

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Syntéza intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených
od Sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu**

Bakalářská práce

Autor: Matěj Marek

Studijní program: B1407 Chemie

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: RNDr. Miroslav Psotka, PhD.

Hradec Králové

duben 2019

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Matěj Marek**
Osobní číslo: **S16CH058BP**
Studijní program: **B1407 Chemie**
Studijní obor: **Toxikologie a analýza škodlivin**
Název tématu: **Syntéza intermediátů inhibitorů STAT3 odvozených od Sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu**
Zadávající katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1.) Rešerše dostupné literatury
- 2.) Syntéza

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **30**

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

Seznam odborné 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, Ph.D.**
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. září 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **9. května 2019**

L.S.

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.
děkan

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

dne

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 9. 5. 2019

Matěj Marek

Poděkování:

Upřímně děkuji RNDr. Miroslavu Psoťkovi PhD. za pomoc při práci v laboratoři, poskytnutí odborných materiálů i za rady a pomoc při tvorbě této práce.

Anotace

MAREK, Matěj, *Syntéza intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených od Sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu*; Hradec Králové, 2019. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta.

Bakalářská práce je zaměřena na syntézu intermediátů STAT3 inhibitorů odvozených od Sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu. V teoretické části je popsána skupina STAT proteinů, podskupina STAT3 proteinů, možné způsoby jejich inhibice a struktury některých známých inhibitorů. Praktická část se věnuje syntéze sedmi syntonů vedoucích k sloučeninám odvozených od BP-1-102 a SF-1-066.

Klíčová slova

Rakovina, STAT proteiny, STAT3, Sarcosine tert-butyl ester hydrochlorid, inhibitory STAT3, BP-1-102, SF-1-066

Annotation

The bachelor thesis is focused on the synthesis of STAT3 inhibitors intermediates derived from Sarcosine tert-butyl ester hydrochloride. In the theoretical part STAT proteins, subgroup of STAT3 proteins, possible methods of inhibition and structures of some known inhibitors are described. Practical part is devoted to the synthesis of seven synthons leading to the compounds derived from BP-1-102 and SF-1-066.

Keywords

Cancer, STAT proteins, STAT3, Sarcosine tert-butyl ester hydrochloride, STAT3 inhibitors, BP-1-102, SF-1-066

Obsah

Seznam zkratk.....	8
Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	10
Seznam schémat.....	11
1 Úvod.....	12-13
1.1 Prevence rakoviny.....	12-13
1.2 Léčba rakoviny.....	13
2 STAT.....	14-23
2.1 STAT3.....	15-23
2.1.1 Inhibice STAT3.....	17-23
2.1.1.1 Inhibitory receptorů na povrchu buněk.....	17-18
2.1.1.2 Inhibitory kináz.....	18-20
2.1.1.3 Přímé inhibitory.....	21-23
2.1.1.3.1 SH2 doménové inhibitory.....	21-22
2.1.1.3.2 DNA-vazebné doménové inhibitory.....	22-23
3 Cíle práce.....	24
4 Výsledky a diskuze.....	25-29
5 Experimentální část.....	30-35
6 Zdroje.....	36-37

Seznam zkratek

Bn	Benzyl
DCM	Dichlormetan
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Kyselina deoxyribonukleová
DIPEA	N,N-Diisopropyletylamin
EGF	Epidermální růstový faktor
EtOAc	Ethyl acetát
FGF	Fibroblastový růstový faktor
HGF	Hepatocytární růstový faktor
IGF	Insulinu podobný růstový faktor
IL	Interleukin
l.t.	Laboratorní teplota
MeCN	Acetonitril
NMR	Nukleární Magnetická Rezonance
PDGF	Růstový faktor z destiček
RVO	Rotační vakuová odparka
STAT	Signal transducer and activator of transcription
^t Bu	tert-Butyl
TFA	Kyselina trifluoroctová
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
VEGF	Vaskulární endotelilální růstový faktor

Seznam obrázků

Obrázek 1	Krystalová struktura monomeru STAT (128-688). Některé cykly (rezidua 185-193, 371-378, 399-400, 419-430) jsou nepravidelné a nejsou přítomny v konečné molekule.....	14
Obrázek 2	Krystalová struktura dimeru STAT3 (a – pohled ze shora, b – pohled zepředu). Coiled-coil doména (zelená), DNA binding doména (červená), SH ₂ doména (modrá), Y705 (žlutá), DNA (oranžová).....	15
Obrázek 3	Struktura STAT3. 6 domén – N-doména (bílá), Coiled-coil doména (zelená), DNA binding doména (červená), Linker doména (oranžová), SH ₂ doména (modrá). Mezi SH ₂ doménou a TAD je segment obsahující fosforylační místo Y705.....	15
Obrázek 4	Signální kaskáda STAT3: Aktivace receptorů na povrchu buňky vazbou cytokináz nebo růstových faktorů, fosforylace a aktivace STAT3. Aktivované STAT3 tvoří homo- nebo heterodimery a přesunují se z cytoplazmy do jádra, kde se váží na DNA a indukují transkripci.....	16
Obrázek 5	Inhibitory receptorů na povrchu buněk.....	18
Obrázek 6	Inhibitory kináz.....	20
Obrázek 7	Přímé inhibitory.....	23
Obrázek 8	Struktury sedmi stavebních bloků.....	24
Obrázek 9	Stavební bloky standardů BP-1-102 a SF-1-066.....	28

Seznam tabulek

Tabulka 1	Výtěžnosti tosylovaných esterů.....	26
Tabulka 2	Výtěžnosti tosylovaných kyselin.....	27
Tabulka 3	Celkové výtěžnosti tosylovaných kyselin po dvou krocích.....	28

Seznam schémat

Schéma 1	Retrosyntetická analýza.....	25
Schéma 2	Všeobecný postup přípravy tosylovaných derivátů 12-18	26
Schéma 1	Všeobecný postup kyselé hydrolýzy.....	27
Schéma 4	Příprava kyseliny 2-(4-metyl-N-metylfenylsulfonamid)octová (3).....	29

1. Úvod

Rakovina (nádorové onemocnění) je skupina chorob, jejichž společným znakem je abnormální nekontrolovatelný růst buněk, které se mohou rozšířit do dalších částí těla krevním a lymfatickým systémem. Nádorové buňky na rozdíl od normálních buněk nereagují na signály pro ukončení růstu a také mají omezenou citlivost vůči indukci programované buněčné smrti (apoptóze). Dále jsou nádorové buňky méně specializované než normální buňky. Pro imunitní systém, který odstraňuje poškozené nebo abnormální buňky z těla, jsou nádorové buňky nerozeznatelné od normálních buněk. Rakovinné buňky mají schopnost migrovat do dalších částí těla a zakládat vzdálená ložiska, tzv. metastázy. Podle schopnosti rakovinných buněk pronikat do další tkáně lze rozdělit nádory na maligní (zhoubné) a benigní (nezhoubné).

Nádorové onemocnění je způsobeno genetickými změnami (mutací DNA), které kontrolují funkci buněk (především jejich růst a dělení). Tyto genetické změny mohou být zděděny, mohou být získány v průběhu života jako důsledek poruch při dělení buněk nebo poškozením buněk vlivem vnějšího prostředí (například tabákový kouř, radiace, ultrafialové záření). Geny způsobující rakovinné bujení se nazývají onkogeny. Vznikají mutací z normálních genů. Existuje několik způsobů, jak může z genu vzniknout onkogen, například delecí (vymazáním části původního genu) nebo translokací (přestavbou genu).^(1,2)

1.1 Prevence rakoviny:

- a) Primární prevence spočívá v zabránění kontaktu s činitelem vyvolávajícím chorobu. Mezi rizikové faktory patří kouření, nadměrné pití alkoholu, nedostatek pohybu, expozice karcinogenům, expozice ionizujícímu záření atd.)
- b) Sekundární prevence spočívá ve včasném záchytu onemocnění v raném stádiu. Základem sekundární prevence je aktivní vyhledávání nádorových onemocnění, například absolvování pravidelných gynekologických prohlídek, vyšetření prsu a mamografie, test na přítomnost krve ve stolici atd.)

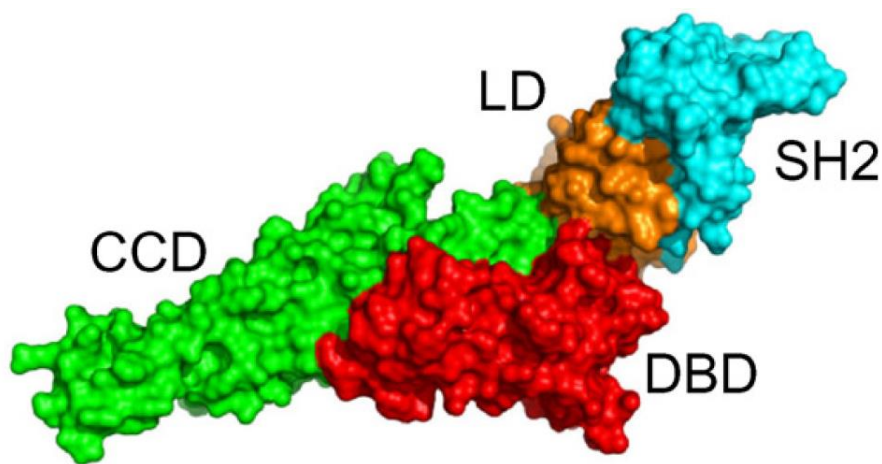
- c) Terciární prevence spočívá v předcházení dalším škodám v důsledku onemocnění nebo terapie.

1.2 Léčba rakoviny:

- a) Operativní – účinná u nádorů, které nemetastázovaly. Například mastektomie u rakoviny prsu. Operativně může být odstraněn celý nádor, anebo může být odstraněna jen část nádoru. Odstranění části nádoru se používá tehdy, pokud by odstranění celého nádoru mohlo poškodit nějaký orgán v těle. Částečné odstranění nádoru může zvýšit účinnost léčby nádoru jiným způsobem. Mezi rizika spojená s operativní léčbou rakoviny patří infekce, krvácení, poškození okolních tkání, nežádoucí reakce na anestetika.
- b) Radioterapeutická – využívá účinků ionizujícího záření k zahubení rakovinných buněk. Zdroj ionizujícího záření může být mimo tkáň (teloradioterapie), nebo může být v úzkém kontaktu s ozařovaným ložiskem (brachyterapie). Ionizující záření ničí genetický materiál buněk, čímž jim zabrání v růstu a dělení. Ničí ho buďto přímo, nebo jsou jeho prostřednictvím vytvářeny v buňce radikály, které poškozují DNA. Ionizující záření poškozuje kromě rakovinných buněk i normální buňky. Radioterapeutická léčba se dá použít například u rakoviny prsu, jater, plic, prostaty, atd.
- c) Chemoterapeutická – využívá cytostatik, které poškozují DNA buňky. Normální buňky mohou poškozenou DNA opravit, kdežto nádorové buňky nemohou. Cytostatika také poškozují cíleně spíše rychle se dělící buňky, tudíž spolu s nádorovými buňkami budou poškozovat také například buňky střevního epitelu, některé krevní buňky, pohlavní buňky. Obvykle se používá kombinace dvou a více látek – této léčbě se říká kombinovaná chemoterapie.
- d) Imunoterapeutická – snaží se využít imunitního systému ke zničení nádoru. K takové léčbě patří například aktivní imunizace pomocí očkování, kdy jsou vlastní leukocyty obohaceny o rozpoznávací systém (antigen a jeho receptor).^(1,2)

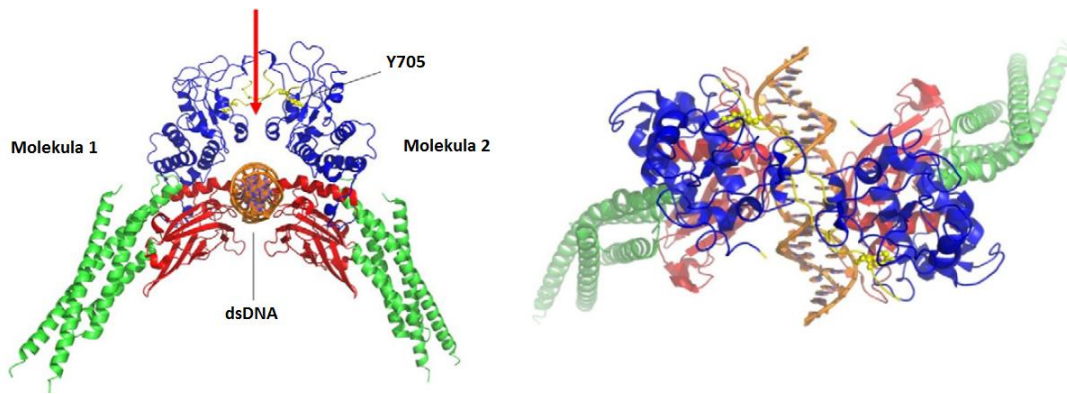
2. STAT

STAT (signal transducer and activator of transcription) je skupina proteinů fungující jako transkripční faktory, které regulují genovou expresi zodpovědnou za buněčný cyklus, životnost buněk a imunitní odpověď. Tím ovlivňují diferenciaci, proliferaci, migraci a apoptózu buněk (je jich celkem 7 – STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6). Každý STAT je kódován jiným genem, ale všechny jsou strukturně podobné (Obrázek 1).⁽³⁾



Obrázek 1: Krystalová struktura monomeru STAT (128-688). Některé cykly (rezidua 185-193, 371-378, 399-400, 419-430) jsou nepravidelné a nejsou přítomny v konečné molekule. (Obrázek je převzat z Zhiyong Ren et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 374, 1–5.)

Aktivita STAT závisí na jejich vazbě k sekvencím aminokyselin obsahujících fosforylovaný tyrosin. Fosforylace STAT spouští STAT-STAT dimerizaci. Po fosforylaci jsou dimery transportovány do jádra pomocí importinů. Aktivní dimery v jádře spouští genovou transkripci navázáním na specifický receptor (Obrázek 2).⁽⁴⁾



Obrázek 2: Krystalová struktura dimeru STAT3 (a – pohled ze shora, b – pohled zepředu). Coiled-coil doména (zelená), DNA binding doména (červená), SH₂ doména (modrá), Y705 (žlutá), DNA (oranžová). (Obrázek je převzat z Edwin Nkansah et al. *FEBS Letters* **2013**, 587, 833–839.)

STAT u savců mají 6 strukturních domén. N-doména (ND), coiled-coil doména (CCD), DNA-binding doména (DBD), linker doména, SH₂ doména, „transcriptional activation“ doména (TAD) (Obrázek 3).⁽³⁾



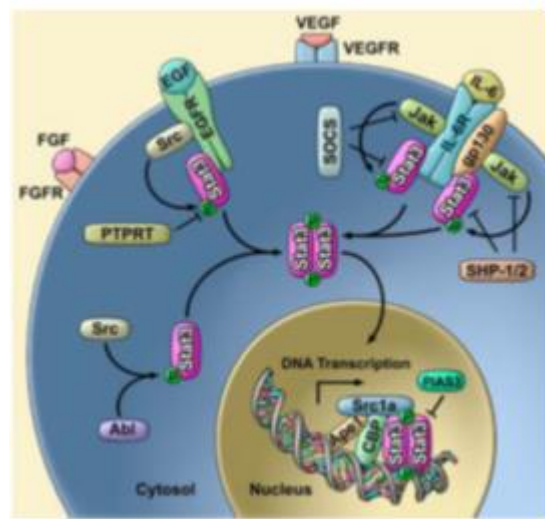
Obrázek 3: Struktura STAT3. 6 domén – N-doména (bílá), Coiled-coil doména (zelená), DNA binding doména (červená), Linker doména (oranžová), SH₂ doména (modrá). Mezi SH₂ doménou a TAD je segment obsahující fosforylační místo Y705. (Obrázek je převzat z Zhiyong Ren et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 374, 1–5.)

2.1 STAT3

STAT3 jsou proteiny, jejichž zvýšená aktivita byla zjištěna v mnoha typech nádorů (rakovina prsu, rakovina prostaty), byly objeveny v roce 1994 výzkumnou skupinou Zhonga.⁽⁵⁾ STAT3 indukuje transkripci genů kontrolujících diferenciaci, zánik a proliferaci buněk. STAT3 aktivované geny blokují apoptózu buněk, podporují proliferaci buněk, jejich životnost

a inhibují protirakovinné imunitní odpovědi. Cytokinázy (například interleukiny IL-6, IL-10, IL-11) stimulují fosforylaci tyrosinových reziduí STAT3 (Tyr 705), což způsobuje tvorbu homodimerů, které se akumulují v jádru buňky a vážou se na DNA sekvence. Abnormální aktivace STAT3 se objevuje v mnoha lidských karcinomech a podporuje vývoj nádoru (například snížená regulace genové exprese vedoucí k nekontrolovatelnému růstu nádorových buněk). Přerušení STAT3 signalizace vede k inhibici růstu rakovinných buněk a jejich apoptózu. Přerušení STAT3 signalizace neovlivňuje jen rakovinné buňky, ale i normální buňky. ⁽⁶⁻¹⁰⁾

STAT3 jsou aktivovány vazbou cytokináz (například interleukinů IL-6, IL-10, IL-11) nebo růstových faktorů (například EGF, FGF = fibroblast growth factor, VEGF = vascular endothelial growth factor) na receptory na povrchu buňky. Aktivovaný STAT3 začne tvořit homodimer s jiným STAT3. Dimery disociují z receptoru a jsou přeneseny z cytoplasmy do jádra, kde se naváží na specifické DNA sekvence indukující transkripci. STAT3 mají vysokou aktivitu v mnoha typech hematopoetických i pevných nádorů (například leukémie, rakovina prsu, rakovina prostaty) (Obrázek 4).⁽⁶⁾



Obrázek 4: Signální kaskáda STAT3: Aktivace receptorů na povrchu buňky vazbou cytokináz nebo růstových faktorů, fosforylace a aktivace STAT3. Aktivované STAT3 tvoří homo- nebo heterodimery a přesunují se z cytoplazmy do jádra, kde se váží na DNA a indukují transkripci. (Obrázek je převzat z Steffanie L. Furtek; Donald S. Backos; Christopher J. Matheson and Philip Reigan *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 308-318.)

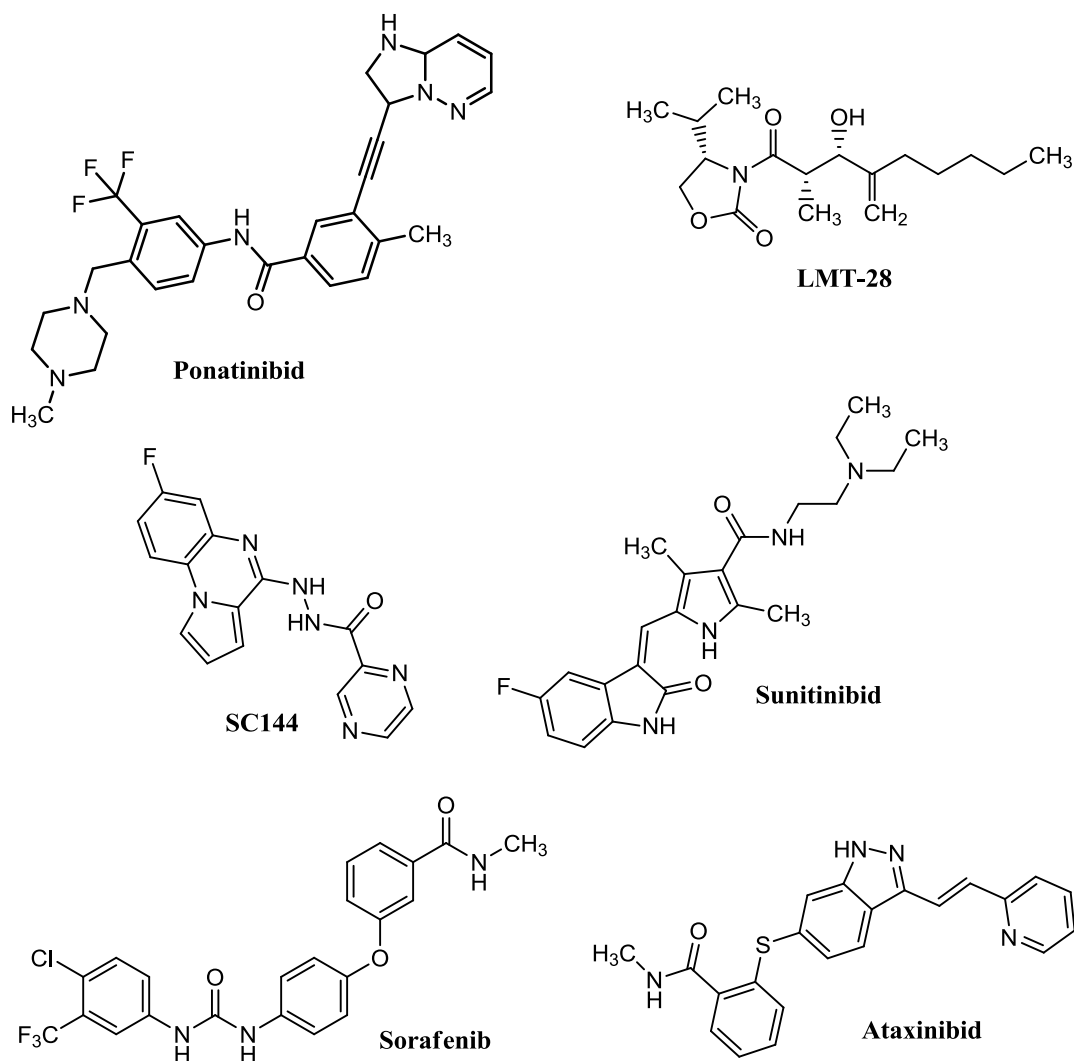
2.1.1 INHIBICE STAT3

2.1.1.1 Inhibitory receptorů na povrchu buněk

U mnoha růstových faktorů a cytokináz byla prokázána jejich aktivace receptory na povrchu buňky. Mezi růstové faktory indukující aktivaci STAT3 proteinů patří EGF (epidermální růstový faktor), FGF (fibroblastový růstový faktor), HGF (hepatocytární růstový faktor), růstový faktor z destiček (PDGF), VEGF (vaskulární endotelilální růstový faktor) a IGF (insulinu podobný růstový faktor). Mezi cytokinázy schopné stimulovat aktivaci STAT3 proteinů patří interleukiny IL-6, IL-10, IL-11, LIF (leukemické inhibiční faktory) a leptin. Inhibice cytokináz a růstových faktorů se prokázala jako účinná.

Inhibitory EGF receptorů, jako například peptidový aptamer KDI1 a malé molekuly (například PD153035) přímo interagují s EGFR a inhibují fosforylaci STAT3 proteinů a tím také zabrání jejich aktivaci a dimerizaci. Inhibitor ponatinib inhibuje FGF receptory, čímž snižuje fosforylaci STAT3 proteinů a také růst nádorů *in vivo*. Mezi inhibitory VEGF receptorů patří sorafenib, sunitinib a atixinib, u všech inhibitorů se ukázala snížená aktivace STAT3 proteinů.

IL-6 signalizaci inhibuje tocilizumab, který se ukázal jako účinný při revmatoidní artritidě. Nízkomolekulární, orálně podávané IL-6 inhibitory nebyly řádně prozkoumány, protože způsobovaly rozvoj bakteriálních infekcí spojených s prodlouženou blokáží IL-6 (kvůli roli cytokinů při potlačování imunitních odpovědí). U nedávno objeveného LMT-28 se ukázalo, že inhibuje IL-6 aktivaci a snižuje hodnoty STAT3 proteinů. Další nízkomolekulární inhibitor SC144 indukoval sníženou aktivaci STAT3 proteinů (Obrázek 5).⁽⁶⁾



Obrázek 5: Inhibitory receptorů na povrchu buněk.

2.1.1.2 Inhibitory kináz

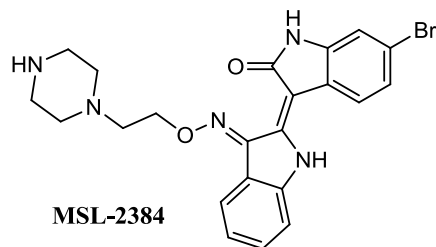
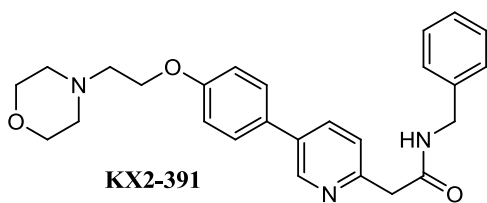
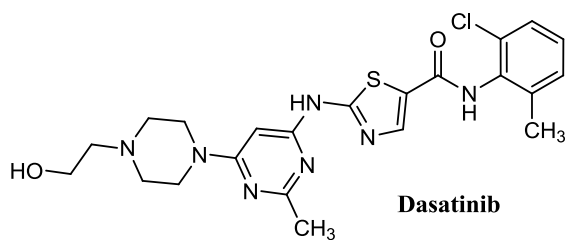
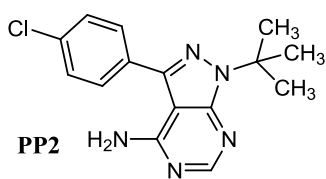
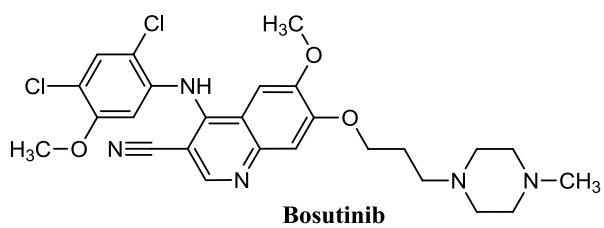
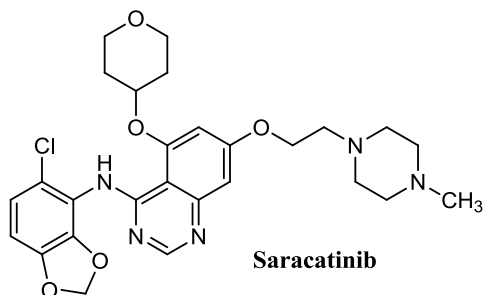
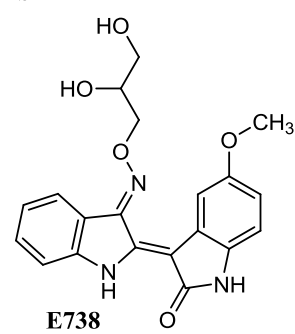
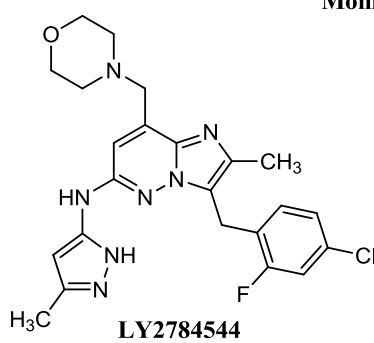
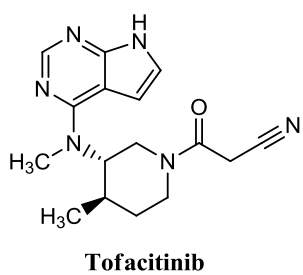
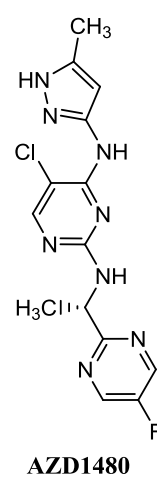
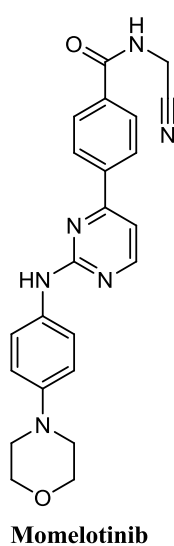
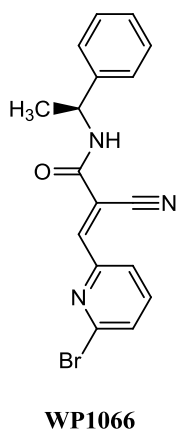
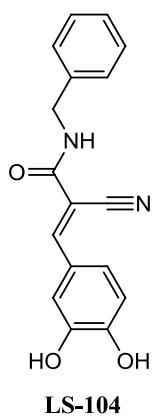
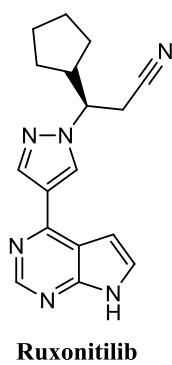
Ačkoliv se způsob snižování aktivity STAT3 proteinů inhibicí receptorů na povrchu buňky ukázal jako účinný, mnohem více prozkoumaný způsob spočíval ve vývoji nízkomolekulárních kinázových inhibitorů, které inhibují STAT3 proteiny ve stádiu fosforylace. Biologická aktivita STAT3 proteinů je závislá na jejich aktivaci, takže rozumný postup při jejich inhibici je inhibicí kináz, které STAT3 proteiny aktivují. Existuje mnoho tyrosinových kináz schopných fosforylovat STAT3 proteiny, největší pozornost je věnována JAK a Src kinázám. Mezi inhibitory JAK kináz patří například ruxolitinib a tofacitinib, WP-1066, LS-104, CEP-701, LY2784544 a CYT387 (momelotinib). Bylo prokázáno, že snižují STAT3 aktivaci, což se projevilo zvýšenou apoptózou a snížením růstu rakovinných buněk.

U AZD1480 inhibitoru se ukázaly nežádoucí účinky (neurotoxicita). Stejně jako u IL-6 inhibitorů se u JAK inhibitorů projevilo zvýšený rozvoj bakteriálních infekcí.

Src kinázy byly identifikovány jako onkoproteiny a má se za to, že hrají důležitou roli při vývoji nádoru. Mezi Src inhibitory patří saracatinib (AZD0530), bosutinib (SKI-606), dasatinib a KX2-391. PP2 inhibitor inhibuje fosforylaci Src a STAT3 a zároveň zpomaluje růst nádoru pomocí selektivní inhibice.

Pan-Jak/Src inhibitory byly také zkoumány z hlediska inhibice STAT3 signalizace. E738, derivát přírodní indirubinu prokázal účinnost na JAK a Src kinázy. Indirubin se dá získat z přírodních zdrojů, ale byla vyvinuta syntéza bromindirubinu, který měl větší vazebnou afinitu ke kinázám (JAK, Src). MLS-2384 (6-bromindirubin) inhibuje JAK i Src kinázy, byla u něj prokázána snížená aktivace STAT3 fosforylace a protirakovinná aktivita v mnoha typech nádorů.

Inhibice kinázové aktivity může úspěšně snížit aktivitu STAT3 proteinů, nevýhodou je ale výskyt nežádoucích účinků. Nedochozí k inhibici kináz pouze v rakovinných buňkách, ale také v ostatních buňkách. Dále jsou kinázy schopné aktivovat nejen STAT3 proteiny, ale také STAT1 a STAT5 proteiny, což má za následek další nežádoucí účinky. Kvůli těmto důvodům se začal zkoumat další způsob inhibice STAT3 proteinů a to inhibice přímá (Obrázek 6).⁽⁶⁾



Obrázek 6: Inhibitory kináz.

2.1.1.3 Přímé inhibitory

Přímé inhibitory jsou nízkomolekulární látky, které přímo inhibují aktivitu STAT3 a byly vyvinuty za účelem léčby a prevence rakoviny. Ačkoliv je výsledek stejný, mechanismus účinku různých přímých STAT3 inhibitorů se liší. Mohou například ovlivňovat fosforylaci, dimerizaci, translokaci do jádra, vazbu na DNA (Obrázek 7).⁽⁶⁾

2.1.1.3.1 SH2 doménové inhibitory

První skupinou přímých inhibitorů jsou SH2 doménové inhibitory. STAT3 homodimerizace je zprostředkována protein-protein interakcemi mezi SH2 doménami jednotlivých monomerů, zejména fosforylací Tyr705. Tuto molekulární interakci lze ovlivnit nízkomolekulárními molekulami, které přímo inhibují STAT3 proteiny. V SH2 doméně STAT3 proteinů jsou 3 vazebná místa vhodná pro malé molekuly. Většina SH2 doménových inhibitorů se může navázat alespoň na 2 tato vazebná místa.

Stattic (STAT3 inhibitor) selektivně inhibuje STAT3 dimerizaci (inhibuje pouze STAT3 dimerizaci a nikoliv dimerizaci STAT1 a STAT5) a zabraňuje translokaci do jádra. Aktivita stattic je ovlivněna časem, dále možnou interakcí s cysteinovými rezidui (například Cys687, který se nachází blízko fosfopeptidické vazebné části SH2 domény). STA-21 inhibitor inhibuje vazbu STAT3 na DNA, tím potlačuje transkripci a indukuje apoptózu rakovinných buněk. Molekula STA-21 byla dále upravena na méně komplexní formu (LLL-3), která má podobnou aktivitu jako STA-21, ale lépe prostupuje buněčnou stěnou. V průběhu testování LLL-3 inhibitorů se ukázala jejich účinnost proti leukémii a také se zjistil jejich synergismus v kombinaci s Imatinibem.⁽¹¹⁾ Další inhibitor, LLL-12 (vzniklý nahrazením acetylové skupiny v LLL-3 sulfonamidem) prokazuje účinnost proti rakovině prsu a rakovině slinivky břišní.⁽¹²⁾ Inhibitor S3I-201 vykazuje třikrát vyšší selektivitu k STAT3 oproti STAT1. S3I-201 inhibitor blokuje formaci STAT3 homodimerů a inhibuje proliferaci (například u rakoviny prsu a jaterních buněk).

SF-1-066 inhibitor (analog S3I-201) blokuje vazbu STAT3 na EGF receptory a inhibuje růst maligních buněk. Z molekuly SF-1-066 bylo vytvořeno 15 dalších analogů. Například

BP-1-102, který narušuje formaci komplexu STAT3-DNA. S3I-1757, další analog S3I-201, snižoval aktivitu STAT3 proteinů v jádře (u rakoviny prsu a rakoviny plic).

Od počátku vývoje STAT3 SH2 doménových inhibitorů bylo potřeba vyhodnotit účinnost těchto nízkomolekulárních látek proti STAT3 aktivitě. Schust a Burg vyvinuli zkoušku pomocí fluorescenční polarizace, důležitou pro vyhodnocení účinnosti těchto látek. Zkouška využívala kompetice malých fluorescenčních peptidů k gp130 podjednotce IL-6 receptoru a prokázala vysokou afinitu k SH2 doméně STAT3 proteinů. Pomocí této metody se v knihovnách chemických látek hledaly potenciální další SH2 doménové inhibitory STAT3 proteinů. Ačkoliv bylo největší úsilí věnováno vývoji SH2 doménových inhibitorů, v nedávné době došlo také ke zkoumání DNA-vazebných doménových inhibitorů.⁽⁶⁾

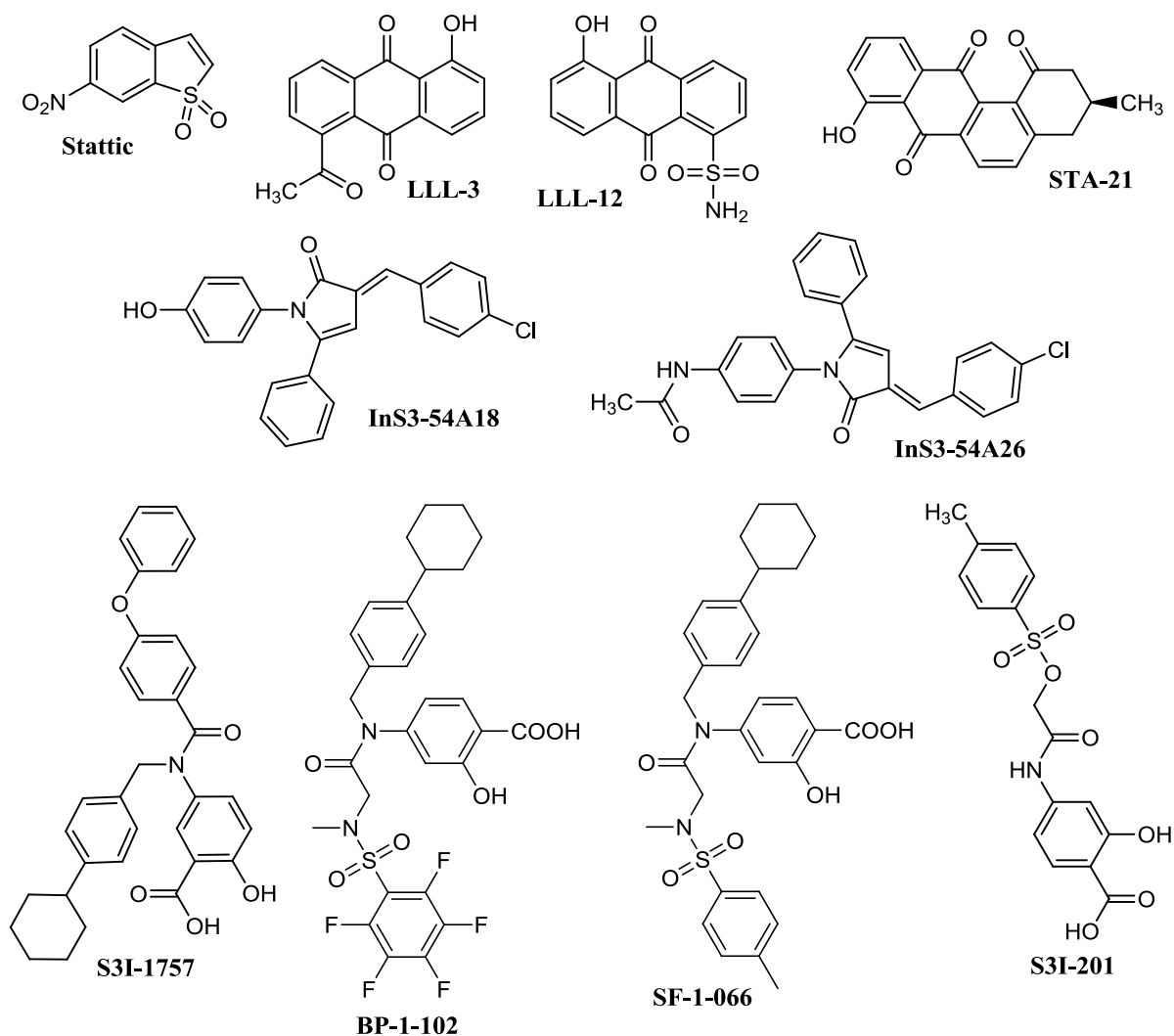
2.1.1.3.2 DNA-vazebné doménové inhibitory

U STAT3, jakožto u transkripčního faktoru, závisí jeho aktivita na interakci aktivního STAT3 dimeru s jemu odpovídající DNA-vazebnou sekvencí. Každý monomer v aktivním STAT3 dimeru má celkově 4 smyčky, tři z DNA-vazebné domény a jednu z linker domény, která zprostředkovává interakce s double helixem DNA.

Sloučeniny platiny tvoří adukty s DNA a tím narušují schopnost STAT3 navázat se na DNA, což vede k apoptóze rakovinných buněk, které jsou STAT3 dependentní. Sloučeniny platiny navrhované jako STAT3 inhibitory jsou klasifikovány jako platičité komplexy a liší se od chemoterapeutik (př. cisplatina), které nemají žádné inhibiční efekty na STAT3. Nejznámější platičité DNA-vazebné inhibitory jsou CPA-1, CPA-7 a chlorid platičitý. Nedávno byla objevena další sloučeniny platiny – IS3-295, která inhibuje DNA-vazebnou kapacitu STAT3, ačkoliv přesný mechanismus není zcela znám.

Stejně jako u SH2 doménových inhibitorů, byly zkoumány peptidy schopné narušit DNA-vazebné domény STAT3 proteinů. DBD-1, malý peptidový aptamer, narušuje DNA-vazebné domény, ale neinterferuje se STAT3 fosforylací. Při in vivo testování vykazoval jenom slabé interakce. InS3-54 inhibitor byl selektivnější na STAT3 než na STAT1 (byla pozorována snížená transkripce STAT3 proteinů a indukce apoptózy u buněk rakoviny prsu a rakoviny plic. Pomocí strukturního porovnávání identifikovali v ChemDiv databázi

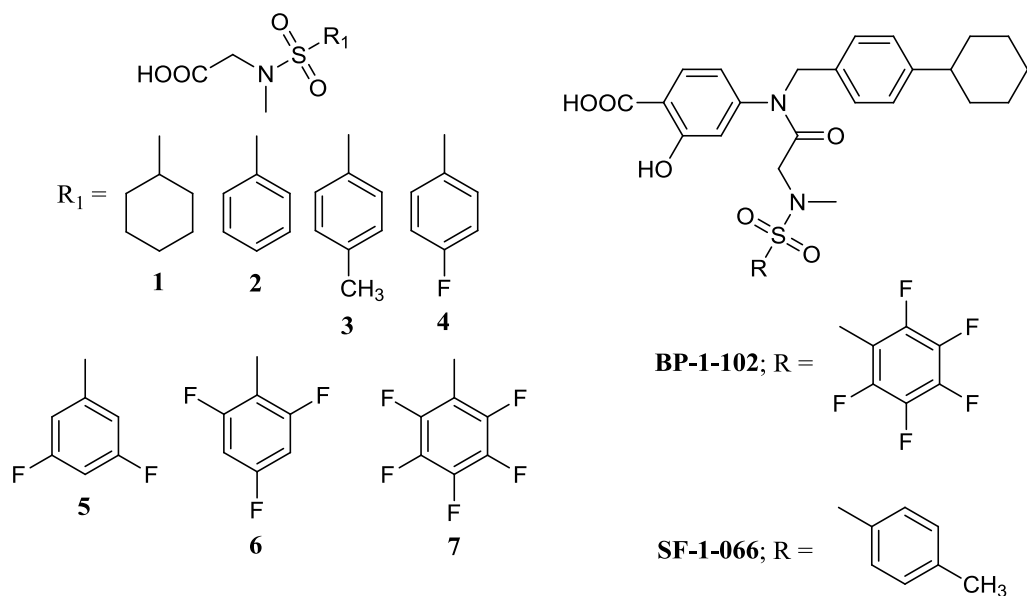
79 komerčně dostupných sloučenin, které měli 80% strukturní podobnost s InS3-54, několik těchto látek mělo lepší aktivitu proti STAT3 proteinům, než parentní látka.⁽¹³⁾ U látek InS3-54A18 a InS3-54A26 byla později zjištěna cytotoxicita. U InS3-54A26 hrála navíc roli špatná rozpustnost.⁽⁶⁾



Obrázek 7: Přímé inhibitory.

3. Cíle práce

Příprava sedmi stavebních bloků **1-7** pro syntézu analogů BP-1-102 a SF-1-066 s různými substituenty R_1 a R_2 (Obrázek 8).



Obrázek 8: Struktury sedmi stavebních bloků.

4. Výsledky a diskuze

Retrosyntetická analýza přípravy příslušných stavebních bloků **1-7** nás dovedla k sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu (**10**) jako výchozí látce (Schéma 1).

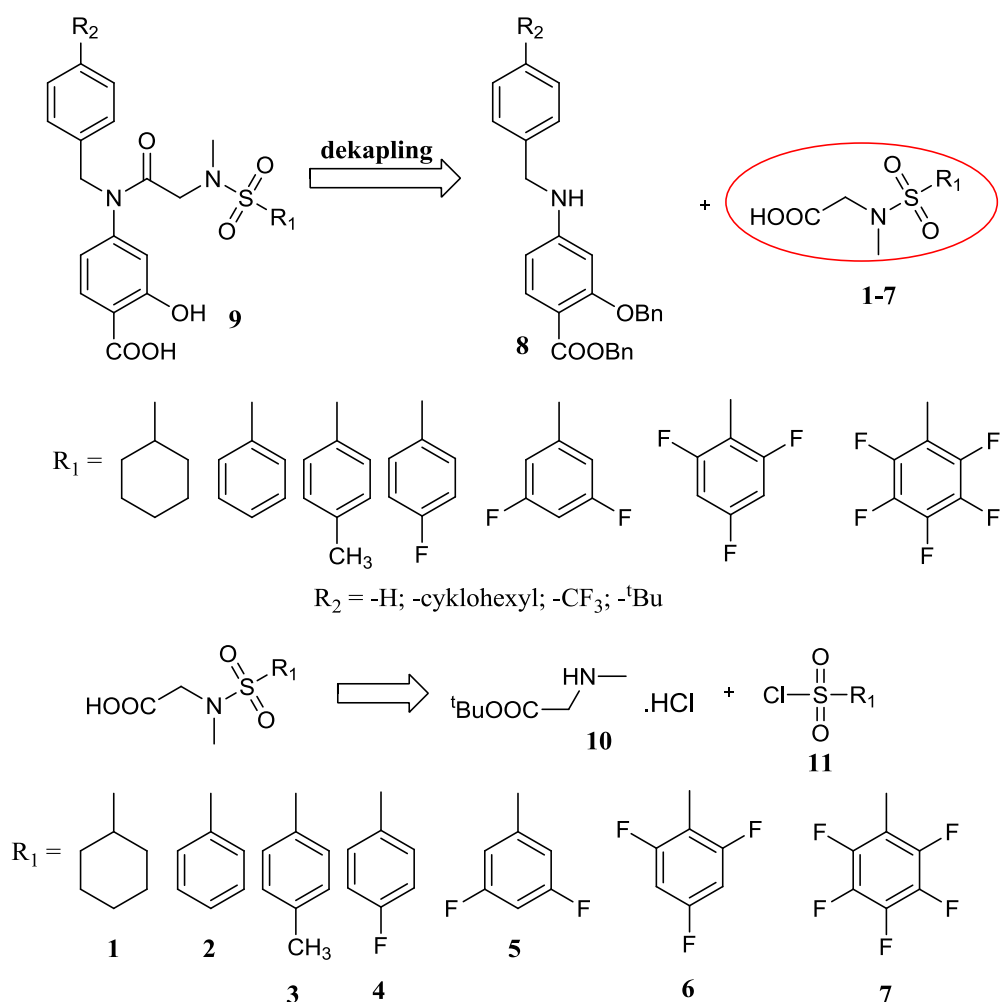


Schéma 1: Retrosyntetická analýza.

Prvním krokem je tosylování sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu (**10**) se sedmi zvolenými tosyl chloridy v MeCN za použití DIPEA jako báze. Reakce probíhala nejdřív 30 minut při teplotě 0°C a následně 60 minut při laboratorní teplotě (Schéma 2).

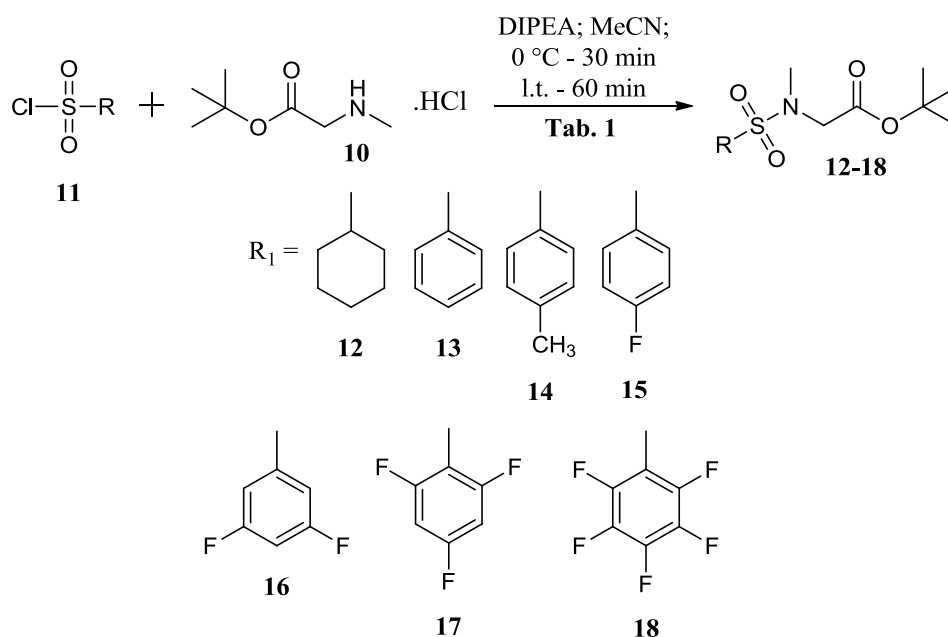
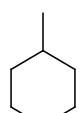
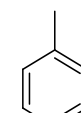
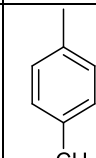
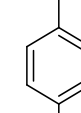

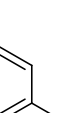
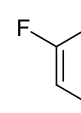


Schéma 2: Všeobecný postup přípravy tosylovaných derivátů **12-18**.

Příslušné výtěžnosti tosylovaných esterů **12-18** jsou uvedeny v Tabulce 1. Použitím aromatických tosylů byli připraveny estery **13-18** ve výborné výtěžnosti, tzn. $\geq 90\%$. Reakcí s cyklohexansulfonyl chloridem byl připraven ester **12** s uspokojivou 44% výtěžností.

Tabulka 1: Výtěžnosti tosylovaných esterů

číslo	12	13	14	15	16	17	18
R							
Výt.	44%	98%	98%	95%	90%	98%	90%

Následně jsme v druhém kroku podrobili připravené tosylované estery **12-18** kyselé hydrolýze tert-butyl esterové funkční skupiny za použití TFA v suchém DCM. Reakce probíhala 30 minut při laboratorní teplotě (Schéma 3).

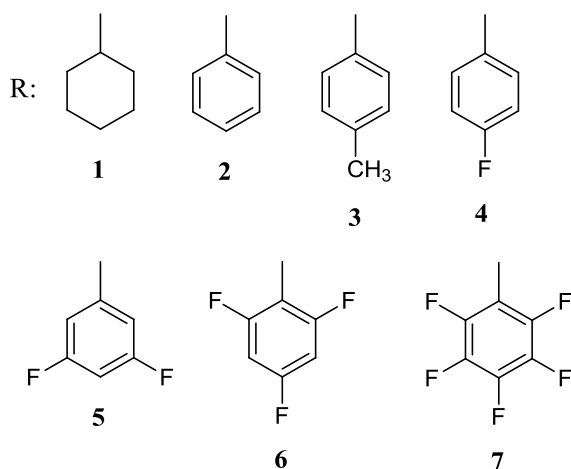
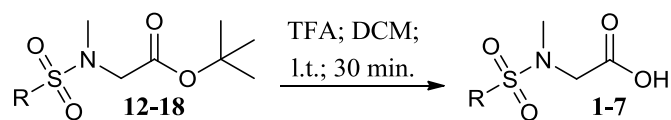
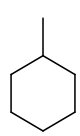
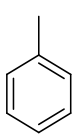
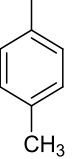
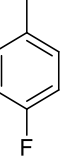
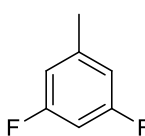
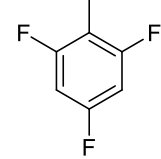
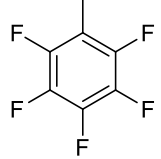


Schéma 2: Všeobecný postup kyselé hydrolyzy.

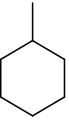
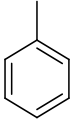
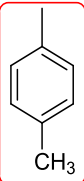
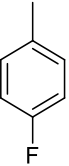
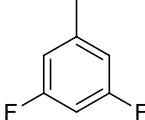
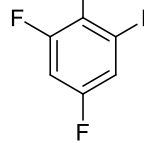
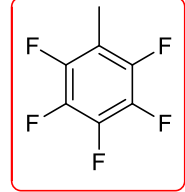
Příslušné výtěžnosti tosylovaných kyselin **1-7** jsou uvedeny v Tabulce 2. U všech tosylovaných esterů probíhala kyselá hydrolyza s výbornou výtěžností, tzn. $\geq 94\%$.

Tabulka 2: Výtěžnosti tosylovaných kyselin

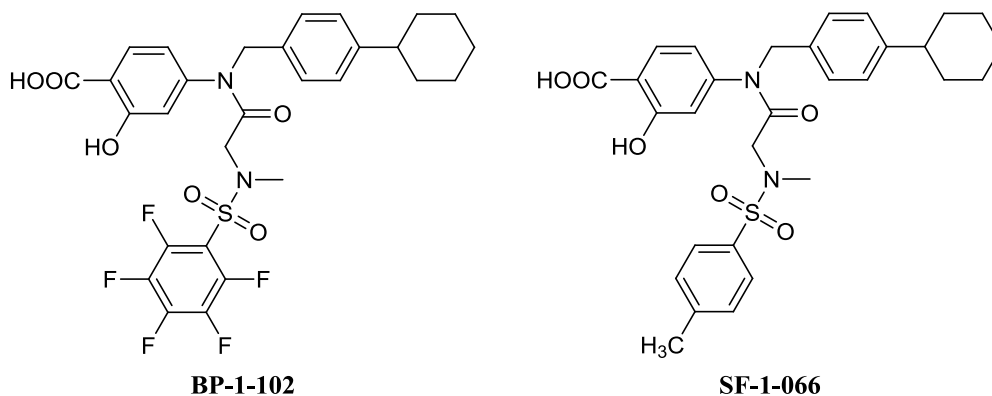
číslo	1	2	3	4	5	6	7
R							
Výt.	95%	97%	99%	99%	95%	94%	97%

Finální výtěžnosti tosylovaných kyselin **1-7** po dvou krocích, tosylaci a kyselé hydrolyze, jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Celkové výtěžnosti tosylovaných kyselin po dvou krocích

číslo	1	2	3	4	5	6	7
R							
Výt.	42%	95%	97%	94%	86%	92%	87%

V Tabulce 3 jsou červeně zakroužkované připravené kyseliny **3** (finální výtěžnost byla 97%) a **7** (finální výtěžnost byla 87%), které jsou stavebními bloky standardů BP-1-102 a SF-1-066 (Obrázek 9).



Obrázek 9: Stavební bloky standardů BP-1-102 a SF-1-066.

Z Tabulky 3 dále vyplývá, že cyklohexyl (číslo **1**) jako alkylový zbytek se ukázal nejméně vhodný z důvodu nejnižší finální výtěžnosti (42%). Všechny ostatní kyseliny, které obsahovali ne/substituovaný aromatický alkylový zbytek, tzn. **2-7**, měly finální výtěžnost nad 85%.

Nejllepší výtěžek byl dosažen u kyseliny **3**, která byla připravena reakcí sarcosine tert-butyl ester hydrochloridu (**10**) s *p*-Toluensulfonyl chloridem (**19**) (Schéma 4).

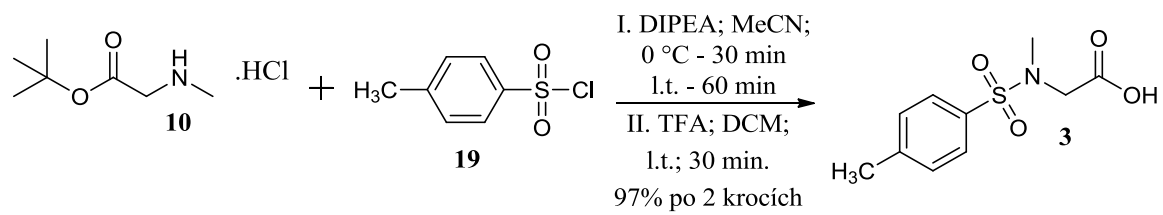


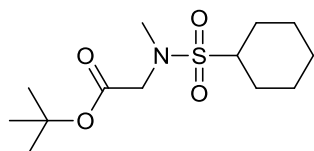
Schéma 4: Příprava kyseliny 2-(4-metyl-N-metylfenylsulfonamid)octové (**3**).

5. Experimentální část

Všeobecný postup přípravy tosylovaných derivátů 12-18 (Schéma 2):

Sarcosine tert-butyl ester hydrochlorid (**10**; 1 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeCN (3,7 ml) a při 0 °C byl přidán DIPEA (2.5 mmol). Po 10 minutách byl následně přidán příslušný tosyl chlorid (1.5 mmol) a finální směs se míchala 30 minut při 0 °C a jednu hodinu při pokojové teplotě. Po zreagování výchozí látky na základě analýzy TLC destičky byl k směsi přidán EtOAc (3,5 ml) a destilovaná voda (3,5 ml) a směs se míchala dalších 10 minut. Následně byla reakční směs extrahovaná s EtOAc (2×5 ml) a spojené organické vrstvy byly extrahované s NaHCO₃ (8 ml). Organická vrstva byla následně vysušena s Na₂SO₄, přefiltrována a surová směs zahuštěna na RVO. Příslušný tosylovaný ester byl izolovaný sloupcovou chromatografií ve fázi H:EA = 10:1.⁽¹⁴⁾

Tert-Butyl 2-(N-metylcyklohexylsulfonamid)acetát (**12**):



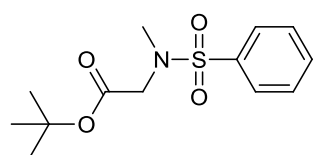
12: C₁₃H₁₈FNO₄S, 128 mg, 44%, bílá tuhá látka, T_{tání} = 37.6 - 39.6 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.21 (m; 4H; 2×CH₂), 1.45 (s; 9H; CH₃), 1.51 (m; 2H; CH₂), 1.85 (m; 2H; CH₂), 2.16 (m; 2H; CH₂), 2.92 (m; 1H; CH),

2.96 (s; 3H; CH₃), 3.88 (s; 2H; CH₂); **¹³C NMR (CDCl₃):** δ 25.1 (CH₂), 25.2 (2×CH₂), 26.4 (2×CH₂), 28.0 (C_q), 36.4 (CH₃), 51.8 (CH₂), 62.4 (CH), 82.1 (C_q), 168.4 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 292,2; experimentální hodnota = 292,2.

Tert-Butyl 2-(N-metylfenylsulfonamid)acetát (**13**):



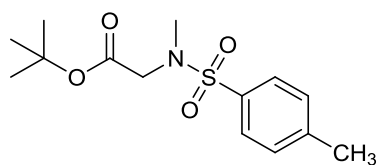
13: C₁₃H₁₈FNO₄S, 280 mg, 98%, bílá tuhá látka, T_{tání} = 59.9 - 61.7 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 1.34 (s; 9H; CH₃), 2.81 (s; 3H; CH₃), 3.90 (s; 2H; CH₂), 7.61 (m; 2H; 2×CH), 7.68 (m; 1H; CH), 7.79 (m; 2H; 2×CH); **¹³C NMR**

(DMSO): δ 27.4 (3×CH₃), 35.3 (CH₃), 51.0 (CH₂), 81.2 (C_q), 126.8 (2×CH), 129.2 (2×CH), 132.7 (CH), 138.0 (C_q), 167.3 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 286,1; experimentální hodnota = 286,1.

Tert-Butyl 2-(4-metyl-N-metylfenylsulfonamid)acetát (14):

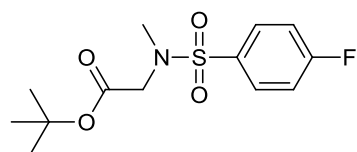


14: C₁₃H₁₈FNO₄S, 293 mg, 98%, bezbarvý olej.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.30 (s; 9H; CH₃), 2.31 (s; 3H; CH₃), 2.77 (s; 3H; CH₃), 3.75 (s; 2H; CH₂), 7.21 (d; 2H; J = 8.0 Hz; 2×CH), 7.58 (d; 2H; J = 8.0 Hz; 2×CH); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 21.1 (CH₃), 27.6 (3×CH₃), 35.2 (CH₃), 51.3 (CH₂), 81.7 (C_q), 127.0 (2×CH), 129.3 (2×CH), 135.1 (C_q), 143.1 (C_q), 167.1 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 300,1; experimentální hodnota = 300,2.

Tert-Butyl 2-(4-fluoro-N-metylfenylsulfonamid)acetát (15):

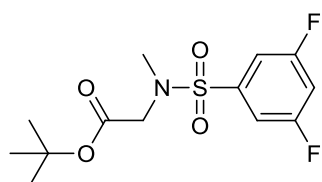


15: C₁₃H₁₈FNO₄S, 288 mg, 95%, bílá tuhá látka,
T_{tání} = 93,5 – 95,5 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 1.34 (s; 9H; CH₃), 2.81 (s; 3H; CH₃), 3.92 (s; 2H; CH₂), 7.44 (m; 2H; 2×CH), 7.86 (m; 2H; 2×CH); ¹³C NMR (DMSO): δ 27.5 (3×CH₃), 35.3 (CH₃), 51.0 (CH₂), 81.3 (C_q), 116.2-116.4 (d; 2×CH), 130.0 (d; 2×CH), 134.5 (d; CH), 163.3-165.3 (d; C_q), 167.3 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 304,1; experimentální hodnota = 304,1.

Tert-Butyl 2-(3,5-difluoro-N-metylfenylsulfonamid)acetát (16):

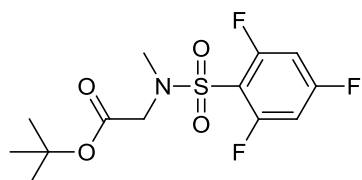


16: C₁₃H₁₇F₂NO₄S, 289 mg, 90%, bílá tuhá látka,
T_{tání} = 78,6 – 80,6 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 1.35 (s; 9H; CH₃), 2.86 (s; 3H; CH₃), 4.01 (s; 2H; CH₂), 7.55 (m; 2H; 2×CH), 7.65 (m; 1H; CH); ¹³C NMR (DMSO): δ 27.4 (3×CH₃), 35.4 (CH₃), 50.9 (CH₂), 81.4 (C_q), 108.3-108.7 (t; CH), 110.7-110.9 (dd; 2×CH), 141.5-141.6 (t; C_q), 161.1-161.2 (d; C_q), 163.1-163.2 (d; C_q), 167.2 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 322,1; experimentální hodnota = 322,1.

Tert-Butyl 2-(2,4,6-trifluoro-N-metylfenylsulfonamid)acetát (17):

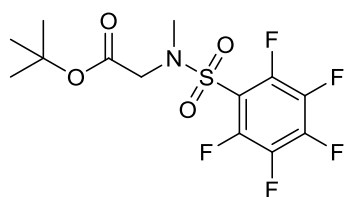


17: C₁₃H₁₆F₃NO₄S, 333 mg, 98%, žlutý olej.

¹H NMR (DMSO): δ 1.35 (s; 9H; CH₃), 2.96 (s; 3H; CH₃), 4.08 (s; 2H; CH₂), 7.44 (m; 2H; 2×CH); **¹³C NMR (DMSO):** δ 27.4 (3×CH₃), 35.0 (CH₃), 50.7 (CH₂), 81.6 (C_q), 102.2-102.7 (m; 2×CH), 113.6-113.9 (m; C_q), 158.7-158.9 (dd; C_q), 160.7-160.9 (dd; C_q), 163.3-165.6 (dt; C_q), 167.1 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 340,1; experimentální hodnota = 340,1.

Tert-Butyl 2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-N-metylfenylsulfonamid)acetát (18):



18: C₁₃H₁₄F₅NO₄S, 338 mg, 90%, bezbarvý olej.

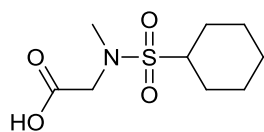
¹H NMR (DMSO): δ 1.38 (s; 9H; CH₃), 2.98 (s; 3H; CH₃), 4.13 (s; 2H; CH₂). **¹³C NMR (DMSO):** δ 27.4 (3×CH₃), 35.1 (CH₃), 51.0 (CH₂), 81.9 (C_q), 114.6 (m; C_q), 136.4 (m; C_q), 138.4 (m; C_q), 143.1 (m; C_q), 144.3 (m; C_q), 145.1 (m; C_q), 167.1 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 376,1; experimentální hodnota = 376,0.

Všeobecný postup kyselé hydrolyzy esterů 12-18 na příslušné finální tosylované kyseliny 1-7 (Schéma 3):

Příslušný tosylovaný ester byl rozpuštěn v suchém DCM (6 ml) a při pokojové teplotě byla za stálého míchání pomalu přikapána TFA (6 ml). Finální reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 30 minut. Rozpouštědlo bylo odpařené pomocí RVO a směs byla následně 3-4 krát zředěna s DCM a zahuštěna. Finální produkt jsme získali dosušením na vakuové pumpě (Vacuubrand-P3003 vario).

Kyselina 2-(N-metylcyklohexylsulfonamid)octová (1):

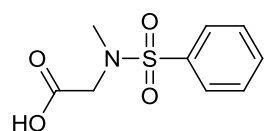


1: C₉H₁₇NO₄S, 224 mg, 95%, hnědá tuhá látka, T_{tání} = 82.0 - 84.0 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 1.22 (m; 6H; 3×CH₂), 1.77 (m; 2H; CH₂), 2.02 (m; 2H; CH₂), 2.88 (s; 3H; CH₃), 3.09 (m; 1H; CH), 3.92 (s; 2H; CH₂); **¹³C NMR (DMSO):** δ 24.5 (2×CH₂), 24.8 (CH₂), 26.0 (2×CH₂), 35.8 (CH₃), 50.4 (CH₂), 60.3 (C_q), 170.6 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 235,1; experimentální hodnota = 236,1.

Kyselina 2-(N-metylfenylsulfonamid)octová (2):

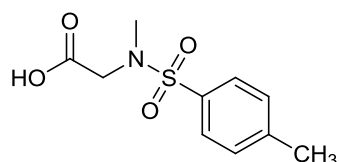


2: C₉H₁₁NO₄S, 222 mg, 97%, sivá tuhá látka, T_{tání} = 180.1 - 181.8 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 2.78 (s; 3H; CH₃), 3.89 (s; 2H; CH₂), 7.61 (m; 2H; 2×CH), 7.68 (m; 1H; CH), 7.79 (m; 2H; 2×CH); **¹³C NMR (DMSO):** δ 35.5 (CH₃), 50.5 (CH₂), 126.9 (2×CH), 129.3 (2×CH), 132.8 (CH), 137.9 (C_q), 169.8 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 228,0; experimentální hodnota = 228,1.

Kyselina 2-(4-metyl-N-metylfenylsulfonamid)octová (3):

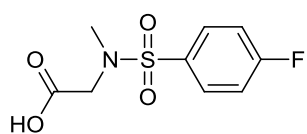


3: C₁₀H₁₃F₁₀NO₄S, 241 mg, 99%, hnědá tuhá látka, T_{tání} = 148,0 - 150,0 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.43 (s; 3H; CH₃), 2.87 (s; 3H; CH₃), 4.00 (s; 2H; CH₂), 7.32 (d; 2H; J = 8.2 Hz; 2×CH), 7.69 (d; 2H; J = 8.2 Hz; 2×CH); **¹³C NMR (CDCl₃):** δ 21.5 (CH₃), 35.8 (CH₃), 50.8 (CH₂), 127.3 (2×CH), 129.8 (2×CH), 134.6 (C_q), 144.1 (C_q), 173.9 (C=O).

MS (ESI⁺): vypočítaná hodnota = 242,1; experimentální hodnota: 242,1.

Kyselina 2-(4-fluoro-N-metylfenylsulfonamid)octová (4):

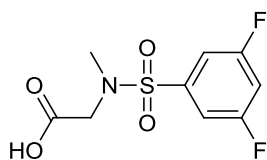


4: C₉H₉F₁₀NO₄S, 245 mg, 99%, bílá tuhá látka,
T_{tání} = 160,4 – 162,2 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 2.79 (s; 3H; CH₃), 3.91 (s; 2H; CH₂), 7.44 (m; 2H; 2×CH), 7.87 (m; 2H; 2×CH); **¹³C NMR (DMSO):** δ 35.4 (CH₃), 50.4 (CH₂), 116.2-116.4 (d; 2×CH), 130.0 (d; 2×CH), 134.4 (d; CH), 163.4-165.4 (d; C_q), 169.7 (C=O).

MS (ESI): vypočítaná hodnota = 246,0; experimentální hodnota: 246,1.

Kyselina 2-(3,5-difluoro-N-metylfenylsulfonamid)octová (5):

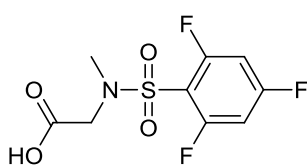


5: C₉H₉F₂NO₄S, 250 mg, 95%, sivá tuhá látka, T_{tání} = 132,1 – 133,8 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 2.84 (s; 3H; CH₃), 4.00 (s; 2H; CH₂), 7.55 (m; 2H; 2×CH), 7.63 (m; 1H; CH); **¹³C NMR (DMSO):** δ 35.4 (CH₃), 50.4 (CH₂), 108.3-108.7 (t; CH), 110.7-110.9 (dd; 2×CH), 141.4-141.5 (t; C_q), 161.1-161.2 (d; C_q), 163.1-163.2 (d; C_q), 169.7 (C=O).

MS (ESI): vypočítaná hodnota = 264,0; experimentální hodnota: 264,1.

Kyselina 2-(2,4,6-trifluoro-N-metylfenylsulfonamid)octová (6):

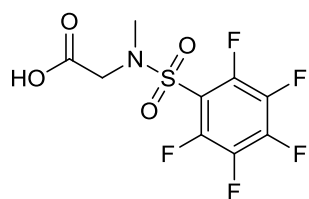


6: C₉H₈F₃NO₄S, 266 mg, 94%, bílá tuhá látka,
T_{tání} = 166.1 – 167.2 °C.

¹H NMR (DMSO): δ 2.94 (s; 3H; CH₃), 4.07 (s; 2H; CH₂), 7.43 (m; 2H; 2×CH); **¹³C NMR (DMSO):** δ 35.0 (CH₃), 50.2 (CH₂), 102.2-102.7 (m; 2×CH), 113.6-113.9 (m; C_q), 158.7-158.9 (dd; C_q), 160.8-160.9 (dd; C_q), 163.3-165.6 (dt; C_q), 169.5 (C=O).

MS (ESI): vypočítaná hodnota = 282,0; experimentální hodnota: 282,1.

Kyselina 2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-N-metylfenylsulfonamid)octová (7):



7: C₉H₆F₅NO₄S⁻, 310 mg, 97%, bílá tuhá látka, T_{tání} = 191-193 °C.

¹H NMR (CD₃OD): δ 3.06 (s; 3H; CH₃), 4.19 (s; 2H; CH₂).

¹³C NMR (CD₃OD): δ 35.9 (CH₃), 51.6 (CH₂), 116.9 (m; C_q), 138.3 (m; C_q), 140.3 (m; C_q), 145.2 (m; C_q), 146.2 (m; C_q), 147.2 (m; C_q), 171.3 (C=O).

MS (ESI): vypočítaná hodnota = 318,0; experimentální hodnota: 318,1.

6. Zdroje

- [1] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [2] <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/cancer>
- [3] 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.
- [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 PEMSA and X-ray crystallography. *FEBS Letters* **2013**, *587*, 833–839.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Takakuma K.; Ogo N.; Uehara Y.; Takahashi S.; Miyoshi N.; Asai A., Novel Multiplexed Assay for Identifying SH2 Domain Antagonists of STAT Family Proteins. *PLoS ONE* **2013**, *8*, 1-11.
- [8] Johnston P., A. a Grandis J., R., STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges. *Mol. Interv.* **2011**, *11*, 18-26.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] Mencialha A. L.; Du Rocher B.; Salles D.; Binato R.; Abdelhay E., LLL-3, a STAT3 inhibitor, represses BCR-ABL-positive cell proliferation, activates apoptosis and improves the effects of Imatinib mesylate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65*, 1039-1046.
- [12] Lin L.; Hutzen B.; Li Pui-Kai; Ball S.; Zuo M.; DeAngelis S.; Foust E.; Sobo M.; Friedman L.; Bhasin D.; Cen L.; Li Ch. a Lin J., A Novel Small Molecule, LLL12, Inhibits STAT3 phosphorylation and Activities and Exhibits Potent Growth-Suppressive Activity in Human Cancer Cells. *Neoplasia* **2010**, *12*, 39-50.
- [13] Huang W.; Dong Z.; Chen Y.; Wang F.; Wang C., J.; Peng H.; He Y.; Hangoc G.; Pollok K.; Sandusky G.; Fu X., Y.; Browmeyer H., E.; Zhang Z., Y.; Liu J., Y. a Zhang J., T., Small-molecule inhibitors targeting the DNA-binding domain of STAT3 suppress tumor growth, metastasis and STAT3 target gene expression in vivo. *Oncogene* **2015**, 1-10.
- [14] Fletcher S.; Page B., D., G.; Zhang X.; Yue P.; Li Z., H.; Sharmeen S.; Singh J.; Zhao W.; Schimmer A., D.; Trudel S.; Turkson J. a Gunning P., T., Antagonism of the Stat3–Stat3 Protein Dimer with Salicylic Acid Based Small Molecules. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 1459-1470.