

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



David VANDA

**Syntéza nových derivátů purinu a deazapurinu a studium jejich
biologických vlastností**

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie N1407

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.

Olomouc 2016

Mé poděkování patří v první řadě doc. RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za veškerou organizaci, pomoc a nespočet rad i příležitostí poskytnutých v rámci vypracovávání této práce. Můj vděk si také zaslouží za to, že díky jeho úsilí a možnostem se spolu s kolegy z Ústavu molekulární a translační medicíny a Laboratoře růstových regulátorů mohla část této práce publikovat v odborném časopise.

Dále bych rád poděkoval všem spolupracovníkům z Katedry organické chemie a Ústavu molekulární a translační medicíny za jejich asistenci při řešení problémů, pomoc při interpretaci analytických dat a v neposlední řadě za kolegiální přístup.

Nemalý podíl na této diplomové práci má i Farmaceutická fakulta Jagellonské univerzity v Krakově, kde jsem absolvoval dvě měsíční stáže, které mi pomohly danou problematiku rozvinout a získat nové zkušenosti pro budoucí výzkum. Výzkumnému týmu pod vedením doc. Pawła Zajdela a všem mým kolegům spolupracujícím na tomto projektu patří také velký dík.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu motivovali k dokončení práce a podporovali mě po celou dobu studia.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne

.....

David Vanda

Obsah

2. Teoretická část	6
2.1 Deriváty purinů	6
2.1.1 Úvod do problematiky purinových derivátů.....	6
2.1.2 Antibiotika	6
2.1.3 Antimykobakteriální látky	7
2.1.4 Antiparazitika	9
2.1.5 Antivirotika.....	9
2.1.6 Cytostatika	15
2.1.7 Purinové deriváty obsahující specifický ligand v poloze N^9	18
2.2 Deriváty deazapurinů	22
2.2.1 Úvod do problematiky deazapurinů	22
2.2.2 Antivirotika.....	22
2.2.3 Cytostatika	23
2.2.4 Protizánětlivé látky	25
2.2.5 Imunosupresory	26
2.2.6 Další látky.....	27
2.3 Základní přehled 5-HT ₆ receptorů a jejich ligandů.....	29
2.3.1 Úvod a dělení 5-HT receptorů	29
2.3.2 Popis a základní funkce 5-HT ₆ receptorů	30
2.3.3 Přehled ligandů pro 5-HT ₆ receptory	31
3. Výsledky a diskuze	34
3.1 Syntéza derivátů purinu na pevné fázi	34
3.1.1 Obecné schéma celkové syntézy	35
3.1.2 Řešení problematiky reakční sekvence	36
3.1.3 Stanovení optické čistoty.....	42
3.1.4 Přehled výchozích látek a shrnutí výsledků syntézy	43
3.1.5 Biologické testování	45
4. Experimentální část.....	47
4.1 Přístroje a metody	47
4.2 Příprava derivátů purinu na pevné fázi	48
4.2.1 Štěpení vzorku z pryskyřice a provedení analýzy	48

4.2.2 Postup pro kvantitativní stanovení loadingu pryskyřice	48
4.2.3 Imobilizace aminu na aminomethylovou pryskyřici - 1(1), 1(2)	48
4.2.4 Imobilizace Fmoc-aminoethanolu na Wangovu pryskyřici – 1(3).....	49
4.2.5 Imobilizace piperazinu na Wangovu pryskyřici – 1(4)	49
4.2.6 Pokračování reakční sekvence.....	49
4.2.7 Finální štěpení produktů	49
4.5 Analytická data připravených derivátů	50
4.5.1 Deriváty purinu.....	50
6. Seznam použitých zkratk	59
7. Literatura.....	60

2. Teoretická část

2.1 Deriváty purinů

2.1.1 Úvod do problematiky purinových derivátů

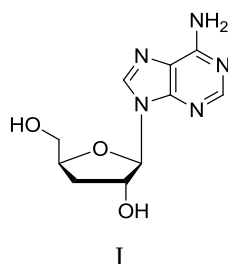
Purinový skelet je bezpochyby jedním z nejvýznamnějších heterocyklů vyskytujícím se v řadě přírodních i syntetických látek. V průběhu minulých desetiletí byly purinové deriváty intenzivně studovány, přičemž byla nalezena řada sloučenin s rozmanitými biologickými účinky.² Drtivá většina studia struktury purinových derivátů se zaměřovala na substituci v polohách C^2 , C^6 a C^8 . Objevily se však i sloučeniny vykazující strukturní variabilitu v poloze N^9 , nicméně spíše v nižším zastoupení.^{3,4,5} Tyto deriváty s rozličnou substitucí vykazují diametrálně odlišnou biologickou aktivitu a je tedy zřejmé, že typ substituce v této poloze má na účinek v živých organismech nemalý vliv.⁶

2.1.2 Antibiotika

Antibiotika jsou jednou z hlavních skupin antimikrobiálních látek. Jejich primárním účelem je bojovat proti bakteriálním infekcím v lidském těle. Vzhledem k tomu, že bakterie jsou známé především svou rychle se rozvíjející antibiotickou rezistencí, je v této skupině léčiv kladen velký důraz na výzkum a vývoj nových látek. V pravém slova smyslu řadíme mezi antibiotika pouze látky přírodního původu, tedy nikoliv látky syntetické. Není tedy divu, že mezi užívanými látkami nalezneme zástupce pocházející z řad purinových derivátů.^{7,8}

Jednou z látek používaných proti infekcím je kordycepin (Obrázek 2). Tato sloučenina byla poprvé izolována z cizopasně houby housenice čínské, dnes se však již vyrábí synteticky. Má velmi mnoho různých biologických účinků, mimo jiné právě antibakteriální. Konkrétně byl studován její vliv na inhibici růstu bakterií rodu *Clostridium*. Bylo prokázáno, že kordycepin je schopen působit na bakterie *C. paraputrificum* a *C. perfringens*. Druhá zmiňovaná bakterie je příčinou několika závažných chorob, např. plynaté sněti, a také bývá velmi častým původcem otravy z jídla.^{9,10}

Obrázek 2: Chemický vzorec kordycepinu (I), látky s antibakteriálními účinky



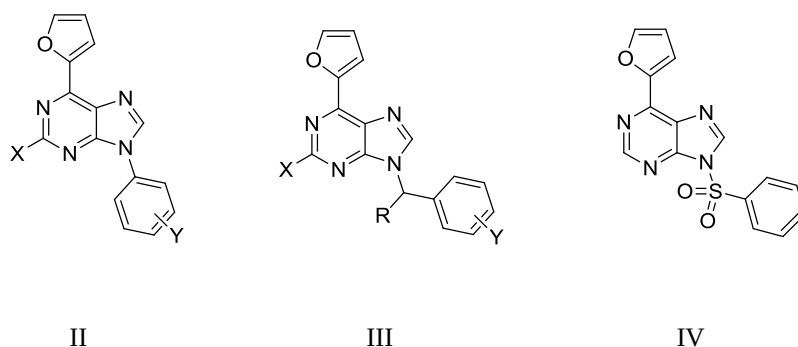
Kromě přímých purinových derivátů se v této skupině nacházejí ještě deriváty deazapurinů, konkrétně pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů. Substituce v poloze N^9 je pak analogická jako v případě kordycepinu.¹¹

2.1.3 Antimykobakteriální látky

I mezi sloučeninami působícími jako antimykobakteriální látky lze najít vybrané deriváty z řady purinů. Vývoj nových aktivních látek v této oblasti je velmi žádaný, neboť v současné době je zhruba třetina světové populace infikována bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, která je považována za extrémně nebezpečnou. Ve většině případů se šíří vzduchem a postihuje plíce infikovaného. Hlavními symptomy jsou chronický krvácivý kašel, zvýšená teplota a úbytek tělesné hmotnosti. Může se však také usadit v jiných oblastech, např. v centrálním nervovém systému, kde pochopitelně způsobuje mnohem závažnější komplikace. Společně s šířením HIV, který v důsledku snížené imunity usnadňuje infekci *M. tuberculosis*, a postupné narůstající rezistence této bakterie vzniká vysoká poptávka po účinných léčivech. Diverzita vyvíjených látek je velmi pestrá, jelikož je nutné se zaměřovat na takové biologické cíle, kde je nižší riziko vzniku nové rezistence na aplikované léčivo.¹²

Potenciálními léčivy v této oblasti se ukazují být 9-aryl-, 9-arylsulfonyl- a 9-benzyl-6-(2-furyl)purinové deriváty (Obrázek 3). Obzvláště poslední zmiňované vykazují velký potenciál v léčbě proti *M. tuberculosis*. Jedním z hlavních faktorů pro účinnost proti těmto mykobakteriím je právě substituce v poloze N^9 . Látky bez substituce v této poloze, resp. se substitucí v podobě velmi krátkého uhlovodíkového řetězce byly ve studii proti *M. tuberculosis* inaktivní. Spolu s faktem, že tyto deriváty vykazují nízkou toxicitu proti savčím buňkám, je možné tyto látky použít jako základ nových léků proti vysoce rezistentním mykobakteriím.¹³

Obrázek 3: 9-aryl-6-(2-furyl)puriny (II), 9-arylsulfonyl-6-(2-furyl)puriny (III) a 9-benzyl-6-(2-furyl)puriny (IV) jako látky s antimykotickými účinky



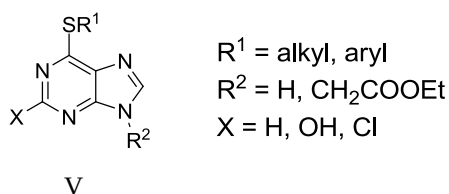
R = H, CH₃

X = H, Cl

Y = H, F, Cl, OCH₃, OCH₂CH₃, SO₂CH₃, C(CH₃)₃, OH, OCOCH₃, SCH₃, NH₂, N(CH₃)₂, ...

Dalšími možnými deriváty, které mají vysoký potenciál pro použití v oblasti antimykobakteriálních látek, jsou deriváty 6-thiopurinu, opět s vhodnou substitucí v poloze N⁹ (Obrázek 4). Jako kontrola důležitosti této substituce byla při studii aktivity 6-thiopurinů na bakteriích *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium avium* testována i sada pyrimidinů a pyridinů. Tyto analoga ovšem byly kompletně neaktivní. Bylo tedy prokázáno, že substituce v poloze N⁹ je pro antimykobakteriální aktivitu purinových derivátů klíčovým faktorem.¹⁴

Obrázek 4: Struktura 6-thiopurinů (V) studovaných pro antimykobakteriální aktivitu

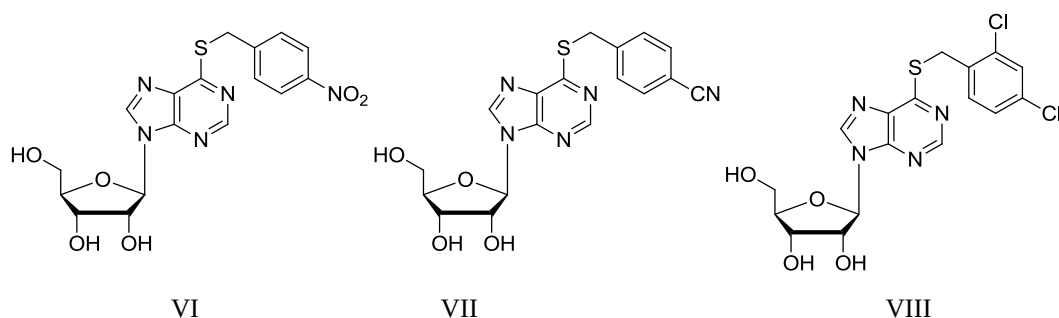


O mechanismu působení purinových derivátů jakožto antimykotik je známo zatím velmi málo. Ukazuje se, že *Mycobacterium tuberculosis* obsahuje ve svém genomu sekvence určené k syntéze purinů, čímž se podobá člověku a ostatním vyšším organismům. Podrobnější informace o konkrétních vlastnostech substrátu pro mikrobiální enzymy zprostředkovávající tuto syntézu však známe nejsou. Tyto deriváty byly tedy připraveny pro zjednodušení studia mechanismu těchto účinků.¹⁵

2.1.4 Antiparazitika

Parazitující mikroorganismy postihují ve velké míře hlavně zvířata, nicméně se můžeme s některými těmito parazity setkat i u člověka. Příkladem může být například *Toxoplasma gondii*. Tento mikroorganismus není nijak ojedinělý, jelikož pozitivní indikace v séru byla zjištěna u 60 % populace Spojených států amerických. Přítomnost tohoto parazita může být problémem převážně pro plod v těle infikované matky nebo pro pacienta s AIDS. Řešením tohoto problému by se mohla stát látka NBMPR, neboli nitrobenzylthioinosin, příp. její analoga (Obrázek 5). Tato látka je schopná být selektivně fosforylována právě parazitickými organismy, nikoliv však savčími kinasami. Tím je umožněno efektivně cílit léčbu na *T. gondii* a potlačit tak riziko projevu toxoplasmózy.^{16,17}

Obrázek 5: Látka NBMPR (VI) a její analoga (VII, VIII) fungující jako antiparazitika



2.1.5 Antivirotika

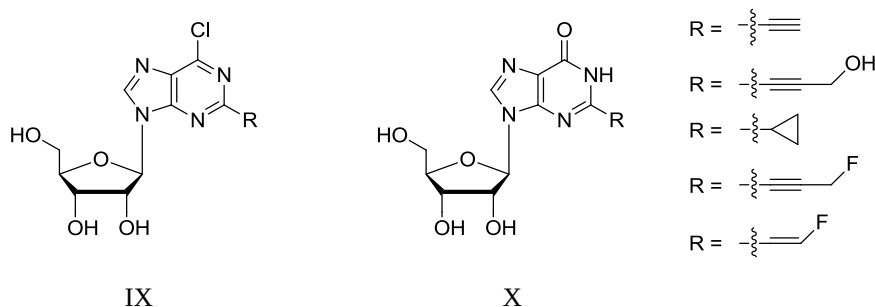
Antivirotika se obecně zaměřují na léčbu virových infekcí. Širokou škálou mechanismů narušují metabolismus virů, čímž brání šíření infekce. Napadené buňky potřebují pro rozmnožování větší množství purinových nukleotidů než buňky zdravé. Hlavní část těchto nukleotidů je využita na syntézu virální RNA a DNA. Není tedy náhodou, že na poli užívaných antivirotik lze najít také purinová analoga. Asi nejčastěji se objevujícími látkami s antivirotickými účinky jsou různě substituované nukleosidy. Biologické účinky purinových antivirotik jsou však velmi komplexní a zahrnují několik druhů působení na multiplikaci virů.

2.1.5.1 Látky ovlivňující syntézu virových nukleových kyselin

Mechanismus syntézy virových nukleových kyselin je velmi dobře prostudovaný proces. Je řízen převážně DNA polymerasami, ale také dalšími enzymy, na které je možné cílit terapii v případě virových onemocnění.

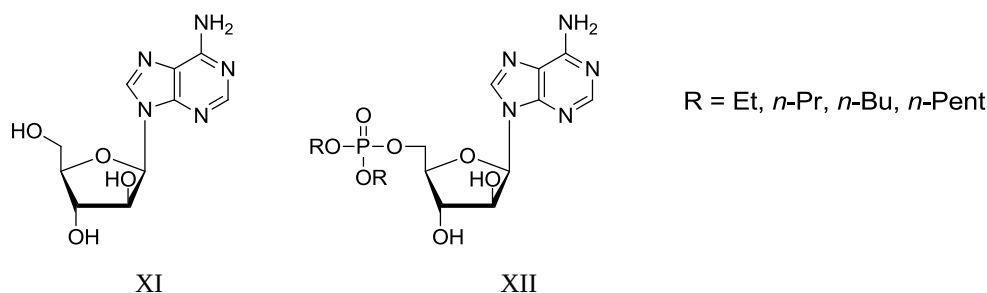
Jedním z možných cílů terapie purinovými analogy je inosin monofosfát dehydrogenasa (IMPDH). Tento enzym je klíčovým katalyzátorem pro *de novo* syntézu purinových nukleotidů. Výhodou je také to, že struktura savčí IMPDH se od virální dostatečným způsobem odlišuje. Tím je umožněno vyvíjet látky selektivní pouze na viry zasažená místa. Mezi inhibitory IMPDH patří například purinové a inosinové nukleosidy vhodně substituované v poloze C^2 (Obrázek 6). V poloze N^9 se pak (obdobně jako u RNA bází) nachází D-ribóza, eventuálně ribóza monofosfát.¹⁸

Obrázek 6: Purinové (IX) a inosinové (X) nukleosidy s účinkem inhibice IMPDH



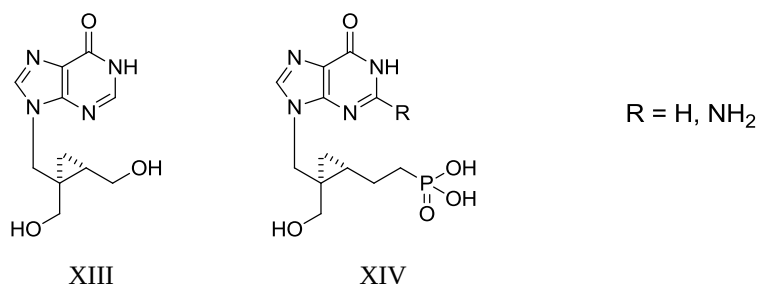
Ribóza však není jediným cukrem, který se v poloze N^9 u antivirotik vyskytuje. Dalším příkladem je arabinóza, která se nachází v adeninarabinosidu, druhém nejstarším antivirotku známým pod komerčním názvem VidarabinTM. Tento cukr byl poprvé izolován z mořských živočichů, což spustilo řadu testování, které vedlo až k vyvinutí adeninarabinosidu. Hlavním biologickým cílem je inhibice herpesvirové DNA polymerasy. Jedná se o jednu z mála látek majících základ v molekule izolované z mořských živočichů. Od této struktury pak byly odvozeny i další antivirotika, tentokrát analogy monofosfátu. Tyto látky mají lipofilnější charakter, díky kterému mají oproti adeninarabinosidu nižší tendenci podléhat rozkladným metabolismům v organismu.^{19,20}

Obrázek 7: Chemický vzorec adeninarabinosidu (XI) a jeho analog (XII)



Později bylo zjištěno, že pro antivirotické účinky není výhradně nutné, aby byla poloha N^9 substituována skeletem sacharidu. Jedním z důkazů je skupina cyklopropanových nukleosidů. Monosacharidová jednotka je u těchto látek nahrazena jednodušším alicyklickým skeletem. Příkladem je látka A-5021, analog inosinu.²¹ Tato látka pak byla následně dále modifikována a byly vyvinuty další podobné cyklopropanové deriváty odvozené od kyseliny fosforité (Obrázek 8).²²

Obrázek 8: Antivirotický účinná látka A-5021 (XIII) a její deriváty (XIV)

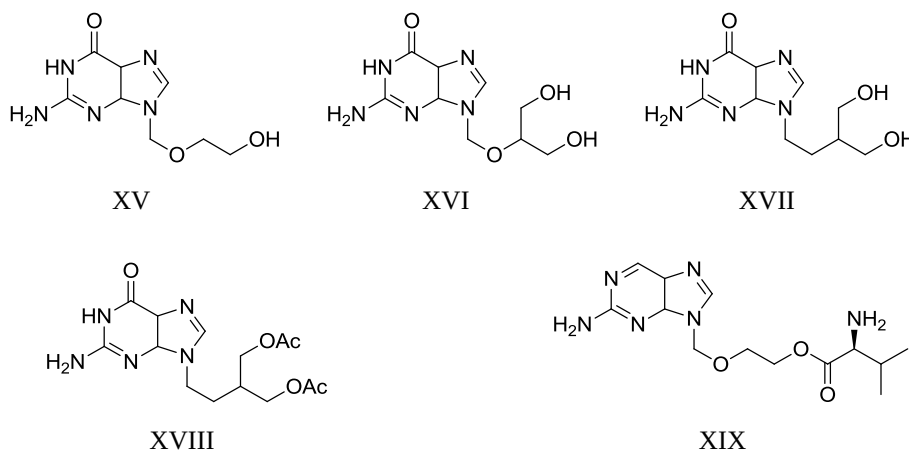


Mezi jedny z nejpoužívanějších antivirotik patřících do řad purinových derivátů patří acyklické nukleosidy. Jejich společným znakem je právě substituce v poloze N^9 . Obsahují totiž pouze část původního sacharidového ligandu. Cyklus je v tomto případě zjednodušen na alifatický řetězec.

Prvním zástupcem této skupiny je aciclovir (ZoviraxTM). Používá se na herpetické viry všech druhů. Ganciclovir se využívá na léčbu cytomegalovirů. Dalšími látkami jsou penciclovir a jeho profarmakum famciclovir. U těchto látek je obecně velký problém s jejich omezenou rozpustností, která značně limituje jejich uplatnění. Aciclovir je například dostatečně rozpustný až v alkalickém pH, takže je vyloučeno intravenózní použití. Proto se podává především topicky. Tento problém byl odstraněn s vývojem další generace těchto léčiv, kam se řadí valaciclovir (ValtrexTM). Ten obsahuje ve své molekule valin, který je vázán přes esterovou vazbu, čímž je zajištěna

vyšší rozpustnost léčiva. Tato generace léčiv zahrnuje hlavně profarmaka již zmíněných látek (Obrázek 9).²³

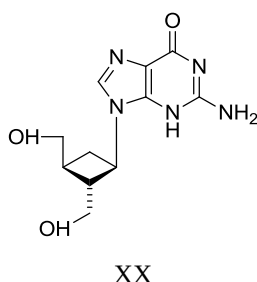
Obrázek 9: Antivirotika z řad acyklických nukleosidů: aciclovir (XV), ganciclovir (XVI), penciclovir (XVII), famciclovir (XVIII) a valaciclovir (XIX)



U všech těchto derivátů dochází k ovlivnění biosyntézy virových nukleových kyselin působením na specifické enzymy, tzv. kinasy. Kinasy slouží k přenosu fosfátového zbytku z molekuly s vysokou energetickou hodnotou (např. ATP) na cílový substrát (v tomto případě antivirotikum). Dané léčivo se pak v této formě zabuduje do řetězce virové DNA, čímž zamezí replikaci viru. Acyklické nukleosidy se váží selektivně pouze na virové kinasy, čímž je zajištěna jejich vysoká specifita.²⁴

Do skupiny antivirotik se řadí také lobucavir (Obrázek 10). Tento analog deoxyguaninu má velmi pestrou antivirální aktivitu. Mimo použití jako léčiva na HIV se uplatňuje i jako aktivní látka proti hepatitidě B, viru herpes simplex a mimo jiné také lidského cytomegaloviru, konkrétně cytomegaloviru infikujícího sítnici a způsobujícího její zánět. Mechanismem jeho účinku je opět inhibice virální DNA polymerasy. Je možné jej použít u takových druhů cytomegalovirů, které jsou rezistentní vůči ostatním jindy účinným antivirotikům, např. vůči gancicloviru. Poměrně zajímavým strukturním motivem je cyklobutanový kruh vázaný v poloze N^9 . Je tedy opět dokázáno, že záměna substituentu v této klíčové poloze může mít stěžejní vliv na biodostupnost a účinnost daného léčiva.²⁵

Obrázek 10: Struktura víceúčelového antivirotika lobucaviru (XX)



2.1.5.2 Látky působící na reverzní transkripci

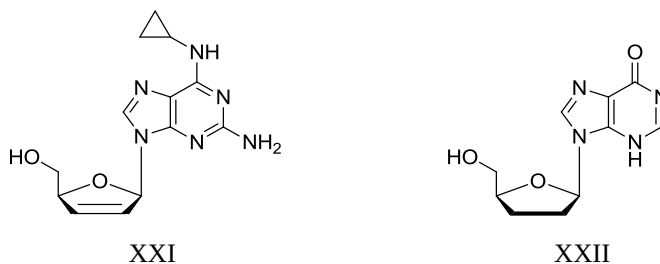
Reverzní transkriptasa (RT) je enzym, který katalyzuje přepis virové genetické informace hostitelské DNA. Je sledován převážně proto, že je klíčový pro replikaci viru HIV. Proto se mnohé oblasti výzkumu léčby HIV zaměřují právě na inhibici tohoto enzymu. Reverzní transkriptasa však může být také cílem v léčbě hepatitidy B, která (přesto, že se řadí mezi DNA viry) tento enzym také využívá. V principu lze inhibitory reverzní transkriptasy rozdělit na tři hlavní kategorie – nukleosidové inhibitory (NRTI), nukleotidové inhibitory (NtRTI) a nenukleosidové inhibitory (NNRTI). Vzhledem k tomu, že tato část práce je zaměřena na purinové deriváty, bude řeč hlavně o prvních dvou skupinách těchto inhibitorů.^{26,27}

Mezi skupinu purinových NRTI patří například abacavir (Obrázek 11). Ten se ukázal jako nadějný léčivo při infekci HIV. Jeho hlavním vedlejším účinkem je hypersenzitivita, což je porucha imunity, při které dochází k poškození organismu, a u pacientů může eskalovat až v úmrtí. I přesto je však hojně používán, převážně v kombinaci s jinými druhy léčiv proti viru HIV.^{28,29}

Účinky podobné abacaviru má i didanosin (Obrázek 11), u kterého je purinový skelet nahrazen hypoxantinem. Jinak je ale princip účinku totožný, tzn. vlastní aktivní formou je až intracelulárně fosforylovaný analog didanosinu (případně abacaviru).³⁰

Po chemické stránce je poloha N^9 substituována opět zjednodušeným skeletem ribózy. Hydroxylové skupiny v poloze 2 a 3 jsou na tomto ligandu nahrazeny dvojnou vazbou mezi příslušnými uhlíky v případě abacaviru, u didanosinu je pak tato vazba pouze jednoduchá.

Obrázek 11: Chemický vzorec abacaviru (XXI) a didanosinu (XXII), léčiv proti HIV



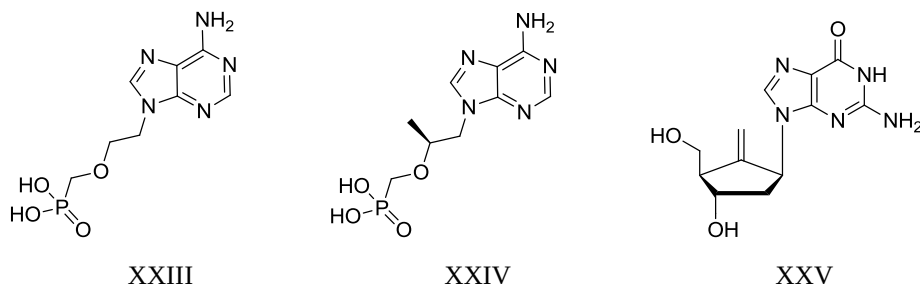
Kromě látek užívaných proti HIV se ve skupině NRTI vyskytují i léčiva působící na hepatitidu B. Mezi ně patří například již zmiňovaný famciclovir nebo ganciclovir (Obrázek 9), o nichž již byla řeč. Dalšími používanými látkami jsou adefovir, tenofovir a entecavir. (Obrázek 12).

Adefovir byl původně vyvinut jako léčivo proti HIV. Díky vysoké nefrotoxicitě však neprošel schválením, a teprve po snížení dávek a objevu účinků proti hepatitidě mohl být řádně schválen. Užívá se v podobě adefoviru dipivoxilu, který podléhá hydrolýze po průchodu buněčnou membránou. Po fosforylaci buněčnými kinasami dochází k jeho aktivaci.

Tenofovir je pro změnu používán v podobě disoproxil fumarátu, a je tedy opět intracelulárně hydrolyzován na aktivní formu. Nevýhodou se jeví nižší selektivita některých metabolických intermediátů, kdy dochází i k ataku na lidskou polymerasu, nicméně studie dokazující mutagenitu nebyly potvrzeny.

Entecavir je multifunkční léčivo při boji proti hepatitidě B. Kromě inhibice reverzní transkriptasy působí i na biosyntézu DNA. Většinou se používá v kombinaci s jinými antiviroty, v samostatné formě je aplikován převážně při transplantaci jater. Vhodným léčivem kombinovatelným s entecavirem je např. výše zmíněný tenofovir.³¹

Obrázek 12: Struktura adefoviru (XXIII), tenofoviru (XXIV) a entecaviru (XXV)



2.1.6 Cytostatika

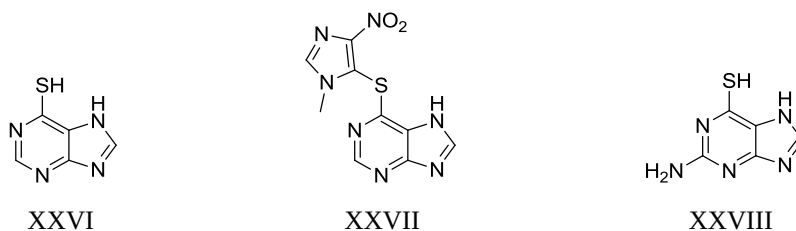
2.1.6.1 Klasická cytostatika

Do skupiny klasických cytostatik patří látky inhibující buněčný růst, konkrétně u rakovinných buněk. V této skupině jako velmi efektivní ukazují právě antimetabolity purinů. Samotný mechanismus účinku je velmi složitý a závisí na spoustě limitujících faktorů, např. na roli transportérů těchto léčiv, na odbourávacích mechanismech atp. I přesto si purinová cytostatika vysloužila čestné místo mezi hojně užívanými látkami.³²

První skupinou látek využívaných pro léčbu různých nádorových onemocnění jsou deriváty 6-merkaptopurinu (Obrázek 13). 6-merkaptopurin se ukázal jako efektivní proti několika onemocněním, zejména akutní lymfatické leukémii a střevním zánětům, např. Crohnově chorobě. Podobné účinky má také jeho proléčivo azathioprin. Ten se v těle metabolizuje právě na 6-merkaptopurin, který je dále přeměněn na aktivní formy, thioguanin nukleotidy.^{33,34}

Zdánlivě podobnou látkou je také tioguanin, neboli 6-thioguanin. Ten se ovšem metabolizuje jinými dráhami než 6-merkaptopurin, a navíc má vyšší toxicitu, zejména v kostech. I tak se však využívá jako cytostatické léčivo.^{35,36}

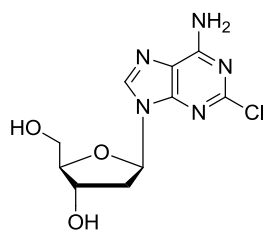
Obrázek 13: Chemický vzorec 6-merkaptopurinu (XXVI), jeho proléčiva azathioprinu (XXVII) a tioguaninu (XXVIII)



U derivátů 6-merkaptopurinu s protinádorovou není substituce v poloze N⁹ obvyklá. Nicméně se objevují i látky, obsahující v této poloze alespoň základní alifatický ligand v podobě ethyl nebo butyl skupiny.³⁷

Naproti tomu například cladribin (Obrázek 14), další purinový analog užívaný jako cytostatikum, již obsahuje o něco rozvětvenější substituent, a sice deoxyribosu. Jeho hlavní aplikace spočívá v léčbě specifického typu leukémie z vlasatých buněk, ale byl aplikován i při léčbě jiných lymfomů. Mimo to byl také testován i jako léčivo pro pacienty trpící roztroušenou sklerózou.^{38,39}

Obrázek 14: Struktura cladribinu (XXIX), léčiva s cytostatickými účinky

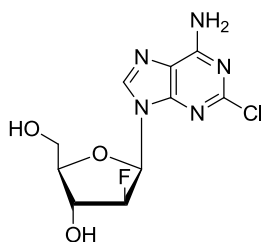


XXIX

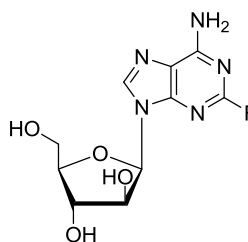
Mezi purinová cytostatika se řadí i clofarabin a fludarabin (Obrázek 15). Molekuly těchto látek mají kromě základního skeletu společnou ještě jednu věc, a to přítomnost atomu fluoru ve struktuře. Clofarabin se používá pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie, a to hlavně u dětských pacientů. Byl však úspěšně otestován i na další druhy leukémií. Atom fluoru se zde nachází na cukerné části molekuly. V této poloze je schopen zabránit glykosidickému štěpení a tím stabilizuje léčivo v kyselém prostředí.⁴⁰

Fludarabin se aplikuje převážně při chronické lymfatické leukémii. Tento derivát se ukázal být efektivním i v takových případech, kdy pacienti nereagují na léčbu standardními antileukemiky. Bývá také užíván v kombinaci s jinými léčivy. V případě fludarabinu je fluor vázán přímo na purinovém heterocyklu v poloze C².^{41,42}

Obrázek 15: Antileukemika clofarabin (XXX) a fludarabin (XXXI)



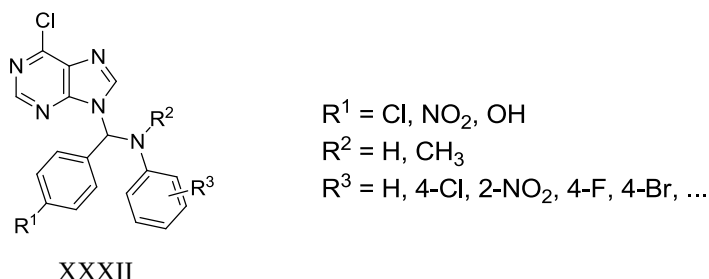
XXX



XXXI

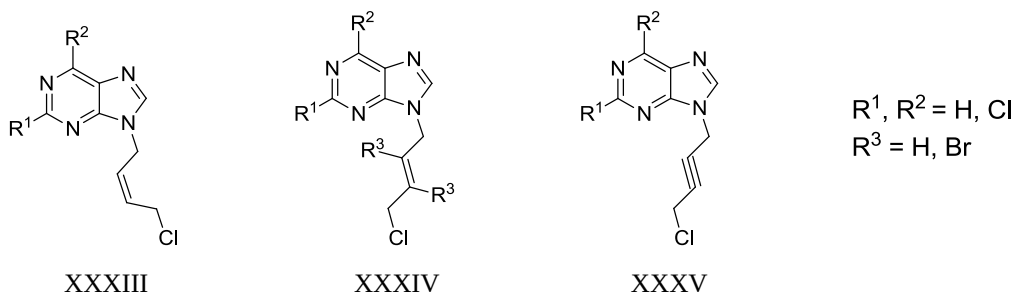
Vývoj nových léčiv v oblasti purinových cytostatik stále probíhá. Důkazem mohou být například deriváty 6-chlorpurinů (Obrázek 16). Tyto deriváty byly původně navrženy jako antibakteriální látky, nicméně se ukázalo, že proti testovaným bakteriím nebyl pozorován znatelný účinek. Namísto toho však prokázaly aktivitu proti rakovinným buňkám z hrtanu. Látky z této série se vyznačují rozvinutou substitucí ve sledované poloze N⁹.⁴³

Obrázek 16: Nově zkoumané látky s potenciální protinádorovou aktivitou (XXXII)



Dalším příkladem za všechny mohou být 2,6-disubstituované puriny (Obrázek 17), které byly testovány hned na několika typech nádorových linií (plic, tlustého střeva, mozku, prsu, ...). Některé z těchto látek prokázaly vysokou cytotoxickou aktivitu u většiny testovaných tkání, díky čemuž by mohly sloužit jako víceúčelová cytostatika. U těchto látek bylo také prokázáno, že při použití N^7 substituovaných purinů nebylo dosaženo požadovaných účinků, tak jako tomu bylo u substituce v poloze N^9 , což opět demonstruje vliv substituce této polohy na biologickou aktivitu.⁴⁴

Obrázek 17: Příklady víceúčelově aktivních látek (XXXIII, XXXIV, XXXV) v oblasti léčby nádorů



2.1.6.2 Inhibitory cyklin-dependentních kinas

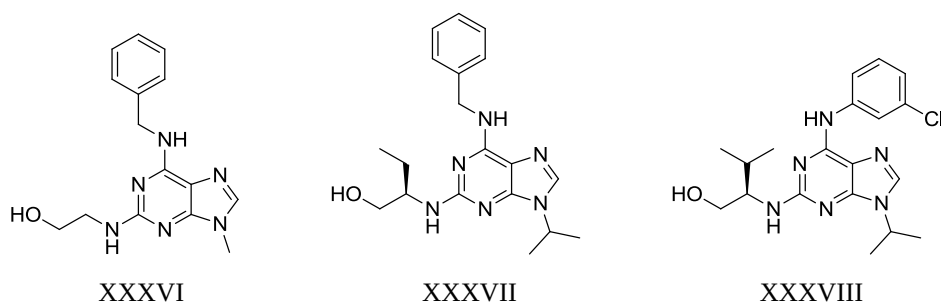
Mezi cytostatika se řadí i velká podskupina specificky zaměřených látek, a to inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK). Tyto aktivní látky se zaměřují na enzymy, které řídí buněčný cyklus. CDK fungují tak, že regulují různá místa buněčného dělení a tím řídí celý replikační proces. Proto se dnes vyvíjí potenciální léčiva, která by mohla inhibovat tyto enzymy a tím pádem zamezit dělení rakovinových buněk.⁴⁵

První látkou ze skupiny inhibitorů CDK stojící za zmínku je bezpochyby olomoucín (Obrázek 18). Byl vyvinut jako inhibitor CDK1. Vzhledem k jeho tehdejší úspěšnosti započal vývoj dalších inhibitorů cyklin-dependentních kinas. Velmi

významnou aktivní substancí se stal roscovitin (komerční název SeleciclibTM). Ten se zaměřuje hlavně na CDK2, CDK7 a CDK9. Dalším příkladem těchto derivátů je purvalanol. V současné době se však vyvíjí spousta dalších látek odvozených od těchto významných derivátů.^{46,47,48,49}

Tyto látky však mají obecně velmi nízkou variabilitu substituce polohy N^9 . Nejčastěji se objevuje uhlovodíkový řetězec v podobě methylové, isopropylové nebo cyklopentylové skupiny

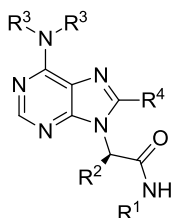
Obrázek 18: Olomoucín (XXXVI), roscovitin (XXXVII) a purvalanol (XXXVIII), látky působící jako inhibitory CDK



2.1.7 Purinové deriváty obsahující specifický ligand v poloze N^9

Na výše zmíněných příkladech biologicky aktivních látek bylo ukázáno, že purinové deriváty mají nepřeberné množství účinků. Tato kapitola se zaměřuje na takové látky, které mají základní strukturní motiv ligandu v poloze N^9 podobný motivu látek připravených v rámci vypracovávání této diplomové práce, tedy strukturu pocházející z přírodních aminokyselin (Obrázek 19).

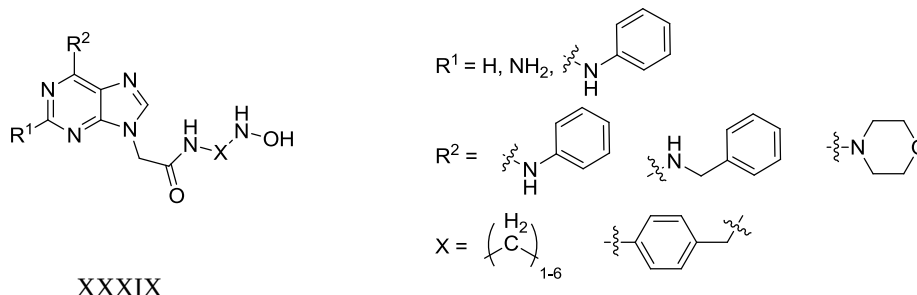
Obrázek 19: Obecná struktura derivátů purinu obsahující sledovaný strukturní motiv



Prvním příkladem jsou deriváty purinu, obsahující v poloze N^9 strukturní motiv hydroxámové kyseliny (Obrázek 20), které byly navrženy a připraveny za účelem

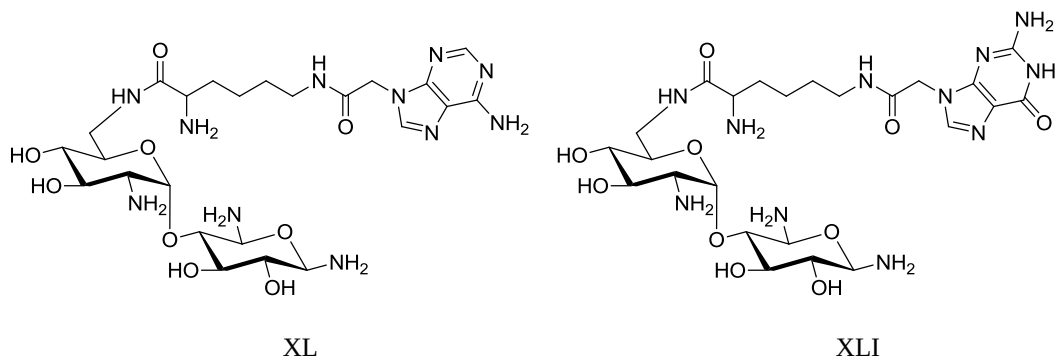
sledování inhibice histon deacetylasy. V této testovací sérii bylo nalezeno hned několik derivátů, které byly z hlediska této inhibice velmi účinné.⁵⁰

Obrázek 20: Základní skelet derivátů purinu (XXXIX) s protinádorovou aktivitou



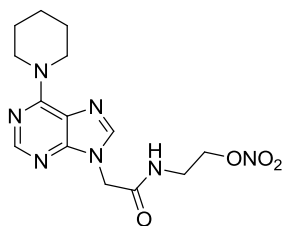
Podobný skelet jako vlastní připravené látky obsahují i substituované deriváty neaminů (Obrázek 21). U těchto látek se osvědčil specifický linker v podobě motivu lysinu, který spojuje zmíněné neaminy se strukturami nukleobází, mimo jiné také adeninu a guaninu. Takto připravené deriváty byly testovány proti TAR-RNA, což je jeden z faktorů kontrolujících spouštění virové replikace. Potenciální aplikací těchto látek je tedy léčba virových infekcí s důrazem na HIV-1.⁵¹

Obrázek 21: Struktury modifikovaných neaminů (XL, XLI)



Na první pohled odlišný skelet mají nové připravené purinové deriváty, které byly substituovány estery kyseliny dusičné (Obrázek 22). Základní struktura substituentu v poloze N^9 však opět vykazuje podobnost s deriváty, které byly syntetizovány pro tuto práci. V sérii biologického testování protizánětlivých účinků se derivát s touto substitucí ukázal jako méně účinný, i tak je však znovu poukázáno na vysokou variabilitu derivátů, které v této poloze obsahují sledovaný strukturní motiv.⁵²

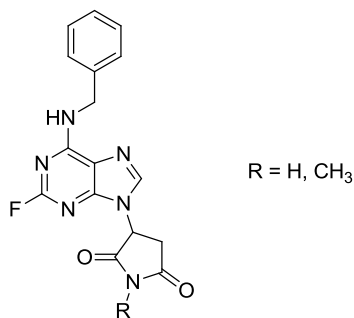
Obrázek 22: Derivát purinu substituovaný esterem kyseliny dusičné (XLII)



XLII

Nové látky s podobnou strukturou ligandu se objevují také mezi molekulami určenými k diagnostice nervových poruch, např. Alzheimerovy choroby. Příkladem mohou být purinové deriváty, které obsahují cyklickou formu cílového skeletu v poloze N^9 (Obrázek 23). Tyto látky byly připraveny k použití ve formě radioaktivních sond, které umožní neinvazivní screening nervové soustavy. Mimo jiné byla sledována interakce se Synapsinem I, fosfoproteinem účastnícím se nervových synapsí.⁵³

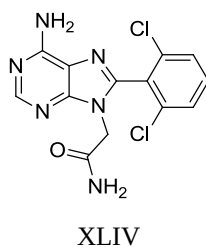
Obrázek 23: Struktury potenciálních radioaktivních sond (XLIII) odvozených od purinu



XLIII

Dalším z mnoha příkladů jsou látky testované pro jejich vliv na tzv. Janus kinasy (Obrázek 24). Tyto kinasy se účastní hned několika dějů v lidském těle. Série zmíněných derivátů byla soustředěna na inhibici jedné z těchto kinas, konkrétně TYK2 kinasy. Tato kinasa může být příčinou několika onemocnění, převážně způsobených mutací tohoto genu. Jedná se hlavně o různé druhy imunodeficiency, a tudíž je inhibice TYK2 kinasy v těchto případech žádaným jevem. Mezi nejvýznamnější choroby spojené s metabolickými drahami TYK2 kinasy patří např. revmatoidní artritida nebo ateroskleróza.⁵⁴

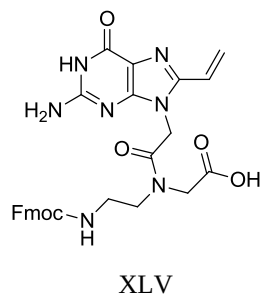
Obrázek 24: Purinový derivát (XLIV) testovaný jako inhibitor TYK2 kinasy



Zdaleka největší podíl významných zástupců purinových derivátů analogických k připravenému skeletu se vyskytuje u stavebních prvků tzv. PNA, tedy peptidových nukleových kyselin. PNA jsou uměle vytvořené řetězce nukleových kyselin, kde na rozdíl od struktury klasické DNA nebo RNA je spojovací část tvořena nikoliv strukturou sacharidu, ale peptidu.⁵⁵

Pro tyto modifikované řetězce nukleových kyselin se purinové deriváty se sledovaným motivem v poloze N^9 jeví jako ideální stavební jednotky. Při použití substituentů s vhodnými fluorescenčními vlastnostmi je pak možné sledovat afinitu syntetické PNA k příslušnému řetězci DNA nebo RNA. To by umožnilo vytvořit látku působící na konkrétní gen. Za tímto účelem byly sledovány např. deriváty 8-vinylguaninu (Obrázek 25), které mohou sloužit jako výše zmíněné stavební jednotky. V tomto případě se jedná o látky substituované Fmoc skupinou, která slouží jako fluorescenční sonda k analýze interakce s cílovou nukleovou kyselinou.⁵⁶

Obrázek 25: Vzorec stavební jednotky pro syntézu PNA (XLV)



U výše zmíněných derivátů obsahujících sledovaný ligand byl v poloze N^9 použit strukturní motiv vycházející z purin-9-ylctové kyseliny, resp. amidů této kyseliny. Z důvodu málo pestré substituce byly v této práci navrženy takové struktury, které umožňují modifikaci na vedlejším řetězci této kyseliny. Pro syntézu cílových produktů byly využity komerčně dostupné aminokyseliny, které umožnily přípravu vhodně substituovaných purinových derivátů.

2.2 Deriváty deazapurinů

2.2.1 Úvod do problematiky deazapurinů

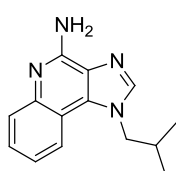
Deazapuriny, konkrétně imidazopyridiny, patří také mezi velmi zkoumané látky z důvodu jejich pestré biologické aktivity. Obecně se jedná o látky, které jsou oproti purinovému jádru o jeden dusík chudší. Tato kapitola je primárně zaměřena na deriváty 1-deazapurinu a 3-deazapurinu, tedy imidazo[4,5-*b*]pyridiny a imidazo[4,5-*c*]pyridiny. Vzhledem k tomu, že závislost struktury a biologické aktivity je v případě těchto dvou skupin látek velmi podobná, budou v následujících podkapitolách řešeny společně.

2.2.2 Antivirotika

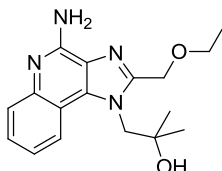
První skupinou, která obsahuje deriváty imidazopyridinů, jsou antivirální látky. Velmi významnou strukturou v oblasti této léčby je imiquimod (Obrázek 26). Funguje jako tzv. modifikátor imunitní odpovědi. Působí na syntézu různých druhů cytokinů, které slouží jako signální molekuly. Po dlouhou dobu nebylo známo, v čem konkrétně spočívá antivirální aktivita imiquimodu a jeho derivátů. Bylo zjištěno, že spouští specifickou dráhu receptoru TLR7, který je klíčový pro vytvoření odezvy imunitního systému na případnou infekci.⁵⁷

Kromě imiquimodu se v této skupině objevují i další deriváty, a sice resiquimod a gardiquimod. Resiquimod se užívá ve formě gelu, a je tedy určen primárně proti herpetickým virům. Gardiquimod funguje podobně jako imiquimod, ale jeho účinnost je několikanásobně vyšší. Navíc má také vyšší specifitu na zmíněný receptor TLR7.^{58,59}

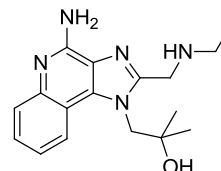
Obrázek 26: Deazapurinová antivirotika imiquimod (XLVI), resiquimod (XLVII) a gardiquimod (XLVIII)



XLVI



XLVII



XLVIII

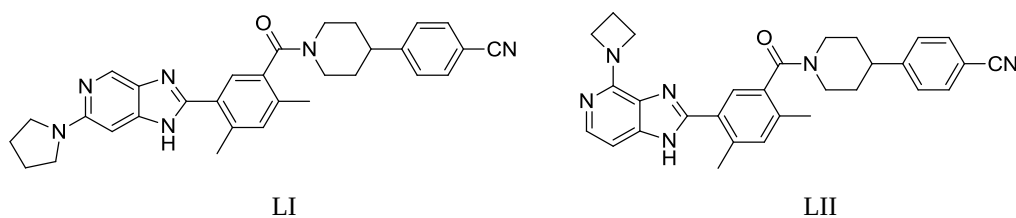
Mezi deazapurinovými antiviroty lze najít i jinou skupinu derivátů, a sice analoga substituovaná hydroxybenzylovou skupinou (Obrázek 27). Tyto látky byly připraveny na základě dříve úspěšného benzimidazolového derivátu HBB (XLIX) se stejnou substitucí. Ukázalo se, že tyto látky jsou schopné zamezit růstu oblastí postižených virem, co se velikosti týče. Na rozdíl od zmíněného benzimidazolu však postrádají schopnost výrazněji zamezit replikaci viru, což může být jejich hlavní nevýhodou.^{60,61}

Obrázek 27: Výchozí struktura HBB (XLIX) a od něj odvozeného derivátu imidazopyridinu (L)



Poněkud složitější strukturu mají deriváty navržené jako inhibitory syntézy mastných kyselin (Obrázek 28). U těchto látek byla prokázána antivirální aktivita, konkrétně proti hepatitidě typu C. Zajímavostí je, že tyto látky nepůsobí přímo na metabolismus virů jako takový, ale ovlivňují jej nepřímo právě omezením syntézy mastných kyselin, což může vést k likvidaci infekce.⁶²

Obrázek 28: Příklad látek vykazujících aktivitu v oblasti antivirotyk

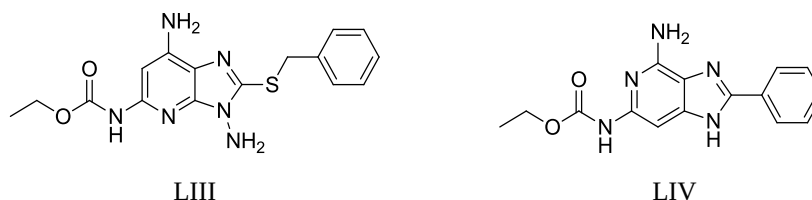


2.2.3 Cytostatika

Zástupce imidazo[4,5-*b*]pyridinů i imidazo[4,5-*c*]pyridinů lze najít i mezi látkami užívanými k léčbě rakoviny. Prvním příkladem mohou být deriváty testované kvůli antimitotické aktivitě (Obrázek 29). Antimitotika jsou látky, které specificky inhibují mitotické dělení a tím zabraňují rozšíření rakovinných buněk. Podobným

způsobem fungují např. vinca alkaloidy, které sloužily jako strukturní vzor pro tyto látky. Připravené látky byly efektivní *in vitro* a v některých případech také *in vivo*.⁶³

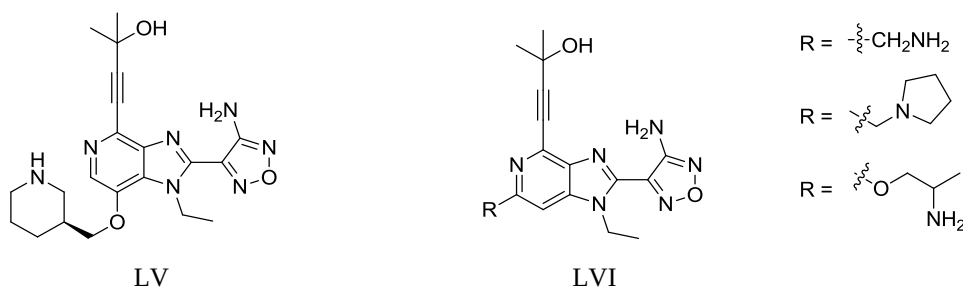
Obrázek 29: Vybrané deriváty imidazo[4,5-*b*]pyridinů (LIII) a imidazo[4,5-*c*]pyridinů (LIV) testovaných na antimitotickou aktivitu



Další oblastí léčby rakoviny, ve které najdeme příklady deazapurinových derivátů, je inhibice Akt kinas. Tyto kinasy jsou důležitými regulátory buněčných metabolismů a jejich aktivita v nádorech je oproti zdravým buňkám mnohem vyšší. Látka GSK690693 (Obrázek 30) je schopna prokazatelně sloužit jako kompetitivní inhibitor pro Akt kinasy a navíc brání fosforylaci jiných substrátů pro tyto enzymy. Biologické účinky této látky byly potvrzeny i u testování na lidských nádorech.⁶⁴

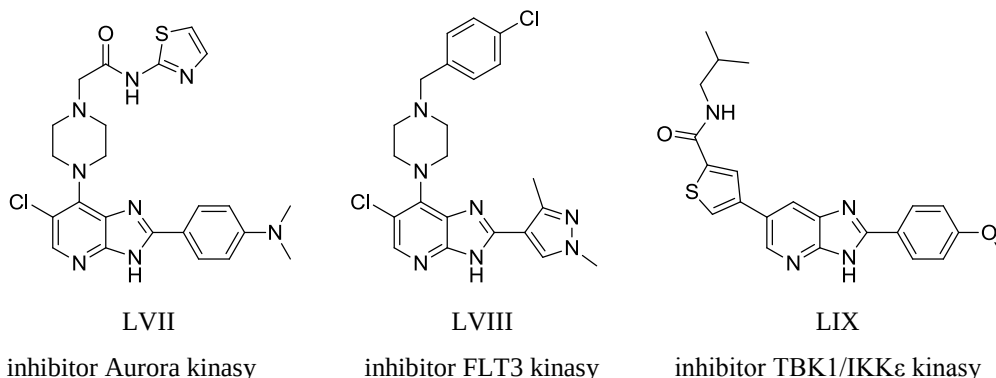
Od této látky se postupem času začaly odvozovat další deriváty, jejichž hlavním cílem bylo usnadnit biodostupnost této látky, převážně z hlediska perorálního užívání.⁶⁵

Obrázek 30: Látka GSK690693 (LV) fungující jako kompetitivní inhibitor Akt kinas a příklady od ní odvozených derivátů (LVI)



Imidazopyridinové deriváty se velmi často objevují jako inhibitory dalších druhů kinas (Obrázek 31). I v současné době probíhá významný výzkum v této oblasti. Hlavním důvodem je jejich bioisosterita s purinovými bázemi, která jim zajišťuje potenciální schopnost interakce s DNA, RNA nebo proteiny. Mezi hlavní skupiny kinas sloužícími jako biologické cíle nových deazapurinových derivátů patří např. Aurora kinasy, FLT3 kinasy nebo TBK1/IKKε kinasy.^{66,67,68}

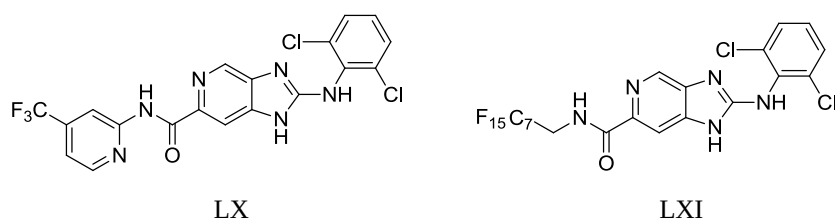
Obrázek 31: Vybrané inhibitory kinas z řad derivátů imidazo[4,5-*b*]pyridinu



2.2.4 Protizánětlivé látky

Pro léčbu zánětlivých onemocnění (revmatoidní artritida, astma aj.) je ve většině případů vývoj nových léků cílen na inhibici enzymu cyklooxygenasy, konkrétně COX-2. Cyklooxygenasy katalyzují metabolizaci kyseliny arachidonové za vzniku tzv. eikosanoidů, kam patří mimo jiné prostaglandiny a leukotrieny. Tyto látky působí v těle již při velmi nízkých koncentracích a slouží k buněčné signalizaci, zejména k vyvolání zánětlivé odpovědi. Inhibitory COX-2 musí být vysoce selektivní látky, jelikož působením na COX-1 dochází k závažným zdravotním komplikacím. Proto je snadnější volit takové látky, které inhibici cyklooxygenasy obcházejí. Příkladem mohou být imidazo[4,5-*c*]pyridin-6-karboxamidy (Obrázek 32), které se zaměřují na tzv. MAPEG enzymy. Ty se uplatňují až v dalších částech syntézy prostaglandinů a jeví se tak být vhodným terapeutickým cílem.^{69,70}

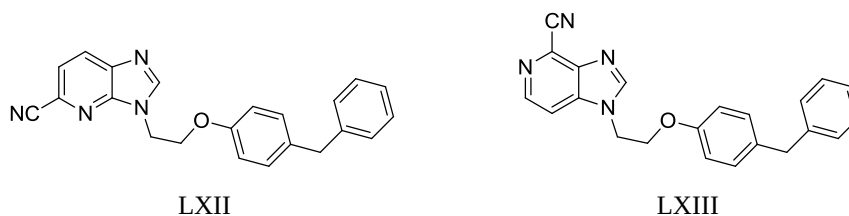
Obrázek 32: Příklady inhibitorů MAPEG, potenciálních protizánětlivých látek



Jiným příkladem použití imidazopyridinů jako protizánětlivých látek jsou inhibitory leukotrien A₄ (LTA₄) hydrolasy. Leukotrieny patří podobně jako prostaglandiny do skupiny mediátorů spouštějících zánětlivou reakci. Vhodně substituované deazapuriny jsou schopny tento enzym úspěšně inhibovat, což bylo

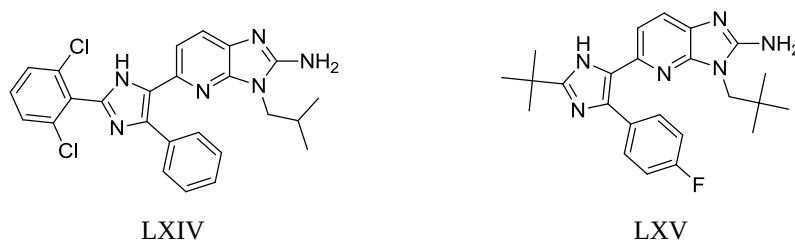
prokázáno i v testech na laboratorních myších. Jak imidazo[4,5-*b*]pyridiny, tak imidazo[4,5-*c*]pyridiny se ukázaly být aktivní, přičemž první zmiňované měly inhibující schopnost o několik řádů vyšší (Obrázek 33).⁷¹

Obrázek 33: Potenciální inhibitory LTA₄ hydrolasy



Kromě působení na biosyntézu eikosanoidů lze protizánětlivé látky cílit např. na p38α kinasy, které jsou zodpovědné za mimobuněčné stimulace způsobující produkci různých cytokinů. Může také vyvolat indukci enzymu COX-2, což je v případě zánětu nežádoucí. K inhibici této kinasy bylo vyvinuto několik derivátů benzimidazolů a také imidazopyridinů. Imidazopyridinové deriváty (Obrázek 34) vykazovaly vyšší inhibiční schopnosti, což jen potvrzuje, že jsou vhodným skeletem pro rozličné biologické aplikace.^{72,73}

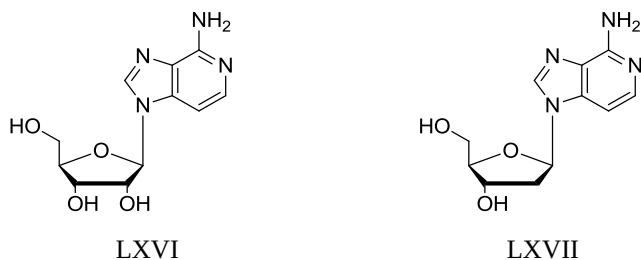
Obrázek 34: Příklady imidazopyridinových inhibitorů p38α kinasy



2.2.5 Imunosupresory

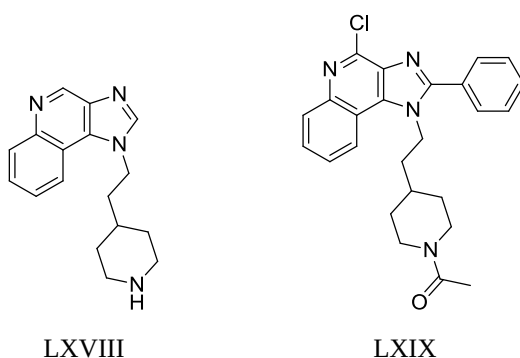
V první skupině deazapurinových imunosupresiv byla testována skupina imidazo[4,5-*c*]pyridinů. Ty byly převedeny na odpovídající analogy nukleosidů pomocí enzymatických reakcí. Jak základní struktury, tak tyto nukleosidové deriváty byly testovány na kultivovaných lidských buňkách pro jejich schopnost imunosuprese. Nejslibnějším kandidátem se ukázal 3-dezaadenosin, (Obrázek 35), resp. jeho analog s 2'-deoxyribosou.⁷⁴

Obrázek 35: 3-deazaadenosin (LXVI), derivát deazapurinu s prokázanými imunosupresivními schopnostmi, a jeho 2'-deoxy analog (LXVII)



Další skupina imunosupresorů byla odvozena od struktury výše zmíněného imiquimodu (Obrázek 26). U této látky byla zjištěna mimo jiné také schopnost potlačení faktoru TNF- α . Tento protein je uvolňován právě při imunitní reakci organismu. Pokud je ovšem produkován v nadbytku, může dojít až k sepsi. Na základě tohoto poznatku byla struktura imiquimodu modifikována a vedla až k derivátu s velmi vysokou schopností suprese faktoru TNF- α (Obrázek 36).⁷⁵

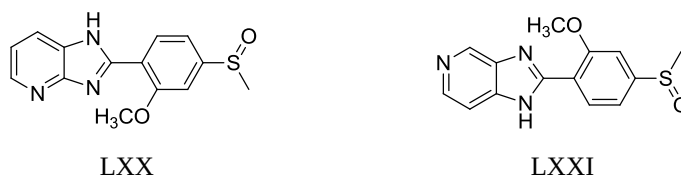
Obrázek 36: Příklady látek odvozených od imiquimodu se schopností suprese TNF- α



2.2.6 Další látky

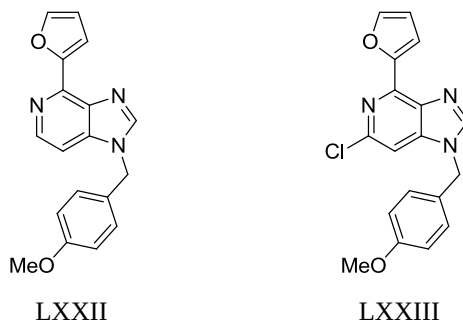
Kromě výše zmíněných tříd biologicky aktivních látek se imidazopyridinové deriváty vyskytují ještě v celé škále dalších skupin. Prvním příkladem mohou být látky sulmazol a isomazol (Obrázek 37). Sulmazol byl původně vyvíjen pro léčbu srdečního selhání jako tzv. inotropikum. Byl ale stažen vzhledem k toxicitě. I tak však byla jeho struktura zkoumána a optimalizována. Isomazol se ukázal být účinnějším než sulmazol. Od objevu těchto struktur již bylo vyvinuto několik dalších inotropik, nicméně vzhledem k problémům s toxikologickými výsledky byl jejich výzkum ukončen.^{76,77,78}

Obrázek 37: Struktury v minulosti zkoumaných inotropik sulmazolu (LXX) a isomazolu (LXXI)



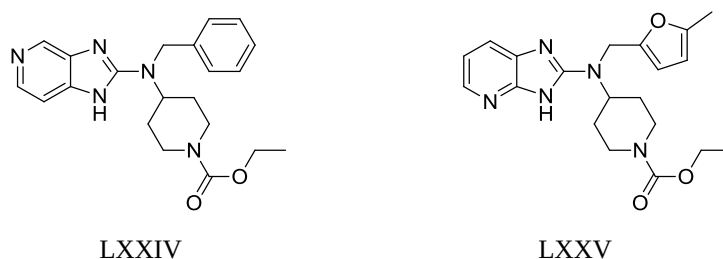
Deazapurinové deriváty se vyskytují také mezi antimykobakteriálními látkami (Obrázek 38). Podnětem pro studium těchto látek byla jako v případě purinových analog snaha vyvinout nové účinné látky pro léčbu tuberkulózy. V sérii těchto látek byly mimo imidazopyridinové deriváty testovány také purinové deriváty se stejnou substitucí. Bylo ukázáno, že antimykobakteriální aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* je u obou skupin látek přibližně stejná, u imidazopyridinů se však objevila vyšší toxicita vůči savcím buňkám.⁷⁹

Obrázek 38: Deriváty imidazo[4,5-c]pyridinu s antimykobakteriálními účinky



I mezi antihistaminiky lze najít deriváty imidazopyridinů. Vybrané látky obsahují mimo substituce na jádře také skelet s piperidinovým jádrem, které je v tomto případě jednou z klíčových částí molekuly zodpovědnou za aktivitu v oblasti blokace účinků histaminu (Obrázek 39).⁸⁰

Obrázek 39: Příklady antihistaminik z řad deazapurinových derivátů



Většina z látek zmíněných v této kapitole nebyla citována v dalších publikacích, i tak však tyto struktury ukazují, že deriváty imidazo[4,5-*b*]pyridinů a imidazo[4,5-*c*]pyridinů jsou molekulami s širokým spektrem biologických účinků. Převážná část úspěchu těchto látek je dána jejich podobností s purinovými bázemi, díky čemuž jsou testovány jako inhibitory nepřeberného množství enzymů. Deazapurinová analoga jsou tedy látky s vysokým potenciálem v oblasti biologicky aktivních substancí.

2.3 Základní přehled 5-HT₆ receptorů a jejich ligandů

2.3.1 Úvod a dělení 5-HT receptorů

Pod pojmem 5-HT receptory rozumíme přenašeče, jejichž přirozeným substrátem je serotonin, neboli 5-hydroxytryptamin. Toto označení je odvozeno z historického vývoje objevů nových receptorů. Serotonin sám o sobě funguje jako neurotransmiter při přenosu vzruchů v centrální i periferní nervové soustavě, ale také v jiných soustavách lidského těla. Přestože mají 5-HT receptory společnou přirozenou afinitu k serotoninu, jejich schopnosti interakcí s jinými ligandy jsou velmi pestré. Tento fakt je umocněn mimo jiné vývojem nových receptorových genů, které daly vzniknout nepřebernému množství agonistů i antagonistů serotoninových přenašečů. Studie biologické aktivity na 5-HT receptorech jsou ukázkovým příkladem vývoje nových látek sloužících jako selektivní ligandy těchto terapeutických cílů.⁸¹

Všechny podskupiny serotoninových receptorů (s výjimkou 5-HT₃) patří mezi receptory spřažené s G proteiny (tzv. GPCR). Jsou přítomny v buněčné membráně, přičemž na vnitřní straně této membrány interagují právě s vybranými druhy G proteinů. Ty jsou schopny na sebe vázat GTP a tím vyvolávat buněčnou signalizaci. Členění serotoninových receptorů započalo v 50. letech 20. století. Přípravou různých selektivně působících ligandů bylo postupem času možné rozlišit několik tříd 5-HT receptorů. K dnešnímu dni je známo 7 hlavních skupin těchto receptorů.

5-HT₁ receptory plní inhibiční funkci při nervových přenosech. Jsou připojené na G_i protein, který je zodpovědný za inhibici syntézy cAMP z ATP.

5-HT₂ receptory jsou spřaženy s jiným typem G proteinu, a sice G_q proteinem. Ten řídí hydrolýzu fosfatidylinositolu 4,5-difosfátu na diacylglycerol a inositol trifosfát. Diacylglycerol pak zůstává v buněčné membráně, kde slouží jako aktivátor

proteinových kinas. Inositol trifosfát pokračuje do buňky, kde slouží jako zdroj fosfátů pro různé druhy proteinů.

Skupina 5-HT₃ receptorů není spřažena s G proteiny, ale patří mezi tzv. iontové kanály. Konkrétně jde o takový druh iontových kanálů, který umožňuje výměnu Na⁺, K⁺, Ca²⁺ nebo Cl⁻ iontů v závislosti na navázání specifického ligandu (v tomto případě serotoninu, příp. jeho analog). U této skupiny receptorů se objevuje také vliv na CNS, jelikož 5-HT₃ receptory mají velké zastoupení právě v této soustavě. Jejich stimulace řídí hned několik fyziologických projevů, např. vnímání bolesti, kognitivní funkce, zvracení a v neposlední řadě také emoční projevy. Z tohoto důvodu mohou být zapojeny při psychózách a drogových závislostech.

Na rozdíl od 5-HT₁ receptorů působí 5-HT₄ úplně opačným účinkem. Jejich úlohou je zvyšování hladiny cAMP. Spřaženy jsou s jiným druhem G proteinu, G_s proteinem.

Oproti tomu 5-HT₅ receptory slouží analogicky k 5-HT₁ receptorům, jsou tedy spřažené s G_i proteinem a snižují hladinu cAMP.

5-HT₆ receptory jsou z našeho pohledu nejzajímavější skupinou serotoninových receptorů. Podobně jako 5-HT₄ receptory jsou spřaženy s G_s proteinem. Hlavní funkcí je tedy opět zvyšování hladiny cAMP. Vzhledem k jejich funkci hrají důležitou roli v oblastech motoriky, emočních projevů, vnímání a paměti. I některá známá antipsychotika (clozapin, olanzapin) a antidepresiva (amitriptylin, nortriptylin) vykazovala antagonismus k těmto receptorům. Proto jsou tyto receptory velmi slibnými biologickými cíli při léčbě schizofrenie a depresivních poruch.

Poslední hlavní skupinou jsou 5-HT₇ receptory. Ty jsou opět spřaženy s G_s proteinem a jsou zodpovědné opět za zvyšování koncentrace cAMP.⁸²

2.3.2 Popis a základní funkce 5-HT₆ receptorů

V průběhu analýz 5-HT₆ receptorů byla zkoumána mimo jiné také jejich schopnost interakce s různými druhy léčiv. Bylo prokázáno, že farmakologické vlastnosti těchto receptorů zajišťují relativně vysokou afinitu k velké spoustě antipsychotik. Již při prvních studiích 5-HT₆ receptorů bylo objeveno, že dochází ke stimulaci adenylát cyklasy, a tedy řízení tvorby cAMP. Ten se pak uplatňuje v široké škále dalších buněčných procesů. Pro správnou regulaci koncentrace cAMP v buňce je tedy zapotřebí jak rozvoj agonistů 5-HT₆ receptorů, tak také jejich antagonistů.^{84,85}

Na základě genetických rozborů 5-HT₆ receptoru byla zjištěna vysoká podobnost mezi lidským 5-HT₆ receptorem a jeho analogem přítomným v laboratorních myších. Díky tomu je možné efektivně provádět testování nových biologicky aktivních látek působících na tento druh receptorů. Vzhledem k tomu, že jsou však 5-HT₆ receptory vysoce homologní s jinými serotoninovými receptory, je velmi těžké získat u potenciálních léčiv dostatečnou selektivitu.⁸⁶

2.3.3 Přehled ligandů pro 5-HT₆ receptory

Mezi zástupci ligandů působících na 5-HT₆ receptory lze najít látky působící různými druhy mechanismů. Patří sem jak celkoví, tak částeční agonisté, antagonisté a také inverzní agonisté. Každá z těchto podskupin ligandů v sobě zahrnuje značné množství strukturně variabilních struktur s ještě rozmanitějším počtem biologických účinků.

2.3.3.1 Agonisté 5-HT₆ receptorů

Agonisté, tedy látky vyvolávající fyziologickou odpověď, mají u 5-HT₆ receptorů hned několik schopností účinku. Relativně zajímavou myšlenou se ukazuje být zjištění, že agonisté i antagonisté mohou v tomto případě vyvolat podobnou odpověď. To by znamenalo, že jak inhibice, tak aktivace 5-HT₆ receptorů může vést k cílovému efektu. I tak je zde však viditelná zjevná strukturní variabilita mezi agonisty a antagonisty těchto přenašečů (Obrázek 40).

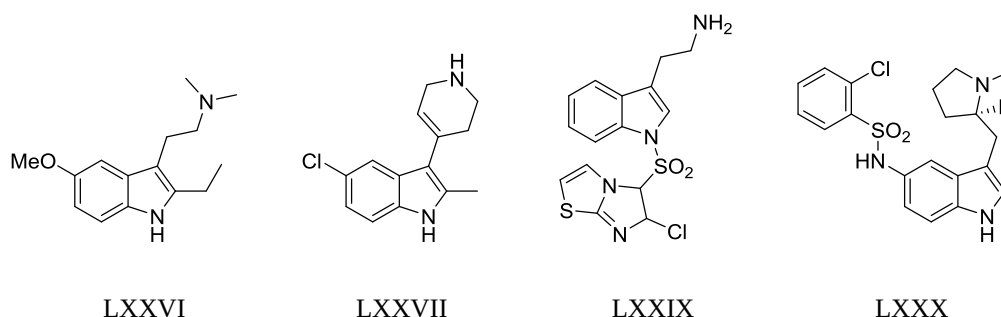
První možnost využití biologicky aktivních látek jako ligandů 5-HT₆ receptorů vychází z informace, že agonisté těchto přenašečů mají schopnost zlepšovat paměť a schopnost učit se u zvířecích modelů. Toho se v tomto případě využívá pro studium léčby Alzheimerovy choroby, jedním z hlavních zdrojů demence u lidí staršího věku.⁸⁷

Jiná skupina těchto derivátů byla testována kvůli schopnosti zvýšit koncentraci GABA pomocí navázání se do vazebného místa 5-HT₆ receptoru. Bylo tedy prokázáno, že tento přenašeč má i tak komplexní vliv, že má schopnost regulovat syntézu GABA. To nabízí potenciální uplatnění v oblasti léčby např. obsedantně kompulzivní poruchy.^{88,89}

Agonistů 5-HT₆ receptorů lze využít například i pro studium vlivu na koncentraci cAMP. Jak již bylo zmíněno, syntéza cAMP je primárním dějem

regulovaným právě těmito receptory. Na základě měření hladiny cAMP je tedy možné optimalizovat strukturu agonistů serotoninových receptorů a vyvíjet tak nové molekuly s vyšší afinitou k vazebnému místu přenašeče.⁹⁰

Obrázek 40: Přehled několika základních agonistů 5-HT₆ receptorů



2.3.3.2 Antagonisté 5-HT₆ receptorů

Nalezení vhodných antagonistů serotoninových receptorů je obecně jednodušší než v případě agonistů. Antagonisté jsou obecně takové ligandy, které jsou schopny se vázat na daný receptor, ale nespustí jeho odpověď. Toho lze opět využít při léčbě různých druhů chorob souvisejících s CNS.

Jak již bylo zmíněno v minulé kapitole, antagonisté mohou vyvolat stejnou fyziologickou odpověď jako agonisté. Příkladem můžou být látky vyvíjené pro léčbu Alzheimerovy choroby, ovšem s důrazem na antagonismus 5-HT₆ přenašečů. Ukázalo se, že klíčovými strukturními motivy pro silnou afinitu k vazebnému místu jsou pravděpodobně indolový skelet nebo jeho bioisoster, a arysulfonová skupina. Na základě tohoto zjištění byly vyvinuty látky mající svůj potenciál právě v léčbě Alzheimerovy nemoci a schizofrenie.⁹¹

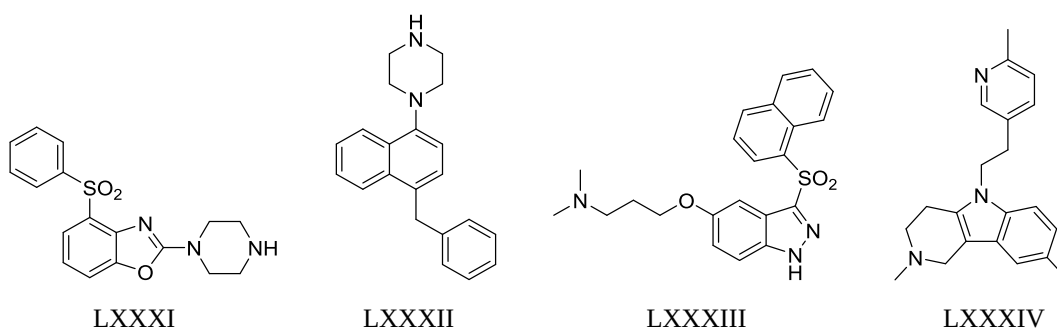
Jiná studie ukázala, že kromě výše zmíněných strukturních motivů má na vysokou afinitu vliv také přítomnost piperazinového kruhu. Ten simuluje postranní řetězec serotoninu a zvyšuje tak schopnost antagonistů vázat se na 5-HT₆ receptory.⁹²

Kromě těchto strukturních motivů lze však u antagonistů 5-HT₆ receptorů najít i mnohé další funkční skupiny, které jim zajišťují cílovou biologickou aktivitu (Obrázek 41). Objevují se zde i látky, které se dostaly do dalších fází klinických zkoušek, např. cerlapirdin (LXXXIII), a latrepirdin (LXXXIV). Většina se zaměřuje na léčbu

Alzheimerovy nemoci a podobných chorob, ale například latrepirdin je známý mimo jiné jako antihistaminikum a potenciální léčivo pro Huntingtonovu chorobu.^{93,94}

Je tedy zjevné, že strukturní variabilita těchto látek je opravdu vysoká a v mnohých případech je již původní skelet serotoninu jen těžce rozeznatelný.

Obrázek 41: Přehled několika zástupců antagonistů 5-HT₆ receptorů



2.3.3.3 Inverzní agonisté 5-HT₆ receptorů

O využití ligandů pro 5-HT₆ receptory jako inverzních agonistů není známo mnoho. Inverzní agonista funguje opačným způsobem než běžný agonista. Po navázání do vazebného místa dojde ke spuštění protichůdné odpovědi, než jakou by vyvolal právě plný agonista.

Přestože se výzkum v oblasti serotoninových receptorů zaměřoval z majoritní části na agonismus/antagonismus, lze najít i práce zaměřující se na inverzní agonismus. Cílovým terapeutickým účinkem je pak podobně jako u agonistů a antagonistů léčba Alzheimerovy choroby, nespavosti, obezity a depresí.⁹⁵

Obrázek 42: Přehled ligandů vyvíjených jako inverzních agonistů 5-HT₆ receptorů



Je tedy spousta variant ligandů, které jsou cíleny na agonismus/antagonismus v oblasti 5-HT₆ receptorů.

3. Výsledky a diskuze

Praktická část této diplomové práce je členěna na tři hlavní kapitoly. První z nich se věnuje rozvinutí metodiky přípravy purinových derivátů, které jsou v poloze N^9 substituovány skeletem pocházejícím z α -aminokyseliny, to vše s využitím syntézy na pevné fázi. Obecná syntetická cesta již byla testována v rámci vypracování bakalářské práce, a to na čtyřech modelových derivátech. Pro ověření variability této metodiky byla navržena rozsáhlejší knihovna látek s rozličnými substituenty v polohách C^6 (resp. C^2), C^8 a pochopitelně i N^9 . Druhá část práce je věnována přípravě derivátů imidazo[4,5-*b*]pyridinu a imidazo[4,5-*c*]pyridinu, neboli také 1-deazapurinů a 3-deazapurinů. První série látek z této skupiny byla připravena pomocí syntézy na pevné fázi. Syntéza těchto látek je v mnohých aspektech analogická k přípravě výše zmiňovaných N^9 substituovaných purinů, a tím pádem spolu tyto dvě metodiky velmi úzce souvisí. Samotná syntéza vycházela z dříve publikovaného postupu¹ za účelem připravit vhodně substituované deazapuriny za účelem studií aktivity na 5-HT₆ receptory. Syntéza těchto derivátů probíhala v rámci pracovní stáže na Farmaceutické fakultě Jagellonské univerzity v Krakově.

V závěrečné fázi práce je diskutována syntéza série derivátů imidazo[4,5-*b*]pyridinu, tentokrát již klasickou roztokovou syntézou. Tato práce byla realizována částečně na Farmaceutické fakultě v Krakově, ve zbývajícím čase pak na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. Hlavním cílem přípravy těchto látek byla opět aplikace pro SAR studie, srovnání biologických účinků s dříve připravenými deriváty a v neposlední řadě optimalizace reakčních podmínek jednotlivých kroků.

Látky se strukturním motivem deazapurinů byly a budou dále testovány na potenciální agonismus/antagonismus 5-HT receptorů, s hlavním zaměřením na 5-HT₆ receptory.

3.1 Syntéza derivátů purinu na pevné fázi

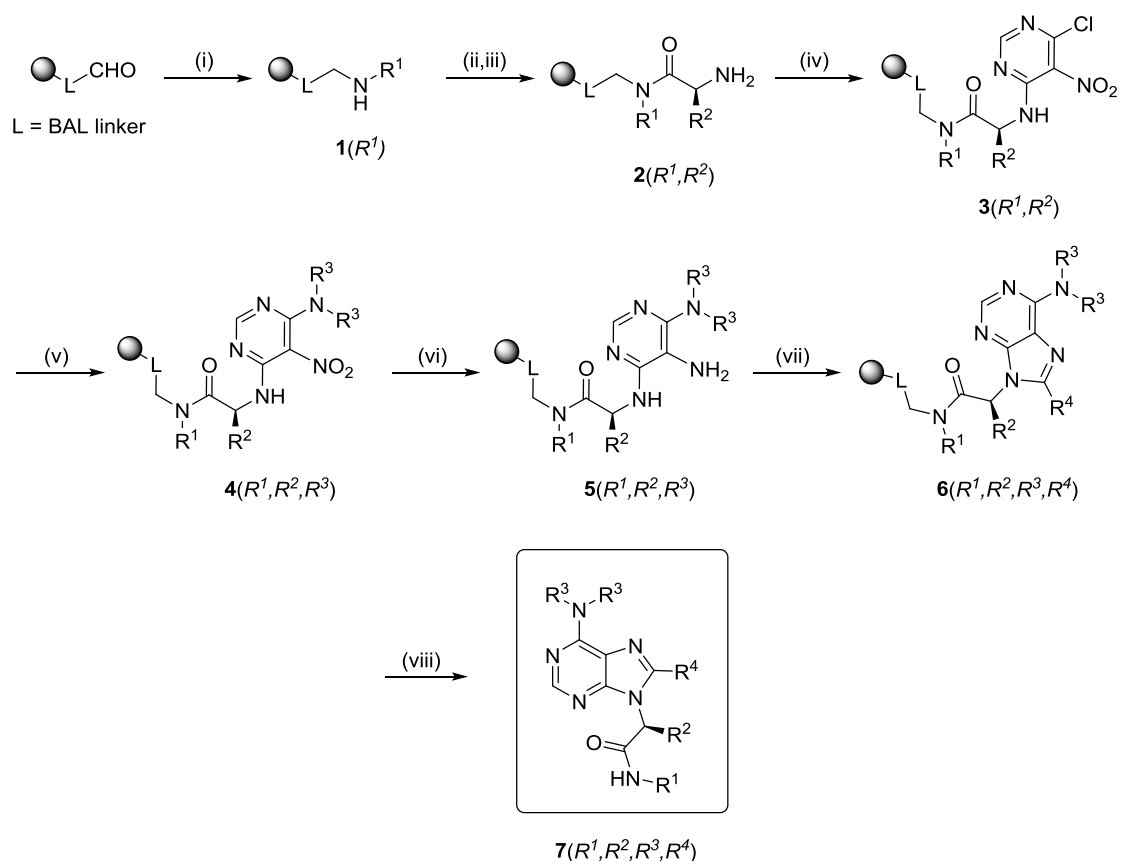
Tato kapitola se zabývá syntézou nových derivátů purinu, které jsou v poloze N^9 substituovány strukturním motivem přírodních α -aminokyselin. Zakomponováním tohoto ligandu na purinový skelet byly získány hned dvě variabilní místa v cílené poloze, a to postranní řetězec aminokyseliny a funkční zbytek od aminu, který byl na

danou kyselinu vázán ve formě amidu. Další dvě pozice na purinovém skeletu, C^6 (resp. C^2) a C^8 byly substituovány pestrout škálou ligandů majících svůj původ v dostupných sekundárních aminech a aldehydech. Všechny tyto výchozí látky byly voleny tak, aby ověřily variabilitu a univerzálnost navržené metodiky. Přesto, že připravené látky neměly analogii k žádným doposud popsaným biologicky aktivním molekulám, byly otestovány v základním screeningu na dvou nádorových liniích.

3.1.1 Obecné schéma celkové syntézy

Obecné a optimalizované schéma syntézy je shrnuto ve Schématu 1. Vychází z reakční sekvence uvedené v bakalářské práci, nicméně bylo dále optimalizováno a upraveno.

Schéma 1: Obecné schéma reakční sekvence*



* (i) amin, AcOH, bezv. DMF, t_{lab} , 16 h., poté $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, t_{lab} , 4 h.; (ii) Fmoc-aminokyselina, HOBT, DIC, DMF, DCM, t_{lab} , 16 h.; (iii) piperidin, DMF, t_{lab} , 30 min.; (iv) 4,6-dichlor-5-nitropyrimidin, DIEA, bezv. DMF, t_{lab} , 16 h.; (v) sekundární amin, bezv. DMF, 60 °C, 16 h.; (vi) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM, H_2O , t_{lab} , 16 h.; (vii) aldehyd, DMSO, 100 °C, 72 h., nebo aldehyd, DMSO, 100 °C v mikrovlnném reaktoru, 1 h.; (viii) TFA, DCM, t_{lab} , 2 h.

Z hlediska dílčích reakcí se nejprve jednalo o ukotvení Backbone Amide Linkeru (BAL, 4-(4-formyl-3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny)⁹⁶ na výchozí aminomethylovou pryskyřici. Na tento linker byl reduktivní aminací imobilizován příslušný amin za vzniku základní struktury **1**(R^1). Následně bylo provedeno navázání chráněné α -L-aminokyseliny amidickou vazbou na ukotvený amin. Tento imobilizovaný meziprodukt byl následně deprotekcí Fmoc skupiny na aminokyselině převeden na derivát **2**(R^1, R^2), který byl arylován 4,6-dichlor-5-nitropyrimidinem za tvorby struktury **3**(R^1, R^2). Zbývající chlor na pyrimidinovém jádře byl v dalším kroku substituován sekundárním aminem za poskytnutí intermediátu **4**(R^1, R^2, R^3). Ten byl následně podroben redukci a vzniklý derivát **5**(R^1, R^2, R^3) byl v následném kroku podroben cyklizaci s aldehydem, což dalo vznik struktuře **6**(R^1, R^2, R^3, R^4). Posledním krokem reakční sekvence bylo odštěpení finální látky z pryskyřice za poskytnutí finálního produktu **7**(R^1, R^2, R^3, R^4), který byl po odpaření štěpící směsi přečištěn pomocí semipreparativní HPLC.

3.1.2 Řešení problematiky reakční sekvence

V části věnované optimalizaci reakční sekvence jsou uvedeny ty problémy, které nejsou podrobně rozebírány v bakalářské práci. Přestože byla reakční sekvence na několika případech optimalizována, při použití širší skupiny výchozích látek bylo třeba některé kroky znovu modifikovat za účelem zvýšení univerzálnosti vyvinuté metodiky. Konkrétní problémy a modifikace jsou zmíněny v této kapitole.

3.1.2.1 Volba vhodné pryskyřice

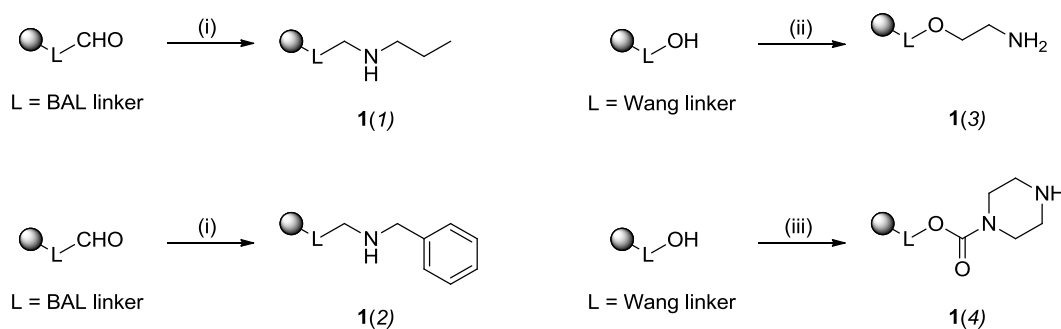
Prvním klíčovým bodem celé reakční sekvence byla volba nosiče, na kterém bude ukotven výchozí amin pro navázání dalších strukturních motivů a výstavbu cílového skeletu. Pro základní primární aminy, v tomto případě propylamin a benzylamin, byla jako nejvhodnější nosič zvolena aminomethylová polystyrenová pryskyřice s navázaným BAL linkerem. Na karbonylovou skupinu linkeru byl amin ukotven pomocí reduktivní aminace.

V případě použití funkčně substituovaných aminů, tj. piperazinu a aminoethanolu, byla pro syntézu vybrána Wangova pryskyřice, jejíž linker zároveň

sloužil i jako protektivní skupina pro vedlejší funkci výchozího aminu. Piperazin byl vázán přes karbamátovou vazbu, aminoethanol pak přes vazbu etherovou.

Celkem tedy byly použity čtyři strukturně rozdílné aminy, ze kterých byly připraveny základní výchozí imobilizované struktury $1(R^1)$ (Schéma 2). Dále pak reakční sekvence pokračovala analogicky k obecnému schématu uvedenému v kapitole 3.1.1.

Schéma 2: Imobilizace výchozích aminů na jednotlivé pevné nosiče*



* (i) propylamin nebo benzylamin, AcOH, bezv. DMF, t_{lab} , 16 h., poté $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, t_{lab} , 4 h.; (ii) a) trichloracetonitril, DBU, DCM, t_{lab} , 1 h., b) 2-(Fmoc-amino)ethanol, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, THF, t_{lab} , 30 min., c) piperidin, DMF, t_{lab} , 20 min.; (iii) a) CDI, pyridin, DCM, t_{lab} , 2 h., b) piperazin, DCM, t_{lab} , 16 h.

3.1.2.2 Test reakční sekvence s použitím 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinu

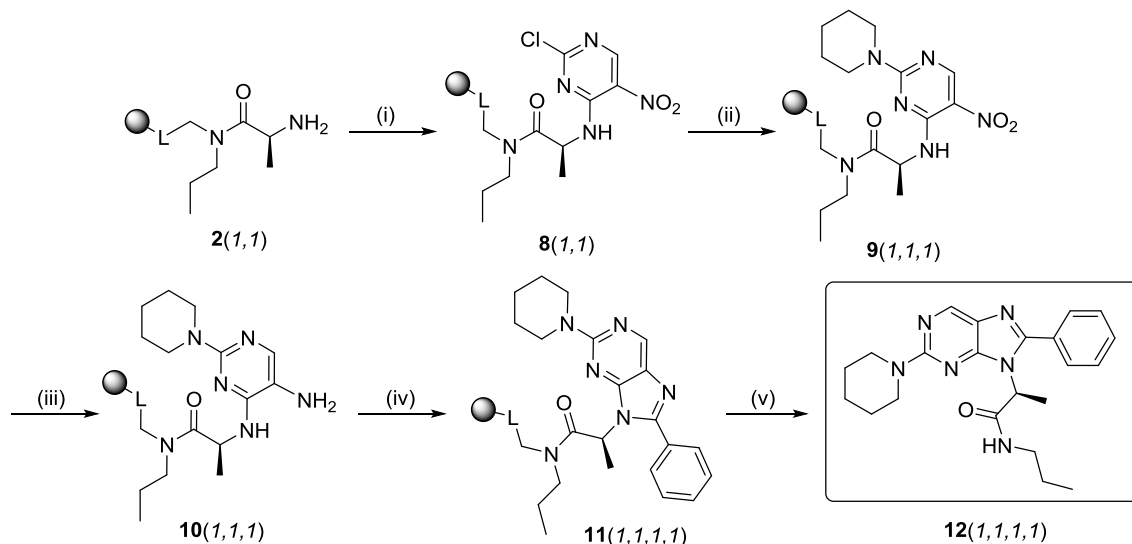
Vzhledem k tomu, že navržená metoda uvažovala pro finální struktury ligand pocházející ze sekundárního aminu pouze v poloze C^6 , byla testována i syntéza dalšího izomeru nesoucí tento substituent v poloze C^2 . Namísto původního 4,6-dichlor-5-nitropyrimidinu byl použit jeho polohový izomer 2,4-dichlor-5-nitropyrimidin, který by zajistil cílenou substituci aminu do polohy C^2 (Schéma 3).

Bohužel však při testování této sekvence vznikl zvolený analog **12(1,1,1,1)** pouze v 53% čistotě surové směsi. Po purifikaci byl pak stanoven výtěžek na pouhých 7 %. Problematickou částí syntézy se stala cyklizace. Bylo testováno několik alternativ, jak výchozí diamin **10(1,1,1)** kvantitativně zcyklizovat.

První z nich vycházela z použití DDQ, jehož aplikace na cyklizaci analogických purinových derivátů byla popsána v literatuře,⁹⁷ nicméně v daném případě nebyl pozorován žádný pozitivní vliv. Následně byly cyklizace katalyzovány přídatkem 5% AcOH, příp. *p*-toluensulfonové kyseliny. Vzhledem k tomu, že se jednalo o kyselé

prostředí, byl monitorován i reakční roztok kvůli případnému nežádoucímu štěpení z pryskyřice. Ani tyto reakce však nevedly ke kvantitativnímu převodu na cílový cyklizovaný produkt **11**(1,1,1,1).

Schéma 3: Modelové schéma reakčního postupu pro syntézu C^2 polohového izomeru*

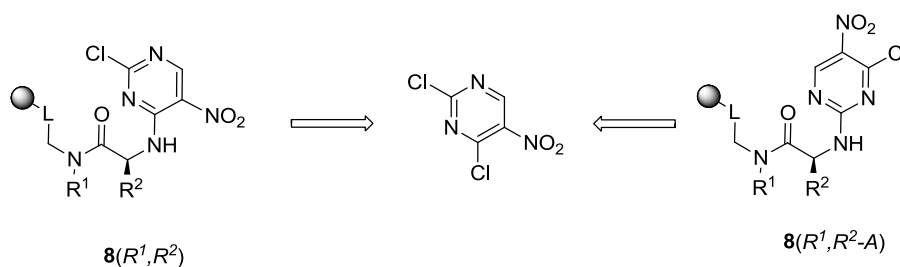


* (i) 2,4-dichlor-5-nitropyrimidin, DIEA, bezv. DMF, t_{lab} , 16 h.; (ii) piperidin, bezv. DMF, 60 °C, 16 h.; (iii) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , TBAHS, DCM, H_2O , t_{lab} , 16 h.; (iv) benzaldehyd, DMSO, 100 °C, 72 h.; (v) TFA, DCM, t_{lab} , 2 h.

Proto bylo k reakci použito mikrovlnného reaktoru, kde byla testována celá řada reakcí, ať už s kyselou katalýzou nebo s použitím DDQ, přičemž bylo použito vyšších teplot (100 °C, 130 °C, 150 °C a 200 °C) a rozličných rozpouštědel (DMF, DMSO, NMP), ale ani jedna z testovaných reakcí neprobíhala dle očekávání.

Byla tedy zvažována alternativa, zda se chlory na nesymetrickém 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinu nesubstituuji v opačném pořadí, což by tedy vedlo k opačnému izomeru **8**(R^1 , R^2 -A) (Schéma 4), který by nebylo možné podrobit finální cyklizaci.

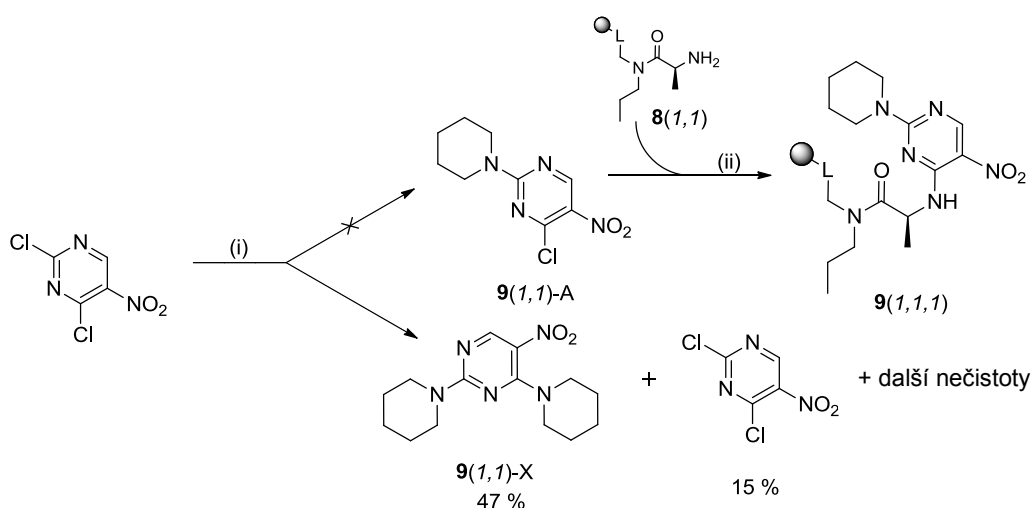
Schéma 4: Hypotéza vzniku opačného izomeru u arylace s 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinem



Přestože v literatuře je uváděna prioritní substituce chloru v poloze 4, chlor v poloze 2 je také relativně aktivovaný a v závislosti na podmínkách a výchozím aminu může docházet k přednostní substituci právě v poloze 2.^{98,99}

Byla tedy provedena analogická reakce, která využívala nejprve reakci 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinu s piperidinem, a poté ukotvení vzniklého intermediátu **9(1,1)-A** na připravenou strukturu **2(1,1)** (Schéma 5). Bohužel však nevznikal požadovaný produkt. Místo toho vznikal rovnou disubstituovaný produkt **9(1,1)-X**, který byl navíc značně znečištěn vedlejšími produkty. Poměr nečistot vznikal nezávisle na ekvivalentu piperidinu.

Schéma 5: Test obrácené substituce 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinu*



* (i) piperidin, DIEA, DMSO, t_{lab} , 16 h.; (ii) DIEA, DMSO, 70°C, 16 h.

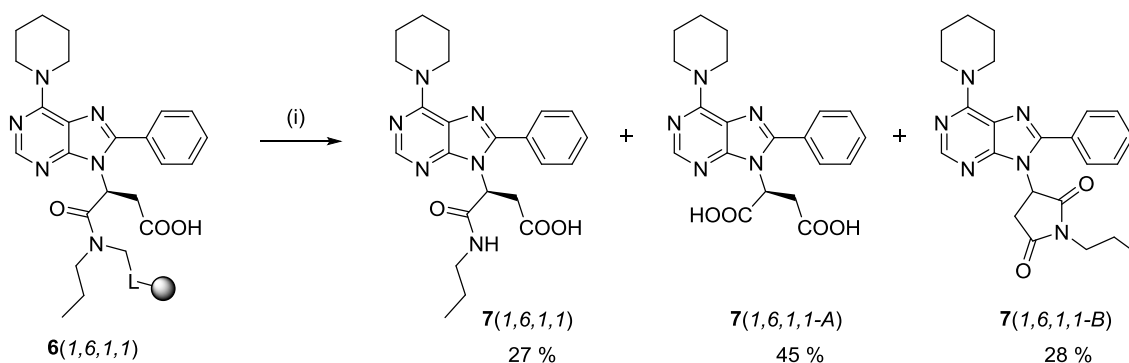
Jednou z dalších možností řešení syntézy výše zmíněného polohového izomeru může být studium derivátu **10(1,1,1)** pomocí pokročilých NMR experimentů, které by prokázaly konstituci molekuly a tedy přednostní orientaci substituce 2,4-dichlor-5-nitropyrimidinu. Tato studie není součástí této diplomové práce.

3.1.2.3 Optimalizace podmínek finálního štěpení

Pro finální štěpení z pryskyřice byly oproti standardním podmínkám štěpení - 50% TFA/DCM, rt, 30 min. - používány tvrdší podmínky, tj. 100% TFA, 60 °C, 2 h. na základě poznatků z bakalářské práce, kde se tento postup jevil jako efektivní pro získání lepších výtěžků, nebyl však podložen relevantními daty.

Navíc, při jeho následném pro deriváty α -L-asparagové kyseliny docházelo při finálnímu odštěpení produktu **7(1,6,1,1)** z pryskyřice ke vzniku dvou vedlejších derivátů, které byly charakterizovány pomocí uHPLC-MS jako produkty částečné hydrolýzy, tj. **7(1,6,1,1-A)** a intramolekulární cyklizace, tj. **7(1,6,1,1-B)** po vystavení cílového produktu těmto štěpicím podmínkám (Schéma 6).

Schéma 6: Vznik vedlejších produktů při finálním štěpení látky **7(1,6,1,1)** z pryskyřice*



* (i) 100% TFA, 80 °C, 16 h.

S cílem ověřit optimální podmínky pro finální štěpení byla provedena detailní studie závislosti složení štěpicí směsi a podmínkám štěpení na celkovém výtěžku a čistotě finálních produktů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Test podmínek pro finální štěpení produktů (A), (B) a (C)

KONCENTRACE TFA/DCM	TEPLOTA	ČAS	PLOCHA SIGNÁLU*			ČISTOTA*		
			A	B	C	A	B	C
50%	t_{lab}	0,5 h.	3854813	5733241	10009938	77 %	80 %	81 %
50%	t_{lab}	2 h.	3845045	7289515	9204768	71 %	74 %	74 %
50%	t_{lab}	18 h.	3895007	7192114	6674195	70 %	73 %	75 %
50%	80 °C	0,5 h.	4262385	7746333	7908226	71 %	70 %	67 %
50%	80 °C	2 h.	4174587	7879978	71100913	78 %	75 %	65 %
50%	80 °C	18 h.	3826720	6804818	4849265	80 %	76 %	48 %
100%	t_{lab}	0,5 h.	4061959	6784700	10310203	73 %	79 %	78 %
100%	t_{lab}	2 h.	3984714	7450037	7726500	70 %	71 %	69 %
100%	t_{lab}	18 h.	3787913	8452276	7360631	70 %	68 %	68 %
100%	80 °C	0,5 h.	4055981	7680416	7617413	72 %	70 %	70 %
100%	80 °C	2 h.	4150952	7831843	7714563	78 %	75 %	63 %
100%	80 °C	18 h.	4043596	7694977	4543394	73 %	74 %	36 %

* Čistota a plocha signálu stanoveny na základě integrovaných chromatogramů.

Pro tuto studii byly vybrány meziprodukty **6(1,1,1,1) (A)**, **6(1,2,1,1) (B)** a **6(1,3,1,1) (C)**. Tyto látky byly podrobeny rozdílným podmínkám štěpení. Proměnnými byly koncentrace TFA ve štěpícím roztoku, teplota použitá pro štěpení a reakční čas. Na základě čistoty a plochy píků produktů z uHPLC-MS analýz byla hledána ideální štěpící směs pro všechny finální produkty (Tabulka 1).

Z údajů v Tabulce 1 vyplývá, že u derivátu **7(1,1,1,1)** nebyl výraznější vliv podmínek na výtěžek pozorován, u derivátu **7(1,2,1,1)** bylo sledováno zlepšení výtěžku s vyššími koncentracemi i teplotami a delšími reakčními časy, u derivátu **7(1,3,1,1)** tomu bylo naopak. Čistota látek byla v průměru nejvyšší při použití mírnějších podmínek.

Nebyl tedy potvrzen zásadní vliv těchto podmínek na celkový výtěžek nebo čistotu reakční směsi, který byl navržen v bakalářské práci. Na základě tohoto testu byly jako optimální podmínky zvoleny 50% TFA/DCM, rt, 2 h. Delší reakční čas oproti standardnímu protokolu byl ponechán převážně z toho důvodu, aby došlo ke kvantitativnímu odchránění protektivních skupin na postranním řetězci aminokyselin, zejména O-*t*Bu protektivní skupiny postranního řetězce serinu.

3.1.2.4 Vznik vedlejších produktů bez substituentu v poloze C⁸

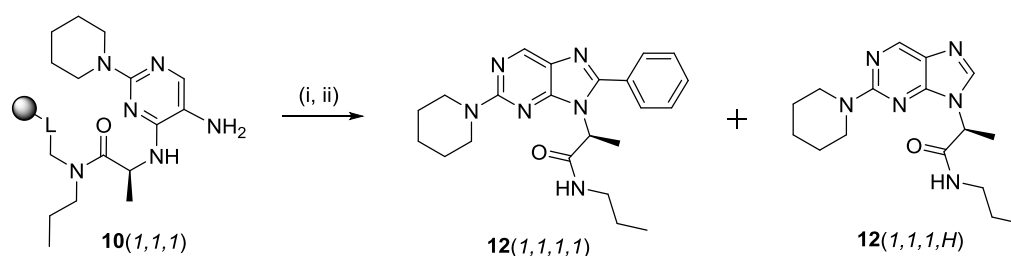
V průběhu syntézy se u některých derivátů při analýzách cyklizačního kroku v reakční směsi objevovaly vedlejší produkty, které podle uHPLC-MS analýzy odpovídaly analogické struktuře bez substituentu v poloze C⁸ (Schéma 7). Nejvyšší zastoupení tohoto vedlejšího produktu se objevovalo u derivátu **12(1,1,1,1)**. Proto byl tento analog z reakční směsi vyizolován a jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR. Bylo tedy testováno, zda tento derivát pochází z procesu štěpení, nebo již z cyklizační reakce.

Na základě výsledků výše zmíněného testu štěpících směsí bylo vyloučeno, že by se tento derivát vytvářel až při štěpení produktů z pryskyřice. Dalším testem tedy bylo zahřívání výchozí látky **5(1,1,1,1)**, příp. **10(1,1,1,1)** v samotném DMSO, který byl použit jako rozpouštědlo pro cyklizační krok s aldehydem. Ani to však vznik tohoto vedlejšího produktu neprokázalo. Byl tedy testován záhřev v DMF, které se mohlo v polymerním nosiči nacházet v reziduálním množství v důsledku špatného promytí z předchozích kroků, a potenciálně fungovat jako cyklizační činidlo při termickém

rozkladu na dimethylamin a formaldehyd. Ani v tomto případě nebyl derivát **12** detekován.

Reakční sekvence vybraných derivátů byly následně opakovány pro další studium původu tohoto vedlejšího produktu, avšak tento již nebyl v analýzách přítomen. Z důvodu této nereprodukovatelnosti nebyl fenomén dále zkoumán.

Schéma 7: Výskyt vedlejšího produktu bez substituce v poloze C⁸ po cyklizaci a štěpení*



* (i) benzaldehyd, DMSO, 100 °C, 72 h.; (ii) TFA, DCM, t_{lab} , 2 h.

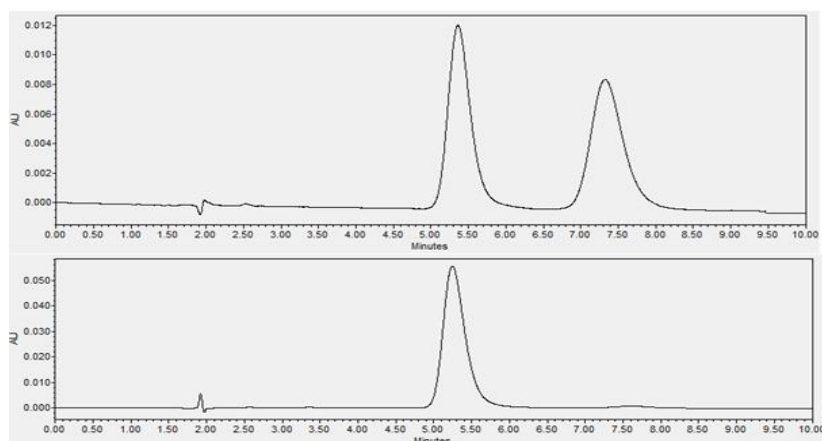
3.1.3 Stanovení optické čistoty

Vzhledem k tomu, že pro reakční sekvenci byly používány opticky čisté L-aminokyseliny, bylo nutné ověřit, zda během syntézy nedochází k ataku na chirální centrum vedoucí k částečné nebo i celkové racemizaci. Tento jev byl u podobných reakcí dříve pozorován.^{100,101}

Z toho důvodu byla připravena látka **7^{DL}(1,3,1,1)**, sloužící jako racemický standard pro vyvinutí vhodné separační metody obou enantiomerů. Příprava tohoto racemátu probíhala v souladu s podmínkami reakcí uvedenými v kapitole 4.1.1, s využitím ekvimolární směsi Fmoc-L-Ser(OtBu)-OH a Fmoc-D-Ser(OtBu)-OH pro acylaci. Vzniknuvší racemický produkt byl poté rozdělen na chirální koloně. Stejnou metodou byl analyzován i derivát **7(1,3,1,1)** (Obrázek 43). Bylo prokázáno, že k ataku na chirální centrum v tomto případě prakticky nedochází.

K podobným výsledkům dospěly i analýzy několika dalších připravených derivátů. Optická čistota analyzovaných finálních produktů byla vyšší než 95%. Druhý enantiomer byl v měřených vzorcích detekován jen v minimálním obsahu. Výsledky pro jednotlivé produkty jsou shrnuty v Tabulce 2.

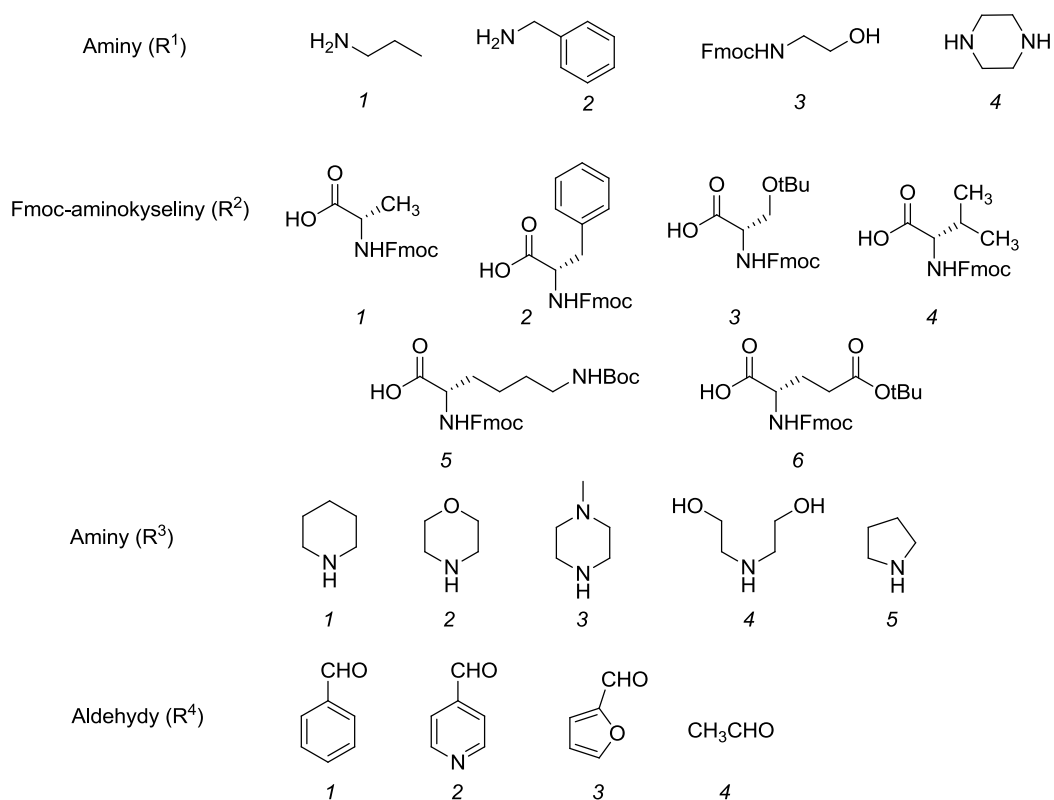
Obrázek 43: Chirální separace racemátu **7^{DL}**(1,3,1,1) (nahore) a látky **7**(1,3,1,1) (dole)



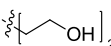
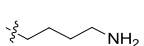
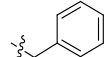
3.1.4 Přehled výchozích látek a shrnutí výsledků syntézy

Pro ověření vyvinuté metodiky byly pro syntézu použity různě substituované výchozí látky z řad primárních a sekundárních aminů, aminokyselin a aldehydů (Obrázek 44). Cílové deriváty **7**(R^1, R^2, R^3, R^4) byly připraveny ve vysoké čistotě a přijatelných výtěžcích (Tabulka 2).

Obrázek 44: Přehled použitých výchozích látek



Tabulka 2: Přehled připravených derivátů, jejich čistoty a celkové výtěžky reakční sekvence

Sloučenina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Čistota (%) [*]	Enant. čistota (%) ^{**}	Výtěžek (%) ^{***}
7(1,1,1,1)		Me			94	99+	38
7(1,1,1,2)		Me			84	NT	35
7(1,1,1,3)		Me			80	99+	35
7(1,1,1,4)		Me		Me	90	99+	37
7(1,1,2,1)		Me			94	99+	37
7(1,1,3,1)		Me			76	99+	47
7(1,1,4,1)		Me			66	99+	29
7(1,1,5,1)		Me			91	99+	52
7(1,2,1,1)					79	99+	32
7(1,3,1,1)					51	98,5	26
7(1,4,1,1)					82	NT	33
7(1,5,1,1)					78	NT	47
7(1,6,1,1)					76	NT	58
7(2,1,1,1)		Me			82	95,0	30
7(3,1,1,1)		Me			78	99+	42
7(4,1,1,1)		Me			89	99+	61
12(1,1,1,1)		Me			53	99+	7

* Čistota stanovena na základě analýzy po finálním odštěpení z pryskyřice z integrovaných uHPLC-UV chromatogramů.

** Optická čistota stanovena na základě chirální separace vyčištěných látek z integrovaných uHPLC-UV chromatogramů. NT – nebylo testováno.

*** Celkový výtěžek reakční sekvence po HPLC purifikaci.

3.1.5 Biologické testování

K důkazu toho, že připravované látky mají biologický potenciál, byly finální produkty testovány na protinádorovou aktivitu na buněčných liniích rakoviny prsu a myeloidní leukémie, konkrétně linie MCF7 a K562. Vyhodnocení pak bylo provedeno pomocí Calcein AM Assay. U této studie se využívá hydrolýza barviva Calcein AM. Produkt hydrolýzy Calcein je pak uvolňován v cytoplazmě a díky svým fluorescenčním schopnostem slouží ke kvantitativnímu stanovení cytotoxicity u dané linie buněk.

Měřitelné hodnoty IC_{50} byly stanoveny u 5 derivátů (Tabulka 3). Nejslibnější hodnotu IC_{50} vykazoval derivát 7(2,1,1,1), který se svou aktivitou na linii K562 blížil roscovitinu.

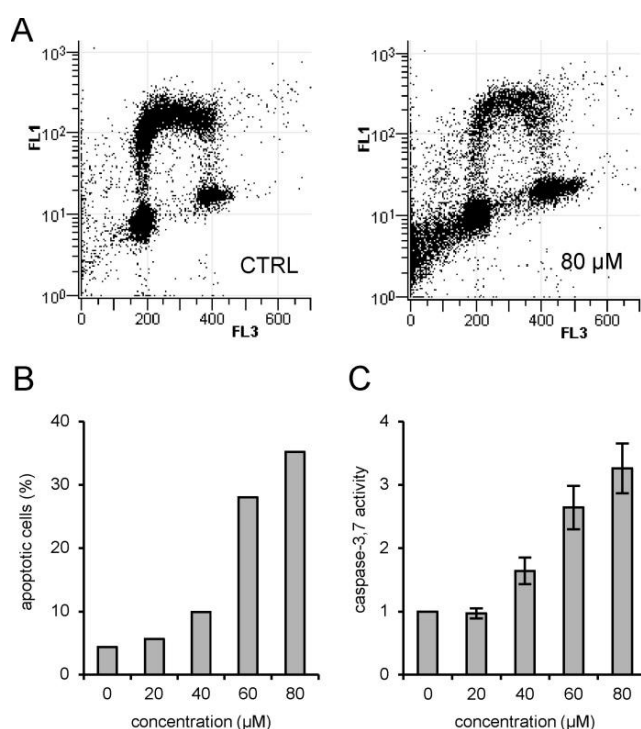
Tabulka 3: *In vitro* aktivita připravených derivátů

Sloučenina	IC_{50} (μM)		Sloučenina	IC_{50} (μM)	
	K562	MCF7		K562	MCF7
7(1,1,1,1)	81	>100	7(1,3,1,1)	>100	>100
7(1,1,1,3)	92	>100	7(1,2,1,1)	75	87
7(1,1,1,4)	>100	>100	7(1,4,1,1)	>100	>100
7(1,1,1,2)	>100	>100	7(1,6,1,1)	>100	>100
7(1,1,5,1)	>100	>100	7(1,5,1,1)	84	>100
7(1,1,2,1)	>100	>100	7(2,1,1,1)	53	88
7(1,1,3,1)	>100	>100	7(3,1,1,1)	>100	>100
7(1,1,4,1)	>100	>100	7(4,1,1,1)	>100	>100
			roscovitin	47	14

Na základě výsledků z výše zmíněné studie byla u nejslibnějšího derivátu 7(2,1,1,1) testována také závislost koncentrace na biologickém účinku. Na linii K562 byl postupně dávkován 80 μM roztok tohoto derivátu v časovém rozmezí 24 hodin. Výsledek působení na buněčnou linii byl zmapován pomocí průtokové cytometrie (Obrázek 45). Ani při nejvyšších dávkách látky nedocházelo k přímému ovlivnění poměru fází buněčného cyklu, nicméně látka zvýšila počet sub-G1 populací oproti kontrolní analýze (A).

Zvýšení této populace je jedním z indikátorů probíhající apoptózy. Apoptóza je řízená smrt buněk a je zajišťována kaskádou aktivací specifických proteas - kaspas. Bylo prokázáno, že míra apoptózy vyjádřená procentuálním zastoupením apoptických buněk je přímo úměrná koncentraci sledované látky 7(2,1,1,1) (**B**). Byla tedy sledována aktivita kaspas v buněčných liniích po vystavení působení tohoto derivátu. V této studii pak bylo potvrzeno, že cílový derivát má skutečně vliv na mechanismus apoptózy pomocí inhibice kaspas (**C**).

Obrázek 45: Vliv látky 7(2,1,1,1) na proliferaci a apoptózu buněčné linie K562 po 24 hodinách



Přesto, že měření optické čistoty ani stanovení biologické aktivity nebylo prováděno v rámci experimentální části diplomové práce, jsou zde výstupní data z těchto analýz vložena v rámci studia cílových sloučenin.

4. Experimentální část

Pro přípravu purinových a deazapurinových derivátů na pevné fázi byly využity plastové stříkačky opatřené fritou z polypropylenu. Promývání pryskyřice a samotné reakce byly prováděny na laboratorní třepačce. Při užití vyšších reakčních teplot pak byla k reakci použita skleněná vialka umístěná v olejové lázni, příp. mikrovlnný reaktor.

K přípravě deazapurinů klasickou roztokovou syntézou byly použity standardní reakční nádoby, k záhřevu pak sloužila olejová lázeň.

4.1 Přístroje a metody

Acquility UHPLC-MS (Waters)

- hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem a PDA detektorem
- mobilní fáze : 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN; lineární gradient z 20 % na 80 % AcCN po dobu 2,5 minut, poté ekvilibrace kolony 20% AcCN po dobu 1 minuty
- průtok 0,6 ml/min
- X Select kolona (HSS T3; 2,5 mikronů)
- další parametry: odpařovací teplota 400 °C, kapilární teplota 200 °C

Semipreparativní HPLC Breeze

- separace na základě specifických absorbancí v UV-VIS oblasti
- mobilní fáze: 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN
- průtok 20 ml/min
- YMC kolona (YMC Pack ODS-A, 5μm, 100x20 mm)

Autopurifikátor Waters

- C¹⁸ kolona (reverzní fáze, 5 μm, 100x19 mm)
- mobilní fáze: 0,1% octan amonný v H₂O:AcCN
- průtok 15 ml/min

NMR JEOL (500 MHz), Varian (400 MHz), Bruker Advance (300 MHz)

- měření spekter v d₆ DMSO (při 23 °C)
- chemický posun v ppm, interakční konstanty v Hz

Měření optické čistoty

- kolona Chiralpak HSA (5 μ m, 150x4 mm)
- mobilní fáze: 0,1% octanu amonný (90 %), isopropylalkohol (10 %)
- průtok 0,8 ml/min

Lyofilizátor SCANVAC

- k odstranění zbytků rozpouštědel (AcCN, H₂O, DMSO) z výsledného vzorku

Mikrovlnný reaktor

- Discover Benchmate (CEM Microwave Technology Ltd.)

Měření HRMS

- Orbitrap Elite High-Resolution Mass Spectrometer
- Thermo Fischer Scientific, MA, USA
- mód skenu 120 000 FWHM v rozsahu 200-900 m/z
- ionizace elektrosprejem, teplota 300 °C

4.2 Příprava derivátů purinu na pevné fázi

4.2.1 Štěpení vzorku z pryskyřice a provedení analýzy

Postup pro štěpení vzorku pro analýzu a samotné provedení analýzy je analogický k postupu popsaném v bakalářské práci (BP).

4.2.2 Postup pro kvantitativní stanovení loadingu pryskyřice

Postup pro stanovení loadingu pryskyřice je analogický k postupu popsaném v BP.

4.2.3 Imobilizace aminu na aminomethylovou pryskyřici - **1(1)**, **1(2)**

Postup pro imobilizaci primárního aminu na připravený BAL linker ukotvený na aminomethylovou pryskyřici je analogický k postupu popsaném v BP.

4.2.4 Imobilizace Fmoc-aminoethanolu na Wangovu pryskyřici – 1(3)

Wangova pryskyřice (0,52 mmol/g; 500 mg) byla promyta 3x bezvodým DCM. Následně byl přidán roztok trichloracetonitrilu (0,75 mmol; 0,75 ml) v bezvodém DCM (5 ml). Do další stříkačky byl přidán roztok DBU (0,32 mmol; 50 μ l) v bezvodém DCM (1 ml). Obě stříkačky byly následně na 30 minut vloženy do mrazáku. Po uplynutí této doby byly obsahy spojeny do jedné stříkačky a reakční směs byla třepána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Pryskyřice byla dále promyta 3x DCM a 3x bezvodým THF. Poté byl přidán roztok 2-(Fmoc-amino)ethanolu (1,5 mmol; 425 mg) v bezvodém THF (5 ml), následovaný přikapáním $\text{BF}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,25 mmol; 32 μ l). Reakční směs byla třepána 30 minut při laboratorní teplotě, promyta 3x THF, 3x DCM, 3x MeOH a vysušena.

Loading pryskyřice 1(3): $L = 0,28 \text{ mmol/g}$.

4.2.5 Imobilizace piperazinu na Wangovu pryskyřici – 1(4)

Wangova pryskyřice (0,52 nebo 0,87 mmol/g; 1 g) byla promyta 3x DCM a reagována s roztokem CDI (5 mmol; 810 mg) a pyridinu (5 mmol; 400 μ l) v DCM (10 ml) po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Po promytí 3x DCM byl přidán roztok piperazinu (5 mmol; 430 mg) v DCM (10 ml). Reakční směs byla třepána přes noc při laboratorní teplotě, následně byla pryskyřice promyta 5x DCM.

Loading pryskyřice 1(4): $L = 0,27 \text{ mmol/g}$ při použití původního loadingu 0,52 mmol/g; $L = 0,63 \text{ mmol/g}$ při použití původního loadingu 0,87 mmol/g.

4.2.6 Pokračování reakční sekvence

Ukotvení aminokyseliny, arylace s 4,6-dichlor-5-nitropyrimidinem, redukce nitro skupiny a finální cyklizace probíhaly podle postupu popsaného v BP.

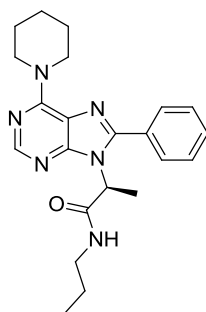
4.2.7 Finální štěpení produktů

Průběh opět analogický s postupem v BP, změněny pouze podmínky štěpení na 50% TFA v DCM po dobu 2 hodin za laboratorní teploty.

4.5 Analytická data připravených derivátů

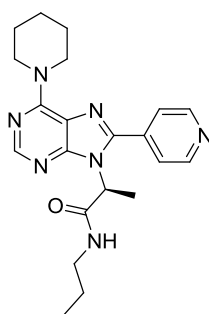
4.5.1 Deriváty purinu

7 (1,1,1,1)

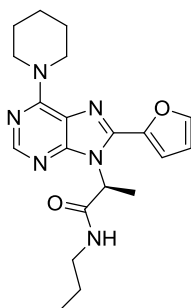


Výtěžek 23,4 mg (38 %). ESI-MS $m/z = 393$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.75 (t, $J=7.16$ Hz, 3 H) 1.35 (sxt, $J=7.22$ Hz, 2 H) 1.48 - 1.59 (m, 4 H) 1.60 - 1.71 (m, 5 H) 2.88 - 3.06 (m, 2 H) 4.18 (br. s., 4 H) 5.01 (q, $J=7.26$ Hz, 1 H) 7.45 - 7.55 (m, 3 H) 7.55 - 7.66 (m, 2 H) 7.92 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.79 (C1), 16.81 (C2), 22.66 (C3), 24.81 (C4), 26.27 (C5), 41.35 (C6), 54.94 (C7), 119.61 (C8), 129.20 (C9), 129.89 (C10), 130.42 (C11), 130.68 (C12), 149.38 (C13), 151.78 (C14), 152.48 (C15), 153.38 (C16), 169.10 (C17). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}$ $[M+H]^+$ 393,2397, naměřeno 393,2401.

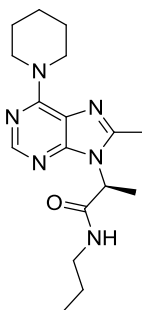
7(1,1,1,2)



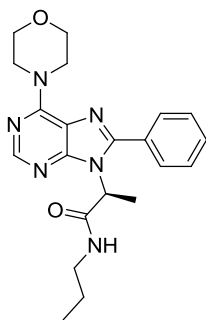
Výtěžek 21,7 mg (35 %). ESI-MS $m/z = 394$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.74 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.34 (sxt, $J=7.22$ Hz, 2 H) 1.51 - 1.60 (m, 4 H) 1.60 - 1.70 (m, 5 H) 2.81 - 3.11 (m, 2 H) 4.19 (br. s., 4 H) 5.13 (q, $J=7.26$ Hz, 1 H) 7.60 - 7.64 (m, 2 H) 7.97 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) 8.18 (s, 1 H) 8.69 - 8.74 (m, 2 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.80 (C1), 16.91 (C2), 22.63 (C3), 24.78 (C4), 26.27 (C5), 41.37 (C6), 54.90 (C7), 119.79 (C8), 124.13 (C9), 138.18 (C10), 146.83 (C11), 150.61 (C12), 152.45 (C13), 152.73 (C14), 153.63 (C15), 163.93 (C16). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}$ $[M+H]^+$ 394,2350, naměřeno 394,2335.

7(1,1,1,3)

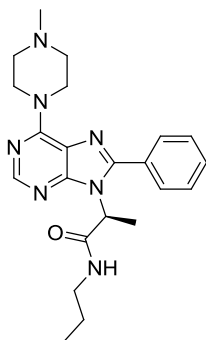
Výtěžek 20,9 mg (35 %). ESI-MS m/z = 383 $[M+H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.70 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.25 - 1.38 (m, 2 H) 1.57 (d, $J=4.01$ Hz, 4 H) 1.61 - 1.74 (m, 5 H) 2.84 - 2.95 (m, 1 H) 2.94 - 3.04 (m, 1 H) 4.19 (br. s., 4 H) 5.48 (q, $J=7.06$ Hz, 1 H) 6.67 (dd, $J=3.15, 2.00$ Hz, 1 H) 7.01 (d, $J=3.44$ Hz, 1 H) 7.84 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 7.86 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.78 (C1), 16.97 (C2), 22.59 (C3), 24.81 (C4), 26.28 (C5), 41.37 (C6), 54.15 (C7), 112.56 (C8), 113.12 (C9), 119.63 (C10), 139.87 (C11), 144.71 (C12), 145.36 (C13), 152.09 (C14), 152.38 (C15), 153.28 (C16), 168.88 (C17). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $C_{20}H_{26}N_6O_2$ $[M+H]^+$ 383,2190, naměřeno 383,2198.

7(1,1,1,4)

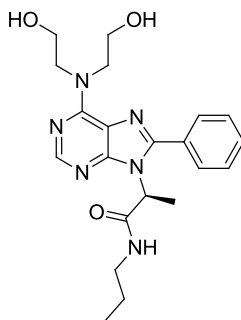
Výtěžek 18,7 mg (37 %). ESI-MS m/z = 331 $[M+H]^+$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.75 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.30 - 1.40 (m, 2 H) 1.49 - 1.56 (m, 4 H) 1.60 - 1.66 (m, 5 H) 2.44 (s, 3 H) 2.91 - 3.04 (m, 2 H) 4.13 (br. s., 4 H) 5.24 (q, $J=7.26$ Hz, 1 H) 7.93 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) 8.08 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.81 (C1), 15.54 (C2), 17.17 (C3), 22.67 (C4), 24.86 (C5), 26.22 (C6), 40.95 (C7), 41.27 (C8), 52.76 (C9), 118.39 (C10), 148.07 (C11), 151.23 (C12), 152.26 (C13), 152.77 (C14), 169.17 (C15). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $C_{17}H_{26}N_6O$ $[M+H]^+$ 331,2241, naměřeno 331,2248.

7(1,1,2,1)

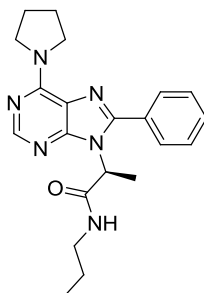
Výtěžek 22,3 mg (37 %). ESI-MS m/z = 395 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.75 (t, J =7.45 Hz, 3 H) 1.35 (sxt, J =7.33 Hz, 2 H) 1.66 (d, J =6.87 Hz, 3 H) 2.92 - 3.05 (m, 2 H) 3.62 - 3.75 (m, 4 H) 4.06 - 4.33 (m, 4 H) 5.02 (q, J =7.26 Hz, 1 H) 7.47 - 7.56 (m, 3 H) 7.57 - 7.65 (m, 2 H) 7.92 (t, J =5.73 Hz, 1 H) 8.21 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.80 (C1), 16.82 (C2), 22.66 (C3), 41.36 (C4), 55.00 (C5), 66.80 (C6), 119.82 (C7), 129.22 (C8), 129.91 (C9), 130.53 (C10), 130.55 (C11), 149.96 (C12), 151.84 (C13), 152.69 (C14), 153.57 (C15), 169.02 (C16). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2$ $[M+H]^+$ 395,2190, naměřeno 395,2175.

7(1,1,3,1)

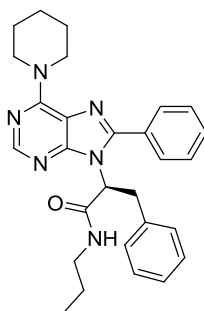
Výtěžek 30,3 mg (47 %). ESI-MS m/z = 408 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.75 (t, J =7.45 Hz, 3 H) 1.31 - 1.39 (m, 2 H) 1.61 - 1.71 (m, 3 H) 2.40 (t, J =4.58 Hz, 3 H) 2.50 (s, 4 H) 2.98 (dt, J =12.60, 6.30 Hz, 2 H) 4.20 (br. s., 4 H) 5.01 (d, J =7.45 Hz, 1 H) 7.47 - 7.56 (m, 3 H) 7.58 - 7.64 (m, 2 H) 7.91 (t, J =5.44 Hz, 1 H) 8.18 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.80 (C1), 16.81 (C2), 22.66 (C3), 40.97 (C4), 41.35 (C5), 46.28 (C6), 54.97 (C7), 55.17 (C8), 119.77 (C9), 129.21 (C10), 129.92 (C11), 130.49 (C12), 130.61 (C13), 149.76 (C14), 151.84 (C15), 152.64 (C16), 153.53 (C17), 169.04 (C18). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}$ $[M+H]^+$ 408,2506, naměřeno 408,2494.

7(1,1,4,1)

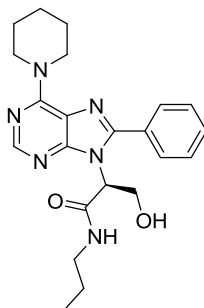
Výtěžek 25,3 mg (29 %). ESI-MS m/z = 413 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.72 - 0.80 (m, 3 H) 1.36 (sxt, $J=7.33$ Hz, 2 H) 1.59 - 1.70 (m, 3 H) 1.74 - 1.95 (m, 2 H) 2.91 - 3.06 (m, 2 H) 3.80 (br. s., 3 H) 4.27 (br. s., 3 H) 5.02 (q, $J=7.26$ Hz, 1 H) 7.46 - 7.54 (m, 3 H) 7.54 - 7.66 (m, 2 H) 7.93 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.80 (C1), 16.80 (C2), 21.93 (C3), 22.68 (C4), 41.34 (C5), 54.95 (C6), 119.60 (C7), 129.20 (C8), 129.89 (C9), 130.37 (C10), 130.76 (C11), 149.63 (C12), 151.77 (C13), 152.38 (C14), 154.14 (C15), 169.13 (C16). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_3$ $[M+H]^+$ 413,2296, naměřeno 413,2286.

7(1,1,5,1)

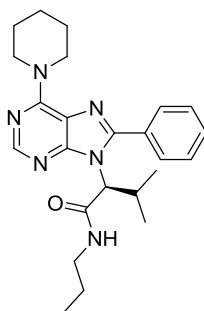
Výtěžek 31,1 mg (52 %). ESI-MS m/z = 379 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.76 (t, $J=7.16$ Hz, 3 H) 1.36 (sxt, $J=7.22$ Hz, 2 H) 1.66 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 1.82 - 2.00 (m, 4 H) 2.91 - 3.06 (m, 2 H) 3.61 (d, $J=6.87$ Hz, 2 H) 3.84 - 4.27 (m, 2 H) 5.01 (q, $J=7.06$ Hz, 1 H) 7.48 - 7.54 (m, 3 H) 7.58 - 7.64 (m, 2 H) 7.92 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.79 (C1), 16.84 (C2), 22.67 (C3), 24.28 (C4), 26.27 (C5) 41.34 (C6), 47.55 (C7), 48.99 (C8), 54.96 (C9), 55.00 (C10), 120.11 (C11), 129.14 (C12), 129.85 (C13), 130.28 (C14), 130.90 (C15), 149.87 (C16), 151.98 (C17), 152.25 (C18), 152.92 (C19), 169.17 (C20). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}$ $[M+H]^+$ 379,2241, naměřeno 379,2246.

7(1,2,1,1)

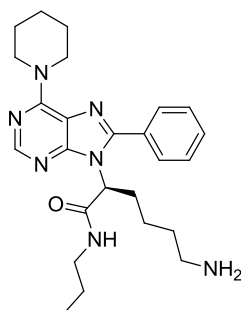
Výtěžek 24,5 mg (32 %). ESI-MS m/z = 469 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.80 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.41 (sxt, $J=7.22$ Hz, 2 H) 1.54 (d, $J=5.73$ Hz, 4 H) 1.59 - 1.68 (m, 2 H) 3.02 - 3.10 (m, 2 H) 3.41 (dd, $J=13.75, 4.01$ Hz, 1 H) 3.63 - 3.75 (m, 1 H) 3.93 - 4.39 (m, 4 H) 4.99 (dd, $J=11.74, 3.72$ Hz, 1 H) 6.53 (d, $J=7.45$ Hz, 2 H) 6.93 - 7.00 (m, 2 H) 7.01 - 7.08 (m, 3 H) 7.33 - 7.40 (m, 2 H) 7.41 - 7.48 (m, 1 H) 8.13 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.24 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.85 (C21), 22.68 (C2), 24.79 (C3), 26.21 (C4), 34.80 (C5), 41.46 (C6), 61.42 (C7), 119.61 (C8), 126.96 (C9), 128.66 (C10), 128.85 (C11), 128.88 (C12), 129.63 (C13), 130.11 (C14), 130.24 (C15), 137.78 (C16), 150.12 (C17), 151.92 (C18), 152.47 (C19), 153.50 (C20), 168.06 (C21). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}$ $[M+H]^+$ 469,2710, naměřeno 469,2728.

7(1,3,1,1)

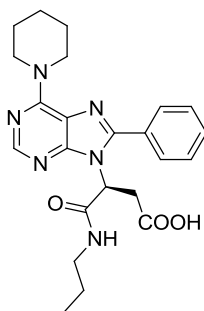
Výtěžek 17,1 mg (26 %). ESI-MS m/z = 409 $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.75 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.30 - 1.40 (m, 2 H) 1.57 (d, $J=3.44$ Hz, 4 H) 1.61 - 1.70 (m, 2 H) 2.91 - 3.06 (m, 2 H) 4.09 (dd, $J=11.46, 4.58$ Hz, 1 H) 4.11 - 4.28 (m, 4 H) 4.30 (dd, $J=10.88, 9.16$ Hz, 1 H) 4.93 (dd, $J=8.88, 4.87$ Hz, 1 H) 7.48 - 7.54 (m, 3 H) 7.60 - 7.66 (m, 2 H) 7.95 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) 8.13 - 8.18 (m, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.77 (C1), 22.64 (C2), 24.84 (C3), 26.31 (C4), 41.12 (C5), 59.64 (C6), 62.24 (C7), 119.61 (C8), 129.15 (C9), 130.05 (C10), 130.33 (C11), 130.58 (C12), 150.37 (C13), 151.68 (C14), 152.50 (C15), 153.50 (C16), 167.13 (C17). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2$ $[M+H]^+$ 409,2347, naměřeno 409,2339.

7(1,4,1,1)

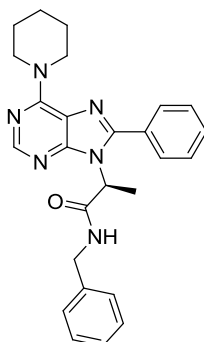
Výtěžek 22,1 mg (33 %). ESI-MS $m/z = 421$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.33 (d, $J=6.41$ Hz, 3 H) 0.77 (t, $J=7.33$ Hz, 3 H) 0.88 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 1.39 (d, $J=7.33$ Hz, 2 H) 1.57 (d, $J=5.04$ Hz, 4 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 2.96 - 3.14 (m, 3 H) 3.88 - 4.34 (m, 4 H) 4.37 (d, $J=10.99$ Hz, 1 H) 7.51 - 7.57 (m, 3 H) 7.67 (dd, $J=6.64$, 2.98 Hz, 2 H) 8.23 (s, 1 H) 8.65 - 8.73 (m, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.87 (C1), 19.59 (C2), 20.05 (C3) 22.60 (C4), 24.74 (C5), 26.23 (C6), 28.45 (C7), 41.15 (C8), 68.92 (C9), 119.42 (C10), 129.28 (C11), 130.14 (C12), 130.25 (C13), 130.63 (C14), 150.13 (C15), 151.90 (C16), 152.08 (C17) 153.60 (C18), 168.70 (C19). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}$ $[M+H]^+$ 421,2710, naměřeno 421,2723.

7(1,5,1,1)

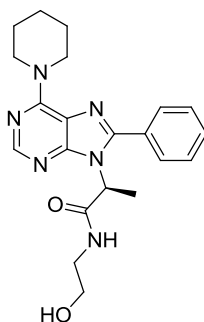
Výtěžek 33,5 mg (47 %). ESI-MS $m/z = 450$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.65 - 0.81 (m, 4 H) 0.83 - 0.98 (m, 1 H) 1.19 - 1.30 (m, 2 H) 1.38 (sxt, $J=7.24$ Hz, 2 H) 1.56 (d, $J=4.58$ Hz, 4 H) 1.64 (d, $J=4.58$ Hz, 2 H) 1.98 - 2.14 (m, 1 H) 2.37 (d, $J=10.08$ Hz, 1 H) 2.48 - 2.59 (m, 2 H) 2.94 - 3.10 (m, 2 H) 4.19 (br. s., 4 H) 4.86 (dd, $J=11.45$, 4.58 Hz, 1 H) 7.45 - 7.56 (m, 3 H) 7.56 - 7.63 (m, 2 H) 8.10 (t, $J=5.72$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.81 (C1), 22.68 (C2), 23.10 (C3), 23.22 (C4), 24.80 (C5), 26.27 (C6), 27.33 (C7), 28.72 (C8), 38.91 (C9), 41.31 (C10), 51.01 (C11), 59.13 (C12), 59.89 (C13), 116.26 (C14), 119.25 (C15), 119.51 (C16), 129.21 (C17), 129.93 (C18), 130.48 (C19), 130.75 (C20), 149.96 (C21), 151.99 (C22), 152.63 (C23), 153.51 (C24), 158.58 (C25), 158.88 (C26), 168.88 (C27). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}$ $[M+H]^+$ 450,2976, naměřeno 450,2973.

7(1,6,1,1)

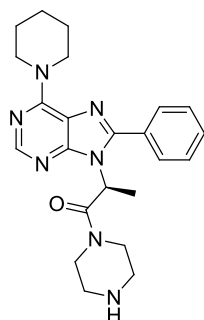
Výtěžek 39,9 mg (58 %). ESI-MS $m/z = 437 [M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.77 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.31 - 1.40 (m, 2 H) 1.56 (d, $J=4.01$ Hz, 4 H) 1.63 (d, $J=4.58$ Hz, 2 H) 2.91 - 3.07 (m, 4 H) 4.18 (br. s., 4 H) 5.26 - 5.39 (m, 1 H) 7.45 - 7.51 (m, 3 H) 7.64 - 7.67 (m, 2 H) 8.14 (s, 1 H) 8.52 - 8.64 (m, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.78 (C1), 22.74 (C2), 23.04 (C3), 24.87 (C4), 26.29 (C5), 39.04 (C6), 40.91 (C7), 41.22 (C8), 57.41 (C9), 119.56 (C10), 128.94 (C11), 129.98 (C12), 130.13 (C13), 131.24 (C14), 150.04 (C15), 151.70 (C16), 152.84 (C17), 153.45 (C18), 169.41 (C19), 173.70 (C20), 173.88 (C21). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_3 [M+H]^+$ 437,2296, naměřeno 437,2304.

7(2,1,1,1)

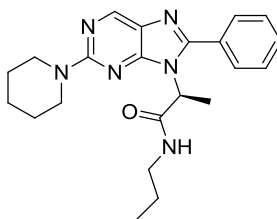
Výtěžek 20,7 mg (30 %). ESI-MS $m/z = 441 [M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.52 - 1.59 (m, 4 H) 1.60 - 1.67 (m, 2 H) 1.70 (d, $J=7.45$ Hz, 3 H) 4.21 (dd, $J=15.46, 5.73$ Hz, 4 H) 4.24 - 4.38 (m, 2 H) 5.08 (q, $J=7.06$ Hz, 1 H) 7.15 - 7.20 (m, 1 H) 7.22 - 7.29 (m, 4 H) 7.46 - 7.55 (m, 3 H) 7.57 - 7.62 (m, 2 H) 8.21 (s, 1 H) 8.49 (t, $J=6.01$ Hz, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 16.70 (C1), 24.83 (C2), 26.28 (C3), 43.06 (C4), 54.93 (C5), 119.68 (C6), 127.17 (C7), 127.62 (C8), 128.64 (C9), 129.22 (C10), 129.91 (C11), 130.44 (C12), 130.57 (C13), 139.80 (C14), 149.35 (C15), 151.95 (C16), 152.46 (C17), 153.49 (C18), 169.40 (C19). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O} [M+H]^+$ 441,2397, naměřeno 441,2393.

7(3,1,1,1)

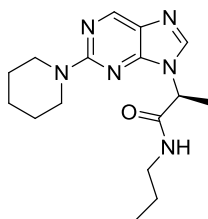
Výtěžek 21,1 mg (42 %). ESI-MS $m/z = 395 [M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.51 - 1.59 (m, 4 H) 1.60 - 1.67 (m, 5 H) 3.05 - 3.16 (m, 2 H) 3.29 - 3.38 (m, 2 H) 4.18 (br. s., 4 H) 5.04 (q, $J=7.06$ Hz, 1 H) 7.47 - 7.54 (m, 3 H) 7.57 - 7.64 (m, 2 H) 7.94 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 16.81 (C1), 22.20 (C2), 24.81 (C3), 26.26 (C4), 42.44 (C5), 54.86 (C6), 60.00 (C7), 116.52 (C8), 118.91 (C9), 119.60 (C10), 129.22 (C11), 129.90 (C12), 130.39 (C13), 130.65 (C14), 149.33 (C15), 151.93 (C16), 152.52 (C17), 153.48 (C18), 169.42 (C19). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2 [M+H]^+$ 395,2190, naměřeno 395,2202.

7(4,1,1,1)

Výtěžek 24,4 mg (61 %). ESI-MS $m/z = 420 [M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.54 (br. s., 4 H) 1.64 (d, $J=6.87$ Hz, 5 H) 2.65 - 3.04 (m, 4 H) 3.34 (br. s., 4 H) 4.17 (br. s., 4 H) 5.57 (d, $J=6.87$ Hz, 1 H) 7.51 (q, $J=6.49$ Hz, 3 H) 7.57 (d, $J=7.45$ Hz, 2 H) 8.19 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 17.57 (C1), 17.60 (C2), 24.79 (C3), 26.22 (C4), 40.93 (C5), 40.97 (C6), 43.56 (C7), 52.40 (C8), 119.16 (C9), 129.05 (C10), 130.05 (C11), 130.54 (C12), 130.74 (C13), 148.96 (C14), 152.24 (C15), 152.28 (C16), 152.63 (C17), 153.49 (C18), 167.89 (C19). HRMS (ESI-TOF) m/z vypočítáno pro $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O} [M+H]^+$ 420,2506, naměřeno 420,2507.

12(1,1,1,1)

Výtěžek 4,1 mg (7 %). ESI-MS $m/z = 393$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.74 (t, $J=7.45$ Hz, 3 H) 1.28 - 1.40 (m, 2 H) 1.41 - 1.56 (m, 4 H) 1.54 - 1.63 (m, 2 H) 1.67 (d, $J=7.45$ Hz, 3 H) 2.87 - 3.08 (m, 2 H) 3.63 - 3.78 (m, 4 H) 4.92 (q, $J=7.45$ Hz, 1 H) 7.43 - 7.58 (m, 3 H) 7.57 - 7.71 (m, 2 H) 7.96 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.67 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.78 (C1), 16.48 (C2), 22.74 (C3), 24.94 (C4), 25.71 (C5), 41.31 (C6), 45.43 (C7), 54.75 (C8), 126.94 (C9), 129.25 (C10), 129.69 (C11), 130.51 (C12), 130.54 (C13), 148.74 (C14), 152.75 (C15), 154.99 (C16), 158.53 (C17), 169.06 (C18).

12(1,1,1,H)

ESI-MS $m/z = 317$ $[M+H]^+$. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 0.79 (t, $J=7.16$ Hz, 3 H) 1.33 - 1.42 (m, 2 H) 1.44 - 1.52 (m, 4 H) 1.55 - 1.62 (m, 2 H) 1.65 (d, $J=6.87$ Hz, 3 H) 2.93 - 3.06 (m, 2 H) 3.70 - 3.76 (m, 4 H) 5.10 (q, $J=7.45$ Hz, 1 H) 8.17 (s, 1 H) 8.27 (t, $J=5.73$ Hz, 1 H) 8.62 (s, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.76 (C1), 18.32 (C2), 22.71 (C3), 24.91 (C4), 25.74 (C5), 41.01 (C6), 45.36 (C7), 52.15 (C8), 126.76 (C9), 142.55 (C10), 148.88 (C11), 153.29 (C12), 158.88 (C13), 169.97 (C14).

6. Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
AcCN, MeCN	acetonitril
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CDI	<i>N,N</i> -karbonyldiimidazol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DDQ	2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
HOBt	hydroxybenzotriazol
MeOH	methanol
TBAHS	hydrogensíran tetrabutylamonný
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran

7. Literatura

1. Lemrová, B.; Smyslová, P.; Popa, I.; Oždian, T.; Zajdel, P.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 558-565.
2. Legrauerend, M.; Grierson, D. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (12), 3987-4006.
3. Llauger, L.; He, H.; Aguirre, J.; Rosen, N.; Peters, U.; Davies, P.; Chiosis, G. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (8), 2892-2905.
4. Raboisson, P.; Lugnier, C.; Muller, C. E.; Reimund, J.-M.; Schultz, D.; Pinna, G.; Le Bec, A.; Basaran, H.; Desaubry, L.; Gaudiot, F.; Selouma, M.; Bourguignon, J.-J. *J. Med. Chem.* **2003**, *38* (1), 199-214.
5. Imbach, P.; Capraro, H. G.; Furet, P.; Mett, H.; Meyer, T.; Zimmermann, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (1), 91-96.
6. Dinesh, S.; Shikha, G.; Bhavana, G.; Nidhi, S.; Dileep, S. *JPSI* **2012**, *1* (2), 29-34.
7. Niu, G.; Tan, H. *Trends Microbiol.* **2015**, *23* (2), 111-119.
8. Isono, K. *J. Antibiot.* **1988**, *41* (12), 1711-1739.
9. Ahn, Y.-J.; Park, S.-J.; Lee, S.-G.; Schin, S.-Ch.; Choi, D.-H. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2744-2748.
10. Shimizu, T.; Ohtani, K.; Hirakawa, H.; Ohshima, K.; Yamashita, A.; Shiba, T.; Ogasawara, N.; Hattori, M.; Kuhara, S.; Hayashi, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (2), 996-1001.
11. De Clerq, E.; Balzarini, J.; Madej, D.; Hansske, F.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 481-486.
12. Smith, I. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (3), 463-496.
13. Bakkestuen, A. K.; Gundersen, L. L.; Utenova, B. T. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2710-2723.
14. Pathak, A. K.; Pathak, V.; Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 273-276.
15. Pathak, A. K.; Pathak, V.; Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1685-1695.
16. El Kouni, M. H.; Guarcello, V.; Al Safaralajani, O. N.; Naguib, F. N. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (10), 2437-2443.

17. Rais, R. H.; Al Safaralajani, O. N.; Yadav, V.; Guarcello, V.; Kirk, M.; Chu, Ch. K.; Naguib, F. N. M.; Kouni, M. H. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69, 1409-1419.
18. Nair, V.; Bera, B.; Kern, E. R. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2003**, 22 (2), 115-127.
19. Kijjoa, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs* **2004**, 2, 73-82.
20. McGuigan, Ch.; Tollerfield, S. M.; Riley, P. A. *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17 (15), 6065-6075.
21. Ono, N.; Iwayama, S.; Suzuki, K.; Sekiyama, T.; Nakazawa, H.; Tsuji, T.; Okunishi, M.; Daikoku, T.; Nishiyama, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42 (8), 2095-2102.
22. Onishi, T.; Sekiyama, T.; Tsuji, T. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2005**, 24 (8), 1187-1197.
23. De Clerq, E. *J. Clin. Virol.* **2001**, 22, 73-89.
24. Schang, L. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50, 779-792.
25. Tenney, D. J.; Yamanaka, G.; Voss, S. M.; Cianci, C. W.; Tuomari, A. V.; Sheaffer, A. K.; Alam, M.; Colonna, R. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41 (12), 2680-2685.
26. Kati, W. M.; Johnson, K. A. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267 (36), 25988-25997.
27. Cihlar, T.; Ray, A. S. *Antiviral Res.* **2010**, 85, 39-58.
28. Hervey, P. S.; Perry, C. M. *Drugs* **2000**, 60 (2), 447-479.
29. Hetherington, S.; McGuirk, S.; Powell, G.; Cutrel, A.; Naderer, O.; Spreen, B.; Lafon, S.; Pearce, G.; Steel, H. *Clin. Ther.* **2001**, 23 (10), 1603-1614.
30. Pruvost, A.; Negredo, E.; Benech, H.; Theodoro, F.; Puig, J.; Grau, E.; García, E.; Moltó, J.; Grassi, J.; Clotet, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (5), 1907-1914.
31. Masgala, A.; Nikolopoulos, G.; Tsiodras, S.; Bonovas, S.; Sitaras, N. M. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19 (35), 5940-5946.
32. Damaraju, V. L.; Damaraju, S.; Young, J. D.; Baldwin, S. A.; Mackey, J.; Sawyer, M. B.; Cass, C. E. *Oncogene* **2003**, 22, 7524-7536.
33. Hawwa, A. F.; Millership, J. S.; Collier, P. S.; Vandenbroeck, K.; McCarthy, A.; Dempsey, S.; Cairns, C.; Collins, J.; Rodgers, C.; McElroy, J. C. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 66 (4), 517-528.
34. Pearson, D. C.; May, G. R.; Fick, G. H.; Sutherland, L. R. *Ann. Intern. Med.* **1995**, 122, 132-142.

35. Moore, E. C.; LePage, G. A. *Cancer Res.* **1958**, *18* (9), 1075-1083.
36. Bronk, J. R.; Lister, N.; Shaw, M. I. *Clin. Sci.* **1988**, *74*, 629-638.
37. Temple, C.; Kussner, C. L.; Montgomery, J. A. *J. Med. Chem.* **1968**, *11* (1), 41-44.
38. Saven, A.; Burian, C.; Koziol, J. A.; Piro, L. D. *Blood* **1998**, *92* (6), 1918-1926.
39. Beutler, E.; Sipe, J. C.; Romine, J. S.; Koziol, J. A.; McMillan, R.; Zyroff, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1716-1720.
40. Jeha, S.; Gandhi, V.; Chan, K. W.; McDonald, L.; Ramirez, I.; Madden, R.; Rytting, M.; Brandt, M.; Keating, M.; Plunkett, W.; Kantarjian H. *Blood* **2004**, *103* (3), 784-789.
41. Rai, K. R.; Peterson, B. L.; Appelbaum, F. R.; Kolitz, J.; Elias, L.; Shepherd, L.; Hines, J.; Threatte, G. A.; Larson, R. A.; Cheson, B. D.; Schiffer, Ch. A. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (24), 1750-1757.
42. Wierda, W.; O'Brien, S.; Wen, S.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; Thomas, D.; Do, K.-A.; Cortes, J.; Koller, Ch.; Beran, M.; Ferrajoli, A.; Giles, F.; Lerner, S.; Albitar, M.; Kantarjian, H.; Keating, M. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23* (18), 4070-4078.
43. Murti, Y.; Badal, N.; Pathak, D. *Sci. Pharm.* **2001**, *1* (1), 116-122.
44. Kode, N. R.; Phadtare, S. *Molecules* **2011**, *16*, 5840-5860.
45. Morgan, D. O. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
46. Veselý, J.; Havlíček, L.; Strnad, M.; Blow, J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; Leclerc, S.; Meijer, L. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771-786.
47. Bach, S.; Knockaert, M.; Reinhardt, J.; Lozach, O.; Schmitt, S.; Baratte, B.; Koken, M.; Coburn, S. P.; Tang, L.; Jiang, T.; Liang, D.; Galons, H.; Dierick, J.-F.; Pinna, L. A.; Meggio, F.; Totzke, F.; Schächtele, Ch.; Lerman, A. S.; Carnero, A.; Wan, Y.; Gray, N.; Meijer, L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (35), 31208-31219.
48. Villerbu, N.; Gaben, A.-M.; Redeuilh, G.; Mester, J. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 761-769.
49. Řezníčková, E.; Popa, A.; Gucký, T.; Zatloukal, M.; Havlíček, L.; Bazgier, V.; Berka, K.; Jorda, R.; Popa, I.; Nasereddin, A.; Jaffe, Ch. L.; Kryštof, V.; Strnad, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2298-2301.

50. Wang, J.; Sun, F.; Han, L.; Hou, X.; Pan, X.; Liu, R.; Tang, W.; Fang, H. *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 1887-1891.
51. Inoue, R.; Watanabe, K.; Katou, T.; Ikezawa, Y.; Hamasaki, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 2139-2147.
52. Maugé, L.; Fotopoulou, T.; Delemasure, S.; Dutartre, P.; Koufaki, M.; Connat, J.-L. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 730, 148-156.
53. Van de Bittner, G.; Hooker, J. M. WO 2016011394 A1 **2016**.
54. Lai, Y.; Liang, J.; Magnuson, S.; Tsui, V. H.; Zhang, B.; Robarge, K. WO2011113802 A2 **2011**.
55. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500.
56. Müller, S.; Strohmeier, J.; Diederichsen, U. *Org. Lett.* **2012**, 14 (6), 1382-1385.
57. Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomizawa, H.; Takeda, K.; Akira, S. *Nat. Immunol.* **2002**, 3 (2), 196-200.
58. Wu, J. J.; Huang, D. B.; Tyring, S. K. *Antiviral Res.* **2004**, 64, 79-83.
59. Ma, F.; Zhang, J.; Zhang, J.; Zhang, C. *Cell. Mol. Immunol.* **2010**, 7, 381-388.
60. Berner, H.; Reinshagen, H. *J. Med. Chem.* **1973**, 16 (11), 1296-1298.
61. Haggerty, W. J.; Springer, R. H.; Cheng, C. C. *J. Med. Chem.* **1965**, 8 (6), 797-802.
62. Oslob, J. D.; Johnson, R. J.; Cai, H.; Feng, S. Q.; Hu, L.; Kosaka, Y.; Lai, J.; Sivaraja, M.; Tep, S.; Yang, H.; Zaharia, C. A.; Evanchik, M. J.; McDowell, R. *S. ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 4, 113-117.
63. Temple, J. *J. Med. Chem.* **1990**, 33 (2), 656-661.
64. Rhodes, N.; Heerding, D. A.; Duckett, D. R.; Eberwein, D. J.; Knick, V. B.; Lansing, T. J.; McConnell, R. T.; Gilmer, T. M.; Zhang, S.-Y.; Robell, K.; Kahana, J. A.; Geske, R. S.; Kleymenova, E. V.; Choudhry, A. E.; Zhihong, L.; Leber, J. D.; Minthorn, E. A.; Strum, S. L.; Wood, E. R.; Huang, P. S.; Copeland, R. A.; Kumar, R. *Cancer Res.* **2008**, 68 (7), 2366-2374.
65. Rouse, M. B.; Seefeld, M. A.; Leber, J. D.; McNulty, K. C.; Sun, L.; Miller, W. H.; Zhang, S.-Y.; Minthorn, E. A.; Concha, N. O.; Choudhry, A. E.; Schaber, M. D.; Heerding, D. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1508-1511.
66. Bavetsias, V.; Sun, Ch.; Bouloc, N.; Reynisson, J.; Workman, P.; Linardopoulos, S.; McDonald, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 6567-6571.

67. Bavetsias, V.; Pérez-Fuertes, Y.; McIntyre, P. J.; Atrash, B.; Kosmopoulou, M.; O'Fee, L.; Burke, R.; Sun, Ch.; Faisal, A.; Bush, K.; Avery, S.; Henley, A.; Raynaud, F. I.; Linardopoulos, S.; Bayliss, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 4203-4209.
68. Püsküllü, M. O.; Karaaslan, C.; Bakar, F.; Göker, H. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, 51 (8), 723-733.
69. Samuelsson, B.; Morgenstern, R.; Jakobsson, P.-J. *Pharmacol. Rev.* **2007**, 59 (3), 207-224.
70. Pfau, R.; Arndt, K.; Doods, H.; Hael, N.; Klinder, K.; Kuelzer, R. WO 2010034798 A1.
71. Penning, T. D.; Chandrakumar, N. S.; Desai, B. N.; Djuric, S. W.; Gasiecki, A. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Russell, M. A.; Askonas, L. J.; Gierse, J. K.; Harding, E. I.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Ghoreishi-Haack, N. S.; Smith, W. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1137-1139.
72. Zarubin, T.; Han, J. *Cell Res.* **2005**, 15 (1), 11-18.
73. Mader, M.; de Dios, A.; Shih, Ch.; Bonjourklian, R.; Li, T.; White, W.; de Uralde, B. L.; Sánchez-Martínez, C.; del Prado, M.; Jaramillo, C.; de Diego, E.; Cabrejas, L. M. M.; Dominguez, C.; Montero, C.; Shepherd, T.; Dally, R.; Toth, J. E.; Chatterjee, A.; Pleite, S.; Blanco-Urgoiti, J.; Perez, L.; Barberis, M.; Lorite, M. J.; Jambrina, E.; Nevill, C. R.; Lee, P. A.; Schultz, R. C.; Wolos, J. A.; Li, L. C.; Campbell, R. M.; Anderson, B. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 179-183.
74. Krenitsky, T. A.; Rideout, J. L.; Chao, E. Y.; Koszalka, G. W.; Gurney, F.; Crouch, R. C.; Cohn, N. K.; Wolberg, G.; Vinegar, R. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 138-143.
75. Izumi, T.; Sakaguchi, J.; Takeshita, M.; Tawara, H.; Kato, K.; Dose, H.; Tsujino, T.; Watanabe, Y.; Kato, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2541-2550.
76. Barraclough, P.; Black, J. W.; Cambridge, D.; Collard, D.; Firmin, D.; Gerskowitch, V. P.; Glen, R. C.; Giles, H.; Hill, A. P.; Dull, R. A. D.; Iyer, R.; King, R.; Kneen, C. O.; Lindon, J. C.; Nobbs, M. S.; Randall, P.; Shah, G. P.; Smith, S.; Vine, S. J.; Whiting, M. V.; Williams, J. M. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 2231-2239.

77. Robertson, D. W.; Beedle, E. E.; Krushinski, J. H.; Pollock, G. D.; Wilson, H.; Wyss, V. L.; Hayes, J. S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 717-727.
78. Barraclough, P.; Black, J. W.; Cambridge, D.; Firmin, D.; Gerskowitch, V. P.; Glen, R. C.; Giles, H.; Gillam, J. M.; Dull, R. A. D.; Iyer, R.; Randall, P.; Shah, G. P.; Smith, S.; Whiting, M. V. *Arch. Pharm.* **1992**, *325*, 225-234.
79. Khoje, A. D.; Charnock, C.; Wan, B.; Franzblau, S.; Gundersen, L.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3483-3491.
80. Janssens, F. E.; Hens, J. F.; Torremans, J. L. G.; Heykants, J. J. P. EP 0232937 B1 **1987**.
81. Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R.; Martin, G. R.; Mylecharane, E. J.; Saxena, P. R.; Humphrey, P. A. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46* (2), 157-203.
82. Hannon, J.; Hoyer, D. *Behav. Brain Res.* **2008**, *195*, 198-213.
83. Filip, M.; Bader, M. *Pharmacol. Rep.* **2009**, *61*, 761-777.
84. Brancheck, T. A.; Blackburn, T. P. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 319-334.
85. Mitchell, E. S.; Neumaier, J. F. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *108*, 320-333.
86. Kohen, R.; Metcalf, M. A.; Khan, N.; Druck, T.; Huebner, K.; Lachowitz, J. E.; Meltzer, H. Y.; Sibley, D. R.; Roth, B. L.; Hamblin, M. W. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 47-56.
87. Ramírez, M. J. *Alzheimer's Res. Ther.* **2013**, *5* (15), 1-8.
88. Cole, D. C.; Stock, J. R.; Lennox, W. J.; Bernotas, R. C.; Ellingboe, J. W.; Boikess, S.; Coupet, J.; Smith, D. L.; Leung, L.; Zhang, G.-M.; Feng, X.; Kelly, M. F.; Galante, R.; Huang, P.; Dawson, L. A.; Marquis, K.; Rosenzweig-Lipson, S.; Beyer, Ch. E.; Schechter, L. E. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (23), 5535-5538.
89. Schechter, L. E.; Lin, Q.; Smith, D. L.; Zhang, G.; Shan, Q.; Platt, B.; Brandt, M. R.; Dawson, L. A.; Cole, D.; Bernotas, R.; Robichaud, A.; Rosenzweig-Lipson, S.; Beyer, Ch. E. **2008**, *33*, 1323-1335.
90. Mattsson, C.; Sonesson, C.; Sandahl, A.; Greiner, H. E.; Gassen, M.; Plaschke, J.; Leibrock, J.; Böttcher, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4230-4234.
91. Liu, K. G.; Lo, J. R.; Comery, T. A.; Zhang, G. M.; Zhang, J. Y.; Kowal, D. M.; Smith, D. L.; Di, L.; Kerns, E. H.; Schechter, L. E.; Robichaud, A. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1115-1117.

92. Lee, M.; Rangisetty, J. B.; Pullagurla, M. R.; Dukat, M.; Setola, V.; Roth, B. L.; Glennon, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1707-1711.
93. Codony, X.; Vela, J. M.; Ramírez, M. J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 94-100.
94. Sabbagh, M. N.; Shill, H. A. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2010**, *11* (1), 80-91.
95. Hostetler, G.; Dunn, D.; McKenna, B. A.; Kopec, K.; Chatterjee, S. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (6), 666-669.
96. Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441-5452.
97. Di Lucrezia, R.; Gilbert, I. H.; Floyd, Ch. D. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 249-253.
98. Taylor, E. C.; Thompson, M. J. *J. Org. Chem.* **1961**, *26* (12), 5224-5226.
99. Lee, M.; Ručil, T.; Heseck, D.; Oliver, A. G.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7757-7763.
100. McMaster, C.; Fülöpová, V.; Popa, I.; Grepl, M.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 221-224.
101. Messina, I.; Popa, I.; Maier, V.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 33-38.
102. Zajdel, P.; Marciniak, K.; Maślankiewicz, A.; Satała, G.; Duszyńska, B.; Bojarski, A. J.; Partyka, A.; Jastrzębska-Więsek, M.; Wróbel, D.; Wesółowska, A.; Pawłowski, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *20*, 1545-1556.
103. Benhamú, B.; Martín-Fontecha, M.; Vázquez-Villa, H.; Pardo, L.; López-Rodríguez, M. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7160-7181.
104. Cheng, Y.-Ch.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099-3108.
105. Vanda, D.; Jorda, R.; Lemrová, B.; Volná, T.; Kryštof, V.; McMaster, C.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 426-432.