

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Syntéza nových axiálně chirálních derivátů
benzimidazolu modifikovaných v poloze 5 s potenciální
protirakovinnou aktivitou**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Adéla Srovnalová**
Studijní program: B0512A130008 – Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Jana Pospíšilová**
Rok: 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Mé poděkování patří školitelce Mgr. Janě Pospíšilové, za její ochotu, profesionální vedení trpělivost, odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat panu docentovi RNDr. Petru Cankařovi, Ph.D., katedře organické chemie a biochemie za možnost vypracování tohoto tématu ve výzkumné skupině docenta Cankaře. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také Mgr. Ing. Václavu Bazgierovi, Ph.D., který se zasloužil o výsledky molekulového dockingu, RNDr. Adamu Příbylkovi, Ph.D. za spolupráci na chirální separaci připravených derivátů, pracovišti LRR, konkrétně Mgr. Lucii Rárové, Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Vojáčkové za možnost se podílet na biologickém testování. Za finanční podporu mé poděkování patří grantu IGA_PrF_2024_028. Poděkování patří také rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adéla Srovnalová
Název práce	Syntéza nových axiálně chirálních derivátů benzimidazolu modifikovaných v poloze 5 s potenciální protirakovinnou aktivitou
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Pospíšilová
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá strukturním motivem benzimidazolu, ze kterého vychází navržené cílové látky, které by potenciálně mohly působit na nádorové buňky. Důvodem vysoké úmrtnosti je hlavně rezistence na léčiva, proto je důležité pokračovat ve vývoji látek, které cílí na maligní buňky. Nádorová rezistence, toxicita léků a nízká úspěšnost léků v klinických studiích se řadí mezi omezující faktory při léčbě rakoviny, což zapříčiňuje poměrně vysokou úmrtnost. Cílem této práce je rozšířit SAR studii látek se stejným strukturním motivem o nové deriváty zavedením CF_3 skupiny do polohy 5 cílových benzimidazolů, seznámit se s principy organické syntézy a následnou analýzou připravených organických látek. Dalším krokem bylo zjistit, jaký vliv má tato skupina na aktivitu daných derivátů, proto proběhlo biologické testování na několika buněčných liniích rakovinných buněk (HeLa, Eol-1, MV4-11). V experimentální části je tato bakalářská práce zaměřena na tříkrokovou syntézu. Prvním krokem byla nukleofilní aromatická substituce, následována redukcí nitroskupiny a konečnou reakcí byla cyklizace s vhodnými cyklizačními činidly. Získané benzimidazolové deriváty byly následně analyzovány pomocí analytické metody ^1H a ^{13}C NMR. Dále byla také stanovena čistota pomocí HPLC. Ve spolupráci s katedrou fyzikální chemie byl proveden molekulový docking zacílený na kolchicinové vazebné místo, které se nachází na β -tubulinu.

Klíčová slova	Benzimidazol, axiální chiralita, benzimidazolové deriváty, rakovina, léčba, medicína, protirakovinné účinky, nukleofilní aromatická substituce, redukce, cyklizace, molekulový docking, biologické testování
Počet stran	70
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Adéla Srovnalová
Title	Synthesis of new axially chiral benzimidazole derivatives modified at position 5 with potential anticancer activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Pospíšilová
The year of presentation	2024

Abstract

This bachelor thesis deals with the structural motif of benzimidazole, which is the basis for the proposed target compounds that could potentially act on cancer cells. The reason for the high mortality rate is mainly due to drug resistance, so it is important to continue to develop agents that target malignant cells. Tumour resistance, drug toxicity and the low success rate of drugs in clinical trials are among the limiting factors in cancer treatment, causing relatively high mortality rates. The aim of this work is to extend the SAR study of compounds with the same structural motif to new derivatives by introducing a CF₃ group at position 5 of the target benzimidazoles, to learn the principles of organic synthesis and subsequent analysis of the prepared organic compounds. The next step was to find out the effect of this group on the activity of the given derivatives, therefore bioassays were performed on several cancer cell lines (HeLa, Eo1-1, MV4-11). The experimental part of this bachelor thesis focuses on the three-step synthesis. The first step was nucleophilic aromatic substitution, followed by reduction of the nitro group and the final reaction was cyclization with suitable cyclization reagents. The benzimidazole derivatives obtained were subsequently analyzed by ¹H and ¹³C NMR analytical method. Further, the purity was also determined by HPLC. Molecular docking targeting the colchicine binding site located on β-tubulin was performed in collaboration with the Department of Physical Chemistry.

Keywords	Benzimidazole, axial chirality, benzimidazole derivatives, cancer treatment, medicine, anticancer effects, nucleophilic aromatic substitution, reduction, cyclization, molecular docking, bioassay
Number of pages	70
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Benzimidazol.....	3
2.2	Fyzikální vlastnosti benzimidazolů.....	3
2.3	Chemické vlastnosti benzimidazolů.....	3
2.4	Axiální chiralita.....	4
2.5	Syntéza benzimidazolů.....	4
2.5.1	První příprava benzimidazolového derivátu	5
2.5.2	Příprava derivátů benzimidazolu z <i>o</i> -fenylendiaminů	5
2.5.3	Příprava benzimidazolu přesmykem	7
2.6	Biologická aktivita benzimidazolů.....	8
2.6.1	Antimikrobiální účinky	9
2.6.2	Antivirotika	10
2.6.3	Protizánětlivé a analgetické účinky.....	11
2.7	Rakovina	12
2.7.1	Protirakovinné účinky benzimidazolových derivátů.....	13
2.7.2	Protinádorové látky necílené na onkogeny	14
2.7.2.1	Inhibitory topoizomerázy	14
2.7.2.2	Interkalace DNA a alkylační činidla	14
2.7.3	Specificky cílené protinádorové látky.....	15
2.7.3.1	Inhibitory kináz	15
2.7.3.2	Inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy-1.....	16
2.7.3.3	Antagonisté androgenního receptoru.....	17
2.8	Mikrotubuly jako cíl léčby rakoviny.....	17
2.8.1	Cytoskelet.....	17

2.8.2	Mikrotubuly	18
2.8.3	Struktura tubulinu	18
2.8.4	Polymerace mikrotubulů	19
2.8.5	Inhibitory mikrotubulů	19
2.8.6	Vazebné domény na mikrotubulech	21
2.8.7	Kolchicinová doména.....	22
2.8.7.1	Látky vázající se do kolchicinového místa.....	23
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
3.1	Reakční schéma a použité reaktanty	25
3.2	Příprava benzimidazolových derivátů s jódem jako substituentem R ¹ ...	26
3.2.1	Nukleofilní aromatická substituce.....	27
3.2.2	Redukce nitroskupiny.....	27
3.2.3	Cyklizační reakce	28
3.3	Příprava benzimidazolových derivátů s nitrilem jako substituentem R ¹	29
3.3.1	Nukleofilní aromatická substituce.....	29
3.3.2	Redukce nitroskupiny.....	30
3.3.3	Cyklizační reakce	31
3.3.4	Finální produkty	32
3.4	Cílové benzimidazolové deriváty.....	33
3.5	Chirální separace	34
3.6	Antiproliferační aktivita	34
3.7	Molekulový docking	35
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1	Syntéza	38
4.1.1	Použité chemikálie	38
4.1.2	<i>N</i> -(2-jodofenyl)-2-nitro-4-(trifluormethyl)anilin (III).....	39
4.1.3	<i>N</i> ¹ -(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diamin (IV)	39

4.1.4	1-(2-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol	40
4.1.5	1-(2-jodofenyl)-2-fenyl-5-(trifluoromethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (Vb).....	41
4.1.6	1-(2-jodofenyl)-2-(4-methoxyfenyl)-5-(trifluoromethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazole (Vc)	41
4.1.7	2-(3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl)-1-(2-jodofenyl)-5-(trifluoromethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (Vd).....	42
4.1.7.1	2-((2-nitro-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzoni-tril (VIII).....	43
4.1.7.2	2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzoni-tril (IX).....	43
4.1.7.3	2-(2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-yl)benzoni-tril (Xe).....	44
4.1.7.4	2-(2-phenyl-5-(trifluormethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-yl)benzoni-tril (Xf)	45
4.1.7.5	2-(2-(4-methoxyfenyl)-5-(trifluormethyl)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-yl)benzoni-tril (Xg)	45
5	ZÁVĚR	47
6	LITERATURA	49
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
8	PŘÍLOHY	59
8.1	Příloha I: HPLC redukce železem.....	59
8.2	Příloha II: NMR spektra.....	60

Cíle práce

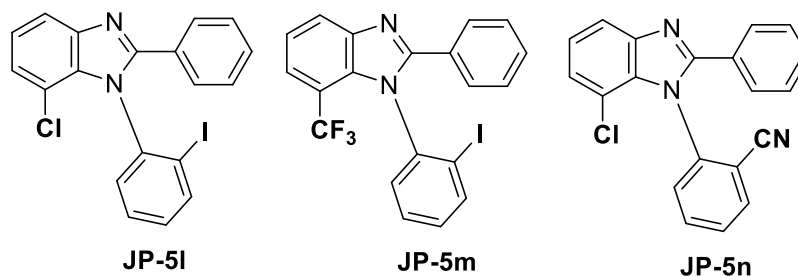
- Syntéza nových látek s potenciální protirakovinnou aktivitou.
- Literární rešerše týkající se problematiky benzimidazolu a jeho derivátů
- Rozšíření SAR studie o nové benzimidazolové deriváty zavedením CF₃ skupiny do polohy 5.
- Prozkoumání vlivu zavedené CF₃ skupiny na aktivitu syntetizovaných derivátů.
- Seznámení se s principy syntézy a separace organických látek.
- Charakterizace syntetizovaných látek pomocí analytických metod (HPLC/MS, NMR, HRMS, teploty tání).
- Testování finálních látek na protirakovinné účinky na různých buněčných liniích (HeLa, Eol-1, MV4-11).
- Molekulární docking nasyntetizovaných látek

1 ÚVOD

Benzimidazol lze zařadit mezi nejvýznamnější heterocyklus tvořený imidazolovým a fenylovým kruhem. Jeho deriváty patří mezi sloučeniny, jejichž vlastnosti se využívají v medicíně díky různým farmakologickým aktivitám. Jedná se o jednu z deseti nejčastěji používaných heterocyklických sloučenin mezi léčivy, která jsou schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Díky širokému spektru účinků se deriváty benzimidazolu využívají také v rámci onkoterapie.

Rakovina patří mezi onemocnění, které je rozšířené po celém světě. Velkým problémem při léčbě je rezistence vůči lékům. Tato rezistence může být vrozená, ale také získaná, proto je nutné pokračovat ve výzkumu a vývoji dalších látek, jejichž biologická aktivita by byla využita právě při léčbě různých variant tohoto onemocnění.

V rámci své bakalářské práce navazují na předchozí výzkum Mgr. Jany Pospíšilové, kdy byla nasyntetizována série 29 látek, které byly testovány na 7 nádorových buněčných liniích a normálních buňkách. Vysokou toxicitu vůči nádorovým buňkám vykazovaly látky **JP-5l**, **JP-5m**, **JP-5n** (Obr. 1), které se lišily v substituentem R² (I, CN). (Pospíšilová et al., n.d.)



Obr. 1: Neaktivnější struktury

Látka **JP-5n** prokazovala nejsilnější účinek ze všech připravených derivátů, bohužel však byla také toxická vůči normálním buňkám. Výměnou nitrilu za jód vznikla látka **JP-5l**, která vykazovala biologickou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím a nepůsobila toxicky na normální buňky RPE-1 nebo BJ (Tab. 1).

Tab. 1: Cytotoxické aktivity benzimidazolových derivátů

	R ¹	R ²	R ³	MV4-11	HeLa	G-361	A2780	RPE-1	BJ
5l	-Cl	-I	-Ph	8.4 ± 1.1	7.3 ± 0.6	5.8 ± 2.5	17.1 ± 3.8	>50	44.9 ± 0.4

Tab. 1: Cytotoxické aktivity benzimidazolových derivátů (pokračování)

(-)-5l	-Cl	-I	-Ph	7.4 ± 0.7	6.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2	>50	>50	>50
(+)-5l	-Cl	-I	-Ph	7.2 ± 0.4	7.4 ± 0.2	8.6 ± 1.1	18.3 ± 5.0	>50	>50
5n	-Cl	-CN	-Ph	8.0 ± 1.0	5.1 ± 1.0	4.9 ± 0.6	15.5 ± 2.3	23.4 ± 0.6	>50
(-)-5n	-Cl	-CN	-Ph	30.7 ± 1.3	3.2 ± 1.0	2.5 ± 0.2	7.0 ± 0.3	10.5 ± 1.1	>50
(+)-5n	-Cl	-CN	-Ph	4.1 ± 1.4	4.9 ± 0.7	6.6 ± 1.1	11.3 ± 1.9	17.3 ± 0.3	>50

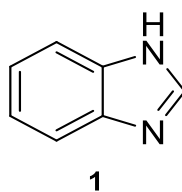
Benzimidazolový derivát **JP-5n** vykazoval rozdíly v aktivitách mezi jednotlivými atropoisomery. **(+)-JP-5n** vykazoval 7,5 krát vyšší cytotoxicitu než **(-)-JP-5n** vůči buňkám MV4-11. Deriváty **JP-5l** a **JP-5n** měly za následek blokaci buněčného cyklu a ovlivnění organizace mikrotubulů lidských buněk karcinomu děložního hrdla HeLa.

Na základě těchto poznatků byly navrženy struktury, které obsahují elektronakceptorovou skupinu v poloze 5, která nebyla příliš prozkoumána, avšak existují látky, které vykazovaly aktivitu vůči rakovinným buňkám. Příkladem je parbendazol, který se váže hluboko do kolchicinového místa a vykazuje účinky vůči buněčné linii rakovinných buněk HNSCC. Benzimidazolové deriváty se liší R¹ substituentem, který byl zvolen na základě předešlých studií a jedná se o jód a nitril. Struktury obsahující buďto jód nebo nitril se lišily v toxicitě vůči zdravým buňkám. Dále bude prozkoumán vliv R² substituentů, které obsahují elektronakceptorní nebo elektrondonorní skupinu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Benzimidazol

Benzimidazol nebo také 1,3 benzidiazol je benzo derivát imidazolu. (Chen et al., 2015) (Digwal et al., 2016) Jedná se o heterocyklickou aromatickou sloučeninu, jehož deriváty vykazují biologickou aktivitu. Heterocyklus obsahuje dva atomy dusíku, které jsou umístěny v poloze 1 a 3. Kyselost je způsobena přítomností vodíku v poloze 1 v molekule, který může reagovat s vodou, za vzniku kyseliny. Dusíkatý atom, který je součástí aromatického kruhu může být protonován. Vytvořený kation je stabilizován aromatickým charakterem benzimidazolového jádra. Benzimidazol **1** (Obr. 2) tedy vykazuje míru kyselosti, ale v porovnání s anorganickými kyselinami, je kyselost mnohem slabší. (B. Wright, 2002)



Obr. 2: Struktura benzimidazolu.

2.2 Fyzikální vlastnosti benzimidazolů

Zavedením substituentu do polohy 1 se obecně snižuje teplota tání. Rozpustnost benzimidazolů se vztahuje k vodíku, který je navázán na dusík v poloze 1. V případě, že je vodík navázán na imidový dusík, tak jsou tyto heterocyklické sloučeniny rozpustné lépe v polárních rozpouštědlech a hůře rozpustné v organických rozpouštědlech. Dále je benzimidazol rozpustný v horké vodě, ale špatně rozpustný např. v benzenu. Vliv na rozpustnost má také navázaný substituent. Např. 2-methylbenzimidazol se snadno rozpouští v nepolárních rozpouštědlech, kdežto 2-aminobenzimidazol je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech. (B. Wright, 2002)

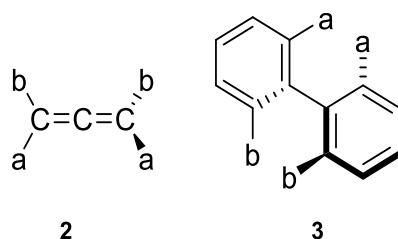
2.3 Chemické vlastnosti benzimidazolů

V poloze 1 je navázaný na dusíku atom vodíku, který může reagovat s aprotickými rozpouštědly. Tato skutečnost vede k tautomerii na *N*-nesubstitovaných

benzimidazolech. Díky této skutečnosti vykazuje určitý stupeň stability. (Singh & Silakari, 2018)Není ovlivněn koncentrovanou anorganickou kyselinou při zahřátí, ani působením horké kyseliny chlorovodíkové nebo zásad. Dále je heterocyklus odolný vůči redukci. Oxidací je benzimidazolový kruh štěpen pouze za radikálních podmínek. S kyselinami benzimidazoly snadno tvoří soli. (B. Wright, 2002)

2.4 Axiální chiralita

Jedná se o termín, který se používá pro označení stereoizomerie, která vzniká v důsledku neplanárního uspořádání substituentů kolem osy chiraloty. (P. G. Moss, 2009) Tento typ izomerie se často vyskytuje v biologicky aktivních látkách. (Hu & Xia, 2023)Substituenty jsou tedy navázány kolem osy tak, že nejsou totožné se svým zrcadlovým obrazem. (Svobodová, 2009)Jedním typem axiálně chirálních sloučenin jsou atropoizomery, mezi které patří např. biaryly (Obr. 3). Tyto sloučeniny mají zablokovanou rotaci kolem jednoduché vazby. Dalším typem jsou alleny **2** (Obr. 3) či spirany **3**. Konfigurace v chirálních centrech je popsána stereodeskriptory Ra a Sa. (P. G. Moss, 2009)



Obr. 3: Struktura allenu (1) a biarylu (2)

2.5 Syntéza benzimidazolů

Historie syntézy prvního benzimidazolu spadá až do roku 1951. Výchozí látkou pro syntézu benzimidazolových sloučenin jsou většinou *ortho*-diaminobenzenové deriváty **4**, které reagují s cyklizačními činidly (Schéma 1). (B. Wright, 2002)

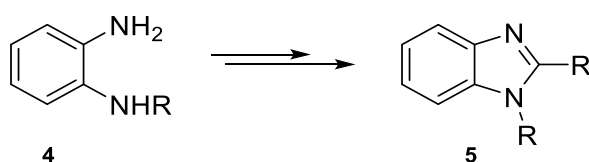


Schéma 1: Obecná syntéza benzimidazolových derivátů, (B. Wright, 2002)

2.5.1 První příprava benzimidazolového derivátu

První benzimidazolový derivát byl poprvé syntetizován redukcí aminoskupiny a následnou dehydratací z 2-nitro-4-methylacetanilidu **7** (Schéma 2). (B. Wright, 2002)

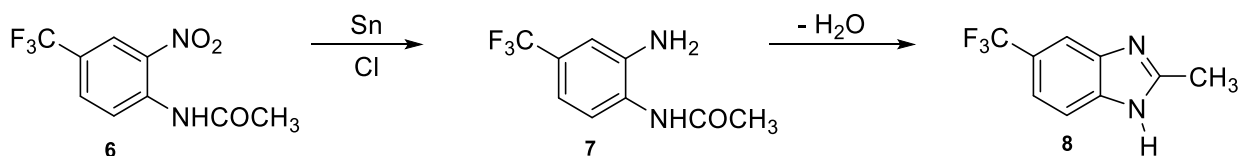


Schéma 2: Schéma přípravy prvního benzimidazolového derivátu. (B. Wright, 2002)

2.5.2 Příprava derivátů benzimidazolu z *o*-fenylendiaminů

Velmi používanou metodou přípravy benzimidazolových derivátů je kondenzace *o*-fenylendiaminů s aldehydy. Oxidace se provádí pomocí různých oxidačních činidel a za těchto podmínek vznikají 2-substituované benzimidazoly. Vybraným příkladem pro demonstraci tohoto přístupu je reakce *o*-fenylendiaminu se substituovaným aldehydem, a to alkylovým, arylovým nebo heterocyklickým. Katalyzátorem může být palladium, případně sloučenina na bázi mědi. Ke katalýze, respektive oxidaci, může postačit také vzduch. Konkrétním příkladem je reakce katalyzovaná octanem měďnatým (Schéma 3). (Saha et al., 2009)

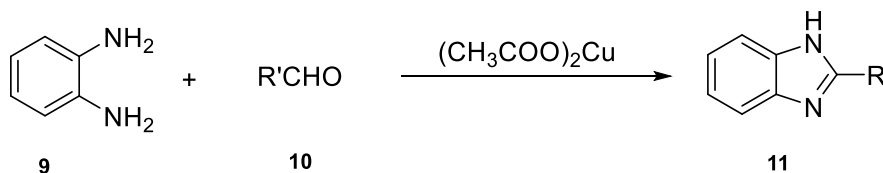


Schéma 3: Schéma reakce katalyzované octanem měďnatým (Saha et al., 2009)

Další reakcí spadající mezi reakce s aldehydy je např. reakce *o*-fenylendiaminového derivátu **12** s 2,4-dichlorbenzaldehydem **13**. Reakce je katalyzována disiřičitanem sodným (Schéma 4). (Özbey et al., 2002)

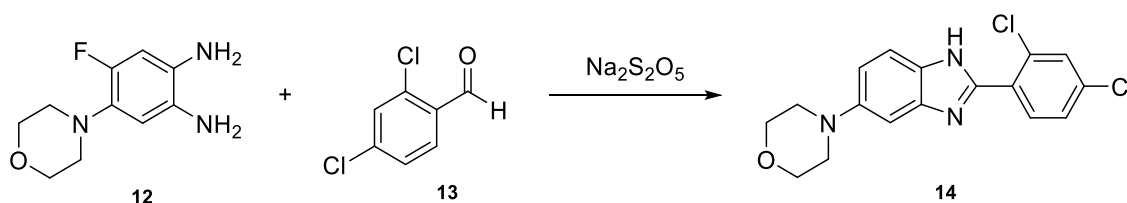


Schéma 4: Syntéza benzimidazolového derivátu. (Özbey et al., 2002)

Dalším způsobem, jak připravit benzimidazolové deriváty, kondenzací s karbonylovými sloučeninami, je způsob podle Alaqeel a kol. Výchozí látkou je opět *o*-fenyldiamin **9**, který reaguje s různými ketony **10** (Schéma 5). (Alaqeel, 2017)

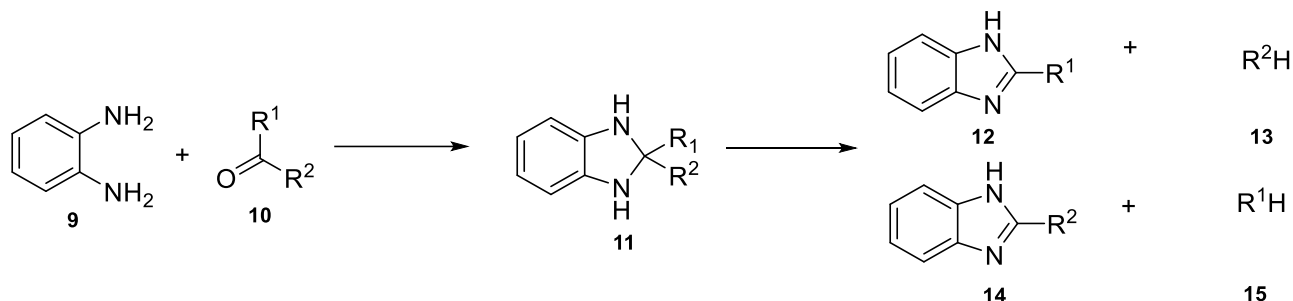


Schéma 5: Obecná syntéza derivátů kondenzací s ketony, (Alaqeel, 2017)

Výsledkem reakce jsou nestabilní 2-disubstituované benzimidazolinyl, které následně podléhají rozkladu na směs benzimidazolových derivátů. Poměr vzniklých derivátů závisí na tom, která z alkylových skupin je eliminována. Kromě vzniku směsi derivátů je také omezujícím faktorem kondenzace s ketony dlouhá reakční doba a obtížné postupy zpracování. (Alaqeel, 2017) Příkladem reakce, jejímž výsledkem je derivát benzimidazolu, je reakce *o*-fenyldiaminu **9** s 1,3-dikarbonylovými sloučeninami za mírného zahřívání v alkoholu (Schéma 6). (Abdallah et al., 2018; Mohareb et al., 2020)

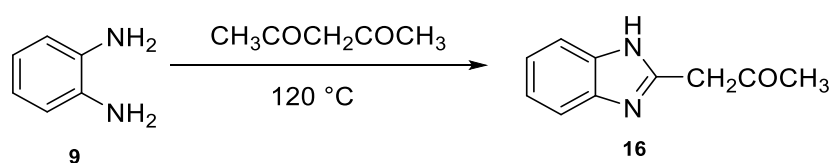


Schéma 6: Syntéza s 1,3-dikarbonylovými sloučeninami. (Mohareb et al., 2020)

Poslední variantou přípravy benzimidazolových derivátů z *o*-fenyldiaminu **9** je kondenzace s karboxylovými kyselinami **17**. Nejběžnější reakcí je reakce *o*-fenyldiaminu s karboxylovou kyselinou v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové (Schéma 7). (Alaqeel, 2017)

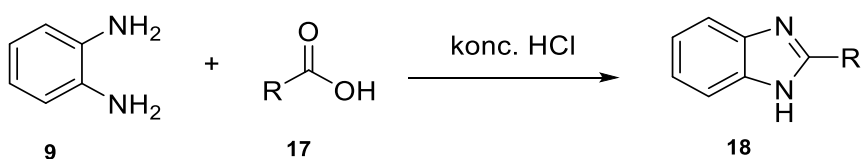


Schéma 7: Obecná syntéza prostřednictvím kondenzace s karboxylovými kyselinami. (Alaqeel, 2017)

Konkrétním příkladem je syntéza 2-substituovaných benzimidazolových derivátů refluxováním ekvimolárního poměru *o*-fenylendiaminu **9** a kyseliny *p*-aminobenzoové **19** v xylenu a kyselině polyfosforečné. Reakční čas je 6 hodin (Schéma 8). (Alam et al., 2017)

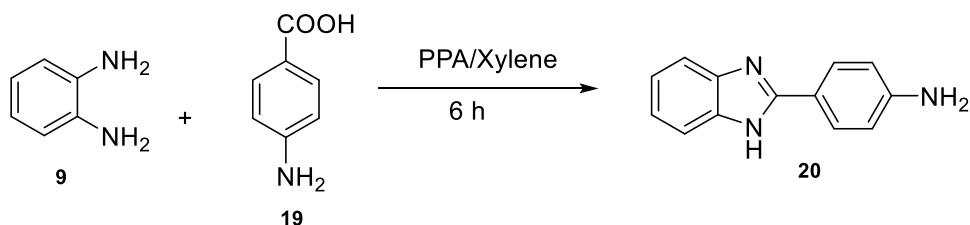


Schéma 8: Syntéza 2-substituovaného derivátu benzimidazolu. (Alam et al., 2017)

2.5.3 Příprava benzimidazolu přesmykem

V porovnání s kondenzacemi, které jsou popsány v podkapitole 2.5.3. je příprava benzimidazolových derivátů přesmykem heterocyklických sloučenin účinnější. Jedná se však o raritní reakci, která není typická pro přípravu těchto látek. (Mamedov & Zhukova, 2017)

Prvním popsáním způsobem je přeskupení benzodiazepinonů. Reakce byla započata refluxováním směsi *o*-fenylendiaminu **9** s ethylacetoacetátem **21** v xylenu. Tato reakce poskytla derivát benzodiazepinonu **22**. Jiný produkt, konkrétně 1-isopropenylbenzimidazol-2-on **23**, poskytla stejná reakce v přítomnosti hydroxidu draselného. Reakce začíná eliminací molekuly ethanolu a následným přerušáním vazby uhlíků C²-C³ s následnou intramolekulární nukleofilní adicí (Schéma 9). Reakce může probíhat mimo jiné i s dalšími dikarboonylovými sloučeninami. (Mamedov & Zhukova, 2017)

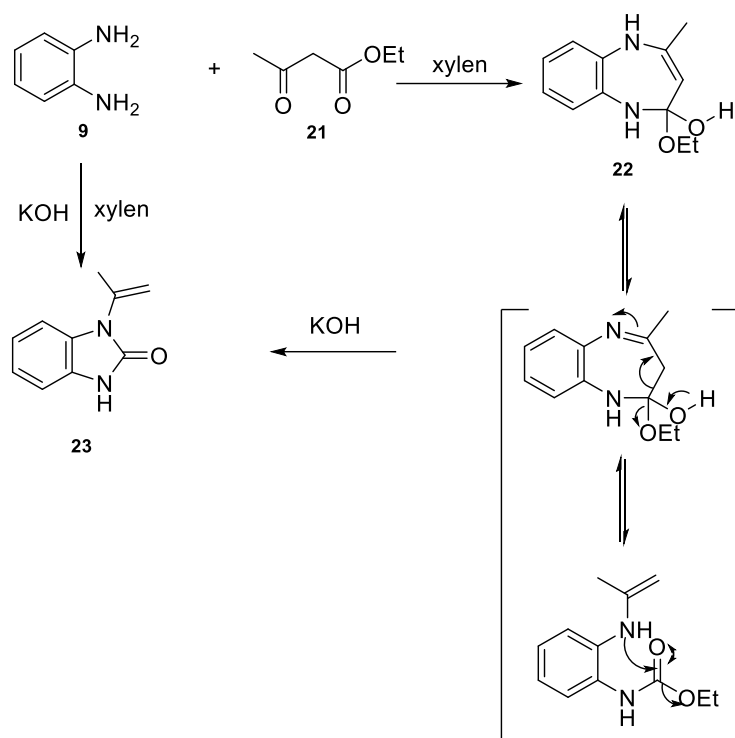


Schéma 9: Obecná syntéza benzimidazolonu přeskupením benzodiazepinonů. (Mamedov & Zhukova, 2017)

Další způsob přípravy je přesmyk 1,2,3-triazolu **24**. Benzimidazolový derivát **25** vznikl po 4hodinovém refluxu roztoku substituovaného triazolu **24** (Schéma 10). (Mamedov & Zhukova, 2017)

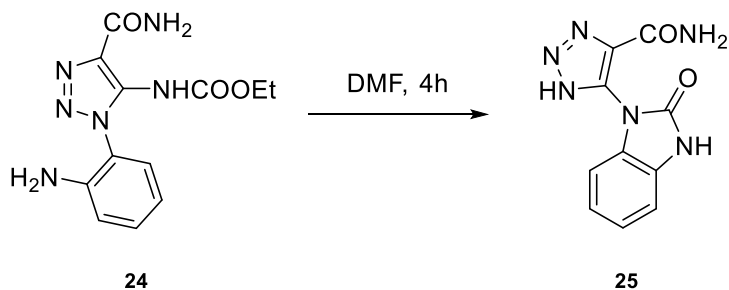


Schéma 10: Obecná syntéza benzimidazolonu přeskupením 1,2,3-triazolu. (Mamedov & Zhukova, 2017)

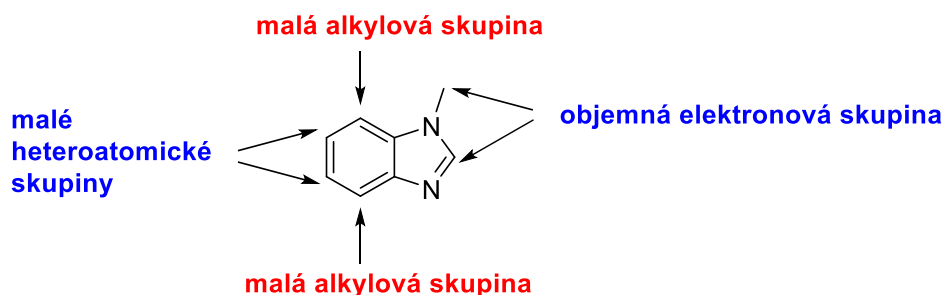
2.6 Biologická aktivita benzimidazolů

Benzimidazol a jeho deriváty se využívají v medicíně pro své farmakologické účinky. Deriváty, které mají v poloze 2 navázanou NH_2 skupinu, se strukturně podobají heterocyklické bázi purinu. Skutečnost, že se strukturně podobají nukleotidům, umožňuje benzimidazolovým derivátům snadno integrovat s biopolymery

v živém organismu. Přítomnost dusíkových atomů v molekule benzimidazolu způsobuje vznik slabých vazebných interakcí, díky kterým se rozšiřuje spektrum pro vazbu s různými terapeutickými cíli. Farmakologický profil benzimidazolu a jeho derivátů substituovaných v polohách 1, 2, 5 a/nebo 6, je díky této skutečnosti rozsáhlý a lze zde zařadit jejich antimikrobiální (Güngördü et al., 2013), antituberkulotické (Alam et al., 2017), antivirové (Lamorte et al., 2013) a protizánětlivé účinky (Eswayah et al., 2017). Kromě vyjmenovaných vlastností se nesmí opomenout také jejich protinádorová aktivita, která je cílem výzkumu také v této práci. (El-Masry et al., 2000)

2.6.1 Antimikrobiální účinky

Řada derivátů benzimidazolu vykazuje antimikrobiální účinky (působí proti mikrobům jako jsou bakterie nebo houby). Důvodem antibakteriálního účinku je přítomnost objemných skupin v poloze 1 a 2 a malých alkylových skupin, které jsou navázané v ostatních polohách (Obr. 4). (Güngördü et al., 2013)



Obr. 4: Navázané skupiny v jednotlivých polohách. (Güngördü et al., 2013)

Gowda *a kol.* vyvinuli novou sérii 1,2-disubstitovaných derivátů benzimidazolu (Schéma 11). Antibakteriální aktivita proti gramnegativním bakteriím *Escherichia. coli* a grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* činila 50-250 µg/ml MBC. Tato hodnota je o něco vyšší v porovnání s MBC standardního ampicilinu, který vykazoval 50-100 µg/ml. (Gowda et al., 2010)

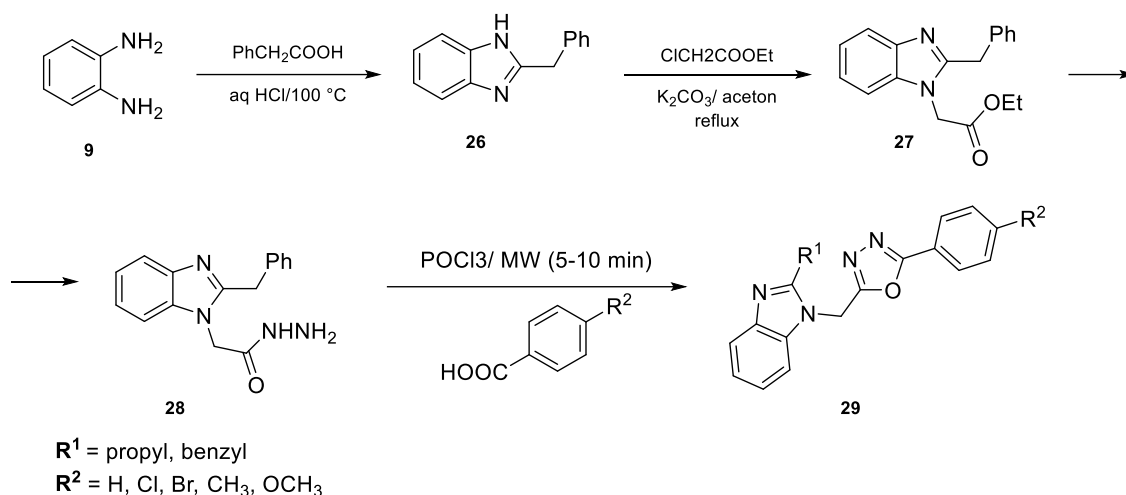
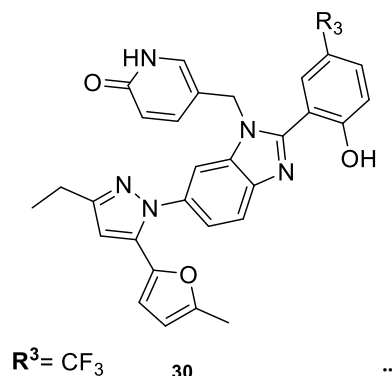


Schéma 11: 1,2-disubstiované deriváty benzimidazolu vykazující antimikrobiální aktivitu ((Gowda et al., 2010)

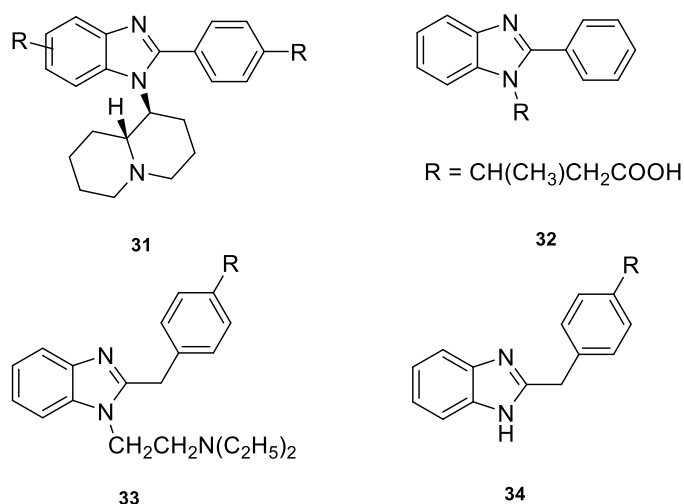
2.6.2 Antivirotika

Díky dalším studiím se prokázala také antivirotická aktivita derivátů benzimidazolu. Trembley *a kol.* syntetizovali deriváty 5-(5-furan-2-yl-pyrazol-1-yl)-1*H*-benzimidazolu **30**, které působily jako inhibitory tvorby kapsidy HIV. Antivirovou účinnost zlepšilo zavedení pyridinového postranního řetězce na N^1 , 2-hydroxyfenylu na C^2 a trifluormethylového skupiny na C^6 (Obr. 5). (Lamorte et al., 2013)



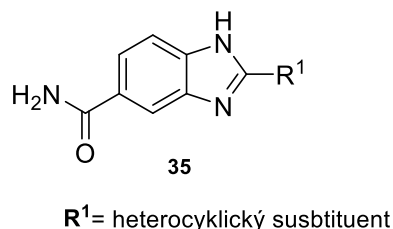
Obr. 5: Modifikovaný 5-(5-furan-2-yl-pyrazol-1-yl)-1*H*-benzimidazol na N^1 pro inhibici HIV-1. (Lamorte et al., 2013)

Další skupinu látek vyvinul Tonelli *a kol.*. Jedná se o benzimidazolové deriváty, které působí proti viru *Coxsackie* B5, proti respiračním syncytickým virům a proti bakteriofágu stafylokoků. Studie ukázala, že 2-[(benzotriazol-1/2-yl)methyl]benzimidazoly, které mají v poloze 1 navázanou dialkylaminoalkylovou nebo chinolizidin-1-yl-alkylovou skupinu, vykazují silnou aktivitu proti respiračnímu syncytiálnímu viru (Obr. 6). (Tonelli et al., 2014)



Obr. 6: Modifikovaný 5-(5-furan-2-yl-pyrazol-1-yl)-1*H*-benzimidazol na C² a C¹⁶. (Tonelli et al., 2014)

Zavedením heterocyklických jader na C² byly syntetizovány sady 2-substituovaných-5-amidinobenzimidazolových derivátů, které na uhlíku číslo 5 mají navázanou amidovou skupinu (Obr. 7). Jejich antivirová aktivita byla potvrzena vůči *coxsacki virům* a *echo virům*. Nejsilnější aktivitu vykazovala struktura s pyridinovým kruhem na C². (Starčević et al., 2007)



Obr. 7: 2-substituovaný-5-amidinobenzimidazolový derivát. (Starčević et al., 2007)

2.6.3 Protizánětlivé a analgetické účinky

Kromě výše zmíněných účinků benzimidazolové deriváty vykazují také protizánětlivou a analgetickou aktivitu. Eswayah *a kol.* připravili *N*-substituované deriváty reakcí benzimidazolu **1** a benzoylchloridu **36** a následnou adicí různých aminů (Schéma 12). Sloučeniny vykazovaly dobrou inhibiční aktivitu ve srovnání s aspirinem, jakožto nesteroidním protizánětlivým léčivem. (Eswayah et al., 2017)

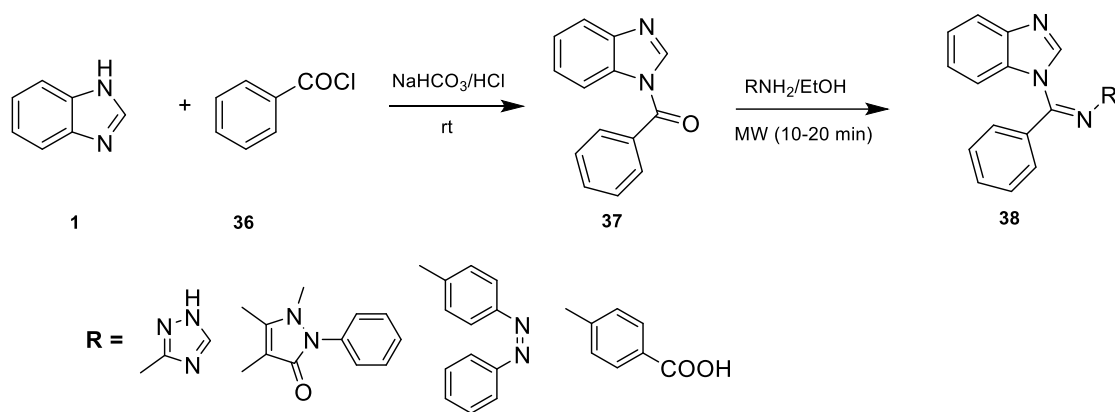


Schéma 12: Syntéza aktivních *N*-substituovaných benzimidazolových derivátů. (B. Wright, 2002; Eswayah et al., 2017)

Další sloučeniny připravili Monika Gaba *a kol.*. Uvedli sérii derivátů, které sloužily jako protizánětlivá a analgetická léčiva k šetrné léčbě gastrointestinálního traktu. Na základě studie *in vivo* a *in vitro* došli k závěru, že ve srovnání se standardním léčivem, tedy kyselinou acetylsalicylovou, mají připravené látky lepší účinek. Protizánětlivý účinek s největší pravděpodobností zvyšují elektrondonorní skupiny. (Gaba et al., 2015)

2.7 Rakovina

Rakovina v dnešní době patří mezi nejčastější příčinou úmrtí. Důvodem vysoké úmrtnosti je hlavně rezistence na léčiva, proto je důležité pokračovat ve vývoji látek, které cílí na maligní buňky. Nádorová rezistence, toxicita léků a nízká úspěšnost léků v klinických studiích se řadí mezi omezující faktory při léčbě rakoviny, což zapříčiňuje poměrně vysokou úmrtnost. (Adams et al., 2016)

Zjednodušeně by se dalo říct, že dochází k nekontrolovanému růstu nádorových buněk, které následně putují do dalších částí těla. Zdravé buňky rostou normálně a množí se během buněčného dělení, čímž vznikají buňky nové. V případě, že dojde k poškození v procesu buněčného dělení, tak vznikají abnormální a poškozené buňky. Tyto buňky rostou a nekontrolovatelně se množí, až dojde ke vzniku nádorů. Nádory následně mohou cestovat do blízkých tkání, kde mohou metastázovat. (Adam et al., 2011)

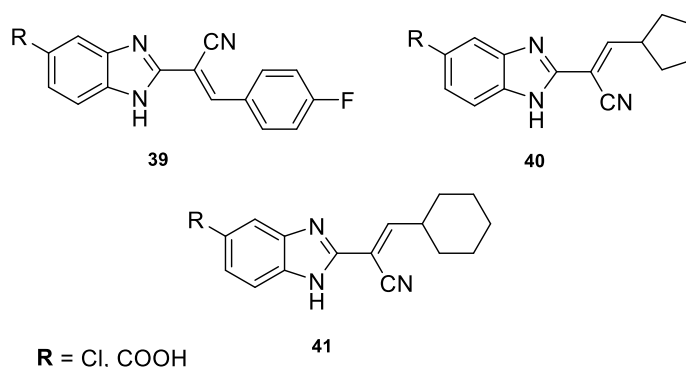
Rozlišujeme 2 druhy rakovinových buněk, a to maligní a benigní. Rozdíl spočívá v tom, že benigní nádory se dále nešíří do blízkých tkání a tím pádem nedochází k napadání ostatní tkáně. Ve srovnání se zdravými buňkami rakovinné vykazují růst

bez iniciativního signálu, nekontrolovatelně se dělí, vyrábí energii pro růst odlišným způsobem a také dokážou oklamat imunitní systém natolik, že imunitní buňky necílí na nádorové ložisko. (Büchler & a kol., 2019)

2.7.1 Protirakovinné účinky benzimidazolových derivátů

Benzimidazolové deriváty získaly pozornost také ve vývoji protinádorových léčiv díky své minimální toxicitě a struktuře, která tvoří základ pro vývoj derivátů s různými biologickými aktivitami. (Adams et al., 2016) (B. Wright, 2002) Farmakofor benzimidazolu s cílovými místy vytváří slabé vazebné interakce, např. vodíkové vazby, hydrofobní interakce či polární vazby. Samotný benzimidazol spolu s jeho deriváty hrají klíčovou roli jako inhibitory topoisomerasy, interkalační a alkylační látky DNA, antagonisté androgenních receptorů, inhibitory PARP, inhibitory proteinkinasy, dihydrofolátreduktasy a inhibitory mikrotubulů. (Shimomura et al., 2019)

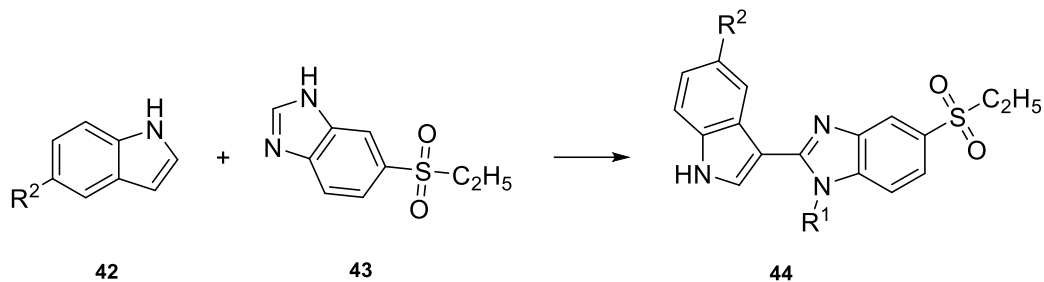
Dle několika studií se uvádí protinádorový účinek derivátů benzimidazolu, které obsahují substituenty v poloze 2. Příkladem jsou *bis*-benzimidazoly, které vykazují cytotoxické účinky na MCF7 a A431. Hanan M. Refaat na základě této studie připravil disubstituované deriváty benzimidazolu, které obsahovaly v poloze 5 chlor nebo karboxylovou skupinu (Obr. 8) a tyto sloučeniny vykazovaly silnou protinádorovou aktivitu. (Refaat et al., 2010)



Obr. 8: Disubstituované deriváty benzimidazolu. (Refaat et al., 2010)

V současných léčích se nachází struktury na bázi indolu a benzimidazolu, které jsou účinnými látkami proti různým nádorovým buňkám. Studie prokázaly, že fenyлиндolové deriváty inhibují rakovinu prsu. Fikriye *a kol.* prokázali, že indolové benzimidazoly, lišící se R¹ a elektrodonorními R² substituenty, mají vysokou účinnost proti nádorovým

buňkám. Tyto deriváty obsahují mají vysokou účinnost proti nádorovým buňkám (Schéma 13). (Karadayi et al., 2020)



$R^1 = p\text{-fluorbenzyl, CH}_3, \text{cyklohexyl, benzyl}$
 $R^2 = \text{Cl, Br}$

Schéma 13: Nové protinádorové deriváty indol-benzimidazolu. (Karadayi et al., 2020)

2.7.2 Protinádorové látky necílené na onkogeny

2.7.2.1 Inhibitory topoizomerásy

DNA topoizomerása je velmi důležitý enzym, který je spojený s integritou genomu, což zahrnuje replikaci DNA, transkripci, rekombinaci a remodelaci chromatinu. (Champoux, 2001) Buňkou je tento enzym využíván k udržování segregace chromozomů a topologie DNA. Inhibitory topoizomerásy potlačují její aktivitu a aktivují funkci enzymu vůči jinému substrátu nebo tento enzym přeměňují na enzym pro buňku toxický (McClendon & Osheroff, 2007) (Schneider et al., 1990) Cílem je tedy vývoj topoizomerásových inhibitorů nebo topoizomerásových jedů s benzimidazolovým skeletem, které budou působit proti nekontrolovatelnému dělení rakovinných buněk. *Bis*-benzimidazolové deriváty se vážou na DNA, což vede ke změně konformace DNA a inhibici tvorby štěpného komplexu. Bielawski *a spol.* použili *bis*-benzimidazoly s chloroalkylovými a bromoalkylovými částmi při vývoji inhibitorů Topo I a Topo II. Tyto látky inhibují syntézu DNA, které interagují s párem bází guanin a cytosin v menším žlábků DNA. Tato interakce vede k nevratné inhibici proliferace u rakovinných buněk karcinomu prsu MDA-MB-231 negativních na estrogenové receptory. (Bielawski et al., 2004)

2.7.2.2 Interkalace DNA a alkylační činidla

Interakce mezi bílkovinami a DNA se často podílejí na různých nádorových onemocněních, což je spojeno s přímým nebo nepřímým kontaktem bílkoviny s DNA.

(Bhaduri et al., 2018; Gromiha & Nagarajan, 2013) Interakce mezi bílkovinou a DNA hraje roli v transkripci genů, replikaci DNA, balení chromozomů a opravách DNA. (Thirumal Kumar et al., 2019) (Wong et al., 2016) V případě přerušení protein-DNA interkalátorem by došlo ke změně konformace DNA a změně biologické funkce navázaných proteinů, mezi které patří transkripční faktory, topoizomerázy, polymerázy a proteiny, opravující DNA. (Karimi Goftar et al., 2014) Tato skutečnost se uplatňuje v chemoterapii, kde léčiva zaměřena na interakci proteinů s DNA fungují vytvořením kovalentní nebo nekovalentní vazby. (Soni et al., 2017)

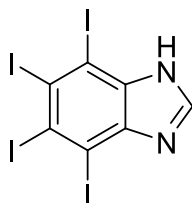
První skupinou jsou metalointerkalátory, které vytváří duální inhibiční režim. (Wong et al., 2016) To znamená, že dochází k interkalaci a koordinaci kovů, což vede k ireverzibilní, kovalentní vazbě a následné apoptóze nádorových buněk. (Karimi Goftar et al., 2014) (Soni et al., 2017)

2.7.3 Specificky cílené protinádorové látky

2.7.3.1 Inhibitory kinás

Kinázy jsou enzymy, které jsou nezbytné pro signální kaskády a pro regulaci biologických procesů, které zahrnují růst, proliferaci, diferenciaci a apoptózu buňky. Benzimidazolový skelet je využíván pro syntézu inhibitorů kináz. (Ardito et al., 2017)

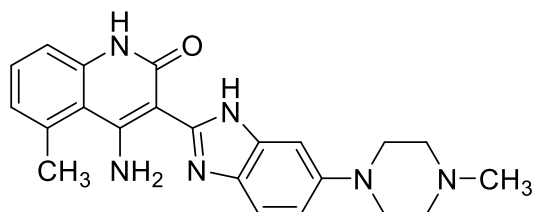
Příkladem ATP-kompetitivních inhibitorů je TIBI neboli 4,5,6,7-tetraiodobenzimidazol, který cílí jako inhibitor proteinkinázy CDK2 odvozený od 5,6-dichlorbenzimidazol-1- β -ribofuranosidového skeletu. (Ardito et al., 2017) Navázané atomy jodu na benzimidazolovém kruhu jsou příčinou lepší afinity k ATP-vazebné kapse CDK2 v porovnání s navázanými atomy bromu nebo chloru. (Gianoncelli et al., 2009) Koronkiewicz *a kol.* uvedli, že TIBI (Obr. 9) působí proapoptoticky a cytostaticky na buněčnou linii promyelocytární leukemie prostřednictvím inhibice CDK2. (Karadayi et al., 2020)



45

Obr. 9: Struktura TIBI. (Karadayi et al., 2020)

Dalším inhibitorem je Dovitinib (Obr. 10). Jedná se perorálně dostupnou laktátovou sůl benzimidazol-chinolinové sloučeniny, která působí jako inhibitor kinázy receptoru růstového faktoru. (Trudel et al., 2005)



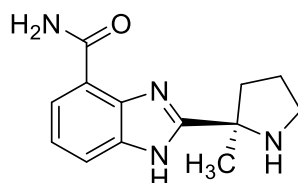
46

Obr. 10: Dovitinib. (Karadayi et al., 2020)

2.7.3.2 Inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy-1

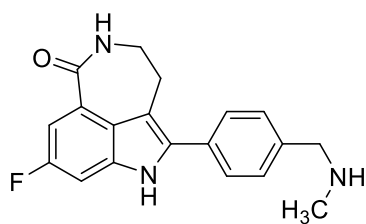
Obecně je poly(ADP-ribóza)polymeráza-1 jaderný enzym, který se uplatňuje v okamžité odpovědi na poškození DNA a podporuje opravu dvoušroubovice. (Hoeijmakers, 2007) PARP také udržuje integritu genomu a usnadňuje přežití buněk. Inhibicí PARP-1 dochází ke genomové nestabilitě, zvýšení aktivity buněčného cyklu, zástavě buněčného cyklu, která je následovaná apoptózou. (Ba & Garg, 2011)

Komerčně dostupné inhibitory PARP jako jsou olaparib, rukaparib, niraparib a veliparib jsou zkoumány na rakovinných buňkách. (Min et al., 2019) Veliparib **47** (Obr. 11) a Rucuparib **48** (Obr. 12) jsou odvozeny od benzimidazolkarboxiamidu, kde je výhodná jeho nízká molekulová hmotnost a také možnost tvorby vodíkové vazby s nikotinamidovým vazebným místem PARP. (Min et al., 2019)(Tong et al., 2009)



47

Obr. 11: Veliparib (Min et al., 2019)



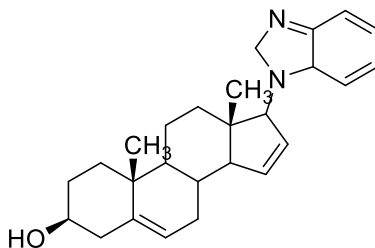
48

Obr. 12: Rucuparib (Min et al., 2019)

2.7.3.3 Antagonisté androgenního receptoru

Androgenní receptor patří do skupiny steroidních receptorů, které se podílí na regulaci transkripce genů v reakci na vazbu testosteronu a dihydrotestosteronu. (Pihlajamaa et al., 2015) Jedná se o kritický marker v rámci diagnózy rakoviny prsu a prostaty. (Heinlein & Chang, 2004; Ricciardelli et al., 2018)

Galeteron (Obr. 13) **49** blokuje vazbu androgenů na androgenní receptor. (Handratta et al., 2005; Schayowitz et al., 2008) Protinádorový účinek je způsoben inhibicí CYP17 lyázy nebo degradací androgenního receptoru. Galeteron (Obr. 13) cílí na dva homologní deubikvitinační enzymy (USP12 a USP46), které se podílí na pozitivní signalizaci dráhy AR-AKT-MDM-p53. Léčba galeteronem může inhibovat růst nádorových buněk, které jsou citlivé na androgeny, nezávislých na androgenech, rezistentních na androgeny a androgen-negativních prostatických buněk. (Mcclurg et al., 2018)



49

Obr. 13: Galeteron (Schayowitz et al., 2008)

2.8 Mikrotubuly jako cíl léčby rakoviny

2.8.1 Cytoskelet

Cytoskelet je dynamická soustava skládající se ze tří typů, která zahrnují aktinová filamenta, intermediární filamenta a mikrotubuly složené z tubulinových dimerů.

Protein reguluje délku, stav polymerace a úroveň zesíťování. Mezi jeho hlavní funkce patří buněčný transport, také udržuje tvar buňky a podílí se na buněčném dělení. V rámci léčby rakoviny se cílí na mikrotubuly, konkrétně na tubulin. Látky ovlivňující mikrotubuly se dělí na inhibitory a stabilizátory. Inhibitory inhibují neboli pozastavují polymeraci mikrotubulů, stabilizátory naopak podporují jejich polymeraci. (Wickstead & Gull, 2011)

2.8.2 Mikrotubuly

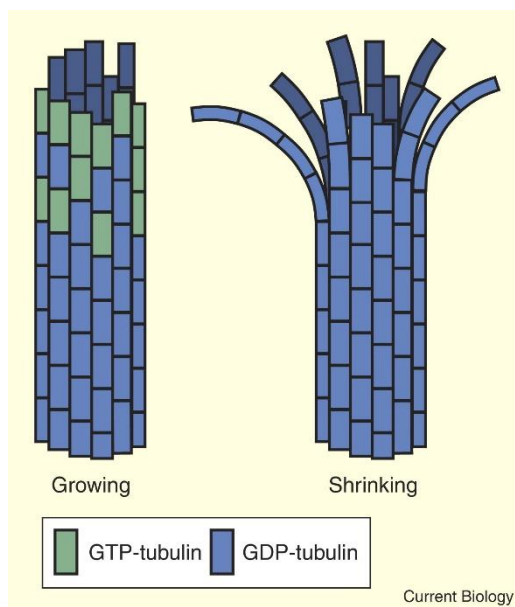
Mikrotubuly řadíme mezi hlavní části eukaryotického cytoskeletu buněk. Díky těmto komponentům se může uskutečňovat plno buněčných funkcí, mezi které patří buněčná signalizace, buněčné dělení (konkrétně mitotická fáze), udržování tvaru buňky a buněčná pohyblivost uskutečněná motorickými proteiny kinesinem a dyneinem. Tyto proteiny se také podílí na dělení buňky. (Ren et al., 2021) Jedná se o duté válce o průměru 25 nm. Hlavní složkou je heterodimer tubulin, který se skládá ze dvou podjednotek, konkrétně α - a β - tubulinu. (Sept, 2007) Izotypy se liší sekvencí aminokyselin kódovanou různými geny. (Binarová & Tuszynski, 2019) Heterodimery se připojují způsobem tzv. head to tail, tedy hlava k ocasu, kdy vznikají polární protofilamenta a 13 z těchto protofilament se spojí a vytvoří útvar podobný trubici. β -tubulin směřuje k plusovému konci mikrotubulu a dodává strukturní polaritu. (Sept, 2007)

2.8.3 Struktura tubulinu

Tubulin je bílkovina, která se podílí na tvorbě dělicího vřeténk. Tvoří dimerní podjednotky, konkrétně α - a β - tubulin, které jsou strukturně téměř identické. Mají podobnou hmotnost a jsou tvořeny přibližně stejným počtem aminokyselinových zbytků. Struktura monomeru obsahuje 3 funkční domény. První doménou je N-koncová doména, kde se váže nukleotid, další doména obsahuje vazebné místo pro Taxol a pravděpodobně se podílí na hydrolyze GTP. Poslední doménou je C-koncová doména, která vytváří prostor pro pohyb molekulových motorů. Existuje mnoho izotypů, které podléhají posttranslačním úpravám. (Želazková, 2008)

2.8.4 Polymerace mikrotubulů

Mikrotubuly nepatří mezi jednoduché rovnovážné polymery kvůli své složité polymerační dynamice, která je klíčová pro buněčnou funkci. (Li et al., 2017) Podmínkou pro polymeraci je vazba GTP na tubulin. Navázaný nukleotid je také důležitým faktorem v růstu a stabilitě. Mikrotubuly podléhají obdobím růstu a smršťování, které je známé jako dynamická nestabilita. (Sept, 2007) Během polymerace dochází nejprve k pomalému formování jádra, které je následováno reverzibilní nekovalentní adicí tubulinových dimerů na koncích mikrotubulů. (Želazková, 2008) K polymeraci dochází vždy na konci mikrotubulu označeném plus, kde se nachází β -tubulin, druhý konec je označen znaménkem mínus a zde nikdy nedochází k růstu mikrotubulu. Pravidelný růst se uskutečňuje do té doby, dokud není dosažen tzv. bod katastrofy, což je bod, kdy dojde k rozpojení spojených protofilament mikrotubulu (Obr. 14). Následným krokem neboli záchranou dojde k obnovení růstu mikrotubulu. Rychlost katastrofy a záchrany je modulována změnou podmínek polymerace. Stabilitu mikrotubulů zajišťuje „čepička“ GTP-tubulinu na koncích mikrotubulu. Hydrolyzou GTP na GDP dochází k depolymerizaci.



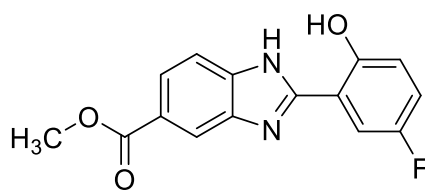
Obr. 14: Růst a rozpad mikrotubulů v průběhu polymerace. Převzato z (Sept, 2007)

2.8.5 Inhibitory mikrotubulů

Inhibitory mikrotubulů nebo také antimitotické léky fungují tak, že potlačují dynamiku mikrotubulů. Dochází k přichycení mikrotubulů k chromozomům

v kinetochorech a k nedokonalému vytvoření metafázních vřetének. (Azarenko et al., 2008) V rámci léčby pomocí inhibitorů dochází k zastavení mitózy během přechodu mezi metafází a profází a následuje apoptóza. (Azarenko et al., 2008)(Khwaja et al., 2021)(Wilson & Jordan, 1995)

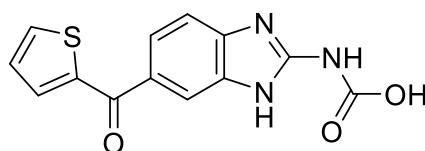
MBIC **50** obsahuje v poloze 2 hydroxy skupinu a v poloze 5 fluor na fenylovém zbytku (Obr. 15). V poloze 5 na benzimidazolovém kruhu se nachází methylkarboxylát. Jedná se o inhibitor mikrotubulů, který má cytotoxický účinek na buňky karcinomu prsu.(Hasanpourghadi et al., 2017)(Karthikeyan et al., 2017) Nádorové buňky odebrané z děložního hrdla ošetřené MBIC vykazovaly zástavu přechodu mezi fází G2 a mitotickou fází s následnou apoptózou. MBIC inhibuje také polymeraci mikrotubulů pomocí up-regulace cyklinu B1, cyklin-dependetní kinázy 1 a proteinu BubR1 a down-proteinu Aurora B. (Dai et al., 2017) V rámci mé bakalářské práce je prozkoumán vliv substituentu v poloze 5. Na základě tohoto faktu lze předpokládat, že obsazením polohy 5 by se mohla zvýšit aktivita vůči rakovinným buňkám.



50

Obr. 15: MBIC (Hasanpourghadi et al., 2017)

Nocodazol (Obr. 16) nebo také (methyl [5-(2-thienylkarbonyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]karbamát) **51** rovněž působí jako destabilizátor mikrotubulů, přesněji řečeno narušuje tvorbu mikrotobulu v profázových buňkách a narušuje jejich připojení ke kinechorům chromozomu, což vede k zástavě buněčného cyklu a následné buněčné smrti.(Choi et al., 2011)(Zhao et al., 2020) Blajeskim *a spol.* prokázali, že buňky karcinomu prsu, konkrétně MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-453, HS0578T, SKBr3 a ZR-75-10 jsou po ošetření nocodazolem náchylné k apoptóze. (Blajeski et al., 2002)



51

Obr. 16: Nocodazol (Choi et al., 2011)

2.8.6 Vazebné domény na mikrotubulech

MTA se zaměřují na 3 domény prostřednictvím stabilizace a destabilizace (Obr. 17). Jedná se o místo pro paklitaxel, vinca alkaloidy a kolchicin. (Dogra et al., 2018)

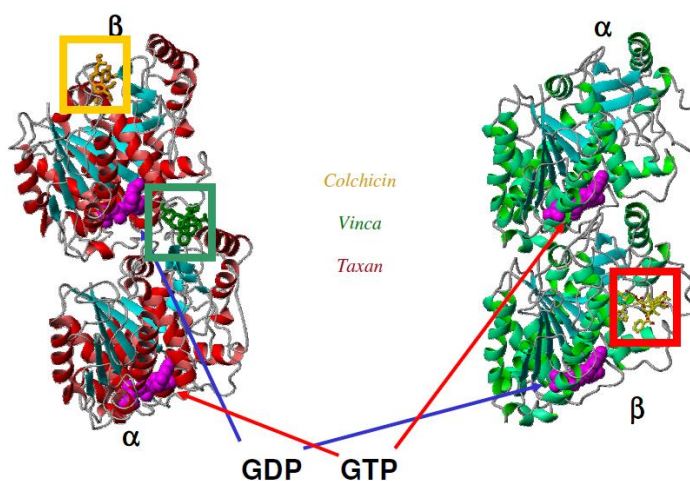
Vinca alkaloidy byly zavedeny jako chemoterapeutické látky před více než 40 lety. Z listů rostliny *Catharanthus roseus* byly izolovány vinblastin a vinkristin. (Johnson et al., 1960) (Noble et al., 1958) V rámci vývoje léčiv došlo k syntéze nových analogů, mezi které patří vindesin, vinorelbin a vinflunin. Nevýhodou nově syntetizovaných derivátů je neuropatie a reverzibilní myelosuprese. (Gidding et al., 1999)

Cílem vinca alkaloidů jsou mikrotubuly, u kterých způsobují depolymerizaci, dochází k poškození mitotického vřeténka, což vede k blokaci mitózy nádorových buněk. (Jordan, 2002) Vinblastin se váže na β -podjednotku tubulinu, konkrétně do oblasti, která se nazývá jako vinca doména. Dochází ke konformační změně tubulinu. (Abelson et al., n.d.) (Bai et al., 1990) (Na & Timasheff, 1980) Kromě tubulinu se může vinblastin navázat přímo na mikrotubuly. Vazba jedné nebo dvou molekul vinblastinu na plus konec mikrotubulu může vést ke snížení stability až o 50 %. Některá léčiva potlačují dynamiku mikrotubulů, což zabraňuje mitotickému vřeténku jeho sestavení a snižuje se napětí v kinetochorech chromozomů. Následkem je apoptóza. (Abelson et al., n.d.)

Paklitaxel a jeho semisyntetický analog docetaxel patřily na konci 20. století k nejčastěji používaným léčivům v chemoterapii. V dnešní době se používá k léčbě karcinomu prsu a vaječníků, nemalobuněčného karcinomu plic či Kaposiho sarkomu. Mezi hlavní vedlejší účinky patří, stejně jako u vinca alkaloidů, neurotoxicita a myelosuprese. (Boichuk et al., 2022) (Rowinsky et al., 1993)

Taxany se obecně špatně vážou na samotný tubulin. Vážou se podél po celé délce mikrotubulu. Vazebné místo se nachází v β -podjednotce, které se nachází uvnitř mikrotubulu. (Nogales et al., 1995) Ke svým vazebným místům na mikrotubulu se dostává pomocí difúze nebo fluktuacemi v mikrotubulech. Vazbou paklitaxelu na vazebné místo se zvyšuje polymerace mikrotobulu čímž se zvyšuje stabilita. (Nogales, 2001) Na každé molekule tubulinu se jedno vazebné místo pro paklitaxel. (Derry et al., 1995) Navázáním taxanu na vazebné místo ve vnitřní dutině mikrotubulu dochází k potlačení dynamiky dělicího vřeténka, což zabraňuje dělení nádorových buněk a je zablokovaný postup z metafáze do anafáze buněčného cyklus. Poslední fází je apoptóza. (Okouneva et al., 2008; Yvon et al., 1999) Na základě

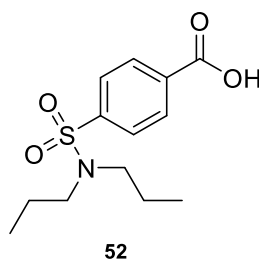
klinických úspěchů taxanů došlo k objevu dalších látek, které stimulují polymeraci mikrotubulu. Mezi tyto látky řadíme například epothilony, discodermolidy, laulimalid nebo eleutherobin. (Pryor et al., 2002)



Obr. 17: Vazebné domény tubulinu. Převzato (Želazková, 2008)

2.8.7 Kolchicinová doména

Kolchicin, konkrétně jeho sloučeniny se používají při léčbě dny. Jedná se o tricyklický alkaloid. Příkladem sloučeniny, která slouží k léčbě dny, je Probenecid **52** (Obr. 18). Jedná se o kolchicinový sulfát, který zvyšuje vylučování kyseliny močové ledvinami, čímž snižuje její koncentraci v krvi. (Bane Hastie, 1991)



Obr. 18: Probenecid

Prozatím se kolchicin, pravděpodobně díky své silné toxicitě, nepoužívá k léčbě rakoviny, avšak látky vázající se na kolchicinové místo jsou zkoumány pro své protirakovinné účinky. (Bane Hastie, 1991; Wilson & Jordan, 1995).

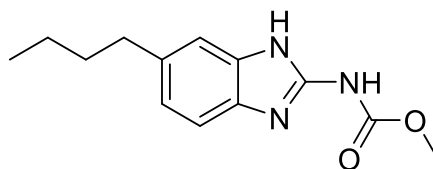
Kolchicinová doména je obecné pojmenování pro vazebné místo kolchicinu, které je složeno z hlavního místa a dalších kapes. Interakce kolchicinu s tubulinem způsobuje stejně jako u vinca alkaloidů depolymeraci mikrotubulů a jejich stabilizaci. Samotný kolchicin se však přímo neváže na kolchicinové místo, ale nejprve vytvoří vazbu

s rozpustným tubulinem, který následně vyvolá pomalé konformační změny v tubulinu až vznikne konečný komplex tubulin-kolchicin, (Bane Hastie, 1991; Wilson & Jordan, 1995) který v malém množství kopolymerizuje do konců mikrotubulů spolu s určitým množstvím volných molekul tubulinu. (Skoufias & Wilson, 1992)

Vazebné místo pro kolchicin se nachází na rozhraní α - a β -podjednotce. Velikost kolchicinového místa je $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 4\text{-}5 \text{ \AA}$. (Nguyen et al., 2005) Kolchicin se váže na β -tubulin na rozhraní s α -tubulinem čímž se následně inhibuje polymerace tubulinu. Trimethoxyfenylová skupina kolchicinu se nachází blízko Cys β 241, Thr179 a Val181 v α -tubulinu tvoří vodíkové vazby s tropolonovým kruhem. (Prota et al., 2014)

2.8.7.1 Látky vázající se do kolchicinového místa

Parbendazol **53** (Obr. 19) se navazuje hluboko do CBS. Interaguje však pouze s β podjednotkou tubulinu. Jedná se o neúčinnější látku z řady benzimidazolových derivátů, kam patří také nocodazol, fendazol, mebendazol a oxibendazol. Parbendazol je destabilizátor tubulinu. Může vyvolat poškození DNA a v závislosti na dávce také pozastavit sestavení mikrotubulů. (Lei et al., 2021) Tato sloučenina má potenciál se stát terapeutickou molekulou pro svoji nízkou toxicitu a vykazuje dobrou inhibici proliferace buněčných linií HNSCC. (Liang et al., 2022)



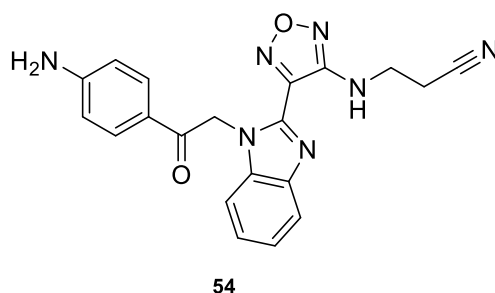
53

Obr. 19: Struktura parbendazolu

Studie ukázaly, že kolchicin uvolňuje fluorescenci v případě, že se váže na tubulin. Jestliže však dojde ke kompetici mezi kolchicinem a molekulou, tak dochází ke snížení fluorescence komplexu kolchicin-tubulin. Po inkubaci parbendazolu a kolchicinu došlo ke snížení intenzity fluorescence tím, že tyto dvě molekuly soutěží o vazebné místo. Lze tedy považovat CBS za přímé vazebné místo parbendazolu. Vazbou parbendazolu na tubulin dochází k inhibici polymerace tubulinu. Po 24 hodinách inkubace buněk s parbendazolem došlo k poškození mikrotubulů ve srovnání s kontrolní skupinou. Parbendazol také indikuje zástavu buněčného cyklu, migraci buněk, která hraje zásadní roli v nádorovém procesu a apoptózu. Se zvyšující se koncentrací dochází ke zvýšení apoptotických buněk ve srovnání s kontrolní skupinou. Vzhledem k nízké toxicitě se

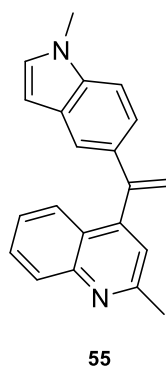
jeví, v porovnání s toxickým kolchicinem, jako potenciální terapeutická látka. (Liang et al., 2022)

Syntetické činidlo BAL27862 **54** (Obr. 20) působí na mikrotubuly. Způsobuje destabilizaci mikrotubulů, zástavu G2/ M fáze buněčného cyklu a působí jako silný inhibitor růstu nádorových buněk. Na základě molekulového dokování bylo zjištěno, že i přesto, že se jedná strukturně o odlišnou látku než samotný kolchicin, tak se velmi dobře váže do kolchicinového místa. Jednotlivé části molekuly interagují s molekulou kolchininu a překrývají se. Benzimidazolová a 3-amiooxadiazolová část se dobře překryje kruhy C a B kolchicin. Tato sloučenina je známá jako Avanbulin a vyskytuje se v klinických studiích. (Esteve et al., 2010)



Obr. 20: Syntetické činidlo BAL27862. (Esteve et al., 2010)

Další sloučeninu, už nebenzimidazolového charakteru, Quinolin **55** (Obr. 21), se váže do kolchicinového místa a vykazuje nejsilnější aktivitu proti leukemickým buňkám K562, kdy se hodnoty IC₅₀ v rozmezí od 5 do 11 nM. (Patil et al., 2016) Tato látka snížila hmotnost nádoru o skoro 65 % bez zjevné toxicity. (Li et al., 2019)



Obr. 21: Struktura Quinolinu. (Patil et al., 2016)

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Reakční schéma a použité reaktanty

V rámci experimentální části jsem pomocí jedné syntetické cesty připravila 2 sady derivátů, které se lišily v navázaných substituentech. Obě sady připravených cílových látek mají v poloze 5 navázanou CF_3 skupinu. Navržené substituenty se lišily substituenty R^1 a R^2 (Schéma 14). Všechny připravené deriváty byly zkoumány na jejich protirakovinné účinky.

Benzimidazolové deriváty se syntetizovaly pomocí jedné syntetické cesty viz Schéma 14, díky které byly připraveny dvě sady derivátů, které se lišily substituentem R^1 . Tento substituent byl volen s ohledem na nejaktivnější struktury z doposud provedené SAR studie. Syntéza zahrnovala celkem tři kroky. Podmínky pro jednotlivé kroky vychází z diplomové práce Mgr. Jany Pospíšilové (Pospíšilová, 2019) a vzhledem k rozdílnosti výchozích látek musely být některé reakční kroky optimalizovány.

Prvním krokem syntézy je aromatická nukleofilní substituce, která byla následována redukcí nitroskupiny. Vzniklý diamin byl poté podroben cyklizaci za použití různě substituovaných aldehydů. Substituent R^2 v poloze *para* výchozího aldehydu představuje elektrondonorní či elektronakceptorní skupinu, která může mít vliv jak na rychlost cyklizačního kroku, tak na biologickou aktivitu finálních benzimidazolů. V sadě derivátů s jodem jako substituentem R^1 byl použit aldehyd, který obsahoval substituenty CF_3 v polohách meta z důvodu zajímavosti této látky pro jiný projekt v naší výzkumné skupině.

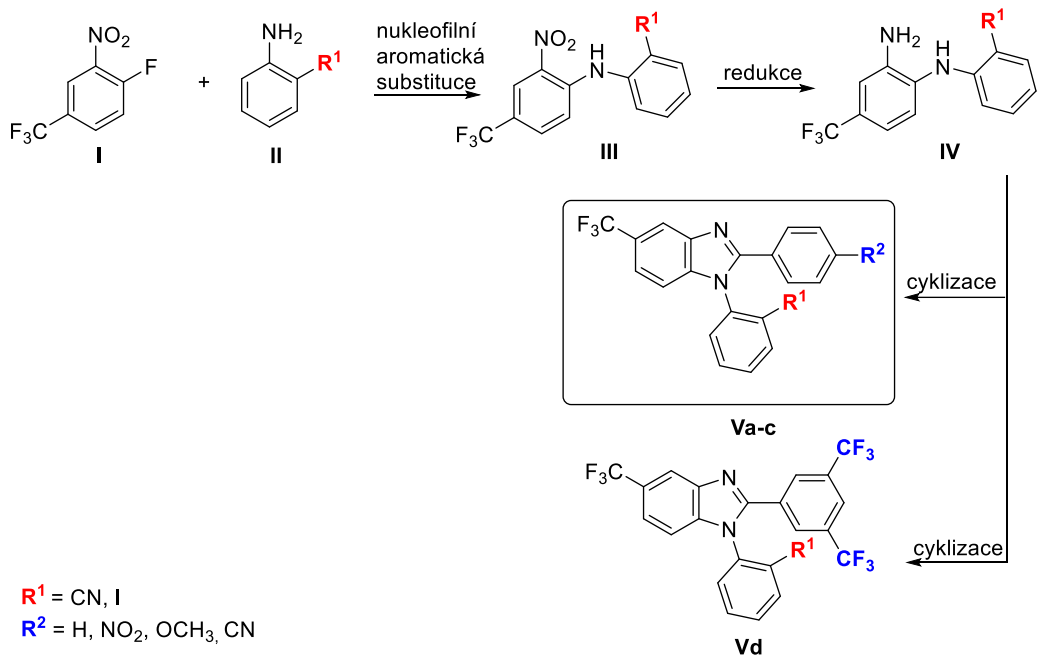


Schéma 14: Obecné reakční schéma syntézy benzimidazolových derivátů

3.2 Příprava benzimidazolových derivátů s jódem jako substituentem R^1

Syntetickou cestu přípravy derivátů znázorňuje (Schéma 15). Prvním krokem syntézy byla nukleofilní aromatická substituce, kdy reagoval 1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzen **I** s 2-jodanilinem **II** za vzniku látky **III**. Následovala redukce nitroskupiny, kdy vznikla látka **IV**. Diamin byl posléze podroben cyklizaci za účasti cyklizačních činidel za vzniku finálních látek **V**, které se liší substituentem R^2 . Pro jiný projekt byl nasyntetizován derivát **Vd**, který má dvě CF_3 skupiny v poloze *meta*, čímž se liší od ostatních substituentů, které mají R^2 substituent v poloze *para*.

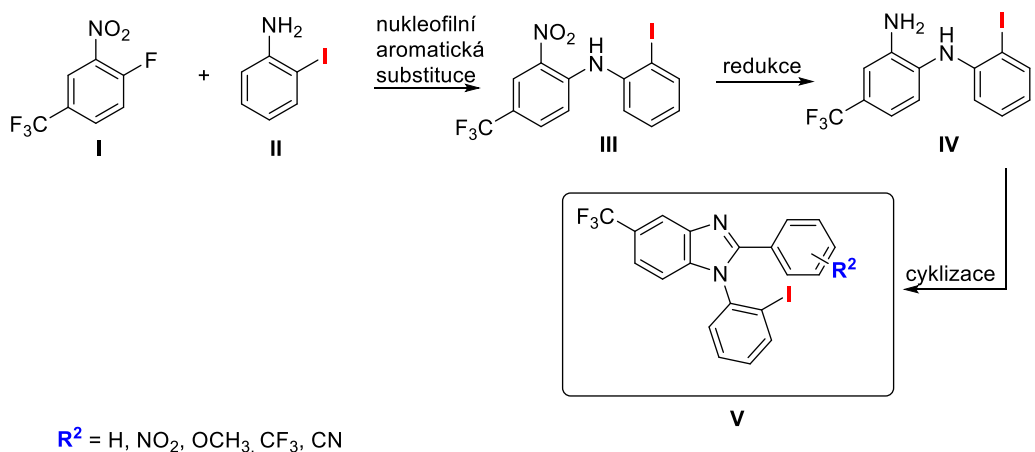


Schéma 15: Navržené schéma přípravy derivátu s jodem

3.2.1 Nukleofilní aromatická substituce

Jedná se o první krok syntézy cílových benzimidazolových derivátů (Schéma 16). Výchozími látkami pro přípravu byl 1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzen **I**, který reagoval s 2-jodanilinem **II**, za vzniku látky **III**. Výchozí látky byly rozpuštěny v DMSO a byly k ní přidány 4 ekvivalenty KOH. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 1,5 hodiny. Reakční směs byla poté nalita do ledové vody a pro úpravu pH byla použita zředěná HCl, kdy došlo k vysrážení oranžové sraženiny ve žlutém roztoku. Produkt byl poté filtrován a výtěžnost reakce byla 78 %. Nukleofilní aromatická substituce byla provedena dvakrát, kdy podruhé byla provedena v desetinásobném množství (4080 mg). Výtěžnosti reakcí byly téměř stejné. V prvním případě se jednalo o 78 %, v druhém případě 73 %.

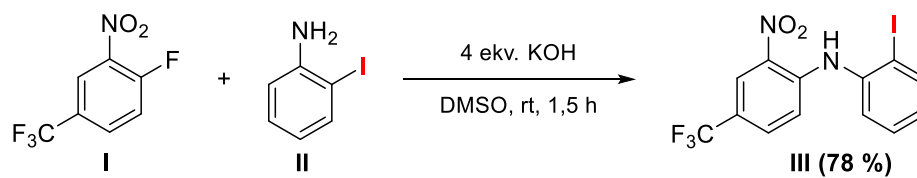


Schéma 16: Nukleofilní aromatická substituce

3.2.2 Redukce nitroskupiny

Vzniklý diamin **III** byl poté redukován pomocí zinku v kyselém prostředí (Schéma 17). Látka **III** byla rozpuštěna v methanolu, ke směsi byly poté přidány 4 ekvivalenty zinku a kyselina octová. Reakce probíhala 30 minut za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byl zinek přefiltrován a filtrát nakapán do vody. Následně bylo pH roztoku pomocí KOH na hodnotu asi 12 a poté byl produkt extrahován do dichlormethanu. Po přečištění produktu pomocí sloupcové chromatografie byla výtěžnost reakce 54 %. Reakce byla provedena dvakrát, podruhé v desetinásobném množství, kdy výtěžnost reakce byla 42 %. Nízká výtěžnost byla pravděpodobně z důvodu nedoreagování, kdy se v reakční směsi nacházely také výchozí látky.

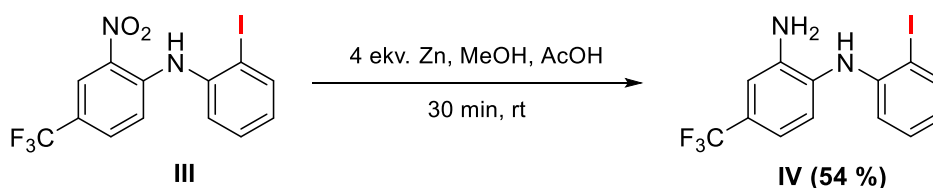


Schéma 17: Redukce nitroskupiny

3.2.3 Cyklizační reakce

Finální benzimidazolové deriváty byly připraveny pomocí cyklizační reakce, která spočívala v reakci látky **IV** s různými aldehydy za tvorby derivátů benzimidazolu (Schéma 18).

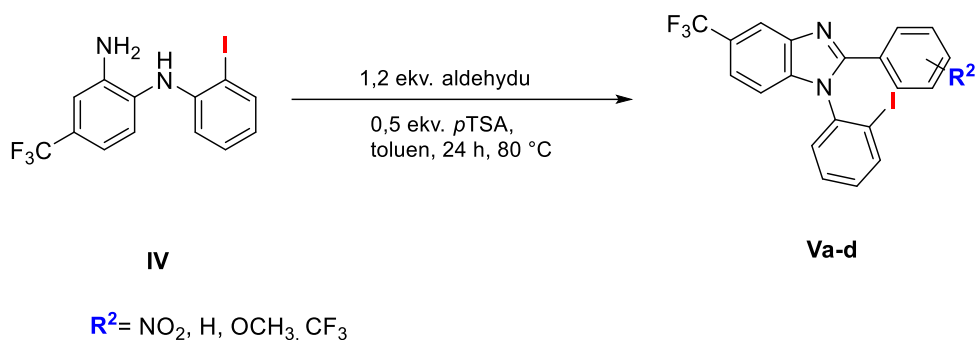
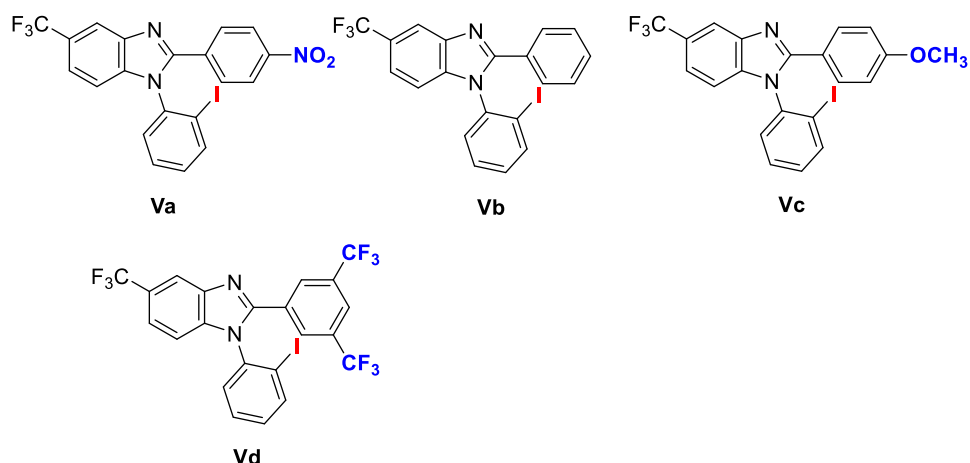


Schéma 18: Cyklizace s 4-nitrobenzaldehydem

První benzimidazolový derivát **Va** byl připraven pomocí 4-nitrobenzaldehydu. Výchozí diamin **IV** (1 ekv.) reagoval s 1,2 ekv. 4-nitrobenzaldehydu a 0,5 ekv. kyseliny *p*-toluensulfonové (*p*TSA). Jako rozpouštědlo byl použit toluen. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Na základě hodnocení průběhu reakce pomocí TLC, kdy v reakční směsi byly stále výchozí látky, bylo po 3 hodinách k reakční směsi přidáno další množství kyseliny *p*-toluensulfonové (*p*TSA), celkově tedy 1 ekvivalent, aby došlo k lepší konverzi. Výtěžnost reakce po přečištění produktu pomocí sloupcové chromatografie činila 50 %. Molekula obsahuje CF_3 skupina, která způsobuje odtah elektronů, což může mít za následek pomalejší průběh reakce. Zároveň byla použita stéricky náročná výchozí látka, která opět způsobuje pomalejší průběh reakce.

Další cílové benzimidazolové deriváty byly připraveny stejnou metodou. Procentuální výtěžnost reakce po cyklizaci s benzaldehydem činila 43 % a s *p*-anisaldehydem 57 %. Poslední derivát s jodem **Vd**, který má obsazené polohy *meta* CF_3 skupinou, byl připraven za stejných podmínek jako deriváty **Vb** a **Vc**. K cyklizaci byl použit 3,5-(bisfluormethyl)benzaldehyd. Procentuální výtěžnost reakce činila 53 %. Všechny finální produkty jsou znázorněny na Obr. 22.



Obr. 22: Výsledné produkty po cyklizaci

3.3 Příprava benzimidazolových derivátů s nitrilem jako substituentem R¹

Postup přípravy benzimidazolových derivátů obsahující nitril jako substituent R¹ zahrnoval stejné kroky přípravy jako u derivátů obsahujících jód. Syntéza byla zahájena nukleofilní aromatickou substitucí, kterou následovala redukce nitroskupiny a posledním krokem syntézy byla cyklizace za vzniku požadovaných benzimidazolových derivátů. Syntézu znázorňuje Schéma 19.

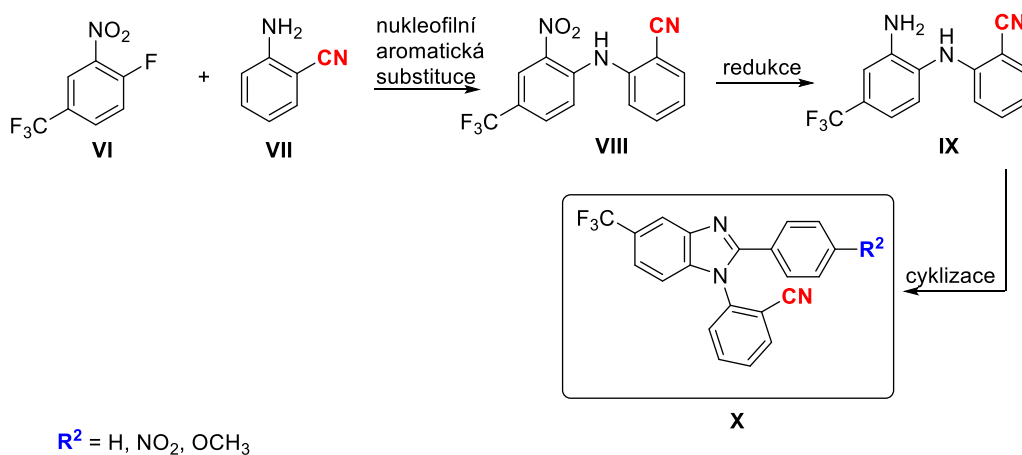


Schéma 19: Obecné reakční schéma

3.3.1 Nukleofilní aromatická substituce

Syntézu druhé sady derivátů s nitrilem jako substituentem R¹ znázorňuje Schéma 20. Prvním krokem syntézy byla nukleofilní aromatická substituce, kdy výchozími látkami byl 2-aminobenzonitril **VII**, který reagoval s 1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzenem

VI. Reakční směs byla rozpuštěna v DMSO, poté byly přidány 4 ekv. KOH. Reakce probíhala za laboratorní teploty a po kontrole na TLC byla po 1 hodině ukončena. Reakční směs byla poté nakapána do ledové vody a okyselena zředěnou HCl. Došlo ke vzniku žlutých krystalů. Produkt byl poté zfiltrován a výtěžnost reakce byla 97 %. Reakce byla provedena dvakrát. Při druhém pokusu bylo použito pětkrát (1045 mg) více výchozí látky a výtěžnost reakce byla 88 %.



Schéma 20: Nukleofilní aromatická substituce

3.3.2 Redukce nitroskupiny

Pokus o redukci nitroskupiny byl proveden třemi různými metodami. Prvním způsobem byla redukce pomocí železa Schéma 21. Bohužel při této reakci výchozí látka prakticky nereagovala a spolu s malým množstvím produktu vznikala řada neidentifikovatelných vedlejších produktů. Výsledek analýzy látky pomocí HPLC se nachází v příloze.

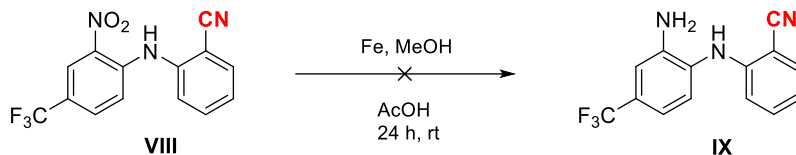


Schéma 21: Redukce železem

Po neúspěšné redukci pomocí železa jsme přistoupili k redukci vodíkem Schéma 22. Tato reakce byla také neúspěšná z důvodu vzniku složité směsi látek.

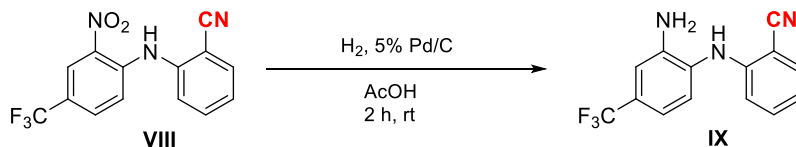


Schéma 22: Redukce vodíkem

Jako neúčinnější se nám jevila redukce za použití zinku v kyselém prostředí, ačkoliv vznikl jeden vedlejší produkt ve větším množství. Cílová látka **IX** od něj však byla dobře separovatelná na chromatografické koloně. Výchozí látka **VIII** byla rozpuštěna v methanolu, k reakční směsi byly přidány 4 ekv. zinku a po kapkách kyselina octová. Reakce probíhala 30 minut za laboratorní teploty (Schéma 23). Na základě TLC bylo

zjištěno, že vznikla směs dvou produktů, konkrétně diamin společně se sloučeninou, kterou nešlo, vzhledem k nerozpustnosti v rozpouštědlech k měření NMR a HPLC, analyzovat. S největší pravděpodobností vznikla látka **IXa**, čímž se odkazují na bakalářskou práci Anny Chládkové (Chládková, 2021). Po redukcí výchozí látky zinkem v kyselém prostředí získala strukturně podobnou sloučeninu. Výtěžnost produktu po přečištění na chromatografické koloně byla 59 %.

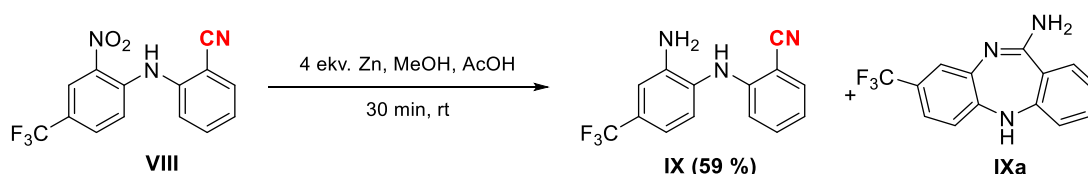


Schéma 23: Redukce zinkem

3.3.3 Cyklizační reakce

Cyklizační reakce sloužily k přípravě cílových benzimidazolových derivátů s nitrilem (Schéma 24). Reakce probíhaly 24 hodin za zvýšené teploty na 80 °C. Vhodnými aldehydy jakožto cyklizačními činidly byl zaveden různý substituent **R²** do cílových derivátů.

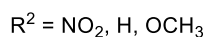
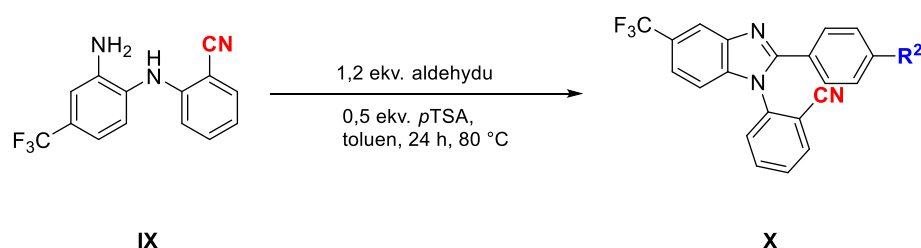
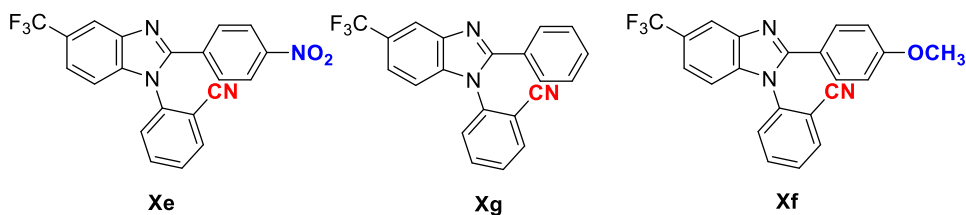


Schéma 24: Cyklizace s různými aldehydy

První cyklizační reakcí byla reakce s 4-nitrobenzaldehydem. 1 ekv. výchozí látky **IX**, 1,2 ekv. 4-nitrobenzaldehydu a 0,5 ekv. *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin za zvýšené teploty na 80 °C za vzniku produktu **Xe**. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po přečištění produktu pomocí sloupcové chromatografie byla výtěžnost reakce 65 %. Příprava finálních látek **Xf** a **Xg** probíhala za stejných podmínek jako syntéza benzimidazolového derivátu **Xe**. Průběh reakcí byl kontrolován pomocí TLC a produkty byly poté přečištěny pomocí sloupcové chromatografie. Výtěžnosti reakcí činily u produktu **Xf** 50 % a u derivátu **Xg** 75 %. Finální produkty znázorňuje Obrázek 23.



Obr. 23: Výsledné produkty po cyklizaci

3.3.4 Finální produkty

K zisku cílových benzimidazolových derivátů byly použity různé aldehydy, které obsahovaly elektrodonorní či elektroakceptorní skupinu v *para* poloze. K přípravě derivátu s jodem pro účely jiného výzkumu byl použit 3,5-(bisfluormethyl)benzaldehyd, který obsahoval dvě CF_3 skupiny v polohách *meta*. Procentuální výtěžnosti reakcí shrnuje (Tab. 2).

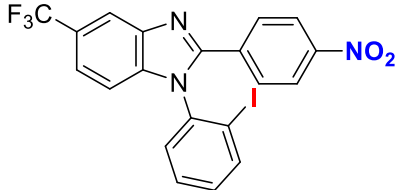
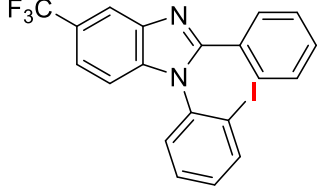
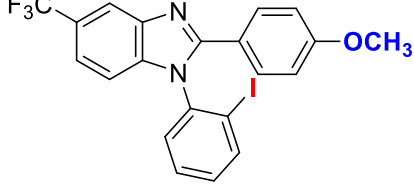
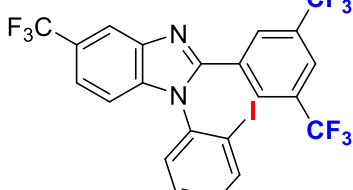
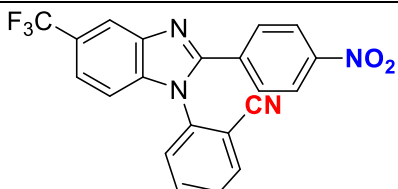
Průběh reakce je kromě reakčních podmínek ovlivněn také přítomností případně nepřítomností elektrondonorní či elektroakceptorní skupiny, která může mít posléze také vliv na antiproliferační aktivitu připraveného benzimidazolového derivátu.

Nitro skupina patří mezi elektroakceptorní skupiny. To znamená, že díky přítomnosti dvou atomů kyslíku navázaných na dusík odtahuje elektrony ze systému. Methoxyskupina se řadí mezi elektrondonorní skupiny. Kyslík má dva volné elektronové páry, které zvyšují elektronovou hustotu na aromatickém jádře. CF_3 skupina má zase tendenci odtahovat elektrony od aromatického jádra, což způsobuje snížení elektronové hustoty a elektrofilního charakteru aldehydové skupiny. Aldehyd obsahující elektroakceptorní skupinu může být méně reaktivní vůči výchozímu diaminu, což může vést k nižším výtěžkům reakce. Naopak aldehyd obsahující elektrondonorní skupinu bude reagovat pomaleji díky umístění elektrondonorní skupiny v *para* poloze, což by mělo vést k vyšším výtěžkům reakce. Poslední aldehyd, který byl použit k zisku derivátu **Vd** obsahoval ve své struktuře dvě CF_3 skupiny, které díky obsahu fluoru způsobují odtah elektronů, čímž se snižuje elektronová hustota na aromatickém jádře. 3,5-(bisfluormethyl)benzaldehyd může díky své stericke náročnosti špatně reagovat s výchozími látkami, avšak v reakci, která vedla k zisku finální látky **Vd** tento aldehyd posloužil k dosažení poměrně vysokého procentuálního výtěžku. Všechny čtyři aldehydy lze charakterizovat jako účinná cyklizační činidla s výtěžností ve většině případů nad 50 %.

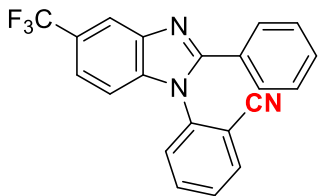
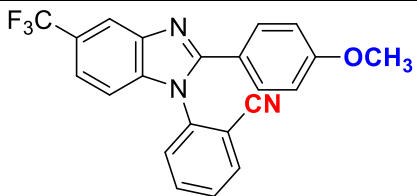
3.4 Cílové benzimidazolové deriváty

Finální látky byly získány pomocí tří krokové syntézy, která zahrnovala nukleofilní aromatickou substituci, redukci nitroskupiny a následnou cyklizaci s vhodnými cyklizačními činidly, která zavedla **R²** substituenty do molekuly. Nejlepší procentuální výtěžek odpovídá látce **Xg (75 %)**. Rozmezí výtěžností ostatních cílových produktů je 49–70 %. V tabulce (Tab. 2) jsou zaznamenány všechny cílové produkty, které byly analyzovány pomocí ¹H a ¹³C NMR a HRMS.

Tab. 2: Přehled finálních produktů

Finální produkty	Vzorec	Výtěžnost (%)	HPLC čistota*
Va		49 %	>99 %
Vb		57 %	>99 %
Vc		70 %	95 %
Vd		64 %	96 %
Xe		65 %	96 %

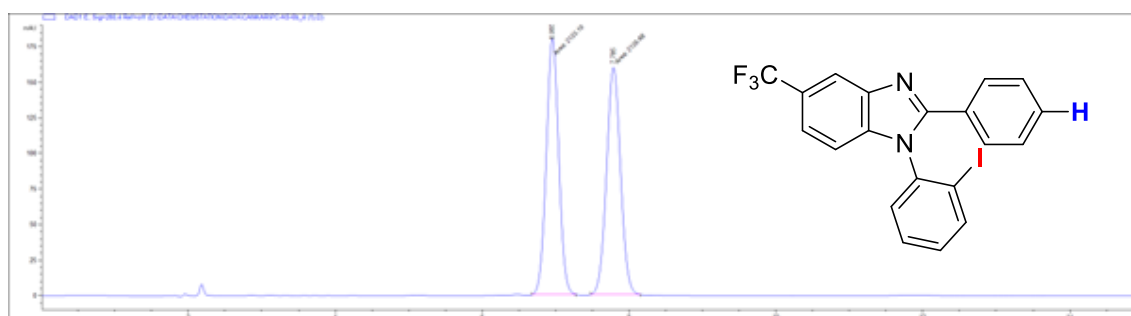
Tab. 2: Přehled finálních produktů (pokračování)

Xf		50 %	>99 %
Xg		75 %	>99 %

*procentuální čistota vypočítaná z UV-VIS spektra (220-500 nm)

3.5 Chirální separace

Pro prokázání axiální chiralitly byly vybrány látky **Va** (R^2 substituent v podobě NO_2), **Vb** (R^2 substituent v podobě vodíku) a **Vd** (s dvěma CF_3 skupinami v poloze *meta*). Z vybraných tří látek se podařilo zatím rozlišit vzniklé atropoizomery pouze u finální látky **Vb** (Obr. 24). K separaci byla nalezena vhodná analytická metoda v podobě HPLC Agilent 1260 Infinity II a kolona Daicel IA-3 (4.6 x 100 mm, 3 μ m), ethanol/voda 70:30, 0.6 ml/min, 35 °C. U testovaných látek byla potvrzena chirální osa, čímž se prokázalo, že jsou látky axiálně chirální.



Obr. 24: Chirální separace látky **Vb**

3.6 Antiproliferační aktivita

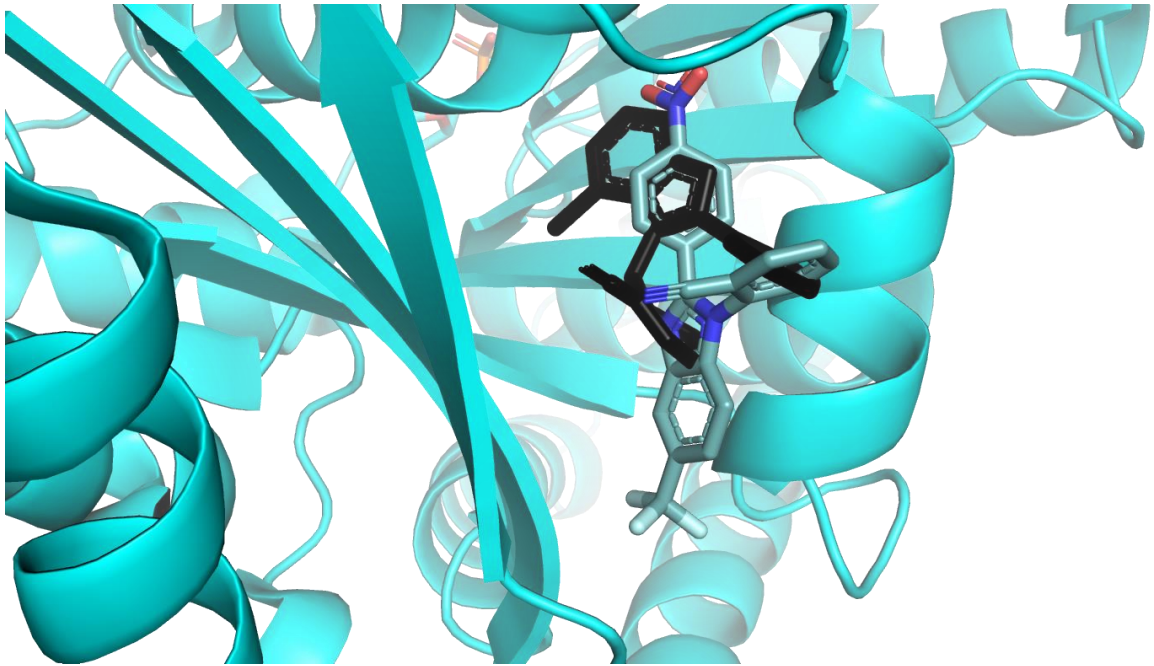
Finální látky byly zaslány na pracoviště růstových regulátorů v Holici, kde jsou testovány pro své protirakovinné účinky na buněčných liniích HeLa, MV4-11, Eol-1. Testování bude provedeno také na normálních lidských buňkách RPE-1, BJ. Prozatím byla provedena první sada testů a pokračuje se v dalším testování. Zacíleno je na

základě předchozích výsledků na tubulin, konkrétně na kolchicinové vazebné místo. Po provedeném molekulovém dockingu do kolchicinového místa na mikrotubulech se jeví jako potenciálně účinný derivát **Xe**.

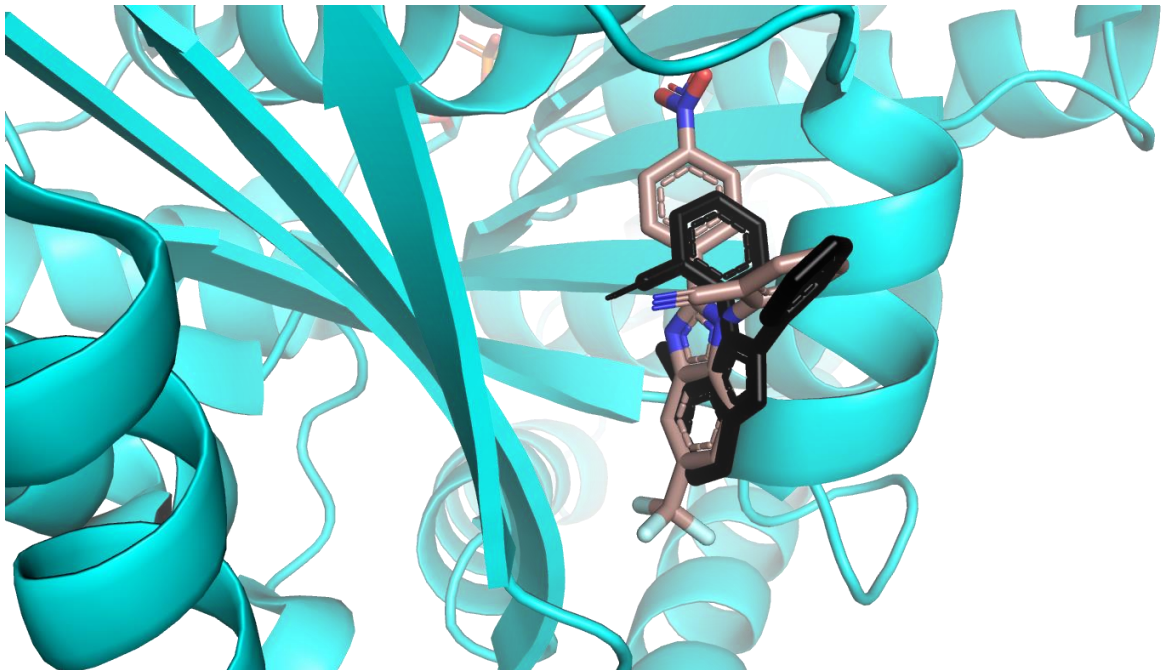
Prvním krokem biologického testování je příprava buněčných linií, které byly vhodně naředěny. Tyto buňky byly spočítány a pomocí pipety umístěny do mikrotitrační destičky. Druhý den byla k buňkám přidána testovaná látka o různých koncentracích. Inkubační doba byla 3 dny. Následujícím krokem bylo přidání fluorescenční barvivo Alamar Blue, díky kterému bylo možné spektrofotometricky změřit proliferaci buněk. Z naměřených hodnot byla sestavena křivka viability buněk na koncentraci testované látky. Posledním krokem byl výpočet IC_{50} [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$].

3.7 Molekulový docking

Ve spolupráci s katedrou fyzikální chemie byl proveden molekulový docking pomocí programu AutoDock Vina. Úprava struktur proběhla v programu Pymol. Jako cíl byl vybrán tubulin, na kterém se nachází různá vazebná místa např. vazebné místo pro paklitaxel, vinca alkaloidy či kolchicin. Docking byl proveden do kolchicinového místa (Obr. 25,26), kde byly navázány dva benzimidazolové deriváty, konkrétně látka **JP-5n** (černá molekula) a **Xe**. Vznikly dvě varianty vazby, tedy pro oba atropoizomery daných sloučenin. V Tabulce č. 2 je zaznamenána vazebná afinita jednotlivých atropoizomerů ke kolchicinovému místu, kdy oba atropoizomery látky **Xe** mají zápornější hodnotu [$-8,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$] v porovnání s vazebnou energií látky **JP-5n** [$-7,6$; $-8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]. Dle výsledků se látka **Xe** váže do kolchicinového místa lépe než látka **JP-5n**.



Obr. 25: Atropoizomery *R*-Xe; *R*-(-)-JP-5n (černě)



Obr. 26: Atropoizomery *S*-Xe; *S*-(+)-JP-5n (černě)

Tab. 3: Vazebné energie vybraných benzimidazolových derivátů navázaných na kolchicinovém místě

Benzimidazolový derivát	Vazebná energie (kcal·mol ⁻¹)
(<i>R</i>)-Va	-8,4
(<i>S</i>)-Va	-8,5
(<i>R</i>)-Vb	-8,1
(<i>S</i>)-Vb	-8,5
(<i>R</i>)-Vc	-8,1
(<i>S</i>)-Vc	-8,1
(<i>R</i>)-Xe	-8,7
(<i>S</i>)-Xe	-8,7
(<i>R</i>)-Xf	-8,1
(<i>S</i>)-Xf	-8,2
(<i>R</i>)-Xg	-8,5
(<i>S</i>)-Xg	-8,4
(<i>R</i>)-(+)-JP-5n	-7,6
(<i>S</i>)-(-)-JP-5n	-8

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Finální látky byly charakterizovány pomocí ^{13}C a ^1H NMR spektrometrie, teploty tání a HRMS. K identifikaci pomocí NMR analýz byl použit spektrometr JEOL ECA 400II (^1H : 399,78, ^{13}C : 100,53 MHz). Chemické signály byly referencovány na reziduální signál rozpouštědla (DMSO- d_6 : 2,50 ppm, 39,51 ppm a CDCl_3 : 7,27 ppm, 77,00 ppm). Další analýza proběhla pomocí HRMS (Orbitrap Elite high-resolution hmotnostní spektrometr) firmy Thermo. K chirální separaci byla nalezena vhodná analytická metoda v podobě HPLC Agilent 1260 Infinity II a kolona Daicel IA-3 (4.6 x 100 mm, 3 μm), ethanol/voda 70:30, 0.6 ml/min, 35 °C. Analýza průběhu chemických reakcí a jednotlivých kroků přípravy deriváty proběhla pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a UHPLC-MS systému firmy Waters (Acquity Waters SQ Detector 2).

4.1 Syntéza

4.1.1 Použité chemikálie

1-fluor-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzen

2-jodanilin

2-aminobenzonitril

Zinek

Železo

Palladium

Vodík

Hydroxid draselný

Methanol

Kyselina octová

Dimethylsulfoxid

Toluen

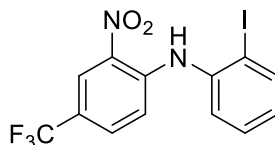
Dichlometan

Hexan

Aldehydy

Kyselina *p*-toluensulfonová

4.1.2 *N*-(2-jodofenyl)-2-nitro-4-(trifluormethyl)anilin (III)

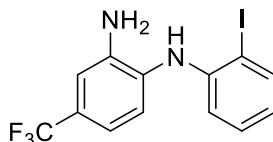


209 mg 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzenu (1 mmol) a 219 mg 2-jodanilinu (1 mmol) bylo rozpuštěno v 5 ml DMSO. Posléze bylo k reakční směsi přidáno 224 mg KOH (4 mmol). Směs byla míchána 1,5 hodiny za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla směs nalita do ledové vody a pomocí HCl bylo upraveno pH na hodnotu 1-2. Produkt byl filtrován. Výtěžnost reakce byla 78 % což odpovídá 320 mg oranžové práškovité látky.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; CHLOROFORM-*d*) δ = 7,00 (d, $J=8.85$ Hz, 1 H); 7,07 (td, $J=7.63$, 1,83 Hz, 1 H); 7,40 (dd, $J=7.70$, 1.70 Hz, 1 H); 7,46 (td, $J=7.70$, 1,40 Hz, 1 H); 7,56 (dd, $J=8.85$, 2.14 Hz, 1 H); 8,00 (dd, $J=7.93$, 1,53 Hz, 1 H); 8,55 (dd, $J=1.83$, 0,92 Hz, 1 H); 9,62 (br. s., 1 H) ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 408,9655; nalezeno 408,9633. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 406,9499; nalezeno 406,9507.

4.1.3 *N*^I-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diamin (IV)



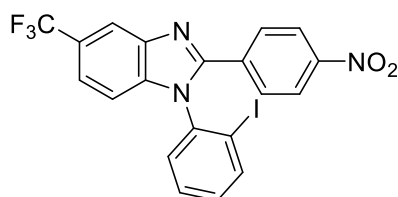
204 mg (0,5 mmolu) *N*-(2-jodofenyl)-2-nitro-4-(trifluormethyl)anilinu bylo rozpuštěno ve 4 ml methanolu a poté bylo přidáno 131 mg (2 mmol) zinku. Po kapkách byl přidán 1 ml kyseliny octové. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 30 minut. Po ukončení reakce byl zinek filtrován a filtrát byl nakapán do 50 ml vody, obazičtěn KOH na pH = 12 a extrahován třikrát do 50 ml dichlormethanu. Koncentrace hydroxidu odpovídá 0,25 mol·ml⁻¹. Dále byl promyt vodou a solankou. Dichlormethan byl odpařen pomocí RVO. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita hexan:dichlormethan v poměru 2:1, kdy rozpouštědlo bylo poté odpařeno pomocí RVO. Po přečištění byla získána růžová krystalická látka jejíž procentuální výtěžnost byla 54 %, což odpovídá 132 mg finální látky.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 4,03 (br. s., 2 H); 5,65 (br. s., 1 H) 6.61 – 6,66 (m, 1 H); 6,68 (dd, $J=8.09$, 1.37 Hz, 1 H); 7,01 – 7,04 (m, 1 H); 7,07 (d, $J=1,83$ Hz, 1 H); 7,16 – 7,22 (m, 2 H); 7,78 (dd, $J=7,93$, 1,53 Hz, 1 H)

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378,9914; nalezeno 378,9901. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 376,9757; nalezeno 376,9766.

Teplota tání: 137 °C–140 °C

4.1.4 1-(2-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (Va)



151 mg (0,4 mmolu) výchozí látky *N*¹-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diaminu, 73 mg (0,5 mmol) 4-nitrobenzaldehydu a 38 mg (0,2 mmol) *p*-toluensulfonové (*p*TSA) bylo rozpuštěno ve 2 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Finální produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byl použit dichlormethan, který byl poté odpařen pomocí RVO. Bylo získáno 51 mg oranžové krystalické látky, což odpovídá procentuálnímu výtěžku 50 %.

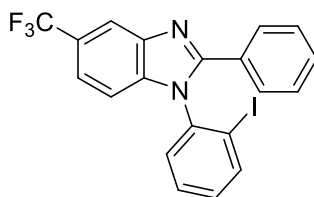
^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 7,13 (d, $J=8,55$ Hz, 1 H); 7,35 (td, $J=7.71$, 1.68 Hz, 1 H); 7,44 (dd, $J=7.63$, 1.53 Hz, 1 H); 7,57 – 7,62 (m, 2 H); 7,79 – 7,83 (m, 2 H); 8,08 (dd, $J=7,93$, 1,22 Hz, 1 H); 8,18 – 8,22 (m, 2 H); 8,23 (d, $J=1,53$ Hz, 1 H)

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 151,34; 148,45; 142,30; 141,01; 138,78; 138,60; 135,46; 130,51; 130,29; 129,80; 129,53; 127,23; 126,30 (q, $J=32,50$ Hz, 1 C), 124,54 (q, $J=272,00$ Hz, 1 C), 123,73; 121,31 (q, $J=3,85$ Hz, 1 C); 118,23 (q, $J=4,60$ Hz, 1 C), 111,54; 98,21 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509,9921; nalezeno 509,9918.

Teplota tání: 213 °C–216 °C

4.1.5 1-(2-jodofenyl)-2-fenyl-5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (Vb)



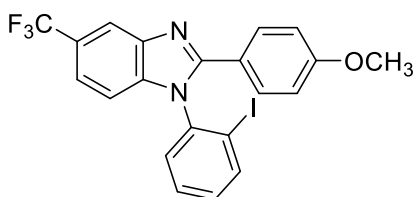
126 mg (0,3 mmolu) výchozí látky *N*¹-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diaminu, 42 mg = 40,38 μ l (0,4 mmol) benzaldehydu, 32 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Finální produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byl použit dichlormethan, který byl poté odpařen pomocí RVO. Po přečištění bylo získáno 43 % krémové krystalické což odpovídá 71 mg finální látky.

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 8,19 (br. s, 1 H); 8,06 (dd, *J*=8,0; 1,37 Hz; 1 H); 7,60 – 7,64 (m, 2 H); 7,51 - 7,56 (m, 2 H); 7,31 – 7,43 (m, 4 H); 7,29 (dd, *J*=7;63; 1,53 Hz; 1 H); 7,08 (d, *J*=8;55 Hz; 1 H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 154,03; 142,44; 140,67; 139,42; 138,49; 131,18; 130,11; 129,93; 129,78; 129,40; 129,10; 128,51; 125,63 (q, *J*=32,00 Hz; 1 C); 124,75 (q, *J*=271,80 Hz; 0 C); 120,30 (q, *J*=3,85 Hz; 1 C); 117,67 (q, *J*=3,85 Hz; 1 C); 111,25; 98,38 ppm.
HRMS (ESI) *m/z* vypočítáno [M+H]⁺ 465,0070; nalezeno 465,0063.

Teplota tání: 196 °C

4.1.6 1-(2-jodofenyl)-2-(4-methoxyfenyl)-5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole (Vc)



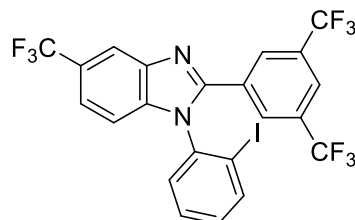
126 mg (0,3 mmolu) výchozí látky *N*¹-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diaminu, 55 mg = 48,58 μ l (0,4 mmol) *p*-anisaldehydu, 32 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie a jako mobilní fáze byl použit dichlormethan:methanol v poměru 4:1. Rozpuštědlo bylo poté odpařeno pomocí RVO. Procentuální výtěžnost reakce je 57 % což odpovídá 88 mg. Finální produkt byl v podobě oranžové krystalické látky.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3,81 (s, 3 H); 6,82 – 6,87 (m, 2 H); 7,04 (dd, $J=8,24$; 0,61 Hz; 1 H); 7,27 – 7,31 (m, 1 H); 7,37 (dd, $J=7,63$; 1,53 Hz; 1 H); 7,49 (dd, $J=7,93$; 0,92 Hz; 1 H); 7,52 – 7,57 (m, 3 H); 8,06 (dd, $J=7,93$; 1,53 Hz; 1 H); 8,16 (d, $J=0,92$ Hz; 1 H); ^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 161,05; 154,00; 142,47; 140,68; 139,62; 138,50; 131,14; 130,59; 129,96; 129,81; 125,48 (q, $J=32,00$ Hz; 1 C); 124,81 (q, $J=271,80$ Hz; 1 C); 121,76; 119,96 (q, $J=3,33$ Hz; 1 C); 117,28 (q, $J=4,61$ Hz; 1 C); 114,01; 110,99; 98,48; 55,26 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 495,0176; nalezeno 495,0184.

Teplota tání: 150 °C–154 °C

4.1.7 2-(3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl)-1-(2-jodofenyl)-5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (Vd)



151 mg (0,4 mmolu) výchozí látky *N*¹-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diamin, 116 mg = 79,11 μl (0,5 mmol) 3,5-bis(trifluormethyl)benzaldehydu a 38 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno ve 2 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy byla použita mobilní fáze dichlormethan:hexan v poměru 1:1. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno pomocí RVO. Procentuální výtěžnost reakce je 53 %, což odpovídá 96 mg finální látky. Produkt byl v podobě světle hnědé krystalické látky.

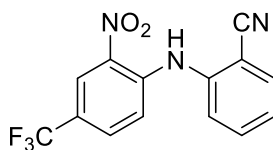
^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 8,23 – 8,25 (m, 1 H); 8,07 – 8,11 (m, 3 H); 7,89 (s, 1 H); 7,58 – 7,65 (m, 2 H); 7,47 (dd, $J=7,63$; 1,53 Hz; 1 H); 7,36 (td, $J=7,71$; 1,68 Hz; 1 H); 7,16 (d, $J=8,85$ Hz; 1 H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 150,50; 142,14; 141,04; 138,50; 132,09 (q, $J=34,00$ Hz; 1 C); 131,57; 130,37; 129,51; 128,85 (q, $J=3,80$ Hz; 1 C); 126,41 (q, $J=32,00$ Hz; 1 C); 124,55 (q, $J=271,80$ Hz; 1 C); 123,47 (q, $J=3,60$ Hz; 1 C); 123,44 (q, $J=3,60$ Hz; 1 C); 122,79 (q, $J=273,00$ Hz; 1 C); 121,46; 118,25 (q, $J=3,80$ Hz; 1 C); 118,27 (q, $J=3,80$ Hz; 1 C); 111,51; 111,48; 98,22 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 600,9818; nalezeno 600,9817.

Teplota tání: 125 °C–130 °C

4.1.7.1 2-((2-nitro-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitril (VIII)

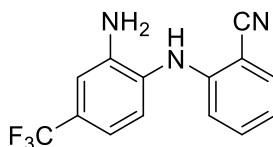


1045 mg (5 mmolu) výchozí látky 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluormethyl)benzenu bylo smícháno s 591 mg (5 mmol) 2-aminobenzonitrilu. K reakční směsi bylo přidáno 40 ml DMSO. Poté bylo přidáno 1122 mg (20 mmol) KOH. Reakce probíhala 2 hodiny za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla reakční směs nakapána do ledové vody a poté bylo pH upraveno pomocí zředěné HCl. Produkt byl filtrován. Procentuální výtěžnost produktu (žlutá práškovitá látka), který byl dále použit k následující reakci, byla 97 %, což odpovídá 1490 mg.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 9,84 (br. s., 1 H); 8,56 (d, $J=1,53$ Hz; 1 H); 7,79 (dd, $J=7,63$; 1,53 Hz; 1 H); 7,70 (td, $J=7,90$; 1,40 Hz; 1 H); 7,65 (dd, $J=8,85$; 2,14 Hz; 1 H); 7,52 (d, $J=7,93$ Hz; 1 H); 7,41 (td, $J=7,63$; 0,92 Hz; 1 H); 7,22 (d, $J=8,85$ Hz; 1 H) ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 308,0641; nalezeno 308,0639. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 306,0485; nalezeno 306,0495.

4.1.7.2 2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitril (IX)

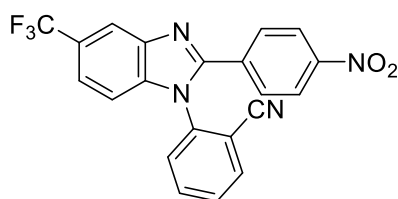


1000 mg výchozí látky 2-((2-nitro-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitrilu (3 mmol) bylo rozpuštěno ve 26 ml methanolu. K reakční směsi bylo přidáno 851 mg (13 mmol) zinku. Poté bylo přidáno 6 ml kyseliny octové. Reakce probíhala za laboratorní teploty při laboratorní 30 minut. Po ukončení reakce byl zinek zfiltrován a filtrát byl nakapán do vody a obazičtěn pomocí KOH (koncentrace 0,02 mol·ml⁻¹) a extrahován třikrát 50 ml, poté byl promyt vodou a následně solankou. Dichlormethan byl poté odpařen pomocí RVO. Produkt byl poté přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Byla použita mobilní fáze dichlormethan:hexan v poměru 1:1.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 7,53 (dd, $J=7,78$; 1,68 Hz; 1 H); 7,38 (td, $J=7,78$; 1,83 Hz; 1 H); 7,22 (d, $J=7,93$ Hz; 1 H); 7,07 (d, $J=1,70$ Hz; 1 H); 7,03 (dd, $J=7,93$; 1,83 Hz; 1 H); 6,87 (td, $J=7,55$; 1,07 Hz; 1 H); 6,66 (d, $J=8,24$ Hz; 1 H); 5,98 (br. s., 1 H); 3,98 (br. s., 2 H) ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278,0900; nalezeno 278,0909. $[\text{M}-\text{H}]^-$ 276,0743; nalezeno 276,0743.

4.1.7.3 2-(2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)benzonitril (Xe)



92 mg (0,3 mmol) výchozí látky 2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitril, 61 mg 4-nitrobenzaldehydu (0,4 mmol), 32 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala při 80 °C 24 hodin. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byl použit samotný dichlormethan. Dichlormethan byl poté odpařen pomocí RVO. Bylo získáno 79 mg bílých krystalů, což odpovídá procentuální výtěžnosti 65 %.

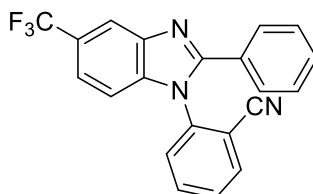
^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 8,24 – 8,25 (m, 1 H); 8,20 – 8,24 (m, 2 H); 7,88 – 7,93 (m, 2 H); 7,73 – 7,78 (m, 3 H); 7,60 – 7,65 (m, 2 H); 7,23 – 7,27 (m, 1 H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 151,83; 148,64; 142,60; 138,68; 138,28; 134,85; 134,77; 130,57; 130,08; 129,17; 128,68; 126,83 (q, $J=32,50$ Hz; 1 C); 124,37 (q, $J=271,00$ Hz; 1 C); 123,88; 121,78 (q, $J=3,85$ Hz; 1 C); 118,64 (q, $J=4,61$ Hz; 1 C); 114,52; 112,56; 110,81 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 409,0907; nalezeno 409,0905.

Teplota tání: 207 °C-210 °C

4.1.7.4 2-(2-phenyl-5-(trifluormethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)benzonitril (Xf)



92 mg (0,3 mmol) výchozí látky 2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitril, 42 mg = 40 μ l (0,4 mmol) benzaldehydu, 32 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala při 80 °C 24 hodin. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byl použit samotný dichlormethan, který byl následně odpařen pomocí RVO. Bylo získáno 55 mg oranžových krystalů, což odpovídá procentuální výtěžnosti 50 %.

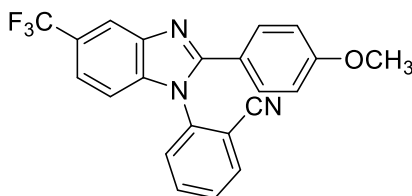
^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 8,19 – 8,22 (m, 1 H); 7,86 (dd, $J=7;63$; 1,53 Hz; 1 H); 7,82 (td, $J=7,90$; 1,50 Hz; 1 H); 7,67 (td, $J=7,70$; 1,20 Hz; 1 H); 7,53 – 7,58 (m, 3 H); 7,51 (dd, $J=7,93$; 0,61 Hz; 1 H); 7,40 – 7,45 (m, 1 H); 7,33 – 7,38 (m, 2 H); 7,21 (d, $J=8,55$ Hz; 1 H); ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 154,52; 142,77; 139,01; 138,62; 134,47; 134,45; 130,39; 129,94; 129,48; 129,33; 128,70; 120,82 (q, $J=3,70$ Hz; 1 C); 124,72 (q, $J=273,00$ Hz; 1 C); 118,18 (q, $J=4,00$ Hz; 1 C); 114,81; 112,68; 110,47 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 364,1056; nalezeno 364,1055.

Teplota tání: 158 °C-162 °C

4.1.7.5 2-(2-(4-methoxyfenyl)-5-(trifluormethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)benzonitril Xg



92 mg (0,3 mmol) výchozí látky 2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitril, 55 mg = 49 μ l (0,4 mmol) *p*-anisaldehydu a 32 mg (0,2 mmol) *p*TSA bylo rozpuštěno v 1,5 ml toluenu. Reakce probíhala 24 hodin při teplotě 80 °C. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy byla použita mobilní fáze dichlormethan, který byl poté odpařen pomocí RVO. Procentuální

výtěžnost reakce byla 75 %, což odpovídá 98 mg finální látky. Produkt byl v podobě bílé krystalické látky.

^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 8,17 – 8,19 (m, 1 H); 7,87 (dd, $J=7,78$; 1,07 Hz; 1 H); 7,83 (td, $J=7,90$; 1,50 Hz; 1 H); 7,68 (td, $J=7,70$; 1,40 Hz; 1 H); 7,51 – 7,55 (m, 2 H); 7,45 – 7,50 (m, 2 H); 7,17 (d, $J=8,55$ Hz; 1 H); 6,84 – 6,89 (m, 2 H); 3,83 (s, 3 H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ = 161,21; 154,52; 142,80; 139,17; 138,59; 134,47; 130,82; 129,87; 129,47; 129,30; 126,04 (q, $J=32,00$ Hz; 1 C); 124,63 (m, $J=271,80$; 271,80; 271,80 Hz; 1 C); 121,02; 120,45 (q, $J=3,85$ Hz; 1 C); 117,73 (q, $J=4,10$ Hz; 1 C); 114,84; 114,19; 112,68; 110,25; 55,31 ppm.

HRMS (ESI) m/z vypočítáno $[\text{M}+\text{H}]^+$ 394,1162; nalezeno 394,1159.

Teplota tání: 195 °C-200 °C

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zaměřuje na syntézu nových axiálně chirálních derivátů benzimidazolu modifikovaných v poloze 5, kde se nachází elektronakceptorní skupina. Tyto deriváty by mohly mít na základě předchozích studií potenciál v léčbě rakoviny.

V rámci teoretické části jsem se zabývala základním strukturním motivem cílových derivátů, což je benzimidazol samotný. Byla popsána jeho struktura, chemické a fyzikální vlastnosti společně s charakteristikou axiální chiralita. V následující části jsem se zaměřila na možnosti přípravy benzimidazolových derivátů, kdy jsem popsala historický způsob společně s možnostmi syntézy v dnešní době. Prvním způsobem byla příprava z *o*-fenylendiaminů, kterou následovala příprava přesmykem.

Benzimidazol a jeho deriváty se široce uplatňují ve zdravotnictví. Z tohoto důvodu byla na účinky zaměřena kapitola 2.6, ve které jsem popsala různé účinky benzimidazolových derivátů. Do této kapitoly spadají antimikrobiální, antivirotické, protizánětlivé a analgetické účinky. Pro moji bakalářskou práci byla nejdůležitější protirakovinná aktivita.

Cílem navržených derivátů jsou mikrotubuly, kterým se věnovala kapitola 2.8, ve které byly shrnuty obecné informace o cytoskeletu, jehož jsou mikrotubuly součástí. Dále jsem se zabývala strukturou tubulinu, což je bílkovina, která je základní stavební jednotkou mikrotubulů, dynamikou mikrotubulů a látkami, které působí na polymeraci mikrotubulů. V poslední části byly popsány domény, které jsou součástí mikrotubulů a konkrétně jsem se zaměřila na kolchicinovou doménu a inhibitory, které se váží do kolchicinového místa, protože do tohoto místa byly dockovány i mnou připravené látky.

V rámci experimentální části bylo připraveno celkem 7 derivátů, které se lišily substituenty R^1 a R^2 . Jedna sada obsahovala jako R^1 substituent jód, druhá nitril. R^2 substituent byl zvolen buďto elektronodonorní či elektronakceptorní. V závislosti na výběru substituentu R^2 bylo sledováno, jaký vliv mají tyto skupiny na průběh reakce. Cílové produkty a meziproducty byly analyzovány pomocí ^1H a ^{13}C NMR, HRMS a teploty tání. Byla také nalezena vhodná analytická metoda pro separaci jednotlivých atropoizomerů látky **Vb** a důkazu axiální chiralita.

Všechny finální látky byly zaslány na biologické testování ve spolupráci s LRR, které proběhlo na několika buněčných liniích, konkrétně na HeLa, MV4-11 a EoL-1 a také normálních buňkách.

Ve spolupráci s katedrou fyzikální chemie byl proveden molekulární docking konkrétně do kolchicinového místa, které je součástí tubulinu. Nejlepší vazebnou energii vykazovala látka **Xe** [-8,7 kcal·mol⁻¹) v porovnání s vazebnou energií derivátu **JP-5n**, kdy hodnota vazebné afinity atropoizomerů činila pro **(R)-(+)-JP-5n** [-7,6 kcal·mol⁻¹] a pro **(S)-(-)-JP-5n** obou atropoizomerů činila [-8 kcal·mol⁻¹], což může být dobrý předpoklad pro biologickou aktivitu této látky, která by mohla působit protinádorově.

6 LITERATURA

- Abdallah, A. E., Helal, M., & Elakabawy, N. I. (2018). Novel Synthesis of Thiophene, Triazole and Pyrimidine Derivatives. *Egyptian journal of Chemistry* 58(6), 309-318.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00922>
- Abelson, J. N., Simon, M. I., Colowick, S. P., & Kaplan, N. O. (2012). Methods in enzymology editors-in-chief. *Division of Biology*.
https://www.bjcancer.org/Sites_OldFiles/Library/UserFiles/pdf/Embryonic%20Stem%20Cells.pdf
- Adam, Z., Krejčí, M., & Vorlíček, J. (2011). *Obecná onkologie*. Galén.
- Adams, M. C., Kish, L. J., Topol, E. J., Alagoz, O., Durham, D., & Kasirajan, K. (2016). The promise and peril of genomic screening in the general population Unpatients(-), why patients should own their medical data. *Genetics&Medicals*, 18(6), 596-599.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.136>
- Alam, S. A. M. F., Ahmad, T., Nazmuzzaman, M., Ray, S. K., Sharifuzzaman, M., Karim, M. R., Alam, M. G., Ajam, M. M., Maitra, P., & Mandol D. (2017). Synthesis of Benzimidazole Derivates Containing Schiff Base Exhibiting Antimicrobial Activities. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 5(7), 18-24.
<http://dx.doi.org/10.20431/2349-0365.0507003>
- Alaqeel, S. I. (2017). Synthetic approaches to benzimidazoles from o-phenylenediamine: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21(2), 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2016.08.001>
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy . In *International Journal of Molecular Medicine* 40(2), 271–280
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- Azarenko, O., Okouneva, T., Singletary, K. W., Jordan, M. A., & Wilson, L. (2008). Suppression of microtubule dynamic instability and turnover in MCF7 breast cancer cells by sulforaphane. *Carcinogenesis*, 29(12), 2360–2368.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgn241>
- B. Wright, J. (2002). The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chemical Reviews*, 48(3), 397–541.
<https://doi.org/10.1021/cr60151a002>
- Ba, X., & Garg, N. J. (2011). Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *The American Journal of Pathology*, 178(3), 946–955.
<https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2010.12.004>
- Bai, R., Pettit, G. R., & Kamel, E. (1990). Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimitotic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17141–17149.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44880-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44880-0)
- Bane Hastie, S. (1991). Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacology and therapeutics*, 51(3), 377-401.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90067-V](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90067-V)

- Bhaduri, S., Ranjan, N., & Arya, D. P. (2018). An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *14*, 1051–1086.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.14.93>
- Bielawski, K., Wołczyński, S., & Bie-Lawska, A. (2004). Inhibition of DNA topoisomerase I and II, and growth inhibition of MDA-MB-231 human breast cancer cells by bis-benzimidazole derivatives with alkylating moiety *Polish Journal of Pharmacology*, *56*(3), 373–378.
<https://www.researchgate.net/publication/8491828>; PMID: 15215569.
- Binarová, P., & Tuszynski, J. (2019). Tubulin: Structure, functions and roles in disease. *Cells*, *8*(10), 1294.
<https://doi.org/10.3390/cells8101294>
- Blajeski, A. L., Phan, V. A., Kottke, T. J., & Kaufmann, S. H. (2002). G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(1), 91–99.
<https://doi.org/10.1172/jci200213275>
- Boichuk, S., Syuzov, K., Bikinieva, F., Galembikova, A., Zykova, S., Gankova, K., Igidov, S., & Igidov, N. (2022). Computational-Based Discovery of the Anti-Cancer Activities of Pyrrole-Based Compounds Targeting the Colchicine-Binding Site of Tubulin. *Molecules*, *27*(9), 2873.
<https://doi.org/10.3390/molecules27092873>
- Büchler, T., & a kol. (2019). *Obecná onkologie*. Maxdorf.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual reviews of biochemistry*, *70*, 369–413.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Choi, H. J., Fukui, M., & Zhu, B. T. (2011). Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole. *PLoS ONE*, *6*(8), e0024312.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024312>
- Dai, X., Wang, L., Deivasigamni, A., Yeng Looi, C., Karthikeyan, C., Trivedi, P., Chinnathambi, A., Ali Alharbi, S., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Cher Goh, B., Man Hui, K., Prem Kumar, A., Rais Mustafa, M., & Sethi, G. (2017). A novel benzimidazole derivative, MBIC inhibits tumor growth and promotes apoptosis via activation of ROS-dependent JNK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *8*(8), 12873–12842.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14606>
- Derry, W. B., Wilson, L., & Jordan, M. A. (1995). Substoichiometric Binding of Taxol Suppresses Microtubule Dynamics'. In *Biochemistry* *34*(7), 2203–2211.
<https://doi.org/10.1021/bi00007a014>
- Digwal, C. S., Yadav, U., Sakla, A. P., Sri Ramya, P. V., Aaghaz, S., & Kamal, A. (2016). VOSO₄catalyzed highly efficient synthesis of benzimidazoles, benzothiazoles, and quinoxalines. *Tetrahedron Letters*, *57*(36), 4012–4016.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.074>
- Dogra, N., Kumar, A., & Mukhopadhyay, T. (2018). Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways. *Scientific Reports*, *8*(1), 11926.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30158-6>
- El-Masry, A. H., Fahmy, H. H., & Ali Abdelwahed, S. H. (2000). Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives. *Molecules*, *5*(12), 1429–1438.

- <https://doi.org/10.3390/51201429>
Esteve, M.-A., Honore, S., McKAY, N., Bachmann, F., Lane, H., & Braguer, D. (2011). A Unique Microtubule-Targeted Drug That Suppresses Microtubule Dynamics, Severs Microtubules, and Overcomes Bcl-2- and Tubulin Subtype-Related Drug Resistance. *Cancer Research*, 70, 1977.
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-1977>
- Eswayah, A., Khaliel, S., Saad, S., Shebani, N., Fhid, O., Belaid, A., Alsharif, T., Elforjane, H., Saadalla, Y., & Baga, E. (2017). Synthesis and Analgesic Activity Evaluation of Some New Benzimidazole Derivatives. *American Journal of Chemistry and Application*, 4(5), 30–35.
<https://doi.org/10.1155/2013/694295>
- Gaba, M., Gaba, P., Uppal, D., Dhingra, N., Bahia, M. S., Silakari, O., & Mohan, C. (2015). Benzimidazole derivatives: Search for GI-friendly anti-inflammatory analgesic agents. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(4), 337–342.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.003>
- Gianoncelli, A., Cozza, G., Orzeszko, A., Meggio, F., Kazimierczuk, Z., & Pinna, L. A. (2009). Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(20), 7281–7289.
<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2009.08.047>
- Gidding, C. E. M., Kellie, S. J., Kamps, W. A., & De Graaf, S. S. N. (1999). Vincristine revisited. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 29(3), 267–287.
[https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(98)00023-7)
- Gowda, J., Khadar, A. M. A., Kalluraya, B., & Kumari, N. S. (2010). Microwave assisted synthesis of 1,3,4-oxadiazoles carrying benzimidazole moiety and their antimicrobial properties. *Hem. Sect. B Org. Med*, 49, 1130–1134.
DOI: 10.1002/CHIN.201050134
- Gromiha, M. M., & Nagarajan, R. (2013). Computational Approaches for Predicting the Binding Sites and Understanding the Recognition Mechanism of Protein–DNA Complexes. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 91, 65–99.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411637-5.00003-2>
- Güngördü, A., Sireci, N., Küçükbay, H., Birhanli, A., & Ozmen, M. (2013). Evaluation of in vitro and in vivo toxic effects of newly synthesized benzimidazole-based organophosphorus compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87, 23–32.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.007>
- Handratta, V. D., Vasaitis, T. S., Njar, V. C. O., Gediya, L. K., Kataria, R., Chopra, P., Newman, D., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y., & Brodie, A. M. H. (2005). Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: Synthesis, in vitro biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(8), 2972–2984.
<https://doi.org/10.1021/jm040202w>
- Hasanpourghadi, M., Pandurangan, A. K., Karthikeyan, C., Trivedi, P., & Rais Mustafa, M. (2017). Mechanisms of the anti-tumor activity of Methyl 2-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-1 H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate against breast cancer in vitro and in vivo. In *Oncotarget*, 8(17), 28840–28853
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16263>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. In *Endocrine Reviews*, 25(2), 276–308).
<https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>

- Hoeijmakers, J. H. J. (2007). Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(7–8), 460–462.
<https://doi.org/10.1016/J.MAD.2007.05.002>
- Hu, F., & Xia, Y. (2023). Axial Chirality in Alkylidene-Cyclic Molecules. *European Journal of Organic Chemistry*, 26(20).
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202300151>
- Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H., & Vlantis, J. (1960). *Antitumor Principles Derived from Vinca rosea Linn I. Vincalukoblastine and Leurosine.*, 20, 1016–1022
<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/20/7/1016/2375715/crs0200071016.pdf>
- Jordan, M. A. (2002). Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. In *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2(1), 1-17.
 Doi:10.2174/1568011023354290
- Karadayi, F. Z., Yaman, M., Kislak, M. M., Keskus, A. G., Konu, O., & Ates-Alagoz, Z. (2020). Design, synthesis and anticancer/antiestrogenic activities of novel indole-benzimidazoles. *Bioorganic Chemistry*, 100, 103929.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2020.103929>
- Karimi Gofar, M., Kor, N. M., & Kor, Z. M. (2014). DNA intercalators and using them as anticancer drugs. In *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3), 811-822
<http://www.ijabbr.com>
- Karthikeyan, C., Solomon, V. R., Lee, H., & Trivedi, P. (2017). Synthesis and biological evaluation of 2-(phenyl)-3H-benzo[d]imidazole-5-carboxylic acids and its methyl esters as potent anti-breast cancer agents. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1788–1794.
<https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.07.003>
- Khwaja, S., Kumar, K., Das, R., & Negi, A. S. (2021). Microtubule associated proteins as targets for anticancer drug development. *Bioorganic Chemistry*, 116, 105320.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2021.105320>
- Lamorte, L., Titolo, S., Lemke, C. T., Goudreau, N., Mercier, J. F., Wardrop, E., Shah, V. B., Von Schwedler, U. K., Langelier, C., Banik, S. S. R., Aiken, C., Sundquist, W. I., & Mason, S. W. (2013). Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4622–4631.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00985-13>
- Lei, J. H., Ma, L. L., Xian, J. H., Chen, H., Zhou, J. J., Chen, H., Lei, Q., Li, Y. Y., Wang, Y. Y., & Wang, Y. X. (2021). Structural insights into targeting of the colchicine binding site by ELR510444 and parbendazole to achieve rational drug design. *RSC Advances*, 11(31), 18938–18944.
<https://doi.org/10.1039/d1ra01173a>
- Li, W., Shuai, W., Sun, H., Xu, F., Bi, Y., Xu, J., Yao, H., Zhu, Z., & Xu, S. (2019). Design, Synthesis and Biological Evaluation of Quinoline-Indole Derivatives as Anti-Tubulin Agents Targeting the Colchicine Binding Site. *Eur. J. Med. Chem*, 163, 428–442.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.070>
- Li, W., Sun, H., Xu, S., Zhu, Z., & Xu, J. (2017). Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: A perspective of privileged structures. *Future Medicinal Chemistry*, 9(15), 1765–1794.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0100>

- Liang, D., Yu, C., Ma, Z., Yang, X., Li, Z., Dong, X., Qin, X., Du, L., & Li, M. (2022). Identification of anthelmintic parbendazole as a therapeutic molecule for HNSCC through connectivity map-based drug repositioning. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(5), 2429–2442.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.005>
- Mamedov, V. A., & Zhukova, N. A. (2017). Recent Advances in the Synthesis of Benzimidazol-2-ones via Rearrangements. *Progress in Heterocyclic Chemistry*, *29*, 1–43.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102310-5.00001-1>
- McClendon, K., & Osheroff, N. (2007). DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research*, *1*(2), 83–97.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009>
- Mcclurg, U. L., Azizyan, M., Dransfield, D. T., Namdev, N., Chit, N. C. T. H., Nakjang, S., & Robson, C. N. (2018). The novel anti-androgen candidate galeterone targets deubiquitinating enzymes, USP12 and USP46, to control prostate cancer growth and survival. *Oncotarget*, *9*(38), 24992-25007.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.25167>
- Min, R., Wu, W., Wang, M., Tang, L., Chen, D., Zhao, H., Zhang, C., & Jiang, Y. (2019). Discovery of 2-(1-(3-(4-Chloroxyphenyl)-3-oxo-propyl)pyrrolidine-3-yl)-1H-benzo[d]imidazole-4-carboxamide: A Potent Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor for Treatment of Cancer. *Molecules*, *24*(10), 1901.
<https://doi.org/10.3390/molecules24101901>
- Mohareb, R. M., Kamel, M. M., & Milad, Y. R. (2020). uses of β -diketones for the synthesis of novel heterocyclic compounds and their antitumor evaluations. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, *34*(2), 385–405.
<https://doi.org/10.4314/bcse.v34i2.15>
- Na, G. C., & Timasheff, S. N. (1980). Stoichiometry of the Vinblastine-Induced Self-Association of Calf Brain Tubulin1. In *Biochemistry*, *19*(7), 1347-1354.
<https://doi.org/10.1021/bi00548a013>
- Nguyen, T. L., McGrath, C., Hermone, A. R., Burnett, J. C., Zaharevitz, D. W., Day, B. W., Wipf, P., Hamel, E., & Gussio, R. (2005). A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(19), 6107–6116.
<https://doi.org/10.1021/jm050502t>
- Noble, R. L., Beer, C. T., & Cutts, J. H. (1958). Further biological activities of vincalkebostine: an alkaloid isolated from *Vinca rosea*, *Cancer Res.*, *1*, 347–348.
PMID: 13719013
- Nogales, E. (2001). Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *30*, 397-420.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.397>
- Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., & Luduena, R. F. (1995). Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*, *375*, 424–427.
<https://doi.org/10.1038/375424a0>
- Okouneva, T., Azarenko, O., Wilson, L., Littlefield, B. A., & Jordan, M. A. (2008). Inhibition of centromere dynamics by eribulin (E7389) during mitotic metaphase. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(7), 2003–2011.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0095>
- Özbey, S., Kaynak, F. B., Kuş, C., & Göker, H. (2002). 2-(2,4-Dichlorophenyl)-5-fluoro-6-morpholin-4-yl-1 H -benzimidazole monohydrate . *Acta*

- Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 58(10), 1062–1064.
<https://doi.org/10.1107/s1600536802015842>
- Patil, R., Patil, S. A., Beaman, K. D., & Patil, S. A. (2016). Indole Molecules as Inhibitors of Tubulin Polymerization: Potential New Anticancer Agents. *Future Med Chem.*, 8(11), 1291–1316.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0047>
- Pihlajamaa, P., Sahu, B., & Jänne, O. A. (2015). Determinants of receptor- and tissue-specific actions in androgen signaling. In *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Issue 4, pp. 357–384).
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1034>
- Pospíšilová, J. (2019). *Syntéza axiálně chirálních benzimidazolů substituovaných v poloze 7 p-tolylem* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Pospíšilová, J., Heger, T., Kurka, O., Kvasnicová, M., Chládková, A., Nemeč, I., Rárová, L., & Cankař, P. (n.d.). Atropisomeric 1-phenylbenzimidazoles targeting microtubules organization: Influence of axial chirality - unpublished.
- Prota, A. E., Danel, F., Bachmann, F., Bargsten, K., Buey, R. M., Pohlmann, J., Reinelt, S., Lane, H., & Steinmetz, M. O. (2014). The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *Journal of Molecular Biology*, 426(8), 1848–1860.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.005>
- Pryor, D. E., O’Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J. F., Wang, Y., Wang, Y., Kabaki, M., Jung, M. K., Andreu, J. M., Ghosh, A. K., Giannakakou, P., & Hamel, E. (2002). The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry*, 41(29), 9109–9115.
<https://doi.org/10.1021/bi020211b>
- Refaat, M. M., Hashash, J. G., & Shalaby, A. A. (2010). Late perforation by cardiac implantable electronic device leads: Clinical presentation, diagnostic clues, and management. In *Clinical Cardiology* 33,(8),466–475).
<https://doi.org/10.1002/clc.20803>
- Ren, Y., Wang, Y., Li, G., Zhang, Z., Ma, L., Cheng, B., & Chen, J. (2021). Discovery of Novel Benzimidazole and Indazole Analogues as Tubulin Polymerization Inhibitors with Potent Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(8), 4498–4515.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01837>
- Ricciardelli, C., Bianco-Miotto, T., Jindal, S., Butler, L. M., Leung, S., McNeil, C. M., O’Toole, S. A., Ebrahimie, E., Millar, E. K. A., Sakko, A. J., Ruiz, A. I., Vowler, S. L., Huntsman, D. G., Birrell, S. N., Sutherland, R. L., Palmieri, C., Hickey, T. E., & Tilley, W. D. (2018). The magnitude of androgen receptor positivity in breast cancer is critical for reliable prediction of disease outcome. *Clinical Cancer Research*, 24(10), 2328–2341.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1199>
- Rowinsky, E., Chaudhry, V., Arbuck, S., & Donehower, R. (1993). Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*, 20 (4), 1-15.
<https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/clinical-toxicities-encountered-with-paclitaxel-taxol-5>
- Saha, P., Ramana, T., Purkait, N., Ali, M. A., Paul, R., & Punniyamurthy, T. (2009). Ligand-free copper-catalyzed synthesis of substituted benzimidazoles, 2-aminobenzimidazoles, 2-aminobenzothiazoles, and benzoxazoles. *Journal of Organic Chemistry*, 74(22), 8719–8725.

- <https://doi.org/10.1021/jo901813g>
Schayowitz, A., Sabnis, G., Njar, V. C. O., & Brodie, A. M. H. (2008). Synergistic effect of a novel antiandrogen, VN/124-1, and signal transduction inhibitors in prostate cancer progression to hormone independence in vitro. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(1), 121–132.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0581>
- Schneider, E., Hsiang, Y. H., & Liu, L. F. (1990). DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets. *Advances in Pharmacology*, 21(C), 149–183.
[https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60342-7](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60342-7)
- Sept, D. (2007). Microtubule Polymerization: One Step at a Time. *Current Biology*, 17(17), 764–766.
<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.07.002>
- Shimomura, I., Yokoi, A., Kohama, I., Kumazaki, M., Tada, Y., Tatsumi, K., Ochiya, T., & Yamamoto, Y. (2019). Drug library screen reveals benzimidazole derivatives as selective cytotoxic agents for KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Letters*, 451, 11–22.
<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.03.002>
- Singh, P. K., & Silakari, O. (2018). Benzimidazole: Journey From Single Targeting to Multitargeting Molecule. *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules*, 31–52.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102083-8.00002-9>
- Skoufias, D. A., & Wilson, L. (1992). 700-707. Mechanism of Inhibition of Microtubule Polymerization by Colchicine: Inhibitory Potencies of Unliganded Colchicine and Tubulin-Colchicine Complexes1. In *Amu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*, 31(3), 738-746.
<https://doi.org/10.1021/bi00118a015>
- Soni, A., Khurana, P., Singh, T., & Jayaram, B. (2017). A DNA intercalation methodology for an efficient prediction of ligand binding pose and energetics. *Bioinformatics*, 33(10), 1488–1496.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx006>
- Starčević, K., Kralj, M., Ester, K., Sabol, I., Grce, M., Pavelić, K., & Karminski-Zamola, G. (2007). Synthesis, antiviral and antitumor activity of 2-substituted-5-amidino-benzimidazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(13), 4419–4426.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.04.032>
- Svobodová, D. (2009). *Chiralita a její význam v enviromentální organické analýze* [Bakalářská práce]. Vysoké učení technické v Brně.
- Thirumal Kumar, D., Mendonca, E., Priyadharshini Christy, J., George Priya Doss, C., & Zayed, H. (2019). A computational model to predict the structural and functional consequences of missense mutations in O6-methylguanine DNA methyltransferase. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 115, 351–369.
<https://doi.org/10.1016/BS.APCSB.2018.11.006>
- Tonelli, M., Novelli, F., Tasso, B., Vazzana, I., Sparatore, A., Boido, V., Sparatore, F., La Colla, P., Sanna, G., Giliberti, G., Busonera, B., Farci, P., Ibba, C., & Loddo, R. (2014). Antiviral activity of benzimidazole derivatives. III. Novel anti-CVB-5, anti-RSV and anti-Sb-1 agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(17), 4893–4909.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.043>
- Tong, Y., Bouska, J. J., Ellis, P. A., Johnson, E. F., Levenson, J., Liu, X., Marcotte, P. A., Olson, A. M., Osterling, D. J., Przytulinska, M., Rodriguez, L. E., Shi, Y., Soni, N.,

- Stavropoulos, J., Thomas, S., Donawho, C. K., Frost, D. J., Luo, Y., Giranda, V. L., & Penning, T. D. (2009). Synthesis and evaluation of a new generation of orally efficacious benzimidazole-based poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors as anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(21), 6803–6813.
<https://doi.org/10.1021/jm900697r>
- Trudel, S., Li, Z. H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C., & Stewart, A. K. (2005). CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood*, 105(7), 2941–2948.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-10-3913>
- Wickstead, B., & Gull, K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. In *Journal of Cell Biology*, 194(4), 513–525.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201102065>
- Wilson, L., & Jordan, M. A. (1995). Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chemistry & Biology*, 2(9), 569–573.
[https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90119-1](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90119-1)
- Wong, K. R., Nelson, L. A., Elliott, E. S. R., Liu, Y., Sommi, R. W., & Winans, E. A. (2016). Utilization of antipsychotic therapeutic drug monitoring at a state psychiatric hospital. *Mental Health Clinician*, 6(1), 1–7.
<https://doi.org/10.9740/mhc.2016.01.001>
- Yvon, A.-M. C., Wadsworth, P., & Jordan, M. A. (1999). Taxol Suppresses Dynamics of Individual Microtubules in Living Human Tumor Cells. In *Molecular Biology of the Cell*, 10(4), 947-959.
<https://www.molbiolcell.org/doi/pdf/10.1091/mbc.10.4.947>
- Želazková, J. (2008). *Nové inhibitory polymerace tubulinu. [Bakalářská práce]*. Masarykova univerzita v Brně.
- Zhao, S., Fang, T., Yao, L., Zheng, Y., Zhang, L., & Zhu, K. (2020). The efficacy and adverse effects of PARP inhibitor combined with chemotherapy compared with chemotherapy alone in the treatment of cancer patient: A protocol for systematic review. *Medicine (United States)*, 99(45), e23040.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023040>

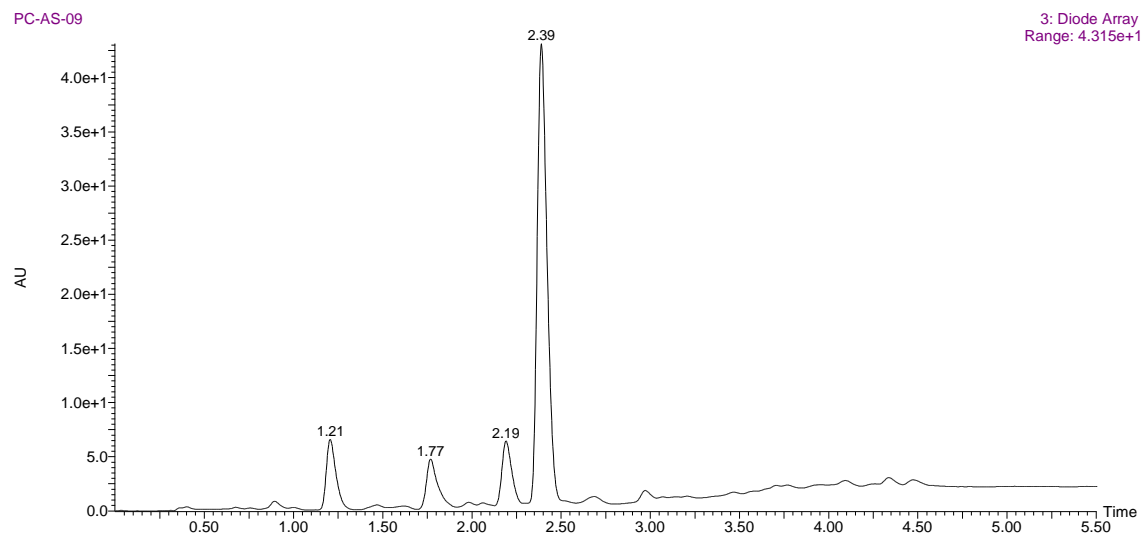
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BAL27862	Avanbulin
BJ	fibroblasty z kůže
BubR1	buddin inhibited by benzimidazole-related 1
CBS	kolchicinové vazebné místo
CCRF-CEM	lidské T-lymfoblasty izolované z periferní krve ženy
CDK2	cyklin-dependentní kináza 2
CYP17	cytochrom 17 (lyáza)
Cys β 241	cystein na pozici β 241
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Eol-1	buňky eosinofilní leukémie
G2	fáze buněčného cyklu končící mitózou
G361	buněčná linie izolována z epitelu kůže
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
HeLa	buněčná linie izolovaná z epitelu karcinomu děložního hrdla
HNSCC	skvamózní karcinom hlavy a krku
HPLC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HS0578T	buněčná linie karcinomu prsu
IC ₅₀	poloviční maximální inhibiční koncentrace
K562	lymfoblastické buňky izolované z kostní dřene
KOH	hydroxid draselný
MBC	minimální bakteriální koncentrace
MBIC	inhibitor mikrotubulů
MCF-7	buněčná linie izolována z karcinomu prsu

MDA-MB-231	buňka izolována z epitelu prsní žlázy (adenokarcinom)
MDA-MB-436	buňka izolována z epitelu prsní žlázy (adenokarcinom)
MDA-MB-453	buňka izolována z epitelu prsní žlázy
MTA	činidla cílená na mikrotubuly
MV4-11	makrofágy izolované z blastových buněk
NH ₂	amino skupina
nM	nanomolární (koncentrace)
nm	nanometr (délka)
NMR	nukleární magnetická resonance
PARP	poly (ADP-ribóza)polymeráza
pH	vodíkový exponent
<i>p</i> TSA	<i>para</i> -toluensulfonová kyselina
RPE-1	pigmentovvé epiteliální buňky
RVO	rotační vakuová odparka
SAR	structure-activity relationship (vztah mezi strukturou a aktivitou)
SKBr3	rakovinné buňky izolované z pleurálního výpotku
Thr179	threonin na pozici 179 v proteinu
TIBI	4,5,6,7 -tetrajodobenzimidazol
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Topo- I	topoizomeráza I
Topo II	topoizomeráza II
USP12	ubiquitin specifická peptidáza 12 (odstraňuje ubiquitin z proteinů)
USP46	ubiquitin specifická peptidáza 46 (odstraňuje ubiquitin z proteinů)
Val181	valin na pozici 181 v proteinu
ZR-75-10	buněčná linie izolovaná z mléčné žlázy

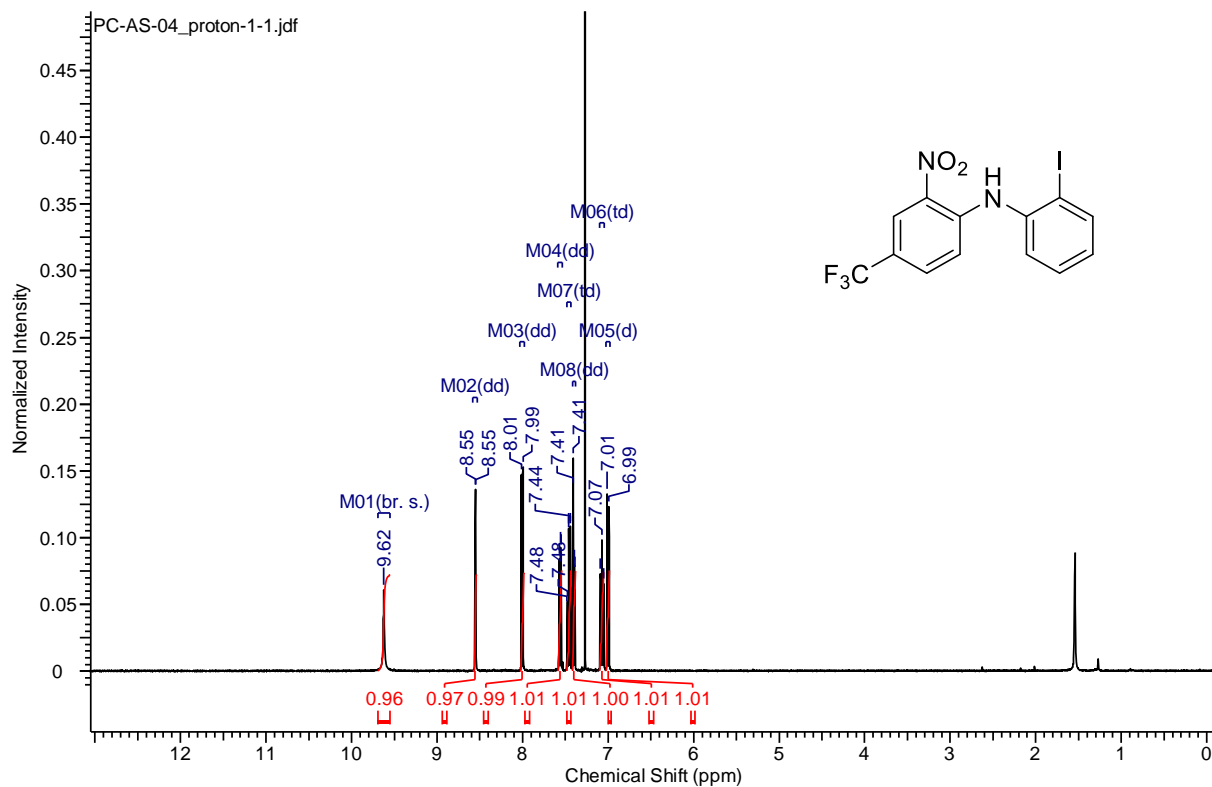
8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha I: HPLC redukce železem

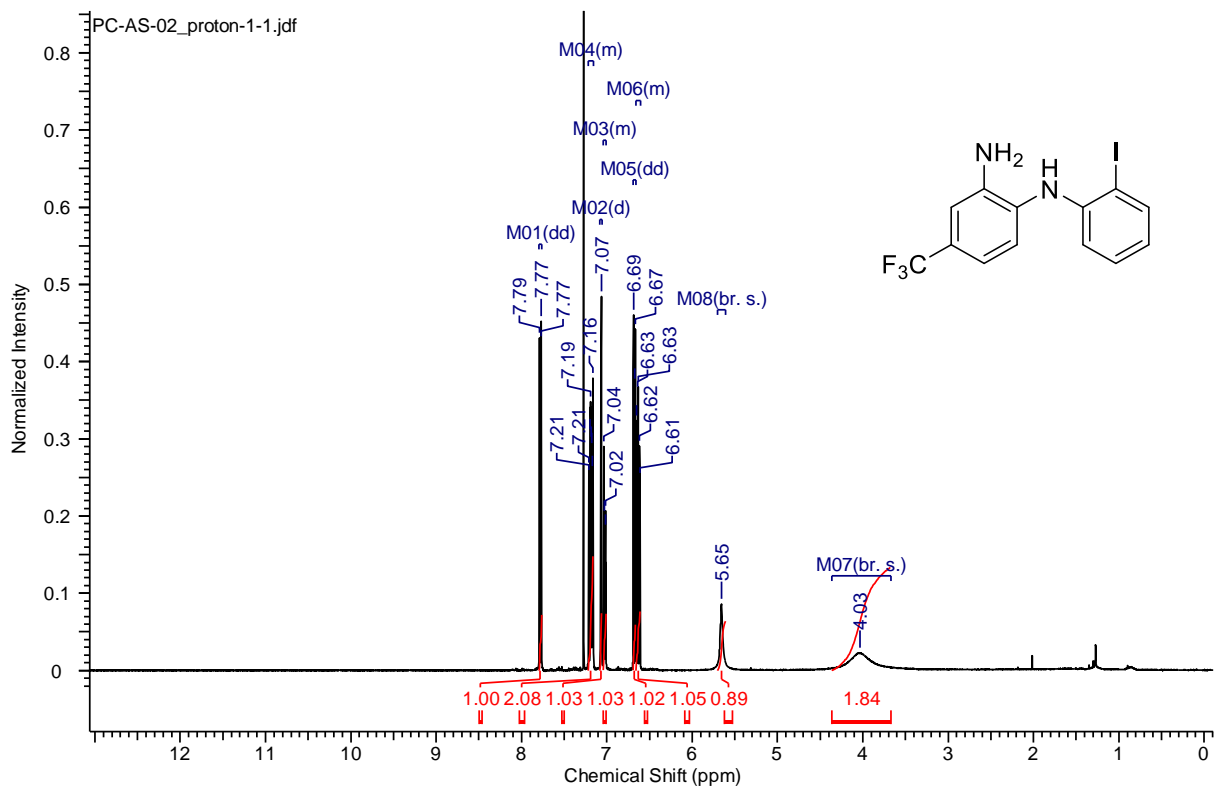


8.2 Příloha II: NMR spektra

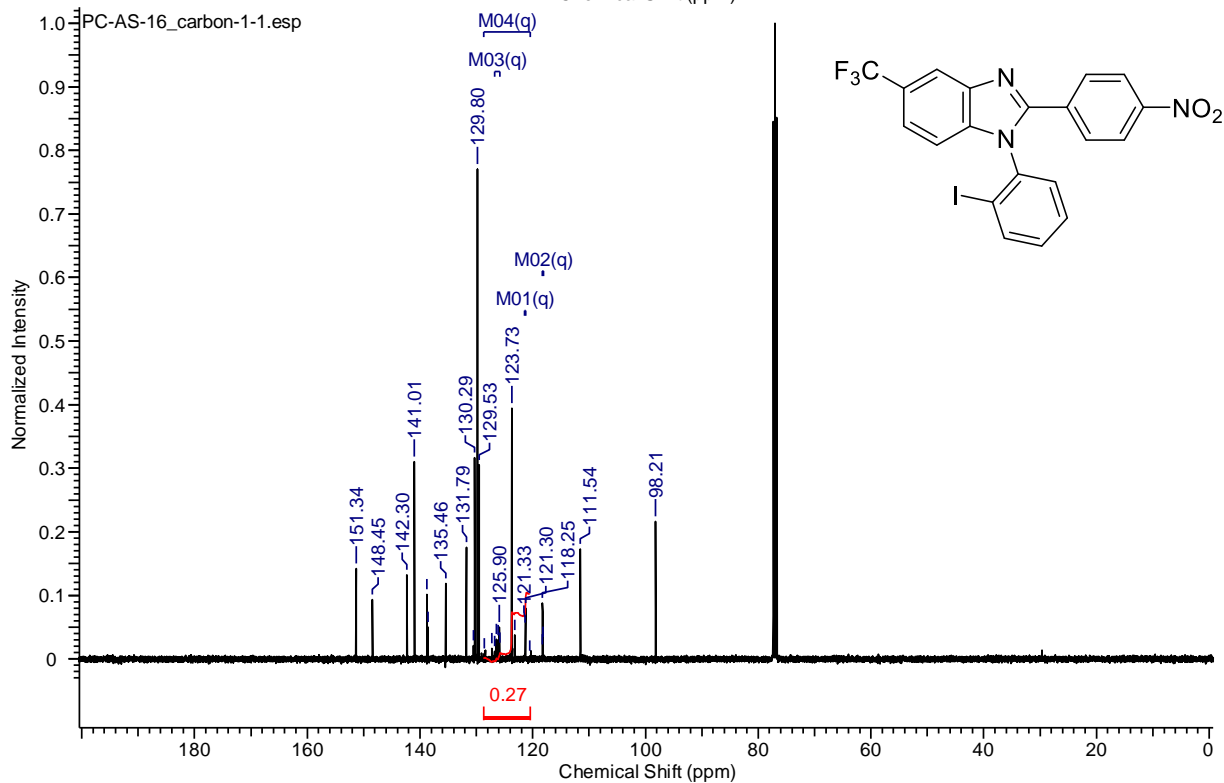
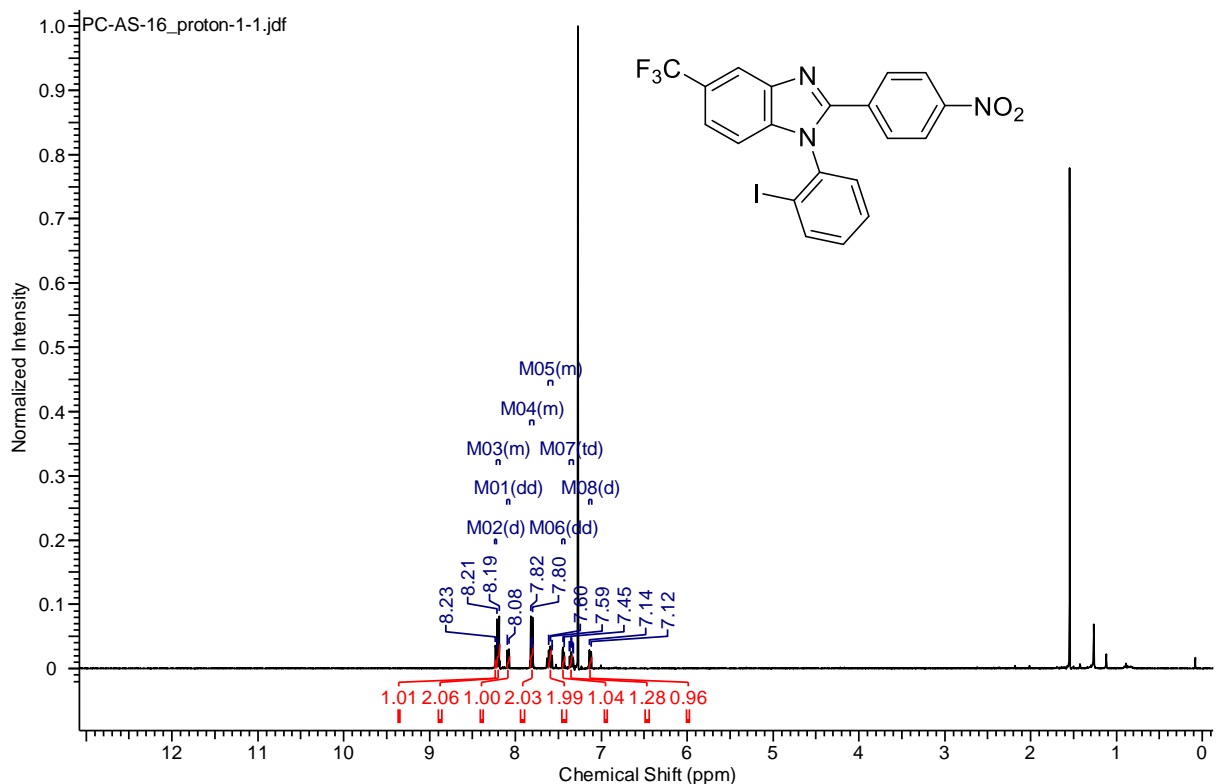
^1H NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) *N*-(2-jodofenyl)-2-nitro-4-(trifluormethyl)anilinu (III)



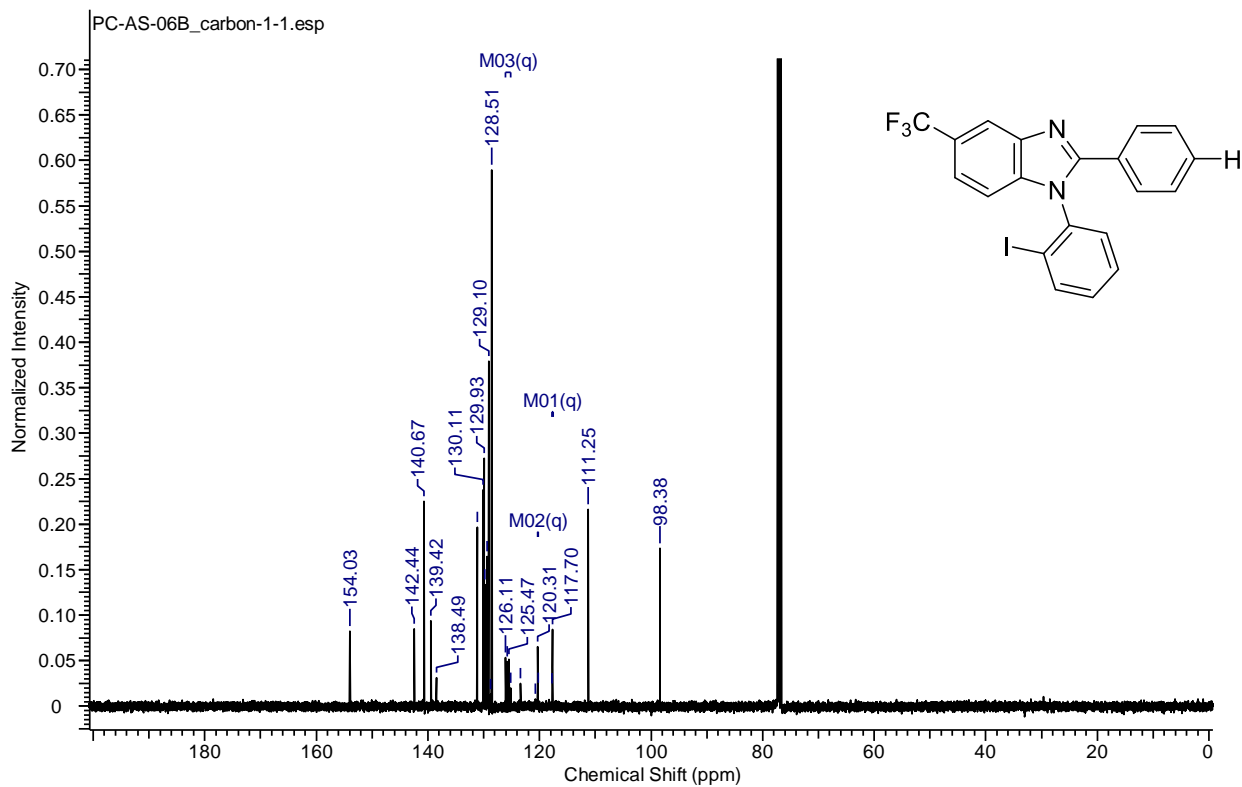
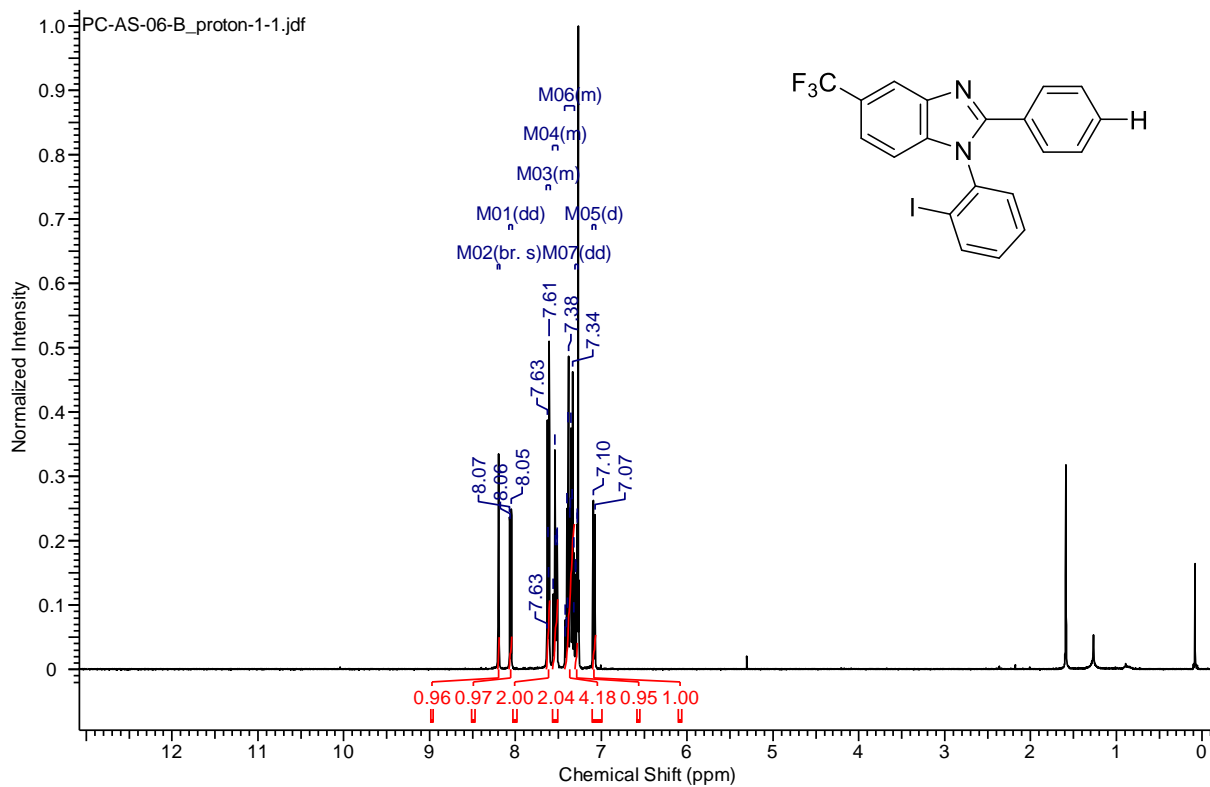
¹H NMR spektra (CHLOROFORM-d) *N*^l-(2-jodofenyl)-4-(trifluormethyl)benzen-1,2-diaminu (IV)



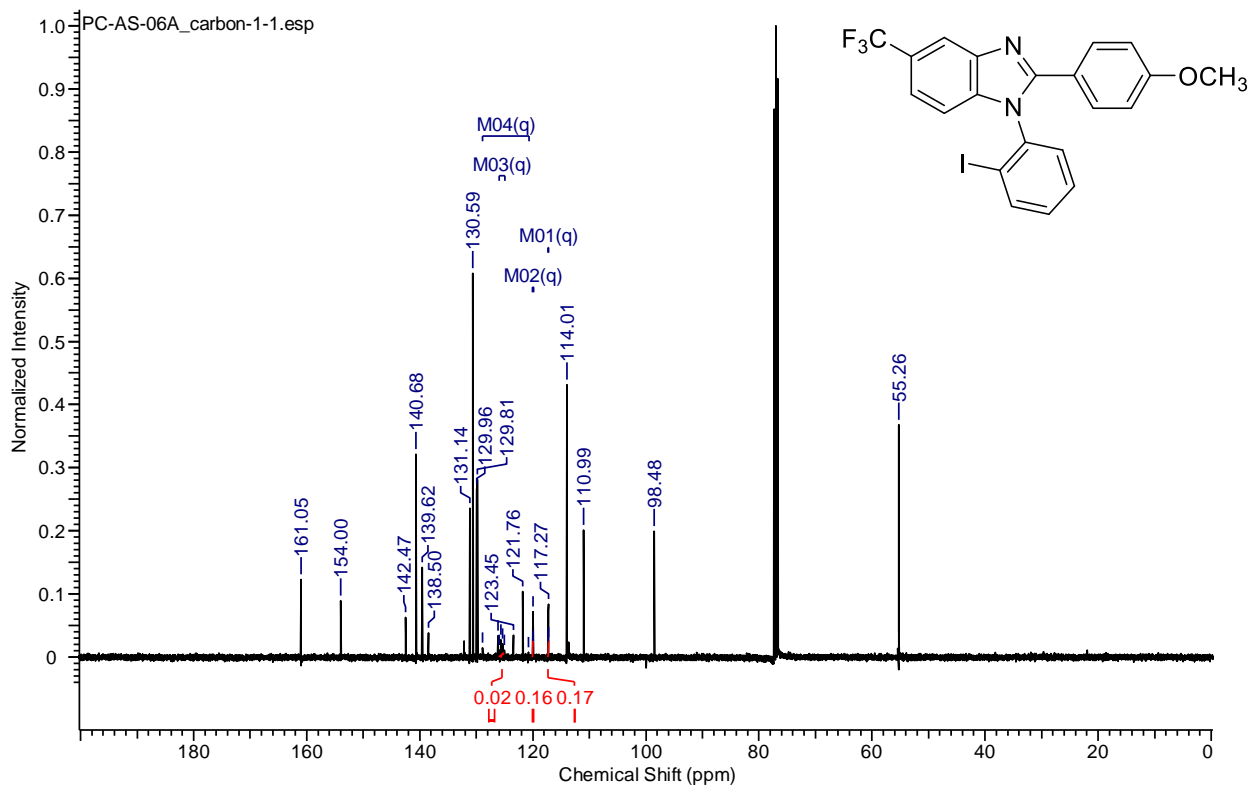
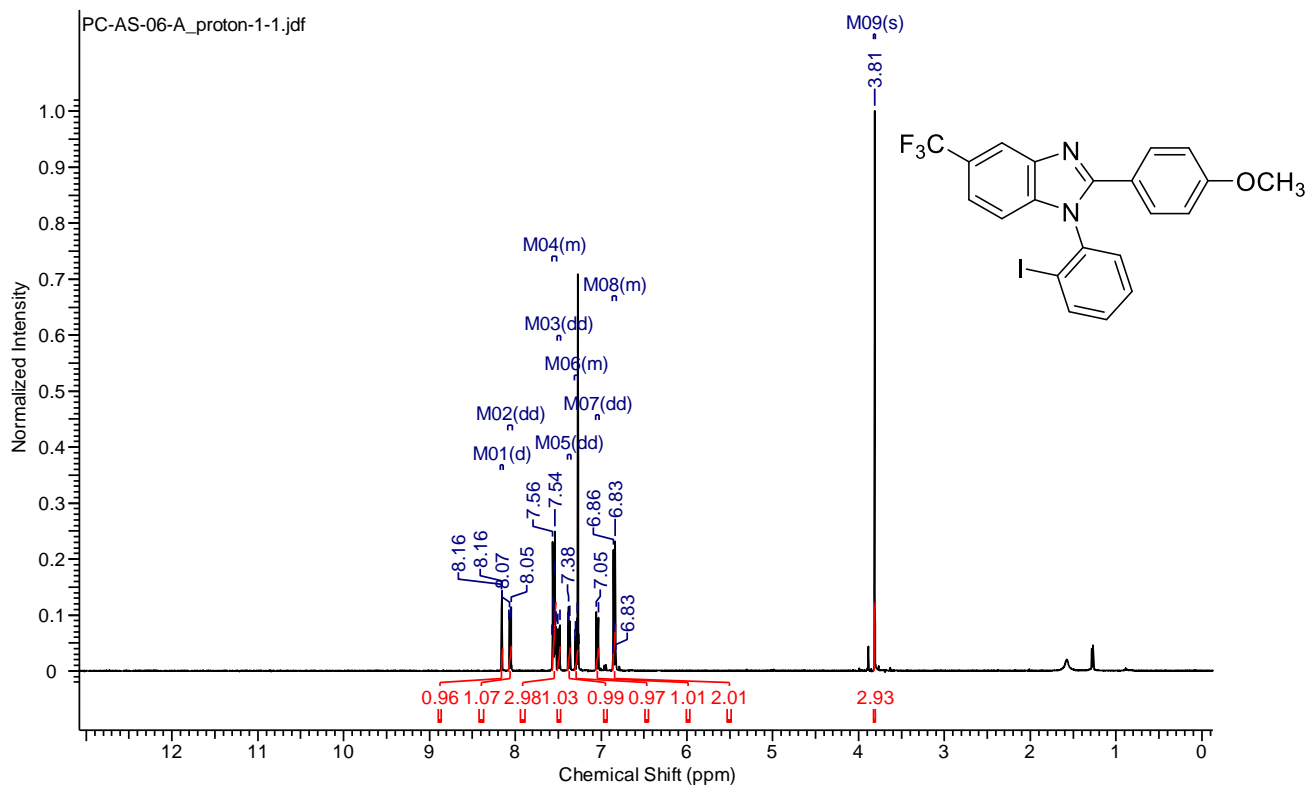
¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 1-(2-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu (Va)



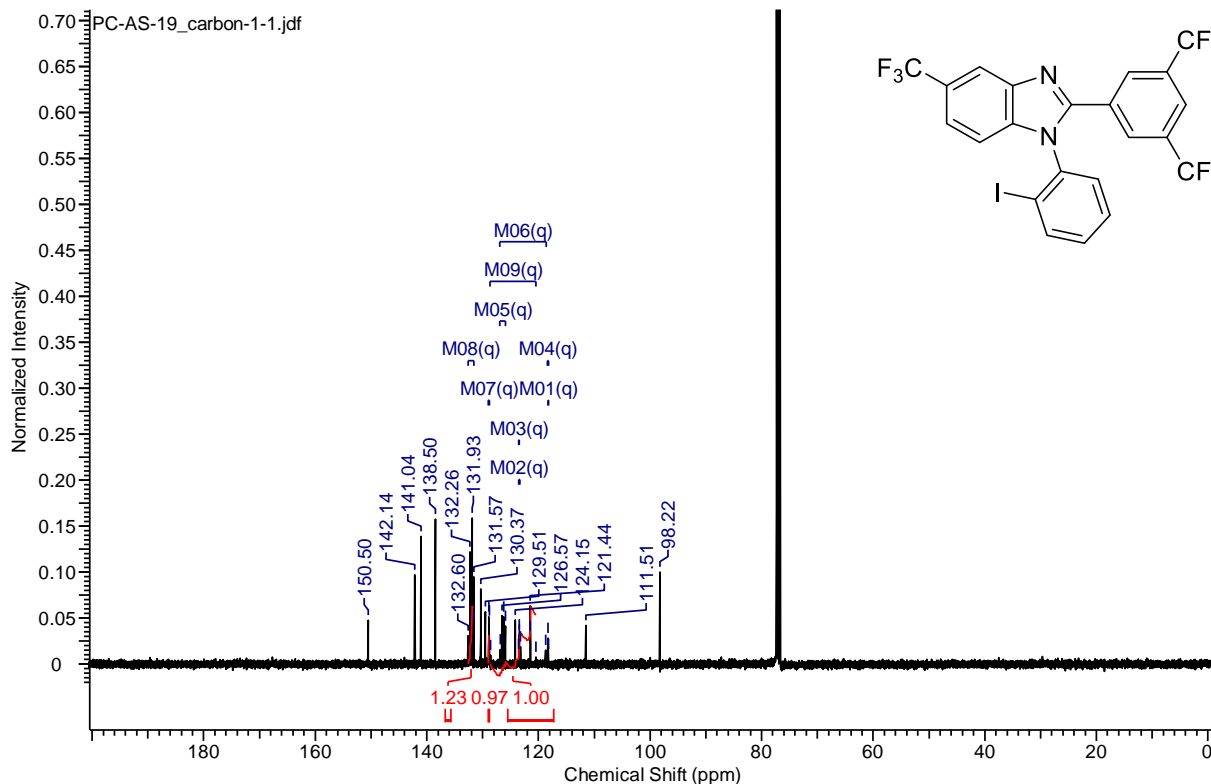
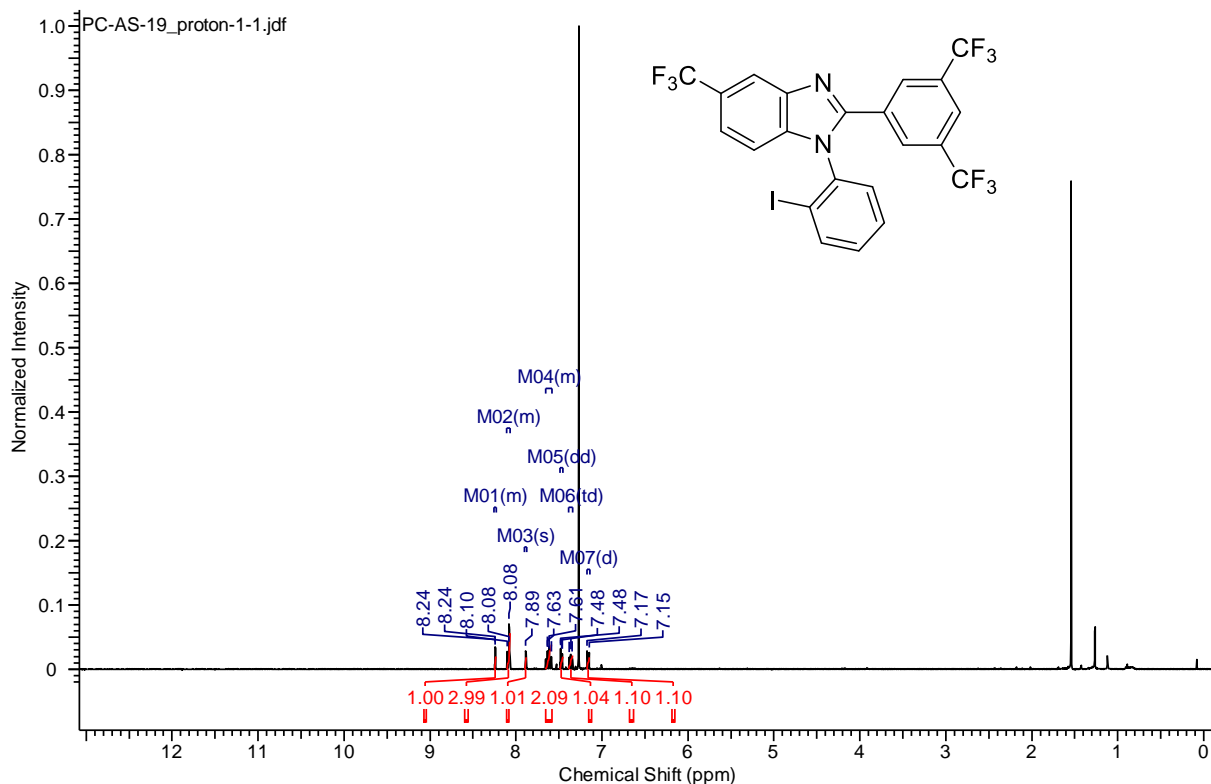
¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 1-(2-jodofenyl)-2-fenyl-5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (Vb)



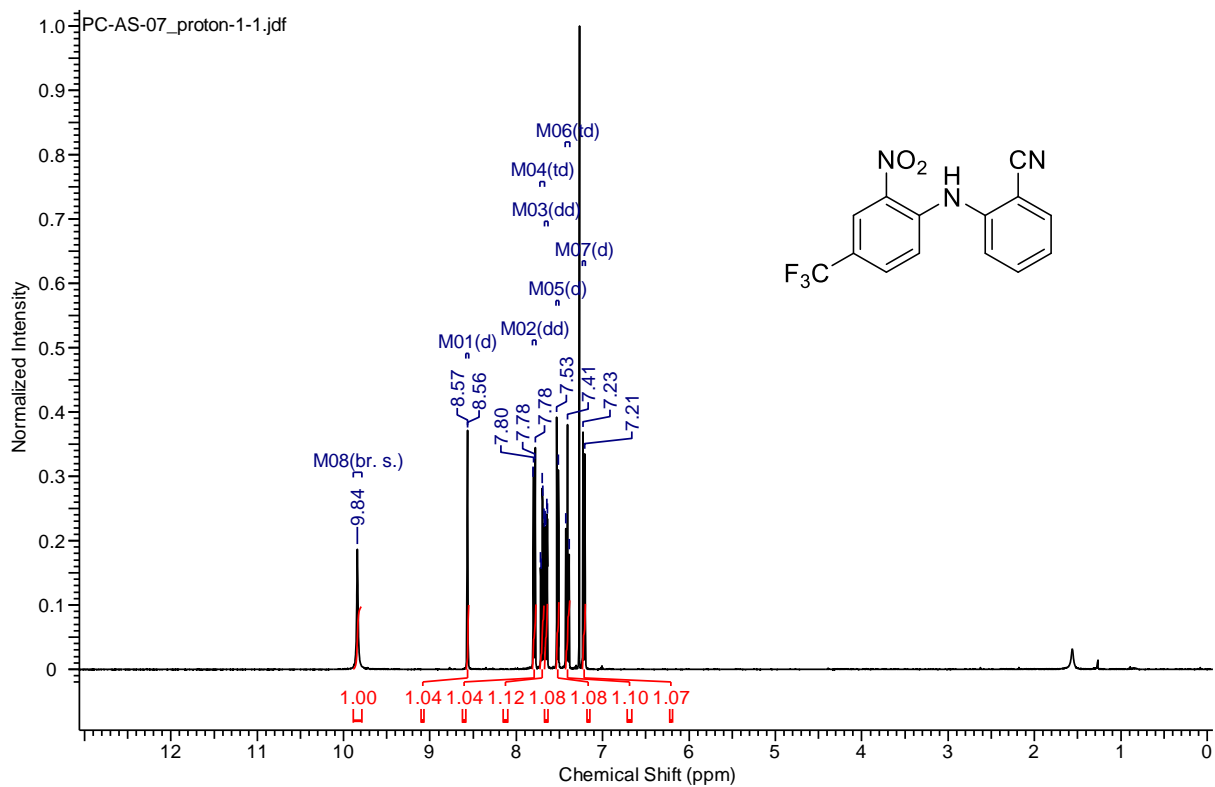
¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 1-(2-jodofenyl)-2-(4-metoksyfenyl)-5-(trifluorometyl)-1H-benzo[*d*]imidazolu (Vc)



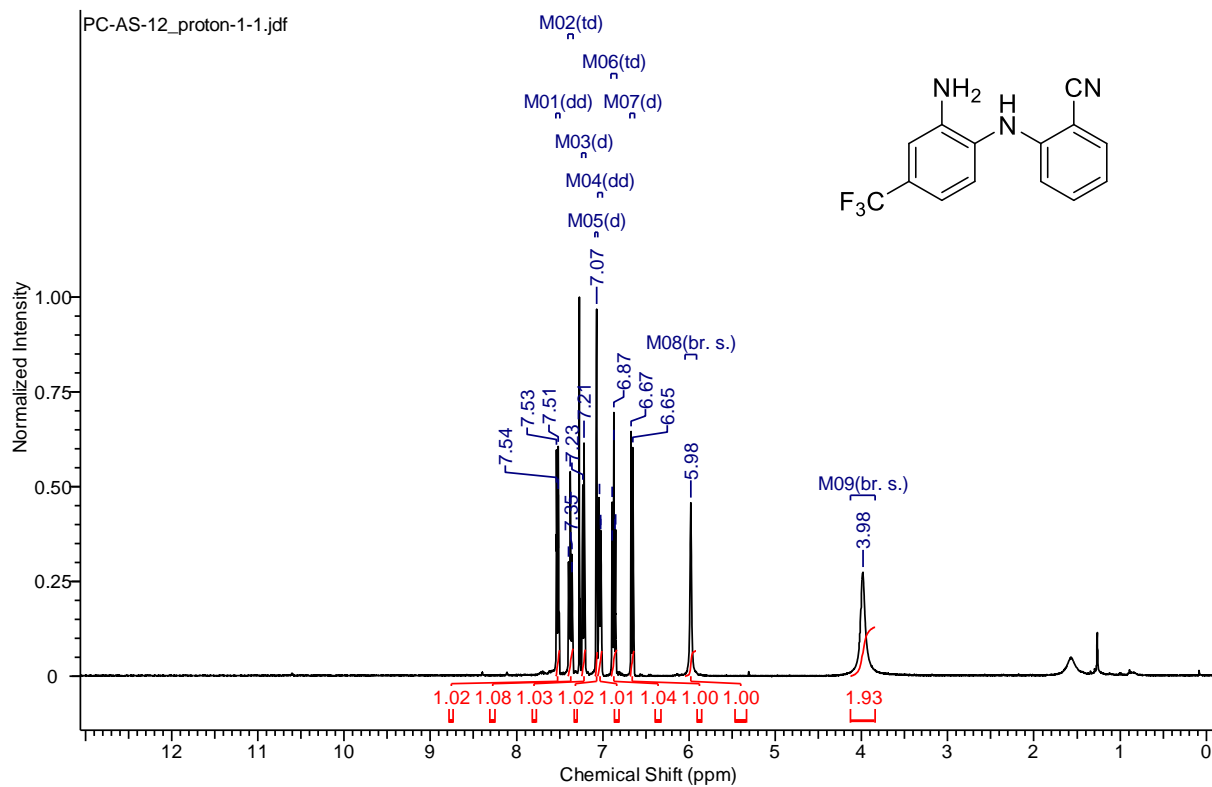
¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-(3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl)-1-(2-jodofenyl)-5-(trifluoromethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu (Vd)



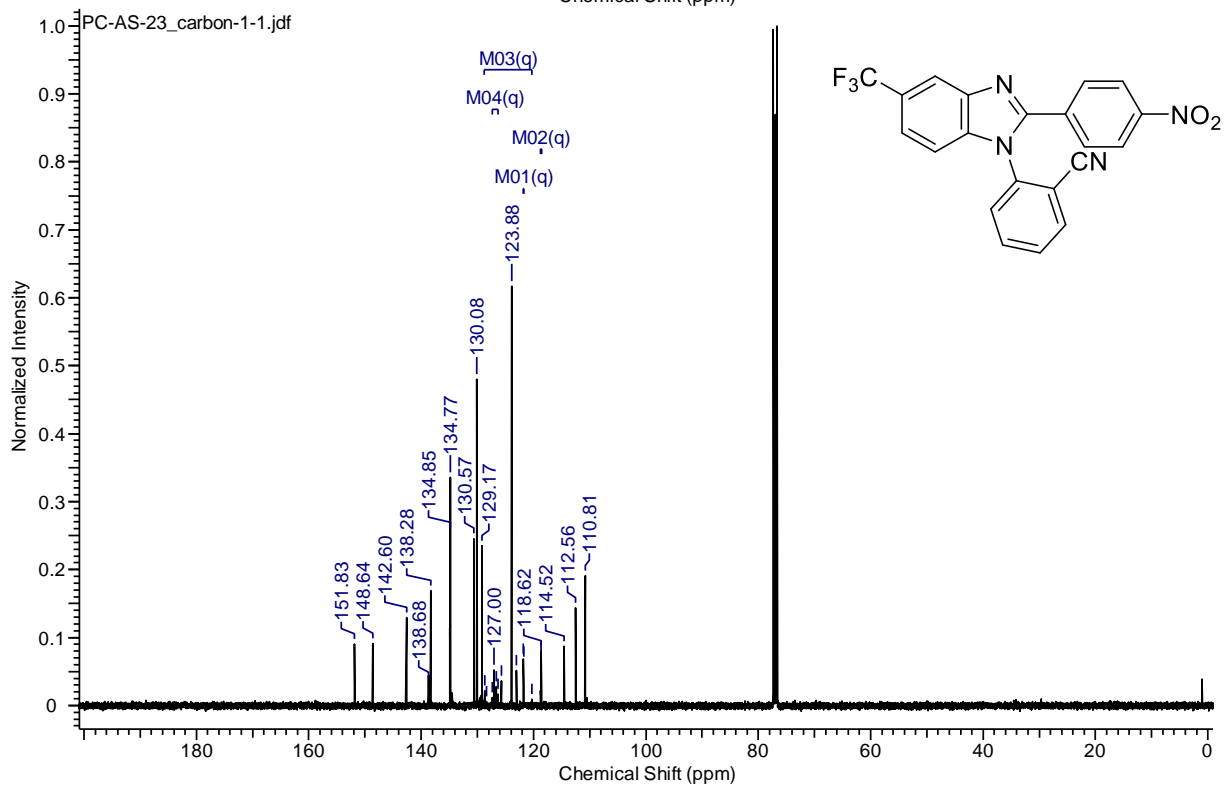
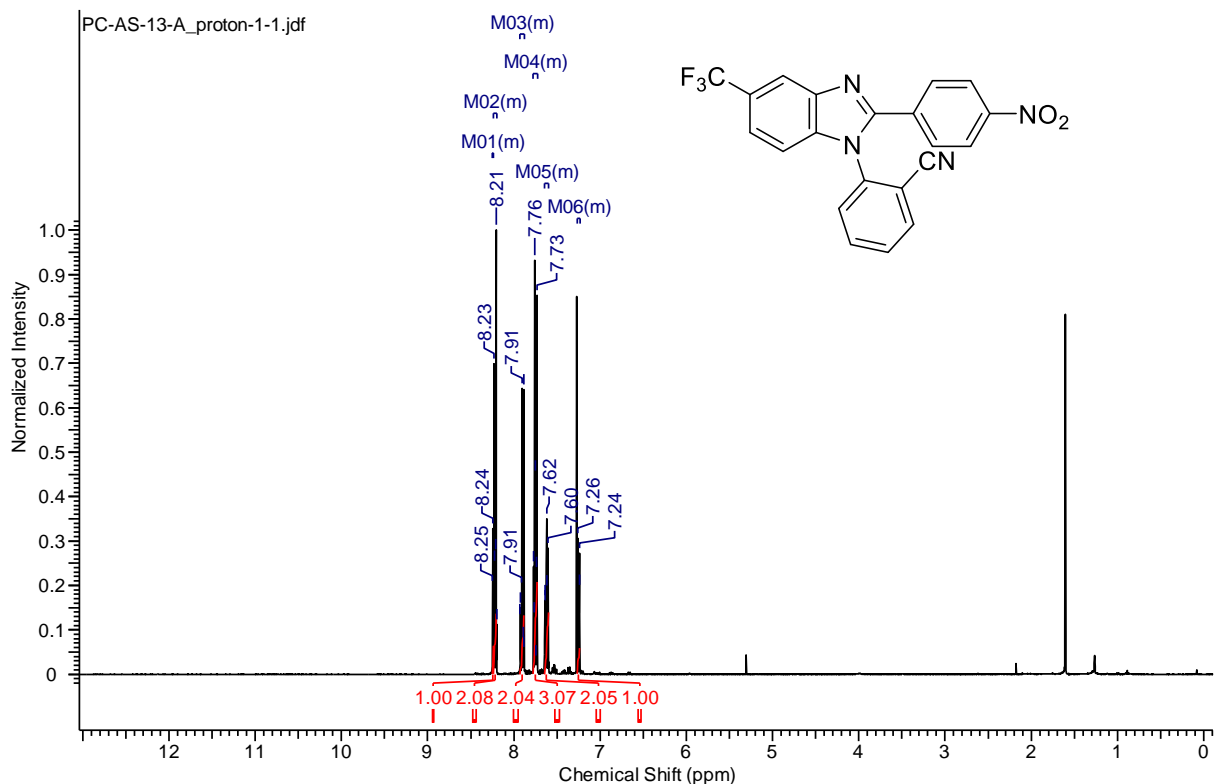
¹H NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-((2-nitro-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitrilu (VIII)



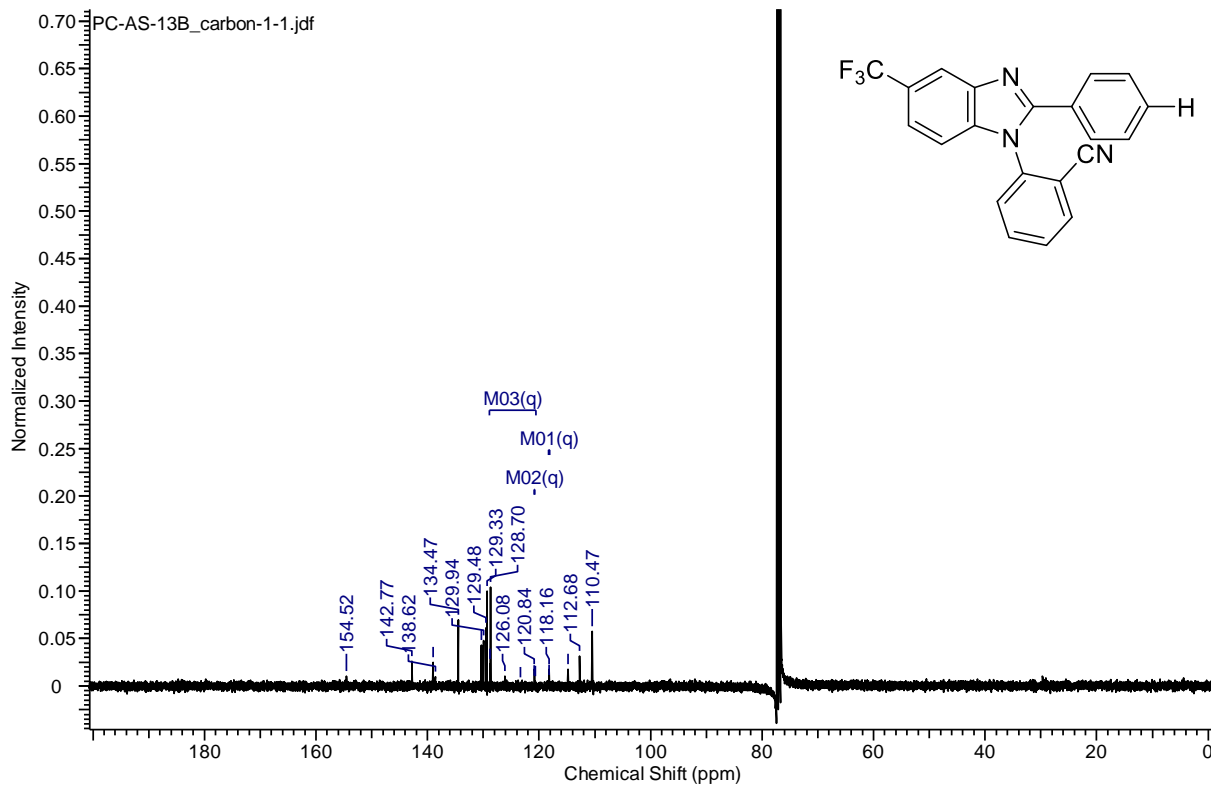
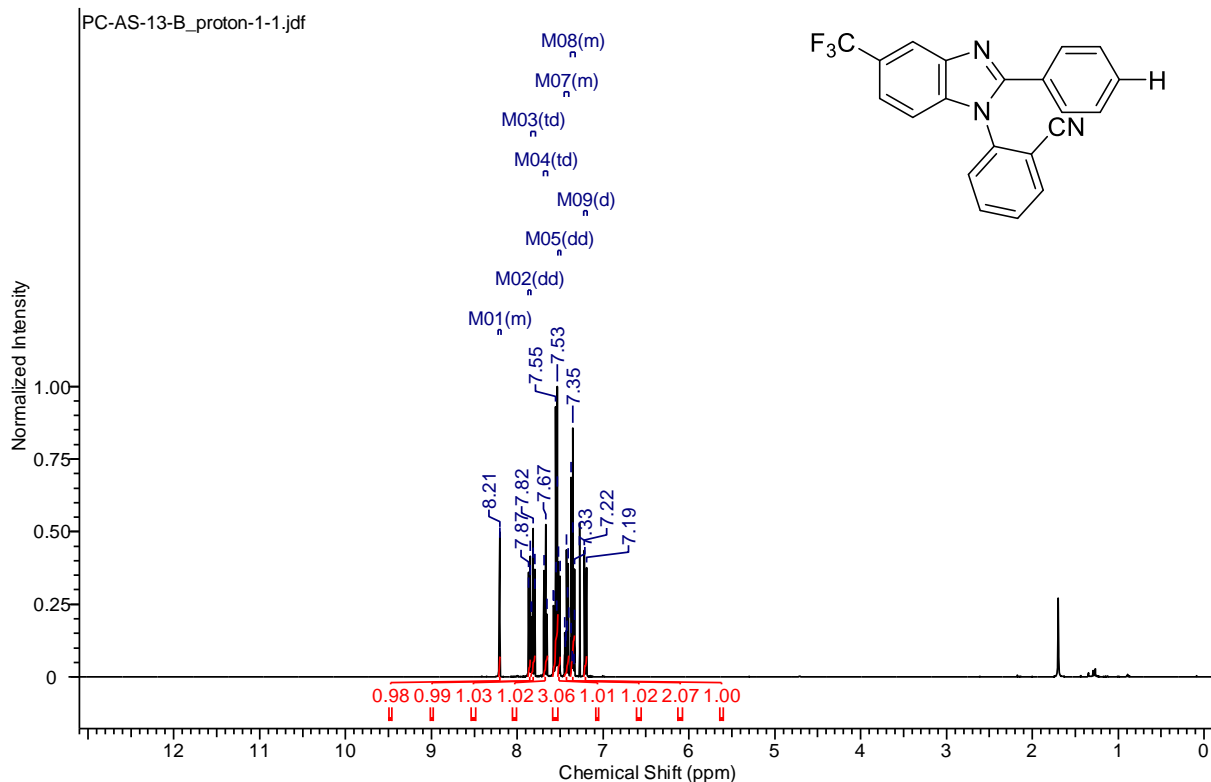
¹H NMR spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-((2-amino-4-(trifluormethyl)fenyl)amino)benzonitrilu (IX)



¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-(2-(4-nitrofenyl)-5-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)benzonitrilu (Xe)



¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-(2-phenyl-5-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)benzonitrilu (Xf)



¹H NMR a ¹³C spektra (CHLOROFORM-*d*) 2-(2-(4-methoxyfenyl)-5-(trifluormethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)benzonitrilu (Xg)

