

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra chemie**

**Syntéza intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených  
od kyseliny 4-amino salicylové**

**Bakalářská práce**

Autor: Adam Rohlíček  
Studijní program: B1407 Chemie  
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin  
Vedoucí práce: RNDr. Miroslav Psotka, PhD.

# UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adam Rohlíček**  
Osobní číslo: **S16CH030BP**  
Studijní program: **B1407 Chemie**  
Studijní obor: **Toxikologie a analýza škodlivin**  
Téma práce: **Syntéza intermediátorů STAT3 odvozených od kyseliny 4-amino salicylové**  
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity STAT3 inhibitorů
2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připravených derivátů, které budou poskytnuty na biologické testování jako potenciální STAT3 inhibitory.
3. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- 1.) Zhang et al., Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses human breast and lung cancer xenografts, PNAS, 2012, 109, 9623-9628.
- 2.) Chengguang Zhao, Huameng Li, Huey-Jen Lin, Shulin Yang, Jiayuh Lin and Guang Liang, Feedback Activation of STAT3 as a Cancer Drug-Resistance Mechanism, Trends Pharmacol. Sci., 2016, 37, 47-61.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Miroslav Psotka, PhD.**  
Katedra chemie

Oponent bakalářské práce: **RNDr. Patrik Olekšák**  
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: 23. září 2019  
Termín odevzdání bakalářské práce: 5. května 2020

L.S.

---

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.  
děkan

---

prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.  
vedoucí katedry

**Prohlášení:**

*„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.“*

V Hradci Králové dne 5. 5. 2020

Adam Rohlíček

## **Poděkování:**

Upřímně děkuji RnDr. Miroslavu Psotkovi PhD. za veškerou pomoc při práci v laboratoři a za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu práce věnoval.

## **Anotace**

ROHLÍČEK, Adam, *Syntéza intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených od kyseliny 4-amino salicylové*; Hradec Králové, 2019. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta.

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených od kyseliny 4-aminosalicylové. Teoretická část práce je zaměřena na seznámení se s problematikou STAT proteinů a jejich nejzajímavější podskupinou STAT3 proteinů. Dále jsou zde popsány možné způsoby inhibice těchto proteinů s příklady konkrétních inhibitorů. Praktická část práce je soustředěna na syntézu čtyřech syntonů, které vedou k tvorbě sloučenin odvozených od inhibitoru BP-1-102.

## **Klíčová slova**

Rakovina, STAT proteiny, STAT3, inhibitory STAT3, BP-1-102, kyselina 4-amino salicylová

## **Annotation**

This bachelor thesis focuses on the synthesis of STAT 3 inhibitors intermediates derived from 4-aminosalicylic acid. The theoretical part deals with the problematics of STAT proteins and its most interesting subgroup of STAT3 proteins. The next chapters explain the possible methods of STAT3 inhibition with specific examples of such inhibitors. The practical part then presents possible synthesis of four synthons, which lead to the formation of compounds derived from BP-1-102

## **Keywords**

Cancer, STAT proteins, STAT3, STAT3 inhibitors, BP-1-102, 4-aminosalicylic acid

# Obsah

Seznam zkratk	8
Seznam obrázků	10
Seznam schémat	11
1. Úvod	12
2. STAT proteiny	16
2.1 STAT3 proteiny	16
2.2 STAT3 inhibitory	19
2.2.1 Upstream inhibitory	19
2.2.1.1 Inhibitory receptorů na povrchu buněk	19
2.2.1.2 Kinázové inhibitory	21
2.2.2 Přímé inhibitory STAT3	23
2.2.2.1 STAT3 SH2 doménové inhibitory	23
2.2.2.2 STAT3 DNA-vázající doménové inhibitory	26
3. Cíl práce	27
4. Výsledky a diskuze	28
4.1 Syntéza benzylovaných derivátů kyseliny 4-aminosalicylové	29
4.2 Syntéza stavebních bloků 2-4	33
5. Experimentální část	36
5.1 Všeobecný postup benzylace kyseliny 4-amino salicylové (10):	37
5.2 Všeobecný postup konjugace primárního aminu (8) s aldehydem (5-7) a následná redukce iminu:	39
6. Závěr	41
7. Zdroje	42

## Seznam zkratek

AcOH	Kyselina octová
Bn	Benzyl
BnBr	Benzyl bromid
CDCl <sub>3</sub>	Deuterovaný chloroform
DBD	<b>DNA-binding Domain</b>
DCM	<b>Dichlormethan</b>
DMF	<b>Dimethylformamid</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
EGF	<b>Epidermal Growth Factor</b>
EtOAc	Ethyl acetát
FDA	<b>Food and Drug Administration</b>
FGF	<b>Fibroblast Growth Faktor</b>
H:EA	Hexan:Ethylacetát
HGF	<b>Hepatocyte Growth Factor</b>
IGF	<b>Insulin-like Growth Factor</b>
IL	<b>Interleukin</b>
JAK	<b>Janus Kináza</b>
KO <sup>t</sup> Bu	<i>Tert</i> -Butoxid draselný
LIF	<b>Leukemia Inhibitory Factor</b>
l.t.	Laboratorní teplota
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol



NaBH <sub>3</sub> CN	Kyanoborohydrid sodný
NMR	<b>N</b> ukleární <b>M</b> agnetická <b>R</b> ezonance
PDGF	<b>P</b> latelet- <b>d</b> erived <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
R <sub>f</sub>	<b>R</b> etenční faktor
RVO	<b>R</b> otační <b>V</b> akuová <b>O</b> dparka
SH2	<b>S</b> rc <b>H</b> omology 2
SN <sub>2</sub>	<b>S</b> ubstituce <b>N</b> ukleofilní bimolekulová (2)
STAT	<b>S</b> ignal <b>T</b> ransducer and <b>A</b> ctivator of <b>T</b> ranscription
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<sup>t</sup> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TFA	<b>T</b> rifluoro <b>a</b> cetic <b>A</b> cid; Kyselina trifluoroctová
TLC	<b>T</b> hin <b>L</b> ayer <b>C</b> hromatography; Tenkovrstvá chromatografie
VEGF	<b>V</b> askular <b>E</b> ndothelial <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
WHO	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganisation

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> „Hallmarks of Cancer“ .....	13
<b>Obrázek 2</b> Modulární struktura STAT proteinu.....	16
<b>Obrázek 3</b> Struktura STAT3 proteinu.....	17
<b>Obrázek 4</b> Signalizační kaskáda pro aktivaci STAT3.....	18
<b>Obrázek 5</b> Inhibitory receptorů na povrchu buňky.....	20
<b>Obrázek 6</b> JAK inhibitory.....	21
<b>Obrázek 7</b> Src inhibitory.....	22
<b>Obrázek 8</b> pan-JAK/Src inhibitory. ....	22
<b>Obrázek 9</b> Vzorec Stattic.....	24
<b>Obrázek 10</b> STA-21 a jeho deriváty.....	24
<b>Obrázek 11</b> S31-201 a jeho analog SF-1-066.....	25
<b>Obrázek 12</b> Další analogy sloučeniny S31-201.....	25
<b>Obrázek 13</b> Vzorec sloučeniny BP-1-102.....	25
<b>Obrázek 14</b> Všeobecná struktura látek (1-4).....	27
<b>Obrázek 15</b> Retrosyntetická analýza.....	28
<b>Obrázek 16</b> TLC destička.....	29
<b>Obrázek 17</b> <sup>1</sup> H NMR spektra produktů benzylace. ....	31

## Seznam schémat

<b>Schéma 1</b> Benzylace kyseliny 4-aminosalicylové.....	29
<b>Schéma 2</b> Benzylace kyseliny 4-amino-2-(benzyloxy)benzoové.....	30
<b>Schéma 3</b> Mechanismus benzylace kyseliny 4-aminosalicylové.....	30
<b>Schéma 4</b> Tvorba iminu a jeho následná redukce na amin.....	32
<b>Schéma 5</b> Reakční mechanismus vzniku iminu.....	32

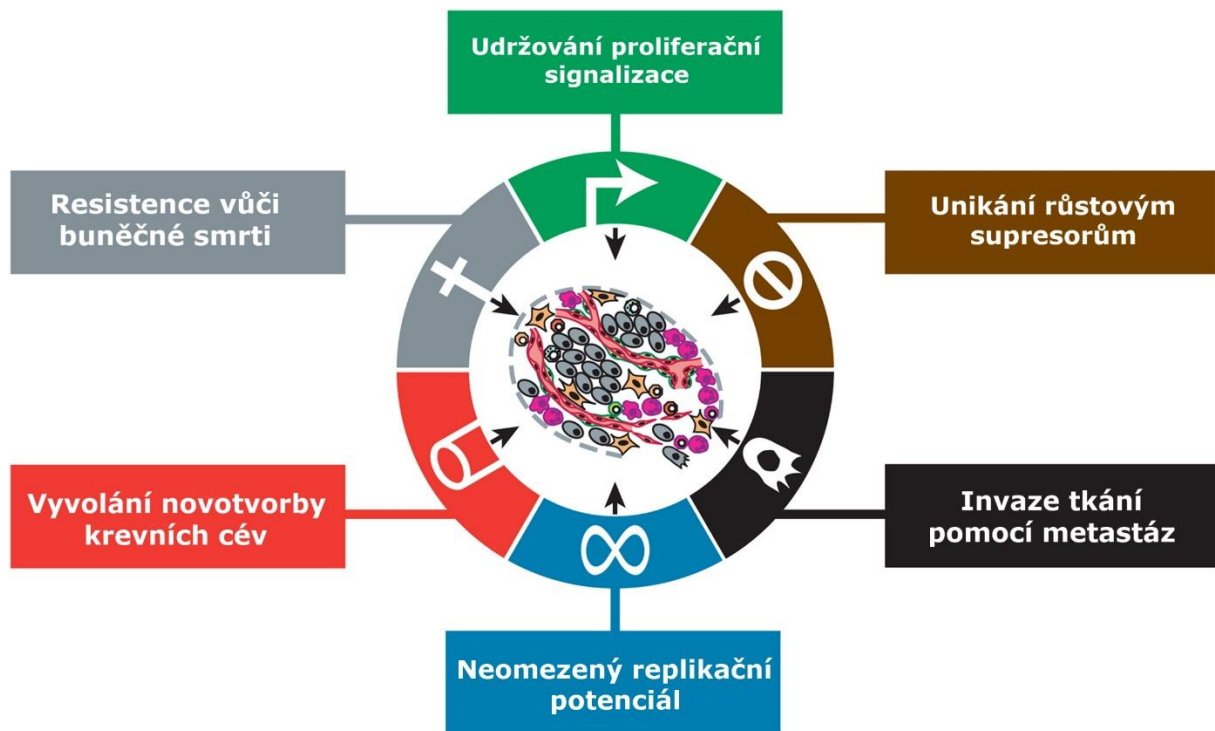
# 1. Úvod

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2018 zemřelo na rakovinová onemocnění přibližně 9,6 milionu lidí. To znamená, že 1 ze 6 úmrtí je způsobeno právě rakovinou. Toto číslo rok od roku roste, a proto zůstává snaha nalézt efektivní lék proti této široké skupině onemocnění jednou z celosvětových priorit medicínského výzkumu.<sup>(2)</sup>

Za rakovinu se považuje velká skupina chorob, které vykazují abnormální růst buněk s potenciálem se rozrůst i do jiných částí těla pomocí lymfatického a krevního systému. Za normálních okolností jsou buňky v těle schopny tuto růstovou mutaci detekovat a opravit, případně se samy rozloží apoptózou. U rakoviny jsou ale tyto tzv. nádorové buňky schopné růst bez přítomnosti růstových faktorů, dále nereagují na signály pro ukončení růstu a abnormální růst se tak vymkne kontrole. Takto zasažená skupina buněk často vytváří neoplasmus neboli nádor. Nádorové buňky se poté mohou od shluku odtrhnout a migrovat po těle organismu pomocí krevních a lymfatických cest, kde vytvářejí druhotná ložiska nádorových buněk tzv. metastázy.

Nádor je soubor buněk schopný samostatně růst bez řízení organismem. Může se vytvořit v jakékoliv tkáni, ale s největší pravděpodobností vzniká ve tkáních, kde dochází k největšímu množení buněk (např. v kostní dřeni). Nádory se rozdělují na maligní (zhoubné) a benigní (nezhoubné). Benigní nádory nejsou invazivní, což znamená, že se nemohou rozrůst do dalších částí těla. Postiženému většinou nezpůsobují závažné poruchy a po jejich odstranění mají, na rozdíl od maligních, malou šanci znovu narůst.<sup>(1-3)</sup>

Všechny buňky maligních nádorů vykazují tzv. šest znaků rakoviny (Obr. 1), poprvé popsanych vědci Hanahan a Weinberg roku 2000 ve vědeckém magazínu Cell v článku „The Hallmarks of Cancer“.<sup>(3)</sup>



**Obrázek 1: „Hallmarks of Cancer“.** Šest charakteristických znaků rakoviny (Obrázek převzat z Hanahan D; Weinberg RA *Cell*. 2011, 144; 646-674).

Tyto znaky jsou:

- 1) Udržování proliferací signalizace
- 2) Unikání růstovým supresorům
- 3) Invaze tkání pomocí metastáz
- 4) Neomezený replikační potenciál
- 5) Vyvolání novotvorby krevních cév
- 6) Resistance vůči buněčné smrti

Příčiny vzniku nádorového růstu jsou různorodé. Důležité jsou jak faktory vnějšího prostředí (např. UV záření, radiace, polycyklické uhlovodíky, azobarviva, toxiny produkované plísněmi atd.), tak životní styl jedince. Mezi nejsilnější faktory životního stylu patří kouření, které se podílí na 28-39 % všech nádorů a také výživové zvyky, ty mají 30% podíl na úmrtnosti na nádorová onemocnění. Tyto příčiny způsobují genetické změny v DNA (mutace). Vlivem mutace se z normálních genů stávají onkogeny, které jsou schopné iniciovat rakovinné bujení.

Šanci vyhnout se onemocnění rakovinou zvyšuje prevence. Prevenci nádorových onemocnění můžeme rozdělit na primární, sekundární a terciární:

- 1) **Primární prevence** spočívá v zábraně kontaktu s rakovinotvorným činitelem. Mezi nejsilnější patří již výše zmíněné faktory životního stylu. Nejjednodušší je vyhnout se kouření, nadměrné konzumaci alkoholu, uzenin nebo výrazně chemicky modifikovaných potravin a aktivně udržovat dobrou fyzickou a psychickou kondici jedince.
- 2) **Sekundární prevence** znamená včasnou detekci rakovinného onemocnění ve stádiu, kdy je ještě léčitelné. Základem je tedy aktivní vyhledávání nádorových onemocnění, což zahrnuje pravidelné gynekologické a andrologické (andrologie je lékařský obor, který se zabývá chorobami mužských reprodukčních orgánů) prohlídky, samovyšetření prsu a mamografie, testy na přítomnost krve ve stolici a podobně.
- 3) **Terciární prevence** znamená předcházení dalším škodám vznikajícím v důsledku rakovinného onemocnění nebo i terapie. Spočívá ve sledování pacientů s cílem včasného záchytu relapsu (znovuzasažení chorobou) rakoviny.<sup>(1-3)</sup>

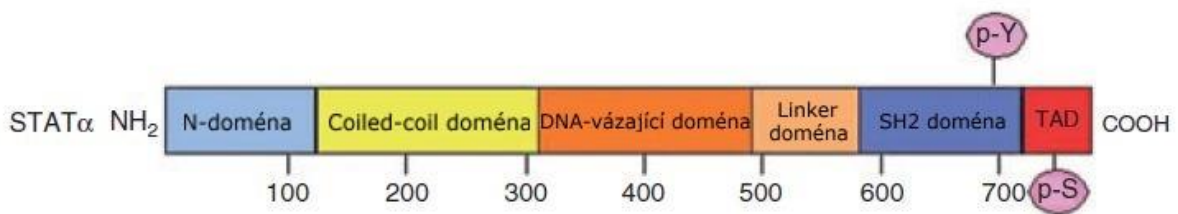
Po zasažení organismu rakovinou zpravidla následuje terapie daného nádorového onemocnění. Ta se rozlišuje podle léčebných záměrů, které jsou určeny typem a pokročilostí nádoru. Mezi nejdůležitější metody terapie patří:

- 1) **Chirurgická terapie** spočívající v operativním odstranění nádoru. Tato metoda je účinná u nádorů, které nemetastázuji. Často se odstraňuje i pouze část nádoru, čehož se využívá v případech, kdy by odstranění celého nádoru mohlo v těle poškodit postižený orgán.
- 2) **Chemoterapie** je metoda využívající cytostatika, což jsou látky, které poškozují DNA buňky. Principem účinku je toxicita pro buňku ve fázi dělení. Jelikož se nádorové buňky dělí rychleji než buňky zdravé, jsou vůči těmto látkám mnohem zranitelnější. Zdravé buňky jsou, na rozdíl od nádorových, také schopny poškozenou DNA opravit. Cytostatika bohužel mají značné vedlejší účinky, jelikož postihují i buňky, které se přirozeně rychle dělí (např. střevní epitel, krevní buňky, pohlavní buňky a další). V důsledku toho dochází k častým průjmům, anémii a leukopenii a vypadávání ochlupení těla. Naštěstí je většina těchto účinků reverzibilní, v léčbě se s nimi počítá a tyto projevy jsou zmírňovány.

- 3) **Radioterapie** je metoda terapie ionizujícím zářením, jehož energie je schopná hubit rakovinné buňky a tím nádor poškozovat. Principem léčebného zásahu je ničení genetického materiálu buněk, což vede k zabránění dělení a růstu. Tato metoda se často uplatňuje v kombinaci s chemoterapií.
- 4) **Imunoterapie** je metoda využívající stimulace imunitního systému k poškození nádorů. Jako příklad léčby lze uvést aktivní imunizaci pomocí očkování, kdy jsou leukocyty obohaceny o rozpoznávací systém – antigen a jeho receptor.<sup>(1-3)</sup>

## 2. STAT proteiny

STAT (signal transducer and activator of transcription) je skupina intracelulárních proteinů, které mají v buňce duální roli přenašečů signálů a transkripčních faktorů. Zprostředkovávají a ovlivňují životní cyklus (diferenciace, proliferace, apoptóza) a také imunitu buněk. Doposud bylo u savců popsáno sedm členů této skupiny (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b a STAT6). Každý STAT protein je kódovaný jiným genem, přesto jsou si strukturně velmi podobné (Obrázek 2).<sup>(4-5)</sup>



**Obrázek 2: Modulární struktura STAT proteinu.** (Obrázek převzat z Mitchell TJ; John S. *Immunology*. 2005, 114; 301-312).

STAT proteiny obsahují 6 strukturních domén – N-doména (ND), coiled-coil doména (CCD), DNA-vázací doména (DBD), linker doména, SH2 doména (Src-homology 2 domain) a trans-aktivační doména (TAD).<sup>(6-7)</sup>

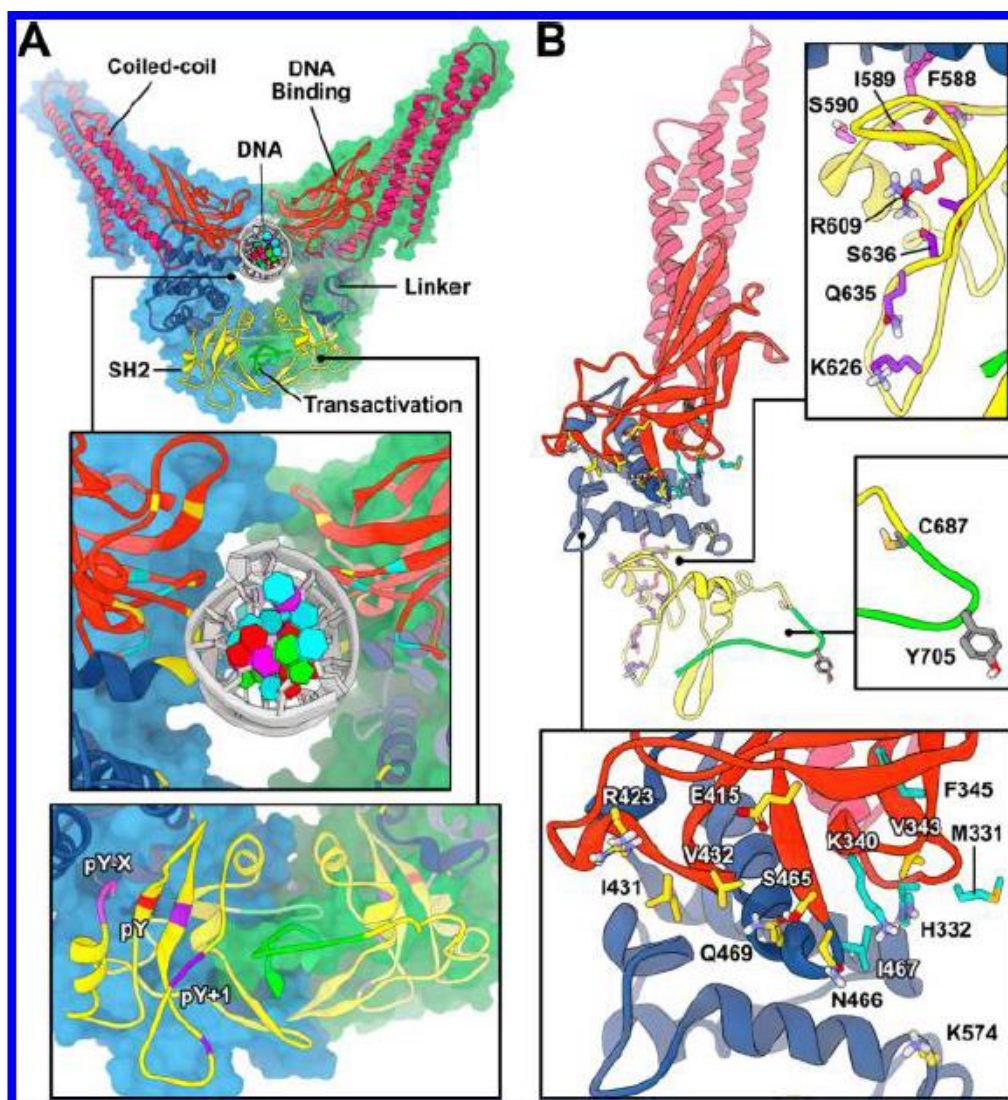
K aktivaci STAT proteinu dochází po fosforylaci tyrosinového zbytku díky tzv. Janus kináze (JAK), která fosforyluje a dimerizuje daný STAT protein, který je poté transportován do buněčného jádra pomocí importinů, kde po navázání na specifický receptor reguluje transkripci a expresi genů.<sup>(6-7)</sup>

### 2.1 STAT3 proteiny

STAT3 proteiny jsou transkripční faktory regulující expresi genů, které kontrolují životní cyklus buňky, její přežití a také imunní odpovědi související s rozvojem rakoviny a invazí nádorových buněk. Poprvé byly popsány v roce 1994 výzkumnou skupinou Zhonga.<sup>(8)</sup> V buňkách většiny nádorů, na rozdíl od zdravých buněk, dosahují hodnoty aktivovaného STAT3 proteinu vysokých úrovní. Proto existuje snaha



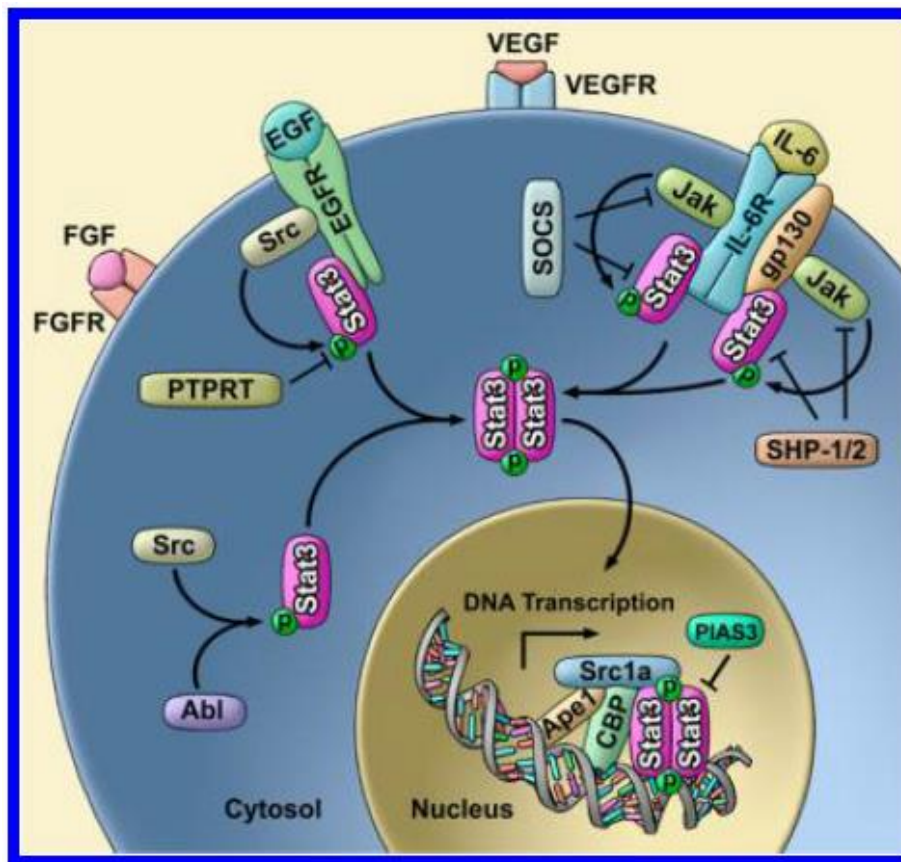
o vývoj selektivních inhibitorů ve formě malých molekul, které by narušovaly funkci STAT3 proteinů a jejich expresi genů regulovaly.<sup>(9)</sup>



**Obrázek 3: Struktura STAT3 proteinu.** V části A je zobrazena krystalová struktura STAT3 homodimeru. V části B je zobrazena struktura individuálního STAT3 monomeru, který daný dimer tvoří. Jednotlivé proteinové domény jsou barevně rozlišeny (fialová = coiled-coil doména, oranžová = DNA-vázací doména, modrá = linker doména, žlutá = SH2 doména, zelená = trans-aktivační doména). (Obrázek převzat z Steffanie L. Furtek; Donald S. Backos; Christopher J. Matheson and Philip Reigan *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 308-318.).

STAT3 proteiny jsou aktivovány navázáním cytokinů nebo růstových faktorů na povrchové receptory buňky. Tímto dojde k aktivaci tyrosin fosforylační kaskády, která vyvrcholí v nahromadění Janus kináz (JAK). JAK jsou zodpovědné za fosforylaci cytoplasmatických tyrosinových zbytků na receptorech, které slouží jako vazebné místo

pro SH2 doménu STAT3 proteinu. STAT3 se poté aktivuje (p-STAT3 – fosforylovaný STAT3) fosforylací jeho Tyr705 zbytku umístěném na jeho SH2 doméně. Po aktivaci začne p-STAT3 tvořit homodimer pomocí interakce p-Tyr705 jednoho monomeru s SH2 doménou druhého monomeru. Takto vytvořený dimer se poté odtrhne od receptoru a je přenesen z cytoplasmy do jádra buňky, kde váže specifické DNA sekvence a indukuje transkripci genů spojovaných s životním cyklem buňky, anti-apoptózou, angiogenezí (proces novotvorby krevních kapilár, který má významnou úlohu pro růst nádoru a tvorbu metastáz) a invazí či migrací nádorových buněk.<sup>(9-12)</sup>



**Obrázek č. 4: Signalizační kaskáda pro aktivaci STAT3.** Aktivace povrchových receptorů buňky vazbou cytokinů či růstových faktorů fosforyluje a aktivuje STAT3. Kromě Janus kináz mohou STAT3 aktivovat také nereceptorové tyrosinkinázy Src a ABL. Aktivovaný STAT3 tvoří homo- či heterodimer, který je poté přesunut z cytoplasmy do jádra buňky, kde váže DNA a indukuje genovou transkripci. (Obrázek převzat z Steffanie L. Furtek; Donald S. Backos; Christopher J. Matheson and Philip Reigan *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 308-318.).

## 2.2 STAT3 inhibitory

Mechanismů inhibice STAT3 je několik. Mezi nejčastěji zkoumané patří inhibice aktivity STAT3 proteinů pomocí inhibice tyrosin kinázy, která je schopná fosforylace a následné aktivace STAT3 proteinu. Další cílem inhibice může být zabránění vzniku funkčního STAT3 dimeru disrupcí na proteinových SH2 doménách. STAT3 inhibitory zvyšují citlivost nádorových buněk vůči terapiím rakoviny, zejména radioterapii a chemoterapii. Dělí se na upstream inhibitory a přímé inhibitory.<sup>(9-12)</sup>

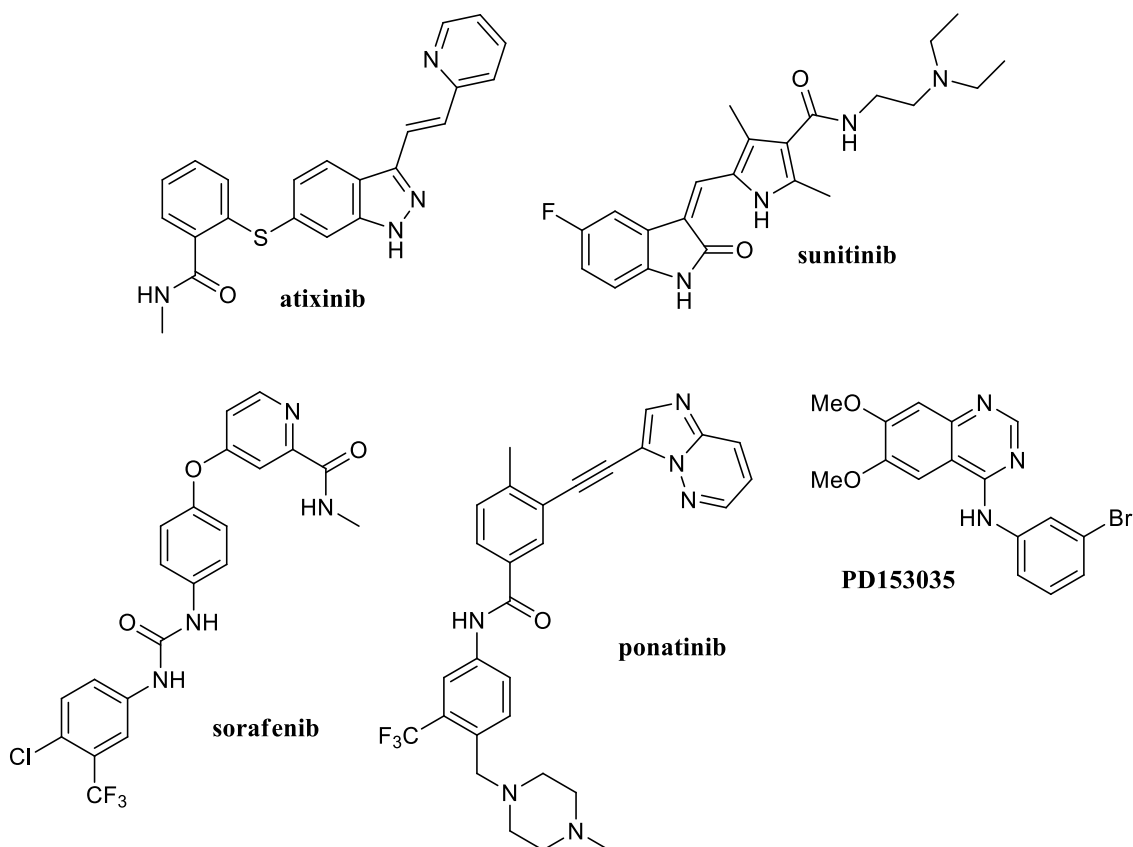
### 2.2.1 Upstream inhibitory

„Upstream“ inhibice STAT3 proteinů spočívá v inhibici členů signalizační kaskády STAT3 proteinu, které aktivují jeho funkci. Dělí se na inhibitory receptorů povrchu buňky a kinázové inhibitory.

#### 2.2.1.1 Inhibitory receptorů na povrchu buněk

Mechanismus inhibice receptorů na povrchu buňky funguje na principu cílené inhibice povrchových receptorů buňky, na které se vážou růstové faktory a cytokiny zodpovědné za indukci aktivace STAT3. Mezi růstové faktory indukující aktivaci patří například EGF (epidermální růstový faktor), FGF (fibroblastový růstový faktor), HGF (hepatocytární růstový faktor), PDGF (destičkový růstový faktor) a IGF (insulinu podobné růstové faktory). Mezi cytokiny indukující aktivaci patří interleukiny IL-6, IL-10, IL-11, dále také LIF (inhibitorní faktor leukemie) a leptin.<sup>(9)</sup>

Cílená inhibice růstových faktorů a cytokinů se ukázala být účinnou strategií. Následně uvedu několik příkladů tohoto typu inhibice. Mezi EGF receptorové inhibitory patří peptidový aptamer *KDII* a malá molekula *PD153035*, které inhibují fosforylaci STAT3 proteinu, čímž mu je znemožněna aktivace a dimerizace. Mezi inhibitory VEGF receptoru patří sloučeniny *sorafenib*, *sunitinib* a *atixinib*, které jsou schopné snížit aktivaci STAT3 proteinu. K inhibici FGF receptoru dochází pomocí látky *ponatinib*, která zabraňuje STAT3 fosforylaci a také snižuje nádorový růst *in vivo*<sup>(13)</sup> (Obrázek 5).



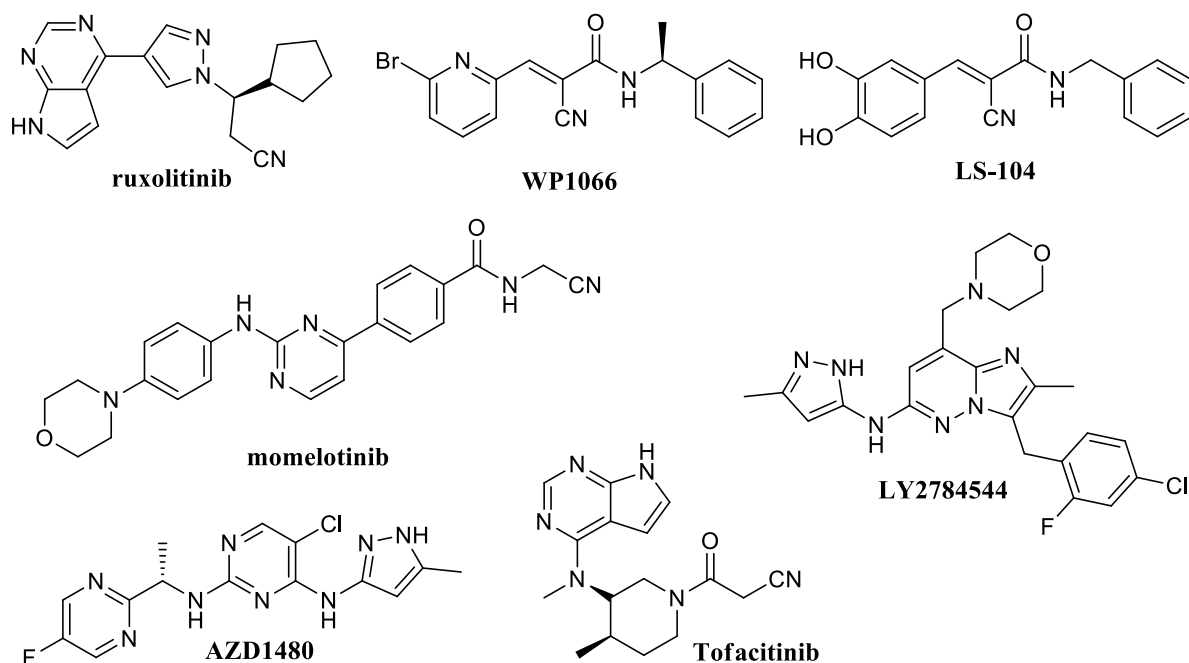
**Obrázek 5:** Inhibitory receptorů na povrchu buňky.

Důležitost IL-6/JAK/STAT signální dráhy v různých případech malignity u lidské populace podnítila výzkum IL-6 receptorových inhibitorů. Jako příkladný inhibitor lze uvést IL-6 monoklonální protilátky (imunoglobuliny pocházející z produkce jednoho klonu aktivovaných B-lymfocytů po styku s konkrétním antigenním epitopem), kam patří i úřadem FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA) schválený lék *tocilizumab*, prodáván pod komerčním názvem Actemra®. Ten se využívá k léčbě revmatoidní artritidy<sup>(14)</sup> a CRS (Cytokine Release Syndrome) a jeho další účinky jsou i nadále zkoumány. Výzkum orálně podávaných IL-6 receptorových inhibitorů bohužel není zdaleka tak rozsáhlý jako výzkumy jiných léků. Cytokin IL-6 totiž zastává významnou roli v imunním systému a při dlouhých blokacích IL-6 receptorů dochází ke zvýšenému riziku vzniku bakteriálních infekcí.<sup>(9)</sup>

### 2.2.1.2 Kinázové inhibitory

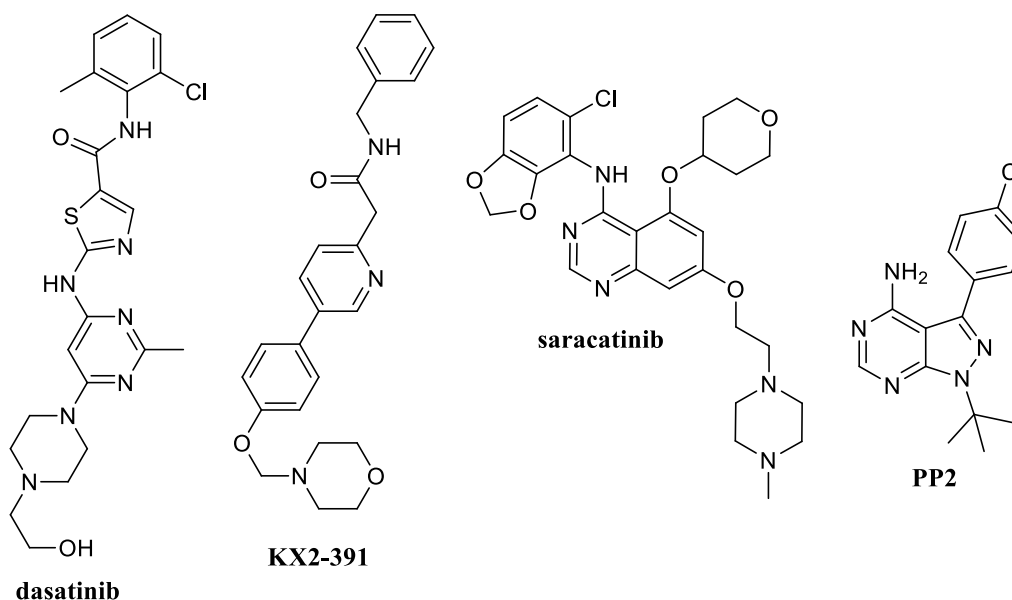
I když inhibitory receptorů povrchu buněk vykazují žádaný účinek a jsou schopné rušit STAT3 signalizaci při stimulaci cytokiny a růstovými faktory, dnes jsou mnohem více zkoumány kinázové inhibitory schopné inhibovat STAT3 ve fázi fosforylace. Je to z důvodu závislosti biologické aktivity STAT3 proteinu na jeho aktivaci. Z toho vyplývá, že logicky nejúčinnější je inhibice STAT3 aktivujících kináz. Existuje mnoho tyrosin kináz schopných fosforylace STAT3. V dnešní době se ale výzkum zaměřuje především na malé molekuly cílené na Janus kinázy (JAK) a Src kinázy (protoonkogen, jehož aktivita zvyšuje dělení buněk a buněčnou migraci. Lze předpokládat, že zastupuje kritickou roli v rozvoji rakoviny).<sup>(9)</sup>

Doposud bylo nalezeno několik JAK inhibitorů, z nichž některé již byly úřadem FDA schváleny<sup>(15)</sup> (např. *ruxolitinib* a *tofacitinib*) a jiné jsou ve stádiu klinického hodnocení (např. sloučeniny *WP-1066*, *LS-104*, *LY2784544* a *momelotinib*). Bohužel se můžeme setkat i s případy klinicky testovaných sloučenin, od kterých bylo upuštěno z důvodu nechtěných vedlejších účinků (např. JAK1/2 inhibitor *AZD1480*, který měl nechtěné neurotoxické účinky<sup>(16)</sup>). Některé JAK1 a JAK3 inhibitory vykazovaly, podobně jako IL-6 inhibitory, zvýšené riziko vzniku infekcí a zánětlivých reakcí.<sup>(17)</sup> (Obrázek 6)



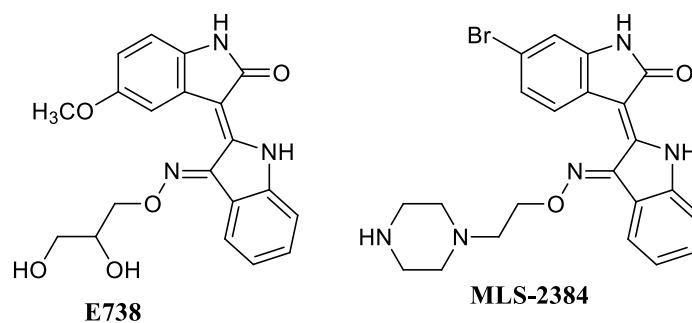
Obrázek 6: JAK inhibitory.

Mezi Src inhibitory například patří látky *saracatinib* (AZD0530) a *KX2-391*, které jsou ve fázi klinického hodnocení. Na konci roku 2017 byl FDA schválen lék *dasatinib*, který se v dnešní době používá při léčbě chronické myeloidní leukémie.<sup>(18)</sup> Dalším Src inhibítorem je *PP2*, který kromě inhibice fosforylace Src a STAT3 také snižuje nádorový růst selektivní inhibicí.<sup>(19)</sup> (Obrázek 7)



**Obrázek 7:** Src inhibitory.

Další zkoumanou skupinou jsou pan-JAK/Src inhibitory, kam patří sloučenina *E738*. Tato látka je derivát přírodní sloučeniny indirubin (produkt metabolismu bakterií). Znalost inhibujících účinků této látky vedla k výrobě syntetického bromindirubinu, jehož afinita k JAK a Src kinázám je vyšší než u jeho přírodního protějšku. Deriváty syntetického bromindirubinu (např. *MLS-2384*) jsou schopné snížit STAT3 fosforylaci a působit protirakovinně u několika typů nádorů.<sup>(20)</sup> (Obrázek 8).



**Obrázek 8:** pan-JAK/Src inhibitory.

Cílená inhibice kinázové aktivity zodpovědné za aktivaci STAT3 proteinu účinně jeho aktivitu snižuje, bohužel ale často dochází k nechtěným vedlejším toxickým účinkům, které při výzkumu i nadále znepokojují vědce. Další nevýhodnou vlastností je fakt, že tyto kinázy mohou aktivovat i jiné členy rodiny STAT proteinů a jejich inhibice může tedy vést k dalším nežádoucím účinkům. Z těchto důvodů se dnes za nevhodnější způsob inhibice považuje přímá inhibice STAT3 proteinů.<sup>(9)</sup>

## 2.2.2 Přímé inhibitory STAT3

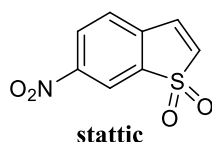
Velmi zkoumanou skupinou inhibitorů STAT3 jsou v dnešní době přímé inhibitory STAT3 proteinu. Jsou to malé molekuly schopné přímo inhibovat aktivitu a funkci STAT3 proteinu. Tyto inhibitory mají v podstatě stejný účinek, ale jejich mechanismus se může zásadně lišit. Aktivitu STAT3 můžou narušovat inhibicí fosforylace, dimerizace, jaderné translokace i schopnosti STAT3 vázat DNA.<sup>(9)</sup> V následujících kapitolách uvedu dvě největší skupiny přímých inhibitorů STAT3, a to konkrétně STAT3 SH2 doménové inhibitory a STAT3 DNA-vázající doménové inhibitory.

### 2.2.2.1 STAT3 SH2 doménové inhibitory

Jelikož SH2 doména představuje esenciální roli ve fosforylaci tyrosinu a dimerizaci STAT3 proteinu, je logickým krokem inhibovat STAT3 pomocí narušení funkce jeho SH2 domény. Tím dochází nejen k inhibici STAT3 aktivace, ale také k zabránění dimerizace STAT3 molekul, které mohly uniknout inhibici aktivace.<sup>(21)</sup>

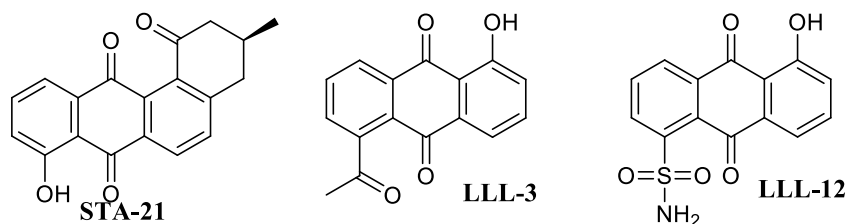
Tato skupina inhibitorů cílí na domény SH2, které zprostředkovávají STAT3 homodimerizaci interakcemi protein-protein, konkrétně fosforylací Tyr705. STAT3 má v doméně SH2 tři vazná místa, které se dají využít k navázání malých molekul inhibitorů.

Jako příklad lze uvést sloučeninu *stattic* (*STAT three inhibitory compound*), která je zároveň jednou z prvně objevených inhibitorů STAT3. Její mechanismus spočívá v selektivní inhibici aktivace a STAT3 dimerizace a také znemožňuje translokaci STAT3 do jádra buňky. Bylo prokázáno, že *stattic* indukuje apoptózu nádorových buněk rakoviny související s nadměrnou expresí STAT3.<sup>(21)</sup> (Obrázek 9)



**Obrázek 9:** Vzorec Stattic.

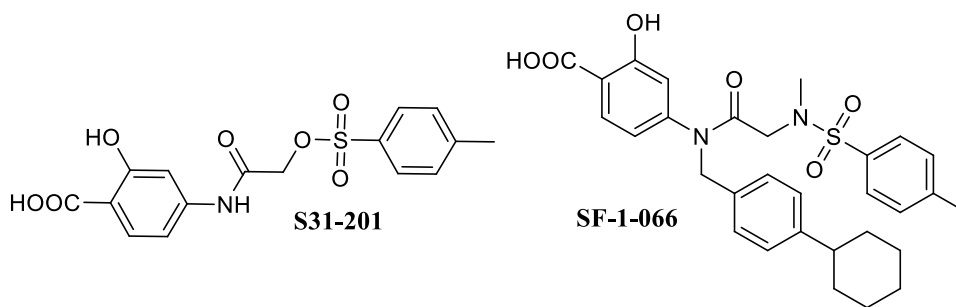
Výzkumná skupina Songa pomocí virtuálního screeningu identifikovala další molekulu inhibitoru pod názvem *STA-21*, která inhibuje schopnost aktivovaného STAT3 proteinu vázat DNA. Podobně jako *stattic* je schopna indukovat apoptózu nádorových buněk rakoviny související s nadměrnou expresí STAT3.<sup>(22)</sup> Ze *STA-21* byl vytvořen derivát *LLL-3*, který má podobné antiproliferativní (růst tlumící) účinky, ale vykazuje vyšší buněčnou permeabilitu.<sup>(23)</sup> Po nahrazení acetylové skupiny sloučeniny *LLL-3* za sulfonamid došlo k objevu dalšího inhibitoru *LLL-12*, u něhož byly zjištěny příznivé účinky vůči buňkám rakoviny prsu, slinivky a glioblastomu<sup>(24)</sup> (Obrázek 10).



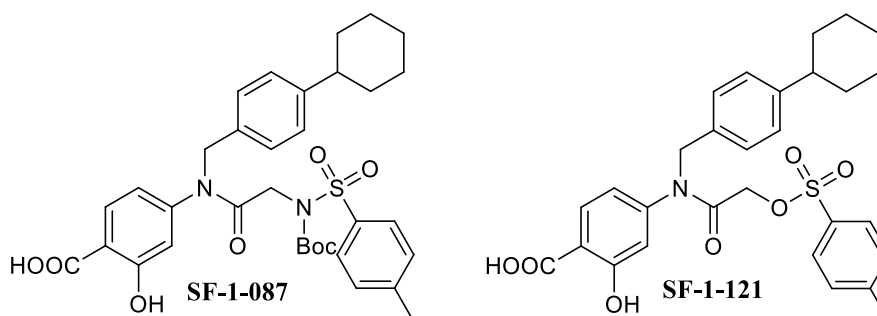
**Obrázek 10:** STA-21 a jeho deriváty.

Díky výzkumu amerického institutu pro studium rakoviny *National Cancer Institute (NCI)* byla objevena sloučenina *S31-201* (Obrázek 11). Ta je selektivní pro STAT3, blokuje vznik STAT3 homodimerů a inhibuje proliferaci nádorových buněk rakoviny prsu a jater u myši.<sup>(25)</sup> Pomocí dalších studií se zjistilo, že *S31-201* vykazuje interakce s SH2 doménou STAT3 proteinů. Objevením těchto vlastností vznikla snaha o vývoj účinnějších analogů látky *S31-201*. Významnými analogy se ukázaly být sloučeniny *SF-1-087*, *SF-1-121* a hlavně *SF-1-066*, pomocí které se dále identifikovalo 15 analogů.<sup>(26)</sup> (Obrázek 12).



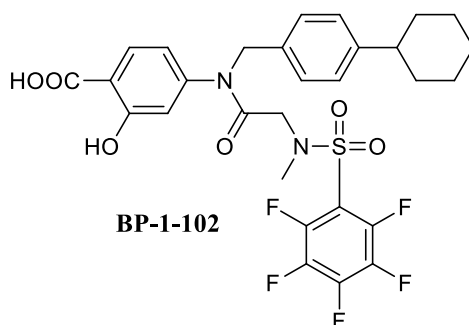


**Obrázek 11:** S31-201 a jeho analog SF-1-066.



**Obrázek 12:** Další analogy sloučeniny S31-201

Jedním z objevených analogů sloučeniny *SF-1-066* a zároveň jedním z dosud nejlepších inhibitorů je látka *BP-1-102*. Ta narušuje vznik komplexu STAT3-DNA a zároveň má pětikrát nižší  $IC_{50}$  (koncentrace inhibitoru, při kterém je snížen účinek inhibované látky na polovinu) než *SF-1-066*. Dále vykazuje příznivé účinky vůči nádorovým buňkám rakoviny prsu a plic a jako první STAT3 inhibitor jej bylo možné podat orálně.<sup>(27)</sup> (Obrázek 13)



**Obrázek 13:** Vzorec sloučeniny BP-1-102.

Ačkoliv jsou malomolekulové SH2 doménové inhibitory atraktivní skupinou inhibitorů v boji proti rakovině, většina jich stále setrvává ve fázi preklinického výzkumu. Výjimkou je sloučenina *STA-21*, která dokončila fázi I a II klinických testů

ve výzkumu proti lupénce.<sup>(28)</sup> Jedním z hlavních důvodů pomalého překonávání fází klinického hodnocení je fakt, že STAT3 dimerizace je protein-protein interakce s velkým povrchem, který je obtížně ovlivnitelný malými molekulami. Mimo jiné je třeba přesně definovat efektivitu a mechanismus účinku těchto inhibitorů. Mnoho sloučenin také vykazuje vysokou koncentraci potřebnou k efektivní STAT3 inhibici, což zvyšuje riziko vzniku nechtěné vedlejší toxicity. Z těchto důvodů vyplývá, že před tím, než tyto sloučeniny budou zahrnuty do *in vivo* testování, bude třeba provést další optimalizace.<sup>(9)</sup>

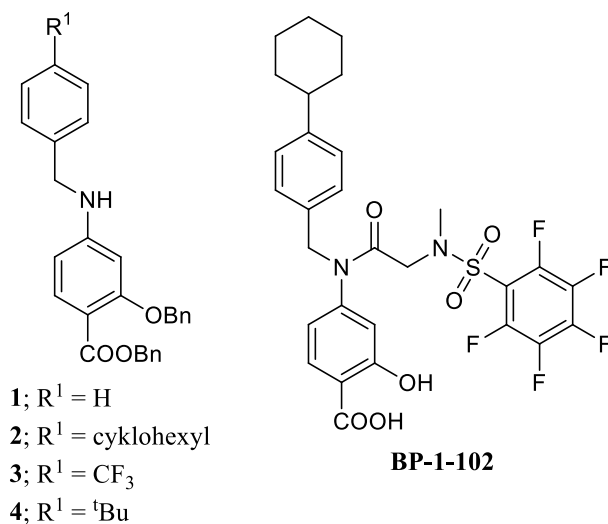
### 2.2.2.2 STAT3 DNA-vázající doménové inhibitory

Zatímco STAT3 SH2 doménové inhibitory setrvávají v čele výzkumu léčiv proti rakovině, nedávno vzrostl zájem o inhibitory, které cílí na DNA-vázající domény. Do této skupiny zejména patří komplexní sloučeniny platiny, označující se jako Pt(IV) komplexy. Je důležité je neplést s chemoterapeutiky jako například cisplatina a Pt(II) komplex, která se sice považují za účinná cytostatika, ale nevykazují žádný inhibující účinek vůči STAT3 proteinům. Mechanismus Pt(IV) komplexů funguje na bázi rušení schopnosti STAT3 vázat DNA, což vede k apoptóze rakovinových buněk spjatých se STAT3.<sup>(29,30)</sup>

Mezi nejznámější Pt(IV) komplex inhibitory se považují látky *CPA-1*, *CPA-7*, a *chlorid platičtý*. U těchto sloučenin byla *in vitro* dokázána blokáce STAT3 aktivity již při nízkých mikromolárních koncentracích. Látky *CPA-1* a *CPA-7*, které patří do skupiny derivátů kyseliny cyklopiazoniové, byly například schopny inhibovat růst a indukovat apoptózu u buněk rakoviny prsu, prostaty a střeva.<sup>(29-30)</sup> Doposud není známo, jakým způsobem a do jaké míry budou tyto sloučeniny své protirakovinné účinky vykazovat *in vivo*.

### 3. Cíl práce

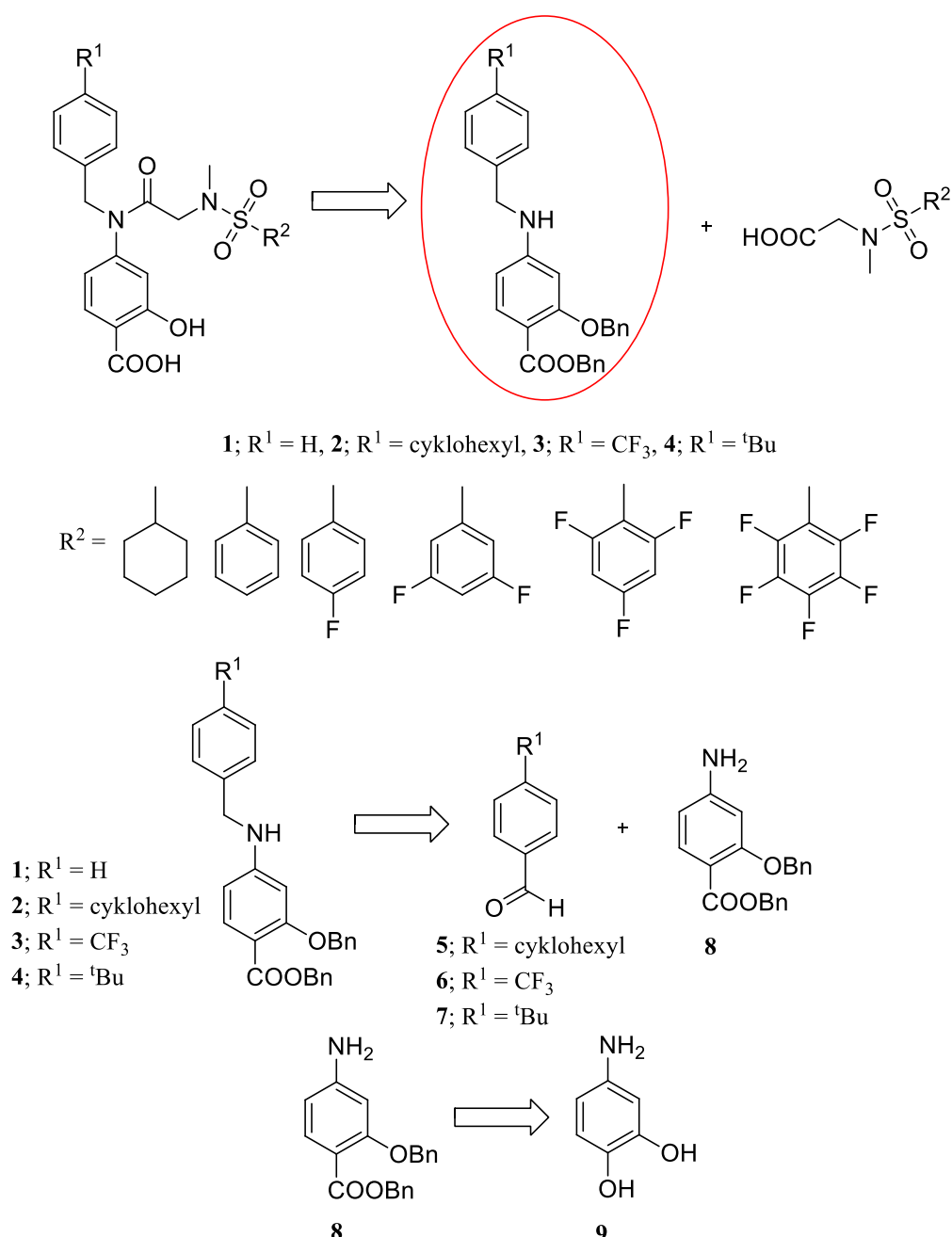
Cílem bakalářské práce je studium reakcí vedoucích k přípravě čtyř stavebních bloků (1-4) s různými substituenty  $R^1$  pro syntézu analogů BP-1-102 (Obrázek 14). První reakcí je benzylace a druhou reductivní aminace, která se skládá ze dvou kroků – z tvorby iminu reakcí primárního aminu s para-substituovanými aromatickými aldehydy a následně redukcí připravených iminů.



**Obrázek 14:** Všeobecná struktura látek (1-4).

## 4. Výsledky a diskuze

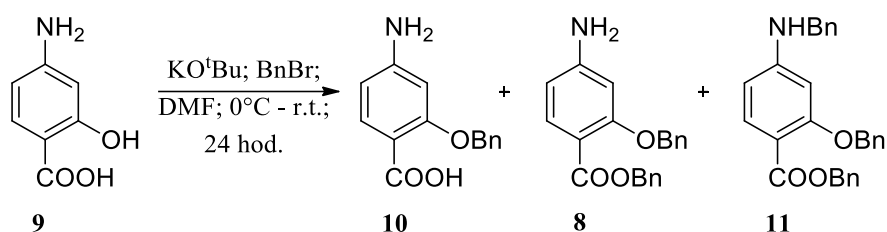
Retrosyntetická analýza přípravy příslušných stavebních bloků (**1-4**) potřebných k přípravě čtyř inhibitorů STAT3 vede k dibenzilyované kyselině 4-amino salicylové (**8**) a třem parasubstituovaným aromatickým aldehydům a následně ke kyselině 4-amino salicylové (**9**) jako výchozí látce (Obrázek 15).



Obrázek 15: Retrosyntetická analýza.

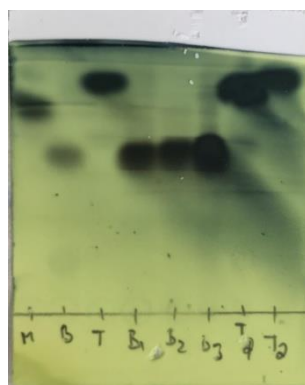
## 4.1 Syntéza benzylovaných derivátů kyseliny 4-aminosalicylové

Příprava cílových stavebních bloků vychází z kyseliny 4-amino salicylové (**9**), která v prvním kroku reaguje 24 hodin s BnBr a KO<sup>t</sup>Bu v DMF. Reakce zpočátku probíhá při teplotě 0°C, při které se přidávají příslušná činidla (KO<sup>t</sup>Bu a BnBr) a následně při laboratorní teplotě. Jde o třístupňovou reakci, jejímž výsledkem je izolace třech produktů, kterými jsou majoritní dibenzylovaný (**8**; 59%) a minoritní monobenzylovaný **10** a tribenzylovaný **11** derivát kyseliny 4-amino salicylové (Schéma 1).



**Schéma 1:** Benzylace kyseliny 4-aminosalicylové.

Příslušné tři produkty benzylace je možné detekovat i na TLC destičce (Obrázek 16), následně chromatograficky separovat na sloupci silikagelu a popsat pomocí MS hmotnostních a <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter.

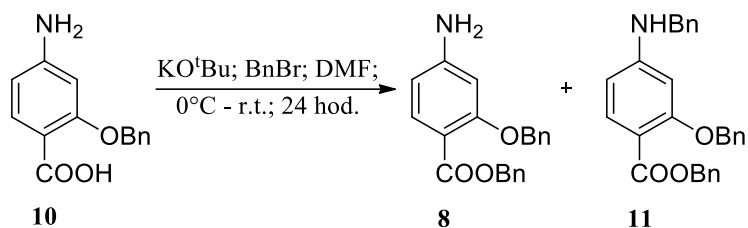


**Obrázek 16:** TLC destička (H:EA = 2:1) (M = monobenzyloxy **10**, B, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> = bisbenzyloxy **8** a T, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> = tribenzyloxy **11**).

Z výsledků jsme pro jednotlivé skvrny na TLC destičce přidělili příslušné produkty. Nejvyšší R<sub>f</sub> hodnotu, tzn. na destičce je nejvýše, má tribenzylovaný produkt **11**, následuje monobenzylovaný **10** a nejmenší R<sub>f</sub> hodnotu, tzn. nejnižší, má dibenzylovaný produkt **8**.

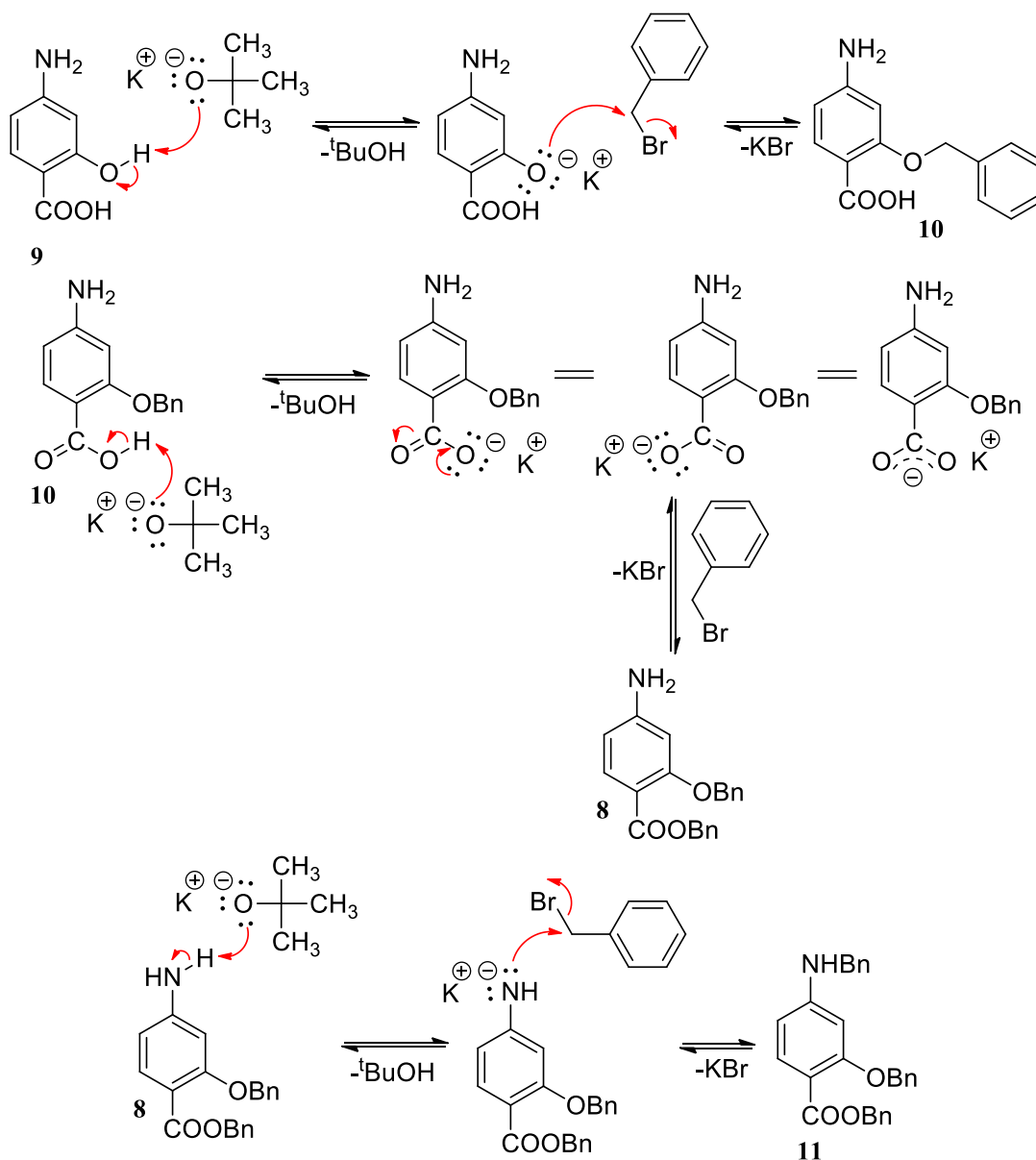
Každý z izolovaných produktů byl dále využit, tzn. tribenzylovaný **11** byl prvním z cílových stavebních bloků **1**. Dibenzylovaný produkt **8** se využil v reakci s třemi para-substituovanými aldehydy **5-7** za tvorby dalších cílových stavebních bloků (**2-4**).

Příslušný monobenzylovaný produkt **10** byl podroben stejným reakčním podmínkám benzylace, které nám poskytly dibenzylovaný **8** a tribenzylovaný produkt **11** (Schéma 2).



**Schéma 2:** Benzylace kyseliny 4-amino-2-(benzyloxy)benzoové.

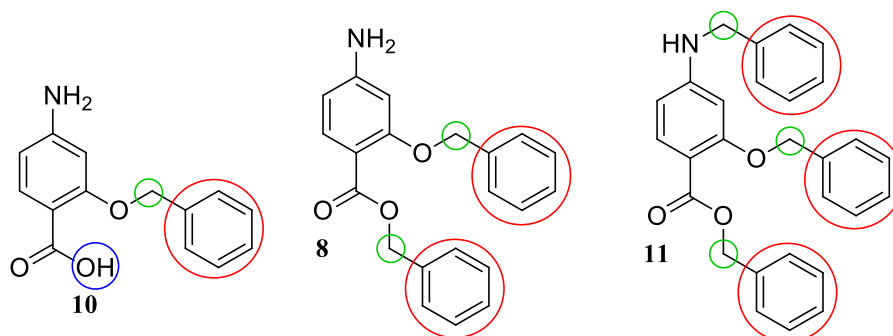
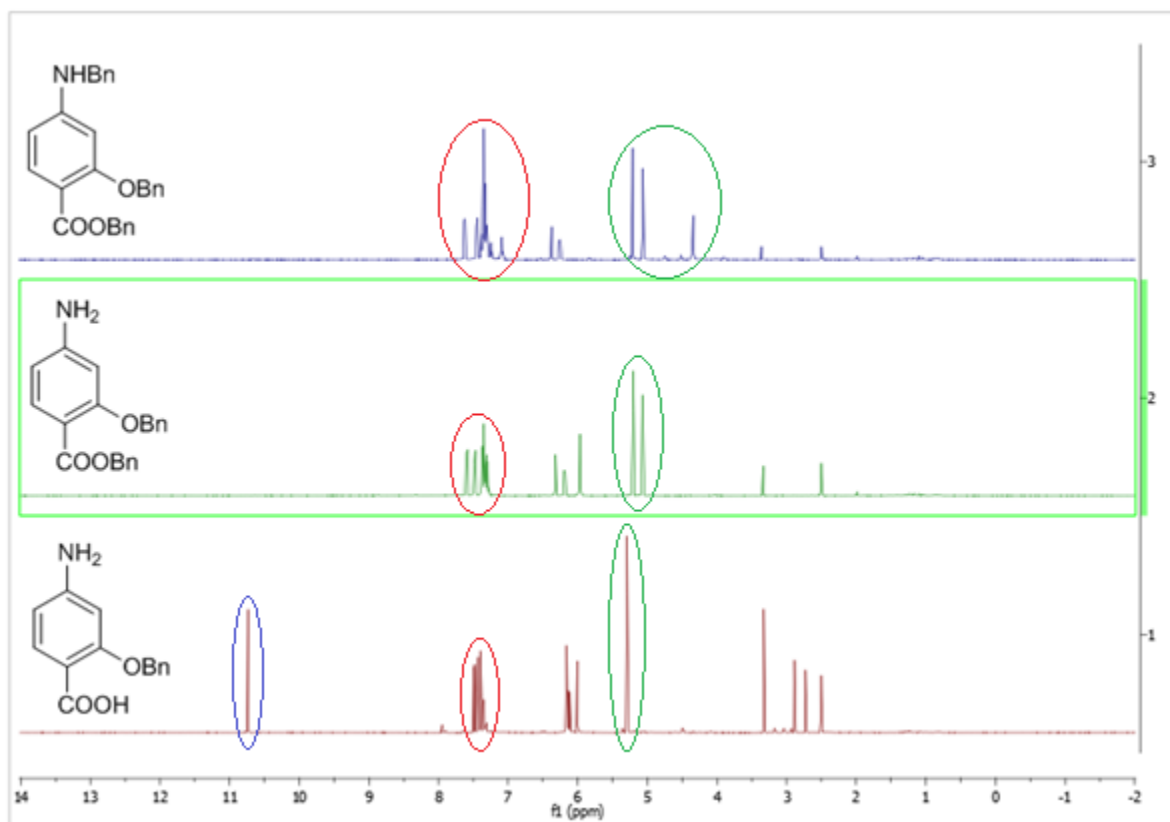
Podrobný reakční mechanismus benzylace amino/hydroxy funkční skupiny je zobrazený na Schématu 3.



**Schéma 3:** Mechanismus benzylace kyseliny 4-aminosalicylové.

Jako první byla benzylována hydroxylová funkční skupina, která v prvním kroku reaguje s  $\text{KO}^t\text{Bu}$  jako bází za tvorby nukleofilu (draselná sůl). Ten následně  $\text{S}_{\text{N}}2$  reakcí reaguje s  $\text{BnBr}$  za tvorby monobenzylovaného derivátu **10**. Stejným mechanismem reaguje v dalším kroku karboxylová funkční skupina, která po reakci s  $\text{KO}^t\text{Bu}$  poskytne karboxylát jako nukleofil. Tento karboxylát je možné nakreslit ve formě třech rezonančních struktur. Reakcí s  $\text{BnBr}$  poskytne dibenzylovaný derivát **8**. Jako poslední podléhá benzylaci aminoskupina sledem dvou stejných kroků, které poskytly příslušný tribenzylovaný produkt reakce **11**.

Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektra izolovaných produktů benzylace jsou zobrazena na Obrázku 17. Z příslušných spekter je možné vidět rozdílný počet signálů v aromatické oblasti mezi 7-8 ppm pro příslušné aromatické vodíky benzylových skupin (červené kruhy), v oblasti 4-6 ppm různý počet  $\text{CH}_2$  skupin benzylových skupin (dvou-protonové singlety; zelené kruhy) a pro monobenzylovaný derivát **10** signál hydroxylové funkční skupiny z kyseliny  $-\text{COOH}$  při 10,74 ppm (modrý kruh).



Obrázek 17:  $^1\text{H}$  NMR spektra produktů benzylace.



## 4.2 Syntéza stavebních bloků 2-4

Cílové stavební bloky **2-4** se připraví konjugací dibenzylovaného derivátu kyseliny 4-aminosalicylové **8** s příslušnými para-substituovanými aldehydy **5-7**. Reakcí vzniká imin, který se poté redukuje na amin přidáním  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (Schéma 4).

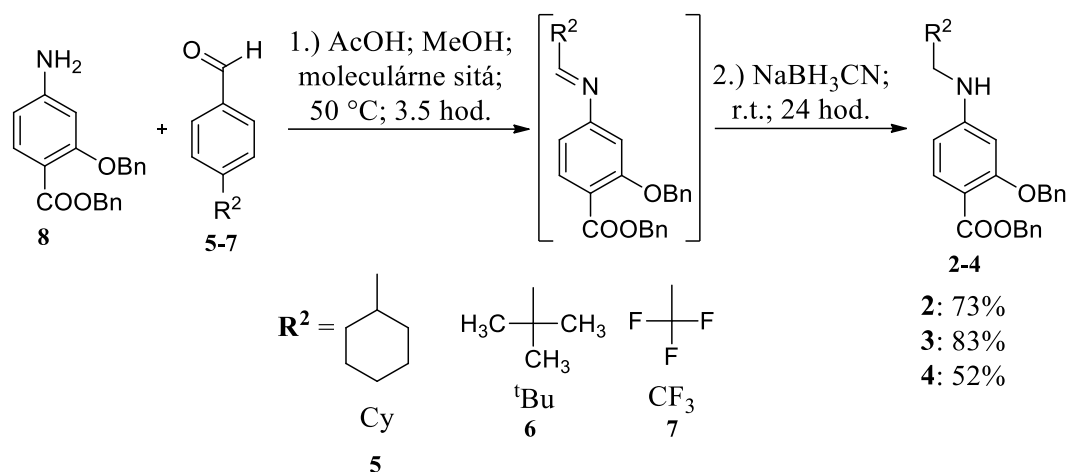
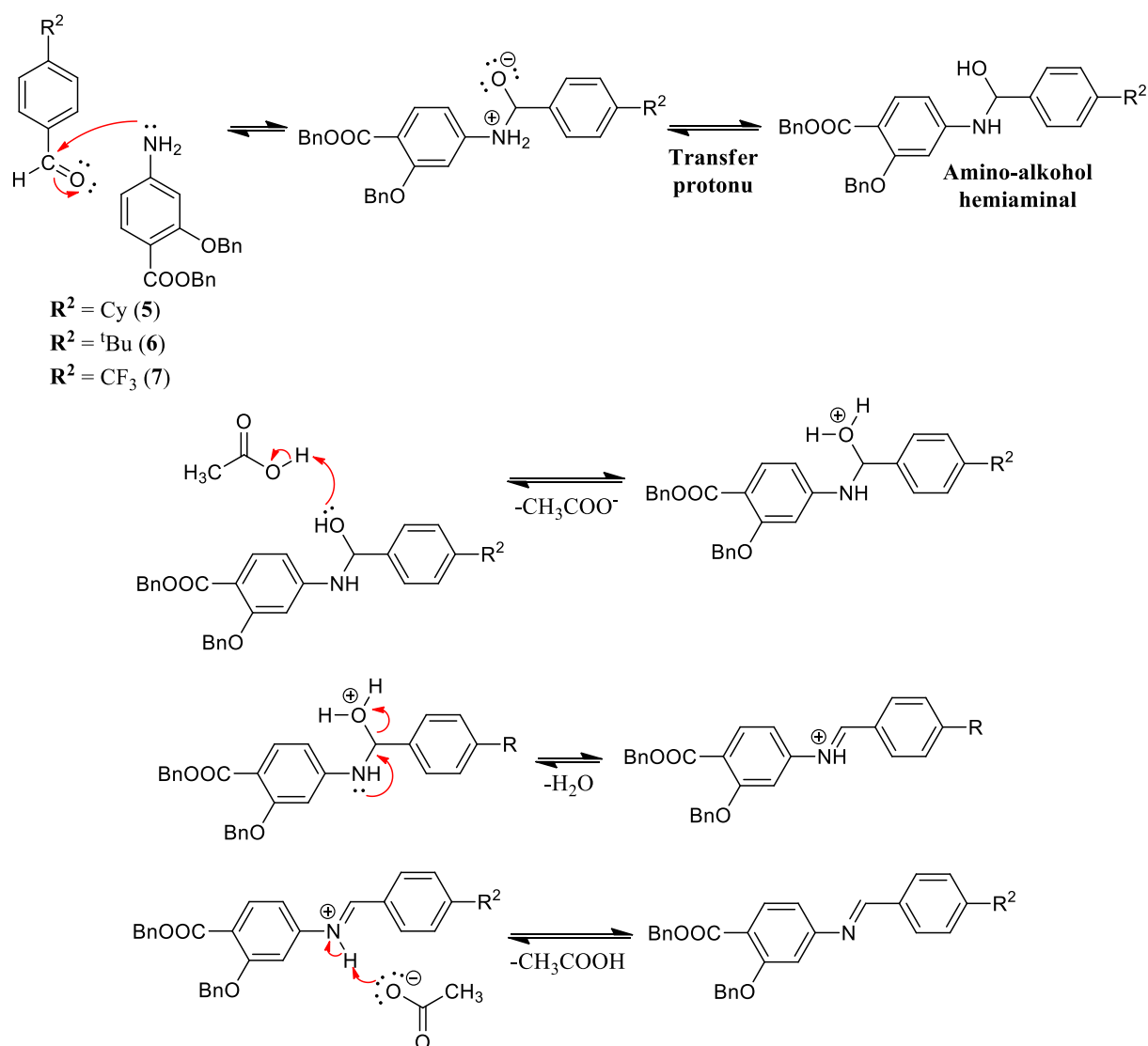


Schéma 4: Dvoustupňová reduktivní aminace.

V prvním kroku příslušný dibenzylovaný amin **8** reagoval 3,5 hodiny s aldehydy **5-7** v MeOH v přítomnosti AcOH a molekulárních sít při teplotě 50°C za tvorby iminů jako meziproduktů, které bez izolace vstupovaly do dalšího kroku. Tím byla redukce příslušných iminů s  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  při laboratorní teplotě, která probíhala 40 hodin za tvorby sekundárních aminů (**2-4**) ve výtěžcích 52-83%.

Podrobný reakční mechanismus adičně-eliminační kondenzační reakce benzyl 4-amino-2-(benzyloxy)benzoátu (**8**) s para-substituovanými aldehydy **5-7** za vzniku iminů je zobrazen na Schématu 5.



**Schéma 5:** Reakční mechanismus vzniku iminu.

Reakce je zahájena nukleofilní adicí primárního aminu **8** na karbonylovou skupinu aldehydů **5-7** a přeskupením elektronové vazby  $\text{C}=\text{O}$  na kyslík karbonylu. Vzniká tak nabitá neutrální molekula, která přenosem protonu z atomu dusíku na atom kyslíku poskytuje neutrální amino-alkohol (hemiaminal).  $\text{AcOH}$  protonuje kyslíkový atom hemiaminalu, tím se přemění  $-\text{OH}$  skupina v lépe odstupující skupinu  $-\text{H}_2\text{O}^+$ , která se odštěpí jako molekula vody při tvorbě iminového iontu použitím volného elektronového páru z dusíku na vznik dvojité vazby  $\text{C}=\text{N}$ . Acetát následně ve finálním kroku z atomu dusíku odštěpí proton a vzniká neutrální imin.

V reakční směsi vzniknutý imin se poté přidáním  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  redukuje na příslušné aminy jako finální produkty, které jsou zároveň cílovými stavebními bloky **2-4** pro tvorbu STAT3 inhibitorů.

## 5. Experimentální část

Všechny chemikálie a rozpouštědla, které byly potřebné pro syntézu, byly zakoupeny z firmy Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika).

Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie za použití TLC desek Merck Silica gel 60 F254 (mobilní fáze = P:EA a H:EA v různých poměrech). Detekce se prováděla UV lampou při vlnové délce 254 nm. Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 bez korekce.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra připravených sloučenin byly měřeny při laboratorní teplotě v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO- $d_6$ ) a deuterovaném chloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro  $^1\text{H}$  a 125,71 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny ( $\delta$ ) protonů v  $^1\text{H}$  NMR a uhlíků v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. V  $^1\text{H}$  NMR spektrech jsou uváděny vzhledem k centrálnímu píku DMSO- $d_6$  ( $\delta = 2,50$ ) a CD3OD- $d_4$  ( $\delta = 3,31$ ), v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech vzhledem k centrálnímu píku DMSO- $d_6$  ( $\delta = 39,43$ ) a CD3OD- $d_4$  ( $\delta = 49,05$ ). Interakční konstanty (J) jsou uvedeny v Hz. Spinová multiplicita je vyjádřena jako s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu) nebo m (multiplet).

Hmotnostní spektra byla získána elektrosprejovou ionizací (ESI/MS) a selekcí iontu pomocí trojitého quadropólu na přístroji Agilent 6470. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

## 5.1 Všeobecný postup benzylace kyseliny 4-amino salicylové (10):

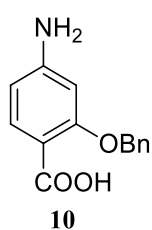
Výchozí látka (6 g; 39.18 mmol) byla rozpuštěna v suchém DMF (300 ml) a při 0 °C byl přidán KO<sup>t</sup>Bu (1.1 eq; 43.098 mmol; 4.836 g) a po 15 minutách i BnBr (1.1 eq; 43.098 mmol; 5.12 ml). Konečná směs se míchala 30 minut při 0 °C a 3.5 hodiny při laboratorní teplotě.

Následně se směs ochladila na 0 °C, přidalo se další množství KO<sup>t</sup>Bu (1.1 eq; 43.098 mmol; 4.836 g) a po 15 minutách i BnBr (1.1 eq; 43.098 mmol; 5.12 ml). Směs se znovu míchala 30 minut při 0 °C a následně přes noc při pokojové teplotě.

Reakce byla ukončena přidavkem vody (50 ml), směs byla následně přemístěna do dělicí nálevky a extrahovala se s EtOAc (3×400 ml). Organická fáze byla extrahována s nasyceným roztokem NaCl (400 ml), vysušena s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována přes fritu a zahuštěna na RVO. Sloupcovou chromatografií ve fázi H:EA 30:1 → 20:1 → 10:1 → 8:1 byl izolován majoritní požadovaný dibenzylovaný produkt **8** (7.640 g; 59%) ve formě nažloutlé pevné látky. Byly izolovány i vedlejší minoritní produkty reakce, tzn. monobenzylovaný derivát **10** a tribenzylovaný derivát **11**, které byly použity do dalších reakcí.

Monobenzylovaný derivát **10** byl použit jako výchozí látka pro přípravu dibenzylovaného a tribenzylovaného derivátu za použití KO<sup>t</sup>Bu (1.1 eq) a BnBr (1.1 eq) v suchém DMF.

### Kyselina 4-amino-2-(benzyloxy)benzoová (10)



**10:** C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>; m = 1.43 g; výtěžnost: 15%; oranžová pevná látka

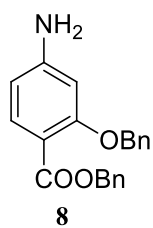
T<sub>tání</sub> = 139,6-141,3 °C.

$\delta_{\text{H}}$  (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 5.29 (2H; s; CH<sub>2</sub>(Bn)), 6.01 (1H; d; *J* = 2.1 Hz; Ar), 6.13 (1H; dd; *J* = 8.8 Hz; *J* = 2.1 Hz; Ar), 6.16 (2H; bs; NH<sub>2</sub>), 7.34-7.36 (1H; m; Ar), 7.38-7.45 (4H; m; Ar), 7.49 (1H; d; *J* = 8.7 Hz, Ar), 10.74 (1H; s; COOH).

$\delta_{\text{C}}$  (126 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 66.3, 100.8, 106.9, 128.2, 128.4, 128.7, 131.8, 136.0, 153.6, 163.8, 169.9.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (*m/z*) = 244.1; experimentální hodnota = 244.2.

### Benzyl 4-amino-2-(benzyloxy)benzoát (8)



**8:** C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>; m = 7.706 g; výtěžnost: 59%; nažloutlá pevná látka

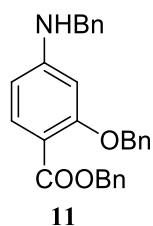
T<sub>tání</sub> = 85,6-87.4 °C.

$\delta_{\text{H}}$  (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 5.07 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.20 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.97 (s; 2H; NH<sub>2</sub>), 6.19 (dd; 1H; J = 1.9; 8.6 Hz; CH), 6.32 (d; 1H; J = 1.9 Hz; CH), 7.33 (m; 8H; 8×CH), 7.48 (d; 2H; J = 8.6 Hz; 2×CH), 7.59 (d; 1H; J = 8.6 Hz; CH).

$\delta_{\text{C}}$  (126 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 64.7, 69.0, 97.5, 105.4, 105.8, 126.9, 127.3, 127.5, 127.6, 128.1, 128.2, 133.6, 136.9, 137.0, 154.6, 160.3, 164.7.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (*m/z*) = 334.1, experimentální hodnota = 334.2.

### Benzyl 4-(benzylamino)-2-(benzyloxy)benzoát (11):



**11:** C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>; m = 1.659 g; výtěžnost: 10%; oranžová pevná látka

T<sub>tání</sub> = 73.3-75.1 °C.

$\delta_{\text{H}}$  (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 4.35 (d; 2H; J = 6.0 Hz; CH<sub>2</sub>), 5.06 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.21 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 6.26 (dd; 1H; J = 1.9; 8.7 Hz; CH), 6.38 (d; 1H; J = 1.9 Hz; CH), 7.09 (m; 1H; CH), 7.32 (m; 12H; 12×CH), 7.45 (m; 2H; 2×CH), 7.63 (d; 1H; J = 8.7 Hz; CH).

$\delta_{\text{C}}$  (126 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 45.9, 64.8, 69.2, 96.4, 104.5, 105.8, 126.8, 127.0, 127.2, 127.4, 127.5, 127.6, 128.1, 128.2, 128.3, 133.4, 136.9, 139.3, 153.8, 160.2, 164.7.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (*m/z*) = 424.2, experimentální hodnota = 424.3.

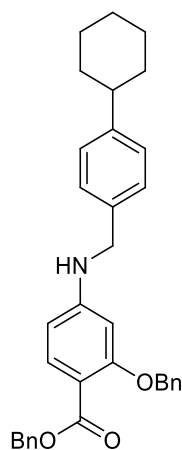
## 5.2 Všeobecný postup konjugace primárního aminu (8) s aldehydem (5-7) a následná redukce iminu:

Aldehyd (5-7; 1.7 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeOH (13.5 ml) a následně byly přidány 4Å molekulová síta. Při pokojové teplotě byla přidána bezvodá kyselina octová (1.8 mmol) a směs byla míchána 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byl ke směsi přidán amin 8 (1 mmol) a výsledná reakční směs se míchala 3.5 hodiny při teplotě 50°C.

Vzniknutý imin byl zredukován na amin po přidání NaBH<sub>3</sub>CN (2.5 mmol) k reakční směsi při pokojové teplotě. Poté byla směs míchána při pokojové teplotě po dobu 24 hodin.

Po proběhnutí reakce na základě analýzy TLC destičky byl MeOH odpařen na RVO, tuhé reziduum bylo rozpuštěno v DCM a přeneseno do dělicí nálevky. Organická fáze byla extrahována s nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O a nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla vysušena s Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrována přes fritu a odpařena na RVO. Surová reakční směs se chromatografovala na sloupci silikagelu ve fázi H:EA:TEA = 4:1:2%. Finální výtěžnosti se pohybovaly v rozmezí od 52–83%.

### Benzyl 2-(benzyloxy)-4-((4-cyclohexylbenzyl)amino)benzoát (2):



2: C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>3</sub>; m = 369 mg; výtěžnost: 73%; bílá pevná látka

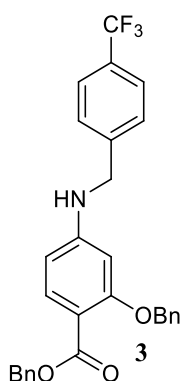
T<sub>tání</sub> = 133.7-135.5 °C.

$\delta_{\text{H}}$  (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1.27 (m; 2H; CH<sub>2</sub>), 1.41 (m; 4H; 2×CH<sub>2</sub>), 1.86 (m; 4H; 2×CH<sub>2</sub>), 2.50 (m; 1H; CH), 4.28 (d; 2H; J = 5.2 Hz; CH<sub>2</sub>), 5.08 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.31 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 6.16 (d; 1H; J = 2.1 Hz; CH), 6.21 (dd; 1H; J = 2.1; 8.7 Hz; CH), 7.19 (d; 2H; J = 8.1 Hz; 2×CH), 7.24 (d; 2H; J = 8.1 Hz; 2×CH), 7.30 (m; 6H; 6×CH), 7.40 (m; 2H; 2×CH), 7.44 (m; 2H; 2×CH), 7.84 (d; 1H; J = 8.7 Hz; CH).

$\delta_{\text{C}}$  (126 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 26.1, 26.9, 34.5, 44.2, 47.5, 65.8, 70.5, 97.3, 104.9, 108.5, 126.9, 127.2, 127.5, 127.6, 127.7, 128.0, 128.4, 128.5, 134.4, 135.5, 136.8, 136.9, 147.6, 153.0, 160.9, 165.7.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (m/z) = 506.3, experimentální hodnota = 506.8.

### Benzyl 2-(benzyloxy)-4-((4-(trifluoromethyl)benzyl)amino)benzoát (3):



**3:** C<sub>29</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>; m = 256 mg; výtěžnost: 52%; žlutá pevná látka

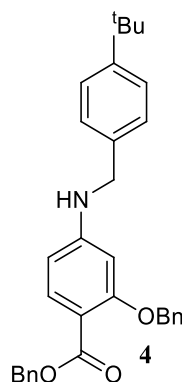
T<sub>tání</sub> = 87.6-89.5 °C.

**δ<sub>H</sub>** (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 4.40 (d; 2H; J = 4.6 Hz; CH<sub>2</sub>), 5.06 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.30 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 6.11 (d; 1H; J = 2.1 Hz; CH), 6.17 (dd; 1H; J = 2.1; 8.6 Hz; CH), 7.31 (m; 5H; 5×CH), 7.39 (m; 5H; 5×CH), 7.48 (m; 1H; CH), 7.58 (m; 2H; 2×CH), 7.61 (m; 1H; CH), 7.82 (d; 1H; J = 8.6 Hz; CH).

**δ<sub>C</sub>** (126 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 47.1, 65.9, 70.4, 97.3, 104.9, 108.9, 125.4, 125.7, 126.7, 126.8, 127.3, 127.6, 127.8, 128.0, 128.4, 128.5, 134.4, 136.6, 142.5, 152.5, 160.8, 165.7.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (m/z) = 492.2, experimentální hodnota = 492.3.

### Benzyl 2-(benzyloxy)-4-((4-(terc-butyl)benzyl)amino)benzoát (4):



**4:** C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>3</sub>; m = 398 mg; výtěžnost: 83%; nažloutlá pevná látka

T<sub>tání</sub> = 90.6-92.1 °C.

**δ<sub>H</sub>** (500 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 1.26 (s; 9H; <sup>t</sup>Bu), 4.28 (d; 2H; J = 5.8 Hz; CH<sub>2</sub>), 5.06 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 5.20 (s; 2H; CH<sub>2</sub>), 6.24 (dd; 1H; J = 1.7; 8.7 Hz; CH), 6.36 (d; 1H; J = 1.7 Hz; CH), 7.02 (m; 1H; CH), 7.30 (m; 13H; 13×CH), 7.44 (d; 2H; J = 7.4 Hz; 2×CH), 7.60 (d; 1H; J = 8.7 Hz; CH).

**δ<sub>C</sub>** (126 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 31.0, 31.1, 34.1, 45.6, 64.7, 69.2, 96.4, 105.7, 125.0, 126.9, 127.1, 127.3, 127.5, 127.6, 128.1, 128.2, 133.4, 136.1, 136.8, 136.9, 149.1, 153.9, 160.2, 164.7.

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> vypočítaná hodnota pro C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> (m/z) = 480.2, experimentální hodnota = 480.4.



## 6. Závěr

V první kapitole teoretické části bakalářské práce se věnuji obecným poznatkům o rakovině, její prevenci a terapii. Prevence je rozdělena na primární, sekundární a terciární, které jsou ve zkratce vysvětleny. Nejdůležitější metody terapie jsou chirurgická, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie, kde u každé je vysvětlen princip a možnosti dané terapie.

V další kapitole jsem popsal skupinu STAT proteinů a hlavně podskupinu STAT3 proteinů a jejich inhibitorů. Vysvětlil jsem mechanismus účinku a jednotlivé možnosti inhibice. Následovala velká podkapitola věnovaná STAT3 inhibitorům, které se rozdělily na Upstream inhibitory, inhibitory receptorů na povrchu buněk, kinázové inhibitory, inhibitory STAT3-SH2 domény a STAT3 DNA-vázající doménové inhibitory.

Praktická část práce začíná cíli práce, kterými jsou čtyři stavební bloky **1-4**. Následná retrosyntetická analýza přípravy těchto čtyř stavebních bloků **1-4** potřebných pro syntézu analogů STAT3 inhibitoru BP-1-102 vede ke kyselině 4-aminosalicylové (**9**).

Experimentální část se v první části věnuje studiu benzylační reakce kyseliny 4-aminosalicylové (**9**). Podařilo se mi izolovat a popsat všechny tři možné produkty benzylace **8**, **10** a **11**. Byly popsány pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR a MS hmotnostních spekter a každému byla na základě TLC destičky přidělena i příslušná  $R_f$  hodnota ve fázi H:EA = 2:1. Reakční mechanismus benzylace byl podrobně popsán. Na  $^1\text{H}$  NMR spektrech jsem následně ukázal a popsal rozdíly mezi jednotlivými deriváty.

Druhou částí bylo studium reduktivní aminace, tzn. dvoustupňové přípravy aminů **2-4** reakcí benzyloxy 4-amino-2-(benzyloxy)benzoátu (**8**) s para-substituovanými aldehydy **5-7**. Prvním stupněm je příprava iminů, které bez další izolace podléhaly redukcí za tvorby aminů **2-4**. Tvorba příslušných iminů je podrobně popsána a vysvětlená.

Všechny čtyři požadované stavební bloky **1-4** pro syntézu analogů inhibitoru BP-1-102 jako inhibitorů STAT3 se mi podařilo připravit a tím jsem splnil stanovené cíle práce.

## 7. Zdroje

- [1] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [2] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [3] Hanahan D; Weinberg R.A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. **2011**, 144; 646-674.
- [4] Nkansah E.; Shah R.; Collie G., W.; Parkinson G., N.; Palmer J.; Khondaker R., M.; Tam B., T.; Drake A., F.; Husby J.; Neidle S.; Zinzalla G.; Thurston D., E.; Wilderspin A., F., Observation of unphosphorylated STAT3 core protein binding to target dsDNA by PEMSAs and X-ray crystallography. *FEBS Letters* **2013**; 587, 833–839.
- [5] Yue P.; Turkson J., Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert Opin Investig Drugs*. **2009**; 18(1): 45–56
- [6] Mitchell T.J.; John S., Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Blackwell Publishing Ltd, Immunology*. **2005**, 114, 301–312
- [7] Ren Z.; Mao X.; Mertens C.; Krishnaraj R.; Qin J.; Mandal P., K.; Romanowski M., J.; McMurray J., S.; Chen X., Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 374, 1–5.
- [8] Zhong Z.; Wen Z.; Darnel J., E. jr., STAT3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **1994**, 264, 95-98.
- [9] Furtek S., L.; Backos D., S.; Matheson Ch., J. a Reigan P., Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 308-318.
- [10] Johnston P., A. a Grandis J., R., STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges. *Mol. Interv.* **2011**, 11, 18-26.
- [11] Demaria M.; Camporeale A. a Poli V., STAT3 and metabolism: How many ways to use a single molecule? *Int. J. Cancer* **2014**, 135, 1997-2003.
- [12] Zhang X.; Yue P.; Fletcher S.; Zhao W.; Gunning P., T.; Turkson J., A novel small-molecule disrupts Stat3 SH2 domain–phosphotyrosine interactions and Stat3-dependent tumor processes. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 1398-1409.

- [13] Li S.Q.; Cheuk A.T.; Shern J.F.; Song Y.K.; Hurd L.; Liao H.; Wei J.S.; Khan J., Targeting wild-type and mutationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the inhibitor ponatinib (AP24534). *PLoS One*. **2013**;8(10):e76551.
- [14] Song S.N.; Yoshizaki K., Tocilizumab for treating rheumatoid arthritis: an evaluation of pharmacokinetics/pharmacodynamics and clinical efficacy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **2015**;11(2):307-16.
- [15] Buchert M.; Burns C.J.; Ernst M., Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges. *Oncogene*, **2016**;35:939–951
- [16] Plimack E.R.; Lorusso P.M.; McCoon P.; Tang W.; Krebs A.D.; Curt G.; Eckhardt S.G., AZD1480: a phase I study of a novel JAK2 inhibitor in solid tumors. *Oncologist*, **2013**;18(7):819-20
- [17] Normal P., Selective JAK inhibitors in development for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs*. **2014**;23(8):1067-77
- [18] Aguilera D.G.; Tsimberidou A.M.; Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag*. **2009**; 5: 281–289
- [19] Brandvold K.R.; Steffey M.E.; Fox C.C.; Soellner M.B., Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*. **2012**;7(8):1393-8.
- [20] Liu L.; Gaboriaud N.; Vougioukianopoulou K.; Tian Y.; Wu J.; Wen W.; Skaltsounis L.; Jove R., MLS-2384, a new 6-bromoindirubin derivative with dual JAK/Src kinase inhibitory activity, suppresses growth of diverse cancer cells. *Cancer Biol Ther*. **2014**;15(2):178-84.
- [21] Schust J.; Sperl B.; Hollis A.; Mayer T.U.; Berg T., Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol*. **2006** Nov;13(11):1235-42.
- [22] Song H.; Wang R.; Wang S.; Lin J., A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**;102(13):4700-5.
- [23] Bhasin D.; Cisek K.; Pandharkar T.; Regan N.; Li C.; Pandit B.; Lin J.; Li P.K., Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. **2008**;18(1):391-5.

- [24] Lin L.; Hutzen B.; Li P.K.; Ball S.; Zuo M.; DeAngelis S.; Foust E.; Sobo M.; Friedman L.; Bhasin D.; Cen L.; Li C.; Lin J., A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells. *Neoplasia*. **2010** Jan;12(1):39-50.
- [25] Siddiquee K.; Zhang S.; Guida W.C.; Blaskovich M.A.; Greedy B.; Lawrence H.R.; Yip M.L.; Jove R.; McLaughlin M.M.; Lawrence N.J.; Sebt S.M.; Turkson J., Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2007** 1;104(18):7391-6
- [26] Fletcher S.; Singh J.; Zhang X.; Yue P.; Page B.D.; Sharmeen S.; Shahani V.M.; Zhao W.; Schimmer A.D.; Turkson J.; Gunning P.T., Disruption of transcriptionally active Stat3 dimers with non-phosphorylated, salicylic acid-based small molecules: potent in vitro and tumor cell activities. *Chembiochem*. **2009**;10(12):1959-64.
- [27] Zhang et al., Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses human breast and lung cancer xenografts, *PNAS*, **2012**, 109, 9623-9628.
- [28] Miyoshi K.; Takaishi M.; Nakajima K.; Ikeda M.; Kanda T.; Tarutani M.; Iiyama T.; Asao N.; DiGiovanni J.; Sano S., Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol*. **2011**;131(1):108-17.
- [29] Turkson J.; Zhang S.; Palmer J.; Kay H.; Stanko J.; Mora L.B.; Sebt S.; Yu H.; Jove R., Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. **2004**;3(12):1533-42.
- [30] Turkson J.; Zhang S.; Mora L.B.; Burns A.; Sebt S.; Jove R., A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem*. **2005**, 23;280(38):32979-88.