

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Příprava derivátů L-4-methylglutamové kyseliny

Bakalářská práce

2024

David Doležal

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Synthesis of derivatives of L-4-methylglutamic acid

Bachelor thesis

2024

David Doležal

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **David Doležal**
Osobní číslo: **C21022**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Příprava derivátů L-4-methylglutamové kyseliny**
Téma práce anglicky: **Synthesis of L-4-methylglutamic acid derivatives**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši týkající se přípravy a biologických vlastností derivátů kyseliny glutamové substituované v pozici 4-alkylovou skupinou.
2. Připravte vhodné deriváty L-4-methylglutamové kyseliny. Jako výchozí sloučeninu použijte L-pyroglytamovou kyselinu.
3. Připravené sloučeniny charakterizujte pomocí dostupných analytických metod.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **doporučený rozsah 40 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Pavel Drabina, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **29. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem *Příprava derivátů L-4-methylglutamové kyseliny* jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

David Doležal v. r.

Rád bych poděkoval zejména vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Drabinovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a přátelský přístup během zpracování experimentální a teoretické části této práce. Děkuji také své rodině, která mě během celého studia velmi podporovala.

ANOTACE

Tato bakalářská práce pojednává o biochemickém významu a metabolismu glutaminu a možnostech využití derivátů glutaminu v protinádorové terapii. V syntetické části práce byl z výchozí L-pyroglutamové kyseliny připraven derivát (2*S*,4*S*)-4-methylglutaminu – (2*S*,4*S*)-*N*-4-fluorbenzyl-4-methyl-L-glutamin. Reakční sekvence zahrnovala celkem sedm reakčních kroků. Finální glutaminový derivát a jednotlivé meziprodukty byly charakterizovány dostupnými analytickými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glutamin; Aminokyseliny; Metabolismus glutaminu; Transportéry glutaminu; Cytotoxicita; Nádor prsu

ANNOTATION

This bachelor's work deals with the biochemical aspects and metabolism of glutamine and the application of glutamine derivatives in anticancer therapy. In the synthetic part of the work, (2*S*,4*S*)-*N*-4-fluorobenzyl-4-methyl-L-glutamine – the representative derivative of (2*S*,4*S*)-4-methyl-L-glutamine was prepared from L-pyroglutamic acid by a seven-step synthesis. The obtained glutamine derivative and individual intermediates were characterised by available analytical methods.

KEYWORDS

Glutamine; Aminoacids; Metabolism of glutamine; Glutamine transporters; Cytotoxicity; Breast cancer

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	10
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	12
1. ÚVOD A TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1. GLUTAMIN – OBECNÁ CHARAKTERISTIKA	13
1.2. ZMĚNY V METABOLISMU NÁDOROVÝCH BUNĚK	15
1.3. VÝZNAM GLUTAMINU PRO NÁDOROVÉ BUŇKY	16
1.4. GLUTAMINOVÁ ZÁVISLOST PŘI NÁDOROVÉM BUJENÍ	18
1.5. VYUŽITÍ METABOLISMU GLUTAMINU PŘI LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	19
1.6. TRANSPORTÉRY GLUTAMINU A JEJICH ZAPOJENÍ DO TERAPIE RAKOVINY PRSU	22
1.7. AMIDY L-4-METYLENGLUTAMOVÉ KYSELINY JAKO INHIBITORY GLUTAMINOVÝCH TRANSPORTÉRŮ	24
1.8. AMIDY L-4-METHYLGLUTAMOVÉ KYSELINY JAKO INHIBITORY RŮSTU NÁDOROVÝCH BUNĚK	29
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2.1. OBECNÉ POSTUPY A POUŽITÁ PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA	32
2.2. PŘÍPRAVA (S)-TERC-BUTYL-PYROGLUTAMÁTU (2)	33
2.3. PŘÍPRAVA (S)-TERC-BUTYL-N-TERC-BUTOXYKARBONYLPYROGLUTAMÁTU (3)	34
2.4. PŘÍPRAVA (S)-TERC-BUTYL-N-(TERC-BUTOXYKARBONYL)-4-(DIMETHYLAMINOMETHYLEN)PYROGLUTAMÁTU (9)	35
2.5. PŘÍPRAVA (2S,4S)-TERC-BUTYL-N-(TERC-BUTOXYKARBONYL)-4-METHYLPYROGLUTAMÁTU (10)	36
2.6. PŘÍPRAVA (2S,4S)-5-(TERC-BUTOXY)-4-(TERC-BUTOXYKARBONYLAMINO)-2-METHYL-5-OXOPENTANOVÉ KYSELINY (11)	37
2.7. PŘÍPRAVA (2S,4S)-TERC-BUTYL-2-(TERC-BUTOXYKARBONYLAMINO)-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOÁTU (12)	38
2.8. PŘÍPRAVA TRIFLUOACETÁTU (2S,4S)-2-AMINO-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOVÉ KYSELINY (13)	39
2.9. PŘÍPRAVA HYDROCHLORIDU (2S,4S)-2-AMINO-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOVÉ KYSELINY (14)	40
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
ZÁVĚR	52
LITERATURA	54
4. PŘÍLOHA	61
4.1. (S)-TERC-BUTYL-PYROGLUTAMÁT (2) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	61
4.2. (S)-TERC-BUTYL-N-TERC-BUTOXYKARBONYLPYROGLUTAMÁT (3) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	62
4.3. (S)-TERC-BUTYL-N-(TERC-BUTOXYKARBONYL)-4-(DIMETHYLAMINOMETHYLEN)PYROGLUTAMÁTU (9) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	63
4.4. (2S,4S)-TERC-BUTYL-N-(TERC-BUTOXYKARBONYL)-4-METHYLPYROGLUTAMÁT (10) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	64

4.5.	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-5-(<i>TERC</i> -BUTOXY)-4-(<i>TERC</i> -BUTOXYKARBONYLAMINO)-2-METHYL-5-OXOPENTANOVÁ KYSELINA (11) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	65
4.6.	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-5-(<i>TERC</i> -BUTOXY)-4-(<i>TERC</i> -BUTOXYKARBONYLAMINO)-2-METHYL-5-OXOPENTANOVÁ KYSELINA (11) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA PŘI 50 °C)	66
4.7.	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)- <i>TERC</i> -BUTYL-2-(<i>TERC</i> -BUTOXYKARBONYLAMINO)-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOÁT (12) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	67
4.8.	TRIFLUORACETÁT (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-AMINO-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOVÉ KYSELINY (13) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	68
4.9.	HYDROCHLORID (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-AMINO-4-(4-FLUORBENZYLKARBAMOYL)PENTANOVÉ KYSELINY (14) (¹ H A ¹³ C NMR SPEKTRA)	69

SEZNAM ZKRATEK

AATs	transportéry aminokyselin
AcOH	kyselina octová
ACS	system přenašečů aminokyselin
AKT	<i>proteinkinasa B</i>
ATP	adenosintrifosfát
BPTES	bis-2-(5-fenylacetamido-1,2,4-thiazidol-2-yl)ethyl sulfid
CPT1	<i>karnitinpalmitoyltransferasa 1</i>
CPT2	<i>karnitinpalmitoyltransferasa 2</i>
CYP53	cytochrom P53
DCM	dichlormethan
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucin
FDA	Food and Drug Administration
GDH	<i>glutamátdehydrogenasa</i>
Gln	glutamin
GLS	<i>glutaminasa</i>
GLS1 (KGA)	renální <i>glutaminasa</i>
GLS2 (LGA)	hepatická <i>glutaminasa</i>
GMD	<i>glutamátdehydrogenasa</i>
GS	<i>glutaminsyntetasa</i>
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluroniumhexafluorofosfát
HER2	lidský epidermální růstový faktor
JMJ	Jumonji enzymy
MeOH	methanol
mRNA	„messenger“ ribonukleová kyselina
mTORC1	<i>serin/threoninová kinasa</i>
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát

NMM	<i>N</i> -methylnorfolin
PC	<i>pyruvátdekarboxylasa</i>
PDT	foto-dynamická terapie
r.t. (room temperature)	laboratorní teplota
ROS	volné kyslíkové radikály
RNS	volné dusíkové radikály
TEA	trimethylamin
TET	ten-eleven translocation enzymy
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TNBC	tripl-negativní karcinom prsu

Cíle bakalářské práce

Předmětem této bakalářské práce bylo provést literární rešerši, která by poskytla přehled o biologických vlastnostech derivátů glutamové kyseliny a glutaminu. Cílem bylo především vyhledat informace týkající se možných postupů příprav těchto sloučenin a případných využití při inhibici růstu rakovinných buněk a omezení jejich maligního chování.

Experimentální část této bakalářské práce měla za cíl optimalizovat reakční podmínky konkrétních reakčních kroků syntézy derivátů (2*S*,4*S*)-4-methylglutamové kyseliny vycházejících z L-pyroglutamové kyseliny. Jednotlivé intermediáty a výsledný (2*S*,4*S*)-4-methylderivát glutaminu měl být připraven v maximální čistotě a měl být charakterizován dostupnými analytickými metodami. Finální cílová sloučenina měla být poskytnuta spolupracujícímu pracovišti (KBBV, UPCE) pro studium inhibice růstu nádorových buněčných linií rakoviny prsu.

1. Úvod a teoretická část

1.1. Glutamin – obecná charakteristika

Glutamin je jednou z 20-ti univerzálně rozšířených aminokyselin v biosféře, které se označují jako tzv. „kódované“ aminokyseliny – v procesu transkripce a translace je zařazení této proteinogenní aminokyseliny řízeno přítomností kodonů CAA a CAG v sekvenci mRNA. Glutamin (Gln) je kategorizován jako semiesenciální aminokyselina. V organismech živočichů a člověka je možná jeho *de novo* syntéza (Schéma 1), a to pomocí enzymu *glutamin syntetasa* (GS)^[1], která katalyzuje kondenzační reakci mezi glutamátem a amoniakem za spotřeby ATP^[2]. Tento biochemický děj je typický především pro plicní nebo svalové buňky. Na druhou stranu, v určitých stavech organismu, například při zraněních, sepsích nebo pooperačních stavech, se glutamin stává esenciální aminokyselinou, a právě při těchto stavech je nezbytný jeho exogenní příjem. Velmi citlivé na nedostatečný příjem glutaminu jsou pak buňky, které jsou charakteristické rychlým dělením (enterocyty, lymfocyty, nádorové buňky).

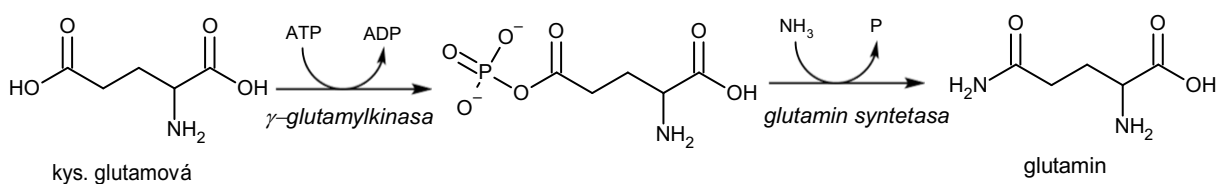
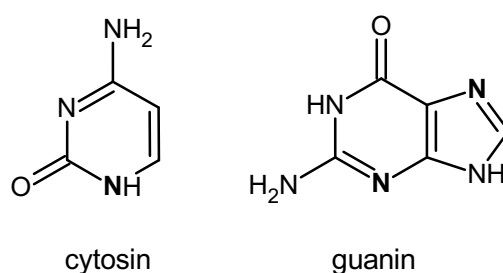


Schéma 1: *De novo* syntéza glutaminu

Glutamin je nejvíce zastoupenou aminokyselinou v krevní plazmě, jeho koncentrace se pohybuje v rozmezí 0,6-0,9 mmol/l^[3]. Toto množství představuje více než 20% podíl ze všech přítomných volných aminokyselin. Ještě vyšší je zastoupení volného glutaminu ve svalové tkáni, a to cca 40 %. Vzhledem k vysokému zastoupení glutaminu v rostlinných a živočišných proteinech je běžnou stravou přijímáno cca 5–10 g glutaminu denně.

Lidský organismus využívá glutamin jako nedílnou součást anabolických procesů – biochemických dějů, při kterém jsou jednodušší molekuly kombinovány do složitějších struktur za účelem růstu, opravy nebo přenosu genetické informace. Jakožto proteinogenní aminokyselina je klíčový zejména pro syntézy proteinů. Nicméně glutamin je rovněž důležitým zdrojem syntetické jednotky – molekuly amoniaku, který je v anabolických procesech využit například pro syntézu jiných neesenciálních aminokyselin (např. transaminace oxokyselin, amidace asparagové kyseliny na asparagin), syntézu 2-amino-2-deoxymonosacharidů nebo

syntézu nukleotidů. V syntéze aminokyselin *de novo* není glutamin pouze zdrojem atomu dusíku pro vytvoření aminové skupiny, je také zdrojem uhlíkatého skeletu. Glutamin může být přeměněn na kyselinu glutamovou (Schéma 2), prolin, ornithin nebo arginin. V syntéze nukleotidů se amidové dusíky glutaminu stávají součástí purinového cyklu, konkrétně pozic 3- a 7- a aminové skupiny guaninu^[4] (Obr. 1), v pyrimidinových bázích pak atomu dusíku v pozici 1- a jsou zdrojem aminové skupiny cytosinu. Kromě toho, například ledviny využívají katabolický rozklad glutaminu na amoniak pro udržování fyziologického pH odpovídajícího homeostáze^[5]. Mezi další využití glutaminu jako výchozí sloučeniny – „stavebního kamene“ – patří rovněž biosyntéza glutathionu, velmi důležitého tripeptidu, který například eliminuje reaktivní radikálové částice (ROS, RNS). Amidová skupina glutaminu v proteinech je pak důležitým centrem pro syntézu proteoglykanů, kdy se zúčastní glykosylační reakce, tj. připojení glykosaminoglykanových řetězců k proteinové kostře.



Obr. 1: Struktura cytosinu a guaninu – tučně vyznačené atomy dusíku původem z glutaminu

Glutamin spadá do skupiny tzv. glukogenních aminokyselin. V rámci katabolického metabolismu je přeměňován na 2-oxoglutarát (Schéma 3), který v rámci anaplerotického procesu vstupuje do Krebsova cyklu. Zde je buďto spotřebován pro vznik energie (produkce ATP a NADPH) nebo může být přeměněn na oxalacetát. Oxalacetát pak může být odveden z Krebsova cyklu a využit v procesu glukoneogeneze – tj. biosyntézy glukosy.

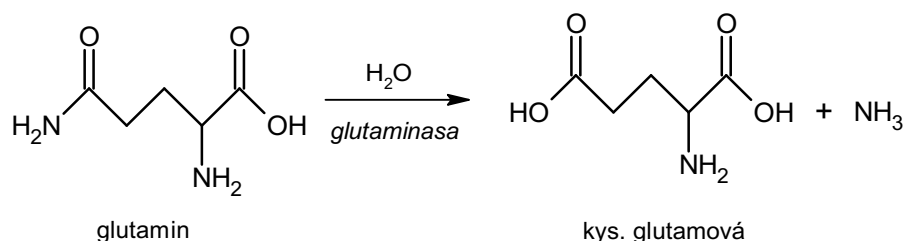


Schéma 2: Přeměna glutaminu na kyselinu glutamovou

Jako nejjednodušší cesta k navýšení dostupnosti nutrientů při zvýšené spotřebě se nabízí zvýšené vychytávání z extracelulárního prostoru. Nádorové buňky se tímto stávají v podstatě závislé na glutaminu a glukose. Nedostatek těchto látek může spustit procesy vedoucí k potlačení proliferace nebo až k buněčné smrti. Katabolismus těchto dvou esenciálních nutrientů je tedy zdrojem uhlíkových meziproductů následně využívaných jako stavební kameny pro anabolické děje, jako zdroje ATP a redukčního činidla NADPH pro produkci makromolekul.

1.3. Význam glutaminu pro nádorové buňky

V roce 1950 popsal Harry Eagle značnou závislost savčích nádorových buněk na příjmu exogenního glutaminu, kdy jeho potřeba může být u nádorových buněk až 100× vyšší než potřeba jiných aminokyselin^[7]. Rovněž bylo zjištěno, že pro lidské nádorové buňky je glutamin nejrychleji zpracovávaný nutrient v rámci růstu v buněčné kultuře^[7]. Nicméně na základě současných poznatků je potřeba glutaminu v rámci různých nádorových buněčných linií velmi variabilní. Některé nádorové buňky jsou glutamin-auxotrofní, tzn. nejsou schopny si jej biosyntetizovat. Jiné však přežívají a proliferují i při absenci exogenního glutaminu^[8]. Nádorové buněčné linie závislé na glutaminu mají často přítomnou disregulaci onkogenů, např. c-Myc, což je protoonkogen zodpovědný za kontrolu buněčného růstu a dělení. Pokud je zmutovaný stává se onkogenem, což může vést k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a rozvoji rakoviny.

Jednou ze základních metabolických charakteristik mnoha nádorových buněk je tedy závislost na exogenním příjmu glutaminu, ačkoli se nejedná o esenciální aminokyselinu a buňky savců jsou schopny ji *de novo* syntetizovat. Jak již bylo zmíněno, glutamin není pouze zdrojem uhlíkatého skeletu. Je zdrojem dvou molekul amoniaku, které jsou následně využívány pro biosyntézu neesenciálních aminokyselin, glukosamin-6-fosfátu, glutathionu nebo prekurzorů pro purinové a pyrimidinové báze. Pro nádorové buňky je však rovněž glutamin důležitou výchozí látkou pro syntézu glutathionu a rovněž mastných kyselin a tedy lipidů. Tento proces je v literatuře označován jako reduktivní karboxylace^[9,10].

Podstatou tohoto pro normální buňky neobvyklého biochemického procesu je syntéza isocitrátu z 2-oxoglutarátu. Dochází tedy k formálnímu „obrácení“ Krebsova cyklu. Uvedenou reakci katalyzuje *isocitrátdehydrogenasa*. Vzniklý isocitrát je rovnovážnými reakcemi Krebsova cyklu přeměněn na citrát, který je většinou vyloučen do cytosolu buněk. Zde je metabolicky přeměněn na acetyl-CoA a oxalacetát. Zatímco oxalacetát se po redukci na malát

vrací zpět do mitochondrie a vstupuje do Krebsova cyklu, acetyl-CoA je využit jako základní prekurzor biosyntézy mastných kyselin^[11].

Mezi další funkce glutaminu v buněčném prostředí lze rovněž uvést účast v procesu transportu jiných aminokyselin z extracelulárního prostoru do buňky. Například esenciální aminokyselina leucin je do buňky transportována specifickým transportérem SLC7A5, který je uskutečňován pouze za současného vylučování glutaminu^[12]. Leucin je pak spolu s argininem důležitým faktorem pro vznik komplexu mTORC1. Tento protein hraje důležitou regulační funkci v buněčných procesech, jako je její růst, přežívání a proliferace. U nádorových buněk bylo zaznamenáno zvýšené vychytávání glutaminu, které souvisí s vyšším počtem transportních proteinů (SLC – solut carrier) v biomembránách. Tento zvýšený výskyt SLC u nádorových buněk je pravděpodobně způsoben vyšší expresí protoonkogenu c-Myc, což je nejčastěji aktivovaný onkogen nádorových buněk^[2,13]. Aktivace c-Myc způsobuje rovněž uvedené změny v metabolismu glutaminu. Kromě zvýšené aktivity glutaminových transportérů dochází působením c-Myc například k indukci exprese enzymu *glutaminasy*, která přeměňuje glutamin na glutamát. Ten je následně využit v Krebsově cyklu nebo produkci glutathionu^[7].

Jak bylo uvedeno výše, glutamin je anapleroticky využit pro sycení Krebsova cyklu. Pro tento účel je konvertován v mitochondrii na α -ketoglutarát. První krok zahrnuje deaminace amidové skupiny na glutamát, což je reverzibilní reakce katalyzovaná *glutaminasou* (GLS). Glutamát je následně deaminován *glutamátdehydrogenasou* (GDH) anebo různými *aminotransferasami*, které poskytují jiné neesenciální aminokyseliny a požadovaný 2-oxoglutarát. GLS je limitní enzym pro celkovou rychlost glutaminolýzy. Vyskytuje se ve dvou formách – renální *glutaminasa* (GLS1, KGA) a hepatická *glutaminasa* (GLS2, LGA). Tyto dva subtypy se liší nejen svým výskytem – zatímco KGA je prakticky ve všech orgánech, tak LGA je dominantně pouze v játrech – ale i svou rolí v nádorovém bujení. Mají totiž opačný efekt. GLS1, která je regulovaná pomocí c-Myc, je spojena s růstem tumoru a stupněm jeho malignity. GLS2, která je regulována kmenem cytochromů CYP53, má naopak na růst nádoru inhibiční účinek. Tento fakt se odráží ve skutečnosti, že vysoká exprese GLS1 je spojena s horší prognózou například u ER-negativního nádoru prsu či u tripl-negativního karcinomu prsu (TNBC) oproti lumenárnímu-karcinomu či karcinomu prsu s expresí proteinového receptoru HER2 (lidský epidermální růstový faktor)^[14]. Exprese GLS1 je přímo spouštěna pomocí c-Myc s cílem zajistit nekontrolovaný růst nádorových buněk.

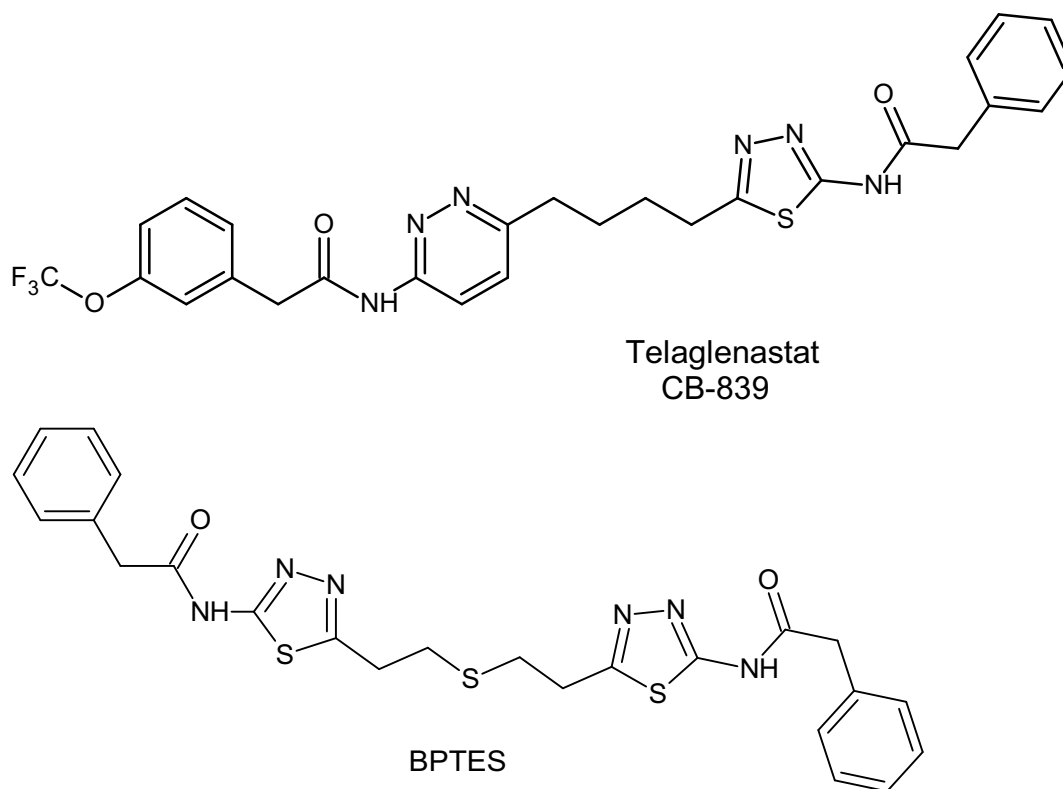
Jedním z charakteristických rysů nádorového růstu je oxidativní stres. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby docházelo rovněž k posilování antioxidační kapacity. I v těchto mechanismech hraje glutamin důležitou roli. Glutamát, vznikající z glutaminu, je využíván k syntéze

katabolismu glutaminu pochopitelně výrazně vyšší oproti okolní zdravé tkáni (nádory střeva, jícnu, jater, žaludku, štítné žlázy). Mezi nádory závislé na katabolismu glutaminu pak kromě nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC – Non-Small Lung Cancer) patří rovněž glioblastom. Tyto nádorové tkáně právě používají *de novo* syntézu glutaminu z příslušných prekurzorů. Exprese genu podmiňujícího syntézu enzymu GLUL/GS je v tomto případě navýšena^[1,19].

Nejen typ tkáně, ze které nádor pochází, ale i subtyp v rámci dané tkáně je faktorem ovlivňující případnou závislost na glutaminu. Například, duktální karcinom plic vykazuje vysokou expresi genu pro syntézu GLUL, zatímco exprese GLS je potlačena, zcela opačná situace je u karcinomu prsu z bazálních buněk. Většina buněk duktálního karcinomu proto může být kultivována v médiích neobsahujících glutamin, zatímco u bazálních buněk je potřeba exogenního glutaminu a jejich růst inhibuje blokáda GLS. Další rozdíly v metabolické potřebě glutaminu lze pozorovat i v závislosti na mikroprostředí. Primární buňky karcinomu prsu mohou vykazovat zvýšenou citlivost na funkci enzymu GLS, zatímco plicní metastázy stejného nádoru vykazují zvýšenou citlivost na *pyruvátdekarboxylasu* (PC), nezbytnou pro proces Krebsova cyklu.

1.5. Využití metabolismu glutaminu při léčbě nádorových onemocnění

Stejně jako typy nádorových tkání jsou různé, tak i jejich metabolismus je heterogenní. Některé buněčné populace zajišťují energii díky glykolýze, jiné pomocí oxidativní fosforylace. Přísun ATP a jiné metabolické požadavky jsou zajišťovány využitím substrátů, včetně glutaminu, z podpůrných – stromálních – buněk^[14]. Zvýšená potřeba glutaminu u nádorových buněk může být efektivním cílem pro léčbu. Buňky karcinomu prsu mají vysoké požadavky na dostatek aminokyselin a léčba cestou metabolické deprivace – nedostatečného zásobení základními nutrienty – může být efektivní a zároveň bezpečná. Taková terapie je cílena na neesenciální aminokyseliny, především na metabolismus glutaminu. Jednou z možností je inhibice mitochondriální *glutaminasy*, která přeměňuje glutamin na glutamát v prvním kroku jeho metabolismu. Aktivita mitochondriální GLS může být inhibována chemicky pomocí molekulárních inhibitorů. Mimo to se nabízí potlačení produkce GLS genovou terapií. V současné době je známo několik účinných inhibitorů. Příkladem jsou dva alosterické reverzibilní inhibitory GLS – CB-839 a BPTES (Obr. 2).



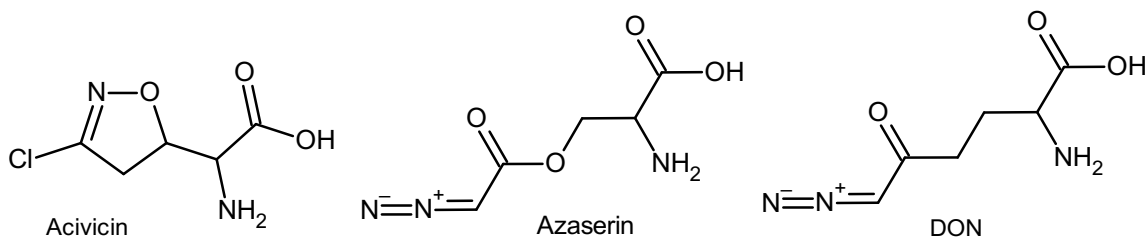
Obr. 2: Struktury CB-839 a BPTES

Sloučenina CB-839 je významným selektivním inhibitorem *glutaminasy* u TNBC, jehož buňky jsou na glutaminu vysoce závislé. Vlastní inhibice *glutaminasy* má u tohoto typu karcinomu klíčový vliv na biosyntézu glutamátu, což se následně projeví v nedostatečné produkci např. kys. asparagové glutathionu, fumarátu nebo malátu^[20]. Bohužel, efektivním inhibitorem je sloučenina CB-839 pouze u některých pacientů s TNBC. U populace rezistentních pacientů byla pozorována zvýšená aktivita enzymů *karnitinpalmitoyltransferasa 1* a *2* (CPT1 a CPT2), což jsou enzymy zajišťující efektivní transport mastných kyselin do mitochondrií pro jejich následný katabolismus produkující značné množství energie^[21]. V těchto případech by byla vhodná kombinovaná terapie spočívající v současné blokaci jak *glutaminasy*, tak i CPT1 nebo CPT2, což by zvýšilo terapeutický dosah i pro CB-839-rezistentní nádory^[22].

Sloučenina bis-2-(5-fenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethylsulfid (BPTES) je druhým selektivním alosterickým inhibitorem *glutaminasy* využívaným v terapii TNBC. Stejně jako u výše uvedeného inhibitoru CB-839, rovněž BPTES není schopný zabraňovat proliferaci nádorových buněk pouze svou vlastní inhibiční aktivitou. Důvodem je jeho nízká stabilita a špatná rozpustnost, což komplikuje jeho terapeutické využití. Nadějnou cestou v terapii TNBC pomocí BPTES však představuje ukotvení aktivní molekuly na nosič, kterým jsou nanočástice

označované BCH NPs. Součástí tohoto nosiče je fotosenzitizér Chlorin c6 (Ce6) – derivát chlorofylu se schopností absorbovat světelnou energii a tu následně přenášet na okolní molekuly kyslíku. Zároveň je celá tato struktura obalena v lidském sérovém albuminu, což vede ke zvýšení stability aktivní molekuly, celkově pak ke zvýšení účinnosti a zacílení na nádorové buňky^[23]. V tomto případě se jedná o kombinaci chemické a fotodynamické terapie (PDT). Tento typ terapie je minimálně invazivní, cílenou metodou, která využívá tři základní složky – fotosenzitizér jako přenašeč energie, světlo specifické vlnové délky jako zdroj energie a molekuly kyslíku pro tvorbu reaktivních kyslíkových molekul (ROS). ROS mohou vyčerpávat glutathion (GSH) a narušovat tak redoxní rovnováhu, čímž posilují účinky inhibitoru^[23]. Problém opět nastává v situaci, kdy v nádorových buňkách proběhne přeprogramování metabolismu a proliferace nádorových buněk se stane závislá nikoliv na metabolismu glutaminu, ale na metabolismu glukosy. V tomto případě lze v rámci změny strategie terapie využít například inhibitory glukosových transportérů, které zabraňují vstupu glukosy do buněk, nebo léčivo metformin, který snižuje produkci glukosy v játrech a zvyšuje citlivost buněk na inzulin.

Další molekulou, která byla studována jako potenciální léčivo rakoviny prsu, je 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON). Jedná se o přirozeně se vyskytující analog glutaminu – v bakteriích rodu *Streptomyces*. Mechanismus protinádorového působení této sloučeniny spočívá v inhibici glutamin-dependentních enzymů jako je GLS, *NAD syntasa* apod. Bohužel, v klinických studiích tato sloučenina neuspěla kvůli své neselektivitě a závažným vedlejším účinkům. Zmínit lze neurotoxicitu nebo gastrointestinální toxicitu^[24]. Rovněž další sloučeniny s podobným mechanismem účinku, jako acivicin nebo azaserin, neuspěly z těchto důvodů. V současnosti se proto výzkum v této oblasti zaměřuje na sloučeniny, které budou mít odlišný mechanismus působení než DON, acivicin a azaserin (Obr. 3). Jedná se o sloučeniny, které místo inhibice glutamin-dependentních enzymů, interagují s glutaminovými transportéry. Tato terapeutická strategie je v současné době považovaná za vhodnou metodu účinné léčby rakoviny prsu^[24]. Vysokou protinádorovou účinností a zároveň selektivitou vykazují například amidy L-4-methylglutamové kyseliny, jejichž funkce pravděpodobně spočívá v blokaci glutaminových transportérů.



Obr. 3: Struktury Acivicinu, Azaserinu a DON

1.6. Transportéry glutaminu a jejich zapojení do terapie rakoviny prsu

Transportéry aminokyselin (AATs) patří mezi membránové přenašeče (solute carrier transporters – SLC). Narušení jejich funkce má zásadní vliv na metabolismus dané buňky. Pokud jednotlivé přenašeče vykazují více než 20% podobnost v genové sekvenci, která předurčuje jejich chemickou strukturu, jsou nomenklaturně zařazeny do stejné skupiny. V současné době je identifikováno celkem 52 skupin SLC, přičemž část z nich je identifikována jako transportéry typické pro určité typy nádorů. U buněk karcinomu prsu se jedná o skupiny SLC1A5, SLC6A14, SLC7A5 a SLC7A11^[25,26]. Jejich vznik je podpořen vysokou genovou expresí, která je indukována a regulována pomocí onkogenu c-Myc. Transportéry SLC1A5, SLC7A5 a SLC7A11 jsou zároveň funkčně propojeny se schopností proliferace nádorových buněk. Transportér SLC7A11 je pak významný pro produkci glutathionu a tím i na redukci oxidativního stresu, a to prostřednictvím zvýšeného influxu cysteinu výměnou za exkreci glutaminu. Výše zmíněné přenašeče jsou zásadní pro absorpci aminokyselin a následný metabolismus nejen nádorových buněk, ale i buněk imunitního systému. Vznik všech zmíněných přenašečů je ovlivňován expresí c-Myc. Vzhledem ke své funkci, která je klíčová pro vstup a následný metabolismus glutaminu, mohou být tyto transportéry zajímavým cílem pro terapii některých typů nádorů, například karcinomů prsu.

Transportér SLC1A5 je na sodíku závislý membránový přenašeč, někdy také nazývaný ACS. V jeho zvýšené syntéze hraje zásadní roli protoonkogen c-Myc, který se váže na promotor SLC1A5, a tím začíná jeho transkripce. Výsledkem je navýšení počtu transportérů zajišťující zvýšený influx glutaminu do buňky výměnou za exkreci cysteinu. Působením c-Myc dochází rovněž k aktivaci mTORC1, významného faktoru buněčné proliferace. Inhibitory SLC1A5 u karcinomu prsu tlumí mTORC1 transdukcí, ve výsledku tedy buněčnou proliferaci, způsobenou redukcí příjmu glutaminu do buňky. Právě tento přenašeč je zásadní pro růst a proliferaci především TNBC, zatímco pro lumenální karcinom prsu takový význam nemá^[27]. Inhibice funkce SLC1A5 lze dosáhnout i pomocí miRNA-137 (non-coding RNA regulující expresi

jiných genů), kdy je zahájena degradace tohoto transportéru a tím je inhibována jeho exprese. Inhibice tohoto transportéru je možná rovněž účinkem inzulinu, který reguluje intracelulární transport glutaminu^[28]. Z výše uvedeného vyplývá, že využití inhibice tohoto aminokyselinového transportéru má značný terapeutický potenciál. Jako potenciální inhibitory SLC1A5 jsou aktuálně studovány monoklonální protilátky^[29], nekompetitivní inhibitory SLC1A5 nebo již používaná léčiva^[29]. Nicméně, ve všech případech jsou pozorovány různé vedlejší účinky, přičemž mnohé z nich jsou velmi nežádoucí. Navíc, uvedená inhibice může být kompenzována zvýšenou expresí jiných aminokyselinových transportérů jako je SLC38A1 a SLC38A2. Dalším významným faktorem inhibice transportéru SLC1A5 je fakt, že SLC1A5 transportér se vyskytuje kromě nádorových buněk vyskytuje rovněž v membránách zdravých buněk, a proto blokování jeho funkce může vést k poškození zdravých tkání (mozek, tenké střevo, kosterní svaly apod.)^[30].

SLC7A5 je selektivní transportér pro neutrální aminokyseliny a jeho zvýšený výskyt je typický pro karcinomu prsu^[14]. Zatímco výše uvedený SLC1A5 je zodpovědný za transport glutaminu do buňky, tak SLC7A5 naopak způsobuje vylučování glutaminu z buňky výměnou za esenciální aminokyselinu leucin. To mimo jiné umožňuje udržovat aktivitu mTORC1. Exprese tohoto transportéru je zvýšena zejména u nádorů s horším histopatologickým stupněm (tzv. grade tumoru) a u TNBC^[31]. Zvýšená exprese urychluje proliferaci nádorových buněk, zároveň inhibuje jejich buněčnou smrt, a to především aktivací metabolické cesty AKT/mTORC1, což je intracelulární signalizační kaskáda regulující buněčný cyklus. Látka mTORC1 je savčí protein – *serin/threoninová kinasa* – a AKT je *proteinkinasa B*. Zvýšená biosyntéza u některých typů nádorů bývá spojena s výskytem rezistence na endokrinní terapii^[32]. Transportér SLC7A5 má v případě tkáňové hypoxie, tedy nerovnováhy mezi proliferací nádorové tkáně a množstvím přísunu kyslíku a živin, vliv na aktivaci angiogeneze (novotvorby cév v nádorové tkáni)^[33]. Jak bylo zmíněno výše, zvýšená biosyntéza aminotransportérů, způsobená overexpresí příslušných genů, má vliv nejen na přeprogramování metabolismu nádorových buněk, ale i funkci imunitního systému. Zejména ve smyslu „úniku“ nádorových buněk před imunitní reakcí.

Transportér SLC7A11, který je zodpovědný za výměnu cysteinu za glutamát, je ve zvýšené míře přítomen u více typů nádorových buněk. Influx cysteinu do buňky je významný zejména pro dostatečnou produkci glutathionu a antioxidantní procesy. Biosyntéza SLC7A11 je pro nádorové buňky a jejich proliferaci zásadní zejména kvůli zamezení konkrétního typu buněčné smrti (ferroptózy) spouštěné peroxidací lipidů^[14]. Pro buňky s vysokou expresí tohoto transportéru je typická vysoká závislost na glutaminu a glukose, což má za následek jejich

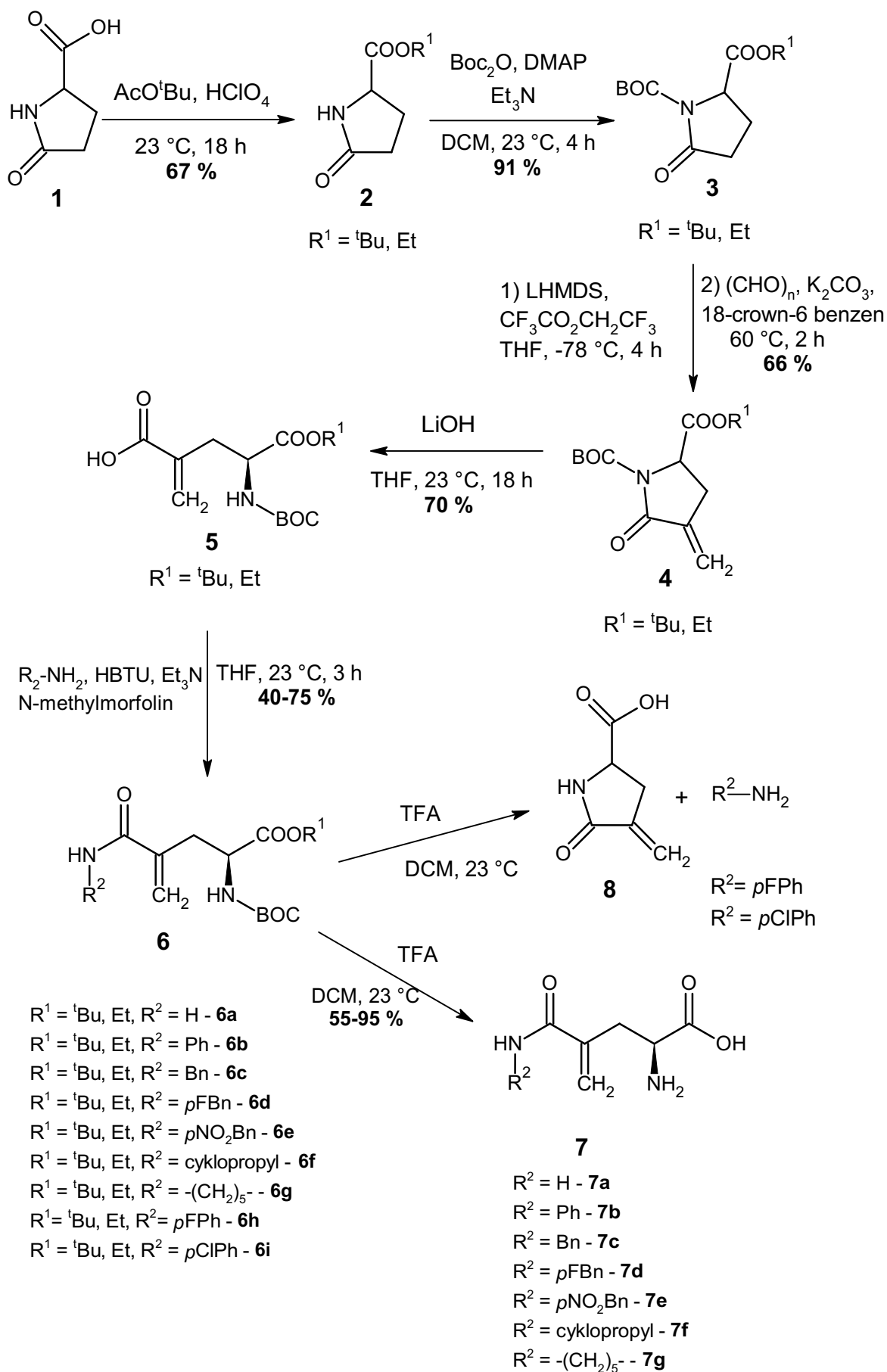
vysokou citlivost na metabolický stres. Z glutaminu tvořený glutamát pak umožňuje vyšší odolnost vůči tomuto stresu konverzí na kyselinu α -ketoglutarovou. Současně je glutamin i prekurzorem pro syntézu glutathionu. V terapii karcinomu prsu se využívá snížení exprese SLC7A11 pomocí metforminu, který zvyšuje pravděpodobnost buněčné smrti nádorových buněk ferroptózou.

1.7. Amidy L-4-methylglutamové kyseliny jako inhibitory glutaminových transportérů

Terapie nádorového bujení buněk rakoviny prsu prostřednictvím metabolismu glutaminu je důležitým výzkumným směrem. V prvních studiích bylo terapeutickým cílem ovlivnění metabolismu glutaminu pomocí inhibice enzymů účastnících se metabolismu glutaminu. Tento terapeutický cíl byl však vyhodnocen jako nevhodný, neboť glutamin dependentní nádorové buňky mohou svůj metabolismus přeprogramovat a stát se závislé na glukose místo glutaminu. Navíc, inhibitory *glutaminas* vykazovaly v klinických studiích závažné nežádoucí vedlejší účinky. Jako vhodnější cesta v terapii rakoviny prsu se v současné době jeví inhibice funkce glutaminových transportérů. Pomocí těchto transportérů je zajišťován nejen dostatek glutaminu, ale i jiných dusíkatých látek v buňce. Mezi nedávno připravené a charakterizované inhibitory glutaminových transportérů patří výše zmíněné *N*-substituované amidy L-4-methylglutamové kyseliny^[24]. Jedná se zejména o sekundární nearomatické, terciární nebo aromatické amidy s potenciálem pro terapeutické využití mimo jiné pro TNBC^[24].

Syntéza těchto sloučenin (Schéma 5) – *N*-substituovaných amidů L-4-methylglutamové kyseliny – vycházela ze snadno dostupné L-pyroglutamové kyseliny^[24]. Nejprve bylo provedeno chránění karboxylové funkční skupiny působením *tert*-butyl-acetátu na *tert*-butyl ester (**2**) s výtěžkem reakce 67 %, případně esterifikací na ethyl ester, a amidová funkční skupina byla ochráněna zavedením skupiny Boc- (**3**) s výtěžkem 91 %. Pro zavedení methylenové skupiny na uhlík C4 (**4**) bylo využito α -methylenace s výtěžkem reakce 66 %. Po vytvoření methylenové skupiny byl laktamový cyklus hydrolyzován působením hydroxidu lithného v THF. Výtěžek reakce byl 70 %. Vzniklá kyselina 4-methylglutamová (**5**) obsahující stále na aminové a α -karboxylové funkční skupině chránící skupiny byla následně ve vhodném rozpouštědle podrobena reakci a příslušným aminem se 40-75% výtěžkem v závislosti na zvoleném aminu. Jako činidlo aktivující karboxylovou skupinu byl použit HBTU. V posledním reakčním kroku syntézy byly obě chránící skupiny odstraněny působením TFA v DCM s 55-95% výtěžkem opět podle zvoleného aminu. V případě některých amidů (**6h**

a **6i**) substituovaných elektronakceptorní skupinou (4-FC₆H₄; 4-ClC₆H₄) docházelo působením TFA k cyklizační reakci za vzniku 4-methylenpyroglutamové kyseliny (**8**). Pro potlačení této nežádoucí reakce bylo provedeno odchránění funkčních skupin působením ZnBr₂ v DCM^[24]. Výtěžek požadovaných amidů (**7h** a **7i**) byl však v tomto případě pouze 11-13 %.



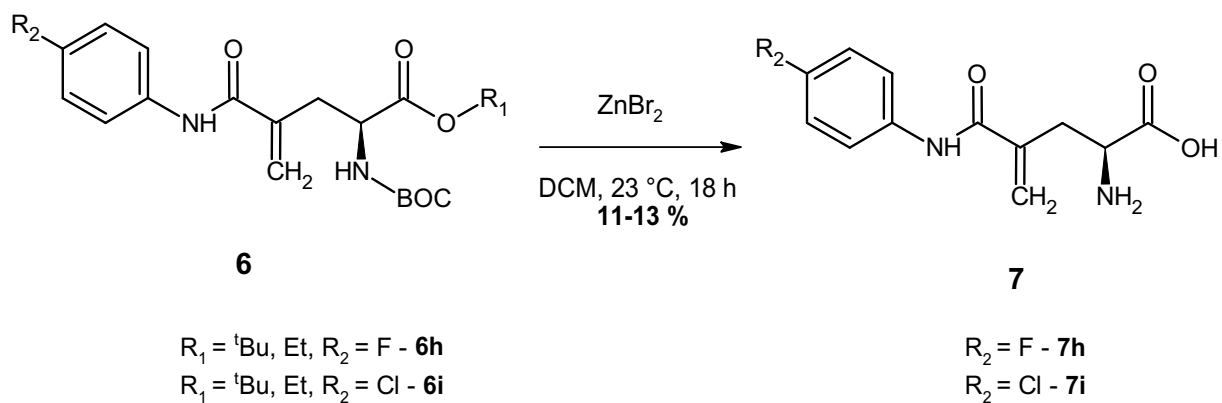
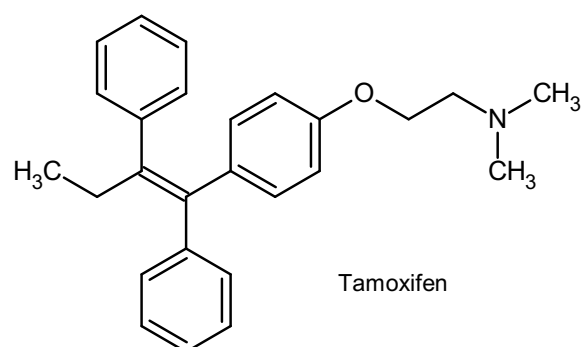
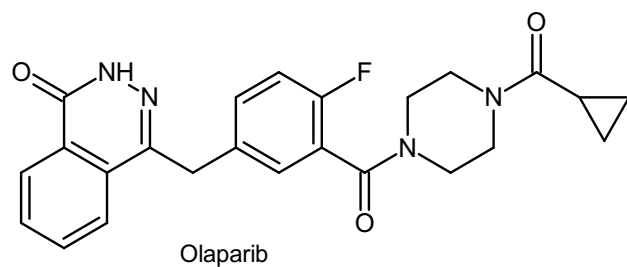


Schéma 5: Syntézy *N*-substituovaných amidů 4-methylglutamové kyseliny

Následně byly připravené deriváty 4-methylglutaminu (**7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **7e**, **7f**, **7g**, **7h** a **7i**) testovány na inhibiční aktivitu růstu buněčných liniích rakoviny prsu MCF-7, SK-BR-3 a MDA-MB-231. Zároveň byla stanovena inhibiční aktivita na „zdravé“ buněčné linii MCF-10A. Stanovená inhibiční aktivita ve formě IC_{50} byla porovnána s již schválenými terapiemi, konkrétně Tamoxifenem a Olaparibem. Tamoxifen byl vybrán vzhledem ke svému účinku na potlačení proliferace ER^+ a ER^- nádorových buněk pomocí inhibice vychytávání glutaminu. Olaparib byl vybrán s ohledem na fakt, že je jedním z mála chemoterapeutik TNBC schválených FDA^[24]. Hodnoty stanovených inhibičních koncentrací pro jednotlivé deriváty a zavedená léčiva jsou shrnuty v Tabulce 1.



Obr. 4: Struktury Olaparibu a Tamoxifenu

Během zkoušek na rakovinných buňkách MCF-7, SK-BR3, MDA-MB231 a MCF-10A byla u devíti syntetizovaných látek – **7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **7e**, **7f**, **7g**, **7h** a **7i** (nejvýrazněji pak inhibici růstu buněčných linií vykazovaly látky **7a**, **7b**, **7d**, **7e**, **7f**, **7g**, **7h**, **7i**) – zjištěna prokazatelná inhibice růstu buněk při následující koncentracích a době působení^[24]:

Tabulka 1: Účinné koncentrace ($[\log(\text{IC}_{50}[\mu\text{M}])\pm\text{SEM}]$) syntetizovaných amidů pro inhibici růstu konkrétních buněčných linií rakoviny prsu

	MCF-7		SK-BR-3		MDA-MB-231		MCF-10A
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h, 72 h
Tamoxifen	2,46±0,24	1,62±0,14	-0,06±0,25	0,24±0,19	1,73±0,12	1,62±0,13	>2,50
Olaparib	>2,50	2,03±0,22	0,21±0,27	0,02±0,19	2,21±0,15	2,19±0,14	>2,50
7a	2,66±0,30	2,79±0,39	0,90±0,23	1,05±0,16	2,15±0,19	2,77±0,17	>2,50
7b	3,03±0,42	2,40±0,18	1,57±0,29	0,22±0,19	2,89±0,22	2,91±0,18	>2,50
7d	2,77±0,21	1,93±0,24	0,59±0,32	0,65±0,16	2,54±0,29	2,53±0,18	>2,50
7e	2,66±0,21	2,73±0,36	1,11±0,27	0,50±0,18	2,34±0,17	2,57±0,18	>2,50
7f	2,36±0,24	2,62±0,24	2,50±0,35	-0,24±0,28	2,81±0,15	2,97±0,15	>2,50
7g	2,64±0,28	2,78±0,28	2,13±0,30	-0,21±0,22	2,84±0,15	2,91±0,14	>2,50
7h	2,62±0,25	1,88±0,21	1,06±0,27	0,68±0,22	2,81±0,16	2,62±0,12	>2,50
7i	2,60±0,25	2,32±0,22	1,90±0,27	0,60±0,21	2,94±0,16	2,85±0,15	>2,50

Zároveň je důležité zmínit, že intermediáty výše znázorněné syntézy, zejména ethyl a *tert*-butyl estery amidů 4-methylglutamové kyseliny a estery cyklických derivátů, byly taktéž zkoumány pro svou potenciální inhibici růstu nádorových buněk. K těmto výzkumům byly použity stejné buněčné linie, jako při testech konečných amidů 4-methylglutammové kyselin, tedy MCF-7, SK-BR-3 a MDA-MB-231^[34]. V porovnání s již zavedenými látkami, jako je Tamoxifen a Olaparib (Obr. 4), a konečnými amidy měly i tyto estery určitý vliv na buněčný

růst v závislosti na koncentraci a době působení (72 h). V porovnání s látkami **7a**, **7b**, **7d**, **7e**, **7f**, **7g**, **7h**, **7i** ale žádný z esterů nevykázal vyšší nebo stejný účinek na růst buněčné linie^[34].

Z výsledků studií vyplývá, že inhibiční vlastnosti u buněčné linie MCF-7 nejsou tak výrazné u amidů vzniklých reakcemi se sekundárními aminy (**7f**, **7g**) jako u primárních (**7a**) a aromatických aminů (**7b**, **7c**, **7d**, **7e**, **7h** a **7i**), kde je inhibice růstu výraznější^[24]. Účinek inhibice je ještě posílený v případě přítomnosti silné elektronakceptorní skupiny, jako je fluor nebo nitro skupina substituovaná v *para*-pozici benzenového jádra^[24]. Právě tyto amidy s elektronakceptorními skupiny substituovanými v *para*-poloze (**7d**, **7e**, **7h** a **7i**) mají ze všech již zmíněných amidů největší potenciál v inhibici růstu buněčných linií rakoviny prsu^[24]. Tento efekt může být důsledkem silného hydrofobního charakteru fluoru, který zamezuje vazbě například s kyselinou glukuronovou a tím se prodlouží doba setrvání v organismu. Tato vlastnost daná strukturou byla prokázána u buněčných linií SK-BR-3 a MDA-MB-231 rakoviny prsu^[24].

Jedním z možných terapeutických cílů amidů L-4-methylglutamové kyseliny je inhibice glutaminových transportérů. Tento cíl je potenciálně účinnější, než inhibice glutamin-dependentních enzymů. V současné době není zcela známá farmakodynamika těchto amidů, a proto nelze zcela jasně vysvětlit, proč jsou některé látky, jako třeba **7c** a **7f**, účinnější při nižších koncentracích. Zároveň nelze zcela jednoznačně určit, že vyšší dávkování zajistí vyšší účinek, a proto je farmakodynamika těchto amidů v současnosti vysoce zkoumanou oblastí^[24].

1.8. Amidy L-4-methylglutamové kyseliny jako inhibitory růstu nádorových buněk

Podobným směrem jako výše zmíněné amidy L-4-methylglutamové kyseliny (**7a**, **7b**, **7d**, **7e**, **7f**, **7g**, **7h**, **7i**) se ubírá výzkum analogů těchto derivátů. Jedná se o výzkumy inhibice glutaminových transportérů působením amidů L-4-methylglutamové kyseliny. Změna ve struktuře oproti výše zmíněným amidům je pouze v pozici 4, kde je místo methylenového zbytku methylový zbytek. Na základě výše zmíněných výsledků bylo vybráno téma této bakalářské práce s cílem optimalizovat syntézy vycházející z pyroglutamové kyseliny a následně otestovat potenciální inhibiční vlastnosti pro buněčné linie rakoviny prsu.

Syntézy methylen- a methylderivátů (Schéma 6) vychází ze stejné molekuly – pyroglutamové kyseliny^[24,35]. Funkční skupiny výchozí látky byly ochráněny stejným způsobem jako v případě syntéz methylenderivátů. Prvním krokem bylo ochránění karboxylové funkční skupiny převedením na *terc*-butyl ester pomocí *terc*-butylacetátu a následně ochránění

amidové skupiny pomocí Boc_2O a DMAP v acetonitrilu s výtěžkem reakce 75 %^[35]. Pro metylaci ulíku C4 bylo využito Brederickova činidla s výtěžkem 83 % a následné hydrogenace. Výtěžnost této reakce byla 78 %^[35]. Otevření laktamového kruhu probíhalo působením vodného roztoku LiOH v THF s výtěžkem 94 %^[35]. V článku, ze kterého částečně vycházela syntéza realizovaná jako předmět bakalářské práce, po otevření laktamového cyklu následoval sled reakcí vedoucí k hydrochloridu (2*S*,4*R*)-[5,5,5-²H₃]leucinu, to ale nebylo předmětem této práce. Namísto toho byla 4-methylglutamová kyselina podrobena reakci s 4-fluorbenzylaminem^[24] a chránicí skupiny odstraněny působením TFA^[24], případně HCl v dioxanu. Na takto syntetizovaném amidu, soli s trifluoracetátem nebo hydrochloridu, lze provést testy pro potvrzení potenciálně inhibičních vlastností u buněčných linií rakoviny prsu.

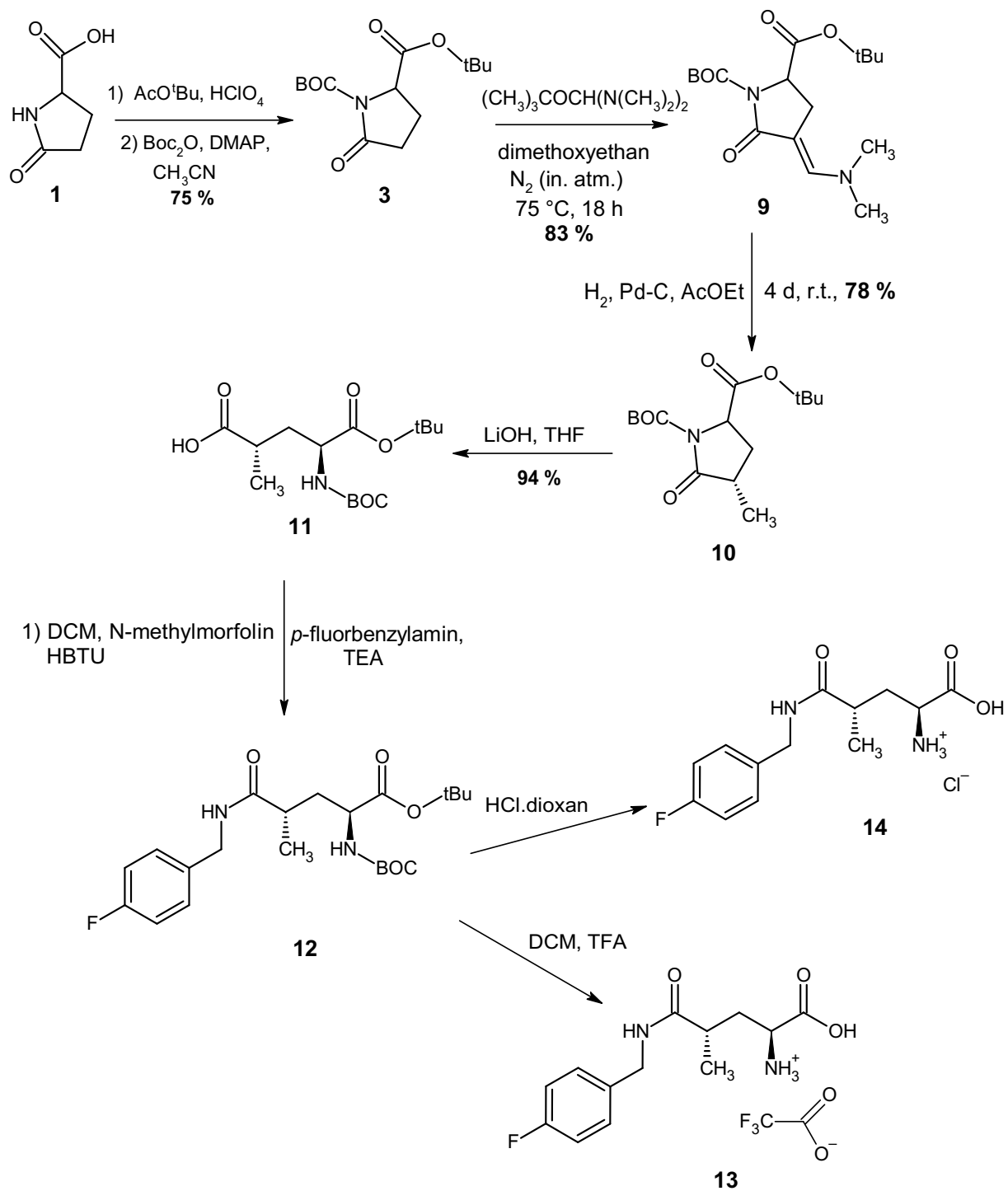


Schéma 6: Syntéza 4-methyl-derivátů glutamové kyseliny

2. Experimentální část

2.1. Obecné postupy a použitá přístrojová technika

V případě magnetického míchání byla použita magnetická míchačka *Heidolph*. Rozpouštědla byla v případě potřeby sušena molekulovým sítem (4 Å). Reakce, u kterých bylo třeba využít inertní atmosféry, byly provedeny pod argonem. Odpařování jednotlivých roztoků bylo uskutečněno pomocí rotační vakuové odparky *Heidolph Laborota 4000 efficient* s vakuovým systémem *Vacuubrand PC 510*. Pro sloupcovou chromatografii byl využit silikagel 60 (230-400 mesh). Tenkovrstvá chromatografie byla provedena na hliníkových deskách potažených silikagelem (Merck DC, Alufolien Kieselgel 60 F254), vizualizace skvrn byla provedena pomocí UV lampy (254 nm nebo 360 nm) nebo parami jódu. NMR spektra byla měřena při laboratorní teplotě na spektrometru Bruker Avance III 400 (400, 13 MHz pro ^{13}C). Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm relativně k signálu Me_4Si . Reziduální signály rozpouštědel byly použity jako vnitřní standart (CDCl_3 – 7,26 a 77,23; CD_3OD – 3,31 a 49,00 ppm pro ^1H resp. ^{13}C NMR spektra). Spin-spinové interakční konstanty (J) jsou uvedeny v jednotkách hertz (Hz), multiplicity signálů jsou značeny: s (singlet), bs (široký singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), sp (septet), m (multiplet). Specifická optická otáčivost byla měřena na polarimetru *Perkin Elmer Polarimeter 341* se sodíkovou výbojkou při vlnové délce $\lambda = 589$ nm a teplotě 20 °C. Koncentrace c je uvedena v g/100 ml rozpouštědla. IČ Spektra byla měřena při laboratorní teplotě na přístroji *Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR Spectrometer* s diamantovým nástavcem s použitím techniky ATR, rozlišení ve spektrech bylo 4 cm^{-1} , FT-IČ data jsou uvedena v cm^{-1} .

2.2. Příprava (*S*)-*tert*-butyl-pyroglutamátu (2)

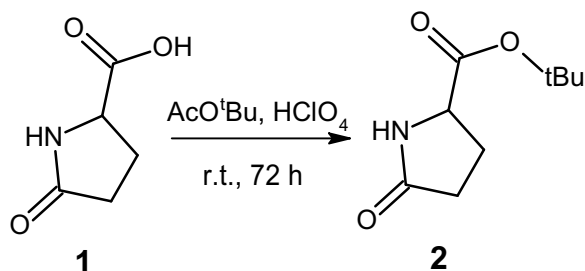


Schéma 7: Esterifikace pyroglutamové kyseliny

Do 250ml baňky (NZ 29), opatřené magnetickým míchadlem, byla navážena L-pyroglutamová kyselina (1) (10 g; 77,5 mmol). Následně byl do baňky přidán *tert*-butylacetát (100 ml) a 70% kyselina chloristá (2,3 ml). Vzniklá směs byla míchána na magnetické míchače pod zpětným chladičem a chlorkalciovou zátkou při laboratorní teplotě po dobu 3 dnů. Reakční suspenze byla následně naředěna diethyletherem (50 ml) a přítomná kyselina chloristá byla neutralizována nasyceným vodným roztokem K₂CO₃. Po neutralizaci byla provedena extrakce diethyletherem (2× 50 ml). Extrakty byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Po odstranění sušidla byla rozpouštědla odpařena na vakuové odparce. Destilační zbytek byl následně vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 8,4 g (56 %) (*S*)-*tert*-butyl-pyroglutamátu ve formě bílé krystalické látky.

Bylo získáno 8,4 g (56 %) bílé krystalické látky s bodem tání 103-104 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3,51$ ($c = 1,0$; CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,89 (bs, 1H, *NH*), 4,12 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 5,6$ Hz, C₂H), 2,46–2,22 (m, 3H, C₄H₂+ C₃H), 2,18 (m, 1H, C₃H), 1,48 (s, 9H, *t*Bu). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 178,0; 171,3; 82,5; 56,2; 29,6; 28,1; 25,0. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3259, 3128, 2991, 2969, 1734, 1699, 1679, 1470, 1370, 1283, 1230, 1164, 1146, 1106.

2.3. Příprava (*S*)-*tert*-butyl-*N*-*tert*-butoxykarbonylpyroglutamátu (3)

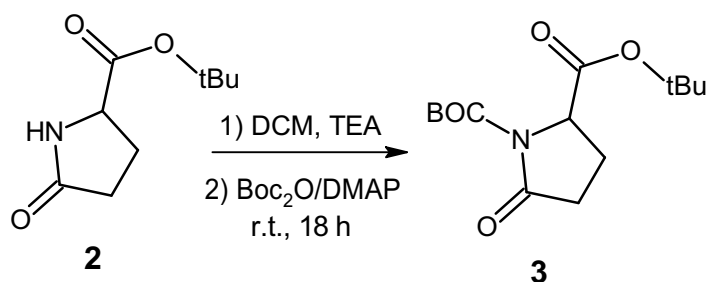


Schéma 8: Zavedení chránící skupiny Boc- na atom dusíku pyroglutamové kyseliny

Do 250ml baňky (NZ 29) opatřené magnetickým míchadlem a chlorkalciovou zátkou byl předložen (*S*)-*tert*-butyl-pyroglutamát (3,82 g; 20,6 mmol). Následně byl přidán DCM (60 ml) a TEA (3,15 ml; 22,6 mmol). Směs byla míchána do rozpuštění výchozí látky a pak byl k reakční směsi přidán Boc₂O (4,92 g; 22,6 mmol) a DMAP (2,76 g; 22,6 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin. Poté byla reakční směs promyta vodným roztokem AcOH (2,7 ml v 80 ml vody). Následně byla organická fáze promyta 100 ml 5% vodného roztoku NaHCO₃. Organická fáze byla poté vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována do 250ml baňky (NZ 29) a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Destilační zbytek byl podroben flash-chromatografii, SiO₂ – mobilní fáze hexan:AcOEt 2:1 (v/v). Filtrát (cca 360 ml) zbavený barevných nečistot a výchozí látky byl odpařen na vakuové odparce. Produkt byl vysušen ve vakuové sušárně, ve které došlo ke krystalizaci na bílou amorfnní látku. Bylo získáno 5,8 g (99 %)

Bylo získáno 5,8 g (99 %) bílé krystalické látky s bodem tání 51-53 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -31,9$ ($c = 1,01$; CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4,47 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J = 2,4$ Hz, C₂H), 2,60 (m, 1H, C₄H), 2,45 (m, 1H, C₄H), 2,27 (m, 1H, C₃H), 1,97 (m, 1H, C₃H), 1,50 (s, 9H, *t*Bu), 1,47 (s, 9H, *t*Bu). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 173,8; 170,6; 149,5; 83,5; 82,5; 59,8; 31,3; 28,1; 28,1; 21,8. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 2998, 2976, 2933, 1777, 1721, 1701, 1457, 1309, 1289, 1257, 1168, 1145, 1047, 1145.

2.4.Příprava

(*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-(dimethylaminomethylen)pyroglutamátu (9)

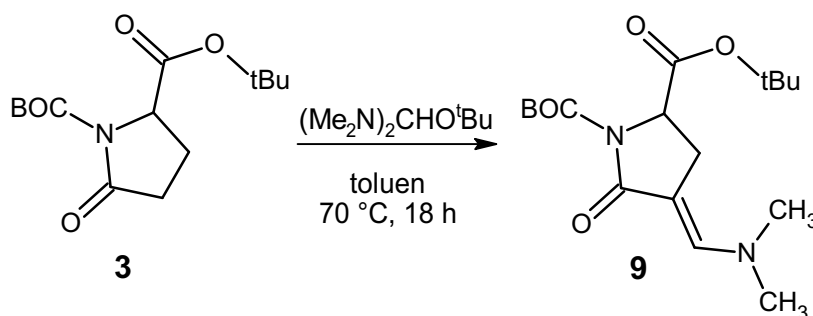


Schéma 9: Reakce s Bredereckovým činidlem

Do 100 ml tříhrdlé baňky (NZ 29) opatřené magnetickým míchadlem, kohoutem a septem byl předložen (*S*)*tert*-butyl-*N*-*tert*-butoxykarbonylpyroglutamát (**3**) (2,85 g; 10 mmol). Na baňku byl nasazen vzdušný chladič a horní zábrus byl opatřen kohoutem. Atmosféra v aparatuře byla nahrazena argonem. Následně byl přes septum přidán stříkačkou suchý toluen (20 ml). Poté bylo k reakční směsi přidáno Bredereckovo činidlo (2,615 g; 15 mmol; 3,09 ml). Reakční směs byla zahřívána pod inertní atmosférou na teplotu $70\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 18 h. Poté byla směs přelita do 100 ml jednohrdlé baňky, původní baňka vypláchnuta DCM (cca 10 ml) a rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce. Destilační zbytek byl podroben flash-chromatografií, SiO_2 – mobilní fáze EtOAc:DCM 4:1 (v/v) (cca 250 ml). Rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a destilační zbytek byl rekrystalizován ze směsi etheru a hexanu (1:4; cca 50 ml). Bylo získáno 2,56 g (68 %) produktu. Vzniklá bílá krystalická látka byla vysušena ve vakuové sušárně.

Bylo získáno 2,56 g (68 %) bílé krystalické látky s bodem tání $120\text{--}125\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38,93$ ($c = 0,98$; CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7,11 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 4,40 (dd, 1H, $J = 10,7\text{ Hz}$, $J = 3,8\text{ Hz}$, C_2H), 3,22 (m, 1H, C_3H), 3,01 (s, 6H, $2\times\text{NH}_3$), 2,81 (dd, 1H, $J = 15,0\text{ Hz}$, $J = 2,5\text{ Hz}$, C_3H), 1,50 (s, 9H, *t*Bu), 1,47 (s, 9H, *t*Bu). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 171,4; 169,9; 150,8; 146,4; 91,4; 82,2; 81,9; 56,8; 42,2; 28,3; 28,2; 26,5. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 2981, 2960, 2932, 1759, 1739, 1686, 1631, 1475, 1369, 1322, 1311, 1270, 1251, 1152, 1120, 963.

2.5. Příprava

(2*S*,4*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-

methylpyroglutamátu (10)

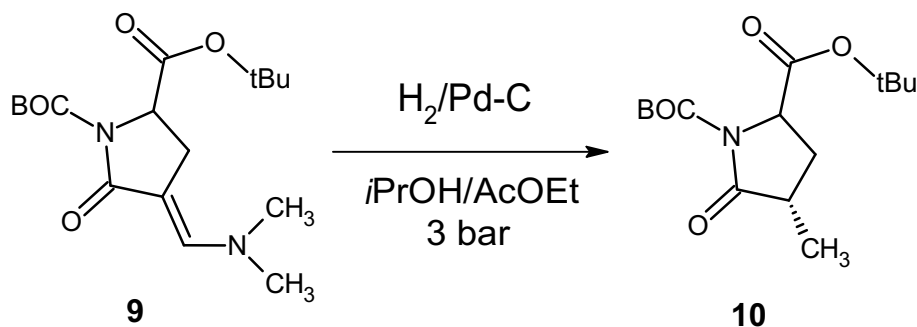


Schéma 10: Hydrogenace (*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-(dimethylaminomethylen)pyroglutamátu

Do 100 ml PTFE vložky hydrogenačního tlakového reaktoru opatřeného tyčinkovým magnetickým míchadlem byl předložen (*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-(dimethylaminomethylen)pyroglutamát (**9**) (2,56 g; 7,5 mmol), který byl následně rozpuštěn ve směsi IPA:EtOAc 2,5:1 (v/v) (12,5:5 ml). K roztoku byl přidán 10% Pd-C (obsah vlhkosti 50 %) (225 mg). Do uzavřeného reaktoru byl zaveden přívod H₂ pod tlakem max 3 bar. Reakční směs byla míchána 7 dní při laboratorní teplotě. Po ukončení byla atmosféra v aparatuře nahrazena argonem. Suspenze byla zfiltrována do 250 ml baňky přes dvojitý skládaný filtr a zachycený katalyzátor byl promyt 5 × 10 ml CH₃OH a následně 5 × 10 ml DCM. Rozpouštědla odpařena na vakuové odparce a destilační zbytek byl vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 2,19 g (97 %) (2*S*, 4*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-methylpyroglutamátu (**10**).

Bylo získáno 2,19 g (97 %) bílé krystalické látky s bodem tání 68-70 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35,8$ ($c = 1,02$; CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4,38 (dd, 1H, $J = 8,5$ Hz, $J = 6,5$ Hz, C₂H), 2,60 (m, 2H, C₃H₂), 1,59 (m, 1H, C₄H), 1,51 (s, 9H, *t*Bu), 1,48 (s, 9H, *t*Bu), 1,26 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 176,1; 170,7; 149,7; 83,4; 82,2; 58,2; 37,5; 29,7; 28,0; 28,0; 16,6. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 2978, 2935, 1780, 1739, 1646, 1457, 1369, 1318, 1294, 1256, 1223, 1159, 980.

2.6. Příprava (2*S*,4*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(*tert*-butoxykarbonylamino)-2-methyl-5-oxopentanové kyseliny (11)

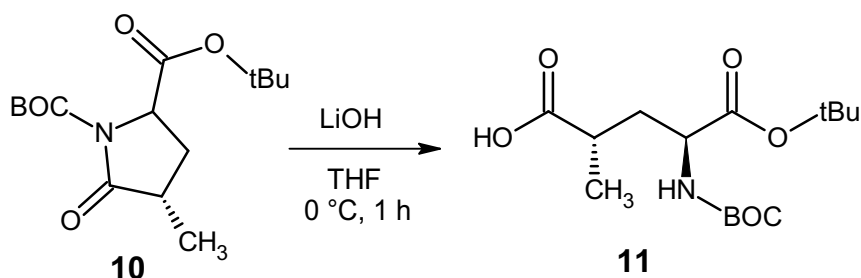


Schéma 11: Otevření laktamového kruhu

Do 100ml jednohrdlé baňky (NZ 29) opatřené magnetickým míchadlem byl předložen (*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-methylpyroglutamát (**10**) (1,54 g; 5,13 mmol). Výchozí látka byla rozpuštěna v THF (25,65 ml) a reakční směs byla ochlazená na ledové lázni umístěné na magnetické míchačce na teplotu 0 °C. Poté byl během cca 10 min přikapáván 1M vodný roztok LiOH (6,2 ml; 6,2 mmol) předložený v 50ml dělicí nálevce. Po přidání hydroxidu byla reakční směs míchána dalších 15 min při teplotě 0 °C, přičemž došlo k homogenizaci reakčního media. Poté byla reakční směs převedena do 100 ml dělicí nálevky, bylo přidáno 15 ml EtOAc a vzniklý roztok byl extrahován nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ (2× 15 ml). Do spojených vodných extraktů byl následně přikapán 10% vodný roztok kyseliny citronové v množství, aby výsledné pH roztoku bylo v rozmezí hodnot 3–4. Následně byl tento roztok extrahován DCM (4× 15 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Po zfiltrování roztoku do 250 ml baňky byla rozpouštědla odpařena na vakuové odparce. Bylo získáno 1,45 g (88 %) (2*S*,4*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(*tert*-butoxykarbonylamino)-2-methyl-5-oxopentanové kyseliny (**6**) ve formě bílé amorfni látky.

Bylo získáno 1,45 g (94 %) bílé krystalické látky s bodem tání 66-68 °C. $[\alpha]_D^{20} = -23,50$ ($c = 1,03$; MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9,85 (bs, 1H, COOH), 6,31+5,06 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, NHCO), 4,22+4,00 (dd, 1H, $J = 9,5$ Hz, $J = 13,5$ Hz, C₂H), 2,55 (m, 1H, C₄H), 1,97 (m, 1H, C₃H), 1,80 (m, 1H, C₃H), 1,43 (s, 9H, *t*Bu), 1,41 (s, 9H, *t*Bu), 1,24 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 181,9+180,8; 172,0+171,5; 156,9+155,8; 82,3+82,0; 81,4+80,0; 54,8+52,5; 37,2+36,5; 36,3+35,8; 28,4; 28,1; 17,9+17,1. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3224, 3978, 2936, 1743, 1716, 1458, 1397, 1368, 1254, 1221, 1158, 1106, 1063, 1019.

2.7. Příprava **(2*S*,4*S*)-*tert*-butyl-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanoátu (12)**

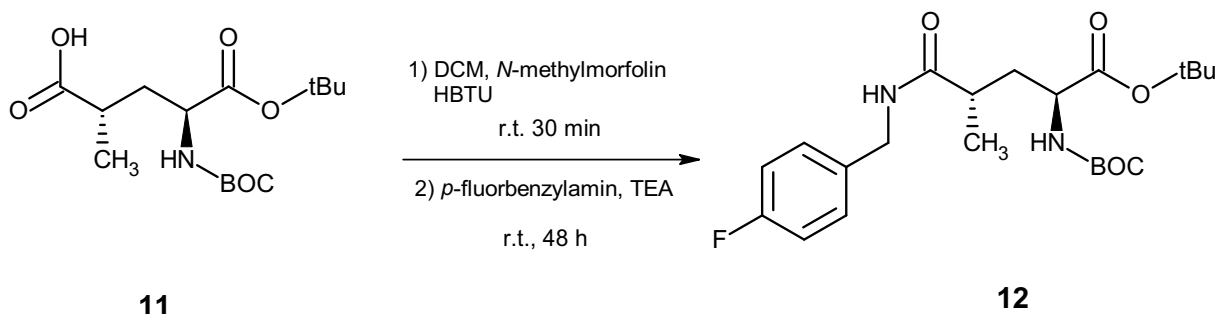


Schéma 12: Reakce chráněné 4-methylglutamové kyseliny s 4-fluorbenzylaminem

Do 100ml baňky opatřené chlorkalciovou zátkou a magnetickým míchadlem byla předložena **(2*S*,4*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(*tert*-butoxykarbonylamino)-2-methyl-5-oxopentanová kyselina (11)** (1,13 g; 3,56 mmol) a suchý DCM (30 ml). Ke směsi byl postupně přidán NMM (0,8 ml; 7,12 mmol) a HBTU (2,70 g; 7,12 mmol). Reakce byla míchána na magnetické míchačce po dobu 30 min při laboratorní teplotě. K suspenzi byl následně přidán 4-fluorbenzylamin (0,8 ml, 7,12 mmol) a suchý TEA (1 ml, 7,12 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 dní. Poté byla reakční směs promyta vodou (2× 15 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována do 250 ml baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Destilační zbytek byl následně podroben flash-chromatografií (SiO₂; mobilní fáze – gradient hexan → hexan:EtOAc 50:50 (v/v)). Rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce a destilační zbytek byl vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 1,02 g (70 %) **(2*S*,4*S*)-*tert*-butyl-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-4-(*p*-fluorbenzylkarbamoyl)pentanoátu (12)** jako bílé krystalické sloučeniny.

Bylo získáno 1,02 g (70 %) bílé krystalické látky s bodem tání 118-121 °C. $[\alpha]_D^{20} = +11,34$ ($c = 0,99$; CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,25 (m, 2H, Ar), 7,00 (m, 2H, Ar), 6,15 (bs, 1H, CONH), 5,04+4,77 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NHCO), 4,49–4,30 (m, 2H, ArCH₂), 4,10+3,94 (m, 1H, C₂H), 2,37 (m, 1H, C₄H), 1,99 (m, 1H, C₃H), 1,79 (m, 1H, C₃H), 1,44 (s, 9H, *t*Bu), 1,42 (s, 9H, *t*Bu), 1,22 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 175,8; 171,9; 162,3 (d, $J = 244$ Hz); 155,9; 134,3 (d, $J = 3,2$ Hz); 129,7 (d, $J = 8,1$ Hz); 115,7 (d, $J = 21,5$ Hz); 82,4; 80,0; 53,4; 43,1; 38,6; 36,9; 28,5; 28,2; 18,5. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3382, 3343, 2971, 2927, 1722, 1687, 1652, 1602, 1520, 1509, 1431, 1367, 1319, 1286, 1252, 1222, 1162, 853.

2.8. Příprava trifluoacetátu (2S,4S)-2-amino-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanové kyseliny (13)

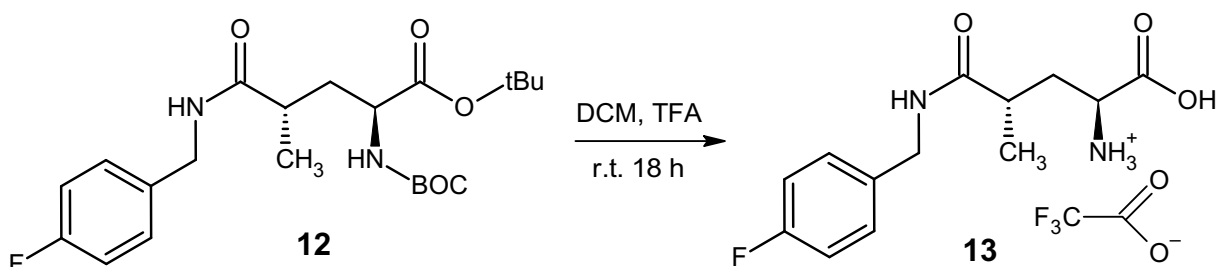


Schéma 13: Syntéza soli amidu 4-methylglutamové kyseliny

Do 50ml jednohrdlé baňky opatřené chlorkalciovou zátkou byl předložen (2S,4S)-*tert*-butyl-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-4-(*p*-fluorbenzylkarbamoyl)pentanoát (**12**) (270 mg; 0,66 mmol). a byla přidána směs DCM:TFA 4:1 (v/v) (5 ml). Po 10 h působení kyselého media při laboratorní teplotě bylo rozpouštědlo a kyselina z reakční směsi odpařena na vakuové odparce. Pro úplné odpaření TFA z destilačního zbytku byl obsah baňky rozpuštěn v DCM (10 ml) a vzniklý roztok byl opět odpařen na vakuové odparce. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Poté byl destilační zbytek vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 0,19 g (78 %) trifluoroacetátu (2S,4S)-2-amino-4-(*p*-fluorbenzylkarbamoyl)pentanové kyseliny (**13**) ve formě bílé krystalické látky.

Bylo získáno 0,19 g (78 %) bílé krystalické látky s bodem tání 112-114 °C. $[\alpha]_D^{20} = +27,57$ ($c = 0,49$; MeOH). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7,30 (m, 2H, Ar), 7,02 (m, 2H, Ar), 4,36 (m, 2H, ArCH₂), 3,81 (dd, 1H, $J = 5,8$ Hz, $J = 8,6$ Hz, C₂H), 2,77 (m, 1H, C₄H), 2,15 (m, 1H, C₃H), 1,94 (m, 1H, C₃H), 1,21 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 177,3; 171,7; 163,4 (d, $J = 243$ Hz); 162,5 (q, $J = 35,1$ Hz); 136,0 (d, $J = 3,0$ Hz); 130,3 (d, $J = 8,1$ Hz); 117,9 (q, $J = 294$ Hz); 116,1 (d, $J = 21,3$ Hz); 52,3; 43,3; 38,3; 35,5; 19,2. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3301, 2970, 2937, 1743, 1640, 1540, 1511, 1458, 1376, 1221, 1158, 1098, 826.

2.9.Příprava hydrochloridu (2S,4S)-2-amino-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanové kyseliny (14)

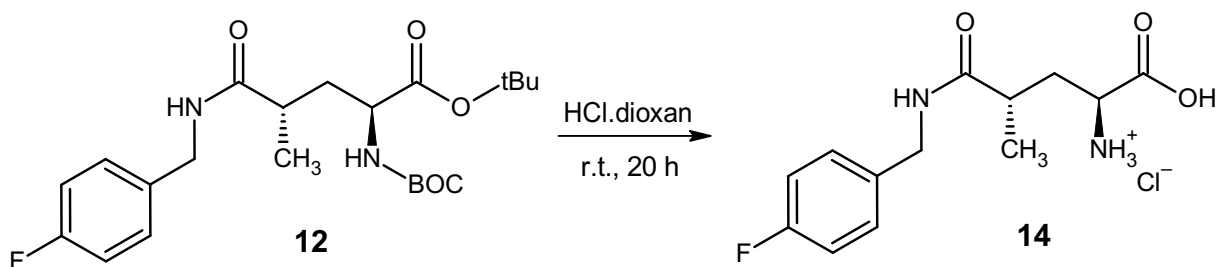


Schéma 14: Syntéza soli amidu 4-methylglutamové kyseliny

Do 50 ml jednohrdlé baňky opatřené chlorkalciovou zátkou byl předložen (2S,4S)-*tert*-butyl-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-4-(*p*-fluorbenzylkarbamoyl)pentanoát (**12**) (410,5 mg; 0,97 mmol) a byla přidána směs HCl ve 4 M dioxanu (5 ml). Po 20 h působení kyselého media bylo do baňky přidáno míchadlo, baňka byla dále opatřena Mi-So nástavcem a chladičem, ke směsi bylo přidáno 10 ml MeOH. Směs byla pod vakuem a na magnetické míchačce zahřata horkovzdušnou pistolí a část rozpouštědel byla odpařena. Z baňky bylo vyjmuto míchadlo, které bylo do směsi opláchnuto MeOH. Směs byla zahuštěna na vakuové odparce. Po zahuštění bylo přidáno malé množství MeOH (5 ml) a roztok byl opět zahuštěn. Tento krok byl opakován celkem třikrát. Před posledním odpařením rozpouštědel byl do baňky přidán DCM (10 ml) a roztok byl zcela zahuštěn. Destilační zbytek byl vysušen ve vakuové sušárně. Bylo získáno 0,29 g (98 %) nažloutlé olejovité látky.

Bylo získáno 0,29 g (98 %) nažloutlé, olejovité látky. $[\alpha]_D^{20} = +33,10$ ($c = 0,56$; MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7,32 (m, 2H, Ar), 7,04 (m, 2H, Ar), 4,37 (m, 2H, ArCH₂), 3,82 (m, 1H, C₂H), 2,79 (m, 1H, C₄H), 2,12 (m, 1H, C₃H), 1,94 (m, 1H, C₃H), 1,22 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 177,3; 171,5; 163,4 (d, $J = 242$ Hz); 136,0 (d, $J = 3,1$ Hz); 130,4 (d, $J = 8,3$ Hz); 116,1 (d, $J = 21,6$ Hz); 52,2; 43,3; 38,4; 35,4; 19,3. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3303, 2970, 2939, 1740, 1646, 1558, 1511, 1458, 1435, 1374, 1227, 1203, 1158, 1141, 836.

3. Výsledky a diskuze

Syntézu *tert*-butylesteru kyseliny pyroglutamové (**2**) (Schéma 7) jsem provedl podle literárního předpisu, který popisuje syntézu derivátu 4-methylenglutamové kyseliny^[24]. Jednalo se o kysele katalyzovanou reesterifikaci. V případě reakce s 1 g výchozí sloučeniny jsem dosáhl 52 % výtěžku. V následném pokusu s 10 g byl výtěžek poněkud vyšší, a to 66 %, což je hodnota, srovnatelná s literárním předpisem (67 %). Ověřil jsem rovněž možnost provedení této reakce za katalýzy H₂SO₄ místo HClO₄. Za těchto reakčních podmínek jsem izoloval produkt s poněkud nižším výtěžkem (40 %). V opakovaných pokusech jsem proto používal kyselinu chloristou. Ve srovnání s původním předpisem jsem provedl jistou modifikaci postupu. Neutralizaci katalyzující kyseliny a kyseliny octové vznikající jako vedlejší produkt jsem nejprve realizoval nasyceným vodným roztokem Na₂CO₃ místo NaHCO₃, a to z důvodu vyšší kapacity této báze. Teprve po neutralizaci většiny kyselých sloučenin jsem pH prostředí upravil vodným roztokem NaHCO₃.

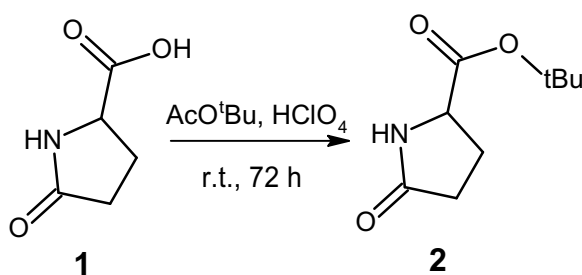


Schéma 15: Esterifikace pyroglutamové kyseliny (**1**)

Rovněž pro následný reakční krok (Schéma 8), kterým bylo zavedení chránicí skupiny Boc na atom dusíku *tert*-butyl-pyroglutamátu (**2**), jsem využil výše uvedený literární předpis^[24]. Reakce spočívala v působení Boc₂O na příslušný pyroglutamát (**2**) v přítomnosti bází DMAP a TEA. Reakci jsem na rozdíl od původního předpisu neprováděl pod atmosférou argonu, vzdušná vlhkost byla vyloučena pouze použitím chlorkalciové zátky. Po uplynutí stanovené reakční doby a po zpracování reakční směsi jsem pomocí NMR spektroskopie zjistil, že surový produkt obsahuje určité množství DMAP a rovněž asi 5 % výchozí sloučeniny. Čistění jsem provedl pomocí flash-chromatografie (AcOEt:hexan – 1:2; SiO₂). Vzhledem k množství produktu cca 6 g nebyla provedena sloupcová chromatografie. Touto technikou se mi podařilo odstranit nečistoty a rovněž došlo k odbarvení produktu (**3**), který jsem získal jako bílou krystalickou sloučeninu s výtěžkem 94 %. Literatura uvádí výtěžek 91 %^[24].

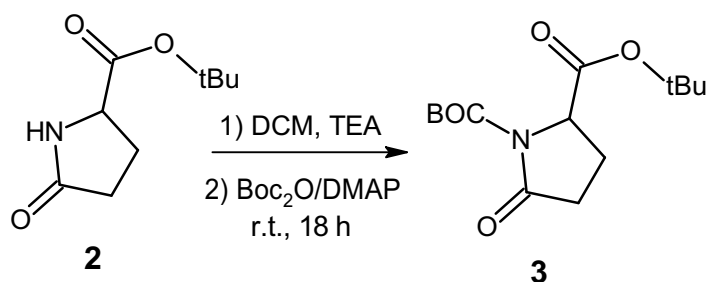


Schéma 16: Zavedení chránicí skupiny Boc- na atom dusíku pyroglutamové kyseliny po esterifikaci

Ve třetím reakčním kroku jsem do polohy 4- derivátu pyroglutamové kyseliny (**3**) zavedl dimethylaminomethylenovou skupinu. Pro tuto chemickou transformaci je velmi vhodné tzv. Bredereckovo činidlo (*tert*-butoxybis(dimethylamino)methan), které je komerčně dostupné. Reakce s Bredereckovým činidlem se obvykle provádí v suchých aprotických rozpouštědlech s dostatečně vysokým bodem varu. V prvním pokusu jsem provedl reakci s 1,5 ekv. Bredereckova činidla v toluenu pod atmosférou argonu při teplotě 100 °C. Reakční doba byla 5 h. Za těchto reakčních podmínek jsem získal produkt, který obsahoval přibližně 5 % výchozí látky. Pro dosažení úplné konverze se nabízelo prodloužit reakční dobu, nicméně za uvedené teploty jsem se obával možnosti racemizace výchozí látky/produktu. V dalším pokusu jsem proto reakční teplotu snížil na 70 °C, avšak reakční čas jsem výrazně prodloužil, a to až na 18 h. Tyto reakční podmínky se velmi podobají reakčním podmínkám, použitým pro analogickou reakci methylesteru *N*-Boc-pyroglutamátu (1,5 ekv. Bredereckova činidla, 70 °C, 10 h, dimethoxyethan)^[36], které byly nalezeny jako optimální z pohledu dosaženého výtěžku a minimální racemizace. Takto získaný surový produkt již obsahoval minimum výchozí látky. V případě potřeby jej lze čistit flash-chromatografií (AcOEt:DCM – 4:1; SiO₂) a produkt lze rovněž rekrystalizovat ze směsi ether:hexan 1:4 (1 g na 20 ml směsi). Možné je rovněž provést čišťení sloupcovou chromatografií (*R*_f = 0,30; AcOEt:DCM – 4:1; SiO₂).

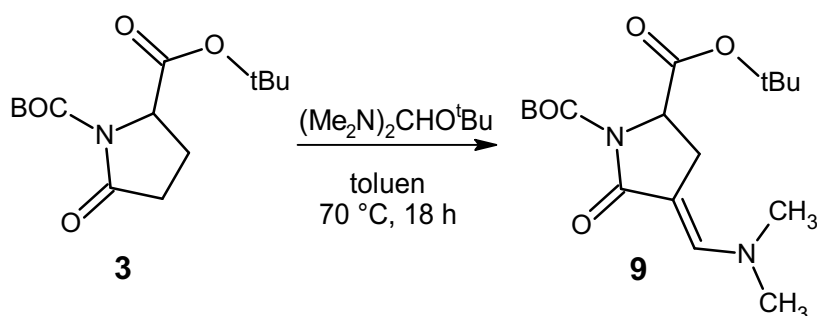


Schéma 17: Reakce s Bredereckovým činidlem

Ve čtvrtém reakčním kroku jsem 4-dimethylaminomethylenový derivát **9** podrobil katalytické hydrogenaci. Při této chemické transformaci vzniká v pozici 4- methylsubstituent **10**, a to ve třech dílčích krocích. Nejprve dochází k hydrogenaci alkenové skupiny ve 4-dimethylaminomethylenovém substituentu, následně se retro-Michaelovou adicí eliminuje dimethylamin a v poslední fázi dochází opět k hydrogenaci, a to nově zformované methylenové skupiny. Uvedená chemická reakce byla několikrát popsána v literatuře, přičemž se jednotlivé předpisy liší reakčními podmínkami. Předpis v literatuře, kterou jsem využil pro provedení prvního pokusu, uvádí podmínky, tlak vodíku 200 psi (cca 14 bar), 72 h při RT^[37], zatímco v jiných postupech je reakce prováděna při tlaku 1 atm po dobu 5-6 dní při RT^[35,36]. Ve všech případech však proběhla hydrogenace s vysokou diastereoselektivitou, vyšší než 30:1. Vzhledem k tomu, že jsem měl k dispozici tlakový reaktor, provedl jsem reakci za vyššího tlaku (15 bar), po dobu 5 dní při 20 °C. Produkt jsem po odstranění pevného katalyzátoru (10% Pd-C) čistil flash-chromatografií ($R_f = 0,61$; AcOEt:DCM – 4:1; SiO₂). Pomocí NMR spektroskopie jsem ovšem zjistil, že produkt je směsí obou epimerů v poměru přibližně dr 9:1. V následujícím pokusu jsem proto snížil tlak vodíku na 5 bar a zároveň prodloužil reakční dobu na 7 dní. V tomto případě jsem po izolaci produktu zjistil, že kromě očekávaného hlavního epimeru *cis*- obsahuje rovněž 5–10 % epimeru *trans*-. Provedl jsem proto reakci s velmi nízkým přetlakem vodíku (<3 bar), při zachování stejného reakčního času. Za těchto reakčních podmínek pak byl obsah nežádoucího *trans*- epimeru méně než 5 %, což jsem vyhodnotil jako dostačující. Nicméně, surový produkt rovněž obsahoval derivát s přítomnou 4-dimethylaminomethyl skupinou, tj. intermediát vzniklý pouze první hydrogenací (formálně Michaelův addukt). Tento meziprodukt bazického charakteru jsem odstranil promytím surového produktu rozpuštěného v AcOEt 5% vodným roztokem kys. citronové.

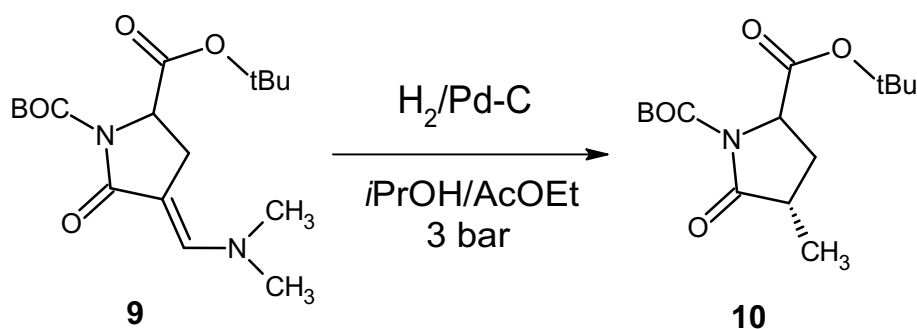


Schéma 18: Hydrogenace (S)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-(dimethylaminomethylen)pyroglutamátu (**9**)

V následujícím reakčním kroku jsem provedl hydrolyzu laktamového cyklu pyroglutamového derivátu **10**. V případě hydrolyzy analogického derivátu 4-methylenpyroglutamátu autoři provedli hydrolyzu působením LiOH ve vodném THF. Produkt hydrolyzy následně izolovali sloupcovou chromatografií (SiO₂; MeOH:DCM 1:4) ve výtěžku 70 %^[24]. Vzhledem k tomu, že při reakci vzniká lithná sůl karboxylové kyseliny, rozhodl jsem se izolaci produktu **11** pomocí sloupcové chromatografie vyhnout. Nicméně, v prvním pokusu jsem převzal reakční podmínky uvedené v této literatuře. Reakci jsem provedl v množství 1 mmol výchozí látky, na kterou jsem působil 1,2 ekv. LiOH o koncentraci 0,2M ve směsi voda:THF 1:5, po dobu 1 h při laboratorní teplotě. Následně jsem produkt **6** izoloval analogicky podle literárního předpisu^[35]. Nejprve jsem přebytek LiOH neutralizoval vodným roztokem NaHCO₃ a případně nezreagovanou výchozí sloučeninu odstranil promytím AcOEt. Poté jsem vodnou fázi obsahující produkt ve formě soli vykyselil roztokem kys. citronové. Produkt ve formě karboxylové kyseliny jsem pak izoloval extrakcí do AcOEt, a to ve výtěžku 99 %. Dle NMR spektroskopie však obsahoval 5–10 % kys. citronové. Protože byl tento reakční postup úspěšný, rozhodl jsem se dále ověřit průběh reakce při teplotě 0 °C. Důvodem provedení reakce za nižší teploty je prevence před možnou racemizací na stereogenních centrech, vyvolané působením bazického prostředí. Zjistil jsem, že rovněž při této teplotě dojde za uvedených bazických podmínek k hydrolyze během 1 h. Po provedení izolace výše popsáním způsobem jsem produkt získal v téměř kvantitativním výtěžku, obsahoval však kys. citronovou. V následujícím pokusu jsem se proto rozhodl pozměnit izolaci a provést finální extrakci kyseliny do DCM, ve kterém je kys. citronová špatně rozpustná. V tomto případě jsem již získal čistý produkt, ve výtěžku 90 %. Při syntéze s větším množstvím výchozí sloučeniny (5 mmol) jsem provedl ještě jednu modifikaci reakčního postupu – roztok LiOH jsem do reakční směsi přidával postupně během 10 min a reakci jsem ukončil, jakmile došlo k homogenizaci reakční směsi (cca 15 min). Poté bylo provedeno zpracování reakční směsi obvyklým způsobem. Výtěžek byl v tomto případě srovnatelný (88 %).

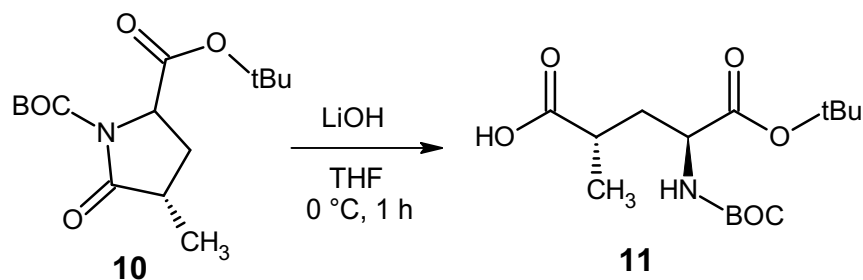
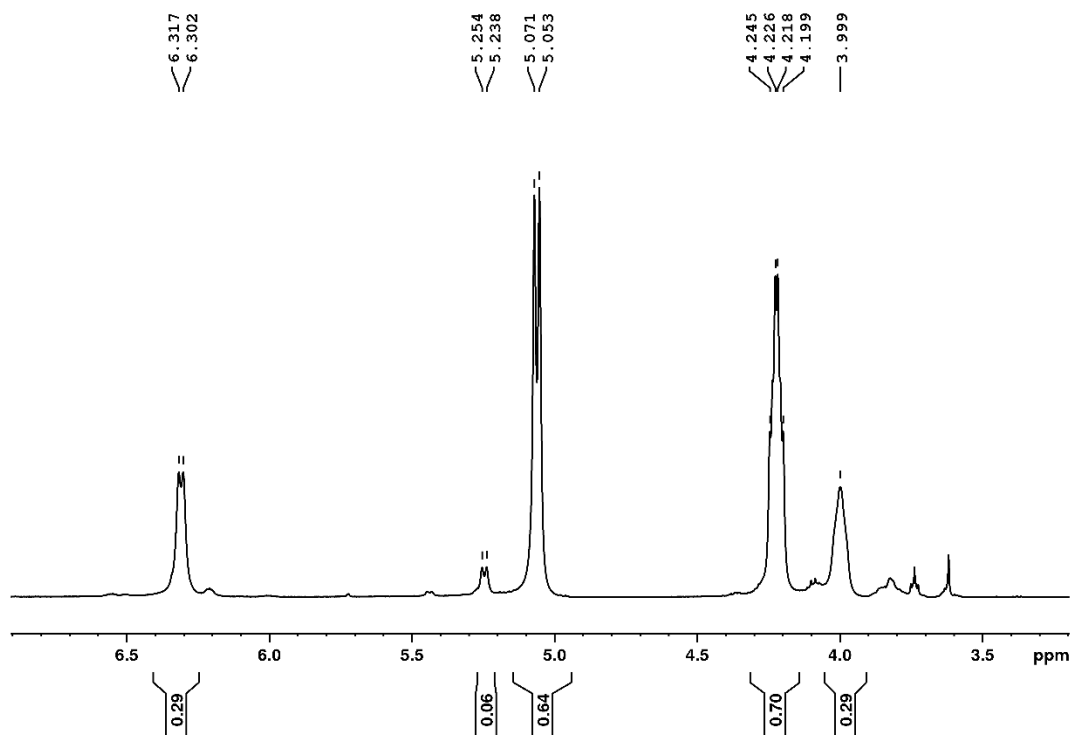
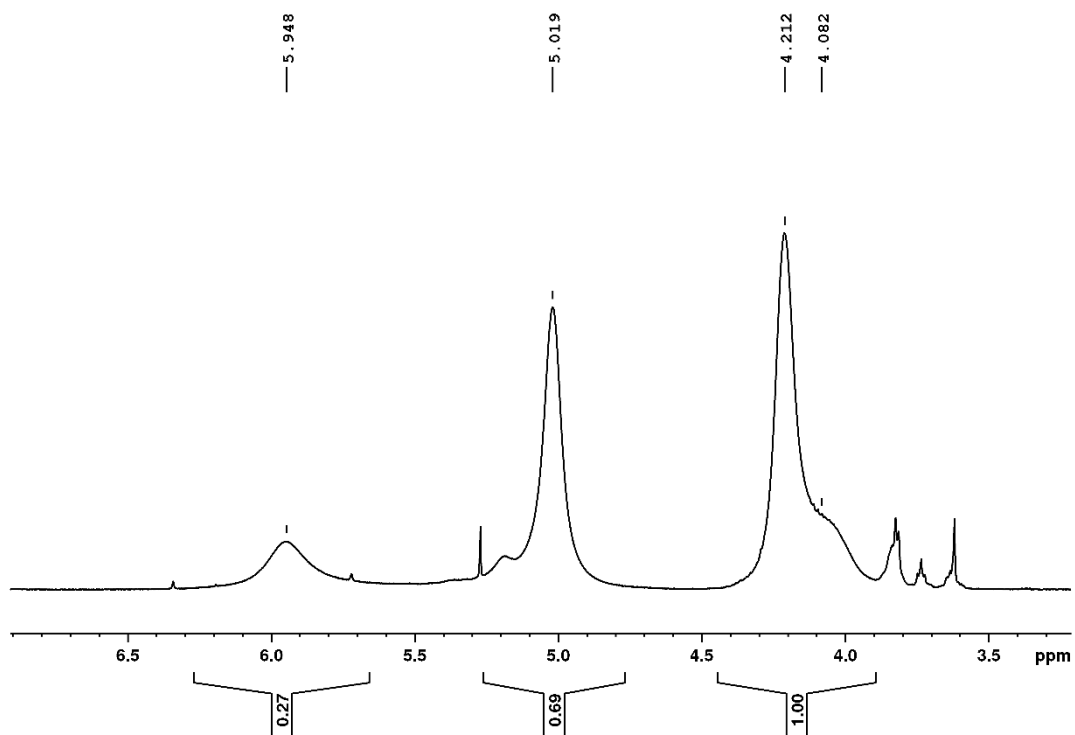


Schéma 19: Otevření laktamového kruhu

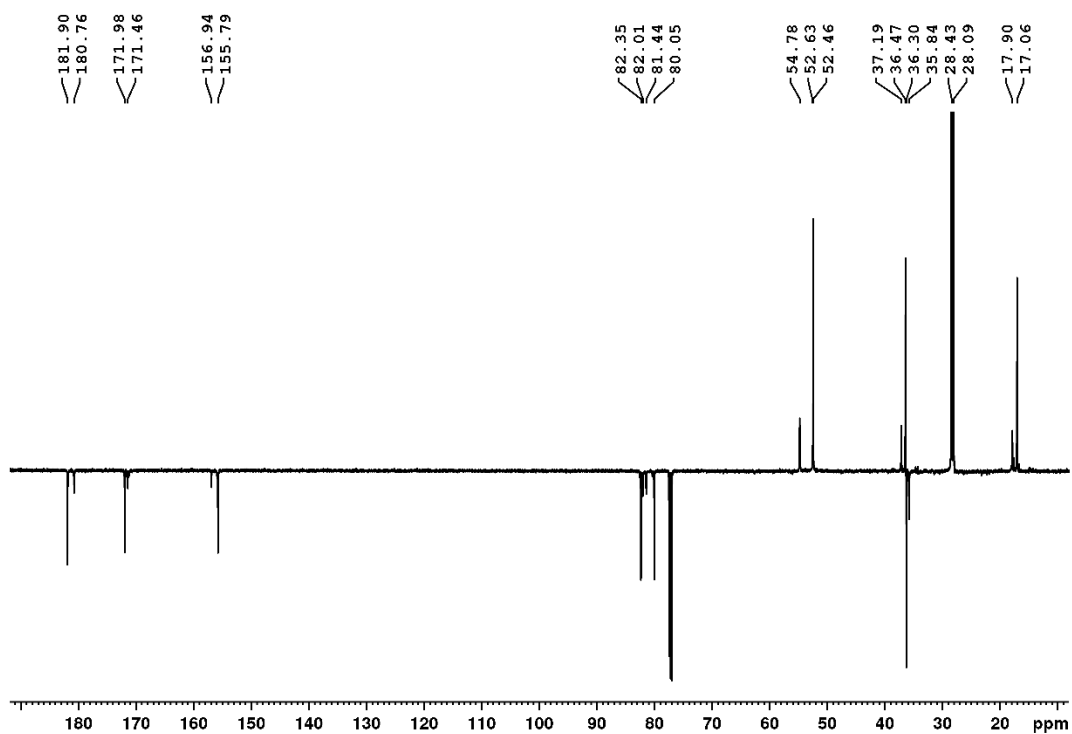
Strukturu produktu **11** jsem potvrdil pomocí ^1H NMR spektroskopie v $\text{MeOD-}d_4$, kdy byly ve spektru nalezeny signály se stejným chemickým posunem, jaké jsou uvedeny v literatuře^[35]. Měřením ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie v CDCl_3 jsem v spektrech v případě některých skupin pozoroval dvojici signálů (Obr. 5, 6, 7, a 8), která v součtu odpovídala zastoupení přítomných atomů vodíku v dané skupině. Předpokládám, že se vzhledem k přítomnosti stericky náročných skupin Boc- a $\text{COO}t\text{Bu}$ jedná pravděpodobně o rotamery. Tuto hypotézu jsem se rozhodl ověřit změřením ^1H a ^{13}C NMR spekter při vyšší teplotě. Vzhledem k použití CDCl_3 bylo měření provedeno při $50\text{ }^\circ\text{C}$. Jak je zřejmé z porovnání části spekter při teplotě $20\text{ }^\circ\text{C}$ a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (Obr. 5 vs 6.), dochází v případě vyšší teploty k určité koalescenci dvojic signálů, která je způsobena rychlejší výměnou mezi jednotlivými rotamery.



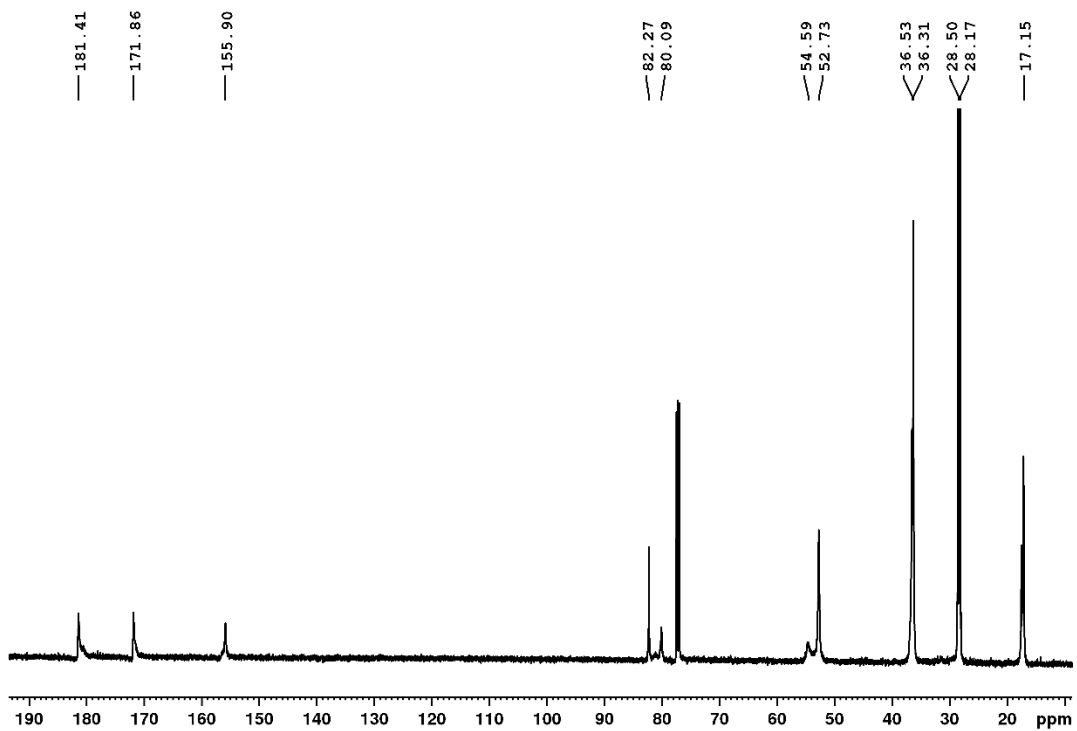
Obr. 5: Výřez ^1H NMR spektra sloučeniny **11** měřené při 20 °C (skupiny $-\text{NH}-\text{CO}-$ a $\text{NH}-\text{CH}-\text{COOR}$)



Obr. 6: Výřez ^1H NMR spektra sloučeniny **11** měřené při 50 °C (skupiny $-\text{NH}-\text{CO}-$ a $\text{NH}-\text{CH}-\text{COOR}$)

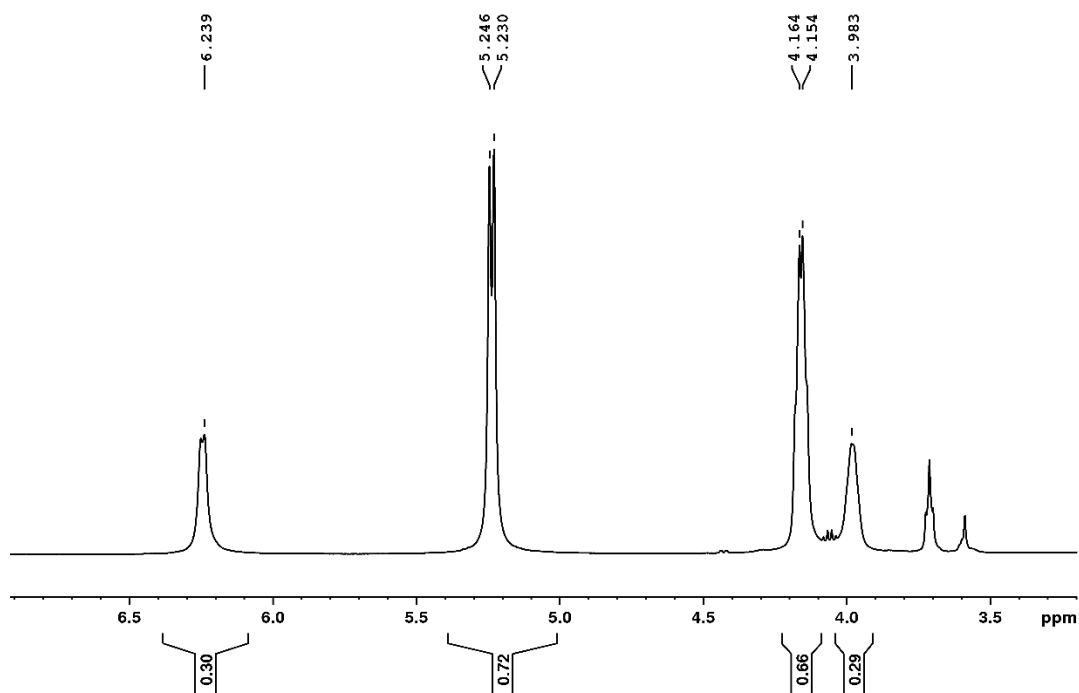


Obr. 7: ^{13}C NMR (APT technika) spektrum sloučeniny **11** měřené při 20 °C.

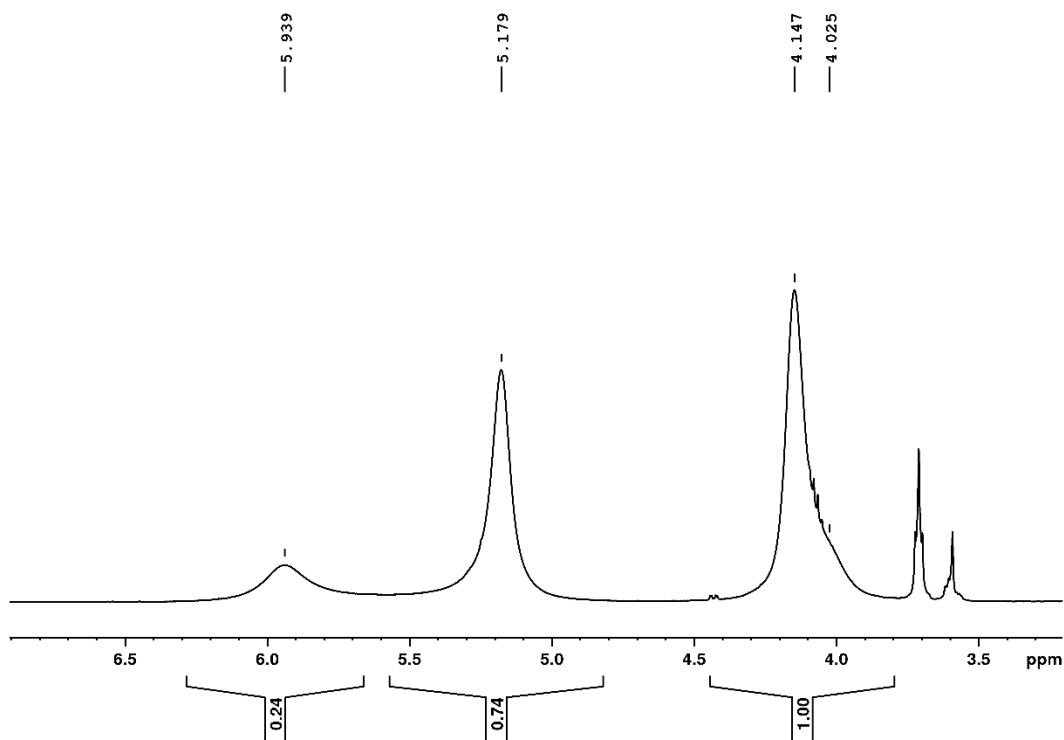


Obr. 8: ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **11** měřené při 50 °C.

Podobný efekt byl pozorován v ^1H a ^{13}C NMR spektroskopech, měřených v CDCl_3 , pro α -*tert*-butylester *N*-Boc-glutamové kyseliny. Tu jsem připravil za účelem provedení uvedené spektrální studie bazickou hydrolyzou sloučeniny **2** za stejných podmínek, které jsou uvedeny pro syntézu sloučeniny **11** ze sloučeniny **10**. Z dvojice obrázků 9 a 10 je zřejmé, že rovněž v případě tohoto derivátu dochází k značně podobnému vzniku rotamerů. U této sloučeniny nelze dvojici signálů vysvětlit vznikem dvojice epimerů (zde v poměru 3:7). Tato sloučenina totiž obsahuje pouze jedno stereogenní centrum, a proto může vytvářet pouze směs dvou enantiomerů, které jsou ovšem při standardní NMR spektroskopii nerozlišitelné.



Obr. 9: Výřez ^1H NMR spektra α -terc-butylesteru *N*-Boc-glutamové kyseliny měřené při 20 °C (skupiny -NH-CO- a NH-CH-COOR)



Obr. 10: Výřez ^1H NMR spektra α -terc-butylesteru *N*-Boc-glutamové kyseliny měřené při 50 °C (skupiny -NH-CO- a NH-CH-COOR)

Jak je patrné z Obr. 9., sloučenina **11** obsahuje přibližně 5 % nežádoucího diastereoizomeru (2*S*,4*R*)-, který je reprezentován signálem skupiny -NH-CO- s chemickým posunem $\delta = 5,24$ ppm. Nalezená hodnota specifické otáčivosti $[\alpha]_D^{20} = -23,50$ ($c = 1,03$; MeOH) je srovnatelná s hodnotou ($[\alpha]_D^{22} = -12,0$ ($c 1,9$; MeOH)) nalezenou v literatuře^[35].

V případě syntézy 4-fluorbenzylamidu chráněné kyseliny 4-methylglutamové **12** jsem opět vycházel z literárního předpisu popisujícího syntézu analogického amidu 4-methylglutamové kyseliny^[24]. Ve srovnání s tímto syntetickým postupem jsem ovšem použil jiné rozpouštědlo. Místo hydrofobického THF jsem zvolil extra suchý DCM. Rovněž jsem zvýšil přebytek činidel (HBTU, TEA a NMM) a aminového reaktantu, a to z 1,5 ekv. na 2 ekv. Dále jsem prodloužil reakční čas. Místo 3 h jsem nechal směs reagovat při laboratorní teplotě po dobu 2 dní. Vzhledem k použití rozpouštědla nemísitelného s vodou, jsem před vlastní chromatografickou izolací požadovaného produktu provedl promytí reakční směsi vodou, která vedla k odstranění značného podílu přítomných solí, které v surovém produktu tvoří balastní příměs. Izolaci produktu jsem optimalizoval pomocí TLC, jako nejvhodnější chromatografický systém jsem vyhodnotil mobilní fáze – směs hexan:AcOEt 1:1; SiO₂. Separaci produktu jsem provedl s využitím preparativního flash-chromatografu, v systému SiO₂; gradient hexan:AcOEt 20:1 → hexan:EtOAc 50:50 (v/v)). Produkt jsem izoloval ve výtěžku 70 %, což je hodnota srovnatelná s výtěžkem přípravy analogického amidu (76 %)^[24].

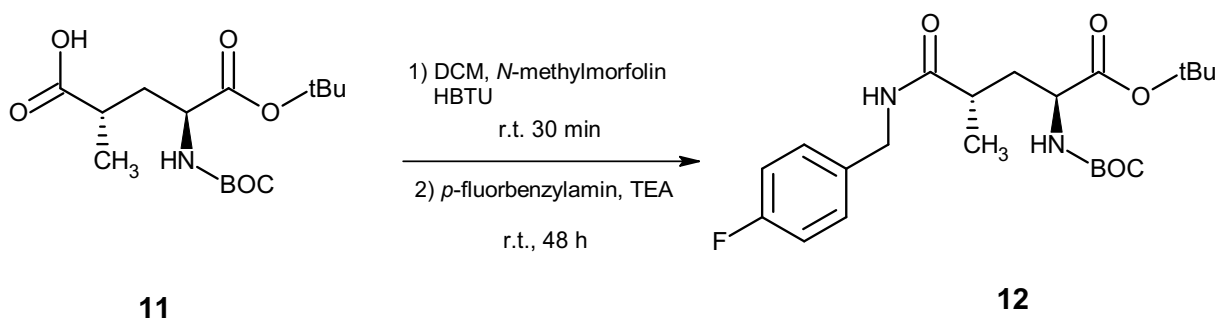


Schéma 20: Reakce chráněné 4-methylglutamové kyseliny s *p*-fluorbenzylaminem

V posledním reakčním kroku jsem provedl ochránění karboxylové a aminové skupiny v intermediátu **12**. V případě syntézy amidů 4-methylglutamové kyseliny bylo odstranění *t*Bu- a Boc- skupiny provedeno v prostředí TFA v DCM (1:4) při laboratorní teplotě. Bohužel však, v postupu není uvedena reakční doba^[24]. U sloučeniny **7** došlo působením směsi TFA:DCM (1:4) při laboratorní teplotě po dobu 2 h pouze k odstranění skupiny Boc-, zatímco esterová skupina zůstala v molekule z větší části zachována. Tento poznatek vyplýval z analýzy

^1H NMR spektra produktu, ve kterém byl nalezen jediný signál pro *t*Bu- skupinu $\delta = 1,50$ ppm a rovněž z analýzy ^{13}C NMR spektra, které obsahovalo signály esterové skupiny $\delta = 169,5$ ppm a *t*Bu- skupiny $\delta = 85,4$ a $28,1$ ppm. Prodloužení reakční doby na 8 h již vedlo k odstranění skupiny *t*Bu-, za vzniku požadovaného produktu **13**. Ten jsem ovšem získal ve formě soli s TFA, což je zřejmé z přítomnosti signálů v ^{13}C NMR spektru, které odpovídají CF_3COO^- aniontu ($\delta = 162,5$ ppm, $J = 35$ Hz a $\delta = 117,9$ ppm, $J = 290$ Hz). To je v rozporu s prací^[24] popisující syntézu analogických 4-methylglutaminových derivátů, ve které autoři uvádějí, že produktem je příslušná aminokyselina ve formě zwitteriontu. Nicméně lze předpokládat, že v organismu se tento typ sloučenin patřící do kategorie α -aminokyselin, může vyskytovat jak ve formě zwitteriontu, tak i ve formě soli s jinými anionty (přítomnost skupiny $-\text{NH}_3^+$) či kationty (přítomnost skupiny $-\text{COO}^-$).

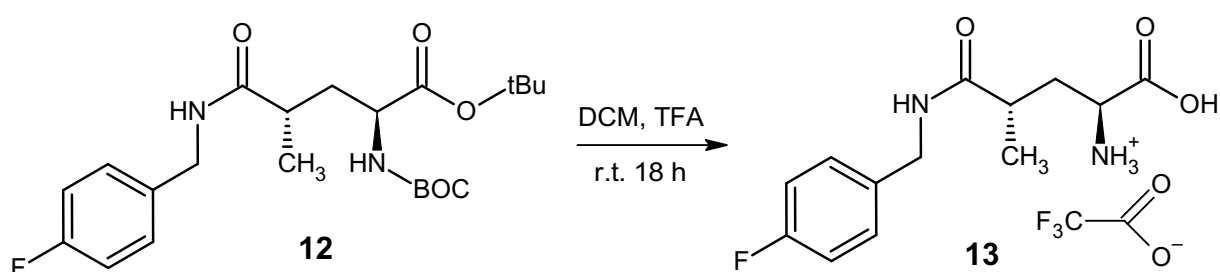


Schéma 21: Syntéza soli (trifluoracetátu) amidu 4-methylglutamové kyseliny

Vzhledem k faktu, že cílová sloučenina je tímto způsobem připravena ve formě amoniové soli obsahující anion příslušné kyseliny použité pro deprotekcí chránících skupin, rozhodl jsem se otestovat možnost provedení deprotekcí sloučeniny **12** v prostředí 4M HCl v 1,4-dioxanu. Trifluoracetát totiž nelze na rozdíl od chloridu považovat za přirozeně se vyskytující anion. Reakci jsem provedl při laboratorní teplotě a na základě předchozího postupu jsem nastavil reakční čas na 20 h. Reakční médium jsem následně odstranil vakuovou destilací. Pomocí NMR spektroskopie jsem zjistil, že za těchto reakčních podmínek došlo k úplnému odstranění obou chránících skupin za vzniku sloučeniny **14**.

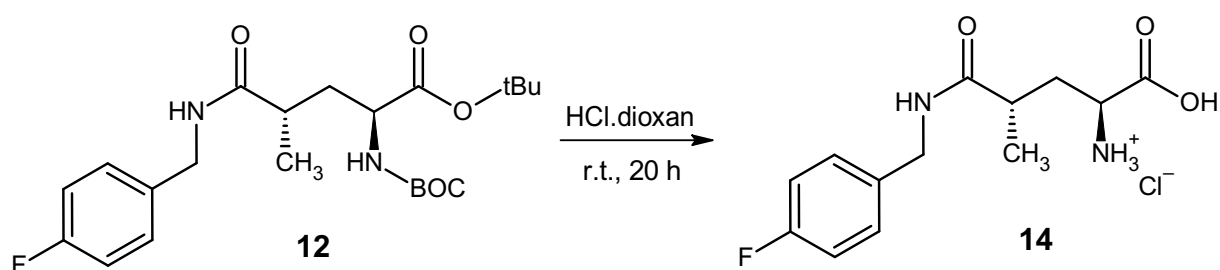


Schéma 22: Syntéza soli (hydrochloridu) amidu 4-methylglutamové kyseliny

Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem syntetizoval dosud nepopsané *N*-substituované deriváty L-4-methylglutaminu – trifluoracetát (**13**) resp. hydrochlorid (**14**) *N*-4-fluorbenzyl-4-methyl-L-glutaminu. Tato sloučeniny byly připraveny jakožto potenciální inhibitory proliferace nádorových buněk, především nádorů prsu. Syntetická metoda vedoucí k výše uvedeným sloučeninám zahrnovala celkem sedm reakčních kroků. Většina z těchto reakčních kroků již byla popsána dříve v literatuře a vedla k intermediátům, pro které jsou v literatuře známa charakterizační data.

Při syntéze jsem vycházel z L-pyroglutamové kyseliny (**1**), kterou jsem působením *tert*-butyl-acetátu v kyselém prostředí převedl na příslušný *tert*-butyl-ester **2** s výtěžkem 56 %. Následně jsem v dalším reakčním kroku provedl chránění amidového atomu dusíku, a to zavedením skupiny Boc-, s velmi vysokým výtěžkem 99 %. Následovala reakce takto modifikovaného derivátu L-pyroglutamové kyseliny **3** s tzv. Brederockovým činidlem, kterým jsem substituoval pozici 4- dimethylaminomethylenovou skupinou za vzniku intermediátu **9**. Tuto sloučeninu **9**, získanou v dobrém výtěžku 68 %, jsem podrobil katalytické hydrogenaci, při které došlo k transformaci 4-dimethylaminomethylenové skupiny na 4-methyl substituent. Reakční podmínky hydrogenace jsem optimalizoval za účelem co nejvyššího diastereoizomerního přebytku (cca 90 % *de*) ve vznikajícím methylderivátu **10** a maximalizace výtěžku (97 %). Poté jsem provedl bazickou hydrolyzu laktamového cyklu derivátu **10** za vzniku chráněné L-4-methylglutamové kyseliny **11** ve vysokém výtěžku 94 %. Karboxylovou kyselinu **11** jsem přeměnil na příslušný *N*-4-fluorbenzylamid **12**. Pro aktivaci karboxylové funkční skupiny jsem použil činidlo HBTU, v kombinaci s bázemi NMM a TEA. Amidový produkt **12**, který je dosud nepopsanou sloučeninou, jsem získal po chromatografické separaci v 70% výtěžku. V posledním reakčním kroku jsem provedl odstranění chránících skupin aminové a α -karboxylové funkční skupiny derivátu **12**, a to v prostředí kyselého media. Použil jsem směs TFA:DCM (1:4) za vzniku trifluoracetátu *N*-4-fluorbenzyl-4-methyl-L-glutaminu (**13**) a 4M HCl v 1,4-dioxanu za vzniku analogického hydrochloridu **14**. V obou případech byl výtěžek deprotekcí reakce velmi vysoký (xx % pro **13** resp. 98 % pro **14**). Jednotlivé intermediáty **2**, **3**, **9–12** a finální *N*-substituované deriváty L-4-methylglutaminu **13** a **14** jsem charakterizoval bodem tání, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopií, IČ spektroskopií a stanovil jsem specifickou optickou otáčivost.

Připravené *N*-substituované deriváty L-4-methylglutaminu **13** a **14** budou poskytnuty spolupracujícímu pracovišti (KBBV, UPCE) pro studium inhibice růstu nádorových buněčných linií rakoviny prsu.

Literatura

1. TARDITO, Saverio., OUDIN, Anaïs., AHMED, U. Shafiq., FACK, Fred., KEUNEN, Olivier., ZHENG, Liang., MILETIC, Hrvoje., SAKARIASSEN, Øystein Per., WEINSTOCK, Adam., WAGNER, Allon., LINDSAY, L. Susan., HOCK, K. Andreas., BARNETT, C. Susan., RUPPIN, Eytan., MØRKVE, H. Svein., LUND-JOHANSEN, Morten., CHALMERS, J. Anthony., BJERKVIG, Rolf., NICLOU, P. Simone., GOTTLIEB, Eyal.: Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nature Cell Biology*, **2015**, *17*, 1556-1568. DOI: 10.1038/ncb3272.
2. NGUYEN, Tra-Ly., DURÁN, V. Raúl.: Glutamine metabolism in cancer therapy. *Cancer Drug Resistance*. **2018**, *1* (3), 126-138. DOI: 10.20517/cdr.2018.08.
3. BERGSTRÖM, J., FÜRST, P., NORÉE, L.-O., VINNARS, E.: Intracellular free amino acids concentration in human muscle tissue. *Journal of Applied Physiology*. **1974**, *36* (6), 693-697. DOI: 10.1152/jappl.1974.36.6.693.
4. ALUR, M. D. Methabolic Pathways – Nitrogens Metabolism. In: ROBINSON, K. Richard (ed). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 1-3. San Diego: Academic Press, 1999. s. 1288-1298. ISBN 0-12-227070-3.
5. STUMVOLL, Michael., PERRIELLO, Gabriele., MEYER, Christian., GERICH, John.: Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International*. **1999**, *55* (3), 778-792. DOI: 10.1046/j.1523.1999.055003778.x.
6. CLUNTUN, A. Ahmad., LUKEY, J. Michale., CERIONE. A. Richard., LOCASALE, W. Jason.: Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*. **2017**, *3* (3), 169-180. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.01.005.

7. TIMMERMAN, A. Luika., HOLTON, Thomas., YUNEVA, Mariia., LOUIE, J. Raymond., PADRÓ, Marcè., DAEMEN, Anneleen., HU, Min., CHAN, A. Denise., ETHIER, P. Stephen., VAN'T VEER, J. Laura., POLYAK, Kornelia., MCCORMICK, Frank., GRAY, W. Joe.: Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target. *Cancer Cell*. **2013**, *24* (4), 450-465. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.020.
8. PAVLOVA, N. Natalya., THOMPSON, B. Craig.: The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. **2016**, *23* (1), 24-27. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
9. DEBERARDINIS, J. Ralph., CHANDEL, S. Navdeep.: Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*. **2016**, *2* (5), e1600200. DOI: 10.1126/sciadv.1600200.
10. ALTMAN, J. Brian., STINE, E. Zachary., DANG, V. Chi.: From Kreb to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*. **2016**, *16* (10), 619-634. DOI: 10.1038/nrc.2016.71.
11. HATZIVASSILIOU, Georgia., ZHAO, Fangping., BAUER, E. Daniel., ANDREADIS, Charalambos., SHAW, N. Anthony., DHANAK, Dashyant., HINGORANI, R. Sunil., TUVESON, A. David., THOMPSON, B. Craig.: ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. **2005**, *8* (4), 311-321. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.09.008.
12. NICKLIN, Paul., BERGMAN, Philip., ZHANG, Bailin., TRIANTAFELLOW, Ellen., WANG, Henry., NYFELER, Beat., YANG, Haidi., HILD, Marc., KUNG, Charles., WILSON, Christopher., MYER, E. Vic., MACKEIGAN, P. Jeffrey., PORTER, A. Jeffrey., WANG, Y. Karen., CANTLEY, C. Lewis., FINAN, M. Peter., MURPHY, O. Leon.: Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. **2009**, *136* (3), 521-534. DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.044.

13. ZACK, I. Trevis., SCHUMACHER, E. Steven., CARTER, L. Scott., CHERNIACK, D. Andrew., SAKSENA, Gordon., TABAK, Barbara., LAWRENCE, S. Michael., ZHANG, Zhong-Cheng., WALA, Jeremiah., MERMEL, H. Craig., SOUGENZ, Carrie., GABRIEL, B. Stacey., HERNANDEZ, Bryan., SHEN, Hui., LAIRD, W. Peter., GETZ, Gad., MEYERSON, Matthew., BEROUKHIM, Rameen.: Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nature Genetics*, **2013**, *45*, 1134-1140. DOI: 10.1038/ng.2760.
14. LI, Shiqi., ZENG, Hui., FAN, Julin., WANG, Fubing., XU, Chen., LI, Yirong., TU, Jiancheng., NEPHEW, P. Kenneth., LONG, Xinghua.: Glutamine metabolism in breast cancer and possible therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*, **2023**, *210* (115464). DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115464.
15. YUNEVA, Mariia., ZAMBONI, Nicola., OEFNER, Peter., SACHIDANANDAM, Ravi., LAZEBNIK, Yuri.: Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *Journal of Cell Biology*. **2007**, *178* (1), 93-105. DOI: 10.1083/jcb.200703099.
16. SHORFF, H. Emelyn., EBERLIN, S. Livia., DANG, M. Vanessa., GOUW, M. Arvin., GABAY, Meital., ADAM, J. Stacey., BELLOVIN, I. David., TRAN, T. Phuoc., PHILBRICK, M. William., GARCIA-OCANA, Adolfo., CASEY, C. Stephanie., LI, Yulin., DANG, V. Chi., ZARE, N. Richard., FLESHER, W. Dean.: MYC oncogene overexpression drives renal cell carcinoma in a mouse model through glutamine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2015**, *112* (21), 6539-6544. DOI: 10.1073/pnas.1507228112.
17. GROSS, I. Matt., DEMO, D. Susan., DENNISON, B. Jennifer., CHEN, Lijing., CHERNOV-ROGAN, Tania., GOYAL, Bindu., JANES, R. Julie., LAIDIG, J. Guy., LEWIS, R. Evan., LI, Jim., MACKINNON, L. Andrew., PARLATI, Francesco., RODRIGUEZ, M. L. Mirna., SHWONEK, J. Peter., SJOGREN, B. Eric., STANTON, F. Timothy., WANG, Taotao., YANG, Jinfu., ZHAO, Frances., BENNETT, K. Mark.: Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. **2014**, *13* (4), 890-901. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0870.

18. DAVIDSON, M. Shawn., PAPAGIANNAKOPOULOS, Thales., OLENCHOCK, A. Benjamin., HEYMAN, E. Julia., KEIBLER, A. Mark., LUENGO, Alba., BAUER, R. Matthew., JHA, K. Abhishek., O'BRIEN, P. James., PIERCE, A. Kerry., GUI, Y. Dan., SULLIVAN, B. Lucas., WASYLENKO, M. Thomas., SUBBARAJ, Lakshmipriya., CHIN, R. Christopher., STEPHANOPOLOUS, Gregory., MOTT, T. Bryan., JACKS, Tyler., CLISH, B. Clary., VANDER HEIDEN, G. Matthew.: Environment Impacts the Metabolis Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metabolism*. **2016**, *23* (3), 517-528. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.01.007.
19. MARIN-VALENCIA, Isaac., YANG, Chendong., MASHIMO, Tomoyuki., CHO, Steve., BAEK, Hyeonman., YANG, Li-Xiao., RAJAGOPALAN, N. Kartik., MADDIE, Melissa., VEMIREDDY, Vamsidhara., ZHAO, Zhenze., CAI, Ling., GOOD, Levi., TU, P. Benjamin., HATANPAA, J. Kimmo., MICKEY, E. Bruce., METÉS, M. José., PASCUAL, M. Juan., MAHER, A. Elizabeth., MALLOY, R. Craig., DEBERARDINIS, J. Ralph., BACHOO, M. Robert.: Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse, human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metabolism*. **2012**, *15* (6), 827-837, DOI: 10.1016/j.cmet.2012.05.001.
20. LEE, Pearl., MALIK, Dania., PERKONS, Nicholas., HUANGYANG, Peiwei., KHARE, Sanika., RHOADES, Seth., GONG, Yu-Yao., BURROWS, Michelle., FINAN, M. Jennifer., NISSIM, Itzhak., GADE, F. P. Terence., WELJIE, M. Aalim, SIMON, M. Celeste.: Targeting glutamine metabolism slows soft tissue sarcoma growht. *Nature Communications* .**2020**, *11* (498). DOI: 10.1038/s41467-020-14374-1.
21. DELGIR, Soheila., BASTAMI, Milad., ILKHANI, Khandan., SAFI, Asma., SEIF, Farhad., ALIVAND, Reza Mohammad.: The pathways related to glutamine metabolism, glutamine inhibitors and their implication for improving the efficiency of chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Mutation Research, Reviews in mutation research*. **2021**, *787* (108366). DOI: 10.1016/j.mrrev.2021.108366.

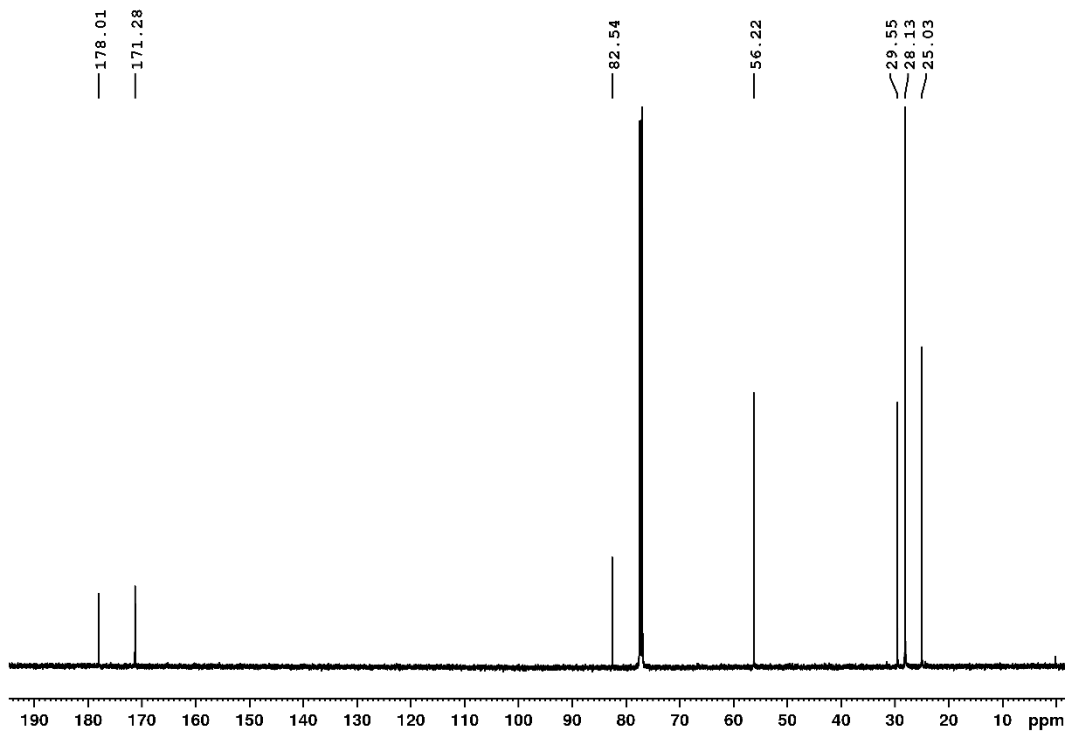
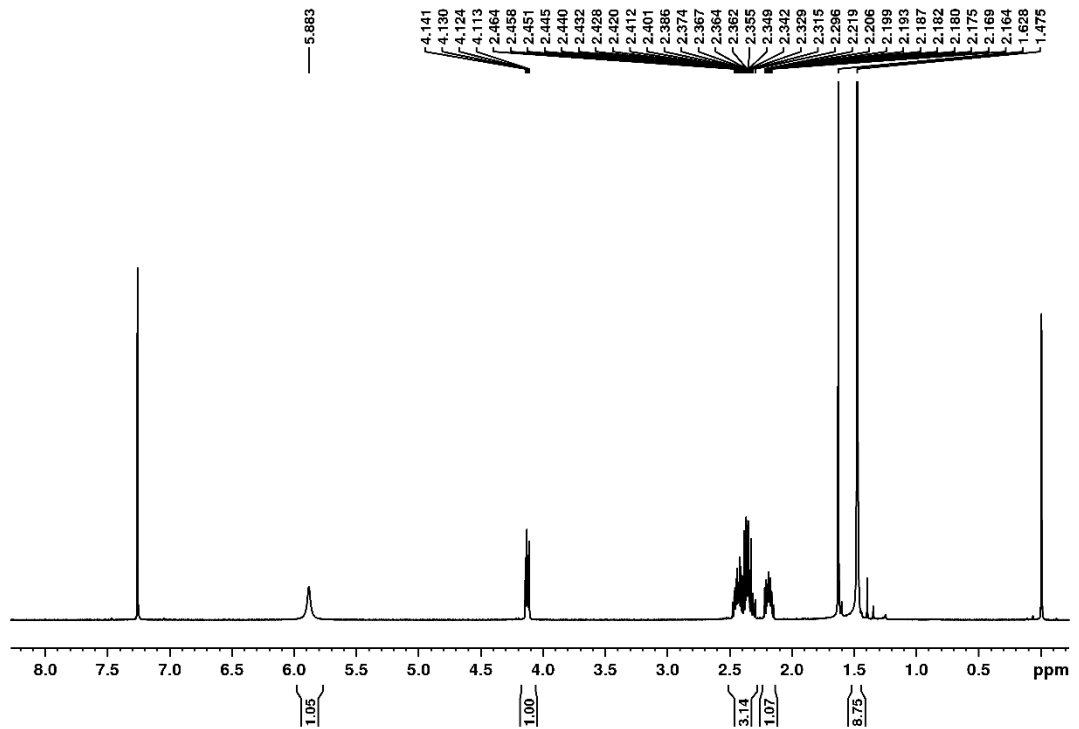
22. MENEZES DOS REIS, Larissa., ADAMOSKI, Douglas., ORNITZ OLIVIERA SOUZA, Rodolpho., RODRIGUES ASCENÇÃO, Fernanda Caroline., SOUSA DE OLIVIERA, Ratna Krishina., CORRÊA-DA-SILVA, Filipe., MALTA DE SÁ PATRONI, Fábio., MEIRA DIAS, Marília., CONSONNI, Roberto Sílvio., MENDES DE MORAES-VIEIRA, Manoel Pedro., SILBER, Mariano Ariel., GOMES DIAS, Martha Sandra.: Dual inhibition of glutaminase and carnitine palmitoyltransferase decreases growth and migration of glutaminase inhibition – resistant triple-negative breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. **2019**, 294 (24), 9342-9357. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008180.
23. YU, Cancan., WANG, Ningning., CHEN, Xiangwu., JIANG, Yue., LUAN, Yuxia., QIN, Wen., HE, Wanxiu.: A photodynamic-mediated glutamine metabolic intervention nanodrug for triple negative breast cancer. *Materials Today Bio*. **2023**, 19 (100577). DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100577.
24. HOSSAIN, Imran., THOMAS, G. Ajit., MAHDI, Fakhir., ADAM, T. Amna., AKINS, S. Nicholas., WOODARD, M. Morgan., PARIS, J. Jason., SLUSHER, S. Barbara., LE, V. Hoang.: An efficient synthetic route to *L*- γ -methyleneglutamine and its amide derivatives, and their selective anticancer activity. *RSC Advances*. **2021**, 11 (13), 7115-7128. DOI: 10.1039/d0RA08249j.
25. NACHEF, Marianna., ALI, Kassim Alla., ALMUTAIRI, Musaed Saeedah., LEE, Seung-Hwan.: Targeting SLC1A5 and ALS3A2/SLC7A5 as a Potential Strategy to Strengthen Anti-Tumor Immunity in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. **2021**, 12 (624324). DOI: 10.3389/fimmu.2021.624324.
26. SOKOLOV, M. Aidan., HOLMBERG, C. Jannie., FELICIANO, M. David.: Thea minor acid transporter SLC7A5 regulates the mTOR pathway and is required for granule cell development. *Human molecular genetics*. **2020**, 29 (18), 3003-3013. DOI: 10.1093/hmg/ddaa186.

27. VAN GELDERMALSEN, Michelle., WANG, Qiguang., NAGARAJAH, Rani., MARSHALL, D. Amy., THOENG, Annora., GAO, Daming., RITCHIE, William., FENG, Yuanning., BAILEY, G. Charles., DENG, Nan., HARVEY, Kate., MCNEIL BEITH, Jane., SELINGER, I. Christina., O'TOOLE, A. Sandra., RASKO, J. E. John., HOLST, J. Jens.: ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumor growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*. **2016**, 35 (24), 3201-3208. DOI: 10.1038/onc.2015.381.
28. RITCHIE, W. A. James., BAIRD, E. Fiona., CHRISTIE, R. Graham., STEWART, Alison., LOW, Y. Sylvia., HUNDAL, S. Harinder., TAYLOR, M. Peter.: Mechanism of Glutamine Transport in Rat Adipocytes and Acute Regulation by Cell Swelling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2001**, 11 (5), 259-270. DOI: 10.1159/000047812.
29. HARA, Yuta., MINAMI, Yushi., YOSHIMOTO, Soshi., HAYASHI, Natsumi., YAMASAKI, Akitaka., UEDA, Shiho., MASUKO, Kazue., MASUKO, Takashi.: Anitumor effects of an antagonistic mAB against the ASCT2 amino acid transporter on KRAS-mutated human colorectal cancer cells. *Cancer medicine*. **2020**, 9 (1), 302-312. DOI: 10.1002/cam4.2689.
30. CORMERAIS, Yann., MASSARD, André Pierre., VUCETIC, Milica., GIULIANO, Sandy., TAMBUTTÉ, Eric., DURIVALUT, Jerome., VIAL, Valérie., ENDOU, Hitoshi., WEMPE, F. Michael., PARKS, K. Scott., POUYSSEGUR, Jacques.: The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *The Journal of biological chemistry*. **2018**, 293 (8), 2877-2887. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001342.
31. JU, YoungJun., BEN-DAVID, Yaacov., ROTIN, Daniela., ZACKSENHAUS, Eldad.: Inhibition of eEF2K synergizes with glutaminase inhibitor or 4EBP1 depletion to suppress growth of triple-negative breast cancer cells. *Scientific reports*, **2021**, 11 (1), 9181. DOI: 10.1038/s41598-021-88816-1.
32. FURUYA, Mio., HORIGUCHI, Jun., NAKAJIMA, Hiroki., KANAI, Yoshikatsu., OYAMA, Tetsunari.: Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. **2012**, 103 (2), 382-389. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02151.x.

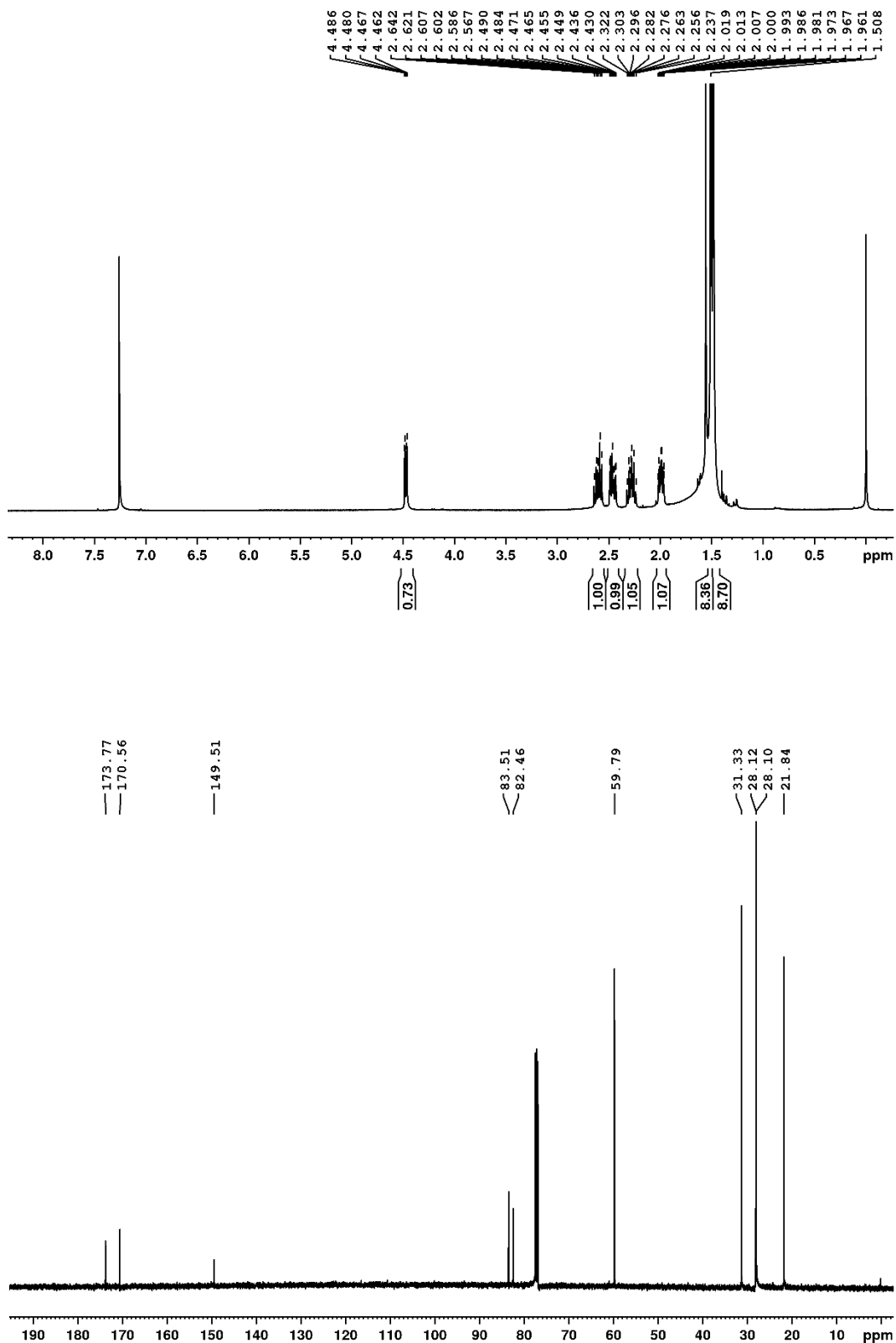
33. OZGÜR, Burak., HELMS CEDERBERG, Christian Hans., TORNABENE, Erica., BRODIN, Birger.: Hypoxia increases expression of selected blood-brain barrier transporters GLUT-1, P-gp, SLC7A5 and TFRC, while maintaining barrier integrity, in brain capillary endothelial monolayers. *Fluids and barriers of the CNS*. **2022**, *19* (1), 1. DOI: 10.1186/s12987-021-00297-6.
34. KHAN, H. Imdadul., MAHDI, Fakhir., PENFORNIS, Patrice., AKINS, S. Nicholas., HOSSAIN, Imran., KIM, Jong Seong., SULOCHANA, P. Suresh., ADAM, T. Amna., TRAN, D. Tristan., TAN, Chalet., CLAUDIO, Paolo Pier., PARIS, J. Jason., LE, V. Hoang.: Synthesis and biological evaluation of tert-butyl ester and ethyl ester prodrugs of L- γ -methyleneglutamic acid amides for cancer. *Bioorganic and medicinal chemistry*. **2023**, *17* (117137). DOI: 10.1016/j.bmc.2022.117137.
35. AUGUST, A. Ryan., KHAN, A. Jeffrey., MOODY, M. Clarie., YOUNG, W. Douglas.: Stereospecific synthesis of (2S,4R)-[5,5,5- $^2\text{H}_3$]leucine. *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1*. **1996**, (6), 507-514. DOI: 10.1039/P19960000507.
36. COUDERT, Elisabeth., ACHER, Francine., AZERAD, Robert.: A Convenient and Efficient Synthesis of (2S,4R)- and (2S,4S)-4-Methylglutamic Acid. *Synthesis*. **1997**, (8), 863-865. DOI: 10.1055/s-1997-1274.
37. CAPORALE, Andrea., O'LOUGHLIN, Jennie., ORTIN, Yannick., RUBINI, Mariana.: A convenient synthetic route to (2S,4S)-methylproline and its exploration for protein engineering of thioredoxin. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2022**, *32* (20), 6324-6328. DOI: 10.1039/D2OB01011A.

4. Příloha

4.1. (*S*)-*tert*-butyl-pyroglytamát (2) (^1H a ^{13}C NMR spektra)

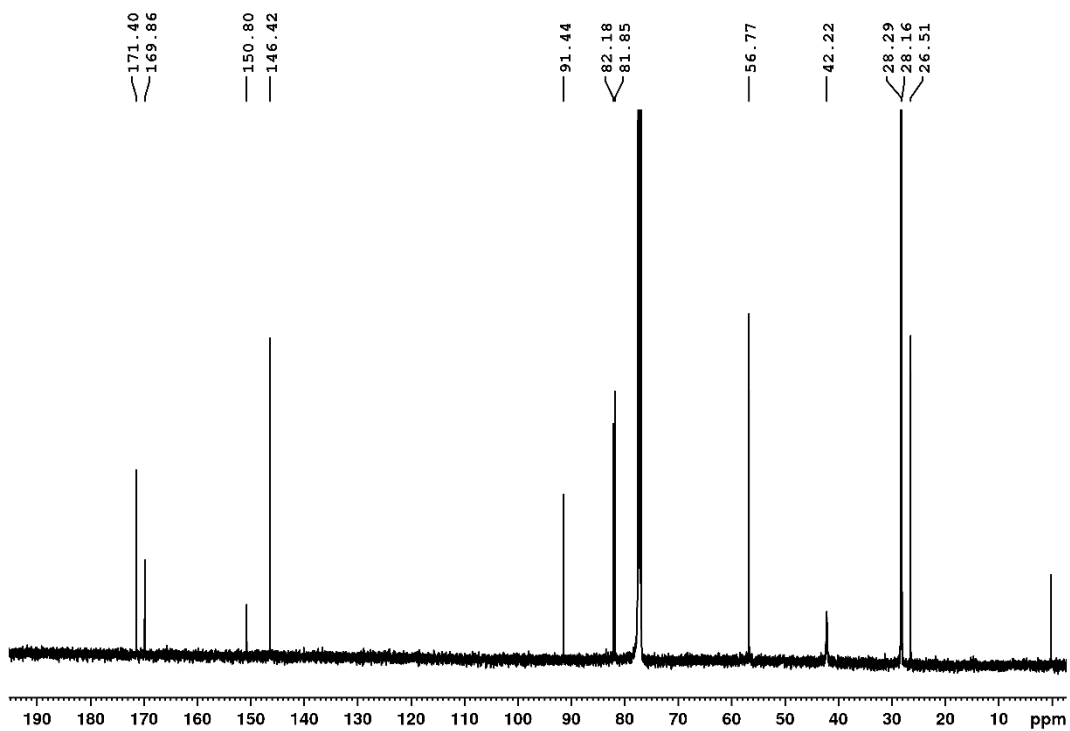
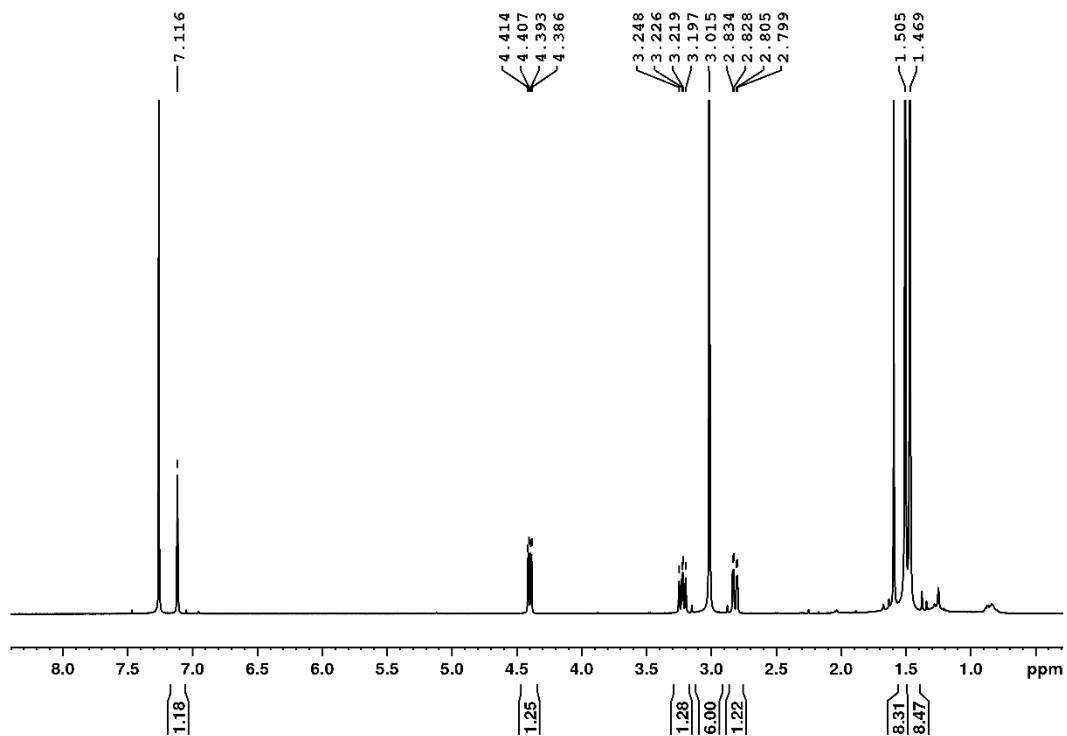


4.2. (*S*)-*tert*-butyl-*N-tert*-butoxykarbonilpyroglutamát (3) (^1H a ^{13}C NMR spektra)

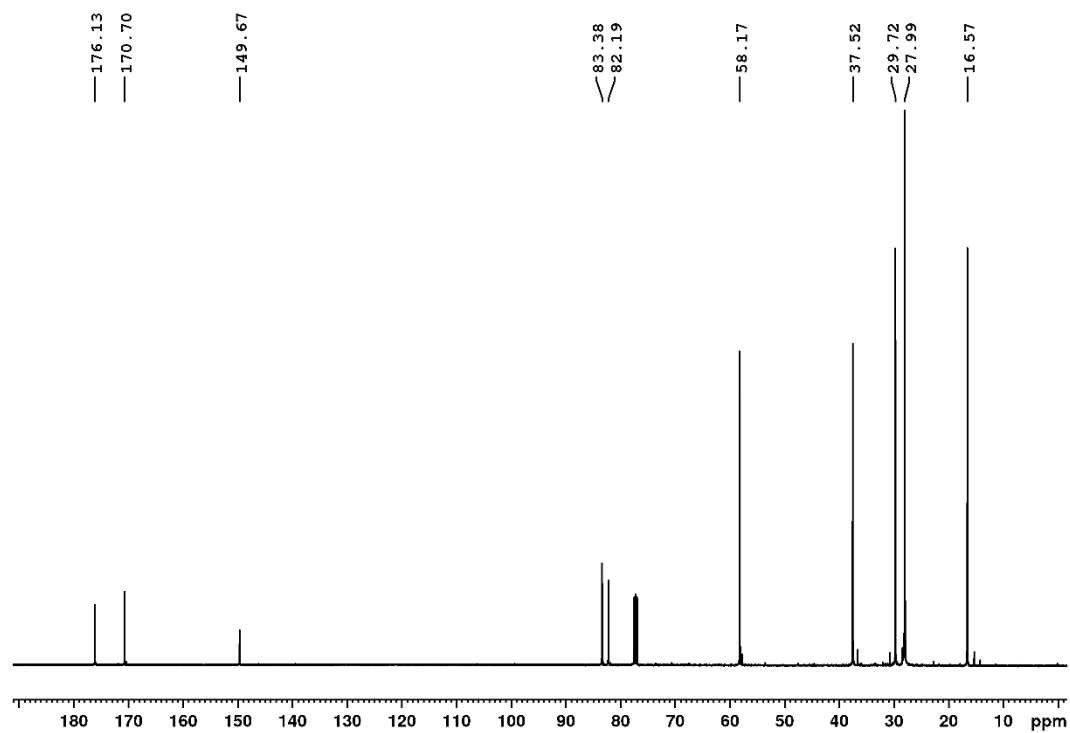
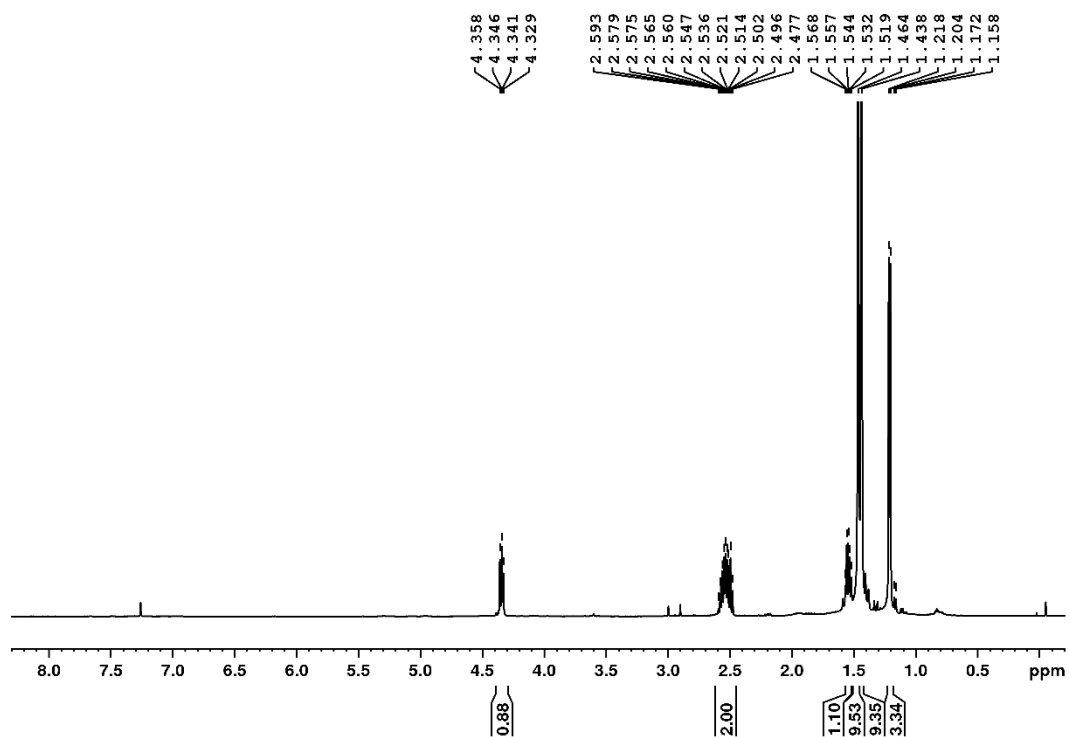


4.3. (*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-

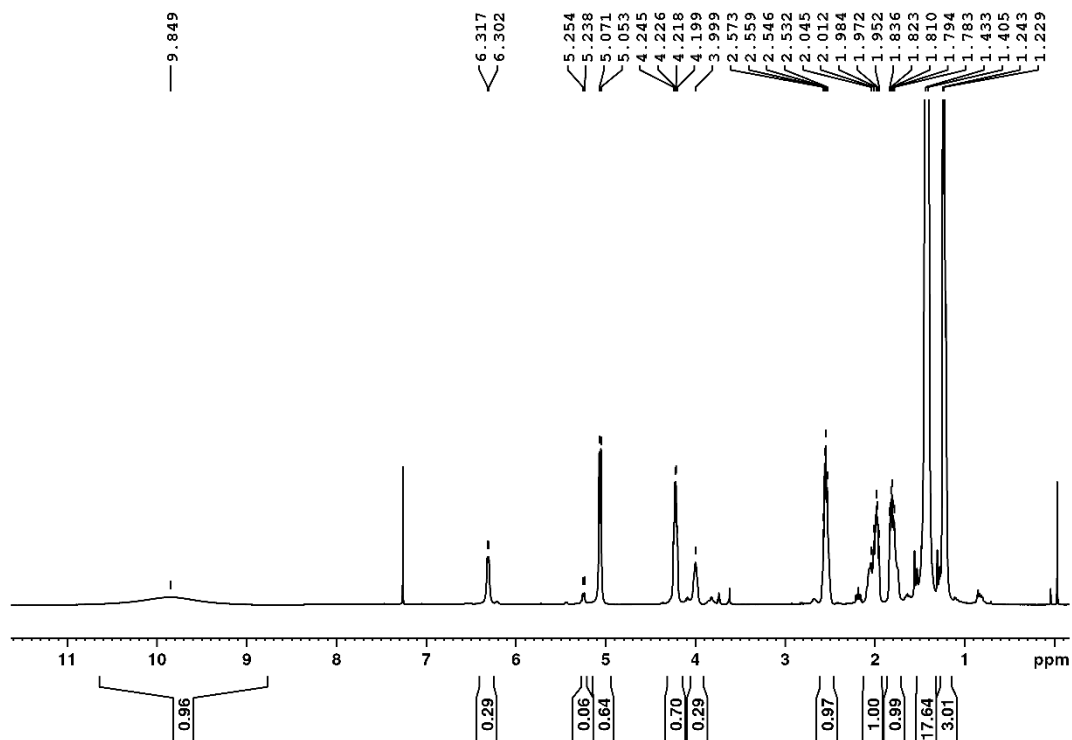
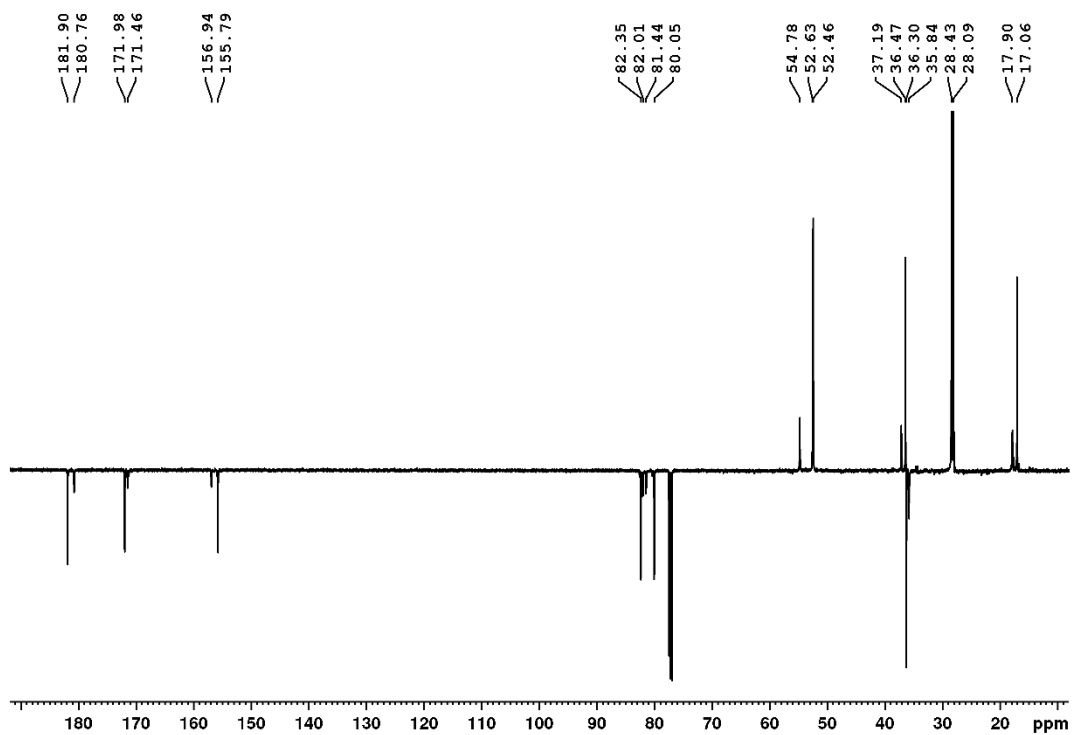
(dimethylaminomethylen)pyroglutamátu (9) (^1H a ^{13}C NMR spektra)



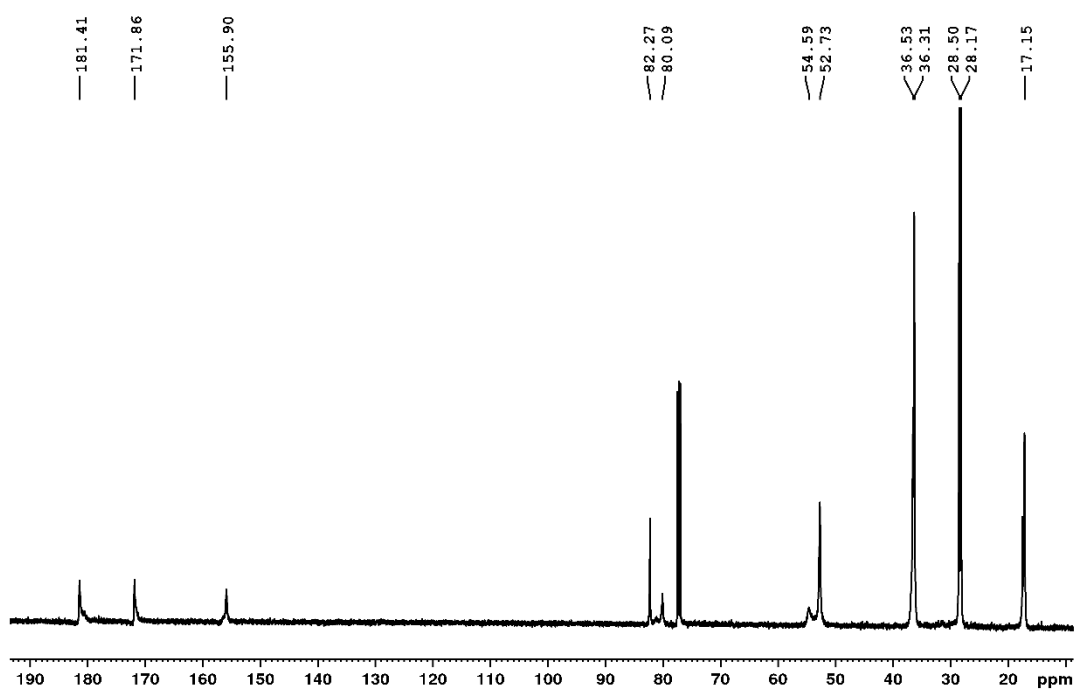
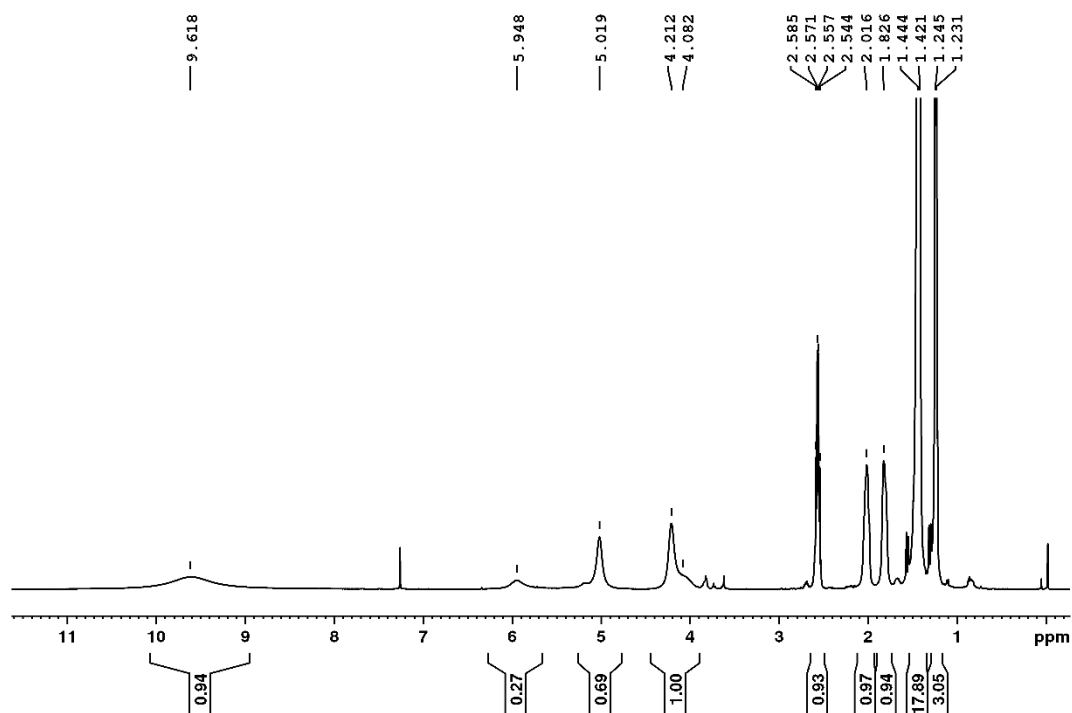
4.4.(2*S*,4*S*)-*tert*-butyl-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-4-methylpyroglutamát (10)
 (¹H a ¹³C NMR spektra)



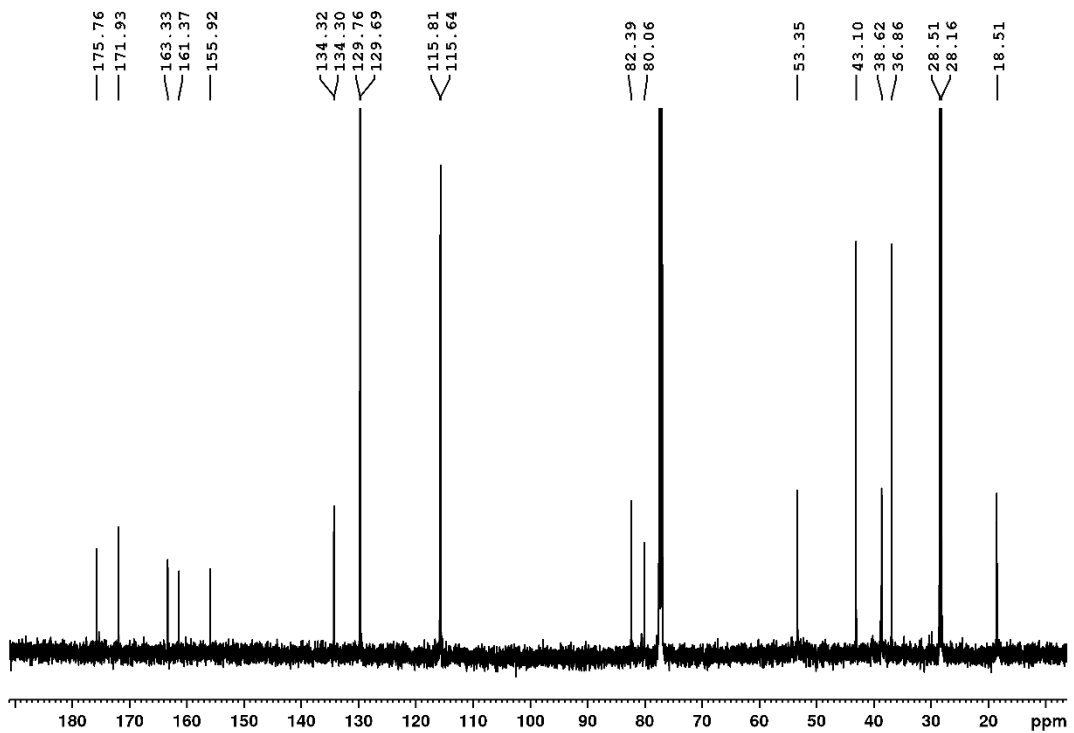
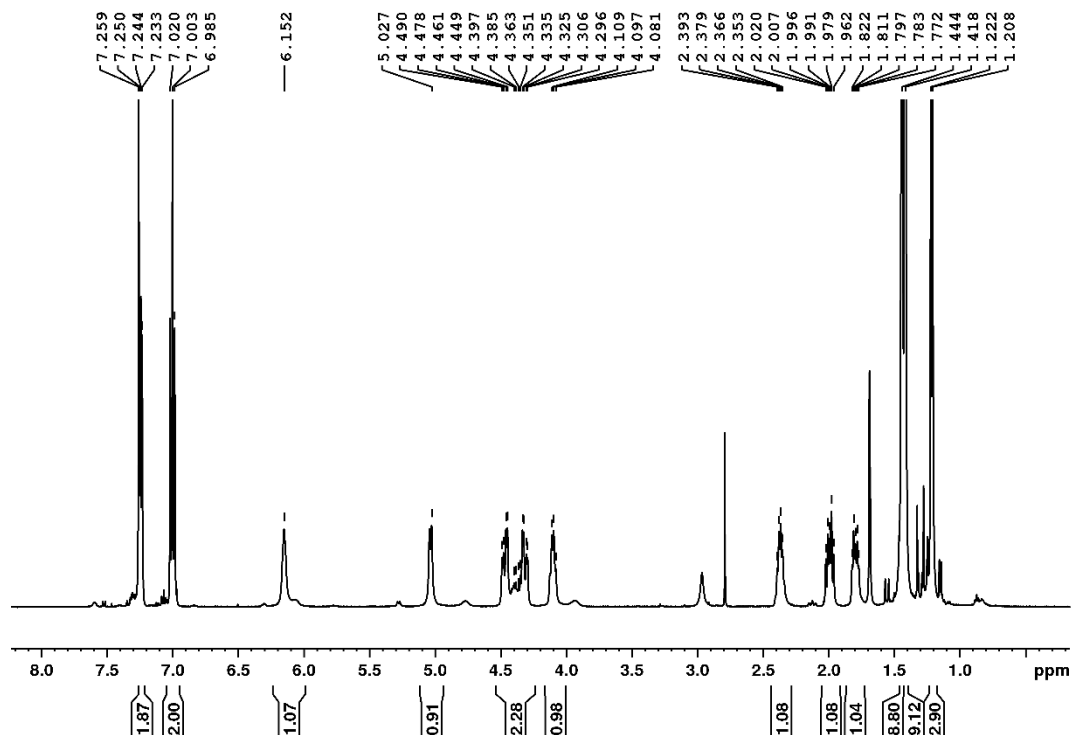
4.5.(2*S*,4*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(*tert*-butoxykarbonylamino)-2-methyl-5-oxopentanová kyselina (11) (¹H a ¹³C NMR spektra)



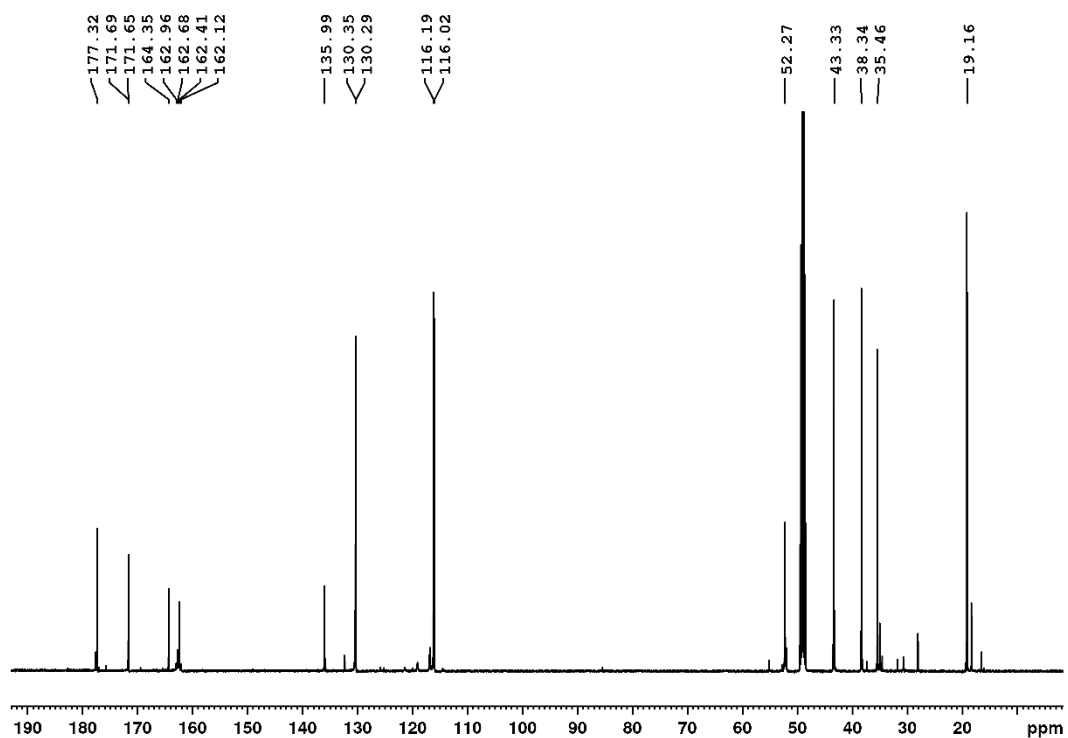
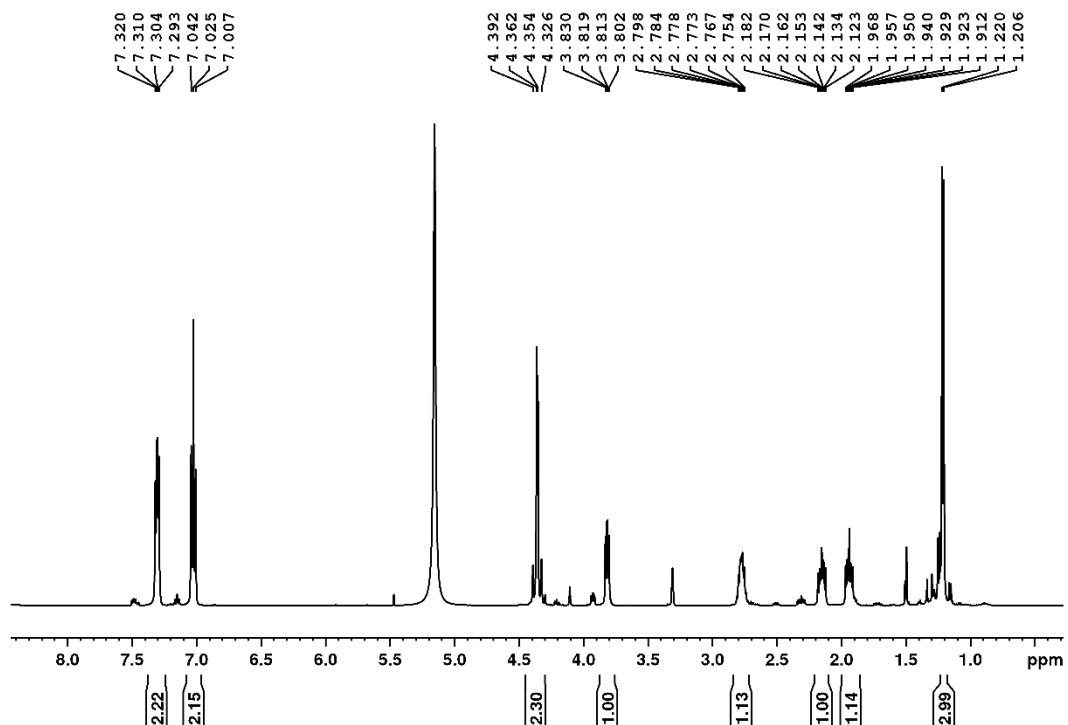
4.6. (2*S*,4*S*)-5-(*tert*-butoxy)-4-(*tert*-butoxykarbonylamino)-2-methyl-5-oxopentanová kyselina (11) (^1H a ^{13}C NMR spektra při 50 °C)



4.7.(2*S*,4*S*)-*tert*-butyl-2-(*tert*-butoxykarbonylamino)-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanoát (12) (^1H a ^{13}C NMR spektra)



4.8. Trifluoracetát (2*S*,4*S*)-2-amino-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanové kyseliny (13) (¹H a ¹³C NMR spektra)



4.9. Hydrochlorid (2*S*,4*S*)-2-amino-4-(4-fluorbenzylkarbamoyl)pentanové kyseliny (14) (¹H a ¹³C NMR spektra)

