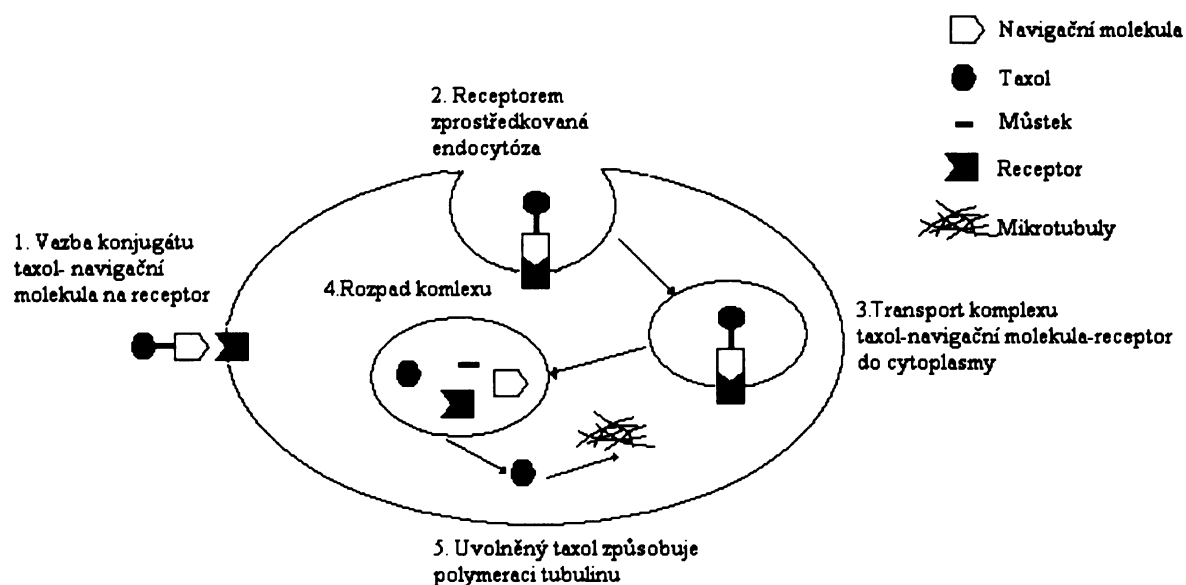
Cílené deriváty taxolu jsou složeny ze tří částí : cytostatikum taxol, můstek a navigační molekula (Obr. 5).



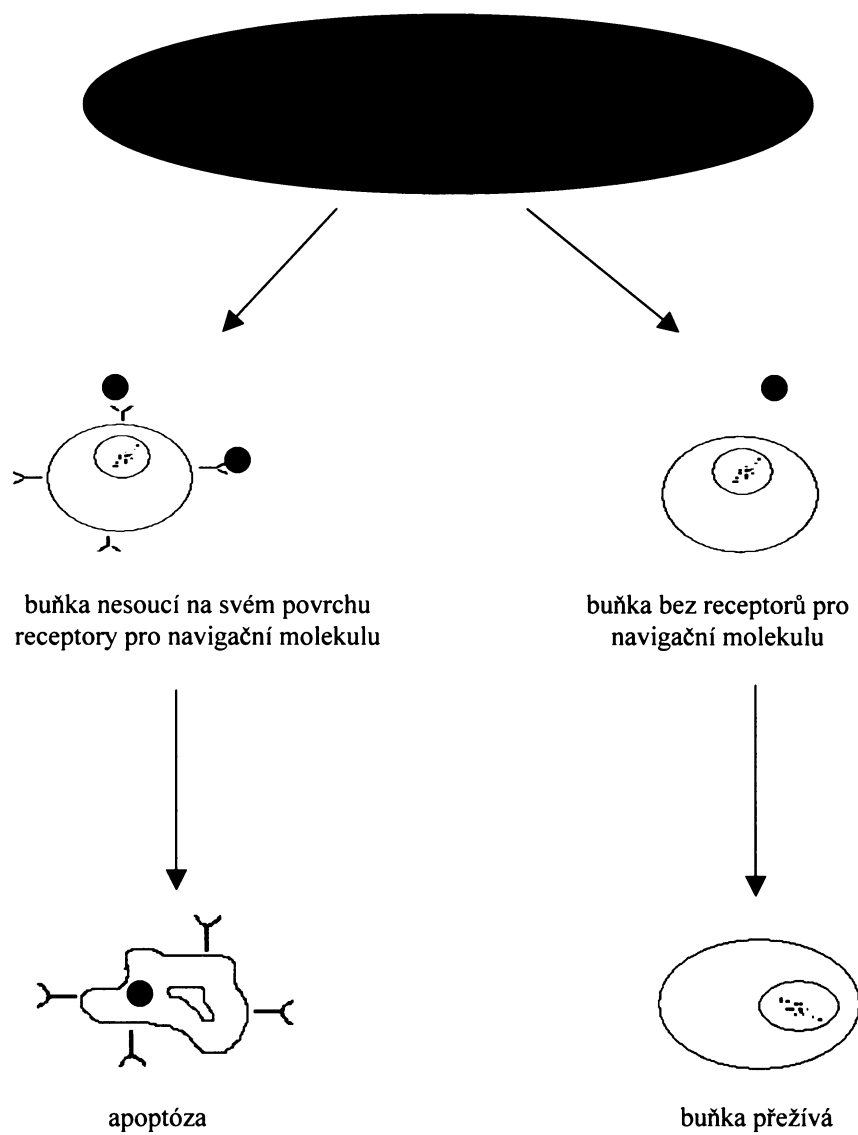
Obr. 5. Struktura cíleného derivátu cytostatika

Důležitou roli v tomto komplexu hraje navigační molekula. Tou je látka, která má své receptory v určitých tkáních ve vyšší koncentraci než na ostatních buňkách. Rakovinné buňky se v mnohém liší od buněk zdravých. Jedním z výrazných rozdílů je exprese receptorů pro některé druhy hormonů. Mezi tyto hormony patří peptidický hormon somatostatin. Byl připraven cílený derivát taxolu s derivátem tohoto hormonu-octreotidem¹. Výsledky provedených testů na buněčných kulturách potvrdily myšlenku působení cíleného chemoterapeutika. U buněk s expresí receptorů pro somatostatin byla cytostatická aktivita pro taxol shodná s aktivitou pro konjugát taxol-octreotid. Buněčná smrt měla stejný průběh u obou látek, ale odlišný byl vstup těchto látek do buňky. Taxol prochází buněčnou stěnou vzhledem ke své hydrofóbnosti pasivní difuzí⁷⁵. Konjugát taxol-octreotid je navázán na receptor pro somatostatin. Komplex (taxol-octreotid-receptor) je vtažen do buňky endocytózou (Obr. 6). Průběh rozpadu komplexu není přesně znám. Předpokládá se, že se komplex rozpadá v endozómu a do cytosolu vstupuje již volný taxol.

Konjugát taxol-octreotid vykazoval vysokou cytostatickou aktivitu u buněk s výraznou expresí receptorů pro somatostatin, zatímco u buněk s nízkou expresí receptorů byla aktivita minimální (Obr. 7, str. 17). Touto selektivitou by se dosáhlo minimalizace zásahu do růstu zdravých buněk a tím i minimalizace nežádoucích vedlejších účinků¹.



Obr. 6. Transport konjugátu taxol-navigační molekula do buňky



Obr. 7. Schéma působení cíleného derivátu

Y - receptor navigační molekuly

● - komplex cytostatikum-mústek-navigační molekula

1.3. Můstek

Můstek hraje u cílených derivátů cytostatik velmi důležitou roli. Jak molekula taxolu, tak molekula hormonu jsou veliké a není možné přímé propojení. Můstek tedy řeší sterické problémy. Důležitou roli hrají jednotlivé vazby spojující můstek s biologicky aktivní látkou na jedné straně a s taxolem na straně druhé. Vazba s taxolem by měla být stabilní pro transport krevním řečištěm k danému orgánu a štěpitelná po vstupu do buňky.

1.4. Navigační molekuly

Navigační molekuly mají v komplexu cíleného derivátu cytostatika transportní roli. Dopravují taxol na specifické místo jeho působení, v němž jsou přítomné receptory zvolené navigační molekuly. V našem případě byly zvoleny dva peptidové hormony: GnRH a Carbetocin

1.4.1. GnRH

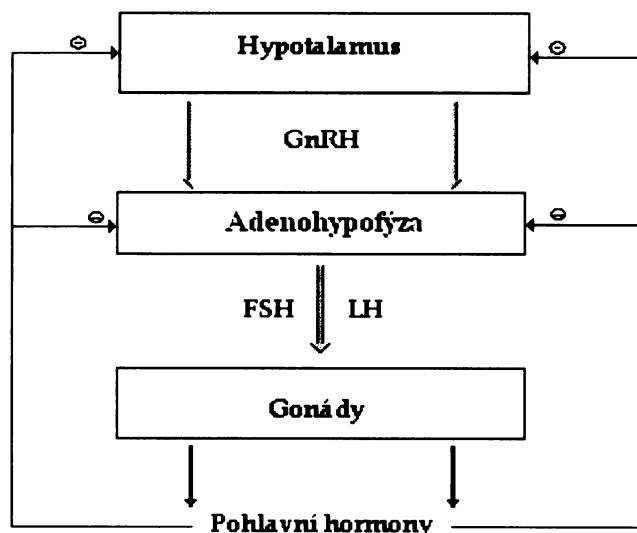
GnRH (Gonadotropin releasing hormone) je hypotalamický faktor, který zprostředkovává reprodukční schopnost. Uvolněné GnRH z hypotalamu působí na receptory v předním laloku hypofýzy, z nichž je signál veden do jádra buňky kde spouští proteosyntézu gonadotropních hormonů - luteinizačního hormonu (LH) a folikul stimulujícího hormonu (FSH) (Obr. 9, str. 19). LH a FSH poté stimulují syntézu pohlavních steroidních hormonů a gametogenezi v gonádách⁷⁶. GnRH je vylučováno pulzativně⁷⁷.

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂

Obr. 8. Struktura savčího GnRH

Agonisté GnRH jsou deriváty přírodního dekaeptidu se specifickými substitucemi aminokyselin. Působí jako GnRH, ale mají mnohem delší poločas rozpadu. Zpočátku jejich aplikace způsobuje vzrůst sekrece FSH a LH, avšak po 10 dnech dochází k velmi silnému poklesu koncentrace těchto hormonů a tedy i pohlavních hormonů⁷⁸. Tohoto jevu je využíváno v léčbě hormonálně dependentních nádorů, která je založena na potlačení produkce pohlavních hormonů. Pohlavní hormony řídí vývoj, růst, funkce i zánik buňky tím, že aktivují protoonkogeny. Ty produkují růstové faktory, jež mají rozhodující vliv na

funkci i reprodukci buněk. Proto je cílem léčby potlačení produkce androgenů a tím růstu buněk⁷⁹.



Obr. 9. Hypotalamo-adenohypofýzo-gonadální osa

Systém uvolňování hormonu GnRH z hypotalamu, FSH a LH z adenohypofýzy, steroidních hormonů z gonád. Zpětné ovlivňování adenohypofýzy a hypotalamu steroidními hormony.

Další využití mají GnRH agonisté při léčbě endometriózy (ložiska tkáně podobné děložní sliznici nacházející se na neobvyklých místech), adenomyózy (nález endometria ve stěně dělohy) a u děložního nádoru⁸⁰. GnRH a jeho receptory se nacházejí kromě hypofýzy i v prsních tkáních, ve vaječnicích, na děložní sliznici, placentě a prostatě. To značí, že jejich vliv se uplatňuje i v periferní oblasti. U lidské centrální nervové soustavy byly identifikovány dvě isoformy, GnRH-I a GnRH-II. GnRH-I je hypotalamický peptid odpovědný za sekreci LH a FSH přední hypofýzou⁸¹. GnRH-II byl původně objeven jako kuřecí hormon II. a nachází se rozptýlený ve většině tkání⁸². Geny pro lidské GnRH-I a GnRH-II jsou na osmém a dvacátém chromosomu^{83,84}. Obě isoformy GnRH jsou decapeptidy pro které je charakteristická postranlační modifikace zahrnující pyroglutamovou kyselinu na N-konci a amid glycinu na C-konci⁸⁴ (Obr. 8, str. 18). GnRH-I je syntetizován jako preprohormon, který u lidí obsahuje 92 aminokyselin. Prvních 23 aminokyselin představuje signální peptid, následuje vlastní decapeptid, dále tři aminokyseliny jako místo štěpení a dalších 56 aminokyselin představuje látku známou jako „GnRH associated peptid“ (GAP). Postranlační procesy zahrnují štěpení prohormonu konvertázou, odstranění bazických aminokyselin karboxypeptidasou, modifikace N-konce

glutamylcyklasou a modifikace C-konce peptidylglycin- α -amidmonooxidasou⁸⁴. Tyto enzymatické procesy dokončují podobu GnRH. Fyziologická role GAP ještě nebyla jednoznačně určena, ale je předpokládáno, že pracuje jako inhibitor syntézy prolaktinu⁸⁵.

U lidí je v hypotalamu 1500-2000 neuronů vytvářejících GnRH, které jsou rozptýlené v neuronové síti⁸³. „Generátor“ způsobující pulzatilní charakter vylučování GnRH se nachází v neuronových buňkách⁸⁴. Během lidského vývoje je GnRH generátor a následné uvolňování gonadotropinu aktivní už v brzkém věku, ale klesá během 3-4 roku života⁸³. Až do puberty je generátor GnRH potlačen. Přesný mechanismus represe není znám. Ani mechanismus aktivace generátoru během puberty není prozkoumán⁸⁵. Savci, včetně lidí, produkují dvě isoformy GnRH receptorů, GnRHR-I a GnRHR-II. Obě isoformy hormonu představují chemické posly, kteří zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Regulace buněčných a nukleárních funkcí těmito hormony začíná aktivací receptorů na povrchu buňky. GnRH receptory mají dvě hlavní komponenty: doménu vázající hormon, která zajišťuje specifitu vazby a efektorovou doménu, která zahajuje vznik biologické odpovědi po vazbě hormonu. Aktivovaný receptor vstupuje do reakce s dalšími buněčnými komponentami a spouští tím signální transdukční proces. GnRH se váže na receptory spojené s G-proteinem, čímž aktivuje membránovou fosfolipasu C (PLC). Aktivace tohoto enzymu vede ke štěpení fosfatidilinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) za vzniku diacylglycerolů (DAG) a D-myoinositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃). IP₃ reguluje přesuny intracelulárních Ca²⁺ iontů vazbou na IP-receptor na endoplasmatickém retikulu, což stimuluje uvolnění Ca²⁺ iontů z endoplasmatického retikula do cytoplasmy. Zde se Ca²⁺ ionty váží na kalmodulin a tento komplex za přítomnosti cAMP aktivuje proteinkinasu A vazbou na její regulační podjednotku. DAG se váže na proteinkinasu C (PKC) a tím ji aktivuje. Aktivace proteinkinas katalyzuje fosforylaci dalších proteinů (např. komponenty signální dráhy) uvnitř buňky⁸⁶. Aktivovaná proteinkinasa C aktivuje MAPK (mitogen-activated proteinkinase)⁸⁷. Signál MAPK prostupuje až do jádra, kde aktivuje množství transkripčních faktorů ke genové expresi. Tyto cesty dále pokračují v různé regulaci syntézy a sekreci gonadotropních hormonů z buněk přední hypofýzy. Další signalizace vede přes adenylátcyklasou, která pomocí cAMP aktivuje další kinasy⁸⁸.

Dalším efektem GnRH receptorů v aktivaci vnitrobuněčné signalizace je spolupráce s receptory růstového hormonu epidermálního původu (EGFR). Tato aktivace je založena na proteolytickém uvolňování „EGF-like“ ligandů z transmembránových prekurzorů. Receptory růstového hormonu epidermálního původu hrají důležitou roli v rakovinném bujení⁸⁸⁻⁹⁰.

GnRH receptory vykazují anomální expresi u hormonálně citlivých nádorových buněk. Tyto receptory mají stejně vysokou afinitu k GnRH jako receptory hypofyzárních buněk⁹¹. Buňky s produkcí GnRH receptorů byly přítomny u rakoviny prsu, prostaty, endometria, vaječníků, pankreatu a u maligního nádoru jater⁹². Analýza prokázala, že sekvence GnRH receptorů u těchto rakovinných buněk jsou totožné se sekvencemi receptorů u hypofyzárních buněk⁹³.

GnRH se také začalo používat ve spojení s cytotoxickými látkami pro dosažení cílené dopravy cytostatika k určitým tkáním. Pro dosažení skutečné specifity dopravy léku na dané místo je nutné, aby tyto cílené buňky měly významně vyšší počet funkčních receptorů pro GnRH než ostatní buňky. GnRH bylo použito ve spojení s cytotoxickým exotocinem *Pseudomonas* (PE) u léčby adenokarcinomu (zhoubný nádor žláz) a difterickým toxoidem u nádoru prostaty⁹⁴.

V dnešní době nachází GnRH a jeho deriváty vysoké využití v oblasti medicíny a zájem je zaostřen zejména na oblast léčby rakoviny, speciálně na oblast cílené terapie.

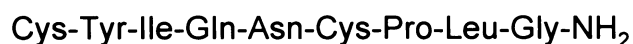
1.4.2. Carbetocin, derivát oxytocinu

Oxytocin je peptid produkovaný v hypotalamu a vylučovaný do krve v zadním laloku hypofýzy. U všech obratlovců napomáhá reprodukci. Je to nanopeptid, který obsahuje disulfidický můstek mezi prvním a šestým cysteinem. Oxytocin je do oběhu uvolňován na základě mnoha podnětů, mezi něž patří např. kojení, porod nebo určitý druh stresu. Syntéza oxytocinu probíhá kromě hypotalamu také v periferních tkáních např. v děloze, placentě, vnitřní plodové bláně, žlutém tělísku, varlatech a srdci⁹⁵.

Oxytocinové receptory jsou spojeny s G proteiny, kterými jsou aktivovány fosfolipázy C. Ke své funkci receptory vyžadují přítomnost Mg^{2+} iontů a cholesterolu, ty pravděpodobně působí jako alosterické modulátory. Klasickou funkcí oxytocinu je stimulace hladkých svalů dělohy během porodu a ejekce mléka během kojení. Oxytocin hraje také důležitou roli v mnoha dalších funkcích spojených s reprodukcí, jako je např.

kontrola délky estrogenního cyklu, vývoj žlutého tělíska uvnitř prasklého Graafova folikulu a steroidogeneze ve vaječnících. Oxytocinové receptory byly identifikovány kromě prsou a dělohy i v tkáni ledvin, brzlíku a pankreatu. Neméně důležitou roli hraje oxytocin při modulaci chování jedinců spojeného s reprodukcí a péčí o potomstvo. Je mocným antistresovým faktorem, který pomáhá při párování⁹⁵.

U připravovaných derivátů nebyl jako navigační molekula použit vlastní oxytocin (Obr. 10), ale jeho syntetický derivát Carbetocin (Obr. 11). Ten se od oxytocinu liší přítomností methylu na hydroxylové skupině tyrosinu⁹⁶. Další změnou je záměna síry u disulfidického můstku methylenovou skupinou, tzv. karba deriváty^{97,98}. Modifikace struktury peptidu neproteinogenními aminokyselinami vedou ke zpomalení enzymatického štěpení a tedy k získání látek s protražovanou biologickou aktivitou. Carbetocin je látkou hormonální povahy stimulující tonus a kontraktilitu dělohy. Používán je stejně jako oxytocin v terapii a profylaxi gynekologických poruch, jako jsou slabé kontrakce dělohy, protražované porody, vyprázdnění patologického obsahu dělohy nebo pro vybavení reflexu ejekce mléka⁹⁹.



Obr. 10. Oxytocin



Obr. 11. Carbetocin

1.5. Metody syntézy derivátů taxolu

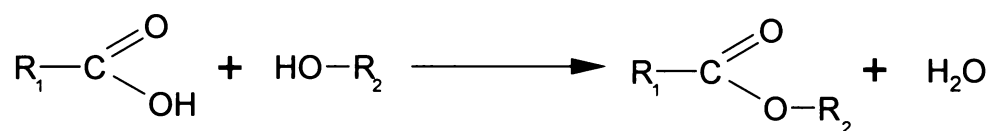
1.5.1. Příprava navigační molekuly

K úpravě Carbetocinu na vhodnou formu s volným karboxylem, který je možné využít k vazbě na OH nebo NH₂ skupinu můstku, byl využit chymotrypsin. Ten byl zvolen na základě studií, které byly prováděny dříve¹⁰⁰.

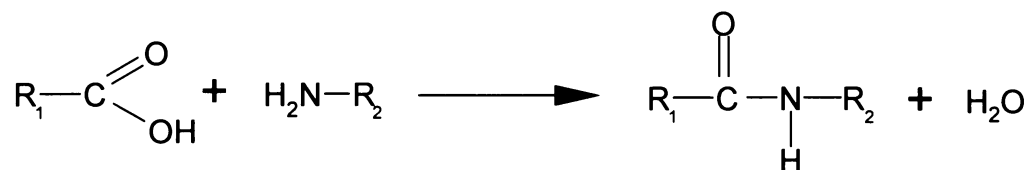
Chymotrypsin u oxytocinu specificky štěpí vazbu mezi leucinem a glycinamidem. U Carbetocinu nedochází ke štěpení vazby mezi tyrosinem a isoleucinem v důsledku methylace hydroxyly tyrosinu¹⁰⁰.

1.5.2. Kondenzační činidla

Syntézy byly založeny na vytváření esterových a amidových vazeb(Obr. 12, 13).



Obr. 12. Vznik esterové vazby
R₁, R₂ - alkyl

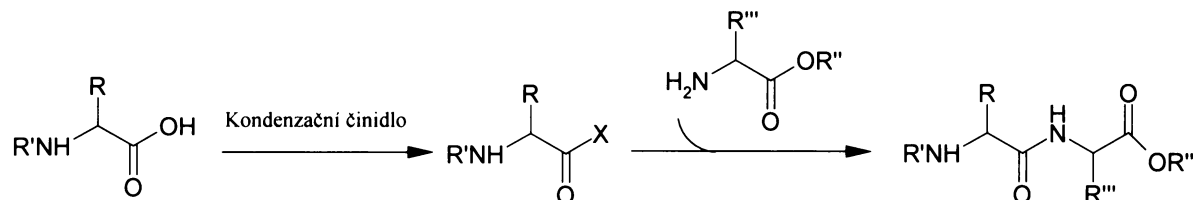


Obr. 13. Vznik amidové vazby
R₁, R₂ - alkyl

Byla použita klasická peptidová kondenzační činidla, která mají funkci aktivátorů karboxylových skupin. Tato aktivace je nezbytná a je počátečním krokem každé syntézy. V dnešní době existuje mnoho druhů kondenzačních činidel. Dělí se podle struktury na karbodiimidy, fosfoniové soli, aminiové soli, deriváty kyseliny fosforité, fosforečné a další¹⁰¹.

1.5.2.1. Průběh kondenzačních reakcí

Vytvoření amidové a esterové vazby je založeno na nukleofilní reakci aktivované karboxylové skupiny s aminem nebo alkoholem¹⁰¹. Tudiž prvním krokem při formaci těchto vazeb je aktivace karboxylové skupiny (Obr. 14).



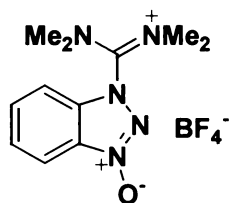
Obr. 14. Průběh tvorby peptidové vazby¹⁰¹

R' chránící skupina aminoskupiny, R'' chránící skupina karboxyskupiny, R''' postranní řetězec aminokyseliny, X aktivační skupina.

1.5.2.2. Použitá kondenzační činidla

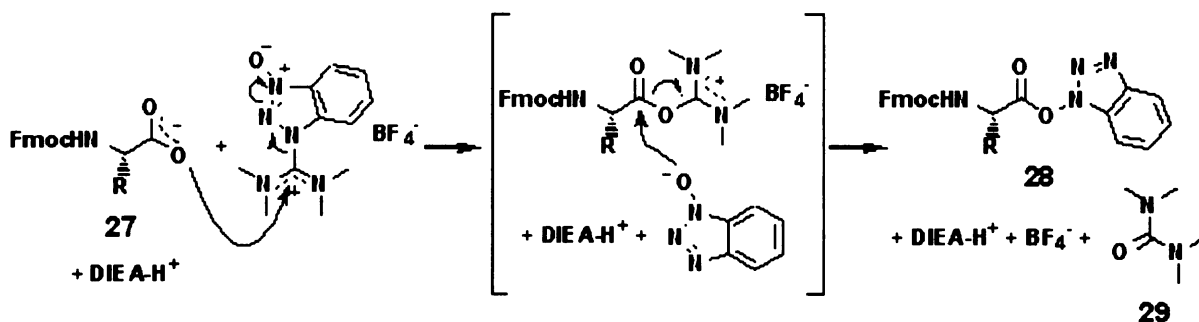
TBTU

N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium tetrafluoroborát N-oxid



Obr. 15. Vzorec TBTU¹⁰¹

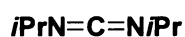
TBTU patří do skupiny aminiových solí (Obr. 15). K reakci je nezbytná báze např. N,N-diisopropylethylamin (DIEA), která aktivuje karboxyskupinu na formu aniontu a neutralizuje kyselé prostředí vznikající během reakce. Vhodným rozpouštědlem je dimethylformamid nebo dichlormethan¹⁰². Reakční mechanismus aktivace karboxylové skupiny je znázorněn na Obr. 16, str. 25.



Obr. 16. Reakční mechanismus aktivace karboxylové skupiny pomocí TBTU¹¹⁰

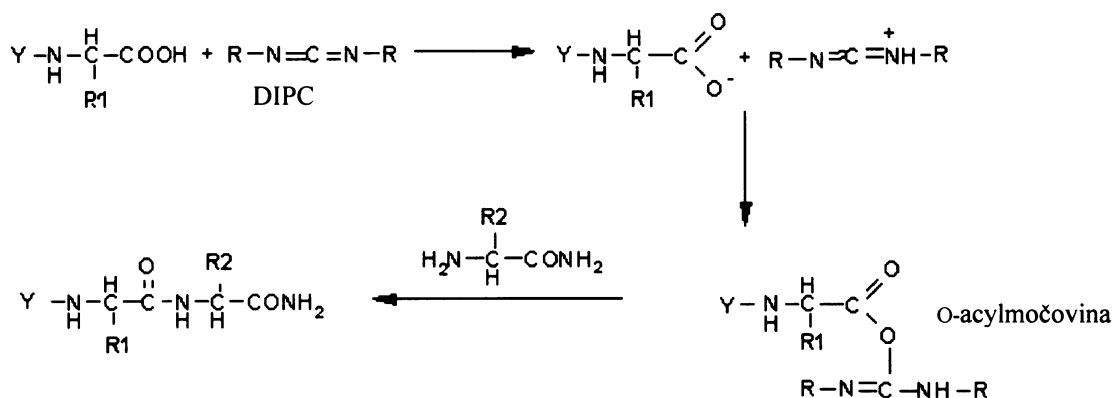
DIPC

N,N'-Diisopropylkarbodiimid (Obr. 17)



Obr. 17. Vzorec DIPC¹⁰¹

Aktivační mechanismus karbodiimidů (Obr. 18) není zcela známý¹⁰²⁻¹⁰⁹. První krok zahrnuje přenos protonu z karboxylové skupiny na kondenzační činidlo, následovaný adicí karboxylové skupiny na formu O-acylmočoviny. Tento intermediát je vysoce reaktivní a atakuje aminoskupinu pro vytvoření žádaného amidu¹⁰³.

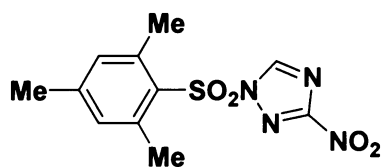


Obr. 18. Aktivační mechanismus DIPC¹⁰¹

R1, R2-postranní řetězce aminokyselin, Y-chránící skupina, R-isopropyl

MSNT

1-(Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol



Obr. 19. Vzorec MSNT¹⁰⁶

Kondenzační činidlo MSNT není vzhledem ke své struktuře (Obr. 19) zařazeno do žádné ze základních skupin. Je aktivátorem karboxylové skupiny, jehož mechanismus nebyl ještě dostatečně prostudován¹⁰¹.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla příprava derivátů taxolu, se zaměřením na syntézu cílených derivátů tohoto cytostatika. Syntéza zahrnovala tyto kroky:

1. Syntéza taxolového derivátu : můstek-taxol
2. Úprava navigační molekuly
3. Syntéza cíleného derivátu taxolu : navigační molekula-můstek-taxol

2. Materiál a metody

(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol - Fluka, Buchs, Švýcarsko

1-Methylimidazol - Sigma, St. Luis, USA

Acetonitril - Scharlau Chemie, Španělsko

Benzylpenicilin - VÚAB, ČR

Boc-Gly-OH - Sigma, St. Luis, USA

Carbetocin - PolyPeptide Laboratories, Dánsko

Dichlormethan (CH_2Cl_2) a methanol - servisní laboratoře ÚOCHB, ČR

Diisopropylkarbodiimid - Fluka, Buchs, Švýcarsko

Dimethylaminopyridin - Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

Ethylester kyseliny octové - Lach-Ner, ČR

Hydroxid sodný - Lach-Ner, ČR

Kyselina octová - Lach-Ner, ČR

N,N-Diisopropylethylamin - Fluka, Buchs, Švýcarsko

N-[(1H-Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]-N-methylmethanaminium

tetrafluoroborát N-oxid - Sigma, St. Luis, USA

N-Chloracetylglycin - Sigma, St. Luis, USA

p-Dimethylaminobenzaldehyd - Sigma, St. Luis, USA

Penicilinacylasa - MBÚ, AV ČR

Phac-Ala-OH - Vidia, ČR

Phac-Gly-OH - Vidia, ČR

Taxol - Hauser INC., Denver, USA

Taxol-sukcinát - připraveno Mgr. Marcelou Dvořákovou

Triethylenglykol - Aldrich, Milwaukee, USA

Trifluorooctová kyselina - Sigma, St. Luis, USA

α -Chymotrypsin - Sigma, St. Luis, USA

2.1. Syntéza 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu

Sukcinyltaxol (5 mg, 0,01 mmol) a kondenzační činidlo TBTU (5 mg, 0,02 mmol) byly rozpuštěny v 1 ml DMF. Poté byla přidána báze DIEA (4 μ l, 0,02 mmol). Směs byla míchána při laboratorní teplotě 10 minut. Nakonec byl do směsi přidán 2-ethylhexylamin (4 μ l, 0,02 mmol). Směs byla míchána 16 hodin při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Vzorek byl zamražen a lyofilizován. Byla provedena semipreparativní HPLC konečné směsi metodou 8. Frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Frakce s očekávanou hmotností 1064,2 byla preparována v mg množství stejnou metodou. Byla změřena cytostatická aktivita této látky.

2.2. Syntéza 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxolu

Postup syntézy vycházel z modifikace postupu autorů Greenwald¹¹¹ et al. Triethylenglykol (10 μ l, 0,07 mmol) byl za laboratorní teploty rozpuštěn v 0,5 ml bezvodého dichlormethanu. Tato směs byla vychlazená na 0°C, poté byly postupně přidány kondenzační činidlo DIPC (2 μ l, 0,01 mmol), sukcinyltaxol (10 mg, 0,01 mmol) a báze DMAP (5 mg, 0,04 mmol). Směs byla míchána 16 hodin při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. HPLC analýza konečné směsi byla prováděna metodou 4. Látka byla identifikována na základě LC/MS analýzy. Frakce s očekávanou hmotností 1085,6 byla izolována semipreparativní HPLC metodou 8. Byla změřena cytostatická aktivita této látky.

2.3. Syntéza 2'-(Boc-glycyl)taxolu

Taxol (5 mg, 0,01 mmol) a MSNT (4 mg, 0,02 mmol) byly rozpuštěny v 1 ml dichlormethanu. Poté byly přidány Boc-Gly-OH (2,6 mg, 0,01 mmol) a báze MeI (4 μ l, 0,05 mmol). Směs byla míchána za laboratorní teploty 18 hodin. Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Reakce byla zastavena odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Jednotlivé frakce po skončení reakce byly izolovány na semipreparativní koloně HPLC metodou 8, a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Látka s očekávanou hmotností 1010,1 byla izolována HPLC metodou 8.

2.4. Syntéza 2'-(Phac-glycyl)taxolu

Taxol (5 mg, 0,01 mmol) a MSNT (9 mg, 0,03 mmol) byly rozpuštěny v 1 ml dichlormethanu. Poté byly postupně přidány Phac-Gly-OH (4 mg, 0,02 mmol) a báze MeI (8 μ l, 0,10 mmol). Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Po 60 hodinách míchání za laboratorní teploty byla reakce ukončena odpařením dichlormethanu na vakuové odparce. Byla provedena semipreparativní HPLC výsledné směsi za použití metody 8. Izolované frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Látka s očekávanou hmotností 1029,2 byla izolována semipreparativní HPLC za použití metody 9.

2.5. Syntéza 2'-(Phac-alanyl)taxolu

Taxol (5 mg, 0,01 mmol) a MSNT (9 mg, 0,03 mmol) byly rozpuštěny v 1,5 ml dichlormethanu. Poté byly postupně přidány Phac-Ala-OH (5 mg, 0,02 mmol) a báze MeI (8 μ l, 0,10 mmol). Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Po 16 hodinách míchání za laboratorní teploty byl dichlormethan odpařen na vakuové odparce. Konečná směs byla rozdělena HPLC metodou 8. Jednotlivé frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií. Látka s očekávanou hmotností 1042,2 byla izolována v mg množství na semipreparativní koloně metodou 9.

2.6. Syntéza 2'-(chloracetylglycyl)taxolu

Taxol (5 mg, 0,01 mmol) a MSNT (9 mg, 0,03 mmol) byly rozpuštěny v 1 ml dichlormethanu. Poté byly postupně přidány N-chloracetylglycin (5 mg, 0,03 mmol) a báze MeI (20 μ l, 0,25 mmol). Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 16 hodin. Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Reakce byla zastavena odpařením dichlormethanu na vakuové odparce. HPLC analýza konečné směsi byla prováděna metodou 5. Jednotlivé frakce byly izolovány semipreparativní HPLC metodou 8 a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Látka s očekávanou hmotností 986,5 byla izolována. Byla změřena cytostatická aktivita této látky.

2.7. Odštěpení chránicí skupiny Boc z NH₂ skupiny glycinu

Při syntéze derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol byla NH₂ skupina aminokyseliny chráněna Boc skupinou. Při odstraňování této chránicí skupiny bylo postupováno

1) podle autorů Mathew et al.¹¹³

Připravený derivát 2'-(Boc-glycyl)taxol byl míchán 30 minut s 1 ml 98 % kyseliny mravenčí. Reakce byla ukončena odpařením kyseliny na vakuové odparce. Ke zbytku bylo přidáno 10 ml destilované vody a pH bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí vychlazeného NaHCO₃. Poté byla provedena extrakce do dichlormethanu. Oddělená organická frakce byla sušena Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Směs byla dělena HPLC metodou 8. Jednotlivé frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií.

2) podle autorů Deutsch et al.¹¹⁴

1 ml 3 M HCl v ethylacetátu byl přidán k derivátu 2'-(Boc-glycyl)taxolu. Tato směs byla míchána 5 minut. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. K vzniklé bílé pěně bylo přidáno 5 ml destilované vody a byla provedena extrakce do dichlormethanu. Oddělená organická frakce byla odpařena na vakuové odparce. Vzniklá směs byla rozdělena HPLC. Jednotlivé frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií.

3) podle autorů Deutsch et al.¹¹⁴

1,5 ml 20 %TFA v dichlormethanu bylo přidáno k derivátu 2'-(Boc-glycyl)taxolu. Po 30 minutách míchání za laboratorní teploty byla směs dichlormethanu odpařena na vakuové odparce. Ke směsi byla přidána destilovaná voda a byla provedena extrakce do dichlormethanu. Oddělená organická frakce byla odpařena na vakuové odparce. Vzniklá směs byla rozdělena HPLC metodou 8. Jednotlivé frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií.

2.8. Odštěpení chránicí skupiny Phac z NH₂ skupiny glycinu (alaninu)

Při syntézách derivátů taxolu (Phac-alanyl)taxol a 2'-(Phac-glycyl)taxol byla NH₂ skupina aminokyseliny chráněna Phac skupinou. Při odstraňování této chránicí skupiny je využívána penicilinacylasy.

2.8.1. Stanovení aktivity penicilinacylasy

Bylo postupováno na základě osobního sdělení¹¹⁵

Princip: Enzym katalyzuje hydrolyzu benzylpenicilinu na kyselinu fenylactovou a 6-aminopenicilanovou (6-APK), jejíž stanovení se provádí spektrofotometricky po reakci s p-dimethylaminobenzaldehydem v kyselém prostředí.

Roztoky:A: 0,05 M fosfátový pufr pH 7,6

B: Roztok substrátu: 200 mg benzylpenicilinu do 10 ml A

C: Roztok p-dimethylaminobenzaldehydu v methanolu: 50 mg v 10 ml MeOH

D: acetátový pufr: 13 ml kyseliny octové, 67 mg NaOH v 87 ml H₂O, pH 2,7

E: Vlastní činidlo: 1 díl C + 6 dílů D (5 ml C + 30 ml D)

F: 10 mg penicilinacylasy v 1 ml A

Provedení: 0,9 ml B a 0,1 ml F bylo promícháno a inkubováno 15 min při 25°C. Poté bylo přidáno 7 ml činidla E a po promíchání a 10 minutách stání byla změřena extinkce při 415 nm v 1 cm kyvetě. Jako slepý pokus byla použita analogicky zpracovaná směs 1 ml B a 7ml E.

2.8.2. Stanovení rozpustnosti taxolu v prostředí methanol/voda

Při stanovení rozpustnosti taxolu v prostředí methanol/voda byla připravena řada roztoků obsahující různou procentuální koncentraci methanolu ve vodě o objemu 1 ml. Byl připraven zásobní roztok taxolu v methanolu o koncentraci 10 mg taxolu na 1 ml methanolu. Do každého roztoku bylo přidáno 100 µl tohoto roztoku. Konečná koncentrace v každém roztoku činila 1 mg na 1,1 ml roztoku MeOH/voda o dané procentuální koncentraci MeOH.

Rozpustnost byla sledována vizuálně tvorbou bílého zákalu a analýzou obsahu látky HPLC.

2.8.3. Stanovení aktivity penicilinacylasy v roztoku 68 % methanolu

Princip: uveden výše

Roztoky:A: 0,05 M fosfátový pufr pH 7,6

B: Roztok substrátu: 200mg benzylpenicilinu do 5 ml A a 5 ml MeOH

C: Roztok p-dimethylaminobenzaldehydu v methanolu: 50 mg v 10 ml MeOH

D. Acetátový pufr: 11 ml kyseliny octové, 56 mg NaOH v roztoku 67 ml MeOH a 33 ml H₂O, pH 3,6

E: Vlastní činidlo: 1 díl C + 6 dílů D (1 ml C + 6 ml D)

F: 10 mg penicilinacylasy v 1 ml A

Provedení: 225 μ l B a 25 μ l F bylo promícháno a inkubováno 15 min při 25°C. Poté bylo přidáno 1,75 ml činidla E a po promíchání a 10 minutách stání byla změřena extinkce při 415 nm v 1 cm kyvetě. Jako slepý pokus byla použita analogicky zpracovaná směs 250 μ l B a 1,75ml E.

2.8.4. Enzymatická reakce derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol s penicilinacylasou v prostředí 68 % methanolu

Roztoky:A: 0,05 M fosfátový pufr pH 7,6

B: Roztok substrátu: 0,5 mg 2'-(Phac-glycyl)taxolu do 120 μ l A a 120 μ l MeOH

C: Methanol

D. Acetátový pufr: 11 ml kyseliny octové, 56 mg NaOH v roztoku 67 ml MeOH a 33 ml H₂O

E: Vlastní činidlo: 1 díl C + 6 dílů D (1 ml C + 6 ml D)

F: 10 mg penicilinacylasy v 1 ml A

Provedení: 225 μ l B a 25 μ l F bylo promícháno a inkubováno 15 min při 25°C. Poté bylo přidáno 1,75 ml činidla E. Jako slepý vzorek byla použita analogicky zpracovaná směs 250 μ l B a 1,75ml E. Průběh reakce v závislosti na čase byl sledován HPLC (viz kapitola 3.8.1., metoda 4.). Byla provedena HPLC derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol jako standardu.

Pozn. Analogicky bylo postupováno u derivátu taxolu (Phac-alanyl)taxol

2.9. Štěpení Carbetocinu chymotrypsinem

100 mg komerčního Carbetocinu bylo rozpuštěno ve 20 ml 0,02 M Tris HCl pufru pH 7,5 a přidáno 20 mg α -chymotrypsinu rozpuštěného v 5 ml stejného pufru s přídavkem 1 mM CaCl₂. Reakce byla ponechána 20 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla směs zamrazena a lyofilizována. HPLC analýza konečné směsi byla prováděna metodou 3. Látka byla identifikována hmotnostní spektrometrií. Preparace byla prováděna semipreparativní HPLC metodou 7. Produkt DesGly(NH₂)carbetocin má volnou karboxyskupinu.

2.10. Syntéza derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH

Sukcinyltaxol (86 mg, 0,09 mmol) a TBTU (29 mg, 0,09 mmol) byly rozpuštěny v 10 ml DMF. Poté byla přidána DIEA (31 μ l, 0,18 mmol). Směs byla ponechána dvě minuty při laboratorní teplotě. Byl přidán fragment GnRH [H-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂] (59 mg, 0,09 mmol). Směs byla míchána 2,5 hodiny při laboratorní teplotě. Průběh reakce byl sledován HPLC metodou 5. Vzorek byl zamražen a lyofilizován. Byla provedena HPLC analýza konečné směsi dle metody 1. Látka byla identifikována hmotnostní spektrometrií. Frakce s očekávanou hmotností 1596,5 byla izolována HPLC metodou 6. Čistota konečného produktu byla potvrzena HPLC analýzou metodou 2. Byla provedena NMR analýza produktu. Byla změřena cytostatická aktivita této látky.

2.11. Rozpouštědla

Výběr rozpouštědel byl omezen rozpustností výchozích látek. Taxol je látkou silně hydrofóbní, která je velmi dobře rozpustná v dichlormethanu, acetonitrilu, methanolu nebo například dimethylformamidu. U cíleného derivátu byl výběr omezen tím, že peptid je naopak vysoce hydrofilní. Vhodným rozpouštědlem jak pro taxol tak i peptid se ukázal být dimethylformamid. Dichlormethan byl použit u ostatních syntéz derivátů taxolu. Reakce prováděné v prostředí dimethylformamidu byly ukončeny zamražením v tekutém dusíku a vymražením na lyofilizaci. Lyofilizace byla prováděna na přístroji LABCONCO 6 Liter (USA) po dobu 18 hodin. Při použití dichlormethanu byly reakce ukončeny odpařením rozpouštědla na vakuové odparce.

2.12. Úprava vzorků před HPLC

Vzorky byly po odstranění rozpouštědla uchovávány při teplotě -18°C. Před HPLC analýzou byly vzorky rozpuštěny v methanolu a centrifugovány na centrifuze Mini Spin Eppendorf při 12 100 x g po dobu 4 minut.

2.13. Vysokoučinná kapalinová chromatografie(HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie byla prováděna na dvou aparaturách:

První byla sestavena z detektoru firmy LabAlliance, Spektra SYSTEM UV6000LP, Thermo Finnigan (USA), čerpadla DeltaChrom Q-Grad od firmy Watrex, gradient byl nastaven pomocí jednotky Systém Control Unit a vzorky byly dávkovány autosamplermem Hewlett Packard 11000 (USA).

Druhá aparatura byla sestavena z detektoru firmy LabAlliance, Spektra SYSTEM UV6000LP, Thermo Finnigan (USA), čerpadla Q-Grad od firmy Watrex, manuálního dávkovače Rheodyne a kolonového termostatu MISTRAL SPARK

Data byla vyhodnocována softwarem EZChrom v němž je absorbance uváděna v absorpčních jednotkách přístroje [mAU] a Clarity s absorbancí vyjádřenou v jednotkách napětí [mV].

Pro analýzu byly použity tyto kolony:

- analytická kolona C18 BIOSPHER PSI 120 (250 x 4.6 mm, 7 µm)
 - PHENOMENEX Luna 5 Phenyl-Hexyl (250x4.60 mm, 5 µm)
 - PUROSPHER, C18 (5 µm)
- preparační kolona BIOSPHER Si C18 (250x10 mm, 7 µm)
 - BIOSPHER, C18 (250x22 mm, 10-15 µm)
 - BIOSPHER PSI 100 C18 (250x10 mm, 7 µm)

2.13.1. Analytická HPLC

Gradient mobilní fáze byl tvořen dvěma zásobními roztoky mobilní fáze A a B, jejichž složení je uvedeno v příslušných tabulkách.

Metoda 1.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 2 a složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce 1
Analytická kolona C18 BIOSPHER PSI 120 (250 x 4,6 mm, 7 µm)

Mobilní fáze

Tabulka 1. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H ₂ O[%]	TFA[%]
A	5	95	0,1
B	95	5	0,1

Gradient mobilní fáze

Tabulka 2. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	30	33	43	46	56
B [%]	0	90	100	100	0	0

Průtok 1 ml/min

Detekce UV 227 nm a 275 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

Metoda 2.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 4 a složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce 3
Analytická kolona PUROSPHER, C18, 5 µm.

Mobilní fáze

Tabulka 3. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H ₂ O[%]	TFA[%]
A	0	100	0,1
B	100	0	0,1

Gradient mobilní fáze

Tabulka 4. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	30	35	40	45
B [%]	0	100	100	0	0

Průtok 1 ml/min

Detekce 218 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

Metoda 3.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 6 a složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce 5

Analytická kolona C18 BIOSPHER PSI 120 (250 x 4,6 mm, 7 µm)

Mobilní fáze

Tabulka 5. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	TFA[%]
A	0	100	0,1
B	100	0	0,1

Gradient mobilní fáze

Tabulka 6. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	80	82	102	112
B [%]	30	85	100	30	30

Průtok 1,2 ml/min

Detekce UV 200 a 280 nm

Vzorek rozpuštěn v H₂O

Metoda 4.

Gradient mobilní fáze je uveden v tab. 8 (str.38) a složení mobilní fáze je uvedeno v tab. 7

Analytická kolona C18 BIOSPHER PSI 120 (250 x 4,6 mm, 7 µm)

Mobilní fáze

Tabulka 7. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	MeOH[%]
A	13	67	20
B	53	27	20

Gradient mobilní fáze

Tabulka 8. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	30	40	50	53	63
B [%]	0	90	100	100	0	0

Průtok 1 ml/min

Detekce UV 227 nm a 274 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

Metoda 5.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 10 a složení mobilní fáze je uvedeno v tabulce 9

Analytická kolona PHENOMENEX Luna 5 Phenyl-Hexyl 250x4.60 mm, 5 µm

Mobilní fáze

Tabulka 9. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	MeOH[%]
A	13	67	20
B	53	27	20

Gradient mobilní fáze

Tabulka 10. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	40	45	50	55
B [%]	30	100	100	30	30

Průtok 1 ml/min

Detekce UV 227 nm a 274 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

2.13.2. Semipreparativní HPLC

Gradient mobilní fáze byl tvořen dvěma zásobními roztoky mobilní fáze A a B, jejichž složení je uvedeno v příslušných tabulkách.

Metoda 6.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 12 a složení mobilní fáze je uvedeno v tab. 11

Semipreparativní kolona BIOSPHER, C18 (250x22 mm, 10-15 µm)

Mobilní fáze

Tabulka 11. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	TFA[%]
A	0	100	0,1
B	50	50	0,1

Gradient mobilní fáze

Tabulka 12. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	75	80	85	90
B [%]	30	85	100	30	30

Průtok 2 ml/min

Detekce UV 220 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

Metoda 7.

Gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 14 a složení mobilní fáze je uvedeno v tab. 13

Semipreparativní kolona BIOSPHER Si C18 (250x10 mm, 7 µm)

Mobilní fáze

Tabulka 13. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	TFA[%]
A	75	25	0,1
B	100	0	0,1

Gradient mobilní fáze

Tabulka 14. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	55	57	67	69	79
B [%]	0	90	100	100	0	0

Průtok 4 ml/min

Detekce UV 220 a 280 nm

Vzorek rozpuštěn v H₂O

Metoda 8.

Gradient mobilní fáze je uveden v tab. 16 a složení mobilní fáze je uvedeno v tab. 15

Semipreparativní kolona BIOSPHER Si C18 (250x10 mm, 7 μm)

Mobilní fáze

Tabulka 15. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	MeOH
A	13	67	20
B	53	27	20

Gradient mobilní fáze

Tabulka 16. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	30	40	50	53	63
B [%]	0	90	100	100	0	0

Průtok 2 ml/min

Detekce UV 227 nm a 274 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

Metoda 9.

Gradient mobilní fáze je uveden v tab. 18 a složení mobilní fáze je uvedeno v tab. 17

Semipreparativní kolona BIOSPHER PSI 100 C18 (25x10 mm, 7 μm)

Mobilní fáze

Tabulka 17. Složení mobilní fáze

	ACN [%]	H₂O[%]	MeOH
A	13	67	20
B	53	27	20

Gradient mobilní fáze

Tabulka 18. Gradient mobilní fáze

čas (min)	0	60	80	83	93
B [%]	0	100	100	0	0

Průtok 2,5 ml/min

Detekce UV 227 nm a 274 nm

Vzorek rozpuštěn v MeOH

2.14. Hmotnostní spektroskopie

Hmotnostní spektra byla měřena v Centrální laboratoři hmotové spektroskopie ÚOCHB AV ČR

Vzorky byly měřeny na spektrometru LCQ classic za použití ionizace elektrosprejem (ESI+). LCQ byl vybaven analyzátozem typu iontová past. Přístroj měřil v rozsahu 50-2000 Da s jednotkovým rozlišením („low resolution“). Hlavním signálem ve spektrech byl molekulární adukt $(M+H)^+$ nebo $(M+Na)^+$, fragmentace byla většinou minimální.

2.14.1. MS analýza izolovaných vzorků

Tato metoda využívala přímého nástřiku jednotlivých izolovaných frakcí. Na základě těchto hmotnostních spekter bylo rozhodnuto, která frakce je žádaným produktem.

2.14.2. LC/MS analýza

Tato metoda byla využívána v případě, že směs na konci reakce obsahovala mnoho látek a tudíž by izolace jednotlivých frakcí byla náročná. Tato analýza je spojením HPLC a hmotnostního spektrometru. Vzorek je dělen na koloně a výstup z HPLC je veden na hmotnostní spektrometr. Výsledkem je tedy chromatogram HPLC a hmotnostní spektra z celého průběhu eluce. Podmínky pro separaci na koloně byly upraveny tak, aby byly porovnatelné s chromatogramy získanými při sledování průběhu reakce, či s chromatogramy při izolaci. Z chromatogramu a hmotnostních spekter byl určen retenční čas produktu, který byl poté izolován semipreparativní HPLC.

2.15. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Analýza NMR byla provedena u připraveného cíleného derivátu Taxol-sukcinyl-GnRH, pro potvrzení struktury.

NMR byla prováděna na přístroji Bruker Avance 500 MHz (H^1 při 500 MHz, C^{13} při 125.8 MHz), stupnice δ (ppm), interakční konstanty (Hz), referováno vůči TMS jako vnitřnímu standardu, měřeno v $CDCl_3$ na oddělení Organické strukturní analýzy AV ČR

2.16. Spektrofotometrie

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji UV mini 1240, UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, SHIMADZU. Byly použity 1 cm křemenné kyvety.

2.17. Stanovení cytostatické aktivity derivátů taxolu in vitro

Stanovení cytostatické aktivity bylo prováděno na oddělení Chemie a biochemie derivátů složek nukleových kyselin na ústavu Organické chemie a biochemie AV ČR.

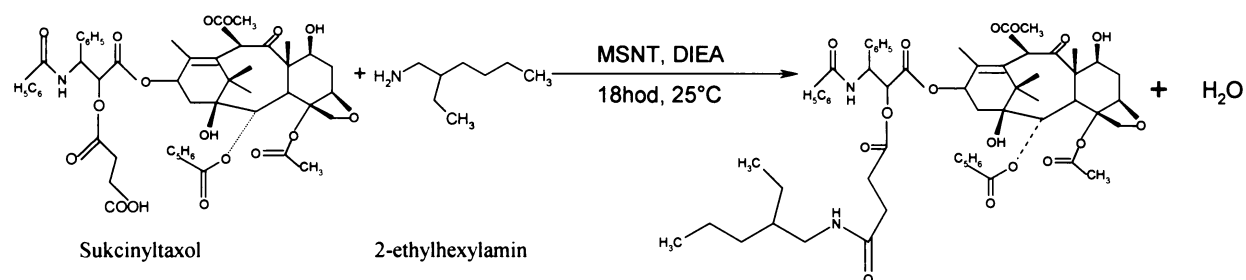
Experimentální práce byla zaměřena na selekci a charakterizaci cytostatických účinků připravených derivátů taxolu na buněčných liniích: cervikálního karcinomu HeLa S3 [*Human cervix carcinoma HeLa S3 cells* (ATCC CCL 2.2)], lidských T-lymfoblastoidech CCRF-CEM [CCRF/CEM T lymphoblastoid cells (ATCC CCL 119)], myších leukemických buňkách L1210 [Mouse leukemia L 1210 cells (ATCC CCL 219)] a HL-60 lidských promyelocytických buňkách leukémie.

Testy byly prováděny v CO inkubátoru při 37 °C (72 hod) a vyhodnoceny konvenčními technikami (na počítací buněk Serono 150+, barvením methylenovou modří a buněčným testem viability XTT). Cytostatická účinnost (hodnoty IC_{50}) jednotlivých sloučenin byla posouzena podle jejich schopnosti inhibovat růst uvedených buněčných kultur⁹.

3. Výsledky

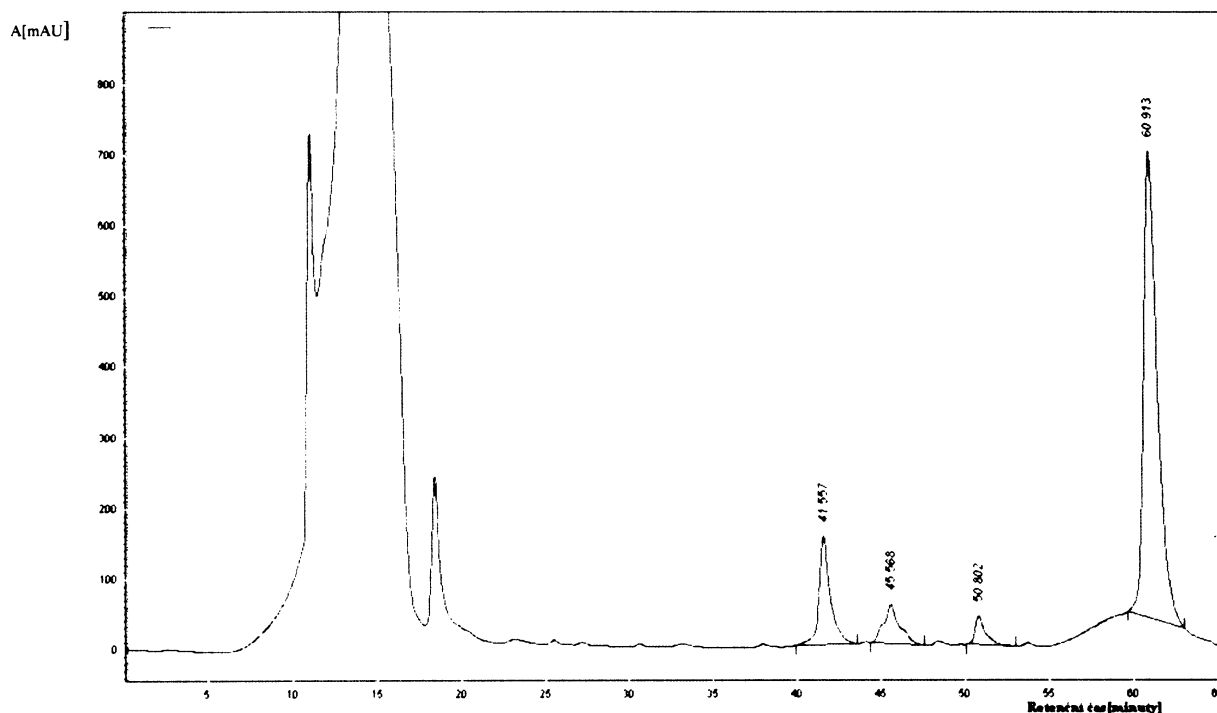
3.1. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol

Syntéza derivátu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu byla provedena postupem uvedeným v kapitole 2.1. Reakční schéma je na obr. 20. Reakce byla ukončena po 18 hodinách, reakční směs byla zamrzána v tekutém dusíku a lyofilizována.



Obr.20. Reakční schéma syntézy 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu

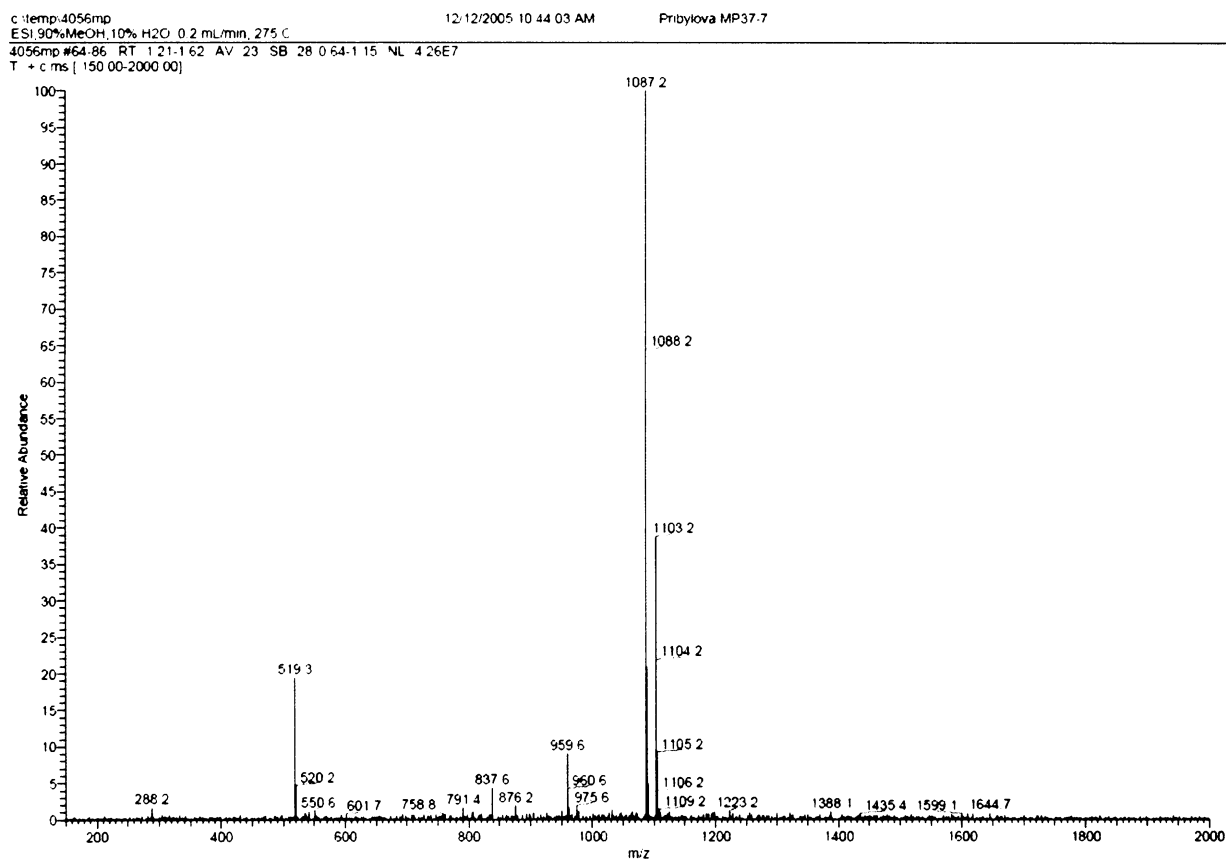
Reakční směs byla analyzována HPLC s UV detekcí při 227 nm (viz kapitola 2.13.2., metoda 8) (Obr. 21). Jednotlivé frakce byly izolovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 2.14.). Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol byla izolována HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8). Retenční čas produktu byl 60,9 minut. Výtěžek reakce byl 25 %.



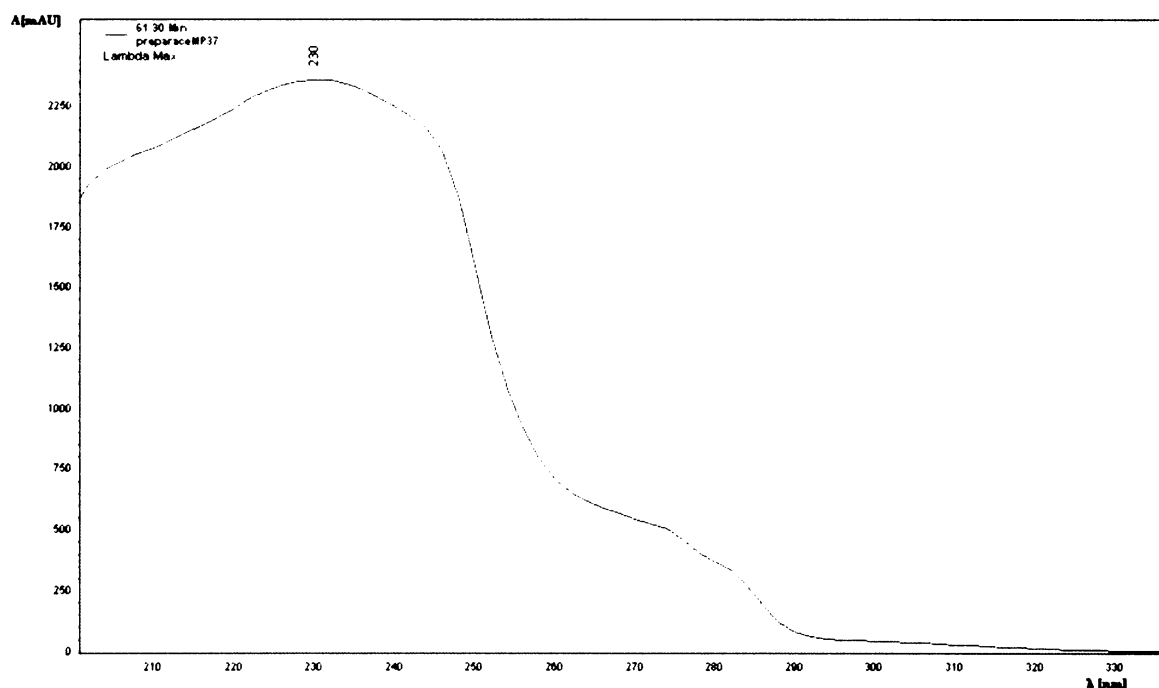
Obr. 21. HPLC analýza reakční směsi obsahující derivát taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol

3.1.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol je 1064,2 a teoretická molekulová hmotnost aduktu (M+Na)⁺ je 1087,2. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 22). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol je uvedeno na obrázku 23, str.45.



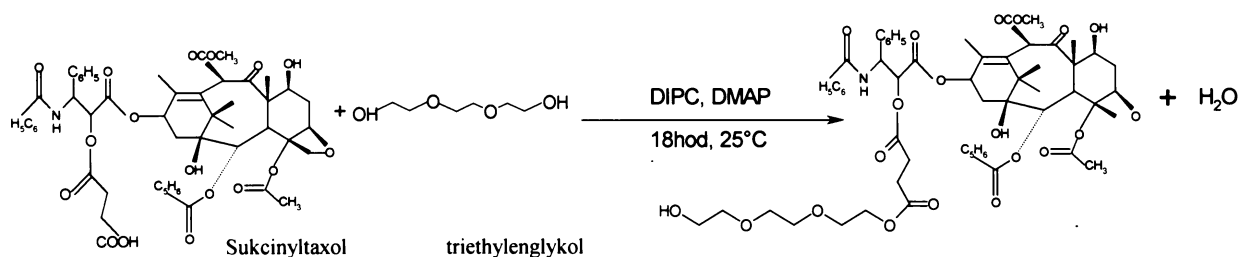
Obr. 22. Hmotnostní spektrum derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol



Obr. 23. UV spektrum derivátu taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol

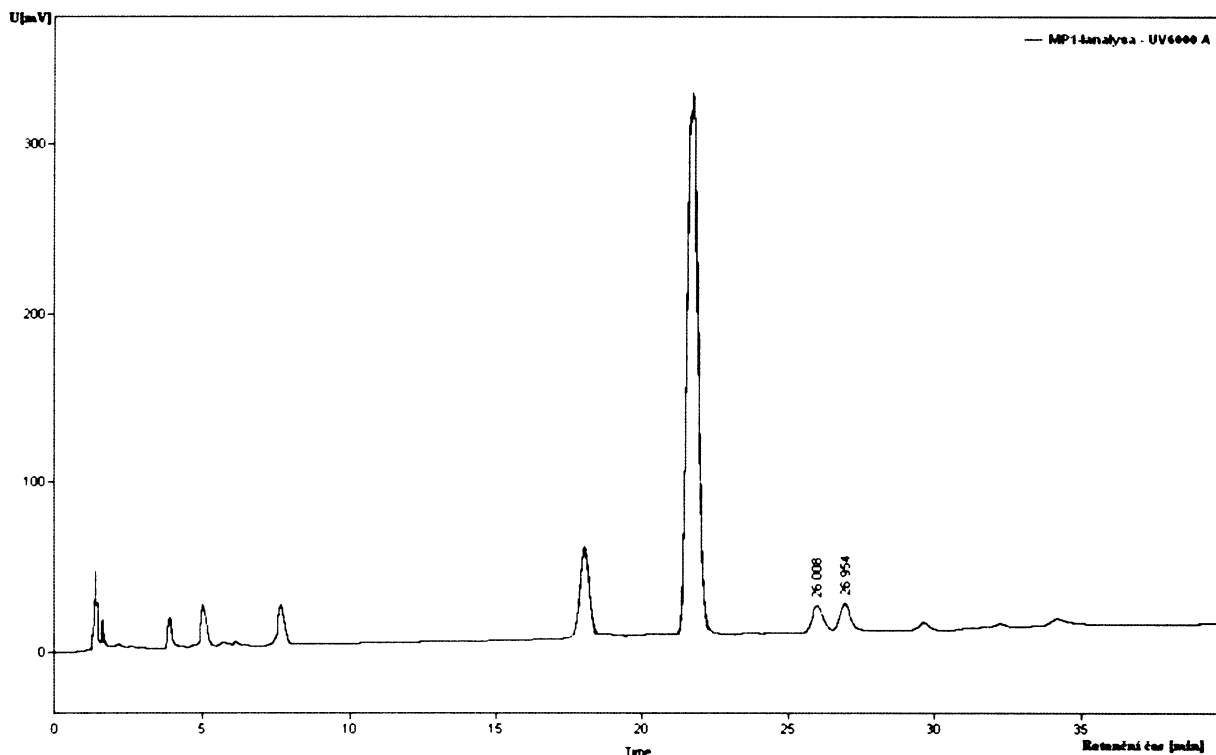
3.2. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(triethylglykol-sukcinyl)taxol

Syntéza derivátu taxolu 2'-(triethylglykol-sukcinyl)taxol byla provedena postupem uvedeným v kapitole 2.2. Reakční schéma je na obrázku 24.



Obr. 24. Reakční schéma syntézy derivátu taxolu 2'-(triethylglykol-sukcinyl)taxol

Směs byla míchána za laboratorní teploty 18 hodin. Poté byl dichlormethan odpařen na vakuové odparce. Byla provedena HPLC analýza konečné směsi (viz kapitola 2.13.1., metoda 4) (Obr. 25, str. 46) s UV detekcí při 227 nm. Jednotlivé frakce byly izolovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 2.14.).



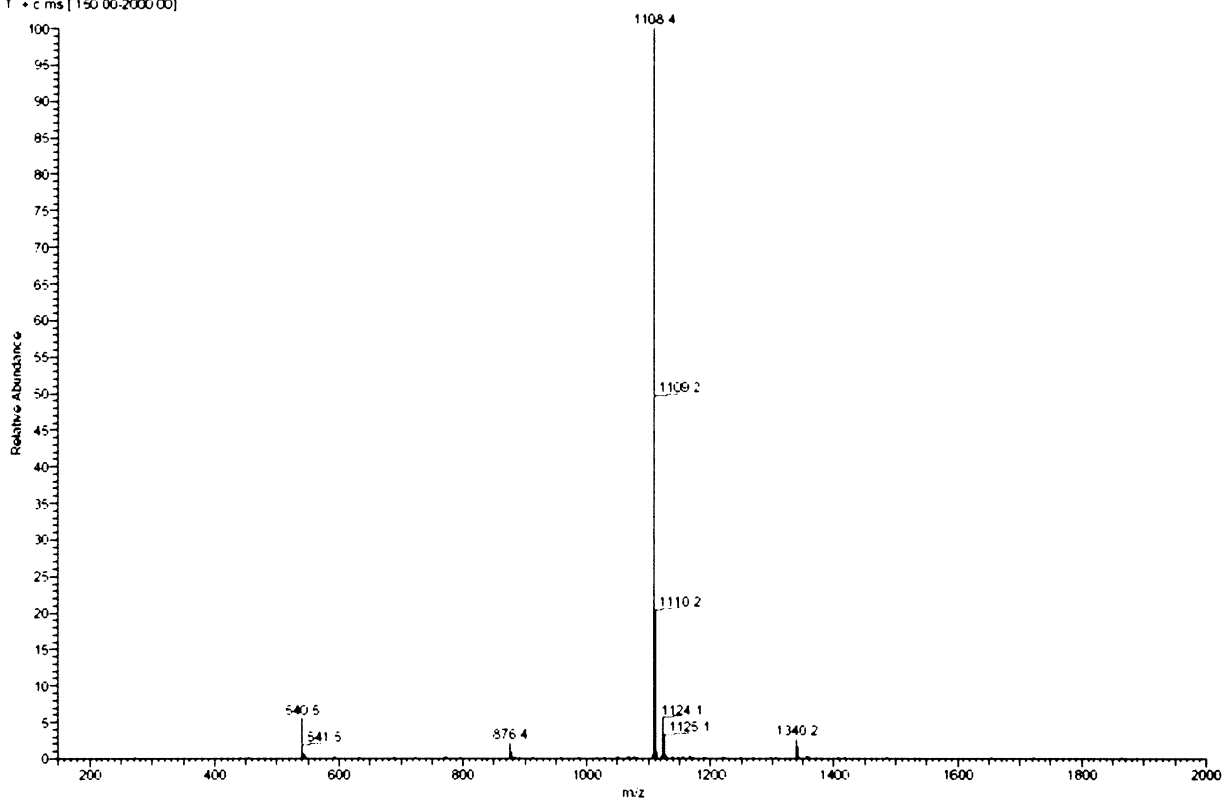
Obr. 25. HPLC analýza reakční směsi obsahující derivát taxolu 2'-(triethylenglykol-sukciny)taxol

Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(triethylenglykol-sukciny)taxol byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 26,0 minut. Výtěžek reakce byl 5 %.

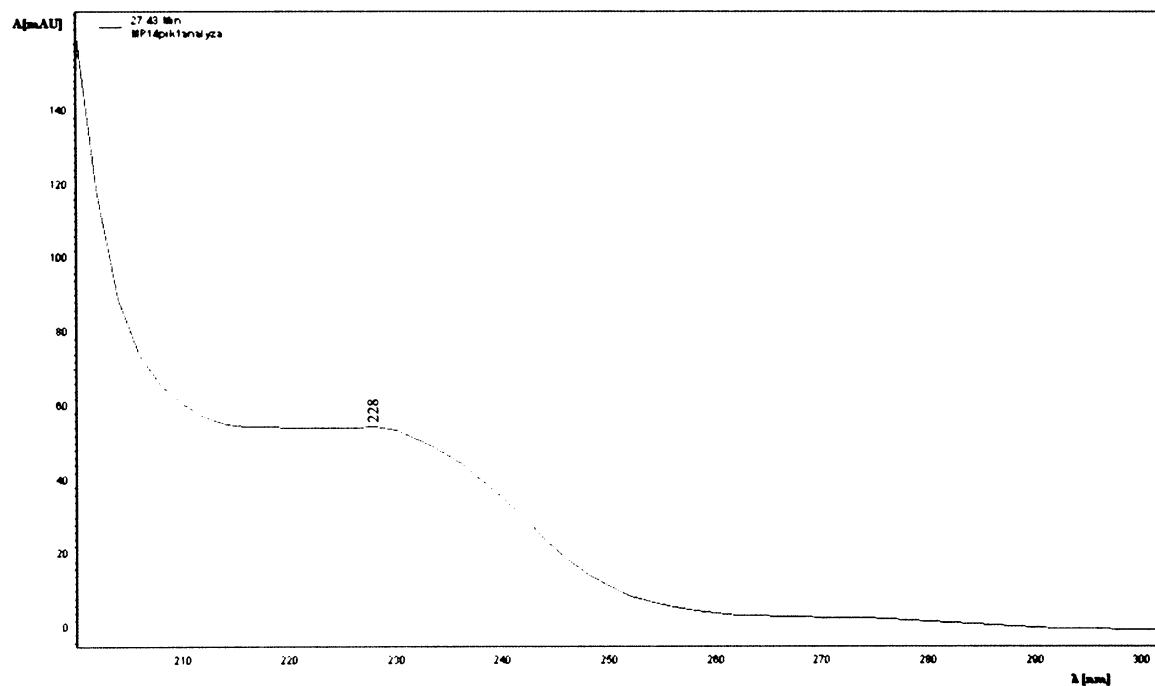
3.2.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(triethylenglykol-sukciny)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(triethylenglykol-sukciny)taxol je 1085,6 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 1108,4. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 26, str. 47). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(triethylenglykol-sukciny)taxol je uvedeno na obrázku 27, str.47.

c:\DOCUME~1\TEXTY\Temp\3774c 10:14:2005 1 10 27 PM Pnbylova MP 3C
ESI 90% MeOH 10% H2O 0.2 mL/min 275 C sample 1 10 MeOH
3774c #59-81 RT 1.19-1.59 AV 23 SB 14 0.21-0.47 NL 5.05E7
T * c ms [150.00-2000.00]



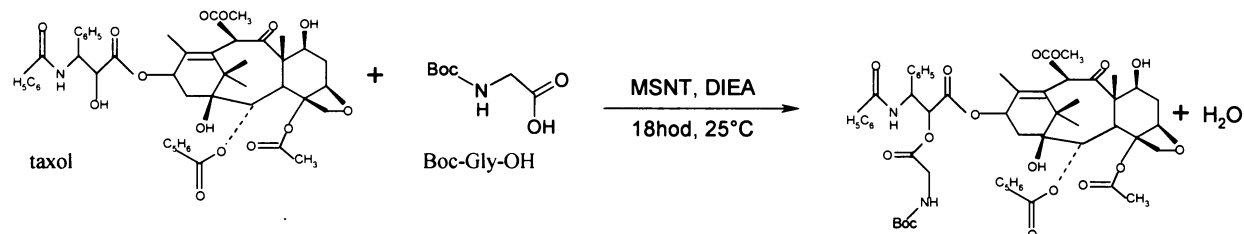
Obr. 26. Hmotnostní spektrum 2'-(triethylglykol-succinyl)taxolu



Obr. 27. UV spektrum 2'-(triethylglykol-succinyl)taxolu

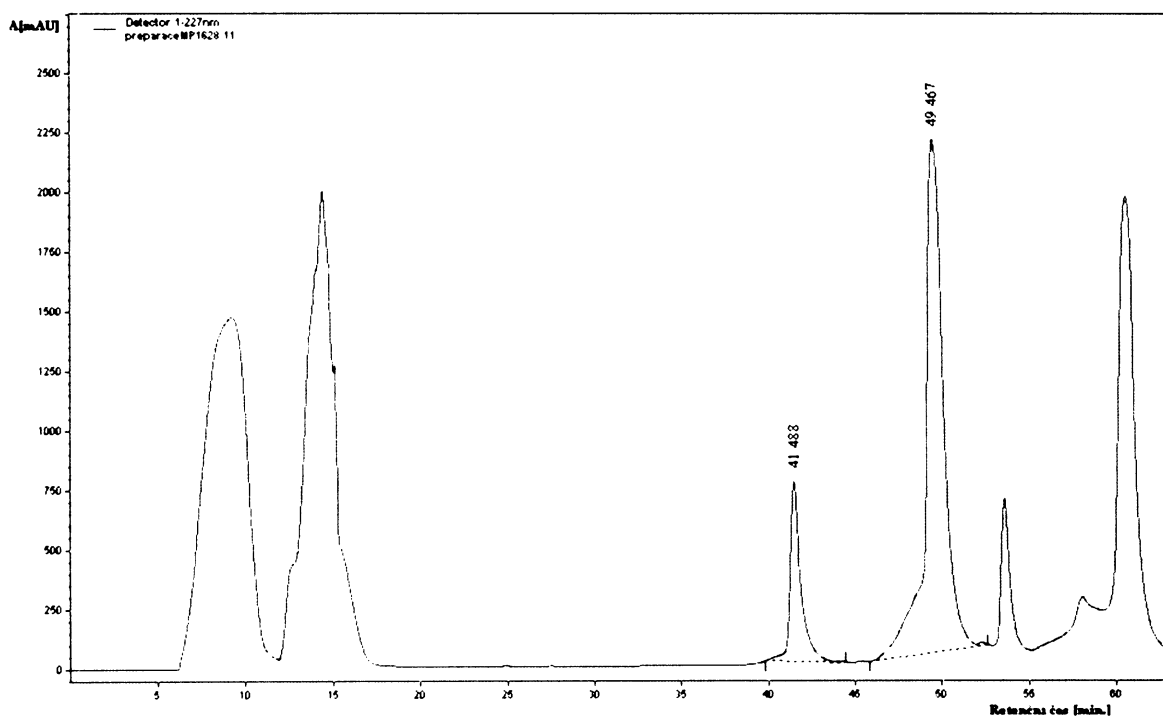
3.3. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol

Syntéza derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol byla provedena podle postupem popsaným v kapitole 2.3. Reakční schéma je na obrázku 28.



Obr. 28. Reakční schéma syntézy derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol

Po 18 hodinovém míchání za laboratorní teploty bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. V průběhu reakce byly odebírány vzorky analyzované HPLC (viz kapitola 2.13.1., metoda 5). Výsledná směs byla analyzována HPLC s UV detekcí při 227 nm (viz 2.13.2., metoda 8) (Obr. 29). Jednotlivé frakce byly izolovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií.

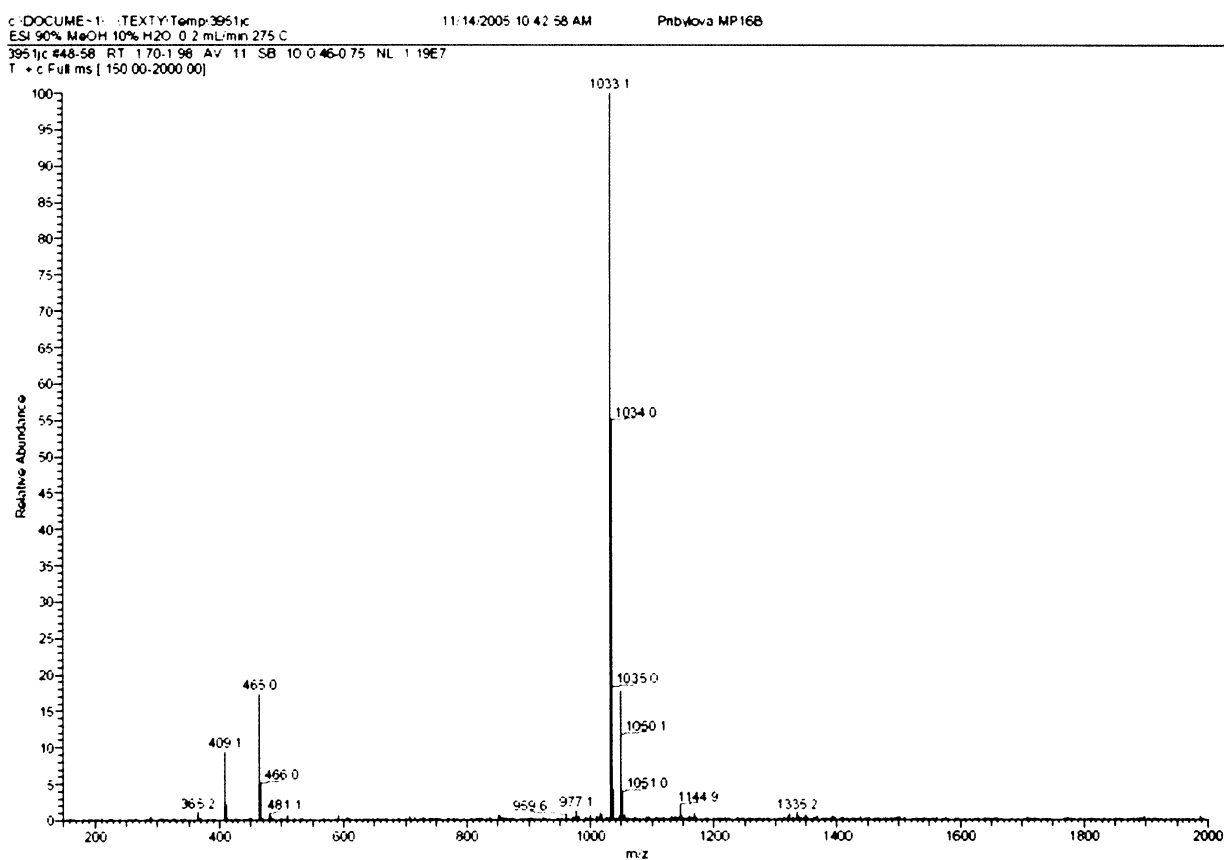


Obr. 29. HPLC analýza reakční směsi obsahující 2'-(Boc-glycyl)taxol

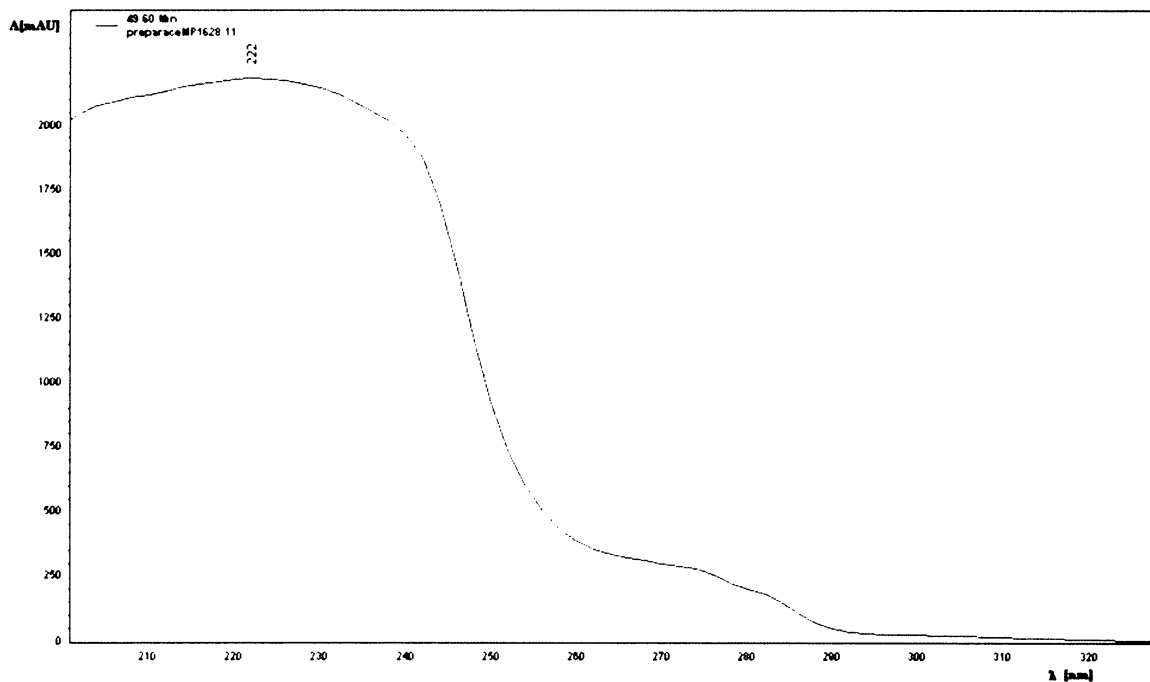
Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 49,4 minut. Výtěžek reakce byl 10 %.

3.3.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol je 1010,1 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 1033,1. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 30). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol je uvedeno na obrázku 31, str. 50.



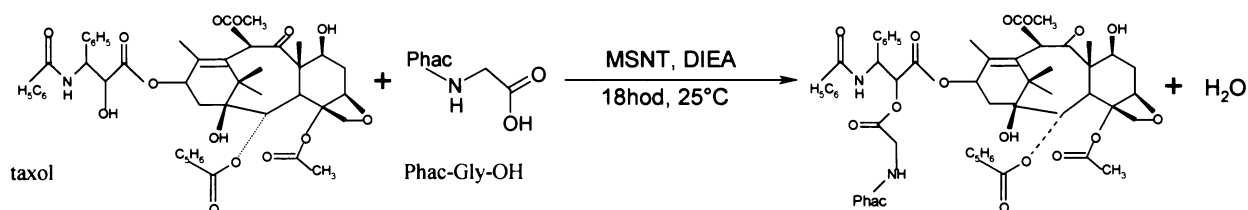
Obr. 30. Hmotnostní spektrum 2'-(Boc-glycyl)taxol



Obr. 31. UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol

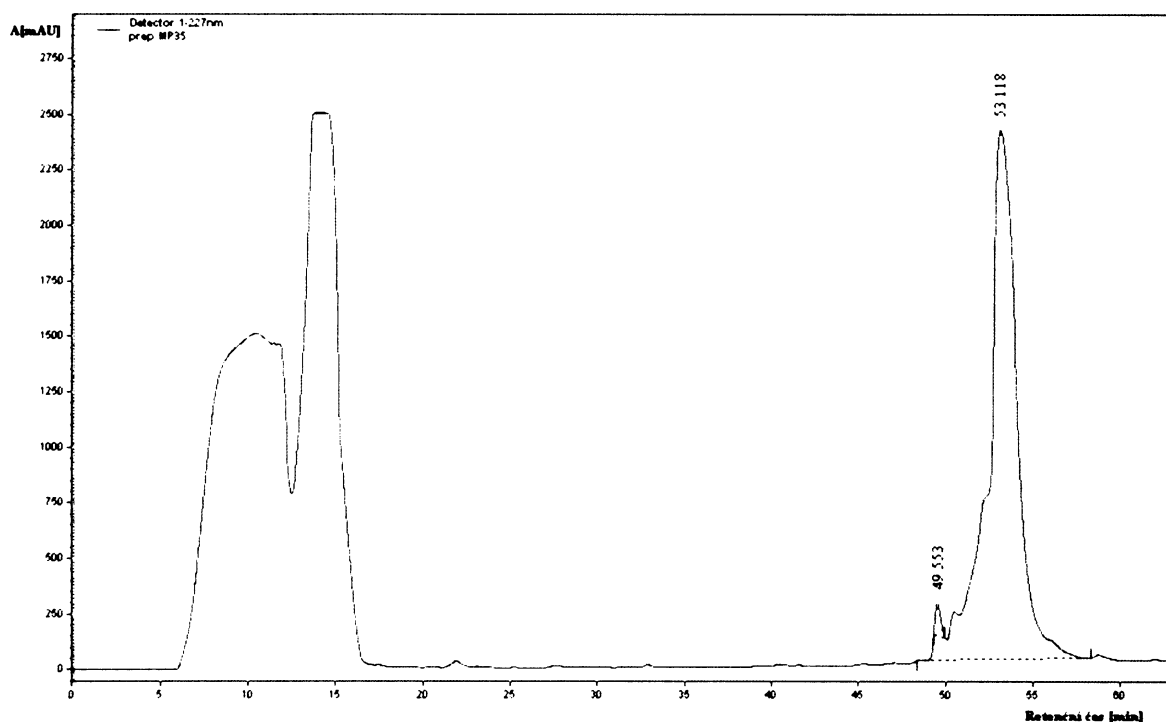
3.4. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol

Derivát taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol byl připraven postupem uvedeným v kapitole 2.4. Reakční schéma je na obrázku 32.



Obr. 32. Reakční schéma syntézy derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol

V průběhu reakce byly odebírány vzorky a ty byly analyzovány HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8) (Obr. 33, str. 51). Reakce byla ukončena po 60 hodinách odpařením dichlormethanu na vakuové odparce. Výsledná směs byla analyzována HPLC s UV detekcí při 227 nm (viz 2.13.2., metoda 8). Jednotlivé frakce byly izolovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií.



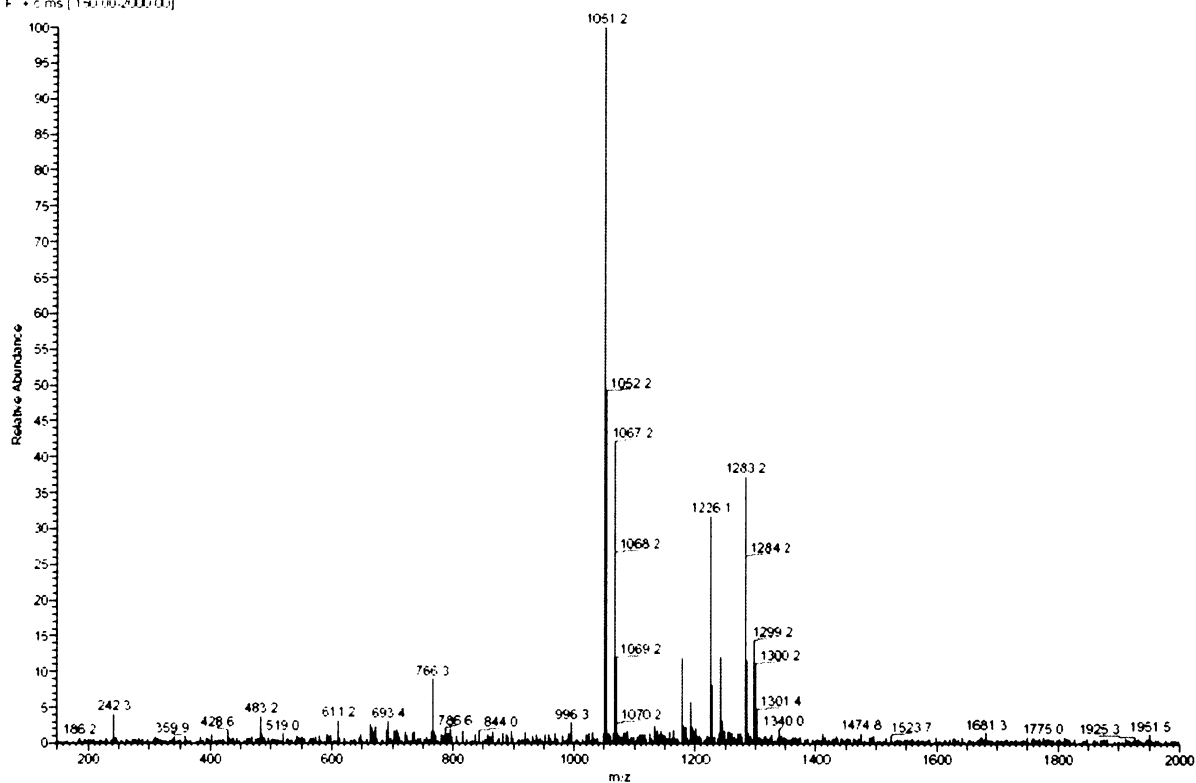
Obr. 33. HPLC analýza reakční směsi obsahující derivát taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol po 12 hodinách reakce

Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 49,5 minut. Výtěžek reakce byl 15 %.

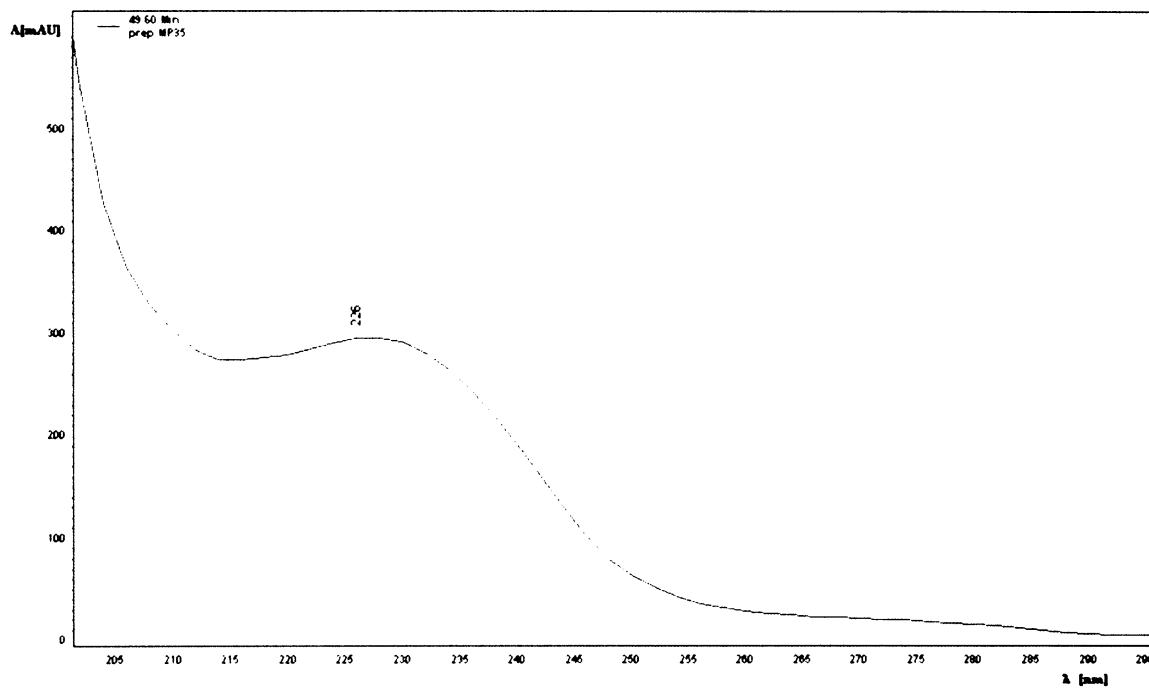
3.4.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol je 1028,2 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 1051,1. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 34, str. 52). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol je uvedeno na obrázku 35, str. 52.

c:temp:4047mp 12:12:2005 9 49 53 AM Prbykova MP35-1
 ESI 90%MeOH 10% H2O 0.2 mL/min 275 C
 4047mp #168-187 RT 3.16-3.51 AV 20 SB 32 0.96-1.54 NL 1.60E7
 F + e ms [150.00-2000.00]



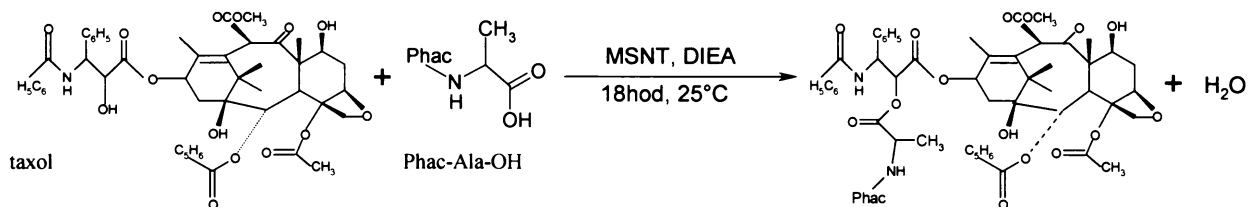
Obr. 34. Hmotnostní spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol



Obr. 35. UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol

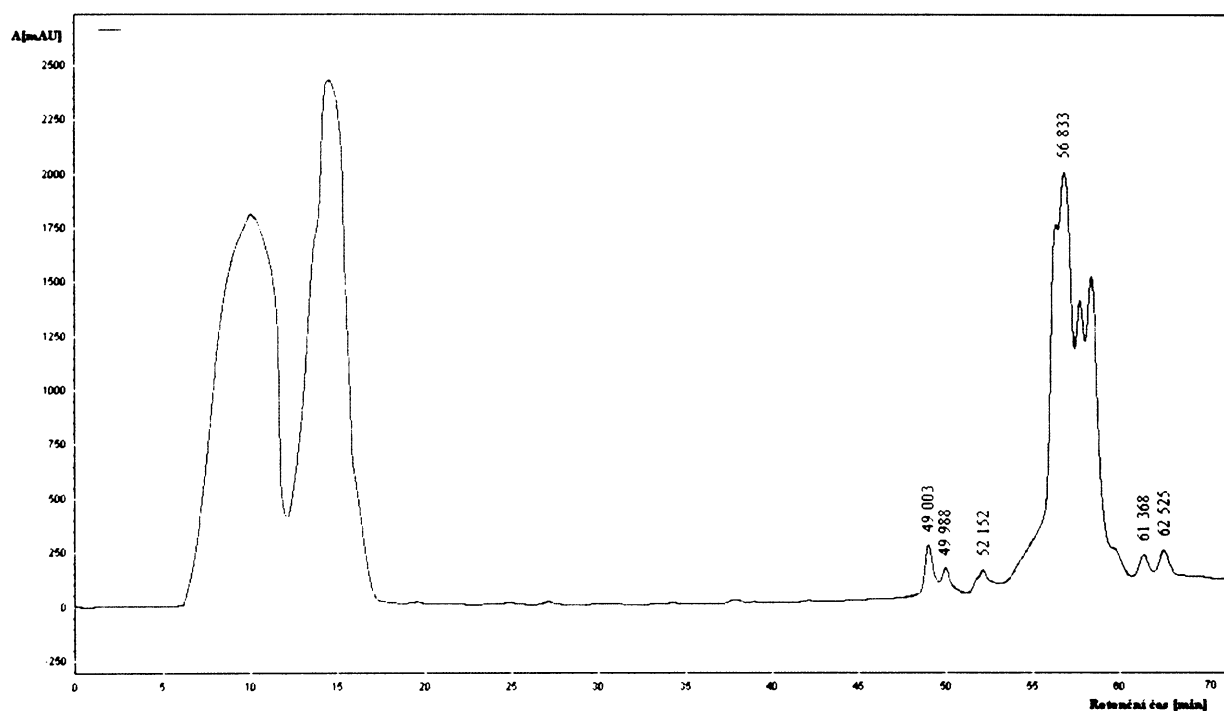
3.5. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol

Derivát taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol byl připraven postupem uvedeným v kapitole 2.5. Reakční schéma je uvedeno na obrázku 36.



Obr. 36. Reakční schéma syntézy derivátu 2'-(Phac-alanyl)taxol

Výsledná směs po odpaření dichlormethanu byla analyzována HPLC s UV detekcí při 227 nm (viz 2.13.2., metoda 8) (Obr. 37). Jednotlivé frakce byly izolovány a analyzovány hmotnostní spektrometrií.

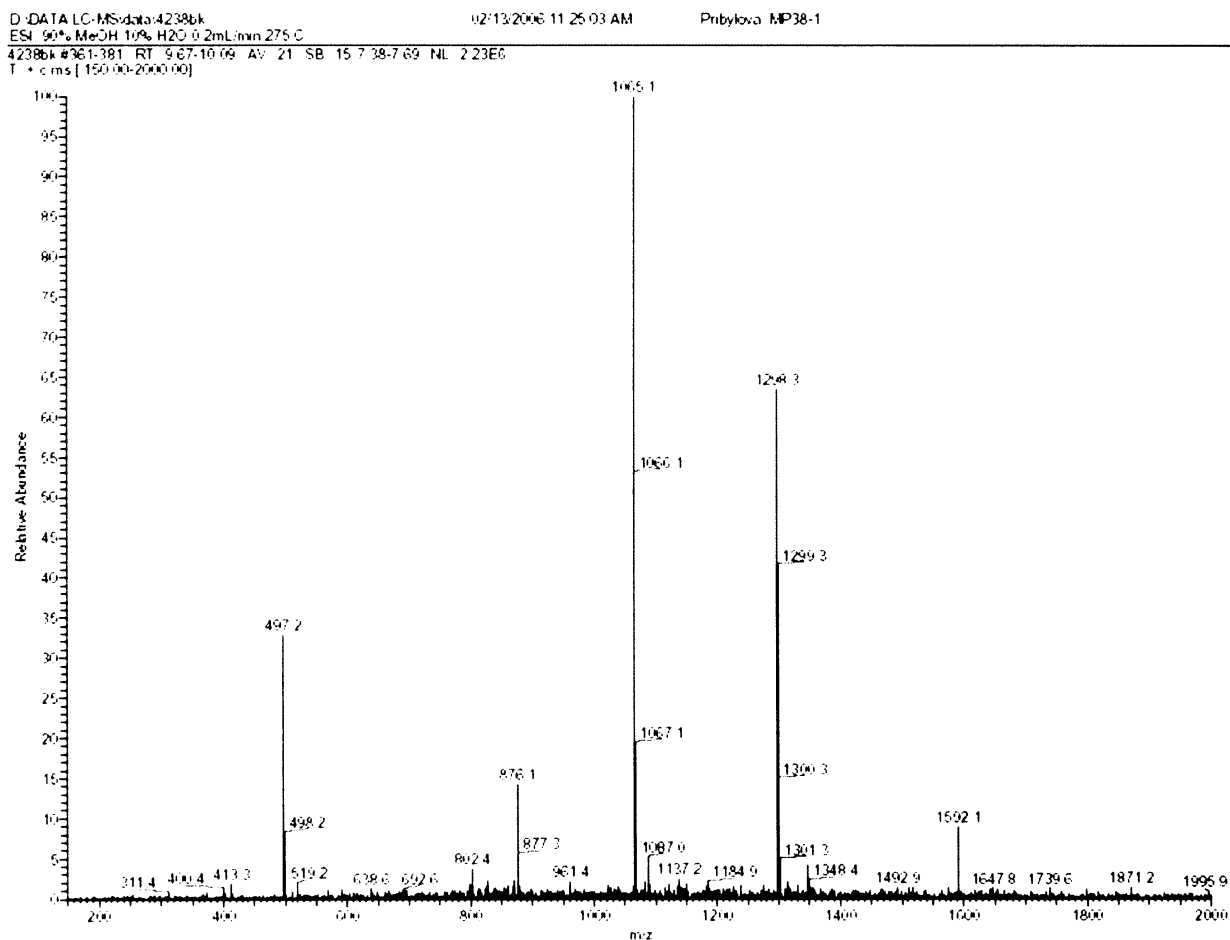


Obr. 37. HPLC analýza reakční směsi obsahující 2'-(Phac-alanyl)taxol

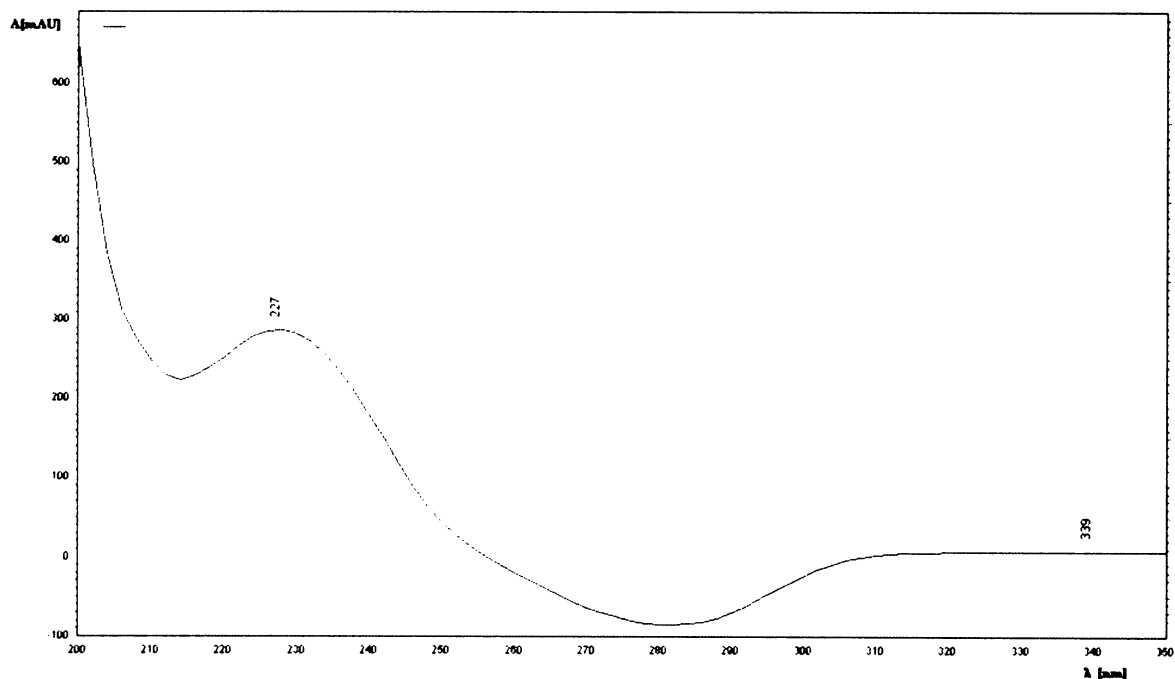
Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 9). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 49,0 minut. Výtěžek reakce byl 5 %.

3.5.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol je 1042,1 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 1065,1. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 38). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol je uvedeno na obrázku 39, str.55.



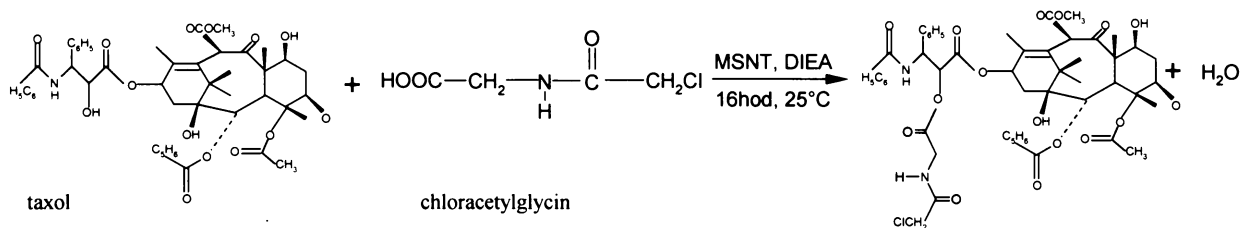
Obr. 38. Hmotnostní spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol



Obr. 39. UV spektrum derivátu taxolu 2'-(Phac-alanyl)taxol

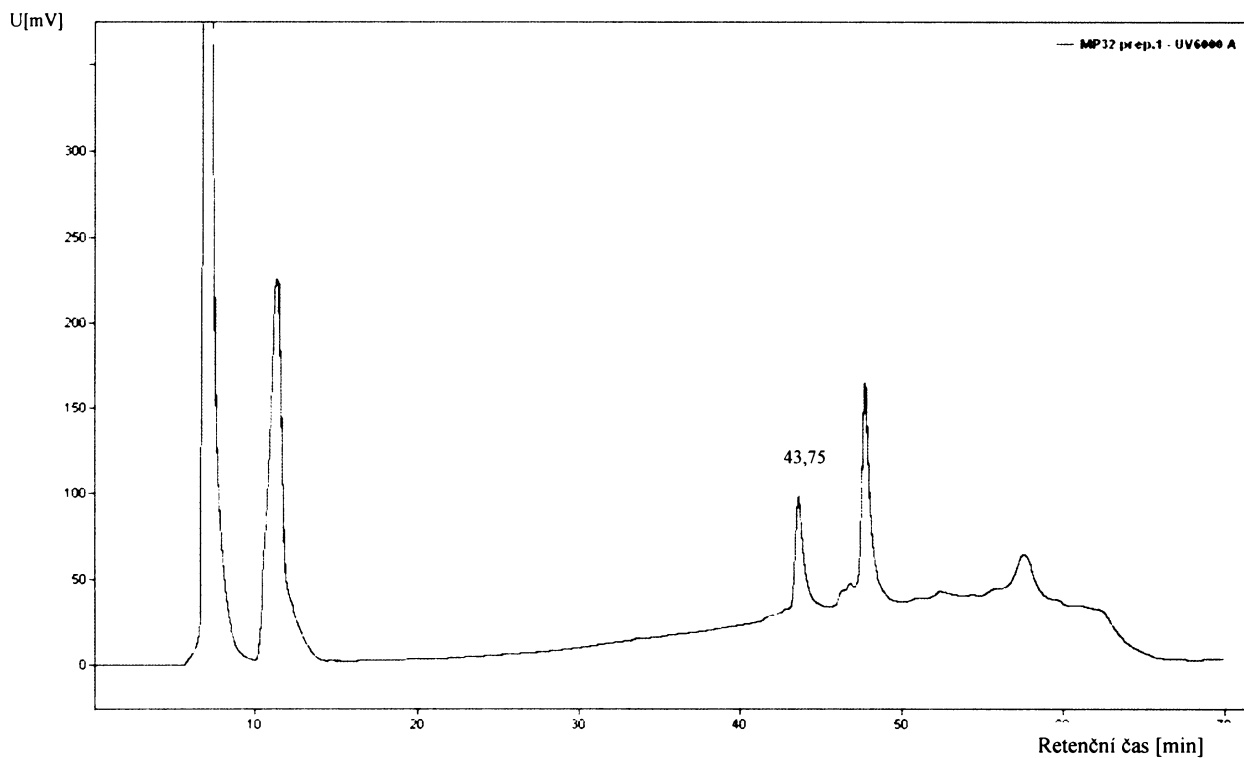
3.6. Syntéza a izolace derivátu taxolu 2'-(chloracetylglycyl)taxol

Derivát taxolu 2'-(chloracetylglycyl)taxol byl připraven postupem uvedeným v kapitole 2.6. Reakční schéma je uvedeno na obrázku 40. V průběhu reakce byly odebrány vzorky analyzované HPLC (viz kapitola 2.13.1., metoda 5).



Obr. 40. Reakční schéma syntézy derivátu taxolu 2'-(chloracetylglycyl)taxol

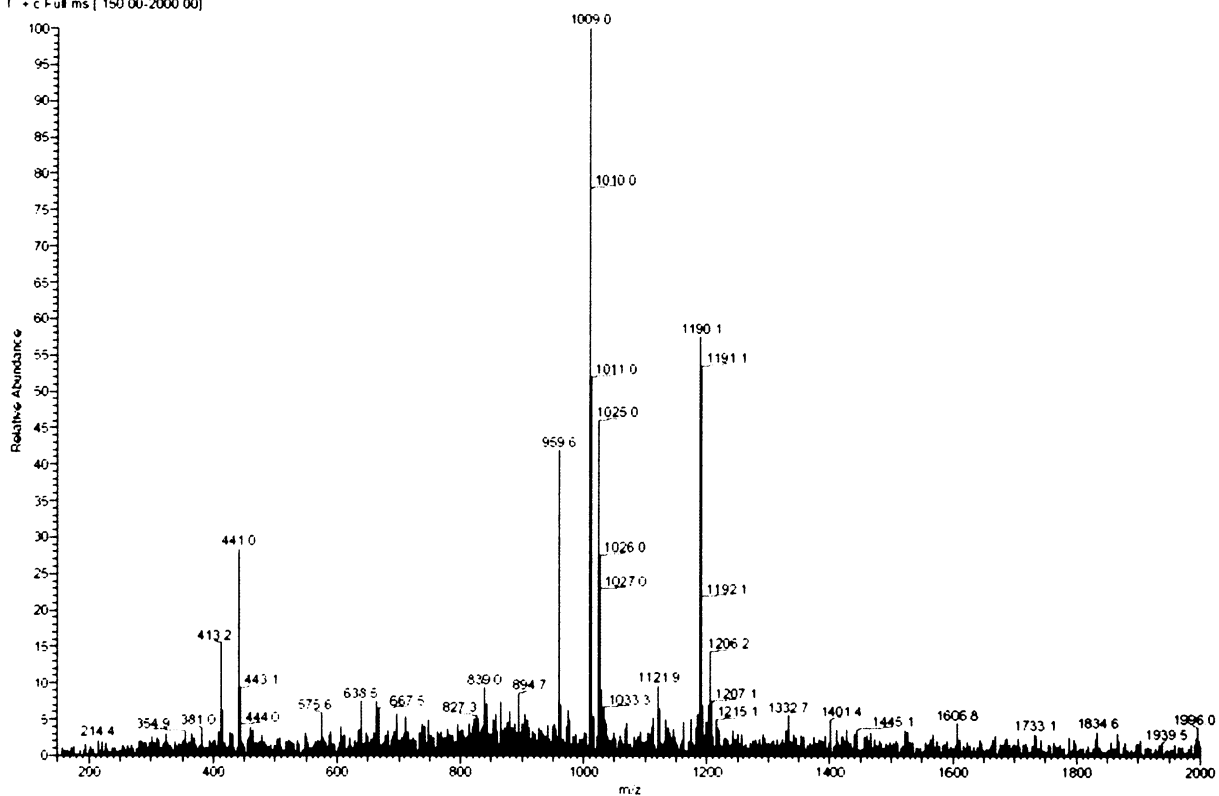
Po 16 hodinách míchání za laboratorní teploty byla reakce ukončena odpařením rozpouštědla na vakuové odparce. Směs byla rozdělena HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8) (Obr. 41, str. 56). Izolované frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 2.14.). Frakce obsahující derivát taxolu 2'-(chloracetylglycyl)taxol byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 8). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 43,7 minut. Výtěžek činil 7 %.



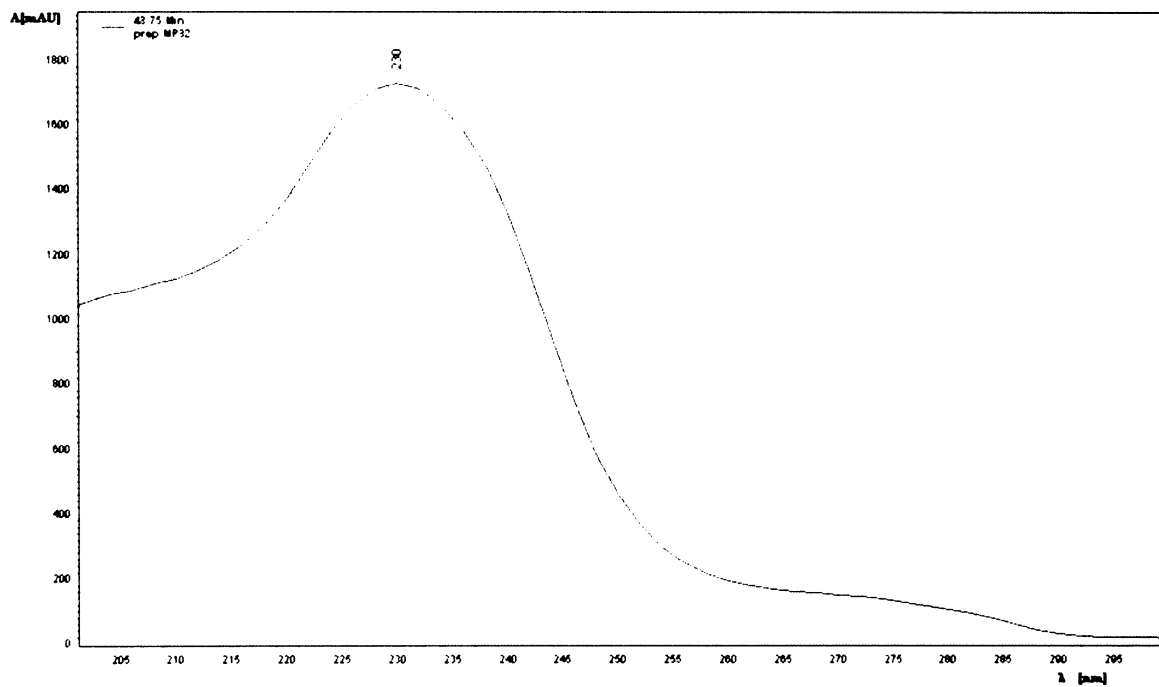
Obr. 41. HPLC analýza reakční směsi obsahující 2'-(chloracetylglucyl)taxol

3.6.1. Charakteristika derivátu taxolu 2'-(chloracetylglucyl)taxol

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu 2'-(chloracetylglucyl)taxol je 986,5 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 1009,0. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 42, str. 57). UV spektrum derivátu taxolu 2'-(chloracetylglucyl)taxol je uvedeno na obrázku 43, str. 57.



Obr. 42. Hmotnostní spektrum 2'-(chloroacetyl)glycyl)taxolu



Obr. 43. UV spektrum 2'-(chloroacetyl)glycyl)taxolu

3.7. Odštěpení chránicí skupiny Boc z NH₂ skupiny glycinu

Při odstraňování chránicí skupiny Boc z NH₂ skupiny glycinu derivátu taxolu 2'-(Boc-glycyl)taxol byly použity podle tři metody uvedené v kapitole 2.7. Teoretická hmotnost žádaného derivátu taxolu 2'-glycyltaxol je 911,9 a molekulárního aduktu (M+Na)⁺ je 934,9. Žádnou z použitých metod nebylo dosaženo odstranění chránicí skupiny Boc. Hmotnostní analýza v konečné směsi neprokázala vznik produktu. Ve směsi byl nalezen taxol.

3.8. Odštěpení chránicí skupiny Phac z NH₂ skupiny glycinu (alaninu)

3.8.1. Stanovení rozpustnosti taxolu v prostředí methanol/voda

Na základě testu (viz kapitola 2.8.2.) bylo zjištěno, že taxol je rozpustný ve vodném roztoku methanolu o koncentraci 65 % a vyšší.

3.8.2. Stanovení aktivity penicilinacylasy v roztoku 68 % methanolu

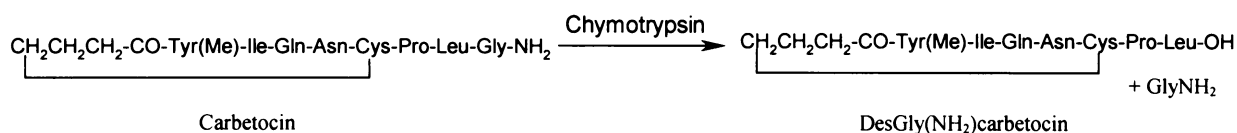
Na základě výsledků testu rozpustnosti taxolu v prostředí taxol/voda byla prověřena aktivita penicilinacylasy v prostředí 68 % methanolu. Aktivita byla sledována postupem uvedeným v kapitole 2.8.3. Spektrofotometricky bylo zjištěno, že v roztoku 68 % methanolu dosahuje aktivita penicilinacylasy 60 % aktivity tohoto enzymu ve vodném roztoku.

3.8.3. Odstraňování chránicí skupiny Phac z aminoskupiny glycinu u derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol penicilinacylasou v prostředí 68 % methanolu

Průběh reakce derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol s penicilinacylasou v prostředí 68 % roztoku methanolu byl sledován průběžným odebíráním vzorků reakční směsi a jejich analýzou HPLC (viz kapitola 2.8.4.). Během reakce nedošlo k žádanému odštěpení Phac skupiny působením penicilinacylasy. Chromatogram reakční směsi u všech odebraných vzorků vykazoval pouze jednu frakci s retenčním časem vrcholu odpovídajícím standardu derivátu taxolu 2'-(Phac-glycyl)taxol.

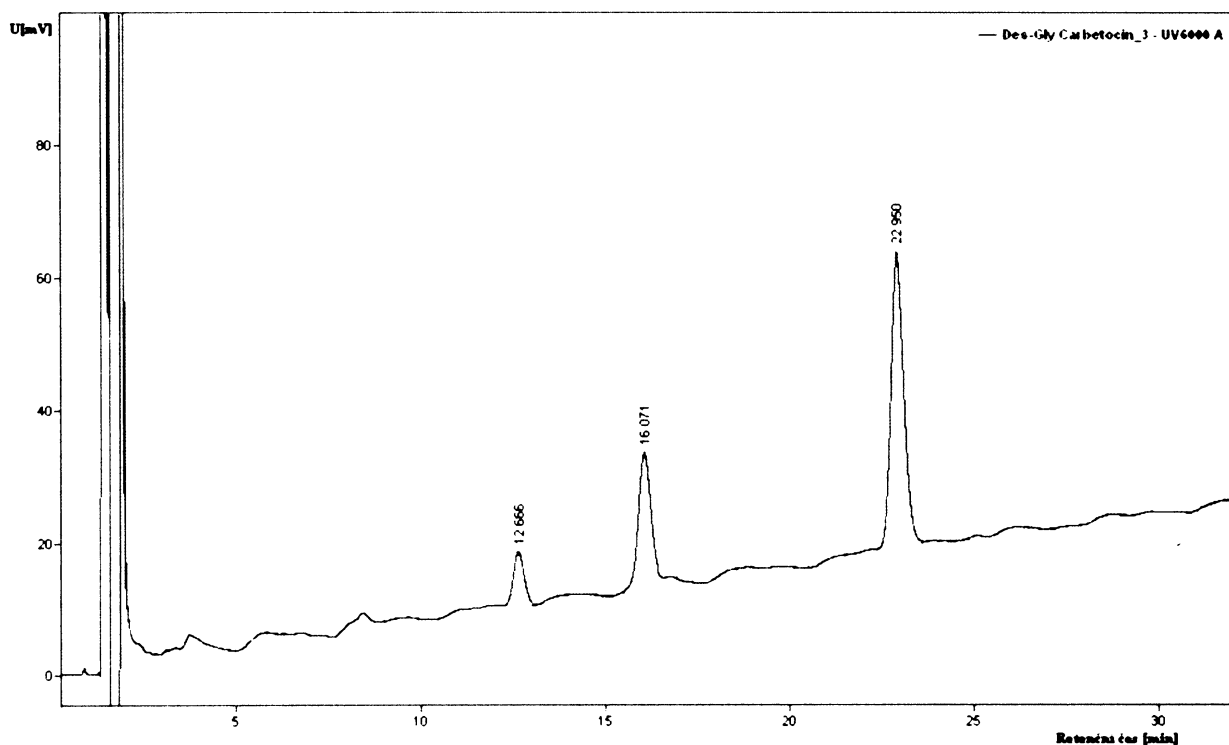
3.9. Štěpení Carbetocinu chymotrypsinem

Při enzymatickém štěpení koncového glycinamidu Carbetocinu bylo postupováno podle reakčního schématu (Obr. 44) a metody uvedené v kapitole 2.9. Po 20 hodinách byla reakce ukončena zmrazením směsi v kapalném dusíku a lyofilizací.



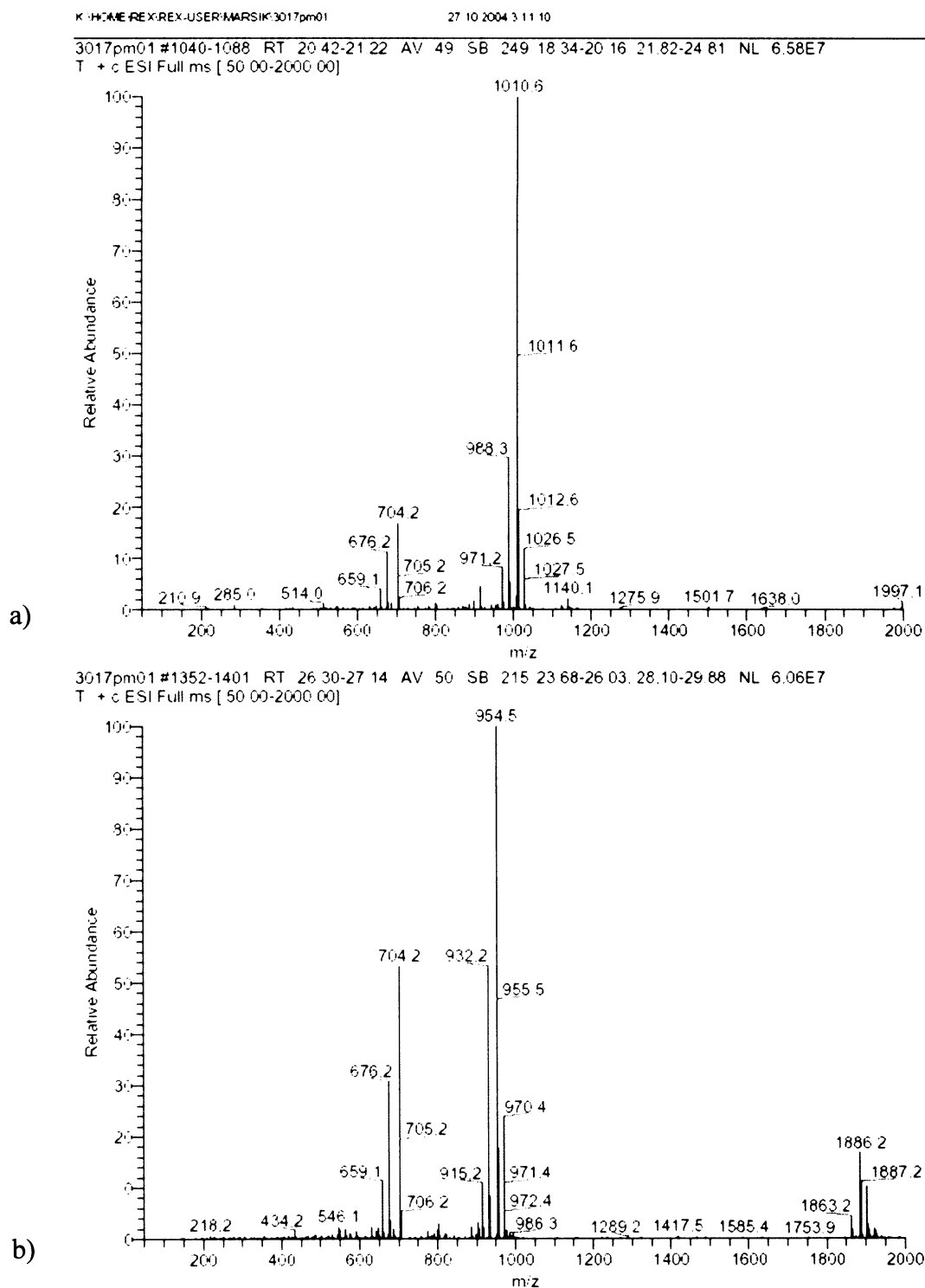
Obr. 44. Reakční schéma přípravy DesGly(NH₂)carbetocinu

Vzniklá směs byla rozdělena HPLC (viz kapitola 2.13.1., metoda 3) (Obr. 45) a analyzována LC/MS metodou (viz kapitola 2.14.2.). Na chromatogramu jsou tři výrazné eluční vrcholy. Směs obsahovala Carbetocin (retenční čas 16,0 minut), produkt DesGly(NH₂)carbetocin (retenční čas 22,9 minut) a neznámou látku (retenční čas 12,6 minut). Molekulová hmotnost Carbetocinu je 987,5 a molekulová hmotnost aduktu (M+Na)⁺ je 1010,6. Teoretická molekulová hmotnost DesGly(NH₂)carbetocinu je 931,5 a teoretická molekulová hmotnost aduktu (M+Na)⁺ je 954,5. Obě tyto látky byly charakterizovány hmotnostní spektrometrií (Obr.46, str.60).



Obr. 45. HPLC analýza reakční směsi obsahující DesGly(NH₂)carbetocin, λ=200 nm

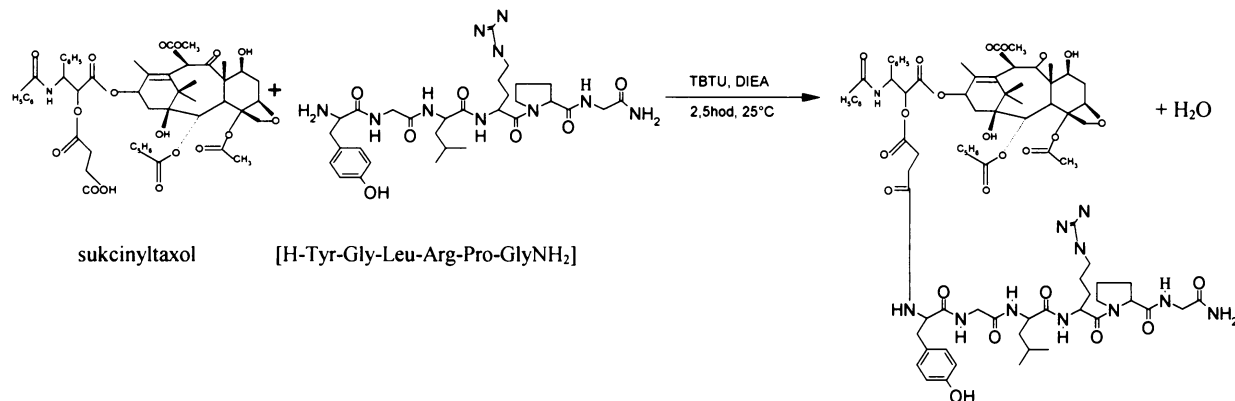
Izolace produktu byla provedena semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 7).
Výtěžek činil 18 %.



Obr. 46. Hmotnostní spektrum a) Carbetocinu a b) DesGly(NH₂)carbetocinu

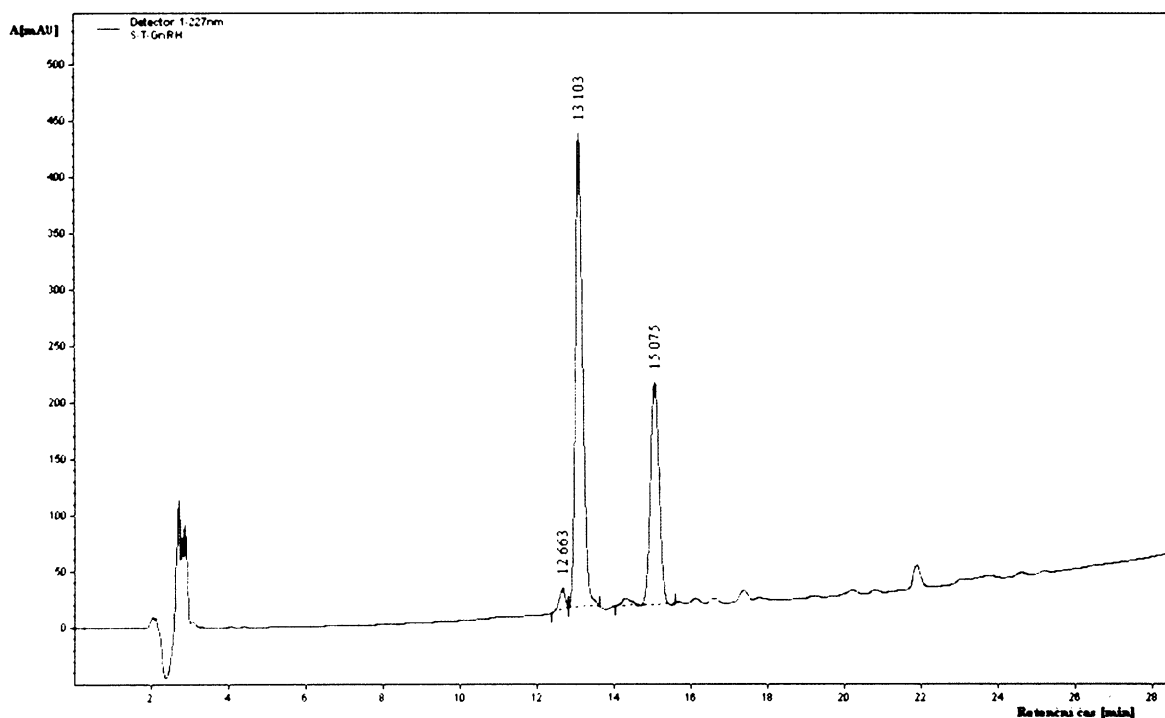
3.10. Syntéza a izolace derivátu taxolu Taxol-sukcinyln-GnRH

Syntéza derivátu taxolu Taxol-sukcinyln-GnRH byla provedena postupem uvedeným v kapitole 2.10. Reakční schéma je uvedeno na obrázku 47. Po 2,5 hodinách byla reakce ukončena zmrazením a lyofilizací vzorku.



Obr. 47. Reakční schéma syntézy derivátu taxolu Taxol-sukcinyln-GnRH

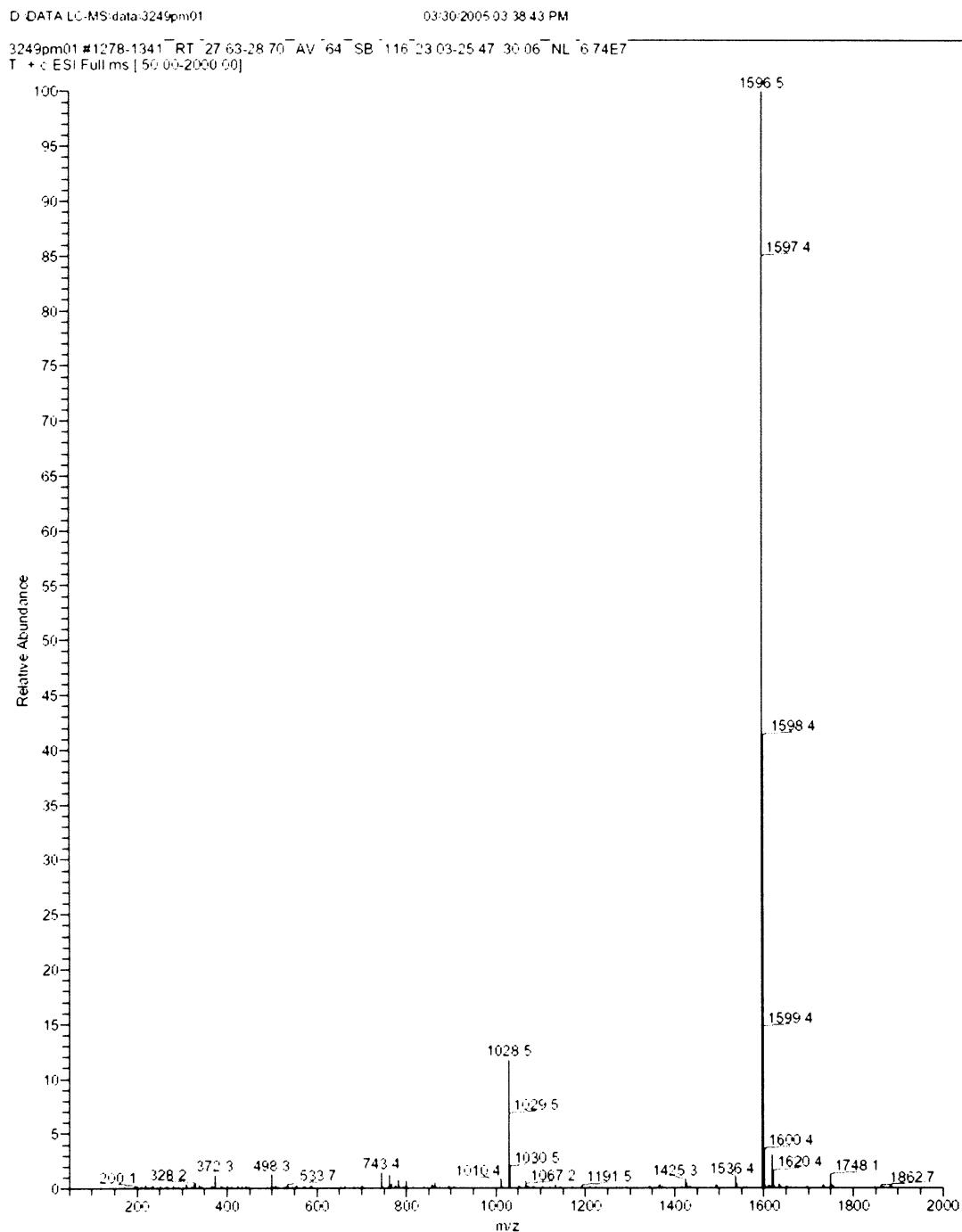
Byla provedena HPLC analýza konečné reakční směsi (viz 2.13.1., metoda 1) (obr.48) s UV detekcí při 227 nm. Izolované frakce byly analyzovány hmotnostní spektrometrií (viz kapitola 2.14.). Frakce obsahující derivát taxolu Taxol-sukcinyln-GnRH byla izolována semipreparativní HPLC (viz kapitola 2.13.2., metoda 6). Retenční čas vrcholu frakce produktu byl 13,1 minut. Výtěžek činil 15 %. Čistota produktu byla kontrolována HPLC s UV detekcí při 218 nm (viz. 2.13.1 metoda 2).



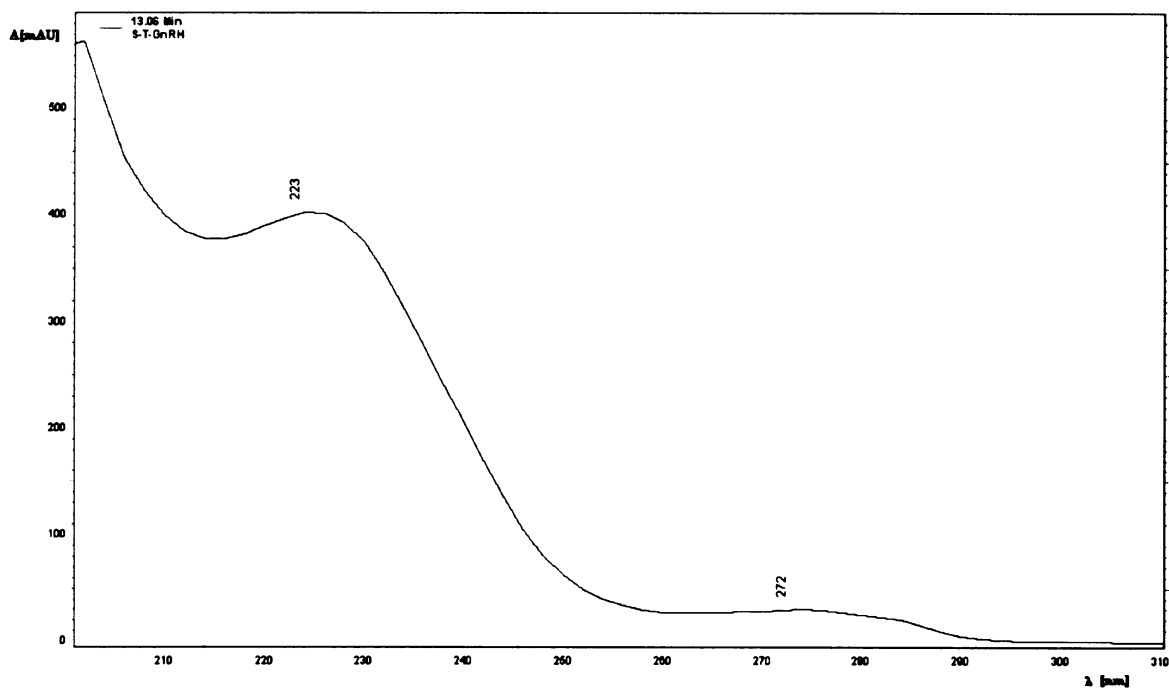
Obr. 48. HPLC analýza reakční směsi obsahující Taxol-sukcinyln-GnRH

3.10.1. Charakteristika derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH

Teoretická molekulová hmotnost derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH je 1595,6 a teoretická molekulová hmotnost aduktu $(M+H)^+$ je 1596,5. Analýza hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost látky s touto molekulovou hmotností (Obr. 49). UV spektrum derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH je uvedeno na obrázku 50, str. 63. Struktura požadovaného produktu byla potvrzena NMR analýzou.



Obr. 49. Hmotnostní spektrum derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH

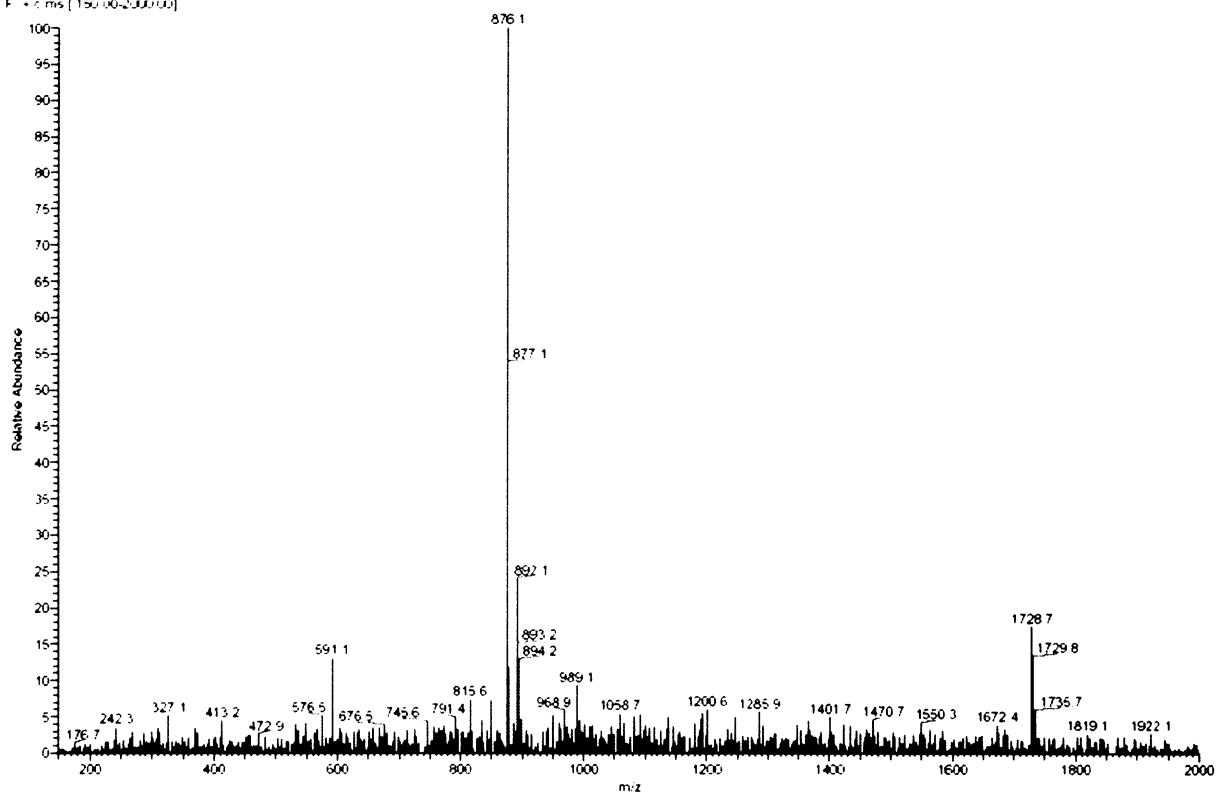


Obr. 50. UV spektrum derivátu taxolu Taxol-succinyl-GnRH

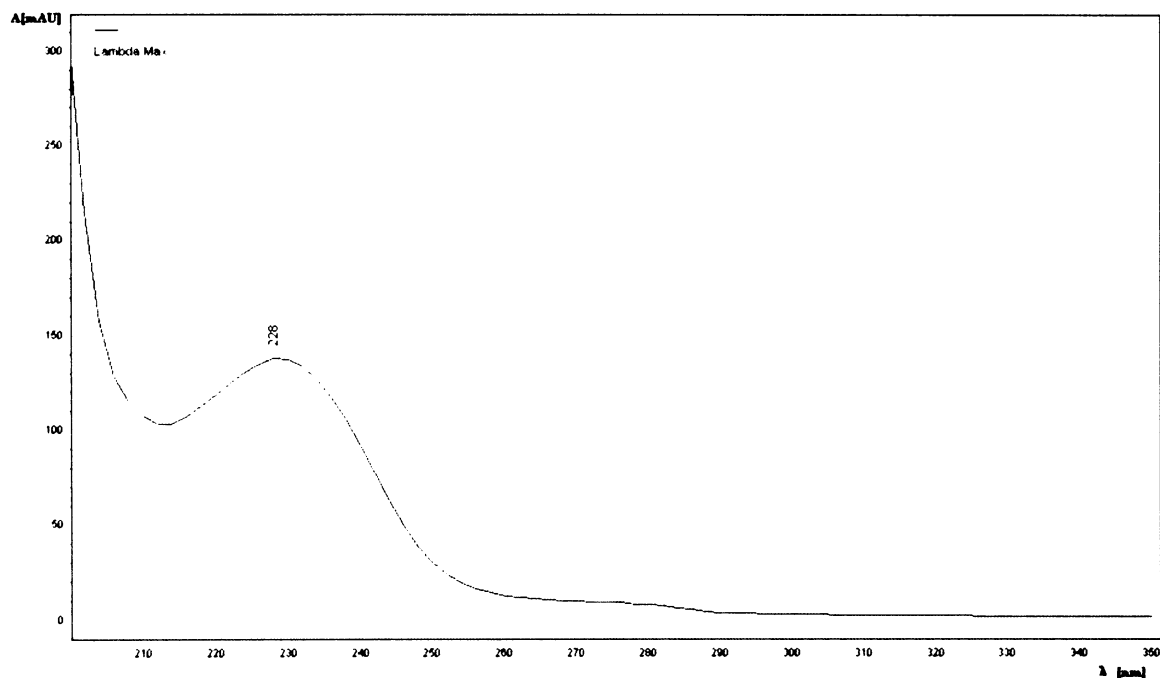
3.11. Charakteristika taxolu a 2'-sukcinyltaxolu jako výchozích látek

3.11.1. Charakteristika taxolu

Taxol byl charakterizován hmotnostní spektrometrií a změřením UV spektra (Obr. 52, str. 64). Hmotnostní spektrum je na obrázku 51, str. 64. Molekulová hmotnost taxolu je 853,0 a molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 876,1.



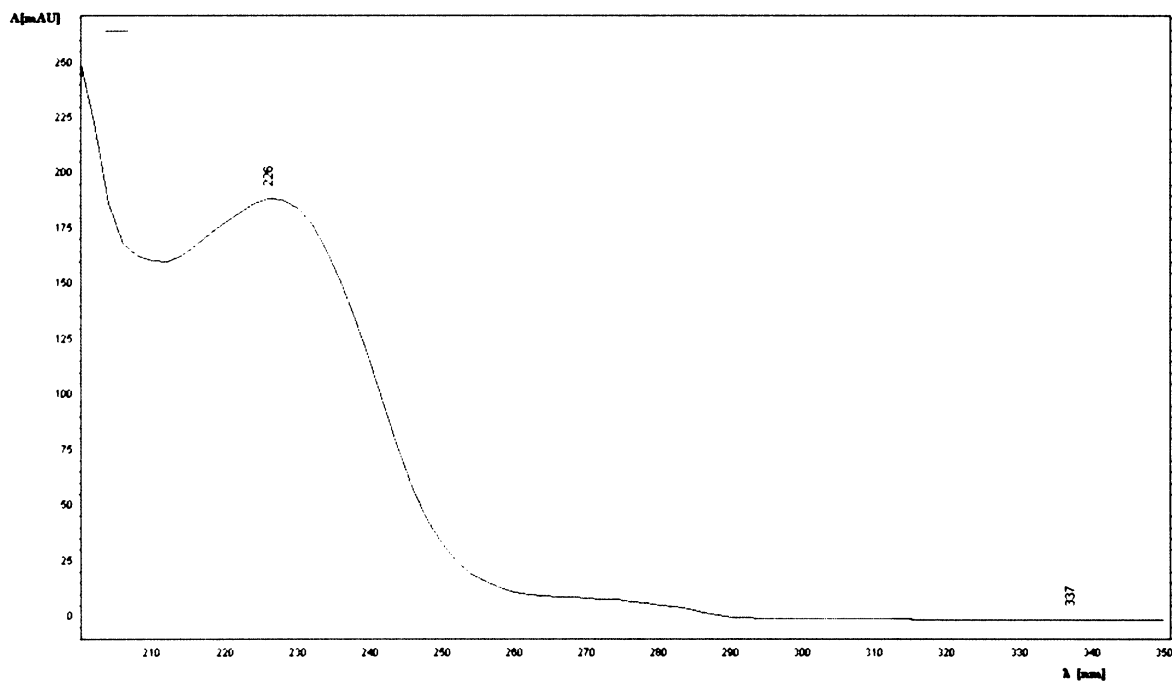
Obr. 51. Hmotnostní spektrum taxolu



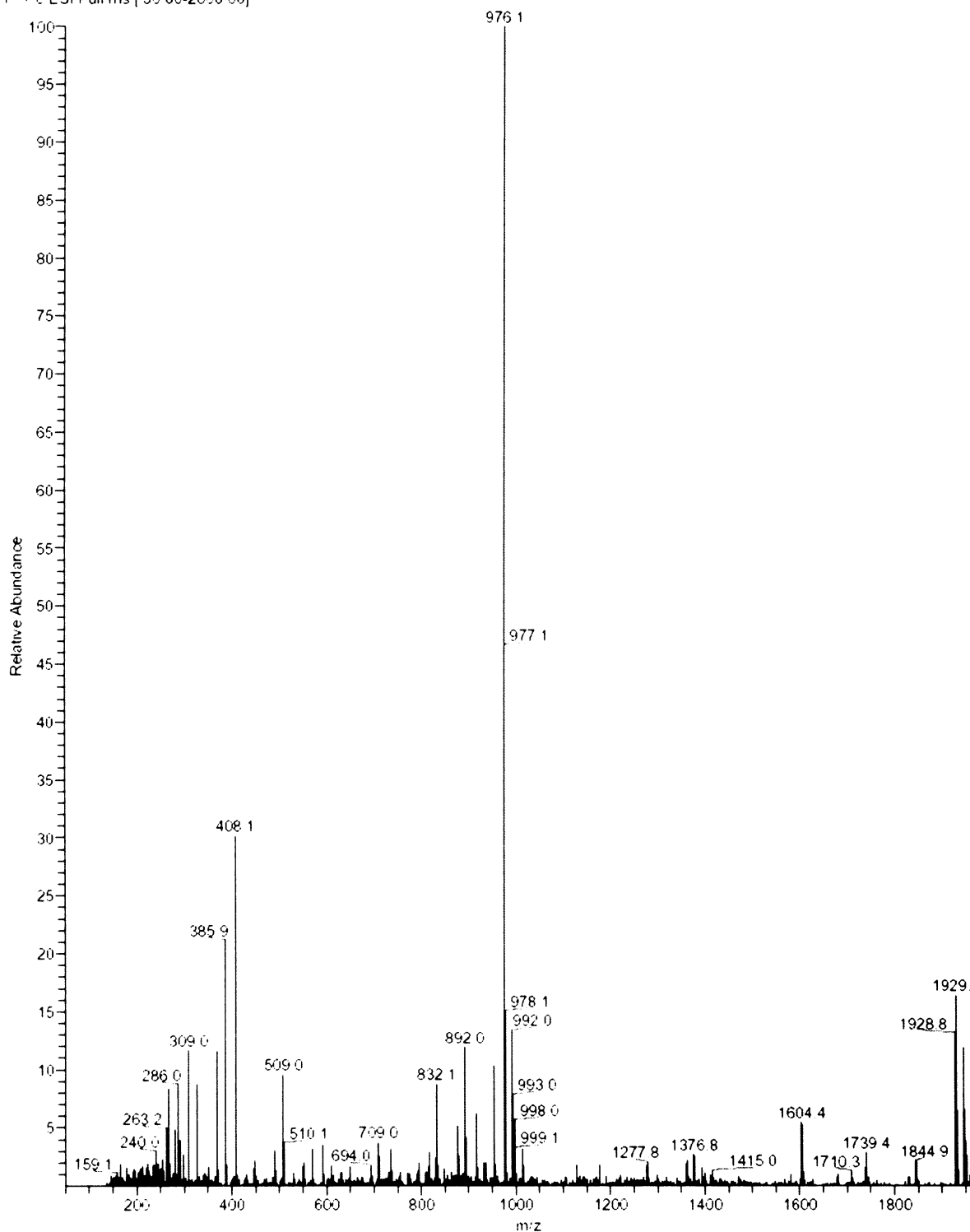
Obr. 52. UV spektrum taxolu

3.11.2. Charakteristika derivátu taxolu 2'-sukcinyltaxolu

2'-sukcinyltaxol byl charakterizován hmotnostní spektrometrií a změřením UV spektra (Obr. 53). Hmotnostní spektrum je na obrázku 54, str. 66. Molekulová hmotnost 2'-sukcinyltaxolu je 954,0 a molekulová hmotnost aduktu $(M+Na)^+$ je 976,1.



Obr. 53. UV spektrum derivátu taxolu sukcinyltaxolu

3249pm01 #1465-1493 RT 31.05-31.56 AV 29 SB 25 30 41-30 85 NL 4 74E6
T + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

Obr. 54. Hmotnostní spektrum derivátu taxolu 2'-succinyltaxolu

3.12. Test cytostatické aktivity derivátů taxolu *in vitro*

Cytostatická aktivita byla stanovena jako hodnota IC₅₀ (viz kapitola 2.17.). IC₅₀ je hodnota koncentrace (nmol.l⁻¹) testované látky, při které je zastaven růst 50% buněk. V tabulce 19 jsou hodnoty pro jednotlivé připravené deriváty taxolu na jednotlivých druzích tkáňových kultur. Pro srovnání je uvedena i hodnota IC₅₀ taxolu.

Látka	IC ₅₀ (nmol.l ⁻¹)			
	<i>L1210</i>	<i>HL-60</i>	<i>HeLa S3</i>	<i>CCRF-CEM</i>
Taxol-sukcinyl-GnRH	220	18	7 600	24
2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxol	381	110	133	40
2'-(chloracetyl)glycyl)taxol	400	47	39	26
2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol	740	147	533	131
Taxol	94	20	35	16

Tabulka 19. Hodnoty cytostatických testů

L1210 - myší leukemické buňky

HL-60 - buňky lidské promyelocytické leukemie

HeLaS3 - buňky karcinomu děložního čípku

CCRF-CEM - buňky lidských T-lymfoblastoidů

4. Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo připravit deriváty taxolu se zaměřením na deriváty s cíleným účinkem. Tyto deriváty taxolu musí splňovat několik základních vlastností. Ta hlavní je, že derivát nesmí být pro organismus toxický při transportu krevním řečištěm, ale jeho toxicita se musí projevit až po uvolnění taxolu a jeho 2' OH skupiny uvnitř buňky na základě enzymatického štěpení či pH. Pro přípravu takového derivátu je důležitý výběr navigační molekuly, která derivát taxolu navádí ke svým receptorům a způsob jejího navázání na taxol s využitím vhodného můstku.

Můstkem je organická látka nesoucí na svých koncích volné funkční skupiny, které mohou tvořit vazbu na jedné straně s taxolem a na druhé s navigační molekulou. V molekule taxolu jsou tři volné hydroxylové skupiny v polohách 1, 7 a 2'. V našem případě byla vazba můstků na taxol prováděna esterifikací OH skupiny nacházející se v poloze 2', tedy na druhém uhlíku fenylisoserinového řetězce taxolu. Tento výběr byl podložen fyzikálními vlastnostmi této skupiny⁹ a na základě již připraveného cíleného derivátu Taxol-sukcinyl-Octreotid¹. Derivatizace právě této OH skupiny by také měla zaručit nízkou toxicitu derivátu, neboť je důležitá při vazbě taxolu na mikrotubuly. Můstek tedy musí být tvořen na jednom konci volnou karboxyskupinou a na druhém konci může být tvořen aminoskupinou, karboxyskupinou, hydroxyskupinou, sulfhydrylovou skupinou či chloridovou skupinou. Na základě požadovaných vlastností byly vybrány 2 látky, chloracetylglycin a sukcinát, pro přípravu základních můstkových derivátů taxolu. Tyto deriváty mohou sloužit buď přímo k navázání navigační molekuly nebo k navázání dalšího můstku, který by měl na svém konci jinou funkční skupinu. 2'-sukcinyltaxol byl tak využit k přípravě delšího můstkového derivátu, 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxolu, nesoucího koncovou OH-skupinu k navázání navigační molekuly. Chloridová skupina 2'-(chloracetyl)glycyl)taxolu může být využita pro navázání navigační molekuly, jejíž řetězec bude obsahovat volnou SH skupinu, například cysteinu.

Problémová se ukázala být příprava můstku nesoucího volnou NH₂ skupinu. Takovýto charakter můstku splňují například aminokyseliny. Připojení volné aminokyseliny přímo na taxol však není možné, vzhledem k rozdílné polaritě, a tedy i rozpustnosti, aminokyselin a taxolu. Proto byly k syntéze použity aminokyseliny s chráněnou NH₂ skupinou. Chránící skupiny aminokyselin mají hydrofóbní charakter a zvyšují tak rozpustnost aminokyseliny v organických rozpouštědlech. Pro syntézu byly

zvoleny dva typy chránících skupin. Prvním z nich byla tert-butyloxykarbonylová skupina (Boc). Na základě tohoto výběru byl připraven derivát 2'-(Boc-glycyl)taxol. Aby tento derivát mohl sloužit jako můstková molekula pro připojení navigační molekuly, bylo nutné odstranění chránící skupiny. Pro její odstranění nelze použít klasického způsobu ochrání pomocí trifluoroctové kyseliny (TFA), kterého se používá při syntéze peptidů, neboť dochází k porušení struktury taxolu. Proto byly zvoleny tři jiné postupy (viz kapitola 2.7.), které byly popsány autory Mathew et al.¹¹³ a Deutsch et al.¹¹⁴. Avšak ani tyto metody se neukázaly být vhodné, neboť při nich docházelo k rozpadu můstkové molekuly na volný taxol.

Proto byla zvolena nová chránící skupina, fenylacetylová skupina (Phac). Tuto chránící skupinu lze odštěpit enzymaticky, tedy za podmínek mírnějších než při štěpení chemickými činidly. Tuto skupinu odštěpuje enzym penicilinacylasa, který je k tomuto účelu běžně používán. Hlavním problémem při práci s enzymy a taxolovými deriváty je nalezení takových reakčních podmínek při nichž enzym aktivně katalyzuje danou reakci a derivát taxolu je v tomto roztoku rozpustný (enzymy jsou aktivní ve vodných prostředích, ve kterých nejsou deriváty taxolu rozpustné). V našem případě se jako vhodná ukázala směs 68 % methanolu ve vodě. V tomto prostředí je penicilinacylasa aktivní a rozpustnost taxolového derivátu dostatečná (1 mg/ml). Přestože se podařilo najít vhodné podmínky k enzymatickému odstranění chránící skupiny z derivátů taxolu (2'-(Phac-glycyl)taxol, 2'-(Phac-alanyl)taxol), k ochránění nedošlo. Možným důvodem je hydrofobicita tohoto substrátu pro enzym či sterická náročnost.

Další možností přípravy můstkového derivátu taxolu s volnou NH₂ skupinou bylo navázání diaminu na 2'-sukcinyntaxol. Provedená syntéza s 1,7-diaminoheptanem však nebyla úspěšná, proto byla vhodnost použitých kondenzačních činidel a podmínek reakce ověřena analogickou reakcí při níž byl 1,7-diaminoheptan nahrazen 2-ethylhexylaminem. Tato syntéza byla úspěšná a výtěžek produktu, 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu, činil 25 %. Problémem se tedy ukázalo být použití diaminu jako výchozí látky. K reakci s diaminem nejspíše nedošlo vzhledem k jeho bazicitě či teplotě, při které byla reakce prováděna.

Pro navázání navigační molekuly na můstkové deriváty bylo nutné upravit navigační molekuly na formu vhodnou k navázání na můstkový derivát. Jako navigační molekuly jsem použila 2 látky: hormon GnRH, respektive jeho fragmenty a derivát oxytocinu, DesGly(NH₂)carbetocin. Fragmenty GnRH byly připravovány syntézou na

pevné fázi a jejich peptidové řetězce byly zakončeny buď volnou NH₂ skupinou nebo COOH skupinou. Bylo tedy možné je rovnou použít k navázání na můstkový derivát. Jinak tomu bylo u Carbetocinu, tato molekula peptidového hormonu neobsahuje žádnou volnou skupinu, kterou by mohla být spojena s můstkem. Volná skupiny byla získána enzymatickým štěpením koncového glycinamidu za vzniku volné karboxyskupiny leucinu. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo připravit derivát taxolu s můstkem, který by byl zakončen volnou NH₂ skupinou, nebyla látka DesGly(NH₂)carbetocin při syntéze cíleného derivátu použita.

Fragment GnRH s volnou NH₂ skupinou byl použit k přípravě cíleného derivátu GnRH-sukcinyl-taxolu. Identifikace tohoto derivátu byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie a NMR.

Bioaktivita derivátů taxolu byla testována na čtyřech tkáňových kulturách: L1210 (myší leukemické buňky), HL-60 (buňky lidské promyelocytické leukémie), HeLaS3 (buňky karcinomu děložního čípku), CCRF-CEM (buňky lidských T-lymfoblastoidů) a vyjádřena hodnotou IC₅₀. U 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxolu, 2'-(chloracetyl)glycyl)taxolu a 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxolu byly hodnoty IC₅₀ srovnatelné s hodnotou IC₅₀ taxolu. Jejich vyšší hodnota v porovnání s taxolem může být způsobena změnou fyzikálních či sterických vlastností derivátů, uplatňujících se při jejich vstupu do buňky pasivní difuzí. Cytotoxická aktivita těchto látek je také podmíněna jejich rozpadem v buňce za uvolnění molekuly taxolu, neboť tyto deriváty jsou tvořeny esterifikací 2'-OH skupiny taxolu, která je pro cytotoxicitu nezbytná. Nedojde-li tedy k úplnému rozpadu derivátu v buňce, pak je i cytotoxická aktivita nižší.

Výrazný rozdíl v hodnotě IC₅₀ byl pozorován u cíleného derivátu taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH. Předpokladem bylo, že tato látka bude mít nejvyšší cytotoxickou aktivitu u tkáňové kultury karcinomu děložního čípku HeLaS3, neboť její buňky nesou receptory pro GnRH. Hodnota IC₅₀ byla ovšem u této tkáňové kultury velmi vysoká. Důvod její nízké cytotoxicity pro tyto kultury je předmětem dalších studií. Příčinou může být navázání cíleného derivátu taxolu na povrchové receptory GnRH bez následné receptorem zprostředkované endocytózy. To také naznačuje, že se tento cílený derivát pravděpodobně nerozpadá v médiu tkáňových kultur, a že tedy nedochází k uvolnění taxolu. Naměřená hodnota IC₅₀ pak vyjadřuje cytotoxickou aktivitu cíleného derivátu, která odpovídá očekávání vzhledem k přítomnosti esterifikované 2'-OH skupiny. Tento výsledek je v rozporu i s výsledky uváděnými u derivátu Taxol-sukcinyl-Octreotid¹, jehož charakter

by měl měl odpovídat našemu derivátu Taxol-sukcinyl-GnRH a u něhož byla selektivita i cytotoxicita vůči buňkám nesoucím příslušné receptory vysoká.

Pro analýzu a dělení reakčních směsí byla použita vysokotlaká kapalinová chromatografie. HPLC byla zvolena na základě předchozích zkušeností s dělením látek taxolového charakteru. Látky byly detekovány UV detektorem a data byla vyhodnocována softwarem Clarity a EZChrom. EZChrom poskytuje UV spektra měřených látek. Tato spektra jsou důležitá při charakterizaci látek, neboť každé spektrum taxolového derivátu nese charakter taxolového UV spektra. Tato skutečnost pomáhá při předběžné identifikaci jednotlivých frakcí. Vlastní identifikace látek byla provedena hmotnostní spektrometrií popř. NMR analýzou.

5. Souhrn

V rámci diplomové práce byly připraveny tyto látky:

1) derivát taxolu 2'-(2-ethylhexylamin-sukcinyl)taxol

2) derivát taxolu plnící funkci můstku 2'-(triethylenglykol-sukcinyl)taxol

2'-(chloracetyl)glycyl)taxol

2'-(Boc-glycyl)taxol

2'-(Phac-glycyl)taxol

2'-(Phac-alanyl)taxol

3) navigační molekula Des(GlyNH₂)carbetocin

4) cílený derivát taxolu Taxol-sukcinyl-GnRH

1. Chung-Ming H., Ying-Ta W., Shui-Tei C. (2000). *Chem Biol* **7**, 453-61.
2. Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Caggion P., McPhail A.T. (1971). *J Am Chem Soc* **93**, 2325.
3. Wiernik P.H., Schwartz E.L., Strauman J.J., Dutcher J.P., Lipton R.B., Paietta E. (1987). *Cancer Res.* **47**, 2486–493.
4. Rowinsky E.K., Donehower R.C. (1995). *N Eng J Med* **332**, 1004–14.
5. Rizzo R., Riley C., Von Hoff D., Kuhn J., Philips J., Brown T. (1990). *J Pharm Biomed Anal* **8**, 159.
6. Wiernik P.H., Schwartz E.L., Einzig A., Strauman J.J., Lipton R.B., Dutcher J.P. (1987). *J Clin Oncol* **5**, 1232.
7. Rowinsky E.K., Donehower R.C. (1993). *Semin Oncol* **20**, 16.
8. Adams J.D., Flora K., Goldspiel B.R., Wilson J.W., Finley R. (1993). *J Nat Cancer Inst Monogr* **15**, 141.
9. Vaněk T. (2005). Závěrečná zpráva, ÚOCHB AV ČR
10. Rowinsky E.K., Cazenave L.A., Donehower R.C. (1990). *J Natl Cancer Inst* **82** , 1247-59.
11. Dustin P. (1980). *Sci Am* **243** , 66-76.
12. Wilson L. (1975). *Ann N Y Acad Sci* **25** , 213-31.
13. Crossin K.L., Carney D.H. (1981). *Cell* **27**, 341-50.
14. Schiff P.B., Fant J., Horwitz S.B. (1979). *Nature* **277**, 665-67.
15. Rowinski E.K., Donehower R.C., Jones R.C., Tucker. R.W. (1988). *Cancer Res* **48**, 4093-100
16. Parness J., Horwitz S.B. (1981). *J Cell Biol* **91**, 479-87.
17. Manfredi J.J., Parness J., Horwitz S.B. (1982). *J Cell Biol* **94**, 688-96.
18. Schiff P.B., Horwitz S.B. (1981). *Biochemistry* **20**, 3247-252.

19. Kumar N. (1981). *J Biol Chem* **256**, 10435-441.
20. Wilson L., Miller H.P., Farrell K.W., Snyder K.B., Thompson W.C., Purich D.L. (1985). *Biochemistry* **24**, 5254-562.
21. Hamel E., del Campo A.A., Lowe M.C., Lin C. (1981). *J Biol Chem* **256**, 11887-894.
22. Jordan M.A., Toso R.J., Thrower D., Wilson L. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9552-556.
23. Schiff, P. B., Horwitz, S. B. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77**, 1561-565
24. De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R., Mey J. (1981). *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5608-12
25. Burkhardt C.A., Berman J.W., Swindell C.S., Horwitz S.B. (1994). *Cancer Res* **54**, 5779-782.
26. Rao S., Horwitz S.B., Ringel I. (1992). *J Natl Cancer Inst* **84**, 785-88.
27. Rao S., Krauss N.E., Heerding J.M. (1994). *J Biol Chem* **269**, 3132-134.
28. Tishler R.B., Schiff P.B., Geard C.R., Hall E.J. (1992) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **22**, 613-17.
29. Tishler R.B., Geard C.R., Hall E.J., Schiff P.B. (1992). *Cancer Res* **52**, 3495-497.
30. Choy H., Akerley W., Safran H. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 2682-686.
31. Sarosy G., Kohn E., Stone D.A. (1992). *J Clin Oncol* **10**, 1165-170.
32. McGuire W.P., Rowinsky E.K., Rosenshein N.B. (1989). *Ann Intern Med* **111**, 273-79.
33. Thigpen J.T., Blessing J.A., Ball H., Hummel S.J., Barrett R.J. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 1748-753.
34. Einzig A.I., Wiernik P.H., Sasloff J., Runowicz C.D., Goldberg G.L. (1992). *J Clin Oncol* **10**, 1748-753.
35. Kohn E.C., Sarosy G., Bicher A. (1994). *J Natl Cancer Inst* **86**, 18-24.
36. Holmes F.A., Walters R.S., Theriault R.L. (1991). *J Natl Cancer Inst* **83**, 1797-805.
37. Reichman B.S., Seidman A.D., Crown J.P. (1993). *J Clin Oncol* **11**, 1943-951.

38. Seidman A., Crown J., Reichman B. (1993). *Proc Am Soc Clin Oncol* **12**, 63
39. Holmes F.A., Valero V., Theriault R.L. (1993). *Proc Am Soc Clin Oncol* **12**, 94
40. Murphy W.K., Fossella F.V., Winn R.J. (1993). *J Natl Cancer Inst* **85**, 384-88.
41. Chang A.Y., Kim K., Glick J., Anderson T., Karp D., Johnson D. (1993). *J Natl Cancer Inst* **85**, 388-94.
42. Forastiere A.A., Neuberg D., Taylor S.G., Deconti R., Adams G. (1993). *ECOG trial. Monogr Natl Cancer Inst* **15**, 181-84.
43. Einzig A.I., Gorowski E., Sasloff J., Wiernik P.H. (1991). *Cancer Invest* **9**, 133-36.
44. Roth B.J., Yeap B.Y., Wilding G., Kasimis B., McLeod D., Loehrer P.J. (1993). *ECOG* **72**, 2457-460.
45. Einzig A.I., Wiernik P.H., Lipsitz S., Benson A. (1993). *ECOG results. Proc Am Soc Clin Oncol* **12**, 194. abstract.
46. Brown T., Tangen C., Fleming T., Macdonald J. (1993) *Proc Am Soc Clin Oncol* **13**, 200
47. Rowinsky E.K., Onetto N., Canetta R.M., Arbusk S.G. (1992). *Semin Oncol* **19**, 646-62.
48. Roth B.J., Dreicer R., Einhorn L.H.(1994). *ECOG,. Proc Am Soc Clin Oncol* **13**, 230
49. Ajani J.A., Ilson D.H., Daugherty K., Pazdur R., Lynch P.M., Kelsen D.P. (1994). *J Natl Cancer Inst* **86**, 1086-91.
50. Motzer R.J., Bajorin D.F., Schwartz L.H. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 2277-283.
51. Lasser E.C., Walters A., Reuter S.R., Lang J. (1971). *Radiology* **100**, 683-86.
52. Weiss R.B., Donehower R.C., Wiernik P.H. (1990). *J Clin Oncol* **8**, 1263-268.
53. Eisenhauer E.A., ten Bokkel Huinink W.W., Swenerton K.D. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 2654-666.
54. Lassus M., Scott D., Leyland-Jones B. (1985). *Proc Am Soc Clin Oncol* **4**, 268

55. Rowinsky E.K., Eisenhauer E.A., Chaudhry V., Arbuck S.A., Donehower R.C. (1993). *Semin Oncol* **20**, Suppl 3:1-15.
56. McGuire W.P., Rowinsky E.K., Rosenshein N.B. (1989). *Ann Intern Med* **111**, 273-79.
57. Holmes F.A., Walters R.S., Theriault R.L. (1991). *J Natl Cancer Inst* **83**, 1797-805.
58. Eisenhauer E.A., ten Bokkel Huinink W.W., Swenerton K.D. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 2654-666.
59. Rowinsky E.K., Chaudhry V., Cornblath D.R., Donehower R.C. (1993). *Monogr Natl Cancer Inst* **15**, 107-15.
60. Thigpen J.T., Blessing J.A., Ball H., Hummel S.J., Barrett R.J. (1994). *J Clin Oncol* **12**, 1748-753.
61. Trimble E.L., Adams J.D., Vena D. (1993). *J Clin Oncol* **11**, 2405-410.
62. Rowinsky E.K., Gilbert M., McGuire W.P. (1991). *J Clin Oncol* **9**, 1692-703.
63. Rowinsky E.K., McGuire W.P., Guarnieri T., Fisherman J.S., Christian M.C., Donehower R.C. (1991). *J Clin Oncol* **9**, 1704-712.
64. Arbuck S.G., Strauss H., Rowinsky E. (1993). *Monogr Natl Cancer Inst* **15**, 117-30.
65. Rowinsky E.K., Burke P.J., Karp J.E., Tucker R.W., Ettinger D.S., Donehower R.C. (1989). *Cancer Res* **49**, 4640-647.
66. Cabral F., Wible L., Brenner S., Brinkley B.R. (1983). *J Cell Biol* **97**, 30-39.
67. Horwitz S.B., Cohen D., Rao S., Ringel I., Shen H.J., Yang C.P. (1993). *Monogr Natl Cancer Inst* **15**, 55-61
68. Gupta R.S. (1983). *J Cell Physiol* **114**, 137-44.
69. Schneider B., Dtsch. Apoth. (1994). *Ztg* **134**, 3389-400
70. Poitier P. (1993). *Nach. Chem Tech Lab* **41**, 559-64
71. Tender P.A., Baham N.F., Conway S.P., Floreancig P.E., Glass T.E., Houze J.B., Krauss N.E., Sutton J.C., Tailor R.E. (1997). *ibis* **119**, 2757-758

72. Stierle A., Strobek G., Stierle D. (1993). *Science* **260**, 214-16
73. Dahiya J.S. (1996). *Chem Abstr* **125**, 326547, 1996
74. Yukimune Y. (1996). *Nat Biotech* **14**, 1129
75. Parekh H., Simpkins H. (1996). *Biochem Pharmacol* **51**, 301-11
76. Neill J.D. (2002). *Endocrinology* **143**, 737-43.
77. Pitteloud N., Hayes F.J., Dwyer A., Boepple P.A., Lee H., Crowley. (2002). *J Clin Endocr Metab* **87**, 4128-136.
78. Wikipedia, free encyklopedia , <http://cs.wikipedia.org>
79. Dvořáček J. (1999). *Remedia* **1**
80. Harrison I G.S., Wierman I M.E., Nett T.M., Glode I L.M. (2004). *Endocr Relat Cancer* **11**, 725-48
81. Guillemin R. (1967). *Annu Rev Physiol* **29**, 313-48.
82. Densmore V.S. , Urbanski H.F. (2003) *J Clin Endocr Metab* **88**, 2126-134.
83. Tobet S.A., Bless E.P., Schwarting G.A. (2001). *Mol Cell Endocrinol* **185**, 173-84.
84. Wierman M.E., Pawlowski J.E., Allen M.P., Xu M., Linseman D.A., Nielsen-Preiss S. (2004) *Trends Endocrin Met* **15**, 96-102.
85. Terasawa E. , Fernandez D.L. (2001). *Endocr Revs* **22**, 111-51.
86. Masopust J. (2003). *Patobiochemie buňky*, Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, Praha
87. Kraus S., Naor Z., Seger R. (2001). *Arch Med Res* **32**, 499-509.
88. Shah B.H., Farshori M.P., Jambusaria A., Catt K.J. (2003). *J Biol Chem* **278**, 19118-9126.
89. Skříčková J., CSc. (2004). *Lékařské listy*
90. Roelle S., Grosse R., Aigner A., Krell H.W., Czubyko F., Gudermann T. (2003). *J Biol Chem* **278**, 47307-7318.

- 91 Kang S.K., Cheng K.W., Ngan E.S., Chow B.K., Choi K.C., Lejny P.C. (2000). *Mol Cell Endocrinol* **162**, 157–66.
92. Imai A., Tamaya T. (2000). *Vitamins and Hormones* **59**, 1–33.
- 93 Chatzaki E., Bax C.M., Eidne K.A., Anderson L., Grudzinskas J.G., Gallagher C.J. (1996). *Cancer Res* **56**, 2059–65.
94. Simms M.S., Scholield D.P., Jacobs E., Michaeli D., Broome P., Humphreys J.E., Bishop M.C. (2000). *Brit J Cancer* **83**, 443–46.
95. Gympf G., Fahrenholz F. (2001). *Physiol Rev* **81**, 629-83
96. Barth T., Krejci I., Vaneckova J., Jost K., Rychlik I. (1974). *Eur J Pharmacol* **25**, 67-70
97. Firemní dokumentace Polypeptide Labororiem. (2004). Bulletin **32**
98. Jost K. (1987). v knize *Handbook of Neurohypophyseal Hormone Analogues* Vol. I., Part 2 str. 144, CRC Press Inc. (editoři Jost. K., Lebl M., Brtnik F.)
99. Flegel M., Sedlák L. (2004). Bulletin **32**
100. Barth T., Pliška V., Rychlik I. (1967). *Coll Czech Chem Commun* **32**, 1058-63
101. Albericio, F., Chinchilla, R., Dodsworth, D., Nájera, C. (2000). *Org Prep & Proc Int* **33**, 203.
102. Carpino L.A., El-Faham A. (1994). *J Org Chem.* **59**, 685
103. Carpino L.A., Ionescu D., El-Faham A. (1996). *J Org Chem* **61**, 2460
104. DeTar D.F., Silverstein R. (1966) *J Am Chem Soc* **88**, 1013
105. DeTar D.F., Silverstein R. (1966). *J Am Chem Soc* **88**, 1020
106. Arendt A., Kolodziejczyk A.M. (1978) *Tetrahedron Lett*, 3867
107. Jones J.J. (1979). *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* **1**, 65-104,
108. Barany G., Merrifield R.B. (1979). *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* **2**, 1-284

109. Rich D.H. , Singh J. (1979). *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* **1.**, 241-61
110. Peptiden zu Peptidmimetika (2000) <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/heine-niklas-2000-07-21/HTML/heine-ch2.html>
111. Greenwald R.B., Gilbert C.W., Pedri A., Conover C.D., Xia J., Martinez A. (1996). *J Med Chem* **19.**, 424-31
112. Osobní sdělení : RNDr. Jiří Velek Ph.D.
113. Abraham E. M., Magdalena R., Mejillano J. P., Nath R. H., Himes V. J. (1991). *J Med Chem* **35.**, 145-51
114. Deutsch H. M., Glinski J.A., Hernandez M., Haugwitz R.D., Narayanan V.L., Suffness M., Zalkow L.H. (1989). *J Med Chem* **32.**, 788-92
115. Osobní sdělení : RNDr. Tomislav Barth, DrSc.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.“

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka